

螯合剂对铜毒性的影响

李锋民^{1,2}, 熊治廷², 胡洪营¹ (1. 清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084; 2. 武汉大学环境科学与工程系, 武汉 430072)

摘要: 研究了螯合剂 EDTA 和 DTPA 对海州香薷蓄铜能力和铜毒性的影响. 结果显示, EDTA 和 DTPA 能抑制植物的生长, 使其生物量降低, 叶绿素含量下降, 同时降低了植物的根系活力. EDTA 和 DTPA 都可引起植物 SOD、POD 活性上升, 在与 Cu^{2+} 共同作用下, EDTA 对 Cu^{2+} 毒性影响较小, 表现在 SOD、POD 活性仍按 Cu^{2+} 独立作用下的变化规律而变化, 且数值上变化不大. 而 DTPA 则降低了 Cu^{2+} 作用下 SOD、POD 活性的变化. EDTA 使海州香薷地上部分铜浓度增加, DTPA 则明显降低了海州香薷的铜含量.

关键词: 铜; 海州香薷; 螯合剂; 毒性; 生物蓄积

中图分类号: X175 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2003)06-05-0096

Effects of Chelating Agents on Toxicity of Copper to *Elsholtzia splendens*

Li Fengmin^{1,2}, Xiong Zhiting², Hu Hongying¹ (1. ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Dept. of Environmental Science and Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Effects of chelating agents on toxicity of copper to and bioaccumulation in *Elsholtzia splendens* were investigated. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) inhibited plant growth, decreased the biomass, chlorophyll content and root activity. EDTA had very low or no influence on the toxicity of copper to *Elsholtzia splendens*. DTPA decreased copper-induced toxicity. DTPA decreased copper accumulation in *Elsholtzia splendens*. EDTA increased copper transfer from the subterranean part to the aerial part of the plant.

Keywords: copper; *Elsholtzia splendens*; toxicity; chelating agents; bioaccumulation

海州香薷 (*Elsholtzia splendens* Nakai ex F. Maekawa) 属唇形科, 香薷属, 是我国长江中下游地区废铜矿石堆上常见的优势植物, 对铜有较高的耐性和强蓄积能力^[1]. 植物对重金属的吸收和耐性会受螯合剂如乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、二乙三胺五乙酸 (diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA) 的影响. 螯合剂对植物吸收重金属离子的影响有许多相互矛盾的报告. 有人认为在培养液中加入 EDTA 和 DTPA 可增加植物对 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子的吸收^[2,3]. 张毅敏认为 EDTA 的存在使 Cu^{2+} 毒性降低^[4]. 沈振国认为 EDTA、DTPA 的存在使 Cu^{2+} 活度降低, 抑制了植物吸收, 也减少了其从地下部向地上部转移^[5]. 但 Sun 等发现 EDTA 的加入使 Cu^{2+} 活度升高, 并易于从土壤中淋出^[6]. 螯合剂对海州香薷的蓄铜能力和对铜耐性的影响鲜见报道. 本

文研究了 EDTA、DTPA 对 Cu^{2+} 胁迫下海州香薷的生长状况、蓄铜性能、根系活力、叶绿素含量、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 活性的影响, 以检验 Cu^{2+} -螯合剂的毒性. 阐明这些问题可为进一步研究和利用铜超量积累植物海州香薷提供依据.

1 材料与方法

1.1 植物培养及处理

海州香薷 (*Elsholtzia splendens*) 采用土培方式培养, 所用土壤采自武汉大学珞珈山, 风干, 过 2 mm 筛. 土壤基本性质为: 棕壤, pH = 5.8, 有机质含量 = 3.07%, CEC = 31.6

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29877021); 湖北省自然科学基金资助项目 (99J095)

作者简介: 李锋民 (1975~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物学.

收稿日期: 2003-02-19; 修订日期: 2003-04-03

cmol/kg,铜含量为 $7.6 \pm 0.1 \text{ mg/kg}$.种子用甲醛消毒后播种(土培,每碗中土壤为 200g),培养 1 个月后间苗,使每个碗中植物为 8 棵且长势均匀.培养 3d 和 7d 时测定叶绿素含量、根系活力、SOD、POD 活性.其余的栽培染铜继续培养.14d 后测定生物量和铜含量.铜浓度设为 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mmol/kg. EDTA 与 DTPA 都设 0.5 mmol/kg(干土)和 4.0 mmol/kg(干土) 2 个浓度.每天浇蒸馏水,每 3 天用 Hoagland 完全培养液施肥一次.每个处理 3 个重复.

1.2 分析项目与分析方法

(1)植物生物量 将地上部与地下部分离,经 80℃ 72h 烘干分别测定每株苗重(W_S)和根重(W_R)及总重(W_T).

(2)叶绿素含量 比色法测定叶绿素含量^[7].

(3)铜含量 WF-5 单光束原子吸收分光光度计测定铜含量^[7].

(4)根系活力的测定^[7] α -萘胺氧化法测定根系活力,以每 g 根系 1h 氧化的 α -萘胺量($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)表示.

(5)过氧化物酶活性的测定^[8] Evans 改进的方法测定 POD 活性,以每 min 光密度变化值表示酶活性大小,即以 $\Delta D_{470}/\text{min}\cdot\text{g}$ 表示.

(6)超氧化物歧化酶活性测定^[9] Giannopolities 的方法测定 SOD 活性,以 $\Delta A/\text{g}\cdot\text{min}$ 表示酶活力.

2 结果与分析

2.1 EDTA、DTPA 对 Cu^{2+} 胁迫下海州香薷生物量的影响

2 种螯合剂本身都具有一定的毒性,能抑制植物的生长,DTPA 的毒性较大.螯合剂与 Cu^{2+} 共同作用于海州香薷能抑制其生长(见图 1).由于螯合剂的存在,使得低浓度 Cu^{2+} 对海州香薷的刺激效应消失,但此时的生物量高于只有螯合剂作用的植株,可以认为是 Cu^{2+} 的存在缓解了螯合剂的毒性,这种缓解作用对 EDTA 更有效些.尤其是 DTPA 为 4 mmol/kg 的与未加螯合剂处理组的根重有极显著差异($p <$

0.1).

2.2 螯合剂对海州香薷蓄铜能力的影响

由图 2 可以看出,EDTA 的存在使海州香薷内 Cu^{2+} 含量升高,海州香薷地上部蓄铜所占比例,未施 EDTA 的处理为 40%~50%,EDTA 处理组为 80%左右.说明 EDTA 促进了 Cu^{2+} 从植物地下部向地上部的运输,而 DTPA 则明显抑制了植物对 Cu^{2+} 的吸收,并且也阻碍了铜由地下部向地上部转移.尤其是 4 mmol/L 的 DTPA 处理组与不加螯合剂的地上部分铜含量具有显著差异($p < 0.5$)

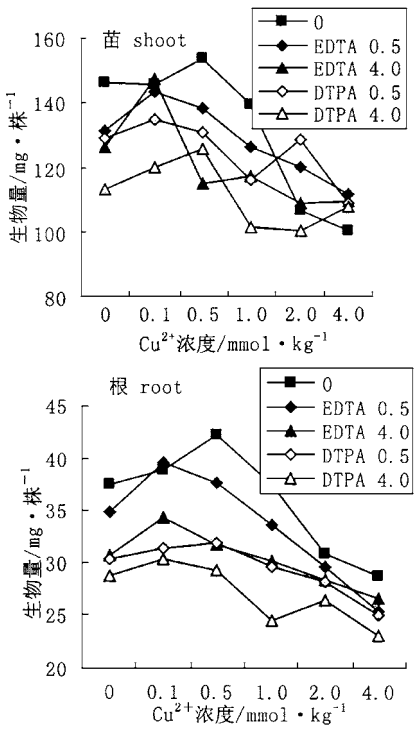


图 1 螯合剂对 Cu^{2+} 胁迫下海州香薷生物量的影响

Fig.1 Effect of chelating agents on biomass of copper stressed *Elsholtzia splendens*

2.3 螯合剂对 Cu^{2+} 胁迫下根系活力的影响

由图 3 看出,随着铜浓度的增加,根系活力下降.2 种螯合剂都降低了海州香薷的根系活力,低浓度(0.1, 0.5 mmol/kg)的铜减轻了 EDTA 对根系活力的抑制作用,却不能使 DTPA 的抑制作用减轻.与 Cu^{2+} 作用时 EDTA 处理组的根系活力变化较大,这可能是由于 EDTA 促进 Cu^{2+} 的吸收,而海州香薷对低浓度的 Cu^{2+} 有一

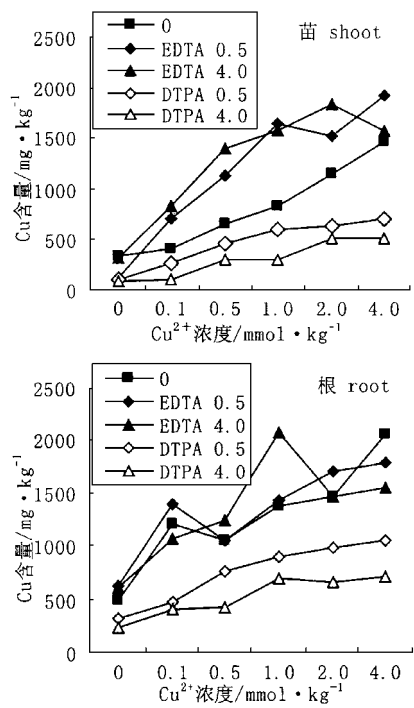


图 2 螯合剂对海州香薷蓄铜浓度的影响
Fig.2 Effect of chelating agents on copper bioaccumulation of *Elsholtzia splendens*

定的需要.因此,最高根系活力出现在 0.1 ml·kg⁻¹ 的处理.DTPA 抑制了 Cu²⁺ 的吸收,因而使 Cu²⁺ 的刺激作用消失.而 DTPA 毒性较大,使得 DTPA 处理组的根系活力都较低.

表 1 螯合剂对 Cu²⁺ 胁迫下海州香薷叶绿素含量的影响/ mg·g⁻¹

Table 1 Effect of chelating agents on chlorophyll content of copper stressed <i>Elsholtzia splendens</i> / mg•g ⁻¹							
螯合剂/ m mol•kg ⁻¹	叶绿素	Cu ²⁺ 浓度/ m mol•kg ⁻¹					
		0	0.1	0.5	1	2	4
0	Chla	1.56	1.6	1.71	1.52	1.41	1.33
	Chlb	0.59	0.62	0.55	0.47	0.44	0.48
EDTA 0.5	Chla	1.31	1.43	1.29	1.13	1.08	1.11
	Chlb	0.41	0.44	0.38	0.39	0.40	0.37
EDTA 4.0	Chla	1.23	1.2	1.31	1.08	1.13	0.98
	Chlb	0.37	0.38	0.36	0.31	0.35	0.37
DTPA 0.5	Chla	1.15	1.08	1.11	1.00	0.89	0.91
	Chlb	0.39	0.43	0.39	0.38	0.41	0.36
DTPA 4.0	Chla	1.01	0.98	0.93	0.89	0.84	0.90
	Chlb	0.37	0.36	0.42	0.43	0.41	0.38

2.5 螯合剂对 Cu²⁺ 胁迫下海州香薷过氧化物酶活性的影响

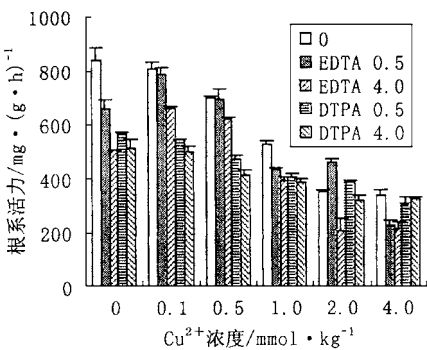


图 3 螯合剂对 Cu²⁺ 胁迫下海州香薷根系活力的影响
Fig.3 Effect of chelating agents on root activity of copper stressed *Elsholtzia splendens*

2.4 螯合剂对 Cu²⁺ 胁迫下海州香薷叶绿素含量的影响

螯合剂能降低海州香薷的生物量,主要原因之一是破坏了叶绿素或抑制了叶绿素的合成.从表 1 中可以看出,2 种螯合剂都降低了叶绿素的含量.并且二者对叶绿素 a、b 都有抑制.从 a/b 值来看,EDTA 对 a/b 影响不大,说明其对叶绿素 a、b 的破坏是同步的;而 DTPA 处理组的 a/b 值明显低于对照组的值,说明其对叶绿素 a 的破坏更强些.在 EDTA 处理组,随着 Cu²⁺ 浓度的增加,叶绿素含量下降明显.而 DTPA 处理组则下降不多,这与 DTPA 抑制了海州香薷吸收 Cu²⁺ 有关.

图 4 示出螯合剂 EDTA 和 DTPA 对海州香薷在 Cu²⁺ 胁迫下地上部和地下部 POD 活性的

变化.与对照组相比,只加入 EDTA 或 DTPA 都能引起 POD 活性的增大.随着 Cu^{2+} 浓度增大,POD 活性先增大后减小.2 种螯合剂相比,EDTA 对 POD 的影响较小,DTPA 使 POD 活性变化较大,说明 DTPA 较大的毒性使之对 POD 的变化起主导作用,从而降低了 Cu^{2+} 贡献.

2.6 螯合剂对 Cu^{2+} 胁迫下海州香薷 SOD 活性的影响

在螯合剂作用下,SOD 的变化趋势是随 Cu^{2+} 浓度的增加先升高后降低(图 5). Cu^{2+} 浓度为 0 时,螯合剂使 SOD 活性升高,说明 EDTA 和 DTPA 都能引起植物体内氧化胁迫的产生.比较 2 种螯合剂可发现,EDTA 作用下,SOD 的最大值高于 DTPA 作用下的最大值.DTPA 作用时 SOD 曲线变化较 EDTA 平缓.SOD 活性最大值出现在 Cu^{2+} 为 0.5 mmol/kg 的处理组中.

最主要机制.在一定浓度范围内, Cu^{2+} 的施入诱导 EDTA 和 DTPA 的产生,使其活性升高^[10-12].EDTA 和 DTPA 对 Cu^{2+} 胁迫下植物抗氧化体系的影响的研究不多见,国内有人对 EDTA 对汞胁迫下 SOD、POD 活性影响有初步研究^[13],认为 EDTA 能减轻汞对植物的毒害作用,使 SOD、POD 活性变化得以恢复.本文的结果显示,EDTA 和 DTPA 都可引起植物 SOD、POD 活性上升.在与 Cu^{2+} 共同作用下,EDTA 对 Cu^{2+} 毒性影响较小,表现在 SOD、POD 活性仍与 Cu^{2+} 独立作用下变化规律相同,且数值上变化不大;而 DTPA 则减小了 SOD、POD 活性的变化幅度,说明 DTPA 螯合后, Cu^{2+} 对海州香薷毒性降低.

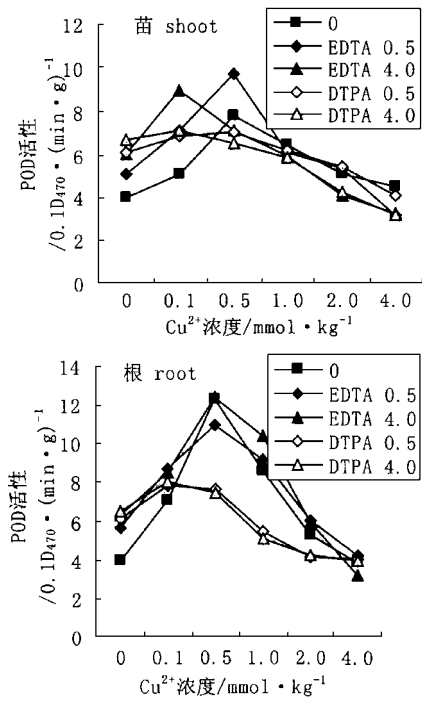


图 4 螯合剂对 Cu^{2+} 胁迫下海州香薷 POD 活性的影响

Fig.4 Effect of chelating agents on POD of copper stressed *Elsholtzia splendens*

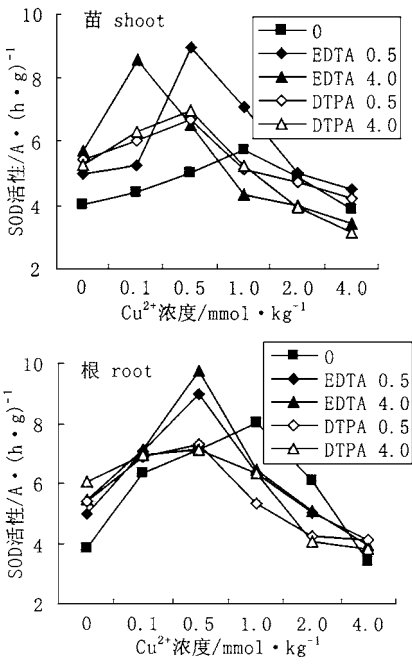


图 5 螯合剂对 Cu^{2+} 胁迫下海州香薷 SOD 活性的影响

Fig.5 Effect of chelating agents on SOD of copper stressed *Elsholtzia splendens*

3 结论

(1) EDTA 和 DTPA 能抑制海州香薷的生长,降低植物的生物量.EDTA 的施入使海州香薷铜含量升高,并促进铜向地上部分转移.而 DTPA 抑制了海州香薷对铜的蓄积.

(2) EDTA 缓解了铜对植物根系活力的抑

一般认为植物吸收过量的金属等有害物质时,体内会产生过量自由基,导致植物组织衰老.SOD 和 POD 是植物体内清除这些自由基的

制, DTPA 减小了铜对叶绿素的破坏.

(3) EDTA 和 DTPA 诱导 SOD 和 POD 的生成, 提高了 2 种酶的活性, 从而缓解铜对植物的毒性. EDTA 可以作为海州香薷修复铜污染土壤的助剂.

参考文献:

1 姜理英, 石伟勇, 杨肖娥等. 铜矿区超量积累 Cu 植物的研究. 应用生态学报, 2002, 13(7): 906 ~ 908 .

2 Webb M J, Norvell W A, Welch R M et al. Using a chelate-buffered nutrient solution to establish the critical solution activity of Mn^{2+} required by barley (*Hordeum vulgare* L). Plant and Soil, 1993, 1535: 195 ~ 205 .

3 Blaylock M J, Salt D E, Dushenkov B et al. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Environmental Science and Technology, 1997, 31: 860 ~ 865 .

4 张毅敏, 金洪钧. EDTA 对 Cu 在水生微宇宙中的毒性和分布的影响. 应用生态学报, 1999, 10(4): 485 ~ 488 .

5 沈振国, 刘友良, 陈怀满. 螯合剂对重金属超量积累植物 *Thlaspi caerulescens* 的锌、铜、锰和铁吸收的影响. 植物生理学报, 1998, 24(4): 340 ~ 346 .

6 Sun B, Zhao F J, Lombi E et al. Leaching of heavy metals

from contaminated soils using EDTA. Environmental Pollution, 2001, 113: 111 ~ 120 .

7 华东师范大学生物系植物生理教研组主编. 植物生理学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1981. 68 ~ 70 .

8 Evans S S. The distribution of peroxidase in extreme dwarf and normal tomato. Phytochemistry, 1965, 4: 449 ~ 503 .

9 Giannoplities C N, Ries S K. Superoxid dismutase purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedling. Plant Physiology, 1977, 59: 315 ~ 318 .

10 Gardner R, Vandro A S, Moradas-Ferreira P. Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? A minimalist explanation. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 32(12): 1351 ~ 1357 .

11 Fang W C, Kao C H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. Plant Science, 2000, 158: 71 ~ 76 .

12 Chen E L, Chen Y A, Chen L M et al. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. Plant Physiol. Biochem., 2002, 40: 439 ~ 444 .

13 李清芬, 马成仓. EDTA 对汞毒害下玉米幼苗细胞膜损伤及体内保护系统变化的缓解作用. 农业环境保护, 1997, 16(4): 165 ~ 167 .