

苜蓿修复重金属 Cu 和有机物苯并[a]芘复合污染土壤的研究

丁克强¹, 骆永明²

(1.南京工程学院,江苏 南京 210013;2.中国科学院南京土壤研究所土壤和环境生物修复研究中心,江苏 南京 210008)

摘要:采用室内盆栽试验方法,研究了苜蓿(*Medicago Sativa lam*)在 Cu 污染土壤中对多环芳烃苯并[a]芘污染的修复作用。通过 60 d 的温室盆栽试验表明,土壤中苯并[a]芘的可提取浓度随着时间延长逐渐减少,苜蓿加快了土壤中可提取态苯并[a]芘浓度的下降。在 1、10、100 mg·kg⁻¹ 苯并[a]芘处理浓度下,苜蓿生长的土壤中苯并[a]芘的减少率分别达 86.0%、84.3%和 39.8%。苜蓿通过增强根圈土壤中微生物的活性和数量而提高植物对苯并[a]芘的降解率,同时,植物的根、茎也可积累少量苯并[a]芘,并且能够在 Cu 和苯并[a]芘混合污染中正常生长,苜蓿对土壤中 Cu 无明显修复作用。由于土壤自身具有修复多环芳烃苯并[a]芘污染的自然本能,在 Cu 污染下种植苜蓿具有强化苯并[a]芘污染土壤的修复作用,可促进苜蓿生长,增强土壤微生物的活性,从而提高苜蓿修复 Cu 和苯并[a]芘混合污染土壤的能力。

关键词:苜蓿; Cu; 苯并[a]芘; 微生物生物量碳

中图分类号:X131.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0766-05

Bioremediation of Copper and Benzo[a]pyrene-Contaminated Soil by Alfalfa

DING Ke-qiang¹, LUO Yong-ming²

(1. Nanjing Institute of Technology, Nanjing 210013, China; 2. Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: Compared with contaminated soil with heavy metals or organic pollutants alone, the mixed contaminated soil with heavy metals and organic pollutants are more common. Using plant to decontaminate heavy metals and organic pollutants-contaminated soil may be a good technology of low cost, effective and friendly to environment. Bioremediation of Copper and Benzo[a]pyrene (B[a]p) contaminated soil by alfalfa (*Medicago Sativa lam*) was studied in 20 m² greenhouse under controlled temperature and light during cultivation. B[a]P was applied into soil with 3 concentrations: 1, 10 and 100 mg·kg⁻¹, and one-week aged seedlings of alfalfa were planted. Microorganisms in soil had natural attenuation and rehabilitated function to B[a]P under suitable conditions but the dynamic mechanism of extractable B[a]P needed more study. Alfalfa promoted the degradation of B[a]P in copper and B[a]P polluted soil. During 60 days pot experiment, the concentration of B[a]P in soil grown alfalfa was significantly lower than that without plant grown ($P<0.05$). Under 1, 10 and 100mg·kg⁻¹ B [a]P treatments, B[a]P biodegradability amounted to 86.0%, 84.3% and 39.8%, respectively. The microbial biomass in soil planted alfalfa was higher than that in soil without plant. A little of B[a]P was accumulated in the stems and roots during alfalfa growth period. So, alfalfa had strong tolerance to copper and B [a]P-contaminated soil, but had no obvious effects on degradation of copper in copper and B[a]p contaminated soil. These results indicated that alfalfa could enhance the degradation rate of B[a]P in the copper and B[a]p contaminated soil and increasing alfalfa yield and the activity of microbial in rhizosphere of soil could improve bioremediation of B[a]P in copper and B[a]P-contaminated soil.

Keywords: B[a]P; Cu; microbial biomass; alfalfa

植物修复污染土壤的研究现在已成为环境科学与技术研究的热点之一。植物修复技术具有绿色的、环境友好的、低费用的特点,被更多地应用于有机、无机物污染土壤的治理和恢复研究中^[1]。土壤犹如地球陆地表面的皮肤,成为陆地系统迎接各种污染物的第一屏障,有机、无机污染物最后都将进入土壤中,有机、无机污染物的混合污染是环境治理面临的现实问题。苯并[a]芘是5环结构的多环芳烃,有很强的致癌性,Ames实验阳性,能够导致染色体畸变、染色体交换、无序的DNA合成^[2]。因此苯并[a]芘被美国环保局列入优先控制有毒有机污染物的黑名单^[3],又因苯并[a]芘具有高的辛醇-水分配系数和较高的蒸汽压,在自然状况下苯并[a]芘很难降解,容易在土壤等环境中积累,造成土壤环境污染^[4]。植物根际土壤与非根际土壤的比较研究表明,植物可以明显地促进根际土壤中多环芳烃、杀虫剂、除草剂等有机物的降解^[5]。Pradhan等^[6]报道,苜蓿和柳枝稷可促进污染土壤中PAHs的降解,6个月后土壤中总PAHs浓度减少了57%。Reilley等^[7]研究表明,种植牧畜、酥油草、苏丹草、三叶草可以促进污染土壤中PAHs的降解,同时认为,一方面是根际作用促进了微生物降解菌的数量,另一方面是植物分泌物为微生物共代谢提供了基质物质。还有报道^[8]指出,植物根区分泌物刺激了微生物的生长,在根区提供了丰富的有机碳物质(根细胞的死亡也可以提供有机碳),这些有机碳物质的增加可促进微生物对污染物的矿化作用。但是,有关苜蓿草在重金属污染的土壤下多环芳烃的降解动态变化及其化学和生物学成因,国内外鲜见报道。

本文将在相关研究的基础上^[9],选择较难降解的5环典型多环芳烃苯并[a]芘和重金属Cu作为研究对象,通过盆栽试验,初步研究苜蓿在重金属Cu污染土壤下苯并[a]芘的降解能力及其影响因素,为今后进一步开展重金属和有机物混合污染土壤的生物修复技术的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤

土样采自中国科学院南京土壤研究所常熟农业生态实验站内的潜育水耕人为土^[10],俗名为乌栅土,风干后过2 mm尼龙筛,其理化性质如下:pH 7.8,有机质 36.3 g·kg⁻¹,全氮 2.25 g·kg⁻¹,全磷 0.75 g·kg⁻¹,全钾 17.4 g·kg⁻¹,阳离子交换量 215.9 mmol·kg⁻¹,试验土

壤中苯并[a]芘浓度低于岛津 10A-HPLC 荧光检测器的检测限,未被测出。

1.1.2 植物

紫花苜蓿 (*Medicago Sativa*)。

1.1.3 化学品

苯并[a]芘 (Benzo[a]pyrene),美国 Sigma 公司产品,纯度>97%。

1.2 研究方法

1.2.1 试验方法

在 20 m³ 的控温、控光的生长室里进行为期 60 d 的盆栽试验。先用分析纯的溶液态 CuSO₄ 调节土壤,使每一个处理 Cu 为 250 mg·kg⁻¹。然后,试验设计 3 种处理,其苯并[a]芘浓度为 1、10、100 mg·kg⁻¹ (表示低、中、高 3 种处理浓度),试验采取如下 3 个步骤将苯并[a]芘与试验土壤混合:

(1)每一浓度处理都先用 200 mL 丙酮溶解试验所需要的苯并[a]芘,然后分别加入到 100.0 g 土壤(作为第一母体污染土壤)中,充分搅拌。

(2)待第一母体污染土壤中丙酮挥发干后,再分别加入到 3 份 900.0 g 土壤(作为第二母体污染土壤)中,充分搅拌,放置 1 d。

(3)将第二母体污染土壤再分别混入到上述 3 种苯并[a]芘处理浓度试验设计所需的全部土壤中,放置 15 d,每天混合 1 次,最后分装到带有底盘的塑料盆(上缘直径 8 cm,底面直径 5 cm,高 7 cm)中,每盆装 100.0 g 土壤(烘干计),放置 1 周后使用。

调节各处理的土壤湿度,使土壤田间持水量保持为 60%,每盆种植 20 粒苜蓿种子,7 d 后间苗,使每盆为 15 棵苗。同时设置不含苯并[a]芘和 Cu 的处理为对照。每一处理重复 4 次。在盆栽期间,通过每天称重将盆栽土壤水分维持在田间持水量的 60%,生长室内的日间温度为 25 ℃(10 h),夜间温度 20 ℃(14 h),光照强度为 4 500~7 300 lx。全部试验在植物生长 60 d 后结束。

1.2.2 样品处理和检测方法

采集的土壤样品经风干后,采用超声法提取苯并[a]芘^[11];植物样品经过 80 ℃烘干至恒重后,也按文献[11]的方法处理。提取液中的苯并[a]芘浓度用岛津 10A-HPLC 荧光检测器测定,本试验中苯并[a]芘的回收率为 82.40%±2.81%。土壤微生物生物量碳的测定采用氯仿浸提法^[12]。土壤和植物 Cu 的测定采用硝酸和高氯酸消煮^[13];植物样品用硝酸和高氯酸消煮^[14]。

1.2.3 数据处理

本文所列结果为 4 次重复的平均值,数据经方差分析,用新复极差法作多重比较。

2 结果分析

2.1 土壤中苯并[a]芘浓度的变化

如表 1 所示,经过 60 d 的培养试验,有无植物的处理土壤中可提取态的苯并[a]芘浓度在低浓度处理中表现出显著的差异($P<0.05$),在中、高浓度处理中表现出极显著差异($P<0.01$)。苜蓿能够促进土壤中苯并[a]芘的降解,在 1、10、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个处理中有植物处理的降解率分别为 86.0%、84.3%、39.8%,而无植物处理的降解率分别为 79.0%、75.3%、11.3%,这种促进作用随着土壤中所添加的苯并[a]芘浓度的升高而增加(见表 1)。苜蓿的体内也出现了苯并[a]芘,在 1、10、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个处理中,苜蓿根的含量分别为

0.57、0.84、0.85 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;茎的含量分别为 0.16、0.21、0.60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 不同处理土壤和苜蓿中 Cu 的变化

由表 2 可见,有苜蓿土壤中和无苜蓿土壤中 Cu 含量无显著差异,在苜蓿的根中各处理 Cu 含量有显著的不同($P<0.05$),随着处理中苯并[a]芘含量的增加,苜蓿根中 Cu 的含量增加。在苜蓿茎中 Cu 和含量各处理无明显差异。

2.3 不同处理对土壤中微生物生物量碳的影响

如图 1 所示,在 3 种不同的苯并[a]芘处理中,有苜蓿与无植物之间的微生物量碳有显著差异 ($P<0.05$),而且在 1、10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理中有植物处理与无植物处理之间差异极显著($P<0.01$)。对照之间有无植物处理的微生物量碳差异不显著。

2.4 不同处理土壤中苜蓿植物鲜重

表 1 土壤和植物(苜蓿)中苯并[a]芘 的含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 1 The concentrations of B[a]P in the soil and alfalfa plants($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

处理浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	土壤的残留		植物体的含量	
	有植物	无植物	根	茎
CK	0.02±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1	0.14±0.01aA	0.21±0.01bA	0.57±0.04aA	0.16±0.03bB
10	1.57±0.02aA	2.47±0.05bB	0.84±0.13cC	0.21±0.04bB
100	60.16±3.56aA	88.71±2.36bB	0.85±0.12cC	0.60±0.03cD

注:数字后的拉丁字母小写字母为 5%差异显著性水平,大写字母为 1%差异显著性水平;除对照外,各处理 Cu 含量均为 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

表 2 盆栽试验土壤和苜蓿中 Cu 的含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 2 The concentrations of Cu in the soil and alfalfa plants($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	60 d			
	种苜蓿土壤	无苜蓿土壤	苜蓿根	苜蓿茎
CK	22.91±1.42 aA	23.05±1.85 aA	7.53±1.58aA	7.85±0.86abA
1	192.04±5.69 bB	193.21±7.75 bB	7.02±1.29aA	6.86±0.16aA
10	180.52±3.73 bB	181.96±9.86 bB	14.85±2.35bA	7.48±0.53aA
100	181.48±27.57 bB	186.35±14.53 bB	28.71±0.72cB	9.38±0.33bA

注:数字后的拉丁字母小写字母为 5%差异显著性水平,大写字母为 1%差异显著性水平;除对照外,各处理 Cu 含量均为 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

如表 3 所示,在苜蓿生长的 60 d 期间,3 种不同的苯并[a]芘处理中植物根的鲜重与对照比较无显著差异($P<0.05$);植物茎的鲜重与对照比较也无显著差异($P<0.05$)。说明苜蓿对土壤中铜与苯并[a]芘的混合毒性有较强的忍耐力,没有表现出对苜蓿生长的抑制作用。

3 讨论

在 60 d 的试验中,未种苜蓿的 Cu 污染土壤中可提取态的苯并[a]芘的含量随着时间延长也在减少(表 1),这与作者对三环芳烃菲污染土壤植物修复研究的

结果相似^[10]。这可能主要是由于土壤中存在的土著微生物对苯并[a]芘有一定的降解作用,使土壤中可提取态的苯并[a]芘浓度随着时间减少。表明土壤本身具有自然消减和修复苯并[a]芘污染的功能^[10,15]。

在 Cu 污染土壤中,种植苜蓿能够促进土壤中苯并[a]芘的降解(表 1),在 60 d 的盆栽试验培养中,种植苜蓿的 Cu 污染土壤中苯并[a]芘可提取率明显低于不种植苜蓿的土壤处理($P<0.05$),3 种(低、中、高)处理中有苜蓿的苯并 [a] 芘降解率分别为 86.0%、84.3%、39.8%,而无苜蓿处理的降解率分别为 79.0%、75.3%、11.3%,表明植物(苜蓿)的作用是明显的。同

表 3 盆栽植物(苜蓿)的鲜重(g)
Table 3 The fresh weight of alfalfa

处理	根	茎	总重
CK	0.194±0.024a	0.652±0.016a	0.846
1	0.138±0.010a	0.681±0.129a	0.819
10	0.177±0.051a	0.677±0.198a	0.854
100	0.140±0.017a	0.600±0.096a	0.740

注: 数字后的拉丁字母小写字母为 5% 差异显著性水平; 除对照外, 各处理 Cu 含量均为 250 mg·kg⁻¹。

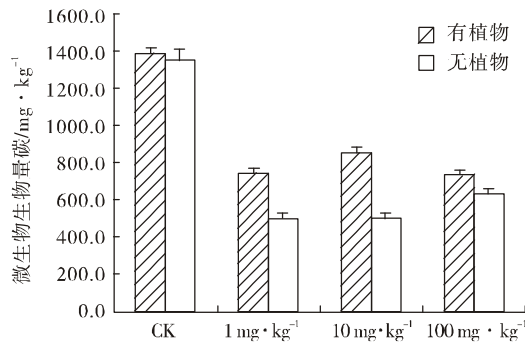


图 1 不同处理土壤的微生物生物量碳的变化
Figure 2 Changes of microbial biomass in the soil under different treatments

时,苜蓿对这种混合污染土壤中苯并[a]芘的促进降解的强化作用随着土壤中所添加苯并[a]芘浓度的升高而增加(见表 1)。另外,可以看到苜蓿体内也出现了苯并[a]芘(见表 1),说明该有机污染物能够迁移到苜蓿体内,其含量范围在根中为 0.57~0.85 mg·kg⁻¹;茎内为 0.16~0.60 mg·kg⁻¹,表明该植物(苜蓿)可以吸收一定的苯并[a]芘。而 Binet 等^[15]和 Wayne 等^[16]报道植物能够促进土壤中 PAHs 的降解,但是植物体本身并不吸收 PAHs。因此,对于其吸收机制需要今后深入研究说明。

土壤中污染物 Cu 的变化如表 2 所示。在试验周期里种植与不种植苜蓿的土壤中 Cu 的含量无明显差异,说明苜蓿对土壤中 Cu 的修复没有表现出明显的作用。另外,在苜蓿的根中 Cu 的含量各处理有差异,表现为苜蓿有一定的吸收,而苜蓿茎中 Cu 的含量各处理无差异。如果将试验周期延长,可能会得出更有意义的结果。

苜蓿生长的污染土壤中微生物生物量碳显著高于无苜蓿生长的污染土壤($P<0.05$)(图 1),说明苜蓿可以提高土壤微生物的活性及数量,形成了更有利的降解修复污染土壤的生物环境,进而促进土壤中苯并[a]芘的快速降解。一般而言,土壤有机物污染的生物降解是在微生物参与下进行的^[17],土壤微生物生物量

碳是反映土壤微生物活性的重要指标。土壤微生物生物量碳既与土壤中的 C、N、P、S 等养分的循环有密切关系,同时还反映土壤被污染物污染的程度。污染土壤中的微生物生物量碳的变化反映了微生物对苯并[a]芘的降解情况。本研究中 3 种不同苯并[a]芘浓度处理的微生物生物量碳都低于对照(图 1),这说明 Cu 和多环芳烃(PAHs)复合污染对土壤微生物有毒害作用,不同程度地抑制了土壤微生物的活性,有关这种作用的强度尚需进一步探讨。由图 1 可见,苜蓿促进了微生物的活性,起到强化微生物修复效果的作用,也说明微生物活性高对苯并[a]芘的降解有利。利用微生物生物量碳的值可以反映出土壤污染的情况,进而可以制定土壤污染生物修复的相应对策,增强土壤微生物的活性,达到良好的污染土壤修复效果。

苜蓿在各个处理中根、茎的鲜重与对照相比无显著的差异(表 3),这说明该植物能够忍耐土壤中重金属和 PAHs 复合的毒性,可以在这样的污染土壤中正常生长,显示出其是一种具有潜在能力、可以开发的生物修复物种资源。土壤中重金属和多环芳烃相混合后与苜蓿生长之间相互作用的关系,以及该植物对 Cu 的修复机制,仍需要深入探讨。如果能够进一步开发该植物积累重金属和促进有机物降解的能力,对利用植物修复重金属和有机物复合污染的现实情况,意义非常深远。

4 结论

不同苯并[a]芘浓度处理的 Cu 污染土壤中苯并[a]芘的浓度随试验的进行而降低,并且有苜蓿生长的土壤中苯并[a]芘的含量进一步减少。表明土壤具有一定的自然修复苯并[a]芘的功能,苜蓿表现出具有强化修复苯并[a]芘污染土壤的作用。这种作用可能与种植苜蓿后土壤中微生物量的增加有关。在 Cu 和苯并[a]芘混合污染的土壤中苜蓿还可吸收少量的苯并[a]芘,其本身对该污染物苯并[a]芘具有净化作用。苜蓿能够忍耐重金属 Cu 和苯并[a]芘的毒害,在污染土壤中生长正常,苜蓿的根中还可吸收一定的 Cu。因此,增加苜蓿的生物量,促进微生物活性,是一条提高植物修复重金属和有机物混合污染土壤能力的有效途径之一。

参考文献:

[1] 吴龙华,骆永明,章海波. 有机络合强化植物修复的环境风险研究. I. EDTA 对复合污染土壤中 TOC 和重金属动态变化的影响[J]. 土

壤,2001,33(4):189–192.

[2] Park K S, Sim R C, Dupont R R, et al. Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization ,abiotic loss and biological activity [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1990, 9: 187–195.

[3] Keith L H, Thlliard W A. Priority pollutants I A perspective view[J]. *Environ Sci Technol*, 1979, 13: 416–423.

[4] Jone K C, Straford J A, Waterhouse K S. Organic contaminants in welsh soils: polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Science and Technology*, 1989a, 23: 540–550.

[5] Gunther T, Dornberger U, and Fritsche W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbon in soil[J]. *Chemosphere*, 1996, 54: 2549–2555.

[6] Pradhan S P, Conrad J R, Paterek J R. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil and MGP sites[J]. *Journal of Soil Contamination*, 1998, 7(4): 467–480.

[7] Reilley A, Banks M K, Schwab A P. Dissipation of PAHs in the rhizosphere[J].*Journal of Environmental Quality*, 1996, 25: 212–219.

[8] Chaineau C H, Morel J L, Oudot J. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2000, 29: 569–578.

[9] 丁克强,骆永明,刘世亮,等. 黑麦草对菲污染土壤修复的初步研究[J].土壤,2002,34(4):233–236.

[10] 龚子同,等.中国土壤系统分类—理论·方法·实践[M]. 北京: 科学出版社,1999.165–167.

[11] 宋玉芳,孙铁珩,许华夏,等. 土壤、植物样品中多环芳烃(PAHs)分析方法研究[J]. 应用生态学报,1995, 6(1): 92–96.

[12] 鲁如坤.土壤农业化学分析法[M].北京: 中国农业科技出版社, 1999.

[13] 刘光崧.土壤理化分析与剖面描述[M].北京: 中国标准出版社, 1996.

[14] McGrath S P, Cunliffe C H. A simplified method for the extraction of Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soil and sewage sludge[J]. *J Sci Fd Agric*, 1985, 36: 794–798.

[15] Binet P, Portal J M, Leyval C. Dissipation of 3–6–ring Polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere of ryegrass[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32:2011–2017.

[16] Wayne A, Ronald C S. Evolution of the use prairie grasses doe stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treatment in soil[J]. *Chmeosphere*, 1990, 20: 253–265.

[17] 丁克强,骆永明,刘世亮. 利用改进的生物反应器研究不同通气条件下土壤中菲的降解[J]. 土壤学报, 2004, 41(2): 245–251.