

沉水植物对重金属 Cu²⁺的生物吸附及其生理反应

颜昌宙¹, 曾阿妍²

(1.中国科学院城市环境研究所, 福建 厦门 361021; 2.北京师范大学环境学院, 北京 100875)

摘要:采用室内培养实验方法,研究了沉水植物轮叶黑藻(*Hydrilla verticillata*)和穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)在吸收铜离子过程中产生的生理反应。以上两种沉水植物在 Cu²⁺浓度分别为 0、2、4、8、16、32、64 mg·L⁻¹ 的溶液中暴露了 24、48、72、96 h,结果表明:黑藻对铜的积累量明显高于狐尾藻对铜的积累量,本实验中黑藻对铜的最大积累量为 11 295.31 μg Cu·g⁻¹(干重),而狐尾藻对铜的最大积累量为 6 861.26 μg Cu·g⁻¹(干重);对以上两种植物的叶绿素含量、SOD 和 POD 活性产生胁迫效应的 Cu²⁺浓度明显不同,表明狐尾藻较黑藻对重金属 Cu²⁺胁迫具有更高的耐受性。以上研究结果对利用沉水植物去除重金属污染能起到一定的指导和参考作用。

关键词:沉水植物;生物吸附;Cu²⁺;叶绿素;SOD;POD

中图分类号:X173 文献标志码:A 文章编号:1672–2043(2009)02–0366–05

Biosorption of Cu²⁺ by Submerged Macrophytes and Their Physiological Responses

YAN Chang-zhou¹, ZENG A-yan²

(1.Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2.School of Environmental Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the physiological responses of *Hydrilla verticillata* and *Myriophyllum spicatum* in the process of copper biosorption. Chlorophyll and antioxidant enzymes(SOD and POD)were measured to reveal copper stress on submerged macrophytes at various concentrations. Both of submerged aquatic macrophytes were treated with 0, 2, 4, 6, 8, 16, 32, 64 mg·L⁻¹ copper solution (copper(II)sulphate). Copper accumulation in the plants after an exposure period of 24, 48, 72, 96 h showed that Cu uptake by *H. verticillata* was much higher than that by *M. spicatum*. In this study, the maximum accumulation was 11.29 mg Cu·g⁻¹(dry weight)for *H. verticillata*, whereas, only 6.86 mg Cu·g⁻¹(dry weight)for *M. spicatum*. Dose effect of copper stress on both macrophytes significantly differed in chlorophyll content and activities of SOD and POD. Compared with the control treatment, copper amendments caused significant differences in chlorophyll content and activities of SOD and POD, 32 mg·L⁻¹, 64 mg·L⁻¹, and 8 mg·L⁻¹ for *M. spicatum*, and 16 mg·L⁻¹, 8 mg·L⁻¹, and 2 mg·L⁻¹ for *H. verticillata*, respectively. Our results indicate that *M. spicatum* is much more tolerant to Cu stress than *H. verticillata*. These findings may contribute to selection of potential submerged aquatic macrophytes for removal of heavy metals in aquatic environments.

Keywords:submerged macrophytes; biosorption; Cu²⁺; chlorophyll; SOD; POD

作为水生态系统中主要的初级生产者之一,高等水生植物具有重要的生态环境功能,不仅可以去除N、P等营养物质和有机污染负荷,还可以吸附、吸收污水中的重金属和有害元素^[1]。因此,一些水生植物常用于构建人工湿地或植物塘^[2–4],以净化、吸收废水或面源污染中的有害元素,达到减轻地表水体污染的目的。然而,重金属污染将影响植物的生长和植物体内

活性氧代谢系统的平衡,导致一系列有害的生理生化变化。研究者已经从形态和显微结构特征、叶绿素和蛋白质等生理生化特征、抗氧化酶活性变化等方面做了大量的研究工作^[5–8],并有从以前的高剂量、短期的急性毒性试验向低剂量、长期的慢性毒性试验转变的趋势^[9]。目前有关重金属污染对沉水植物生态毒理效应的研究主要集中在暴露剂量-效应关系的研究上,而从不同沉水植物的重金属生物积累能力与生态毒理效应关系角度开展的研究还涉及较少。

轮叶黑藻(*H. verticillata*)和穗花狐尾藻(*M. spicatum*)是多年生沉水植物,具有生长范围广、耐污能

收稿日期:2008–05–02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(20777059)

作者简介:颜昌宙(1969—),男,湖南衡阳人,博士,研究员。

E-mail:czyan@iue.ac.cn

力和适应性强的特点,在国内外富营养化水体治理和生态修复中已经得到了广泛的应用,并且对重金属具有很强的吸收积累能力^[10]。本文研究了轮叶黑藻和穗花狐尾藻对重金属 Cu²⁺的生物积累,以及在此条件下 Cu²⁺对轮叶黑藻和穗花狐尾藻的一些生理指标的影响,目的是为筛选出适宜的沉水植物进行水体治理和生态修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料的制备

轮叶黑藻和穗花狐尾藻取自太湖,截取生长健壮、形态较一致的顶枝,用3%的盐酸溶液浸洗后再用蒸馏水冲洗,晾干表面水分后备用。将分析纯硫酸铜溶液配制成浓度为100 mg·L⁻¹的储备液,置于1 000 mL容量瓶中(25℃)备用。

1.2 实验方法

取150 mL初始Cu²⁺浓度分别为0、2、4、8、16、32和64 mg·L⁻¹溶液于250 mL锥形瓶中,加入2.0 g植物体(鲜重),放在摇床中振荡,分别在24、48、72、96 h后取出。处理后每个瓶中取1.0 g植物叶,经蒸馏水清洗几次后,在室温中晾干,在70℃烘干2 d确定其干重。将植物干样放入四氟乙烯消解罐中,先加2~3滴稀硝酸湿润样品,再加1 mL氢氟酸和1 mL高氯酸,将四氟管密封拧紧,用电热板加热(在160~170℃之间),消解2~3 h。冷却后,取出四氟管在200℃的石英砂中加热赶酸,在液体浓缩成球状后,用3%的稀硝酸稀释小球,并将其转移至容量瓶中,定容,采用原子吸收法测定Cu²⁺离子。为了解沉水植物在吸收Cu²⁺后生理反应,测定各浓度处理组初始和96 h后的植物叶绿素含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性。

1.3 各项生理指标的测定方法

叶绿素含量的测定:取新鲜叶片,用蒸馏水洗净、揩干,称取0.5 g放入研钵中,采用丙酮提取法^[11]、分光光度法测定。

SOD、POD酶液的制备:取植株相同叶位的鲜叶片,用蒸馏水洗净、揩干,用于测定各项生理指标。SOD、POD酶液制备时取材于预冷研钵中,加入pH7.8磷酸缓冲液(0.05 mol·L⁻¹),冰浴下研磨成匀浆,10 000 r·min⁻¹低温(4℃)离心20 min,上清液即为所需要的酶液。

SOD活性测定:采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法^[11]。

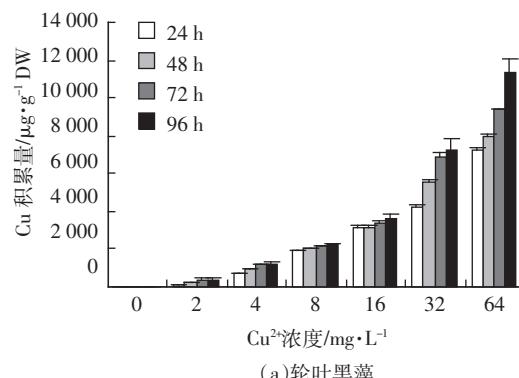
POD活性的测定:采用愈创木酚氧化法^[12]。

以上所有试验设置3个平行。

2 结果与讨论

2.1 Cu 在植物叶的积累量

在Cu²⁺浓度分别为0、2、4、8、16、32、64 mg·L⁻¹的溶液中暴露24~96 h后,轮叶黑藻和穗花狐尾藻叶中的Cu积累量见图1。由图1可见,Cu在植物叶的积累量与溶液中Cu²⁺浓度的增加呈正相关。然而,两种植物中Cu的积累量明显不同($P<0.05$)。例如:当采用Cu²⁺浓度为2 mg·L⁻¹的溶液处理植物24 h后,轮叶黑藻叶中的积累量为145.82 μg Cu·g⁻¹(干重),而狐尾藻中的积累量仅为58.10 μg Cu·g⁻¹(干重)。同时,也可以发现两种植物中Cu的积累量基本上均随暴露时间的延长而增加。在本实验条件下,轮叶黑藻的最大积累量为11 295.31 μg Cu·g⁻¹(干重),而狐尾藻的最大积累量为6 861.26 μg Cu·g⁻¹(干重)。



(a) 轮叶黑藻

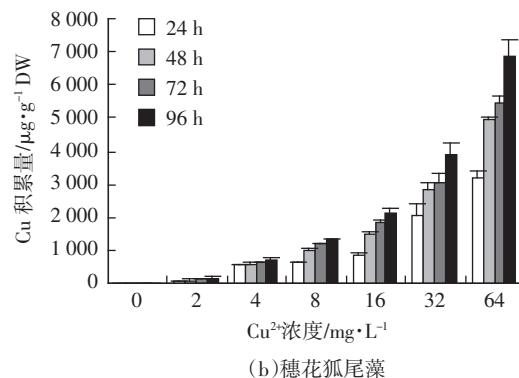


图1 暴露24~96 h后轮叶黑藻和穗花狐尾藻叶中的Cu积累量

Figure 1 Copper accumulation in leaves of *H. verticillata* and *M. spicatum* exposed for 24~96 h

2.2 植物体叶绿素的变化

表1对黑藻、狐尾藻实验前以及暴露96 h后的叶绿素含量进行了比较。从表1可以看出,在Cu²⁺浓

度为 0~8 mg·L⁻¹ 的范围内, 黑藻实验前和暴露 96 h 后的叶绿素含量没有明显差异($P>0.05$);而狐尾藻也在 Cu²⁺浓度为 0~16 mg·L⁻¹ 的范围内, 实验前和暴露 96 h 后的叶绿素含量没有明显差异($P>0.05$)。然而, 当黑藻暴露在更高的 Cu²⁺浓度范围时(16~64 mg·L⁻¹), 其叶绿素含量出现了在统计学上的明显降低 ($P<0.05$), 这表明上述的 Cu²⁺浓度范围(16~64 mg·L⁻¹)对沉水植物黑藻产生了显著的生物毒性。Cu²⁺浓度为 64 mg·L⁻¹ 时, 其叶绿素含量只有对照的 48.9%;狐尾藻的耐受性要更高一些, 但暴露在 Cu²⁺浓度为 32 mg·L⁻¹ 和 64 mg·L⁻¹ 时, 其叶绿素含量也明显降低 ($P<0.05$), 当 Cu²⁺浓度为 64 mg·L⁻¹ 时, 其叶绿素含量只有对照的 56.2%。

表 1 黑藻、狐尾藻实验前和暴露 96 h 后叶绿素含量的 P 值比较($\alpha = 0.05$)

Table 1 P-Value comparisons at a 95% confidence limit ($\alpha = 0.05$) of initial and post-copper exposure chlorophyll levels for *H. verticilla* and *M. spicatum*

植物名称	初始值/ mg·g ⁻¹ FW	Cu ²⁺ 浓度/mg·L ⁻¹							
		0	2	4	8	16	32		
黑藻 叶绿素	0.530	0.522	0.496	0.513	0.458	0.385	0.344	0.259	
	s^a	0.044	0.032	0.037	0.061	0.027	0.036	0.048	0.015
	P 值	0.806	0.366	0.727	0.073	0.011	0.008	0.001	
狐尾藻 叶绿素	1.048	1.165	1.037	0.829	0.802	0.852	0.762	0.589	
	s^a	0.161	0.097	0.085	0.065	0.039	0.064	0.017	0.069
	P 值	0.191	0.923	0.094	0.101	0.122	0.038	0.011	

注: s^a 为标准偏差。

叶绿素含量是反映叶片光合作用的重要生理指标。重金属胁迫导致植物色素含量降低已有许多研究者对此进行过报道^[13~14],这一现象也在本实验中得到证实。由本实验可以看出,随 Cu²⁺浓度增加沉水植物黑藻和狐尾藻叶绿素含量基本上呈持续下降趋势。叶绿素含量降低与合成叶绿素所需的酶(原叶绿素脂还原酶、 δ -氨基乙酰丙酸合成酶和胆色素原脱氨酶)受重金属破坏有关,并与叶绿素分子所结合的叶绿体膜结构的破坏有关^[17]。据报道,一些植物能耐受多种高浓度重金属的胁迫而不对其生长产生负面效应^[15]。然而,正如相关文献所报道的那样,在重金属胁迫条件下植物的叶绿素和类胡萝卜素含量会下降^[16]。

2.3 抗氧化酶活性的变化

图 2、图 3 分别显示了黑藻和狐尾藻在不同 Cu²⁺浓度溶液中暴露 96 h 后的 SOD、POD 活性变化。从图

2 和图 3 可以看出,在本实验设定的浓度范围内,随着 Cu²⁺浓度的升高,沉水植物的 SOD、POD 活性也基本上呈增加趋势(狐尾藻在铜离子浓度为 8 mg·L⁻¹ 时,SOD 略有降低,但在实验误差范围内)。这一现象说明沉水植物黑藻和狐尾藻对重金属 Cu²⁺胁迫具有一定的抗逆性能和适应能力(但应该指出的是,过高的 Cu²⁺浓度会使植物生长受到抑制,其抗逆性能也将受到抑制)。

从实验结果来看,沉水植物黑藻和狐尾藻对重金属 Cu²⁺浓度变化的生理响应是明显不同的。独立样本 t 检验表明,狐尾藻处理组与对照组的 SOD 和 POD 活性出现统计学上明显差异的 Cu²⁺暴露浓度分别为 64 mg·L⁻¹($P<0.05$) 和 8 mg·L⁻¹($P<0.05$), 均高于黑藻相应的 Cu²⁺暴露浓度 8 mg·L⁻¹ ($P<0.05$) 和 2 mg·L⁻¹ ($P<0.01$);此外,狐尾藻的 POD 活性明显高于黑藻,并且狐尾藻的 POD 活性在 Cu²⁺浓度为 16 mg·L⁻¹ 以后变化不明显($P>0.05$),而黑藻的 POD 活性变化却异常显著($P<0.01$)。这表明黑藻对 Cu²⁺浓度变化较为敏感,而狐尾藻对重金属 Cu²⁺具有更高的抗氧化胁迫能力。造成上述现象的原因可能是黑藻体内被转移进入(积累)了更多的重金属 Cu²⁺(见图 1),因而其抗氧化酶 POD 活性变化较狐尾藻对 Cu²⁺浓度变化更为敏感。

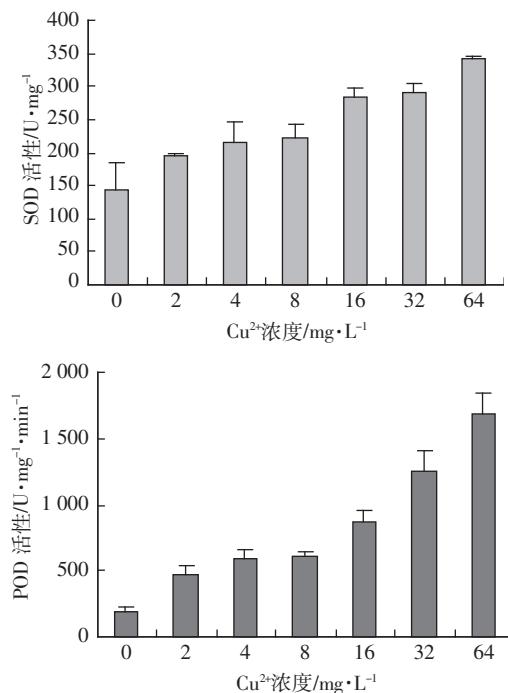


图 2 黑藻在不同 Cu²⁺浓度溶液中暴露 96 h 后的 SOD、POD 活性变化

Figure 2 The activities of SOD and POD of *H. verticillata* exposed to different concentration copper for 96 h

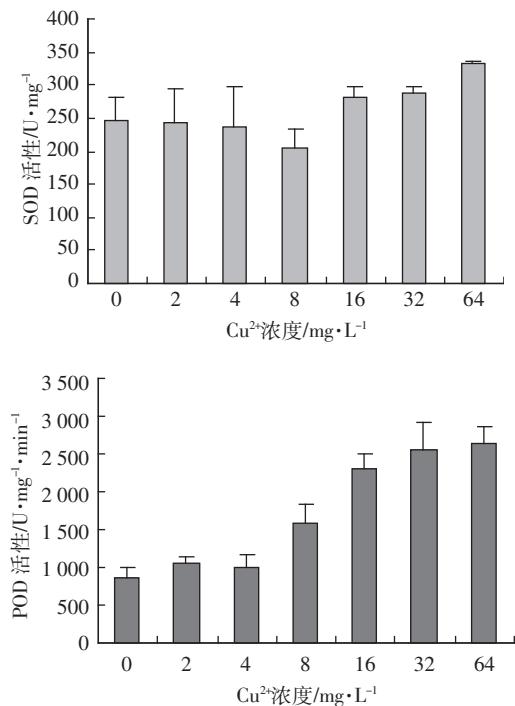


图3 狐尾藻在不同Cu²⁺浓度溶液中暴露96 h后的SOD、POD活性变化

Figure 3 The activities of SOD and POD of *M. spicatum* exposed to different concentration copper for 96 h

感。但两种植物的SOD活性为何没有出现类似POD活性的变化,仍有待于进一步深入细致的实验研究。

重金属Cu是植物必需的微量元素之一,是一些酶(如多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶、细胞色素氧化酶)的成分,可以影响氧化还原过程,还存在于叶绿体的质体蓝素中,参与光合作用的电子传递体系^[17],对植物的生长发育起着十分重要的作用。但是,当环境中重金属数量超过某一临界值时,就会对植物产生一定的毒害作用,轻则使植物体内的代谢过程发生紊乱,生长发育受到抑制,重则导致植物死亡。

SOD、POD等是植物体内抗氧化酶系统中几种主要的保护酶,在消除自由基、减轻脂质过氧化物作用和膜损伤方面起重要作用。在本实验中,SOD和POD的活性出现一定程度的升高,这是植物体的保护性反应,能有效地清除毒害所产生的活性氧。在本实验中,POD活性较SOD活性高出许多,并且其活性变化对Cu²⁺浓度的响应更为敏感,说明POD在重金属Cu²⁺胁迫下发挥着重要作用。由此推测出植物体内产生了大量的过氧化物和少量的超氧化物。

本实验结果表明,狐尾藻较黑藻对重金属Cu²⁺胁迫具有更高的耐受性,这可能与以上两种沉水植物形

态和生理特性的不同有关。黑藻叶片面积明显大于狐尾藻,黑藻叶4~8枚轮生,线性或长条形,长7~17 mm,宽1~1.8 mm,而狐尾藻叶4~6枚轮生,丝状全裂,裂片长10~15 mm。狐尾藻丝状全裂的叶片形态可能有利于提高其对Cu²⁺胁迫的抗性。本实验中发现,狐尾藻在暴露浓度为2~32 mg·L⁻¹时出现了不同程度的叶片脱落现象,这可能是由于狐尾藻以脱落受损叶片(减少与Cu²⁺接触面积)来抵御Cu²⁺胁迫对自身的伤害。但在暴露浓度为64 mg·L⁻¹,狐尾藻的叶片却没有出现脱落情况,植物体变黑发硬,推测可能该浓度已经达到或超过狐尾藻对Cu²⁺的耐受阈值;而黑藻在各处理组中均没有出现叶片脱落现象,但是在Cu²⁺暴露后出现叶片不同程度地变黑现象,显示出黑藻的叶绿素含量对Cu²⁺胁迫更为敏感。其次,黑藻粗纤维素占干物质的比重是狐尾藻的2倍多^[18],细胞壁表面有更多的重金属吸附位点,因而也更有利于重金属Cu²⁺在黑藻体内的积累。本实验结果证实,在相同的实验条件下,狐尾藻的Cu²⁺积累量明显低于黑藻(见图1),这可能是狐尾藻对重金属Cu²⁺胁迫具有更高耐受性的重要原因之一,并且也造成两种植物对Cu²⁺浓度变化的生理响应的明显不同。此外,这两种沉水植物的其他生理特性也有所不同,如狐尾藻的叶绿素含量和抗氧化酶POD活性均明显高于黑藻,而这些生理特性均有利于提高狐尾藻对重金属Cu²⁺胁迫的抗性。

3 结论

(1)沉水植物轮叶黑藻和穗花狐尾藻对重金属Cu²⁺具有较高的生物积累能力。实验结果表明,轮叶黑藻的Cu²⁺积累量明显高于穗花狐尾藻,在Cu²⁺浓度为64 mg·L⁻¹的溶液中暴露96 h后,轮叶黑藻的Cu²⁺积累量为11 295.31 μg Cu·g⁻¹(干重),约为相同实验条件下穗花狐尾藻Cu²⁺积累量的1.6倍。

(2)沉水植物轮叶黑藻和穗花狐尾藻对重金属Cu²⁺浓度变化的生理响应是明显不同的。在本实验条件下,穗花狐尾藻处理组与对照组的叶绿素含量、SOD和POD活性出现统计学上明显差异的Cu²⁺暴露浓度分别为32、64和8 mg·L⁻¹,均高于轮叶黑藻相应的Cu²⁺暴露浓度,并且穗花狐尾藻的POD活性明显高于轮叶黑藻,这表明穗花狐尾藻对重金属Cu²⁺具有更高的抗氧化胁迫能力。

(3)尽管轮叶黑藻对铜具有较高的生物积累能力,但由于轮叶黑藻较穗花狐尾藻对铜污染更为敏感,因此在有较高浓度铜污染水体的治理和生态修复

中,更适合于选择穗花狐尾藻作为污染水体植物修复的物种。

参考文献:

- [1] 郭 静, 阮宜纶, 林荣忱. 水生植物对地热废水净化作用的研究[J]. 环境科学学报, 1995, 15(2):251-255.
GUO Jing, RUAN Yi-lun, LIN Rong-chen. Purification capacity of aquatic plants in treatment of geothermal wastewater[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1995, 15(2):251-255.
- [2] Alaerts G, Mahbubar R, Kelderman P. Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon[J]. *Water Research*, 1996, 30(4): 843-852.
- [3] 成水平, 夏宜珍. 香蒲、灯心草人工湿地的研究: III. 净化污水的机理[J]. 湖泊科学, 1998, 10(2):66-71.
CHENG Shui-ping, XIA Yi-cheng. Studies on artificial wetland with cattail (*Typha angustifolia*), rush (*Juncus effusus*) III : mechanisms of purifying wastewater[J]. *Journal of Lake Sciences*, 1998, 10(2):66-71.
- [4] 贺 锋, 吴振斌. 水生植物在污水处理和水质改善中的应用[J]. 植物学通报, 2003, 20(6):641-647.
HE Feng, WU Zhen-bin. Application of aquatic plants in sewage treatment and water quality improvement[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(6):641-647.
- [5] 吴振斌, 马剑敏, 赵 强, 等. Hg²⁺、Cd 及其复合胁迫对伊乐藻的危害[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3):262-266.
WU Zhen-bin, MA Jian-min, ZHAO Qiang, et al. Toxic harm of Hg²⁺、Cd²⁺ and their combined stress on *Elodea nuttallii* [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(3):262-266.
- [6] 铁柏清, 孙 健, 钱 湛, 等. 重金属复合污染对灯心草的生态毒性效应及重金属积累特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(3):629-636.
TIE Bo-qing, SUN Jian, QIAN Zhan, et al. The eco-toxicological effect of Cu, Cd, Pb, Zn and as compound pollution on *Juncus effusus* and its accumulation character of heavy metals[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(3):629-636.
- [7] 周红卫, 施国新, 杜开和, 等. Cd²⁺污染对水花生生理生化及超微结构的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(9):1581-1584.
ZHOU Hong-wei, SHI Guo-xin, DU Kai-he, et al. Toxic effects of Cd²⁺ pollution on the biochemical and physiological characters and ultra-structure of *Alternanthera philoxeroides*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(9):1581-1584.
- [8] Aravind P, Prasad M N V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate -glutathione cycle and glutathione metabolism[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2005, 43:107-116.
- [9] Thomas D L, Styblo M, Lin S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, 176: 127-144.
- [10] 黄 亮, 李 伟, 吴 蕙, 等. 长江中游若干湖泊中水生植物体内重金属分布[J]. 环境科学研究, 2002, 15(6):1-4.
HUANG Liang, LI Wei, WU Ying, et al. Distribution of heavy metals in aquatic plants of some lakes in the middle reach of the Yangtze River[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2002, 15(6):1-4.
- [11] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2003.
ZHANG Zhi-liang, QU Wei-jing. Experimental guidance of plant physiology[M]. Beijing: High Education Press, 2003.
- [12] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2002:120-121.
CHEN Jian-xun, WANG Xiao-feng. Experimental guidance of plant physiology[M]. Guangzhou : South China University of Technology Press, 2002:120-121.
- [13] Aravind P, Prasad M N V. Zn alleviates cadmium induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, 41(4):391-397.
- [14] Sivaci E R, Sivaci A, Sökmen M. Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* orchard[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(11):1043-1048.
- [15] Dumbabin J S, Bowmer K H. Potential use of constructed wetlands for treatment of industrial waste waters containing metals[J]. *Science of the Total Environment*, 1992, 3:151-168.
- [16] Shin H W, Sidharthan M, Young K S. Forest fire ash impact on micro- and macroalgae in the receiving waters of the east coast of South Korea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45:203-209.
- [17] 潘瑞炽, 董惠得. 植物生理学[M]. (第三版), 北京:高等教育出版社, 1997.
PAN Rui-chi, DONG Yu-de. Plant physiology (Third edition)[M]. Beijing: High Education Press, 1997.
- [18] 颜昌宙, 曾阿妍, 金相灿, 等. 沉水植物轮叶黑藻和狐尾藻对 Cu²⁺的等温吸附特征[J]. 环境科学, 2005, 27(6):1068-1072.
YAN Chang-zhou, ZENG A-yan, JIN Xiang-can, et al. Equilibrium sorption isotherm for Cu²⁺ onto *Hydrilla verticillata* Royle and *Myriophyllum spicatum* L.[J]. *Environmental Sciences*, 2005, 27(6):1068-1072.