

羧基化多壁碳纳米管单一及其与镉复合处理对水稻幼苗叶片毒性效应的研究

刘玲^{1,2}, 杨俊文¹, 陈成¹, 戴慧芳¹, 许婷婷¹, 孟壮¹, 方炎明^{2,①}

(1. 淮南师范学院生物工程学院, 安徽 淮南 232038; 2. 南京林业大学生物与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 研究了 0~12 mg·L⁻¹ 羧基化多壁碳纳米管 (MWCNTs-COOH) 单一及其与 10 μmol·L⁻¹ 镉 (Cd) 复合处理对水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 品种 ‘Y 两优 900’ (‘Y Liangyou 900’) 幼苗叶片生理指标及 H₂O₂ 定位的影响。结果表明: 随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高, MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片叶绿素含量呈逐渐降低的趋势, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和过氧化物酶 (POD) 活性呈先升高后降低的趋势, 丙二醛 (MDA) 含量和 O₂⁻ 产生速率呈逐渐升高的趋势。6 和 3 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH 单一处理组的 SOD 和 POD 活性分别达到最大值, 显著高于 0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH (CK1) 组; 1.5、3、6 和 12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH 单一处理组的 MDA 含量和 O₂⁻ 产生速率均高于 CK1 组。随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高, MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组水稻幼苗叶片叶绿素含量和 SOD 活性呈逐渐降低的趋势, POD 活性呈“降低—显著升高—降低”的趋势, MDA 含量呈逐渐升高的趋势, O₂⁻ 产生速率呈先降低后升高的趋势。同一质量浓度 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组的叶绿素含量和 SOD 活性均低于 MWCNTs-COOH 单一处理组, 而 MDA 含量和 O₂⁻ 产生速率均高于 MWCNTs-COOH 单一处理组。12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd 复合处理组水稻幼苗叶片褐色斑点面积最大、颜色最深。上述研究结果显示: 高质量浓度 MWCNTs-COOH 单一和 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理均对水稻幼苗叶片产生毒性效应, MWCNTs-COOH-Cd 复合处理对水稻幼苗叶片具有明显的协同抑制效应, 致使毒性显著增强。

关键词: 羧基化多壁碳纳米管; 镉; 水稻品种 ‘Y 两优 900’; 毒性效应

中图分类号: Q945.78; S511; X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)01-0037-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.01.05

Research on toxic effects of single carboxylated multi-walled carbon nanotubes and its combined treatments with cadmium on leaves of *Oryza sativa* seedlings LIU Ling^{1,2}, YANG Junwen¹, CHEN Cheng¹, DAI Huifang¹, XU Tingting¹, MENG Zhuang¹, FANG Yanming^{2,①} (1. College of Biological Engineering, Huainan Normal University, Huainan 232038, China; 2. College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(1): 37-43

Abstract: Effects of single carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH) at 0-12 mg·L⁻¹ and their combined treatments with 10 μmol·L⁻¹ cadmium (Cd) on physiological indexes and H₂O₂ localization of leaves of seedlings of cultivar ‘Y Liangyou 900’ of *Oryza sativa* Linn. were studied. The results show that with enhancing of mass concentration of MWCNTs-COOH, chlorophyll content in leaves of *O. sativa* seedlings decreases gradually, activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) increase first and then decrease, while malondialdehyde (MDA) content and O₂⁻ generation rate increase gradually in single MWCNTs-COOH treatment group. Activities of SOD and POD in single treatment group of 6 and 3 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH reach the maximum value, respectively, which are significantly higher than those in 0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH (CK1) group. MDA content and

收稿日期: 2019-05-13

基金项目: 安徽省教育厅重点项目 (KJ2018A0472); 安徽省科技重大专项 (1830701189)

作者简介: 刘玲 (1967—), 女, 安徽淮南人, 博士研究生, 副教授, 主要从事植物生态学及逆境生理方面的研究。

①通信作者 E-mail: jwu4@njfu.edu.cn

O_2^- generation rate are higher in single treatment group of 1.5, 3, 6 and 12 $mg \cdot L^{-1}$ MWCNTs-COOH than in CK1 group. With enhancing of mass concentration of MWCNTs-COOH, chlorophyll content and SOD activity of leaves of *O. sativa* seedlings decrease gradually, POD activity appears the trend of “decreasing-increasing significantly-decreasing”, MDA content increases gradually, and O_2^- generation rate decreases first and then increases in combined MWCNTs-COOH-Cd treatment group. Chlorophyll content and SOD activity are lower and MDA content and O_2^- generation rate are higher in combined MWCNTs-COOH-Cd treatment groups than those in single MWCNTs-COOH treatment groups with the same mass concentration. The area of brown spots on leaves of *O. sativa* seedlings in combined treatment group of 12 $mg \cdot L^{-1}$ MWCNTs-COOH-10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cd is the largest, and its color is the deepest. It is indicated that both single MWCNTs-COOH and combined MWCNTs-COOH-Cd treatments with high mass concentration have toxic effects on leaves of *O. sativa* seedlings, and combined MWCNTs-COOH-Cd treatment has an obvious synergistic inhibitory effect on leaves of *O. sativa* seedlings, resulting in toxicity significantly enhancing.

Key words: carboxylated multi-walled carbon nanotubes; cadmium; cultivar ‘Y Liangyou 900’ of *Oryza sativa* Linn.; toxic effect

碳纳米管(CNTs)是一种纤维化的纳米材料,因其具有自收缩、抗裂、增韧和半导体等特性被广泛应用于工业、陶瓷业和信息工程等领域^[1-3]。由于对CNTs持续的开发、生产和应用,CNTs不可避免地释放到环境中^[4-5]。植物是生态系统的生产者,在从土壤或水体吸收营养的同时伴随着对其中CNTs的吸附,植物对CNTs具有潜在的累积效应,被认为是CNTs进入生物循环的重要途径^[6-7]。因此,研究CNTs对植物生长的毒性效应及其在环境中的迁移和转化至关重要。CNTs分为单壁碳纳米管(SWCNTs)和多壁碳纳米管(MWCNTs),其中,MWCNTs具有较强的抗压抗折^[8-9]和导电导热能力^[10-11],且成本较低,易制取,用途广泛^[12]。MWCNTs的表面功能化能改变材料本身的化学和物理学特性,使其稳定性和生物相容性增加,从而增强材料本身的工业化应用潜力^[13]。羧基化多壁碳纳米管(MWCNTs-COOH)作为MWCNTs表面功能化的典型代表,其分散性和亲水性更佳,市场应用前景更广。

近年来,MWCNTs和MWCNTs-COOH的生态安全性受到人们越来越多的关注。研究表明:MWCNTs可降低微生物活力^[14],引起小鼠骨髓细胞和人体淋巴细胞染色体畸变和DNA异常,影响肝脏代谢功能,对哺乳动物具有潜在毒性^[15-17]。高浓度MWCNTs不仅抑制藻细胞增殖,降低叶绿素a含量和抗氧化酶活性^[18-19],还对作物根和叶的形态产生不利影响^[20]。另外,MWCNTs团聚物对植物细胞也存在胁迫,干扰拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]T87悬浮细胞的干质量、通透性和超氧化物

歧化酶(SOD)活性等^[21]。MWCNTs-COOH进入植物体内,致使叶片氧化损伤加剧,植物亚细胞结构被破坏^[22]。

MWCNTs-COOH具有较大的比表面积且易分散在水体中,其吸附性能得到极大发挥,易成为有机和重金属污染物的载体,并对其毒性产生影响^[23-24]。已有研究结果证明:MWCNTs-COOH具有吸附重金属的能力,并能够促进重金属离子向植物根和叶细胞内部渗透^[22]。在MWCNTs-COOH和重金属复合污染的环境介质中,二者间不可避免地会发生相互作用,进而干扰重金属的环境行为和对生态系统的毒性效应^[25]。目前,关于单一MWCNTs-COOH或镉(Cd)对植物生长影响的研究很多,而关于MWCNTs-COOH与Cd复合作用下对植物生长影响的研究较少,MWCNTs-COOH与Cd复合作用对植物的毒性作用机制尚不明确。为此,本研究以水稻(*Oryza sativa* Linn.)品种‘Y两优900’(‘Y Liangyou 900’)幼苗为实验对象,选取Cd作为典型重金属,研究水稻幼苗在MWCNTs-COOH单一及其与Cd复合处理下叶片生理特性的变化,以期为早期诊断和科学评价MWCNTs-COOH与Cd复合污染的生态风险提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 羧基化多壁碳纳米管(MWCNTs-COOH)及镉(Cd)的母液配制 MWCNTs-COOH(外径8~15 nm,

长 0.5~2.0 μm ,纯度大于 95%)购自中国科学院成都有机化学有限公司。取 500 mg MWCNTs-COOH,加入适量的去离子水,使用 SCIENTZ JY92-II 超声波破碎仪(河北慧采科技开发有限公司)于 650 W 超声振荡 150 次,每次振荡 15 s、间歇 10 s,最后定容至 500 mL,制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MWCNTs-COOH 母液,备用,使用时进行稀释。

供试 Cd 源为氯化镉($\text{CdCl}_2\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)。取 1.140 g 氯化镉,加入适量去离子水溶解,然后定容至 500 mL,制成 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cd 母液,备用,使用时进行稀释。

1.1.2 水稻幼苗培养 将籽粒饱满、大小基本一致的水稻品种‘Y 两优 900’种子(湖南袁创超级稻技术有限公司)进行浸种催芽($0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HNO_3 溶液浸泡 16~24 h,去离子水清洗后,于 $30\ ^\circ\text{C}$ 水浴中浸泡 2 d,每天换水 2 次),种子露白后,放在铺有湿润纱布的白瓷盘中,于黑暗条件、 $30\ ^\circ\text{C}$ 人工气候箱中培育。待幼芽长至约 5 mm 时,挑选芽势相近的萌发种子悬浮培养于 $1/4$ Hoagland 营养液中(漂浮板固定),于光照度 $3\ 000\ \text{lx}$ 、光照时间 $16\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 和空气相对湿度 70% 条件下进行培养,每 3 d 更换 1 次培养液。待第 3 枚真叶长出,株高和直径分别达 7.5 cm 和 0.5 cm 左右(种子萌发 21 d),移植到培养盒(长 320 mm、宽 240 mm、高 120 mm)中进行处理,每盒 48 株幼苗。

1.2 方法

1.2.1 处理方法 设置 MWCNTs-COOH 单一及 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理,共 10 个处理:CK1 不添加 MWCNTs-COOH,即 $0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH;S1、S2、S3 和 S4 单一处理分别添加 1.5 、 3 、 6 和 $12\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH;CK2 添加 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd;C1、C2、C3 和 C4 复合处理分别添加 1.5 、 3 、 6 和 $12\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH- $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd,基础培养液为 Hoagland 营养液,pH 5.3 至 pH 5.5。每 7 d 更换 1 次处理液。21 d 后,测定和观察叶片相关指标。每个处理种植 3 个培养盒,即为 3 次重复。

1.2.2 叶片生理指标测定 从每个处理的 3 个培养盒中分别随机选取 10 株水稻幼苗采集倒三叶,混合后用于生理指标测定,每个培养盒作为 1 次重复。叶绿素含量测定参考胡秉芬等^[26]的方法;POD 活性测定采用愈创木酚比色法^{[27]100};MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)显色法^{[27]227-228}; O_2^- 产生速率测定

采用盐酸羟胺法^{[27]223-224}。

SOD 活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法^{[27]218-219}并略有改动。称取叶片 0.5 g,加入 5 倍于样品质量的 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.8)冰浴研磨,经 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,上清液为粗酶提取液。取粗酶提取液 0.1 mL,加入 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 3.5 mL、 $130\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合型甲硫氨酸 $0.5\ \text{mL}$ 、 $750\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBT $0.5\ \text{mL}$ 、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 $0.5\ \text{mL}$ 、蒸馏水 $0.4\ \text{mL}$ 和 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素 $0.5\ \text{mL}$ (最后加入),在光照度 $2\ 000\ \text{lx}$ 条件下照射 12 min 后立即测定 OD_{560} ,计算 SOD 活性。

各处理每个指标均重复测定 3 次。

1.2.3 叶片 H_2O_2 定位 叶片 H_2O_2 定位参考王晨芳^[28]的二氨基联苯胺(DAB)染色法并略有改动。于每个培养盒中随机选取 3 株水稻幼苗的倒三叶置于锥形瓶中,加 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DAB 染液浸没,于黑暗条件、 $120\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床振荡过夜后,光照度 $2\ 000\ \text{lx}$ 下照射至所有叶片出现褐色斑点。然后将水稻叶片从 DAB 染液中取出,加脱色液[V(无水乙醇):V(甘油):V(去离子水)=15:1:4]后,于 $80\ ^\circ\text{C}$ 水浴脱色 30 min,将脱色的叶片抽真空后平铺于滤纸上,对比不同处理和对照间各叶片颜色的差异并拍照。每处理 3 次重复。

1.3 数据统计

采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行数据处理和分析,利用单因素方差分析进行差异显著性检验。

2 结果和分析

2.1 MWCNTs-COOH 单一及 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理对水稻幼苗叶片生理指标的影响

MWCNTs-COOH 单一及 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理对水稻幼苗叶片生理指标的影响见表 1。

2.1.1 对叶绿素含量的影响 由表 1 可见:随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高,MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片叶绿素含量呈逐渐降低的趋势,但与 $0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH(CK1)组间均无显著差异;MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组水稻幼苗叶片叶绿素含量的变化趋势与 MWCNTs-COOH 单一处理组相同,其中, $1.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH- $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd(C1)和 $3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH- $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd(C2)复合处理组的叶绿素含量均高于

0 mg · L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L⁻¹ Cd (CK2) 组, 12 mg · L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L⁻¹ Cd (C4) 复合处理组的叶绿素含量较 CK2 组显著 ($P < 0.05$) 降低。同一质量浓度 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组的叶绿素含量均低于 MWCNTs-COOH 单一处理组, 其中, C4 复合处理组与 12 mg · L⁻¹ MWCNTs-COOH (S4) 单一处理组间差异显著。

2.1.2 对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响 由表 1 还可见: 随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高, MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片 SOD 活性呈先升高后降低的趋势, 4 个 MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片 SOD 活性均高于 CK1 组, 其中, 6 mg · L⁻¹ MWCNTs-COOH (S3) 单一处理组的 SOD 活性 (24.70 U · mg⁻¹) 最高; MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组水稻幼苗叶片 SOD 活性呈逐渐降低的趋势, 其中, C1 复合处理组的 SOD 活性 (21.59

U · mg⁻¹) 最高。同一质量浓度 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组的 SOD 活性均低于 MWCNTs-COOH 单一处理组, 其中, C2、6 mg · L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L⁻¹ Cd (C3) 和 C4 复合处理组分别与对应的单一处理组间差异显著。

2.1.3 对过氧化物酶(POD)活性的影响 由表 1 还可见: 随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高, MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片 POD 活性呈先升高后降低的趋势, 其中, 3 mg · L⁻¹ MWCNTs-COOH (S2) 和 S3 单一处理组的 POD 活性较高, 与 CK1 组间差异显著, 之后 POD 活性显著降低; MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组水稻幼苗叶片 POD 活性呈“降低—显著升高—降低”的趋势。同一质量浓度 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组与 MWCNTs-COOH 单一处理组间水稻幼苗叶片 POD 活性均存在显著差异。

表 1 MWCNTs-COOH 单一及 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理对水稻幼苗叶片生理指标的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
Table 1 Effect of single MWCNTs-COOH and combined MWCNTs-COOH-Cd treatments on physiological indexes of leaves of *Oryza sativa* Linn. seedlings ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

编号 No.	处理组 Treatment group	Chl	SOD	POD	MDA	GR
单一处理组 Single treatment group						
CK1	0 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH	1.68±0.06a	23.19±1.03b	17.73±0.53b	20.5±0.5c	3.61±0.07b
S1	1.5 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH	1.72±0.02a	23.23±0.12b	23.46±0.80b	21.5±1.5c	3.76±0.01b
S2	3 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH	1.71±0.15a	23.96±0.25ab	33.30±2.63a	22.0±1.0bc	3.98±0.03b
S3	6 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH	1.62±0.12a	24.70±0.68a	31.03±6.83a	24.0±1.0ab	4.49±0.07a
S4	12 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH	1.60±0.06a	24.27±0.14ab	19.10±1.03b	25.3±2.0a	4.59±0.51a
复合处理组 Combined treatment group						
CK2	0 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L ⁻¹ Cd	1.54±0.05ab*	20.32±0.10b*	23.67±3.73b*	22.5±2.5a	3.95±0.27c
C1	1.5 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L ⁻¹ Cd	1.69±0.18a	21.59±1.19a	20.03±1.90bc*	23.0±2.0a	5.04±0.27ab*
C2	3 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L ⁻¹ Cd	1.64±0.12ab	20.58±0.72ab*	17.90±1.23c*	24.0±2.0a	4.53±0.30bc*
C3	6 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L ⁻¹ Cd	1.54±0.11ab	20.13±0.34b*	34.17±3.37a*	25.5±3.5a	4.70±0.61bc
C4	12 mg · L ⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol · L ⁻¹ Cd	1.39±0.17b*	19.87±0.20b*	30.47±0.33a*	27.0±5.0a	5.78±0.54a*

¹⁾ Chl: 叶绿素含量 Chlorophyll content (mg · g⁻¹); SOD: 超氧化物歧化酶活性 Superoxide dismutase activity (U · mg⁻¹); POD: 过氧化物酶活性 Peroxidase activity (U · mg⁻¹ · min⁻¹); MDA: 丙二醛含量 Malondialdehyde content (nmol · g⁻¹); GR: O₂⁻ 产生速率 O₂⁻ generation rate (nmol · min⁻¹ · g⁻¹). 同列中不同小写字母表示同一指标在不同质量浓度的单一或复合处理组间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference among single or combined treatment groups with different mass concentrations. *: 表示同一质量浓度复合处理组与单一处理组间差异显著 ($P < 0.05$) Indicating the significant ($P < 0.05$) difference between combined and single treatment groups with the same mass concentration.

2.1.4 对丙二醛(MDA)含量的影响 由表 1 还可见: 随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高, MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片 MDA 含量呈逐渐升高的趋势, 其中, S3 和 S4 单一处理组的 MDA 含量较高, 分别较 CK1 组显著升高了 17.1% 和 23.4%; MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组水稻幼苗叶片 MDA 含量的变化趋势与 MWCNTs-COOH 单一处理组相

同, 但不同质量浓度 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组间的 MDA 含量无显著差异。同一质量浓度 MWCNTs-COOH-Cd 复合处理组的 MDA 含量均高于 MWCNTs-COOH 单一处理组, 但均无显著差异。

2.1.5 对 O₂⁻ 产生速率的影响 由表 1 还可见: 随着 MWCNTs-COOH 质量浓度提高, MWCNTs-COOH 单一处理组水稻幼苗叶片 O₂⁻ 产生速率呈逐渐升高的趋

势,其中,S3和S4单一处理组的 O_2^- 产生速率较高,分别较CK1组显著升高了24.4%和27.1%;MWCNTs-COOH-Cd复合处理组水稻幼苗叶片 O_2^- 产生速率呈先降低后升高的趋势,C2复合处理组的 O_2^- 产生速率最低,C4复合处理组的 O_2^- 产生速率最高,显著高于CK2组。同一质量浓度MWCNTs-COOH-Cd复合处理组的 O_2^- 产生速率均高于MWCNTs-COOH单一处理组,其中,C1、C2和C4复合处理组分别与对应的单一处理组间差异显著。

2.2 MWCNTs-COOH单一及MWCNTs-COOH-Cd复合处理对水稻幼苗叶片 H_2O_2 定位的影响

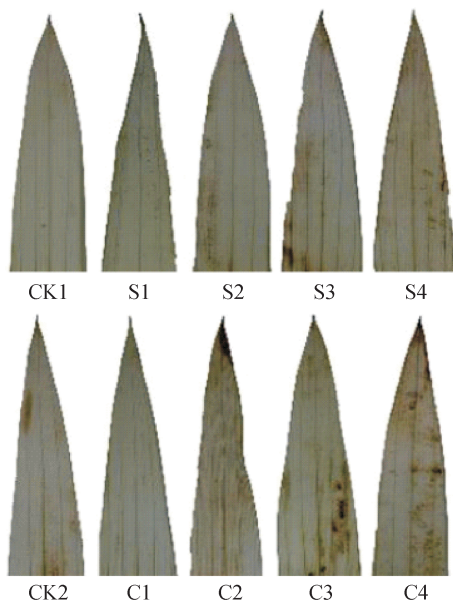
MWCNTs-COOH单一及MWCNTs-COOH-Cd复合处理对水稻幼苗叶片 H_2O_2 定位的影响见图1。由图1可见:1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH单一处理组与1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd复合处理组间水稻幼苗叶片褐色斑点面积差异不大;与0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd组相比,6 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd和

12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd复合处理组叶片褐色斑点面积增大、颜色加深。

3 讨 论

叶绿素含量是反映植物光合作用水平的基本指标^[29]。杨祥宇^[30]的研究结果表明:1~50 mg·L⁻¹纳米二氧化钛能够提高黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)和芦苇[*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.]等植物的光合色素含量。本研究中,1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH(S1)单一处理组水稻幼苗叶片叶绿素含量最高,而12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd(C4)复合处理组的叶绿素含量最低,说明低质量浓度MWCNTs-COOH可能对水稻生长具有一定的促进作用,高质量浓度MWCNTs-COOH和重金属Cd共同作用则会对水稻造成毒害作用,使叶绿素合成受抑制,进而导致叶绿素含量下降。MWCNTs-COOH单一及其与Cd复合处理均较纳米二氧化钛对植物的毒性更强,这可能与纳米材料和植物种类有关^[31],但具体原因还有待深入研究。

MDA和 O_2^- 是植物在逆境下的产物,对植物的生长和生理均有毒害作用^[32]。本研究结果显示:3 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd(C2)复合处理组水稻幼苗叶片 O_2^- 产生速率低于其他复合处理组,推测这是由于该质量浓度MWCNTs-COOH能够与Cd产生拮抗效应,降低毒性。同一质量浓度MWCNTs-COOH-Cd复合处理组的丙二醛(MDA)含量和 O_2^- 产生速率均高于MWCNTs-COOH单一处理组,且12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH(S4)单一处理组及C4复合处理组水稻幼苗叶片MDA含量和 O_2^- 产生速率总体上分别显著高于0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH(CK1)和0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd(CK2)组,说明高质量浓度MWCNTs-COOH与Cd共同作用后产生协同效应,水稻幼苗叶片细胞活性氧(ROS)的代谢平衡被打破,氧化损伤加剧。然而,环境中 O_2^- 等ROS也可激活植物体内超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)等抗氧化酶活性,使MDA含量和 O_2^- 产生速率维持动态平衡,以达到植物的自我保护^[33-34]。Wang等^[22]认为,MWCNTs-COOH在一定范围内可促进蚕豆(*Vicia faba* Linn.)叶片SOD和POD活性的增加。本研究中,随MWCNTs-COOH质量浓度提高,低质量浓度



CK1: 0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH; S1: 1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH; S2: 3 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH; S3: 6 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH; S4: 12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH; CK2: 0 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd; C1: 1.5 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd; C2: 3 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd; C3: 6 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd; C4: 12 mg·L⁻¹ MWCNTs-COOH-10 μmol·L⁻¹ Cd.

图1 MWCNTs-COOH单一及MWCNTs-COOH-Cd复合处理对水稻幼苗叶片 H_2O_2 定位的影响

Fig. 1 Effect of single MWCNTs-COOH and combined MWCNTs-COOH-Cd treatments on H_2O_2 localization of leaves of *Oryza sativa* Linn. seedlings

MWCNTs-COOH 单一处理组的 POD 和 SOD 活性升高,而 S4 单一和 C4 复合处理组的 POD 和 SOD 活性分别较 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH (S3) 单一和 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWCNTs-COOH- $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd (C3) 复合处理组降低,说明 MWCNTs-COOH 质量浓度过高时水稻幼苗氧化损伤程度加剧。

逆境下 H_2O_2 和 O_2^- 的失衡会导致叶片氧化应激、损伤和防御反应。植物细胞产生 H_2O_2 和 O_2^- 可将 Mn^{2+} 氧化成 Mn^{3+} , Mn^{3+} 进一步氧化 DAB 形成红褐色多聚化合物,叶片中红褐色物质颜色的深浅及产生斑点的面积可直观反映叶片的氧化损伤程度^[35]。Wang 等^[22] 研究发现,随 MWCNTs-COOH 质量浓度提高,单一及与 Cd 和 Pb 复合处理下蚕豆幼苗叶片中红褐色物质逐渐变多,说明叶片损伤很可能是由高质量浓度 MWCNTs-COOH 胁迫引起的。本研究中, C4 复合处理组水稻幼苗叶片 O_2^- 产生速率较 CK2 组大幅度增加,叶片褐色斑点面积最大、颜色最深,说明高质量浓度 MWCNTs-COOH 与 Cd 共同作用后,对水稻的毒性加剧。

综上所述,高质量浓度 MWCNTs-COOH 单一及其与 Cd 复合处理对水稻幼苗叶片生理和生长影响显著,主要表现为 SOD 和 POD 活性降低、MDA 含量升高、叶绿素降解及叶片受损伤等,因此,要降低 MWCNTs-COOH 与 Cd 复合作用带来的生态风险。

参考文献:

- [1] 施 韬, 李泽鑫, 李闪闪. 碳纳米管增强水泥基复合材料的自收缩及抗裂性能[J]. 复合材料学报, 2019, 36(6): 1528-1535.
- [2] CHEN L, ZHAO J, WANG L, et al. In-situ pyrolyzed polymethylsilsesquioxane multi-walled carbon nanotubes derived ceramic nanocomposites for electromagnetic wave absorption [J]. Ceramics International, 2019, 45(9): 11756-11764.
- [3] 刁加加, 安立宝, 常春蕊. 碳纳米管在典型微纳电子器件中的应用进展[J]. 液晶与显示, 2016, 31(2): 149-156.
- [4] CHEN C, WANG H. Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials[M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016: 487-514.
- [5] 禹 露, 唐志强, 梁 跃, 等. 碳纳米管材料的释放途径、生态毒性及环境归趋[J]. 化工新型材料, 2014, 42(8): 1-3, 25.
- [6] LAHIANI M H, DERVISHI E, CHEN J, et al. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops [J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2013, 5(16): 7965-7973.
- [7] 钟建丹, 陈红春, 罗春燕, 等. 碳纳米管与非暴露对水稻发芽及幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(10): 2110-2117.
- [8] 张东东. 石墨烯(碳纳米管-连续碳纤维)增强环氧树脂复合材料力学及吸波性能研究[D]. 北京: 北京化工大学材料科学与工程学院, 2015: 16-20.
- [9] SEDAGHATDOOST A, BEHFARNIA K. Mechanical properties of Portland cement mortar containing multi-walled carbon nanotubes at elevated temperatures [J]. Construction and Building Materials, 2018, 176: 482-489.
- [10] 柳和生, 段翔宇, 赖家美. 高剪切分散对多壁碳纳米管/VARTM用环氧树脂导电性能的影响[J]. 湖南大学学报(自然科学版), 2017, 44(12): 62-68.
- [11] 何 燕, 冯娟娟, 马连湘. 定向碳纳米管对天然橡胶复合材料性能的影响[J]. 材料研究学报, 2013, 27(5): 495-500.
- [12] CHEN H, GU Z, AN H, et al. Precise nanomedicine for intelligent therapy of cancer[J]. Science China Chemistry, 2018, 61(12): 1503-1552.
- [13] MALLAKPOUR S, ZADEHNAZARI A. A facile, efficient, and rapid covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes with natural amino acids under microwave irradiation [J]. Progress in Organic Coatings, 2014, 77(3): 679-684.
- [14] 贺涔霖, 高 飞, 卢晓霞, 等. 多壁碳纳米管对土壤微生物的生态毒理效应[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(2): 155-161.
- [15] 贾建博, 江翠娟, 闫 兵. 纳米材料在易感群体小鼠模型中的潜在毒性[J]. 科学通报, 2017, 62(24): 2749-2757.
- [16] GHOSH M, CHAKRABORTY A, BANDYOPADHYAY M, et al. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): induction of DNA damage in plant and mammalian cells [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 197: 327-336.
- [17] ZHANG Y, WANG Y, LIU A, et al. Modulation of carbon nanotubes' perturbation to the metabolic activity of CYP3A4 in the liver [J]. Advanced Functional Materials, 2016, 26(6): 841-850.
- [18] 王应军, 李 娜, 罗潇宇, 等. 多壁碳纳米管对铜绿微囊藻生长及生理特征的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 316-325.
- [19] LONG Z, JI J, YANG K, et al. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae [J]. Environmental Science and Technology, 2012, 46(15): 8458-8466.
- [20] BEGUM P, FUGETSU B. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L.) and the role of ascorbic acid as an antioxidant [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 243: 212-222.
- [21] LIN C, FUGETSU B, SU Y, et al. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* T87 suspension cells [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170: 578-583.
- [22] WANG C, LIU H, CHEN J, et al. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 274: 404-412.

- [23] LI X, ZHAO H, QUAN X, et al. Adsorption of ionizable organic contaminants on multi-walled carbon nanotubes with different oxygen contents [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(1): 407-415.
- [24] YU G, LU Y, GUO J, et al. Carbon nanotubes, graphene, and their derivatives for heavy metal removal [J]. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2018, 1(1): 56-78.
- [25] RONG H, WANG C, YU X, et al. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes exacerbated oxidative damage in roots of *Vicia faba* L. seedlings under combined stress of lead and cadmium [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 161: 616-623.
- [26] 胡秉芬, 黄华梨, 季元祖, 等. 分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度 [J]. *草业科学*, 2018, 35(8): 1965-1974.
- [27] 张志良, 翟伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [28] 王晨芳. 小麦与条锈菌互作过程中活性氧迸发的组织学和细胞化学研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学植物保护学院, 2008: 48.
- [29] 张栋. 干旱胁迫对苹果光合作用和叶绿素荧光的影响及叶片衰老特性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学园艺学院, 2011: 6-9.
- [30] 杨祥宇. 纳米二氧化钛对人工湿地水处理系统的影响机制研究 [D]. 重庆: 重庆大学城市建设与环境工程学院, 2018: 55-56.
- [31] BEGUM P, IKHTIARI R, FUGETSU B. Potential impact of multi-walled carbon nanotubes exposure to the seedling stage of selected plant species [J]. *Nanomaterials*, 2014, 4: 203-221.
- [32] 郭敏, 龚继来, 曾光明. 多壁碳纳米管对水稻幼苗的植物毒性研究 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(5): 94-102.
- [33] 尚玉坤, 刘思凯, 陈杨晗, 等. 镉胁迫对东营野生大豆幼苗抗氧化系统及可溶性蛋白的影响 [J]. *四川农业大学学报*, 2019, 37(1): 15-21.
- [34] 阮志平, 唐源江, 曾美涓. 干旱胁迫对 4 种棕榈植物幼苗光合特性及抗氧化酶活性的影响 [J]. *热带作物学报*, 2016, 37(10): 1914-1919.
- [35] 殷奎德, 黄海. 拟南芥叶片超氧自由基的组织化学定位 [J]. *生物学杂志*, 2003, 20(2): 44, 41.

(责任编辑: 张明霞)



(上接第 36 页 Continued from page 36)

- [11] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 2 版. 广州: 华南理工大学出版社, 2006: 120-121.
- [12] 张锦雀, 吴晓珊, 朱善岚, 等. 金线莲多糖苯酚-硫酸法测定条件的优化 [J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(2): 113-116.
- [13] 王延峰, 李延清, 郝永红, 等. 超声法提取银杏叶黄酮的研究 [J]. *食品科学*, 2002, 23(8): 166-167.
- [14] 刘树兴, 郭瑞霞, 赵芳. 超声波法提取荷叶生物碱的研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(16): 52-55.
- [15] 陈黎明, 罗美佳, 夏鹏国, 等. 光强对三七生长、光合特性及有效成分积累的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(12): 3004-3006.
- [16] 廖小强. 金线莲林下仿生栽培技术探析 [J]. *绿色科技*, 2018(1): 194-195.
- [17] 贺彩艳, 李德荣. 求米草的耐阴性研究 [J]. *草业科学*, 2013, 30(10): 1531-1534.
- [18] 邵青松, 周爱存, 黄瑜秋, 等. 不同移栽条件对金线莲组培苗成活率及生长的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6): 955-958.
- [19] 李炎林, 桂克印, 唐前瑞, 等. 地被植物耐阴性研究进展 [J]. *现代园艺*, 2008(5): 4-5.
- [20] 郑连金, 马增强, 肖玉兰. 不同光照强度对台湾金线莲生长发育和次生代谢物合成的影响 [J]. *安徽农学通报*, 2016, 22(16): 25-27.

(责任编辑: 郭严冬)