

Tb(Ⅲ)对不同生长阶段辣根过氧化物酶生态毒性：温度效应

张颂婧¹, 周 青^{1,2}

(1.江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; 2.江南大学环境与土木工程学院, 无锡 214122)

摘 要: 稀土农用的环境安全问题是限制稀土在农业上应用的关键。实验以辣根为研究材料, 采用生态毒理学中的急性毒性试验方法研究不同生长阶段与不同温度条件下 Tb(Ⅲ)对 HRP 的生态毒性。结果表明, 比较不同生长阶段不同温度下对照 CK 的 HRP 活性, 数据显示不同生长阶段 HRP 活性对温度响应不尽一致。辣根在不同生长阶段和不同温度下, HRP 对高、低剂量 Tb(Ⅲ)毒害的响应存在明显差异。进一步比较不同温度各生长阶段的半效应剂量(EC_{50})及 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活的最小作用剂量(LOEC)、最大无作用剂量(NOEC)变化规律, 不同生长阶段温度对 Tb(Ⅲ)的生态毒性的影响不同(9 月份影响最小), 5、9 月份 HRP 对低温敏感, 7、11 月份 HRP 对高温敏感, 各阶段适温下 HRP 对 Tb(Ⅲ)胁迫的敏感性小于低、高温。

关键词: 生态毒理学; 辣根; 钷; HRP; 生长阶段; 温度

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)06-2367-04

The Ecotoxicity Effect of Tb(Ⅲ) on Horseradish POD During Different Growing Periods at Different Temperatures

ZHANG Song-jing¹, ZHOU Qing^{1,2}

(1.The Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2.Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The environmental safe of rare earth used in agriculture is the key problem to limit rare earth application on agriculture. Horseradish was used as an experimental material to study ecotoxicity of Terbium at different temperatures during different growing periods by determining its acute toxicity. The results showed that effects of temperature on the activities of HRP were different in different growing periods by comparison of the activities of HRP of control (CK). There was a significant difference between the response of HRP to high and low concentration of Tb(Ⅲ) under different temperatures during different growing periods. The effects of temperature on Terbium ecotoxicity varied remarkably with growing periods (the minimum effect appeared in September) by the comparison of 24 h- EC_{50} of Tb(Ⅲ) and LOEC and NOEC at different temperatures during different growing periods. Among all the growing periods May and September were sensitive to low temperature while July and December were sensitive to high temperature, but all periods were less sensitive to natural temperature.

Keywords: eco-toxicology; *Cochlearia armoracta* L.; terbium (Ⅲ); HRP; growing period; temperature

随着稀土(rare earths, RE)在农业中应用广度和深度的增加^[1], RE 进入生态系统并通过食物链导入人体^[2], RE 环境安全问题已引起政府高度重视。因此, 亟待对农用 RE 的生态毒理学效应做出科学评估, 为 RE 农用提供科学指导。过氧化物酶(POD)是一种含有血红素的植物呼吸代谢末端氧化酶, 广泛存在于植

物体内, 具有清除自由基, 控制膜脂过氧化作用和保护细胞膜的正常代谢等多种生理功能^[3]。POD 对 RE 敏感, 常被作为研究 RE 毒理作用的生物标志物之一。^[4-5]辣根过氧化物酶(HRP)是迄今研究较为深入的植物过氧化物酶之一, HRP 具有多种生理功能, 如参与活性氧代谢、参与 IAA 降解、参与木质素和木质酸的合成。目前有关辣根对 RE 胁迫响应, 以及 RE 对 HRP 影响的研究报道较少。在前期工作中, 我们研究了 Tb(Ⅲ)与 HRP 的剂量效应关系, 得出在辣根不同生长阶段特定温度背景下的 Tb(Ⅲ)- EC_{50} 参数。此外, 已从分子水平上揭示了 Tb(Ⅲ)可以通过改变

收稿日期: 2008-01-07
基金项目: 国家自然科学基金(30570323); 国家发改委稀土国际合作项目(IFZ051210)
作者简介: 张颂婧(1987—), 女, 安徽淮南人, 国家生命科学基地班本科生。
通讯作者: 周 青 E-mail: zhouqeco@yahoo.com.cn

HRP 空间结构而影响其活性。由于 RE 对植物的影响与植物生长阶段及诸多环境因素有关^[6]。本文仍以辣根为实验材料,进一步探讨辣根不同生长阶段温度对 Tb(Ⅲ)生态毒性的影响,为阐释 RE 毒害植物的机理与 RE 农用的环境安全问题提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

本实验材料采用盆栽的辣根(*Cochlearia armoracia* L.),依据常规方法栽培管理^[7],幼苗期室内培养温度为(20±1)℃,光照强度 1.5 klx,光暗时间比为 12 h:12 h。实验始于辣根幼苗期,止于收获期,实验共设 5、10、30、100、300、1 000 mg·L⁻¹ 6 个剂量 TbCl₃ 溶液,选择辣根不同生育期 10 ℃温度级差来比较 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活影响。分别在 5 月、7 月、9 月、11 月选取长势相近的辣根植株,均匀叶喷不同剂量

Tb(Ⅲ)溶液,滴液为限,对照(CK)植株喷等量蒸馏水。各处理均 3 株,3 个平行。将处理后的辣根置于光照植物培养柜中,设定不同的培养温度与光照强度(同上),用 TbCl₃ 处理 24 h 后,取样测定。

1.2 指标测定与数据处理

取各生长阶段不同处理下的辣根叶片测定 HRP 活性。HRP 活性的测定采用愈创木酚氧化法^[8]。采用几率单位-浓度对数直线回归法,得到 Tb(Ⅲ)的剂量反应方程。当概率单位为 5 时,通过回归方程计算出各温度梯度下 HRP 的 24 h-EC₅₀。为保证计算结果的可信度,对所计算出的 24 h-EC₅₀(以下简化为 EC₅₀)值进行 X² 检验^[9]。

2 结果与分析

2.1 不同生长阶段辣根 HRP 活性对温度的响应

表 1 数据表明,不同生长阶段辣根 HRP 活性对

表 1 辣根各生育阶段不同温度下 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活的影响
Table 1 Effect of Tb(Ⅲ) on HRP at different temperatures during different growing periods

生育阶段	Tb(Ⅲ)浓度/mg·L ⁻¹	HRP 酶活/ΔA ₄₇₀ ·min ⁻¹ ·g ⁻¹		
		10 ℃	20 ℃	30 ℃
5 月份	CK	116.22±4.77a(100.00)	153.40±1.72a(100.00)	193.23±5.40a(100.00)
	5	108.10±4.26a(93.01)	152.26±0.03a(99.26)	190.78±6.38ab(98.73)
	10	90.55±2.69b(77.91)	148.15±0.64ab(96.58)	186.46±1.94bc(96.49)
	30	74.36±2.25c(63.02)	141.63±1.77b(92.33)	173.50±1.41c(89.79)
	100	68.64±2.94cd(59.06)	125.70±1.45cd(81.95)	115.72±1.41d(59.89)
	300	64.77±1.37cd(55.72)	119.64±4.99d(78.00)	94.32±2.88e(48.81)
	1 000	31.81±0.4e(27.37)	81.84±3.21e(53.35)	53.35±2.05f(27.61)
7 月份	CK	115.93±2.82a(100.00)	127.40±1.38a(100.00)	141.08±1.99ab(100.00)
	5	102.30±5.45bc(88.24)	124.06±2.80ab(97.37)	135.89±1.95b(96.32)
	10	100.83±0.31c(86.97)	118.68±2.81bc(93.15)	128.90±1.68c(91.37)
	30	89.32±1.26d(77.05)	113.76±2.57c(89.29)	108.61±1.60d(76.98)
	100	84.56±2.75d(72.94)	68.92±2.08d(54.10)	83.86±0.76e(59.44)
	300	64.03±1.82e(55.23)	53.77±2.12e(42.21)	71.43±1.35f(50.63)
	1 000	48.63±0.427f(41.95)	47.06±1.01e(36.93)	49.03±0.56g(34.75)
9 月份	CK	93.13±0.95a(100.0)	170.15±6.48a(100.00)	211.20±2.62a(100.00)
	5	78.42±1.97b(84.20)	171.95±3.91b(101.06)	179.40±2.31b(84.94)
	10	71.40±0.34bc(76.67)	160.52±1.75c(94.34)	158.20±3.49c(74.91)
	30	68.20±3.40cd(73.23)	154.58±2.45d(90.85)	151.20±2.55d(71.59)
	100	66.32±0.43de(71.20)	126.99±2.76e(74.64)	146.65±1.16e(69.44)
	300	61.57±1.30e(66.11)	116.63±1.60ef(68.55)	127.81±3.30f(60.52)
	1 000	56.59±1.48e(60.77)	110.18±3.77f(64.76)	101.21±2.91g(47.92)
11 月份	CK	78.98±1.39a(100.00)	207.65±3.54a(100.00)	169.55±5.78a(100.00)
	5	72.93±0.22a(92.34)	151.44±8.64b(72.93)	147.68±0.95bc(87.10)
	10	70.41±6.03ab(89.16)	146.97±1.89bc(70.78)	121.71±0.34c(71.78)
	30	60.96±1.31b(77.19)	142.42±2.34c(68.59)	106.49±3.04d(62.81)
	100	50.76±1.62c(64.27)	102.75±0.85d(49.48)	89.91±0.47e(53.03)
	300	46.27±0.95c(58.59)	86.49±1.86e(41.65)	81.98±1.36e(48.35)
	1 000	42.69±1.64c(54.05)	84.64±0.46e(40.76)	51.30±0.35f(30.26)

注:7 月份高温设为 40 ℃;括号内数值为相对值,表中不同字母表示差异显著水平(P<0.05),以下同。
Note:High temperature set on July is 40 ℃;values in brackets are relative values, different letters denote significant difference(P<0.05), same as below.

表 2 辣根不同生长阶段不同温度 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活毒理指标相关分析
Table 2 Relationships of Tb(Ⅲ)and activity of HRP at different temperatures during different growing periods

月份	温度/℃	NOEC/mg·L ⁻¹	LOEC/mg·L ⁻¹	EC ₅₀ (95%置信区间)/mg·L ⁻¹	回归方程	r ²
5 月	10	5	10	190.10(188.46~191.73)	Y=-0.837x+6.907	0.939
	20	10	30	1 185.91(1 185.35~1 187.47)	Y=-0.926x+7.847	0.961
	30	10	30	193.27(191.90~194.64)	Y=-1.309x+7.993	0.951
7 月	20	1	3	276.59(275.77~277.41)	Y=-1.064x+7.598	0.939
	30	1	3	579.69(578.26~581.11)	Y=-0.599x+6.656	0.986
	40	0	1	280.59(279.79~281.38)	Y=-0.932x+7.281	0.971
9 月	10	1	3	1 250.16(1 248.70~1 251.6)	Y=-0.560x+6.734	0.927
	20	5	10	2 293.45(2 292.06~2 294.84)	Y=-0.648x+7.179	0.918
	30	3	10	832.58(830.97~834.19)	Y=-0.447x+6.306	0.954
11 月	10	10	30	602.49(601.14~603.83)	Y=-0.716x+6.989	0.939
	20	1	3	369.46(368.79~370.14)	Y=-0.697x+6.862	0.936
	30	0	1	164.30(163.61~164.99)	Y=-0.577x+6.279	0.907

注:Y 是概率单位,x 是 Tb(Ⅲ)浓度对数。
Note:Y is probit, x is Log of the concentration of Tb(Ⅲ).

温度的响应不尽一致。其中对低温(10℃)的响应特点是 5、7 月份 HRP 活性高(116.22, 115.93△A₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹),9、11 月低。对高温(30~40℃)的反应是 5、9 月 HRP 活性最高(193.23, 211.20△A₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹),7、11 月低。对适温(20℃)的响应表现是 9、11 月份 HRP 活性最高(170.15, 207.65△A₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹),5、7 月低。

2.2 不同温度与生长阶段 HRP 对 Tb(Ⅲ)毒害的响应

不同生长阶段及温度背景下,辣根 HRP 对高(低)剂量 Tb(Ⅲ)的响应见表 1。低温下(10℃)HRP 对高(1 000 mg·L⁻¹)剂量 Tb(Ⅲ)的响应特点是 5 与 7 月份 HRP 活性降幅较大,降幅为 CK 的 27.37%和 41.95%,低剂量(5 mg·L⁻¹)是 7 与 9 月份,活性降幅是 CK 的 88.24%和 84.20%;高温下(30~40℃)HRP 对高剂量的响应特点是 5 与 11 月降幅大,分别是 CK 的 27.61%和 30.26%,低剂量是 9 与 11 月份降幅大(84.94%、87.10%);适温下(20℃)HRP 对高与低剂量的响应特点都是 7、11 月份降幅大(36.93%、40.76%和 97.37%,72.93%)。数据显示各温度高(低)剂量 Tb(Ⅲ)作用下 HRP 活性均下降(9 月份除外),但不同温度下各生长阶段降幅不同,不同温度高剂量 Tb(Ⅲ)作用下各生长阶段降幅与低剂量作用下也不尽一致。

2.3 Tb(Ⅲ)对不同温度与生长阶段 HRP 的毒理学分析

比较不同温度与生长阶段下 Tb(Ⅲ)对 HRP 的半效应剂量(EC₅₀/mg·L⁻¹,表 2)发现,低温(10℃)下 9 月份最大(1 250.16),5 月份最小(190.10);高温(30~40℃)下 9 月份最大(832.58),11 月份最小(164.30);

适温(20℃)下 9 月份最大(2 293.45),7 月份最小(276.59)。说明不同温度下各生长阶段 EC₅₀ 不同,即不同生长阶段温度对 Tb(Ⅲ)的生态毒性的影响不同,但各温度下 9 月份 EC₅₀ 均最大,说明 9 月份温度对 Tb(Ⅲ)的生态毒性的影响在整个生长阶段中最小。

比较辣根各生长阶段不同温度下 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活的最大无作用剂量(NOEC)和最小作用剂量(LOEC)规律可知,5 月份的 NOEC 与 LOEC 是高温>低温;7 月份是低温>高温;9 月份是高温>低温;11 月份是低温>高温。即温度影响 HRP 对 Tb(Ⅲ)的响应规律是 5、9 月份 HRP 对低温敏感,7、11 月份 HRP 对高温敏感。各阶段适温下 HRP 对 Tb(Ⅲ)的敏感性小于低、高温。

3 讨论

辣根原产欧洲,喜阴凉,而耐热与寒^[7]。辣根的这一特性与其固有的发育节律使 HRP 的变化在一定程度上保留着辣根生育适应环境的痕迹。4—5 月份是辣根苗期,自然界温度渐高,因幼苗阶段辣根生理代谢与生长尚慢,以至同样适温(20℃)CK 下 HRP 活性低于 9、11 月份的 CK。由于幼苗的抗逆能力弱,此时若遇低温胁迫,HRP 对 Tb(Ⅲ)的敏感性因生长因素而增加,HRP 易受 Tb(Ⅲ)毒害(为 CK 的 27.37%和 41.95%,表 1),EC₅₀(190.10 mg·L⁻¹)小;7—8 月份是辣根快速生长期,但因时逢南方高温,不适于辣根生长(迟缓),所以 CK 的 HRP 活性小于其它实验月份 CK。同时,HRP 对 Tb(Ⅲ)的敏感性也因环境因素(温度)而增加,HRP 活性降低,导致 EC₅₀(276.59 mg·L⁻¹)

减小;9—11月乃辣根生殖生长期(根系膨大期),地上同化器官面积达到最大,地下器官迅速生长,细胞分裂与生长诱导 HRP 酶活增加,表现为适温下 CK 的 HRP 活性高于 5、7 月份 CK。但由于 11 月份自然界气温已低,此时给予高温处理,Tb(Ⅲ)对 HRP 的伤害加重(是 CK 的 27.61%和 87.10%,表 1),造成 EC_{50} ($164.30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)减小。

温度对植物 POD 的影响研究表明,高(低)等极端温度胁迫可改变 POD 活性。正常情况下,HRP 参与自由基代谢与细胞分裂生长,常温下 HRP 参与自由基代谢并维持其平衡。高(低)温可导致自由基产生加快,当自由基积累超出 HRP 淬灭能力时,大量自由基引发和加剧膜脂过氧化,破坏膜结构与其上进行的物质与能量代谢功能,改变膜透性,严重时导致细胞崩溃死亡^[10-11]。同时高温易导致蛋白质构象变化从而使酶蛋白失去功能或变性^[12]。本实验结果表明,不同生育阶段 HRP 对温度的反应不同;不同生育阶段和不同温度下的 HRP 响应 Tb(Ⅲ)胁迫的敏感性同样存在差异。与适温条件相比,温度变化加剧了 Tb(Ⅲ)生态毒理效应,推测原因在于高(低)温使辣根的呼吸作用能量代谢加剧,HRP 等保护酶系统活性降低,自由基生成速度加快,细胞内自由基的产生和消除平衡受到破坏,膜脂过氧化加剧,膜系统损伤,膜通透性增大,反馈促进 Tb(Ⅲ)通过各种途径进入细胞,净通量增加。Tb(Ⅲ)原子结构的电子轨道与 Ca^{2+} 相似,可以与膜上的 Ca^{2+} 结合位点相结合,从而部分取代 Ca^{2+} 与膜上的 Ca^{2+} 结合位点结合影响酶活;Tb(Ⅲ)也可以与肽链氨基酸残基结合肽链上的 O 或 N 结合,改变 HRP 的二级结构进而影响其活性中心卟啉环微结构,最终导致 HRP 酶活降低;Tb(Ⅲ)还能部分剪切肽链上的氨基酸残基,直接改变酶的整体结构,从而影响 HRP 活性^[13];Tb(Ⅲ)也可能通过影响 HRP 基因的复制和转录对 HRP 合成起到抑制作用。本实验结果提示人们,在环境温度变化较大地区种植辣根,植株更容易遭受 Tb(Ⅲ)毒害。因此应尽量避免极端温度导致的 Tb(Ⅲ)生态毒理效应加剧,并减轻由此带来的农业经济损失和食品安全隐患。

4 结论

(1)不同发育阶段与温度背景下 HRP 活性存在差异,此与辣根适应环境的遗传保守性有关。

(2)HRP 对 Tb(Ⅲ)的敏感性既受发育阶段影响,也与发育环境温度有关。

(3)毒理学指标显示,温度影响 HRP 响应 Tb(Ⅲ)胁迫的规律是 5、9 月份 HRP 对低温敏感,7、11 月份 HRP 对高温敏感。而各阶段适温下 HRP 响应 Tb(Ⅲ)胁迫的敏感性小于低温和高温。

参考文献:

- [1] 张自立,常江,汪成胜,等.混合稀土对作物生长量的影响[J].中国稀土学报,2001,19(1):85-87.
ZHANG Zi-li, CHANG Jiang, WANG Cheng-sheng, et al. Effects of rare earth elements on growth of crops[J]. *Journal of The Chinese Rare Earth Society*, 2001, 19(1):85-87.
- [2] Chu Haiyan, Zhu Jianguo, Xie Zubin, et al. Effects of lanthanum on hydrolytic enzyme activities in red soil[J]. *Rare Earths*, 2002, 20(2):158-160.
- [3] Nigel C. Veitch. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65:249-259.
- [4] 曹睿,黄晓华,周青.稀土离子生态毒性的分子生态标志物研究[J].农业系统科学与综合研究,2007,23(3):324-327.
CAO Rui, HUANG Xiao-hua, ZHOU Qing. Research on molecular biomarker of rare earths ions ecotoxicity[J]. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 2007, 23(3):324-327.
- [5] Aleš Nepovím, Radka Podlipá, Petr Soudek, et al. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase[J]. *Chemosphere*, 2004, 57:1007-1015.
- [6] Zhengyi Hu, Herfried Richter, Gerd Sparovek, et al. Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: a review[J]. *Plant Nutrition*, 2004, 27(1):183-220.
- [7] 韩凤,林茂祥,李娟.辣根的使用栽培技术[J].特种经济动植物,2004,12:24.
HAN Feng, LIN Mao-xiang, LI Juan. Practical cultivation technique of *cochlearia armoracia* L[J]. *Special Economic Animal and Plant*, 2004, 12:24.
- [8] Feibo Wu, Guoping Zhang, Peter Dominy. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 50:67-78.
- [9] 张伟,阎海,吴之丽.铜抑制单细胞绿藻生长的毒性效应[J].中国环境科学,2001,21(1):4-7.
ZHANG Wei, YAN Hai, WU Zhi-li. Toxic effects of copper on inhibition of the growths of unicellular green algae[J]. *China Environmental Science*, 2001, 21(1):4-7.
- [10] Sala J M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruit[J]. *Postharv Biol Technol*, 1998, 13:255-261.
- [11] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review[J]. *Ann Bot*, 2003, 91:179-194.
- [12] Dylewski D P, Singh N K, Cherry J H. Effects of heat shock and thermoadaptation on the ultrastructure of cowpea (*Vigna unguiculata*) cells[J]. *Protoplasma*, 1991, 163:125-135.
- [13] 亓昭鹏,周青,杜江燕,等. Tb^{3+} 离子与植物辣根过氧化物酶的作用方式探讨[J].化学学报,2005,63(1):1-4.
YUAN Zhaopeng, ZHOU Qing, DU Jiang-yan, et al. Study on interaction ways between Tb(Ⅲ) and horseradish peroxidase[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2005, 63(1):1-4.