科学通报 2009 年 第 54 卷 第 2 期: 157 ~ 160
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

同步辐射技术在大气环境生物监视器中的应用研究

张元勋[①], 曹同[②], A. Iida[③], 黄万霞[④], 曹清晨[①], 娄玉霞[②], 张桂林[①], 李燕[①]

① 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800;
② 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234;
③ Photon Factory, National Laboratory for High Energy Physics, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan;
④ 中国科学院高能物理研究所, 北京 100049
E-mail: yxzhang@sinap.ac.cn

2008-08-02 收稿, 2008-11-14 接受
中国科学院知识创新工程重要方向性项目(编号: KJCX3.SYW.N3)、国家自然科学基金(批准号: 10775170)、上海市自然科学基金(批准号: 05ZR14143)、上海市科委重点项目(编号: 08390513800)、北京正负电子对撞机国家实验室(编号: VR-07004)和日本光子工厂 KEK(编号: 2007G504)资助

摘要 基于同步辐射先进光源为研究平台, 探讨了苔藓植物监视大气污染的机制. 使用同步辐射 X 射线显微成像技术, 观测了苔藓植物细胞超微结构的变化. 使用同步 X 荧光微探针对苔藓组织表面和茎干剖面进行微区扫描测定, 获取了苔藓植物叶面和茎断面 Pb, Cu, Fe, Ni, Mn, Zn, Ca, K 等元素的精细分布. 结果表明, 苔藓植物对环境重金属污染十分敏感且具有较强的富集能力, 环境污染会导致苔藓植物体细胞损伤、超微结构变化和生长发育滞缓等一系列影响. 在遭受污染情况下, 叶表吸附和富集了过量的 Fe, Ni, Pb 等金属离子, 同时抑制了植物对 K, Ca, Zn 等微量营养元素的正常吸收.

关键词
同步辐射
环境生物监视器
苔藓
大气污染

研究表明, 生物监测由于具有简便、真实、灵敏等其他监测手段无法比拟的优越性而备受青睐, 苔藓就是其中的代表植物[1]. 附生于树皮上的苔藓和地衣不受土壤条件等差异的影响, 可减少多因子分析中造成的困难. 它没有真正的根和维管组织, 表面积较大, 对环境因子的反应敏感度是种子植物的 10 倍[2]. 附生于树皮上的苔藓和地衣, 其生长所需的水分和养分依赖于大气中的湿沉降和干沉降, 因而可以直接反映大气污染程度. 苔藓、地衣系多年生绿色植物, 可提供污染物长时间内的危害累积效应. 苔藓植物由于体形小且结构简单, 有其特殊的生理适应机制, 能分布于各种环境, 而且苔藓取材容易, 调查方法简便, 因此是一种很好的环境生物监视器[3].

国外利用苔藓植物监测重金属污染已经得到了广泛的重视和应用[4], 国内近年也有利用苔藓和地衣作为生物监视器对环境重金属污染监测的报道[5]. 例如, 方炎明等人[6]使用中子活化法、原子吸收光谱和原子荧光光谱仪开展了苔藓对大气沉降重金属元素富集作用的研究; 李小梅等人[7]使用ICP方法测定南极乔治王岛上的苔藓样品, 得到了地球化学元素在苔藓植物体内的含量序列; 康士秀和沈显生等人[8,9]使用同步辐射X射线荧光分析法对南极苔藓植株中的重金属进行测定, 研究了植物样品中元素含量与生长环境的关系等. 从目前的研究状况来看, 测定的都是样本总体组织的理化指标, 缺乏对苔藓植物的细微深处进行形貌观察. 另外, 由于样本制备时受损, 无法再现苔藓植物受环境时空的变化和演化规律, 更无法进行实时跟踪研究[10]. 生物监测的机理研究是应用推广的前提, 近年来已成为国际研究的热点. 例如, 苔藓植物对环境变化引起的生理生态反应和适应机制, 污染可引起苔藓植物细胞膜系统损伤、线粒体膨胀、叶绿体破坏并富集晶体等, 环境污染造成植物体超微结构和发育等一系列影响, 更深入的环境变化对苔藓DNA水平上的蛋白质变化和基因稳定性的影响研究就更少了[11]. 本项研究基于先进的同步辐射光源及相关技术为研究平台, 将X射线荧光微

探针技术和微区显微成像技术相结合，研究在不同环境下苔藓植物吸收金属离子机制、重金属累积规律以及元素的迁移分布特性，观测苔藓植物细胞超微结构的变化，研究苔藓植物对污染的生理生态反应机制，为进一步阐明苔藓植物监视大气污染的作用机理提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 样品制备

根据对上海和华东地区的调查，细叶真藓(真藓科，*Bryum capillare* Hedw.)对重金属富集能力强，分布广泛，取材容易，可作为主要研究材料. 样本采自地处上海郊区嘉定的中国科学院上海应用物理研究所内，将采集的样本充分混匀后，随机分成两份，分别装入尼龙丝编织的网袋内. 一份样品作为对照组，置于应用物理研究所实验楼顶(15 m)空旷处. 另一份样品作为污染组，放置在位于上海吴淞工业区中心的钢铁研究所大气监测站楼顶(16 m)空旷处. 两份样品在不同环境状况下同时暴露一个月.

暴露后的样品用去离子水清洗三遍后沥干，除去表面浮尘污染就可以直接进行同步辐射 X 射线相衬成像分析. 而用于同步辐射 X 荧光微探针扫描分析的样品必须进行制备，方法是在光学显微镜的观测下，使用特制的高纯钛手术刀，将清洗干净的苔藓茎、叶和假根等组织逐一分离，并作茎横断面切片，然后将单片叶和茎切片等组织分别转移到贴有 6 μm 厚聚乙烯膜的有机玻璃框架上.

1.2 实验测定

中国科学院高能物理研究所形貌站的X射线相衬成像装置使用同步辐射光源代替传统光源，具有极强亮度(比常规X射线源高 10^3~10^6 倍)和高准直性(垂直张角为零点几毫弧度). 实验选择使用能量为 10 keV的单色光，利用空间相干X射线透过样品后携带的位相信息成像，通过CCD数字探测器或使用感光胶片曝光，实现实时动态显微观察. 这是一种全新的成像方法，与传统吸收反衬成像相比，这种技术的敏感性要高 1000 倍，尤其对苔藓植物可以在完全不破坏组织的自然状态下研究完整的细胞以及细胞器的结构，特别是在显微观察细胞核、线粒体、叶绿素等时具有更显著的优势[12].

同步辐射X荧光微探针扫描分析是在位于日本筑波高能物理国家实验室的光子工厂BL-4A实验站上进行. 通过调节多层膜单色器，选择单色激发能量为 14.2 keV，这样可以突出对感兴趣元素，如Pb进行选择激发，从而大大提高激发效率和减少谱线干扰. 通过调整K-B微聚焦镜，使入射光束成为 3.5 μm×5 μm微束. 实验测定时将苔藓叶片和茎切片样品置于二维移动平台上，使样品台沿着设定的扫描范围逐点(point by point)移动，从而实现单色光激发的X荧光微探针对苔藓组织表面和剖面进行测定，提供元素微区分布信息. 在微机上设置全自动扫描能谱获取系统，将多道分析器(MCA)设置成 8 个能量范围的单通道，分别采集K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn和Pb共 8 个元素的特征X射线荧光强度，然后由分析软件进行数据处理[13].

2 结果和讨论

2.1 同步辐射相衬显微成像的实验观察

在同步辐射形貌实验站上，利用插入件辐射引出的空间相干硬X射线，运用同轴轮廓成像原理，采用位相衬度成像方法，配以CCD数字图像系统，实现对苔藓组织进行实时动态显微观察. 研究在不同污染环境条件下，苔藓组织的生理生化反应. 图 1(a)是正常环境下生长的苔藓植物的数码照片，图 1(b)是它的同步辐射X射线相衬成像. 可以看到苔藓植物生长发育良好，微观结构清晰完整. 而图 2 是苔藓植物在遭受吴淞工业区污染环境暴露后的同步辐射X射线相衬成像，观察环境暴露前后的苔藓形貌，植株明显表现为失绿变黄. 当苔藓受到大气污染物伤害时，最常见的反应是叶绿素降解并富集晶体、叶片厚度减小、光合作用速率变慢等宏观效应. 微观显微成像反映了苔藓植物细胞受到损伤并逐渐凋谢死亡，导致植株出现萎靡不振症状. 出现这些变化的直接原因是受到钢铁研究所周边大气污染所致，其伤害程度与大气颗粒物中的污染密切相关[14].

2.2 同步辐射 X 荧光微探针的分析测定

使用同步辐射 X 荧光微探针对不同大气环境暴露下的苔藓植物叶片、茎横断面以及假根进行微区元素扫描分析，获取苔藓植物叶片和茎剖面微区组织中 Pb, Cu, Cr, Fe, Ni, Mn, Zn 等金属离子的精细分布，探讨重金属对苔藓细胞超微结构和发育的影响. 图 3 显示了钢铁研究所环境暴露后的细叶真藓茎横切片中 Fe, Cu, Zn 和 Pb 的分布，从图中可以清晰地看到苔藓茎干的表皮和中心部位的髓细胞中含有较少的无机元素，而金属元素主要富集在皮层细胞中. 由于藓

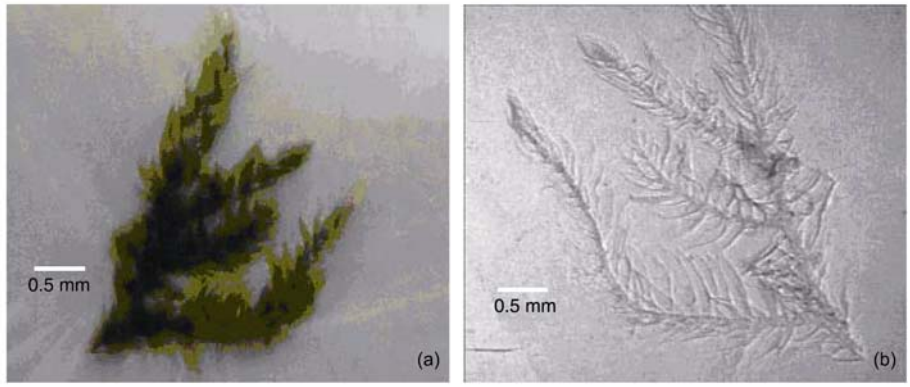


图 1　正常环境下生长的苔藓植物(a)及其同步辐射 X 射线相衬成像(b)

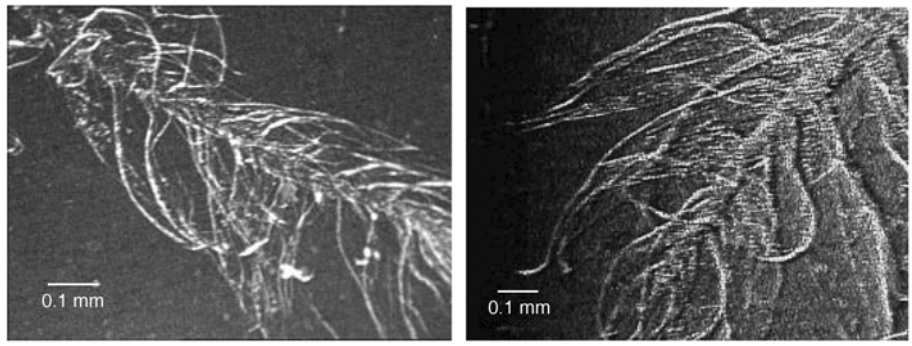


图 2　遭受污染环境暴露后苔藓植株的同步辐射 X 射线相衬成像

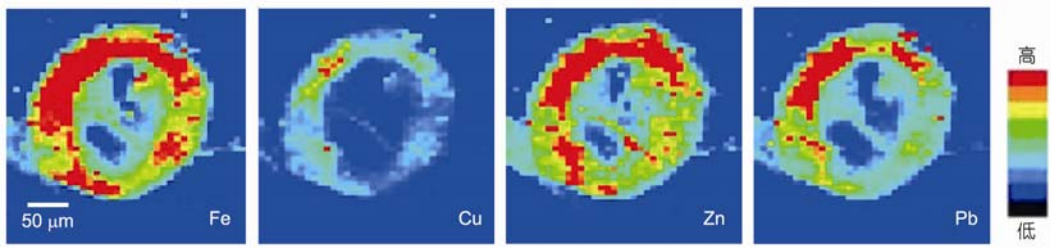


图 3　细叶真藓的茎切片中 Fe, Cu, Zn 和 Pb 元素的精细分布

类植物茎的结构中没有维管组织，不能输运水分和养料，因而水分、有机物和无机元素的运输和贮藏主要由皮层薄壁细胞来完成.

图 4 和 5 分别显示了细叶真藓活体样本在应用物理研究所和钢铁研究所不同大气环境暴露后的叶片中K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn和Pb元素的精细分布. 苔藓叶片大多为单层细胞，污染物质可从叶的两面直接侵入叶细胞，每个叶细胞所受的平均浓度皆大于其他高等植物，而且苔藓形体小和生长缓慢，一旦受到污染，不易恢复[15]. 由图可见，在应用物理研究所正常大气环境下暴露的苔藓植物生长发育良好，其叶片对毒性元素Pb的吸收主要集中在中肋部位，Pb 在叶绿体细胞中的浓度很低，而且分布均匀. 但是在钢铁研究所暴露的苔藓植物由于受到 Fe, Mn, Pb 等重金属的过量污染，叶片吸附和富集了大量的 Pb 等毒性元素，使其形体变小和生长缓慢，污染严重时还会导致苔藓植物体死亡. 钢铁研究所暴露的苔藓由于受到 Pb 等元素的毒性作用和它的拮抗作用，叶片中 K, Ca, Zn 等营养元素含量相比正常苔藓已经很少，表明叶片已经逐渐丧失了吸附营养元素的能力.

3　结论

同步辐射显微成像观察了苔藓植株在不同环境暴露下超微结构的变化，苔藓植物除了遭受大气中 SO_2, CO_2, NO_x 等污染因素外，还受到 Mn, Ni, Pb 等无

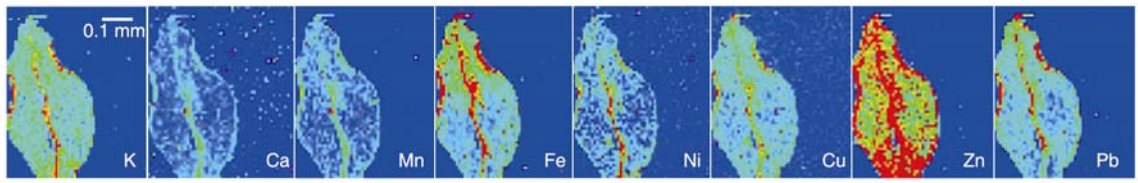


图 4 在上海应用物理研究所大气环境暴露后的苔藓叶片中元素微区分布

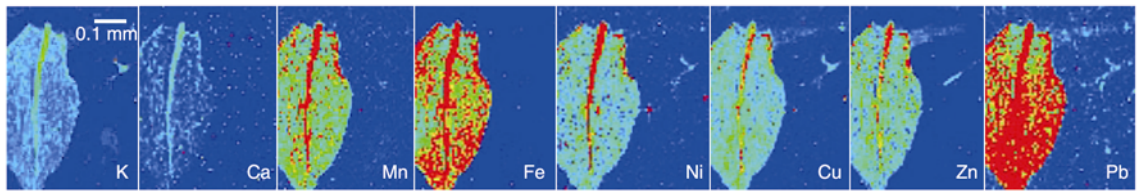


图 5 在上海钢铁研究所大气环境暴露后的苔藓叶片中元素微区分布

机元素的污染，环境污染会导致苔藓植物体细胞损伤、超微结构变化和生长发育滞缓等一系列影响. 苔藓植物对重金属元素具有较强的累积吸收能力，且 Pb 和 K 之间表现为拮抗作用. 苔藓植物遭受毒害后，体内的细胞器受到不同程度的损伤，揭示了重金属对苔藓植物的毒害机理.

同步辐射 X 荧光微探针扫描分析了苔藓植物的叶片和茎断面，表明叶片和茎干吸附金属离子后不是均匀分布的，尤其是叶尖和中肋部位富集了 K, Ni, Fe, Pb 等元素. 在遭受污染状况下，叶表吸附和富集了过量的 Ni, Pb 等金属离子，引起苔藓植物细胞膜系统损伤、线粒体膨胀、叶绿体破坏和细胞新陈代谢功能伤害，同时抑制了植物对 K, Ca, Zn 等营养元素的正常吸收.

基于先进的同步辐射光源为研究平台，将光子扫描微探针分析技术和微区显微成像技术相结合，观测了苔藓植物细胞超微结构的变化和对污染的生理生态反应特征，研究了在不同环境下苔藓植物吸收金属离子机制、重金属累积规律以及元素的迁移特性. 初步研究结果表明，先进的同步辐射分析技术在揭示苔藓植物监视大气污染的机理研究中大有可为，并正在发挥着其他检测技术不可替代的积极作用.

参考文献

1 Szczepaniak K, Biziuk M. Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. Environ Res, 2003, 93: 221—230[doi]
2 Wolterbeek B. Biomonitoring of trace element air pollution: Principles, possibilities and perspectives. Environ Pollut, 2002, 120: 11—21[doi]
3 Wolterbeek B, Verburg T G. Judging survey quality: Local variances. Environ Monit Assess, 2002, 73: 7—16[doi]
4 Maurizio A, Ornella A, Raffaele C. The use of mosses as environmental metal pollution indicators. Chemosphere, 2003, 50: 333—342 [doi]
5 邵晶, 张朝晖, 柴之芳, 等. 苔藓对大气沉降重金属元素富集作用的研究. 核化学与放射化学, 2002, 24(1): 6—10
6 方炎明, 魏勇, 张晓平, 等. 苔藓生物监测大气重金属污染研究进展. 南京林业大学学报, 2000, 24(5): 64—68
7 李小梅, 赵俊琳, 孙立广. 南极地区苔藓剖面中地球化学元素的营养运移特征. 生态学报, 2001, 21(7): 1079—1083
8 康士秀, 沈显生, 姚焜, 等. 同步辐射 X 射线荧光分析在植物微量元素分析中的应用. 自然科学进展, 2001, 11(10): 1050—1054
9 沈显生, 孙立广, 尹雪斌, 等. 菲尔德斯半岛 3 种金发藓植株的同步辐射 X 射线荧光分析. 极地研究, 2002, 14(2): 105—111
10 Conti M E, Cecchetti G. Biological monitoring: Lichens as bioindicators of air pollution assessment-a review. Environ Pollut, 2001, 114: 471—492[doi]
11 Knor I B, Naumova E N, Trounova V A, et al. Biological monitoring of meadow moths by SR-XRF technique. Nucl Instrum Meth A, 1995, 359(1): 324—326[doi]
12 Stevenson A W, Gureyev T E, Paganin D, et al. Phase-contrast X-ray imaging with synchrotron radiation for materials science applications. Nucl Instrum Meth B, 2003, 199: 427—435[doi]
13 Iida A. X-ray spectrometric applications of a synchrotron X-ray microbeam. X-ray Spectrometry, 1997, 26: 359—363[doi]
14 Fernandez J A, Aboal J R, Carballeira A. Identification of pollution sources by means of moss bags. Ecotoxic Environ Safety, 2004, 59: 76—83[doi]
15 Joohyoung L, Perry J, Eunju L. Correlation between environmenral conditions and the distribution of mosses exposed to urban air pollutants. Water Air Soil Pollut, 2004, 153: 293—305[doi]