

纳米二氧化铈对斜生栅藻的毒性研究

钟 秋, 何 桢, 戴安琪, 张 灿, 杨 雪, 胡晓静, 郭 佳, 熊 丽*, 刘德立

(湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘 要:实验研究了纳米二氧化铈(CeO_2)对斜生栅藻的毒性效应。结果显示,当纳米二氧化铈浓度为 $5, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对斜生栅藻的生长有促进作用($P < 0.01$),其促进作用随着浓度增大而减小;至浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,开始变为抑制效应;当浓度达到 $100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,表现出显著的抑制作用($P < 0.01$),且抑制作用随着浓度增大而增大。光镜拍照和藻细胞直径的变化表现出,随着处理浓度的增大,细胞有小型化的趋势。处理 7 d 后,纳米二氧化铈对叶绿素和 SOD 含量的影响和对藻密度的影响一致,而对 MDA 含量的影响刚好相反,说明细胞膜发生了不同程度的脂质过氧化反应。

关键词:纳米二氧化铈;斜生栅藻;光合色素;超氧化物歧化酶(SOD);丙二醛(MDA)

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)02-0299-07

Toxicities of Nanoparticulate CeO_2 on *Scenedesmus Obliquus* Kütz

ZHONG Qiu, HE Zhen, DAI An-qi, ZHANG Can, YANG Xue, HU Xiao-jing, GUO Jia, XIONG Li*, LIU De-li

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: China contains the most rare earth resources in the world. Thus, it may provide a reliable basis for the use of rare earth materials. The nanoparticulate CeO_2 is widely used in numerous areas such as fuel batteries and gas sensors due to its good electrical and optical properties. However, the potential for the release of CeO_2 nanoparticles into the environment is also increasing. The possibility of water resources and soils being contaminated by the discharge of CeO_2 nanoparticles arouses more and more concern. This study was designed to test the CeO_2 nanoparticle's toxicity effects on aquatic ecosystems. *S. obliquus* was exposed to a series of CeO_2 concentrations ($0, 5, 10, 50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Five parameters were measured after 7 days of exposure which were growth rate, cell diameter, superoxide dismutase (SOD), photosynthetic pigments and free malondialdehyde (MDA). It was shown that nanoparticulate CeO_2 concentrations of $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ caused a significant increase in growth, while $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of nanoparticles started to inhibit the growth and high concentrations of $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly inhibited the growth. As the concentration increased, the stimulative effect was reduced and the inhibition effect was enhanced. The influence on the chlorophyll and SOD contents was consistent with that of cell growth, while the influence on the MDA contents was opposite with that of SOD indicating that varying degrees of lipid peroxidation occurred in the cell membrane. Optical microscopy images and changes in the diameter of the *S. obliquus* cells illustrated that with the increase of the concentration of the Cerium(IV) oxide nanoparticles, there was a tendency of miniaturization of the cells. This study contributes to the research on the toxicological effects of nanomaterials and can provide references for the risk assessments on issues concerning nanomaterial research.

Keywords: cerium(IV) oxide nanoparticle; *Scenedesmus obliquus*; photosynthesis pigments; SOD; MDA

我国是稀土资源最丰富的国家,稀土储量和产量均居世界首位,稀土纳米材料的开发应用,开辟了稀

土资源有效利用。纳米二氧化铈具有晶型单一、电学性能和光学性能良好等优点,因此被广泛应用于 SOFCs 电极、光催化剂、防腐涂层、气体传感器、燃料电池、离子薄膜等方面,是用途最广泛的纳米稀土材料^[1]。随着纳米二氧化铈在工农业生产和日常生活中的应用日益广泛,它将不可避免地进入环境和食物链中,因而人类终将面临纳米二氧化铈的安全问题。

收稿日期:2011-08-01

基金项目:国家自然科学基金(30771429,31071653);教育部留学归国人员科研基金

作者简介:钟 秋(1988—),女,湖北随州人,在读硕士研究生,研究方向为环境毒理学。

* 通讯作者:熊 丽 E-mail:xianglily@mail.ccnu.edu.cn

目前关于纳米二氧化铈的生物效应研究的报道并不多见。据路凯等^[2]研究发现,二氧化铈纳米颗粒对小鼠肺和肺外靶器官有不同程度的损伤,且该颗粒可通过嗅神经通路进入脑部,引起脑部(嗅球)丙二醛(MDA)升高。陈陵等^[3]研究发现纳米二氧化铈对雄性小鼠的脑、睾丸、心脏有一定的毒性作用。另有实验研究^[4]证实 Ce(IV)处理的海水会导致海胆(*Paracentrotus lividus*)胚胎细胞产生生长缺陷,影响其受精成功率,甚至直接导致胚胎细胞的死亡。

藻类作为水生生态系统的初级生产者,其种类的多样性和初级生产量直接影响水生生态系统的结构功能,因而成为检测评价水环境质量的重要指标^[5]。斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)对毒物敏感、个体小、繁殖迅速、培养方便,生长状况在一定程度上能反映水环境质量,并且在较短的时间内,可得到被测化学物质对其世代及种群水平的影响评价,是一种较常使用的测试生物。目前,纳米二氧化铈对藻的影响还未见报道。因此,选择常见的浮游藻类斜生栅藻作为实验生物,就纳米二氧化铈对其毒性效应进行研究,为纳米二氧化铈的安全评估提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

实验材料:纳米二氧化铈(Cerium(IV)oxide, <25 nm Sigma);斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)由中国科学院武汉水生生物研究所藻种库提供(No. FACHB39),并经室内扩大培养用于实验。斜生栅藻的培养基为 HB-4 培养基^[6],所有试剂均为分析纯。

实验仪器:5415R 高速冷冻离心机(Eppendorf),酶标仪(BIO-TEC),光照培养箱(武汉瑞华仪器设备有限公司 HP300GS-C 型),粒度计数仪(BACKMAN),超声波清洗器(KQ-250B 型,昆山市超声仪器有限公司),荧光显微镜(LEICA, DM400B)。

1.2 实验方法

1.2.1 驯化培养

将斜生栅藻在无菌条件下转移至 HB-4 人工培养液中,于光照培养箱中驯化培养 1 周,至对数生长期进一步扩大培养。培养条件为:温度(25±0.5)℃, pH 7~8;明暗周期比 12 h:12 h,光强 3 000 lx,静置培养,每日定时人工摇动 3 次^[7]。

1.2.2 制备纳米二氧化铈悬浮液

将纳米 CeO₂ 加入到灭菌的 HB-4 培养液中,配制成 5 000 mg·L⁻¹ 的母液,实验处理前置于超声仪中

超声处理 15 min,使悬浊液稳定均匀。

1.2.3 纳米 CeO₂ 对斜生栅藻生长的影响

将处于对数生长期的斜生栅藻接种于灭菌的 HB-4 人工培养液中,起始藻密度均为 1.1×10⁶ 个,设置 5 个纳米 CeO₂ 浓度梯度(5、10、50、100、200 mg·L⁻¹)和一个对照组,每个浓度设 3 个平行组。每隔 24 h 取样测定藻细胞密度和大小。

1.2.4 光合色素的测定

处理第 7 d 时,取 20 mL 藻液,5 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min 收集藻细胞,转移到 10 mL 的试管中,加入 5 mL 80% 的丙酮,在黑暗处抽提 24 h 后,充分混匀,以 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液置于酶标 96 孔板中,以 80% 丙酮为参比,用酶标仪测定 OD₆₆₃、OD₆₄₅、OD₄₃₀ 值。光合色素的含量计算公式如下^[8]:

$$C-a=12.21 \times OD_{663} - 2.81 \times OD_{645}$$

$$C-b=20.13 \times OD_{645} - 5.03 \times OD_{663}$$

$$C-k=(1\,000 \times OD_{430} - 3.27 \times C-a - 104 \times C-b)/229$$

C-a 为叶绿素 a; C-b 为叶绿素 b; C-k 为类胡萝卜素。

并以 80% 的丙酮作为参比,测定 300~800 nm 波长范围内叶绿素的连续吸收光谱。

1.2.5 粗酶液的提取

取 100 mL 藻液于冷冻离心机在 4℃、5 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min 收集藻细胞,分别用磷酸缓冲溶液(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.8)润洗藻细胞 3 次,每组中加入预冷的磷酸缓冲溶液 0.8 mL(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.8)和少量的石英砂在液氮条件下充分碾磨,将匀浆液在 4℃ 下 8 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液并记下总体积,冷冻保存以备后面测指标使用^[7]。

1.2.6 SOD 的测定

采用 Beachamp^[9]建立的 Bewley^[10]改良的氮蓝四唑(NBT)光化学还原反应法。酶活力单位定义为能引起反应初速度(不加酶时)半抑制时的酶用量。蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定^[11],以小牛血清蛋白作标准曲线。

1.2.7 MDA 的测定

参照 Heath^[12]和林植芳等^[13]的方法,采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定。

1.3 实验数据处理

每组实验均设计 3 组平行,实验数据处理采用 Origin 6.1 和 SPSS Statistics 13.0 统计分析软件,进行 *t* 检测和差异显著性分析并绘图。以下各图中 * 和 ** 分别表示和对照组相比 *P*<0.05(差异显著)和 *P*<0.01

(差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 纳米二氧化铈对斜生栅藻生长的影响

图1表示不同浓度纳米二氧化铈对斜生栅藻的生长影响。由图1看出,空白对照组和实验组的细胞均呈现S型生长曲线。在细胞培养的前2 d,各个浓度的纳米二氧化铈溶液均对藻细胞的生长没有表现出明显的影响作用。第5 d时,高浓度组(100 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)开始对藻的生长表现出明显的抑制作用($P<0.01$),且抑制作用随着浓度增大而增大,至第7 d时其细胞数与对照组相比分别下降了6.4%和15.1%;而低浓度组(5 、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)则表现出促进作用($P<0.01$),且促进作用随着浓度增大而减小,至第7 d时与对照组相比其细胞数分别增加了9.8%和5.9%。处理浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其生长趋势与空白组基本持平,没有显示出明显的促进或抑制作用。

图2表示不同浓度纳米二氧化铈对斜生栅藻的细胞粒径影响。由图2看出,随着处理天数的增加,浓

度为 50 、 100 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纳米二氧化铈作用下的细胞粒径减小的幅度相对空白对照组逐渐增大($P<0.01$),而低浓度 5 、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的细胞相对空白对照则无明显变化。说明较高浓度的纳米二氧化铈有使细胞小型化的趋势。

2.2 纳米二氧化铈对斜生栅藻光合色素含量的影响

图3表示用不同浓度纳米二氧化铈对斜生栅藻处理7 d后,光合色素含量受到的影响。从图3可知,在纳米二氧化铈浓度为低浓度 5 、 10 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各种色素的含量与对照组相比都有所增加($P<0.01$),其促进作用随着浓度增大而减小;当纳米二氧化铈浓度为高浓度 100 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其对藻的生长变为抑制作用,且随着处理浓度的增加,抑制作用显著增加($P<0.01$)。表现出低浓度纳米二氧化铈促进光合色素的合成,而高浓度则抑制光合色素的合成,表现出剂量-效应关系。在这3种色素中,纳米二氧化铈对叶绿素a的影响最大,在高浓度 100 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶绿素a相对于对照组分别下降了23.0%($P<0.01$)和67.4%($P<0.01$)。

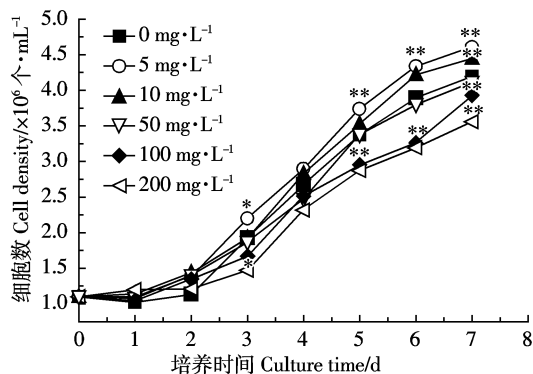


图1 纳米二氧化铈对斜生栅藻生长的影响

Figure 1 Effects of CeO_2 nanoparticles on growth of *S. obliquus*

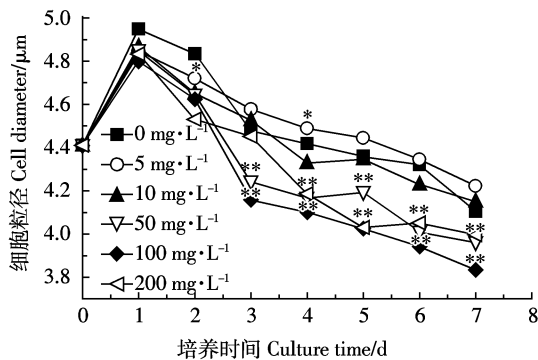


图2 纳米二氧化铈对斜生栅藻细胞粒径的影响

Figure 2 Effects of CeO_2 nanoparticles on the cell diameter of *S. obliquus*

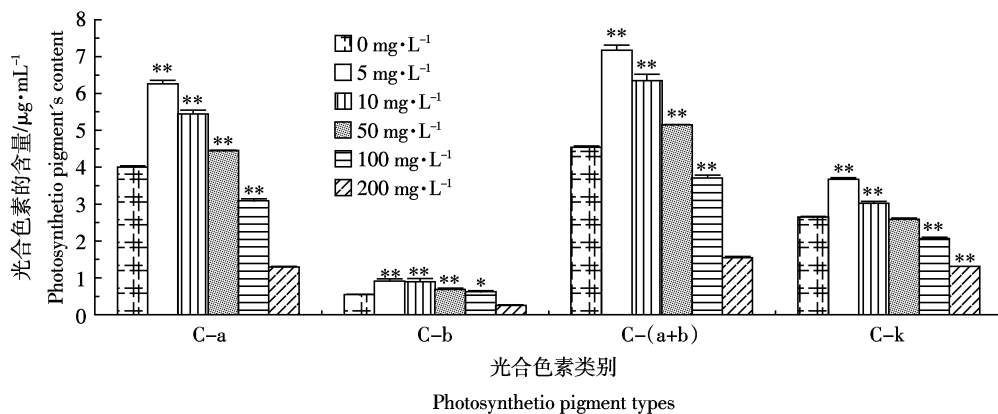


图3 纳米二氧化铈对斜生栅藻光合色素含量的影响

Figure 3 Effects of CeO_2 nanoparticles on the photosynthetic pigment content of *S. obliquus*

图 4 表示纳米二氧化铈对斜生栅藻处理 7 d 后对其吸收光谱的影响。处理 7 d 后,各浓度组的吸收光谱谱带相似,在蓝光区 430 nm 处和红光区 663 nm 处均出现明显的吸收峰,其分别为叶绿素 a、b 的特征吸收峰。不同处理浓度组明显影响了吸收峰值的大小,其结果和光合色素含量的变化是一致的。

2.3 纳米二氧化铈对斜生栅藻 SOD 活性和 MDA 含量的影响

图 5 表示处理 7 d 后,纳米二氧化铈对斜生栅藻 SOD 和 MDA 含量的影响。由图可看出,与对照组相比,低浓度组(5 、 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)及中浓度组(50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 SOD 含量分别增加了 77.4% 、 57.3% ($P<0.01$) 和 38.8% ($P<0.01$),其对应的 MDA 则分别降低了 55.0% ($P<0.01$)、 2.1% 和 2.9% ;而高浓度组(100 、 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 SOD 含量与对照组相比则分别下降了 13.1% ($P<0.05$) 和 18.0% ($P<0.01$),其 MDA 则分别上升了

78.1% ($P<0.01$) 和 108.3% ($P<0.01$)。

2.4 纳米二氧化铈对斜生栅藻细胞形态的影响

图 6 和图 7 为处理 7 d 后,在扫描电镜和光镜下拍摄到斜生栅藻细胞形态的变化。正常条件下生长的斜生栅藻为真性定形群体,细胞呈纺锤形,两端尖细,群体由 4 个或 8 个细胞组成,长轴平行排列在一个平面上^[14],如图 6-A。实验过程中每日定时摇动 3 次,使其呈单细胞如图 7-a 所示,与对照组 a 相比,低浓度组(图 b)中的纳米二氧化铈团聚物分散在藻细胞中,并与少量的细胞接触;随着纳米二氧化铈浓度的增大,其所形成的团聚物也倾向于将更多的细胞包埋其中(图 c、d),在图 6 中可以清晰看到与对照图 6-A 相比,图 6-B 的斜生栅藻细胞被纳米二氧化铈颗粒所包埋。在图 7 中,有个别高浓度组能观察到畸形细胞,并且细胞也逐渐变得更小且不饱满,这与由细胞直径变化所表明的随着处理浓度的升高,细胞变得小型化

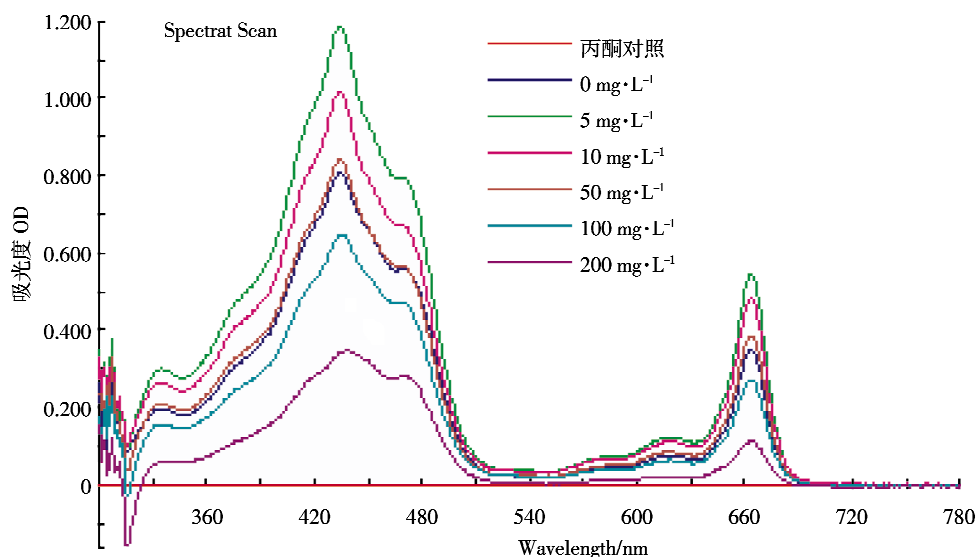


图 4 纳米二氧化铈对斜生栅藻吸收光谱的影响

Figure 4 Effects of CeO_2 nanoparticles on the absorption spectrum of *S. obliquus*

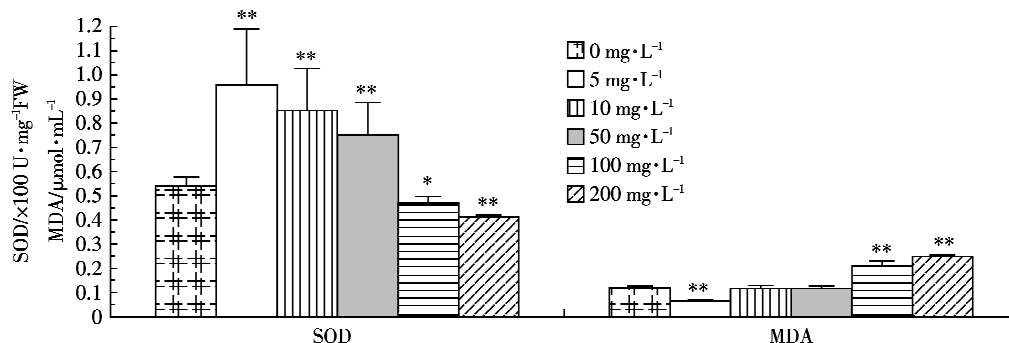


图 5 纳米二氧化铈对斜生栅藻 SOD 和 MDA 含量的影响

Figure 5 Effects of CeO_2 nanoparticles on the SOD and MDA contents of *S. obliquus*

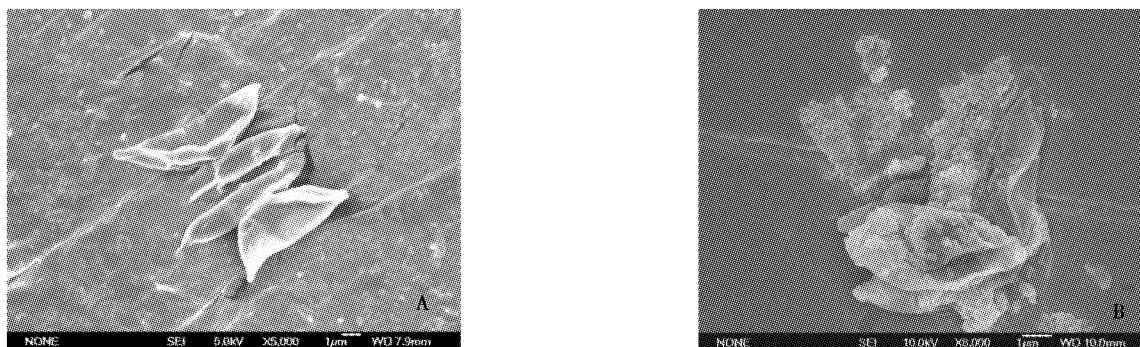
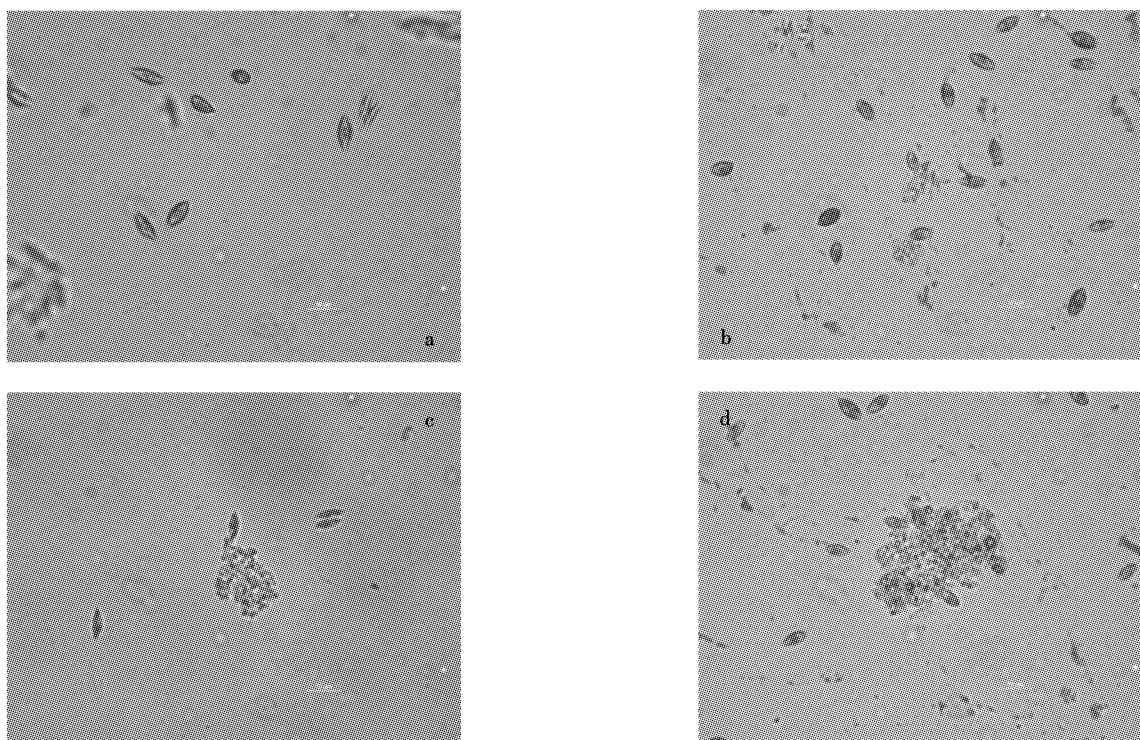


图 6 扫描电镜拍照培养 7 d 后的斜生栅藻细胞(A:0 mg·L⁻¹ B:200 mg·L⁻¹)

Figure 6 Scanning electron microscopy(SEM) images of *S.obliquus* cells after 7 days exposure (A:0 mg·L⁻¹ B:200 mg·L⁻¹)



a、b、c、d 的二氧化铈浓度分别为 0、5、50、200 mg·L⁻¹, 标尺: 10 µm

CeO₂ nanoparticles concentrations of a, b, c, d are 0, 5, 50, 200 mg·L⁻¹, respectively. bar: 10 µm

图 7 光镜拍照培养 7 d 后的斜生栅藻细胞

Figure 7 Light microscopy images of *S.obliquus* cells after 7 days exposure

的结果是一致的。

3 讨论

藻类的生长实验结果可用于评价受试物对藻类的短期暴露效应,反映受试物对水体中初级生产营养级的影响^[15]。在本实验的生长抑制测试中,低浓度的纳米二氧化铈(5、10 mg·L⁻¹)均对藻细胞的生长具有促进作用($P<0.01$),而到第 5 d,高浓度组(100、200 mg·L⁻¹)对藻细胞的生长表现出显著的抑制效应($P<$

0.01),并且使藻细胞小型化,表现出低浓度促进、高浓度抑制效应。

关于纳米二氧化铈对藻的毒性效应,Karen Van Hoecke 等^[16]提出了 5 个假设:(1)纳米二氧化铈的聚集导致藻细胞聚集,造成仪器测量到细胞数下降的假象;(2)纳米二氧化铈颗粒能够进入藻细胞,或者其吸附在藻细胞表面,对藻细胞产生了不利影响;(3)从纳米 CeO₂ 中解离出 Ce³⁺,从而对藻细胞产生毒性效应;(4)纳米 CeO₂ 吸附培养液中的铵盐和磷酸盐造成藻

类的营养缺失;(5)纳米 CeO_2 的遮光效应抑制了藻类的光合反应。对应这 5 个假设,Karen Van Hoecke 等分别设计相应的实验加以验证,结果否定了假设(1)(2)(4),假设(5)的毒性效应也可忽略,而假设(3)可以成为致毒原因之一。

在本实验中,低浓度的纳米二氧化铈对斜生栅藻产生促进作用可能是由于其解离出的少量 Ce^{3+} 对斜生栅藻产生了如下作用:(1)营养作用,即低浓度的稀土元素可能作为生物生长的营养元素起促进作用,或是增加细胞对其他营养元素的摄取而加速生物生长;(2)应激反应^[16],即低浓度的稀土具有促进生物生长的作用^[17]。斜生栅藻在受到外界不利因素的影响时,具有抵抗及适应抑制作用的机制^[18],这与稀土元素生物效应中的 Hormesis 效应相吻合^[19]。

光合色素是客观反映植物利用光照能力的一类重要指标,往往可以作为判断植物光合生理能力、反映环境胁迫状况的重要指标。不同植物具有不同的光合色素含量特征,植物光合色素因环境变化和生长发育阶段的不同而变化^[20]。本实验中斜生栅藻的光合色素含量在纳米二氧化铈浓度为 5、10、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时均要高于对照组,且对斜生栅藻生长的促进作用随着浓度增大而减小;高浓度时(100、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)则显著地抑制光合色素的合成($P < 0.01$),且对叶绿素 a 的抑制作用最为明显。这可能是因为高浓度纳米二氧化铈暴露下,细胞内活性氧的积累导致叶绿体结构破坏,叶绿素合成受阻。而叶绿素 a 对纳米二氧化铈最为敏感,原因可能是叶绿素 a 作为捕光色素复合体重要组成部分,在光合系统 PS II 的反应中心中,作为光合电子传递链的电子供体,与其他光合色素相比,更容易受到光降解作用的影响^[21]。

逆境胁迫下,植物体内会积累大量的 ROS,对细胞造成危害,而 SOD 作为清除活性氧的关键酶,其活性的变化可以反映出植物受胁迫的程度。MDA 在细胞内的积累通常被用来作为细胞在受到胁迫时脂质过氧化的重要指标。在本实验中,低浓度和中浓度处理的斜生栅藻 SOD 含量均高于对照组,高浓度组的 SOD 含量显著低于对照组,而其 MDA 含量则正好相反。可能是在低浓度处理时,斜生栅藻光合作用的增强使得细胞内活性氧的积累,而为了降低活性氧对机体的损伤,藻细胞产生更多的 SOD 来清除过多的活性氧,使活性氧在体内保持平衡状态。而高浓度时,藻细胞受到的伤害超出了自身所能调节的范围,SOD 含量显著下降,同时 MDA 含量显著上升,表明细胞膜

受到了严重的损伤。有研究^[22]对比了纳米和微米级别的二氧化铈对近头状伪蹄形藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)的毒性效应,证实其机理可能正是因为光照条件刺激了二氧化铈颗粒的光催化活性,导致产生羟基自由基,并发生一种植物模式脂肪酸的过氧化反应。这些发现表明二氧化铈对近头状伪蹄形藻的抑制效应模式是由一种细胞-颗粒作用作为中介的,而这种相互作用又会导致细胞膜的损坏。这种效应极有可能是由光化学反应诱导的,并在二氧化铈颗粒大小为纳米级别的时候得到增强。

4 结论

本实验结果显示纳米二氧化铈在较低浓度时能促进斜生栅藻的生长,至中浓度(50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时开始变为抑制作用,高浓度(100、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时表现出显著的抑制作用;处理 7 d 后斜生栅藻光合色素、SOD、MDA 含量也出现相应变化,表明高浓度的纳米二氧化铈对斜生栅藻的光合作用及细胞膜等均产生了损伤;光镜拍照及细胞直径的变化表明斜生栅藻细胞出现了小型化的趋势。

纳米二氧化铈对斜生栅藻细胞表面的吸附作用和遮光效应以及解离出的 Ce^{3+} 可能是其对斜生栅藻的致毒原因,其具体作用机制还有待进一步研究。但是纳米二氧化铈作为一种新型的广泛使用的材料,其对水环境的潜在危害不容忽视,相关部门在制定纳米二氧化铈的安全标准时应当慎重考虑。

参考文献:

- [1] 张敬超,张玉军,谭砂砾,等. 纳米二氧化铈的制备与应用[J]. 现代化工, 2004, 24(1): 233-235.
ZHANG Jing-chao, ZHANG Yu-jun, TAN Sha-li, et al. Preparation and application of nanometer ceric oxide[J]. *Modern Chemical Industry*, 2004, 24(1): 233-235.
- [2] 路 凯. 纳米二氧化铈水环境行为及其与纳米氧化铈对于小鼠呼吸暴露毒性研究[D]. 广州:华南理工大学, 2009.
LU Kai. Behavior of ceria nanoparticles in aquatic ecosystems & inhalation toxicity of ceria and ytterbia nanoparticles to ICR mice [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2009.
- [3] 陈 陵,赵学成,邓 琼. 纳米氧化铈急性染毒对雄性小鼠体重和脏器系数及血常规的影响[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(10): 899-900.
CHEN Ling, ZHAO Xue-cheng, DENG Qiong. The effects of nano cerium oxide acute poisonous to male mice's weight, organcoefficient and the blood routine[J]. *Journal of Environment and Health*, 2010, 27(10): 899-900.
- [4] Oral C, Bustamante P, Warnau M. Cytogenetic and developmental toxicity of cerium and lanthanum to sea urchin embryos[J]. *Chemosphere*, 2010,

- 81:194-198.
- [5] 陈雷, 郑青松, 刘兆普, 等. 不同 Cu^{2+} 浓度处理对斜生栅藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. 生态环境学报, 2009, 18(4):1231-1235.
CHEN Lei, ZHENG Qing-song, LIU Zhao-pu, et al. Effects of different concentration of copper ion on the growth and chlorophyll II fluorescence characteristics of *Scenedesmus obliquus* L[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(4):1231-1235.
- [6] 黎尚豪, 朱惠, 夏宜峥. 单细胞绿藻的大量培养试验[J]. 水生生物学集刊, 1959(4):463-472.
LI Shang-hao, ZHU Hui, XIA Yi-zheng. Single cell green algae batch-culture[J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1959(4):463-472.
- [7] 何楨, 胡晓静, 牟文, 等. 三聚氰胺对斜生栅藻的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(8):1455-1459.
HE Zhen, HU Xiao-jing, MOU Wen, et al. Melamine toxicity of *Scenedesmus Obliquus* Kütz[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(8):1455-1459.
- [8] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
LI He-sheng, SUN Qun, ZHAO Shi-jie. Manual book of botanical physiology and biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003.
- [9] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel[J]. *Anal Biochem*, 1971, 44:246-278.
- [10] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30:195-238.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [12] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 125:189-198.
- [13] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6):605-615.
LIN Zhi-fang, LI Shuang-shun, LIN Gui-zhu, et al. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice on leaves[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1984, 26(6):605-615.
- [14] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
ZHANG Zong-she, HUANG Xiang-fei. Research methods of fresh water plankton[M]. Beijing: Science Press, 1991.
- [15] 朱小山, 朱林, 田胜艳, 等. 三种金属氧化物纳米颗粒的水生态毒性[J]. 生态学报, 2008, 28(8):3507-3516.
ZHU Xiao-shan, ZHU Lin, TIAN Sheng-yan, et al. Aquatic ecotoxicities of nanoscale TiO_2 , ZnO and Al_2O_3 water suspensions [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8):3507-3516.
- [16] Karen Van Hoecke. Fate and effects of CeO_2 nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43:4537-4546.
- [17] 饶本强, 黄斌, 张列宇, 等. 稀土元素 Ce 对爪哇伪枝藻盐胁迫耐受性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(9):1693-1701.
RAO Ben-qiang, HUANG Bin, ZHANG Lie-yu, et al. Effects of cerium on the endurance of salt stress of *Scytonema javanicum* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(9):1693-1701.
- [18] Chenxi Wei. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedesmus obliquus* [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(1):155-160.
- [19] 李哲, 蔡明刚, 等. 稀土元素 Ce 对雨生红球藻生长及虾青素积累影响的研究[J]. 海洋科学, 2008, 32(9):37-40.
LI Zhe, CAI Ming-gang, et al. Effects of cerium on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(9):37-40.
- [20] 石磊, 刘伟才, 何红燕. 不同培养液中 3 种藓类光合色素含量比较[J]. 山地农业生物学报, 2009, 28(2):175-179.
SHI Lei, LIU Wei-cai, HE Hong-yan. Photosynthetic pigment contents of three bryophytes compared in the different media[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2009, 28(2):175-179.
- [21] 刘涛, 熊丽, 生秀梅. 高效氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(17):37-39.
LIU Tao, XIONG Li, SHENG Xiu-mei. Study on the toxicity of beta-cypermethrin to *Scenedesmus Obliquus* [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2006, 23(17):37-39.
- [22] Rogers N J, et al. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nano-particulate CeO_2 in freshwater[J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 7(1):50-60.