

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150126002

常海伟, 任文杰, 刘鸿雁, 等. 磺化石墨烯对小麦幼苗生长及生理生化指标的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4): 123-128

Chang H W, Ren W J, Liu H Y, et al. Effect of sulfonated graphene on seedling growth and physiological and biochemical indices of wheat [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(4): 123-128 (in Chinese)

磺化石墨烯对小麦幼苗生长及生理生化指标的影响

常海伟^{1,2}, 任文杰², 刘鸿雁¹, 滕应^{2,*}, 李丽娜²

1. 贵州大学资源与环境工程学院, 贵阳 550025

2. 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008

收稿日期: 2015-01-26 录用日期: 2015-05-13

摘要: 随着石墨烯生产量和使用量的不断增大, 其对生态环境的风险逐渐引起了环境学家的关注。采用水培试验, 探究了磺化石墨烯(SGO)对小麦幼苗的生长、抗氧化酶活性及脂质过氧化的影响。结果表明: 在培养10 d后, 低浓度磺化石墨烯对小麦根系的生长有显著促进作用($P < 0.05$)。200 mg·L⁻¹浓度处理与对照处理相比提高了84.3%。随着浓度增加促进作用逐渐减弱, 1000 mg·L⁻¹时与对照相比提高了19.9%。但对小麦地上部的生长没有影响。磺化石墨烯处理的小麦幼苗根系和叶片组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)及丙二醛(MDA)都呈现先下降后上升的趋势。当磺化石墨烯浓度低于200 mg·L⁻¹时, 处理组小麦抗氧化酶的活性及MDA含量相对于对照处理大都有所降低, 说明低浓度时磺化石墨烯没有对小麦的生长产生氧化胁迫, 这与磺化石墨烯可能具有一定的抗氧化能力有关, 而高浓度时由于产生氧化胁迫使各项生理生化指标逐渐上升。本实验结果为石墨烯材料对植物的毒理学研究提供了基础数据。

关键词: 磺化石墨烯; 小麦; 抗氧化酶; MDA

文章编号: 1673-5897(2015)4-123-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of Sulfonated Graphene on Seedling Growth and Physiological and Biochemical Indices of Wheat

Chang Haiwei^{1,2}, Ren Wenjie², Liu Hongyan¹, Teng Ying^{2,*}, Li Lina²

1. College of Resource and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Received 26 January 2015 accepted 13 May 2015

Abstract: With the increasing consumption and production amount of graphene, its risk to ecological environment attracts growing concern of environmentalists. The effect of sulfonated graphene (SGO) on seedling growth, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation content of wheat was investigated based on hydroponic experiments. The results showed that sulfonated graphene at low concentrations significantly promoted wheat root length ($P < 0.05$) after culturing for 10 d. Compared to the control treatment, the root length was increased by 84.3% at a concentration of 200 mg·L⁻¹. However, the promotion effect gradually decreased as the concentration increased, and the root length was increased by 19.9% at a concentration of 1000 mg·L⁻¹. No obvious effect was observed on

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(No. 41401565)

作者简介: 常海伟, 男, 硕士研究生, 研究方向为环境化学, E-mail: chw1207818533@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yteng@issas.ac.cn

wheat shoot length. The activities of superoxide-dismutase (SOD) , catalase (CAT) , peroxidase (POD) and the content of malondialdehyde (MDA) in roots and leaves were decreased at first and then increased after 10 d. These indices at graphene concentrations below $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ were higher than those of the control treatment , indicating that sulfonated graphene did not generate oxidative stress at low concentrations , which may be due to the antioxidant capacity of sulfonated graphene. Sulfonated graphene generated oxidative stress at high concentrations , resulting in the increasing physiological and biochemical indices. These results have provided basic data for plant toxicology of graphene.

Keywords: sulfonated graphene; wheat; antioxidant enzymes; MDA

石墨烯(graphene) 是由碳原子 sp^2 杂化形成的具有二维结构的新型纳米材料^[1]。由于具有很高的机械强度、优异的导电性能、独特的光学特征和良好的电化学特性,故石墨烯可以广泛应用于电子、光学、医疗器械、化妆品、食品包装、水处理等各个行业^[2-4]。近年来,纳米产品正以每3年翻一番的速度增长,预计到2020年将达到3万亿的市场价值^[5],而石墨烯作为纳米材料中的佼佼者必将占据重要地位。随着石墨烯生产量和使用量的不断增大,不可避免地会进入到大气、水体和土壤等环境中,因此石墨烯对生态环境和人类健康的影响逐渐引起了环境学家的关注。

目前关于石墨烯对生态环境的效应研究主要集中在动物^[6-7]和细菌活性^[8-9]方面。已有报道指出,石墨烯由于具有强吸附能力和高化学活性,容易与有机体相互作用并引起组织损伤甚至细胞凋亡^[10]。植物是生态系统结构的重要组成部分和主要的初级生产者,因此研究石墨烯对植物的毒性以及环境效应至关重要。已有一些学者对石墨烯等纳米材料对植物的发芽率^[11]、根长、株高和代谢^[12]的影响展开了研究。研究结果表明不同浓度石墨烯、氧化石墨烯都能引起

细胞脂质过氧化进而导致机体受损死亡^[13]。但是随着纳米材料的种类、暴露时间、剂量,还有植物种类的不同,影响程度也会有所不同^[14]。磺化石墨烯(SGO) 是否同其他纳米材料一样具有相同的影响,目前还不得而知。本研究以小麦作为供试植物,分析了在不同浓度 SGO 胁迫下,小麦幼苗生长、抗氧化酶活性及丙二醛含量等指标的变化情况,了解 SGO 对小麦幼苗的毒性效应,从而为石墨烯的毒性评价、生态环境效应等提供科学依据和基础资料。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料与仪器

SGO 由苏州高通新材料有限公司提供,其扫描电镜图像如图1。从扫描电镜图像可见,其结构非常规整。

小麦种子购于南京农业大学神州种业公司,品种为南农9918。测定小麦幼苗生理生化指标的相关试剂盒和标准品购于南京建成生物工程研究所。NaCl、冰醋酸为分析纯,乙醇、NaOH 和 HNO_3 为优级纯,均购于南京博巧生物科技有限公司。实验用水为去离子水。

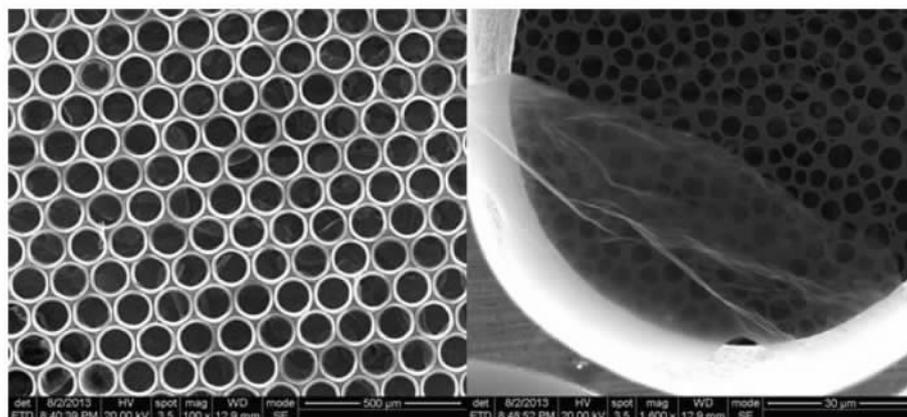


图1 磺化石墨烯(SGO) 的扫描电镜图像

Fig. 1 SEM image of sulfonated graphene (SGO)

实验仪器: 752 紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司), 人工气候恒温培养室, Allegra X-型高速离心机(贝克曼库尔特公司, 美国), KQ-300VDE 型超声波仪(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 实验处理

选取颗粒饱满、大小均匀的小麦种子, 经 3% 的 H_2O_2 水溶液表面消毒 10 min 后, 用去离子水充分冲洗。在 $(25 \pm 1)^\circ C$ 的培养箱中催芽 48 h。配制不同浓度(0、50、100、200、500、800、1 000 $mg \cdot L^{-1}$) 的 SGO 分散液, 分别取 50 mL 分散液于培养瓶中, 采用 $0.1 mol \cdot L^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 至 6.3 ~ 6.5 之间, 然后将定植篮放置于培养瓶中, 此时培养瓶中的 SGO 分散液刚好将定植篮浸没, 挑选芽长一致的种子均匀摆放于定植篮上。将培养瓶放置于智能光照培养室(光照强度 60% Lx, $25^\circ C$, 光照 10 h, 黑暗 14 h) 中进行培养。以不加 SGO 的处理作为对照, 每个处理设 3 个重复。每天补水至初始液面处, 震荡使得溶液混合均匀, 培养 10 d。

1.3 测定方法

1.3.1 生物量及根长、株高的测定

培养结束后, 用去离子水冲洗干净, 用吸水纸吸干植株表面水分。测定株高和根长, 称量鲜重, 然后将根和叶分开, 分别称量根部和地上部鲜重, 根据以下公式计算根冠比: 根冠比 = 根部鲜重(g) / 地上部鲜重(g)。

1.3.2 小麦抗氧化酶活性及丙二醛含量的测定

将一定量的植物地上部和根部分别置于液氮中速冻, 各加入体积为 9 倍于鲜重的生理盐水, 在冰浴中研磨, 冰水浴提取 20 min 后, 将得到的 10% 组织匀

浆液于 $4\ 000 r \cdot min^{-1}$ ($4^\circ C$) 离心 20 min, 上清液即可用于各指标的分析测定。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA) 等生理生化指标均严格按照试剂盒说明进行测定。

1.4 数据分析

实验结果以平均值 \pm 标准偏差表示。采用 SPSS19.0 软件, 以单因素方差分析(One way ANOVA) 对 SOD、POD、CAT 等酶的活性和 MDA 含量变化进行差异性分析, 并采用 Origin 软件绘图。

2 结果(Results)

2.1 SGO 对小麦幼苗生长的影响

如图 2 所示, 培养 10 d 后, 不同浓度 SGO 处理下, 小麦幼苗的根长均显著($P < 0.05$) 高于对照处理。当 SGO 浓度为 50 ~ 200 $mg \cdot L^{-1}$ 时, 各浓度处理之间小麦幼苗的根长没有显著差异, 200 $mg \cdot L^{-1}$ 处理时, 小麦幼苗根长最长, 相比于对照提高 84.3%; 而当 SGO 浓度为 200 ~ 1 000 $mg \cdot L^{-1}$ 时, 小麦幼苗的根长随着 SGO 浓度的增加而降低, 1 000 $mg \cdot L^{-1}$ 处理时, 小麦幼苗的根长相对对照提高了 19.9%。结果表明 SGO 在试验浓度范围能促进小麦根的伸长, 但浓度相对较高时, 这种促进作用会逐渐降低。然而各浓度处理的小麦幼苗地上部长度与对照相比无显著差异。

根冠比(root/shoot ratio) 是指植物地下部分与地上部分的鲜重或干重的比值。在农业生产过程中, 往往力求促进根系生长, 增大根冠比, 为作物幼苗期创造良好的营养条件。若根系生长受到促进(或阻碍), 根冠比往往会表现出升高(或下降)的趋势。如图 2 所示, 在各浓度 SGO 处理下, 小麦幼苗的根冠比与对照

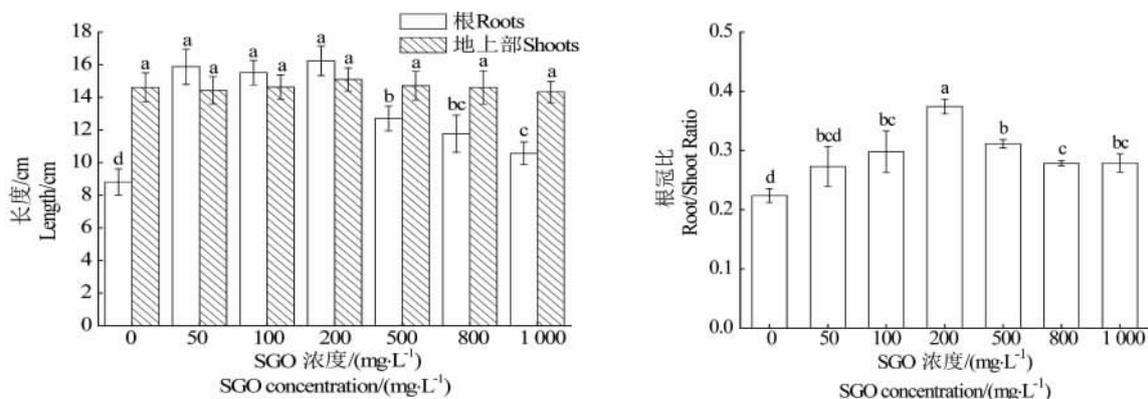


图 2 SGO 对小麦根长、株高及根冠比的影响

注: 不同字母表示不同处理间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 2 Effects of SGO on wheat root length, shoot length and root/shoot ratio

Note: Different letters indicate significance level ($P < 0.05$) between different treatments, the same below.

相比显著增大,随着SGO浓度的增加根冠比随之增加到 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大,后又随浓度的增加逐渐下降,这与小麦根长先增加后降低的趋势保持一致。

2.2 SGO对小麦幼苗SOD活性的影响

SOD是生物体内重要的抗氧化酶,能清除生物体内自由基,最先与 $\text{O}_2\cdot$ 发生作用,把 $\text{O}_2\cdot$ 歧化生成 H_2O_2 和 O_2 ,所以,SOD的诱导与植株体内 $\text{O}_2\cdot$ 的含量有着密切关系。经SGO处理10d后,在50和 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理下,根系SOD活性比对照分别显著提高了27.5%和12.3% ($P < 0.05$),其余各浓度处理与对照相比无明显差异。叶片中SOD活性随着SGO浓度的增加先降低后逐渐升高。与对照相比,当SGO浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时下降到最低为8.4%, $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时上升最高为19.2%。

2.3 SGO对小麦幼苗POD和CAT活性的影响

POD和CAT的反应底物都是 H_2O_2 ,能够清除

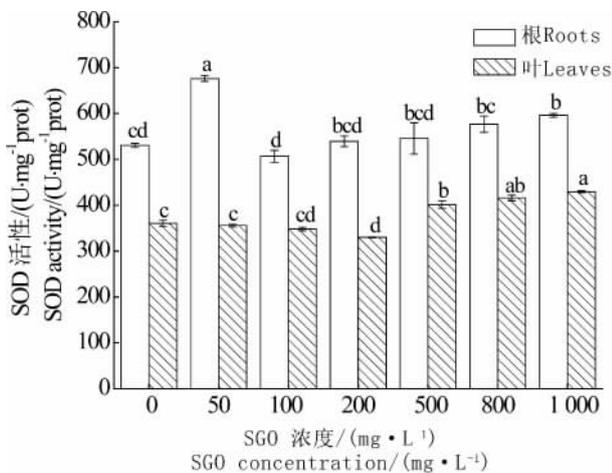
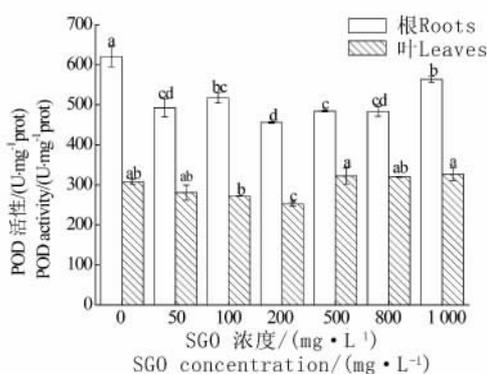


图3 SGO对小麦根系和叶片中SOD活性的影响

Fig. 3 Effect of SGO on SOD activities in wheat roots and leaves



植物体内产生的 H_2O_2 在抑制植物膜脂过氧化方面发挥着重要作用。它们的诱导说明植物体内产生了大量的 H_2O_2 ,使植物体处于氧化应激状态。从图4可以看出,各浓度处理幼苗的根系POD活性显著低于对照,SGO浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时降到最低(相对于对照降低了26.5%)。叶片中 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理的POD活性比对照显著降低了18.1%,其余处理与对照相比均无显著差异,根中CAT活性除 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度较对照处理显著提高24.5%,其余各浓度处理均无明显差异,而叶中CAT活性相对于对照先降低后又逐渐升高。就总体趋势来看,2种酶活性在低浓度时降低($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最低)后随浓度增大而升高。

2.4 SGO对小麦幼苗MDA含量的影响

当植物受到比较严重的胁迫时,大量活性氧(ROS)会超过抗氧化酶系统的清除能力,活性氧自由基就会在植物体内积累导致脂质过氧化损伤。而MDA是膜质过氧化作用的重要产物之一,它的含量可表示膜质过氧化作用的损伤程度。如图5所示,低浓度(小于 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时,根和叶中MDA含量逐渐降低,随着浓度的升高(大于 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),MDA含量又逐渐升高,但是与对照相比,各浓度处理均显著降低。

3 讨论(Discussion)

已有研究表明大部分纳米材料对植物生长具有毒害作用,而本研究结果与之相反。在所试浓度范围内,SGO能够明显促进小麦根系生长,增大根冠比,当浓度大于 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随浓度增大促进作用逐渐减弱,而地上部分与对照处理相比没有显著差异(图1)。这可能是由于SGO只是吸附到根系表面,

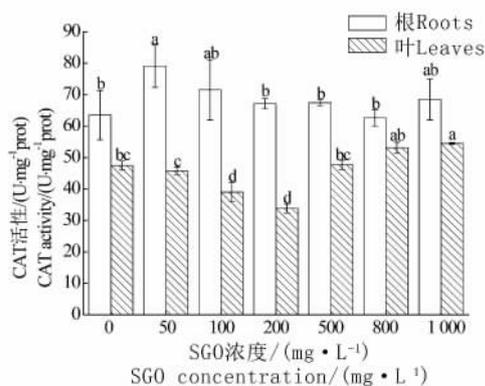


图4 SGO对小麦根系和叶片中POD和CAT活性的影响

Fig. 4 Effect of SGO on POD and CAT activities in wheat roots and leaves

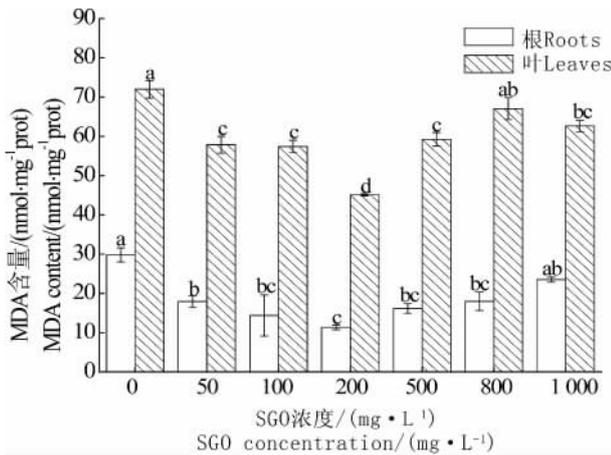


图5 SGO对小麦根系和叶片中MDA含量的影响

Fig. 5 Effect of SGO on MDA in wheat roots and leaves

因为植物的细胞壁和凯氏带对SGO进入细胞起阻碍作用。根系表面吸附的SGO可能会刺激根细胞的水通道蛋白,促进细胞吸水,提高细胞的含水量进而促进根细胞的各种代谢^[15-16]。在幼苗凯氏带尚未形成时,可能有少量SGO通过细胞壁孔隙进入根细胞并经导管转移到地上部^[17],但不足以对叶片生长产生影响,SGO进入细胞时由于机械力破坏了细胞壁膜结构导致细胞持水量增加^[18],因而也能促进根系细胞的伸长。Wang等^[19]的研究也发现氧化多壁碳纳米管(o-MWCNTs)能够显著促进根区细胞的伸长并增加脱氢酶的活性进而促进小麦根系的快速生长。

目前,有关纳米材料的毒性机制可能是纳米材料引起的氧化胁迫和脂质过氧化,从而导致细胞膜破坏、DNA损伤甚至是细胞死亡^[20-21]。大多数纳米材料在生物体外(内)能产生活性氧诱发氧化压力导致生物体内各种代谢失衡,而机体在外界胁迫下会产生应激反应保护机体不受损伤。本研究中抗氧化酶活性和丙二醛含量与对照相比均有先下降后上升的趋势。低浓度时(除50 mg·L⁻¹)SOD活性有下降趋势(图2),说明低浓度SGO对小麦不仅没有产生氧化胁迫,而且营造了一种更适宜的生长条件,这可能由于SGO具有一定抗氧化活性,能在一定程度上消除活性氧自由基^[22]。高浓度时小麦根和叶中SOD活性都有了显著提高,证明此时已有活性氧在组织中积累,诱导提高SOD活性清除体内过多的活性氧维持体内正常代谢。POD和CAT都能有效清除SOD与O₂^{·-}歧化生成的H₂O₂,降低植株体内H₂O₂的含量。当50 mg·L⁻¹时根中CAT活性随SOD

活性提高而提高,因为SOD歧化产生大量的H₂O₂会诱导CAT活性增加,从而抵御H₂O₂对组织的损害。而此时POD活性没有进一步提高,可能是因为CAT最先作用于H₂O₂,使H₂O₂的含量下降到了正常水平。低浓度时POD和CAT(除50 mg·L⁻¹)的活性逐渐下降,其原因可能是O₂^{·-}和H₂O₂一起与CAT和POD反应形成复合物或是分别与其形成复合物,这些钝化形式在一定程度上能抑制酶的活性^[23]。而随着浓度增加,POD和CAT活性又逐渐上升,说明此时小麦体内有过多的H₂O₂产生,大量过氧化氢诱导编码基因产生活性更高的CAT和POD调控胁迫水平^[24]。SGO高浓度时小麦体内抗氧化酶均有升高,但还不至于使小麦产生毒性反应。这点也可以从所测MDA含量得到证实。试验中不同浓度处理的MDA含量均明显低于对照处理(图4),进一步表明试验浓度范围内SGO没有引起植物的脂质过氧化损伤。这和试验中未观察到小麦叶片出现发黄死亡的现象相一致。

本实验结果表明,SGO胁迫对小麦的生长及酶活性产生了一定的影响,但对于不同浓度SGO对植物产生不同效应的内在机理还不是很清楚,这将是今后研究的重点。

致谢:感谢苏州高通新材料有限公司为本研究免费提供磺化石墨烯。

通讯作者简介:滕应(1975-),男,土壤学博士,研究员,主要从事污染土壤环境过程与生物修复、污染土壤微生物生态与风险评估、土壤污染化学生物学等方面研究。

参考文献(References):

- [1] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. *Science*, 2004, 306: 666-669
- [2] Ji L, Chen W, Xu Z, et al. Graphene nanosheets and graphite oxide as promising adsorbents for removal of organic contaminants from aqueous solution [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2013, 42(1): 191-198
- [3] Zhang W X, Elliott D W. Applications of iron nanoparticles for ground water remediation [J]. *Remediation*, 2006, 16: 7-21
- [4] Klaine S J, Alvarez P J, Batley G E, et al. Critical review—Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(9): 1825-1851

- [5] Roco M C , Mirkin C A , Hersam M C. Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020 [R]. New York: Springer , Science Policy Reports , 2011
- [6] Yang K , Gong H , Shi X , et al. In vivobiodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration [J]. *Biomaterials* , 2013 , 34(11) : 2787 – 2795
- [7] Zhang X , Yin J , Peng C , et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration [J]. *Carbon* , 2011 , 49 (3) : 986 – 995
- [8] Akhavan O , Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria [J]. *ACS Nano* , 2010 , 4 (10) : 5731 – 5736
- [9] Liu S , Zeng T H , Hofmann M , et al. Antibacterial activity of graphite , graphite oxide , grapheme oxide , and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress [J]. *ACS Nano* , 2011 , 5(9) : 6971 – 6980
- [10] Begum P , Fugetsu B. Induction of cell death by graphene in *Arabidopsis thaliana* (Columbiaecotype) T87 cell suspensions [J]. *Journal of Hazardous Materials* , 2013 , 260: 1032 – 1041
- [11] Begum P , Ikhtiar R , Fugetsu B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage , tomato , red spinach , and lettuce [J]. *Carbon* , 2011 , 49: 3907 – 3919
- [12] Naser A , Anjum N S , Manoj K S , et al. Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. *Science of the Total Environment* , 2014 , 472: 834 – 841
- [13] Amedea B , Seabra A J , Paula R L , et al. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide [J]. *Chemical Research in Toxicology* , 2014 , 27(2) : 159 – 168
- [14] Melissa A , MaurerJan L , Gunsolus Catherine J , et al. Toxicity of engineered nanoparticles in the environment [J]. *Analytical Chemistry* , 2013 , 85: 3036 – 3049
- [15] Horie T , Kaneko T , Sugimoto G , et al. Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots [J]. *Plant and Cell Physiology* , 2011 , 52 (4) : 663 – 675
- [16] Hove R M , Bhavé M. Plant aquaporins with non-aqua functions: Deciphering the signature sequences [J]. *Plant Molecular Biology* , 2011 , 75(4) : 413 – 430
- [17] Nowack B , Buchel T D. Occurrence , behavior and effects of nanoparticles in the environment [J]. *Environmental Pollution* , 2007 , 150(1) : 5 – 22
- [18] Akhavan O , Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria [J]. *ACS Nano* , 2010 , 4(10) : 5731 – 5736
- [19] Wang X P , Han H Y , Liu X Q , et al. Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticumaestivum*) plants [J]. *Journal of Nanoparticle Research* , 2012 , 14: 841 – 851
- [20] Gill S S , Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiology Biochemistry* , 2010 , 48(12) : 909 – 930
- [21] Anjum N A , Ahmad I , Mohmood I , et al. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review [J]. *Environmental and Experimental Botany* , 2012 , 75: 307 – 324
- [22] Cyren M R , Jie H , Maria I M , et al. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: A study involving antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging [J]. *Environmental Science & Technology* , 2013 , 47(11) : 5635 – 5642
- [23] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* , 1999 , 50: 601 – 639
- [24] Wei X L , Ge Z Q. Effect of graphene oxide on conformation and activity of catalase [J]. *Carbon* , 2013 , 60: 401 – 409

◆