

纳米银对连续三个世代褶皱臂尾轮虫的毒性效应*

王晓冰^{1,2}, 潘进芬^{1,2**}, 王雨^{1,2}, 魏铭^{1,2}

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100; 2. 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100)

摘要: 为了探究纳米银(Ag NPs)长期暴露下对海洋浮游动物的毒性效应,本研究通过以海洋浮游动物褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)为研究对象,研究了Ag NPs对连续三个世代褶皱臂尾轮虫的平均寿命、首次带卵时间、首次产幼时间和总后代数的影响,并通过产幼大小来明确非混交卵时期的发育情况以及通过摄食实验来探究Ag NPs对各世代轮虫能量摄入的影响。结果表明:Ag NPs对褶皱臂尾轮虫的24 h-LC₅₀和48 h-LC₅₀分别为18.7和3.4 mg·L⁻¹;不同浓度Ag NPs对各世代褶皱臂尾轮虫的生活史特征的影响存在显著的差异,且在同一世代中呈现出剂量-效应关系;在不同世代中,随着世代数的增加对其各生活史特征抑制效应显著增强。通过测量子代体长和进行摄食实验,结果发现能量的摄入不足和分配不均可能导致子代轮虫发育不良,进而导致其敏感性增强。

关键词: 褶皱臂尾轮虫; 纳米银; 急性毒性; 多世代毒性效应; 摄食行为

中图法分类号: X503.225

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2022)07 II-028-08

DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20210149

引用格式: 王晓冰, 潘进芬, 王雨, 等. 纳米银对连续三个世代褶皱臂尾轮虫的毒性效应[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(增 I): 28-35.

Wang Xiaobing, Pan Jinfen, Wang Yu, et al. Toxic effects of silver nanoparticles on three successive generations of *Brachionus plicatilis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2022, 52(Sup. I): 28-35.

纳米银(Ag NPs)是服装、医疗产品、食品包装等消费品最常用的纳米颗粒^[1]。正是Ag NPs的广泛应用将不可避免地通过地表径流、大气环流和污水排放进入海洋环境,在海洋环境中长期存在或被海洋生物摄食,对海洋生物造成潜在危害^[2]。

海洋浮游动物是海洋食物链中重要的一环,其中轮虫在海洋浮游动物中占很大比例,可以向更高的营养层次输送大量的物质和能量^[3]。褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)是海洋轮虫中重要的一种,广泛分布于近海岸和河口区域,而近岸环境和河口区域作为污染物的汇不可避免受到Ag NPs的污染^[4]。因此,褶皱臂尾轮虫是Ag NPs随地表径流进入海洋中首当其冲的浮游生物之一^[5]。此外,褶皱臂尾轮虫是一种以低取食选择性的水中颗粒(如藻类)为食的浮游动物^[5],这就大大增加了其摄取纳米颗粒的机会。Jeong等^[6]研究表明,轮虫能够摄入0.05、0.5和6 μm的微塑料,而其中纳米级微塑料的毒性更强。然而,传统的轮虫毒性实验只对未接触的亲代进行,往往忽略了污染物对其后代的进一步影响^[7]。迄今为止,对于浮游

动物的多代研究多是关于淡水浮游生物如大型溞^[8]、萼花臂尾轮虫^[9]等,而对于海洋浮游动物的世代毒性研究却相对较少,且在过往的淡水生物测试中的各世代结果差异较大^[10]。因此,由于自然种群可能在几代的时间都接触到有毒污染物,所以研究多代接触污染物下的毒性效应将是完善海洋生态风险评估一个重要方向。最近的研究表明,纳米颗粒可以通过亲代大型溞摄入而转移到后代体内,从而导致后代繁殖能力下降^[11]。这表明,亲代接触过污染物后产下的后代可能对污染物更敏感。因此,研究污染物对连续世代的水生生物的毒性作用具有重要的意义,但有关纳米金属对连续世代的褶皱臂尾轮虫的影响尚未见报告。

本文研究了Ag NPs对褶皱臂尾轮虫连续3个世代的生活史特征和其两代(F0、F1代)摄食行为的影响,旨在揭示暴露于Ag NPs中的各世代轮虫可能存在的敏感性差异以及从能量的角度分析敏感性差异的原因。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(41276104);国家海洋局公益专项(201505034-2)资助

Supported by the National natural Science Foundation of China(41276104); the Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean(201505034-2)

收稿日期:2021-03-30; 修订日期:2021-04-24

作者简介:王晓冰(1996—),男,硕士生。E-mail:wang0xiaobing@163.com

** 通讯作者:E-mail:jfpan@ouc.edu.cn

1.1 材料

1.1.1 主要试剂的配制 纳米银溶液及表征: 纳米银 (Ag NPs, 粒径 < 100 nm) 购于 Sigma-Aldrich。将 5 g Ag NPs 加入超纯水中, 冰水浴超声 15 min, 配成浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 储备液。每次实验开始时, 先冰水浴超声 15 min, 再稀释到各暴露浓度。采用透射电子显微镜 (TEM, Hitachi H-7650, 日本) 观察 Ag NPs 的形态。

实验用的海水为天然海水, 在沉淀 24 h 后, 充气泵曝气过夜, 再通过孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的硝酸纤维素酯膜过滤, 最后在 $121.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 下灭菌 20 min, 冷却备用。盐度为 31 ± 1 , pH 为 8.1 ± 1 。

1.1.2 生物的培养 小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 作为褶皱臂尾轮虫的饵料。实验室条件下在 f/2 培养基中连续培养, 在光学显微镜下用血细胞计直接计数细胞数量。培养参数如下: 温度 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照强度 3000 lx , 光照周期为 $12 \text{ h} : 12 \text{ h}$ 。

褶皱臂尾轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 由中国海洋大学生命学院提供。在实验室用灭菌海水培养 2 个月备用。每天上、下午各喂食小球藻一次 (密度为 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养条件同小球藻。

1.2 急性毒性实验

通过 24 和 48 h 预实验, 进行轮虫的急性毒性实验。采用不同浓度 Ag NPs 在 24 孔板中进行急性毒性实验, 具体浓度设置如下: 24 h ($0.5, 10, 15, 22.5, 33.8, 50.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 48 h ($0, 1.5, 2.25, 3.38, 5.07, 7.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。在每个孔中放入 10 只幼虫 (虫龄 < 2 h), 每个孔中暴露液体积为 1 mL。每个浓度有 4 个平行组且在实验过程中不进行喂食。24 和 48 h 后分别在解剖镜下观察并记录死亡数。

1.3 连续世代毒性实验

轮虫连续 3 代 (F0, F1, F2) 暴露于 Ag NPs。根据急性毒性实验结果, 设约 $1/20, 1/100, 1/250, 1/500$ 的 24 h-LC₅₀ 值 ($0, 40, 200, 500, 1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为实验浓度。幼虫 (< 2 h, F0) 暴露于 1 mL 含有一系列 Ag NPs 浓度实验溶液的 24 孔培养板中。每个处理组和对照组设 12 个重复。每天更换暴露液并喂食浓度为 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小球藻作为饵料。为了获得准确的每一代轮虫首次繁殖时间, 每 4 h 在体式显微镜下检查每个孔的轮虫。第一次繁殖后, 每 12 h 计数并取出新生幼虫数, 直到母体轮虫死亡。实验在所有最初的母体轮虫都死亡后结束。将 F0 代第 4 天产出幼虫作为 F1 代, 并在体式显微镜下测量并记录体长, 随后如前文所述暴露实验进行。同样的方法用于获得 F2 代并进行实验。由于暴露于 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 F1 代产幼数量过少, 因此只对 F2 代设置了 4 个浓度 ($0, 40, 200, 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.4 轮虫摄食实验

将新孵化的 F0 代和 F1 代轮虫 (< 2 h) 随机放入 24 孔板中 (每孔 10 只轮虫), 每孔中有 1 mL 的 5 种浓度 ($0, 40, 200, 500, 1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的暴露液。每个浓度组设 3 个平行。在实验开始时, 每个空加入浓度为 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小球藻。为了抑制小球藻的生长和繁殖, 所有实验组均置于完全黑暗中 24 h。暴露结束后, 在光学显微镜下用血细胞计数板测定剩余藻类细胞密度。轮虫的摄食行为有 2 种常用的取食行为指标: 滤水率 (F) 和摄食率 (I)^[12], 分别计算公式如下:

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C'_t}{t},$$

$$F = \frac{V \ln C_0 - \ln C_t}{n t} - A,$$

$$I = F \sqrt{C_0 C_t}.$$

其中: C_0 和 C_t 为食物初始和最终浓度 ($\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1}$); C'_t 为不含动物的对照组中在 t 时刻的浓度; A 为控制在 t 时刻后最终浓度 C'_t 变化的校正因子; n 为轮虫数量 (只); V 为体积 (mL)。

1.5 数据处理与分析

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行方差分析和回归分析。半数致死浓度及其置信区间计算采用 Probit 概率分析。采用 ANOVA 分析 Ag NPs 暴露组与空白对照组之间的差异, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 Ag NPs 的形态

图 1 显示出 Ag NPs 成球状, 颗粒大小均匀, 其 TEM 显示平均粒径为 $(6.8 \pm 3) \text{ nm}$, 且在暴露介质中分散较好。

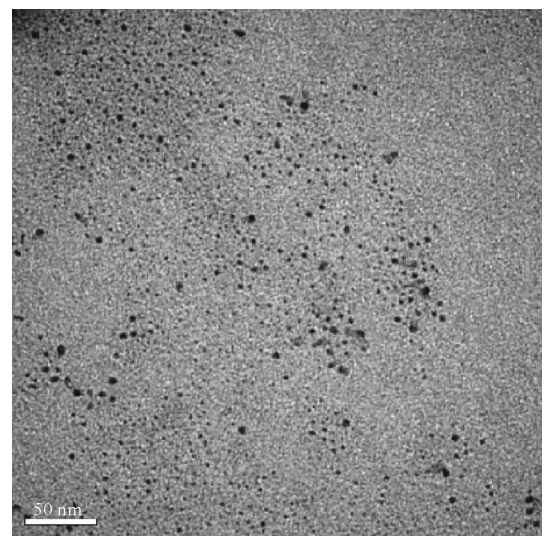


图 1 Ag NPs TEM 图

Fig.1 TEM images of Ag NPs

2.2 急性毒性实验

Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫的急性毒性实验结果见

表 1。实验结果表明 24 h-LC₅₀ 和 48 h-LC₅₀ 分别为 18.7 和 3.4 mg · L⁻¹。

表 1 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫的急性毒性

Table 1 Acute toxicity of silver nanoparticles to *Brachionus plicatilis*

时间 Time/h	回归方程 Regression equation	相关系数 R ²	LC ₅₀ /(mg · L ⁻¹)	95%置信区间 Confidence interval
24	$y = -3.51 + 2.73x$	0.94	18.7	16.5~21.3
48	$y = -1.69 + 3.16x$	0.92	3.4	3.0~3.9

2.3 Ag NPs 对多世代轮虫生活史特征的影响

2.3.1 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫首次带卵时间的影响

从表 2 中可以看出,同一世代,高浓度 Ag NPs 暴露导致 F0、F1 和 F2 代的带卵时间的滞后效应愈发显著,并表现为浓度依赖效应。随着世代数的增加,Ag NPs 对轮虫带卵抑制的效果逐渐显著。在 200 μg · L⁻¹ 的暴露下,与对照组相比,F0、F1 和 F2 代首次带卵时间分别推迟了 9.3%、10.8%、17.4%。在 500 和 1 000 μg · L⁻¹ 的暴露下,F1 代的首次带卵时间延长分别高达 31.3% 和 80.9%。此外,在 F2 代中,在 500 μg · L⁻¹ 的暴露中轮虫在存活期间已不再带卵。

2.3.2 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫首次产幼时间的影响

在 F0 代中与 Ag NPs 对首次带卵时间的影响相比,Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫的首次产幼时间的影响是较轻的。与对照组相比,F0 代仅在最高浓度组出现了显著推迟,且推迟了 8.4% ($p < 0.05$) (见表 2),而其他浓度组无显著影响。但是 F1 代和 F2 代中 Ag NPs 对首次产幼时间的影响变化趋势是与其对首次产幼时间变化相似的 (见表 2)。在 200 μg · L⁻¹ 的暴露下,与对照组相比,F1、F2 代首次产幼时间分别显著推迟了 7.7% 和 16.8%。在 500 和 1 000 μg · L⁻¹ 的暴露下,F1 代的首次产幼时间延长分别高达 77.2% 和 53.1% ($p < 0.05$) (见表 2)。

表 2 不同浓度纳米银暴露对连续三代褶皱臂尾轮虫生活史特征的影响

Table 2 Life-history traits of three successive generations of *Brachionus plicatilis* exposed to different silver nanoparticles concentrations

世代 Generation	纳米银浓度 Ag NPs concentration / (μg · L ⁻¹)	平均寿命 Average lifespan/d	首次带卵时间 Time to first batch of eggs/h	首次产幼时间 Time to first brood/h	总后代数(后代/雌体) Total progeny (offspring/female)
F0	Control	262.0 ± 29.8	27.0 ± 1.4	20.2 ± 1.6	18.3 ± 0.9
	40	281.0 ± 18.1	26.8 ± 1.6	21.3 ± 2.2	17.8 ± 1.4
	200	208.0 ± 26.3*	29.5 ± 1.2*	20.5 ± 1.7	15.3 ± 2.2*
	500	164.0 ± 27.7*	30.2 ± 1.3*	20.2 ± 2.0	11.4 ± 2.9*
	1 000	152.7 ± 14.3*	31.2 ± 1.8*	21.9 ± 1.8*	8.8 ± 1.3*
F1	Control	268.8 ± 26.6	27.8 ± 1.7	20.7 ± 1.6	19.1 ± 1.8
	40	256.5 ± 42.5	29.0 ± 1.1	19.7 ± 1.5	15.0 ± 1.1*
	200	193.5 ± 23.5*	30.8 ± 1.5*	22.3 ± 2.0*	12.3 ± 2.7*
	500	156.0 ± 21.3*	36.5 ± 2.1*	36.7 ± 3.9*	5.9 ± 2.8*
	1 000	128.0 ± 23.6*	50.3 ± 3.9*	31.7 ± 5.6*	1.4 ± 1.4*
F2	Control	226.0 ± 16.8	27.0 ± 1.3	20.2 ± 1.6	18.3 ± 0.9
	40	229.0 ± 23.1	26.8 ± 1.6	21.7 ± 2.2	17.3 ± 1.7
	200	152.0 ± 36.4*	31.7 ± 1.7*	23.6 ± 3.7*	10.7 ± 3.0*
	500	24.3 ± 6.4*	—	—	—

注:“*”表示与各世代的空白对照组相比有显著差异 ($p < 0.05$)。“*” represents significant difference compared with the control group ($p < 0.05$).

2.3.3 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫存活时间的影响 低浓度 Ag NPs 暴露下对多代轮虫存活时间均无显著影响($p > 0.05$)(见表 2)。但与对照组相比,暴露于 200、500、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 的 F1 代存活时间缩短了 20.6%、42.0%、41.6%,缩短显著(见表 2)。而 F2 代与对照组相比,暴露于 200、500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 轮虫存活时间分别缩短了 32.7%、89.4%,缩短显著($p < 0.05$)(见表 2)。

2.3.4 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫总后代数的影响 在 F1 代和 F2 代中 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 未观察到对褶皱臂尾轮虫总后代数的影响,但却显著降低了轮虫 F1 代的总后代数($p < 0.05$)(见表 2)。与空白对照组相比,暴露于 40、200、500、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 浓度下的 F1 代总后代数分别减少了 21.1%、35.6%、69.1%、92.6%(见表 2)。而 F2 代与对照组相比,暴露于 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 浓度下轮虫的总后代数显著缩短了 41.5%($p < 0.05$)(见表 2)。

2.4 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫 F0 和 F1 代孵化幼虫体长的影响

如图 2, F0 代孵化幼虫在 200 和 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的长度显著低于对照组,分别为对照组的 92.1% 和 92.4%($p < 0.05$)。F1 代孵化幼虫在各暴露浓度下均显著减小,分别为对照组的 90.9%、84.6%、84.4% 和 87.3%($p < 0.05$)。

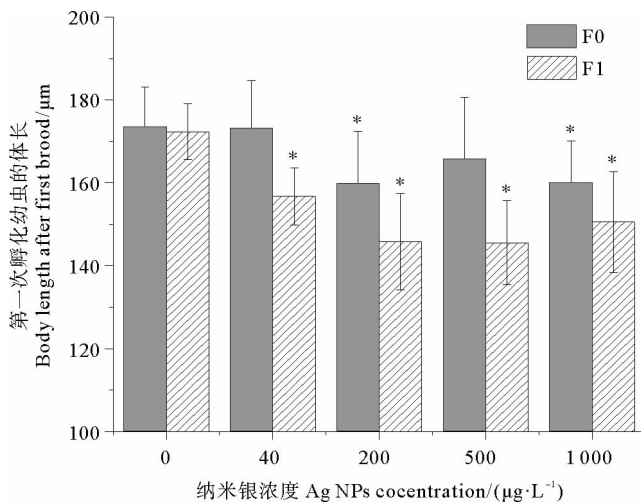


图 2 Ag NPs 对 F0 和 F1 代孵化幼虫体长的影响
Fig.2 Effects of silver nanoparticles on the body length of F0 and F1 generation hatching larvae

2.5 Ag NPs 对 F0 代和 F1 代摄食行为的影响

如图 3 所示,与对照相比 F0 代在 500 和 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下的摄食率和滤水率分别降低了 26.01%、28.43% 和 40.17%、42.7%,降低显著($p < 0.05$),而在 40 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下则无显著变化。当 F1 代暴露在

200、500、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ag NPs 时,与 F0 代相比, F1 代的滤水率和摄食率分别下降到 68.2%、65.2%、61.7% 和 79.9%、72.7%、69.4%。

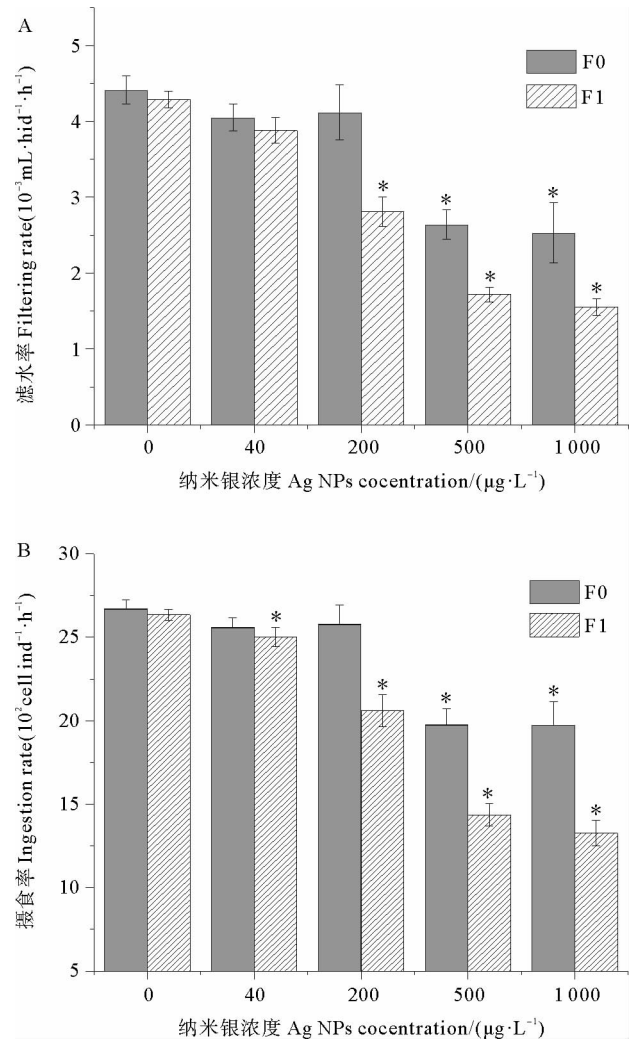


图 3 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫滤水率(A)和摄食率(B)的影响
Fig.3 Effect of silver nanoparticles on the filtering rate(A) and Ingestion rate of *B. plicatilis*(B)

3 讨论

3.1 金属纳米颗粒对海洋轮虫急性毒性效应的影响

从当前来看,有的学者研究了纳米氧化铜对褶皱臂尾轮虫的急性毒性实验,纳米氧化铜(25~55 nm)的 48 h-LC₅₀为 16.94 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [13];也有学者研究了纳米二氧化钛(15 nm)对褶皱臂尾轮虫的 48 h 急性毒性,虽然在相对低的浓度($\text{EC}_{50} = 5.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)产生了抑制效应,但却没有显著的致死[14]。本实验结果表明了 Ag NPs 的 24 和 48 h 对褶皱臂尾轮虫的半数致死浓度为 18.7 和 3.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,高于纳米氧化铜和二氧化钛毒性。此外,也有学者对不同的臂尾轮虫进行了研究,如 Mashjoor 等[15]研究了复合型纳米材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Mg}$

NPs(15~20 nm)对海洋轮虫圆形臂尾轮虫(*B. rotundiformis*)毒性效应,结果表明 48 h-EC₅₀ 为 722 mg · L⁻¹ 而 24 h-EC₅₀ 则大于 1 000 mg · L⁻¹, 毒性是远低于 Ag NPs。Wong 等^[16]研究 9 种纳米金属氧化物对朝鲜臂尾轮虫(*B. koreanus*)的 24 h 急性毒性,结果仅得出氧化锌(ZnO NPs)(20 nm)对朝鲜臂尾轮虫在 24 h-LC₅₀ 值为 18.66 mg · L⁻¹, 而其他纳米颗粒(α -Al₂O₃ NPs, γ -Al₂O₃ NPs, In₂O₃ NPs, MgO NPs, SnO₂ NPs, TiO₂ NPs(锐钛矿), TiO₂ NPs(金红石))在 24 h 内没有产生致死效应。先前研究表明 Ag NPs 的毒性效应通常是高于 ZnO NPs, 这主要归功于其能释放出有毒的 Ag⁺^[17]。而 ZnO NPs 的 24 h-LC₅₀ 与本实验得出的 Ag NPs 半数致死浓度相近,同样的有报道称相比于其他纳米颗粒,细菌、藻类和原生动物通常对 ZnO NPs 更敏感^[18], 这可能是由于 ZnO NPs 释放了生物可利用的 Zn²⁺, 从而促进了 Zn²⁺ 的溶解。先前有研究表明 Al³⁺ 和 Sn²⁺ 对藻类^[19] 和甲壳类动物^[20] 的毒性比 Zn²⁺ 更大。但当铝和锡以氧化物形式存在时,它们的毒性比 ZnO 小,这是因为铝和锡氧化物的离子溶解非常有限,因此它们的毒性显著降低^[16]。此外,小粒径的金属纳米颗粒通常会释放出更多的金属离子^[21], 但在当前对海洋轮虫的毒性效应研究中缺少纳米金属不同粒径的研究。尤其是像 ZnO NPs 所释放的 Zn²⁺ 能够被生物所利用,那小粒径的 ZnO NPs 是否比同等粒径 Ag NPs 的毒性效应更强,这在今后的工作中是值得思考的。总的来说,在当前纳米材料对海洋轮虫急性毒性研究中,Ag NPs 对轮虫的急性毒性与 ZnO NPs 急性毒性相近,大于其他纳米材料。

3.2 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫生活史特征的影响

褶皱臂尾轮虫是海洋鱼类重要的天然食物,也是连接 2 个营养层次的不可或缺的一环^[22]。当轮虫的生活史特征因环境影响而改变时,将会影响轮虫群落的结构和功能,进而对食物链和食物网产生不利影响^[23]。在本实验结果中褶皱臂尾轮虫 F0 代首次带卵时间比首次繁殖时间更加敏感。与对照组相比,在首次带卵时间随浓度的增加而显著延长的情况下,仅有在最高暴露浓度下轮虫首次孵化时间显著推迟。而相比较各世代轮虫的生活史特征,其孵化后代数量是最为敏感的参数。在 F1 代褶皱臂尾轮虫总后代数在所有的 Ag NPs 处理组出现了显著降低,并呈现出明显的剂量-效应关系。值得注意的是,与对照组相比,暴露于 40 μ g · L⁻¹ Ag NPs 的 F1 代总后代数显著降低,但在 F2 代却无显著影响。这可能是一种适应性机制,即低浓度污染物会在短时间内对生物体产生刺激或抑制作用,但几个世代后生物体会对污染物产生适应性^[24]。但是这种适应性是有上限的,在高浓度 Ag NPs 暴露

下,轮虫的繁殖能力随着世代数的增加受到的抑制效果显著增加。Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫繁殖能力的抑制一方面是由于轮虫应激导致的脂质的消耗从而导致生物体缺乏繁殖的能量。脂质是生物应对压力条件下消耗的第一能源^[25],也是参与胚胎的发育,构成休眠卵的主要部分^[11]。另一方面生物蓄积使得后代体内的污染物有着较大基数,从而使得毒性加剧,进而抑制 F1 和 F2 代的后代数量。江田田等^[26]研究表明浮游动物亲代能通过产卵等方式将污染物传递给后代。最近的研究也表明 Ag NPs 能够从亲代水蚤转移至子代的脂质中蓄积^[11]。

3.3 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫幼虫体长的影响

幼虫的体型是轮虫亲代适应环境的特征,在其从休眠卵孵化的过程中受到各种选择压力的影响,能够反映卵的发育状态及与后代的生存密切相关性^[27]。结果表明 Ag NPs 减少 F0 代和 F1 代幼虫出生时的体长,更表明了 Ag NPs 在子代轮虫的非混交卵时期对其发育产生了不利的影响。Sun 等^[28]研究发现,在微塑料的暴露下,褶皱臂尾轮虫子代的大小显著降低,与微米级别的相比,纳米级别的微塑料对轮虫子代体长的抑制效果更为明显,并且呈现一种剂量-效应关系。相比之下,同期在 Ag NPs 对轮虫生活史特征的研究中也明显观察到 F1 代比 F0 代对 Ag NPs 的敏感性更高,尤其体现在中、高浓度 Ag NPs 暴露下,表现为各生活史特征受到抑制,这与幼虫体长变化相似。有研究表明体型通常被认为是确定对环境压力的敏感性一个关键因素,小的个体往往比大的个体更敏感^[29]。这是由于当亲代轮虫受到外界环境胁迫时,它们需要更多的能量进行抵抗,从而导致繁殖所需的能量减少,进而影响卵的发育^[28,30]。此外,新陈代谢率与体型成反比。与大的有机体相比,小个体会更高的代谢率从而累积更多的有毒物质^[31]。因此,可以合理推测褶皱臂尾轮虫幼虫的体长变化可以反应其对污染物敏感性的强弱,可作为一种评估子代对污染物敏感性强弱的指标。

3.4 Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫摄食行为的影响

食物摄取是生物获取能量的主要方式,当有毒物质抑制取食行为时,就会直接或间接影响生物的生长、发育和繁殖。值得注意的是与对照组相比,F0 代轮虫的发育在 200 μ g · L⁻¹ 浓度时受到显著抑制,而对摄食行为却没有显著影响。这可能由于生物的低促进效应所引起的,正如之前研究发现较低浓度的污染物可促进浮游动物的摄食。如:徐风凤等^[32]发现低浓度 BDE-47 显著促进了日本虎斑猛水蚤的摄食率,而高浓度并没有显著影响;谢志浩等^[33]同样研究发现低浓度的百草枯提高了轮虫的摄食率和滤水率。然而当百草枯浓度达到一定值时,再随着浓度的增加轮虫的摄食

率和滤水率却显著降低。因此, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 Ag NPs 可作为轮虫摄食行为的刺激因子, 促进轮虫获取更多能量抵抗 Ag NPs 带来的毒害。然而同浓度 (200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 下轮虫的繁殖能力却受到显著的抑制, 这正表明在 Ag NPs 胁迫下, 轮虫将获取更多能量用于维持自身的生存, 从而减少了用于繁殖的能量。Bouchnak 和 Steinberg^[34] 的研究与本研究结果一致, 他们发现当轮虫暴露在含有镉和低浓度食物的水中时, 轮虫会将大部分能量用于抵抗环境胁迫以维持生存, 然后再分配给生长繁殖。同样有研究表明, 摄入纳米颗粒会增加能量消耗, 无法满足压力条件下的高能量需求, 进而缩减用于繁殖的能量^[35]。此外, 在浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, F0 代生活史特征也受到显著抑制。这可能与暴露于 Ag NPs 的藻类品质有关。食物品质极大地影响了动物的能量的吸收, 从而影响了食物网中能量和物质的转移^[35]。Behzadi 等^[37] 研究发现, 随着 Ag NPs 浓度的增加, 小球藻的不饱和脂肪酸含量显著降低, 而不饱和脂肪酸对动物的生长和繁殖至关重要^[37]。当暴露于高浓度的 Ag NPs 时, 轮虫能够摄入更多的 Ag NPs, 它们的身体会产生一种虚假的饱腹感, 从而导致食物摄入量减少^[38]。对于 F1 代来说, 暴露于 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ag NPs 中, 与对照组相比, 其摄食率和滤水率也出现显著抑制, 失去了 F0 代所表现出来的低促进效应。这不仅仅表明 F1 代对 Ag NPs 更加敏感, 也意味着 F1 代获取的能量的降低。因此, 随着 Ag NPs 暴露的世代数的增加, 轮虫将摄取能量减少的同时, 将获取的能量大部分用于生存, 减少用于繁殖的能量, 从而使后代的非混交卵时期发育受到影响, 进而导致后代对 Ag NPs 敏感性增强。

4 结论

(1) 相比于其他纳米颗粒, Ag NPs 对褶皱臂尾轮虫具有较强的毒性效应。

(2) Ag NPs 显著抑制了褶皱臂尾轮虫各世代的生活史特征参数。且随着世代的增加, 轮虫对 Ag NPs 的敏感性增强。

(3) 暴露于 Ag NPs 的亲代褶皱臂尾轮虫能量的摄入不足和分配不均可能导致子代褶皱臂尾轮虫发育不良, 进而导致其对 Ag NPs 的敏感性增强。

参考文献:

- [1] Zhang C, Hu Z, Deng B. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physicochemical behavior and antimicrobial mechanisms[J]. Water Research, 2016, 88: 403-427.
- [2] Turan N B, Erkan H S, Engin G O, et al. Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity—A review[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2019, 130: 238-249.
- [3] Tinh N T N, Nguyen Ngoc P, Dierckens K, et al. Gnotobiotically grown rotifer *Brachionus plicatilis* sensu strictu as a tool for evaluation of microbial functions and nutritional value of different food types[J]. Aquaculture, 2006, 253(1): 421-432.
- [4] Li X-D, Wang X-Y, Xu M-E, et al. Progress on the usage of the rotifer *Brachionus plicatilis* in marine ecotoxicology: A review[J]. Aquatic Toxicology, 2020, 229: 105678.
- [5] Dahms H-U, Hagiwara A, Lee J-S. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 101(1): 1-12.
- [6] Jeong C B, Won E J, Kang H M, et al. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*) [J]. Environmental Science and Technology, 2016, 50(16): 8849-8857.
- [7] 储斌, 席貽龙, 朱凌云, 等. 红霉素对连续 3 个世代多刺裸腹溞存活和生殖的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 193-200. Chu B, Xi Y L, Zhu L Y, et al. Effects of Erythromycin on survival and reproduction of three successive generations of *Moina macrocopa* [J]. Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 193-200.
- [8] Gonçalves R A, de Oliveira Franco Rossetto A L, Nogueira D J, et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests[J]. Aquatic Toxicology, 2018, 197: 32-40.
- [9] Martins N, Pradhan A, Pascoal C, et al. Effects of metal nanoparticles on freshwater rotifers may persist across generations[J]. Aquatic Toxicology, 2020, 229: 105652.
- [10] Biron P A, Massarin S, Alonzo F, et al. Population-level modeling to account for multigenerational effects of uranium in *Daphnia magna* [J]. Environmental Science and Technology, 2012, 46(2): 1136-1143.
- [11] Yan N, Tsim S M J, He X, et al. Direct visualization and quantification of maternal transfer of silver nanoparticles in zooplankton [J]. Environmental Science and Technology, 2020, 54(17): 10763-10771.
- [12] Fernández-Casalderrey A, Ferrando M D, Andreu-Moliner E. Effect of the insecticide methylparathion on filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna* [J]. Science of the Total Environment, 1993, 134: 867-876.
- [13] Rotini A, Gallo A, Parlapiano I, et al. Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 14: 852-860.
- [14] Clément L, Hurel C, Marmier N. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants—Effects of size and crystalline structure[J]. Chemosphere, 2013, 90(3): 1083-1090.
- [15] Mashjoor S, Yousefzadi M, Zolgharnain H, et al. Organic and inorganic nano-Fe₃O₄: Alga *Ulva flexuosa*-based synthesis, antimicrobial effects and acute toxicity to briny water rotifer *Brachionus rotundiformis* [J]. Environmental Pollution, 2018, 237: 50-64.
- [16] Wong S W Y, Zhou G J, Kwok K W H, et al. In vivo toxicities of nine engineered nano metal oxides to the marine diatom *Skeletonema costatum* and rotifer *Brachionus koreanus* [J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 153: 110973.
- [17] Zhang L, Li J, Yang K, et al. Physicochemical transformation and algal toxicity of engineered nanoparticles in surface water

- samples[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 211: 132-140.
- [18] Aruoja V, Pokhrel S, Sihtmäe M, et al. Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa[J]. *Environmental Science: Nano*, 2015, 2(6): 630-644.
- [19] Magdaleno A, Gomez C, Vélez C, et al. Preliminary toxicity tests using the green alga, *Ankistrodesmus falcatus*[J]. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 1997, 12: 11-14.
- [20] Martin T R, Holdich D M. The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to fresh-water asellids and gammarids)[J]. *Water Research*, 1986, 20(9): 1137-1147.
- [21] Zhang W, Yao Y, Sullivan N, et al. Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(10): 4422-4428.
- [22] Halbach U. Population dynamics of rotifers and its consequences for ecotoxicology[J]. *Hydrobiologia*, 1984, 109(1): 79-96.
- [23] Yan Z, Yan K, He X, et al. The impact assessment of anticancer drug imatinib on the feeding behavior of rotifers with an integrated perspective: Exposure, post-exposure and re-exposure [J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 423-430.
- [24] Sanchez M, Andreu-Moliner E, Ferrando M D. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59(3): 316-323.
- [25] Goncalves R A, de Oliveira Franco Rossetto A L, Nogueira D J, et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 197: 32-40.
- [26] 江田田, 朱丽岩, 韩萃, 等. 渤、黄海浮游动物对四溴双酚 A 生物富集的研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(5): 51-58.
- Jiang T T, Zhu Y L, Han C, et al. The study on accumulation of Tetrabromobisphenol-A in zooplankton of Bohai Sea and Yellow Sea[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(5): 51-58.
- [27] Yoshinaga T, Kaneko G, Kinoshita S, et al. The molecular mechanisms of life history alterations in a rotifer: A novel approach in population dynamics[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 715-722.
- [28] Sun Y, Xu W, Gu Q, et al. Small-sized microplastics negatively affect rotifers: Changes in the key life-history traits and rotifer-phaeocystis population dynamics[J]. *Environmental Science and Technology*, 2019, 53(15): 9241-9251.
- [29] Kang H-M, Lee J-S, Lee Y H, et al. Body size-dependent inter-specific tolerance to cadmium and their molecular responses in the marine rotifer *Brachionus* spp[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 206: 195-202.
- [30] Guo R, Snell T W, Yang J. Studies of the effect of environmental factors on the rotifer predator-prey system in freshwater[J]. *Hydrobiologia*, 2010, 655(1): 49-60.
- [31] Savage V M, Allen A P, Brown J H, et al. Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with body size in mammals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(11): 4718-4723.
- [32] 徐风凤, 朱丽岩, 巩文静, 等. 四溴联苯醚(BDE-47)对两种海洋桡足类动物的毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(5): 737-747.
- Xu F F, Zhu L Y, Gong W J, et al. Toxic effects of BDE-47 on two marine Copepods[J]. *Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(5): 737-747.
- [33] 谢志浩, 屠燕萍, 俞泓伶, 等. 除草剂百草枯对褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)摄食和实验种群动态的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 299-304.
- Xie Z H, Tu Y P, Yu H L, et al. Effects of paraquat on feeding and experimental population dynamics of *Brachionus plicatilis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 299-304.
- [34] Bouchnak R, Steinberg C E. Algal diets and natural xenobiotics impact energy allocation in cladocerans. I. *Daphnia magna* [J]. *Limnologia*, 2013, 43(6): 434-440.
- [35] Bour A, Haarr A, Keiter S, et al. Environmentally relevant microplastic exposure affects sediment-dwelling bivalves[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 652-660.
- [36] Andersen T, Elser J J, Hessen D O. Stoichiometry and population dynamics[J]. *Ecology Letters*, 2004, 7(9): 884-900.
- [37] Behzadi T M, Esmailbeigi M, Shirdel I, et al. Perturbation of fatty acid composition, pigments, and growth indices of *Chlorella vulgaris* in response to silver ions and nanoparticles: A new holistic understanding of hidden ecotoxicological aspect of pollutants [J]. *Chemosphere*, 2020, 238: 124576.
- [38] Wang Y, Qin S, Li Y, et al. Combined effects of ZnO nanoparticles and toxic Microcystis on life-history traits of *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2019, 233: 482-492.

Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Three Successive Generations of *Brachionus plicatilis*

Wang Xiaobing^{1,2}, Pan Jinfen^{1,2}, Wang Yu^{1,2}, Wei Ming^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. The Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: In order to explore the toxic effects of silver nanoparticles (Ag NPs) on marine zooplankton after long-term exposure. We studied the effects of silver nanoparticles (Ag NPs) on the average life span, time to the first batch of eggs, time to the first brood, and the total number of offspring of three successive generations of *Brachionus plicatilis*, and through the larva body length to clear the period of the development situation and by the feeding experiment to explore the effect of Ag NPs on the energy intake of rotifers in different generations. The results showed that the 24 h-LC₅₀ and 48 h-LC₅₀ were 18.7 and 3.4 mg · L⁻¹, respectively. There were significant differences in the effects of different concentrations of Ag NPs on the life history characteristics of *Brachionus plicatilis* in different generations, and there was a dose-response relationship in the same generation. In different generations, the inhibition effect on the life history characteristics of *Brachionus plicatilis* was significantly enhanced with the increase of the number of generations. By measuring the body length of the progeny and feeding experiments, the results showed that insufficient energy intake and uneven distribution may lead to the dysplasia of progeny rotifers, and thus enhance their sensitivity.

Key words: *Brachionus plicatilis*; silver nanoparticles; acute toxicity; multi-generational toxic effect; feeding behaviors

责任编辑 高 蓓