

交流电场与 *Fusarium* sp.A-2 耦合对博落回修复铀污染土壤的强化作用

丁德馨¹, 成浩¹, 刘晶晶², 董雪², 李艾书², 谭国炽², 马建洪¹, 张辉¹, 王永东², 胡南^{1*} (1.南华大学, 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 湖南 衡阳 421001; 2.南华大学, 极贫铀资源绿色开发技术湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 通过盆栽试验研究了交流电场(AC)与 *Fusarium* sp.A-2(A-2)真菌耦合对博落回(P)的生物量、富集铀(U)性能、酶活性以及根际土壤中有机酸含量、生物可利用态铀、根际微生物群落结构的影响。结果表明,在铀(U)污染土壤中,与 AC+P+U、A-2+P+U 和 P+U 相比,AC+A-2+P+U 组博落回的鲜重、株高、总干重分别升高了 10.67%~45.76%、26.87%~92.02%和 61.99%~159.98%;总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)含量分别提高了 41.24%~133%和 15.35%~63.63%;根际土壤中草酸显著增加了 13.03%~157.09%;与 A-2+P+U 和 P+U 组相比,AC+A-2+P+U 组土壤中生物可利用态铀分别提高了 12.5%和 28.57%。在 AC+A-2+P+U 组,植物根际土壤中存在大量的镰刀型菌(*Fusarium*)真菌属和酸杆菌属(*Acidobacteria*)等细菌属,且镰刀型菌属(*Fusarium*)占比最高,与 AC+P+U、A-2+P+U、P+U 和 A-2+U 组相比,*Fusarium* 分别提高了 16.67%、81.03%、299.23%和 374.47%。AC 和 A-2 耦合强化博落回修复铀污染土壤的可能机理包括 AC 提高了铀在土壤中的流动性,增加了植物根部与铀的接触,促进了铀的富集;AC 刺激了博落回的生理活性,增大了博落回的生物量,提高了抗氧化酶活性,使博落回对铀的耐受性增强;AC 刺激了 A-2 真菌和酸杆菌属(*Acidobacteria*)的生长,使其比例增大,从而产生大量的有机酸,与铀形成螯合物,降低了铀对植物的胁迫作用,提高了生物可利用态铀的占比,促进了博落回对铀的富集。AC 与 A-2 真菌耦合对 P 修复铀污染土壤有显著的强化作用,是一种有潜在应用前景的强化方法。

关键词: 交流电场; *Fusarium* sp.A-2 真菌; 博落回; 植物修复; 铀污染土壤

中图分类号: X53 **文章编号:** 1000-6923(2022)01-0258-09

Enhancement effects of the coupling between AC electric field and *Fusarium* sp. A-2 on the remediation of uranium contaminated soil by *Macleaya Cordata*. DING De-Xin¹, CHENG Hao¹, LIU Jing-Jing², DONG Xue², LI Ai-Shu², TAN Guo-Chi², MA Jian-Hong¹, ZHANG Hui¹, WANG Yong-Dong², HU Nan^{1*} (1.Key Discipline Laboratory for National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang 421001, China; 2.Hunan Province Key Laboratory of Green Development Technology for Extremely Low Grade Uranium Resources, University of South China, Hengyang 421001, China). *China Environmental Science*, 2022,42(1): 258–266

Abstract: Pot experiments were conducted to study the effects of the coupling between alternating current electric field (AC) and *Fusarium* sp. A-2 (A-2) fungi on the biomass, uranium (U) enrichment and enzyme activity of *Macleaya cordata* (P), as well as the organic acid content, bioavailable uranium and microbial community structure in the rhizosphere soil. The results showed that compared with AC+P+U, A-2+P+U, and P+U groups, the fresh weight, plant height and total dry weight of *Macleaya cordata* in AC+A-2+P+U group were significantly increased by 10.67%~45.76%, 26.87%~92.02% and 61.99%~159.98%, respectively, and the contents of the total superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT) were increased by 41.24%~133% and 15.35%~63.63%, respectively, and the oxalic acid was increased by 13.03%~157.09%. Compared with the A-2+P+U and P+U groups, the bioavailable uranium in soil in AC+A-2+P+U group was increased by 12.5% and 28.57%, respectively. In the AC+A-2+P+U groups, there were a large number of *Fusarium* fungi and *Acidobacteria* in rhizosphere soil, and the proportion of *Fusarium* fungi was the highest. Compared with AC+P+U, A-2+P+U, P+U, and A-2+U groups, the proportion of *Fusarium* fungi in AC+A-2+P+U group was increased by 16.67%, 81.03%, 299.23% and 374.47%, respectively. The mechanisms of AC and A-2 coupling enhanced the remediation of uranium contaminated soil by *Macleaya cordata* may be include that AC improved the mobility of uranium in soil, increased the contact between plant roots and uranium, and promoted the enrichment of uranium by *Macleaya cordata*; that AC stimulated the physiological activity and increased the biomass of *Macleaya cordata*, improved the activity of antioxidant enzymes, and enhanced the tolerance of *Macleaya cordata* to uranium; and that AC stimulated the growth of A-2 fungi and *Acidobacteria*, increased their proportion, and produced a large number of organic acids which can form chelates with uranium, reduced the stress of uranium on plants, increased the proportion of bioavailable speciation of uranium, and promoted the enrichment of uranium by

收稿日期: 2021-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1967210,11775106);湖南省科技人才托举项目(2020TJ-Q03);湖南省教育厅重点资助项目(19A436)

* 责任作者, 高级实验师, hn12352000@163.com

Macleaya cordata. AC and A-2 coupling exhibited a significant enhancement effect on the remediation of uranium contaminated soil by *Macleaya cordata*, and there coupling was a promising enhancement method.

Key words: AC electric field; *Fusarium* sp.A-2 fungi; *Macleaya cordata*; phytoremediation; uranium contaminated soil

铀矿采冶产生的铀尾矿、铀废水导致了土壤的铀污染.铀污染土壤中的铀,极易通过食物链进入人体,由于铀具有放射毒性和重金属毒性,对人体健康产生较大威胁.因此,铀污染土壤的修复,是环境保护领域亟需开展的工作.

过去几十年内,已经提出了铀污染土壤的物理、化学和生物修复法.物理修复法如覆土法、客土法等,成本高而且修复效果不佳^[1-2].化学修复法如土壤淋洗法,会改变土壤的理化性质^[3-4].生物修复法如植物修复,成本低、绿色环保且无二次污染,是被认为最具潜力的修复方式^[5],然而,由于大部分植物的生物量小、富集量低,导致了植物修复的效率低^[6].目前修复重金属污染土壤的微生物-植物联合修复技术、电场-植物联合修复技术、电场-微生物联合修复技术,都存在一定的缺陷.微生物修复是一种绿色环保、廉价、对土壤理化性质扰动小的修复方法^[7],但在处理大面积、高浓度污染土壤时,存在修复时间长、效率低等问题;电动修复是一种高效、可行的铀污染土壤修复技术,但存在能耗高、成本过大、土壤酸碱化等问题^[8-9].已有研究^[10]发现采用耐铀微生物 *Fusarium* sp.A-2 菌能够提高植物的生物量、抗氧化能力、提高根际土壤中植物可利用态铀的比例.研究表明,交流电场不仅能够有效加强重金属在土壤中的移动性,提高植物对重金属的吸收,而且也对微生物的生理特性产生了刺激作用,从而提高微生物的新陈代谢,提高植物的生物量、促进土壤中金属离子的迁移^[11-12].因此,在植物修复铀污染的土壤中,同时加入交流电场和耐铀微生物,能够有效地提高植物对铀污染土壤的修复效率.

本文采用盆栽试验研究交流电场和 *Fusarium* sp.A-2 真菌的耦合对博落回的生物量、富集 U 性能、酶活性以及根际土有机酸、生物可利用态铀、根际微生物群落结构的影响,揭示电场与 *Fusarium* sp.A-2 真菌耦合强化博落回修复铀污染土壤的机理,从而提出交流电场与 *Fusarium* sp.A-2 真菌耦合强化博落回修复铀污染土壤的方法.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验土壤 土壤取自南华大学校内西山山脚,该土壤与我国南方某尾矿库周边地区的土壤属于同一种类型,且理化性质一致,因此,可被用来作为铀尾矿库周边区域的模拟供试土壤^[13-14].根据铀尾矿库周边污染土壤中铀含量及有关文献^[15]来设置土壤中铀的浓度为 30mg/kg.具体操作如下:(1):将土壤和粗沙按 2:1 的质量比混匀得到 3kg 的供试土壤,将其灭菌 2h;(2):把配制好的六水硝酸铀酰标准液分 2 次均匀地添加到步骤(1)中,搅拌均匀;(3)将步骤(2)中配置好的含铀土壤装入到花盆中,其土层厚度为 18cm,用薄膜封住花盆口,定期浇定量的灭菌水并重新混匀,使土壤的含水率保持在 65%.放于温室大棚中平衡 1 个月,经检测,土壤的理化性质如表 1.

表 1 土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil

参数	值
pH 值	6.50
有机质(%)	2.31
阳离子交换量(cmol/kg)	18.60
速效氮(mg/kg)	89.10
速效磷(mg/kg)	20.63
速效钾(mg/kg)	17.84
U(mg/kg)	30.16

1.1.2 试验植物 本试验所用植物为罂粟科类-博落回,是一种多年生草本植物,由 Li 等^[16]对铀尾矿库周围的植物进行调查采样分析后,发现博落回对铀具有较强的富集效果.试验中所用的博落回种子购买于衡阳市花鸟市场,具体操作处理如下:先将种子浸泡在 1%(质量分数)的次氯酸钠溶液中,消毒 0.5h,再用去离子水冲洗种子 2~3 次,其次将清洗干净的种子放在去离子水中浸泡 10h,然后将种子滤出撒在灭菌的营养土中,放于温室大棚 10~15d 左右,等到长出幼苗.待其生长稳定后,挑选生长一致的幼苗用于试验.

1.1.3 试验真菌 本试验所用微生物为 *Fusarium* sp.A-2 镰刀型真菌,在 CDA 固体培养基上,菌落正面

凸起呈絮状且为白色;菌落反面为淡黄色,随着时间增加,菌落颜色逐渐加深;具有耐铀、产酸、提高植物生物量和修复效率的功能^[10].

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 盆栽实验在衡阳市南华大学西山温室大棚中进行,大棚温度维持在 25℃左右,相对湿度为 55%~75%,16h/8h 的光照(150μmol/(m²·s)).结合之前的预实验和相关文献,选择耐铀微生物-*Fusarium* sp.A-2 真菌,电场为 1V/cm 的交流电场强度,植物为多年生博落回,电极材料为石墨电极棒.具体操作如下:将 1.1.2 中生长一致的幼苗,栽种到花盆中,待幼苗生长稳定一段时间后,把培养好的 *Fusarium* sp.A-2 真菌接种到博落回根部,待植物生长 3 个月时,将电极垂直插入到离博落回同等距离(植物在中间,两根电极位于植物两边,电极间距为 16cm,在土壤中的深度为 18cm)的土壤中,开始通电,24h/d,持续 4 周后,收获植物.实验设置 12 个处理组,每组共有 3 个平行样,具体试验分组如表 2.

表 2 试验分组
Table 2 Experimental groups

试验序号	处理模式
①	电场(AC)
②	<i>Fusarium</i> sp.A-2 真菌(A-2)
③	博落回(P)
④	电场+博落回(AC+P)
⑤	<i>Fusarium</i> sp.A-2+博落回(A-2+P)
⑥	电场+ <i>Fusarium</i> sp.A-2 真菌+博落回(AC+A-2+P)
⑦	电场+铀(AC+U)
⑧	<i>Fusarium</i> sp.A-2 真菌+铀(A-2+U)
⑨	博落回+铀(P+U)
⑩	电场+博落回+铀(AC+P+U)
⑪	<i>Fusarium</i> sp.A-2+博落回+铀(A-2+P+U)
⑫	电场+ <i>Fusarium</i> sp.A-2 真菌+博落回+铀(AC+A-2+P+U)

注:AC表示交流电场、A-2表示*Fusarium* sp.A-2真菌、P表示博落回、U表示铀.

1.2.2 植物生物量的测定 用自来水冲洗掉已收割植物的地上和地下部分表面上残留的土壤、灰尘及铀等杂质后,用去离子水冲洗 2~3 次,再次将冲洗好的地上和地下部分分别放在 20mmol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液中浸泡 0.5h,使得植物表面残余的铀以络合物的形式得以去除,并用吸水纸吸干植物表面的水分,称重即可得到鲜重^[17].将植物样品放于

105℃的干燥箱中杀青 0.5h 后,调节温度至 70℃直到烘至恒重,冷却后称其质量即为干重,将烘干后的植物样品放入马弗炉中,逐渐升温至 550℃,灰化 6h,冷却取出,称重即为灰重^[18].

1.2.3 植物中铀含量的测定 将上述 1.2.2 中灰化的地上、地下植物样品,分别放于 100mL 烧杯中,按照浓盐酸:浓硝酸:高氯酸=3:1:2 的体积比加入到烧杯中,放在电热炉进行消解.消解完成后,用 3%(质量分数)热的稀硝酸溶液定容至 50mL,再用 0.22μm 的滤头过滤,最后利用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, 7700X,Agilent,USA)测地上、地下消解样品中的铀.

1.2.4 植物体内相关性酶活的测定 利用南京建成生物研究所生产的试剂盒,测定植物地上部分的总蛋白(TP)、可溶性糖、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)以及过氧化氢酶(CAT)的含量.

1.2.5 根际土壤有机酸含量的测定 将新鲜根际土壤过 2mm 筛,称取 5.0g 置于 50mL 离心管中,加入 10mL 超纯水,再置于 25℃、150r/min 的摇床中震荡 45min,使其充分混匀后取出,然后以 5000r/min 的转速离心 5min,再用 0.22μm 的滤头过滤,滤液在-20℃下保存.采用离子色谱仪(万通 883)分析检测滤液中有机酸的含量,最佳色谱条件为 Metroseporganic Acid-250/7.8,5mmol/L H₂SO₄ 作为流动相,流速为 0.5mL/min,压力为 5.1MPa,总记录时间为 27min^[13].6 种酸的出峰顺序依次为草酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、丁二酸和乳酸,检出时间分别为 8.28, 8.86, 9.42, 10.87, 13.28 和 13.36min.

1.2.6 土壤中铀结合形态的测定 土壤中铀结合形态的提取基于 Tessier 法^[19]和 BCR 法^[20]相结合的方法进行.

1.2.7 根际土壤微生物群落测定 待植物生长至设定周期后,取植物根部新鲜土壤,采用高通量测序分析土壤中群落结构.高通量测序由上海生工生物工程有限公司提供.细菌引物:338F-806R(5'-AC-TCCTACGGGAGGCACAGG-3');真菌引物为:SSU0817F-1196R(5'-TTAGCATGGAATAATRRA-ATAGGA-3').

1.2.8 数据处理与分析 试验结果采用 3 次重复试验结果的平均值+标准误差表示,并采用单因素方差分析检测不同组别均值间差异的显著性.

2 结果与讨论

2.1 不同处理模式对植物生物量的影响

如表 3 所示,在 U 污染土壤中,与 AC+P+U、A-2+P+U 及 P+U 组相比,AC+A-2+P+U 处理组,博落回的鲜重、株高、总干重均显著性($P<0.05$)升高,分别升高了 10.67%~45.76%、26.87%~92.02%和 61.99%~159.98%。实验结果表明,AC 和 A-2 菌有利于促进博

落回的生长,提高博落回的的生物量^[10,17],这结果与 Acosta-Santoyo 等^[17]研究结论一致。其原因可能是在 AC 和 A-2 菌耦合作用下,一方面 AC 刺激了博落回的生理特性,其与博落回体内细胞间隙液中的离子相互作用,导致植物细胞内外的代谢活性变得更强;另一方面 A-2 菌提高博落回体内酶的活性,有效地缓解铀对博落回光合系统的抑制作用,减轻铀对植物叶片的损坏,从而提高植物的生物量^[10]。

表 3 不同处理模式下植物生物量的测量结果

Table 3 Measurement results of plant biomass under different treatment modes

处理	鲜重(g)	株高(cm)	根长(cm)	地上干重(g)	地下干重(g)	总干重(g)
P	25.32±1.02 ^e	15.34±3.15 ^e	14.80±3.57 ^d	8.45±0.83 ^{ef}	5.56±1.36 ^c	14.01±1.26 ^{de}
A-2+P	27.86±1.15 ^d	19.78±2.31 ^d	12.83±1.76 ^e	9.25±1.06 ^e	4.79±1.78 ^d	14.04±1.23 ^{de}
AC+P	29.70±1.24 ^c	20.75±1.74 ^c	16.71±0.93 ^c	10.34±3.80 ^{de}	5.78±2.14 ^c	16.12±1.51 ^d
AC+A-2+P	33.76±1.02 ^{ab}	22.37±2.56 ^b	19.38±2.98 ^b	19.88±3.46 ^b	6.88±3.21 ^b	26.76±4.99 ^b
P+U	24.91±1.11 ^{ef}	14.78±3.50 ^f	11.95±2.15 ^f	7.50±1.70 ^f	4.47±0.50 ^d	11.97±0.61 ^e
A-2+P+U	28.10±1.36 ^{cd}	21.50±3.21 ^c	15.01±1.67 ^{cd}	11.52±1.17 ^d	5.36±0.97 ^c	16.88±2.36 ^d
AC+P+U	32.81±0.52 ^b	22.37±1.35 ^b	18.21±1.91 ^b	12.53±3.13 ^c	6.68±2.07 ^b	19.21±1.76 ^c
AC+A-2+P+U	36.31±1.20 ^a	28.38±1.30 ^a	22.21±4.01 ^a	23.11±3.34 ^a	8.01±0.43 ^a	31.12±3.75 ^a

注:数据为平均值±标准偏差($n=3$),同一列不同小写字母表示组间具有显著差异($P<0.05$)。

2.2 不同处理模式对博落回富集 U 性能的影响

表 4 不同处理模式下博落回铀富集量的测量结果

Table 4 Measurement results of enriched uranium *Macleaya cordata* under different treatment modes

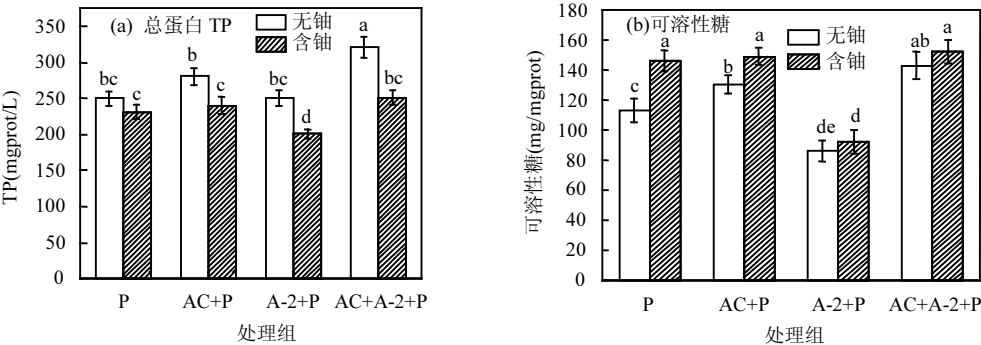
处理	地上部分含量(mg/kg)	地下部分含量(mg/kg)	铀富集总量(mg)	富集系数
P+U	38.89±3.89 ^d	205.17±25.46 ^d	1.21±1.25 ^c	1.29
AC+P+U	65.79±2.76 ^b	569.99±50.74 ^b	3.79±1.01 ^b	2.18
A-2+P+U	52.15±3.56 ^c	367.89±34.55 ^c	3.11±2.31 ^{bc}	1.73
AC+A-2+P+U	89.05±8.56 ^a	1100.15±90.86 ^a	10.87±3.12 ^a	2.95

注:数据为平均值±标准偏差($n=3$),同一列不同小写字母表示组间具有显著差异($P<0.05$)。

如表 4 所示,AC+P+U 与 P+U 组相比,地上部分和地下部分铀含量分别提高了 69.17%和 177.81%,A-2+P+U 组与 P+U 组相比,地上部分和地下部分铀含量分别提高了 34.10%和 79.30%,AC+A-2+P+U 组与 P+U 组相比,地上部分和地下部分铀含量分别提

高了 128.98%和 436.21%,博落回对铀的富集主要在地下部分.AC+A-2+P+U 组富集系数最高为 2.97,与 AC+P+U、A-2+P+U 和 P+U 组相比,分别显著性提高了 27.40%、60.34%和 119.69%。AC 和 A-2 真菌耦合,有利于强化博落回对铀的富集。其原因可能是,在 AC 作用下,铀酰离子在土壤中的流动性增加,植物根系接触到铀酰离子的概率也随之增加,从而提高了植物对铀的富集量。该机理与 O'Connor 等^[22]的研究一致,其认为在土壤中施加电场后,重金属和间隙液体会流动起来,增加金属离子与植物根系的碰撞概率,从而提升植物的修复效率。周丽玮等^[23]也进一步证明了 O'Connor 等^[22]的研究。而 A-2 菌能缓解铀对植物的毒性作用^[10],提高植物的耐受性。

2.3 不同处理模式对博落回体内相关性生理指标的影响



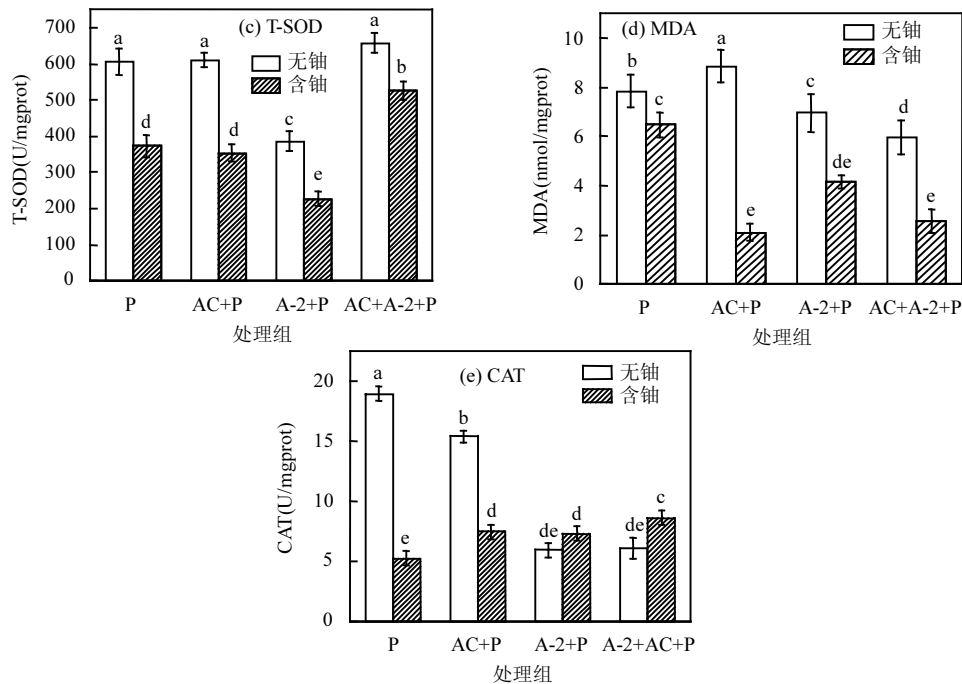


图 1 不同处理模式下植物体内生理活性指标检测结果

Fig.1 Results of physiological activity indicators in plants under different treatment modes

不同小写字母表示不同处理下植物体内相关性酶含量具有显著差异($P<0.05$)

如图 1 所示,在 U 污染土壤中,与 A-2+P、AC+P 和 P 组相比,A-2+AC+P 组博落回体内 T-SOD 和 CAT 含量分别显著($P<0.05$)提高了 41.24%~133%和 15.35%~63.63%。这说明在 AC 和 A-2 菌耦合作用下,通过改变 T-SOD、CAT 含量,缓解铊胁迫对植物膜脂过氧化作用,有效阻止过多的活性氧自由基侵害细胞,在一定范围内平衡了细胞内的活性氧自由基,提高了植物抗铊耐性的能力,增强了植物对逆境环境的耐受性^[9-10,24]。

2.4 不同处理模式对根际土壤有机酸含量的影响

表 5 不同处理模式下根际土壤有机酸含量测量结果

Table 5 Measurement results of organic acid content in rhizosphere soil under different treatment modes

组别	草酸(mg/L)	柠檬酸(mg/L)	酒石酸(mg/L)	苹果酸(mg/L)	丁二酸(mg/L)	乳酸(mg/L)
P	56.26±6.35 ^f	—	0.31±0.27 ^e	0.65±0.44 ^e	0.52±0.27 ^{de}	7.51±1.13 ^c
AC+P	129.09±6.75 ^d	—	2.50±0.29 ^c	2.63±0.30 ^c	3.05±0.33 ^c	7.63±0.78 ^c
A-2+P	145.96±5.27 ^c	0.18±0.32 ^a	2.11±0.32 ^{cd}	3.11±0.50 ^b	3.92±0.32 ^b	8.15±0.98 ^{bc}
AC+A-2+P	143.92±8.25 ^c	—	2.87±0.03 ^b	3.62±0.16 ^b	3.95±0.34 ^b	9.49±0.64 ^b
P+U	70.83±7.03 ^e	—	0.47±0.03 ^d	1.10±0.21 ^d	0.79±0.42 ^d	5.52±0.81 ^{de}
AC+P+U	161.10±6.31 ^b	—	2.52±0.16 ^c	2.31±0.08 ^c	4.52±0.30 ^a	7.12±0.33 ^c
A-2+P+U	153.98±5.12 ^{bc}	—	2.51±0.06 ^c	3.22±0.17 ^b	3.52±0.16 ^{bc}	8.47±0.52 ^{bc}
AC+A-2+P+U	182.10±3.96 ^a	—	3.12±0.02 ^a	4.21±0.14 ^a	4.16±0.08 ^a	10.64±0.48 ^a

注:数据为平均值±标准偏差($n=3$),同一列不同小写字母表示组间具有显著差异($P<0.05$),“—”表示未检测到。

如表 5 所示,在含 U 土壤中,与 AC+P+U、A-2+P+U 和 P+U 相比,AC+A-2+P+U 组中草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸分别显著性($P<0.05$)增加了 13.03%~157.09%、23.81%~563.83%、30.75%~283.73%和 25.62%~92.75%。本实验结果表明在 AC 和 A-2 菌耦合作用下,提高了土壤中有机酸的含量。在重金属的胁迫下,植物会通过分泌有机酸来改变根际的生存状况从而来适应恶劣的环境。徐卫红等^[25]将苹果酸添加到芥菜中后,苹果酸不仅强化了芥菜对铊的吸收,而且还提高了铊在芥菜体内的迁移。Shahandeh 等^[26]将草酸添加到印度芥菜中,最后发现草酸不仅提高了印度芥菜对铊的富集量,而

且也提高了转运系数.有大量研究发现,有机酸把土壤中碳酸盐结合态、铁锰氧化态以及有机结合态的铀部分分解、解吸和转化,通过降低植物根系周围土壤的 pH 值或以螯合作用将其转换成可交换的铀酰离子,进入到土壤溶液中,被植物更好的利用吸收,并使铀由植物的地下部分向地上部分转移,使铀的生物有效性大大提高^[27-29].

2.5 不同处理模式对土壤中铀结合形态的影响

如图 2 所示,在其他条件相同的情况下,与 AC+U、A-2+P+U 和 P+U 相比,AC+A-2+P+U 组生物可利用态铀分别提高了 34.04%、12.50% 和 28.57%.AC+A-2+P+U 组可利用态高的原因可能是在 AC 和 A-2 菌耦合的作用下,AC 提高了铀酰离子在土壤中流动性,同时也刺激了 A-2 菌及土壤中其他的微生物,分泌出了大量的有机酸,而有机酸使部分碳酸盐结合态、铁锰氧化态发生分解,可交换态铀的占比增加,进入土壤溶液,从而被植物吸收^[27].而这一结论与 Cameselle 等^[30]和雷鸣等^[31]研究的结果一致.Montiel-Rozas 等^[32]发现根系分泌物-小分子有机酸(如草酸、苹果酸以及丁二酸等)会影响土壤中重金属的生物可利用性,可促使铀从不可利用态向潜在可利用态转化,这可能是 AC 和 A-2 菌耦合作用增强博落回富集铀的原因.

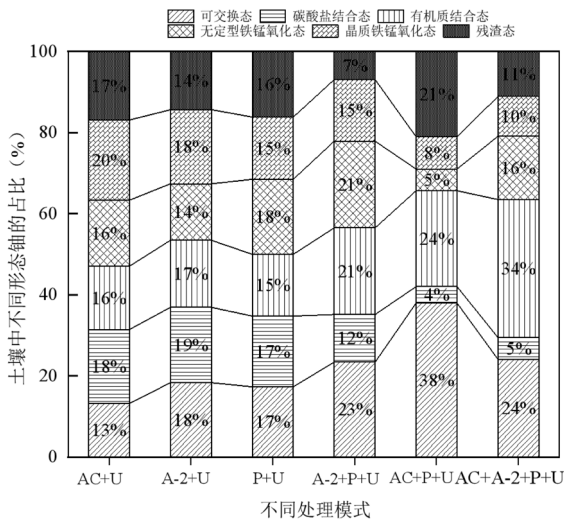


图 2 不同处理模式对土壤中铀形态含量的检测结果
Fig.2 Measurement results of uranium form content in soil by different treatment modes

2.6 不同处理模式对根际土壤微生物群落的影响

2.6.1 微生物丰度和多样性分析 如表 6 所示,其中

Coverage 数值越高,说明样品文库覆盖率高,数据可靠,且均在 0.99 以上.细菌 Shannon 指数的变化范围为 4.23~5.36,平均值为 4.82,与 A-2+P+U、AC+ P+U 和 P+U 组比,AC+A-2+P+U 组中 Shannon 指数偏低为 4.23,此外细菌 ace 指数和 chao 指数最低,说明在 AC 和 A-2 菌耦合作用下降低了土壤中细菌的多样性和丰度.真菌的 Shannon 指数变化范围为 2.30~3.88,平均值为 2.99,AC+A-2+P+U 组中 Shannon 指数、ace 指数和 chao 指数最高,分别为 3.88、141.41 和 140.75,表明 AC 和 A-2 菌耦合作用提高了土壤中真菌的多样性和丰度,原因可能是在 AC 和 A-2 菌的作用下,与根系分泌物的数量和种类增多有关^[34],而这些分泌物为真菌提供了更多的生长所需的营养,所以真菌的数量会有所增加^[35].此外,另有可能是在 AC 和 A-2 菌耦合作用下,引起了土壤酸碱性轻微的变化,如草酸等有机酸分泌的增加和有关土壤酶含量的变化,为微生物提供了生长基质或改善了微生物生长的微环境^[36],最终导致土壤真菌数量的增加.

表 6 不同处理模式对植物根际土壤微生物多样性指数检测结果

Table 6 Measurement results of plant rhizosphere soil microbial diversity index under different treatment modes					
组别	shannon	simpson	ace	chao	coverage
细菌	AC	4.13	0.02	960.24	963.12
	A-2	4.19	0.04	1117.48	1111.34
	P	4.14	0.01	1206.02	1076.28
	AC +P	4.89	0.02	1326.17	1305.09
	A-2 +P	4.54	0.03	1225.07	1185.56
	AC+A-2+P	5.15	0.02	1439.67	1424.42
	AC+U	4.73	0.03	910.93	904.20
	A-2+U	4.89	0.02	1143.75	1123.59
	P+U	5.35	0.02	1299.42	1270.00
	AC+P+U	5.28	0.01	1415.60	1395.81
	A-2 +P+U	5.36	0.01	1447.30	1425.83
	AC+A-2+P+U	4.23	0.05	1148.20	1090.32
真菌	AC	2.45	0.21	77.58	77.00
	A-2	2.30	0.19	85.60	71.50
	P	2.34	0.19	89.94	87.50
	AC +P	3.12	0.09	80.13	80.00
	A-2 +P	2.63	0.12	105.56	109.00
	AC+A-2+P	3.20	0.21	108.95	107.20
	AC+U	2.62	0.13	43.31	42.50
	A-2+U	3.01	0.09	140.69	124.67
	P+U	3.24	0.06	92.67	90.67
	AC+P+U	3.35	0.07	136.30	121.17
	A-2 +P+U	3.79	0.14	128.86	137.00
	AC+A-2+P+U	3.88	0.11	141.41	140.75

2.6.2 功能性微生物群落组成分析 根际土壤中细菌的群落构成如图 3 所示,根际土壤样品中优势细菌是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomomas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、酸杆菌属(*Acidobacteria*)等.在含 U 土壤中,AC+A-2+P+U 组与 A-2+P+U、AC+P+U、P+U 组相比,土壤中酸杆菌属

(*Acidobacteria*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomomas*)的比例升高,假单胞菌属(*Pseudomonas*)等菌属比例降低.在施加 AC 和 A-2 菌的含 U 处理组中,植物对铀富集系数和生物量都有提高,这可能是根际土壤中存在的具有耐重金属和产酸功能的优势微生物酸杆菌(*Acidobacteria*)^[13,37],可使土壤中可交换态铀的浓度增大,从而促进博落回富集更多游离的铀酰离子^[37].

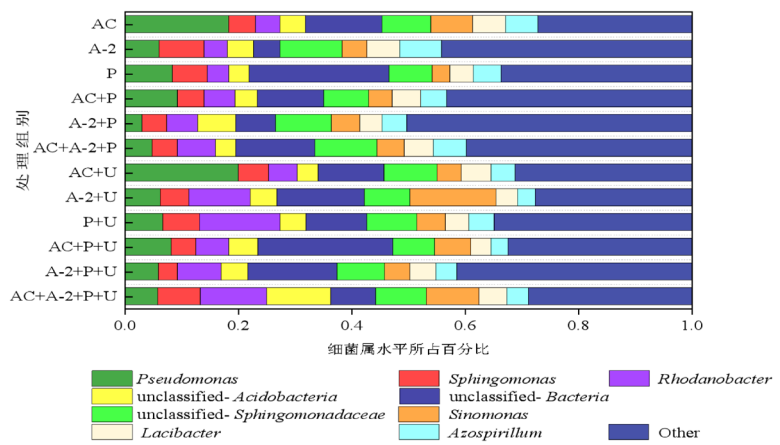


图 3 根际土壤中细菌属水平的群落构成(物种丰度>10%)

Fig.3 Community composition of bacteria at genus level in rhizosphere soil (species abundance>10%)

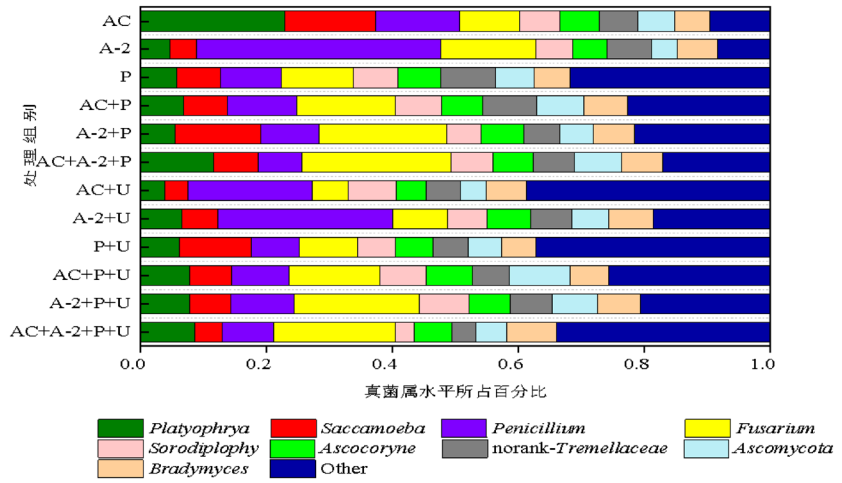


图 4 根际土壤中真菌属水平的群落构成(物种丰度>10%)

Fig.4 Community composition of fungi at genus level in rhizosphere soil (species abundance>10%)

根际土壤中真菌的群落构成如图 4 所示,根际土壤中优势真菌是镰刀菌属(*Fusarium*)、子囊菌纲(*Sordariomycetes*)、子囊菌门(*Ascomycota*)等.在含 U 土壤中,与 AC+P+U、A-2+P+U、P+U、A-2+U 组相比,AC+A-2+P+U 组镰刀菌属(*Fusarium*)分别提高了 16.67%、81.03%和 299.23%和 374.47%.镰刀菌属(*Fusarium*)比例升高的原因,可能是在 AC 作用下,刺激了博落回的代谢功能,提高了博落回的生物量,

为 *Fusarium* 菌属提供了生长所需的碳水化合物^[10].优势微生物 *Fusarium* sp.A-2 菌可以显著提高博落回富集铀总量(表 4)的机理是,铀污染土壤中的 A-2 菌分泌的小分子有机酸对土壤中的铀具有螯合固定和溶解释放两种作用.A-2 菌分泌的草酸与土壤中的铀酰离子发生螯合作用生成微溶于水的草酸铀酰^[10],从而降低铀对植物的毒性,如图 2 所示,添加 A-2 菌后,土壤中有机质结合态铀的占比显著增

加.A-2 菌分泌的酒石酸可与土壤中的铀发生螯合作用,生成铀酰-酒石酸-二元羧酸的混合络合物^[38],使土壤中不溶态铀转变成可溶态铀,如图 2 所示,添加 A-2 菌后,土壤中碳酸盐结合态和铁锰氧化态铀的占比降低,可交换态铀的占比增加,进入到土壤溶液,从而被植物吸收,提高植物对铀的修复效率^[10,27,39].此外,有机酸还能通过缓解氧化应激、提升相关抗氧化酶活性以及促进植物对营养元素的吸收等多种间接方式进一步体现其在植物修复中的强化作用^[40-41].优势微生物子囊菌门(*Ascomycota*),如子囊菌门(*Ascomycota*)下的曲霉菌属(*Aspergillus*),以植物中的纤维素为碳源通过胞外酶的形式进行代谢,将大分子纤维素转化为自身生长所需的营养物质,同时分泌有机酸^[42-44],从而螯合铀酰离子、缓解铀对博落回的胁迫和提高博落回的铀富集量。

3 结论

3.1 在 AC 和 A-2 菌的耦合作用下,博落回的鲜重、株高和总干重分别提高了 10.67%~45.76%、26.87%~92.02%和 61.99%~159.98%;植物地上和地下部分铀含量分别提高了 35.35%~128.98%和 93.01%~436.21%,主要富集在地下部分;铀富集总量分别提高了 186.80%、249.51%和 798.34%。

3.2 在 AC 和 A-2 菌耦合作用下,AC 刺激了植物根系与根际微生物分泌小分子有机酸,有机酸以草酸含量最多,提高了 13.03%~157.09%,接种 A-2 后,通过调控 T-SOD、CAT 的含量,使其分别提高了 41.24%~133%和 15.35%~63.63%,来缓解铀对植物光合系统的胁迫,提高了植物抗氧化的能力,增强了博落回对铀的耐受性,表现为博落回生物量的提高,根际土壤中生物可利用态铀提高了 12.5%~28.57%。

3.3 在 AC 和 A-2 菌耦合作用下,土壤根际微生物群落的丰度与多样性发生了变化,使 *Fusarium* 属和酸杆菌(*Acidobacteria*)属比例增加,提高博落回对铀的耐受性和富集能力。

参考文献:

- [1] Ali H, Khan E, Sajad M A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications [J]. *Chemosphere*, 2013,91(7):869–881.
- [2] Derakhshan Nejad Z, Jung M C, Kim K H. Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology [J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2017, 40(3):927–953.
- [3] Mason C F V, Lu N, Turney W R J R, et al. A complete remediation system for uranium-contaminated soils: Application to a uranium-contaminated site at Los Alamos National Laboratory [J]. *Remediation Journal*, 1998,8(3):113–126.
- [4] Roy D, Kommalapati R R, Mandava S S, et al. Soil washing potential of a natural surfactant [J]. *Environmental Science & Technology*, 1997,31(3):670–675.
- [5] Baycu G, Tolunay D, Ozden H, et al. An abandoned copper mining site in Cyprus and assessment of metal concentrations in plants and soil [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2015,17(7):622–631.
- [6] Stingiu A, Volf I, Popa V, et al. New approaches concerning the utilization of natural amendments in cadmium phytoremediation [J]. *Industrial Crops and Products*, 2012,35(1):53–60.
- [7] Karigar C S, Rao S S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review [J]. *Enzyme Research*, 2011, 2011:1–11.
- [8] Peppicelli C, Cleall P, Sapsford D, et al. Changes in metal speciation and mobility during electrokinetic treatment of industrial wastes: Implications for remediation and resource recovery [J]. *Science of the Total Environment*, 2018,624:1488–1503.
- [9] 胡南,朱若南,成浩,等.电场强化博落回修复铀镉复合污染土壤机理 [J]. *中国环境科学*, 2020,40(10):4457–4467.
- [10] 陈思羽. *Fusarium* sp.A-2 强化博落回修复铀镉复合污染土壤的行为和机理研究 [D]. 衡阳:南华大学, 2019.
- [11] Chen S Y. *Fusarium* sp.A-2Enhancement phyteremediation of Uranium and Cadmium compound contaminated soil by *Macleaya cordata* [D]. Hengyang: University of South China, 2020.
- [12] Cameselle C, Gouveia S. Phytoremediation of mixed contaminated soil enhanced with electric current [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019,361:95–102.
- [13] Cameselle C, Chirakkara R A, Reddy K R. Electrokinetic-enhanced phytoremediation of soils: status and opportunities [J]. *Chemosphere*, 2013,93(4):626–636.
- [14] Sha Y H, Hu N, Wang Y D, et al. Enhanced phytoremediation of uranium contaminated soil by artificially constructed plant community plots [J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2019,208–209:106036.
- [15] 陈威,胡南,陈可,等.博落回和竹柳间作修复铀污染土壤的研究 [J]. *原子能科学技术*, 2018,52(10):1748–1755.
- [16] Chen W, Hu N, Chen K, et al. Study on the remediation of uranium contaminated soil by intercropping with bamboo and willow [J]. *Atomic Energy Science and Technology*, 2018,52(10):1748–1755.
- [17] Li G Y, Hu N, Ding D X, et al. Screening of plant species for phytoremediation of uranium, thorium, barium, nickel, strontium and lead contaminated soils from a uranium mill tailings repository in South China [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011,86:646–652.
- [18] Li C, Hu N, Ding D X, et al. Phytoextraction of uranium from contaminated soil by *Macleaya cordata* before and after application of EDDS and CA [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015,22(8):6155–6163.

- [17] Acosta-Santoyo G, Cameselle C, Bustos E. Electrokinetic - Enhanced ryegrass cultures in soils polluted with organic and inorganic compounds. [J]. Environmental Research, 2017,158:118-125.
- [18] Duquène L, Vandenhove H, Tack F. et al. Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments [J]. Science of the Total Environment, 2009,407(5):1496-1505.
- [19] Tessier A, Campbell P G C, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particular trace elements [J]. Analytical Chemistry, 1979,51(7):844-851.
- [20] Alborés A F, Cid B P, Gómez E F, et al. Comparison between sequential extraction procedures and single extractions for metal partitioning in sewage sludge samples [J]. Analyst, 2000,125(7):1353-1357.
- [21] Nie X Q, Dong F Q, Liu M X, et al. Removal of uranium from aqueous solutions by *Spirodela punctata* as the mechanism of biomineralization [J]. Procedia Environmental Sciences, 2016,31:382-391.
- [22] O'Connor C S, Lepp N W, Edwards R, et al. The combined use of electrokinetic remediation and phytoremediation to decontaminate metal-polluted soils: A laboratory-scale feasibility study [J]. Environmental Monitoring & Assessment, 2003,84(1/2):141-158.
- [23] 周丽玮,王 航,刘阳生.转换电极的电动力强化植物修复高浓度砷污染土壤 [J]. 环境工程, 2020,38(10):228-233.
- Zhou L W, Wang H, Liu Y S. Electrodynamic enhanced phytoremediation of high-concentration arsenic contaminated soil with conversion electrodes [J]. Environmental Engineering, 2020, 38(10):228-233.
- [24] Mishra N P, Mishra R K, Singhal G S. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis Inhibitors [J]. Plant Physiology, 1993,102(3):903-910.
- [25] 徐卫红,黄 河,王爱华.根系分泌物对土壤重金属活化及其机理研究进展 [J]. 生态环境学报, 2006,15(1):184-189.
- Xu W H, Huang H, Wang A H. Advance in studies on activation of heavy metal by root exudates and mechanism [J]. Ecology and Environment, 2006,15(1):184-189.
- [26] Shahandeh H, Hossner L R. Enhancement of uranium phytoaccumulation from contaminated soils [J]. Soil Science, 2002, 167(4):269-280.
- [27] Evangelou M W H, Mathias E, Andreas S. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents [J]. Chemosphere, 2007,68(6):989-1003.
- [28] Qin R, Hirano Y, Brunner I. Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn [J]. Tree Physiology, 2007,27(2):313-320.
- [29] Vandenhove H, Vanhoudt N, Antunes K, et al. Comparison of two sequential extraction procedures for uranium fractionation in contaminated soils [J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2014,137:1-9.
- [30] Cameselle C, Gouveia S. Phytoremediation of mixed contaminated soil enhanced with electric current [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019,361:95-102.
- [31] 雷 鸣,廖柏寒,秦普丰.土壤重金属化学形态的生物可利用性评价 [J]. 生态环境学报, 2007,16(5):1551-1556.
- Lei M, Liao B H, Qin P F. Bioavailability assessment of chemical speciation of heavy metals in soil [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2007,16(5):1551-1556.
- [32] Montiel-Rozas M M, Madejón E, Madejón P. Effect of heavy metals and organic matter on root exudates (low molecular weight organic acids) of herbaceous species: An assessment in sand and soil conditions under different levels of contamination [J]. Environmental Pollution, 2016,216:273-281.
- [33] 秦延文,张 雷,郑丙辉,等.太湖表层沉积物重金属赋存形态分析及污染特征 [J]. 环境科学, 2012,33(12):4291-4299.
- Qin Y W, Zhang L, Zheng B H, et al. Speciation analysis and pollution characteristics of heavy metals in surface sediments of Taihu Lake [J]. Environmental Science, 2012,33(12):4291-4299.
- [34] Zhou X, Yu G, Wu F. Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield [J]. European Journal of soil Biology, 2011,47(5):279-287.
- [35] Broeckling C D, Broz A K, Bergelson J, et al. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008,74(3):738-744.
- [36] Ameloot N, Neve S D, Jegajeevagan K. Short-term CO₂ and N₂O emissions and microbial properties of biochar amended sandy loam soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013,57:401-410.
- [37] Barns S M, Cain E C, Sommerville L, et al. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007,73(9):3113-3116.
- [38] 凌达仁,郑祖英,董发运.铀酰-酒石酸-二元羧酸的混合络合物 [J]. 兰州大学学报, 1990,26(3):58-63.
- Ling D R, Zheng Z Y, Dong F Y. Mixed complexes of uranyl ion with tartaric and dicarboxylic acid [J]. Journal of Lanzhou University, 1990, 26(3):58-63.
- [39] Hu N, Lang T, Ding D, et al. Enhancement of repeated applications of chelates on phytoremediation of uranium contaminated soil by *Macleaya cordata* [J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2019,199:58-65.
- [40] Kaur R, Yadav P, Sharma A, et al. Castasterone and citric acid treatment restores photosynthetic attributes in *Brassica juncea* L. under Cd(II) toxicity [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 145:466-475.
- [41] Adem O, Veli U. Effects of low-molecular-mass organic acids on P nutrition and some plant properties of *Hordeum vulgare* [J]. Journal of Plant Nutrition, 2018,41(11):1482-1490.
- [42] Lyons J I, Newell S Y, Buchan A. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a southeastern US salt marsh [J]. Microbial Ecology, 2003,45(5):270-281.
- [43] Jiang S, Wang W, Xue X, et al. Fungal diversity in major oil-shale mines in China [J]. Journal of Environmental Sciences, 2016,41(3):81-89.
- [44] Wang Y D, Li G Y, Deng Q W, et al. Uranium leaching using mixed organic acids produced by *Aspergillus niger* [J]. Journal of Radioanalytical & Nuclear Chemistry, 2013,298(2):769-773.

作者简介: 丁德馨(1958-),男,教授,博士,主要研究方向为铀矿采冶技术及相关环境问题.发表论文 200 余篇。