

## 铬诱导植物根细胞壁化学成分变化的 FTIR 表征

张晓斌, 刘 鹏\*, 李丹婷, 徐根娣, 蒋敏姣

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

**摘 要** 随着制革、电镀等行业的发展, 铬污染已成为严重的环境问题而受到人们的关注。铬在植物体内主要积累于根部, 植物根细胞壁化学变化与金属元素在植物体内的蓄积行为有密切关系。与其他方法比较, 应用 OMNI 采样器-FTIR 直接测定法表征细胞化学成分变化具有简便、快速和准确的优点。文章用 FTIR 对凤眼莲(*Eichhornia crassipes*) 和空心莲子草(*Alternanthera philoxeroides*) 根细胞壁进行了测定、分析和指认, 并利用半定量分析方法研究了铬处理和对照处理下根细胞壁红外光谱的差异。结果表明, 铬处理的凤眼莲和空心莲子草根细胞壁上—OH 向低频分别发生了 20 和 6  $\text{cm}^{-1}$  的位移, 同时凤眼莲的根细胞壁上—OH 和自由羧基  $\text{COO}^-$  等吸附位点数目较对照均有所增加, 而空心莲子草则相反。说明这些基团与铬的结合密切相关, 进一步解释了凤眼莲耐铬及其在根部积累铬的机理, 说明 FTIR 在监测逆境诱导植物化学成分变化和环境绿色修复方面具有广泛的应用前景。

**关键词** 傅立叶变换红外光谱; 铬; 细胞壁

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)05-1067-04

### 引 言

水、空气和土壤中的铬可以通过食物链逐级富集, 对动植物和人类健康构成危害, 其中又以 Cr(VI) 的生物毒性最大<sup>[1]</sup>。Cr(VI) 在细胞内参与氧化还原的过程, 被转化成较低的价态, 从而影响细胞正常的新陈代谢<sup>[2]</sup>。水体中的重金属对植物产生毒性的前提是金属与植物细胞的结合。细胞壁是植物细胞特有的结构, 主要由蛋白质和多糖如纤维素、半纤维素、木质素、果胶质等组成, 有许多有机配体基团如羟基、羧基、氨基、醛基、巯基等<sup>[3,4]</sup>, 可以参与一系列反应如离子交换、络合、沉析及结晶, 改变金属元素在植物体内的蓄积行为<sup>[5]</sup>。探究金属毒害对植物细胞壁及组分的影响, 以及细胞壁组分参与金属蓄积的特征, 对阐述植物体内金属耐性和解毒机制可提供非常有用的信息<sup>[6]</sup>。

细胞壁上化学结构的变化主要采用化学分级分离细胞壁, 采用气相色谱测定各糖组分的变化。这些分析方法不仅费时, 需要大量植物材料, 而且采用溶剂溶解细胞壁上糖分会导致不真实生化过程。FTIR 被认为是快速测定细胞组分变化的检测手段<sup>[7,9]</sup>, 可以得到植物细胞壁上非破坏性的聚合物性质及基团的特征, 且所需植物材料样品很少, 能提供丰富的细胞壁组分结构信息。近年来, 红外光谱分析在重金

属污染对植物营养的影响和环境生物修复方面也有应用<sup>[10,11]</sup>。同时, 细胞壁上羟基、羧基、氨基、醛基、巯基等的 FTIR 特征吸收峰变化, 可以反映出细胞壁上有机配体基团与重金属离子的结合信息。

据报道, 凤眼莲(*Eichhornia crassipes*) 能在其根部积累高浓度的铬( $70 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>。我们在研究过程中发现, 凤眼莲在水体中 Cr(VI) 浓度达到  $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时仍能正常生长, 而空心莲子草(*Alternanthera philoxeroides*) 根系生长发育却受到严重抑制。本文对铬处理和无铬处理下两种植物根细胞壁的傅里叶红外光谱进行了测定和分析, 探究细胞壁上各组分及其有机配体的基团结构参与植物体内重金属解毒的机制, 以期对植物适应逆境条件下的对策理论提供创新研究方法。

### 1 实验部分

#### 1.1 植物材料

供试植物凤眼莲和空心莲子草均取自浙江师范大学生物园, 反复用蒸馏水冲洗, 挑选生长一致且长势相同的植物转移到 4.0 L 的水培容器中(每盆 5 株苗), 预处理 2 周后, 在稀释了 800 倍的完全营养液中进行铬处理, 铬以  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  形式加入, 浓度梯度为 0(CK) 和  $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr, 重复 3 次, 每

收稿日期: 2006-12-02, 修订日期: 2007-03-03

基金项目: 浙江省科技攻关重点项目(2005C24011) 和环境修复生态健康教育部重点实验室开放基金项目(050204) 资助

作者简介: 张晓斌, 1982 年生, 浙江师范大学化学与生命科学学院在读硕士生 \* 通讯联系人 e-mail: pliu99@163.com

天用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$  或  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$  调节营养液 pH 至  $6 \pm 0.3$ 。每 7 d 更换一次营养液, 植物处理 30 d 后收获。用水将植株冲洗干净, 再用去离子水浸泡交换 20 min, 去除根表面吸附的离子, 最后用去离子水冲洗干净, 吸水纸吸干表面水, 备用。

### 1.2 植物根细胞壁提取分离

准确称取 4 g 左右的植物根于石英研钵中, 用研钵研成粉状。每次用 75% 冰乙酸冲洗两次, 研磨, 移入离心管, 并在冰浴中存放 20 min。此匀浆液以 4 000 rpm 离心 10 min ( $4^\circ\text{C}$ ) (以下试剂用量均为  $10 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ )。沉淀物分别用冰丙酮、冰甲醇-三氯甲烷 ( $\varphi = 1:1$ ) 和甲醇各冲洗一次, 并在 4 000 rpm 下离心 10 min。弃去上清液, 沉淀物即为粗制细胞壁, 冷冻真空干燥, 尽可能除去细胞壁上吸附的饱和水。

### 1.3 植物细胞壁及组分的 FTIR 表征

对上述粗制细胞壁进行红外光谱测定。光谱仪为美国 Nicolet NEXUS 670 FTIR, 光谱范围  $4\,000 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$ , 分辨率为  $0.1 \text{ cm}^{-1}$ , 扫描累加次数 32 次。应用 OMNIC 采样器直接测定红外光谱, 采用 OMNIC E.S.P.5.1 同步智能软件, ATR 校正, 每个样品测定前均对背景进行扫描, 得到的红外

结果造成的影响, 每种样品取 9 份用于红外光谱的扫描观察。

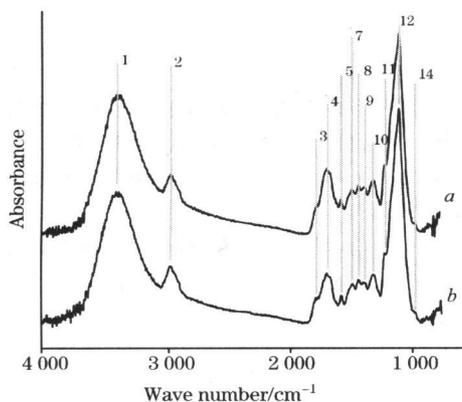
## 2 结果与讨论

### 2.1 凤眼莲和空心莲子草根细胞壁 FTIR 谱图的分析

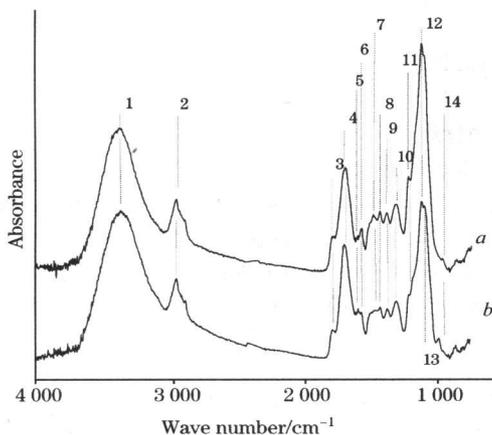
图 1 和图 2 分别为凤眼莲和空心莲子草根细胞壁 FTIR 图谱。

**Table 1 Functional groups of the cell wall and the corresponding infrared absorption frequencies**

Number	Function group	Wavenumber/ $\text{cm}^{-1}$			
		<i>E. crassipes</i> root cell wall		<i>A. philoxeroides</i> root cell wall	
		Control	Cr treated	Control	Cr treated
1	—OH, —NH	3 382	3 362	3 354	3 348
2	C—H	2 926	2 930	2 919	2 923
3	—COOR	1 717	1 721	1 735	1 735
4	—C=O(酰胺 I 带)	1 635	1 632	1 636	1 645
5	—N—H(酰胺 II 带)			1 541	1 545
6		1 516	1 514	1 508	1 516
7	COO <sup>-</sup>	1 419	1 420	1 419	1 415
8	—CH <sub>2</sub>	1 367	1 370	1 372	1 372
9	—C=O	1 318	1 315	1 319	1 318
10	C—N, N—H	1 247	1 247	1 251	1 249
11		1 153	1 149	1 156	1 155
12	C—O			1 057	1 055
13		1 036	1 036		1 035
14	—OH	903	903	899	928



**Fig. 1 FTIR spectra of root cell wall of Cr treated *Eichhornia crassipes* (b) and control (a)**



**Fig. 2 FTIR spectra of root cell wall of Cr treated *Alternanthera philoxeroides* (b) and control (a)**

FTIR 谱图是植物细胞壁各主要化学成分的综合反映, 可以根据所含化学成分的官能团特征找到相应红外光谱吸收峰的归属。由图 1, 图 2 和表 1 可知, 凤眼莲根细胞壁上羟基 (—OH) 的 FTIR 吸收峰一般为  $3\,382 \text{ cm}^{-1}$ , 当羟基上的 O 配体参与 Cr 结合时, 其吸收峰移向低频  $3\,362 \text{ cm}^{-1}$ 。同样, 空心莲子草根细胞壁上—OH 在结合了 Cr 之后也发生了  $6 \text{ cm}^{-1}$  的位移。因此, 高含量的  $\nu_{\text{OH}}$  伸缩振动峰说明凤眼莲和空心莲子草根细胞壁上含有大量—OH, 同时也说明细胞壁与 Cr(VI) 结合过程中化学吸附起了一定作用。这一结果与韩润平等对结合重金属前后浮萍的红外光谱比较研究的结论一致<sup>[13]</sup>。 $2\,926 \text{ cm}^{-1}$  左右的吸收是饱和 C—H 键的伸缩振动吸收, 主要来自于细胞壁中蛋白质、纤维素和果胶等组织成分。FTIR 中反映细胞壁多糖信息的是指纹区  $900 \sim 1\,200 \text{ cm}^{-1}$  (糖链的特征峰) 和  $1\,600 \sim 1\,750 \text{ cm}^{-1}$ 。 $1\,036$  和  $1\,056 \text{ cm}^{-1}$  附近主要为纤维素糖链中 C—C 和 C—O 键的吸收峰,  $1\,153 \text{ cm}^{-1}$  左右为纤维素中糖苷的 C—O—C 吸收峰,  $1\,372 \text{ cm}^{-1}$  为纤维素中甲基的伸缩振动吸收峰, 说明细胞壁中有较多的纤维素。 $1\,419 \text{ cm}^{-1}$  左右归属为果胶质糖醛酸中羧酸根离子 (COO<sup>-</sup>) 的特征吸收峰, 说明胼胝中有较多的果胶质, 而  $1\,736 \text{ cm}^{-1}$  归属为酯化果胶中酯基的伸缩振动吸收峰。 $1\,640 \text{ cm}^{-1}$  附近为细胞壁蛋白质上的 C=O (酰胺 I 带), 而  $1\,540$  及  $1\,515 \text{ cm}^{-1}$  附近为蛋白质上 N—H 特征吸收峰 (酰胺

II 带), 它通常作为半定量分析的标准谱带<sup>[14]</sup>。1 250  $\text{cm}^{-1}$  附近是酰胺 III 带, 是 C—N 的伸缩振动和 N—H 的弯曲振动引起的, 可能还有 P=O 与 C=S 的伸缩振动或羧基 C—O 的伸缩振动的贡献, 其中前 2 个峰是蛋白质的特征谱带。899 ~ 928  $\text{cm}^{-1}$  可能是羧酸中 O—H 面外变形振动吸收峰。

## 2.2 FTIR 谱图特征峰的半定量分析

为揭示植物根部细胞壁红外光谱图的重复性和差异性, 本文根据 FTIR 谱图进行了半定量分析, 对每个谱图分别以图中 2 号峰(2 925  $\text{cm}^{-1}$  左右)  $\text{CH}_3$  中的 C—H 特征吸收峰的吸光度( $A_{2925}$ )为基准, 其他特征峰的吸光度  $A$  与  $A_{2925}$  的比值, 来半定量分析凤眼莲根和空心莲子草根细胞壁中的特征峰变化, 结果如表 2 所示。

Table 2 Half-quantitative analysis results

$A/A_{2925}$	<i>E. crassipes</i> root cell wall		<i>A. philoxeroides</i> root cell wall	
	Control	Cr treated	Control	Cr treated
$A_{3398}/A_{2925}$	2 284	2 299	2 088	1 818
$A_{1736}/A_{2925}$	0 495	0 485	0 522	0 467
$A_{1639}/A_{2925}$	0 998	0 940	1 502	1 522
$A_{1540}/A_{2925}$	0 505	0 417	0 534	0 695
$A_{1419}/A_{2925}$	0 709	0 710	0 811	0 687
$A_{1372}/A_{2925}$	0 764	0 771	0 842	0 714
$A_{1153}/A_{2925}$	1 125	1 164	1 282	0 862
$A_{1055}/A_{2925}$			3 030	1 963
$A_{1035}/A_{2925}$	3 239	3 760	2 882	1 910

与对照处理相比, 铬处理条件下, 凤眼莲和空心莲子草根细胞壁上  $A_{1735}/A_{2925}$  比值下降, 说明铬处理导致了两种植物根细胞壁上果胶质甲基酯化程度的下降, 同时凤眼莲根细胞壁  $A_{3382}/A_{2925}$  比值和  $A_{1419}/A_{2925}$  比值较对照略有升高, 表明铬作用下其根细胞壁上—OH 和果胶质中  $\text{COO}^-$  数目略有增加;  $A_{1540}/A_{2925}$  比值和  $A_{1639}/A_{2925}$  比值的降低表明, 铬使细胞壁上蛋白质含量下降(图 1 和表 2);  $A_{1055}/A_{2925}$ ,  $A_{1035}/A_{2925}$ ,  $A_{1153}/A_{2925}$  和  $A_{1372}/A_{2925}$  比值升高, 说明根细胞壁中纤维素含量增加。对空心莲子草而言, 其根细胞壁  $A_{3382}/A_{2925}$  比值和  $A_{1419}/A_{2925}$  比值有明显降低, 意味着其根细胞壁上—OH 和果胶质中  $\text{COO}^-$  数目在铬处理下显著减少;  $A_{1540}/A_{2925}$  比值和  $A_{1639}/A_{2925}$  比值的升高, 与蛋白质含量在铬处理下有所升高相关(图 2 和表 2);  $A_{1055}/A_{2925}$ ,  $A_{1035}/A_{2925}$ ,  $A_{1153}/A_{2925}$  和  $A_{1372}/A_{2925}$  比值大幅下降, 说明铬使空

心莲子草根细胞壁中主要组分纤维素含量锐减。对照处理中, 凤眼莲根细胞壁中纤维素含量和—OH 数目明显高于空心莲子草, 而在铬处理时, 凤眼莲的根细胞壁中甲基酯化程度及果胶质  $\text{COO}^-$  含量等也明显高于空心莲子草。

细胞壁是具有大表面积的离子交换剂, 在细胞壁的三维结构中, 细胞壁多糖组分上含有的主要基团为—OH 和  $\text{COO}^-$ , 因而细胞壁具有较高的阳离子交换量(CEC)。据报道, 凤眼莲能在其根部积累高浓度的铬(70  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 并推测根部细胞壁的物理吸附作用做出了很大贡献<sup>[14]</sup>。本文结果显示, 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  铬处理 30 d 后, 凤眼莲根生长发育正常, 根细胞壁上—OH 和自由羧基  $\text{COO}^-$  数目较对照均有所增加。因此, 我们认为, 根细胞壁上—OH 和自由羧基  $\text{COO}^-$  参与了铬的结合, 凤眼莲在根部积累铬的能力与其在铬处理下根部细胞壁上—OH,  $\text{COO}^-$  等化学吸附位点的增加密切相关。—OH,  $\text{COO}^-$  等吸附位点的增加可能分别与铬处理下凤眼莲根细胞壁上纤维素组分的增加和果胶质甲基酯化程度的下降有关。据报道果胶质甲基酯化的形成, 降低细胞壁上自由羧基的数目, 不利于细胞壁对铬的固定, 且由于果胶质甲基酯化或乙基酯化降低有利于形成刚性细胞壁结构, 阻碍细胞壁的正常生长。因而, 我们可以推断, 铬处理下凤眼莲通过某种生理调节作用, 降低了根细胞壁上果胶质甲基酯化程度, 从而增加了其果胶质组分上的自由羧基( $-\text{COO}^-$ )的数目。我们利用植物修复方法净化含铬废水时, 铬处理下植物细胞壁纤维素、—OH 和自由羧基  $\text{COO}^-$  含量高可作为筛选净化植物的一个参考指标。

## 3 结 论

(1) 长期铬处理后, 植物根细胞壁的结构发生了变化, —OH 的吸收峰向低频发生了位移, 结合 Cr(VI) 时物理吸附与化学吸附共同作用。

(2) 铬处理下, 凤眼莲根细胞壁上—OH,  $\text{COO}^-$  等吸附位点的吸收峰的吸光度较对照均有所上升, 而空心莲子草则显著下降, 说明这些基团与铬的结合密切相关, 这种差异进一步解释了凤眼莲耐铬及其在根部积累铬的机理。

(3) FTIR 能作为探究金属毒害对植物细胞壁及组分的影响、细胞壁组分参与金属蓄积的特征的一种快速的检测手段, 在监测植物在逆境下化学成分变化及其环境修复等方面具有广泛的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] McGrath S P, Smith S. Chromium and Nickel. In Alloway B J, Ed. Heavy Metals in Soils, New York: Wiley, 1990. 125.
- [2] Arslan P, Beltrame M, et al. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 931: 10.
- [3] Leita L, Nobili M De, Cesco S. J. Plant Nutri., 1996, 19(3, 4): 527.
- [4] Iwasaki K, Sakurai K, Takahashi E. Soil Sci. Plant Nutr., 1990, 36(3): 431.
- [5] Mullen M D, Wolf D C, Beveridge T J, et al. Soil Biol. Biochem., 1992, 24: 129.
- [6] Suresh K, Subramanyan C. J. Inorganic Biochem., 1998, 69: 209.
- [7] Ana Alonso-Simón, Antonio E Encina, Penélope Gardá Angulo, et al. Plant Science, 2004, 167: 1273.
- [8] Grégory Mouille, Stéphane Robin, Mannä g Lecomte, et al. The Plant Journal, 2003, 35: 393.

- [ 9 ] Michael C J, Maureen C M. *Plant Physiol. Biochem.*, 2000, 38(1/2): 1.
- [ 10 ] CHI Guang-yu, LIU Xin-hui, LIU Shi-hong, et al(迟光宇, 刘新会, 刘素红, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(7): 1272.
- [ 11 ] HAN Run-ping, ZOU Wei-hua, ZHU Lu, et al(韩润平, 邹卫华, 朱路, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(11): 1801.
- [ 12 ] Mangabeira P A, Mielke M S, Arantes I, et al. *Applied Surface Science*, 2006, 252: 6816.
- [ 13 ] HAN Run-ping, LI Jian-jun, YANG Guan-yu, et al(韩润平, 李建军, 杨贯羽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2000, 20(4): 489.
- [ 14 ] LIU Ming-jie, WANG Zhao, SUN Shi-qing, et al(刘明杰, 王钊, 孙素琴, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(5): 688.

## FTIR Spectroscopic Characterization of Chromium-Induced Changes in Root Cell Wall of Plants

ZHANG Xiao-bin, LIU Peng\*, LI Dan-ting, XU Gen-di, JIANG Min-jiao

College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

**Abstract** Due to its wide industrial use, chromium is considered a serious environmental pollutant. Contamination of soil and water by chromium (Cr) is of recent concern. Chromium mainly accumulates in root in plants, and the change in compounds of the root cell wall have a close relation with the Cr accumulation. Compared with the other identification methods, the identification of the Chinese traditional and herbal drugs using Fourier transform infrared spectrometer with OMNI collector is simple and convenient, fast and accurate. In the present paper, the spectra of cell wall of Cr-treated root and control of *Eichhornia crassipes* and *Alternanthera philoxeroides* were determined. Absorption peaks were identified to the corresponding functional groups and half-quantitative analysis was also used. The results showed that a significant shift of —OH absorption peaks can be seen when comparing the FTIR spectra of control and Cr-treated plants, and the absorbency of —OH and COO<sup>-</sup> groups went up in *E. crassipes* root cell wall while dropped in *A. philoxeroides* root cell wall. It is suggested that —OH and COO<sup>-</sup> groups were referred in binding Cr<sup>6+</sup> in aqueous solutions, and this may be included in the mechanism of Cr accumulation in *E. crassipes* roots. Therefore, FTIR spectrometry could be widely used to monitor changes in chemical composition of plant parts under stresses and environmental restoration.

**Keywords** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy; Chromium; Cell wall

(Received Dec. 2, 2006; accepted Mar. 3, 2007)

\* Corresponding author