

徐文君,程江峰,余向阳,等. 多种抑制剂对上海青吸收土壤中邻苯二甲酸二丁酯的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):272-276.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.050

多种抑制剂对上海青吸收土壤中 邻苯二甲酸二丁酯的影响

徐文君^{1,2}, 程江峰¹, 余向阳², 万 群²

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东青岛 266042; 2. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏南京 210014)

摘要:通过添加各种离子通道抑制剂、水通道抑制剂及代谢抑制剂到上海青 (*Brassica rapa* var. *chinensis*) 培养液中,研究植株对水溶液中邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的吸收机制。结果表明,添加水通道抑制剂、钾离子通道抑制剂、钙离子通道抑制剂、非选择性阳离子通道抑制剂以及阴离子通道抑制剂对上海青吸收 DBP 的抑制程度并不显著,添加代谢抑制剂 2,4-二硝基苯酚(DNP)、碳酰胍间氯苯胺(CCCP),对上海青吸收 DBP 的抑制程度降低了 69.6%、69.1%,使上海青对 DBP 的富集系数降低了 77.4%、95.2%。说明该水培条件下 DBP 进入上海青体内并非通过不耗能的各种离子通道或水通道,而是一个依赖能量代谢的过程。

关键词:邻苯二甲酸二丁酯(DBP);上海青;富集系数;通道抑制剂;代谢抑制剂

中图分类号: X173 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)08-0272-05

塑化剂,通常也叫增塑剂,是一种在塑料加工过程中被广泛使用的高分子材料助剂,它可以使塑料的柔韧性增强^[1]。邻苯二甲酸酯(PAEs),又称酞酸酯,是塑化剂中使用最频繁的一类物质,其中常见的有以邻苯二甲酸二丁酯(DBP)以及邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)为首的大约 30 种物质^[2]。它们的用途广泛,涉及塑料、橡胶、黏合剂、保鲜膜、化妆品、医疗器械等领域^[3-4]。但是由于 PAEs 与塑料制品间并非以共价键相连,并不稳定,所以会非常容易的扩散到外界环境中去^[5]。人体能通过皮肤吸收、呼吸、饮食等多种途径吸收环境中的 PAEs^[6],它被认为是环境荷尔蒙,具有类雌激素作用,可严重干扰人类的内分泌系统,影响生殖系统,甚至会造成基因毒性^[7-8]。因此,控制环境中的 PAEs 污染是一个亟待解决的重要问题。

近年来,随着塑料大棚、地膜栽培技术的广泛使用,农田土壤中已经多次被检出含有 PAEs,而土

壤中的 PAEs 最终会以各种形式进入作物中^[9],对作物的质量及产量产生极大影响,土壤与作物已经遭受到 PAEs 的严重污染^[10]。目前针对土壤-作物系统中 PAEs 的治理方法有多种,常见的有以自然降解和生物降解手段降低土壤中 PAEs 的含量,其中自然降解包括水解和光解,但效果并不理想,无法做到完全矿化^[11];微生物降解恰恰相反,因为具有高效快速、降解彻底等优点,已成为降解环境中 PAEs 污染的主要途径^[12-13]。此外,国内外也有学者利用其他途径解决这一问题。文勤亮通过向 DEHP 污染土壤中添加氧化剂,加速对 DEHP 的降解^[14]。Wu 等通过将冬瓜与其他蔬菜进行套种,利用冬瓜大量吸收土壤中的 DEHP 来降低其他蔬菜的 DEHP 含量^[15]。但以上方法都具有各自的局限性及弊端,无法大规模适用,因此针对目前土壤-作物系统中的 PAEs 污染,选择一种全面、合适的治理方法显得尤为重要。

降低作物对污染物吸收的方法可以作为修复土壤-作物系统中 PAEs 污染的另一种途径。植株吸收、累积 PAEs 的能力受多种因素影响,目前认为宏观影响因素主要有土壤类型、植株类型、PAEs 污染程度、生长情况等^[16]。从吸收途径上来讲,植物对污染物的吸收主要通过叶片气孔的蒸腾作用以及植物根部的主动吸附和被动吸附,并且在主动吸收过程中经常需要三磷酸腺苷(ATP)的参与^[17]。

收稿日期:2019-03-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31772197、31601660)。

作者简介:徐文君(1994—),男,山东青岛人,硕士研究生,主要从事微生物、植物与环境污染塑化剂研究。E-mail:741056894@qq.com。

通信作者:余向阳,博士,研究员,主要研究方向为污染物残留代谢调控及其机理和农药环境行为及生态毒理评估。E-mail:yuxy@jaas.ac.cn。

叶片吸收的主要是空气中的蒸汽态污染物,根系吸收才是植株吸收土壤中污染物的主要途径^[18]。根系吸收通道包括水通道以及离子通道等,水通道蛋白在细胞膜转运水分子时表现出特异性,有助于维持机体水平衡;离子通道在植物各种生理活动中具有重要作用,它能够帮助植物实现的营养物质的吸收、叶片运动以及气孔开闭等。因此,针对植物对污染物的吸收方式,以特定手段进行抑制或阻断将可能实现对土壤-作物系统中 PAEs 污染的治理。

本研究以添加抑制剂来降低作物对土壤中 PAEs 的吸收为思路,选择 PAEs 中经常被大量检出的成分邻苯二甲酸二丁酯(DBP)和常见作物上海青为研究对象,通过向含有 DBP 的植株水培营养液中分别添加水通道抑制剂、离子通道抑制剂、代谢抑制剂,观察在 DBP 污染营养液中生长 24 h 的上海青在各类抑制剂影响下对 DBP 的吸收情况,计算植株在各种抑制剂影响下对 DBP 的富集系数(BCF),以期从中找到合适的抑制剂来降低上海青对 DBP 的吸收,为治理土壤-作物系统中的 PAEs 污染提供一种新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 上海青青菜种子,购自南京绿领种业有限公司。

1.1.2 主要试剂 邻苯二甲酸二丁酯,上海安普实验科技股份有限公司,含量>98.5%;色谱纯乙腈,德国默克集团;乙酸乙酯($C_4H_8O_2$),德国默克集团;氯化钠(NaCl)氯化钡($BaCl_2$)、氯化钙($CaCl_2$),上海久亿化学试剂有限公司;无水硫酸镁($MgSO_4$),成都市科隆化学品有限公司;*N*-丙基乙二胺(PSA)、石墨化炭黑(GCB),天津博纳艾杰尔科技有限公司;甘油(Glycerol),广州赛国生物科技有限公司;氯化汞($HgCl_2$),山东西亚化学工业有限公司;9-CA,阿达玛斯试剂有限公司;4,4-二异硫氰酸基-2,2-二苯乙烯磺酸二钠(DIDS),梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;氯化四乙胺、2,4-二硝基苯酚(DNP),酷尔化学科技(北京)有限公司;乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、氯化钴($CoCl_2$)、碳酸氯间氯苯胺(CCCP),合肥博美生物科技有限责任公司。以上抑制剂利用合适的溶剂溶解成合适的浓度低温保存待用。

1.1.3 仪器设备 WH-3 微型漩涡混合仪,上海

沪西分析仪器厂有限公司;Centrifuge 5804R 型离心机,EPPENDORF 公司;JJ223BC 型电子天平,常熟市双杰测试仪器厂;Agilent Technologies 1200 高效液相色谱仪,美国安捷伦科技公司;KQ-600E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;IKA 型组织匀浆机,广州仪科实验室技术有限公司。

1.2 试验设计

向 50 mL 透明玻璃试管中加入 55 mL 的营养液[称取 1 g 花无缺全水溶性肥料(上海全美盛肥料科技有限公司),溶于 1 000 mL 纯净水中],并且配制成 DBP 质量浓度为 100 mg/L,同时分别加入各种抑制剂配制成以下浓度:水通道抑制剂包括 Glycerol 1 mmol/L 和 $HgCl_2$ 1 μ mol/L;阴离子通道抑制剂包括 9-CA 10 μ mol/L 和 DIDS 10 μ mol/L;钾离子通道抑制剂包括 $BaCl_2$ 5 mmol/L 和氯化四乙胺 5 mmol/L;钙离子通道抑制剂包括 EGTA 20 μ mol/L 和 $CoCl_2$ 20 μ mol/L;非选择性阳离子通道抑制剂为 $CaCl_2$ 10 mmol/L;代谢抑制剂包括 DNP 5 mmol/L 和 CCCP 5 mmol/L,以不加抑制剂为空白对照。供试植株为温室土壤培养下长势一致(3 叶 1 心)的上海青。将上海青从土壤中小心取出,尽量保持根部完整,清洗干净后分别移入含有以上浓度抑制剂的营养液中,在光照良好的条件下培养 24 h 后取出,用清水将根部洗净,样品经前处理后利用高效液相色谱(HPLC)法检测植株 DBP 含量,同时检测培养 24 h 后营养液的 DBP 含量,以此计算上海青在各种抑制剂作用下吸收 DBP 的富集系数。以上处理设 5 个重复,除营养液中抑制剂种类、浓度不同外,光照时间、光照度、温度、湿度等其他培养条件均保持一致。

1.3 DBP 的提取分析方法

由于植物中含有较多杂质,本试验采用最近研发的 QuEChERS 方法提取植物中的 DBP^[19],利用吸附剂来吸附样品中杂质,从而达到提取、净化的目的。将培养 24 h 后的植株整株清洗干净后晾干,置于组织匀浆机中加入液氮均匀打碎后,称取 1.0 g 样品置于 10 mL 玻璃具塞试管中,加入 3 mL 乙腈,超声 30 min 后,加入 1.0 g 氯化钠涡旋振荡 2 min,取 2 mL 上清液,加入 50 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA 和 30 mg GCB 进行净化,涡旋振荡 5 min,静置后取 1 mL 上清液,经 0.22 μ m 有机滤膜过滤后进行 HPLC 检测。营养液中 DBP 的提取方法较为简单,吸取 1 mL 营养液于 10 mL 玻璃试管中,加入 3 mL

乙酸乙酯,涡旋振荡 3 min,静置分层后,吸取 2 mL 上清液于 10 mL 玻璃离心管中,用氮气吹干后,用色谱纯乙腈定容至 2 mL,取 1 mL 经 0.22 μm 有机滤膜过滤后进行 HPLC 检测。HPLC 条件:色谱柱为 ZORBA \times SB-AQ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相为 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=85:15$;流速为 0.9 mL/min;检测波长为 225 nm;柱温为室温;进样量为 20 μL ;在上述条件下 DBP 的保留时间为 4.2 min。在该方法下植株的回收率为 83.1%,相对标准偏差(RSD)为 3.5%;水样的回收率为 91.5%,RSD 为 4.7%。

1.4 上海青富集系数计算方法

富集系数指的是生物体内污染物的平衡浓度与其生存环境中该污染物浓度的比值,是描述污染物在生物体内累积趋势的重要指标。本试验中上海青的生存环境可以认为是营养液,因此上海青对 DBP 的 BCF 等于植株 DBP 质量浓度与营养液 DBP 质量浓度的比值。计算公式为

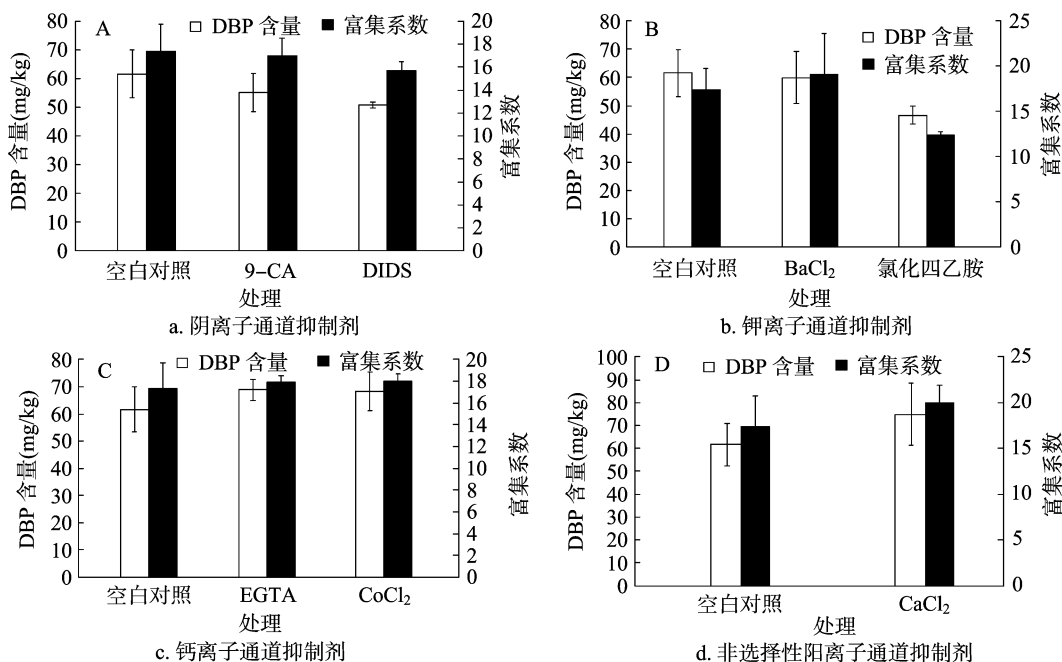
$$BCF = \frac{\text{植株 DBP 质量浓度}}{\text{营养液 DBP 质量浓度}}$$

2 结果与分析

2.1 添加离子通道抑制剂后上海青对 DBP 的吸收情况

离子通道是帮助植物调节生长发育、进行营养吸收和适应不良环境的重要部分^[20],不同的离子通

道抑制剂对离子通道的影响不尽相同。水培前将长势一致的 3 叶 1 心上海青取出,并利用 HPLC 法检测植株 DBP 含量,结果表明,植株中并没有 DBP 存在;水培 24 h 后对整株及营养液 DBP 含量进行检测并计算富集系数。从图 1 可以看出,9-CA、DIDS 对上海青吸收 DBP 的抑制程度分别为 10.6%、17.6%,9-CA、DIDS 的添加分别使上海青对 DBP 的富集系数降低了 2.2%、9.7%,但阴离子通道抑制剂对上海青吸收 DBP 的影响不显著。钾离子通道抑制剂 BaCl₂、氯化四乙胺对上海青吸收 DBP 的抑制程度分别为 2.7%、24.2%,添加 BaCl₂ 后上海青对 DBP 的富集系数提高了 9.8%,添加氯化四乙胺使上海青对 DBP 的富集系数降低了 28.5%,但它们对上海青吸收 DBP 的影响均不显著。钙离子通道抑制剂 EGTA、CoCl₂ 对上海青吸收 DBP 表现出激活作用,激活程度分别为 11.8%、10.8%;添加 EGTA、CoCl₂ 提高了上海青对 DBP 的富集系数,分别提高 3.0%、3.7%,但它们对上海青吸收 DBP 的影响不显著。非选择性阳离子通道抑制剂 CaCl₂ 对上海青吸收 DBP 同样表现出激活作用,激活程度为 21.6%,添加 CaCl₂ 使上海青对 DBP 的富集系数提高了 15.2%,但没有达到显著性水平。综合来看,在本研究中的水培条件下 DBP 并不是通过上面几种离子通道进入上海青体内的。



**, * 分别表示差异达到 0.01、0.05 显著水平,若未标星号,则表示无显著性差异每种抑制剂只与空白对照进行比较,其他处理之间不进行比较。图 2、图 3 同

图 1 添加离子通道抑制剂后上海青对 DBP 的吸收及富集系数

2.2 添加水通道抑制剂后上海青对 DBP 的吸收情况

水通道抑制剂 Glycerol、 HgCl_2 对上海青吸收 DBP 的抑制程度分别为 4.8%、7.7%，添加 Glycerol 后上海青对 DBP 的富集系数提高了 2.3%，添加 HgCl_2 使上海青对 DBP 的富集系数降低了 8.5%，它们对上海青吸收 DBP 的影响均不显著，而且富集系数也没有显著降低(图 2)，说明在本研究中的水培条件下 DBP 并不是通过水通道进入上海青体内的。

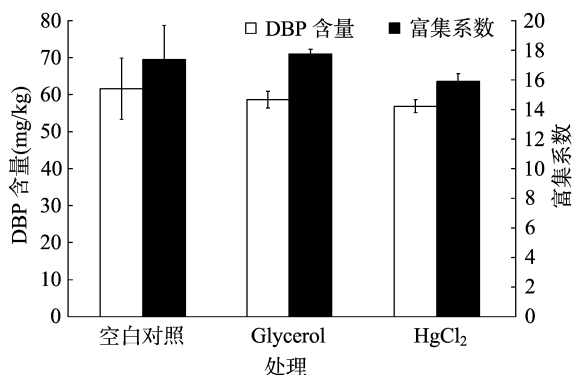


图2 添加水通道抑制剂后上海青对 DBP 的吸收及富集系数

2.3 添加代谢抑制剂后上海青对 DBP 的吸收情况

代谢抑制剂能够抑制机体产生 ATP，从而抑制需要能量的代谢的进行。从试验结果(图 3)可以看出，DNP、CCCP 对上海青吸收 DBP 的抑制程度分别为 69.6%、69.1%，DNP、CCCP 的添加分别使上海青对 DBP 的富集系数降低了 77.4%、95.2%。2 种代谢抑制剂都能够极显著地抑制上海青对 DBP 的吸收($P < 0.01$)，且 2 种代谢抑制剂的添加极显著降低了上海青对 DBP 的富集系数($P < 0.01$)。表明代谢抑制剂极显著地抑制了上海青根系对 DBP 的吸收，同时说明在本研究中的水培条件下上海青吸收 DBP 是一个依赖能量代谢的过程。

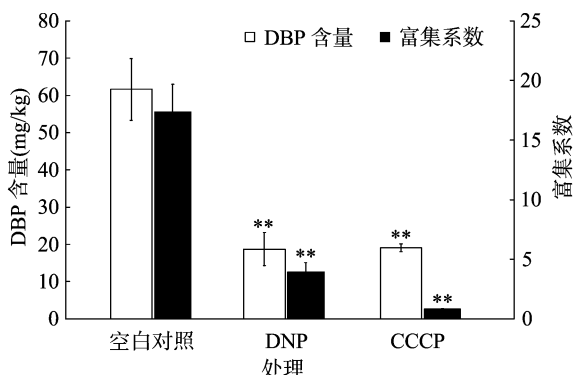


图3 添加代谢抑制剂后上海青对 DBP 的吸收及富集系数

3 讨论与结论

20 世纪 30 年代，樟脑球因为气味大、易挥发等

不足而被 PAEs 所取代^[21]，并且开始被大规模应用于工业生产^[3]，目前 PAEs 已经被认为是第 2 个全球性多氯联苯(PCB)污染物^[22]。为了防止 PAEs 的过度使用，我国于 2008 年开始实行“限塑令”，然而效果并不理想，至 2014 年 PAEs 产量已经高达 580 万 t，并且以每年 3.9% 的速度持续增长至今^[23]。而我国农田土壤也被检测到 PAEs 严重超标，土壤-作物系统在 PAEs 的污染下已经岌岌可危。

利用微生物降解土壤中的 PAEs，以缓解作物对其吸收是目前治理土壤-作物系统中 PAEs 的主要方法，目前已经有大量的降解菌在污染土壤、污水底泥等中被分离出来。金德才等分离的 JDC-11 能够在 DBP 浓度为 1 000 mg/L 的条件下 24 h 内完全降解 DBP^[24]。Feng 等从植物中分离到 1 株能在 5 d 内对 DBP 的降解率达到 82.5% 的内生菌 YJB3^[25]。

通过添加通道抑制剂来抑制植物对污染物的吸收的方法在近几年被大量运用。施翔研究发现，添加钙离子通道抑制剂和蛋白合成抑制剂后，盐肤木根系吸收的铅显著减少^[26]。张福祯发现，苹果酸、柠檬酸、草酸的添加以及钾离子的存在可显著促进单一抑制剂对水稻吸收铊的抑制作用^[27]。本研究结果表明，上海青对 DBP 的吸收并没有受到各种通道抑制剂的影响，说明在本研究中的水培条件下上海青对 DBP 的吸收并不依赖于这些通道。

DNP 和 CCCP 是非常典型的解偶联剂，它们能够使呼吸链中电子传递所产生的能量不能用于二磷酸腺苷(ADP)的磷酸化，而只能以热的形式散发，进而抑制 ATP 的形成，从而影响需要 ATP 参与的各种代谢。华海霞发现，添加 DNP 对水稻在硅浓度较低的培养液中吸收硅抑制效果比在硅浓度较高的培养液中更明显^[28]。马恒亮发现，添加 DNP 对培养液中吸收硅小麦吸收苯丙氨酸(PHE)有显著的抑制作用，且抑制作用随其浓度的增大而增强^[29]。本研究发现，DNP、CCCP 对上海青吸收 DBP 的抑制作用极强，并且可以看到，使上海青对 DBP 的富集系数极显著下降，说明在本研究中的培养条件下上海青对 DBP 吸收的主要途径是需要能量的。但吸收途径并非一成不变，不同的培养条件会导致不同的吸收途径，张联合等发现，在不同的 pH 值条件下水稻根系吸收亚硒酸盐的途径并不一致^[30]。关于不同培养条件下上海青对 DBP 的吸收途径还有待进一步研究。

治理和修复土壤—作物系统的 PAEs 污染对农产品质量安全以及人类健康有极其重要的意义。本研究发现,通过添加代谢抑制剂可以有效地降低上海青对土壤中 DBP 的吸收,结果可对 PAEs 污染土壤上的作物种植和植物修复提供新的研究思路。

参考文献:

- [1] 黄 艳,卞战强,田向红,等. 环境中邻苯二甲酸酯类化合物降解技术研究进展[J]. 环境与健康杂志,2010(7):654–657.
- [2] 任 仁. 警惕邻苯二甲酸酯污染[J]. 大学化学,2003,18(6):33–36.
- [3] Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans[J]. Clinica Chimica Acta,2005,361(1/2):20–29.
- [4] Stales C A, Peterson D R, Parkerton T F, et al. The environmental fate of phthalate esters; a literature review[J]. Chemosphere,1997,35(4):667–749.
- [5] Abdel daïem M M, Rivera – Utrilla J, Ocampo – Pérez R, et al. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies—a review[J]. Journal of Environmental Management,2012,109:164–178.
- [6] Guo Y, Kannan K. Comparative assessment of human exposure to phthalate esters from house dust in China and the United States[J]. Environmental Science & Technology,2011,45(8):3788–3794.
- [7] 胡 丹. 酞酸酯暴露、神经递质通路基因多态性及其交互作用与儿童注意缺陷多动障碍的关联研究[D]. 武汉:华中科技大学,2017.
- [8] 闻 福. 孕妇尿液中邻苯二甲酸酯含量与胎盘基因表达关系研究[D]. 天津:天津医科大学,2012.
- [9] 陈意良. DEHP 高/低累积水稻品种的根际环境差异及土壤吸附研究[D]. 广州:暨南大学,2016.
- [10] Xu X R, Li X Y. Adsorption behaviour of dibutyl phthalate on marine sediments[J]. Marine Pollution Bulletin,2008,57(6/7/8/9/10/11/12):403–408.
- [11] 李海潮,黄岁樑. 水环境中邻苯二甲酸酯的迁移转化研究[J]. 环境污染与防治,2006,28(11):853–858.
- [12] Zhao H M, Du H, Feng N X, et al. Biodegradation of di – n – butylphthalate and phthalic acid by a novel *Providencia* sp. 2D and its stimulation in a compost – amended soil [J]. Biology and Fertility of Soils,2015,52(1):65–76.
- [13] Zhao H M, Du H, Lin J, et al. Complete degradation of the endocrine disruptor di – (2 – ethylhexyl) phthalate by a novel *Agromyces* sp. MT – O strain and its application to bioremediation of contaminated soil [J]. The Science of the Total Environment,2016,562:170–178.
- [14] 文勤亮. 邻苯二甲酸酯污染土壤化学氧化修复技术的初步研究[D]. 南京:南京农业大学,2016.
- [15] Wu Z, Zhang X, Wu X, et al. Uptake of di (2 – ethylhexyl) phthalate (DEHP) by the plant *Benincasa hispida* and its use for lowering DEHP content of intercropped vegetables[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2013,61(22):5220–5225.
- [16] 宋广宇,代静玉,胡 锋. 邻苯二甲酸酯在不同类型土壤—植物系统中的累积特征研究[J]. 农业环境科学学报,2010,29(8):1502–1508.
- [17] 何龙飞,刘友良,沈振国,等. 植物离子通道特征、功能、调节与分子生物学[J]. 植物学通报,1999,16(5):517–525.
- [18] 戴松香,陈少良. 植物根细胞离子通道研究进展[J]. 北京林业大学学报,2005,27(3):98–103.
- [19] 严煌倩,李 勇,翟丽菲,等. 气相色谱—质谱法结合 QuEChERS 法快速检测青椒中 15 种邻苯二甲酸酯[J]. 江苏农业学报,2018,34(2):459–465.
- [20] Barbier – Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, et al. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role [J]. Biochimica et Biophysica acta,2000,1465(1/2):199–218.
- [21] Cirillo T, Fasano E, Castaldi E, et al. Children’s exposure to di (2 – ethylhexyl) phthalate and dibutylphthalate plasticizers from school meals [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(19):10532–10538.
- [22] 刘 敏,林玉君,曾 锋,等. 城区湖泊表层沉积物中邻苯二甲酸酯的组成与分布特征 [J]. 环境科学学报,2007,27(8):1377–1383.
- [23] Zhang Z M, Zhang H H, Zhang J, et al. Occurrence, distribution, and ecological risks of phthalate esters in the seawater and sediment of Changjiang River Estuary and its adjacent area [J]. The Science of the Total Environment,2018,619–620:93–102.
- [24] 金德才,梁任星,王洋洋,等. 一株 DBP 高效降解菌的筛选及其降解特性[J]. 中南大学学报(自然科学版),2010,41(1):8–14.
- [25] Feng N X, Yu J, Mo C H, et al. Biodegradation of di – n – butyl phthalate (DBP) by a novel endophytic *Bacillus megaterium* strain YJB3 [J]. The Science of the Total Environment,2018,616/617:117–127.
- [26] 施 翔. 盐肤木对铅的吸收累积及耐性机制 [D]. 北京:中国林业科学研究院,2017.
- [27] 张福祯. 水稻根系吸收重金属铊的初步机理研究 [D]. 广州:广州大学,2018.
- [28] 华海霞. 水稻对硅元素吸收特性研究 [J]. 安徽农业科学,2017,45(35):23–25.
- [29] 马恒亮. 多环芳烃(菲)跨小麦根系界面的传输机制 [D]. 南京:南京农业大学,2009.
- [30] 张联合,李友军,苗艳芳,等. pH 值对水稻离体根系吸收亚硒酸盐生理机制的影响 [J]. 土壤学报,2010,47(3):523–528.