

小青菜酶活性与铅形态关系的研究

殷宪强¹,王昌钊²,易磊¹,刘永轩¹,王国栋¹,张兴昌^{1,3}

(1.西北农林科技大学资源环境学院,陕西 杨凌 712100; 2.陕西出入境检验检疫局,陕西 西安 710068;

3.西北农林科技大学/中国科学院水利部水土保持研究所,陕西 杨凌 712100)

摘要:采用添加外源铅和室内培养的方法,研究了黄绵土盆栽小青菜体内铅的形态分布规律及铅形态对植物酶活性的影响。结果表明:土壤受铅污染后小青菜茎叶不同形态的铅的呈显著和极显著增加,根部各形态铅含量随土壤中外源 Pb 含量的增加呈极显著增加,铅污染后小青菜体内铅活性提高。在外源 Pb 作用下小青菜茎叶内多酚氧化酶和过氧化氢酶的活性显著提高,以保护植物免受铅的危害,同时可以指示植物体受到高浓度铅的危害,保护酶系统的变化主要受醋酸提取态和盐酸提取态铅的影响。

关键词:小青菜;铅形态;植物酶活性

中图分类号: X53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)05-0133-05

铅是人类最早利用的元素之一,远古时期就被普遍用于管道^[1]。因此人类活动向环境输入了铅,从而导致土壤、植物、地表水以及很多生物中的铅含量接近于天然水平(未工业化)^[2-4]。铅对很多土壤动物、维管植物和小型哺乳动物具有毒性^[5-7]。

外源铅进入土壤后,通过植物根系的代谢吸收,部分滞留在根中,部分随原生质的流动转运至邻近的细胞,通过胞间运输导管中,进一步随作物的蒸腾作用向茎叶运移,在作物的茎叶、籽实中积累从而危害植株生长^[8]。铅的活性形态和分布的比较研究表明植物体内的重金属可以多种复杂的形态存在,在不同的植物、不同生长发育阶段、植物不同部位的分布特征均不同,各种形态的迁移能力及毒性也有显著的差异。孙贤斌等^[9]对小麦和玉米的研究表明以水溶性有机酸盐或以硝酸盐、氯化物、无机盐形态存在的重金属的迁移比难溶性磷酸盐或牢固吸附在细胞壁上的重金属要容易的多,随着提取剂极性的增强所浸取出的铅的活性不断降低,且与植物基质的结合程度也越来越紧密。

进入细胞内的铅能够危害植物的生理功能,Stohs 等^[10]报道 Pb^{2+} 能够与酶活性中心或蛋白质中的巯基相结合,取代金属蛋白中的必需元素,导致蛋白质大分子构象改变、酶活性丧失、干扰细胞的正常代谢过程。有相当大比例的铅结合在细胞核、线粒体以及核蛋白,同时,进入细胞内部的铅(可溶性成分)还可以迁移到其它细胞。过量铅进入植物体后,

体内自由基代谢失衡将产生过剩自由基,当低浓度铅处理植物体内 SOD、POD 和 CAT 受到活性氧自由基的诱导时,活性上升,参与清除自由基;长时间高浓度处理后,酶系统就会被重金属离子破坏,SOD、POD 和 CAT 活性下降,从而使植物细胞受到毒害^[11]。

本研究在不同铅含量的黄绵土中盆栽小青菜,研究了小青菜的茎叶与根受土壤铅污染的影响,各形态 Pb 在植物体内的分布规律及小青菜保护酶系统的变化规律,结果对于揭示小青菜保护酶系统与各形态铅的关系具有实际意义。

1 材料与方法

1.1 供试植物及其盆栽方法

供试植物为市售小青菜 (*Brassica Chinensis*),盆栽土壤为铅处理后土壤,土壤铅处理水平分别为 0, 200, 400, 600, 800, 1 000 mg/kg,盆栽底肥施用脲素 ($CO(NH_2)_2$) 321.5 mg/kg (含 N 量为 150.14 mg/kg),磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 191.5 mg/kg (含 P 量为 43.64 mg/kg),硫酸钾 155 mg/kg (含 K 量为 124.27 mg/kg)。盆栽试验每个水平设 8 个重复,于网室内进行,种植后第 5 天各盆出苗 15~20 株不等。定苗连续培养 30 d 后,采集植物样品,分为茎叶和根部分,茎叶部分测定酶和铅形态,根部测定铅形态。

1.2 植物酶活性及铅形态的测定

植物酶活性:称取植物鲜样,采用 X.H 波钦诺克的方法测定^[12],过氧化物酶 (POD) 采用愈创木酚

收稿日期:2010-01-10

基金项目:中科院知识创新工程重要方向(KZCX2-YW-441);国家 973 计划(2007CB106803);西北农林科技大学科研专项(07ZR044)

作者简介:殷宪强(1977—),男,山东枣庄人,讲师,博士,主要从事土壤污染与修复方面的教学与研究工作。E-mail: xianqiangyin@yao.hoo.com。

通讯作者:张兴昌。E-mail: zhangxc@ms.iswc.ac.cn。

法,过氧化氢酶(CAT)采用硫代硫酸钠法,多酚氧化酶采用碘酸钾滴定剩余抗坏血酸的方法测定。

植物体内铅形态:称取在烘箱中已烘干的植物样品 3 g,置于 100 mL 塑料离心管中,按照表 1 所示

步骤,依次加入一定量提取剂,在振荡机上振荡 1 h 后,高速离心,过滤,采用连续浸提的方法得浸提液,浸提液铅含量用原子吸收分光光度计(日立 Z5000)测定。

表 1 植物中铅形态分级方法^[13-16]
Table 1 The sequential extraction of Pb in plant

浸提步骤 Extraction order	形态 Fraction	浸提剂 Extraction solution	备注 Note
1	醋酸提取态 HFAC - Pb	2% CH ₃ COOH	提取难溶于水的重金属磷酸盐,包括二代磷酸盐,亚磷酸盐等
2	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	1 mol/L NaCl	提取果胶酸盐,与蛋白结合态或呈吸着态的重金属等
3	盐酸提取态 FHCl - Pb	0.6 mol/L HCl	提取草酸盐等
4	残渣态 Res - Pb	450℃灰化 4h,6 mol/L HCl 溶解	以上形态提取后剩余残渣中的铅

注:每次浸提后的残留物用去离子水洗涤,在 60℃下烘干后进行后续浸提

1.3 统计分析

用 Microsoft Office Excel 2003 对数据进行预处理处理与制图,不同形态铅浓度及酶活性用 SAS 程序进行方差分析和通径分析^[17]。

2 结果与讨论

2.1 外源铅对小青菜体内各形态 Pb 的影响

小青菜茎叶内各形态铅的含量均随外源 Pb 浓度的增加而增加(图 1)。经 SAS 数理统计分析可知,小青菜茎叶内醋酸提取态($R = 0.9346, P < 0.0001$)和盐酸提取态($R = 0.9624, P < 0.0001$)氯化钠提取态($R = 0.9387, P < 0.0001$)铅均随着土壤铅含量的增加而极显著增加,而残渣态铅($R = 0.557, P = 0.016$)随着土壤铅含量的增加呈显著增加趋势。小青菜根内的醋酸提取态铅($R = 0.6799$),氯化钠提取态铅($R = 0.8533$),盐酸提取态铅($R = 0.9380$),残渣态铅($R = 0.9202$),总铅($R = 0.9258$)(P 均 < 0.01)均随着外源铅浓度的增加而极显著增加(图 2),表明不同浓度 Pb 处理对小青菜根醋酸提取态,氯化钠提取态,盐酸提取态和残渣态 Pb 的含量均有极显著影响。当土壤受到铅污染后,小青菜根茎叶均对土壤铅产生了显著的吸收,铅在小青菜体内以不同的形式进行累积。

当土壤无外源 Pb 时,小青菜茎叶内各形态 Pb 含量都略高于根中各形态含量(图 1,2),茎叶、根中各形态 Pb 含量的顺序是:盐酸提取态>残渣态>氯化钠提取态>醋酸提取态。当土壤有外源 Pb 后,小青菜根各形态 Pb 含量明显大于小青菜茎叶内各形态 Pb 含量,表明在铅污染土壤后,小青菜根对 Pb 的吸收远远高于小青菜茎叶对 Pb 的吸收。根中铅的

盐酸提取态>醋酸提取态>残渣态>氯化钠提取态,茎叶中铅的盐酸提取态>残渣态>醋酸提取态>氯化钠提取态,且小青菜根与茎叶的盐酸提取态 Pb 含量显著大于其它三种 Pb 提取态含量(图 1,2)。说

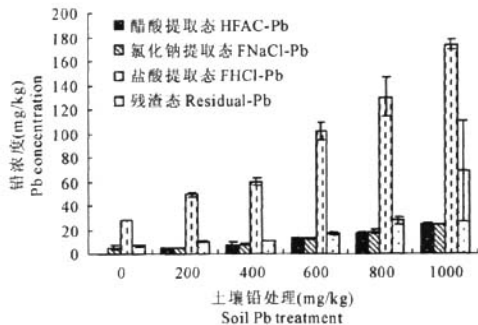


图 1 小青菜茎叶内各形态铅的含量
Fig.1 The concentration of different fraction Pb in Brassica Chinensis Shoot/Leaf

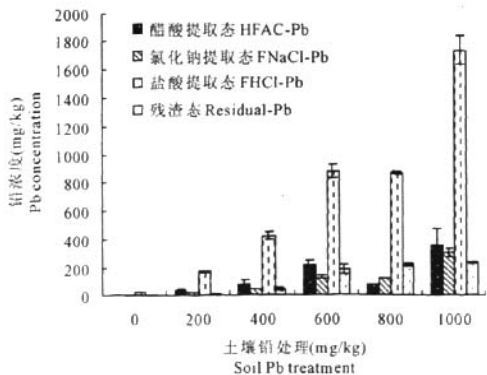


图 2 小青菜根部各形态铅的含量
Fig.2 The concentration of different fraction Pb in Brassica Chinensis Root

明铅污染土壤中种植的小青菜茎叶和根对铅的累积形式有所不同。根据浸提原理可知,随着提取剂极性的增强所浸取出的铅的活性不断降低,与植物基质的结合程度也越来越紧密。当土壤受到铅污染时,醋酸提取态含量均显著提高,表明当土壤受到铅污染后,通过茎叶和根对铅的吸收后,植株体内铅的活性显著提高。

2.2 外源铅对酶活性的影响

当土壤 Pb 含量较低时(200 mg/kg)时,过氧化物酶(POD)受到铅的抑制活性降低,之后随土壤铅含量的增加过氧化物酶活性增加,600 mg/kg 时达最高,随土壤铅含量继续升高,过氧化物酶受到铅的抑制作用增强,酶活性下降,呈先降低后升高再降低趋势(表 2)。

外源 Pb 作用下在土壤铅浓度小于 400 mg/kg 时过氧化氢酶(CAT)活性降低,当土壤铅含量大于 400 mg/kg 后,其活性增加,在受试土壤铅浓度范围内其活性呈现极显著增加趋势(见表 2, $R = 0.7204$, $P = 0.0007$),说明过氧化氢酶活性受到植物体内铅的刺激作用活性增强。

多酚氧化酶(PPO)活性在土壤铅含量为 200 mg/kg 时活性降低,之后随着土壤铅浓度的增加而呈现极显著增加趋势(见表 2, $R = 0.8001$, $P < 0.0001$),说明多酚氧化酶在铅的刺激下活性增加,植物体抗氧化能力增强。

以上结果表明,在受试土壤铅含量范围内,多酚氧化酶(PPO)和过氧化氢酶(CAT)的活性受到铅污染后活性显著提高,说明小青菜保护酶系统的抗氧化功能以多酚氧化酶和过氧化物酶为主以保护植物免受铅的危害,二者活性的升高同时可指示植物体受到高浓度铅的危害。

2.3 Pb 形态与保护酶系统的关系

铅进入植物体内以不同形式进行累积分布,铅

在植物体内的赋存形态及其活性对保护酶系统均具有不同的影响。

表 2 小青菜保护酶系统对土壤铅污染的响应
Table 2 The response of enzyme in *Brassica Chinensis* with Pb polution

土壤铅 Soil Pb (mg/kg)	过氧化物酶 Peroxidase [$\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$]	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase [$\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$]	过氧化氢酶 Catalase [$\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$]
0	484.879 ± 19.217	0.358 ± 0.015	555.600 ± 0.003
200	358.066 ± 14.245	0.283 ± 0.030	529.933 ± 0.005
400	446.640 ± 29.983	0.946 ± 0.034	501.400 ± 0.008
600	619.891 ± 20.315	0.858 ± 0.015	638.600 ± 0.004
800	321.868 ± 7.113	1.304 ± 0.015	636.733 ± 0.004
1000	247.357 ± 5.004	0.937 ± 0.054	626.000 ± 0.005

经对小青菜体内铅形态与保护酶活性进行的通径分析表明,当铅进入小青菜茎叶内,过氧化氢酶(CAT)和多酚氧化酶(PPO)的活性受到不同形态铅的抑制或激活,但以激活作用为主,且与醋酸提取态、氯化钠提取态、盐酸提取态均呈极显著正相关关系(见表 3 和表 4)。总铅对两种酶没有影响,其中多酚氧化酶以盐酸提取态铅的激活作用为主,过氧化物酶以氯化钠提取态铅的激活作用为主,残渣态和醋酸提取态的抑制作用远弱于其他形态铅的激活作用。以上说明 PPO 和 CAT 活性的增加既是一种保护机制,同时也表明植物受到了重金属的胁迫,可以作为小青菜受到铅危害的指示。多酚氧化酶和过氧化氢酶活性的升高主要是受氯化钠提取态和盐酸提取态的激活作用。

过氧化物酶(POD)的活性受到醋酸提取态、氯化钠提取态、残渣态铅的抑制作用,和盐酸提取态的激活作用,其中以氯化钠提取态的抑制作用为主(见表 5)。以上说明在小青菜体内累积的各形态铅中,氯化钠提取态和盐酸提取态对保护酶系统起到主要影响。

表 3 过氧化氢酶活性与铅形态的通径分析
Table 3 The path analysis between catalase and Pb fraction

项目 Item	醋酸提取态 FHAC - Pb	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	盐酸提取态 FHCl - Pb	残渣态 Residual - Pb	总铅 Total - Pb
直接通径系数 Direct path coefficient	- 0.085	0.574	0.384	- 0.152	0.000
间接通径系数 Indirect path coefficient	醋酸提取态 FHAC - Pb	0.516	0.355	- 0.078	0.000
	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	- 0.076	0.364	- 0.088	0.000
	盐酸提取态 FHCl - Pb	- 0.079	0.544	- 0.096	0.000
	残渣态 Residual - Pb	- 0.043	0.333	0.242	0.000
	总铅 Total - Pb	- 0.075	0.526	0.369	- 0.124
r	0.7085	0.7728	0.7533	0.3794	0.6956
p	0.001	0.0002	0.0003	0.1205	0.0013

表 4 多酚氧化酶活性与铅形态的通径分析

Table 4 The path analysis between polyphenol oxidase and Pb fraction

项目 Item	醋酸提取态 FHAC - Pb	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	盐酸提取态 FHCl - Pb	残渣态 Residual - Pb	总铅 Total - Pb
直接通径系数 Direct path coefficient	0.044	0.2432	0.5154	- 0.1347	0.000
间接通径系数 Indirect path coefficient	醋酸提取态 FHAC - Pb	0.2188	0.4768	- 0.0688	0.000
	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	0.0396	0.4889	- 0.0782	0.000
	盐酸提取态 FHCl - Pb	0.0407	0.2307	- 0.0849	0.000
	残渣态 Residual - Pb	0.0225	0.1412	0.3249	0.000
	总铅 Total - Pb	0.0387	0.2228	0.4957	- 0.1099
r	0.6709	0.6935	0.7019	0.3540	0.6472
p	0.0023	0.0014	0.0012	0.1495	0.0037

表 5 过氧化物酶与铅形态的通径分析

Table 5 The path analysis between peroxidase and Pb fraction

项目 Item	醋酸提取态 FHAC - Pb	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	盐酸提取态 FHCl - Pb	残渣态 Residual - Pb	总铅 Total - Pb
直接通径系数 Direct path coefficient	- 0.2154	- 0.4602	0.3010	- 0.2168	0.000
间接通径系数 Indirect path coefficient	醋酸提取态 FHAC - Pb	- 0.4141	0.2784	- 0.1108	0.000
	氯化钠提取态 FNaCl - Pb	- 0.1938	0.2855	- 0.1259	0.000
	盐酸提取态 FHCl - Pb	- 0.1992	- 0.4365	- 0.1366	0.000
	残渣态 Residual - Pb	- 0.1100	- 0.2673	0.1897	0.000
	总铅 Total - Pb	- 0.1891	- 0.4216	0.2894	- 0.1769
r	- 0.4618	- 0.4944	- 0.4715	- 0.4044	- 0.4982
p	0.0537	0.037	0.0483	0.096	0.0354

3 结 论

通过以上分析,可以得出如下的结论:

1) 铅污染土壤后小青菜茎叶和根铅的含量增加,根部各形态铅都受到外源 Pb 极显著增加,茎叶中只有醋酸提取态和盐酸提取态受到极显著的增加。外源 Pb 使根中的铅形态的分布产生了变化,无 Pb 污染时各形态 Pb 含量的大小顺序是:盐酸提取态 > 残渣态 > 醋酸提取态 > 氯化钠提取态,有 Pb 污染时各形态 Pb 含量的大小顺序是:盐酸提取态 > 醋酸提取态 > 氯化钠提取态 > 残渣态,铅污染后小青菜体内铅活性有所增加。

2) 在外源 Pb 作用下小青菜茎叶内多酚氧化酶和过氧化氢酶的活性受到铅污染后活性显著提高,以保护植物免受铅的危害,同时可以指示植物体受到高浓度铅的危害,保护酶系统的变化主要受醋酸提取态和盐酸提取态铅的影响。

参 考 文 献:

[1] Essington M E, Foss J E, Roh Y. The Soil Mineralogy of Lead at Horace's Villa[J]. Soil Sci Soc Am J, 2004, 68(3): 979—993.
[2] Kabata-Pendias A, Mukherjee A B. Trace Elements from Soil to Hu-

man[M]. New York: Springer-Verlag, 2007.

[3] Murray K S, Rogers D T, Kaufman M M. Heavy Metals in an Urban Watershed in Southeastern Michigan[J]. J Environ Qual, 2004, 33(1): 163—172.
[4] Yanai R D, Ray D G, Siccama T G. Lead Reduction and Redistribution in the Forest Floor in New Hampshire Northern Hardwoods[J], J Environ Qual, 2004, 33(1): 141—148.
[5] Bongers M, Rusch B, Van Gestel C A M. The effect of counterion and percolation on the toxicity of lead for the springtail folsomia candida in soil[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23(1): 195—199.
[6] Needleman H L, Schell A, Bellinger D, et al. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood: An 11-year follow-up report[J]. The New England Journal of Medicine, 1990, 322(2): 83—88.
[7] Nriagu J O, Blankson M L, Ocran K. Childhood lead poisoning in Africa: a growing public health problem[J]. Science of The Total Environment, 1996, 181(2): 93—100.
[8] 杨 刚,伍 钧,唐 亚.铅胁迫下植物抗性机制的研究进展[J].生态学杂志, 2005, 24(12): 1507—1512.
[9] 孙贤斌,李玉成,王 宁.铅在小麦和玉米中活性形态和分布的比较研究[J].农业环境科学学报, 2005, 24(4): 666—669.
[10] Stohs S J, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1995, 18(2): 321—336.
[11] 何 冰,叶海波,杨肖娥.铅胁迫下不同生态型东南景天叶片

- 抗氧化酶活性及叶绿素含量比较[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3): 274—278.
- [12] 荆家海, 丁钟荣. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [13] 查燕, 杨居荣, 刘虹, 等. 污染谷物中重金属的分布及加工过程的影响[J]. 环境科学, 2000, 21(3): 52—55.
- [14] Brooks R R, Shaw S, Marfil A A. The chemical form and physiological function of nickel in some Iberian Alyssum species[J]. *Physiologia Plantarum*, 1981, 51(2): 167—170.
- [15] 李书鼎, 李雪莲. 土壤植物系统重金属长期行为的研究[J]. 环境科学学报, 2000, 20(1): 76—80.
- [16] Beauford W, Barber J, Barringer A R. Uptake and Distribution of Mercury within Higher Plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 1977, 39(4): 261—265.
- [17] SAS S A I. SAS, SAS/ETS User's Guide, Version 8[R]. Carey: Statistical Analysis Institute, Inc. 2001.

Study on relationship between Pb chemical forms and enzyme activity in *Brassica Chinensis*

YIN Xian-qiang¹, WANG Chang-zhao², YI Lei¹, LIU Yong-xuan¹, WANG Guo-dong¹, ZHANG Xin-chang^{1,3}

(1. College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an, Shaanxi 710068, China;

3. Northwest A&F University/Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resource, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study investigated the Pb chemical forms distribution and the effect of Pb forms on plant enzyme activity of *Brassica Chinensis* indoor cultivated with added Pb in loessal soil. The result showed that the Pb concentration of different forms in shoot/leaf of *Brassica Chinensis* increased significantly and extremely significantly, and all Pb forms in root extremely significantly increased with Pb increasing after the soil was polluted by Pb. The activity of Pb in *Brassica Chinensis* increased after the soil was polluted by Pb. In order to erase the hazards of Pb to *Brassica Chinensis*, the activity of polyphenol oxidase and catalase increase significantly, which also can indicate the hazards of Pb to plant. Among all Pb forms HAc-extractable Pb and HCl-extractable Pb was the dominant harmful forms to the protection enzyme system in *Brassica Chinensis*.

Keywords: *Brassica Chinensis*; Pb chemical form; plant enzyme activity