

张 军, 王文科, 耿雅妮, 等. 黑麦草抗氧化酶对 Cd、Zn 和 Pb 复合污染的响应[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(6): 1117-1124.  
ZHANG Jun, WANG Wen-ke, GENG Ya-ni, et al. The response to the combined pollution of cadmium, zinc, and lead by the antioxidant enzyme activity of *Lolium perenne* L.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(6): 1117-1124.

## 黑麦草抗氧化酶对 Cd、Zn 和 Pb 复合污染的响应

张 军<sup>1,2</sup>, 王文科<sup>1</sup>, 耿雅妮<sup>2</sup>, 任雪盈<sup>2</sup>, 王周锋<sup>1</sup>, 曹书苗<sup>1</sup>

(1. 长安大学旱区地下水文与生态效应教育部重点实验室, 西安 710064; 2. 宝鸡文理学院陕西省灾害监测与机理模拟重点实验室, 陕西 宝鸡 721013)

**摘 要:**为研究植物抗氧化酶活性与重金属复合污染之间的关系,通过土培正交实验考察重金属 Cd(0、10、20、30、40、50 mg·kg<sup>-1</sup>)、Zn(0、150、250、350、450、550 mg·kg<sup>-1</sup>)、Pb(0、100、300、500、700、900 mg·kg<sup>-1</sup>) 复合污染在不同胁迫时间(14、21、28、35 d) 对黑麦草过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD) 和超氧化物歧化酶(SOD) 活性的影响。结果表明,Cd 对 CAT 和 POD 起激活作用,对 SOD 起抑制作用;Zn 和 Pb 对 CAT 和 POD 起抑制作用,对 SOD 起激活作用。在重金属复合污染胁迫下,POD 和 SOD 活性随着培养时间的延长而显著增加,在 28 d 和 35 d 时达到最大,分别为对照的 260%和 637.4%。考虑交互作用,SOD 活性对 Cd×Zn、Cd×Pb、Zn×Pb 有显著响应( $P<0.05$ )。3 种抗氧化酶中,SOD 活性对重金属污染反应最敏感,可以作为表征重金属污染的指示指标。

**关键词:** 重金属; 正交实验; 抗氧化酶; 黑麦草

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)06-1117-08 doi:10.11654/jaes.2017-1506

### The response to the combined pollution of cadmium, zinc, and lead by the antioxidant enzyme activity of *Lolium perenne* L.

ZHANG Jun<sup>1,2</sup>, WANG Wen-ke<sup>1</sup>, GENG Ya-ni<sup>2</sup>, REN Xue-ying<sup>2</sup>, WANG Zhou-feng<sup>1</sup>, CAO Shu-miao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Subsurface Hydrology and Ecological Effect in Arid Region of Ministry of Education, Chang'an University, Xi'an 710054, China; 2. Shaanxi Key Laboratory of Disaster Monitoring and Mechanism Simulation, Baoji University of Arts and Sciences, Baoji 721013, China)

**Abstract:** To study the relationship between plant antioxidant enzyme activity and combination heavy metal pollution, the effects of combination pollution by heavy metals Cd(0, 10, 20, 30, 40, 50 mg·kg<sup>-1</sup>), Zn(0, 150, 250, 350, 450, 550 mg·kg<sup>-1</sup>), and Pb(0, 100, 300, 500, 700, 900 mg·kg<sup>-1</sup>) on the activity of the enzymes catalase(CAT), peroxidase(POD), and superoxide dismutase(SOD) were investigated for different periods of stress(14, 21, 28, 35 d), based on orthogonal and interactive soil culture experiments. The results showed that CAT and POD were activated by Cd, whereas SOD was inhibited. CAT and POD were inhibited by Zn and Pb, whereas SOD was activated. Under the contamination stress of a combination of heavy metals, POD and SOD activities significantly increased with incubation time. In addition, at 28 and 35 d, POD and SOD activities were respectively 260% and 637.4% of those of the control. SOD activity significantly responded to the interactive effects of Cd×Zn, Cd×Pb, and Zn×Pb( $P<0.05$ ) and insignificantly responded to CAT and POD activities. The response of SOD activity was more sensitive than that of the other two antioxidant enzymes. Therefore, SOD activity can be used as an indicative index in the evaluation of the heavy metal contamination of soil.

**Keywords:** heavy metals; orthogonal experiment; antioxidant enzyme; *Lolium perenne* L.

收稿日期: 2017-10-31 录用日期: 2018-01-26

作者简介: 张 军(1974—),男,陕西宝鸡人,博士研究生,副教授,研究方向为水土污染与生态修复。E-mail: zhangjun1190@126.com

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41230314); 旱区地下水文与生态效应教育部重点实验室项目(310829151140, 310829151141)

Project supported: The Key Program of National Natural Science Foundation of China(41230314); The Open Fund of Key Laboratory of Subsurface Hydrology and Ecological Effects in Arid Region, Ministry of Education, China(310829151140, 310829151141)

土壤重金属污染,尤其重金属复合污染,具有影响范围广,持续时间长,隐蔽性强,不易被发现且不可逆的特点<sup>[1]</sup>。植物修复作为清洁、有效的土壤污染修复方法,被广泛应用,但是重金属也会对植物本身造成毒害<sup>[2]</sup>,导致植物枯萎甚至死亡。植物可以通过自身解毒机制特别是抗氧化酶系统来减轻这种危害,对于具有一定重金属富集能力的植物,例如龙葵、东南景天等植物对重金属表现出很强的耐性和抗性<sup>[3-5]</sup>。国内外研究表明,植物抗氧化酶系统可以清除重金属产生的活性氧自由基,其中最主要的抗氧化酶是过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)<sup>[6]</sup>,3种抗氧化酶随着重金属种类<sup>[7-8]</sup>、浓度<sup>[9]</sup>和植物类型不同<sup>[10]</sup>,分别表现为激活或抑制作用。在一定重金属胁迫水平下 SOD 活性和细胞内的活性氧自由基水平呈正相关,POD 活性与植物体内重金属浓度呈正相关<sup>[11]</sup>。

黑麦草(*Lolium perenne* L.)是我国北方常见的优质草坪草,种植方便,有很强的再生能力,不仅对多种重金属有很好的富集能力,而且对重金属胁迫有很强的耐性和抗性<sup>[12-13]</sup>。研究表明,黑麦草抗氧化性酶对土壤重金属污染都有明显响应,单一重金属污染可以激发 CAT、SOD、POD 活性,重金属复合污染对酶活性增加具有协同作用<sup>[14-15]</sup>。其中,Cd 对黑麦草 SOD、POD 活性都有激活作用,呈现出先增加后降低的趋势<sup>[6]</sup>,Pb 在低浓度、短时间内可以使黑麦草 SOD 活性明显升高,但 POD 活性随着 Pb 浓度升高随之降低<sup>[17]</sup>。以前的研究多集中在单一重金属或两两复合重金属污染上,对多种重金属复合污染植物抗性酶响应机制研究较少,因此可以探索利用黑麦草抗氧化酶对重金属污染的响应特征,筛选敏感性指示指标来预报土壤重金属污染程度<sup>[18]</sup>。

鉴于重金属复合污染在环境中普遍存在,许多环境效应都无法采用单一污染物机理来解释,因此本研究选择土壤中污染严重的 Cd、Zn 和 Pb 作为污染来源,采用复合和交互正交实验方法,以黑麦草为实验生物,研究重金属复合污染对黑麦草抗氧化酶活性的影响,以期能为土壤重金属污染植物修复和污染识别提供理论依据。

表 1 实验土壤理化性质

Table 1 The physical-chemical properties of the experimental soil

土壤类型	TN/g·kg <sup>-1</sup>	TP/g·kg <sup>-1</sup>	OM/%	pH	CEC/cmole·kg <sup>-1</sup>	质地/%			本底值/mg·kg <sup>-1</sup>		
						砂粒	粉粒	粘粒	Cd	Pb	Zn
黄土	1.78	2.53	3.15	8.31	8.90	25.63	66.0	7.27	0.62	12.2	54.1

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品

土壤采自陕北延安镰刀湾地区黄土,采用多点布设方法采取 0~20 cm 表层黄土,装入密封袋中带回实验室风干,去除碎石、植物残根等。然后过 20 目筛,存放待用。按土壤农化的常规分析法<sup>[19]</sup>测得土壤的理化性质见表 1。土壤中重金属含量采用微波消解-ICP-MS (NexION 350X, PE, 美国)测定;称取土壤样品 0.150 0 g,采用 HNO<sub>3</sub>-HCl-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 微波(MDS-10, 上海新仪)法消解,同时制作空白,并用标准液进行校正,同时采用国家标准土样(GSS-8)进行质量控制,回收率为 97%~103%,RSD≤5%。所有酸均为优级纯,水为超纯水(>18.2 MΩ)。

### 1.2 实验设计

选取 3 种植物抗氧化酶 CAT、POD、SOD 为指示指标,Cd、Zn、Pb 的量和培养时间作为实验因素,设计正交实验因素和水平表(如表 2)。Cd、Zn、Pb 和时间复合作用实验采用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)复合正交表,3 种重金属交互作用实验采用 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>)交互正交表。重金属指标水平设计参照土壤环境质量标准(GB 15618—2008)和相关文献确定<sup>[14, 16-17]</sup>,Cd、Zn、Pb 分别以 CdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O、Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 和 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 配制水溶液的形式加入到土壤中,充分搅拌,平衡 3 周后待用,每处理 3 个重复。

黑麦草种子先用 1%酒精消毒 2 min,再用去离子水清洗,然后浇湿放入光照生化培养箱(PGX-450L, 宁波赛福),在光照充足恒温处发芽。待 7 d 发芽后移

表 2 正交实验设计

Table 2 Design of orthogonal experiment

级别	Cd/mg·kg <sup>-1</sup>	Zn/mg·kg <sup>-1</sup>	Pb/mg·kg <sup>-1</sup>	培养时间/d
L <sub>16</sub> (4 <sup>5</sup> )水平 1	0	0	0	14
L <sub>16</sub> (4 <sup>5</sup> )水平 2	10	150	100	21
L <sub>16</sub> (4 <sup>5</sup> )水平 3	30	350	500	28
L <sub>16</sub> (4 <sup>5</sup> )水平 4	50	550	900	35
L <sub>8</sub> (2 <sup>7</sup> )水平 1	20	250	300	
L <sub>8</sub> (2 <sup>7</sup> )水平 2	40	450	700	

植到花盆中,每盆保留幼苗 30 株,每日早晚浇水,保证含水率为田间含水率的 60%。1 周后施入少量 N、P 肥,植物发育吸收后每 7 d 对植物叶片进行采样,在植物生长期 35 d 内共采样 4 次,按照 1.3 测试方法测试样品。

### 1.3 测试指标与方法

称取 1.0 g 左右新鲜叶片测定抗氧化酶(SOD、POD、CAT)指标:参照 Marklund 等<sup>[20]</sup>测定方法,将叶片放入冷冻钵体中,加入磷酸溶液,在冰浴下研磨成浆,冷冻离心后取酶上清提取液,由抑制剂氮蓝四唑(NBT)在光下还原作用来确定 SOD 活性,一个酶活性单位由 NBT 光还原 50%来表示;参照 Polle 等<sup>[21]</sup>测定方法,用愈创木酚比色法测定 POD 活性,以 1 min 内 470 nm 吸光度变化 0.01 单位来表示酶活性;测量酶上清液 240 nm 下吸光率的变化速度来反映过氧化氢分解,以 1 min 内减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位,用紫外分光光度法(DR6000, HACH, 日本)测定 CAT 活性<sup>[22]</sup>。

### 1.4 数据处理

采用 Excel 2007 进行数据处理,采用 SPSS v22.0 进行正交实验方差和差异显著性分析(Duncan,  $P < 0.05$ ),采用 Origin8.5 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cd、Zn、Pb 复合作用对黑麦草抗氧化酶活性的影响

由表 3 可知,在表中 16 组实验数据中,T6 组的 CAT 活性值最大,T3 组的 POD 活性值最大,T4 组的 SOD 活性值最大。由极差分析可知,各实验因素对 CAT 影响顺序依次为培养时间>Cd>Zn>Pb;对 POD 影响顺序依次为培养时间>Pb>Zn>Cd;对 SOD 影响顺序依次为培养时间>Pb>Zn>Cd;由此可见,培养时间对植物 3 种抗氧化酶都是主要影响因素,重金属 Cd 对 CAT 活性有较大影响,Pb 对 POD、SOD 活性有较大影响。

表 4 中的复合作用方差分析结果显示,3 种氧化酶活性对 Cd、Zn、Pb 均无显著响应( $P > 0.05$ )。培养时间对 CAT 活性有较显著影响( $P < 0.1$ ),对 POD 活性和 SOD 活性有显著影响( $P < 0.05$ )。同时,结合表 3 可以得出,CAT 对 Cd、Zn 的方差和较大,对 Cd、Zn 浓度响应较敏感,当 Cd 为  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,Zn 为  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的较小浓度时,CAT 活性值达到最大  $3\ 731.4 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,表明低浓度的 Cd、Zn 对 CAT 活性具有激活作用;POD、SOD 对 Pb 的方差和较大,表明 POD、SOD 对 Pb 较敏感,当 Pb 为  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,POD 活性值达到

表 3  $L_{16}(4^5)$ 复合正交实验结果

Table 3 Results of combined orthogonal experiment,  $L_{16}(4^5)$

处理编号	实验因素				植物酶活性/ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$		
	Cd	Zn	Pb	培养时间	CAT	POD	SOD
T1	0	0	0	14	344.3±21.1	837.5±28.2	68.9±1.7
T2	0	150	100	21	538.0±2.9	595.8±22.5	262.6±42.0
T3	0	350	500	28	1 046.9±14.2	2 757.6±103.3	319.7±16.7
T4	0	550	900	35	728.4±31.0	145.1±25.7	1 577.8±0.0
T5	10	0	100	28	1 283.0±13.1	2 473.6±21.1	299.8±19.2
T6	10	150	0	35	3 731.4±83.0	931.9±11.5	982.0±61.1
T7	10	350	900	14	375.7±8.0	1 047.0±43.1	225.5±78.2
T8	10	550	500	21	581.6±9.8	427.1±6.7	232.0±56.1
T9	30	0	900	35	2 302.5±18.5	1 593.1±134.4	682.9±158.3
T10	30	150	500	28	1 573.4±6.5	2 468.1±95.9	918.0±49.7
T11	30	350	0	21	523.4±12.5	349.8±72.0	353.5±39.5
T12	30	550	100	14	456.7±2.9	1 104.4±14.0	132.2±23.1
T13	50	0	900	21	613.5±16.3	501.4±14.2	142.3±25.9
T14	50	150	500	14	425.0±2.9	949.1±8.1	120.1±41.6
T15	50	350	100	35	2 398.9±89.1	1 992.4±49.2	243.1±10.5
T16	50	550	0	28	1 475.9±37.5	2 551.4±172.9	518.4±98.3

注:数值是平均值与 3 次重复的标准偏差,下同。

Note: Values are given as mean ± SD from triplicate determinations. The same below.

最大 2 757.6 U·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> FW, 当 Pb 为 900 mg·kg<sup>-1</sup>, SOD 活性值达到最大 1 577.8 U·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> FW, 表明中浓度的 Pb 对 POD 活性具有激活作用, 高浓度的 Pb 对 SOD 活性具有激活作用。

2.2 Cd、Zn、Pb 的交互作用对黑麦草抗氧化酶活性的影响

如表 5 可知, 在交互正交实验 8 组数据中, S3 的 CAT 活性值最大, S8 的 POD 活性值最大, S4 的 SOD 活性值最大。由极差分析可知, 各实验因素对 CAT 影响顺序依次为 Zn×Pb>Cd×Zn>Pb>Cd×Pb>Zn>Cd; 对 POD 影响顺序依次为 Zn>Pb>Cd×Pb>Cd×Zn>Cd>Zn×Pb; 对 SOD 影响顺序依次为 Cd×Zn>Zn×Pb>Pb>Cd×Pb>Cd>Zn。

由表 6 中方差分析结果可知, Cd、Zn、Cd×Zn、Pb、Cd×Pb、Zn×Pb 这些因素都对 SOD 活性有显著影响 (P<0.05), 对 CAT 活性和 POD 活性无显著影响。

2.3 Cd、Pb 和 Zn 主效应对黑麦草抗氧化酶活性的影响

重金属浓度对抗氧化酶活性影响如图 1A~图 1C 所示, 不同培养时间对抗氧化酶活性影响如图 1D 所示。图 1A 表明, CAT 活性在 Cd 不同浓度水平均与对照有显著差异 (P<0.05), 在 Cd 浓度为 10 mg·kg<sup>-1</sup> 时酶活性最高, 为对照的 225%, 后随 Cd 浓度增加酶活

性逐渐降低趋于平稳。POD 活性在 Cd 浓度为 30、50 mg·kg<sup>-1</sup> 时与对照有显著差异 (P<0.05), 分别为对照的 127%和 138%。SOD 活性在 Cd 不同浓度下均比对照值低, 在 Cd 浓度为 10、50 mg·kg<sup>-1</sup> 时明显小于对照 (P<0.05), 分别为对照的 78%和 56%。说明随着 Cd 浓度增加, CAT、POD 活性逐渐升高, 起激活作用, SOD 活性总体呈降低趋势, 有明显的抑制作用。

图 1B 表明, Zn 浓度在 150 mg·kg<sup>-1</sup> 时 CAT 活性最高, 为对照的 138%, 在 550 mg·kg<sup>-1</sup> 时为最低, 是对照的 71%。POD 活性在 Zn 浓度 350 mg·kg<sup>-1</sup> 时最高,

表 6 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>)交互作用正交实验方差分析

Table 6 ANOVA for interaction orthogonal experiment, L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>)

变异来源	自由度	方差和			显著性		
		CAT	POD	SOD	CAT	POD	SOD
Cd	1	211	65	1859			P<0.05
Zn	1	396	27 627	1251			P<0.05
Cd×Zn	1	2895	5128	40 569			P<0.05
Pb	1	803	13 411	7036			P<0.05
Cd×Pb	1	519	8997	5547			P<0.05
Zn×Pb	1	5493	35	10 217			P<0.05
误差	1	619	3179	3			
总计	7						

表 4 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)复合作用正交实验方差分析

Table 4 ANOVA for combined orthogonal experiment, L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)

变异来源	自由度	方差和			显著性		
		CAT	POD	SOD	CAT	POD	SOD
Cd	3	1 454 690	394 432	217 169			
Zn	3	1 173 154	486 763	366 550			
Pb	3	988 611	642 074	521 122			
培养时间	3	8 973 160	9 612 908	1 282 345	P<0.1	P<0.05	P<0.05
误差	3	1 086 661	568 196	119 178			
总计	15						

表 5 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>)交互作用实验结果

Table 5 Results of interaction orthogonal experiment, L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>)

处理编号	实验因素						植物酶活性/U·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> FW		
	Cd	Zn	Cd×Zn	Pb	Cd×Pb	Zn×Pb	CAT	POD	SOD
S1	1	1	1	1	1	1	416.1±8.1	753.9±21.3	126.7±51.2
S2	1	1	1	2	2	2	482.2±10.6	804.4±6.8	168.5±18.5
S3	1	2	2	1	1	2	538.2±16.3	856.5±5.6	173.9±19.0
S4	1	2	2	2	2	1	464.3±3.3	835.7±28.1	356.1±83.8
S5	2	1	2	1	2	1	477.6±2.5	670.4±10.2	353.5±39.5
S6	2	1	2	2	1	2	476.2±6.4	775.2±15.3	287.5±25.8
S7	2	2	1	1	2	2	488.4±11.4	794.4±20.5	113.4±11.3
S8	2	2	1	2	1	1	417.5±16.1	987.5±10.0	192.8±15.4

为对照的114%,550 mg·kg<sup>-1</sup>时最低,为对照的78%。SOD活性在Zn浓度150、550 mg·kg<sup>-1</sup>时与对照有显著差异( $P<0.05$ ),分别为对照的191%和206%。说明随着Zn浓度的增加,总体来看,对CAT、POD活性为先升高后降低,起抑制作用,对SOD先升高然后降低再升高,起激活作用。

图1C表明,CAT活性在Pb浓度为100、500、900 mg·kg<sup>-1</sup>时与对照有显著差异( $P<0.05$ ),分别为对照的77%、72%和54%。POD活性在Pb浓度为100、500 mg·kg<sup>-1</sup>时与对照有显著差异( $P<0.05$ ),分别为对照的132%和123%。SOD活性在Pb浓度为100、500、900 mg·kg<sup>-1</sup>时与对照有显著差异( $P<0.05$ ),分别为对照的49%、70%和149%。说明CAT活性随Pb浓度升高逐渐降低,起抑制作用,POD活性在低浓度升高,高浓度降低,为先促后抑作用;SOD活性先降低后升高,在高浓度下表现为激活作用。

图1D表明,从14 d到35 d,CAT和SOD活性随着时间增长,酶活性一直在升高,起激活作用,CAT和

SOD活性在35 d时达到最高,分别为对照的527.5%和637.4%。对POD活性来说,在第21 d时酶活性下降。在第28 d时酶活性明显升高,达到对照的260%,第35 d时酶活性又下降,POD活性随时间的变化先低后高,随着时间上下波动并逐渐平稳。

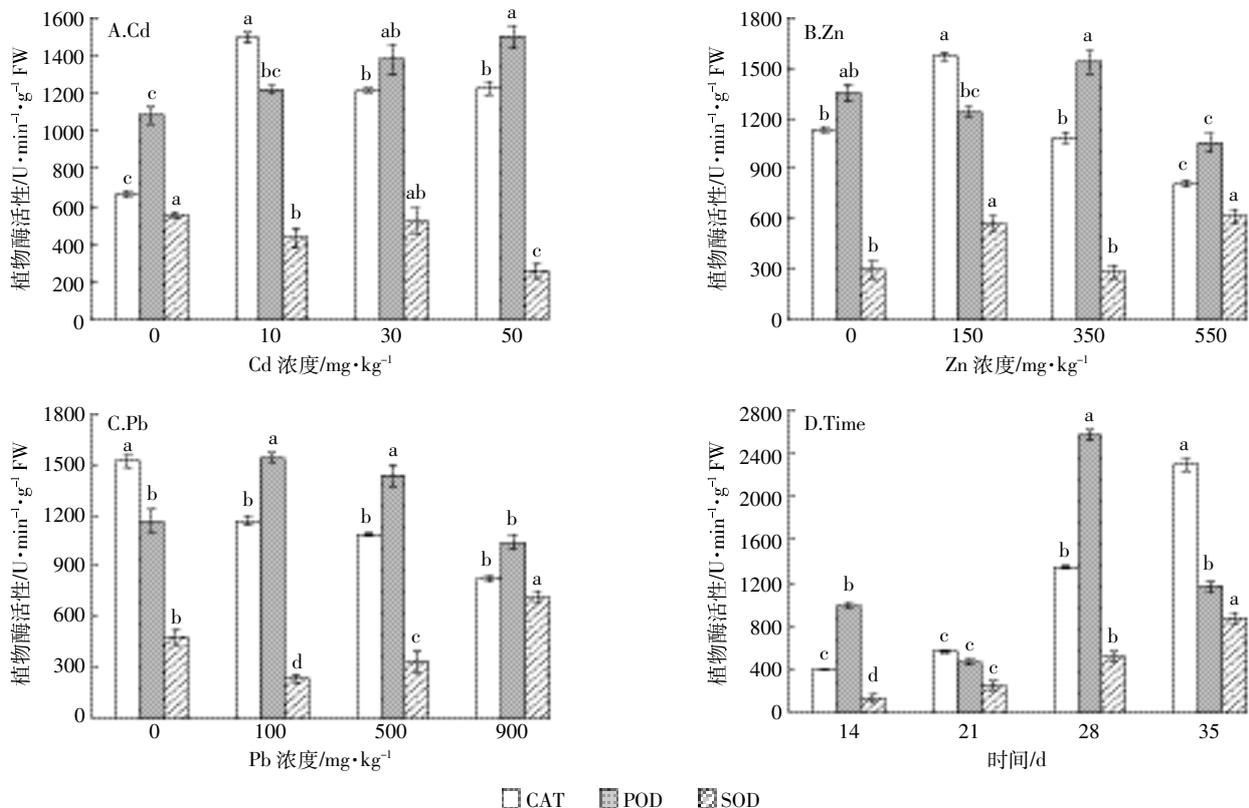
3种抗氧化酶和重金属浓度之间的多元回归方程如式(1)~式(3)所示。从式(1)~式(3)可得,Cd对CAT、POD、SOD活性的回归系数分别为141.2、140.2、-81.7,Cd表现为对CAT、POD活性的激活作用,对SOD活性的抑制作用。同理,Zn、Pb表现为对CAT、POD活性的抑制作用,对SOD活性的激活作用。多元回归方程的分析结果与以上方差分析结果相符。

$$Y_{\text{CAT}}=90.2+141.2c_{\text{Cd}^{2+}}-145.6c_{\text{Zn}^{2+}}-216.8c_{\text{Pb}^{2+}}+645.0t \quad (1)$$

$$Y_{\text{POD}}=553.8+140.2c_{\text{Cd}^{2+}}-58.2c_{\text{Zn}^{2+}}-49.1c_{\text{Pb}^{2+}}+263.7t \quad (2)$$

$$Y_{\text{SOD}}=-339.6-81.7c_{\text{Cd}^{2+}}+66.4c_{\text{Zn}^{2+}}+80.9c_{\text{Pb}^{2+}}+247.0t \quad (3)$$

式中: $Y_{\text{CAT}}$ 、 $Y_{\text{POD}}$ 、 $Y_{\text{SOD}}$ 分别代表CAT、POD、SOD3种植物抗氧化酶值。



不同小写字母表示各处理水平之间在 $P<0.05$ 水平差异显著

Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the  $P<0.05$  level

图1 不同Cd、Pb、Zn浓度及时间对黑麦草3种抗氧化酶活性的影响

Figure 1 Effect of different cadmium, zinc, lead and time on three antioxidant enzyme activities in ryegrass

### 3 讨论

重金属污染对植物抗氧化酶的影响已经有所报道<sup>[23-27]</sup>。CAT、POD、SOD 抗氧化酶是植物适应外部污染胁迫的保护性酶,在外部重金属胁迫下可以协同清除由其产生的活性氧基团(Reactive Oxygen Species, ROS),从而保护植物细胞不受到破坏<sup>[28-29]</sup>。在本研究中,单一变异源 Cd、Zn、Pb 对 3 种植物抗氧化酶活性影响变化不大,但 Zn 和 Pb 相比较 Cd 来说,对 POD 活性影响较显著,当 Zn 浓度为 550 mg·kg<sup>-1</sup> 时,POD 活性仅比对照下降了 21.7%,当 Pb 浓度为 900 mg·kg<sup>-1</sup> 时,POD 活性仅比对照下降了 10.9%,无显著变化,表明 POD 在去除 Zn 和 Pb 引起的自由基中起主要作用<sup>[6]</sup>,这与徐卫红等<sup>[14]</sup>、王晨等<sup>[30]</sup>的研究结果一致。本研究中,正交复合实验设计下,低浓度 Cd、Zn 对 CAT 酶活性具有较大影响,中、高浓度的 Pb 对 POD、SOD 酶活性具有较大影响,而培养时间对 3 种抗氧化酶活性具有显著影响,随着培养时间的延长,CAT 和 SOD 活性呈升高趋势,表明这 2 种抗氧化酶一直都在起着清除植物体内自由基的作用。且在长时间(28 d 和 35 d)重金属胁迫下,CAT 和 SOD 都显著高于对照( $P < 0.05$ ),表现为随时间的激活效应。在正交交互实验中,CAT 活性对 Zn×Pb、Cd×Zn 交互作用最敏感,POD 活性对 Zn、Pb 及 Zn×Pb 交互作用最敏感,SOD 活性对 Cd×Zn、Zn×Pb 交互作用最敏感,这与单一重金属胁迫下黑麦草抗氧化酶活性变化有所不同<sup>[8,16-17]</sup>,表明在复合重金属污染下,酶活性并非单一重金属影响之和,而是表现为协同或拮抗作用,激发了植物抗氧化酶长期处于较高水平,防止膜脂过氧化作用而导致细胞死亡。重金属交互明显增强了 CAT、SOD 酶活性响应,这一结果可能与黑麦草细胞解毒机制以及重金属之间的交互作用相关<sup>[31]</sup>。

植物在重金属胁迫下,可以通过多种机制和途径消除重金属产生的毒害,特别是通过抗氧化酶清除过量的 ROS,达到解毒的目的<sup>[32]</sup>。本研究交互实验的结果显示,重金属 Cd、Zn、Pb 复合污染对 SOD 活性影响最显著( $P < 0.05$ ),尤其是 Cd×Zn,其次是 Zn×Pb,Zn 的存在可以加大 Cd、Pb 对植物抗氧化酶的影响,尤其是增强 SOD 酶活性,这与董冰冰研究黑麦草得出 SOD 是重金属耐性敏感指标结果一致<sup>[33]</sup>。SOD 对 3 种重金属复合污染具有明显的响应,这可能是因为抗氧化酶 SOD 最先被激活用来去除氧化自由基 O<sub>2</sub>·,其去除产物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进一步被抗氧化系统中 CAT、POD 转

化<sup>[34]</sup>,因此黑麦草抗氧化性酶 SOD 对重金属污染敏感性大于 CAT 和 POD。

### 4 结论

(1) Cd、Zn、Pb 复合污染下,黑麦草抗氧化酶产生了不同程度的响应。Cd 表现为对 CAT、POD 活性的激活作用,对 SOD 活性的抑制作用。Zn、Pb 表现为对 CAT、POD 活性的抑制作用,对 SOD 活性的激活作用。相对于 3 种重金属来说,培养时间对 CAT、POD、SOD 活性影响显著,特别是对 POD 活性的影响最大。

(2) 在 Cd、Zn、Pb 污染胁迫下,SOD 活性对 3 种重金属及其交互作用最敏感( $P < 0.05$ ),尤其是 Cd×Zn、Zn×Pb 共同作用时,因此在黑麦草抗氧化酶中可以选取 SOD 作为重金属单独或复合污染程度的指示指标。

#### 参考文献:

- [1] 和莉莉,李冬梅,吴 钢. 我国城市土壤重金属污染研究现状和展望[J]. 土壤通报, 2008, 39(5): 1210-1216.  
HE Li-li, LI Dong-mei, WU Gang. Heavy metal contamination of urban soils in China: State and prospect[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(5): 1210-1216.
- [2] Yadav S K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants[J]. *South African Journal of Botany*, 2010, 76(2): 167-179.
- [3] 刘 萍,翟崇治,余家燕,等. Cd、Pb 复合污染下柠檬酸对龙葵修复效率及抗氧化酶的影响[J]. 环境工程学报, 2012, 6(4): 1387-1392.  
LIU Ping, ZHAI Chong-zhi, YU Jia-yan, et al. Effect of citric acid on remediation efficiency and antioxidant enzyme of *Solanum nigrum* L. under Cd and Pb combined pollution[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(4): 1387-1392.
- [4] 陆海燕,刘志辉,吕光辉. 镉污染下芦苇叶片丙二醛、脯氨酸及 SOD 保护酶反应研究[J]. 干旱区资源与环境, 2013, 27(8): 171-175.  
LU Hai-yan, LIU Zhi-hui, LÜ Guang-hui. Reaction of MDA, proline, and SOD under Cd stress in mixture of *Phragmites australis*'s stems and leaves[J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2013, 27(8): 171-175.
- [5] 吴彬艳,邵冰洁,赵惠恩,等. 11 种广义景天属植物对 Cd 的耐性和积累特性[J]. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1947-1956.  
WU Bin-yan, SHAO Bing-jie, ZHAO Hui-en, et al. Cd accumulation and tolerance characteristics of 11 species in *Sedum sensu lato*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(5): 1947-1956.
- [6] Bhaduri A M, Fulekar M H. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress[J]. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 2012, 11(1): 55-69.
- [7] 寇士伟,倪高风,马岚婷,等. Cd-Pb-Cu 复合污染对芥菜生长及生理特性的影响[J]. 环境科学研究, 2011, 24(3): 281-286.  
KOU Shi-wei, NI Gao-feng, MA Lan-ting, et al. Effects of Cd, Pb and

- Cu compound pollution on the growth and physiological characteristics of Mustard plants[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(3): 281-286.
- [8] 李文一,徐卫红,胡小凤,等. Zn 胁迫对黑麦草幼苗生长、生理生化及 Zn 吸收的影响[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(5): 190-194.  
LI Wen-yi, XU Wei-hong, HU Xiao-feng, et al. Effects of zinc stress on growth, physiological and biochemical and Zn uptake of ryegrass (*Lolium perenne* L.)[J]. *Transactions of the CSAE*, 2007, 23(5): 190-194.
- [9] Rastgoo L, Alemzadeh A. Biochemical responses of Gouan (*aeluropus Littoralis*) to heavy metals stress[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, 5(4): 375-383.
- [10] Li S, Chen J, Islam E, et al. Cadmium-induced oxidative stress, response of antioxidants and detection of intracellular cadmium in organs of Moso Bamboo (*phyllostachys Pubescens*) seedlings[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 107-114.
- [11] Sharma J, Chakraverty N. Mechanism of plant tolerance in response to heavy metals[M]. New Delhi: Molecular Stress Physiology of Plants, Springer India, 2013: 289-308.
- [12] 冉文静,傅大放. 黑麦草修复模拟重金属污染土壤的化学强化及其潜在风险[J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2011, 41(4): 793-798.  
RAN Wen-jing, FU Da-fang. Effects and risk of chemical enhancement measures to phytoremediation using *Lolium* L. for artificially polluted soil with heavy metals[J]. *Journal of Southeast University(Natural Science Edition)*, 2011, 41(4): 793-798.
- [13] 徐卫红,熊治庭,李文一,等. 4 品种黑麦草对重金属 Zn 的耐受性及 Zn 积累研究[J]. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 27(6): 785-790.  
XU Wei-hong, XIONG Zhi-ting, LI Wen-yi, et al. Tolerance and accumulation of zinc in four varieties of ryegrass[J]. *Journal of Southwest Agricultural University(Natural Science)*, 2005, 27(6): 785-790.
- [14] 徐卫红,王宏信,李文一,等. 重金属富集植物黑麦草对 Zn 的响应[J]. *水土保持学报*, 2006, 20(3): 43-46.  
XU Wei-hong, WANG Hong-xin, LI Wen-yi, et al. Growth and uptake response of hyperaccumulator ryegrass to Zn stress[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2006, 20(3): 43-46.
- [15] 徐卫红,王宏信,王正银,等. 重金属富集植物黑麦草对锌、镉复合污染的响应[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(6): 365-368.  
XU Wei-hong, WANG Hong-xin, WANG Zheng-yin, et al. Response of hyperaccumulator ryegrass (*Lolium perenne* L.) to cadmium, zinc and their combined pollution[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(6): 365-368.
- [16] 张 尧,田正贵,曹翠玲,等. 黑麦草幼苗对镉耐受能力及吸收积累和细胞分布特点研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(11): 2080-2086.  
ZHANG Yao, TIAN Zheng-gui, CAO Cui-ling, et al. Characteristics of cadmium tolerance, accumulation and cellular distribution in *Lolium perenne* seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(11): 2080-2086.
- [17] 刘慧芹,韩巨才,刘慧平,等. 铅梯度胁迫对多年生黑麦草幼苗生理生化特性影响[J]. *草业学报*, 2012, 21(6): 57-63.  
LIU Hui-qin, HAN Ju-cai, LIU Hui-ping, et al. Influence of lead gradient stress on the physiological and biochemical characteristics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) seedlings[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2012, 21(6): 57-63.
- [18] 张金彪,周碧青,雷永程,等. 植物源 POD 和 CAT 的筛选及其与重金属的相互作用 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2009, 38(3): 295-300.  
ZHANG Jin-biao, ZHOU Bi-qing, LEI Yong-cheng, et al. Screening of botanical POD and CAT and their interaction with heavy metals[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University(Natural Science Edition)*, 2009, 38(3): 295-300.
- [19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 12-24.  
LU Ru-kun. Soil agro-chemical analysis[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 12-24.
- [20] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3): 469-474.
- [21] Polle A, Otter T, Friederike S. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.)[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(1): 53-60.
- [22] Li Y, Zhang S, Jiang W, et al. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde(MDA) content in *Pistia Stratiotes* L.[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2013, 20(2): 1117-1123.
- [23] 刘柿良,杨容子,马明东,等. 土壤镉胁迫对龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 幼苗生长及生理特性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(2): 240-247.  
LIU Shi-liang, YANG Rong-jie, MA Ming-dong, et al. Effects of soil cadmium on growth and physiological characteristics of *Solanum nigrum* L. plants[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(2): 240-247.
- [24] 胡宗达,杨远祥,朱雪梅,等. Pb, Zn 对超富集植物(小鳞苔草)抗氧化酶活性的影响[J]. *水土保持学报*, 2007, 21(6): 86-91.  
HU Zong-da, YANG Yuan-xiang, ZHU Xue-mei, et al. Influence of Pb, Zn on activity of SOD, POD and CAT within roots and leaves of hyperaccumulator (*Carex gentiles* Franch.)[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21(6): 86-91.
- [25] 何 洁,高钰婷,贺 鑫,等. 重金属 Zn 和 Cd 对翅碱蓬生长及抗氧化酶系统的影响[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(1): 312-320.  
HE Jie, GAO Yu-ting, HE Xin, et al. The effect of Zn and Cd on growth and antioxidant enzymes activity of *Suaeda heteroptera Kitagawa*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(1): 312-320.
- [26] Israr M, Jewell A, Kumar D, et al. Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania Drummondii*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(2): 1520-1526.
- [27] Fatima R A, Ahmad M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater[J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 346(1): 256-273.
- [28] Yilmaz S H, Kaplan M, Temizgul R, et al. Antioxidant enzyme response

- of sorghum plant upon exposure to aluminum, chromium and lead heavy metals[J]. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2017, 42(4):503-512.
- [29] 杨国远, 万凌琳, 雷学青, 等. 重金属铅、铬胁迫对斜生栅藻的生长、光合性能及抗氧化系统的影响[J]. *环境科学学报*, 2014, 34(6):1606-1614.
- YANG Guo-yuan, WAN Ling-lin, LEI Xue-qing, et al. Effects of lead and chromium on the growth, photosynthetic performance and antioxidant activity of *Scenedesmus obliquus*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(6):1606-1614.
- [30] 王 晨, 王海燕, 赵 琨, 等. 硅对镉、锌、铅复合污染土壤中黑麦草生理生化性质的影响[J]. *生态环境*, 2008, 17(6):2240-2245.
- WANG Chen, WANG Hai-yan, ZHAO Kun, et al. Effects of silicon on physiological and biochemical properties of ryegrass under the compound pollution of Cd, Zn and Pb[J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(6):2240-2245.
- [31] Cobbett C S. Heavy metal detoxification in plants: Phytochelatin biosynthesis and function[J]. *Plant Life*, 2001, 51(3):183-188.
- [32] Wójcik M, Skórzyńska-polit E, Tukiendorf A. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi Caerulescens* under Zn and Cd stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2006, 48(2):145-155.
- [33] 董冰冰, 陈友媛, 惠红霞, 等. 黑麦草和牵牛花对铬耐受能力和积累效果的指标表征研究[J]. *环境科学*, 2016, 37(10):4044-4053.
- DONG Bing-bing, CHEN You-yuan, HUI Hong-xia, et al. Characterization of Cr tolerance and accumulation in *Lolium perenne* L. and *Pharibitis purpurea*(L.) Voigt[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(10):4044-4053.
- [34] 徐勤松, 施国新, 王 学, 等. 镉、铜和锌胁迫下黑藻活性氧的产生及抗氧化酶活性的变化研究[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(1):107-112.
- XU Qin-song, SHI Guo-xin, WANG Xue, et al. Generation of active oxygen and change of antioxidant enzyme activity in *Hydrilla verticillata* under Cd, Cu and Zn stress[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(1):107-112.