

戊二醛胁迫对黑藻光合作用及抗氧化酶活性的影响

胡一鸿¹, 王梦龙¹, 袁盛建¹, 莫亿伟²

(1. 湖南人文科技学院生命科学系, 湖南 娄底 417000; 2. 中国热带农业科学院亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

摘要:为探讨戊二醛对常见沉水植物的危害, 用含有 0、1、5、10、50 mg·L⁻¹ 戊二醛的 1/20 Hoagland 营养液培养沉水植物黑藻, 就不同浓度的戊二醛胁迫下黑藻叶绿素含量、光合速率、抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)活性和 MDA 含量变化进行试验研究。结果表明: 戊二醛抑制叶绿素的合成或使其分解加速, 叶绿素含量下降, 光合速率下降; 1、5 mg·L⁻¹ 的戊二醛处理 1 d 和 3 d 后, SOD 活性上升; 1、5、10 mg·L⁻¹ 的戊二醛处理 1 d 和 3 d 后, POD 活性上升; 经 1 mg·L⁻¹ 戊二醛处理后, CAT 活性均处于较高水平, 但当戊二醛浓度大于等于 5 mg·L⁻¹ 时, CAT 活性与对照相比明显下降。经 1 mg·L⁻¹ 戊二醛处理, MDA 含量没有明显变化; 经 5、10、50 mg·L⁻¹ 戊二醛处理 3 d 后, MDA 含量上升。低浓度戊二醛胁迫后能诱导黑藻的抗氧化酶活性增加, 随着胁迫处理时间的延长和处理浓度的增大, 抗氧化酶活性下降, 但 1 mg·L⁻¹ 戊二醛处理 7 d 后, CAT 活性没有下降, 说明 CAT 对戊二醛的耐受能力较强。

关键词: 戊二醛; 黑藻; 抗氧化酶活性; 光合速率

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2013)06-1143-07 doi:10.11654/jaes.2013.06.009

Effects of Glutaraldehyde Stress on Photosynthesis and Antioxidase Activity of *Hydrilla Verticillata*

HU Yi-hong¹, WANG Meng-long¹, YUAN Sheng-jian¹, MO Yi-wei²

(1. Department of Life Sciences, Hunan Institute of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, China; 2. South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Zhanjiang 524091, China)

Abstract: In order to evaluate the injury and inherent physiological mechanism of glutaraldehyde stress on advanced aquatic organisms, *Hydrilla verticillata* was cultivated in 1/20 Hoagland solution with 0 mg·L⁻¹, 1 mg·L⁻¹, 5 mg·L⁻¹, 10 and 50 mg·L⁻¹ glutaraldehyde. Chlorophyll content, photosynthetic rate, antioxidantase (SOD, POD and CAT) activity and MDA content were measured. The results showed that with the increase of concentration of glutaraldehyde and the extension of stress time, the content of chlorophyll a and chlorophyll b declined and the photosynthetic rate dropped. Under the treatment of 1 mg·L⁻¹ or 5 mg·L⁻¹ glutaraldehyde for 1 day and 3 days, SOD activity increased. But at 10 mg·L⁻¹ or higher concentration of glutaraldehyde, it was significantly lower than that of the control. POD activity increased significantly under the treatment of 1 mg·L⁻¹, 5 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ glutaraldehyde for 1 day and 3 days, but when the stress time extended to 5 days, it showed an absolute dropping even at low concentration of 1 mg·L⁻¹ glutaraldehyde. At a general level, during all treatments, CAT activity showed a higher level under 1 mg·L⁻¹ glutaraldehyde, but 5 mg·L⁻¹ or higher concentration of glutaraldehyde stress made CAT activity lower than that of the control. MDA content remained almost unchanged in 1 day stress of all glutaraldehyde concentrations. However, when the stress time prolonged to 3 days and longer, it showed a rising tendency as the glutaraldehyde concentration increased. Generally, the results showed that antioxidantase activity of *H. verticillata* was stimulated by low concentration of glutaraldehyde but declined with higher glutaraldehyde concentration and prolonging stress time. It's worth noting that CAT activity did not decline with the treatment of 1 mg·L⁻¹ glutaraldehyde for 7 days, suggesting CAT might be more tolerant to low content of glutaraldehyde than SOD and POD.

Keywords: glutaraldehyde; *Hydrilla verticillata*; antioxidantase activity; photosynthetic rate

黑藻 [*Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle] 是多年生的淡水大型沉水植物, 常用作水体绿化的植被, 也是多

种淡水鱼类和蟹类的重要饲料。黑藻的生长旺盛, 能作为重金属污染环境修复植物和水体污染的指示植物^[1-2]。戊二醛广泛应用于医疗消毒、酶固定化、水处理、养殖、制革工业等行业^[3-4], 戊二醛的羰基能与蛋白质和核酸的羟基、巯基、羧基、氨基等基团相互作用, 通过共价键交联这些基团影响生物的生长与代谢, 如

收稿日期: 2012-10-18

基金项目: 湖南人文科技学院博士启动基金(1007)

作者简介: 胡一鸿(1965—), 湖南冷水江人, 博士, 教授, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: huyihongwangyi@163.com

通过交联细菌细胞壁和细胞膜的氨基进行杀毒,医院常采用高浓度的戊二醛灭菌^[5],这些废水通常不经处理直接排放进入水体中。其中戊二醛具有水解速度慢、热稳定性强和自然光下稳定等特点,因此大量未经处理的戊二醛直接向河流排放对水生生物造成很大的影响^[3]。有研究表明对戊二醛敏感的水生生物如月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)的致死浓度约为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5]。还有研究发现,戊二醛浓度大于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就会对水体中的生物环境造成影响^[6]。虽然前人在重金属胁迫对黑藻的生理生化变化和毒理机理已有不少的研究^[7-9],有机物中苯类污染胁迫黑藻生长机理也有相关报道^[2],但是戊二醛对黑藻生长影响的研究报道并不多,对其胁迫机理也尚不清楚。

本文以不同浓度的戊二醛胁迫黑藻,通过研究其光合速率的变化、分析光合色素含量的变化及3种主要抗氧化酶(超氧化物歧化酶,SOD;过氧化物酶,POD;过氧化氢酶,CAT)活性和膜脂过氧化的影响,以期阐明戊二醛对水生生物黑藻的毒害机理,并为水体的戊二醛污染预报和治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑藻采自湖南省冷水江大乘山的泉水。

1.2 试验方法

在室温下于纯净水中驯化培育黑藻1周后选取8~10 cm长的枝条移栽入含1/20 Hoagland的1000 mL烧杯中,烧杯下部铺3 cm河砂,在烧杯中加入戊二醛使其终浓度分别为1、5、10、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以不加戊二醛($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为对照进行处理。所有的处理均设置3个重复,随机排列,置于光照培养箱中培养。培养条件为25℃、光照强度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照周期12 h/12 h(昼/夜),分别在处理后的1、3、5、7 d取样进行测定分析。

1.3 分析方法

黑藻叶绿素的测定采用Arnon法^[10]:取黑藻叶片0.05 g,加入3 mL丙酮研磨,5000 g离心5 min,取1 mL上清液加入2 mL 80%丙酮,测定 A_{663} 和 A_{645} ;黑藻叶片光合速率测定参照刘学庆等^[11]的方法,采用Oxy-graph型氧电极仪(Hansatech公司,英国)测定放氧速率:将黑藻叶片切成16 mm×2 mm小片,置于含2.5 mL $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.8磷酸缓冲液的反应杯中,距反应杯30 cm设置20 W射灯光源照射,设定磁转子速度为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,测定5 min内黑藻放氧量,用单位时

间内单位叶面积放氧量($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)表示光合速率;SOD活性测定按照Ruan等^[12]的方法,以抑制光化还原氯化硝基氮蓝四唑50%为1 U;POD活性测定按照张龙翔等^[13]的方法,以每分钟 A_{480} 增加0.1为1 U;CAT活性测定采用Liu等^[14]的方法, H_2O_2 在 A_{240} 的摩尔消光系数取 $39.4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;丙二醛(MDA)含量测定采用张志良等^[15]的方法,测定 A_{450} 与 A_{532} 。

1.4 数据处理

所有试验的测定均重复3次,试验结果采用SPSS11.5进行差异显著性分析(LSD法),在图中用不同的小写字母标注差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 戊二醛胁迫处理对黑藻叶绿素含量的影响

光合作用是通过叶绿素吸收太阳能再将能量转到叶绿体的光合中心的过程,因而叶绿素含量的多少通常是直接体现叶片光合能力大小的一个重要生理指标。如图1所示,随戊二醛处理浓度的增大和处理时间的延长,各浓度组的叶绿素含量与对照相比均有明显下降,戊二醛浓度越高,叶绿素下降的趋势越明显,但叶绿素a/b的比值没有明显变化。50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛处理7 d后,总叶绿素的含量仅为对照的8.29%,叶片泛黄,说明当水体受到戊二醛污染后,直接导致叶片叶绿素的含量下降,其原因可能是戊二醛影响黑藻叶绿素a、b的合成或使其分解加速,造成总叶绿素含量降低,而且随着污染时间的延长,叶绿素含量下降更加严重。

2.2 戊二醛胁迫处理对黑藻光合速率的影响

光合速率是反映植物叶片碳同化能力的重要指标,由于黑藻为沉水植物且叶片很小,采用氧电极法更能真实地测定黑藻的光合速率。如图2所示,用戊二醛处理后,各浓度组黑藻的光合速率与对照相比均明显下降($P < 0.05$)。其中50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛处理1 d后,光合速率下降为对照的19.16%;处理3 d后,光合速率仅为对照的9.09%。试验结果表明戊二醛能在短时间内降低黑藻的光合速率,高浓度的戊二醛对光合速率的影响更加明显。

2.3 戊二醛胁迫处理对SOD活性变化的影响

如图3所示,用1、5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛处理1 d和3 d,与对照相比黑藻SOD活性上升,说明低浓度下适时的胁迫提高了叶片的抗氧化酶SOD活性,有利于清除过多的活性氧;随着胁迫的时间延长,SOD的活性开始下降,用1、5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛处理5 d,SOD活

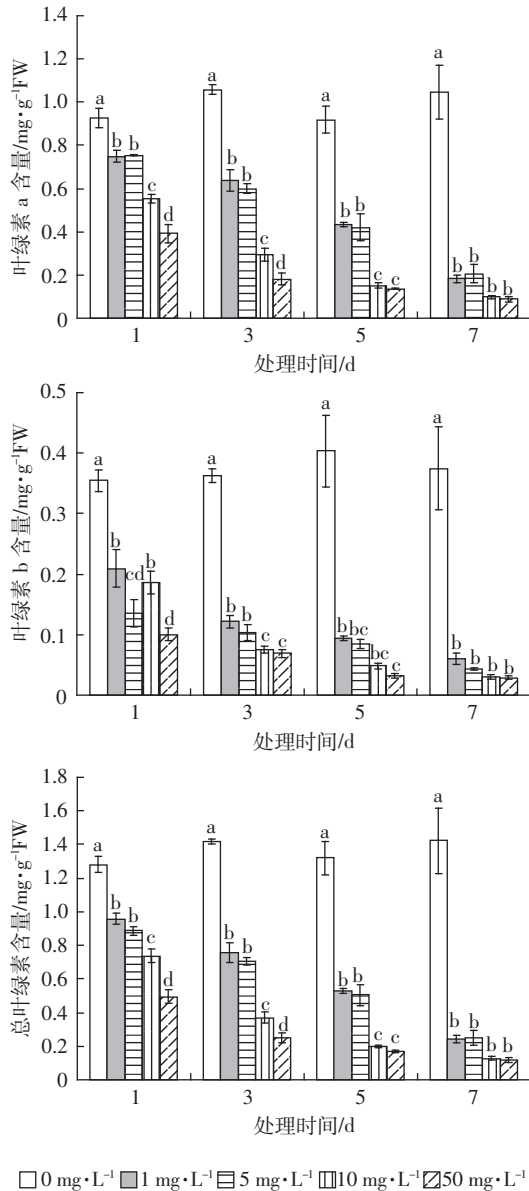


图 1 不同浓度戊二醛胁迫对黑藻叶绿素的影响

Figure 1 Effect of glutaraldehyde stress at different concentration on chlorophyll content of *Hydrilla verticillata*

性分别仅为对照的 72.08% 和 56.85%。用 10 mg·L⁻¹ 浓度以上的戊二醛处理 1 d, SOD 活性即开始下降, 说明高浓度对 SOD 的活性影响更大, 随着处理时间的延长, 这种抑制效果更加明显; 用 10、50 mg·L⁻¹ 的戊二醛处理 7 d, SOD 活性分别仅为对照的 34.39% 和 17.83%, 均达到显著差异 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 低浓度的戊二醛诱导了 SOD 活性的上升, 有利于黑藻提高抗氧化能力; 当浓度增加时, 黑藻已受到戊二醛的严重胁迫, 导致 SOD 的活性不断下降, 浓度越高, SOD 活性下降越快, 可能是由于戊二醛的浓度超过了黑藻耐受的浓度范围。

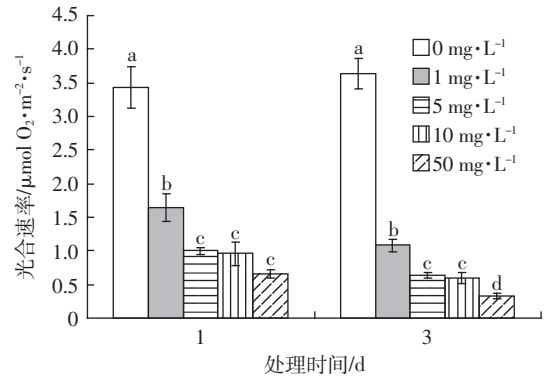


图 2 不同浓度戊二醛胁迫下黑藻叶片的光合速率

Figure 2 Effect of glutaraldehyde stress at different concentration on photosynthetic rate of *Hydrilla verticillata*

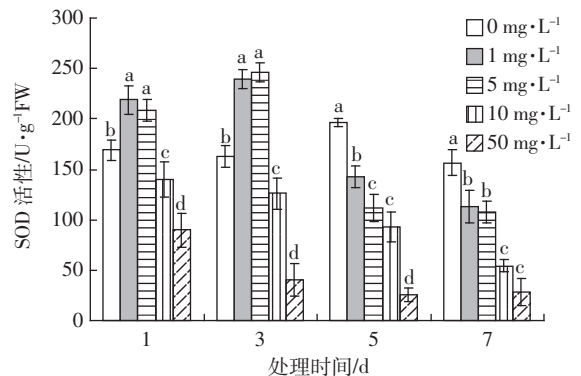


图 3 不同浓度戊二醛胁迫下黑藻 SOD 活性变化

Figure 3 Effect of glutaraldehyde stress at different concentration on SOD activity of *Hydrilla verticillata*

2.4 戊二醛胁迫处理对 POD 活性变化的影响

如图 4 所示, 经戊二醛处理后 1 d, 与对照相比, 各浓度组黑藻的 POD 活性均出现了上升, 其中用 10 mg·L⁻¹ 戊二醛处理的黑藻的 POD 活性为对照活性的 283.92%, 而用 50 mg·L⁻¹ 戊二醛处理的黑藻的 POD

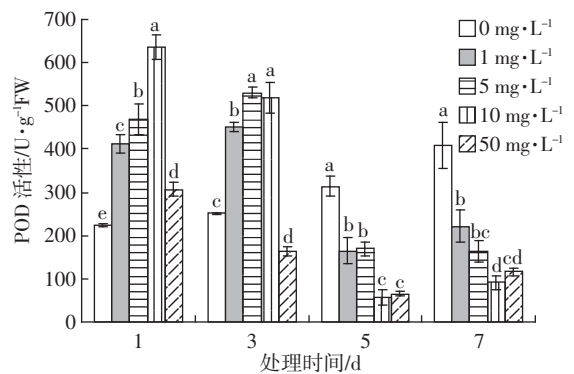


图 4 不同浓度戊二醛胁迫下黑藻 POD 活性变化

Figure 4 Effect of glutaraldehyde stress at different concentration on POD activity of *Hydrilla verticillata*

活性也达到对照活性的 137.05%,说明戊二醛胁迫能够提高 POD 活性,有利于对歧化反应产生的过氧化物的清除。但浓度达 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,高浓度的戊二醛已对黑藻造成了胁迫,POD 的上升幅度低于其他浓度组的黑藻。经戊二醛处理 3 d, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛组黑藻的 POD 活性下降,仅为对照活性的 73.33%,达到显著差异 ($P < 0.05$),而其他浓度组黑藻的 POD 活性仍明显高于对照。随处理时间的延长,各浓度组黑藻的 POD 与对照相比均出现了下降的趋势,处理 5 d 时, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低浓度戊二醛也能显著抑制 POD 活性。结果表明,戊二醛能够刺激黑藻 POD 活性的上升,随处理时间的延长,黑藻受到损害,高浓度戊二醛处理的黑藻的 POD 活性的下降趋势更为明显。

2.5 戊二醛胁迫处理对 CAT 活性变化的影响

如图 5 所示,经 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛处理后,在各个处理时间内,CAT 活性处于较高的水平,当戊二醛浓度大于等于 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CAT 活性出现明显下降。经 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛处理 3 d,黑藻的 CAT 活性明显上升,为对照活性的 168.91%,达到显著差异 ($P < 0.05$),说明低浓度的戊二醛胁迫能够刺激 CAT 活性应激上升,有利于黑藻对过氧化物的清除。在各个处理时间内其他浓度组的 CAT 的活性均明显低于对照,说明 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上的戊二醛处理浓度已超过了黑藻的耐受能力。

2.6 戊二醛胁迫处理对 MDA 含量变化的影响

MDA 是细胞膜脂过氧化产物,其含量的多少直接表示细胞受到过氧化伤害的程度。从图 6 可知,经 4 种浓度的戊二醛处理 1 d,各浓度组的黑藻 MDA 含量与对照相比无显著差异。用 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的戊二醛对黑藻处理 3~7 d,MDA 含量与对照相比略有增

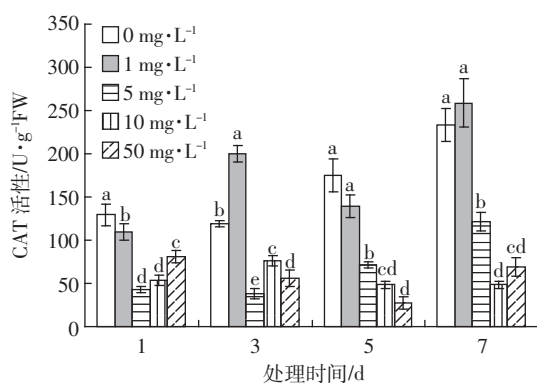


图 5 不同浓度戊二醛胁迫下黑藻 CAT 活性变化

Figure 5 Effect of glutaraldehyde stress at different concentration on CAT activity of *Hydrilla verticillata*

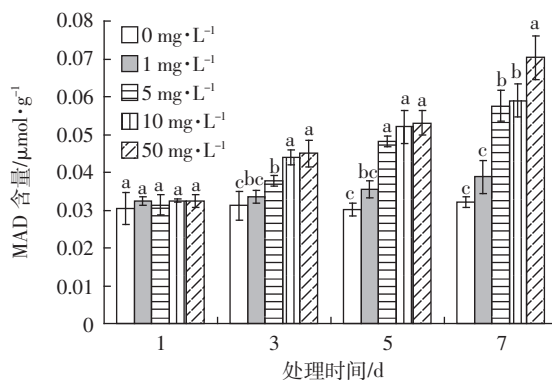


图 6 不同浓度戊二醛胁迫下黑藻 MDA 含量变化

Figure 6 Effect of glutaraldehyde stress at different concentration on MDA content of *Hydrilla verticillata*

加但无显著差异,而其余浓度组的 MDA 含量都显著增加。用 5 、 10 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛处理 3 d,MDA 含量明显高于对照;处理 7 d,MDA 含量分别为对照的 181.25%、184.38%和 218.75%,均达显著差异 ($P < 0.05$)。当水体中的戊二醛达 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时,受戊二醛胁迫 3 d 就使 MDA 的含量均显著增加,而且随处理时间的延长,各浓度组的 MDA 含量均呈增加的趋势,说明 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上浓度的戊二醛已能够促使黑藻的膜脂过氧化,对黑藻细胞造成伤害。

3 讨论

3.1 戊二醛对黑藻叶绿素和光合效率的影响

叶绿体是植物光合作用的场所,光合色素的变化是植物对环境污染敏感的重要指标之一,光合色素的合成受到抑制使得叶绿素的含量下降,叶绿体膜系统和光合中心受到破坏,均能造成光合效率与光合速率下降^[2,16-17]。徐勤松等^[7]的研究表明,镉、铜和锌等金属离子能够抑制黑藻叶绿素的合成,镉等金属离子通过抑制叶绿素酸脂还原酶和影响氨基- γ -戊酮酸合成,从而抑制叶绿素的合成^[18];张建平^[19]对镉胁迫浮萍的研究也表明,镉等金属离子对光合中心造成破坏,降低了光合链的电子传递速率,从而降低光合速率和抑制光合磷酸化;也有研究表明,植物受到金属离子和杀虫剂胁迫后,光合色素被氧化分解,同时叶绿体膜、类囊体的结构和 PS I、PS II 受到破坏,导致光合速率下降^[20-24]。前人的研究也表明,有机物也能不同程度影响叶绿素的含量:高海荣等^[25]研究发现二甲基甲酰胺处理的沉水植物苦草叶片明显褪绿变黄或变黑,叶绿素的含量降低;Kummerová 等^[26]的研究表明,豆科植物经多环芳烃萤蒽处理后叶绿素含量明显下降;

Yan 和 Zhou^[2]的研究结果也表明,高浓度的芳香族的有机化合物能降低黑藻的叶绿素含量。本试验也发现,低浓度的戊二醛处理后黑藻叶绿素的含量显著下降,短时间内就使叶片光合速率降低,而且随培养时间的延长,下降幅度更为明显,并且随戊二醛的浓度增大,这种现象更明显。

正常情况下,叶绿素的分解与合成代谢处于一个动态平衡的过程,一旦平衡被打破就会导致植物滞绿或者黄化,影响光合效率^[27]。叶绿素 a 位于 PSI、PSII 和集光蛋白复合体(LHCP)上,叶绿素 b 只位于 LHCP 上,在叶绿素的合成与分解途径中通过叶绿素循环调节叶绿素 a/b 的比值来适应不同的生理状况。其中,叶绿素 a 由叶绿素脂 a(Chlide a)还原而成,叶绿素 b 是 Chlide a 转化成 Chlide b,再由 Chlide b 还原而成;叶绿素的分解则是由叶绿素 b 转化成叶绿素 a,叶绿素 a 水解形成 Chlide a 进行分解^[28]。黑藻经戊二醛处理后,叶绿素的含量出现了明显的下降,高浓度的戊二醛处理后黑藻的叶片出现明显泛黄现象,说明在戊二醛的胁迫下,叶绿素的合成途径可能受到破坏或者叶绿素受到氧化而造成分解加速,导致叶绿素的含量减少。叶绿素 a/b 的比值没有显著变化,推测在此过程中,黑藻的叶绿素循环并没有受到影响。由于叶绿素的合成与分解是一个由许多酶参与的复杂过程,戊二醛抑制叶绿素的合成或者加速叶绿素分解的机制还有待于深入研究。

3.2 戊二醛对 SOD、POD、CAT 活性和 MDA 含量的影响

抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 是植物的重要保护酶系统,正常情况下,这些酶能够维持体内的活性氧(ROS)的动态平衡。逆境条件下,ROS 产生和清除的平衡会被打破,ROS 增多促使保护酶的活性应激上升,增强清除 ROS 的能力,当 ROS 积累超过保护酶系的清除能力时,致使膜脂过氧化,造成 MDA 含量上升^[7,29]。因此,清除 ROS 能力的大小能够衡量植物抗逆性的能力。SOD 消除过氧化产生的氧自由基,POD、CAT 则用于清除歧化反应产生的有毒物质 H₂O₂。有研究表明在重金属的胁迫下,植物体产生大量的氧自由基引起膜系统中不饱和脂肪酸的过氧化,从而改变膜系统的机构和功能,进而引起 DNA 损伤,改变 RNA 从细胞核向细胞质的运输^[30];另外重金属的积累直接破坏保护酶系统,降低了保护酶清除自由基的能力,加剧了膜脂过氧化作用,造成细胞器不可逆损伤,破坏了植物的正常生命活动的结构基础^[31];有机污染物同样也会对植物的抗氧化酶系统产生影

响,当植物受到有机污染物的胁迫时,会激活其体内的抗氧化酶系统,相应的抗氧化酶水平随之升高^[32],但当污染物浓度过高时,抗氧化系统遭到破坏,各种抗氧化酶含量下降^[33]。

黑藻叶片很薄,仅由单层细胞组成,而且叶片均匀浸泡在水中,因而对金属离子和有机物胁迫十分敏感。大量研究表明,铜、锌、镉、铁等金属离子低浓度时会诱导黑藻 SOD、POD 和 CAT 等酶的表达,这些离子浓度增高时会打破黑藻的 ROS 平衡,产生严重的氧化胁迫,造成膜脂过氧化^[7-8,20,29,34];Yan 和 Zhou^[2]用含苯有机试剂处理黑藻的实验也表明,在低浓度的有机试剂胁迫下,黑藻的 POD、SOD 等保护酶的活性均应激上升,随处理浓度的增大,MDA 含量上升,酶受到氧化胁迫,使得细胞受到伤害,保护酶的活性随后出现下降的现象。本试验中,低浓度的戊二醛胁迫下在短时间内能提高 SOD、POD 的活性,黑藻在戊二醛胁迫下使 SOD、POD 活性应激提高,从而在一定程度上提高其耐性。随着处理时间的延长,黑藻受到 ROS 的胁迫,MDA 含量上升,SOD、POD 活性与对照相比明显下降,说明此时严重的氧化胁迫产生的 O₂·已给 SOD 造成损害,POD 活性在 SOD 产物严重过载的情况下受到抑制。同时,由于戊二醛是双功能试剂,其活泼羰基能与这些酶蛋白的极性基团交联,直接破坏酶的结构造成酶活性下降。同样,低浓度的戊二醛处理黑藻后,CAT 的活性也出现应激上升的现象,但随后其活性与对照相比没有明显下降,说明 CAT 对低浓度戊二醛的耐受能力高于 SOD 和 POD。

4 结论

(1)用戊二醛处理黑藻,随戊二醛浓度增大和处理时间的延长,叶绿素含量下降,导致光合速率下降。

(2)经低浓度戊二醛处理黑藻 1~3 d,SOD 活性应激上升,当戊二醛浓度为 10 mg·L⁻¹ 或更大时,戊二醛抑制 SOD 活性;戊二醛能够刺激黑藻 POD 活性上升,随处理时间的延长,1 mg·L⁻¹ 的低浓度戊二醛就能抑制 POD 活性;低浓度的戊二醛能够刺激黑藻 CAT 活性上升,当戊二醛浓度达到 5 mg·L⁻¹ 时,CAT 活性出现明显下降。低浓度的戊二醛刺激抗氧化酶活性上升,而高浓度的戊二醛抑制抗氧化酶的活性。

(3)经 5 mg·L⁻¹ 及更大浓度的戊二醛处理 3 d 时,MDA 含量显著增加,致使黑藻细胞由于膜脂过氧化造成伤害。

参考文献:

- [1] Wang C, Zhang S, Wang P, et al. Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle plants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(2): 189–195.
- [2] Yan S, Zhou Q. Toxic effects of *Hydrilla verticillata* exposed to toluence, ethylbenzene and xylene and safety assessment for protecting aquatic macrophytes[J]. *Chemosphere*, 2011, 85(6): 1088–1094.
- [3] Leung H. Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 49(1): 26–39.
- [4] Emmanuel E, Hanna K, Bazin C, et al. Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organism[J]. *Environment International*, 2005, 31(3): 399–406.
- [5] Sano L L, Krueger A M, Landrum P F. Chronic toxicity of glutaraldehyde: Differential sensitivity of three freshwater organisms[J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(3): 283–296.
- [6] Jolibois B, Guerbert M, Vassal S. Glutaraldehyde in hospital wastewater[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 42(2): 137–144.
- [7] 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[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(1): 107–112.
XU Qin-song, SHI Guo-xin, WANG Xue, et al. Generation of active oxygen and change of antioxidant enzyme activity in *Hydrilla verticillata* under Cd, Cu and Zn stress[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(1): 107–112.
- [8] Wang C, Zhang S, Wang S, et al. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(7): 938–945.
- [9] 杨艳华, 陈国祥, 刘少华, 等. 镉对黑藻叶光化学及硝酸还原酶特性的影响[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2002, 25(1): 28–33.
YANG Yan-hua, CHEN Guo-xiang, LIU Shao-hua, et al. Effect of cadmium on characteristics of photochemistry and nitrate reductase in the leaves of *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2002, 25(1): 28–33.
- [10] 黄帆, 郭正元, 徐珍. 测定浮萍叶绿素含量的方法研究[J]. *实验技术与管理*, 2007, 24(5): 29–31.
HUANG Fan, GUO Zheng-yuan, XU Zhen, et al. Determined methods of chlorophyll from *Lemna paucicostata*[J]. *Experimental Technology and Management*, 2007, 24(5): 29–31.
- [11] 刘学庆, 李涛, 孙级霞, 等. 应用氧电极方法测定蝴蝶兰光合速率[J]. *山东农业科学*, 2009(3): 111–112, 119.
LIU Xue-qing, LI Tao, SUN Ji-xia, et al. Mensuration of phalaenopsis photosynthetic rate by oxygen electrode[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2009(3): 111–112, 119.
- [12] Ruan H, Shen W, Ye M, et al. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(8): 677–681.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法技术[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 348–351.
- ZHANG Long-xiang, ZHANG Ting-fang, LI Ling-yuan. Experimental method and technology of biochemistry[M]. 2nd Edition. Beijing: High Education Press, 1997: 348–351.
- [14] Liu K, Xu S, Xuan W, et al. Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa*[J]. *Plant Science*, 2007, 172(3): 544–555.
- [15] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 第四版. 北京: 高等教育出版社, 2009: 227–229.
ZHANG Zhi-liang, QU Wei-jing, LI Xiao-fang. The guidance of plant physiology experiments[M]. 4th Edition. Beijing: High Education Press, 2009: 227–229.
- [16] Yruea I. Copper in plants[J]. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, 17(1): 145–156.
- [17] 陈新斌, 孙锦, 郭世荣, 等. 海水胁迫对菠菜叶绿素代谢的影响[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(9): 1781–1787.
CHEN Xin-bin, SUN Jin, GUO Shi-rong, et al. Chlorophyll metabolism of spinach leaves under seawater stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(9): 1781–1787.
- [18] Stobart A X, Griffiths W T, Ameen-Burkhari I, et al. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Physiologia Plantarum*, 1985, 63(3): 293–298.
- [19] 张建平, 陈娟, 胡一鸿, 等. 镉胁迫对浮萍叶片光合功能的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(6): 2027–2032.
ZHANG Jian-ping, CHEN Juan, HU Yi-hong, et al. Effects of cadmium stress on photosynthetic function of leaves of *Lemna minor* L.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6): 2027–2032.
- [20] Srivastava S, Mishra S, Tripathi R D, et al. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 80(4): 405–415.
- [21] Kanoun-Boulé M, Vicente J, Nabais C, et al. Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper[J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91(1): 1–9.
- [22] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(6): 1027–1039.
- [23] Pan H, Li X, Xu X, et al. Phytotoxicity of four herbicides on *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria spiralis* and *Elodea nuttallii*[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2009, 21(3): 307–312.
- [24] Mohapatra P K, Schubert H, Schiewer U. Effect of dimethoate on photosynthesis and pigment fluorescence of *Synedra sp.* PCC 6803[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 36(3): 231–237.
- [25] 高海荣, 林清, 陆延婷. 有机溶剂胁迫下苦草生理指标的变化[J]. *广西师范学院学报(自然科学版)*, 2006, 23(4): 40–44.
GAO Hai-rong, LIN Qing, LU Yan-ting. Physiological changes of the submerged plant *Vallisneria spiralis* under organic solvents stress[J]. *Journal of Guangxi Teachers Education University (Natural Science Edition)*, 2006, 23(4): 40–44.
- [26] Kummerová M, Krulová J, Zezulka S, et al. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(3): 489–496.

- [27] Kusaba M, Ito H, Morita R, et al. Rice non-yellow coloring is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(4):1362-1375.
- [28] 史典义, 刘忠香, 金危危. 植物叶绿素合成、分解代谢及信号调控[J]. 遗传, 2009, 31(7):698-704.
- SHI Dian-yi, LIU Zhong-xiang, JIN Wei-wei. Biosynthesis, catabolism and related signal regulations of plant chlorophyll[J]. *Hereditas*, 2009, 31(7):698-704.
- [29] 许秋瑾, 金相灿, 王兴民, 等. 不同浓度铵态氮对镉胁迫轮叶黑藻生长及抗氧化酶系统的影响 [J]. 应用生态学报, 2007, 18(2):420-424.
- XU Qiu-jin, JIN Xiang-can, WANG Xing-min, et al. Effects of different concentration ammonium-N on *Hydrilla verticillata* antioxidant enzymes under Cd stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(2):420-424.
- [30] Tuteja N, Mohan B S, Mithilesh K M, et al. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: Progress in plants[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 36(4):337-397.
- [31] 徐勤松, 施国新, 许丙军, 等. Cu、Zn 在黑藻叶片中的富集及其毒理学分析[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1):1-8.
- XU Qin-song, SHI Guo-xin, XU Bing-jun, et al. Bioaccumulation and toxicity of Cu and Zn in *Hydrilla verticillata* (Linn. F.) Royle[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1):1-8.
- [32] Verkleij J A C, Golan-Goldhirsh A, Antosiewicz D M, et al. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 67(1):10-22.
- [33] Qu B, Zhao H, Zhou J. Toxic effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on wheat (*Triticum aestivum* L.) plant[J]. *Chemosphere*, 2010, 79(5):555-560.
- [34] Sinha S, Gupta M, Chandra P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle: Response of antioxidants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 38(3):286-291.