

Cr⁶⁺、Cr³⁺胁迫对黑藻生理生化影响的比较研究

马广岳, 施国新, 徐勤松, 王学, 拉非克

(南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097)

摘要: 以沉水植物黑藻(*Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle)为实验材料,通过模拟水体 Cr⁶⁺、Cr³⁺污染环境,比较研究了两种价态铬对黑藻叶的毒害影响。结果表明:随着 Cr⁶⁺、Cr³⁺浓度的加大,超氧阴离子(O₂⁻)产生速率、丙二醛(MDA)、可溶性蛋白含量皆呈先升后降趋势。Cr⁶⁺、Cr³⁺浓度过高时,三种抗氧化酶(SOD、POD、CAT)活性比例失衡,且 Cr⁶⁺处理组的 O₂⁻产生速率、MDA含量高于 Cr³⁺处理组,叶绿素、可溶性蛋白含量、叶绿素 a/b 值低于 Cr³⁺处理组,显示出 Cr⁶⁺的毒性远大于 Cr³⁺。

关键词: Cr⁶⁺; Cr³⁺; 黑藻; 胁迫; 比较

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0161-05

Comparative studies of toxic effect of Cr⁶⁺, Cr³⁺ stress on the physiological and biochemical characteristics of *Hydrilla verticillata*

MA Guang-yue, SHI Guo-xin, XU Qin-song,
WANG Xue, Rafeek khaled

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Toxic effects of Cr⁶⁺, Cr³⁺ on *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle cultured with simulated different concentration of Cr⁶⁺, Cr³⁺ water pollution were studied. The results showed that the O₂⁻ generation rate, chlorophyll and soluble protein content rose at first and fell subsequently with the increase of the two pollutants. Three kinds of antioxidases disordered at higher concentration of Cr⁶⁺, Cr³⁺, O₂⁻ generation rate and MDA content of Cr⁶⁺ treatment were higher while chlorophyll and soluble protein content, ratio of chlorophyll a/b were lower than that of Cr³⁺ treatment. As a result, toxicity of Cr⁶⁺ to *Hydrilla verticillata* was more serious than that of Cr³⁺.

Key words: Cr⁶⁺; Cr³⁺; *Hydrilla verticillata*; stress; comparison

随着工业生产的迅速发展,大量重金属进入水体环境,致使污染加剧。重金属污染不但影响水生植物的产量和质量,更为严重的是通过食物链进一步影响人畜健康。铬是广泛存在于环境中的“五毒”元素之一,其中 Cr⁶⁺是重要的环境污染物和生物致畸、致突变剂(顾公望等,1983)。铬对植物的毒害前

人已做过大量研究(任安芝等,2000;王惟咨等,1990;张义贤,1997),而 Cr⁶⁺和 Cr³⁺两种价态的铬对水生植物生理生化影响的比较研究则鲜有报道。黑藻(*Hydrilla verticillata*),沉水植物,水鳖科,分布广泛。该植物沉在水中;对水环境变化比较敏感,故本文选取黑藻为实验材料,对其进行了急性毒害

收稿日期: 2003-03-20 修订日期: 2003-06-27

基金项目: 教育部科学研究重点项目(01043);江苏省重点实验室开放基金共同资助。

作者简介: 马广岳(1965-),男,山东梁山县人,硕士生,主要从事重金属对水生植物毒害机制的研究。

实验,比较了这两种价态铬毒害下黑藻叶的一些生理生化指标的变化规律,为其污染防治及生物监测提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

黑藻采自南京江心洲无污染水域。九月中旬采集后置于大玻璃缸中,用自来水预平衡两天后,取长势一致的植株移入容积为 2 000 mL 装有 1/20 Hoagland 培养液的大烧杯中,一次性分别加入分析纯 $K_2Cr_2O_4$ 及 $CrCl_3 \cdot 3H_2O$ 。培养液中 Cr^{6+} 及 Cr^{3+} (以纯 Cr 计)的最终浓度依次为 1、3、5、7、10、20 mg/L。以不加 Cr 为零对照。每隔 4 d 更换 1 次培养液,培养期间每天补足失水量。处理后第八天取相同部位的叶片,用蒸馏水洗净、揩干,测定各项生理指标。

1.2 指标测定

叶绿素含量:参照张志良(1990)的分光光度法测定,单位:mg/g。

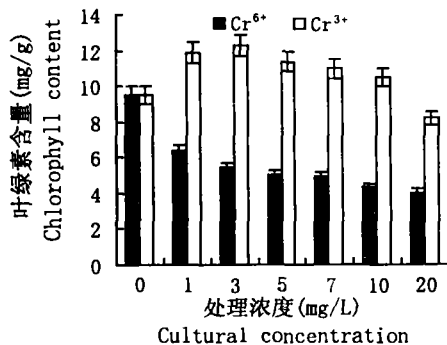


图 1 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻叶绿素含量的影响
Fig. 1 Effect of Cr^{6+} , Cr^{3+} stress on chlorophyll content in leaves of *Hydrilla verticillata*

实验设 3 次重复,取其平均值。并对数据进行相关性及其差异显著性统计分析。

以上测定结果均以鲜重计。

2 结果

2.1 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻叶绿素含量、叶绿素 a/b 值的影响

在 Cr^{6+} 处理组中,叶绿素含量随浓度增加持续下降($r=-0.867^*$, $n=6$) (图 1), 20 mg/L 浓度时只有对照的 42.1%, 而在 Cr^{3+} 浓度梯度中,叶绿素含

可溶性蛋白含量的测定:采用 Bradford(1976)的考马氏亮蓝 G-250 法,单位:mg/g,以标准牛血清白蛋白为标准。

O_2^- 产生速率的测定:参照王爱国等(1990)的方法,单位: $A_{530} \text{ nm/min} \cdot \text{g}$ 。

MDA 含量的测定:按 Heath 和 Parker(1968)的硫代巴比妥酸(TBA)比色法,单位:mmol/g。

酶提取液的制备:将供试材料置于预冷研钵中,加入 pH7.8 磷酸缓冲液(0.05 mol/L)8 mL,冰浴下研磨成匀浆,4 °C 下 10 000 g 离心 20 min,上清液即为酶提取液。

SOD 活性的测定:采用化学比色法,根据南京建成生物工程公司 SOD 试剂盒的顺序进行测定,以每 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位(NU),单位:NU/g。

CAT 活性的测定:采用分光光度法,根据南京建成生物工程公司 CAT 试剂盒的顺序进行测定,单位:U/g。

POD 活性测定:参照 Maehly(1955)的愈创木酚氧化法,单位: $A_{470} \text{ nm/min} \cdot \text{g}$ 。

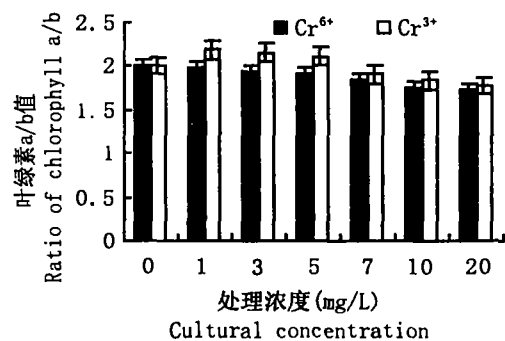


图 2 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻叶绿素 a/b 值的影响
Fig. 2 Effect of Cr^{6+} , Cr^{3+} stress on ratio of chlorophyll a/b in leaves of *Hydrilla verticillata*

量呈先升后降的趋势($r=-0.983^{**}$), 3 mg/L 时达到峰值,为对照的 1.29 倍,然后随 Cr^{3+} 浓度的递增而逐渐下降,但在 20 mg/L 时仍为对照的 86.3%。黑藻叶片叶绿素含量对两种价态铬反应显著不同($F=31.32^{**}$)。

由图 2 可以看出,叶绿素 a/b 值随 Cr^{6+} 浓度的增加呈下降趋势($r=-0.918^{**}$, $n=6$), 而随 Cr^{3+} 浓度的增加呈先升后降趋势($r=-0.816^*$, $n=6$)。两处理组叶绿素 a/b 值差异极显著($F=15.72^{**}$)。

2.2 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻可溶性蛋白含量的影响

随着 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 浓度增加,可溶性蛋白含量都

呈先升后降趋势(图 3),但 Cr^{6+} 处理组上升快,下降也快($r = -0.935$),5 mg/L 时达最大值,为对照的 1.60 倍,在 20 mg/L 时最低,为对照的 60%。而 Cr^{3+} 处理组则上升慢,下降也慢($r = -0.865$),在 7 mg/L 时达最大值,为对照的 1.81 倍,20 mg/L 时最小,但仍为对照的 85.3%。两处理组差异显著($F = 6.55^*$)。

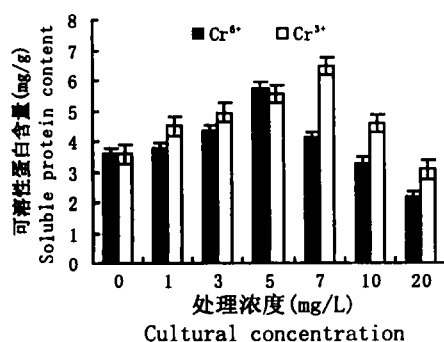


图 3 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻可溶性蛋白含量影响
Fig. 3 Effect of Cr^{6+} 、 Cr^{3+} stress on soluble protein content in leaves of *Hydrilla verticillata*

生速率相似, Cr^{3+} 组 MDA 最大值在 10 mg/L 时,为对照的 1.29 倍, Cr^{6+} 处理时,MDA 最大值出现在 7 mg/L 时,为对照的 1.59 倍。两处理组差异显著($F = 13.62^*$)。

2.4 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 SOD、CAT、POD 活性的影响

SOD 活性都呈轻微的先升后降趋势($r_{\text{Cr}^{6+}} = 0.983^{**}$, $r_{\text{Cr}^{3+}} = 0.960^*$)(图 6),其中 Cr^{6+} 处理组在 7 mg/L 时达最大值,为对照的 1.08 倍。 Cr^{3+} 处理组在 3 mg/L 达最大值,为对照的 1.11 倍,然后持续下降。

Cr^{3+} 组 CAT 活性在 0~10 mg/L 范围内呈直线上升趋势($r = 0.870^*$, $n = 6$)(图 7),只是在 20 mg/L 时突然下降,而 3 mg/L Cr^{6+} 处理有一个较大幅度的升高,达最大值,为对照的 1.51 倍,然后持续下降。

POD 活性两组都呈明显的上升趋势(图 8),且 Cr^{6+} 组的 POD 活性普遍高于 Cr^{3+} 组($r_{\text{Cr}^{6+}} = 0.987^{**}$, $n = 6$; $r_{\text{Cr}^{3+}} = 0.982^{**}$, $n = 6$)。两处理组存在显著差异($F = 6.96^*$)。

3 讨 论

Woolhouse(1974)认为,叶绿素 a/b 值可作为

2.3 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 O_2^- 产生速率的影响

O_2^- 产生速率也都呈先升后降趋势($r_{\text{Cr}^{6+}} = 0.983^*$, $r_{\text{Cr}^{3+}} = 0.960^*$)(图 4),且呈下降趋势时两处理组 O_2^- 产生速率都高于对照。7 mg/L Cr^{6+} 处理时, O_2^- 产生速率达最大值,为对照的 2.18 倍。 Cr^{3+} 处理组在 10 mg/L 时达最大值,为对照的 1.94 倍。

由图 5 可以看出,MDA 含量变化趋势与 O_2^- 产

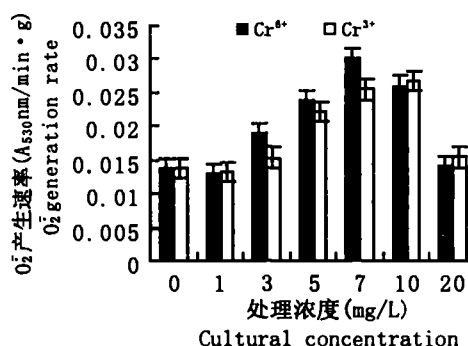


图 4 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 O_2^- 产生速率的影响
Fig. 4 Effect of Cr^{6+} 、 Cr^{3+} stress on O_2^- generation rate in leaves of *Hydrilla verticillata*

叶片衰老的重要指标。叶绿素 a/b 值随 Cr^{6+} 处理浓度的增加呈现下降趋势,说明 Cr^{6+} 对叶绿素有较强的毒害作用。而随 Cr^{3+} 处理浓度增加呈先升后降趋势,可能与叶绿素 a 对低浓度 Cr^{3+} 的刺激较叶绿素 b 敏感,合成速度较快有关。本实验中, Cr^{6+} 处理组的叶绿素 a/b 值小于 Cr^{3+} 组,说明 Cr^{6+} 比 Cr^{3+} 具有更强的加速衰老的作用。

重金属胁迫导致叶绿素含量下降,前人(Stobart 等,1985; Van 和 Clijsters,1990; Kar 和 Chondhuri,1987)已多有研究,其中 Kar 发现 POD 活性升高明显地与叶绿素减少有关,并认为这种对酚专一的 POD 和叶绿素降低的关系比其防御过氧化作用更为明显。本实验 POD 活性与叶绿素含量呈显著负相关($r_{\text{Cr}^{6+}} = -0.840^*$, $n = 6$; $r_{\text{Cr}^{3+}} = -0.992^{**}$, $n = 6$),也充分说明这一点。

施国新等(2000)曾观察到 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 处理黑藻叶时,随浓度的增加,黑藻叶细胞内核糖体数目急剧减少,直到完全消失,这也从结构上阐明了重金属可导致可溶性蛋白含量下降。 Cr^{6+} 组下降比 Cr^{3+} 组更显著,说明 Cr^{6+} 毒性比 Cr^{3+} 更大。

植物体中存在着多种抗氧化酶,其中 SOD 是体内重要的保护酶,它与 POD、CAT 等协同作用构成体内保护酶防御系统,以清除在逆境条件下产生的

氧自由基(王爱国等,1983)。通过 SOD 将 O_2^- 歧化成 H_2O_2 ,抑制 Haber-Weiss 反应,再由 CAT 和 POD 将 H_2O_2 分解成 H_2O (Chris 等,1992),从而有利于阻止 O_2^- 和 H_2O_2 的积累。只有三者协同才有利于清除叶片中过多的活性氧并使之维持在较低水平。低浓度 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 能使 SOD、CAT 和 POD 活性都呈逐渐增加趋势,可能与许多抗氧化酶都是诱导酶有关,是植物对防止活性氧伤害的一种保护性适应,但在高浓度时,CAT 活性持续下降,POD 活

性急剧上升,而 SOD 变化不大,说明在铬的毒害下,黑藻叶细胞抗氧化系统内多种酶之间的活性比例已失衡,造成清除活性氧的能力下降,导致 O_2^- 等自由基积累。 O_2^- 作为一种很强的自由基,当它积累到一定水平后,必然会对植物生理活动造成伤害(Wilson 和 McDonald,1996),使细胞发生生理紊乱,以致于高浓度时 MDA 含量、 O_2^- 产生速率反而持续下降。综合整个实验过程, Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 对黑藻的致死浓度分别在 7~10 mg/L 和 15~20 mg/L 之间。

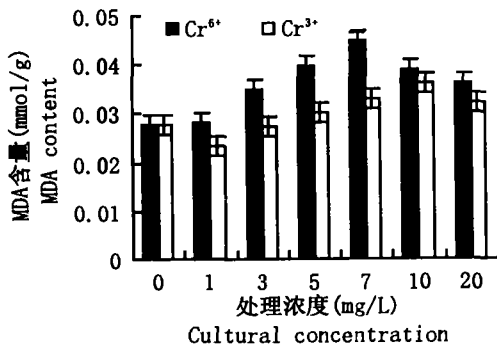


图 5 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 MDA 含量的影响
Fig. 5 Effect of Cr^{6+} , Cr^{3+} stress on MDA content in leaves of *Hydrilla verticillata*

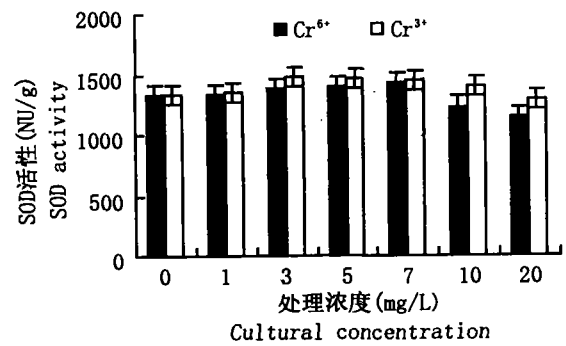


图 6 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 SOD 活性的影响
Fig. 6 Effect of Cr^{6+} , Cr^{3+} stress on SOD activity in leaves of *Hydrilla verticillata*

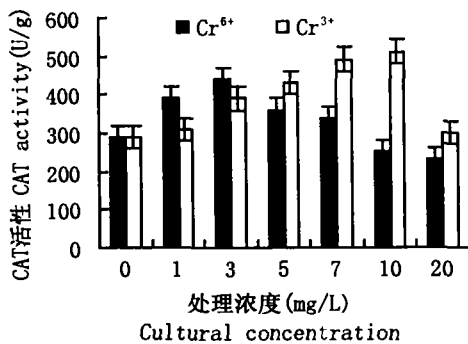


图 7 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 CAT 活性的影响
Fig. 7 Effect of Cr^{6+} , Cr^{3+} stress on CAT activity in leaves of *Hydrilla verticillata*

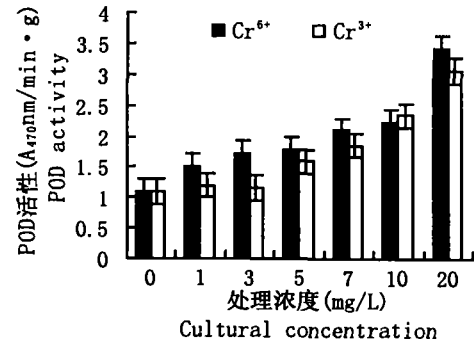


图 8 Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻 POD 活性的影响
Fig. 8 Effect of Cr^{6+} , Cr^{3+} stress on POD activity in leaves of *Hydrilla verticillata*

综上所述, Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫可不同程度地使叶绿素、可溶性蛋白含量和叶绿素 a/b 值减少(小), O_2^- 产生速率和 MDA 量不同程度的增加,最终导致植物受到伤害。 Cr^{6+} 组的以上各指标减小(少)及增加幅度明显高于 Cr^{3+} 组,充分说明 Cr^{6+} 的毒性远大于 Cr^{3+} 。

Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 的毒性差异如此显著可能与铬离子的理化性质及存在状态有关。 Cr^{6+} 的毒性大可能是由于 Cr^{6+} 化合物溶解性较大,具有较强的氧化性且

易通过生物膜。而 Cr^{3+} 在生理 pH 范围内易与一些生物大分子强烈地键合或生成氢氧化物胶体而使它在通过细胞膜时常受到限制(李汉卿等,1985),可能是其毒性较弱的原因。

鉴于铬有其复杂的化学行为,其价态及存在形态决定了它对黑藻的毒性不同,因此,在研究有关铬污染及制定环境标准时,应当考虑这种差异。作者认为,用总铬这一指标有其局限性,考虑到不同价态的差异性,针对不同价态的铬分别制定相应标准将

更能准确反映水质污染程度。

参考文献:

- 李汉卿, 谢文焕, 傅纯彦, 等. 1985. 环境污染与生物[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 168
- 张志良. 1990. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 154.
- 顾公望, 张宏伟. 1983. 微量元素与恶性肿瘤[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 199—205.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**(1): 248—254.
- Chris B, Marc VH, Dirk I. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu Rev Plant Mol Biol*, **43**: 83.
- Heath RL, Parker L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, **25**: 189—198.
- Kar RK, Chondhuri MA. 1987. Possible mechanisms of light-induced chlorophyll degradation in senescing leaves of *Hydrilla verticillata*[J]. *Physiol Plant*, **70**: 729—734.
- Maehly AC. 1955. Plant peroxidase[J]. *Meth Enzym*, **2**: 801—813.
- Ren AZ(任安芝), Gao YB(高玉葆), Liu S(刘爽). 2000. Effects of Cr, Cd and Pb on free proline content etc in leaves of *Brassica chinensis*(铬、镉、铅胁迫对青菜叶片几种生理指标的影响)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), **6**(2): 112—116.
- Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I, et al. 1985. The effect of Cd on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Physiol Plant*, **63**: 293—298.
- Shi GX(施国新), Du KH(杜开和), Xie KB(解凯彬), et al. 2000. Ultrastructural study of leaf cells damaged from Hg²⁺ and Cd²⁺ pollution in *Hydrilla verticillata*(汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), **42**(4): 373—378.
- Van assche F, Clijsters H. 1990. Effects of metal on enzyme activity in plants[J]. *Plant Cell Environ*, **13**: 195—206.
- Wang WZ(王惟咨), He ZY(何增耀), Ye ZJ(叶兆杰). 1990. Effects of chromium on soil biochemical metabolism(铬对土壤生化代谢的影响)[J]. *China Environmental Science*(中国环境科学), **10**(6): 440—445.
- Wang AG(王爱国), Luo GH(罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants(植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系)[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), **26**(6): 55—57.
- Woolhouse HW. 1974. Longevity and senescence in plant[J]. *Sci Prog Oxford*, **61**: 23.
- Wang AG(王爱国), Shao CB(邵从本), Luo GH(罗广华). 1983. The comparison of several methods for determining the activity of superoxide dismutase(SOD)(几种检测超氧化物歧化酶活性反应的比较)[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), **5**: 46—49.
- Wilson DO, McDonald NB. 1996. The lipid peroxidation metal of seed aging[J]. *Seed Sci Technol*, **14**: 269—282.
- Zhang YX(张义贤). 1997. A comparative study of the toxic effects of the trivalent and hexavalent chromium in *Hordeum vulgare*(三价铬和六价铬对大麦毒性效应的比较)[J]. *China Environmental Science*(中国环境科学), **17**(6): 565—567.

(上接第 192 页 Continue from page 192)

参考文献:

- 王鉴明. 1985. 中国甘蔗栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 42—43.
- 许大全. 2002. 光合作用效率[M]. 上海: 上海科技出版社, 72—79.
- 张泽林. 1999. 细胞分裂相的决定因素——取材时间[J]. *生物学通报*, **34**(8): 22.
- 李懋学, 张学敦. 1991. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨: 东北大学出版社, 26.
- 骆君骥. 1992. 甘蔗学[M]. 北京: 轻工业出版社, 68—76.
- 黄有总, 徐建云, 陈超君, 等. 2001. 几个甘蔗新品种的农艺性状比较研究[J]. *福建甘蔗*, (3): 8—13.
- 彭绍光. 1990. 甘蔗育种学[M]. 北京: 农业出版社, 110—116.
- 蔡程辉, 庄永龙. 2001. SPSS V 10.0 for window 实用基础教程[M]. 北京: 希望电子出版社, 98—106; 174—209.
- AC 吉斯. 1984. 细胞生理学[M]. 北京: 科学出版社, 576—578.
- AC 吉斯. 1984. 细胞生理学[M]. 北京: 科学出版社, 601—603.
- Dong HZ(董合忠), Li WJ(李维江), Tang W(唐薇), et al. 2000. Photosynthetic characters of field grown cotton leaves(大田棉长叶片叶光合特性的研究)[J]. *Shandong Agricultural Sciences*(山东农业科学), **6**: 7—9, 15.