

环境水体中纳米氧化铜对金鱼藻的毒性效应研究

崔 静, 袁旭音*, 刘 泉, 郭荣荣

(河海大学环境学院, 南京 210098)

摘要:采用模拟水体环境的方法,研究了低浓度($2\sim 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)纳米氧化铜(CuONPs)溶液对金鱼藻生长的毒性影响,并与相同浓度的微米氧化铜和可比剂量铜离子进行对比分析。实验结果显示在纳米氧化铜溶液的作用下,金鱼藻对Cu元素的积累量为相同浓度的微米氧化铜溶液作用下的6~12倍,金鱼藻体内的酶活性对纳米氧化铜溶液作用的浓度和时间均有明显反应。在作用20 d时, $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纳米氧化铜溶液作用下金鱼藻体内POD、SOD活性均达到最大值;在作用30 d时,同样浓度作用下金鱼藻的叶绿素含量达到峰值,其后逐步下降。对于 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜溶液的可比剂量铜离子($0.23\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于金鱼藻,其POD活性、SOD活性和叶绿素含量的变化明显小于 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的纳米氧化铜溶液。上述结果表明低浓度($4\sim 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的纳米氧化铜溶液对金鱼藻生长有明显的抑制效应和毒害作用,纳米氧化铜对金鱼藻的生长表现出很强的纳米效应,其生长同时受到纳米氧化铜溶液作用时间的影响,但低浓度的微米氧化铜溶液对金鱼藻生长几乎不存在毒害作用。

关键词:纳米氧化铜;金鱼藻;抗氧化酶;叶绿素;毒性效应

中图分类号:X503.233 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)05-0910-06 doi:10.11654/jaes.2013.05.005

Toxic Effects of Low Concentration Copper Oxide Nanoparticles on *Ceratophyllum demersum* in the Aquatic Environment

CUI Jing, YUAN Xu-yin*, LIU Quan, GUO Rong-rong

(College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: A solution experiment of simulated water environment was conducted to study the toxic effects of low concentration ($2\sim 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) copper oxide nanoparticles (CuONPs) on *Ceratophyllum demersum*. The same concentrations of copper oxide microparticle (CuOMPs) and the Cu^{2+} corresponding to CuONPs were compared. The experimental results showed that the concentrations of Cu in *Ceratophyllum demersum* growing in CuONPs solution were about 6~12 times than the concentrations exposing in CuOMPs solution. When *Ceratophyllum demersum* were cultured for 20 d, the activities of POD and SOD reached the maximum values under the stress of $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CuONPs solution and when the *Ceratophyllum demersum* were cultured for 30 d, the chlorophyll-a level reached a peak at the same concentration. Under the stress of comparable Cu^{2+} concentration ($0.23\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CuONPs, the activities of POD and SOD, the chlorophyll-a level were significantly less than those influenced by $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CuONPs solution. These results indicated that the CuONPs solution of low concentrations ($4\sim 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) had the restraining or toxic effects on the growth of *Ceratophyllum demersum*. The CuONPs solution exhibited the remarkable ecological effects with nanoparticle characters, as well as the time scale effects for the growth of *Ceratophyllum demersum*. But the CuOMPs solution of low concentration had no observed toxic effects on *Ceratophyllum demersum*.

Keywords: copper oxide nanoparticles; *Ceratophyllum demersum*; antioxidant enzyme; chlorophyll-a; toxic effect

随着纳米材料应用日益广泛,其生态安全性问题正引起世界范围内的普遍关注^[1]。粒径在0.10~100 nm

的纳米粒子因其所特有的尺度特点和表面效应,使得物质的表面特征和晶体结构有了显著变化^[2]。纳米金属材料是当前应用最为广泛的一类纳米材料^[3-4],在其研发、生产、运输、消费和处置过程中都有可能进入水体,因此研究其对水生植物的影响是十分必要的。当越来越多的纳米金属进入水环境以后,水生生物的生长发育是否受到影响逐渐成为人们关注的问题。研究

收稿日期:2012-11-01

基金项目:国土资源公益性行业科研专项经费项目(201111021);河海大学自然科学基金项目(2008432511)

作者简介:崔 静(1988—),女,安徽蚌埠人,在读硕士,主要从事水生生物生态学和生态修复研究。E-mail:453102536@qq.com

*通信作者:袁旭音 E-mail:yuanhuu@qq.com

表明,纳米金属氧化物等纳米材料会增加靶目标活性氧化物(Reactive oxygen species)的产生,同时提高氧化压力(Oxidative stress),对细菌、微藻、人体细胞、脊椎动物等造成严重毒害^[5-8],但目前关于纳米金属氧化物对水生植物的胁迫与毒性反应研究还鲜见报道。金鱼藻是一种多年生沉水植物,在我国淡水池塘、湖泊和小溪等处广泛分布,是研究水生植物耐受金属胁迫过程中活性氧清除机制的良好材料^[9]。

以往在研究纳米金属材料对水生植物的毒性时,研究者往往采用高浓度($\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的纳米悬浮液对植物进行短时间水培试验^[10],与真实水体环境条件存在差异,且没有考虑培养时间对金鱼藻生长的影响。本文以典型的纳米金属材料纳米氧化铜作为研究对象,探讨低浓度($2 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的纳米氧化铜在不同暴露时间段对金鱼藻的生理生化行为的影响,并以相同浓度的微米氧化铜和可比剂量的铜离子作为对照研究,以探讨水体中纳米氧化铜的纳米效应和时间效应,为纳米金属粉末的生物安全性和环境治理提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

金鱼藻采集于江苏省南京市钟山景区附近的前湖,培养植物的底泥同样取自该湖泊。纳米氧化铜购置于上海水田材料科技有限公司,粒径范围在40~100 nm,平均粒径为70 nm,纯度在99.9%以上;普通氧化铜粉也由上海水田材料科技有限公司提供,纯度在99.5%以上,粒度为300目。实验试剂硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)分析纯由广州化学试剂厂生产。

1.2 试验仪器

KQ-300VDE型超声波仪(昆山超声仪器有限公司),752紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),ACO-001电磁式空气泵(浙江森森集团),高频电感耦合等离子体发射光谱仪ICP-AES(Leeman-LABS, Prodigy, USA)。

1.3 试验方法

1.3.1 植物培养方法

底泥经过晾晒、磨匀、称重后平铺在实验桶内,且设置3个平行实验组,每个实验组底泥4~5 cm厚,重约2 kg。为防止藻类滋生,白色塑料桶均经过浓硝酸杀毒灭菌。将金鱼藻放入装满澄清自来水的水槽中,露天驯化10 d后,选取长10~12 cm、生长状况良好且长势相同的植株,在每个实验塑料桶中定植总鲜重约

为100 g的金鱼藻。选用Hoagland培养液的稀释($0.1 \times$)溶液。用纯净水配置培养液,分别加入 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 配置相同的N、P浓度,其中铵态氮和硝态氮之比为1:3,N:P之比为10:1。

1.3.2 悬浮液实验溶液制备

将纳米氧化铜和微米氧化铜加入高纯水中经过超声处理(100 W, 40 kHz)使其均匀分散悬浮于高纯水中,制成悬浮溶液备用,使用之前再用玻璃棒搅拌2 min。铜离子(Cu^{2+})溶液由 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于高纯水制备。

1.3.3 实验处理方法

实验组中纳米氧化铜、微米氧化铜和铜离子(Cu^{2+})的浓度以铜含量计算,纳米氧化铜和微米氧化铜溶液均设置浓度梯度为0、2、4、6、8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;根据多次重复实验,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米氧化铜在培养液中释放 Cu^{2+} 为0.23 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,故可比剂量纳米氧化铜的 Cu^{2+} 设置为0.23 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。金鱼藻暴露期间保持24 h通气,自然光照,温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。暴露期间每日保持水面高度不变。实验周期为50 d,每隔10 d取不同实验组的金鱼藻组织,用滤纸吸干后分成3份,分别用于POD活性、SOD活性、叶绿素a和铜含量的测定。同步采集水样测定水体中铜元素含量。每次采样后,补入同体积的Hoagland培养液,使实验组的溶液保持同样的体积。

1.4 试验测定和数据处理方法

金鱼藻POD酶活性的测定采用愈创木酚法^[11],金鱼藻SOD酶活性的测定采用连苯三酚自氧化法^[12],金鱼藻叶绿素a含量的测定采用95%乙醇提取法^[13],金鱼藻中铜含量经微波消解后使用高频电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-AES)测定,实验水样经消解后使用ICP-AES测定铜元素含量。

运用Excel2007、SPSS17.0对所得数据进行整理、分析与作图。

1.5 试验精度控制

每一批分析样品均有一个空白样;每份金鱼藻样品均重复3次测定,保证实验的精度,测定结果用3次重复的平均值加标准差表示;铜元素含量测定加入空白样,其检出限为0.005 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,实验所得数据的误差在规定范围之内。

2 结果与分析

2.1 纳米氧化铜与微米氧化铜在水体中的浓度特征

通过实验研究发现:水体中纳米氧化铜溶液浓度低于2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时未检测出铜离子,在4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和8

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时测得铜离子溶出量分别为 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 水体中微米氧化铜溶液在系列浓度下未检测出铜离子。推断纳米氧化铜进入水体之后一部分会沉入底泥中, 部分以离子态或颗粒状悬浮在水体中, 而微米氧化铜则几乎全部沉入底泥中。

2.2 纳米氧化铜和微米氧化铜暴露下金鱼藻对 Cu 的吸收和积累

由表 1 可以看出, 随着纳米氧化铜浓度及暴露时间的增加, 金鱼藻体内 Cu 的积累量均显著增加。处理实验组中金鱼藻体内 Cu 的积累量均高于对照, 且均与对照存在显著差异 ($P < 0.05$)。低浓度纳米氧化铜暴露下, 金鱼藻对 Cu 的吸收和积累量明显高于相同浓度的微米氧化铜, 在不同浓度作用下, 金鱼藻对 Cu 的吸收量约是相同含量的微米氧化铜作用下的 6~12 倍。暴露 10 d 后 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜溶液作用下金鱼藻体内的 Cu 含量是可比剂量 Cu^{2+} ($0.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 胁迫下的 1.37 倍 (表 2 和表 3); 50 d 后, 在 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米氧化铜溶液作用下, 金鱼藻体内的 Cu 积累量达到峰值。

2.3 纳米氧化铜对金鱼藻体内过氧化物酶活性的影响
过氧化物酶(POD)是由微生物或植物所产生的

表 1 纳米氧化铜不同暴露时间段金鱼藻体内 Cu 的含量

Table 1 The Cu contents of *Ceratophyllum demersum* in nano-CuO suspension with the increase of contact time

纳米 CuO 处理浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Cu 的含量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	$0.56 \pm 0.07\text{a}$	$0.68 \pm 0.07\text{a}$	$0.72 \pm 0.10\text{a}$	$0.73 \pm 0.10\text{a}$	$0.73 \pm 0.11\text{a}$
2	$3.60 \pm 0.17\text{b}$	$4.01 \pm 0.19\text{b}$	$4.28 \pm 0.21\text{b}$	$4.43 \pm 0.24\text{b}$	$4.47 \pm 0.23\text{b}$
4	$6.41 \pm 0.62\text{c}$	$7.19 \pm 0.62\text{c}$	$7.34 \pm 0.68\text{c}$	$7.41 \pm 0.63\text{c}$	$7.47 \pm 0.67\text{c}$
6	$8.54 \pm 0.71\text{d}$	$8.79 \pm 0.73\text{c}$	$8.84 \pm 0.74\text{d}$	$8.91 \pm 0.71\text{d}$	$8.97 \pm 0.76\text{d}$
8	$9.12 \pm 0.71\text{d}$	$9.33 \pm 0.67\text{d}$	$9.46 \pm 0.77\text{d}$	$9.48 \pm 0.73\text{d}$	$9.51 \pm 0.74\text{d}$

注: 数据表达为均值±标准差, 同一列中不同小写字母标示不同处理间差异达 5% 显著水平。以下同。

表 2 微米氧化铜不同暴露时间段金鱼藻体内 Cu 的含量

Table 2 The Cu contents of *Ceratophyllum demersum* in micro-sized-CuO suspension with the increase of contact concentration and time

微米 CuO 处理浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Cu 的含量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	$0.56 \pm 0.07\text{a}$	$0.69 \pm 0.06\text{a}$	$0.71 \pm 0.07\text{a}$	$0.71 \pm 0.05\text{a}$	$0.73 \pm 0.06\text{a}$
2	$0.60 \pm 0.04\text{b}$	$0.70 \pm 0.06\text{a}$	$0.72 \pm 0.06\text{a}$	$0.72 \pm 0.06\text{a}$	$0.74 \pm 0.07\text{a}$
4	$0.61 \pm 0.06\text{b}$	$0.70 \pm 0.07\text{a}$	$0.73 \pm 0.05\text{a}$	$0.74 \pm 0.07\text{a}$	$0.74 \pm 0.04\text{a}$
6	$0.61 \pm 0.07\text{b}$	$0.72 \pm 0.05\text{a}$	$0.73 \pm 0.07\text{a}$	$0.74 \pm 0.06\text{a}$	$0.76 \pm 0.05\text{a}$
8	$0.62 \pm 0.06\text{b}$	$0.72 \pm 0.07\text{a}$	$0.77 \pm 0.05\text{b}$	$0.78 \pm 0.07\text{b}$	$0.79 \pm 0.07\text{b}$

表 3 可比剂量的 Cu^{2+} 不同暴露时间段金鱼藻体内 Cu 的含量
Table 3 The Cu contents of *Ceratophyllum demersum* in the comparable Cu^{2+} solution with the increase of contact time

Cu^{2+} 的处 理浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Cu 的含量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$				
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
0	$0.56 \pm 0.07\text{a}$	$0.57 \pm 0.07\text{a}$	$0.60 \pm 0.10\text{a}$	$0.61 \pm 0.10\text{a}$	$0.61 \pm 0.11\text{a}$
0.23	$6.62 \pm 0.64\text{b}$	$6.78 \pm 0.63\text{b}$	$6.91 \pm 0.61\text{b}$	$6.96 \pm 0.67\text{b}$	$7.02 \pm 0.63\text{b}$

一类氧化还原酶, 具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用, 是反应污染胁迫的灵敏指标, 一般老化组织中活性较高。从图 1 可以看出, 在纳米氧化铜的胁迫下, 金鱼藻的 POD 活性均是先升高后降低, 且在纳米氧化铜浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 POD 活性达到最大值。纳米氧化铜的浓度高于 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, POD 活性开始降低。POD 活性随着时间的变化而变化, 当培养时间为 20 d 时, POD 活性达到最大值, 随后 POD 活性开始降低。在微米氧化铜的胁迫下, 短时间内 ($< 20 \text{ d}$)

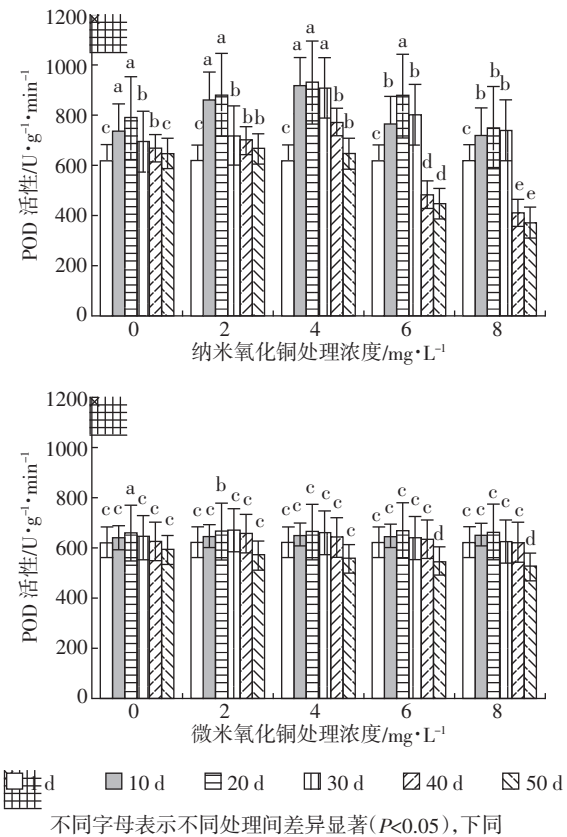


图 1 不同时间及不同浓度的纳米氧化铜和微米氧化铜暴露下金鱼藻体内 POD 活性的变化

Figure 1 POD values of *Ceratophyllum demersum* under different concentrations of nano-CuO and micro-sized-CuO suspensions and contact times

金鱼藻的 POD 活性变化不明显,30 d 后 POD 活性有所降低,但不明显。在可比剂量 Cu^{2+} ($0.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 胁迫下,不同时间段 POD 活性值分别为 624、674、691、587、543 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 金鱼藻体内 POD 在 30 d 后明显下降,但这些值均低于 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜溶液作用下的值。

2.4 纳米氧化铜对金鱼藻体内超氧化物歧化酶活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)是一种源于生命体的活性物质,具有特殊的生理活性,是生物体内重要的抗氧化酶,能消除体内的自由基。植物体内 SOD 水平高低可表征其抗不良胁迫能力。从图 2 上图可见,随着纳米氧化铜溶液胁迫浓度的升高,SOD 的活性先升高后下降,且 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜处理 20 d 时 SOD 活性达到最大值,比对照增加 70% ($P < 0.05$); 20 d 后 SOD 活性值迅速下降,胁迫 50 d 后 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜处理下降至最低值。从图 2 下图可见,随着微米氧化铜溶液浓度的升高,SOD 的活性值几乎没有变化,但是随着微米氧化铜溶液处理时间的增加,SOD

的活性先升高后降低,且在处理 20 d 时,金鱼藻 SOD 活性值达到最大,比对照增加 33% ($P < 0.05$)。在可比剂量 Cu^{2+} ($0.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 胁迫下,不同时间段 SOD 活性值分别为 24、26、29、31、28、25 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 相比 CuONPs 的胁迫,在处理 20 d 内,金鱼藻体内的 SOD 活性值较小,20 d 后较大,但 SOD 活性值明显高于微米氧化铜溶液胁迫下的 SOD 活性值。

2.5 纳米氧化铜对金鱼藻叶片叶绿素含量的影响

由图 3 上图可见,在处理 30 d 内,金鱼藻叶片叶绿素含量随着纳米氧化铜胁迫浓度的增加和胁迫时间的延长而先升高后下降,在 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化铜处理 30 d 时金鱼藻中叶片叶绿素含量最高,比对照升高 64.9%; 纳米氧化铜处理 50 d 时叶绿素含量最低,比对照下降 41.2% ($P < 0.05$)。由图 3 下图可知,在微米氧化铜处理 50 d 内,金鱼藻叶片叶绿素含量随着纳米氧化铜作用时间的延长先升高后下降,但是随着微米氧化铜处理浓度的增加叶绿素含量变化不显著。在可比剂量 Cu^{2+} ($0.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 胁迫下,不同时间段叶绿素含量分别为 0.667、0.771、0.923、0.993、0.912、

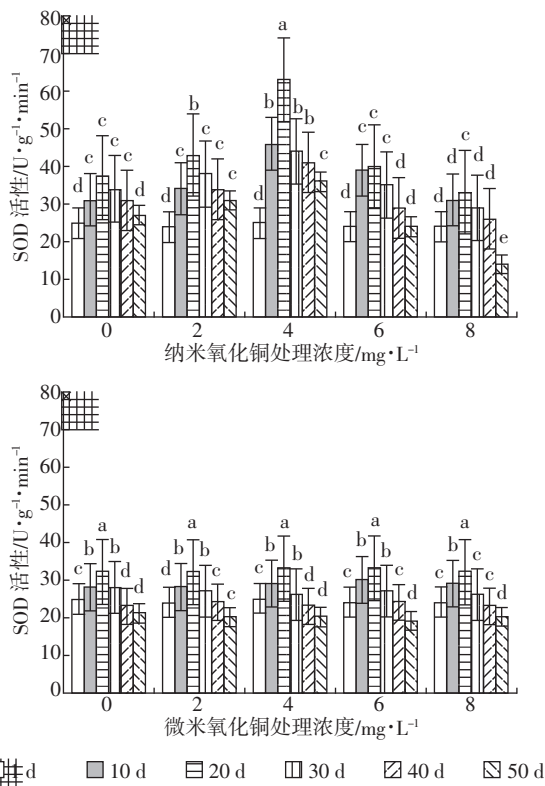


图 2 不同时间及不同浓度的纳米氧化铜和微米氧化铜暴露下金鱼藻体内 SOD 活性的变化

Figure 2 SOD values of *Ceratophyllum demersum* under different concentrations of nano-CuO and micro-sized-CuO suspensions and contact times

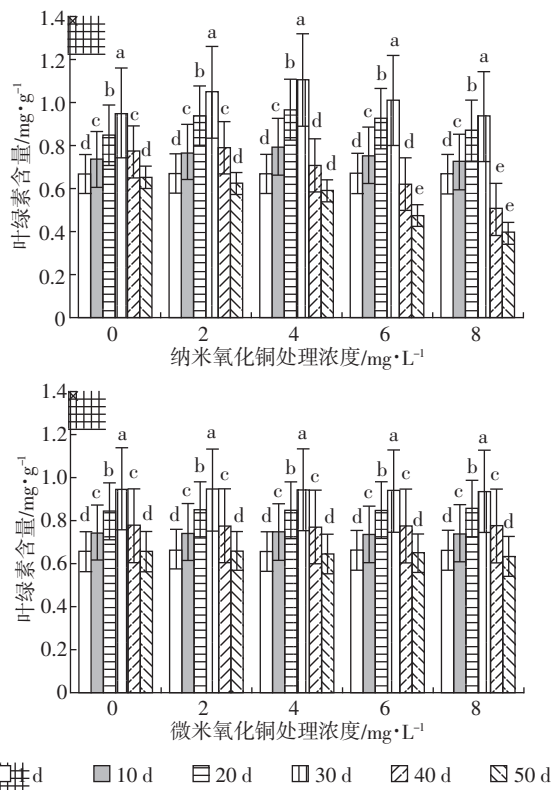


图 3 不同时间及不同浓度的纳米氧化铜和微米氧化铜暴露下金鱼藻叶片叶绿素含量的变化

Figure 3 chlorophyll-a values of *Ceratophyllum demersum* under different concentrations of nano-CuO and micro-sized-CuO suspensions and contact times

0.659 mg·g⁻¹, 相比纳米氧化铜的胁迫, 在处理 30 d 内, 其叶绿素含量较低。

3 讨论

3.1 水环境中纳米氧化铜对金鱼藻的作用

由上述结果可知, 低浓度(8 mg·L⁻¹)纳米氧化铜在水环境中暴露一段时间后可溶出少量的 Cu²⁺, 在浓度为 8 mg·L⁻¹ 悬浮液时可溶出 0.23 mg·L⁻¹ 的 Cu²⁺, 但微米氧化铜几乎不会溶出 Cu²⁺。低浓度的纳米氧化铜作用下, 金鱼藻对 Cu 的积累量要显著高于相同浓度的微米氧化铜, 也高于相应的可比剂量 Cu²⁺。这是因为纳米颗粒的粒径小, 比表面积大, 容易透过细胞壁渗透到细胞内部, 使 Cu 富集在植物细胞内, 这与向奎等^[14]研究纳米氧化铜对白菜种子发芽的毒害作用时, 发现不同形态重金属铜对芽伸长的毒害作用顺序的研究结果一致。

3.2 纳米氧化铜对金鱼藻酶活性的影响

由 2.2 和 2.3 的结果可知, 低浓度(4 mg·L⁻¹)的纳米氧化铜在一定程度上可以促进金鱼藻的生长, 说明纳米金属材料与其他有毒物质一样对植物生长具有低浓度刺激效应^[15]。当暴露浓度继续升高时(>4 mg·L⁻¹), 纳米氧化铜表现出显著的植物毒性效应。低浓度的纳米氧化铜暴露下, POD 活性增加, 由于 POD 可分解 H₂O₂, 降低植物体内 H₂O₂ 的浓度, 使机体免受活性氧化物(ROS)的伤害, 纳米氧化铜可能通过影响植物细胞的抗氧化能力而产生毒性效应。Nel 等^[16]认为纳米材料暴露能刺激生物细胞表面电子供体与氧分子反应, 从而生成超氧自由基(O₂[·]), 随后超氧自由基可以在细胞体内发生歧化反应或 Fenton 反应而产生 ROS, ROS 的产生能够导致生物细胞 DNA 复制出错、膜系统受损和氧化应激等反应。尹海川等^[17]利用改性纳米 TiO₂ 针对滇池蓝藻的一系列实验也发现, 与空白对照组相比, 纳米 TiO₂ 实验组蓝藻的超氧自由基增多, 叶绿素含量、光合速率、呼吸速率、氧化物歧化酶(SOD)活性降低。从实验结果看, 死亡细胞或者裂解, 或者细胞变形, 色素体解体, 可以推测纳米氧化铜粉很可能大量渗透入细胞并团聚在细胞内部。图 1 和图 3 也表明, 低浓度(4 mg·L⁻¹)纳米氧化铜暴露下, 金鱼藻可以通过增强 POD 和 SOD 活性以清除纳米材料诱导产生的 H₂O₂ 和 ROS, 从而保证甚至促进金鱼藻的生长。在低浓度的纳米氧化铜的作用下, 金鱼藻体内超氧化物歧化酶(SOD)灵敏性高于过氧化物酶(POD), 说明不同的保护酶会对纳米氧化铜有不同的

生理响应。相同浓度的微米氧化铜和可比剂量的 Cu²⁺对金鱼藻的毒性远远小于纳米氧化铜, 主要原因还在于纳米氧化铜特殊的表面效应和量子尺寸效应。随着培养时间的延长(>20 d), 金鱼藻的 POD、SOD 活性均开始显著下降, 说明金鱼藻抗纳米氧化铜的生理过程还受到时间效应的影响, 长时间的作用将抑制抗氧化酶的活性。

3.3 纳米氧化铜对金鱼藻叶片叶绿素的影响

金鱼藻叶片叶绿素含量随着纳米氧化铜溶液浓度的增加和作用时间的延长先升高后下降, 且在 4 mg·L⁻¹ 浓度处理 30 d 时叶绿素含量最大。随着胁迫程度的增加, 植物光合色素的含量逐渐减少, 可能是由于金鱼藻体内 Cu²⁺与叶绿素合成有关的酶与巯基结合从而阻碍了叶绿素的生物合成^[18]。同时, 由于过量的金属 Cu 进入金鱼藻细胞, 对植物体造成胁迫和伤害, 降低了植物体对 Fe 的吸收, 从而导致植物体缺 Fe, 也会降低叶绿素的生物合成^[19]。在 4 mg·L⁻¹ 的纳米氧化铜胁迫下, 金鱼藻的叶绿素含量在 30 d 时达到峰值, 此后逐步下降, 但在相同浓度的微米氧化铜和可比剂量的 Cu²⁺胁迫下, 叶绿素含量的变化不显著, 表明纳米效应起了重要作用, 纳米金属氧化物的毒性大小与其粒径、形态等因素有关。

4 结论

(1)在低浓度的纳米氧化铜溶液(2~8 mg·L⁻¹)中, 随着其浓度的升高, 金鱼藻对 Cu 的积累量显著提高, 且累积量高于相同浓度的微米氧化铜和可比剂量 Cu²⁺溶液。

(2)随着纳米氧化铜溶液暴露时间的增加, 金鱼藻体内的保护酶 POD、SOD 活性均是先升高后降低, 在 20 d 时达到峰值, 且保护酶的活性值和变化速率均明显高于相同浓度的微米氧化铜和可比剂量 Cu²⁺溶液。

(3)随着纳米氧化铜溶液浓度和暴露时间的增加, 金鱼藻体内的保护酶 POD、SOD 均在 4 mg·L⁻¹ 的纳米氧化铜溶液处理 20 d 时达到峰值, 叶绿素含量则在相同浓度处理 30 d 时达到峰值。

参考文献:

- [1] 金盛杨, 王玉军. 纳米氧化铜对小麦根系生理生化行为的影响[J]. 土壤, 2011, 43(4): 605-610.
JIN Sheng-yang, WANG Yu-jun. Effects of CuO nanoparticles on physiological and biochemical behaviors of wheat (*Triticum aestivum* L.) root [J]. Soils, 2011, 43(4): 605-610.

- [2] 张盛强, 汪建义, 王大辉, 等. 纳米金属材料的研究进展[J]. 材料导报, 2011, 25(17): 5-10.
- ZHANG Sheng-qiang, WANG Jian-yi, WANG Da-hui, et al. Recent progress on metallic materials[J]. *Materials Review*, 2011, 25(17): 5-10.
- [3] Griffitt R J, Luo J, Gao J, et al. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms[J]. *Environment Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(9): 1972-1978.
- [4] Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 150(1): 5-22.
- [5] LING Yang, Daniel J W. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles[J]. *Toxicology Letters*, 2005(8): 122-132.
- [6] LIN Dao-hui, XING Bao-shan. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibitory of seed germination and root growth[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 150(2): 243-250.
- [7] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7): 1308-1316.
- [8] Porter A E, Gass M, Muller K, et al. Visualizing the uptake of C60 to the cytoplasm and nucleus of human monocyte-derived macrophage cells using energy-filtered transmission electron microscope and electron tomography[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(8): 3012-3017.
- [9] Gupta P, Chandra P. Response of cadmium to *Ceratophyllum demersum* L., a rootless submerged plant[J]. *Waste Management*, 1996, 16(4): 335-337.
- [10] Doshi R, Braida W, Christodoulatos C, et al. Nano-aluminum: Transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities[J]. *Environmental Research*, 2008, 106(3): 296-303.
- [11] 庞怀宇, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定 SOD 的活性改进[C]//第六届全国 SOD 学术研讨会论文集. 2009.
- PANG Huai-yu, YUAN Qin-sheng. Improvement of pyrogallol self-oxidation for determination of superoxide dismutase[C]. The Sixth National SOD Conference Proceedings. 2009.
- [12] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- GAO Jun-feng. Physiology experiments of plants[M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000.
- [13] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 134-137.
- LI He-sheng. Plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Progress, 2006: 134-137.
- [14] 向 垒, 莫测辉. 纳米氧化铜对白菜种子发芽的毒害作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(9): 1830-1835.
- XIANG Lei, MO Ce-hui. Toxicity of copper nanoparticles to the seed germination of Chinese cabbage[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(9): 1830-1835.
- [15] 黄 健, 唐学玺, 宫相忠, 等. 低浓度毒物对海洋微藻生长刺激效应的初步研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(11): 1516-1518.
- HUANG Jian, TANG Xue-xi, GONG Xiang-zhong, et al. Preliminary study on the grow stimulation of marine microalgae stimulated by low level of toxicant[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(11): 1516-1518.
- [16] Nel A, Xia T, Mädler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. *Science*, 2006, 311(5761): 622-627.
- [17] 尹海川, 柳清菊, 林 强, 等. 纳米 TiO₂ 负载贵金属 Pd 抑制蓝藻的生长[J]. 西北植物学报, 2005, 25(9): 1884-1887.
- YIN Hai-chuan, LIU Qing-ju, LIN Qiang, et al. Inhibitory effects of nano-TiO₂ loaded Pd on cyanobacteria growth[J]. *Acta Botanica Borealioccidentalia Sinica*, 2005, 25(9): 1884-1887.
- [18] Van Assche F, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants[J]. *Plant Cell and Environment*, 1990, 13(4): 195-206.
- [19] Root R A, Miller R J, Koeppel D E. Uptake of Cd—its toxicity and effect on the iron-to-zinc ratio in hydroponically grown corn[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1975, 4: 473-476.