

纳米氧化铜对白菜种子发芽的毒害作用研究

向 垒¹, 莫测辉^{1*}, 卢锡洪², 吴小莲¹, 李彦文¹, 黄献培¹, 屈相龙¹, 郝 艳¹,
黄韵怡¹

(1.暨南大学环境工程系, 广东省高校水土环境毒害性污染防治与生物修复重点实验室, 广州 510632; 2.中山大学化学与化学工程学院, 广东高校环境与能源化学重点实验室, 广州 510275)

摘 要:纳米材料的生态毒性问题越来越受到人们的广泛关注。本文探讨了纳米氧化铜(22~75 nm, 平均 43 nm)对白菜种子发芽的影响,并以微米氧化铜和铜离子(Cu^{2+})进行对比分析。结果表明,各浓度处理(0.2、0.5、1、2、4、8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)纳米氧化铜对白菜种子发芽率与对照相比均无显著差异($P>0.05$),但在较低浓度下(0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对根伸长和芽伸长即表现出抑制作用。随着纳米氧化铜浓度增加,对根伸长抑制率显著提高,对芽伸长抑制率则缓慢提高,其半抑制浓度(IC_{50})分别为 11.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1 309.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,微米氧化铜对白菜根、芽伸长的抑制率都小于 20%,其毒性小于纳米氧化铜;但纳米氧化铜的毒性并非其溶解出的铜离子所致。

关键词:纳米颗粒;氧化铜;种子发芽;毒性;白菜

中图分类号:X503.231 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)09-1830-06

Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles to the Seed Germination of Chinese Cabbage

XIANG Lei¹, MO Ce-hui^{1*}, LU Xi-hong², WU Xiao-lian¹, LI Yan-wen¹, HUANG Xian-pei¹, QU Xiang-long¹, HAO Yan¹, HUANG Yun-yi¹

(1.Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation of Guangdong Higher Education Institutions, Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2.Key Laboratory of Environment and Energy Chemistry of Guangdong Higher Education Institutes, School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275; China)

Abstract: Eco-toxicity of nanomaterials was subject to more and more attention recently. The toxicity of copper oxide nanoparticles (22~75 nm, the average 43 nm) to seed germination of Chinese cabbage was investigated, and the counterpart investigation of copper oxide micron particle and copper ions were compared. The results showed that the effect of copper oxide nanoparticles within the concentrations of 0.2, 0.5, 1, 2, 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ on seed germination rate of Chinese cabbage showed no significant difference compared with control ($P>0.05$), but the inhibition of root elongation and shoot elongation was observed in lower concentrations. With the increasing concentrations of copper oxide nanoparticles, inhibition rate increased significantly for root elongation but slowly for shoot elongation, with half-inhibitory concentration (IC_{50}) of 11.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1 309.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The toxicity of copper oxide nanoparticles was stronger than that of copper oxide micron particle. However the copper ion (Cu^{2+} , 0.22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dissolved from 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of copper oxide nanoparticles contributed to the inhibition only 4.6% for root elongation and almost zero for shoot elongation.

Keywords: nanoparticles; copper oxide; seed germination; toxicity; Chinese cabbage

纳米材料是指任何一维几何尺寸处于纳米尺度(1~100 nm)、并具有特殊性能的材料^[1-3]。由于其尺度

和结构方面的特点,纳米材料具有优越的磁性、电导性、反应活性和光学性质等特点^[4],因而广泛应用于电子、医药、食品、纺织、化工、军事、航空航天等各种行业^[5],最近几年其产量将超过几百万 $\text{t}\cdot\text{a}^{-1}$,全球市场可达 1 000 亿美元 $\cdot\text{a}^{-1}$ ^[5]。

流行病学研究表明,大气细颗粒物尤其纳米级超细颗粒物的浓度与呼吸系统疾病发病率特别是肺癌死亡率呈正相关^[6]。随着纳米材料的大规模生产和使用,不可避免地不断进入环境中,并发生复杂的迁移

收稿日期:2011-05-12

基金项目:国家自然科学基金项目(41071211);广东省科技计划项目(2010B020311006);广东省高校高层次人才项目;广州市科技计划项目(10A82070466);暨南大学第七批本科生科技创新工程项目(CX11021)

作者简介:向 垒(1987—),男,硕士生,研究方向为土壤污染与修复,
E-mail: wuxian622622@163.com

* 通讯联系人:莫测辉 E-mail: tchmo@jnu.edu.cn

转化、环境行为和生态效应,给生态环境带来难以预料的影响^[7-17],甚至可能通过各种途径危害人体健康。2003年以来国际顶级刊物 Science、Nature 等发表文章呼吁加强纳米材料的环境行为与生态效应的研究工作^[7-8],该研究领域越来越受到人们的关注和重视^[9-17]。研究表明,富勒烯、碳纳米管和纳米金属氧化物等纳米材料会增加靶目标活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)的产生^[18],同时提高氧化压力(oxidative stress, OS),对细菌、藻类、脊椎动物、人体细胞等造成严重毒害^[9-10,12,19]。但关于纳米材料对陆生植物特别是农作物的植物毒性目前还鲜见研究报道^[4,10]。

纳米氧化铜是一种重要的纳米材料,由于其良好的导电、导热和抗菌等性能,被作为涂覆材料、催化剂、润滑剂、杀菌剂等广泛应用于电子、化工、机械、农业等行业^[14]。白菜是我国重要的经济作物之一,属于 EPA 推荐的广泛用于生态毒性评价的高等植物^[20]。种子发芽和幼苗生长是评估污染物植物毒性的重要参数^[21],因此,本文选择纳米氧化铜为研究对象,研究其对白菜种子发芽和幼苗生长的影响,并以微米氧化铜和铜离子(Cu^{2+})作为对照进行对比分析,初步揭示其植物毒性的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料:供试白菜品种为广泛种植于华南地区的交配白菜,种子购自广州长合种子有限公司,发芽率为95%。纳米氧化铜(CuO)购自阿法埃莎(天津)化学有限公司,纯度 $\geq 99.5\%$,经扫描电镜测定,其形态为椭球状(图1a),粒径为22~75 nm(平均43 nm),比

表面积为 $25\sim 40\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$;微米氧化铜($\text{CuO}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$)为分析纯,购自广州化学试剂厂,经扫描电镜测定粒径为 $0.98\sim 8\text{ }\mu\text{m}$ (平均 $2.6\text{ }\mu\text{m}$),形态有椭球形、块状、团聚体等(图1b)。硫酸铜($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$)分析纯,购自广州化学试剂厂。

主要仪器及试剂:直径9 cm 的玻璃培养皿,光照培养箱(PYX-300G-B,科力仪器),岛津 AA7700 原子吸收光谱仪,KQ-250E 型超声波仪(昆山超声仪器有限公司),HC-3018R 型高速离心机(科大创新股份有限公司),场发射扫描电镜(日本电子株式会社 JSM-6330F); $30\%\text{H}_2\text{O}_2$ (分析纯),实验所用水均为高纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 污染溶液(悬浮液)制备

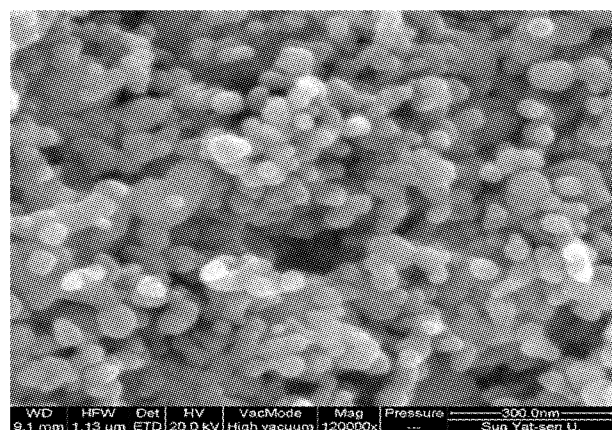
将纳米氧化铜和微米氧化铜粉末加入高纯水中,经过超声(100 W,40 kHz)使其均匀分散悬浮于高纯水中形成悬浮溶液备用,使用前再用玻棒搅拌1 min。铜离子(Cu^{2+})溶液由 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于高纯水制备。

1.2.2 纳米氧化铜和微米氧化铜悬浮液中铜离子(Cu^{2+})含量测定

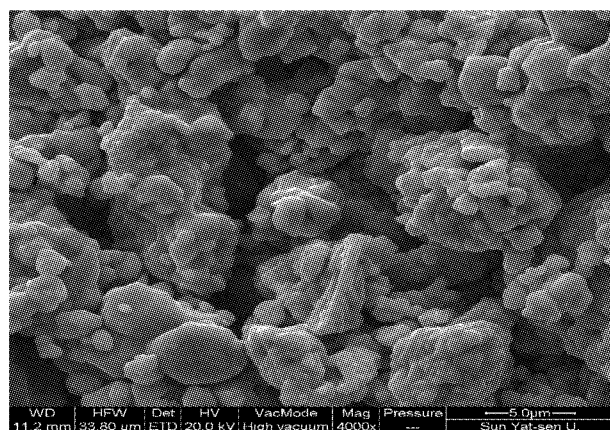
将制备的纳米氧化铜和微米氧化铜悬浮溶液在3 000 g 重力加速度的条件下离心1 h,后过 $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,用火焰原子吸收光谱仪测定溶出的铜离子(包括自由铜离子、羟基络合铜离子等)浓度。

1.2.3 预实验

将处理浓度为0、1、10、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纳米氧化铜悬浮液各5 mL 分别置于内径为9 cm、铺有滤纸的培养皿中,每个处理3个重复,分别接入经挑选和消毒(10%双氧水10 min)的白菜种子各20粒,盖好玻璃培养皿,置于恒温培养箱中 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 避光培养。种子露白



a.纳米氧化铜



b.微米氧化铜

图1 纳米氧化铜和微米氧化铜的扫描电镜图片

Figure 1 SEM image of nano-CuO and micro-sized-CuO

即认为其发芽^[10], 当对照组种子发芽率>90%、根长大于 20 mm 时, 实验结束, 并计算纳米氧化铜对种子根伸长和芽伸长的抑制率为 50% 和 10% 的浓度 (IC_{50} 、 IC_{10}), 计算公式为 $(A-B)/A \times 100\%$, 其中 A 为对照处理根伸长或芽伸长, mm; B 为污染处理根伸长或芽伸长, mm。

1.2.4 正式实验

根据预备实验结果, 在纳米氧化铜对白菜种子根伸长抑制率 10%~50% 范围内, 设置其 6 个浓度处理 (0.2、0.5、1、2、4、8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时对微米氧化铜和铜离子也设置 6 个相同的浓度处理进行对比研究, 每个处理均设 3 个重复。在与预备试验相同条件下进行白菜种子发芽实验。实验结束时, 测定各处理种子的发芽率、根伸长和芽伸长 (以胚轴与根之间的过度点区分根伸长和芽伸长^[21])。计算根伸长和芽伸长的平均值及标准偏差。以浓度-抑制率绘制曲线, 进行回归分析, 并根据回归方程计算污染物对根伸长和芽伸长抑制率为 10% 的浓度 (IC_{10}) 和 50% 的浓度 (IC_{50}), 其中把 IC_{10} 值作为引起植物受害的阈值, 其值越小说明污染物越易产生毒害; 把 IC_{50} 值作为评价污染物毒性大小的关键值, 其值越小, 毒性越大^[23]。

1.3 数据分析

采用 SPSS13.0 对数据进行方差分析、回归分析和多重比较分析 (LSD), 同时计算出 IC_{10} 值和 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 纳米氧化铜对白菜种子发芽的影响

在实验浓度范围内, 各浓度纳米氧化铜处理对白菜种子发芽率 (85%~100%) 与对照处理 (高纯水) 相比均无显著差异 ($P>0.05$)。这主要是因为种子在发芽前有种皮保护, 而种皮具有选择透过性, 可以减少污染物对于种子的毒害, 所以只有受到严重污染时, 种子发芽才受到明显影响^[10,22]。但在较低浓度纳米氧化

铜时对白菜种子根伸长和芽伸长均造成明显影响, 根伸长和芽伸长的 IC_{10} 值均低于 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1)。随着纳米氧化铜浓度提高, 根伸长抑制率和芽伸长抑制率均明显增加 (图 2), 呈对数线性关系 (表 1)。当纳米氧化铜浓度大于 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 根伸长抑制率大于芽伸长抑制率 (图 2), 根伸长 IC_{50} 值 (11.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 也远小于芽伸长 IC_{50} 值 (1 309.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 而且芽伸长抑制率在浓度小于 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时各浓度处理之间差异不显著, 但根伸长抑制率在各浓度处理之间均有显著差异, 从而表明根伸长对纳米氧化铜的毒害作用指示更明显。因为其伸出种皮较早, 与污染物接触时间更长^[4], 且与污染物接触面积也更大 (包含须根结构)。这与其他污染物对植物种子发芽影响的研究结果相似^[22-24]。

2.2 铜离子 (Cu^{2+}) 对白菜种子发芽的影响

在实验浓度范围, 各浓度铜离子处理白菜种子发芽率 (85%~95%) 与对照 (高纯水) 相比没有显著差异 ($P>0.05$)。各浓度铜离子与根伸长和芽伸长抑制率呈对数线性关系, 低浓度铜离子 (0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对根伸长和芽伸长影响也不明显, 甚至对后者有轻微促进作用, 表现出低剂量刺激效应^[25]。随着铜离子浓度提高, 根伸长抑制率迅速增加, 各处理间差异显著 ($P<$

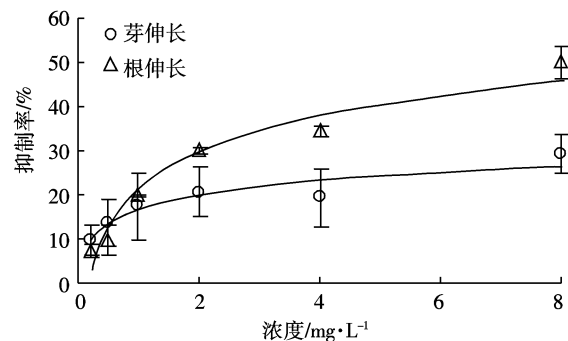


图 2 纳米氧化铜对白菜种子发芽的影响

Figure 2 Effect of nano-CuO on shoot/root elongation

表 1 纳米氧化铜、微米氧化铜、铜离子 (Cu^{2+}) 对白菜种子发芽的影响

Table 1 Effect of nano-CuO, micro-sized-CuO and copper ion on Chinese cabbage shoot/root elongation

污染物	影响因子	回归方程	$IC_{10}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$IC_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	R^2
纳米氧化铜	根伸长	$y = 11.65 \ln(x) + 21.92$	0.4	11.4	0.948
	芽伸长	$y = 4.602 \ln(x) + 16.97$	0.22	1 309.4	0.899
微米氧化铜	根伸长	$y = 0.203x - 7.560$	86.5	332.8	0.801
	芽伸长	—	—	—	—
铜离子	根伸长	$y = 26.59 \ln(x) + 43.52$	0.7	1.7	0.954
	芽伸长	$y = 4.237 \ln(x) + 11.92$	0.6	8 002	0.614

注: “—”表示在实验浓度范围内未受影响。

0.05),表明根伸长易受抑制(IC_{50} 1.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),但芽伸长抑制率增加缓慢,各浓度处理间差异不显著, IC_{50} 值高达 8 002 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1、图 3)。这主要是因为随着铜离子浓度提高,对根伸长抑制显著增强,当铜离子浓度大于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,根伸长开始骤缩和塌陷,降低了与铜离子接触面积及其吸收程度,从而降低了对芽伸长的毒害,因此出现了铜离子大于 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后对芽伸长的抑制没有显著提高(图 3),甚至铜离子为 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时芽伸长抑制率($13.4\%\pm 3.7\%$)低于 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($17.3\%\pm 6.7\%$)的现象。

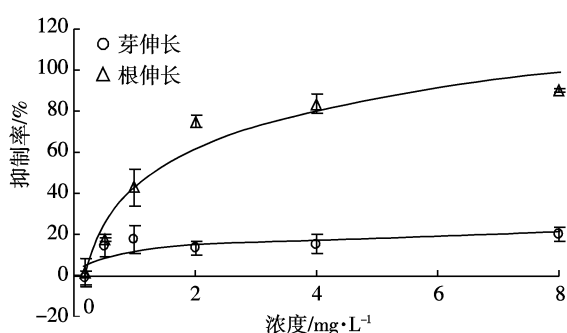


图 3 铜离子对白菜种子发芽的影响

Figure 3 Effect of copper ions on shoot/root elongation

2.3 微米氧化铜对白菜种子发芽的影响

在上述相同浓度下,微米氧化铜对白菜种子发芽率、根伸长和芽伸长均无抑制作用。因此进一步设定微米氧化铜浓度为 10、20、40、60、80、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行实验。结果表明,各浓度下微米氧化铜对白菜种子发芽率(85%~95%)与对照处理(高纯水)相比没有显著差异($P>0.05$),对根伸长和芽伸长的抑制作用也较小,前者随着浓度提高呈线性增加,后者变化规律不明显,在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时根伸长抑制率和芽伸长抑制率分别仅为 $15.3\%\pm 3.8\%$ 和 $7.6\%\pm 2\%$ 。可见在本实验浓度范围内微米氧化铜对白菜种子发芽影响很小。

3 讨论

纳米氧化铜可以进入植物幼苗根部细胞并运移^[26]。本文研究表明(表 1、图 2~图 3),白菜种子根伸长对纳米氧化铜、微米氧化铜和铜离子的毒害作用敏感性大于芽伸长,对根伸长毒害作用大小顺序为:铜离子>纳米氧化铜>微米氧化铜,这与前人关于土壤脲酶毒性研究的结果一致^[24]。而对于毒害作用敏感性相对较弱的芽伸长而言,不同形态重金属铜的毒害作用大小顺序则为:纳米氧化铜>铜离子>微米氧化铜。这可能涉及到纳米氧化铜的致毒机理问题。研究

表明,供试纳米氧化铜和微米氧化铜悬浮液中溶出铜离子(包括自由铜离子、羟基络合铜离子等)的含量都很低,纳米氧化铜浓度低于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时未检出铜离子,在 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时铜离子含量仅为 0.06 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。微米氧化铜只在较高浓度(100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时检出铜离子含量为 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2)。根据回归方程(表 1)计算结果表明,纳米氧化铜悬浮液浓度为 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,所溶出的铜离子浓度(0.22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对根伸长抑制率仅为 2.3%,对芽伸长没有影响。而图 2 和图 3 表明,纳米氧化铜浓度为 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对根伸长和芽伸长的抑制率分别约 50%和 30%。因此,本研究中纳米氧化铜对白菜种子根伸长和芽伸长的致毒机理主要是纳米效应。在纳米氧化铜浓度为 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时溶出的铜离子对于根伸长抑制的贡献只占 4.6%,而对于芽伸长抑制的贡献几乎是零。纳米氧化铜毒性大于微米氧化铜表明了尺度效应对毒性大小的影响。随着颗粒尺度变小,纳米氧化铜表面晶格破损程度更高,产生活性位点更多,形成超氧自由基 O_2^- 及其他活性氧化物质(ROS)更多,氧化压力(OS)提高,导致脂质过氧化,破坏细胞膜^[1],因此对白菜种子根伸长和芽伸长产生毒害。

表 2 不同浓度纳米氧化铜和微米氧化铜悬浮液中溶解铜离子含量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Table 2 Concentration of copper ion dissolved from nano-CuO and micro-sized-CuO($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

	0.2(10)	0.5(20)	1(40)	2(60)	4(80)	8(100)
纳米氧化铜	—	—	—	—	0.06±0.01	0.22±0.05
微米氧化铜	—	—	—	—	—	0.05±0.01

注:括号中为微米氧化铜浓度;“—”表示未检出。

有关研究也表明,纳米材料的生物毒性不全部源于溶解的重金属离子,纳米效应起到重要作用^[4,27-28],毒性大小与其粒径、形态等因素有关。在相当粒径下纳米氧化锌的生物毒性大于纳米氧化铜^[29]。但我们研究却发现,纳米氧化铜(22~75 nm,平均 43 nm)对白菜根伸长的 IC_{50} 值(11.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)小于纳米氧化锌(44~220 nm,平均 118 nm)的 IC_{50} (33.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)值(另文发表),即前者比后者表现出更大的生物毒性。在粒径 20~80 nm 范围内,纳米 SiO_2 对水稻根伸长的毒害作用与粒径呈负相关^[30]。毒性树枝状团聚体纳米氧化镍(60 nm)对斑马鱼的毒性(半致死浓度 LC_{50} 115 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)甚至大于镍离子(LC_{50} 221 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),而球形颗粒状纳米氧化镍(30~100 nm)的毒性则小得多(LC_{50} 221~361 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),且毒性与粒径之间相关

性不显著^[31]。但与上述相反,也有研究结果认为,纳米金属氧化物的生物毒性主要源于所溶出的金属离子^[32-33]。不同研究结果之间存在差异的影响因素是复杂的,如纳米金属氧化物的溶解性、供试生物所受纳米效应和金属离子毒害之间的相对敏感性等等^[31]。若纳米金属氧化物的溶解性或供试生物对金属离子的敏感性较小,则纳米效应致毒机理发挥更重要作用,反之则以所溶出的金属离子产生毒害为主^[34]。如本研究中,铜离子对白菜种子根伸长毒害比对芽伸长毒害更为敏感性,因此在相同浓度下对于芽伸长毒害作用大小为纳米氧化铜>铜离子,而对于根伸长毒害作用大小为铜离子>纳米氧化铜(表 1、图 2~图 3)。

4 结论

在实验浓度($0.2\sim 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)范围内纳米氧化铜对白菜种子发芽率无显著影响,但在较低浓度下($0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对根伸长和芽伸长即表现出抑制作用。随着纳米氧化铜浓度增加,对根伸长抑制率显著提高,对芽伸长抑制率则缓慢提高,其半抑制浓度(IC_{50})分别为 $11.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\ 309.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。微米氧化铜为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对白菜根、芽伸长的抑制率都小于 20%,其毒性明显小于纳米氧化铜;但纳米氧化铜的毒性并非其溶解出的铜离子所致。

参考文献:

- [1] 林道辉, 冀 静, 田小利, 等. 纳米材料的环境行为与生物毒性[J]. 科学通报, 2009, 54(29): 3590-3604.
- [2] LIN Dao-hui, JI Jing, TIAN Xiao-li, et al. Environmental behavior and toxicity of engineered nanomaterials[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(29): 3590-3604.
- [3] 汪 冰, 丰伟悦, 赵宇亮. 纳米材料生物效应及其毒理学研究进展[J]. 中国科学 B, 2005, 35(1): 1-10.
- [4] WANG Bing, FENG Wei-yue, ZHAO Yu-liang. Status of study on biological and toxicological effects of nanoscale materials[J]. *Science in China Ser. B Chemistry*, 2005, 35(1): 1-10.
- [5] 白春礼. 纳米科技及其发展前景[J]. 科学通报, 2001, 46(2): 89-92.
- [6] BAI Chun-li. Nano technology and its prospects[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(2): 89-92.
- [7] LIN Dao-hui, XING Bao-shan. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(15): 5580-5585.
- [8] ZHANG Yang, CHEN Yong-sheng, Westerhoff P, et al. Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water[J]. *Water Research*, 2008, 42(8-9): 2204-2212.
- [9] 刘 颖, 陈春英. 纳米材料的安全性研究及其评价[J]. 科学通报, 2011, 56(2): 119-125.
- [10] LIU Ying, CHEN Chun-ying. Safety and risk assessment of nanomaterials[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(2): 119-125.
- [11] Sereice R F. Nanomaterials show signs of toxicity[J]. *Science*, 2003, 300(5677): 243.
- [12] Maenard A D. Safe handling of nanotechnology[J]. *Nature*, 2006, 444(1038): 267-269.
- [13] LING Yang, Daniel J W. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles[J]. *Toxicology Letters*, 2005(8): 22-132.
- [14] LIN Dao-Hui, XING Bao-Shan. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibitory of seed germination and root growth[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 150(2): 243-250.
- [15] GAO Jie, Youn S J, Hovsepian A. Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: Effects of water chemical composition[J]. *Environmental Science & Technology* 2009, 43(9): 3322-3328.
- [16] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7): 1308-1316.
- [17] MIAO Ai-jun, Schwehr K A, Xu Chen, et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(11): 3034-3041.
- [18] Rorft J G, Roxana W, Kelly A. Exposure to causes gill lethality in copper nanoparticles injury and acute zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(23): 8178-8186.
- [19] ZHANG Wei-xian. Environmental technologies at the nanoscale[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(5): 103-108.
- [20] Kelly K L. Nanotechnology grows up[J]. *Science*, 2004, 304(5678): 1732-1734.
- [21] Dowling A, Clift R, Grobert N, et al. Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties[M]. London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering Report, Jul 2004.
- [22] ZHU-Lin, Chang D W, Dai Li Ming, et al. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(12): 3592-3597.
- [23] Porter A E, Gass M, Muller K, et al. Visualizing the uptake of C₆₀ to the cytoplasm and nucleus of human monocyte-derived macrophage cells using energy-filtered transmission electron microscope and electron tomography[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(8): 3012-3017.
- [24] Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.4200-1996 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test[S]. USA: EPA, 1996.
- [25] Liu T F, Wang T, Sun C, et al. Single and joint toxicity of cypermethrin and copper on Chinese cabbage (*Pakchoi*) seeds[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163(1): 344-348.
- [26] 金彩霞, 刘军军, 鲍林林, 等. 磺胺间甲氧嘧啶-镉复合污染对作物种子发芽的影响[J]. 中国环境科学 2010, 30(6): 839-844.
- [27] JIN Cai-xia, LIU Jun-jun, BAO Lin-lin. Joint toxicity of sulfamonomethoxine and Cd on seed germination and root elongation of crops in soil[J]. *China Environmental Science*, 2010, 30(6): 839-844.

- [23] 周启星, 王美娥. 土壤生态毒理学研究进展与展望[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(1): 1-11.
ZHOU Qi-xing, WANG Mei-e. Researching advancement and prospect of soil ecotoxicology[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(1): 1-11.
- [24] 金盛杨, 王玉军, 汪 鹏, 等. 纳米与微米 CuO 及 Cu²⁺对土壤脲酶的生态毒性比较研究[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(6): 835-841.
JIN Sheng-yang, WANG Yu-jun, WANG Peng. Comparative ecotoxicity of nanometer-, micrometer-sized CuO and ionic copper to soil urease [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(6): 835-841.
- [25] LIU T F, WANG T, SUN C. Single and joint toxicity of cypermethrin and copper on Chinese cabbage seed[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163(1): 344-348.
- [26] Lee W M, An Y J, Yoon H, et al. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to terrestrial plants *Phaseolus radiatus* (mung bean) and *Triticum aestivum* (wheat): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2008, 27(9): 1915-1921.
- [27] Griffith R J, Weil R, Hyndman K A, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Daniorerio*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(23): 8178-8186.
- [28] Asharani P V, Wu Y L, Gong Z Y, et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(25): 102-225.
- [29] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(4): 1461-1468.
- [30] 杨莎莎, 林匡飞, 徐圣友, 等. 多尺度纳米 SiO₂ 对水稻的生态毒理效应及临界指标研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 30-34.
YANG Sha-sha, LIN Kuang-fei, XU Sheng-you, et al. Eco-toxicological effects of multiscale nano-SiO₂ and its critical value on rice[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 30-34.
- [31] Ispas C, Andreescu D, Patel A, et al. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(16): 6349-6356.
- [32] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* [J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7): 1308-1316.
- [33] Franklin N M, Rogers N J, Apte S C, et al. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(4): 8484-8490.
- [34] Brunner T J, Wick P, Manser P, et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(14): 4374-4381.