

马菲菲,孙雪梅,韩倩,等. 不同粒径 TiO_2 颗粒对海洋微藻的毒性效应[J]. 海洋学报,2015,37(10):100—105,doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2015.10.010

Ma Feifei, Sun Xuemei, Han Qian, et al. Toxic effects of TiO_2 particles with different size on the marine microalga[J]. Haiyang Xuebao, 2015, 37(10): 100—105, doi: 10.3969/j.issn.0253-4193.2015.10.010

不同粒径 TiO_2 颗粒对海洋微藻的毒性效应

马菲菲¹, 孙雪梅¹, 韩倩¹, 陈碧鹃¹, 夏斌^{1*}, 曲克明¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 本实验以新月菱形藻为受试生物,研究了低浓度不同粒径 TiO_2 颗粒(21 nm、60 nm 和 400 nm)对海洋微藻生长、抗氧化酶活性(超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT 和过氧化物酶 POD)、脂质过氧化产物(MDA)含量的影响,并测定了相应的活性氧自由基(ROS)的含量,初步探讨了 TiO_2 颗粒对海洋微藻的作用机制。结果表明,1 mg/L TiO_2 颗粒对新月菱形藻生长的抑制作用随着粒径的减小而逐渐增强,第 48 h、72 h、96 h 呈现出显著的纳米效应。 TiO_2 颗粒可以诱导藻细胞内 ROS 的含量增加,对藻细胞产生氧化胁迫,新月菱形藻的抗氧化酶活性发生应激响应,以清除过量的 ROS,但剩余的 ROS 对藻细胞产生氧化损伤,导致 MDA 含量升高,并且纳米级 TiO_2 颗粒对新月菱形藻的氧化损伤大于微米级颗粒。在不同粒径 TiO_2 颗粒的胁迫下,藻细胞 SOD 和 CAT 活性的响应也存在差异。本研究将为开展人工纳米材料对海洋生态系统影响的潜在风险评估提供科学依据。

关键词: TiO_2 ; 新月菱形藻; 纳米颗粒; 海洋微藻; 抗氧化酶; 毒性效应

中图分类号: X171.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2015)10-0100-06

1 引言

随着纳米科技的迅猛发展,纳米材料已经广泛的应用在人类生产和生活中,同时也会不可避免的进入到水环境中,对水生生态结构和功能产生潜在的影响,已引起国内外科研工作者的广泛关注^[1-2]。纳米 TiO_2 已被工业化生产并大量的应用在水质净化、医药、化妆品、食品、电子及工程制造等领域^[3-5]。微藻是水生生态系统的初级生产者,能为其他营养级的生物提供能量和氧气,对维护整个水生生态系统的物质平衡和能量循环起着十分重要的作用。因此,藻类毒

性试验被广泛应用于评估有害物质的毒性效应^[6-7]。目前国内外已有不少关于 TiO_2 纳米颗粒(Nanoparticles, NPs)对微藻毒性效应的报道^[8-12],均表明 TiO_2 NPs 可以抑制浮游植物的生长,并对藻细胞造成氧化损伤。但是以上研究都是针对 TiO_2 NPs 对淡水微藻的影响,而不同粒径 TiO_2 颗粒对海洋微藻毒性效应的研究还未见报道。

NPs 通过地表径流,大气沉降或人为泄漏等方式进入到海洋环境后,会受到海水有机质、离子强度和 pH 等水化学条件,光照、风浪等环境因素的影响而发生一系列复杂的聚集—分散—再聚集或者分散—聚

收稿日期: 2015-01-05; 修订日期: 2015-07-21。

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2013A02YQ02); 国家自然科学基金青年基金(41206100); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项基金(20603022012020)。

作者简介: 马菲菲(1987—),女,山西省运城市人,主要从事海洋生态毒理学研究。E-mail: wuyanmf001@163.com

* 通信作者: 夏斌,副研究员,主要从事海洋生态毒理学研究。E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn

集一再分散过程^[13],所以 NPs 在海洋环境中的行为相比与淡水中会更加复杂,进而会影响到 NPs 对海洋生物的毒性效应及致毒机制^[14-15]。新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)是一种海洋真核单细胞硅藻,因其富含蛋白质、碳水化合物及多不饱和脂肪酸而被作为优良饵料广泛应用于水产养殖,是多种软体动物、甲壳类幼体和浮游动物的主要饵料。本研究选取 3 种不同粒径 TiO₂ 颗粒(21 nm、60 nm 和 400 nm),分析 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生长、抗氧化酶活性(SOD、CAT 和 POD)和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的影响以及相应的胞内活性氧自由基(ROS)含量的变化,探讨不同粒径 TiO₂ 颗粒对海洋微藻的毒性效应,为客观评价人工纳米材料对海洋生态系统的潜在影响提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

新月菱形藻取自中国水产科学研究院黄海水产研究所藻种培养室。21 nm TiO₂ 颗粒购自西格玛奥德里奇(中国)有限公司,纯度大于 99.5%;60 nm 和 400 nm TiO₂ 颗粒购自阿拉丁试剂(中国)有限公司,纯度分别为大于 99.8%和大于 99.8%。本实验所用试剂均为国产优级纯或分析纯。玻璃器皿在使用前均用 10%浓硝酸浸泡 48 h,并用蒸馏水冲洗干净,高温高压(120℃,20 min)灭菌后待用。

2.2 实验方法

2.2.1 新月菱形藻的培养

将砂滤海水用 0.45 μm 混合纤维滤膜过滤后,置于锥形瓶中进行高温高压灭菌,添加 f/2^[16] 培养液后,接入新月菱形藻,放入光照培养箱进行培养。培养温度为(20±0.5)℃,光照强度为 3 500 lx,光暗比为 12 h:12 h。

2.2.2 TiO₂ 母液的制备

将 TiO₂ 颗粒加入到 f/2 培养液中,制备浓度为 1 000 mg/L 的 TiO₂ 母液,置于棕色玻璃瓶中,待用。配制试验液之前超声波震荡 30 min。

2.2.3 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生长的影响

取生长状况良好,处于对数增长期的新月菱形藻加入到 f/2 培养基中,使得新月菱形藻密度为 1×10⁶ cell/mL。把混合好的藻液分装到 250 mL 的锥形瓶中,每瓶体积为 200 mL,分别将 21 nm、60 nm 和 400 nm TiO₂ 母液加入到藻液中,立即摇匀,配置浓度为

1 mg/L TiO₂ 实验组,每个实验组设 3 个平行,以正常培养的藻液(无 TiO₂)为对照组,然后放入光照振荡培养箱中培养。于 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 在奥林巴斯显微镜(AX70)下用血球计数板计数得到藻细胞密度,以表征不同粒径 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生长的影响。

2.2.4 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生理指标的影响

将新月菱形藻暴露在浓度为 1 mg/L 的 21 nm、60 nm 和 400 nm TiO₂ 实验组 96 h 后,运用高速冷冻离心机离心(5 000 r/min,5 min)收集 100 mL 的藻细胞,加入 2 mL 新鲜培养液使藻细胞悬浮,将收集到的藻细胞用超声破碎仪进行破碎,4 000 r/min 离心 5 min 取上清液,用于 SOD, CAT, POD 活性以及 MDA 和 ROS 含量的测定,均采用南京建成科技有限公司的试剂盒完成,具体操作参照说明书进行。其中,蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定;SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,定义每 mg 蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U/mg);CAT 活性采用紫外吸收法测定,定义为每毫克组织蛋白每秒钟分解 1 μmol 的过氧化氢的量为一个活力单位(U/m);POD 活性的测定采用催化过氧化氢反应的原理,在 420 nm 处测定吸光度的变化,定义在 37℃条件下,每毫克组织蛋白每分钟催化 1 μg 底物的酶量为一个 POD 活力单位(U/mg);MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定,单位为 nmol/mg;在激发波长 485 nm,发射波长 538 nm,采用荧光分光光度计检测 ROS 含量,结果以荧光强度/mg 表示。

2.3 数据处理

每个实验重复 3 次,数据结果以平均值±标准偏差表示,采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA),用 Tukey's test 进行各组均数的多重比较, $P<0.05$ 表示显著差异。

3 结果与讨论

3.1 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生长的影响

不同粒径 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生长的影响如图 1 所示。第 24 h 时 21 nm、60 nm 和 400 nm TiO₂ 颗粒对新月菱形藻生长出现抑制作用,到 48 h 时达到最大,抑制率分别为 23.88%、21.66%和 7.19%,随着暴露时间的延长,抑制率有所降低,到 96 h 时,抑制率分别为 13.89%、12.68%和 5.48%。第 24 h

时 3 种粒径 TiO_2 颗粒对新月菱形藻的抑制作用没有显著差异($P>0.05$),随后 21 nm 与 60 nm TiO_2 颗粒对新月菱形藻的抑制作用没有显著差异($P>0.05$),但与 400 nm TiO_2 颗粒均具有显著差异($P<0.05$),这表明在纳米尺度范围内(1~100 nm),1 mg/L 的 TiO_2 颗粒对新月菱形藻的抑制作用不具有尺寸效应,但是纳米级与微米级颗粒相比具有尺寸效应。Aruoja 等^[8]研究了大颗粒和纳米级 CuO、ZnO 及 TiO_2 对羊角月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)生长的影响,结果表明大颗粒对微藻的 72 h EC_{50} 值均显著大于纳米颗粒。Sadiq 等^[9]研究表明微米级 TiO_2 颗粒对栅藻(*Scenedesmus* sp.)和小球藻(*Chlorella* sp.)生长的抑制作用要小于纳米颗粒。以上研究是不同粒径颗粒对淡水微藻生长的抑制作用,但与本实验结果一致,均表现出良好的纳米效应,这表明虽然纳米颗粒在海水中发生团聚^[17],但仍有部分颗粒以纳米形式存在,从而对海洋微藻产生毒性效应。

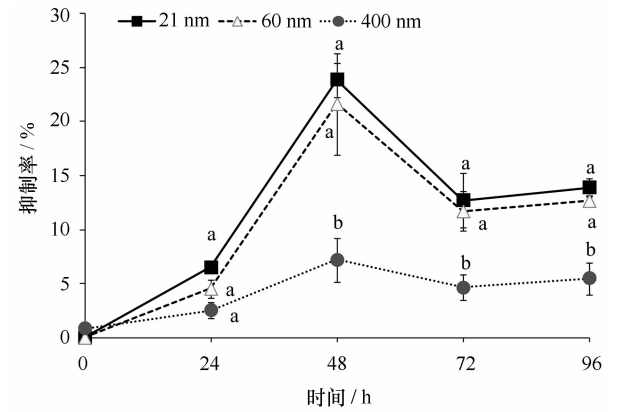


图 1 不同粒径 TiO_2 颗粒对新月菱形藻生长的影响

Fig. 1 The impact of TiO_2 particles on *N. closterium* cell growth

不同字母表示不同实验组间呈显著差异($P<0.05$),下同
Different letters indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$). The same below

3.2 TiO_2 颗粒对新月菱形藻的 ROS 含量的影响

当细胞受到外界毒物的干扰时,细胞就会处于氧化胁迫状态使得胞内 ROS 升高。在正常条件下,细胞内产生的 ROS 会被细胞的抗氧化还原系统清除掉,而如果细胞内产生的 ROS 过多超出细胞的清除能力时,大量的 ROS 就会在细胞内累积从而引起细胞的氧化损伤,发生脂质过氧化、基因损伤及细胞凋亡等^[18]。

不同粒径 TiO_2 颗粒对新月菱形藻活性氧自由基

(ROS)的影响如图 2 所示,新月菱形藻在 1 mg/L TiO_2 颗粒的作用下产生大量的 ROS,与对照组有显著性差异($P<0.05$),21 nm 和 60 nm TiO_2 颗粒与 400 nm TiO_2 颗粒实验组相比具有显著差异($P<0.05$),这表明纳米级和微米级 TiO_2 颗粒对新月菱形藻细胞 ROS 的影响具有显著的尺寸效应。细胞内 ROS 水平的增加,是对环境压力的一个早期响应^[19]。已有研究证明,在纳米 TiO_2 颗粒的作用下,大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[20]、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)^[21]、短裸甲藻(*Gymnodinium breve*)^[11]均产生大量 ROS,与对照组呈显著差异($P<0.05$),与本实验结果一致。所以,ROS 是纳米颗粒对细胞产生氧化损伤的主导因素,而纳米颗粒的氧化损伤机制是迄今最为普遍接受的一种纳米材料致毒机制^[22]。

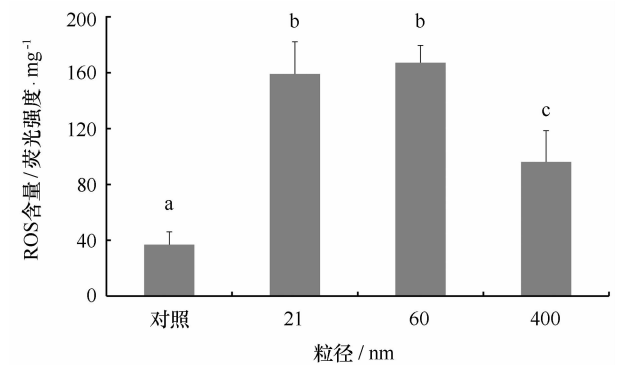


图 2 TiO_2 颗粒对新月菱形藻 ROS 的影响

Fig. 2 ROS level of algal cells after exposed to TiO_2 particles for 96 h

3.3 TiO_2 颗粒对新月菱形藻丙二醛(MDA)含量的影响

丙二醛(MDA)是膜脂受活性氧作用产生的物质,测定其含量可以评价质膜受损程度,反映植物遭受逆境伤害的程度。MDA 从膜上产生的位置释放出来后,可以与蛋白质、核酸反应,从而丧失功能,还可使纤维素分子间的桥键松弛,或抑制蛋白质的合成。因此,MDA 的积累可以对膜和细胞造成一定的伤害。

不同粒径 TiO_2 颗粒对新月菱形藻 MDA 含量的影响如图 3 所示,1 mg/L TiO_2 颗粒处理新月菱形藻后,各实验组藻细胞 MDA 含量均增加,其中 21 nm 和 60 nm TiO_2 颗粒实验组与对照相比增加了近 1 倍,具有显著差异($P<0.05$)。400 nm TiO_2 颗粒实验组与对照组,21 nm 和 60 nm TiO_2 颗粒实验组均无显著差异($P>0.05$)。在纳米 TiO_2 颗粒(21 nm 和 60 nm)暴露下,藻细胞 ROS 和 MDA 含量变化趋势基本

一致,也进一步证实藻中 ROS 的增多导致细胞脂质过氧化产物 MDA 的累积,从而使得细胞发生脂质过氧化。侯东颖等研究表明在 1 mg/L 纳米 TiO₂ 颗粒暴露下,普生轮藻(*Chara vulgaris*)的 MDA 含量显著升高,造成了膜脂质过氧化,与本实验结果一致^[12]。在微米 TiO₂ 颗粒暴露下,藻细胞 ROS 含量虽然显著高于对照组,但藻细胞 MDA 含量与对照组没有显著差异,这主要是由于藻细胞内抗氧化酶活性对胁迫发生响应,清除了一部分 ROS,剩余的 ROS 没有对藻细胞产生脂质过氧化。

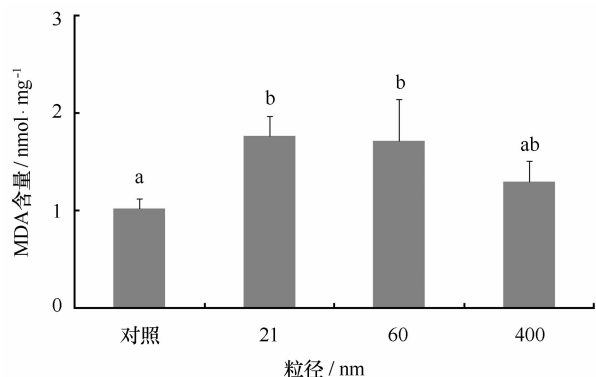


图 3 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻 MDA 含量的影响

Fig. 3 MDA levels of algal cells after exposed to TiO₂ particles

3.4 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)。SOD 能够催化细胞内的超氧化物的阴离子自由基(O₂⁻)发生歧化反应,生成过氧化氢(H₂O₂)和分子氧(O₂)。CAT 是生物体抵抗氧化损伤的第二道防线,能够促进过氧化氢转化成分子氧和水,从而有效地清除活性氧,具有保护细胞的作用。POD 广泛存在于植物体中,是活性较高的一种酶。它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系,与 CAT 都可以清除细胞内的 H₂O₂,防止脂质过氧化作用。不同粒径 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻抗氧化酶活性的影响如图 4 所示,当用 TiO₂ 颗粒处理小新月菱形藻时,与对照组相比,21 nm 实验组 SOD 活性显著增加($P < 0.05$),60 nm 实验组的 SOD 活性略有增加但差异不显著,而 400 nm 实验组 SOD 活性略有降低但不具有显著差异。这表明在纳米颗粒的作用下,藻细胞内 ROS 含量的增加诱导了 SOD 的活性, SOD 发挥保护作用清除细胞内

多余的 ROS,从而使细胞免受毒害^[18]。在 60 nm 和 400 nm TiO₂ 颗粒处理下的新月菱形藻体内 CAT 活性与对照组相比显著升高($P < 0.05$),呈诱导作用;而在 21 nm TiO₂ 颗粒暴露下,藻细胞 CAT 活性略有降低,但与对照组没有显著差异,呈抑制作用。这可能说明小新月菱形藻在 60 nm 和 400 nm TiO₂ 颗粒的诱导下,产生大量过氧化氢自由基,从而激发了抗氧化系统第二道防线, CAT 活性也随之增加,分别是对照组的 1.74 和 1.75 倍;而 21 nm TiO₂ 颗粒对藻细胞作用产生的氧化氢自由基已超出 CAT 的清除能力,受到抑制作用。在不同粒径 TiO₂ 颗粒暴露下,新月菱形藻 POD 的活性略有升高,但与对照相比均没有显著差异($P > 0.05$),这表明藻细胞 POD 活性没有发生显著响应。

综上所述,低浓度 TiO₂ 颗粒进入海水中发生团聚^[17],但仍有部分颗粒以纳米形式存在,对新月菱形藻生长的抑制作用以及氧化损伤均呈现出纳米效应。在不同粒径 TiO₂ 颗粒暴露下,海洋微藻细胞发生应激响应, SOD 和 CAT 活性受到显著诱导或抑制,以清除过量的 ROS,从而减轻藻细胞的氧化损伤。由于暴露 TiO₂ 颗粒粒径的不同,藻细胞抗氧化酶活性响应存在差异,这可能是由于不同粒径 TiO₂ 颗粒对新月菱形藻的作用方式有所不同,这将是我們下一步研究的重点,以明确不同粒径 TiO₂ 颗粒对海洋微藻的致毒机制。

4 结论

(1)浓度为 1 mg/L 的 TiO₂ 颗粒(21 nm、60 nm 和 400 nm)对新月菱形藻的生长均有抑制作用,并且在第 48 h、72 h、96 h 时纳米级和微米级颗粒对新月菱形藻生长的抑制作用具有显著差异,呈现出纳米效应。

(2)在 TiO₂ 颗粒的作用下,新月菱形藻 ROS 的含量增加,MDA 的含量升高,且纳米级的 TiO₂ 颗粒(21 nm 和 60 nm)对新月菱形藻的氧化损伤要大于微米级(400 nm)。

(3)在不同粒径 TiO₂ 颗粒的胁迫下,新月菱形藻的 SOD 和 CAT 活性受到显著诱导或抑制,但响应存在差异,这可能是由于 TiO₂ 颗粒因粒径不同对海洋微藻的作用方式有所不同。

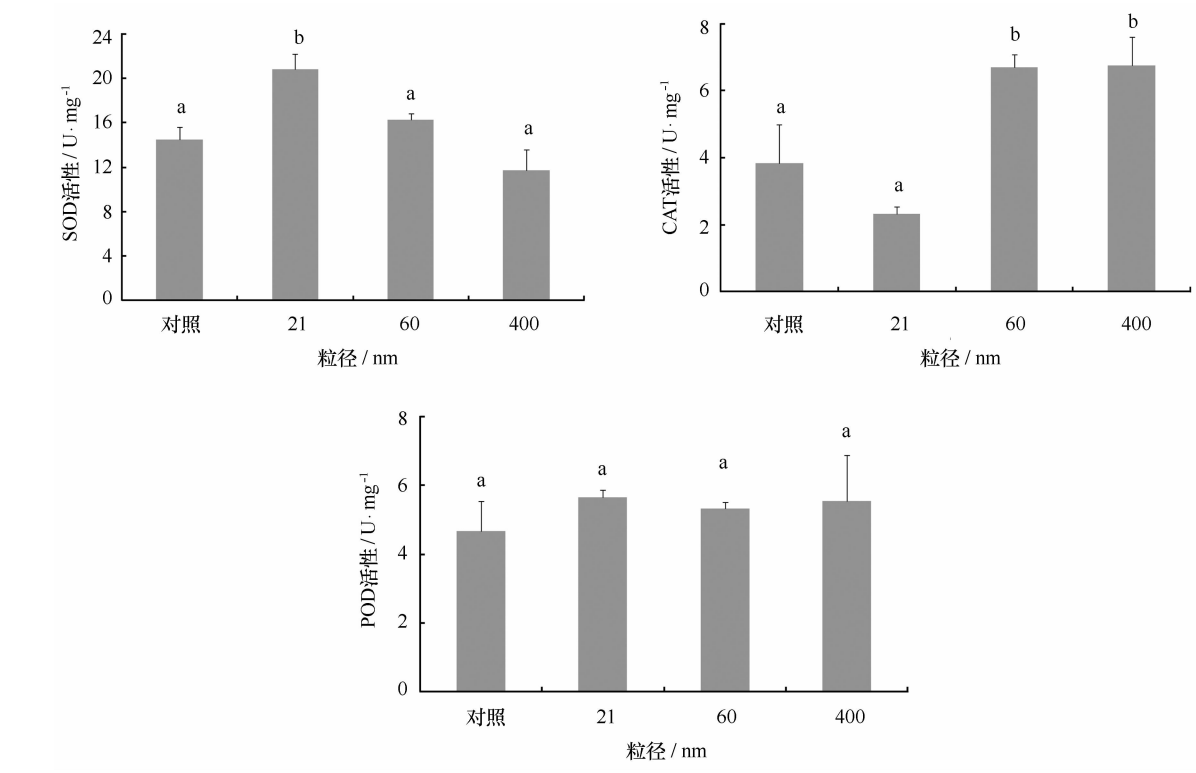


图 4 不同粒径 TiO_2 颗粒对新月菱形藻抗氧化酶活性的影响
Fig. 4 Antioxidant enzymes activities of algal cells after exposure to TiO_2 particles

参考文献:

[1] Moore M N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? [J]. Environment International, 2006, 32 (8): 967—976.

[2] 王震宇, 赵建, 李娜, 等. 人工纳米颗粒对水生生物的毒性效应及其机制研究进展[J]. 环境科学, 2010, 31(6): 1409—1418.
Wang Zhenyu, Zhao Jian, Li Na, et al. Review of ecotoxicity and mechanism of engineered nanoparticles to aquatic organisms[J]. Environmental Science, 2010, 31(6): 1409—1418.

[3] Fujishima A, Rao T N, Tryk D A. Titanium dioxide photocatalysis[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2000, 1(1): 1—21.

[4] Pena M E, Korfiatis G P, Patel M, et al. Adsorption of As(V) and As(III) by nanocrystalline titanium dioxide[J]. Water Res, 2005, 39(11): 2327—2337.

[5] Meng X, Dadachov M, Korfiatis G P, et al. Methods of repairing a surface-activated titanium dioxide product and of using same in water treatment processes[P]. U. S. : Patent Application Number 6919029, 2005.

[6] Hund-Rinke K, Simon M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO_2) on algae and daphnids[J]. Environ Sci Pollut Res, 2006, 13 (4): 225—232.

[7] Franklin N M, Rogers N J, Apte S C, et al. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl_2 to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the Importance of Particle Solubility[J]. Environ Sci Technol, 2007, 41(24): 8484—8490.

[8] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*[J]. Sci Total Environ, 2009, 407(4): 1461—1468.

[9] Sadiq I M, Dalai S, Chandrasekaran N, et al. Ecotoxicity study of titania (TiO_2) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(5): 1180—1187.

[10] 蔡舒婕, 李顺兴, 蔡添寿, 等. 纳米 TiO_2 对海洋生源要素含量及威氏海链藻生长的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(5): 53—56.
Cai Shujie, Li Shunxing, Cai Tianshou, et al. Influence of nanometer size titanium dioxide on the content of marine biogenic elements and the growth of *Thalassiosira weissflogii*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(5): 53—56.

[11] 李锋民, 赵薇, 李媛媛, 等. 纳米 TiO_2 对短裸甲藻的毒性效应[J]. 环境科学, 2012, 33(1): 233—238.
Li Fengmin, Zhao Wei, Li Yuanyuan, et al. Toxic effects of nano- TiO_2 on *Gymnodinium breve*[J]. Environmental Science, 2012, 33(1): 233—

- 238.
- [12] 侯东颖,冯佳,谢树莲. 纳米二氧化钛胁迫对普生轮藻的毒性效应[J]. 环境科学学报,2012,32(6): 1481—1486.
Hou Dongying, Feng Jia, Xie Shulian. Toxic effects of nanoparticle TiO₂ stress on *Chara vulgaris* L. [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32(6): 1481—1486.
- [13] Klaine S J, Alvarez P J J, Batley G E, et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(9): 1825—1851.
- [14] Baker T J, Tyler C R, Galloway T S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms[J]. Environmental Pollution, 2014, 186: 257—271.
- [15] Matraga V, Corsi I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches[J]. Marine Environmental Research, 2012, 76: 32—40.
- [16] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustdt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229—239.
- [17] Morelli E, Cioni P, Posarelli M, et al. Chemical stability of CdSe quantum dots in seawater and their effects on a marine microalga[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 122—123: 153—162.
- [18] Xia Tian, Kovochich M, Brant J, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm[J]. Nano Lett, 2006, 6(8): 1794—1807.
- [19] Szivák I, Behra R, Sigg L. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)[J]. J Phycol, 2009, 45(2): 427—435.
- [20] Ivask A, Bondarenko O, Jepihina N, et al. Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO₂, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: differentiating the impact of particles and solubilised metals[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(2): 701—716.
- [21] Gunawan C, Sirimanoonphan A, Teoh W Y, et al. Submicron and nano formulations of titanium dioxide and zinc oxide stimulate unique cellular toxicological responses in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 260: 984—992.
- [22] Nel A, Xia Tian, Mädler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311(5761): 622—627.

Toxic effects of TiO₂ particles with different size on the marine microalga

Ma Feifei¹, Sun Xuemei¹, Han Qian¹, Chen Bijuan¹, Xia Bin¹, Qu Keming¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: With the increasing application of nanotechnologies, it is no doubt that more and more engineered nanoparticles end up in marine environment. The toxicity of TiO₂ particles with different sizes (21 nm, 60 nm and 400 nm) to the marine microalga *Nitzschia closterium* was investigated in this study, including the growth inhibition and oxidative stress. The results showed that the toxicity of 1 mg/L TiO₂ particles to *N. closterium* cells increased with the decrease of particle size, indicating significant nano-effects at 48 h, 72 h and 96h exposure, respectively. TiO₂ particles induced excessive reactive oxygen species (ROS) which led to oxidative stress on the algal cells. The antioxidant enzyme activities of *N. closterium* cells could eliminate some ROS in order to protect algae cells. However, the rest could cause oxidative damage and increase malondialdehyde (MDA) levels concomitantly. In addition, the oxidative damage caused by nano-sized TiO₂ particles (21nm and 60nm) was greater than micro-sized particles. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities of the algal cells had different response under the stress of TiO₂ particle with different size. This study shed new light on the assessment of ecological toxicity of engineered nanomaterials.

Key words: TiO₂; *Nitzschia closterium*; nanoparticles; marine microalga; antioxidant enzyme; toxic effect