

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200819004

曾颖, 黄爽秋, 廖金鑫, 等. 负载型纳米零价铁对蛋白核小球藻的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 170-180

Zeng Y, Huang S Q, Liao J X, et al. Toxicity of supported nanoscale zero-valent iron on green alga *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 170-180 (in Chinese)

## 负载型纳米零价铁对蛋白核小球藻的毒性研究

曾颖, 黄爽秋, 廖金鑫, 陈巧玲, 杜琼\*

中国药科大学工学院, 南京 211198

收稿日期: 2020-08-19 录用日期: 2020-11-10

**摘要:** 负载型纳米零价铁不仅能够克服单一纳米零价铁(nanoscale zero-valent iron, nZVI)不稳定、易团聚等缺点, 还能提高污染物的去除效率, 因此被认为是一类具有广泛应用前景的高效环境修复材料。然而, 纳米零价铁及其复合材料在应用过程中可进入环境, 对环境及生态系统存在潜在风险。因此, 为充分评估其应用对水环境的潜在危害, 本文以蛋白核小球藻为受试生物, 研究了负载型纳米零价铁(supported nanoscale zero-valent iron)D201-ZVI 的藻类毒性及其影响因素。结果表明, 负载型 D201-ZVI 可以显著降低 nZVI 生物毒性, 在 pH=6~10 的范围内毒性效应会随 pH 的增加而减弱, 共存污染物 Cr(VI)及磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMX)均会增加 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的生长抑制作用。D201-ZVI 在环境中的老化作用可以减弱其生物毒性, 且其毒性作用会随着暴露时间的延长而逐渐消失。D201-ZVI 是一种对生物及环境安全友好的新型材料。

**关键词:** 纳米零价铁; D201 树脂; 蛋白核小球藻; 生长抑制; 光合色素

文章编号: 1673-5897(2021)4-170-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Toxicity of Supported Nanoscale Zero-valent Iron on Green Alga *Chlorella pyrenoidosa*

Zeng Ying, Huang Shuangqiu, Liao Jinxin, Chen Qiaoling, Du Qiong\*

School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Received 19 August 2020 accepted 10 November 2020

**Abstract:** Nanoscale zero-valent iron loaded polymer-based composites (D201-ZVI) is regarded as a high-efficient material for environmental remediation. D201-ZVI dramatically overcomes disadvantages of agglomeration and unstable physicochemical property and significantly improves the pollutant removal efficiency, compared with nanoscale zero-valent iron (nZVI). However, the application of nZVI and its composites may pose potential risks to the environment and ecosystem. This study is aimed to assess these potential risks by using *Chlorella pyrenoidosa*. The algae toxicity and its influencing factors of D201-ZVI were also discussed. The results showed that D201-ZVI could significantly reduce the biological toxicity of bare ZVI. And its toxic effect could weaken with the increase of pH in the range from 6 to 10. The presence of the coexisting pollutants Cr(VI) and sulfamethoxazole (SMX) could increase its inhibition on *Chlorella pyrenoidosa*. The aging effect of D201-ZVI could weaken its biological toxicity,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21707166); 中央高校基本科研业务费专项(2632019ZD13); 大学生创新创业训练计划项目(202010316239)

第一作者: 曾颖(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境污染化学, E-mail: 1396650080@qq.com

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: duqiong116@163.com

and its toxic effect gradually disappeared with the extension of exposure time. In summary, we propose D201-ZVI as a green novel material that is safe and environmentally friendly to our ecosystem.

**Keywords:** nanoscale zero-valent iron; D201 resin; *Chlorella pyrenoidosa*; growth inhibition; photosynthetic pigments

负载型纳米零价铁是将纳米零价铁(nanoscale zero valent iron, nZVI)负载在多孔材料上的一种新型复合材料,与纳米零价铁相比具有更大的比表面积、更高的反应活性,并且能够改善纳米零价铁在实际污染环境中迁移能力弱、易钝化失活等局限性<sup>[1]</sup>。负载型材料由于其多孔及较好的吸附特性,不仅能够提高污染物的去除效率,而且对污染物具有一定的固定作用,从而降低反应产物的二次污染<sup>[2]</sup>。Zhu 等<sup>[3]</sup>成功地合成了生物炭负载磁性纳米零价铁(nZ-VI-BC),发现 nZVI-BC 能够有效去除 Pb(II)、Cd(II)、Cr(VI)、Cu(II)、Ni(II)和 Zn(II)等多种重金属,且复合材料显著提高了纳米零价铁的稳定性,这对解决重金属污染有一定的借鉴意义。Zhao 等<sup>[4]</sup>合成的沸石负载 PEG-4000 稳定纳米零价铁(PZ-NZVI)能够有效去除 2 种氟喹诺酮类抗生素诺氟沙星(norfloxacin, NOR)和氧氟沙星(ofloxacin, OFL)。

随着纳米材料的大量生产和广泛应用,它们不可避免地会被排放或泄漏到环境中,其尺寸较小且具有亲脂性,使得它们不仅可以通过沉降、迁移等方式扩散,而且可以通过食物链在生物体内进行累积、放大,最终对生态环境和人类造成危害<sup>[5]</sup>。目前已有研究表明,nZVI 对病毒、细菌、藻类、动植物以及微生物群落等都具有一定的毒性效应<sup>[6-9]</sup>。Lei 等<sup>[10]</sup>研究铁基纳米颗粒对绿藻的毒性效应及可能的毒性机制,发现铁基纳米颗粒会对绿藻生长产生抑制作用,毒性大小与其颗粒大小、晶体相有关,且提出毒性机制为氧化损伤和细胞的物理相互作用。

为了提高 nZVI 在环境修复中的应用潜力,发展负载型 nZVI,并对其进行毒性效应研究、生物安全评价就显得尤为重要。本研究以水生生态系统初级生产者——蛋白核小球藻为研究对象,考察树脂负载纳米零价铁(D201-ZVI)对蛋白核小球藻生长量、光合色素的影响,并改变暴露条件如溶液 pH、暴露时间、材料老化环境、材料处理污染物形成的复合物等,以明确不同暴露条件下,D201-ZVI 对蛋白核小球藻毒性的变化。研究结果可为负载型 nZVI 对环境的影响及其生物安全评估提供一定的实验依据和参考价值,也为负载型 nZVI 的进一步推广使用

提供参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与仪器

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、KBH<sub>4</sub> 等试剂均为分析纯,均购于中国国药有限公司。所用树脂为大孔强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂(型号 D201),均由杭州泳洲水处理科技有限公司提供。在使用前需分别用质量分数为 5% 的 NaOH 溶液、质量分数为 5% 的 HCl 溶液对树脂进行预处理以除去杂质。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。培养条件见 1.2.2。其中 BG-11 培养基配方如表 1 和表 2 所示。

| 表 1 BG-11 培养基配方                           |                                      |                                    |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Table 1 Components of BG-11 culture media |                                      |                                    |
| 序号                                        | 组分                                   | 含量/(g·L <sup>-1</sup> )            |
| Serial number                             | Component                            | Concentration/(g·L <sup>-1</sup> ) |
| 1                                         | NaNO <sub>3</sub>                    | 1.5000                             |
| 2                                         | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.0400                             |
| 3                                         | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.0750                             |
| 4                                         | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.0360                             |
| 5                                         | 柠檬酸 Citric acid                      | 0.0060                             |
| 6                                         | 柠檬酸铁铵<br>Ferric ammonium citrate     | 0.0060                             |
| 7                                         | EDTANa <sub>2</sub>                  | 0.0010                             |
| 8                                         | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>      | 0.0200                             |
| 9                                         | A5 微量元素溶液<br>A5 trace metal solution | 1 mL·L <sup>-1</sup>               |

| 表 2 A5 微量元素溶液的配方                               |                                                      |                                    |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Table 2 Formulation of A5 trace metal solution |                                                      |                                    |
| 序号                                             | 组分                                                   | 含量/(g·L <sup>-1</sup> )            |
| Serial number                                  | Component                                            | Concentration/(g·L <sup>-1</sup> ) |
| 1                                              | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2.8600                             |
| 2                                              | MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 1.8600                             |
| 3                                              | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.2200                             |
| 4                                              | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.3900                             |
| 5                                              | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 0.0800                             |
| 6                                              | Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.0500                             |

主要仪器: WFX-200 原子吸收分光光度计(瑞利分析仪器有限公司, 中国); UV-1800 紫外可见分光光度计(岛津, 日本); BSG-250 智能光照培养箱(博讯实业有限公司, 中国); BM2000 显微镜(贝朗科技有限公司, 中国); JEM-2100F 透射电子显微镜(日本电子公司); Smart Lab 9kW X 射线衍射仪(日本 Rigaku 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 D201-ZVI 的制备及表征

用离子交换-液相还原法制备 D201-ZVI<sup>[11]</sup>: 将预处理后的 D201 树脂加入到  $\text{FeCl}_4^-$  溶液( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{HCl}$ 、饱和  $\text{NaCl}$  和体积分数为 10% 的乙醇配制而成), 在  $25^\circ\text{C}$  恒温水浴中振荡, 使得溶液中的  $\text{FeCl}_4^-$  充分交换到阴离子树脂上, 过滤冲洗后, 用质量浓度为 0.9% 的  $\text{KBH}_4$  溶液还原得到负载型纳米零价铁 D201-ZVI, 其铁负载量为 10.0%。采用透射电子显微镜(TEM)和 X 射线衍射仪(XRD)对制备的 D201-ZVI 表征分析。

称取新鲜干燥的 0.050 g D201-ZVI 在空气中老化 24 h 得到空气老化材料 D201-ZVI-Air。同样称取新鲜干燥的 0.050 g D201-ZVI 在 50 mL 水中老化 24 h ( $25^\circ\text{C}$ 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 并将老化后的材料过滤至灭菌并烘干的锥形瓶中, 得到水中老化材料 D201-ZVI- $\text{H}_2\text{O}$ 。

### 1.2.2 蛋白核小球藻的实验室培养条件

在无菌条件下, 将生长至对数生长期、长势良好的蛋白核小球藻藻种接种至 BG-11 培养基中, 于 BSG-250 智能光照培养箱中培养, 培养温度为  $25.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 初始 pH 为 8.05, 光暗比为 12 h : 12 h, 光照强度为 3 000 lux, 每组设置 3 个平行, 每天摇瓶 3 ~ 5 次, 每次 2 ~ 3 min, 以防止藻细胞贴壁或沉淀, 并随机调换培养藻液的锥形瓶以保证实验藻种受光均匀。

### 1.2.3 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的毒性效应实验

将蛋白核小球藻分别暴露于 ZVI 含量为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 D201-ZVI 体系及同样浓度的 ZVI 体系中, 同时设置仅用 BG11 培养基培养蛋白核小球藻的实验组作为空白对照。按照 1.2.2 中的培养条件培养 24 h 并按照 1.2.6 和 1.2.7 测定各组藻的生长量及细胞色素含量。

### 1.2.4 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的生长抑制实验

按照藻类急性毒性试验方法进行藻类生长抑制实验<sup>[12]</sup>, 以确定 D201-ZVI 对蛋白核小球藻生长影

响的有效浓度。称取不同量的 D201-ZVI 于灭菌并烘干的锥形瓶中, 加入用新鲜的 BG-11 重新配制的藻液, 使藻细胞与材料混合体系中 D201-ZVI 的浓度分别为 0、100、250、500、1 000 和 2 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 各复合体系对应的 ZVI 含量分别为 0、10、25、50、100 和 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (注: 后续浓度均按复合材料中零价铁含量计)。每个浓度做 3 个平行样, 接入已进入对数生长期的蛋白核小球藻, 初始藻密度为  $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ , 放入光照培养箱内培养 24 h。根据藻细胞密度, 以比生长率为基础的抑制率公式<sup>[13]</sup>计算不同浓度 D201-ZVI 对藻细胞的抑制率。进而绘制剂量-效应曲线, 计算出 D201-ZVI 的 24 h 的半数效应浓度值( $\text{EC}_{50}$ )。

藻类比生长率(1)和生长抑制率(2)计算公式如下:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (1)$$

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $\mu_{i-j}$  为从  $i$  时到  $j$  时的比生长率;  $X_i$  为  $i$  时的藻细胞密度;  $X_j$  为  $j$  时的藻细胞密度;  $I_r$  为以比生长率为基础的抑制率;  $\mu_c$  为对照组各平行比生长率的平均值;  $\mu_T$  为实验组各平行的比生长率。

### 1.2.5 不同条件下 D201-ZVI 暴露实验

将蛋白核小球藻分别暴露于 ZVI 含量为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 D201-ZVI 体系中, 同时设置空白对照。改变溶液 pH 值、材料老化环境、暴露时间、共存污染物 Cr(VI) 和磺胺甲噁唑(SMX) 条件, 按照 1.2.2 中的培养条件培养 24 h 并按照 1.2.6 和 1.2.7 测定各组藻的生长量及细胞色素含量, 来研究不同条件对 D201-ZVI 毒性效应的影响。

### 1.2.6 蛋白核小球藻生长量的测定

取系列浓度梯度的藻液, 在光学显微镜下用血球计数板计算藻细胞数, 同时使用分光光度计在 680 nm 波长测定藻液的吸光度值( $\text{OD}_{680}$ ), 以吸光度值为纵坐标  $y$ , 单位体积藻细胞的个数为横坐标  $x$  ( $10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 建立两者之间的线性方程  $y = 0.055x + 0.008$ , 根据线性方程计算各体系藻密度, 其中粉状零价铁会影响藻细胞的吸光度值, 故需扣除仅含粉状零价铁与 BG-11 培养基混合体系的背景值。

### 1.2.7 光合色素含量的测定

取藻细胞与材料混合体系中的藻液经离心后取上清液, 分别在波长 665、649 和 470 nm 处测定吸光

值。用公式分别计算出叶绿素 *a* (chlorophyll *a*) 含量、叶绿素 *b* (chlorophyll *b*) 含量和胡萝卜素(carotenoid)含量<sup>[14-15]</sup>。

叶绿素 *a* (chlorophyll *a*) 含量:

$$C_a(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (13.95 \times A_{665}) - (6.88 \times A_{649})$$

叶绿素 *b* (chlorophyll *b*) 含量:

$$C_b(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (24.96 \times A_{649}) - (7.32 \times A_{665})$$

胡萝卜素(carotenoid)含量:

$$C_d(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (1\,000 \times A_{470}) - (2.05 \times C_a) - (114.8 \times C_b) / 245$$

### 1.3 数据分析

数据图使用软件 Origin 8.5 绘制,实验数据均为 3 个平行样的平均值±标准偏差。实验数据使用软件 SPSS 24 进行显著性差异分析,对藻密度、比生长率、生长抑制率和光合色素含量等进行单因素方差分析并进行多重比较,显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 D201-ZVI 的表征

D201-ZVI 的形貌用 TEM 表征分析的结果如图 1(a)和(b)所示,ZVI 具有纳米尺寸,并且分散在树脂载体上。图 1(c)和(d)为 D201-ZVI 与藻类接触前后的 XRD 图谱。图 1(c)为新制备的 D201-ZVI,仅在  $2\theta$  为  $44.6^\circ$  处观察到一个衍射峰,通过对照铁的标准卡,此峰对应的是  $\alpha\text{-Fe}^0$  的(110)晶面,判断纳米零价铁为  $\alpha\text{-Fe}^0$ 。从图 1(d)中可以看出,D201-ZVI 在水中与藻类接触 24 h 后, $44.6^\circ$  处的  $\text{Fe}^0$  特征峰消失,在  $30.2^\circ$ 、 $35.6^\circ$ 、 $43.2^\circ$ 、 $53.7^\circ$ 、 $57.2^\circ$  和  $62.9^\circ$  出现衍射峰,与  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  的标准卡 JCPDS 39-1346 匹配良好,表明 D201-ZVI 在水中与藻类接触过程中被氧化为  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。

### 2.2 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的毒性效应

图 2(a)显示了 D201-ZVI 和 ZVI 对蛋白核小球藻生长量的影响。如图 2(a)所示,ZVI 对蛋白核小球藻的抑制率显著高于 D201-ZVI( $P < 0.05$ ),且与对照组相比,2 个实验组的比生长率均显著降低( $P < 0.05$ ),其中 D201-ZVI 和 ZVI 组的比生长率为  $0.228 \text{ d}^{-1}$  和  $0.207 \text{ d}^{-1}$ ,分别是对照组的 93.78% 和 84.87%。图 2(b)显示了 D201-ZVI 和 ZVI 对蛋白核小球藻细胞光合色素含量的影响,由图 2(b)中可知,色素含量从高到低排序:空白组 < D201-ZVI 暴露组 < ZVI 暴露组。其中 D201-ZVI 暴露组的叶绿素 *a* 含量显著高于 ZVI 暴露组( $P < 0.05$ ),而其他光合色素含量这 2 个暴露组无明显差异( $P > 0.05$ )。

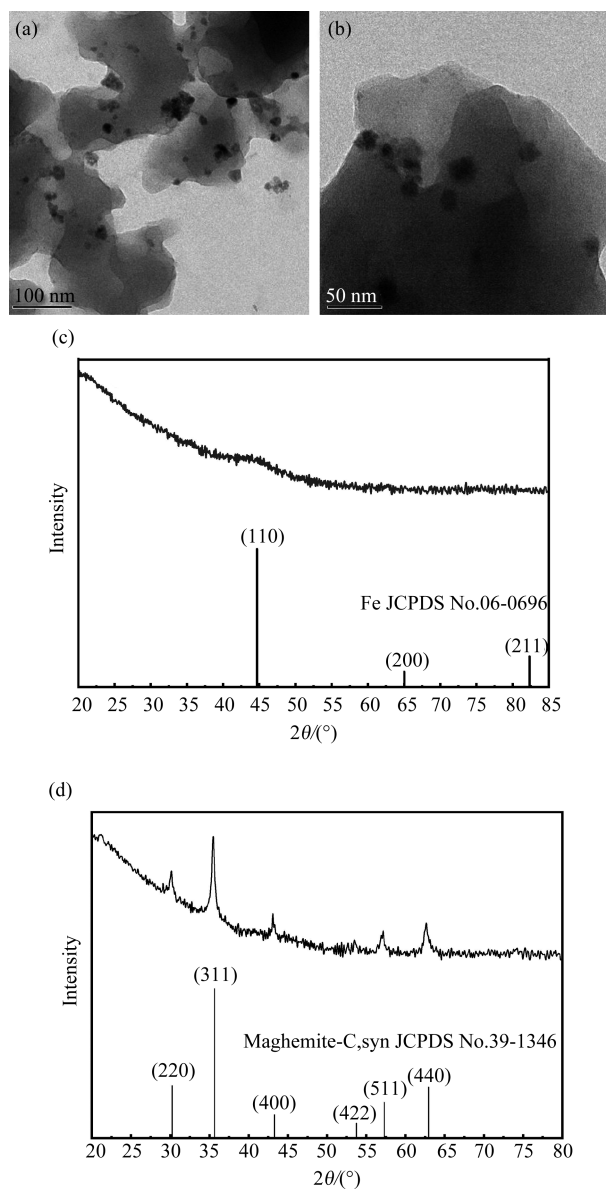


图 1 D201-ZVI 的 TEM 图(a)和(b);D201-ZVI 与小球藻接触前的 XRD 图谱(c); D201-ZVI 与小球藻接触后的 XRD 图谱(d)

Fig. 1 TEM images of D201-ZVI (a), (b); XRD patterns of D201-ZVI before contact with *Chlorella* (c) and XRD patterns of D201-ZVI after contact with *Chlorella* (d)

### 2.3 D201-ZVI 的毒性评价

D201-ZVI 对蛋白核小球藻的 24 h 生长抑制剂量-效应关系曲线如图 3(a)所示,对所得结果进行线性拟合如图 3(b)所示,所对应的拟合方程:  $I_r - 9.52329 + 5.55631 \times \ln C$ ,  $R^2 = 0.9926$ 。根据线性拟合方程计算抑制率为 50% 时对应的 D201-ZVI 浓度 ( $\text{EC}_{50}$  值)为  $4.49 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,这表示 D201-ZVI 短期内具有良好的生物安全性。

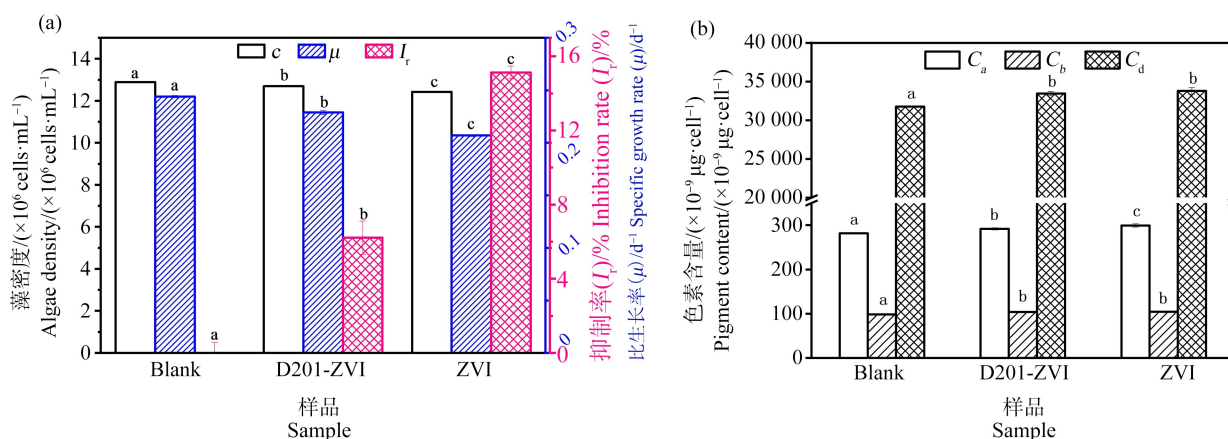


图 2 负载型纳米零价铁对蛋白核小球藻生长量 (a) 和色素含量 (b) 的影响

注: D201-ZVI 表示树脂负载纳米零价铁, ZVI 表示零价铁; 不同字母代表存在显著性差异 ( $P < 0.05$ );

$c$  表示藻密度,  $\mu$  表示比生长率,  $I_r$  表示抑制率,  $C_a$  表示叶绿素  $a$  含量,  $C_b$  表示叶绿素  $b$  含量,  $C_d$  表示胡萝卜素含量。

Fig. 2 Effect of loaded nano-zero iron on *Chlorella pyrenoidosa* growth (a) and pigment content (b)

Note: D201-ZVI stands for resin-supported nanoscale zero-valent iron; ZVI stands for zero-valent iron; different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ );  $c$  represents algae density;  $\mu$  represents specific growth rate;  $I_r$  represents inhibition rate;  $C_a$  represents chlorophyll  $a$  concentration;  $C_b$  represents chlorophyll  $b$  concentration;  $C_d$  represents carotenoid concentration.

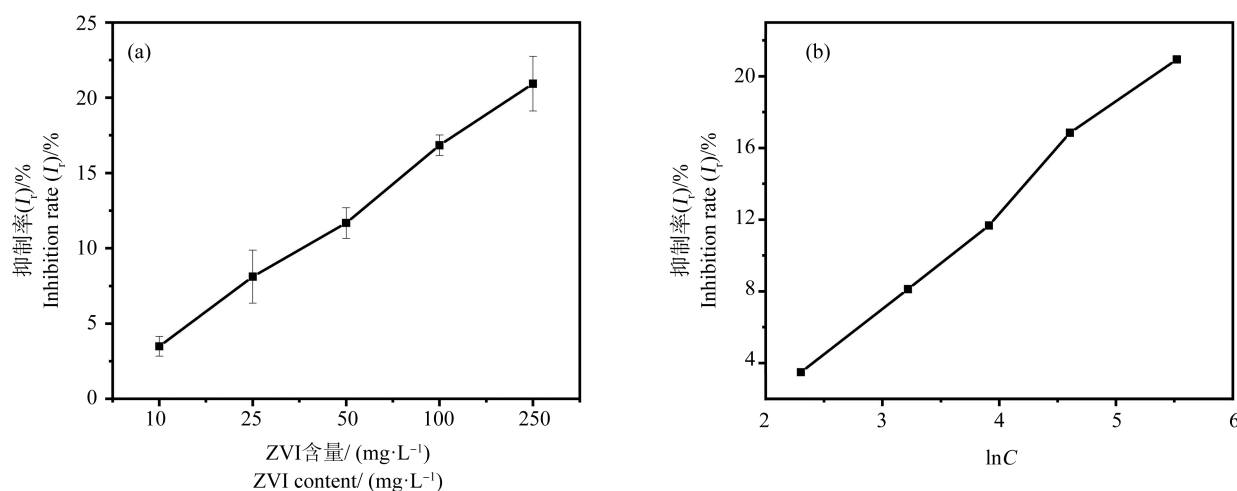


图 3 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的 24 h 生长抑制剂量效应关系曲线 (a) 及线性拟合 (b)

注: ZVI 含量代表投加的 D201-ZVI 中零价铁的含量。

Fig. 3 The curve of D201-ZVI content to inhibitory effect on *Chlorella pyrenoidosa* in 24 h (a) and its linear fitting (b)

Note: ZVI content stands for the content of zero-valent iron in D201-ZVI.

## 2.4 D201-ZVI 的藻类毒性效应影响因素

### 2.4.1 初始 pH 的影响

过酸或过碱的环境条件均不利于蛋白核小球藻的生长, 甚至使其表现为负增长或死亡。研究表明, 小球藻在 pH 为 5.5 ~ 11.5 的条件下可以生存<sup>[16-17]</sup>, 故本实验设置 pH 为 6、7、8、9 和 10。图 4 为不同初始 pH 对 D201-ZVI 暴露下蛋白核小球藻生长量的影响。如图 4 所示, 在 pH=6 ~ 10 的范围内, 空白组

中蛋白核小球藻的藻细胞密度随 pH 的增加而增加, 其中 pH=6 的酸性条件及 pH=7 的中性条件抑制蛋白核小球藻的生长, 而碱性条件 (pH=8、9 和 10) 则促进蛋白核小球藻的生长。在 D201-ZVI 暴露组中, pH 与 D201-ZVI 联合作用使 D201-ZVI 的存在依旧表现为抑制蛋白核小球藻的生长, 且其对蛋白核小球藻的抑制作用随 pH 的增加而减弱, 但相比于空白组, pH=6 的酸性条件下 D201-ZVI 暴露 24 h

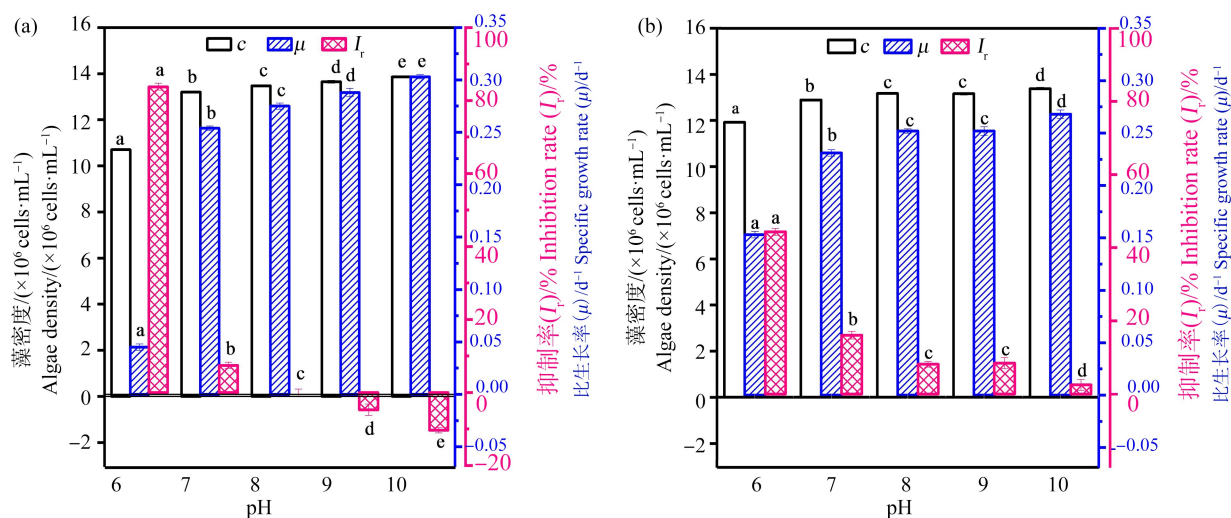


图4 初始 pH 对 D201-ZVI 藻类生长毒性效应的影响

注:(a)空白组;(b)D201-ZVI 组;不同字母代表存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 4 The effect of initial pH on toxicity of D201-ZVI on algae growth

Note: (a) blank group, (b) D201-ZVI group; different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

后的生长量高于对应空白组,而中性及碱性条件(pH=7、8、9 和 10)下则出现相反的情况。在初始 pH 分别为 6、7、8、9 和 10 时对应的 D201-ZVI 暴露组的比生长率分别为对应空白组的 342.93%、90.68%、91.89%、87.43% 和 88.40%,即在 pH=6 的酸性条件下,D201-ZVI 的存在促进蛋白核小球藻的生长;在中性及碱性条件(pH=7、8、9 和 10)下,D201-ZVI 表现为抑制蛋白核小球藻的生长。

不同初始 pH 条件下 D201-ZVI 对蛋白核小球藻细胞色素含量的影响如图 5 所示,空白组和 D201-ZVI 暴露组都表现出蛋白核小球藻的藻细胞色素含量基本随 pH 的增加而下降。在空白组中,pH=6 的酸性条件诱导小球藻细胞色素含量的增加,而中性及碱性条件(pH=7、8、9 和 10)下小球藻细胞色素含量并无显著差异( $P > 0.05$ )。相比于对应 pH 下的空白组,在 pH=6 的酸性条件下,D201-ZVI 的存在减缓了酸性 pH 对蛋白核小球藻细胞色素的诱导生成作用;而在中性及碱性条件(pH=7、8、9 和 10)下,D201-ZVI 的存在则诱导蛋白核小球藻细胞色素含量的增加。

#### 2.4.2 老化作用的影响

老化作用对 D201-ZVI 藻类生长毒性效应和色素含量的影响如图 6 所示。D201-ZVI 在空气及水中老化 24 h 后,其对蛋白核小球藻生长量的影响如图 6(a)所示。由图 6(a)可知,比生长率大小:D201-ZVI-H<sub>2</sub>O > 空白组 > D201-ZVI-Air > D201-ZVI。

D201-ZVI、D201-ZVI-Air 和 D201-ZVI-H<sub>2</sub>O 的比生长率分别为空白组的 87.72%、94.89% 和 102.62%。即 D201-ZVI 在空气及水中的老化均在一定程度上减缓了新鲜制备的 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的生长抑制作用。并且水中老化 24 h 的 D201-ZVI 甚至对蛋白核小球藻的生长起轻微促进作用。不同老化条件下 D201-ZVI 对蛋白核小球藻细胞色素含量的影响如图 6(b)所示。由图 6(b)可知,3 种光合色素含量变化具有相同的趋势,色素含量高低顺序为: D201-ZVI-H<sub>2</sub>O  $\approx$  空白组 < D201-ZVI-Air < D201-ZVI。对比蛋白核小球藻的生长情况可知,对蛋白核小球藻生长抑制作用越强的暴露组对藻细胞光合色素的诱导作用越强。

#### 2.4.3 共存污染物的影响

##### 2.4.3.1 无机污染物 Cr(VI)

D201-ZVI 去除 Cr(VI)后形成的复合物对蛋白核小球藻生长量和色素含量的影响如图 7(a)所示,未使用的 D201-ZVI、D201-ZVI 与 50 mg·L $^{-1}$  的 Cr(VI)反应 24 h 的复合产物暴露组(记为 D201-ZVI-Cr(VI)-C50)的比生长率分别为空白组的 87.72% 和 56.40%,即去除 Cr(VI)后的 D201-ZVI 显著增加了 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的生长抑制作用。图 7(b)展示了结合 Cr(VI)的 D201-ZVI 对蛋白核小球藻细胞光合色素含量的影响,D201-ZVI 的存在诱导小球藻细胞光合色素含量的增加,而共存污染物 Cr(VI)的存在则显著降低了蛋白核小球藻的光合色素含量。

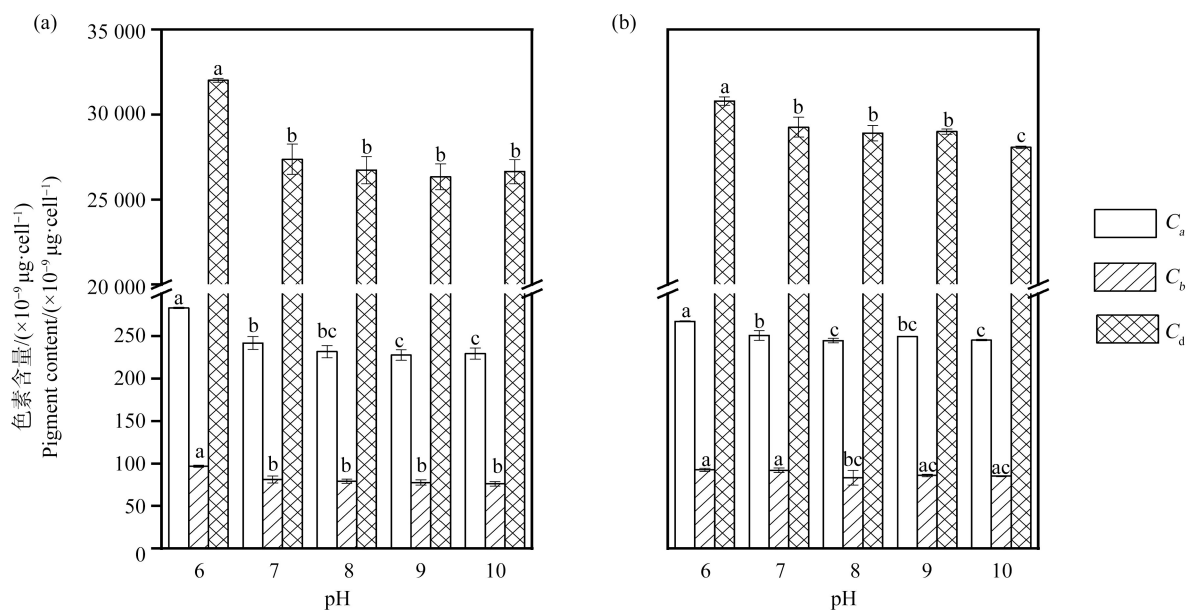


图 5 初始 pH 对 D201-ZVI 藻类毒性效应的影响(色素含量变化)

注:(a)空白组,(b)D201-ZVI 组;不同字母代表存在显著性差异( $P<0.05$ )。

Fig. 5 Effects of initial pH on algal toxicity of D201-ZVI (change of pigment content)

Note: (a) blank group, (b) D201-ZVI group; different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

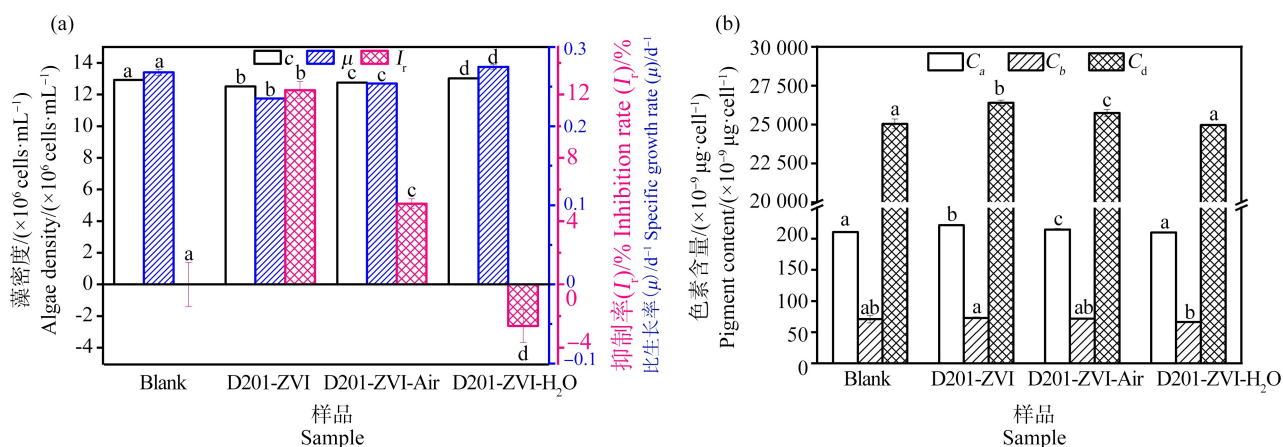


图 6 老化作用对 D201-ZVI 藻类生长毒性效应 (a) 和色素含量 (b) 的影响

注:不同字母代表存在显著性差异( $P<0.05$ )。

Fig. 6 Effects of aging on algae toxicity of D201-ZVI on growth (a) and pigment content (b)

Note: Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

#### 2.4.3.2 有机污染物 SMX

图 8 展示了 D201-ZVI 去除 SMX 后形成的复合物对蛋白核小球藻生长量和色素含量的影响。由图 8 (a) 可知,未使用的 D201-ZVI、D201-ZVI 与  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 SMX 反应 24 h 的复合产物暴露组(记为 D201-ZVI-SMX-C50)的比生长率分别为空白组的 89.87% 和 84.58%,即 D201-ZVI-SMX-C50 复合体系增加了 D201-ZVI 对蛋白核小球藻的生长抑

制作用。结合 SMX 的 D201-ZVI 对蛋白核小球藻细胞光合色素含量的影响如图 8(b)所示,D201-ZVI 的存在诱导小球藻细胞光合色素含量的增加,而共存污染物 SMX 的存在则显著降低了蛋白核小球藻的光合色素含量。

#### 2.4.4 暴露时间的影响

暴露时间对蛋白核小球藻生长量的影响如图 9 (a)所示,在前 16 d 时 D201-ZVI 表现为对蛋白核小

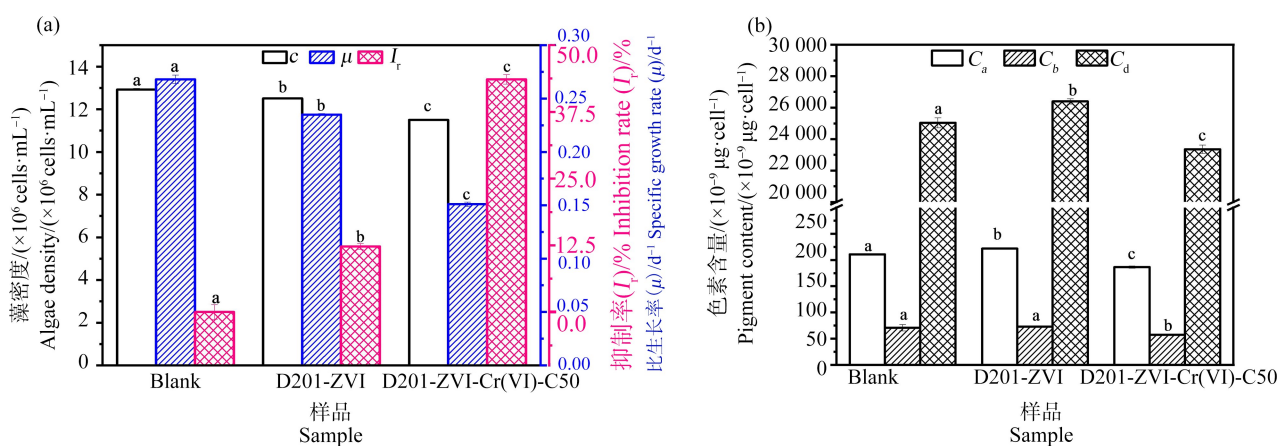


图7 共存污染物(Cr(VI))对D201-ZVI藻类生长毒性效应(a)和色素含量(b)的影响

注:不同字母代表存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 7 Effects of coexisting pollutants (Cr(VI)) on algae toxicity of D201-ZVI on growth (a) and pigment content (b)

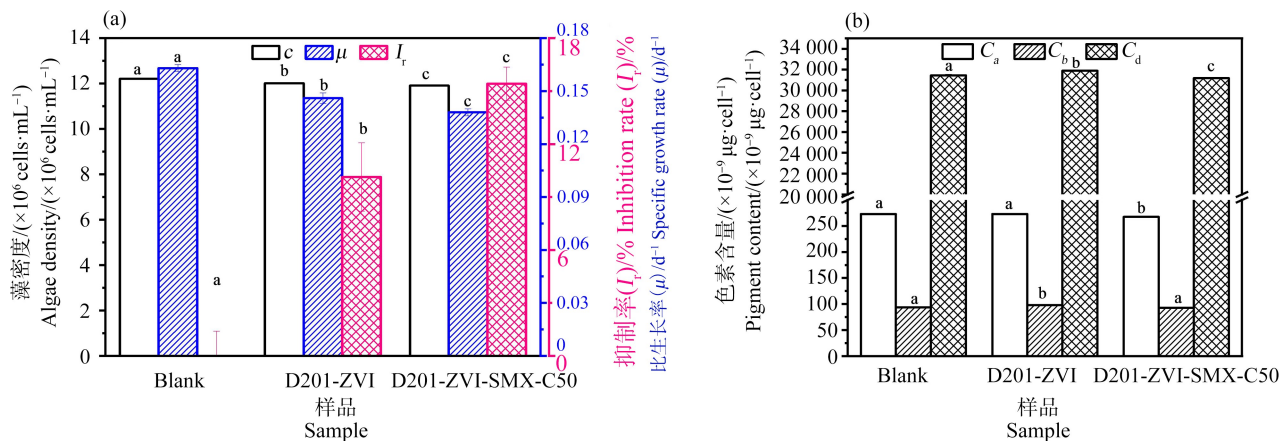
Note: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图8 共存污染物(SMX)对D201-ZVI藻类生长毒性效应(a)和色素含量(b)的影响

注:SMX表示磺胺甲噁唑;不同字母代表存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 8 Effects of coexisting pollutants (SMX) on algae toxicity of D201-ZVI on growth (a) and pigment content (b)

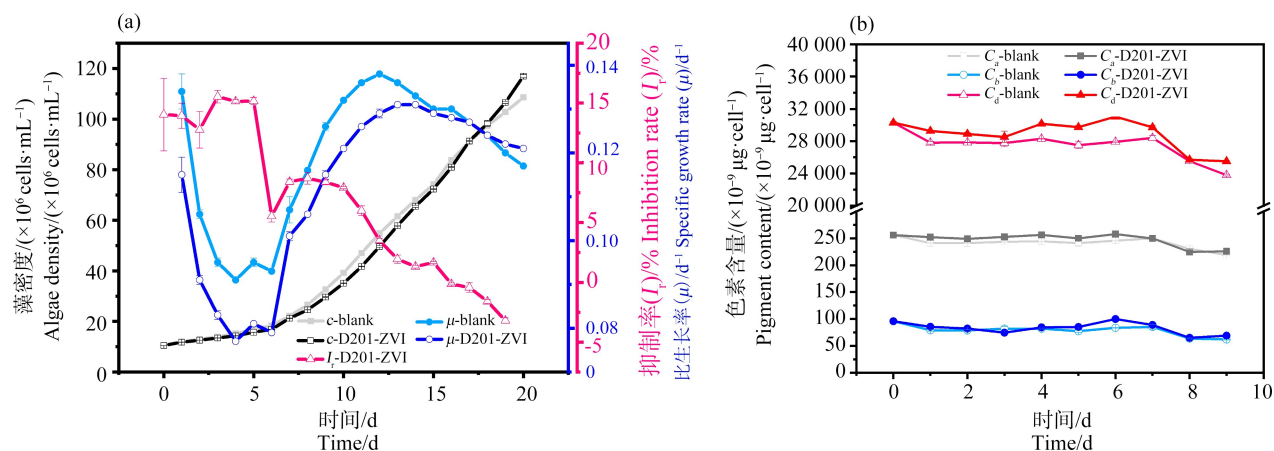
Note: SMX stands for sulfamethoxazole; different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图9 暴露时间对D201-ZVI藻类生长毒性效应(a)和色素含量(b)的影响

注:不同字母代表存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 9 Effects of exposure time on algae toxicity of D201-ZVI on growth (a) and pigment content (b)

Note: Different letters indicate significant difference.

球藻的抑制作用,第17天开始表现为促进作用。也就是说,D201-ZVI的毒性作用会随着时间的延长而逐渐消失。随着暴露时间延长D201-ZVI对蛋白核小球藻细胞光合色素含量的影响如图9(b)所示,D201-ZVI暴露组的色素含量基本在空白组之上,这也可以说明D201-ZVI的毒性作用会随着时间的延长而逐渐消失。

### 3 讨论(Discussion)

有研究表明,纳米零价铁由于尺寸较小、容易团聚从而会对生物造成影响<sup>[18]</sup>。本研究发现,D201-ZVI对蛋白核小球藻的抑制率要显著低于ZVI(图2(a)),即ZVI负载后显著降低其生物毒性。这与王菁姣和陈家玮<sup>[6]</sup>的实验结果一致。一方面可能是由于D201-ZVI具有空间效应可以阻止纳米颗粒与蛋白核小球藻的直接接触,从而降低了ZVI生物毒性<sup>[6]</sup>。另一方面,D201-ZVI中的ZVI在载体中稳定存在,减少了ZVI团聚从而降低了ZVI生物毒性<sup>[19]</sup>。从光合色素指标来看,D201-ZVI和ZVI暴露组的色素含量均大于空白组(图2(b))。可能是因为D201-ZVI及ZVI会释放微量Fe,从而被藻细胞吸收用于合成叶绿素<sup>[20-22]</sup>,故使蛋白核小球藻光合色素增加。本研究还得到D201-ZVI的 $EC_{50}$ 值为 $4.49 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $EC_{50}$ 值反映的是引起50%最大效应的浓度,评价毒物安全性时其值越大越安全<sup>[23]</sup>,这表明D201-ZVI急性毒性极其微小。研究还显示,D201-ZVI的毒性效应会随其暴露时间的延长而逐渐减弱,甚至消失(图9(a)),进一步说明D201-ZVI具有良好的生物安全性。

D201-ZVI在环境中可能会转化为铁氧化物、铁氢氧化物或在酸性条件下转化为铁离子等,其潜在毒性也不容忽视。本研究发现,不同初始pH条件下D201-ZVI对蛋白核小球藻的毒性效应是溶液pH效应与D201-ZVI联合作用的结果。酸性条件下,pH的抑制作用占主导,D201-ZVI的促进作用表现为减缓酸性pH对蛋白核小球藻的抑制作用;碱性条件下,D201-ZVI的抑制作用占主导,碱性pH的促进作用表现为减缓D201-ZVI对蛋白核小球藻的抑制作用。同时本研究显示,pH=6~10条件下,空白组和D201-ZVI暴露组中蛋白核小球藻的藻细胞色素含量基本随pH的增加而下降,可能是酸性条件有利于藻类光合量子的生成<sup>[24]</sup>。通过检测有无D201-ZVI暴露的藻液,发现光照培养后的D201-

ZVI暴露组和对照组(仅有BG-11培养基和藻液)的上清液中均未检测到铁离子的存在。这表明,D201-ZVI在本实验暴露过程中没有铁溶出,或者仅有微量的铁溶出,随即被蛋白核小球藻吸收。也就是说,本实验中铁离子的溶出并非D201-ZVI对蛋白核小球藻的主要毒性机理,其毒性机制可能是由于D201-ZVI材料引起的物理损伤、遮光效应和活性氧物质诱导的氧化损伤等。雷铤<sup>[25]</sup>研究,nZVI在不同水环境老化后均可降低其对蛋白核小球藻的生物毒性。本研究显示D201-ZVI在空气及水中的老化能够减弱新鲜D201-ZVI对蛋白核小球藻的生长抑制作用,这表明D201-ZVI在环境中的老化作用可以减弱其生物毒性。可能是由于老化过程中,nZVI表面转化为无毒或低毒的钝化层(图1(d)),阻碍了纳米材料与受试生物的接触,缓解其毒性<sup>[25-26]</sup>。

D201-ZVI对有机及无机污染物均具有良好的去除效果<sup>[11,27]</sup>,去除污染物后的复合材料本身吸附的污染物及其产物等在环境中可能造成二次污染,且对生物可能产生一定复合毒性<sup>[28]</sup>。本研究发现,去除污染物Cr(VI)及SMX后的复合物D201-ZVI-Cr(VI)-C50和D201-ZVI-SMX-C50均会增加D201-ZVI对蛋白核小球藻的抑制作用,同时显著降低蛋白核小球藻的光合色素含量。因而,利用纳米材料处理污染物时应考虑潜在的复合毒性。

综上所述,本研究制备的负载型D201-ZVI可以显著降低ZVI的生物毒性,其急性毒性极其微小( $EC_{50}=4.49 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),且毒性作用会随暴露时间的延长而逐渐减弱,甚至消失。在pH=6~10范围内毒性效应随pH的增加而减弱。D201-ZVI去除Cr(VI)和SMX后形成的复合物均会增强其对蛋白核小球藻的生长抑制作用。D201-ZVI在空气及水中的老化作用会降低其生物毒性。D201-ZVI本身对生物安全友好,但同时应注意及时回收使用后的D201-ZVI以减少二次污染对生物及环境的影响。

通讯作者简介:杜琼(1984—),女,博士,讲师,主要研究方向为环境污染化学。

### 参考文献(References):

- [1] Fang Y, Wen J, Zeng G M, et al. From nZVI to SNCs: Development of a better material for pollutant removal in water [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(7): 6175-6195
- [2] 杨晓丹, 王玉如, 李敏睿. 纳米零价铁的制备、改性及

- 对废水中重金属和有机污染物的去除[J]. 化工进展, 2019, 38(7): 3412-3424
- Yang X D, Wang Y R, Li M R. Preparation, modification of nanoscale zero valent iron and its application for the removal of heavy metals and organic pollutants from wastewater [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2019, 38(7): 3412-3424 (in Chinese)
- [3] Zhu S, Ho S H, Huang X, et al. Magnetic nanoscale zero-valent iron assisted biochar: Interfacial chemical behaviors and heavy metals remediation performance [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5 (11): 9673-9682
- [4] Zhao J, Yang X, Liang G W, et al. Effective removal of two fluoroquinolone antibiotics by PEG-4000 stabilized nanoscale zero-valent iron supported onto zeolite (PZ-NZ-VI) [J]. Science of the Total Environment, 2020, 710: 136289
- [5] 苗令占, 王沛芳, 侯俊, 等. 金属纳米材料对不同微生物聚集体的毒性研究进展[J]. 水资源保护, 2019, 35(1): 73-78, 94
- Miao L Z, Wang P F, Hou J, et al. Research progress on toxicity of metallic nanomaterials to different microbial aggregates [J]. Water Resources Protection, 2019, 35(1): 73-78, 94 (in Chinese)
- [6] 王菁姣, 陈家玮. 不同种类纳米零价铁的毒性比较研究[J]. 现代地质, 2012, 26(5): 926-931
- Wang J J, Chen J W. Comparison study on toxicity of different nanoscale zero-valent iron [J]. Geoscience, 2012, 26 (5): 926-931 (in Chinese)
- [7] 孙馨, 王雅楠, 王薇, 等. 水中纳米零价铁在斑马鱼体内的生物富集和组织病理学研究[J]. 安全与环境学报, 2016, 16(3): 371-377
- Sun X, Wang Y N, Wang W, et al. Bioaccumulation and histopathology research of nano-scale zero-valent iron on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Safety and Environment, 2016, 16(3): 371-377 (in Chinese)
- [8] 王学, 李勇超, 李铁龙, 等. 零价纳米铁对大肠杆菌的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(1): 49-56
- Wang X, Li Y C, Li T L, et al. Toxicity effects of nano-Fe<sup>0</sup> on *Escherichia coli* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(1): 49-56 (in Chinese)
- [9] Marsalek B, Jancula D, Marsalkova E, et al. Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(4): 2316-2323
- [10] Lei C, Zhang L Q, Yang K, et al. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging [J]. Environmental Pollution, 2016, 218: 505-512
- [11] Wang Y, Song Y Q, Shi C F, et al. Performance and mechanism of Cr (VI) removal by resin-supported nanoscale zero-valent iron (nZVI): Role of nZVI distribution [J]. Desalination and Water Treatment, 2019, 166: 344-352
- [12] 梁长华. 纳米 NiO 对小球藻的生物毒性及致毒机制研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2010: 28-29
- Liang C H. Research on biotoxicity and toxic mechanism of NiO nanoparticles on *Chlorella vulgaris* [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2010: 28-29 (in Chinese)
- [13] 陈薇. 金属有机骨架材料抑制藻细胞生长效果及机理研究[D]. 福州: 福州大学, 2018: 22-23
- Chen W. The effect and mechanisms of metal organic frameworks on inhibiting the growth of harmful algae [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2018: 22-23 (in Chinese)
- [14] Huang L, Lu Y Y, Gao X, et al. Ammonium-induced oxidative stress on plant growth and antioxidative response of duckweed (*Lemna minor* L.) [J]. Ecological Engineering, 2013, 58: 355-362
- [15] Kumar M, Lee S C, Kim J Y, et al. Over-expression of dehydrin gene, OsDhn1, improves drought and salt stress tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Plant Biology, 2014, 57(6): 383-393
- [16] 张奇, 曹英昆, 邢泽宇, 等. pH、盐度对小球藻生长量和溶氧量的影响[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(11): 83-86
- Zhang Q, Cao Y K, Xing Z Y, et al. Effects of pH and salinity on growth and dissolution of *Chlorella vulgaris* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(11): 83-86 (in Chinese)
- [17] 吕梦梦. 普通小球藻培养过程中 pH 条件优化的实验研究[D]. 天津: 天津大学, 2013: 31-43
- Lv M M. Experimental studies on the optimization of pH conditions during *Chlorella vulgaris* culture process [D]. Tianjin: Tianjin University, 2013: 31-43 (in Chinese)
- [18] Bhattacharya K, Hoffmann E, Schins R F P, et al. Comparison of micro- and nanoscale Fe<sup>3+</sup>-containing (hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells *in vitro* [J]. Toxicological Sciences, 2012, 126 (1): 173-182
- [19] 徐莺莺, 林晓影, 陈春英. 影响纳米材料毒性的关键因素[J]. 科学通报, 2013, 58(24): 2466-2478
- Xu Y Y, Lin X Y, Chen C Y. Key factors influencing the toxicity of nanomaterials [J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(24): 2466-2478 (in Chinese)
- [20] 石清. 纳米三氧化二铁对藻类的毒性效应及生态风险研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2019: 27-28

- Shi Q. Toxic effects of nano-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on algae and ecological risk assessment [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2019: 27-28 (in Chinese)
- [21] 李雅洁, 王静, 崔益斌, 等. 纳米氧化锌和二氧化钛对斜生栅藻的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(6): 1122-1127
- Li Y J, Wang J, Cui Y B, et al. Ecotoxicological effects of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on microalgae *Scenedesmus obliquus* [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(6): 1122-1127 (in Chinese)
- [22] 邹安琪, 赵伟华, 李青云, 等. 典型污染物对藻类生态毒性效应研究进展[J]. 长江科学院院报, 2015, 32(6): 100-109
- Kuai A Q, Zhao W H, Li Q Y, et al. Research advances in ecotoxicological effects of typical pollutants on algae [J]. Journal of Yangtze River Scientific Research Institute, 2015, 32(6): 100-109 (in Chinese)
- [23] 袁媛, 邱霞. 急性毒性试验研究进展[J]. 海军医学杂志, 2013, 34(5): 360-361
- [24] Chen S, Beardall J, Gao K. A red tide alga grown under ocean acidification upregulates its tolerance to lower pH by increasing its photophysiological functions [J]. Biogeosciences, 2014, 11(17): 4829-4837
- [25] 雷铖. 铁基纳米材料对水中有机污染物的去除作用及藻类毒性效应[D]. 杭州: 浙江大学, 2019: 105-110
- Lei C. Organic contaminants removal and algal toxicity of iron-based nanomaterials [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019: 105-110 (in Chinese)
- [26] Dong H R, Xie Y K, Zeng G M, et al. The dual effects of carboxymethyl cellulose on the colloidal stability and toxicity of nanoscale zero-valent iron [J]. Chemosphere, 2016, 144: 1682-1689
- [27] Tai C, She J P, Yin Y G, et al. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol using hydrogen peroxide catalyzed by nanoscale zero-valent iron supported on ion exchange resin [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2016, 16(6): 5850-5855
- [28] Fajardo C, Gil-Díaz M, Costa G, et al. Residual impact of aged nZVI on heavy metal-polluted soils [J]. Science of the Total Environment, 2015, 535: 79-84 ◆