

生物质炭对邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯污染土壤中黄瓜幼苗生理特性的影响

李贞霞^{1,2,*}, 李瑞静¹, 穆娟¹, 杨志龙¹, 孙帅¹, 严云¹, 王广印^{1,2}

¹河南科技学院园艺园林学院, 河南新乡453003

²河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心, 河南新乡453003

摘要: 以黄瓜品种‘津优1号’为试材, 研究利用生物质炭改善邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(diethyl hexyl phthalate, DEHP)污染土壤时, 对黄瓜幼苗生理特性的影响。结果表明DEHP污染土壤施入生物质炭可以改善DEHP对细胞膜的伤害, 施入1%和2%生物质炭对黄瓜幼苗细胞膜稳定性的影响优于0.5%生物质炭。生物质炭可以提高黄瓜叶片SOD活性和叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量, 降低叶片POD和APX活性, 对CAT的影响以0.5%生物质炭最显著。施入生物质炭对叶绿素荧光参数 F_v/F_m 无显著影响, 但0.5%和1%生物质炭可以显著改善DEHP污染对 q_p 、NPQ和 Φ_{PSII} 的影响。灰色关联度分析结果表明, 生物质炭和DEHP都是从影响光合色素的合成开始, 进而影响NPQ和抗氧化酶系统, 最后引起细胞膜的稳定性和叶绿素荧光特性的改变。综合分析利用生物质炭改善DEHP污染土壤时, 1%生物质炭的效果优于0.5%和2%生物质炭。同时也表明, 农田施用生物质炭时必须评估其对作物的风险。

关键词: 生物质炭; 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯; 黄瓜; 抗氧化酶; 叶绿素荧光

生物质炭(biochar)是指将生物质材料经过高温厌氧热解而制成的含碳丰富的固体物质。自20世纪末期生物质炭在亚马逊腹地被发现以来, 生物质炭在环境工程、环境管理、土壤管理、气候变化应对等领域得到广泛的研究和应用, 已成为农业可持续发展研究的重要前沿领域(刘晓雨等2018)。生物质炭能够改善土壤理化性状(Hagner等2016)、修复污染土壤(郭彦蓉等2015)、降低农田温室气体排放(葛晓改等2016)、增加作物产量(Liu等2013)等。深入研究发现土壤施加生物质炭除了有正面的积极效应, 还可能存在负面的消极效应(Mukherjee和Lal 2014; Viger等2015)。生物质炭施入土壤后, 一方面会改变土壤理化性状、微生物类群等, 另一方面也会影响植物的生理生化特性。但目前生物质炭对植物生理生化特性方面的研究很少, 且长期被忽视(刘铭龙等2017)。

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(diethyl hexyl phthalate, DEHP)是邻苯二甲酸酯类(phthalate esters, PAEs)中的一种, 广泛用于农膜和塑料中的添加剂。和大多数PAEs一样, DEHP在农膜和塑料等使用过程中会随着水滴雾滴等释放到土壤中, 对农田土壤造成污染(刘庆等2012)。DEHP污染是PAEs污染的重要类型, 是亟需优先控制的环境污染物

(Wang等2003)。我国农田土壤DEHP污染普遍存在(王凯荣等2013), 是一个被忽视的健康风险点, 据统计, 我国5~11岁年龄段儿童DEHP的摄入量是欧洲水平的4倍, 摄入量高的主要原因来自其对设施蔬菜的消费(Zhang等2018)。设施农田中DEHP污染的存在, 一方面会促使蔬菜对DEHP的富集吸收(李晓贝等2018), 另一方面也会影响植物的生理特性(张颖等2014)。目前人们尝试了物理方法(沙滤、混凝和吸附等)、化学方法(化学氧化、光化学氧化和光催化法)、生物方法(植物修复和微生物修复)等方法去除土壤DEHP污染(杨婧2018)。随着生物质炭研究应用的崛起, 利用生物质炭改善设施农田也得到广泛的应用(肖婧等2018)。

黄瓜是我国设施农业生产中的主要蔬菜作物之一, 在长期的设施栽培过程中, 因设施农田土壤连作障害、土壤污染等因素而造成产量降低、品质下降, 严重影响了黄瓜的经济效益和食用安全。黄瓜是喜欢吸收积累DEHP污染物的蔬菜之一(傅小伟

收稿 2019-09-01 修定 2019-12-06

资助 河南省大宗蔬菜产业技术体系建设项目(S2010-03-G06)、河南省科技厅基础与前沿项目(142300410140)和河南省大学生创新创业训练计划项目(201810467009)。

* 通讯作者(lizhenxia196@163.com)。

2012)。He等(2016)研究认为生物质炭对土壤DEHP生物有效性的影响取决于土壤有机碳含量和生物炭类型,但无论在低有机碳土壤还是高有机碳土壤,生物质炭的施用都会降低小白菜(*Brassica chinensis*)嫩芽中DEHP含量;王建超等(2016)的研究也发现施用生物质炭可以显著降低花生(*Arachis hypogaea*)植株各器官对DEHP的富集。但在DEHP污染存在的情况下,施入生物质炭对植物生理特性影响的研究还鲜见报道。为此,本试验主要研究在DEHP污染存在的前提下,生物质炭对黄瓜幼苗细胞膜稳定性、抗氧化酶活性及叶片光合荧光特性的影响,以期为生物质炭对设施作物生理特性影响、DEHP污染治理及生物质炭的合理应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种为‘津优1号’,培育单位为鲁蔬种业,购自河南省新乡市牧野种子经销部。DEHP购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度大于99%。

供试土壤采自河南科技学院校园;土壤pH 8.1,采用玻璃电极法(土水比1:2.5)测定;土壤碱解氮含量 $52.41 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用扩散法测定;有机质 $9.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用油溶法测定;速效磷 $28.63 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用碳酸氢钠比色法测定;速效钾 $139.38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用醋酸铵提取火焰光度法测定;以上测定均参考鲍士旦(2008)《土壤农化分析》方法。

小麦(*Triticum aestivum* L.)秸秆采自河南科技学院试验田;将秸秆室温自然风干,用粉碎机粉碎,过1 mm筛,过筛后分别装入50 mL的陶瓷坩埚中,装满后压实,盖上盖子置于马弗炉于 500°C 下进行厌氧热解,升温速率 $20^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,热解过程持续4 h,制成生物炭,待自然冷却后取出备用;生物炭pH 10.63,按炭:水比为1:5搅拌过滤测定;生物炭元素成分采用Optima 2100pv电感耦合等离子发射光谱仪(美国PE仪器有限公司)测定,其有益元素Ca、K、Mg、Na含量分别为1 182.81、2 002.34、434.38、77.85 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,有害元素Pb、Zn、Cr含量分别为0.13、5.46、0.58 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;灰分含量 $252.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用直接灰化法;全氮 $10.89 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用奈氏比色法(鲍士旦2008)。

1.2 试验方法

污染土壤制备:设置4个DEHP污染水平(0、10、20和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);将一定量DEHP溶于丙酮溶剂中,配成总浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙酮溶液,将DEHP丙酮溶液按设计的污染水平添加到供试土壤中,待丙酮彻底挥发干净后,充分混匀备用。

试验设置4个生物质炭处理,分别为不添加生物质炭、添加0.5% (炭土比)生物质炭、添加1%生物质炭和添加2%生物质炭。每个生物质炭处理均含有DEHP污染的4个水平。称取50 g混合有DEHP的土壤于育苗穴盘中放置2 d,待丙酮彻底挥发后混入相应的生物质炭;黄瓜种子浸种后置于人工气候培养箱中 28°C 下暗培养,露白后播种于处理好的土壤中。盆栽试验用硬质塑料营养钵栽培,黄瓜幼苗置于日光温室培养架上培养,控制夜温不低于 15°C ,昼温不高于 30°C ,每天观察幼苗长势,平均每2 d浇一次水,每个组合设置5个重复,培养3周后进行各项指标的测定。

1.3 测定项目

细胞膜稳定系数:用相对电导率表示,取新鲜叶片0.2 g,剪碎后放入试管,加10 mL去离子水,在室温下放置3 h使叶片充分吸水后测定溶液电导率(R_1);再放入恒温水浴锅中在 100°C 沸水浴中煮20 min,用冷水冷却到室温后测定溶液电导率(R_2);细胞膜稳定系数($\%$)= $(1-R_1/R_2) \times 100$ (杜静2016)。

抗氧化酶测定:取叶片加入预冷的Hepes缓冲溶液研磨; 4°C 条件下,12 000 $\times g$ 离心20 min,上清液用于抗氧化酶活性测定;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性参照Giannopolitis和Ries (1997)的方法测定;过氧化物酶(peroxidase, POD)活性参照Herzog和Fahimi (1973)的方法测定;过氧化氢酶(catalase, CAT)活性参照Aebi (1984)的方法测定;抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性参照Nakano和Asada (1981)的方法测定。

叶绿素含量测定:取新鲜叶片0.2 g,剪碎混匀后,加入10 mL混合提取液(乙醇:丙酮:水=4.5:4.5:1,体积比),于黑暗中浸提24 h,然后采用分光光度计进行比色(王学奎2006)。

叶绿素荧光参数的测定:采用yaxin-1611G叶绿素荧光仪测定植株叶片的叶绿素荧光参数;暗

适应20 min后, 测定叶片的初始荧光(F_0)、最大荧光产量(F_m)、PSII的最大光化学效率(F_v/F_m)、PSII实际光化学量子产量(Φ_{PSII})、光化学猝灭系数(q_p)和非光化学猝灭系数(NPQ)。光化光强度为280 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 饱和脉冲光强为2 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 脉冲时间1.0 s。

1.4 数据处理

所有处理为完全随机设计, 所有数据均采用DPS7.55及Microsoft Excel 2010软件进行方差分析、相关分析、灰色关联度分析及作图, 采用Duncan氏新复极差法进行多重比较($P<0.05$)。

2 实验结果

2.1 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗细胞膜相对稳定性的影响

不施生物质炭和施入0.5%生物质炭时各DEHP处理组合细胞膜稳定系数差异不显著, 与之相比, 施入1%和2%生物质炭各处理组合细胞膜稳定系数显著提高(图1)。分析发现, 不施生物质炭时随着DEHP浓度的增大细胞膜稳定系数降低, 二者呈显著负相关($r=0.962\ 3$, $P<0.05$), 说明DEHP对黄瓜幼苗细胞膜造成了损伤。DEHP污染土壤施入生物质炭可以改善DEHP对黄瓜细胞膜造成的伤害, 提高细胞膜稳定系数, 以1%和2%浓度效果最好。

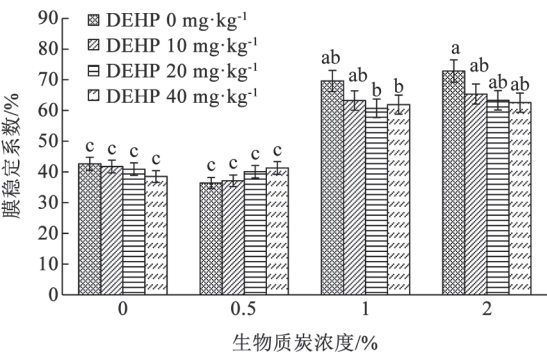


图1 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗细胞膜稳定系数的影响
Fig.1 Effect of biochar on cell membrane stability index of cucumber seedlings in DEHP contaminated soil
不同小写字母表示各处理组合间差异显著($P<0.05$), 下同。

2.2 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗抗氧化酶系统的影响

由图2-A可知, 黄瓜在未受DEHP污染的土壤中成长时, 叶片SOD活性在生物质炭浓度1%时最高; DEHP含量10、20和40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, SOD活性在生物质炭浓度2%时最高。分析不施入生物质炭时SOD活性随DEHP含量的变化发现, SOD活性与DEHP含量呈正相关, 但相关系数不显著($r=0.901\ 9$, $P>0.05$)。分析DEHP含量10、20和40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 随生物质炭含量的变化趋势发现二者呈显著正相关($P<0.05$), 相关系数分别为0.973 0、0.961 7和0.957 9。说明DEHP污染土壤施入生物质炭提高了黄瓜幼苗SOD活性。

不施入生物质炭时POD活性随DEHP含量的增大呈下降趋势, 呈显著负相关($r=0.965\ 9$, $P<0.05$), 但各处理POD活性显著高于生物质炭浓度为0.5%、1%和2%。说明DEHP污染会降低黄瓜幼苗POD活性, 生物质炭的施入也会降低POD活性, 二者的共同作用使POD活性降得更低(图2-B)。

不施入生物质炭时各DEHP处理CAT活性无显著差异。生物质炭施入量0.5%时CAT活性显著高于生物质炭施入量为0、1%和2%的相应处理组合的CAT活性。说明生物质炭浓度0.5%时显著提高了CAT活性(图2-C)。

由图2-D可知, DEHP含量为0时, APX活性随生物质炭含量的增加而降低, 呈显著负相关($r=0.952\ 6$, $P<0.05$); DEHP含量10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, APX活性随生物质炭含量的增加也呈降低趋势, 但相关性不显著($r=0.892\ 2$, $P>0.05$); DEHP含量20和40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 生物质炭浓度为0.5%时APX活性最高。说明生物质炭可以降低APX活性, 0.5%处理时APX活性高于1%和2%。

2.3 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗光合色素的影响

不施入生物质炭时各DEHP处理的叶绿素a含量无显著差异。但DEHP含量为0时, 随生物质炭浓度的增大叶绿素a含量增加, 二者呈显著正相关($r=0.965\ 8$, $P<0.05$); DEHP含量在10、20和40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 叶绿素a含量也随生物质炭量的增大而增加, 但相关性不显著。说明DEHP会影响叶绿素

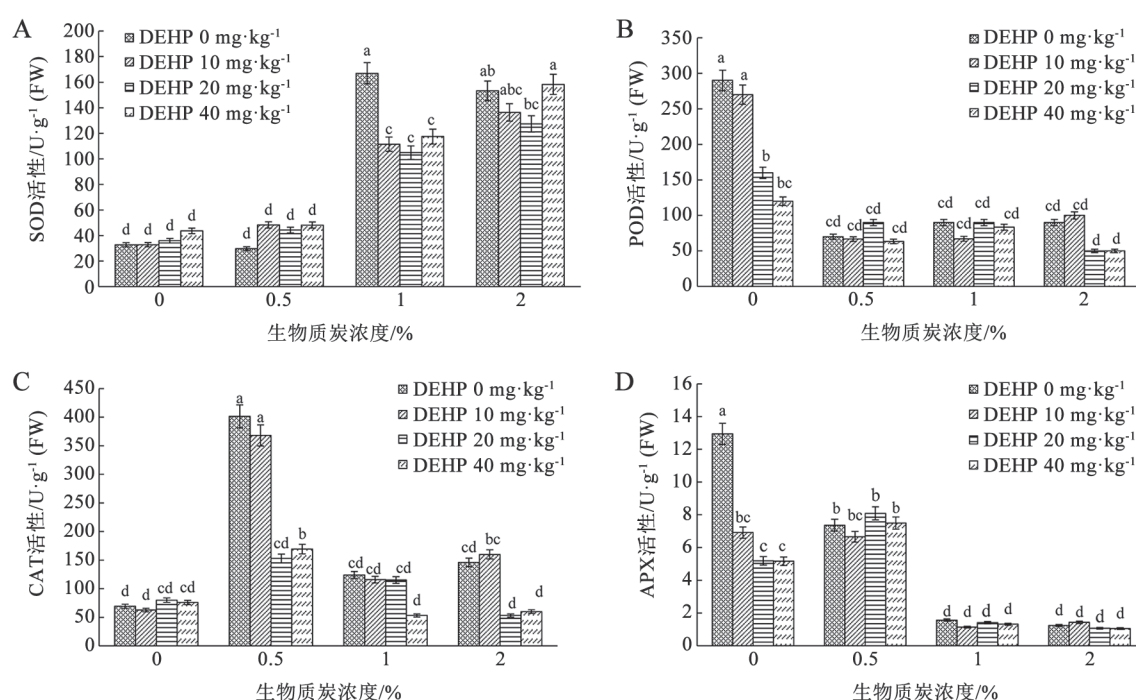


图2 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗抗氧化酶的影响

Fig.2 Effect of biochar on antioxidantase of cucumber seedlings in DEHP contaminated soil

a含量的变化, 生物质炭的施入会增加叶绿素a含量(图3-A)。

由图3-B可知, DEHP含量在0、10和20 mg·kg⁻¹时, 生物质炭浓度为1%时叶绿素b含量显著高于0、0.5%和2%; 而0.5%和2%浓度又显著高于不施加生物质炭处理。说明生物质炭的施入显著提高了黄瓜叶片叶绿素b含量, 且以生物质炭含量1%效果最好。

不施入生物质炭而DEHP含量在10 mg·kg⁻¹时, 类胡萝卜素含量最高, 这与叶绿素a的变化相似。DEHP含量在10、20和40 mg·kg⁻¹时, 随生物质炭浓度的增加类胡萝卜素含量增加, 二者呈正相关($P < 0.05$), 相关系数分别为0.984 1、0.974 6和0.989 3。说明DEHP污染土壤施入生物质炭可以显著增加黄瓜叶片类胡萝卜素含量(图3-C)。

2.4 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗叶绿素荧光特性的影响

F_0 是PSII反应中心处于完全开放时的荧光产量。由图4-A可知, 生物质炭施入量为0、0.5%和1%时各DEHP处理 F_0 差异不显著。施用2%生物质

炭后, DEHP含量10、20和40 mg·kg⁻¹时, F_0 显著高于其他处理。而0.5%生物质炭处理的 F_0 最低。说明DEHP污染土壤施入生物质炭在低含量(0.5%)可以降低 F_0 , 而高含量(2%)可以升高 F_0 。

F_m 是PSII反应中心处于完全关闭时的荧光产量。不含DEHP时, 1%生物质炭处理的 F_m 最高; DEHP含量10、20和40 mg·kg⁻¹时, 0.5%生物质炭处理与不施生物质炭的处理相比 F_m 差异不显著, 而1%和2%的 F_m 会基本维持或稍有升高(图4-B)。

F_v/F_m 是PSII最大光化学量子产量, 反映PSII反应中心内禀光能转换效率。由图4-C可知, 各生物质炭处理在DEHP处理间 F_v/F_m 有轻微波动, 但差异都不显著。说明生物质炭和DEHP对 F_v/F_m 都无显著影响。

q_p 是光化学猝灭系数, 是PSII天线色素吸收的光能用于光化学电子传递的比率。由图4-D可知, 不施入生物质炭时 q_p 随DEHP含量的增大而逐渐降低, 呈负相关($r = -0.965 5$, $P < 0.05$); 说明DEHP污染可以降低 q_p , 且降低的量随DEHP的量增大而增大。生物质炭的施入量在0.5%和1%时可以升高 q_p , 而2%处理显著降低了 q_p 。

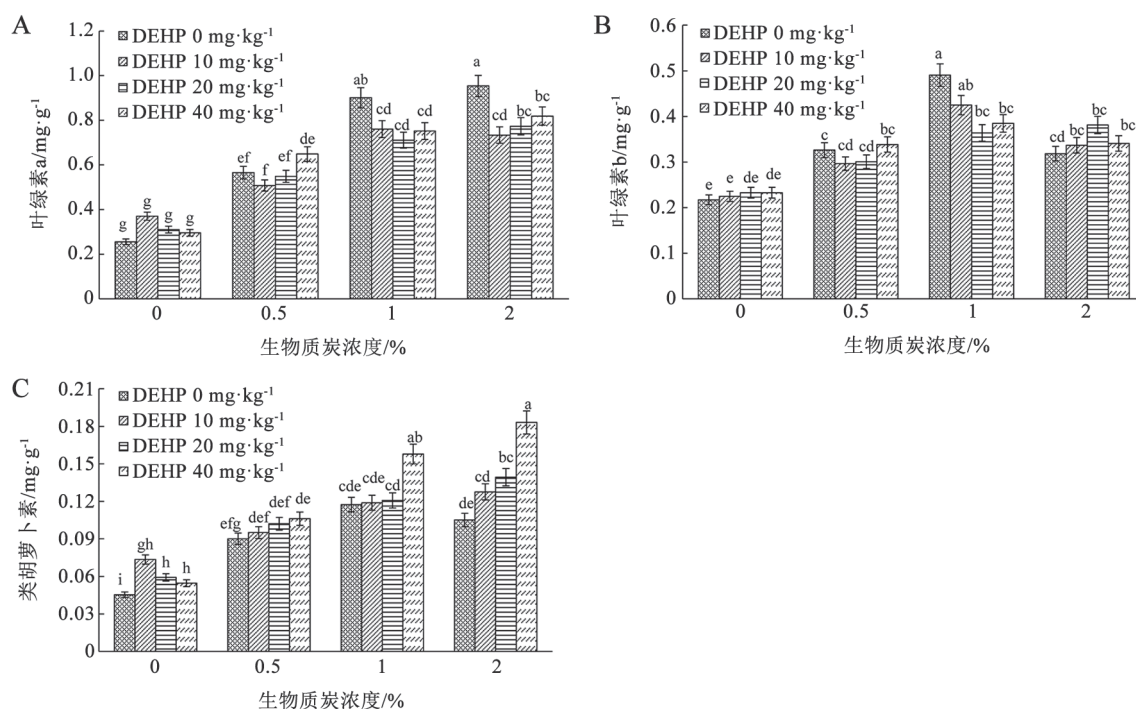


图3 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗光合色素含量的影响

Fig.3 Effect of biochar on photosynthetic pigment content of cucumber seedlings in DEHP contaminated soil

NPQ是非光化学猝灭系数, 是PSII天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而以热能形式耗散掉的部分。由图4-E可知, 不施入生物质炭时, DEHP含量为40 mg·kg⁻¹的NPQ显著低于10和20 mg·kg⁻¹ DEHP处理, 说明DEHP对NPQ有低促高抑效应。生物质炭施入量1%时, DEHP含量为40 mg·kg⁻¹的NPQ较DEHP含量在10和20 mg·kg⁻¹时有升高趋势。但生物质炭施入量2%时各处理NPQ又显著低于不施加、0.5%和1%。

Φ_{PSII} 反映在照光条件下PSII反应中心部分关闭时的实际原初光能捕获效率。不施入生物质炭时 Φ_{PSII} 随DEHP含量的增加而降低, 说明DEHP可以抑制 Φ_{PSII} 。施入0.5%和1%生物质炭后各DEHP处理 Φ_{PSII} 显著高于不施入生物质炭, 而施入2%生物质炭的各DEHP处理 Φ_{PSII} 显著低于不施入生物质炭, 这与NPQ的趋势一致。说明高浓度的生物质炭(2%)降低了黄瓜叶片对其吸收的过剩光能的耗散能力, PSII反应中心实际的电子传递效率降低, 预示着叶片光合机构失活或破坏; 而适当浓度的

生物质炭(1%、0.5%)可以提高叶片热耗散能力与实际电子传递效率(图4-F)。

2.5 生物质炭和DEHP与黄瓜幼苗生理指标的灰色关联度分析

由表1可知, 与生物质炭关联系数在0.70以上的生理指标有3个, 分别为类胡萝卜素、叶绿素a和叶绿素b; 与生物质炭关联系数在0.66以上的生理指标有6个, 分别为NPQ、POD、APX、SOD、CAT和膜稳定系数; 与生物质炭关联系数在0.64以上的生理指标有5个, 分别为 q_p 、 F_0 、 Φ_{PSII} 、 F_v/F_m 和 F_m 。说明生物质炭对黄瓜幼苗的影响首先从光合色素的合成上开始, 光合作用时叶绿素荧光系统的NPQ升高, 清除光合色素吸收的过剩光能, 引起抗氧化酶系统做出反应, 影响到细胞膜稳定性与叶绿素荧光特性。

与DEHP关联系数在0.70以上的指标有3个, 分别为类胡萝卜素、叶绿素b和叶绿素a; 与DEHP关联系数在0.66以上的指标有4个, 分别为SOD、NPQ、POD和APX; 与DEHP关联系数在0.62以上

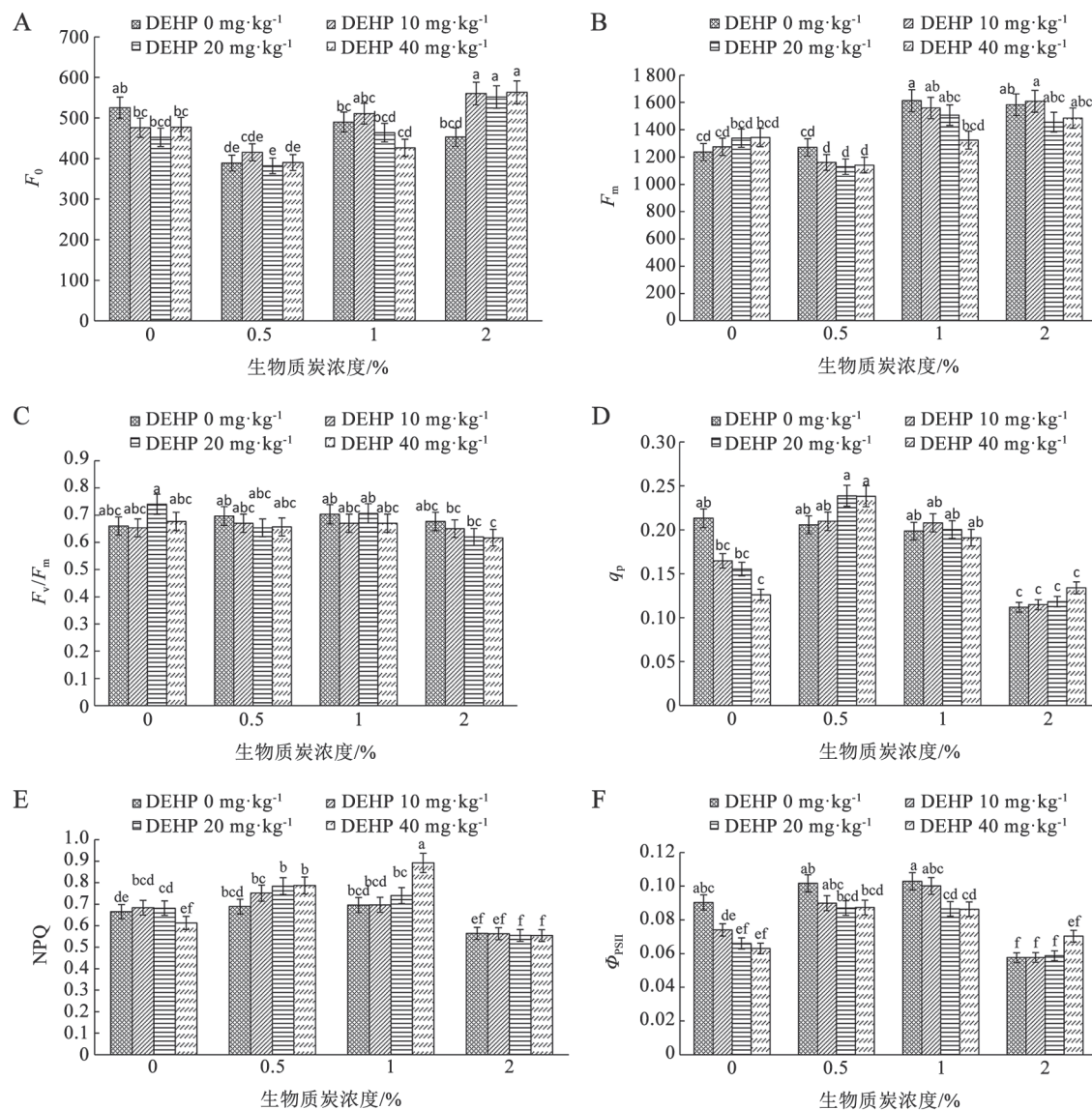


图4 生物质炭对DEHP污染土壤中黄瓜幼苗叶绿素荧光特性的影响

Fig.4 Effect of biochar on chlorophyll fluorescence characteristics of cucumber seedlings in DEHP contaminated soil

的指标有7个, 分别为膜稳定系数、 F_0 、CAT、 Φ_{PSII} 、 q_p 、 F_v/F_m 和 F_m ; 说明DEHP污染对黄瓜幼苗的影响首先也从光合色素的合成上开始, 紧接着抗氧化酶系统和NPQ升高, 清除自由基和吸收的过剩光能, 影响到细胞膜的稳定性和叶绿素荧光特性。生物质炭和DEHP与黄瓜幼苗生理指标的关联度有微小差异, 但总体趋势一致。

3 讨论

在DEHP污染土壤中施入生物质炭可以改善

DEHP对黄瓜幼苗细胞膜造成的伤害; 这与Farhan-gi-Abriz和Torabian (2017)研究盐胁迫下生物炭对大豆幼苗渗透调节的结论有一致性。分析原因可能与生物质炭的表面性质有关, 生物质炭有丰富的孔隙和巨大的表面积及丰富的含氧官能团, 能够很好地吸附有机污染物, 减少植物对有机污染物的吸收(张小凯等2013), 从而减少或改善DEHP对植物的伤害; 所以在生物质炭高施量(1%和2%)条件下, 黄瓜幼苗的细胞膜稳定性要高于0.5%和未施加时。本试验结果发现DEHP污染会破坏细

表1 生物质炭和DEHP含量与黄瓜幼苗生理指标的灰色关联度分析

Table 1 Grey correlation analysis of biochar and DEHP content with physiological indexes of cucumber seedlings

生物质炭			DEHP		
指标	关联系数	排序	指标	关联系数	排序
类胡萝卜素	0.746 3	1	类胡萝卜素	0.755 7	1
叶绿素a	0.720 9	2	叶绿素b	0.711 1	2
叶绿素b	0.714 9	3	叶绿素a	0.703 0	3
NPQ	0.684 7	4	SOD	0.686 5	4
POD	0.682 0	5	NPQ	0.684 6	5
APX	0.680 6	6	POD	0.666 5	6
SOD	0.673 3	7	APX	0.661 2	7
CAT	0.668 7	8	膜稳定系数	0.655 7	8
膜稳定系数	0.660 0	9	F_0	0.655 4	9
q_p	0.648 4	10	CAT	0.648 2	10
F_0	0.647 0	11	Φ_{PSII}	0.644 1	11
Φ_{PSII}	0.645 9	12	q_p	0.639 0	12
F_v/F_m	0.643 5	13	F_v/F_m	0.636 3	13
F_m	0.641 3	14	F_m	0.628 2	14

胞膜的稳定性, 这个结论支持了张颖等(2014)的研究结果。

本实验结果证实了DEHP污染土壤添加生物质炭可以显著提高黄瓜幼苗的叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素的含量。这一方面可能与生物质炭含有大量作物需要的营养元素, 施入土壤后培肥了地力有关; 另一方面说明生物质炭施入DEHP污染土壤后, DEHP污染物被生物质炭吸附固定, 其生物有效性降低。现有研究表明生物质炭对有机污染物的吸附机理主要包括分配作用、表面吸附和孔隙截留三种(李晓娜等2017)。土壤中DEHP与生物质炭的吸附作用可能是这三种方式共同作用的结果。DEHP不溶于水, 但能溶于大多数有机物中, 而生物质炭含有脂肪双键、氧化态碳以及芳香族结构(罗煜等2013); DEHP与生物质炭可以通过氢键、 π 键、离子偶极键等作用结合, 从而被分配或表面吸附在生物质炭的相应结合位点上; DEHP也可以扩散进生物质炭的内部空隙结构中, 被生物质炭的空隙截留, 从而降低其生物有效性。

本试验中较高浓度生物质炭(1%和2%)提高了黄瓜幼苗SOD活性, 降低了POD活性。这与王晓维等(2016)探讨生物质炭缓解油菜(*Brassica campestris*)铜污染研究中, 无铜污染胁迫下生物质

炭处理的效应有一致性。也支持了李杰等(2018)研究生物质炭与氮肥配施时, 生物质炭含量2%不施氮肥处理, SOD活性显著高于生物质炭与氮肥配施的结论。提示农田中生物质炭的高量施入会造成植物的氧化应激反应。对本试验不施生物质炭的各DEHP处理的SOD活性进行方差分析发现, DEHP为40 mg·kg⁻¹时SOD活性显著高于0、10和20 mg·kg⁻¹, 而0、10和20 mg·kg⁻¹之间差异不显著; 这与常青等(2008)利用细沙和营养液研究DEHP (0~20 mg·kg⁻¹)对蚕豆(*Vicia faba*)幼苗SOD活性的影响有一致性; 提示DEHP对抗氧化酶系统的影响有剂量效应。

生物质炭处理会显著影响黄瓜叶绿素荧光参数, 这与Lyu等(2016)研究干旱胁迫下生物质炭对秋子梨(*Pyrus ussuriensis*)叶绿素荧光特性的影响有相似之处; 但上述研究认为生物质炭可以显著增加 F_v/F_m , 这与本试验观察到的情况不一致。我们发现, 在无DEHP胁迫时, 生物质炭的处理浓度对 F_v/F_m 的影响差异不显著, 与Thomas等(2013)在研究生物质炭对两种植物叶绿素荧光参数 F_v/F_m 的影响结论具有一致性。张守仁(1999)认为 F_v/F_m 在非胁迫条件下变化极小, 不受物种和生长条件的影响, 胁迫条件下该参数明显下降, 本试验结果支持了该结论。

本试验结果表明DEHP污染土壤施入生物质炭可以改善DEHP对细胞膜的伤害, 提高黄瓜叶片SOD活性和叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量, 降低叶片POD和APX活性, 显著影响叶绿素荧光参数的变化。本研究结论期待为DEHP污染治理及生物质炭的合理应用提供科学依据。

参考文献(References)

- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. Method Enzymol, 105: 121–126
- Bao SD (2008). Soil and Agricultural Chemistry Analysis. Beijing: China Agriculture Publishing House (in Chinese). [鲍士旦(2008). 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社]
- Chang Q, Zheng Y, Gao NN, et al (2008). Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on micronucleus and superoxide dismutase of seedling of *Vicia faba*. Asian J Ecotoxicol, 3 (6): 596–600 (in Chinese with English abstract) [常青, 郑宇铎, 高娜娜等(2008). 邻苯二甲酸二乙基己酯对蚕豆根尖微核及幼苗超氧化物歧化酶的影响. 生态毒理学报, 3 (6): 596–600]
- Du J (2016). Proteome and physiological mechanisms of improved $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress tolerance of cucumber seedlings by exogenous spermidine (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [杜静(2016). 外源亚精胺提高黄瓜幼苗 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫耐性的蛋白质和生理机制研究. 南京: 南京农业大学]
- Farhangi-Abriz S, Torabian S (2017). Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. Ecotox Environ Safe, 137: 64–70
- Fu XW (2012). DEHP contamination of vegetables and the influence factors corresponding various pollution sources (dissertation). Hangzhou: Zhejiang Gongshang University (in Chinese with English abstract) [傅小伟(2012). 蔬菜DEHP污染状况及污染成因研究(学位论文). 杭州: 浙江工商大学]
- Ge XG, Zhou BZ, Xiao WF, et al (2016). Priming effect of biochar addition on soil carbon emission: A review. Ecol Environ Sci, 25 (2): 339–345 (in Chinese with English abstract) [葛晓改, 周本智, 肖文发等(2016). 生物质炭输入对土壤碳排放的激发效应研究进展. 生态环境学报, 25 (2): 339–345]
- Giannopolitis CN, Ries SK (1997). Superoxide dismutase in higher plants. Plant Physiol, 59: 309–314
- Guo YR, Zeng H, Liu YS, et al (2015). The application of biochar in organic polluted soil. Soils, 47 (1): 8–13 (in Chinese with English abstract) [郭彦蓉, 曾辉, 刘阳生等(2015). 生物质炭修复有机物污染土壤的研究进展. 土壤, 47 (1): 8–13]
- Hagner M, Kemppainen R, Jauhiainen L, et al (2016). The effects of birch (*Betula* spp.) biochar and pyrolysis temperature on soil properties and plant growth. Soil Till Res, 163: 224–234
- He L, Fan S, Müller K, et al (2016). Biochar reduces the bioavailability of di-(2-ethylhexyl) phthalate in soil. Chemosphere, 142: 24–27
- Herzog V, Fahimi H (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydroxyl donor. Anal Biochem, 55: 554–562
- Li J, Wu R, Shang JT, et al (2018). Effects of combined application of biochar and nitrogen fertilizer on photosynthetic pigment and protective enzyme of millet. J Shanxi Agric Sci, 46 (3): 383–386 (in Chinese with English abstract) [李杰, 吴荣, 尚晶涛等(2018). 生物质炭与氮肥配施对谷子光合色素和保护酶的影响. 山西农业科学, 46 (3): 383–386]
- Li XB, Zhang T, Zhou CY, et al (2018). Absorption and accumulation of di-*n*-butyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and metabolites in four vegetables. J Agric Resour Environ, 35 (1): 87–94 (in Chinese with English abstract) [李晓贝, 张腾, 周昌艳等(2018). 四种蔬菜对DBP和DEHP及其代谢物的吸收累积研究. 农业资源与环境学报, 35 (1): 87–94]
- Li XN, Song Y, Jia MY, et al (2017). A review of researches on biochar adsorbing organic contaminants and its mechanism. Acta Pedol Sin, (6): 3–15 (in Chinese with English abstract) [李晓娜, 宋洋, 贾明云等(2017). 生物质炭对有机污染物的吸附及机理研究进展. 土壤学报, (6): 3–15]
- Liu ML, Liu XY, Pan GX (2017). Advance in effect of biochar on plant phenotype and gene expression. Plant Nutr Fert Sci, 23 (3): 789–798 (in Chinese with English abstract) [刘铭龙, 刘晓雨, 潘根兴(2017). 生物质炭对植物表型及其相关基因表达影响的研究进展. 植物营养与肥料学报, 23 (3): 789–798]
- Liu Q, Yang HJ, Shi YX, et al (2012). Research progress on phthalate esters (PAEs) organic pollutants in the environment. Chin J Eco-Agric, 20 (5): 968–975 (in Chinese with English abstract) [刘庆, 杨红军, 史衍玺等(2012). 环境中邻苯二甲酸酯类(PAEs)污染物研究进展. 中国生态农业学报, 20 (5): 968–975]
- Liu X, Zhang A, Ji C, et al (2013). Biochar's effect on crop productivity and the dependence on experimental conditions—a meta-analysis of literature data. Plant Soil, 373: 583–594
- Liu XY, Bian RJ, Lu HF, et al (2018). Biochar for sustainable soil management: biomass technology and industry from soil perspectives. Bull Chin Acad Sci, 33 (2): 184–190 (in

- Chinese with English abstract) [刘晓雨, 卞荣军, 陆海飞等(2018). 生物质炭与土壤可持续管理: 从土壤问题到生物质产业. 中国科学院院刊, 33 (2): 184–190]
- Luo Y, Zhao LX, Meng HB, et al (2013). Physio-chemical characterization of biochars pyrolyzed from miscanthus under two different temperatures. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 29 (13): 208–217 (in Chinese with English abstract) [罗煜, 赵立欣, 孟海波等(2013). 不同温度下热裂解芒草生物质炭的理化特征分析. 农业工程学报, 29 (13): 208–217]
- Lyu S, Du G, Liu Z, et al (2016). Effects of biochar on photosystem function and activities of protective enzymes in *Pyrus ussuriensis* Maxim. under drought stress. *Acta Physiol Plant*, 38: 220
- Mukherjee A, Lal R (2014). The biochar dilemma. *Soil Res*, 52: 217–230
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22 (5): 867–880
- Thomas SC, Frye S, Gale N, et al (2013). Biochar mitigates negative effects of salt additions on two herbaceous plant species. *J Environ Manag*, 129: 62–68
- Viger M, Hancock RD, Miglietta F, et al (2015). More plant growth but less plant defence? First global gene expression data for plants grown in soil amended with biochar. *GCB Bioenergy*, 7: 658–672
- Wang JC, Rao XX, Zhou ZF (2016). Effects of biochar on absorption and accumulation of phthalic acid esters in peanut plants. *Acta Agric Boreali-Sin*, 31: 329–333 (in Chinese with English abstract) [王建超, 饶潇潇, 周震峰(2016). 施用生物炭对花生产量及吸收累积邻苯二甲酸酯的影响. 华北农学报, 31: 329–333]
- Wang JL, Ye YC, Wu WZ (2003). Comparison of di-*n*-methyl-phthalate biodegradation by free and immobilized microbial cells. *Biomed Environ Sci*, 16: 126–132
- Wang KR, Cui MM, Shi YX (2013). Phthalic acid esters (PAEs) pollution in farmland soils: A review. *Chin J Appl Ecol*, 24 (9): 2699–2708 (in Chinese with English abstract) [王凯荣, 崔明明, 史衍玺(2013). 农业土壤中邻苯二甲酸酯污染研究进展. 应用生态学报, 24 (9): 2699–2708]
- Wang XK (2006). Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [王学奎(2006). 植物生理生化试验原理和技术. 北京: 高等教育出版社]
- Wang XW, Xu JC, Sun DQ, et al (2016). Effects of biochar on chlorophyll and protective enzyme activity of rape seedlings in red soil under copper stress. *J Agro Environ Sci*, 35 (4): 640–646 (in Chinese with English abstract) [王晓维, 徐健程, 孙丹平等(2016). 生物炭对铜胁迫下红壤地油菜苗期叶绿素和保护性酶活性的影响. 农业环境科学学报, 35 (4): 640–646]
- Xiao J, Wang CJ, Huang M, et al (2018). Meta-analysis of biochar application effects on soil fertility and yields of fruit and vegetables in greenhouse. *Plant Nutr Fert Sci*, 24 (1): 228–236 (in Chinese with English abstract) [肖婧, 王传杰, 黄敏等(2018). 生物质炭对设施大棚土壤性质与果蔬产量影响的整合分析. 植物营养与肥料学报, 24 (1): 228–236]
- Yang J (2018). Characterization of phthalate-degrading bacterial strain and its application in phthalate-contaminated soil (dissertation). Guangzhou: South China University of Technology (in Chinese with English abstract) [杨婧(2018). 邻苯二甲酸酯降解菌的降解特性与土壤应用研究(学位论文). 广州: 华南理工大学]
- Zhang SR (1999). A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance. *Chin Bull Bot*, 16 (4): 444–448 (in Chinese with English abstract) [张守仁(1999). 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. 植物学通报, 16 (4): 444–448]
- Zhang XK, He LZ, Lu KP, et al (2013). Use of biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants: A Review. *Soils*, 45 (6): 970–977 (in Chinese with English abstract) [张小凯, 何丽芝, 陆扣萍等(2013). 生物质炭修复有机物污染土壤的研究进展. 土壤, 45 (6): 970–977]
- Zhang Y, Duan SW, Wang L, et al (2014). A comparative study of leaf ultrastructure and physiological changes of cucumber seedlings grown under stress of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *J Agro Environ Sci*, 33 (9): 1706–1711 (in Chinese with English abstract) [张颖, 段淑伟, 王蕾等(2014). 黄瓜发育早期对邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)胁迫的亚显微结构及生理响应比较研究. 农业环境科学学报, 33 (9): 1706–1711]
- Zhang YX, Huang B, Thomesen M, et al (2018). One overlooked source from phthalate exposure - Oral intake of vegetables produced in plastic greenhouses in China. *Sci Total Environ*, 642: 1127–1135

Effects of biochar on physiological characteristics of cucumber seedlings in diethyl hexyl phthalate contaminated soil

LI Zhenxia^{1,2,*}, LI Ruijing¹, MU Juan¹, YANG Zhilong¹, SUN Shuai¹, YAN Yun¹, WANG Guangyin^{1,2}

¹College of Horticulture and Landscape, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China

²Henan Province Engineering Research Center of Horticultural Plant Resource Utilization and Germplasm Enhancement, Xinxiang, Henan 453003, China

Abstract: In the present study, the cucumber ‘Jinyan No.1’ as test material, we investigated the effects of biochar on physiological characteristics of cucumber seedlings in soils contaminated with diethyl hexyl phthalate (DEHP). The results showed that biochar could remit the damage of DEHP on cell membrane, and the effects of 1% and 2% biochar were better than that of 0.5% biochar. Biochar could improve the activity of SOD and contents of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid, reduce activities of POD and APX in leaves. The most significant influence on CAT activity was 0.5% biochar. Treatment with biochar had no significant effects on chlorophyll fluorescence parameters F_v/F_m . While, 0.5% and 1% biochar treatment can significantly relieve the effects of DEHP pollution on q_p , NPQ and Φ_{PSII} . Grey correlation analysis indicated that biochar and DEHP firstly influenced the photosynthetic pigment synthesis, then affected NPQ and antioxidant enzyme system, finally caused changes of cell membrane stability and chlorophyll fluorescence. Comprehensive analysis showed the effects of 1% biochar treatment on cucumber seedlings in DEHP contaminated soil was better than 0.5% and 2% biochar. At the same time, risk assessment on crops was very necessary when biochar was applied to farmland.

Key words: biochar; diethyl hexyl phthalate (DEHP); cucumber; antioxidant enzyme; chlorophyll fluorescence

Received 2019-09-01 Accepted 2019-12-06

This work was supported by Henan Province Construction Project for Bulk Vegetable Industry Technical System (S2010-03-G06), Basic and Frontier Project of Henan Science and Technology Department (142300410140) and Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Henan Province (201810467009).

*Corresponding author (lizhenxia196@163.com).