第 31 卷 第 1 期　　水 生 生 物 学 报　　Vol. 31, No. 1
2007 年 1 月　　ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA　　Jan., 2007

Cu、Zn 在黑藻叶片中的富集及其毒理学分析

徐勤松　施国新　许丙军　吴国荣　胡金朝
(南京师范大学生命科学学院, 南京　210097)

摘要: 本文以分布广泛的沉水植物 ——黑藻为研究对象, 在人工模拟的含不同浓度的 Cu、Zn 污水中培养 7d, 研究了 Cu、Zn 在黑藻体内的富集及部分毒理学影响。研究表明: 黑藻对 Cu 和 Zn 都有较强的富集作用, 黑藻叶片中的 Cu、Zn 含量都随介质中金属浓度的增大而呈增长趋势, 统计分析都达到极显著正相关 ($R_{Cu} = 0.9875$, $P < 0.01$; $R_{Zn} = 0.9990$, $P < 0.01$)。但黑藻对 Cu、Zn 吸收和积累能力 (以富集系数表示) 不同: 对 Cu 的富集系数为 571 —1328; 对 Zn 的富集系数为 346 —830。这表明黑藻对 Cu 的吸收能力大于 Zn, 而富集系数随外界浓度的增大而下降, 则说明较低处理浓度更有利于黑藻对金属元素的吸收。逐步提取法分析表明黑藻体内 Cu 是 2 %醋酸提取态最多, 而 Zn 是以 1mol/L 的 NaCl 溶液提取态占优势。各结合形态的含量多少依次为: Cu: $F_{HAc} > F_{HCl} > F_{NaCl} > F_{Water} > F_{Ethanol} > F_{Residue}$; Zn: $F_{NaCl} > F_{HAc} > F_{HCl} > F_{Ethanol} > F_{Residue} > F_{Water}$。激光共聚焦扫描显微镜观察结果显示 Cu、Zn 污染后黑藻叶片自发荧光范围变窄, 峰值变小, 平均强度减小。扫描电镜和透射电镜观察发现, 黑藻叶细胞形态和结构发生了较明显的变化, 主要表现为: 细胞壁扭曲, 细胞变形; 细胞核核仁解体, 染色质凝集, 核膜断裂; 叶绿体类囊体膨胀, 被膜破裂; 线粒体嵴数目减少, 线粒体呈空泡状。结果表明, Cu、Zn 在黑藻叶中富集得越多, 造成的毒害越重, 剂量效应非常明显。

关键词: 黑藻; Cu; Zn; 富集; 毒理学
中图分类号: X173　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2007)01-0001-08

水体重金属污染所造成的环境问题日益引起人们的关注[1—8]。其中, Cu、Zn 是兼具营养和毒害的重金属元素, 一方面, 它们是植物正常生长所必需的微量营养元素; 另一方面, 当环境中的浓度超过一定范围后, 则和 Cd、Hg 等一样对植物产生不良影响 (毒性系数: Cu = 5; Zn = 1)[9]。我们发现, 和 Cd 一样, 作为过渡金属元素, Cu 和 Zn 对黑藻体内的氧化还原酶系统都有较强的抑制作用, 使活性氧的产生速率明显上升[10], 显示出 Cu 和 Zn 诱导对黑藻的氧化胁迫。同时, 水生植物对金属元素的净化作用被认为对人类健康和环境保护都特别重要, 有研究指出金鱼藻对水体中的 Cu、Zn 和 Pb[6,8], 浮萍对 Cd 和 Cu[7]都有较强的清除效果。我们的研究也证实黑藻对 Cd 有明显的富集作用[5]。然而有关 Cu 和 Zn 在黑藻体内的富集及其所造成的毒害影响的报道尚不多见。因此, 在前文研究的基础上, 本文继续以黑藻为材料, 主要研究了 Cu 和 Zn 在黑藻体内的富集情况; 同时用逐步提取法分析了 Cu 和 Zn 在黑藻体内的化学形态; 用激光共聚焦扫描显微镜观察了 Cu 和 Zn 胁迫后叶片自发荧光的变化; 用扫描电子显微镜观察了 Cu 和 Zn 处理所引起的叶细胞表观形态的变化, 并用 X-射线扫描能谱分析了 Cu 和 Zn 在黑藻单个叶片中的相对含量, 最后用透射电镜观察了 Cu 和 Zn 所造成的超微结构损伤。本文旨在探讨沉水植物对水体重金属的净化潜力, 同时也为丰富重金属的水生植物毒理学提供更多的资料。

1　材料与方法

1.1　植物材料　黑藻 (*Hydrilla verticillata* (*L. f.*) Royle) 采自江苏省苏州市东山镇太湖水域, 后将其移种于南京师范大学水生植物培育池中, 2003 年 9 月 (20 —25 ℃), 选取长度为 10cm 左右的植株作为实

收稿日期: 2005-02-01; **修订日期**: 2006-03-22
基金项目: 国家自然科学基金 (30370083); 江苏省教育厅自然科学基金 (05KJB180067); 江苏省重点实验室开放基金及南京师范大学科研启动基金共同资助
作者简介: 徐勤松 (1976 —), 山东省临沭县人; 博士, 助研; 主要研究重金属对水生植物的毒害机制
通讯作者: 徐勤松, E-mail: xuqinsong@njnu.edu.cn

验材料。

1.2 材料处理 将受试材料先在实验室无底泥玻璃缸中驯化培养 2d 后,于上午 8:00 在 4 个玻璃缸(2L)中一次性施入 0.5mg/L、1mg/L、5mg/L 和 10mg/L 的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$(AR)(以纯 Cu 计),在另 4 个玻璃缸中加入相同浓度的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(AR)(以纯 Zn 计)。另以不额外加 Cu、Zn 的作为对照。对照和实验组皆用 1/20 Hoagland 培养液配制。全部玻璃缸置于 Forma 3744 培养箱中,光周期:12h∶12h,温度:25—18 ℃,光照强度为 70μmol/m^2·s。每隔 2d 更换一次溶液,第 7d 上午 8:00 取叶片进行分析。

1.3 金属含量的测定 用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP)(Leeman 公司)测定。

1.4 金属形态分析 逐步提取法,提取剂及提取方法同前文[5]。

1.5 自发荧光强度的检测 根据我们前文报道的方法[3],取倒数第 3 叶,在 Bio-Rad 公司 MRC-1024 激光共聚焦扫描显微镜下用 Kr/Ar 激光器观察记录,激发波长为 488nm,发射波长为 522—35nm,孔径为 8.0,电压为 1288V。观察结果用 Lasersharp 软件进行数字化分析[10]。

1.6 细胞形态观察 第 7d 上午 8:00 从各培养缸中取植株倒数第 3 叶中段,样品真空干燥,JEOL5610LV 高分辨率扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司)进行表面形态扫描,JSM-5000 软件成像分析。VANTAGE 型 X 射线能谱仪(美国 Noran 公司)能谱扫描,工作条件:工作距离:20mm;电压:15kV;加速电压:20kV;束斑:35。系统自带 Spectral Display 软件对元素相对含量进行分析。

1.7 超微结构观察 第 7d 上午 8:00 从各培养缸中取植株倒数第 3 叶中段,2.5 %戊二醛和 1 %锇酸,4 ℃双重固定 2h,丙酮系列脱水,Epon 812 包埋,LKB 超薄切片机切片,厚度为 70nm,切片经柠檬酸铅-醋酸双氧铀双重染色后,于 Hitachi 600-A-2 透射电镜(日本日立公司)下观察并拍照。

1.8 数据分析 实验重复 3 次,通过计算机软件对相关数据进行相关系数分析(R),以 $P < 0.05$ 为差异显著,$P < 0.01$ 为差异极显著。以鲜重作为单位。

2 结果与分析

2.1 Cu、Zn 在黑藻叶中的富集

Cu 和 Zn 都是植物正常生长所必需的微量营养元素,由图 1 可知,正常情况下,它们在黑藻体内的含量都比较低。当培养液中加入不同浓度的 Cu 和 Zn 后,植物体内的金属含量随介质金属浓度的升高呈线性增长趋势。就 Cu 而言,植物体内的含量分别是对照植株含量的 172.47 倍(0.5mg/L),256.36 倍(1mg/L),984.68 倍(5mg/L)和 1484.16 倍(10mg/L)。黑藻对 Zn 富集略弱于 Cu,体内的含量依次为对照的 5.08 倍(0.5mg/L),6.49 倍(1mg/L)、22.11 倍(5mg/L)和 42.35 倍(10mg/L)。统计分析表明黑藻对 Cu 和 Zn 的积累与处理浓度间都达到极显著正相关,相关系数 $R_{Cu} = 0.9875$,$P < 0.01$;$R_{Zn} = 0.9990$,$P < 0.01$。

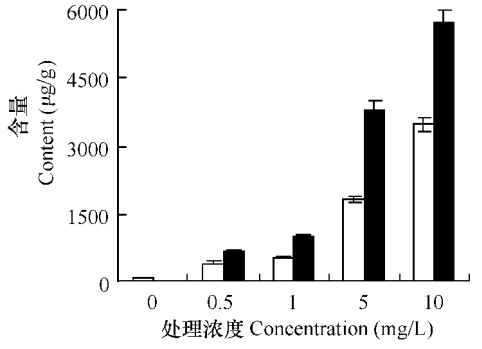


图 1 黑藻体内的 Cu 和 Zn 含量(均值 ±标准离差)(n = 3)

Fig. 1 Content of Cu & Zn in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle

$y_{Zn} = 814.76x - 1185.7$

$y_{Cu} = 1454.7x - 2132.2$

□Zn ■Cu

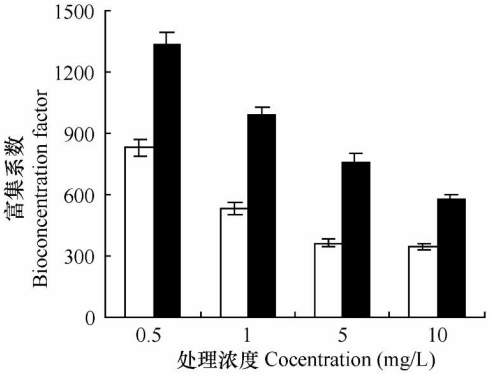


图 2 黑藻对 Cu 和 Zn 的富集系数

Fig. 2 The bioconcentration factor of Cu & Zn in *H. verticillata*

$y_{Zn} = -162.08x + 922$

$y_{Cu} = -248.48x + 1531.5$

□Zn ■Cu

水生植物对金属的富集能力可以用富集系数,即植物体内某元素的含量与水体中该元素含量的比值表示。本实验中,黑藻对 Cu 和 Zn 的富集系数都是在 0.5mg/L 浓度时最大,分别是 1328 和 830。后随浓度升高,富集系数逐渐变小(图 2)。说明黑藻对二者的吸收机能受到障碍,这也可能与毒害作用

所引起的功能性损伤有关。统计分析表明黑藻对 Cu 的富集系数达到显著负相关($R = -0.8968$, $P < 0.05$)。相比之下,黑藻对 Cu 的富集能力强于 Zn。

2.2　Cu、Zn 在黑藻体内的化学形态

从表 1 看出,正常情况下,黑藻体内 Cu 的各种结合形态所占总 Cu 的比例都超过 10 %,其中最多的是用 1mol/L NaCl 提取的 Cu,为 24.20 %,最少的是去离子水提取态,占到总量的 13.36 %。而 Cu 毒害后,各结合态含量都有不同程度的上升,而所占比例则有升有降。其中 2 %醋酸提取态含量增多,占总量的 27.64 %。而 80 %乙醇态和残渣态的含量分别只有 5.67 %和 4.97 %。各形态 Cu 的排列顺序也发生改变,由对照植株中的 $F_{NaCl} > F_{Ethanol} > F_{HCl} > F_{Residue} > F_{HAc} > F_{Water}$变为 $F_{HAc} > F_{HCl} > F_{NaCl} > F_{Water} > F_{Ethanol} > F_{Residue}$。

与 Cu 不同(见表 2),对照植株中 2 %醋酸提取态的 Zn 最多,占比例为 27.48 %,然后依次为 NaCl 提取态、残渣态、乙醇提取态、HCl 提取态和水提取态。施加 10mg/L Zn 后,各提取态的含量都有一定增长,所占比例也发生较大变化。含量最多的为 NaCl 提取态,占到 35.75 %,醋酸提取态 Zn 也达到总量的 31.22 %,而乙醇提取态、残渣态和水提取态都有所下降,分别为 7.76 %、6.17 %和 4.23 %。Zn 的排列顺序也发生改变,正常植株中为 $F_{HAc} > F_{NaCl} > F_{Residue} > F_{Ethanol} > F_{HCl} > F_{Water}$,水体中施加 Zn 后变为 $F_{NaCl} > F_{HAc} > F_{HCl} > F_{Ethanol} > F_{Residue} > F_{Water}$。

表 1　黑藻体内不同 Cu 化学形态的含量 (μg/g·FW) (均值 ±标准离差) (n = 3)

Tab.1　Contents of different Cu chemical forms in *H. verticillata* (μg/g·FW)

化学形态 Chemical forms / 处理方式 Treatment	$F_{Ethanol}$	F_{Water}	F_{NaCl}	F_{HAc}	F_{HCl}	$F_{Residue}$
对照 Control	16.55 ±0.41	12.57 ±0.21	22.77 ±0.29	13.46 ±0.11	14.64 ±0.23	14.08 ±0.33
10mg/L	79.70 ±0.58	149.16 ±3.05	339.12 ±10.36	388.60 ±10.88	382.26 ±11.85	67.28 ±2.42

表 2　黑藻体内不同 Zn 化学形态的含量(μg/g·FW) (均值 ±标准离差) (n = 3)

Tab.2　Contents of different Zn chemical forms in *H. verticillata* (μg/g·FW)

化学形态 Chemical forms / 处理方式 Treatment	$F_{Ethanol}$	F_{Water}	F_{NaCl}	F_{HAc}	F_{HCl}	$F_{Residue}$
对照 Control	31.59 ±0.85	12.37 ±0.32	43.06 ±1.18	59.62 ±1.18	27.97 ±0.44	42.33 ±1.18
10mg/L	74.78 ±2.31	40.76 ±1.21	344.57 ±6.89	300.91 ±5.71	143.28 ±3.72	59.48 ±1.01

2.3　叶片自发荧光强度的变化

黑藻叶片经过 488nm 波长激发后,在激光共聚焦扫描显微镜下可以观察到蓝、绿两种颜色图像,其中绿色为细胞壁扫描图像,蓝色图像为细胞组分(叶绿体)自发荧光图像[3]。对蓝色图像进行数字化处理分析的图谱结果表明(图 3—7),不同浓度 Cu、Zn 毒害后,黑藻叶绿体自发荧光的范围都不同程度的变窄,峰值变小,平均自发荧光强度减弱。其中 1mg/L 处理的 Cu、Zn 分别使自发荧光强度最大值降为对照的 22.00 %和 62.40 %,10mg/L 则分别只有 13.20 %和 68.00 %。平均自发荧光强度分别为对照的 10.90 %(1mg/L Cu)、5.94 %(1mg/L Zn)和 2.83 %(10mg/L Cu)、13.52 %(10mg/L Zn)。由此可以看出 Cu 对荧光分子的破坏作用强于 Zn。统计分析表明,

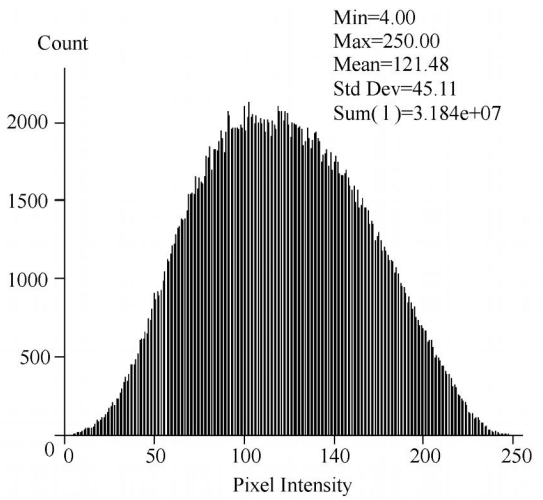


图 3　对照叶的自发荧光图谱

Fig.3　The auto-fluorescent intensity of control leaves

自发荧光最大值和平均荧光强度与 Cu 处理浓度分别为显著负相关和负相关，$R_{max} = -0.9672$，$P < 0.05$；$R_{mean} = -0.9462$。与 Zn 处理浓度都为负相关，但不显著。而叶绿体自发荧光的强弱同叶绿素特别是 PS Ⅱ作用中心分子与类囊体膜的结合状态直接相关。荧光急剧减弱说明重金属已经影响了光合色素的结合状态。这可能与叶绿体结构的损伤有关系。

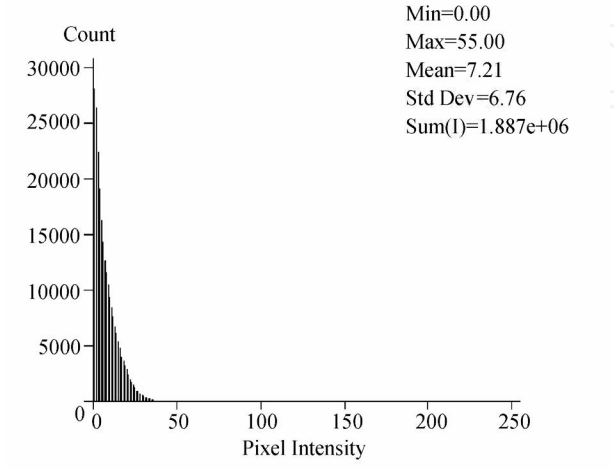


图 4 1mg/L Cu 处理叶的自发荧光图谱

Fig. 4 The auto-fluorescent intensity of leaves treated with 1mg/L Cu

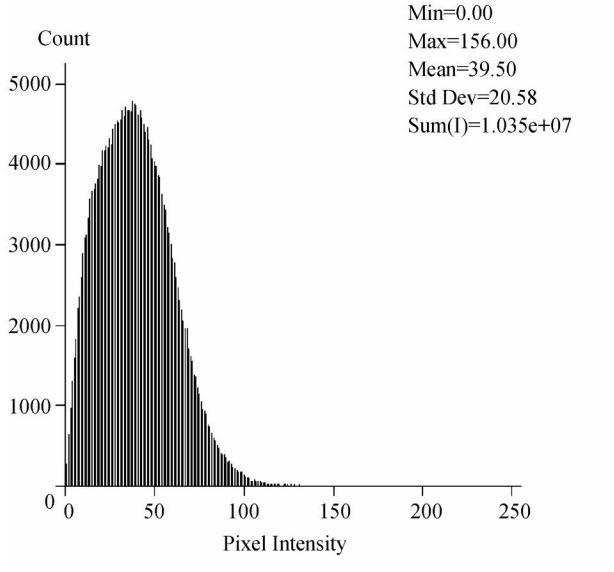


图 5 1mg/L Zn 处理叶的自发荧光图谱

Fig. 5 The auto-fluorescent intensity of leaves treated with 1mg/L Zn

2.4 黑藻叶片表皮细胞形态及扫描能谱分析

2.4.1 黑藻叶片表皮细胞形态的变化 整个处理期间，正常的黑藻植株健壮，叶片深绿色，表皮细胞呈规则的长方形(图 8a)。而施加不同浓度的 Cu、Zn 后植株则出现不同程度的褪绿症状，特别是 10mg/L 处理得最突出，扫描电镜观察发现叶片表皮细胞的形态发生了较大变化。与对照相比，Cu、Zn 处理后表皮细胞形状扭曲，细胞壁增厚(见图 8b，c)。

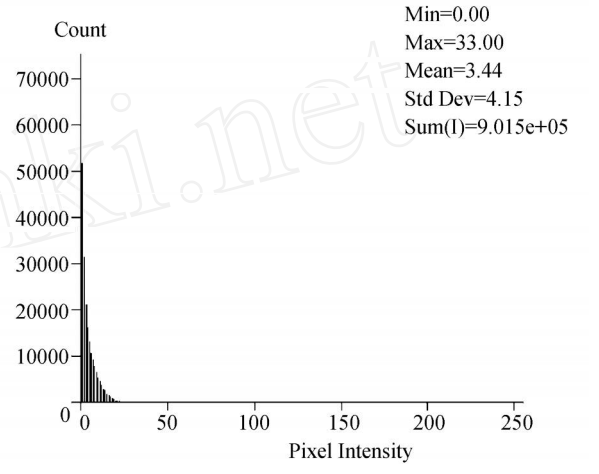


图 6 10mg/L Cu 处理叶的自发荧光图谱

Fig. 6 The auto-fluorescent intensity of leaves treated with 10mg/L Cu

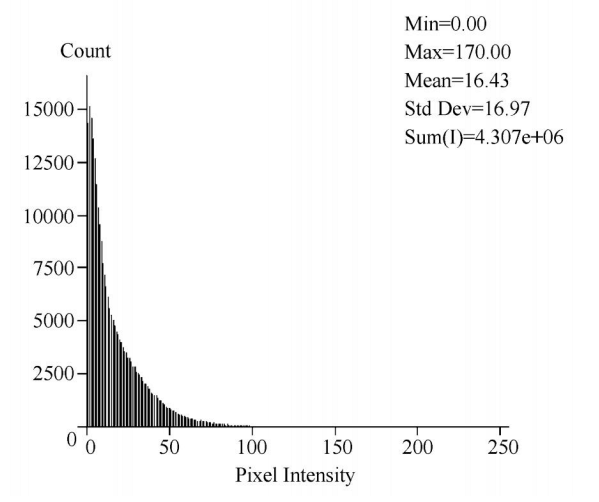


图 7 10mg/L Zn 处理叶的自发荧光图谱

Fig. 7 The auto-fluorescent intensity of leaves treated with 10mg/L Zn

2.4.2 黑藻叶的扫描能谱分析 与整个植株中的元素含量变化趋势相似，倒数第 3 叶中的 Cu、Zn 相对含量也都随处理浓度的增大而上升(见表 3)。通过系统自带软件对各扫描能谱的峰值进行量化分析，结果显示该叶中的 Cu 和 Zn 的相对含量与相应金属处理浓度也都达到极显著正相关，相关系数 $R_{Cu} = 0.9805$，$P < 0.01$；$R_{Zn} = 0.9314$，$P < 0.01$。

2.5 黑藻叶细胞超微结构的变化

叶绿体 叶绿体是绿色植物所特有的细胞器，在正常叶细胞中，叶绿体为长椭圆形，内部结构清

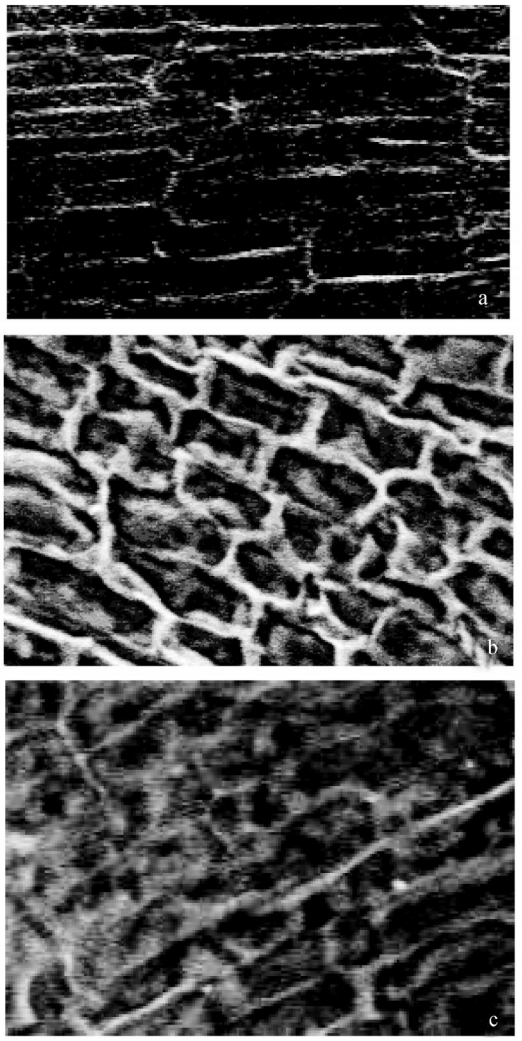


图 8　黑藻叶片表皮细胞的形态变化

Fig. 8　Morphology changes of epidermis in *H. verticillata* under Cu and Zn stress

a: CK ×190; b: 10mg/L Cu ×300; c: 10mg/L Zn ×300

表 3　第 3 叶中 Cu、Zn 的相对含量(%)

Tab. 3　The quantitative analysis of Cu and Zn relative content in the 3rd leaf under Cu and Zn stress(%)

	0.5mg/L	1mg/L	5mg/L	10mg/L
Cu	2.69 ±0.33	2.64 ±0.37	2.71 ±0.35	4.73 ±0.70
Zn	8.22 ±0.40	7.76 ±0.60	12.41 ±0.44	10.51 ±1.04

晰,基粒类囊体排列整齐紧密,显示出良好的结构和功能状态(图版 Ⅰ:1,7)。Cu 和 Zn 对叶绿体的损伤相似,都表现为类囊体片层排列扭曲,叶绿体膨胀成球形(图版 Ⅰ:2,8)。最高浓度处理后的叶绿体部分被膜断裂(图版 Ⅰ:3,11),最后类囊体片层溶解(图版 Ⅰ:8),叶绿体解体(图版 Ⅰ:4)。

细胞核　对照叶细胞细胞核的核膜分成 2 层,核仁致密,核仁与核质界限分明(图版 Ⅰ:1)。Cu 胁迫后,细胞核核仁逐渐消解(图版 Ⅰ:2),染色质成凝胶状[2](图版 Ⅰ:2,5),核膜开始破损,最后凝胶状的染色质逐渐消失。Zn 引起的细胞核的变化除上述表现外(图版 Ⅰ:10),还观察到核膜破损和核质散出(图版 Ⅰ:12)。

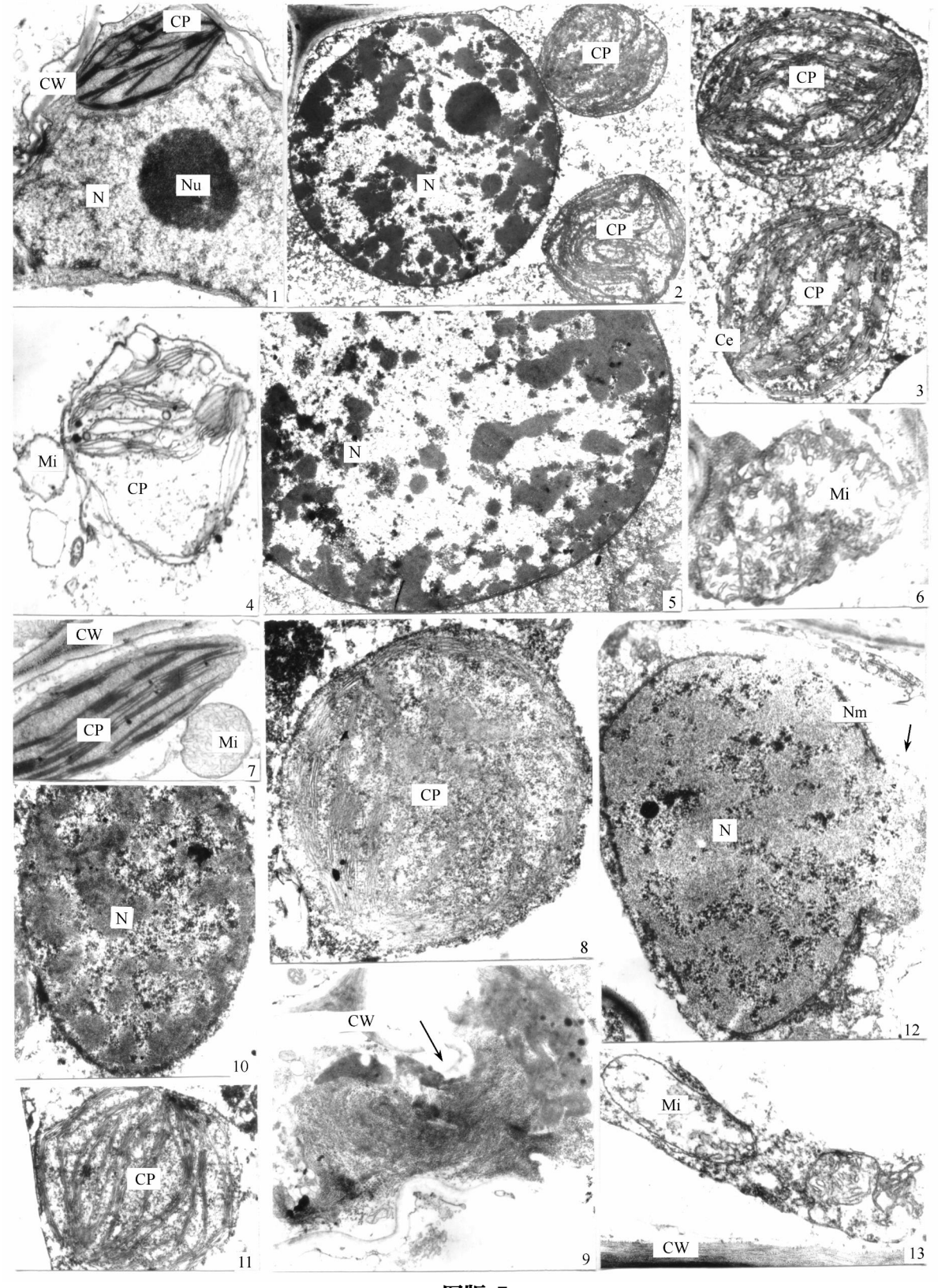
线粒体　正常的线粒体嵴明显(图版 Ⅰ:7)。作为对重金属污染较敏感的细胞器,线粒体中最先受到影响的是嵴,电镜下可以看到 Cu 和 Zn 处理后的线粒体嵴凌乱,部分线粒体嵴溶解(图版 Ⅰ:6,13),线粒体空泡化明显(图版 Ⅰ:4,13),有的线粒体破损,嵴散出(图版 Ⅰ:13)。

细胞壁　在 5mg/L Zn 处理样品中观察到由于细胞壁的破坏,导致原生质从一个细胞流到另一个相邻细胞的现象(图版 Ⅰ:9)。

3　讨　论

许多研究者都认为沉水植物对水体重金属元素有很好的净化效果[5,6,8,12]。本实验中,当把黑藻培养在含 Cu、Zn 污水中后,无论是单个叶片的相对含量还是整个植株的总体含量,黑藻吸收和积累这两种重金属的线性关系都非常显著。统计分析都达到极显著正相关。表明黑藻对水体中的各种重金属元素有明显的吸收作用[5]。而富集系数通常被用来说明某种植物对重金属的吸收和积累能力。对本实验结果分析发现,黑藻对 Cu 的富集系数范围为 571—1328;Zn 为 346—830。以平均富集系数计,Cu 为 911,Zn 为 516。由此可以看出黑藻对 Cu 的吸收能力远强于 Zn。根据前文研究结果[10],Cu、Zn 处理后,尤其是高浓度(10mg/L),黑藻叶细胞内膜系统遭受了比较严重的膜脂过氧化损伤,因此作者认为黑藻对 Cu 和 Zn 的吸收主要是以被动吸收为主。而富集系数随处理浓度增大而下降则反映出黑藻吸收能力的下降,这说明相对较低浓度更有利于植物对金属的吸收;另一方面也不能排除非积累机制的影响,如由于细胞的功能性损伤加剧所导致的吸收下降等。

重金属的生物毒性不仅与其总量有关,更大程度上由其形态分布决定,不同的形态产生不同的效应[13]。许嘉琳等认为各种结合形态的迁移能力和活性都有显著差异[14]。本研究表明,黑藻体内 Cu 和 Zn 都是以 HAc 提取态、NaCl 提取态和 HCl 提取态较高,分别占到总量的 78.93%和 81.86%,其中 Cu 的 HAc 提取态和 HCl 提取态的比例明显增加,显示 Cu 可能与多种配位体如磷酸、草酸等结合。Zn 的 NaCl 提取态增幅最大则说明 Zn 可能主要是以和



图版 Ⅰ

1. 对照叶细胞,示叶绿体和细胞核, ×10 000; 2. 5mg/L Cu 处理的叶细胞,示类囊体排列扭曲和核仁正在解体中, ×6000; 3. 5mg/L Cu 处理的叶细胞,示叶绿体被膜断裂, ×10 000; 4. 10mg/L Cu 处理的叶细胞,示叶绿体解体, ×10 000; 5. 5mg/L Cu 处理的叶细胞,示部分染色质消失, ×8000; 6. 0. 5mg/L Cu 处理的叶细胞,示线粒体嵴突无序, ×20 000; 7. 对照叶细胞,示叶绿体和线粒体, ×15 000; 8. 5mg/L Zn 处理的叶细胞,示叶

蛋白质等结合为主存在于黑藻体内。

众所周知,细胞结构是植物一切生命活动的结构基础,其中,叶绿体是进行光合作用的细胞器[15],正常情况下类囊体的排列能保证其最大受光面积和最大光合效率,而 Cu、Zn 处理后则使叶绿体中基粒消失和被膜瓦解,所以将大大降低叶绿体捕获光能的能力。而叶绿体的解体也意味着其完全丧失了光合功能。线粒体则被看作是真核细胞的"动力站"[16],是细胞呼吸作用的主要场所。电镜下观察到的嵴突数目减少或空泡化将导致线粒体功能异常,从而使细胞的能量供应不足[2],对细胞抵御逆境胁迫非常不利。过量 Cu 和 Zn 同样导致核染色质凝集和核膜断裂等。由此可以看出,Cu、Zn 处理后黑藻叶细胞亚显微结构损伤的共同表现是破坏了细胞的膜结构,这一方面可能是由于重金属与蛋白质的-键 SH 基结合而使蛋白质变性[4],从而使以蛋白质为主要成分的膜结构发生改变;另一方面,重金属 Cd、Cu 等还使膜脂的脂类含量明显降低,脂肪酸组成发生改变[17,18]。同时这些也都是重金属对叶绿体、线粒体和细胞核等的不可逆转的致死性伤害[1]。细胞器超微结构的改变反映了内膜系统的完整性遭到破坏,说明重金属对植物有共同的毒害机制。

参考文献:

[1] Xu Q S, Shi G X, Du K H, *et al*. Toxic effect of Cd^{2+} treatment on protective enzyme activity and ultrastructrue in leaf cells of *Potamogeton crispus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27** (6): 584—589 [徐勤松,施国新,杜开和,等. Cd^{2+}处理对菹草叶片保护酶活性和细胞超微结构的毒害影响. 水生生物学报, 2003, **27**(6): 584—589]

[2] Shi G X, Xu Q S, Xie K B, *et al*. Physiology and Ultrastructure of Azolla imbricata as affected by Hg^{2+} and Cd^{2+} [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45** (4): 437—444

[3] Gu W, Shi G X, Zhang C Y, *et al*. Toxic effects of Hg^{2+}, Cd^{2+} and Cu^{2+} on photosynthetic systems and protective enzyme systems of *Potamogeton crispus* [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, **28**(1): 69—74[谷巍,施国新,张超英,等. Hg^{2+}、Cd^{2+}、Cu^{2+}污染对菹草光合系统及保护酶系统的毒害作用. 植物生理与分子生物学学报, 2002, **28**(1): 69—74]

[4] Zhou C F, Wu G R, Shi G X, *et al*. The role of antioxidant systems in Cu^{2+} stress resistance in *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Acta Bot Sin*, 2001, **43**(4): 389—394 [周长芳,吴国荣,施国新,等. 水花生抗氧化系统在抵御 Cu^{2+}胁迫中的作用. 植物学报, 2001, **43**(4): 389—394]

[5] Xu Q S, Shi G X, Zhou Y M, *et al*. Distribution and toxicity of cadmium in *Hydrilla Verticillata* (L. F.) Royle [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2004, **37** (6): 461—468 [徐勤松,施国新,周耀明,等. 镉在黑藻叶细胞中的亚显微定位分布及其毒害效应分析. 实验生物学报, 2004, **37**(6): 461—468]

[6] Keskinkan O, Goksu M Z L, Basibuyuk M, *et al*. Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*) [J]. *Bioresource Technology*, 2004, **92**: 197—200

[7] Prasad M N V, Malec P, Waloszek A, *et al*. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation [J]. *Plant Science*, 2001, **161**: 881—889

[8] Rama D S, Prasad M N V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants [J]. *Plant Science*, 1998, **138**: 157—165

[9] He M C. Bioavailability of heavy metals in aquatic environment and sediment quality assessment approaches [J]. *Advances in Environmental Science*, 1998, **6**(5): 9—19[何孟常. 水体沉积物重金属生物有效性及评价方法. 环境科学进展, 1998, **6**(5): 9—19]

[10] Xu Q S, Shi G X, Wang X, *et al*. Generation and active oxygen and change of antioxidant enzyme activity in *Hydrilla verticillata* under Cd, Cu and Zn tress [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(1): 107—112 [徐勤松,施国新,王学,等. 镉、铜和锌胁迫下黑藻活性氧的产生及抗氧化酶活性的变化研究. 水生生物学报, 2006, **30**(1): 107—112]

绿体膨胀,部分被膜消失, ×17 000; 9.5mg/L Zn 处理的叶细胞,示细胞壁破坏(箭头), ×10 000; 10.5mg/L Zn 处理的叶细胞,示细胞核染色质凝集, ×8 000; 11.5mg/L Zn 处理的叶细胞,示叶绿体被膜消失, ×8 000; 12.10mg/L Zn 处理的叶细胞,示细胞核核质散出(箭头), ×10 000; 13.5mg/L Zn 处理的叶细胞,示线粒体空泡化, ×17 000

Ce. 叶绿体膜; CP. 叶绿体; CW. 细胞壁; Mi. 线粒体; N. 细胞核; Nm. 核膜; Nu. 核仁

1. Showing nucleus and chloroplast in normal leaf cells, ×10 000; 2. Leaf cells treated with 5mg/L Cu, showing disorder of thylakoid and disintegration of nucleolus, ×6000; 3. Leaf cells treated with 5mg/L Cu, showing rupture of chloroplast membrane; 4. Leaf cells treated with 10mg/L Cu, showing disintegration of chloroplast; 5. Leaf cells treated with 5mg/L Cu, showing disappearance of some chromatin; 6. Leaf cells treated with 0.5mg/L Cu, showing disorder of mitochondria cristae, ×20 000; 7. Chloroplast and mitochondria in normal leaf cells, ×15 000; 8. Leaf cells treated with 5mg/L Zn, showing swelling of chloroplast and disrupted chloroplast envelope, ×17 000; 9. Leaf cells treated with 5mg/L Zn, showing destroyed cell wall (arrow), ×10 000; 10. Leaf cells treated with 5mg/L Zn, showing agglutination of chromatin, ×8000; 11. Leaf cells treated with 5mg/L Zn, showing disappearance of chloroplast membrane, ×8000; 12. Leaf cells treated with 10mg/L Zn, showing spill out of karyoplasms in leaf cells (arrow), ×10 000; 13. Leaf cells treated with 5mg/L Zn, showing vacuolization of mitochondria, ×17 000

Ce. Chloroplast envelope; CP. Chloroplast; CW. Cell wall; Mi. Mitochondria; N. Nucleus; Nm. Nuclear membrane

[11] Paddok S W. Confocal Microscopy Methods and Protocols [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press. 1999, 103—130

[12] Keskinkan O, Goksu M Z L, Yuceer A, *et al*. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*) [J]. *Process Biochemistry*, 2003, **39**: 179—183

[13] Liu Q, Wang Z J, Tang H X. Research progress in heavy metal speciation and toxicity and bioavailability of heavy metals [J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 1996, **17**(1): 89—92 [刘清, 王子健, 汤鸿霄. 金属形态与生物毒性及生物有效性关系的研究进展. 环境科学, 1996, **17**(1): 89—92]

[14] Xu J L, Bao Z P, Yang J R, *et al*. Chemical forms of Pb, Cd and Cu in crops [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1991, **2**(3): 244—248 [许嘉琳, 鲍子平, 杨居荣, 等. 农作物体内铅、镉、铜的化学形态研究. 应用生态学报, 1991, **2**(3): 244—248]

[15] Pan R Z, Dong Y D. Plant Physiology [M] (3ird Edition). Beijing: Higher Educational Press. 1995, 31—35 [潘瑞炽, 董愚得. 植物生理学[M](第3版). 北京: 高等教育出版社. 1995, 31—35]

[16] Siekevitz P. Powerhouse of the cell [J]. *Sci American*, 1957, **197**(1): 131—140

[17] Ogariti O, Boussama N, Zarrouk M, *et al*. Cadmium-and copper-induced changes in tomato membrane lipids [J]. *Phytochemistry*, 1997, **45**(7): 1343—1350

[18] Bergmann H, Machelett B, Lippmann B, *et al*. Influence of heavy metals on the accumulation of trimehtylglycine, putrescine and spermine in food plants [J]. *Amino Acids*, 2001, **20**(3): 325—329

BIOACCUMULATION AND TOXICITY OF Cu AND Zn IN HYDRILLA VERTICILLATA (L. INN. F.) ROYLE

XU Qin-Song, SHI Guo-Xin, XU Bing-Jun, WU Guo-Rong and HU Jin-Zhao

(*College of life sciences, Nanjing Normal University, Nanjing*, 210097)

Abstract: In the present study, *Hydrilla verticillata* (Linn. f.) Royle, a submerged macrophyte widely distributed in China was used as experimental material. Cu and Zn, essential elements for the normal development and growth of plants were selected as the stress factors. *H. verticillata* was cultivated in water containing elevated concentrations of Cu and Zn (up to 10 mg/L) for 7d under lab condition. The bioaccumulation of Cu and Zn were determined by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP) and their environmental toxicology in *H. verticillata* was studied. The results suggested that contents of Cu and Zn in *H. verticillata* were nearly in linear increase with rise of metal concentration in solution, and statistical analysis indicated that they all reached significant positive levels ($R_{Cu} = 0.9875$, $P < 0.01$; $R_{Zn} = 0.9990$, $P < 0.01$). It was found that *H. verticillata* fronds were able to absorb and accumulate Cu and Zn differently, and the bioaccumulation factor ranged from 571 to 1328 and 346 to 830, respectively. The absorption capability of *H. verticillata* to Cu was better than to Zn and low heavy metal concentration was good for absorption. Sequential extraction indicated that the ratio of different Cu and Zn chemical forms were different markedly, of which NaCl extractable Zn, 2% HAc extractable Cu were predominated as compared with the other 5 forms; which could be seen in the following order: Cu: $F_{HAc} > F_{HCl} > F_{NaCl} > F_{Water} > F_{Ethanol} > F_{Residue}$; Zn: $F_{NaCl} > F_{HAc} > F_{HCl} > F_{Ethanol} > F_{Residue} > F_{Water}$. Auto fluorescent range narrowed; both peak value and average intensity decreased in leaf of *H. verticillata* under Cu and Zn stress. Scanning and transmission electron microscope observation indicated that Cu and Zn imposed injury action on morphological structure and ultrastructure of leaf cells, such as distortion of cell wall and cell shape, disaggregation of nucleolus, agglutination and disappearance of chromatin of nucleus, disruption of nuclear membrane, swelling of thylakoids and breakage of chloroplast envelope, decreasing of cristae quantity and vacuolization of mitochondria. The conclusion was that there was a significant dose-effect between bioaccumulation and toxicity. Namely, the more the pollutant contents in *H. verticillata*, the severer the toxicity to the plant.

Key words: *Hydrilla verticillata* (Linn. f.) Royle; Cu; Zn; Bioaccumulation; Phytotoxicity