

巨大芽孢杆菌与柠檬酸联合强化青苜修复镉污染土壤研究

张冰, 刘杰, 蒋萍萍, 蒋旭升, 丁志凡, 程艳, 雷玲

引用本文:

张冰, 刘杰, 蒋萍萍, 等. 巨大芽孢杆菌与柠檬酸联合强化青苜修复镉污染土壤研究[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(3): 552-561.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1007>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

青苜对镉的超富集特征及累积动态研究

姚诗音, 刘杰, 王怡璇, 朱园芳, 丰顺

农业环境科学学报. 2017, 36(8): 1470-1476 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1677>

稻秆炭与巨菌草联合对铜镉污染土壤的修复

王玺洋, 辛在军, 李晓晖, 李亮, 孙小艳, 闵芳芳

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 74-82 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0878>

石灰石砂砾负载铁膜及其强化除磷效果

施佳诚, 陈灿明, 高婷, 卫泽斌, 吴启堂

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1993-2000 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0284>

微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究

王娣, 马闯, 高欢, 刘恒, 徐会宁, 吴蔓莉

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2798-2805 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0534>

磷灰石、石灰对Cd胁迫下黑麦草根形态及Cd吸收影响研究

杜志敏, 向凌云, 杜凯敏, 杨文玲, 王继雯, 雷高, 郭雪白, 郭亮, 周静, 巩涛, 陈国参, 甄静

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 92-101 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0376>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张冰, 刘杰, 蒋萍萍, 等. 巨大芽孢杆菌与柠檬酸联合强化青葙修复镉污染土壤研究[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(3): 552-561.
ZHANG Bing, LIU Jie, JIANG Ping-ping, et al. *Bacillus megaterium* and citric acid enhanced the remediation of Cd-contaminated soil by *Celosia argentea* Linn[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(3): 552-561.



开放科学 OSID

巨大芽孢杆菌与柠檬酸联合强化青葙修复镉污染土壤研究

张冰¹, 刘杰^{1,2*}, 蒋萍萍^{1*}, 蒋旭升¹, 丁志凡¹, 程艳¹, 雷玲¹

(1. 桂林理工大学环境污染控制理论与技术广西重点实验室, 广西 桂林 541004; 2. 自然资源部南方石山地区矿山地质环境修复工程技术创新中心, 广西 桂林 541004)

摘要:为研究柠檬酸和巨大芽孢杆菌对青葙修复 Cd 污染土壤的影响, 筛选最佳添加量以提高修复效率, 采用盆栽试验, 以正交方式研究了添加不同浓度的柠檬酸(Citric acid)(0、2.5、5、7.5 mmol·kg⁻¹和 10 mmol·kg⁻¹)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)(0、10⁸、10⁹ cfu·kg⁻¹和 10¹⁰ cfu·kg⁻¹)对青葙(*Celosia argentea* Linn)修复 Cd 污染土壤的强化作用。结果表明:与对照处理(无柠檬酸和巨大芽孢杆菌添加)相比, 柠檬酸和巨大芽孢处理使青葙各部分生物量、Cd 含量及 Cd 积累量均增加。其中, 10⁹ cfu·kg⁻¹的巨大芽孢杆菌+5 mmol·kg⁻¹柠檬酸处理增加效果最显著, 使青葙叶、茎、根及地上部的生物量分别比对照处理增加 48.7%、43.3%、78.8%和 45.6%; 叶、茎及根中的 Cd 含量较对照处理分别增加 75.8%、76.3%和 74.6%; 地上部 Cd 积累量增加 159%。该处理的青葙地上部 Cd 积累量为 1.03 mg·pot⁻¹, Cd 去除率高达 21.0%。因此, 添加柠檬酸和巨大芽孢杆菌浓度为 5 mmol·kg⁻¹和 10⁹ cfu·kg⁻¹的处理最有利于提高青葙对 Cd 污染土壤的修复效率。

关键词:柠檬酸; 巨大芽孢杆菌; 青葙; 植物修复; Cd 污染土壤

中图分类号: X53; X17 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2021)03-0552-10 doi:10.11654/jaes.2020-1007

Bacillus megaterium and citric acid enhanced the remediation of Cd-contaminated soil by *Celosia argentea* Linn

ZHANG Bing¹, LIU Jie^{1,2*}, JIANG Ping-ping^{1*}, JIANG Xu-sheng¹, DING Zhi-fan¹, CHENG Yan¹, LEI Ling¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Environmental Pollution Control Theory and Technology, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China; 2. Mining Geological Environment Rehabilitation Engineering Technology Innovation Center, Southern Shishan Region, Ministry of Natural Resources, Guilin 541004, China)

Abstract: To study the effects of citric acid and *Bacillus megaterium* on the remediation of Cd-contaminated soil by *Celosia argentea* and optimize their application rates to improve remediation efficiency, a pot experiment using a 4 × 4 factorial design was conducted to study the effect of citric acid (0, 2.5, 5, 7.5 mmol·kg⁻¹, and 10 mmol·kg⁻¹) and *B. megaterium* (0, 10⁸, 10⁹ cfu·kg⁻¹, and 10¹⁰ cfu·kg⁻¹) on phytoremediation of Cd-contaminated soil by *C. argentea*. The results indicated that the application of *B. megaterium* and citric acid significantly increased the biomass, Cd concentration, and Cd accumulation in the roots, stems, and leaves of *C. argentea* compared with the control (without *B. megaterium* and citric acid addition). Application of 10⁹ cfu·kg⁻¹ *B. megaterium* and 5 mmol·kg⁻¹ citric acid had the best effects, and increased leaf, stem, root, and shoot biomass by 48.7%, 43.3%, 78.8%, and 45.6%, respectively compared with the

收稿日期: 2020-08-29 录用日期: 2020-10-30

作者简介: 张冰(1994—), 男, 陕西渭南人, 硕士研究生, 主要研究方向为受损土壤环境的生态修复。E-mail: 1025768862@qq.com

*通信作者: 刘杰 E-mail: liujie@glut.edu.cn; 蒋萍萍 E-mail: jiangpp@glut.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(41867022); 广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目(桂财教函[2018]319号)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41867022); The High-level Innovation Team and Outstanding Scholars Program of Guangxi Colleges and Universities of China([2018]319)

control. With 10^9 cfu \cdot kg $^{-1}$ *B. megaterium* + 5 mmol \cdot kg $^{-1}$ citric acid treatment, the Cd concentrations in the leaves, stems, and roots increased by 75.8%, 76.3%, and 74.6%, respectively, and Cd accumulation in shoots increased by 159%. The highest Cd accumulation in the shoots and the rate of Cd removal were 1.03 mg \cdot pot $^{-1}$ and 21.02%, respectively when 10^9 cfu \cdot kg $^{-1}$ *B. megaterium* and 5 mmol \cdot kg $^{-1}$ citric acid were applied to the soil. Therefore, the application of citric acid and *B. megaterium* at a concentration of 5 mmol \cdot kg $^{-1}$ and 10^9 cfu \cdot kg $^{-1}$, respectively is most effective for improving the remediation efficiency of Cd-contaminated soil using *C. argentea*.

Keywords: citric acid; *Bacillus megaterium*; *Celosia argentea* Linn; phytoremediation; Cd contamination soil

随着我国工业化脚步的不断加快,土壤重金属污染问题也日益突出。被重金属污染的土壤中Cd的点位超标率为7.0%,是所有无机污染物中最高的,并且Cd是自然环境中生物毒性和迁移性最强的重金属元素之一,极易通过食物链被人体吸收,危害人类身体健康^[1-3]。土壤中的重金属具有长期性、隐蔽性和不可逆性,这些特性加大了重金属污染土壤的治理难度,因此,土壤Cd污染的治理已迫在眉睫^[4-5]。

植物提取修复技术因其具有不破坏土壤结构、可用于大面积污染土壤修复、后期处理简单等诸多优点,被认为是一种很有前途的原位修复方法^[6-7]。近年来,植物修复已成为农业和环境科学领域研究和开发的热点^[8-9]。但由于受到重金属生物有效性低、超富集植物生物量小等因素的制约,植物修复往往效率不太高^[3]。

柠檬酸是一种有机螯合剂,生物降解性好,对土壤环境没有污染^[10]。柠檬酸能够溶解土壤中的重金属,使之进入土壤液相中,提高生物可利用性,可以促进重金属在植物根际的扩散,增强植物对其的吸收、转运和富集^[11-13]。巨大芽孢杆菌已经被证实是一种解磷菌,它可以通过释放土壤中的难溶磷元素,分泌IAA(生长素)、产铁载体来促进植物的生长,并在一定程度上提高重金属的生物有效性^[14]。大量研究表明柠檬酸和巨大芽孢杆菌能提高植物的修复效率,但是试验得到的最佳添加量却不尽相同。姚诗音^[15]研究证明向Cd污染土壤中添加5 mmol \cdot kg $^{-1}$ 柠檬酸效果最佳,可使青葙叶片Cd含量较对照增加2.72倍;而许伟伟等^[16]试验表明添加1 mmol \cdot kg $^{-1}$ 柠檬酸时油菜对Cd的去除效率提高效果最好,提高2.1%。王小敏等^[17]研究发现,添加 2×10^9 cfu \cdot kg $^{-1}$ 巨大芽孢杆菌时最大程度提高印度芥菜Cd积累量,提高96.9%;而纪宏伟等^[18]试验证明接种 10^{10} cfu \cdot kg $^{-1}$ 巨大芽孢杆菌和胶冻样类芽孢杆菌混合液效果最好,使印度芥菜Cd的积累量提高60.4%。柠檬酸和巨大芽孢杆菌虽然都能提高植物修复效率,但是在实际修复过程中还有许多局限性。柠檬酸虽然可以提高土壤重金属的生物

可利用性,但是对提高植物生物量效果并不明显,甚至可能因为有效态浓度的急剧增加而对植物产生毒害作用;巨大芽孢杆菌虽然可以释放植物需要的营养元素,分泌促生激素IAA、产铁载体来促进植物生长,但是对吸收、转运及富集重金属的影响并不明显^[19]。因此,本文以超富集植物青葙(*Celosia argentea* Linn)为供试植物,通过添加不同浓度的柠檬酸和巨大芽孢杆菌,研究柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合强化作用对青葙修复Cd污染土壤的影响,为青葙修复Cd污染土壤提供指导和技术支持^[3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物

供试植物为青葙,苋科青葙属一年生草本植物,具有结籽量多、喜阳耐旱、易于人工种植等特点^[20]。本课题组前期工作发现青葙是一种重金属Mn和Cd的超富集植物^[21]。青葙种子2019年5月1日采集于广西桂林市阳朔县兴坪镇思的村,选取颗粒饱满的青葙种子播种于育苗盘中,置于桂林理工大学重金属污染植物修复试验基地温室培养,温室温度恒定在20~35℃。种子萌发后(3d),每日浇水,一周后每周用20%的Hoagland's营养液浇灌一次。待幼苗长出4~6片真叶,高度约为5~6cm时,移栽进行盆栽试验^[3]。

1.1.2 供试土壤

供试土壤采自广西桂林市某地Cd污染农田0~20cm表层土壤。将采集的土壤置于阴凉处自然风干,剔除石子和枯叶等杂物,压碎后过5目筛,备用^[22]。土壤基本理化性质为:pH 6.06(H₂O),有机质50.1 g \cdot kg $^{-1}$,铵态氮16.0 mg \cdot kg $^{-1}$,速效磷49.2 mg \cdot kg $^{-1}$,速效钾145 mg \cdot kg $^{-1}$,总Cd含量为4.90 mg \cdot kg $^{-1}$ 。

1.1.3 巨大芽孢杆菌悬浮液

将巨大芽孢杆菌菌株接种于LB液体培养基中,在温度为30℃、转速为180 r \cdot min $^{-1}$ 的条件下培养48h,将得到的菌悬液10 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心10min,倒掉上层溶液,然后用无菌水冲洗菌体,再次离心,重复3

次^[23],添加适量无菌水制备成浓度为 10^{10} cfu·mL⁻¹的细菌悬浮液备用。

1.2 试验方案

2019年5月至7月于桂林理工大学重金属污染植物修复试验基地进行盆栽试验。准确称取1 kg的土壤装于规格为2 L(高15.5 cm,底直径14 cm,上口直径19.7 cm)的塑料桶内。育苗当天将柠檬酸以溶液形式加入土壤中,混匀后平衡15 d(平衡期间要定时翻动)。平衡结束后,选取生长一致的青苜蓿幼苗移入盆中,每盆1株。半个月后,向巨大芽孢杆菌悬浮液中加入适量去离子水,制备成 0 、 10^8 、 10^9 cfu·50 mL⁻¹及 10^{10} cfu·50 mL⁻¹悬浊液,取50 mL直接浇于植物根部(即 0 、 10^8 、 10^9 cfu·kg⁻¹及 10^{10} cfu·kg⁻¹)。生长期间,使土壤含水量保持在田间持水量的80%左右。3个月后收获植物。试验共设20个处理,3次重复。添加物情况见表1。

1.3 植物及土壤样品的采集、处理及分析方法

收获的青苜蓿分为根、茎、叶3部分,根系洗净后用 10 mmol·L⁻¹的EDTA(乙二胺四乙酸)溶液浸泡30 min,以洗去吸附在根系表面的重金属,然后超声波清洗仪清洗10 min,再用去离子水冲洗干净^[24];茎和叶先用流水冲洗掉表面的尘土,再用去离子水冲洗干净。洗净的植物样品在 105 °C下杀青30 min, 70 °C下烘干至恒质量(48 h)并测定其干质量(生物量以干质量计),粉碎,备用^[3]。称取粉碎的植物样品(约 0.200 g)用HNO₃-H₂O₂法消解,样品Cd含量用电感耦合等离子体发射光谱仪测定。

植物收获时,先去除根部大块土壤,抖落黏附在根系表面 $1\sim 4$ mm范围内的松散土壤作为根际土^[25],置于阴凉处自然风干,压碎后过 5 、 10 目及 200 目筛,备用^[3]。土壤样品pH值采用pH计测定,浸提剂为去离子水,按照土水比 $1:2.5$ 测定^[26]。有效磷含量采用氟化铵-盐酸浸提剂提取,钼锑抗显色剂显色,紫外可见分光光度计测定^[27]。全Cd采用HNO₃-H₂O₂法消解;有效态Cd采用DTPA(二乙烯三胺五乙酸)浸提法

浸提,样品Cd含量均用电感耦合等离子体发射光谱仪(PerkinElmer Optima 7000 DV)测定。分析过程中所用试剂均为优级纯,采用国家一级标准参比物质[GBW 07602(GSV-2)]和平行空白样进行植物及土壤样品消解及质量控制,样品回收率控制在95%~105%^[3]。

1.4 数据处理分析

富集系数(BCF)=植物叶Cd含量/土壤Cd含量

地上部Cd积累量=叶生物量×叶Cd含量+茎生物量×茎Cd含量

地上部生物量=叶生物量+茎生物量

地上部Cd含量=地上部Cd积累量/地上部生物量

采用SPSS 23中的单因素方差(ANOVA)和最小显著差数法(LSD)对数据进行分析 and 显著性检验($P<0.05$),并用Origin 2018制图。

2 结果与分析

2.1 不同处理方式对根际土pH的影响

处理方式的不同对根际土pH的影响见图1。添加不同浓度的巨大芽孢杆菌和柠檬酸后,与对照处理(B0-C0)相比,所有处理pH值均显著下降,且都小于6.50。单独添加柠檬酸时,根际土pH值平均下降0.38个单位;单独添加巨大芽孢杆菌时,根际土pH值平均下降0.21个单位;柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合处理时,pH值下降 $0.12\sim 0.79$ 个单位,平均下降0.58个单位,其中B10-C10处理下降幅度最大,下降了0.79个单位。柠檬酸对土壤的酸化作用强于巨大芽孢杆菌,而巨大芽孢杆菌和柠檬酸联合添加时pH值下降幅度大于两者单独添加时。

2.2 不同处理方式对根际土有效态Cd含量的影响

处理方式的不同对根际土有效态Cd含量的影响见图2。添加不同浓度的巨大芽孢杆菌和柠檬酸后,与对照处理相比,所有处理根际土有效态Cd含量均显著提高。单独添加巨大芽孢杆菌时,有效态Cd含

表1 土壤的不同处理方式

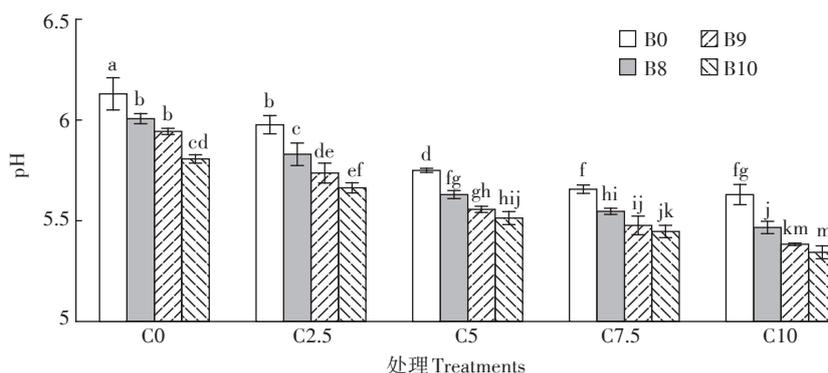
Table 1 Treatments in soils

巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i> / (cfu·kg ⁻¹)	柠檬酸 Citric acid/(mmol·kg ⁻¹)				
	0	2.5	5.0	7.5	1.0
0	B0-C0	B0-C2.5	B0-C5	B0-C7.5	B0-C10
10^8	B8-C0	B8-C2.5	B8-C5	B8-C7.5	B8-C10
10^9	B9-C0	B9-C2.5	B9-C5	B9-C7.5	B9-C10
10^{10}	B10-C0	B10-C2.5	B10-C5	B10-C7.5	B10-C10

量提高了1.05%~3.56%,平均提高2.13%;单独施加柠檬酸时,有效态Cd含量提高了5.10%~8.76%,平均提高6.30%;柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合处理时,有效态Cd含量提高了3.03%~16.0%,平均提高8.76%,其中B9-C5处理活化效果最好,比对照提高了16.0%。柠檬酸对Cd的活化效果优于巨大芽孢杆菌,而两者联合处理时对Cd的活化效果更好。

2.3 不同处理方式对根际土有效磷含量的影响

处理方式的不同对根际土有效磷含量的影响见图3。添加不同浓度的巨大芽孢杆菌和柠檬酸后,与对照处理相比,除B0-C10外,所有处理均显著提高了土壤有效磷含量。单独添加柠檬酸时,提高了5.91%~45.6%,平均提高了26.5%;单独添加巨大芽孢杆菌时,提高了75.1%~101%,平均提高了87.4%。柠



不同小写字母表示数值间存在统计学上的显著差异($P < 0.05, n=3$)。下同

Different letters above the bars indicate significant differences among the treatments according to the LSD test ($P < 0.05, n=3$). The same below

图1 不同处理方式对根际土pH的影响

Figure 1 Effect of different treatments on rhizosphere pH

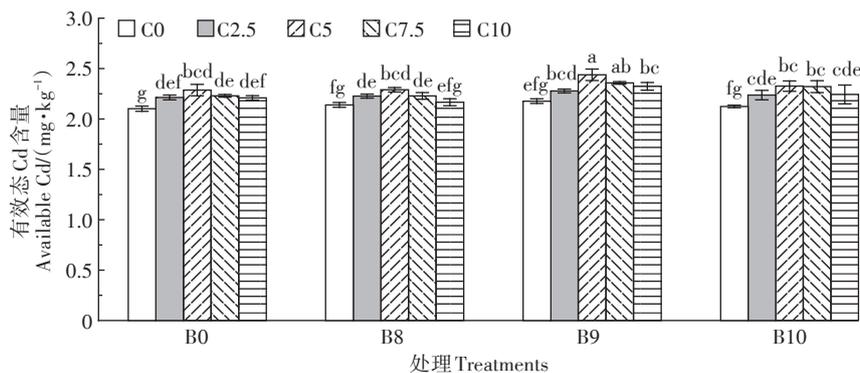


图2 不同处理方式对根际土有效态Cd含量的影响

Figure 2 Effects of different treatments on available Cd in rhizosphere soil

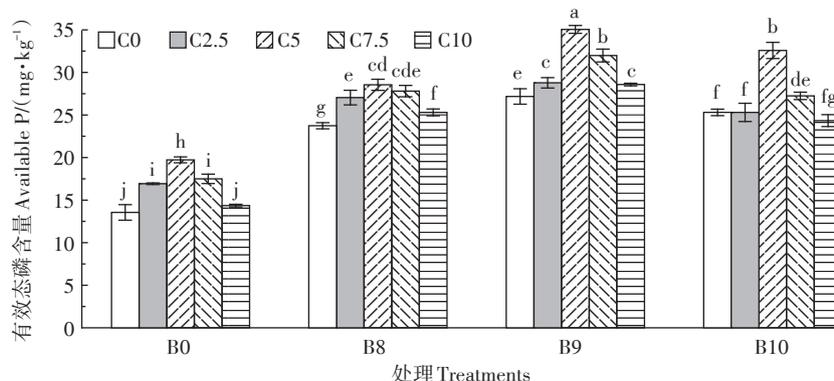


图3 不同处理方式对根际土有效磷含量的影响

Figure 3 Effects of different treatments on available phosphorus in rhizosphere soil

檬酸和巨大芽孢杆菌联合处理时,提高了79.6%~159%,平均提高111%,其中B9-C5处理效果最好,比对照提高了159%。添加巨大芽孢杆菌对土壤有效磷含量的提高效果优于添加柠檬酸,而两者联合处理时效果更好。

2.4 不同处理方式对青箱各部分生物量的影响

处理方式的不同对青箱各部分生物量的影响如图4所示。可看出向土壤中添加巨大芽孢杆菌和柠檬酸的处理与对照相比,青箱各部分生物量均显著增加。单独添加巨大芽孢杆菌的处理青箱地上部生物

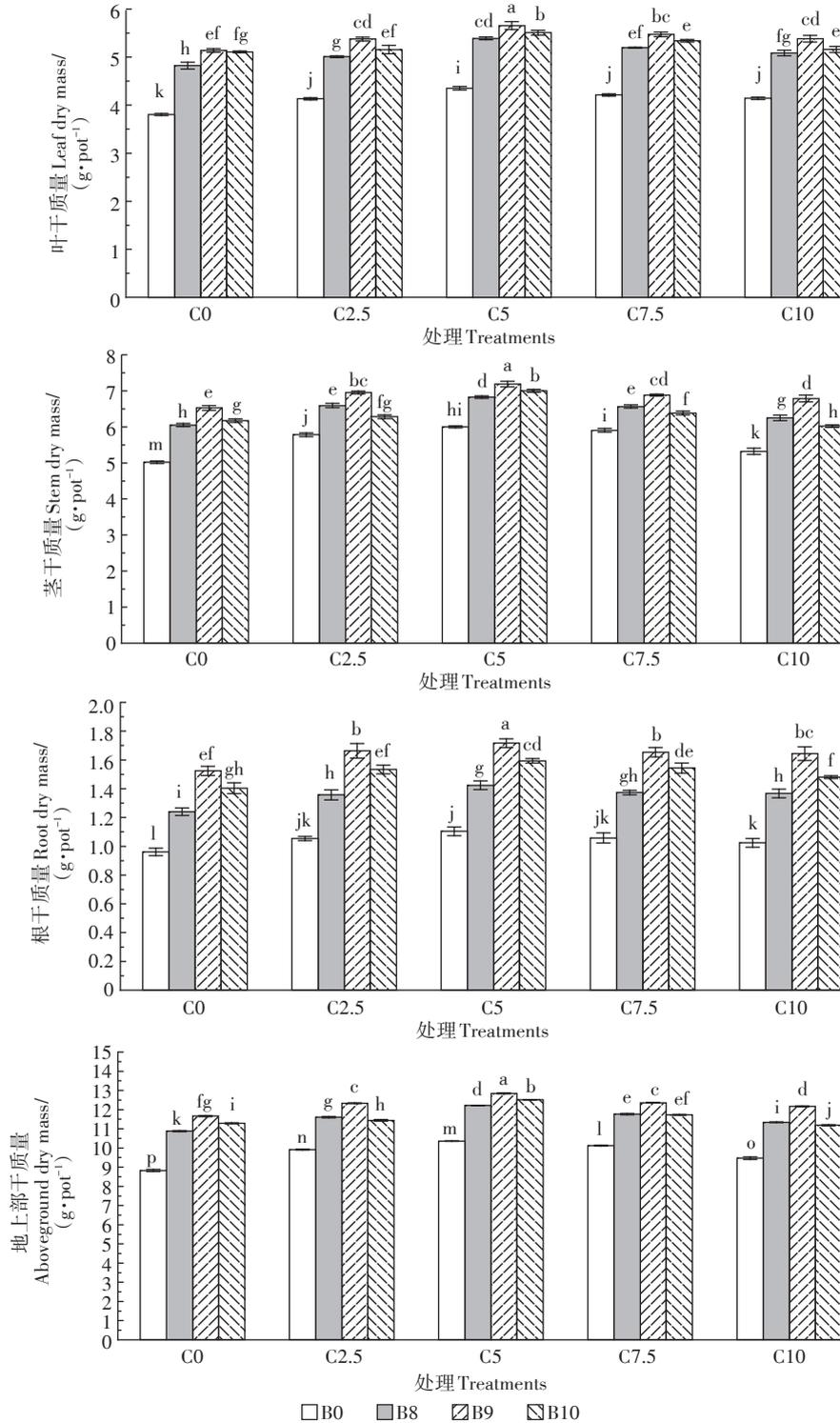


图4 不同处理方式对青箱各部分生物量的影响

Figure 4 Effects of different treatments on biomass in various parts of *C. argentea*

量增加了23.3%~32.2%,平均增加27.8%;单独添加柠檬酸的处理增加了7.29%~17.4%,平均增加12.9%;柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合处理时增加了26.8%~45.6%,平均增加35.5%。其中B9-C5处理效果最好,青苜生物量为 $12.8 \text{ g} \cdot \text{pot}^{-1}$ 。巨大芽孢杆菌对青苜的

促生效果优于柠檬酸,但两者联合应用得到了更好的效果。

2.5 不同处理方式对青苜各部分Cd含量的影响

处理方式的不同对青苜各部分Cd含量的影响如图5所示。向土壤中添加不同浓度的柠檬酸和巨大

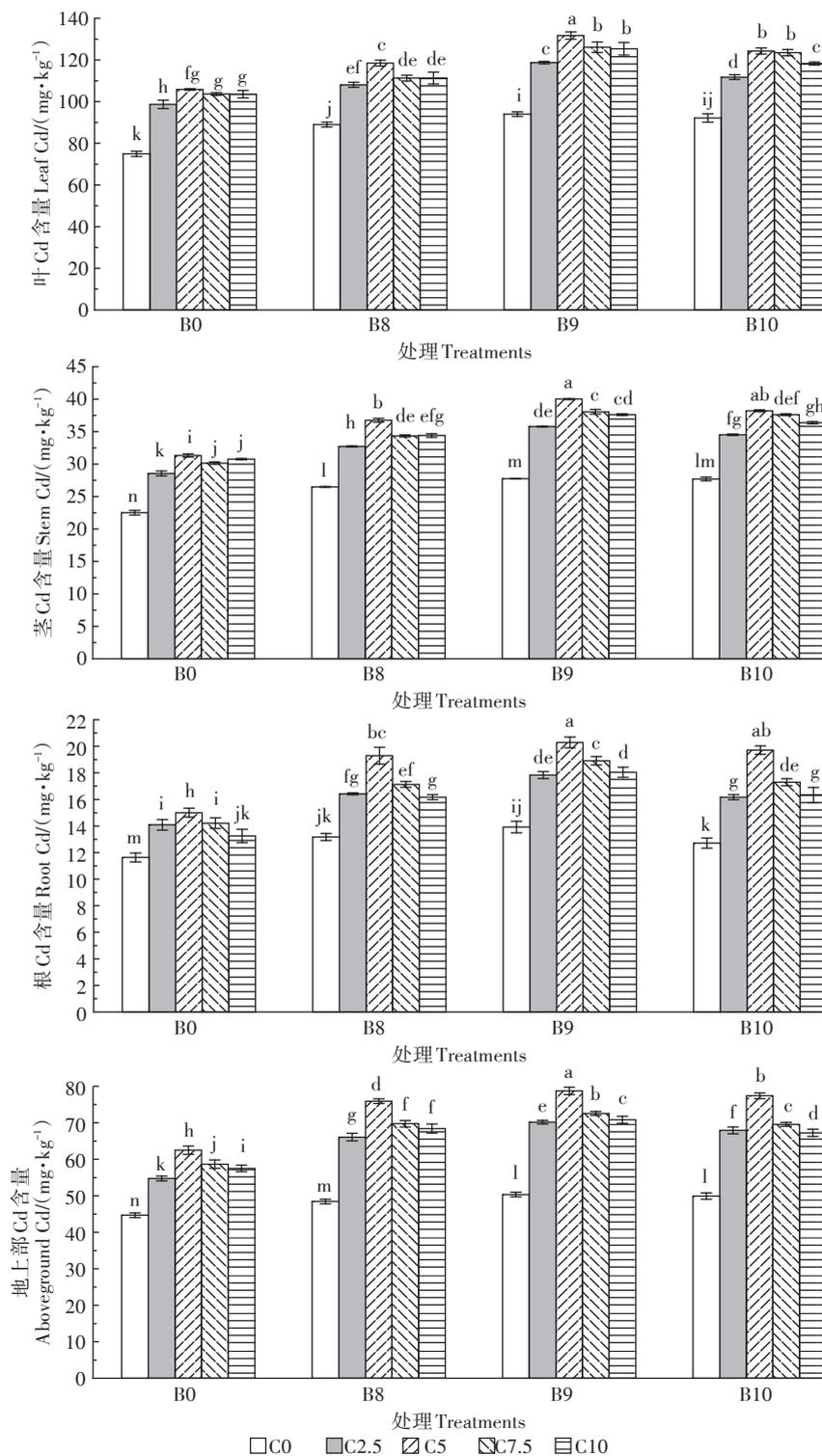


图5 不同处理方式对青苜各部分Cd含量的影响

Figure 5 Effects of different treatments on Cd contents in various parts of *C. argentea*

芽孢杆菌后,与对照处理相比,所有处理均显著提高了青苜各部分的Cd含量。单独添加柠檬酸时,青苜各部分Cd含量增加,其中叶增加31.8%~41.3%,茎增加22.6%~39.9%,根增加21.2%~29.0%,地上部和地下部分别平均增加34.2%和21.6%;单独添加巨大芽孢杆菌时,青苜各部分Cd含量增加,其中叶增加18.8%~25.5%,茎增加8.4%~12.7%,根增加17.6%~23.3%,地上部和地下部分别平均增加21.3%和14.1%;柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合处理时青苜各部分Cd含量增加,其中叶增加18.8%~75.8%,茎增加8.4%~76.3%,根增加8.3%~74.6%,地上部和地下部分别平均增加61.6%和40.3%,其中B9-C5处理效果最好,增加了77.8%。添加柠檬酸对青苜Cd含量的提高效果优于巨大芽孢杆菌,而两者联合处理效果更好。

2.6 不同处理方式对青苜富集系数的影响

生物富集系数也称为吸收系数,是指植物体内某种重金属的浓度与其生长的土壤中这种重金属浓度之比^[28]。生物富集系数被用来反映土壤-植物体系中元素迁移的难易程度,这是植物将重金属吸收转移到体内能力大小的评价指标^[29]。从表2可以看出,向土壤中单独或联合添加不同浓度巨大芽孢杆菌和柠檬酸后,与对照处理相比,富集系数均有显著提高($P <$

0.05),说明添加巨大芽孢杆菌和柠檬酸可以促进青苜对重金属Cd的吸收及转移;富集系数均大于15.0,说明青苜对重金属Cd的富集能力很强。在B9-C5处理下达到最大(27.7),比对照处理(15.8)提高了75.3%。说明向土壤中添加柠檬酸和巨大芽孢杆菌可以提高青苜对Cd的吸收、转移及富集能力。

2.7 不同处理方式对青苜地上部Cd积累量的影响

处理方式的不同对青苜地上部Cd积累量的影响如图6所示。向土壤中施加不同浓度巨大芽孢杆菌和柠檬酸后,所有处理青苜地上部Cd积累量均显著高于对照处理。单独添加柠檬酸时增加了42.6%~63.3%,平均增加51.6%;单独添加巨大芽孢杆菌时增加了45.2%~63.1%,平均增加55.2%;柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合处理时,增加了46.6%~159%,平均增加119%,两者联合应用效果更好。其中B9-C5处理效果最好,比对照增加159%。

3 讨论

植物提取修复技术最终收获的是超富集植物的地上部,所以植物地上部重金属积累量的大小是植物修复过程中最具有实际意义的指标之一,表征了植物的修复潜力,决定了植物提取修复技术效率的高低^[30]。而地上部重金属积累量的大小取决于两个关

表2 不同处理方式对青苜富集系数的影响

Table 2 Effects of different treatments on enrichment coefficients of *C. argentea*

	C0	C2.5	C5	C7.5	C10
B0	15.8±0.3j	20.8±0.4g	22.3±0.2ef	21.8±0.1f	21.8±0.4f
B8	18.7±0.3i	22.8±0.3e	24.9±0.3c	23.4±0.3d	23.4±0.6d
B9	19.8±0.2h	25.0±0.1c	27.7±0.4a	26.6±0.5b	26.4±0.4b
B10	19.4±0.4h	23.5±0.2d	26.2±0.3b	26.0±0.3b	24.9±0.2c

注:不同小写字母表示数值间存在统计学上的显著差异($P < 0.05, n=3$)。

Note: Different letters in the table indicate significant differences among the treatments according to the LSD test ($P < 0.05, n=3$).

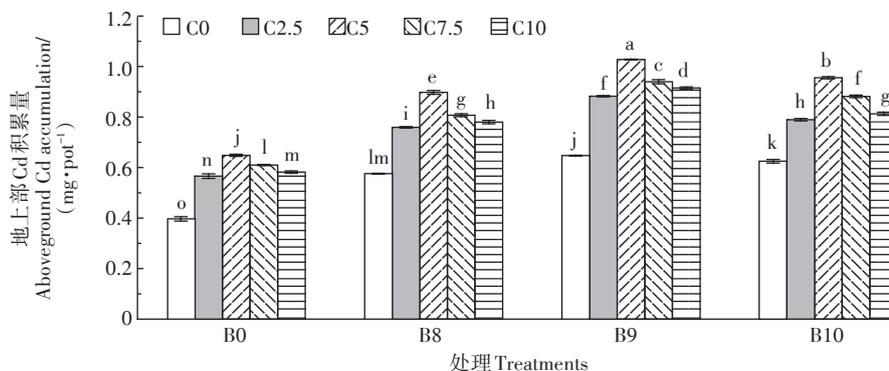


图6 不同处理方式对青苜地上部Cd积累量的影响

Figure 6 Effects of different treatments on Cd accumulation in shoots of *C. argentea*

键点,一个关键点是所用超富集植物生物量的大小,另一个关键点就是所用超富集植物吸收重金属能力的强弱,即植物体重金属浓度的大小^[31-32]。

本试验结果显示添加巨大芽孢杆菌和柠檬酸显著提高了青苜地上部的生物量,平均增加了29.6%,Esringü等^[33]研究显示在 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd污染土壤中添加 $1.5\times 10^{10}\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 巨大芽孢杆菌后甘蓝型油菜的生物量提高了3.3%,Han等^[31]试验也证明添加 $2\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸时喜盐鸢尾地上部的生物量比对照处理提高43.0%。本试验结果与这些研究类似。单独添加巨大芽孢杆菌时对青苜的促生效果更好,地上部生物量平均增加量(27.9%)是柠檬酸(12.9%)的2.16倍。这一方面可能是因为添加巨大芽孢杆菌时土壤有效磷含量是柠檬酸的3.30倍,另一方面是巨大芽孢杆菌促进植物生长的途径不止一种,它还可以分泌促生激素IAA、产铁载体为植物提供足够的Fe元素来促进植物生长,增加植物对逆境的抗性^[24],而柠檬酸不具备这些能力。

同时,添加巨大芽孢杆菌和柠檬酸后青苜地上部Cd的含量平均提高了49.4%,詹淑威等^[34]研究表明添加 $10\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸可使小飞扬草地上部Cd的含量增加49.1%;邓月强等^[23]试验也证明接种 $10^{11}\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 巨大芽孢杆菌时伴矿景天地上部Cd含量比对照处理提高60.4%,本试验研究结果与这些研究相似。而柠檬酸在这个方面似乎更有优势,平均提高量比巨大芽孢杆菌高12.9个百分点,而这得益于添加柠檬酸时土壤有效态Cd含量比巨大芽孢杆菌高4.17个百分点。这可能是因为柠檬酸在青苜还没有种植时提前加入,环境较简单,柠檬酸能够更好地作用于土壤,而巨大芽孢杆菌是青苜移栽之后添加的,其分泌的有机酸成分比较复杂,作用的目标不仅是土壤,且对Cd的活化能力也有强有弱。从青苜对Cd的富集系数可看出添加柠檬酸和巨大芽孢杆菌提高了青苜对Cd的富集能力,但青苜地上部组织Cd平均含量却没有达到超富集植物的临界标准($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),这是因为富集系数计算公式为:富集系数(BCF)=植物叶Cd含量/土壤Cd含量,而青苜地上部Cd含量计算公式为:地上部Cd含量=(叶生物量×叶Cd含量+茎生物量×茎Cd含量)/(叶生物量+茎生物量),将青苜叶和茎中的Cd单独计算时,青苜叶片中的Cd含量达到了超富集植物的标准,叶片中的平均Cd含量为 $110\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,最大可达到 $132\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。而青苜茎的Cd含量相对较低,平均只有 $32.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,最高也只有 $39.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,所

以导致青苜地上部Cd含量并未达到超富集植物的标准。本研究将青苜叶、茎、根分开分析,能够体现出植物特性。

柠檬酸和巨大芽孢杆菌的添加提高了青苜地上部Cd积累量,随柠檬酸和巨大芽孢杆菌添加量的增加,青苜地上部Cd积累量呈现先增大后减小的趋势。柠檬酸浓度从 $0\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $5\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、巨大芽孢杆菌从 $0\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $10^9\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 过程中,积累量的趋势是逐渐提高的,但是当柠檬酸和巨大芽孢杆菌浓度进一步提高到 $7.5\sim 10\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $10^{10}\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,积累量不增反降,这可能是因为高浓度的柠檬酸进入土壤后促使有效态重金属含量过高,对青苜产生了生理毒害,也会降低巨大芽孢杆菌的活性,而低浓度的柠檬酸反而促进了青苜的生长,这与沈斌等^[35]研究结果一致,即低浓度柠檬酸的施加促进了鱼腥草的生长发育,但高浓度柠檬酸对鱼腥草有生理毒害,导致鱼腥草生物量降低;Wang等^[36]试验也表明添加高浓度柠檬酸显著促进了玉米和冬小麦对Pb、Zn的积累,但同时抑制了植物的生长,降低了产量;过量的巨大芽孢杆菌进入土壤会产生过量的有机酸对青苜产生毒害作用,会因生存空间产生竞争相互消耗,反而降低了修复效果,所以柠檬酸和巨大芽孢杆菌的添加量不宜过高。

柠檬酸和巨大芽孢杆菌在强化青苜修复Cd污染土壤中各具优势,联合施用可将两者的优势结合起来,在促进青苜对Cd吸收的同时生物量也得到增加,从而得到更好的修复效果。数据显示,柠檬酸和巨大芽孢杆菌联合施用及单独施用,青苜地上部Cd积累量最大分别提高了159.0%、63.3%和63.1%,显然联合处理时效果更好,甚至产生了“1+1>2”的效果。这与丁玲^[37]的研究结果一致,巨大芽孢杆菌和柠檬酸联合施用比单独施用更有利于提高印度芥菜对重金属Cd的富集能力,其中混合添加 $30\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸和 $10^9\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 巨大芽孢杆菌处理组效果最好,对Cd的去除率为4.91%。本试验结果表明混合添加 $5\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸和 $10^9\text{ cfu}\cdot\text{kg}^{-1}$ 巨大芽孢杆菌效果最好,地上部Cd积累量为 $1.03\text{ mg}\cdot\text{pot}^{-1}$,比对照增加了159%,对Cd的去除率为21.0%,而不添加强化剂时去除率只有8.10%。

从经济利益角度分析,不添加强化剂时需要种植13茬青苜可使该片农田土壤Cd含量恢复到安全生产水平,而添加强化剂则只需种植5茬,使农田可以尽早产生经济效益,但是添加强化剂也需要成本,需要

核算添加强化剂与不添加强化剂的经济效益孰强孰弱。按照农田表层0~20 cm土壤,土壤密度 $1.3 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 计算,每平方米土壤质量为260 kg。柠檬酸和巨大芽孢杆菌的施加量分别为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10^9 \text{ cfu} \cdot \text{kg}^{-1}$,则施加柠檬酸的成本为 $3\ 000 \sim 3\ 750 \text{ 元} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。但本试验制备巨大芽孢杆菌菌剂的方法不适用于大面积修复工程,工程修复只能使用商品菌剂,这也会提高修复成本。添加巨大芽孢杆菌成本约为 $3\ 750 \sim 4\ 500 \text{ 元} \cdot \text{hm}^{-2}$,强化修复成本为 $6\ 750 \sim 8\ 250 \text{ 元} \cdot \text{hm}^{-2}$,而种植经济作物(小麦、水稻等)利润为 $12\ 000 \sim 15\ 000 \text{ 元} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。如果巨大芽孢杆菌添加后可以形成优势菌群并且长期保持优势,那么就不需要每次种植都添加菌剂,可以极大降低修复成本。巨大芽孢杆菌进入土壤后是否会成为优势菌群,其优势能维持多久,即巨大芽孢杆菌在土壤中的动态变化还需要进一步试验探究。综上所述,添加柠檬酸和巨大芽孢杆菌不仅能够提高青苜对Cd污染土壤的修复效率,降低成本,使土地尽早投入使用,还可以减少磷肥用量,降低化学肥料对环境造成危害的风险。

4 结论

(1) 柠檬酸和巨大芽孢杆菌在提高青苜对Cd污染土壤修复效率中各具优势,而联合应用能达到更好的效果。

(2) 柠檬酸和巨大芽孢杆菌的添加量分别为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10^9 \text{ cfu} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时更有利于青苜对土壤中Cd的吸收、转移以及富集,地上部Cd积累量最大为 $1.03 \text{ mg} \cdot \text{pot}^{-1}$,去除效率最高为21.0%。

参考文献:

- [1] 环境保护部,国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[R]. 北京: 环境保护部,国土资源部,2014:56. Ministry of Environmental Protection, Ministry of Land and Resources. National survey bulletin of soil pollution[R]. Beijing: Ministry of Environmental Protection, Ministry of Land and Resources, 2014:56.
- [2] 包姣,韦惠琴,赵秀兰. 低分子量有机酸强化烟草修复镉污染土壤的适用性研究[J]. 水土保持学报,2012,26(2):265-270. BAO Jiao, WEI Hui-qin, ZHAO Xiu-lan. Feasibility of low molecular weight organic acids in enhancing phytoextraction of cadmium from soils[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2012, 26(2):265-270.
- [3] 傅校锋,刘杰,龙玉梅,等. 强化青苜修复镉污染土壤的柠檬酸施用方式优化试验研究[J]. 土壤,2020,52(1):153-159. FU Xiao-feng, LIU Jie, LONG Yu-mei, et al. Experimental study on optimization of citric acid application method for remediation of cadmium-contaminated soil by *Celosia argentea* Linn[J]. *Soils*, 2020, 52(1):153-159.
- [4] 郑君健,刘杰,张学洪,等. 重金属污染土壤植物修复及强化措施研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(18):159-164. ZHENG Jun-jian, LIU Jie, ZHANG Xue-hong, et al. Research progress of phytoremediation and strengthening measures for soil contaminated by heavy metals[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(18):159-164.
- [5] 魏本杰. 微生物强化植物修复重金属污染土壤[D]. 株洲:湖南工业大学,2014:1. WEI Ben-jie. Microbes enhance the phytoremediation for heavy metal contaminated soil[D]. Zhuzhou: Hunan Industry University, 2014:1.
- [6] Kumar P B, Dushenkov V, Mott H, et al. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 1995, 29(5):1232-1238.
- [7] 董林林,赵先贵,韦良焕,等. 曼陀罗和苍耳对污染土壤中镉的吸收与富集[J]. 生物技术,2009,19(2):29-32. DONG Lin-lin, ZHAO Xian-gui, WEI Liang-huan, et al. Sorption and accumulation of cadmium in the polluted soil of *Datura stramonium* and *Xanthium sibiricum* [J]. *Biotechnology*, 2009, 19(2):29-32.
- [8] Kang W, Bao J G, Zheng J, et al. Phytoremediation of heavy metal contaminated soil potential by woody plants on Tonglushan ancient copper spoil heap in China[J]. *Int J Phytoremediation*, 2018, 20(1):1-7.
- [9] 吴明文. 南丹部分尾矿区土壤及优势植物重金属含量研究[D]. 南宁:广西大学,2007:1. WU Ming-wen. Heavy metal concentrations of soils and dominant plants at some mine stailings area of Nandan[D]. Nanning: Guangxi University, 2007:1.
- [10] 刘志强,陈廷廷,张晓霞. 柠檬酸对土壤中重金属形态转化的影响[J]. 中国石油和化工标准与质量,2019,39(14):108-109,111. LIU Zhi-qiang, CHEN Ting-ting, ZHANG Xiao-xia, et al. The effect of citric acid on the transformation of heavy metals in soil[J]. *China Petroleum and Chemical Standard and Quality*, 2019, 39(14):108-109,111.
- [11] 胡亚虎,魏树和,周启星,等. 螯合剂在重金属污染土壤植物修复中的应用研究进展[J]. 农业环境科学学报,2010,29(11):2055-2063. HU Ya-hu, WEI Shu-he, ZHOU Qi-xing, et al. Application of chelator in phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(11):2055-2063.
- [12] 魏思翔. 螯合剂与联合物质在植物修复重金属污染土壤的应用研究进展[J]. 广东化工,2013,40(19):84-85,90. WEI Si-xiang. Research progress in the application of phytoremediation on heavy metal contaminated soils in combination with chelating agents and auxiliary material[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2013, 40(19):84-85,90.
- [13] Nowack B, Schwyzer I, Schulin R. Uptake of Zn and Fe by wheat (*Triticum aestivum* var. Greina) and transfer to the grains in the presence of chelating agents (ethylenediaminedisuccinic acid and ethylenediaminetetraacetic acid) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(12):4643-4649.
- [14] 卢玉杰. 生物菌肥种类及作用[J]. 河南农业,2015,379(23):14. LU Yu-jie. Types and functions of biological fertilizer[J]. *Agriculture of Henan*, 2015, 379(23):14.
- [15] 姚诗音. 超富集植物青苜对土壤镉的修复性能及强化措施研究[D]. 桂林:桂林理工大学,2017:40. YAO Shi-yin. Cd repairing performance and strengthening measures of *Celosia argentea* Linn. for phytoremediation of Cd-contaminated soil[D]. Guilin: Guilin University of Technology, 2017:40.

- [16] 许伟伟, 李方洲, 任静华, 等. 活化剂与植物联合修复Cd污染土壤的田间研究[J]. 环境科学与技术, 2019, 42(7): 126-130. XU Wei-wei, LI Fang-zhou, REN Jing-hua, et al. Enhanced phytoextraction for contaminated soil with Cd by cole (*Brassica napus* L.) in field-based research[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 42(7): 126-130.
- [17] 王小敏, 纪宏伟, 刘文菊, 等. 巨大芽孢杆菌与印度芥菜对Cd污染土壤的联合修复效果研究[J]. 水土保持学报, 2014, 28(4): 232-236. WANG Xiao-min, JI Hong-wei, LIU Wen-ju, et al. Effect of *Bacillus megaterium* and *Brassica juncea* combination on phytoextraction of Cd from polluted soil[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2014, 28(4): 232-236.
- [18] 纪宏伟, 王小敏, 赵英男, 等. 巨大/胶冻样类芽孢杆菌对印度芥菜修复Cd污染土壤的影响[J]. 水土保持学报, 2015, 29(2): 215-219. JI Hong-wei, WANG Xiao-min, ZHAO Ying-nan, et al. Effects of *Bacillus megaterium*/*Paenibacillus kribbensis* on phytoextraction of Cd from contaminated soil by *Brassica juncea*[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29(2): 215-219.
- [19] 刘晓娜, 赵中秋, 陈志霞, 等. 螯合剂、菌根联合植物修复重金属污染土壤研究进展[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(增刊2): 127-133. LIU Xiao-na, ZHAO Zhong-qiu, CHEN Zhi-xia, et al. Chelate, mycorrhiza and plants joint remediation of heavy metal contaminated soil [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(Suppl 2): 127-133.
- [20] 余轲, 刘杰, 尚伟伟, 等. 青苜蓿对土壤锰的耐性和富集特征[J]. 生态学报, 2015, 35(16): 5430-5436. YU Ke, LIU Jie, SHANG Wei-wei, et al. Tolerance and accumulation characteristics of *Celosia argentea* Linn. growing in Mn-contaminated soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(16): 5430-5436.
- [21] Liu J, Mo L G, Zhang X H, et al. Simultaneous hyperaccumulation of cadmium and manganese in *Celosia argentea* Linn[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2018, 20(11): 1106-1112.
- [22] 朱剑飞. 环境因子对黑麦草富集土壤重金属Cu、Pb的影响[D]. 金华: 浙江师范大学, 2018: 1. ZHU Jian-fei. Effects of environmental factors on soil heavy metal accumulation of *Lolium perenne* L.[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2018: 1.
- [23] 邓月强, 曹雪莹, 谭长银, 等. 巨大芽孢杆菌对伴矿景天修复镉(Cd)污染农田土壤的强化作用[J]. 应用生态学报, 2020, 31(9): 3111-3118. DENG Yue-qiang, CAO Xue-ying, TAN Chang-yin, et al. Strengthening effect of *Bacillus megaterium* on remediation of Cd-contaminated farmland soil by *Sedum plumbizincicola*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(9): 3111-3118.
- [24] 赵树民. 巨大芽孢杆菌LY02对黑麦草修复重金属污染土壤的强化作用[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018: 23. ZHAO Shu-min. Effects of *Bacillus megaterium* LY02 on the remediation of heavy metal contaminated soil by *Lolium perenne*[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2018: 23.
- [25] 苏宝玲, 韩士杰, 王建国. 根际微域研究中土样采集方法的研究进展[J]. 应用生态学报, 2000, 11(3): 477-480. SU Bao-ling, HAN Shi-jie, WANG Jian-guo. Advance in soil sampling methods in rhizosphere microzone study[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(3): 477-480.
- [26] 黄荣. 施用不同化肥对海泡石钝化镉污染土壤修复效果影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018: 8. HUANG Rong. Effects of different inorganic fertilizer on immobilization remediation of Cd polluted paddy soil using sepiolite[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018: 8.
- [27] 张笑宇. 烟田土壤微生物特征及其影响因素分析[D]. 郑州: 郑州大学, 2018: 10. ZHANG Xiao-yu. Analysis of soil microbial characteristics and its influencing factors in tobacco field[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018: 10.
- [28] 白永飞. 拉萨河流域主要湿地芦苇不同部位金属元素富集规律研究[D]. 拉萨: 西藏大学, 2019: 41-42. BAI Yong-fei. Study on the enrichment of metallic element in different parts of *Phragmites australis* in the main wetland of Lhasa River Basin[D]. Lhasa: Tibet University, 2019: 41-42.
- [29] 聂发辉. 关于超富集植物的新理解[J]. 生态环境学报, 2005, 14(1): 136-138. NIE Fa-hui. New comprehensions of hyperaccumulator[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2005, 14(1): 136-138.
- [30] 傅校锋, 刘杰, 朱文杰, 等. 青苜蓿修复镉污染土壤的田间试验研究[J]. 水土保持学报, 2019, 33(4): 329-334. FU Xiao-feng, LIU Jie, ZHU Wen-jie, et al. Field experiment on remediation of cadmium contaminated soil by *Celosia argentea* L.[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2019, 33(4): 329-334.
- [31] Han Y L, Zhang L L, Gu J G, et al. Citric acid and EDTA on the growth, photosynthetic properties and heavy metal accumulation of *Iris halophila* Pall. cultivated in Pb mine tailings[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 128: 15-21.
- [32] 刘星, 刘晓文, 吴颖欣, 等. 农用地重金属污染植物提取修复技术研究进展[J]. 环境污染与防治, 2020, 42(4): 507-513. LIU Xing, LIU Xiao-wen, WU Ying-xin, et al. Review on phytoextraction of heavy metals from contaminated agricultural land[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2020, 42(4): 507-513.
- [33] Esringü A, Turan M, Günes A, et al. Roles of *Bacillus megaterium* in remediation of boron, lead, and cadmium from contaminated soil[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2014, 45(13): 1741-1759.
- [34] 詹淑威, 潘伟斌, 赖彩秀, 等. 外源有机酸对小飞扬草(*Euphorbia thymifolia* L.)修复镉污染土壤的影响[J]. 环境工程学报, 2015, 9(10): 5096-5102. ZHAN Shu-wei, PAN Wei-bin, LAI Cai-xiu, et al. Effects of exogenous organic acids on phytoremediation of Cd-contaminated soil by *Euphorbia thymifolia* L.[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(10): 5096-5102.
- [35] 沈斌, 伍钧, 孟晓霞, 等. 柠檬酸对鱼腥草吸收累积铅锌矿区土壤中重金属的影响[J]. 水土保持学报, 2015, 29(3): 320-324. SHEN Bin, WU Jun, MENG Xiao-xia, et al. Effects of citric acid addition on absorption and accumulation of heavy metals by *Houttuynia cordata* thunb in the soil of lead-zinc mining area[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29(3): 320-324.
- [36] Wang X M, Hou Y L, Jie X L. Citric and oxalic acids effect on Pb and Zn uptake by maize and winter wheat[J]. *Chinese Journal of Population Resources and Environment*, 2004, 2(4): 37-40.
- [37] 丁玲. 巨大/胶质芽孢杆菌与柠檬酸联合强化植物修复铅镉污染的土壤[D]. 石家庄: 河北大学, 2017: 17. DING Ling. Effects of *Bacillus* and citric acid enhanced phytoremediation in Pb, Zn and Cd contaminated soil[D]. Shijiazhuang: Hebei University, 2017: 17.