

超富集植物李氏禾根系对Cr(VI)吸收机制的研究

卢媛媛, 张学洪, 刘杰*, 伍婵翠

(桂林理工大学 广西矿冶与环境科学实验中心, 广西 桂林 541004)

摘要:通过盆栽试验,研究了超富集植物李氏禾根系对Cr(VI)的吸收特征。结果表明,解偶联剂2,4-二硝基苯酚(DNP),ATP酶抑制剂(Na₃VO₄)和低温(2℃)处理均显著地抑制了李氏禾根对Cr(VI)的吸收($P<0.05$)。其中,低温处理的抑制作用最明显,李氏禾根中铬的浓度较对照降低69.8%,说明李氏禾根对Cr(VI)的吸收是需要能量的主动过程。此外,李氏禾根系对Cr(VI)的吸收符合Michaelis-Menten方程,其米氏常数(K_m)为91.08 μmol·L⁻¹。在5 mmol·L⁻¹ SO₄²⁻处理下,该米氏常数是对照的1.27倍;而在SO₄²⁻缺失的条件下,李氏禾根对Cr(VI)吸收的米氏常数较对照减少了24.3%。这种拮抗关系表明李氏禾根对Cr(VI)的吸收可能与硫酸根吸收体系有关。

关键词:李氏禾;Cr(VI);吸收;能量抑制剂;SO₄²⁻

中图分类号:X173 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)11-2140-05 doi:10.11654/jaes.2013.11.006

Mechanism of Cr(VI) Uptake by Hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz

LU Yuan-yuan, ZHANG Xue-hong, LIU Jie*, WU Chan-cui

(Guangxi Scientific Experiment Center of Mining, Metallurgy and Environment, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: *Leersia hexandra* Swartz, present in Southern China, has been found to be a chromium hyperaccumulator. Under hydroponic conditions, the mechanisms of Cr(VI) uptake by roots of *L. hexandra* were studied at 30 μmol Cr(VI)·L⁻¹. Absorption of Cr(VI) by the plant was significantly reduced by uncoupler 2, 4-dinitrophenol(DNP), ATPase inhibitor(Na₃VO₄) and low temperature(2℃), with the greatest inhibition(69.8% reduction) by low temperature, implying that Cr(VI) uptake by roots of *L. hexandra* was an active process associated with energy metabolism. In addition, Cr(VI) absorption followed Michaelis-Menten kinetics and was competitively inhibited by sulfate. Sulfate(SO₄²⁻) did not affect the maximum absorption rate of Cr(VI)(0.143~0.148 μmol·g⁻¹ DW·h⁻¹), but increased the constant K_m values by 27.6% compared with the control(the plants grown in 25% Hoagland solution). However, sulfate-deficiency decreased the K_m by 24.3%. This result suggested that the Cr(VI) uptake by the roots of *L. hexandra* may be partially carried via sulfate transporters.

Keywords: *L. hexandra*; Cr(VI); uptake; metabolic inhibitors; SO₄²⁻

超富集植物由于在重金属污染植物修复领域的应用价值和在植物逆境生理研究中的学术价值而备受关注。与普通植物相比,超富集植物对特定重金属元素有超强的吸收能力。因此,超富集植物对重金属的吸收机制成为相关领域的研究热点。

基于对模式生物遏蓝菜 *Thlaspi caerulescens* 的

研究^[1-2],人们对超富集植物吸收Zn、Cd等二价离子的机制有了一定的认识。但是,由于铬超富集植物极少,关于超富集植物对铬的吸收机制研究十分缺乏。李氏禾(*Leersia hexandra* Swartz)是国内报道的唯一铬超富集植物,其对Cr(III)和Cr(VI)都具有很强的吸收和富集能力^[3]。在此前的研究中,我们发现李氏禾根对Cr(III)的吸收是需要消耗能量的主动过程,并且与高价铁吸收体系有关^[4]。然而,Cr(VI)以阴离子形式存在,与Cr(III)在生物化学特性上有明显的区别^[5],其吸收机制显然与Cr(III)有所不同。因此,李氏禾根对Cr(VI)的吸收机制成为值得研究的科学问题。阐

收稿日期:2013-04-15

基金项目:国家自然科学基金(41163003, 41273142);广西科学研究与技术开发计划(桂科攻10124003-3)

作者简介:卢媛媛(1988—),女,广西兴业人,硕士,主要研究方向为重金属污染及恢复生态学。

*通信作者:刘杰 E-mail:liu-j7775@163.com

明李氏禾根对Cr(VI)的吸收途径和方式可以为揭示超富集植物铬吸收机理完善必要的信息,对于铬污染土壤的植物修复有着重要的理论和现实意义。

本文通过ATP酶抑制剂、解偶联剂和低温抑制李氏禾根系的能量代谢,研究李氏禾根系对Cr(VI)的吸收过程,并探讨李氏禾根系对Cr(VI)吸收机制。由于SO₄²⁻与Cr(VI)存在着较多生物化学上的相似性,本文还研究了李氏禾根系对SO₄²⁻和Cr(VI)吸收的相互关系。

1 材料与方法

1.1 植物的培养

选取生长一致的李氏禾幼苗,用去离子水洗净,放入含有1.5 L 25% Hoagland营养液的塑料盆中,于人工气候箱(LRH-550-GSI)中培养10 d。每天加入去离子水保持培养液的体积,每3 d更换1次营养液。培养条件为:光周期12 h,温度25℃,相对湿度75%,光照强度7000 lx。

1.2 代谢抑制剂对Cr(VI)吸收的影响

实验前,将植物转移至pH为5.5的250 μmol·L⁻¹CaCl₂溶液中预培养。12 h后,对李氏禾幼苗进行如下处理:(1)30 μmol·L⁻¹ K₂Cr₂O₇(对照);(2)25 μmol·L⁻¹ATP酶抑制剂(Na₃VO₄)+30 μmol·L⁻¹ K₂Cr₂O₇;(3)50 μmol·L⁻¹ Na₃VO₄+30 μmol·L⁻¹ K₂Cr₂O₇;(4)25 μmol·L⁻¹解偶联剂(2,4-二硝基苯酚,DNP)+30 μmol·L⁻¹ K₂Cr₂O₇;(5)50 μmol·L⁻¹ DNP+30 μmol·L⁻¹ K₂Cr₂O₇。所有处理的pH值均调至5.5,分别于处理后的1、2、4、8、12、24、48 h收获植物。取植物的根用10 mmol·L⁻¹EDTA于超声波中清洗10 min,去除植物根表面吸附的金属离子^[6]。清洗后的根用去离子水漂洗3次,放入105℃的烘箱杀青30 min,紧接着80℃烘至恒重。烘干的样品经浓HNO₃和H₂O₂消解后,用火焰原子吸收法测定铬的浓度。

1.3 低温对Cr(VI)吸收的影响

实验前12 h,李氏禾幼苗如1.2的方法预培养。预培养后,培养液中添加30 μmol·L⁻¹的K₂Cr₂O₇。处理后的植物迅速放入2℃的人工气候箱中,分别于1、2、4、8、12、24、48 h收获植物。样品消解和测试方法参照1.2,并以1.2中的对照为正常温度对照。

1.4 SO₄²⁻对Cr(VI)吸收的影响

实验前,将植物分成3组,吸收介质pH值均调至5.5。一组用SO₄²⁻完全缺失的25% Hoagland溶液培养,另一组用含5 mmol·L⁻¹ SO₄²⁻的25% Hoagland溶液

培养,对照组为正常的25% Hoagland溶液培养。48 h后,分别将10、20、30、40、50 μmol·L⁻¹的K₂Cr₂O₇加入各组培养液中。4 h后,收获各组植物的根,用10 mmol·L⁻¹ EDTA洗去表面吸附的铬,用原子吸收法测定样品中的铬浓度。具体操作参照1.2进行。

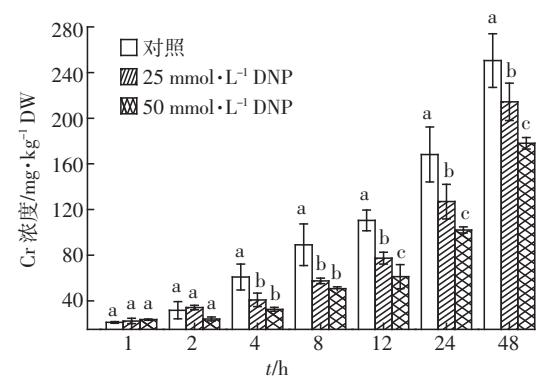
1.5 数据处理与统计分析

实验数据以三个平行样品测定值的算术平均值±标准偏差(SD)表示,数据用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析,用最小显著差数法(LSD)评价数据间的差异水平($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 代谢抑制剂对李氏禾根吸收Cr(VI)的影响

李氏禾根对外源Cr(VI)(60 μmol·L⁻¹)的吸收动态过程如图1所示。在解偶联剂2,4-二硝基苯酚(DNP)的作用下,李氏禾根对Cr(VI)的吸收明显被抑制(图1)。50 μmol·L⁻¹ DNP处理48 h后,李氏禾根中铬的浓度为对照的71.1%,并且50 μmol·L⁻¹ DNP对Cr(VI)吸收的抑制效应显著大于25 μmol·L⁻¹ DNP($P<0.05$)。但在2 h之前,DNP对Cr(VI)吸收的抑制效应并不明显,可能的原因是DNP对李氏禾根的能量代谢抑制在2 h后才表现出来。



不同字母表示同一时间的数值存在显著差异($P<0.05$)。下同

The different letters denote significant differences at each time ($P<0.05$). The same below

图1 DNP对李氏禾根吸收Cr(VI)的影响

Figure 1 Effects of DNP on uptake of Cr(VI) by *L. hexandra*

在ATP酶抑制剂(Na₃VO₄)的作用下,李氏禾根对Cr(VI)吸收随时间的变化如图2所示。与DNP相似,25 μmol·L⁻¹和50 μmol·L⁻¹ Na₃VO₄均能显著地减少李氏禾根对Cr(VI)的吸收($P<0.05$)。例如,在25 μmol·L⁻¹和50 μmol·L⁻¹ Na₃VO₄处理48 h后,李氏禾根中铬的浓度较对照分别下降了16.6%和24.1%。与

DNP 不同的是, Na_3VO_4 对李氏禾根吸收 Cr(VI)的减少在实验的浓度范围内, 并没随 Na_3VO_4 浓度增加而增加。在 48 h 内, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 对李氏禾根吸收 Cr(VI)的抑制作用无显著差异(图 2)。由于本实验仅设置了两个 Na_3VO_4 的处理水平, 有关 Na_3VO_4 对李氏禾根吸收 Cr(VI)影响的剂量-效应关系还有待进一步研究。

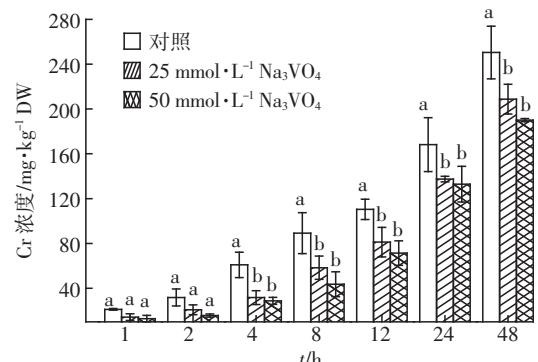


图 2 钒酸钠对李氏禾根吸收 Cr(VI)的影响

Figure 2 Effects of Na_3VO_4 on uptake of Cr(VI) by *L. hexandra*

2.2 低温对李氏禾根吸收 Cr(VI)的影响

低温可以抑制植物的代谢水平^[7]。在 2 ℃时, 李氏禾根对培养液中 Cr(VI)的吸收明显受到抑制(图 3)。2 ℃处理的李氏禾根中的铬浓度在 4 h 后显著地低于对照(25 ℃)。4 h 时, 2 ℃处理的李氏禾根中铬的浓度较对照下降了 65.8%; 在 48 h 时最为明显, 李氏禾根中铬的浓度较对照下降了 69.8%。这表明李氏禾根对 Cr(VI)的吸收与植物的代谢水平有关, 当代谢水平下降时, 李氏禾根对 Cr(VI)的吸收明显下降。

2.3 SO_4^{2-} 对李氏禾根吸收 Cr(VI)的影响

在 SO_4^{2-} 缺失的条件下, 李氏禾根对 Cr(VI)的吸收有增加的趋势(图 4)。例如, 当营养液中 Cr(VI)的浓

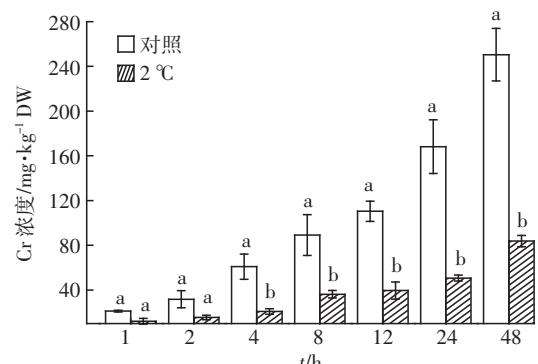


图 3 低温对李氏禾根吸收 Cr(VI)的影响

Figure 3 Effects of low temperature on uptake of Cr(VI) by *L. hexandra*

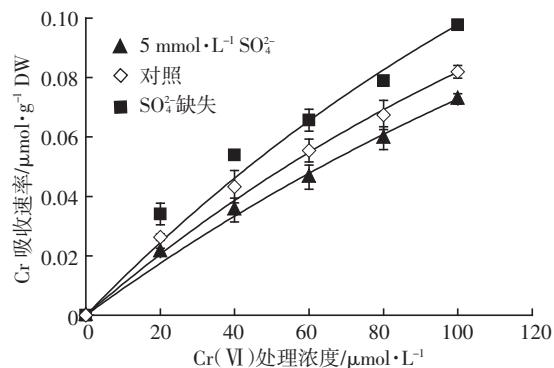


图 4 Cr(VI)吸收速率与 Cr(VI)处理浓度之间的关系

Figure 4 Concentration-dependence of Cr(VI) absorption rates by *L. hexandra* at the presence and absence of SO_4^{2-}

度为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, SO_4^{2-} 缺失使李氏禾根对 Cr(VI)的吸收增加了 19.8%, 而向营养液中加入 SO_4^{2-} , 能减少李氏禾根对 Cr(VI)的吸收。同样在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cr(VI)处理下, 李氏禾根对 Cr(VI)的吸收较对照下降了 18.1% (图 4)。 SO_4^{2-} 缺失, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$ 和对照处理, 李氏禾根对 Cr(VI)的吸收动态均符合 Michaelis-Menten 方程。根据双倒数法求得 Michaelis-Menten 方程的各参数显示, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$ 处理的李氏禾根对 Cr(VI)的最大吸收速率(V_{\max})与对照相似, 但米氏常数(K_m)较对照明显增加(表 1)。这表明 SO_4^{2-} 与 Cr(VI)竞争李氏禾根部相同的吸收位点。而在 SO_4^{2-} 缺失的条件下, 李氏禾根对 Cr(VI)吸收的米氏常数较对照减少了 24.3% (表 1)。这表明在 SO_4^{2-} 缺失的条件下, 李氏禾根吸收位点与 Cr(VI)的亲和力增加。

3 讨论

DNP 是氧化磷酸化解偶联剂, 由于它破坏了跨线粒体内膜的质子梯度从而抑制 ATP 生成, 并且它还会引起线粒体中 ATP 大量水解^[8-9]。因此, DNP 能有效地降低植物的能量供应水平。在本研究中, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNP 均显著地抑制了李氏禾根对 Cr(VI)的吸收(图 1), 表明李氏禾根对 Cr(VI)

表 1 李氏禾根对 Cr(VI)吸收的米-门方程常数

Table 1 Parameters of Michaelis-Menten kinetic equation fitted to Cr(VI) uptake by *L. hexandra*

处理	V_{\max} / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}\cdot\text{h}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	R^2
对照	0.144	91.08	0.99
SO_4^{2-} 缺失	0.148	68.87	0.99
$5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$	0.143	116.24	0.98

的吸收与能量有关,即李氏禾根对Cr(VI)的吸收可能存在主动运输方式。微量的Na₃VO₄(μmol级)即可抑制各种P型-ATP酶的活性^[10]。本实验中在60 μmol·L⁻¹ Cr(VI)处理下,Na₃VO₄对李氏禾根吸收Cr(VI)具有明显的抑制作用,表明李氏禾根对Cr(VI)的吸收有主动运输的作用(图2)。这与DNP抑制吸收的实验结果一致。为排除代谢抑制剂本身对植物吸收离子的影响,分析了低温对李氏禾根吸收Cr(VI)的影响,结果进一步证实,李氏禾根对Cr(VI)的吸收可能存在主动吸收的机制。这与前人的研究结果是一致的。Skeffington等^[11]发现叠氮化钠等代谢抑制剂能有效地减少大麦对Cr(VI)的吸收,Peralta-Videa等^[12]认为植物对Cr(VI)的吸收是主动运输。在本研究中,DNP、Na₃VO₄和低温均能有效抑制李氏禾根对Cr(VI)的吸收,表明李氏禾根存在对Cr(VI)的主动吸收。主动吸收能帮助植物从环境中获取更多的金属离子,对植物富集特定金属元素起到一定的作用。

本研究中在SO₄²⁻作用下,李氏禾根对Cr(VI)的最大吸收速率V_{max}没有显著变化,而米氏常数K_m较对照增加了21.64%(表1)。这表明SO₄²⁻对李氏禾根吸收Cr(VI)的抑制是一种竞争性抑制。由于SO₄²⁻和Cr(VI)在生物化学方面存在着较多的相似性,Pankow和Janauer^[13]认为,Cr(VI)以CrO₄²⁻阴离子形式被植物吸收,可能会干扰植物对SO₄²⁻的吸收。SO₄²⁻会抑制大麦幼苗对Cr(VI)的吸收^[14]。Riedel^[15]发现,海链藻对Cr(VI)的吸收与外源SO₄²⁻浓度成反比,而且Cr(VI)会抑制其对SO₄²⁻的吸收。经过Cr(VI)处理的芥菜明显减少了对SO₄²⁻的吸收^[16]。Kleiman和Cogliatti^[17]认为SO₄²⁻和Cr(VI)能够竞争根细胞上相同的吸收位点。因此,李氏禾根细胞表面可能存在着SO₄²⁻和Cr(VI)共同的吸收位点。在SO₄²⁻缺失的条件下,李氏禾根对Cr(VI)吸收的米氏常数K_m较对照显著下降。这表明SO₄²⁻缺失不仅促进了李氏禾根细胞对Cr(VI)的吸收,还增强了Cr(VI)与李氏禾根细胞吸收位点的亲和力。Lee^[18]等发现SO₄²⁻缺失的植物在增强对SO₄²⁻吸收的同时也增强对其化学类似物的吸收,即SO₄²⁻缺失时,植物可能会增强对Cr(VI)的吸收。人们认为Cr(VI)是通过硫酸根运输系统进入植物体内的^[19]。NtST1(一种硫转运蛋白)的表达增加了SO₄²⁻和Cr(VI)在酿酒酵母^[20]和转基因烟草^[21]中的含量,那么对于李氏禾根中是否存在与Cr(VI)吸收有关的硫转运蛋白,有待进一步开展分子生物学研究。

4 结论

能量代谢抑制剂和低温能够抑制李氏禾根对Cr(VI)的吸收,表明李氏禾根中可能存在对Cr(VI)主动吸收的机制。SO₄²⁻缺失能促进李氏禾根对Cr(VI)的吸收,而SO₄²⁻没有显著改变李氏禾根对Cr(VI)的最大吸收速率V_{max},但增加其米氏常数K_m值。这些结果表明,李氏禾根对Cr(VI)的吸收可能与硫酸根吸收体系有关。

参考文献:

- [1] Guerinet M L. The ZIP family of metal transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465(1-2):190-198.
- [2] Williams L E, Pittman J K, Hall J L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465(1-2):104-126.
- [3] Zhang X H, Liu J, Huang H T, et al. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(6):1138-1143.
- [4] Liu J, Duan C Q, Zhang X H, et al. Characteristics of chromium(Ⅲ) uptake in hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 74:122-126.
- [5] 何红蓼,倪哲明,李冰,等.环境样品中痕量元素的化学形态分析Ⅱ.砷汞镉锡铅硒铬的形态分析[J].岩矿测试,2005,24(2):118-128.
He H L, Ni Z M, Li B, et al. Trace elemental speciation in environmental samples: II. Speciation of As, Hg, Cd, Sn, Pb, Se and Cr[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2005, 24(2):118-128.
- [6] Leita L, Contin M, Maggioni A. Distribution of cadmium and induced Ca-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*[J]. *Plant Science*, 1991, 77:139-147.
- [7] Ruelland E, Zachowski A. How plants sense temperature[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 69:225-232.
- [8] Felle H, Bentrup F W. A study of primary effect of the uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazone on membrane potential and conductance in *Riccia fluitans*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, 464:179-187.
- [9] Tripathi R D, Rai U N, Gupta M, et al. Cadmium transport in submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. in presence of various metabolic inhibitors and calcium channel blockers[J]. *Chemosphere*, 1995, 31(7):3783-3791.
- [10] Williams L E, Pittman J K, Hall J L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1465:104-126.
- [11] Skeffington R A, Shewry P R, Peterson P J. Chromium uptake and transport in barley seedlings(*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Planta*, 1976, 132(3):209-214.
- [12] Peralta-Videa J R, Lopez M L, Narayan M, et al. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food

- chain[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41: 1665–1677.
- [13] Pankow J F, Janauer G E. Analysis for chromium traces in natural water; Preconcentration of chromate from ppb levels in aqueous solutions by ion exchange[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1974, 69(1): 97–104.
- [14] Shewry P R, Peterson P J. The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1974, 25(4): 785–797.
- [15] Riedel G F. The relationship between chromium(VI) uptake, sulfate uptake and chromium(VI) toxicity in the estuarine diatom *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Aquatic Toxicology*, 1985, 7(3): 191–204.
- [16] Schiavon M, Pilon-Smits E A H, Wirtz M, et al. Interaction between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2008, 37: 1536–1545.
- [17] Kleiman I D, Cigliatti D H. Uptake of chromate in sulfate deprived wheat plants[J]. *Environmental Pollution*, 1997, 97(1–2): 131–135.
- [18] Lee R B. Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency[J]. *Annals of Botany*, 1982, 50: 429–449.
- [19] Schiavon M, Galla G, Wirtz M, et al. Transcriptome profiling of genes differentially modulated by sulfur and chromium identifies potential targets for phytoremediation and reveals a complex S–Cr interplay on sulfate transport regulation in *B. juncea*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 239: 192–205.
- [20] Smith F W, Hawkesford M J, Prosser I M, et al. Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulfate transporter at the plasma membrane[J]. *Molecular and General Genetics*, 1995, 247(6): 709–715.
- [21] Kim Y J, Kim J H, Lee C E, et al. Expression of yeast transcriptional activator MSN1 promotes accumulation of chromium and sulfur by enhancing sulfate transporter level in plants[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(1): 206–210.