

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

徐勤松 施国新 王学 吴国荣

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要:研究了不同 Cd、Cu、Zn 处理浓度对黑藻体内活性氧(O_2^-)产生及对抗氧化酶(SOD、POD、CAT)活性的分子毒理学效应以探讨高等水生植物抗氧化酶对重金属胁迫的反应。结果表明,三种重金属都不同程度地加快了 O_2^- 产生速率;Cu 使 SOD、POD、CAT 活性下降;Cd 也都减弱了 SOD 和 POD 活性,而 CAT 活性在 0.5—5mg/L 处理浓度时增加;Zn 对 SOD 活性也为抑制作用,当浓度为 0.5—5mg/L 时 POD 和 CAT 活性都上升。关联度分析发现 Cd、Cu 和 Zn 胁迫下黑藻起主要保护作用的分别为 SOD、POD 和 CAT,而 SOD 最易受到影响。Cd、Cu 处理下的叶绿素含量也都呈下降趋势,而 0.5—5mg/L 的 Zn 浓度刺激了叶绿素合成。所有 Zn 处理、0.5mg/L 的 Cu 处理和 0.5—1mg/L 的 Cd 处理的叶绿素 a/b 值都大于对照值。除了 Cu 使可溶性蛋白含量减少外,0.5—5mg/L 的 Zn 和 0.5—1mg/L 的 Cd 都使其含量增加。综合起来,Cu 的毒性最强,其次为 Cd,Zn 最弱。致死阈浓度分别为:Cu:0.5—1mg/L;Cd:1—2mg/L;Zn:5—6mg/L。SOD 是评价重金属对沉水植物毒性效应的灵敏指标。黑藻对水环境 Cu 污染反应敏感。

关键词: Cd; Cu; Zn; 胁迫; 黑藻; 活性氧; 抗氧化酶; 毒理

中图分类号: Q945.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2006)01-0107-06

大量研究认为许多外源性化学污染物都是通过产生大量活性氧,从而诱发机体损害的;另一方面,起重要保护作用的抗氧化酶的活性或含量可能会因为污染物的胁迫作用而发生改变^[1]。目前,就有机污染物对水生动物抗氧化酶活性影响的研究资料表明 SOD 活性的变化可以间接反映环境中有毒有害物质的存在,是分子水平上预报有机毒物对水生态系统危害的敏感性生物标志物,已被用来评价和监测有机污染物对水生生物的毒性效应^[2]。贾秀英研究指出 SOD 活性可以作为鱼类逆境生理的一个生化指标^[3]。重金属作为水环境污染的重要因子,本研究表明重金属污染对高等水生植物的生理指标和超微结构都能产生一定的毒害影响^[4]。

本文以不同浓度 Cd、Cu、Zn 为胁迫因子,以在全国分布广泛的沉水植物——黑藻为受试材料。通过研究其对超氧阴离子(O_2^-)产生速率及对抗氧化酶——SOD、POD、CAT 活性等的影响,以期阐明重金属对高等水生植物抗氧化酶的生态毒理学影响,为水体重金属污染的早期预报和防治筛选灵敏的分子生态毒理学指标提供参考和依据。

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 °C)选取长度为 10cm 左右的植株作为实验材料。

1.2 实验处理 将受试材料先在实验室无底泥的 13 个玻璃缸中用 1/20 培养液预培养 2d 后,于上午 8:00 分别在 4 个玻璃缸(2L)中一次性施入 0.5mg/L、1mg/L、5mg/L、10mg/L 的 $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ (AR),同时在另外的两组玻璃缸(每组 4 个)中分别加入同样梯度浓度的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (AR) 和 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (AR) (以纯 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 计),以在不施加任何金属的 1/20 Hoagland 培养液中生长的黑藻植株为零对照。全部培养缸置于 Form-3744 型(英国产)全封闭的培养箱中培养,温度为 24 °C,光周期为 12h 光照(3500lx)和 12h 黑暗交替。每组设 3 个重复,培养第 7d 取相同部位的材料,去离子水洗净,测定生理生化指标。

另外,分别设 3 种受试金属的浓度梯度依次为:

收稿日期:2004-09-10;修订日期:2005-04-12

基金项目:国家自然科学基金(30370083);教育部科学技术研究重点项目(01043);江苏省教育厅自然科学基金(03JB180062);江苏省重点实验室开放基金项目资助

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

0.5mg/L, 1mg/L, 2mg/L, 3mg/L, 4mg/L, 5mg/L, 6mg/L, 7mg/L, 8mg/L, 9mg/L, 10mg/L, 以观察其对黑藻的致死阈浓度。

1.3 超氧阴离子(O_2^-)产生速率的测定 按照王爱国等^[5]的羟胺氧化反应方法。

1.4 SOD、POD、CAT 活性的测定 取材于预冷的研钵中,加入 0.05mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.8),冰浴,研磨,10000r/min,低温(0—4℃)离心 20min,取其上清液。SOD、CAT 活性用一般分光光度法,按从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒的顺序测定;POD 活性用愈创木酚法^[6]测定。

1.5 叶绿素含量测定 采用分光光度法^[6]

1.6 可溶性蛋白含量测定 采用 Bradford^[7]的考马斯亮蓝 G250 法测定。

1.7 数据分析 用计算机系统自带软件分析各测定指标与处理浓度间的相关性(R)和不同离子处理间的差异(T-检验)。以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。结果以均值 $\pm$ Sd 表示。灰色关联度分析用邓聚龙^[8]的方法。

2 结果与分析

2.1 O_2^- 产生速率的变化

研究认为 O_2^- 伤害植物的机理之一是参与启动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用,从而破坏膜结构^[9]。如图 1 所示,就对产生速率的影响而言 Cu 表现最突出,其次为 Cd 和 Zn。特点是 5mg/L 和 10mg/L 处理后 3 种重金属都使 O_2^- 产生速率急剧加快,如 5mg/L 浓度下,Cu、Cd、Zn 处理组的 O_2^- 产生速率分别为对照组的 15.9 倍、4.9 倍和 1.6 倍。10mg/L 处理浓度

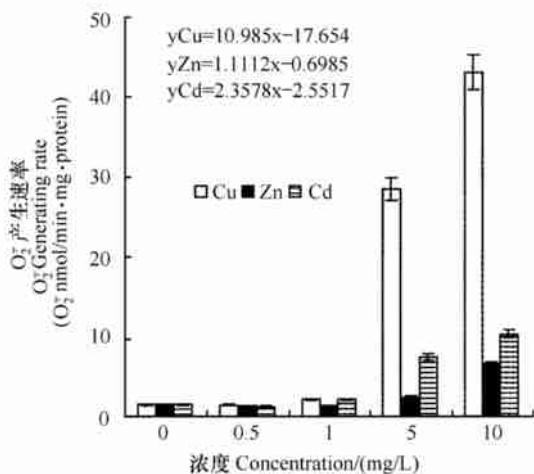


图 1 Cd、Cu、Zn 对黑藻 O_2^- 产生速率的影响

Fig. 1 The effect of Cd, Cu, Zn treatment on O_2^- generating rate

图 2—图 6 的图例同图 1

的 O_2^- 产生速率则分别达到 28.1 倍(Cu)、6.7 倍(Cd)和 4.3 倍(Zn)。统计结果表明 O_2^- 产生速率与 3 金属浓度都达到极显著正相关,相关系数为 $R_{Cu} = 0.984$, $P < 0.01$; $R_{Cd} = 0.981$; $P < 0.01$; $R_{Zn} = 0.953$, $P < 0.01$ 。

2.2 保护酶的变化

2.2.1 SOD 由图 2 看出,Cd、Cu、Zn 处理后,SOD 活性都呈下降趋势。但就下降的程度而言,三者间存在差异,最低浓度 0.5mg/L 处理后,Cd 处理组的活性为对照的 90.2%,Cu 的为 90.6%,而 Zn 处理组活性最高,为 91.3%。浓度继续增大后,Cu 处理使酶活降低的程度明显大于 Cd 和 Zn,如 5mg/L 处理浓度时,Cu 处理的活性是对照的 41.7%,Cd 是 53.7%,Zn 的抑制效果最差,是对照的 84.3%。数据分析结果表明 SOD 活性与 Cd 处理浓度为极显著负相关, $R = -0.967$, $P < 0.01$,与 Cu 为显著负相关, $R = -0.890$, $P < 0.05$ 。

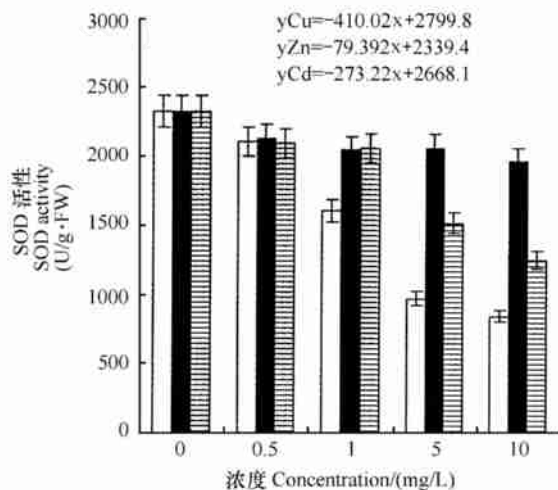


图 2 Cd、Cu、Zn 对黑藻 SOD 活性的影响

Fig. 2 The effect of Cd, Cu, Zn treatment on SOD activity

2.2.2 POD POD 活性在 3 种金属处理后变化趋势不同(图 3)。其中 Cd、Cu 都使活性下降,而 Zn 则在处理浓度为 0.5—5mg/L 时高于对照酶活性,并在 1mg/L 时达到峰值,比对照值上升了 21.6%。比较相同处理浓度 3 金属对 POD 的影响可以发现,Cu 的效果最突出。如 0.5mg/L 处理后,Zn 使活性比对照增加了 9.47%,Cd 使酶活下降了 5.42%,Cu 则使之减少了 27.3%。10mg/L 处理后,Cd 处理组的活性为对照的 82.6%,Zn 为 71.2%,Cu 为 56.7%。统计结果表明,POD 活性与 Cd 处理浓度达到极显著负相关,相关系数 $R = -0.932$, $P < 0.01$,Cu 与 Zn 处理和 Cu 与 Cd 处理间对 POD 活性的影响都差异显

著,方差分别为 $0.048 < 0.05$ 和 $0.021 < 0.05$ 。

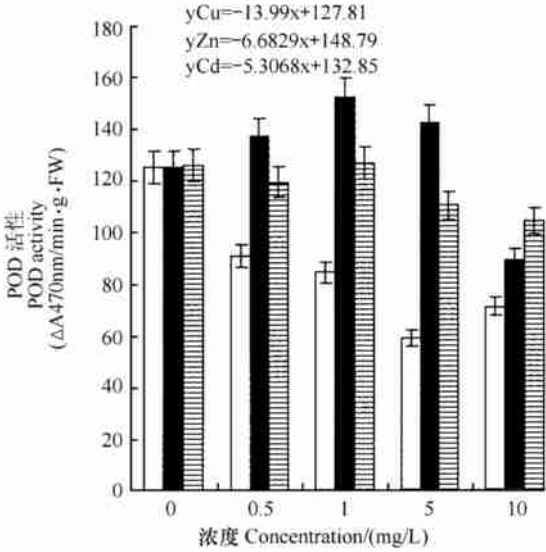


图3 Cd、Cu、Zn 对黑藻 POD 活性的影响

Fig.3 The effect of Cd,Cu,Zn treatment on POD activity

2.2.3 CAT Cd、Cu、Zn 对 CAT 活性的影响不同 (图 4)。低浓度 Cd、Zn 都诱使活性上升,其中,0.5mg/L 处理浓度下 Zn 使其比对照值增加了 51.0 %,Cd 处理的比对照酶活增加了 89.5 %,并且都到 10mg/L 浓度后,CAT 活性才低于对照,分别是对照的 79.2 %(Zn)和 93.8 %(Cd)。而 Cu 处理则使酶活性随浓度增大而减弱,0.5mg/L 时就比对照降低了 70.6 %,当浓度为 10mg/L 时,酶活只有对照值的 30.6 %。比较相同浓度下酶活的大小证明 Cu 对 CAT 的抑制作用最强。统计分析表明 CAT 活性与 Cu 处理浓度为显著负相关, $R = -0.872$, $P < 0.05$ 。Cu 与 Zn 处理和 Cu 与 Cd 处理对 CAT 活性的影响也

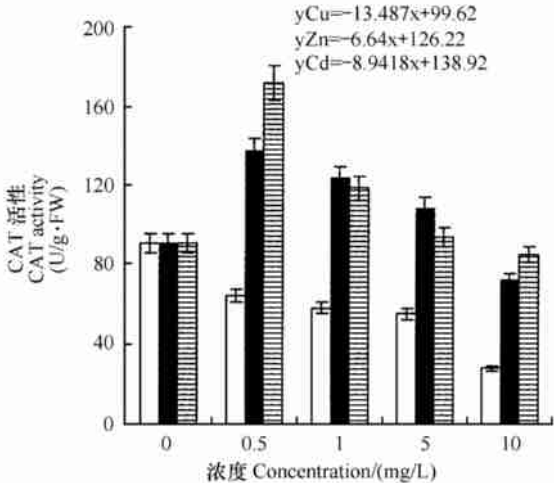


图4 Cd、Cu、Zn 对黑藻 CAT 活性的影响

Fig.4 The effect of Cd,Cu,Zn treatment on CAT activity

都达到显著程度,方差分别为 $0.021 < 0.05$ 和 $0.039 < 0.05$ 。

2.3 叶绿素含量和叶绿素 a/b 的变化

叶绿素含量和叶绿素 a/b 比值是光合器官生理状况的重要指标。如图 5 所示,Cu、Cd 处理后叶绿素含量都呈现递减趋势,而 Zn 处理组则在 0.5mg/L 浓度时达到峰值,比对照值高 28.1 %,并且直到浓度为 10mg/L 时才低于正常值。Cu 对叶绿素含量的影响最大,Cd、Zn 次之。如在 1mg/L 处理浓度时 Cu、Cd、Zn 分别使叶绿素含量变为对照值的 61.4 %、91.2 %和 113.0 %。5mg/L 处理的依次为 51.4 %(Cu)、62.7 (Cd)和 108.0 %(Zn)。统计分析表明叶绿素含量与 Cd 处理浓度为极显著负相关,相关系数 $R = -0.929$, $P < 0.01$,Cu 与 Zn、Cu 与 Cd 和 Cd 与 Zn 处理间对叶绿素总含量的影响都差异显著,方差分别为 0.030、0.046 和 0.048。

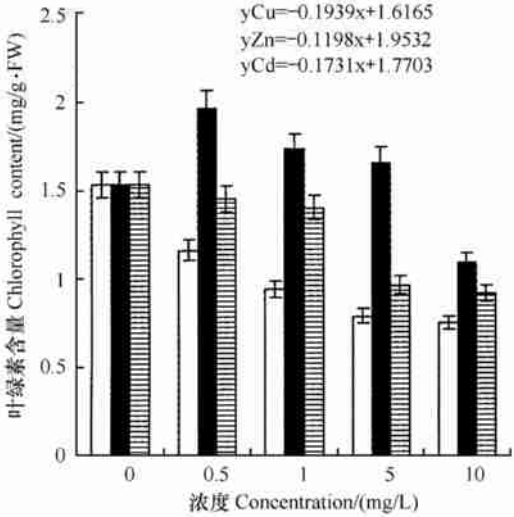


图5 Cd、Cu、Zn 对黑藻叶绿素含量的影响

Fig.5 The effect of Cd,Cu,Zn treatment on chlorophyll content

由图 6 可以看出,与叶绿素含量不同的是,Cu、Cd、Zn 都在 0.5mg/L 浓度时 a/b 值增大,分别较对照上升了 34.7 %、22.3 %和 19.9 %。随浓度增大,Cu、Cd 处理的都呈下降趋势,而 Zn 则在 1mg/L 时达到最大,其后降低但都大于正常值。

2.4 可溶性蛋白含量的变化

图 7 表明,三种金属元素处理后,只有 Cu 处理组的可溶性蛋白含量一直下降,相关系数 $R = -0.838$, $P < 0.05$,为显著负相关。而 0.5mg/L Cd 浓度和 1mg/L Zn 浓度则刺激了蛋白的合成,含量达到最大,分别比对照增加了 57.2 %和 77.5 %。继续加大金属浓度后,蛋白含量逐渐减少,其中,5mg/L Zn

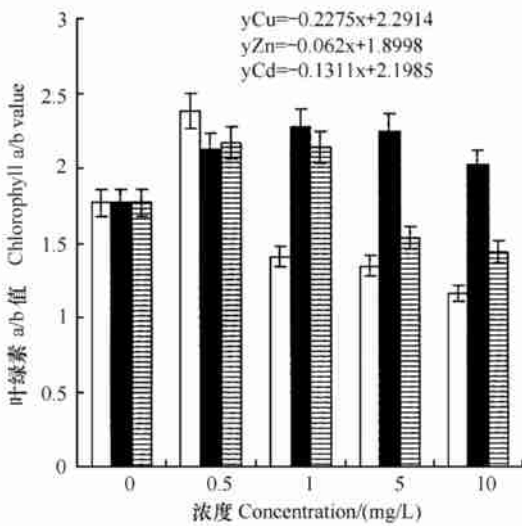


图6 Cd、Cu、Zn对黑藻叶绿素 a/ b 的影响

Fig.6 The effect of Cd,Cu,Zn treatment on chlorophyll a/ b value

处理时仍比对照上升了 20.4 %。统计分析表明 Cd 处理浓度与蛋白含量达到显著负相关, $R = -0.834$, $P < 0.05$ 。Cu 与 Zn 处理对蛋白含量的影响差异显著, $P = 0.036$ 。

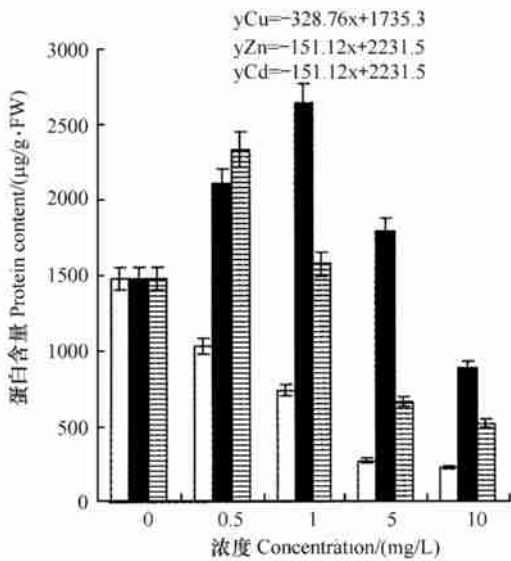


图7 Cd、Cu、Zn对黑藻可溶性蛋白含量的影响

Fig.7 The effect of Cd,Cu,Zn treatment on soluble protein content

2.5 外观生长结果

培养 7d, 1mg/L Cu 处理浓度和 2mg/L Cd 处理的植株都褪绿明显。高于 5mg/L 浓度的 Cu 和 Cd 处理的黑藻植株则完全失绿。尤其是 10mg/L Cu 处理的植株甚至腐烂, 植株极易断裂。转移至不含金属离子的培养液中后都不能正常生长而死亡。当浓度大于 5mg/L 后, Zn 处理的黑藻植株出现萎黄现象, 转移至培养液中也逐渐死亡, 低于 5mg/L 则生

长基本正常。对照植株则都健壮, 叶色碧绿。在整个处理期间, 就同一离子处理而言, 高浓度比低浓度更先出现毒害现象。就每植株而言, 老叶比嫩叶受的毒害重。根据浓度间黑藻植株外观所表现出的受毒害程度, Cu 处理的最显著, Cd 次之, Zn 最轻。

3 讨论

正常情况下, 作为保护酶系统的重要组成部分, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等能维持体内活性氧产生和清除的动态平衡, 从而防止自由基的毒害。而逆境条件则往往使植物细胞中活性氧产生增多或清除能力减弱, 在这种情况下活性氧清除能力的高低也就成为植物抗逆境能力大小和能否在逆境中生存的关键。本实验结果表明, 当把黑藻培养在含 Cd、Cu、Zn 污水中后, 该平衡随即被打破, 这种失衡首先是由于 O_2^- 产生速率的急剧上升, 尤其是高浓度处理更明显(图 1); 另一方面, 负责将其歧化为 H_2O_2 和 O_2 的 SOD 活性并没有发生应激性的增强, 酶活性都随金属浓度的增大而下降(图 2)。对 POD 和 CAT 活性而言, 只有 0.5—5mg/L 的 Zn 处理刺激了 POD 活性增加, 低于 10mg/L 的 Cd 和 Zn 浓度也诱使 CAT 活性有所增强, 而 Cu 则都始终显示出抑制效应。前人研究认为抗氧化系统(SOD、CAT、POD)清除 H_2O_2 和 O_2^- 功能的削弱, 将会导致形成高反应活性的 $\cdot OH$ ^[10]。根据灰色关联度分析, 3 个抗氧化酶对 Cd、Cu、Zn 胁迫起作用的主次顺序为: Cd: POD(0.746) > CAT(0.740) > SOD(0.468); Cu: POD(0.684) > CAT(0.683) > SOD(0.598); Zn: CAT(0.702) > POD(0.702) > SOD(0.575)。由此反映出 SOD 是黑藻体内的 3 个保护酶中对 Cd、Cu、Zn 最敏感和最易失活的酶类, 其解毒作用弱于 POD 和 CAT。

黑藻由于叶片极薄, 且沉入污染水中, 所以叶片受害均匀, 整个叶片由深绿色变为淡绿色, 最后完全失绿^[11]。实验中观察到由于 Cd、Cu、Zn 的毒性强弱差异, 所导致的植株褪绿的程度也不同, 在受试金属浓度和时间内, Cu 处理样本的失绿程度最明显, 其次为 Cd, 最高 Zn 处理浓度下的黑藻也仅变为浅黄绿色。叶绿素含量的变化与此一致, Cu 使叶绿素含量下降得最多, Cd 次之, 而 Zn 则在 0.5—5mg/L 浓度时刺激了叶绿素的生物合成。由此说明叶绿素含量也能反映植物受重金属胁迫程度的差异。已有研究表明, 与叶绿素含量减少直接相关的机制包括重金属抑制参与叶绿素合成的酶^[12]。重金属原位替

换叶绿素中央 Mg^{2+} 也是重要的损伤机制^[13]。作者认为,重金属 Cd、Cu、Zn 胁迫后黑藻抗活性氧伤害的能力减弱,致使叶绿体膜系统破坏也是叶绿素减少的重要原因(未发表资料)。作为光合作用的主要色素,叶绿素含量下降的越多,对植物光合作用的抑制程度也越重。

重金属对蛋白质含量变化的影响差异也比较显著,其中 Cu 使之呈下降趋势,这可能是由于其与—SH 基结合导致蛋白变性而降解,也可能是蛋白质合成酶的失活或 DNA 转录翻译途径受阻,影响了蛋白质的合成^[14]。而 Cd、Zn 都能在一定浓度范围内(Cd:0.5—1mg/L;Zn:0.5—5mg/L)刺激其合成,从而使其含量上升。作者认为这也是 Cu 毒性比 Cd 和 Zn 更强和各金属对黑藻毒害的浓度效应不同的原因之一。大量研究都表明重金属毒害后,植物体可以通过诱导合成植物络合素^[15]、金属硫蛋白^[16]和胁迫蛋白^[17]来螯合进入体内的重金属或在损伤蛋白的修复和保护中起作用。

众所周知,Cd 是植物非必需的重金属元素,而 Cu 和 Zn 是兼具营养和毒害的金属元素。虽然表现出相同抑制效应的浓度大小不同,但就其对黑藻活性氧代谢和叶绿素含量的影响来看,它们具有共同的作用机制:(1)加速活性氧自由基的生成。(2)抑制抗氧化酶活性。从而导致活性氧的累积和对膜系统的伤害,对细胞膜结构的损伤也证明这一点^[11]。(3)对光合色素含量产生影响。综合各指标的变化,Cu 的毒性最大,Cd 次之,Zn 最弱。由此看出 Cu 的环境生态效应不容忽视。从自由基的角度分析,Cu 的毒性之所以最强,其一因为 Cu 是非常活跃的氧化还原型过渡金属元素,它能吸收或释放一个电子(Cu^{2+}/Cu^{+}),从而产生自由基导致损伤^[18]。其二它是 Haber-Weiss 反应生成 $\cdot OH$ 等活性氧的非常有效的催化剂^[19]。虽然 Zn 也是过渡金属,但它的化学性质比 Cu 要弱的多。

本研究为急性毒害实验,结合外观表现和生理指标的变化,Cu 对黑藻的致死阈浓度为 0.5—1mg/L,Cd 为 1—2mg/L,Zn 为 5—6mg/L。黑藻的 Cu 致死剂量已经达到了国家环保总局制定的地面水环境质量标准(Cu:1mg/L),说明其对水体 Cu 污染极敏感。

参考文献:

[1] Banerjee B D, Seth V, Bhattacharya A. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers[J]. *Toxi-*

colog Letters. 1999, 107: 33—47

- [2] Li W M, Yin D Q, Hu S Q, et al. Effects of chloric-nitroanilinated chemicals on antioxidant enzymes in serum of *Carassius auratus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*. 2002, 22 (2): 236—240 [李伟民, 尹大强, 胡双庆, 等. 氯代硝基苯胺对鲫鱼 (*Carassius auratus*) 血清抗氧化酶的影响. 环境科学学报, 2002, 22 (2): 236—240]
- [3] Jia X Y, Chen Z W. The effects of Cu Cd on superoxide activities in *Carassius Auratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2003, 27 (3): 323—325 [贾秀英, 陈志伟. 铜、镉对鲫组织超氧化物歧化酶活性的影响. 水生生物学报, 2003, 27 (3): 323—325]
- [4] Xu Q S, Shi G X, Du K H, et al. Toxic effect of Cd^{2+} treatment on protective enzyme activity and ultrastructure 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]
- [5] Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants [J]. *Plant physiol Commun*. 1990, 6: 55—57 [王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, 6: 55—57]
- [6] Zhang Z L. Laboratory Guide for Plant Physiology (2nd edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990, 88—91; 154—155 [张志良. 植物生理学实验指导 (第 2 版). 北京: 高等教育出版社, 1990, 88—91, 154—155]
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantity of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*. 1976, 72: 248—254
- [8] Deng J L. Grey systems basic method [M]. Wuchang: Huazhong University of Science and Technology Press, 1998, 5—40 [邓聚龙. 灰色系统基本方法. 武汉: 华中理工大学出版社, 1998, 5—40]
- [9] Lü Q, Zheng R L. Membrane lipid peroxidation and deesterification of wheat induced by drought and active oxygen [J]. *Science in China (Series C)*. 1996, 26: 26—30 [吕庆, 郑荣梁. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化与脱酯化. 中国科学 (C 辑), 1996, 26: 26—30]
- [10] Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants [J]. *Photosynthetica*, 1997, 34 (3): 321—342
- [11] Shi G X, Du K H, Xie K B, et al. Ultrastructural study of leaf damaged from Hg^{2+} and Cd^{2+} pollution in *Hydrilla verticillata* [J]. *Acta Botanica Sinica*. 2000, 42 (4): 373—378 [施国新, 杜开和, 解凯彬, 等. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究. 植物学报, 2000, 42 (4): 373—378]
- [12] Van A F V, Clijsters, H. Effects of metals on enzyme activity in plants [J]. *Plant Cell Environment*. 1990, 13: 195—206
- [13] Kupper H, Kupper F, Spiller M. In situ detection of heavy metal substitution chlorophylls in water plants [J]. *Photosynthesis Research*, 1998, 58 (2): 123—133
- [14] Zhou C F, Wu G R, Shi G X, et al. The role of antioxidant systems in Cu stress resistance in *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Acta Botanica Sinica*. 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]
- [15] Cobbett C S. Phytochelatins biosynthesis and function in heavy-metal

- detoxification[J]. *Current Opinion in Plant Biology*. 2000 ,3:211 — 216
- [16] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002 ,53:159 —482
- [17] Sofia M E ,Boris A M ,Irina V G ,et al. Heat shock protein HSP70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and paper plant[J]. *Aquatic Toxicology*. 2002 ,57 :267 —280
- [18] Li Y and Trush M A. DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper :role for a Cu(II) / Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation[J]. *Carcinogenes* ,1993 ,7 :1303 —1311
- [19] Wardman P ,Cadeias L P. Fenton chemistry :an introduction[M]. *Radiat Res* ,1996 ,145 :525 —531

GENERATION OF ACTIVE OXYGEN AND CHANGE OF ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN HYDRILLA VERTICILLATA UNDER Cd,Cu AND Zn STRESS

XU Qin-Song ,SHI Guo-Xin ,WANG Xue and WU Guo-Rong

(College of Life Sciences , Nanjing Normal University , Nanjing 210097)

Abstract: It is well known that the unbalance between production and elimination of the active oxygen often caused by many chemicals and the antioxidant systems play an important role in the resistance to the stress. Heavy metal is a major pollutant in water body ,but little work has been done on the response of antioxidant enzyme activity in aquatic plants to heavy metals. In order to investigate the molecular toxicological effects of heavy metals on antioxidant enzyme activity in higher hydrophytes ,*Hydrilla verticillata*(L.f.) Royle ,a wide spread submerged macrophyte in China is selected and cultivated in nutrient solution containing different concentration of Cd ,Cu ,Zn for 7 days. The results showed that three heavy metals accelerated the generation rate of $O_2^{\cdot -}$ to certain extent ;Cu inhibited the SOD ,POD and CAT activity ;Cd decreased the SOD and POD activity ,while CAT activity increased under 5mg/L ;Zn had a similar influence with Cu and Cd on SOD ,but both POD and CAT activity were enhanced by 0.5 —5mg/L concentration. Evaluation with the method of grey relational grade analysis suggested that POD ,POD and CAT played an important role in protection against the injury resulting from active oxygen under Cu ,Cd and Zn stresses ,respectively. SOD was the most susceptible to the adversity. Chlorophyll content decreased when treated with Cd and Cu ,and augmented when Zn concentration was 0.5 —5mg/L. Chlorophyll a/ b value was higher than that of the control under all Zn concentration ;0.5mg/L Cu and 0.5 —1mg/L Cd treatment. The soluble protein content ascended when treated with 0.5 —5mg/L Zn and 0.5 —1mg/L Cd ,but descended by all Cu treatment. In general ,the toxicity of Cu was the most serious following by Cd and Zn. The lethal concentration was 0.5 —1mg/L for Cu ;1 —2mg/L for Cd and 5 —6mg/L for Zn. Therefore ,SOD activity served as a sensitive biomarker to evaluate the toxic effect of heavy metal on submerged macrophytes and *H. verticillata* was impressible to the Cu pollution in water environment.

Key words : Cd ;Cu ;Zn ;Stress ;*Hydrilla verticillata* ;Active oxygen ;Antioxidant enzyme ;Toxicity