

## 黄铁矿和谷氨酸对砷酸盐生菜毒性的调控研究

温婧玉, 唐鑫, 翁靓娴, 穆莉, 刘潇威, 赵玉杰, 戴礼洪

### 引用本文:

温婧玉, 唐鑫, 翁靓娴, 穆莉, 刘潇威, 赵玉杰, 戴礼洪. 黄铁矿和谷氨酸对砷酸盐生菜毒性的调控研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2120–2130.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0175>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 硫素对小花南芥体内含硫化合物与铅累积特征的影响

牟凤利, 杨京民, 刘翠, 刘才鑫, 刘梅, 陈建军, 祖艳群, 王吉秀

农业环境科学学报. 2021, 40(9): 1851–1859 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0345>

#### 外源NO对铝胁迫下西瓜幼苗生长及生理特性的影响

肖家昶, 郑开敏, 马俊英, 郑阳霞

农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1650–1658 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0145>

#### DA-6对水培生菜生长及生理特性的影响

杨修一, 李圣会, 梅宇超, 杨广, 孙晓慧, 赵晨浩, 张民, 李成亮

农业环境科学学报. 2017, 36(1): 32–38 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1048>

#### 铀对蚕豆幼苗光合特性和呼吸代谢的毒害机理

刘泽伟, 赖金龙, 李俊柯, 丁峰, 张宇, 罗学刚

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1916–1924 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0390>

#### 微塑料对DBP胁迫下生菜光合作用及品质的影响

王成伟, 刘禹, 宋正国, 高敏苓

农业环境科学学报. 2021, 40(3): 508–516 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1134>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

温婧玉, 唐鑫, 翁靓娴, 等. 黄铁矿和谷氨酸对砷酸盐生菜毒性的调控研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2120-2130.

WEN J Y, TANG X, WENG L X, et al. Implications of pyrite and glutamate in arsenate toxicity in lettuce[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(10): 2120-2130.



开放科学 OSID

# 黄铁矿和谷氨酸对砷酸盐生菜毒性的调控研究

温婧玉, 唐鑫, 翁靓娴, 穆莉\*, 刘潇威, 赵玉杰, 戴礼洪

(农业农村部环境保护科研监测所, 农业农村部农产品质量安全环境因子控制重点实验室, 天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191)

**摘要:**为探究含铁矿物和有机物添加对生菜砷酸盐毒性的调控作用,采用高分辨扫描电镜和X射线光电子能谱表征培养液中外源添加物与砷(As)之间的相互作用,采用高效液相色谱串联电感耦合等离子体质谱法测定不同处理组生菜中As的存在形态及累积变化状况,并综合考察了营养元素含量、超氧化物酶浓度和丙二醛含量等抗氧化系统和纤维素等指标的变化。结果表明:培养液中的As通过物理吸附或化学作用力结合在黄铁矿表面,添加谷氨酸促进了该过程的发生,从而抑制了As从植物根部向可食部的迁移。当生菜生长至第20~40天,相比黄铁矿单独处理,黄铁矿和谷氨酸组合处理使无机As浓度降低35.9%,总As浓度降低16.9%;与谷氨酸单独处理相比,无机As浓度降低4.0%,总As浓度降低21.8%。在植物叶片中,相比As(V)单独处理组,黄铁矿和谷氨酸的添加使叶质量和叶绿素含量分别提高了20.8%~30.8%和17.1%~25.5%,通过增加叶片中超氧化物酶的合成限制活性氧在体内的积累,减少脂质过氧化反应。黄铁矿添加具有促进营养元素吸收的作用,而谷氨酸添加有利于缓解由As胁迫引起的植物氧化应激作用。相比黄铁矿单独处理,黄铁矿和谷氨酸组合处理更有利于植物对镁(Mg)、锰(Mn)、铜(Cu)和铁(Fe)元素的吸收,增强植物对As的抗逆性。同时,与谷氨酸或黄铁矿单独处理相比,二者组合处理提升了植物的品质,分别使维生素C含量提高了42.5%和69.3%,纤维素含量提高了21.2%和374.6%,蛋白质含量提高了71.4%和21.4%。研究表明,黄铁矿和谷氨酸组合处理能有效降低溶液中As的迁移和生菜叶片中As的积累,有利于植物体中活性氧的清除,并可提高植物对营养元素的吸收,促进品质改善。

**关键词:**砷酸盐;生菜;黄铁矿;有机物;谷氨酸

中图分类号:X173 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)10-2120-11 doi:10.11654/jaes.2022-0175

## Implications of pyrite and glutamate in arsenate toxicity in lettuce

WEN Jingyu, TANG Xin, WENG Liangxian, MU Li\*, LIU Xiaowei, ZHAO Yujie, DAI Lihong

(1. Key Laboratory for Environmental Factors Control of Agro-product Quality Safety (Ministry of Agriculture and Rural Affairs), Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Safe-Product, Institute of Agro-Environmental Protection, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China)

**Abstract:** This study was aimed to evaluate the role of iron-containing minerals and organic matter in the regulation of arsenate toxicity in lettuce. High-resolution scanning electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy were used to characterize the interaction between exogenous additives and arsenic in a Hoagland solution, and high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) was used to determine the morphological and cumulative changes in arsenic in lettuce

收稿日期:2022-02-24 录用日期:2022-04-11

作者简介:温婧玉(1997—),女,山东临沂人,硕士研究生,从事农业环境学研究。E-mail:chinasuzhouwjy@163.com

\*通信作者:穆莉 E-mail:muli@caas.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(21876092, 22176103);中央科研院所基本科研业务费项目(2022)

**Project supported:** The National Natural Science Foundation of China (21876092, 22176103); The Central Public Research Institutes Basic Funds for Research and Development (2022)

in different treatment groups and investigate the changes in nutrient content, superoxide dismutase concentration, and malondialdehyde concentration in the antioxidant system and fiber. Results showed that arsenic in the culture solution was physically adsorbed or chemically bound to the surface of pyrite, and glutamate addition facilitated this process, thus hindering the migration of arsenic from the roots to the edible parts of the plants. When lettuce was grown for 20–40 days, the combined treatment of pyrite and glutamate reduced the inorganic arsenic and total arsenic concentrations by 35.9% and 16.9%, respectively, compared to that by pyrite treatment alone and by 4.0% and 21.8%, respectively, compared to that by glutamic acid treatment alone. In leaves, pyrite and glutamate addition increased leaf weight by 20.8%–30.8% and chlorophyll content by 17.1%–25.5% compared to that by the addition of pentavalent arsenic alone, limiting the accumulation of reactive oxygen species in the body by increasing the synthesis of superoxide dismutase in the leaves and reducing lipid peroxidation reactions. Pyrite addition promoted nutrient uptake, whereas glutamate addition was beneficial in alleviating oxidative stress in plants caused by arsenic stress. Compared to pyrite treatment alone, the combined pyrite and glutamate treatment was more beneficial to the uptake of Mg, Mn, Cu, and Fe elemental nutrients by plants and enhanced plant resistance to arsenic. In addition, the combined treatment enhanced the quality of the plants compared to glutamate or pyrite treatment alone, increasing the vitamin C content by 42.5% and 69.3%, cellulose content by 21.2% and 374.6%, and protein content by 71.4% and 21.4%, respectively. The combined treatment effectively reduced the migration of arsenic in solution and accumulation of arsenic in lettuce leaves, which consequently facilitated the removal of reactive oxygen species from plants, increased the uptake of nutrient elements, and improved the quality of plants.

**Keywords:** arsenate; lettuce; pyrite; organic matter; glutamate

环境中过量的砷(As)会损害植物生长,并可通过食物链威胁人类健康。好氧环境是农业生产中植物生长的常见环境,其中As主要以砷酸盐形式存在,研究表明As对非抗性植物具有明显的胁迫作用<sup>[1]</sup>。植物As中毒后会表现出叶片数量减少、萎黄、坏死,植物衰老和落叶等形态变化,As不仅可使植物养分吸收受限、叶绿素降解以及生物量和产量减少,还会导致活性氧(ROS)过度产生和碳水化合物、蛋白质、DNA的合成受损等<sup>[2]</sup>。植物可通过多种机制增强对As的抗性,如合成金属结合蛋白,通过特定转运蛋白或区隔化作用降低重金属毒性,以及通过内部酶促及非酶促反应系统清除造成细胞损伤的ROS<sup>[3]</sup>。近期研究表明,通过添加外源物质可增强植物自身抗逆性并降低有毒物质的积累,如水杨酸<sup>[4]</sup>、腐植酸(HA或FA)<sup>[5]</sup>、脯氨酸<sup>[6]</sup>、硅<sup>[7]</sup>和磷<sup>[8]</sup>的外源供应均可以通过减少有毒物质的吸收及ROS产生、增加抗氧化酶活性及叶绿素浓度、加快生长等机制减轻As胁迫导致的植物毒害。基于前期研究发现<sup>[5]</sup>,谷氨酸(Glu)作为植物面临压力环境时的信号分子,参与创伤反馈,对植物适应非生物胁迫(如盐、冷、热和干旱)作出反应,并转导因局部刺激(非生物或生物胁迫)触发的长距离信号。因此本研究通过添加谷氨酸,以期达到增强植物对As抗逆性的目的。

铁的氧化还原过程显著影响地下水和土壤环境中As的存在形态<sup>[9]</sup>,砷酸盐As(V)与硫化铁矿物之间的相互作用通常会影响As在地球化学环境中的迁移和转化,其中黄铁矿(FeS<sub>2</sub>)是地球表面最常见的岩石形

成矿物之一,其对As有较强的亲和性。在自然界还原性的沉积物或土壤中,铁硫化物[包括马基诺矿(FeS)和黄铁矿]对As固定起重要作用<sup>[10]</sup>。FeS-As(V)共沉淀在酸性环境中对As(V)的固持能力较大,且As(V)-O易与Fe位点结合<sup>[11]</sup>。黄铁矿在As(V)环境中被氧化,其表面形成Fe(III)氧化物,同时氧化S<sub>2</sub>(-II)并释放Fe(II)<sup>[12]</sup>。黄铁矿释放S(-II)和Fe(II)离子均会促使As沉淀,氧化形成的Fe(III)和环境中的As(V)在黄铁矿表面反应形成无定形砷酸铁,最终转化为结晶性的臭葱石<sup>[13]</sup>,增强了As在酸性条件下的稳定性。黄铁矿表面的官能团(-OH、-COOH)和活性氧(O<sub>2</sub>·、·OH)会通过形成Fe-As、Fe-O-As等化学键,对As的存在状态及吸附产生影响<sup>[14]</sup>。目前溶解性铁离子与As的相互作用研究主要集中在铁(氢)氧化物对As的吸附上,但近年来,许多研究表明黄铁矿可以从水中去除包括As在内的各种有机和无机污染物<sup>[15]</sup>。黄铁矿能影响As和有机物的环境行为,特别是溶解性有机物(DOM),其可通过金属阳离子桥与As形成络合物(As-Fe-DOM三元络合物)<sup>[16]</sup>。基于此,本研究以天然黄铁矿为研究对象,考察其对As存在状态及对植物As积累造成的影响,并在此基础上,进一步考察其与谷氨酸组合处理对As植物毒性的调控作用。

本研究选取谷氨酸作为外源添加有机物,采用球磨天然黄铁矿,研究两者单独及组合处理对As植物毒性的调控作用。考察了培养液中黄铁矿与As之间的相互作用关系及有机小分子添加对其造成的影响。

通过比较各处理组植物可食部 As 积累、植物生长发育和生理生化变化、植物营养元素变化等,阐明黄铁矿等自然要素及外源小分子对植物 As 胁迫的调控作用,以期为 As 生态环境风险评估及污染事故应急处理提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料和处理方法

选择意大利生菜(*Lactuca sativa* var. *capitalata*)作为研究对象。种子用 75% 酒精消毒 3 min,超纯水漂洗 3 次,超纯水浸泡 30 min。采用蛭石培育种子至 4~5 片真叶阶段,然后将幼苗转移到 Hoagland 溶液培养 10 d,培养液配制及培养条件采用本课题组前期的研究方法<sup>[17]</sup>。每天光照( $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )时间设置为 14 h。最终选择均匀的个体进行 As(V) 暴露实验,暴露时间分别为 10、20、30、40、50 d。Hoagland 溶液体积为 100 mL,每 10 d 更换一次。

为研究黄铁矿和谷氨酸对生菜 As 胁迫的影响,未暴露于 As(V) 的植株作为空白对照组(CK),4 个处理组分别为五价 As(V)、五价 As+黄铁矿(V-P)、五价 As+谷氨酸盐(V-G)、五价 As+黄铁矿+谷氨酸盐(V-PG),每种处理分别设置 3 个重复。As(V) 标准溶液由上海安谱(O2Si)提供,添加浓度为  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,该浓度根据前期研究选取,在该浓度下生菜对外源物质较敏感<sup>[5,17]</sup>。为进一步比较不同处理对 As 胁迫的调控作用,首先考察黄铁矿和谷氨酸( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ , Sigma-Aldrich, CAS: 56-86-0)对溶液和生菜中 As 形态的影响。为了避免对植物造成额外的负面影响,黄铁矿颗粒添加量为 2 mg(黄铁矿与 As 的质量比为 2:1)<sup>[13]</sup>,谷氨酸盐的浓度为  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[18]</sup>,超声混合。使用的天然黄铁矿(直径 0.153~0.483 cm)由 Alfa Aesar(美国)提供,采用球磨的方式快速减小黄铁矿粒径、均一化颗粒尺寸<sup>[14]</sup>,用球磨机在  $300 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下球磨 4 h(干磨法,3 个研磨球,一个直径 5 mm,两个直径 20 mm),球磨后颗粒的平均粒径为  $13.58 \mu\text{m}$ (直径 3.84~39.02  $\mu\text{m}$ )。

为考察不同生长期生菜生长情况,分别收取第 10、20、30、40、50 天的生菜叶片,用蒸馏水冲洗后测量生菜的叶质量和叶绿素水平。其中叶绿素水平采用便携式叶绿素仪(SPAD-502, Minolta Camera, Osaka, 日本)测定,叶绿素水平用 SPAD(Soil and plant analyzer development)值表示。

### 1.2 黄铁矿颗粒的表征

将添加黄铁矿的培养液[含 As(V)]用  $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,去掉上清液保留沉淀物,用超纯水清洗沉淀物并离心 3 次,最后将沉淀物冷冻干燥,获得反应后的黄铁矿颗粒。采用 TESCAN MIRA4 扫描电镜-能量色散光谱(SEM-EDS)对黄铁矿颗粒表面形貌和元素分布进行表征。X 射线光电子能谱(XPS)采用 X 射线光电子能谱仪(美国 ThermoFischer, ESCALAB 250Xi)测试,仪器配备 Al ka 射线( $h\nu=1\,486.6 \text{ eV}$ ),在真空( $4\times 10^{-7} \text{ Pa}$ )和 14.6 kV 电压下工作,获得了 Fe2p、S2p、O1s 和 As3d 的窄扫描光谱(20 次扫描),并以  $\text{C1s}=284.8 \text{ eV}$  结合能为能量标准进行荷电校正。XPS 的数据分析参考数据库(NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database)。

1.3 As 总量和营养元素的测定

收集生菜叶片并用超纯水冲洗。称取新鲜样品 0.5 g,营养元素及 As 测定的前处理采用王琦等<sup>[17]</sup>的方法。培养液经适当稀释后直接上机测定。采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Agilent 7700)分析砷(As)、钙(Ca)、铜(Cu)、铁(Fe)、钾(K)、镁(Mg)、锰(Mn)、钼(Mo)、钠(Na)和锌(Zn)的浓度。每个分析批次包含至少一个试剂空白和两个参考材料,如 GBW(E)100348 和 GBW10049(GSB-27)。

### 1.4 As 形态的测定

分别收取各处理组的生菜叶片,每份称取 0.5 g,将样品加液氮研磨后加入 10 mL 提取剂( $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸氢二铵和  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠), $250 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡 20 min, $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,上清液经  $0.45 \mu\text{m}$  水系滤膜过滤后上机测定。使用与电感耦合等离子体质谱联用的高效液相色谱法(HPLC-ICP-MS, Agilent Technologies 7700 Series, 美国)对叶中的 As 无机形态进行分析,具体方法及质量控制参考王琦等<sup>[17]</sup>的方法,用无机 As 浓度表示 As 对植物的毒害程度。

### 1.5 生菜营养指标和抗氧化系统活性的测定

按照维生素 C(建成科技)、纤维素(Solarbio)、蛋白质浓度(格锐思生物)试剂盒的步骤测定第 50 天时生菜叶片的品质指标。植物丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性采用南京建成科技公司提供的试剂盒测定。用 MDA 值判断植物细胞受自由基迫害的程度,用 SOD 值表示植物清除氧自由基的能力。

### 1.6 数据处理

所有生菜实验均设置 3 个平行,结果以平均值和标准差的形式表示。使用 IBM SPSS Statistics 24 通过单因素方差分析进行数据处理。统计显著性用  $P$

值评估, $P<0.05$ 被认为具有差异显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄铁矿及谷氨酸对培养液中As存在状态的影响

研究表明,溶解性有机物有降低植物As吸收的作用<sup>[5-6]</sup>。黄铁矿通过吸附或共沉淀作用去除As<sup>[19]</sup>,有机物与As在环境中存在竞争吸附和络合沉淀的相互作用<sup>[20]</sup>,从而可以减少生菜从培养液中吸收As。从图1a至图1c的黄铁矿颗粒表面As元素的质量分数可知,在添加As的生菜培养液中,V-PG矿物表面的As比重高于V-P和原始黄铁矿。与V-P相比,V-PG的As分布主要集中在颗粒表面,可能是谷氨酸使As更稳定地结合在了黄铁矿表面。前期研究表明,植物根际产生的小分子酸释放到溶液中会使溶液呈弱酸性( $\text{pH}<6.0$ ),该条件会促进As结合到矿物表面,因为在酸性条件下,亚砷酸盐[As(III)]和砷酸盐[As(V)]对黄铁矿表面都有很强的亲和力<sup>[21]</sup>。在有氧环境中,As(V)结合在黄铁矿表面可形成砷酸铁和黄钾铁矾氧化层<sup>[22]</sup>。图1d和图1e的XPS数据显示,V-P和V-PG的固体中出现了 $\text{As}_2\text{S}_5$ 和 $\text{Fe}-\text{As}(\text{V})-\text{O}$ ,表明溶液中的As可以与黄铁矿结合,并与黄铁矿中的硫形成As-S基团<sup>[23]</sup>。与已有研究中的Fe发挥主要作用不同,Fe在本研究收集的固体中XPS的峰值较低(0.01%),而S起到了重要作用,近年有研究建议可以将S肥用于降低农产品中的As毒性<sup>[24]</sup>。此外,As的迁移率与有机物的分子量有关,分子量越小,有机物与As之间的竞争吸附能力越小,从而使得更多的As保留在矿物表面。谷氨酸的低分子量(147 Da)维护了As在矿物表面的稳定性,这种低As迁移率可能是由于抑制了矿物的氧化溶解,或通过表面络合增强了Fe(III)(氢氧)氧化物沉淀对As的吸附<sup>[18]</sup>,如图1d中V-PG较明显的As(V)-O-OH的特征峰。从黄铁矿颗粒的表征推断,在弱酸性的生菜培养液中,As吸附或结合在黄铁矿表面,谷氨酸的添加使得这种吸附或结合更加稳定,更多的As(V)保留在体外环境中,从而减少了As从植物根部进入体内的机会。

### 2.2 生菜叶片中As的累积变化规律

无机As对植物的毒性较有机As更强<sup>[25]</sup>,因此本研究主要研究了植物可食部的无机As含量。如图2所示,第10天时,V-P、V-G、V-PG之间无机As浓度[As(III)+As(V)]差异较小,且均大于V;第20天时,外源添加物使无机As浓度低于V,而且黄铁矿+谷氨酸盐更有利于降低生菜叶片中的无机As含量,即无

机As含量为 $V-\text{PG}<V-\text{G}<V-\text{P}$ ;随着植物生长,第30天和第40天叶片中积累的无机As含量低于第20天的含量。在第30天时,V-G和V-PG的无机As含量差异较小,且低于V和V-P。在第40天时,V-G和V-PG的无机As含量均低于V和V-P,V-G和V-PG之间含量差异较小,V和V-P之间差异也较小。在20~40 d,生菜叶片中的As以As(III)为主,通过比较发现V-PG比V-G的无机As浓度平均降低4.0%,比V-P平均降低35.9%。

如图2所示的As总量[As(T)],在植物转移到染毒培养液的第10天,相比其他添加外源物的处理组,V中植物对As吸收较少,与上述无机As的结果一致。随着植物的生长,从20~40 d,V-PG中的As含量低于V-P或V-G,说明黄铁矿和谷氨酸同时存在有利于降低植物体内的As含量,即 $V-\text{PG}<V-\text{G}<V-\text{P}$ 。20~40 d间,V-PG比V-G的As(T)含量降低21.8%,比V-P降低16.9%。

含铁矿物、有机物和As之间在水环境中通过氧化还原、络合沉淀<sup>[20]</sup>和竞争吸附<sup>[26]</sup>作用减少As进入植物体内,若植物根部形成铁膜还会阻碍进入植物组织内部的As向上转运<sup>[27]</sup>。如图3所示,总As浓度在V的培养液中第10天到第30天平均剩余 $6.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,添加黄铁矿和谷氨酸后,培养液中总As浓度增加85.67%(V-PG),说明含铁矿物和有机物对植物吸收As具有阻碍作用,这与在水稻和白骨壤中的研究现象一致<sup>[27]</sup>。该现象在固相表征中也得到证实,即培养液中黄铁矿颗粒表面As的质量分数增加。同时,进入植物根部的As(V)也能通过自身代谢途径外排到植物体外<sup>[28]</sup>。有研究表明番茄和水稻根不仅可直接排出As(V),还可以迅速将植物体中的As(V)还原为As(III)进行外排<sup>[29]</sup>。第30天培养液中的总As浓度在所有处理中相对较高,此时植物体内As(T)含量最低。黄铁矿和谷氨酸组合处理通过吸附等作用固定As以减少As向植物体内迁移,从而有效降低叶片中As(T)及无机As积累,并通过转化As形态而增强As的流动性,进而增强植物对As的抗胁迫能力。

### 2.3 生菜生长发育及抗氧化指标的变化

由图2中As(T)和无机As含量变化以及图4a的叶质量判断得出,快速生长期为30~40 d。通过对不同处理组第30天和第40天的抗氧化指标进行比较,阐明黄铁矿和谷氨酸抗氧化系统的调控作用。各处理组第30天SOD的值高于第40天(图4b),叶片叶绿素含量在30~40 d持续上升(图3c),第30天的MDA

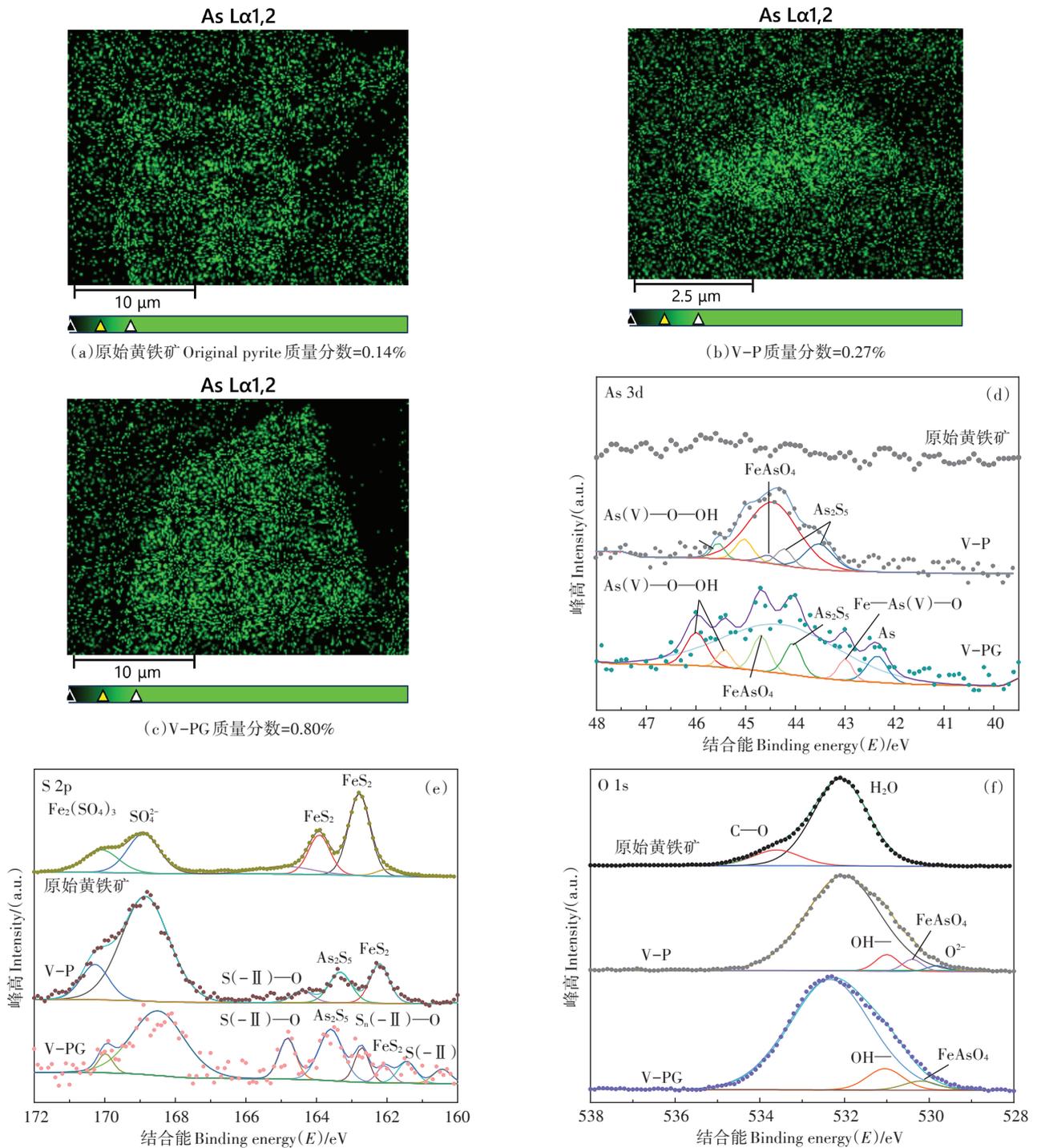


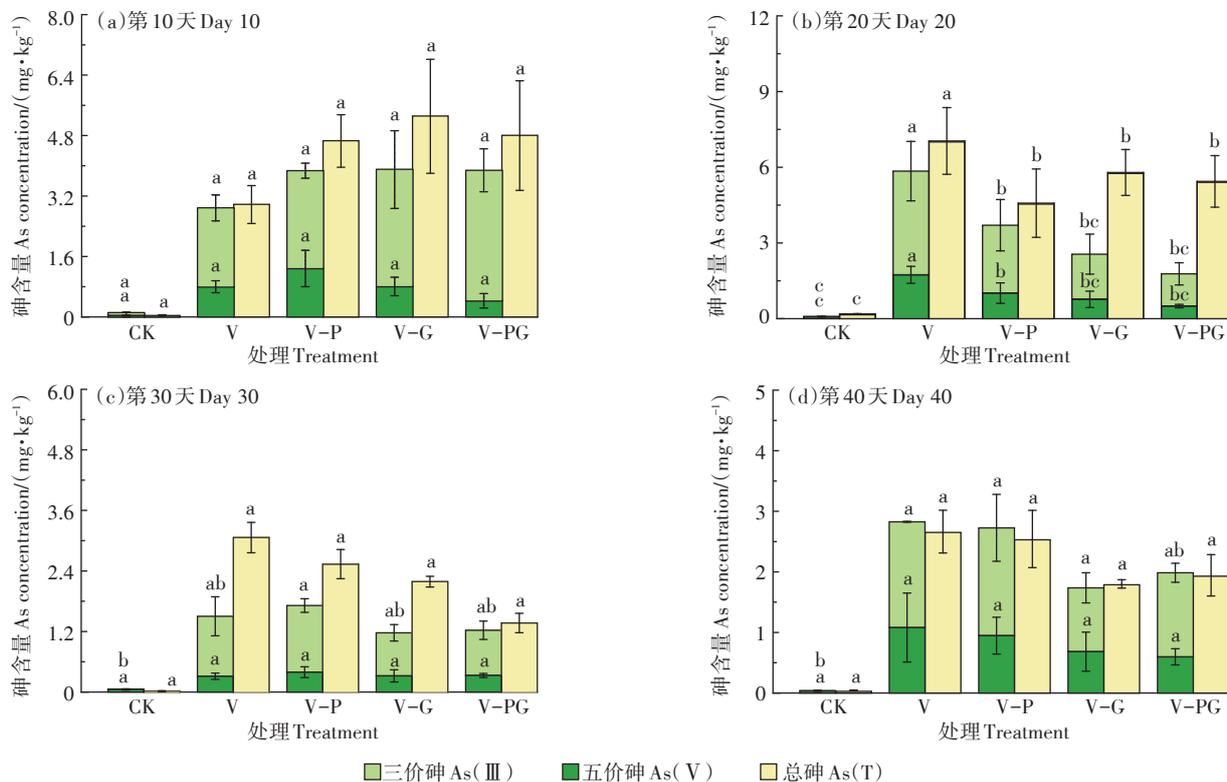
图1 黄铁矿表面As的质量分数SEM-EDS图谱和As 3d,S 2p和O 1s的XPS图谱

Figure 1 The specific gravity of arsenic on the surface of pyrite from SEM-EDS and the As 3d,S 2p and O 1s XPS spectra of original pyrite and V-P,V-PG after 40 days

含量小于第40天(图3d),以上说明30~40 d时植物清除氧自由基的能力最强,对As毒性的抗性最大。

植物暴露于无机As中会导致体内产生过多的ROS<sup>[30]</sup>,抗氧化酶的合成有利于过量ROS的清除。SOD是用于清除植物体中ROS的重要抗氧化酶,其

活性高低与酚类物质代谢和植物抗性密切相关,可以反映特定环境下植物的适应能力,其活性越高,植物对逆境的忍受能力越强。如图4b所示,第30天时,V-P、V-G和V-PG的SOD值均大于V,且V-PG大于V-G和V-P,说明添加黄铁矿和谷氨酸均有利于清除



图中不同小写字母代表处理间的差异显著,  $P < 0.05$ 。下同  
Different lowercase letters indicate significant differences among treatments,  $P < 0.05$ . The same below

图2 生菜叶片中的As含量

Figure 2 Arsenic concentration in lettuce leaves

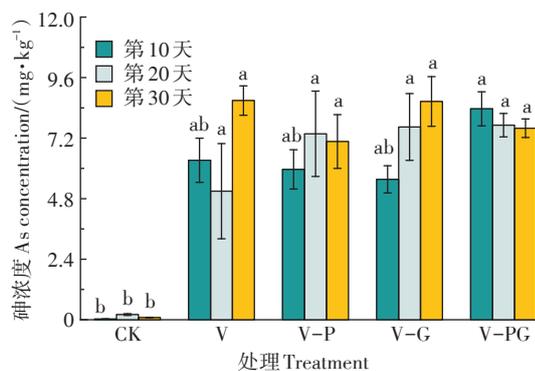


图3 培养液中总As浓度

Figure 3 Total As concentration in Hoagland solution

植物体内因环境胁迫产生的自由基,使植物的抗性增强,且黄铁矿和谷氨酸组合处理时植物对As胁迫表现出更强的抗性。有研究表明外源添加氨基酸可以通过增强抗氧化酶的活性来抵抗环境中的重金属毒害<sup>[31]</sup>。第40天的SOD值在不同处理之间的差异较小,说明随着生长,植物对砷酸盐的胁迫具有了一定的适应性,体内氧化还原反应比前期减缓。植物细胞中的Fe-SOD主要存在于叶绿体中,如图4c所示,20~

30 d时的叶绿素含量保持上升,40~50 d时开始下降。添加黄铁矿和谷氨酸有利于维持叶片中的叶绿素含量,并且抑制由As(V)引起的叶绿素降解,表现为在10~50 d时,V-P、V-G和V-PG的叶绿素含量均高于V,相比V提高了17.1%~25.5%。有研究表明外源氨基酸的添加可缓解茄子幼苗中由As胁迫引起的叶绿素含量下降<sup>[6]</sup>。As胁迫会下调叶片中的谷氨酸<sup>[5]</sup>,并造成植物的谷氨酸激酶活性显著降低<sup>[32]</sup>,外源谷氨酸缓解了由As(V)胁迫引起的氧化应激,提高了植物对砷酸盐的抗逆性。由此推断,黄铁矿和谷氨酸是通过增加SOD的合成限制ROS在体内的积累,并维持叶片中的叶绿素含量,从而在As(V)胁迫时对叶绿体起到保护作用。

脂质过氧化是As胁迫对植物代谢造成较强损伤的表现<sup>[33]</sup>。MDA是膜脂质过氧化的最终分解产物,MDA在体外影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶,加剧膜损伤,其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度。As(V)胁迫下,随着时间的延长,生菜的生长速率减缓,由图4d可知30~40 d时MDA含量增加,呈损害程度加深的趋势,但添加黄铁矿(V-P、V-PG)

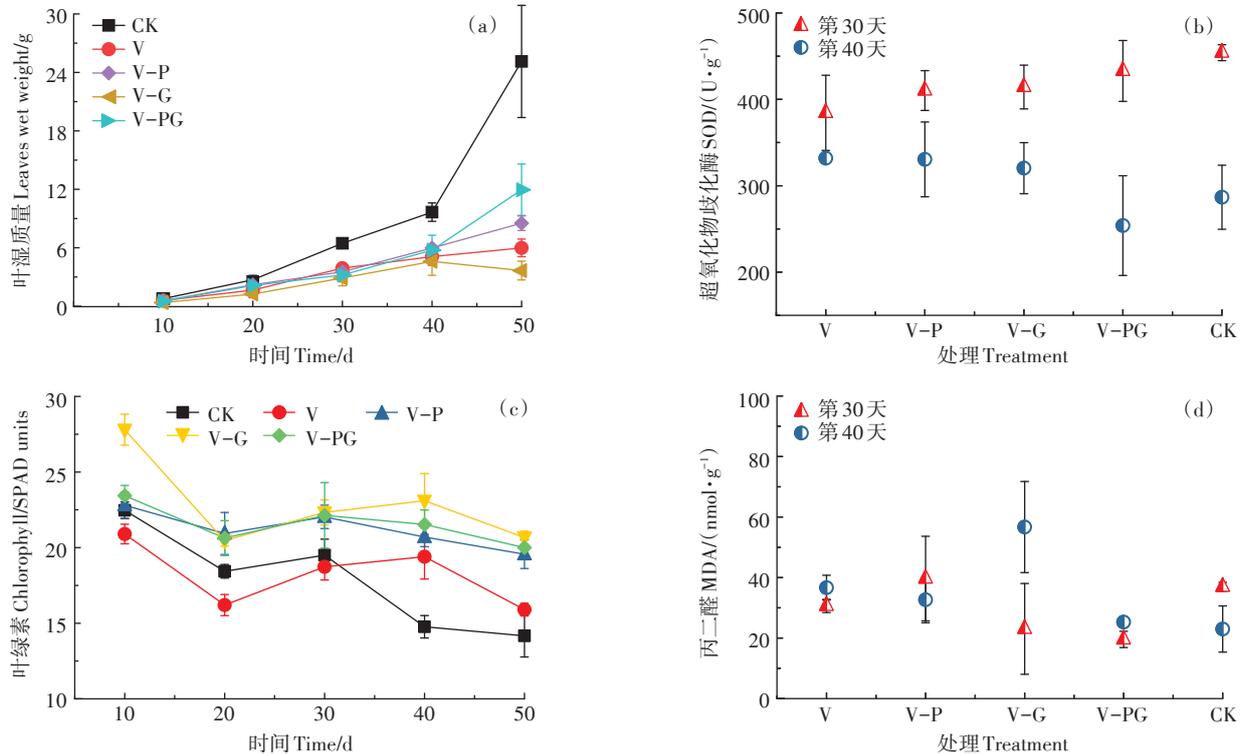


图4 叶片湿质量、超氧化物歧化酶活性、叶绿素和丙二醛含量  
Figure 4 Leaves wet weight, SOD, chlorophyll content and MDA

呈现MDA含量降低的趋势,说明黄铁矿可缓解膜脂质过氧化作用,在As(V)胁迫时保护植物细胞膜,使得叶片的湿质量相比V增加了20.8%~30.8%(图4a, 20~50 d的平均值)。第30天时,MDA含量为V-PG<V-G<V;第40天时,V-PG<V-P<V;V-P、V-PG在第30天时的SOD活性均大于V组。在V-P中第40天的MDA含量比第30天低;V-PG的MDA含量在第30天和第40天间差距较小且保持较低值,与CK的MDA含量最接近。在As胁迫下,植物体内产生的谷氨酸优先用于代谢途径,增加植物螯合素的合成<sup>[32]</sup>。植物螯合素的产生对于抵抗As毒害具有重要意义,然而其可能会导致谷胱甘肽含量的消耗,从而导致氧化应激反应<sup>[34]</sup>。从MDA的结果来看,外源谷氨酸减弱了生菜的氧化应激反应。综上可知,添加谷氨酸的生菜在As(V)诱导时可分泌更多的SOD,黄铁矿可减少脂质过氧化反应,两者组合添加可以更有效地增强植物对As积累的耐受性。

#### 2.4 生菜中营养元素的变化

黄铁矿和谷氨酸通过增加营养元素吸收来提高生菜对As(V)的耐受性。由于第10天处于初期暴露阶段,各组的叶质量较小(图4a),组内误差较大;第50天各组叶片萎黄,叶绿素值较低(图4c),生菜处于

生长的稳定期,营养指标处于衰退阶段。因此,本研究选取生长至第20天、第30天和第40天的生菜进行矿物营养元素分析。如图5所示,相对于CK的元素含量分析结果,在培养20 d后,暴露于As(V)使得叶片中的Ca、Fe、Mg、Mn、Na含量显著升高,Zn和Mo含量降低;Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>起到降低膜通透性的作用<sup>[35]</sup>,植物能通过调节膜通透性抵抗As毒性。在对水稻的研究中也有类似的结果<sup>[36]</sup>。V-PG显著增加了叶片中K、Na和Fe的含量。由图6可知,在第20天时,Fe含量在V-PG中显著提高(160.6%),比V-G高78.8%,比V-P高57.1%。Fe可构成细胞色素,是过氧化物酶、过氧化氢酶的激活剂<sup>[35]</sup>,说明V-PG在第20天时的抗氧化活性提高。在As(V)胁迫的基础上,添加黄铁矿和谷氨酸(V-P和V-G)对生长20 d的矿物营养元素影响相对减弱,生菜自身对毒性的应激反应减弱,可能是黄铁矿和谷氨酸使As(V)毒性相对减弱,与抗氧化指标的结果一致。随着植株对环境适应性增强,V与CK之间的差异性相对减小。培养30 d后,相对CK,添加As(V)使得叶片中的Ca、Fe含量显著升高。V-P的Ca、Fe含量升高但不显著,可能是黄铁矿使植株适应环境的速度变快,V-PG在第20天即出现了营养元素含量的显著差异,在同时期的5组中表现

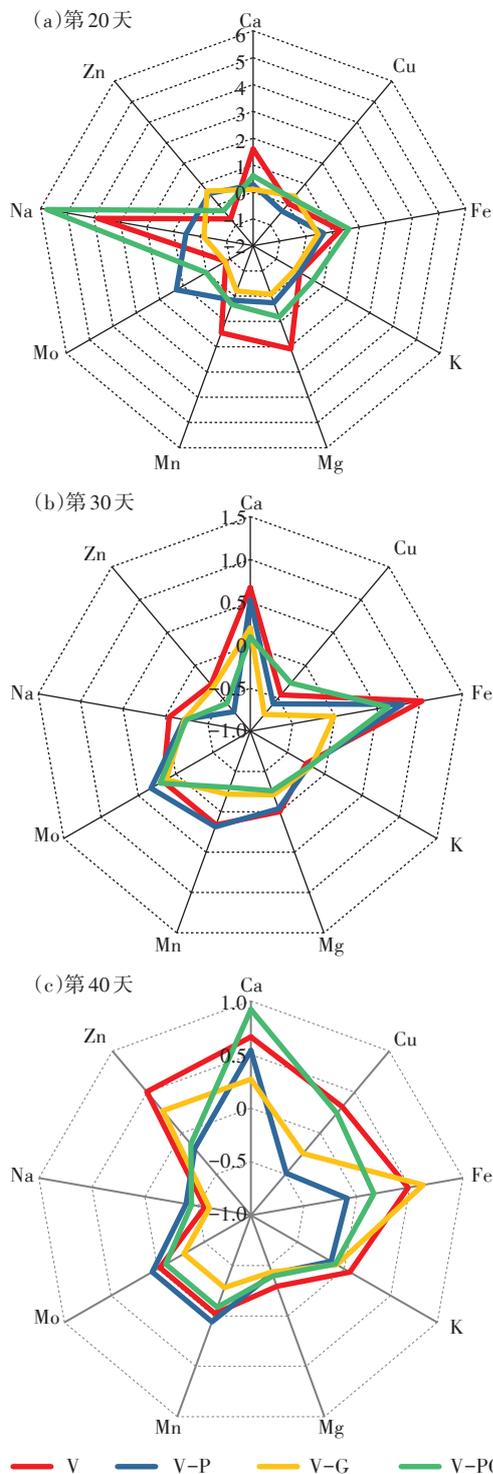


图5 叶片中的营养元素相对含量变化(相对CK)

Figure 5 Changes in relative contents of nutrient elements in leaves (compared with CK)

出最高的Fe含量(图6)。第40天,各组与CK的营养元素含量差异不显著。黄铁矿和谷氨酸通过增加叶片中营养元素含量来缓解As(V)毒性,加快植物对As的适应,单独谷氨酸对营养元素的吸收影响不显著。

如图5所示,相比V的植株,生长20 d后,V-P和V-PG提高了V中的Zn和Mo含量,ORTAS等<sup>[37]</sup>的研究也表明黄铁矿可以作为植物的Zn肥添加。V-G和V-PG相比V还增加了Cu的含量。第20天,V-PG提高了叶片中Zn、Mo、Cu和K的含量。第30天,V-PG的Cu含量高于V,V-P的Mo含量高于V。第40天,V-PG的Ca、Na含量高于V,V-P的Na、Mo、Mn含量比V提高,V-G的Fe含量大于V。在As(V)胁迫时,谷氨酸对营养元素的吸收影响较小,黄铁矿在20~40 d期间提高了Zn、Mo、Na、Mn的含量,黄铁矿和谷氨酸组合在20~40 d增加了叶片中Zn、Mo、Cu、K、Ca和Na的含量。黄铁矿在提高小麦必需微量营养素(Fe、Cu、Zn和Mn)方面也起到了促进作用<sup>[38]</sup>。Fe、Cu和Mo等元素是许多酶的组成成分,Mn、Cu可以调节植物矿质营养平衡,参与植物的光合作用,对改善品质、提高产量及抗逆性有重要作用<sup>[39]</sup>。本研究表明,添加黄铁矿在提高膜渗透、吸收更多养分供生长需求方面,比谷氨酸发挥了更多的促进作用,并通过促进元素吸收,增强了对As(V)胁迫的抗逆性。

从CK和V对比得出的元素含量结果可知,受影响的元素中Mg、Mn、Cu和Fe均与叶绿体组成以及色素合成有关。在植物细胞中,微量营养元素金属阳离子的主要汇是叶绿体和线粒体(叶绿体中存在50%的Cu和80%的Fe<sup>[35]</sup>)。随植物生长,添加黄铁矿和谷氨酸组叶绿素水平高于V(图4c)。综上可以推断,对于生菜生长,黄铁矿起到促进营养元素吸收的主要作用,而谷氨酸的影响不显著;相比单独添加黄铁矿,黄铁矿和谷氨酸组合可使生菜更快吸收营养元素,从而加快植物对As(V)环境的适应,增加植物叶片生物量,抑制由As(V)引起的叶绿素降解。

## 2.5 黄铁矿与谷氨酸对生菜品质的影响

由图7a可知,生菜的VC含量在V与V-PG中显著

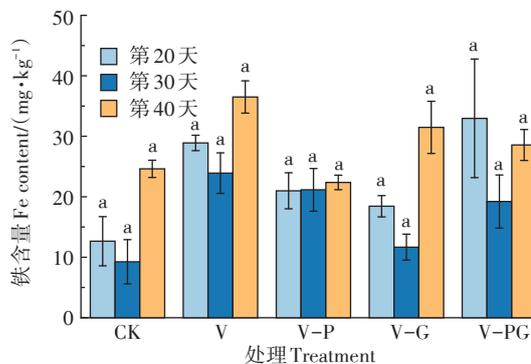


图6 叶片中的Fe含量

Figure 6 The Fe content in leaves

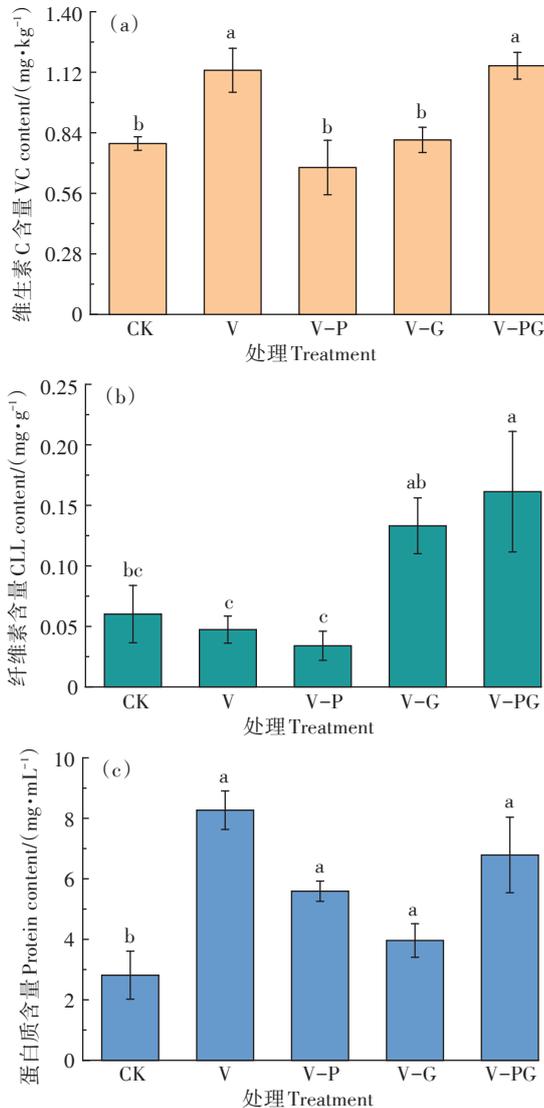


图7 第50天时的生菜叶片品质

Figure 7 Quality of lettuce leaves at day 50

提升,V-P、V-G与CK的差异较小;V-PG的VC含量与V-G和V-P相比,分别增加42.5%和69.3%。由图7b可知,V-P的纤维素含量最低,而V-PG的纤维素含量与V-G、CK、V-P相比分别提高21.2%、168.3%、374.6%。谷氨酸和黄铁矿组合处理比单独谷氨酸处理使植物纤维素的合成明显增强。如图7c所示,植物体中蛋白质含量之间关系为V>CK,V-PG>V-P>V-G。V-PG的蛋白质含量与V-G及V-P相比分别提高了71.4%和21.4%。黄铁矿和谷氨酸的添加有利于纤维素的合成,As(V)刺激了叶片中蛋白质的合成,添加黄铁矿有利于改善谷氨酸单独处理组蛋白质含量较低的现象。此外,MDA可以与蛋白质、核苷反应,松弛纤维素分子间的桥键,或抑制蛋白质的合成<sup>[40]</sup>。因此As过

量会降低纤维素含量并改变植物组织结构,特别是对多年生的植物有显著影响<sup>[41]</sup>。组合处理能降低植物对MDA的积累,从而减少其对纤维素和蛋白质合成的损伤。在植物生长的30~40 d,V-PG的MDA含量与V-G和V-P相比分别降低35.2%和36.6%。在暴露于As(V)的50 d后,黄铁矿和谷氨酸维持叶片中的VC含量,刺激纤维素和蛋白质的合成与积累,黄铁矿和谷氨酸组合有利于改善二者单独添加时生菜的品质,对提高生菜VC和纤维素水平有重要意义。

### 3 结论

(1)在培养液中,黄铁矿和谷氨酸组合处理有利于形成As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、Fe—As—O、As—O—OH等物质或化学键,有效降低植物体内的无机As积累,并通过增加SOD的合成以及限制ROS在植物体内的积累,促进植物体中叶绿素的合成,减少植物的脂质过氧化反应,最终增强植物对As(V)的耐受性。

(2)黄铁矿和谷氨酸处理可以促进生菜对营养元素的吸收,尤其对Mg、Mn、Cu和Fe元素的吸收作用明显增强;提高生菜对As(V)的适应性,并有效增加了生菜叶片的生物量,缓解了As(V)引起的生菜中叶绿素的降解。

(3)与单独谷氨酸或黄铁矿处理相比,二者组合处理提高了生菜维生素C、纤维素和蛋白质含量,使植物的营养品质得到明显改善。

#### 参考文献:

- [1] MEHARG A A, HARTLEY-WHITAKER J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species[J]. *New Phytologist*, 2002, 154(1):29-43.
- [2] ABBAS G, MURTAZA B, BIBI I, et al. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(1):59.
- [3] ARMENDARIZ A L, TALANO M A, TRAVAGLIA C, et al. Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98:119-127.
- [4] SAIDI I, YOUSFI N, BORGHI M A. Salicylic acid improves the antioxidant ability against arsenic-induced oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedling[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2017, 40(16):2326-2335.
- [5] WANG Q, WEN J, ZHENG J, et al. Arsenate phytotoxicity regulation by humic acid and related metabolic mechanisms[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 207:111379.
- [6] SINGH M, PRATAP SINGH V, DUBEY G, et al. Exogenous proline application ameliorates toxic effects of arsenate in *Solanum melongena* L.

- seedlings[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 117: 164–173.
- [7] SIL P, BISWAS A K. Silicon nutrition modulates arsenic-inflicted oxidative overload and thiol metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(36): 45209–45224.
- [8] BUSTINGORRI C, NORIEGA G, LAVADO R S, et al. Protective effect exerted by soil phosphorus on soybean subjected to arsenic and fluoride [J]. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 2017, 22(6): 353–360.
- [9] BORCH T, KRETZSCHMAR R, KAPPLER A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(1): 15–23.
- [10] NIAZI N K, BIBI I, FATIMAH A, et al. Phosphate-assisted phytoremediation of arsenic by *Brassica napus* and *Brassica juncea*: Morphological and physiological response[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2017, 19(7): 670–678.
- [11] HAN Y-S, PARK J-H, MIN Y, et al. Competitive adsorption between phosphate and arsenic in soil containing iron sulfide: XAS experiment and DFT calculation approaches[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 397: 125426.
- [12] SUN F, DEMPSEY B A, OSSEO-ASARE K A. As(V) and As(III) reactions on pristine pyrite and on surface-oxidized pyrite[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 388(1): 170–175.
- [13] LI Y, QI X, LI G, et al. Double-pathway arsenic removal and immobilization from high arsenic-bearing wastewater by using nature pyrite as in situ Fe and S donor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 410: 128303.
- [14] YANG X, LIU S, LIANG T, et al. Ball-milled magnetite for efficient arsenic decontamination: Insights into oxidation-adsorption mechanism[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 427: 128117.
- [15] OH S-Y, CHIU P C, CHA D K. Reductive transformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene, hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine, and nitroglycerin by pyrite and magnetite[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 158(2/3): 652–655.
- [16] MIKUTTA C, KRETZSCHMAR R. Spectroscopic evidence for ternary complex formation between arsenate and ferric iron complexes of humic substances[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(22): 9550–9557.
- [17] 王琦, 温婧玉, 赵玉杰, 等. 腐植酸调节砷酸盐生菜毒性作用研究[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(6): 1196–1206. WANG Q, WEN J Y, ZHAO Y J, et al. The effect of humic acid on arsenate toxicity of lettuce[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(6): 1196–1206.
- [18] WU X, BOWERS B, KIM D, et al. Dissolved organic matter affects arsenic mobility and iron(III)(hydr)oxide formation: Implications for managed aquifer recharge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(24): 14357–14367.
- [19] ZHANG Z, MOON H S, MYNENI S C B, et al. Effect of dissimilatory iron and sulfate reduction on arsenic dynamics in the wetland rhizosphere and its bioaccumulation in wetland plants (*Scirpus actus*) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 321: 382–389.
- [20] MLADENOV N, ZHENG Y, SIMONE B, et al. Dissolved organic matter quality in a shallow aquifer of Bangladesh: Implications for arsenic mobility[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(18): 10815–10824.
- [21] KIM E J, BATCHELOR B. Macroscopic and X-ray photoelectron spectroscopic investigation of interactions of arsenic with synthesized pyrite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(8): 2899–2904.
- [22] TABELIN C B, CORPUZ R D, IGARASHI T, et al. Acid mine drainage formation and arsenic mobility under strongly acidic conditions: Importance of soluble phases, iron oxyhydroxides/oxides and nature of oxidation layer on pyrite[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 399: 122844.
- [23] BLANCHARD M, ALFREDSSON M, BRODHOLT J, et al. Arsenic incorporation into FeS<sub>2</sub> pyrite and its influence on dissolution: A DFT study[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2007, 71(3): 624–630.
- [24] DIXIT G, SINGH A P, KUMAR A, et al. Sulfur mediated reduction of arsenic toxicity involves efficient thiol metabolism and the antioxidant defense system in rice[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 298: 241–251.
- [25] TAMAKI S, FRANKENBERGER W T. Environmental biochemistry of arsenic[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 124: 79–110.
- [26] ZHU Y C, ZHAO X Y, CHEN M, et al. Characteristics of high arsenic groundwater in Hetao Basin, Inner Mongolia, northern China[J]. *Sciences in Cold and Arid Regions*, 2015, 7(1): 104–110.
- [27] 史荣荣. 砷铁互作条件下植物根系形态响应及砷铁累积的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2019: 32–42. SHI R R. The response of plant root morphology and the accumulation of As and Fe under As-Fe interaction: Cases study of *Oryza sativa* L. and *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.[D]. Xiamen: Xiamen University, 2019: 32–42.
- [28] ZHAO F-J, MCGRATH S P, MEHARG A A. Arsenic as a food chain contaminant: Mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 535–559.
- [29] XU X Y, MCGRATH S P, ZHAO F J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots[J]. *New Phytologist*, 2007, 176(3): 590–599.
- [30] HARTLEY-WHITAKER J, AINSWORTH G, MEHARG A A. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2001, 24(7): 713–722.
- [31] ZOUARI M, BEN AHMED C, ELLOUMI N, et al. Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 128: 195–205.
- [32] PAVLÍK M, PAVLÍKOVÁ D, STASZKOVÁ L, et al. The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L.[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(6): 1309–1313.

- [33] BHOWMIK A K, ALAMDAR A, KATSOYIANNIS I, et al. Mapping human health risks from exposure to trace metal contamination of drinking water sources in Pakistan[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 538:306–316.
- [34] LIMA A I G, PEREIRA S I A, ALMEIDA PAULA FIGUEIRA E M DE, et al. Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: Relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 55(1/2): 149–162.
- [35] KATHPALIA R, BHATLA S C. Plant mineral nutrition[M]//BHATLA S C, LAL M A. Plant physiology, development and metabolism. Singapore: Springer Singapore, 2018:37–81.
- [36] KHAN E, GUPTA M. Arsenic–silicon priming of rice (*Oryza sativa* L.) seeds influence mineral nutrient uptake and biochemical responses through modulation of Lsi-1, Lsi-2, Lsi-6 and nutrient transporter genes[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):10301.
- [37] ORTAS I, KAYA Z, ERCAN S. Effect of pyrite application on wheat–maize growth and nutrient uptake under diverse soil conditions[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2015, 38(2):295–309.
- [38] TOZSIN G, AROL A I, CAYCI G. Use of waste pyrite as an alternative to gypsum for alkaline soil amelioration[J]. *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*, 2015, 29(3):169–177.
- [39] ALEJANDRO S, HÖLLER S, MEIER B, et al. Manganese in plants: From acquisition to subcellular allocation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:300.
- [40] PIZZIMENTI S, CIAMPORCERO E, DAGA M, et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins[J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4:242.
- [41] WALISZEWSKA B, MLECZEK M, ZBOROWSKA M, et al. Changes in the chemical composition and the structure of cellulose and lignin in elm wood exposed to various forms of arsenic[J]. *Cellulose*, 2019, 26(10):6303–6315.

(责任编辑:李丹)