

## 六价铬污染对水车前叶片生理生化及 细胞超微结构的影响

徐勤松, 施国新, 杜开和

(南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097)

**摘要:** 以培养在铬(VI)浓度梯度的污水中6 d的水车前为实验材料, 分析了叶绿素含量和抗氧化酶系统的变化, 并用透射电镜观察了叶细胞超微结构的损伤。实验结果表明: (1) 叶绿素含量在0.1 mg/L浓度达到最高, 而后下降。而可溶性蛋白则一直成下降趋势; (2) SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)、CAT(过氧化氢酶)活性影响明显; 三者分别在0.1 mg/L、10 mg/L、和1 mg/L处理浓度有抗性峰出现, 随处理浓度的继续增大则下降; (3) 对超微结构造成不可逆损伤, 特别是对叶绿体、线粒体和细胞核: 叶绿体膨胀, 被膜破裂和消失, 叶绿体解体; 线粒体脊突膨胀和空泡化; 细胞核变形, 染色质凝集和核质解体, 核膜破裂。并根据实验结果初步讨论了重金属对植物的毒害机制。

**关键词:** 水车前; 铬; 污染; 生理生化; 超微结构

**中图分类号:** Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)01-0092-05

## Effects of Cr (VI) on physiological and ultrastructural changes in leaves of *Ottelia alismoides* (L.) Pers

XU Qin-song, SHI Guo-xin, DU Kai-he

(College of life science, Nanjing Normal university, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** *Ottelia alismoides* (L.) Pers was cultivated in water medium polluted with Cr (VI) of different gradient concentration for 6 days. Chlorophyll content and antioxidant enzyme systems changes were analyzed and the ultrastructural damages of leaf cells were observed using electron microscopy. The conclusion showed that: (1) chlorophyll content reached the highest point at 0.1 mg/L concentration and decreased afterward, while soluble protein content decreased with the increasing of cultural concentration; (2) Cr (VI) had a bad effect on the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT); they had a resistant peak at 0.1, 10, and 1 mg/L respectively and decreased afterward; (3) Cr (VI) induced non-reversible damage of ultra-structure, especially of the chloroplast, mitochondria and nucleus. That was the swelling of chloroplast, disruption and disappearance of chloroplast membrane, disintegration of chloroplast at last; the swelling of cristae of mitochondria and vacuotation of mitochondria; deforming of nucleus, agglutination of chromatin of nucleus, de-

**收稿日期:** 2000-10-08

**作者简介:** 徐勤松(1976-), 男, 山东临朐人, 在读硕士研究生, 主要研究重金属污染水对水生植物的毒害影响。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(编号: 39770046)

struction of nucleoplasm and disruption of nuclear membrane. The toxic mechanism of heavy metals was discussed primarily on the base of experimental consult.

**Key words:** *Ottelia alismoides* (L.) Pers; Cr (VI); pollution; physiology and chemistry; ultrastructure

重金属干扰了许多人体和其他生物体内的必不可少的酶的活性,并且在水生生态系统中由于生物放大作用而常常使重金属毒害问题复杂化<sup>[1]</sup>。因此,如何监测水环境中的重金属污染、对及时治理具有重要意义。

铬(VI)作为工业“五毒”之一,是一种毒性较大的致畸、致突变剂<sup>[2]</sup>,前人详细研究了它对种子萌发、细胞分裂和染色体的影响<sup>[3,4]</sup>。而关于对水生植物尤其是对沉水植物的影响的报道则较少,本文即以沉水植物水车前(*Ottelia alismoides*(L.)Pers)为材料,系统研究了铬(VI)对它生理生化的影响及细胞超微结构的损伤,以探讨重金属对植物的毒害机理,也为水环境污染的监测和治理提供有价值的参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

水车前(*Ottelia alismoides* (L.) Pers.),又称水带菜,属于水鳖科,采自江苏胜浦镇。

### 1.2 实验方法

将实验材料放在大玻璃缸(20 L)中用蒸馏水驯化培养,7 d后选取状态一致、大小相当的植株,移种在含  $K_2Cr_2O_7$ (AR)的培养液中,浓度梯度为 0.1、1、10、50、100 mg/L(以纯 Cr 计),另设对照为 0。培养第 6 d,分析生理生化指标并观察超微结构的损伤。

**1.2.1 酶液的制备** 将叶片放在加了适量 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8)的研钵中,冷冻研磨,10 000 g 离心 20 min,上清液分析 SOD、POD、CAT 活性和可溶性蛋白含量的变化。

**1.2.2 叶绿素含量的测定** 分光光度法<sup>[5]</sup>。单位:mg/g·FW。

**1.2.3 叶片 SOD 活性的测定** 化学比色法,按从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒的顺序测定。单位:NU/g·FW。

**1.2.4 叶片 POD 活性的测定** 愈创木酚法<sup>[6]</sup>。单位:470 nm/min.g·FW。

**1.2.5 叶片 CAT 活性的测定** 一般分光光度法,按

从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒的顺序测定。单位:U/g·FW。

**1.2.6 可溶性蛋白含量的测定** 考马斯亮蓝染色法<sup>[6]</sup>、以结晶牛血清清蛋白为标准,测 595 nm 处光吸收。单位:mg/g·FW。

**1.2.7 叶细胞超微结构的电镜观察** 处理第 6 天,取拳卷幼叶,用 2.5%戊二醛和 2%锇酸双重固定,丙酮系列脱水,Epon 812 包埋,LKB 超薄切片机切片,切片经醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色,于 Hitachi 600-A-2 型透射电镜下观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 铬污染对叶绿素含量的影响

从图 1 看出,低浓度(0.1~1 mg/L)对叶绿素的合成有刺激作用,0.1 mg/L 处理达到最高点,随污染浓度的增大对叶绿素的破坏程度也增大,表现为叶绿素含量下降比较明显,100 mg/L 处理使含量仅为对照的 17%。

### 2.2 铬污染对叶片 SOD 活性的影响

SOD 活性在 0.1 mg/L 处理处有一抗性峰出现,而后下降,100 mg/L 处理使 SOD 活性下降了 35.61%(图 2)。

### 2.3 铬污染对叶片 POD 活性的影响

POD 活性从 0.1~10 mg/L 处理呈上升趋势,随浓度的继续增加则呈下降趋势(图 3)。

### 2.4 铬污染对叶片 CAT 活性的影响

CAT 活性在 1 mg/L 处理有一抗性高峰,50 mg/L 处理使酶活性降为对照的 4.2%,浓度增大为 100 mg/L 时则几乎测不出酶活性(图 4)。

### 2.5 铬污染对可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白含量随处理浓度的增大一直呈下降趋势,100 mg/L 处理使含量降为对照的 24.2%(图 5)。

### 2.6 铬污染对叶细胞超微结构的损伤

**2.6.1 叶绿体** 叶绿体是植物细胞中较大的细胞器,正常叶细胞中的叶绿体通常为椭圆形,基粒类囊体片层堆叠整齐紧密,与间质类囊体相连,被膜完整(图版 I:1)。0.1~1 mg/L 处理的叶绿体无明显

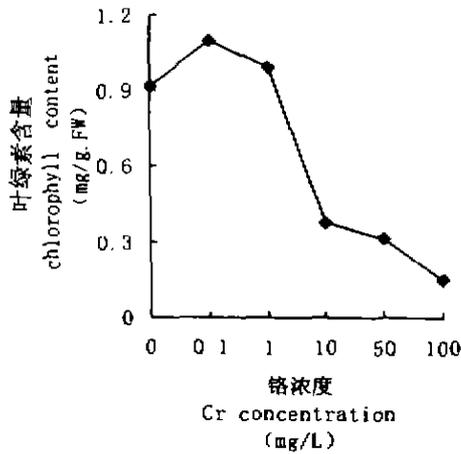


图 1 铬污染对叶绿素含量的影响  
Fig. 1 Effect of (VI) on chlorophyll content

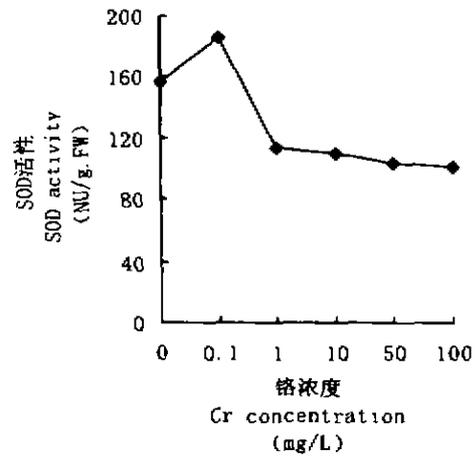


图 2 铬污染对 SOD 活性的影响  
Fig. 2 Effect of Cr (VI) on activity of SOD

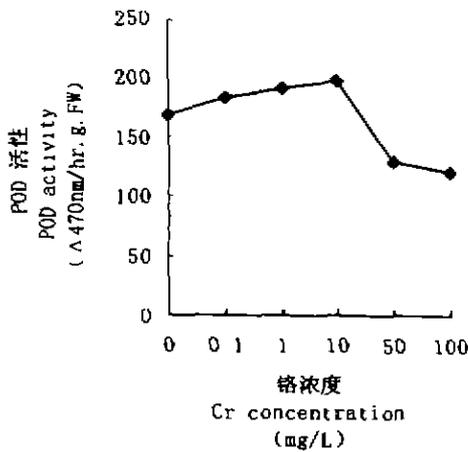


图 3 铬污染对 POD 活性的影响  
Fig. 3 Effect of Cr (VI) on activity of POD

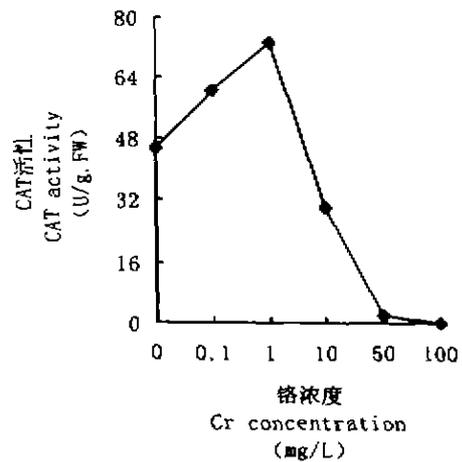


图 4 铬污染对 CAT 活性的影响  
Fig. 4 Effect of Cr (VI) on activity of CAT

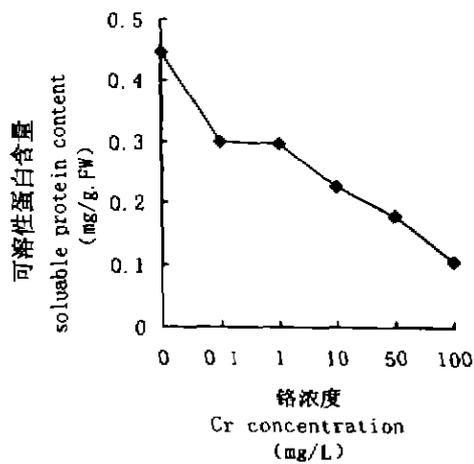


图 5 铬污染对可溶性蛋白含量的影响  
Fig. 5 Effect of Cr (VI) on content of soluble protein

显变化,10 mg/L 的浓度则使叶绿体膨胀,类囊体排列无序(图版 I:3);叶绿体膨胀成圆球形,类囊体片层明显肿胀,部分膜破裂和类囊体模糊(图版 I:4),最终肿胀的类囊体散出(图版 I:5),叶绿体解体(图版 I:6,7)。

2.6.2 线粒体 正常线粒体为比较规则的椭圆形,双层膜清晰,脊突呈管状(图版 I:2)。10 mg/L 处理的线粒体膨胀成圆形,脊突肿胀和排列紊乱(图版 I:7,11),50 mg/L 的浓度则使线粒体的脊突明显减少,被膜模糊,明显空泡化(图版 I:6)。

2.6.3 细胞核 正常叶片细胞的细胞核为椭圆形,双层膜清晰、完整,染色质分布均匀,核仁清楚(图版 I:8),铬污染后,细胞核首先变形,核膜内折(图版 I:10),有的核膜之间形成空泡状(图版 I:9),

细胞核核仁散开,染色质凝集,部分核质融解(图版 1:12)和核膜破裂,细胞核变成空核(图版 1:13)。

### 3 讨 论

叶绿素作为植物光合作用的主要色素,含量的高低与植物光合作用水平的强弱密切相关,尽管低浓度(0.1~1 mg/L)的 Cr(VI)处理刺激了叶绿素的合成,但 1 mg/L 处理已表现出下降趋势,尤其是高浓度(100 mg/L)对叶绿素的破坏更明显,Alberte<sup>[7]</sup>的研究认为其主要原因是由于叶绿体片层中捕光 Chla/b-Pro 复合体合成受到抑制。而叶绿体是植物细胞所特有的能量转换细胞器,它受重金属的影响也比较明显,随铬污染浓度的增大对它的破坏呈加重趋势,这表现为叶绿体膨胀、类囊体排列紊乱、被膜消失和叶绿体解体。由于叶绿体中 SOD 活性的下降使对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>的歧化能力减弱,从而导致高浓度的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>通过 Harber-Weiss 反应转化成氧化能力很强的羟自由基(OH<sup>·</sup>)而直接攻击膜脂不饱和脂肪酸,引发过氧化作用,导致对叶绿体的损伤<sup>[8]</sup>。我们发现在同一个细胞中,即使是同一细胞器(叶绿体)对同一种逆境胁迫的反应也不同(图版 1:7),这种对逆境反应的不同步性,可保证细胞在逆境下适应性生理调节和正常生理功能的同时进行,对提高植物对逆境的抵抗力有重要意义。由于重金属 Cr(VI)污染既导致了叶绿素含量的下降,又对叶绿体的正常结构造成不可逆损伤。所以,最终将严重影响植物的光合作用的正常进行。

线粒体是植物有氧代谢的非光合作用能量转换的中心,它含有多种酶类,参与细胞的氧化作用、电子传递和能量转换<sup>[9]</sup>,是细胞进行呼吸作用的场所。前人的研究<sup>[10]</sup>指出植物细胞的线粒体的膜脂脂肪酸不饱和程度较高,线粒体又是高效率利用分子氧的亚细胞器,部分基态分子氧能在线粒体内膜进行单电子还原成超氧化物自由基。彭鸣等<sup>[11]</sup>的研究认为线粒体是比较敏感的细胞器。由于重金属 Cr(VI)胁迫严重破坏了体内抗氧化酶系统,尤其是 SOD 的活性,这必将使在植物体内高度积累的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>启动并加剧膜脂过氧化作用,从而破坏膜的通透性,导致线粒体脊突的膨胀和空泡化等致死性损伤。这表明重金属 Cr(VI)抑制了线粒体的正常生理功能,破坏了线粒体内的氧化磷酸化循环和电子传递系统。最

终导致细胞呼吸作用减弱。

与叶绿体和线粒体相比,细胞核是比较稳定的细胞器,较高浓度(50~100 mg/L)的 Cr(VI),污染使细胞核变形,染色质凝聚,核质解体和成为空核。细胞核的变形和核膜内折会严重影响正常基因的活动和细胞内蛋白质合成及细胞分化<sup>[11]</sup>。染色质的凝集和核质解体是由于铬渗入细胞后与细胞核内的核酸等大分子物质结合,从而使 DNA 凝集,导致染色体断裂和畸变<sup>[3]</sup>的结果,是对细胞核的不可逆损伤。细胞核作为细胞生命活动的调控中心,对它的破坏将导致细胞生命活动的紊乱,最终导致细胞死亡。

由此推测重金属对植物的毒害机理之一是通过破坏植物体内的酶促保护酶系统——SOD、POD、和 CAT 的活性,导致活性氧对细胞器膜的不饱和脂肪酸的过氧化作用,对细胞器产生不可逆损伤,从而破坏植物进行正常生命活动的结构基础;另一机理可能是重金属与蛋白质结合而使蛋白质变性,使膜蛋白的功能改变和功能丧失。最终都是通过破坏细胞的膜系统而对植物造成伤害。

### 参考文献:

- [1] Mackenzie A, Ball A S, Virdee S R. 生态学(影印版)[M]. 北京:科学出版社,1999. 286.
- [2] 顾公望,张宏伟. 微量元素与恶性肿瘤[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993. 199-205.
- [3] 张义贤. 三价铬和六价铬对大麦毒害效应的比较[J]. 中国环境科学,1997,17(6):565-567.
- [4] 蒋德富,杨晓华. Cr<sup>6+</sup>对冬小麦 6246 发芽及根尖细胞有丝分裂影响的初步研究[J]. 环境科学,1981,2(5):14-18.
- [5] 华东师范大学生物系植物生理教研组. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1980. 88-90,143-144.
- [6] 李建武,萧能庚,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994. 174.
- [7] Alberte R S. Water stress effects on the content and organization of chlorophyll in Mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize [J]. *Plant Physiol.*, 1997, 59: 351-353.
- [8] Rosen G M, Rauckman E J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals [J]. *Methods Enzymol.*, 1984, 105: 198-206.

- [9] 史密斯 H. 植物细胞分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 67-147.
- [10] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆下胚轴线粒体产生超氧化物自由基的效率[J]. 植物生理学报, 1986,

12: 148-153.

- [11] 彭 鸣, 王焕校, 吴玉树. 镉、铅诱导的玉米(*Zea mays* L.) 幼苗细胞超微结构的变化[J]. 中国环境科学, 1991, 11(6): 426-431.

### 图版说明

Ce-叶绿体膜; CP-叶绿体; CW-细胞壁; Mi-线粒体; N-细胞核; Nm-核膜; Nu-核仁。

#### 图版 I

1. 对照叶细胞的超微结构, 示正常的叶绿体( $\times 15\ 000$ ); 2. 对照叶细胞中的线粒体( $\times 15\ 000$ ); 3. 10 mg/L 处理的叶细胞, 示叶绿体膨胀, 类囊体排列紊乱( $\times 17\ 000$ ); 4. 100 mg/L 处理的叶细胞, 示圆球形叶绿体和类囊体膨胀( $\times 17\ 000$ ); 5. 50 mg/L 处理的叶细胞, 示叶绿体被膜破裂( $\times 17\ 000$ ); 6. 50 mg/L 处理的叶细胞, 示叶绿体解体 and 线粒体空泡化( $\times 17\ 000$ ); 7. 10 mg/L 处理的叶细胞, 示叶绿体解体, 线粒体膨胀和细胞器囊泡化( $\times 20\ 000$ ); 8. 对照叶细胞的超微结构, 示细胞核和核仁( $\times 6\ 000$ ); 9. 100 mg/L 处理的叶细胞, 示染色质凝集和核周腔明显膨大(箭头)( $\times 8\ 000$ ); 10. 50 mg/L 处理的叶细胞, 示细胞核变形( $\times 10\ 000$ ); 11. 10 mg/L 处理的叶细胞, 示线粒体脊突膨胀( $\times 20\ 000$ ); 12. 100 mg/L 处理的叶细胞, 示核质开始解体( $\times 10\ 000$ ); 13. 50 mg/L 处理的叶细胞, 示核膜破裂, 核质消失和叶绿体被膜破裂( $\times 8\ 000$ )。

### Explanation of Plates

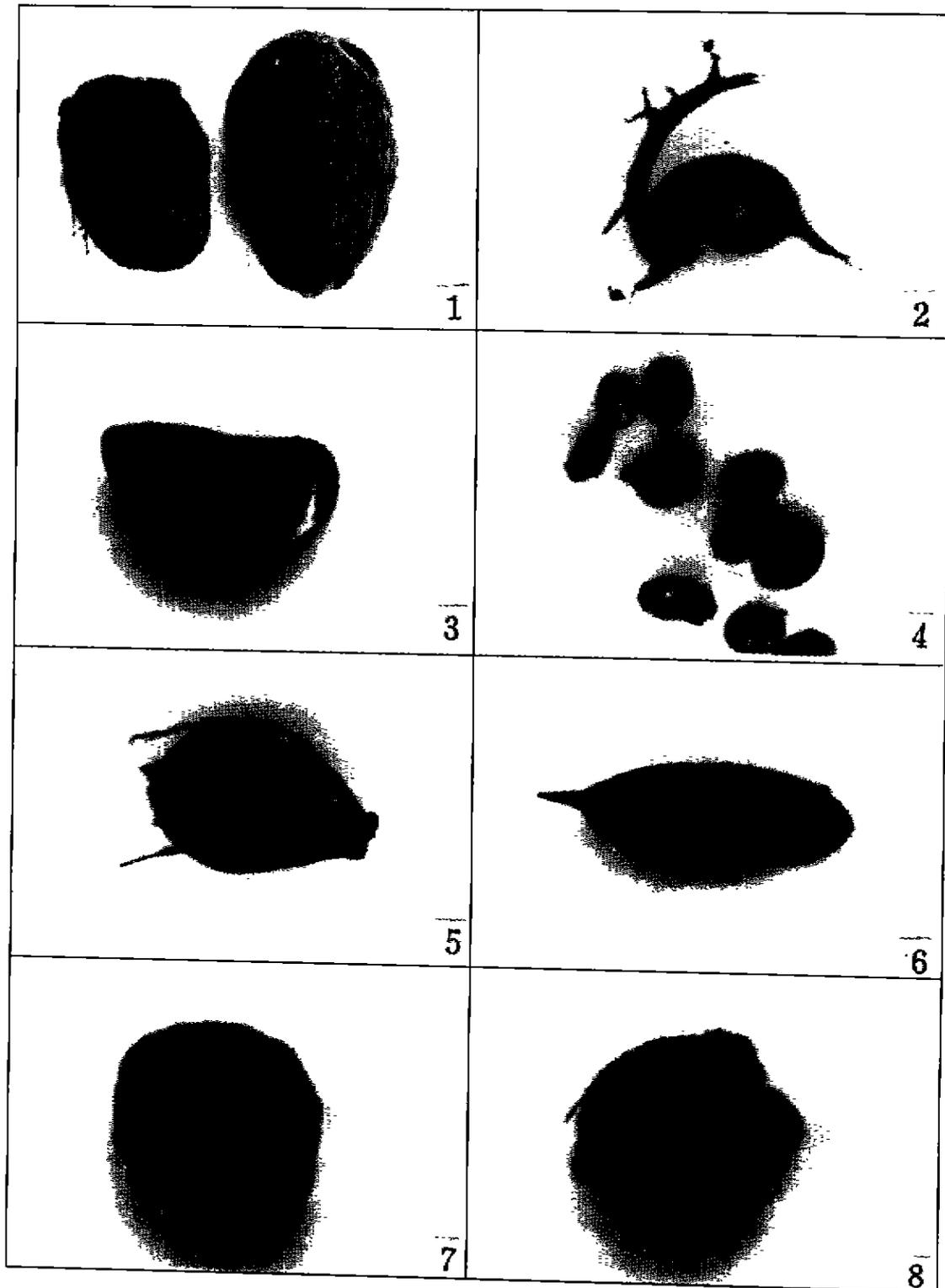
Ce-Chloroplast envelope; CP-Chloroplast; CW-Cell Wall; Mi-Mitochondria; N-Nucleus; Nm-Nuclear membrane; Nu-Nucleolus.

#### Plate I

1. Ultrastructure of control leaf cells, showing normal chloroplast( $\times 15\ 000$ ); 2. Mitochondria in control leaf cell( $\times 15\ 000$ ); 3. Leaf cells treated with 10 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing swelling of chloroplasts and thylakoids arranged irregularly( $\times 17\ 000$ ); 4. Leaf cells treated with 100 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing round chloroplasts and swollen thylakoids( $\times 17\ 000$ ); 5. Leaf cells treated with 50 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing disruption of chloroplast membrane( $\times 17\ 000$ ); 6. Leaf cells treated with 50 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing disintegration of chloroplasts and vacuolation of mitochondria( $\times 17\ 000$ ); 7. Leaf cells treated with 10 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing disintegration of chloroplasts, swollen mitochondria and vacuolation of organelles( $\times 17\ 000$ ); 8. Ultrastructure of control leaf cells, showing nucleus and nucleolus( $\times 6\ 000$ ); 9. Leaf cells treated with 100 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing agglutination of chromatin and enlarged perinuclear space (arrow)( $\times 8\ 000$ ); 10. Leaf cells treated with 50 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing deforming of nucleus( $\times 10\ 000$ ); 11. Leaf cells treated with 10 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing swelling of cristae of mitochondria( $\times 20\ 000$ ); 12. Leaf cells treated with 100 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing destruction of nucleoplasm( $\times 10\ 000$ ); 13. Leaf cells treated with 50 mg/L Cr(VI) for 6 days, showing disruption of nuclear membrane and chloroplast membrane, disappearance of nucleoplasm( $\times 8\ 000$ ).

沈显生, 等: 浙江朱家尖观音湾古木层中果实与种子的分类学研究  
SHEN Xian-sheng, *et al.*: Taxonomy about the fruits and seeds of ground ancient-woods  
at Guanyin bay of Zhujiajian in Zhejiang province

图版 I  
Plate I



See explanation at the end of text