

## 螯合剂对 Ni 污染土壤中紫花苜蓿生长和土壤酶活性的影响

谢芳芳, 李信用, 夏焕焕, 丁艳萍, 李 玲\*

(新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐 830046)

**摘要:** 通过盆栽紫花苜蓿实验, 考察 EDTA 和柠檬酸 (CA) 对供试土壤中 Ni 各个形态分布、紫花苜蓿生理指标和土壤酶活性变化的影响。结果表明, 供试土壤中施加 EDTA/CA 浓度为 5.0/2.5 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 对土壤中 Ni 的活化效果较好, 其水溶态含量是对照组的 48.2 倍, 紫花苜蓿中丙二醛 (MDA) 含量提高了 232.0%; 施加 EDTA/CA 浓度为 2.5/5.0 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 紫花苜蓿转运系数最大, 是对照组的 194.3%; 紫花苜蓿细胞通透性随螯合剂总添加量的增大而增大, 施加 EDTA/CA 浓度为 5.0/10.0 mmol·kg<sup>-1</sup> 时最大, 比对照组增大 206.3%; 施加 EDTA/CA 对土壤过氧化氢酶均有不同程度的抑制作用。土壤蔗糖酶酶的激活率与 CA 施加量显著相关 ( $P < 0.01$ )。研究认为, 将 EDTA/CA 适当配比后施加, 既可以减少螯合剂的用量, 又可以较好地提高紫花苜蓿富集土壤中重金属 Ni 的效果。

**关键词:** 重金属 Ni; 丙二醛; 电导率; 土壤酶活性; 析因设计

中图分类号: X53

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0684-06

### Influence of chelating agents on alfalfa growth and enzyme activity in Ni polluted soil

XIE Fangfang, LI Xinyong, XIA Huanhuan, DING Yanping, LI Ling

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Urumqi 830046)

**Abstract:** Pot experiments of alfalfa were conducted to study the effects of EDTA and CA on distribution of Ni, physiological indexes of alfalfa and changes of soil enzyme activities. The results showed that when the EDTA/CA content was 5.0/2.5 mmol·kg<sup>-1</sup>, the Ni in the soil was better hydrated with the solubility was 48.2 times higher than that of the control group, and the content of malondialdehyde (MDA) in alfalfa increased by 232.0% compared the control group. When the concentration of EDTA / CA was 2.5/5.0 mmol·kg<sup>-1</sup>, the transfer coefficient of alfalfa was the highest, which was 194.3% of the control group. The cell permeability of alfalfa increased with the increase of the total amount of chelating agent with the highest cell permeability observed in the group of EDTA/CA 5.0/10.0 ( $P < 0.05$ ), which was 206.3% higher than that of the control group. The effect of EDTA/CA on soil catalase was inhibitory in different extent and the invertase was significantly correlated with CA ( $P < 0.01$ ). It is suggested that the addition of EDTA/CA in an appropriate proportion can reduce the dosage of chelating agent and improve the enrichment of heavy metal Ni in alfalfa.

**Key words:** metal Ni; MDA; relative conductivity; soil enzyme activity; factorial design

目前许多地区土壤中重金属的污染给人们的生存环境造成了很大危害<sup>[1-3]</sup>。土壤中的镍 (Ni) 可通过食物链进入人体, 造成皮肤过敏症、肺纤维化、肾和心血管系统病症和呼吸道癌以及诱发肿瘤恶化等<sup>[1,4]</sup>。修复重金属污染土壤的方式有多种, 其中植物修复是一种新兴的原位修复手段<sup>[5]</sup>。土壤中能直接被植物吸收的重金属主要是其活性部分, 即有效态部分<sup>[6-7]</sup>, 其余大部分是以铁锰氧化态或残渣态存在于

土壤中, 无法被植物吸收。在土壤中加入螯合剂可加强植物对重金属的富集<sup>[8]</sup>。螯合剂的添加还会不同程度影响土壤酶的活性, 土壤酶影响土壤养分的释放及土壤中作物的生长<sup>[9-10]</sup>, 可以作为土壤重金属污染程度的指标<sup>[11]</sup>。本研究通过紫花苜蓿盆栽实验, 研究不同浓度的柠檬酸 (CA)、EDTA 单独以及联合施加对紫花苜蓿富集土壤中 Ni 的效果、土壤酶活性、及紫花苜蓿叶绿素含量、丙二醛 (MDA)

收稿日期: 2016-12-05

基金项目: 国家自然科学基金 (21467029) 资助。

作者简介: 谢芳芳, 硕士研究生。E-mail: 1534656502@qq.com

\* 通信作者: 李 玲, 副教授。E-mail: llwzd2@163.com

含量等各个生理生化指标的影响。希望通过联合施加的方法, 既可以减少螯合剂的添加量, 又能达到更好地富集土壤中 Ni 的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验植物为紫花苜蓿。供试土壤取自乌鲁木齐市某石化厂污水库周边农田土壤。取土壤表层 0~20 cm 的土样, 风干后, 磨碎, 过 2 mm 筛, 常温保存备用。采用常规方法测定土壤的理化性质<sup>[12]</sup>, 农田土的理化性质为: 有机质 0.27%, 全氮 165.14 mg·kg<sup>-1</sup>, 全磷 86.30%, 全钾 61.05 mg·kg<sup>-1</sup>, 全镍 56.04 mg·kg<sup>-1</sup>, pH 7.94; 添加 300 mg·kg<sup>-1</sup> Ni 后, 土壤的理化性质如下: 有机质 0.31%, 全氮 307.37 mg·kg<sup>-1</sup>, 全磷 86.04%, 全钾 60.02 mg·kg<sup>-1</sup>, 全镍 355.87 mg·kg<sup>-1</sup>, pH 8.11。

### 1.2 实验设计

采用 2 因素 3 水平实验设计, 螯合剂 EDTA 和 CA 浓度梯度设置为: 2.5、5.0 和 10.0 mmol·kg<sup>-1</sup>, 文中用 EDTA/CA 表示。实验组分别标记为: 2.5/2.5、2.5/5.0、2.5/10.0、5.0/2.5、5.0/5.0、5.0/10.0、10.0/2.5、10.0/5.0 和 10.0/10.0, 前者表示 EDTA 的浓度, 后者为 CA 浓度, 单位均为 mmol·kg<sup>-1</sup>, 下同。设置一个不加任何螯合剂的对照组 (0.0/0.0), 以及 EDTA 和 CA 单独作用组, 分别标记为: 2.5/0.0、5.0/0.0、10.0/0.0、0.0/2.5、0.0/5.0 和 0.0/10.0, 每组设 3 个平行样。分别取土壤 0.5 kg 装入花盆中, 其直径为 12.5 cm。外源 Ni 浓度为 300 mg·kg<sup>-1</sup>, 平衡 60 d 后, 所有花盆中播种紫花苜蓿, 待幼苗生长至 3 片复叶后间苗, 每盆留 15 株。当紫花苜蓿生长 3 个月后, 将不同配比的 EDTA 与 CA, 以水溶液的形式, 分 5 次、每天添加 1 次, 施加螯合剂 1 周后, 收获植物, 取种植后混合完全的土样进行测定。

### 1.3 样品分析与测定

**1.3.1 样品前处理** 收获植物后, 采集盆中土样, 风干后, 磨碎, 过 120 目筛, 用于测定土壤 Ni 的形态分布、总量, 取土壤鲜样测定土壤酶活性。

**1.3.2 土壤重金属 Ni 的测定方法** Tessier 连续提取法测定各个形态含量<sup>[13]</sup>; 土壤及植物中重金属总量采用浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub> 法消解, 以上均采用火焰原子吸收分光光度法定量。

**1.3.3 土壤酶活性测定方法** 过氧化氢酶活性的测定采用高锰酸钾滴定法<sup>[14]</sup>; 蔗糖酶活性的测定采用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 滴定法<sup>[15]</sup>。

**1.3.4 植物生理特征的测定方法** 叶绿素 (叶绿素

a, 叶绿素 b, 类胡萝卜素), 采用乙醇-丙酮-水 (4.5:4.5:1) 浸提法<sup>[16]</sup>; 丙二醛 (MDA) 采用 TBA 显色法<sup>[17]</sup>; 电导率测定采用浸提法<sup>[18]</sup>。

### 1.4 数据处理

数据处理采用 Microsoft Excel 软件, 实验作图采用 Origin 8.0 软件, 用 SPSS 18.0 统计分析软件进行相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 EDTA/CA 对土壤中 Ni 各形态分布的影响

取种植后并混合均匀的土壤, 用 Tessier 连续提取法测定对照组及实验组 Ni 的各个形态含量变化如图 1 所示。由图 1 可知, CA 单独作用时, Ni 的有效态 (水溶态+交换态+碳酸盐结合态) 含量随 CA 添加量的增大变化不显著, 这可能与 CA 的结构有关, CA 为小分子有机酸, 易降解, 作用时间较短; 单独施加 EDTA, Ni 的有效态含量与对照组相比均增加。EDTA、CA 联合施加时, 各实验组 Ni 的有效态含量均增高明显, 当 EDTA 和 CA 施加总量相同时部分实验组中 Ni 有效态含量关系有: 2.5/2.5>5.0/0.0>0.0/5.0, 5.0/5.0>10.0/0.0>0.0/10.0; 此外 5.0/2.5>5.0/5.0>10.0/0.0>0.0/10.0, 说明适当的 EDTA、CA 配比对土壤中 Ni 不仅可以达到更好的活化的效果, 又可以减少螯合剂总添加量, 降低污染。在实际应用中, 可以考虑用混合螯合剂代替单一螯合剂。Ni 的铁锰氧化态和有机物结合态受 EDTA/CA 的影响也较大, 添加适量的 EDTA/CA 可使其向水溶态转变, 从而促进紫花苜蓿对 Ni 的富集。铁锰氧化态的百分比含量变化范围为: 35.08%~50.78%, 有机物结合态的百分比含量变化范围为: 21.87%~32.88%, 与对照组相比, 实验组

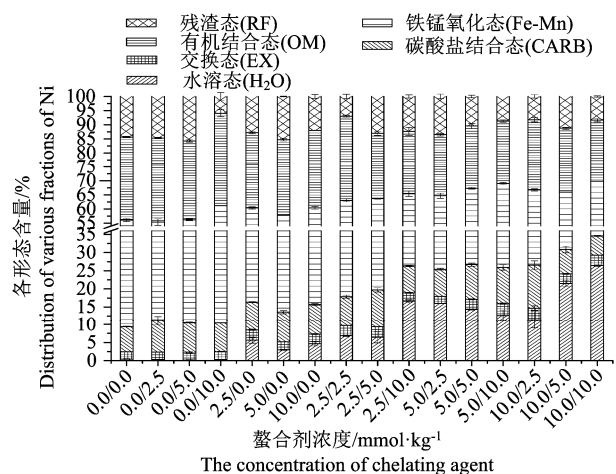


图 1 EDTA/CA 对土壤中 Ni 各形态分布的影响

Figure 1 Effect of EDTA/CA on the distribution of Ni in soil

表 1 EDTA/CA 对土壤中有效态 Ni 百分含量影响的方差分析  
Table 1 ANOVA of effect of EDTA /CA on the effective state Ni content in soil

偏差来源 Source of variation	偏差平方和 SS	自由度 DF	方差 MS	F 值 F-value	P 值 P-value
EDTA	21 366.22	3	7 122.07	3 267.89	<0.000
CA	2774.73	3	924.91	424.39	<0.000
EDTA/CA	2304.87	9	256.10	117.51	<0.000
随机误差 Random error	69.74	32	2.18		
总和 Cor total	26515.56	48			

注:  $a.R^2=0.997$  (调整  $R^2=0.996$ )。Note:  $a.R^2 = 0.997$  (adjusted  $R^2 = 0.996$ )。)

表 2 EDTA/CA 对紫花苜蓿生物量和株高的影响  
Table 2 Effects of chelating agents on biomass and plant height of alfalfa

EDTA/CA 处理 EDTA / CA treatment	干重/g Biomass			平均株高/cm Plant height
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	
0.0/0.0	2.01 <sup>bc</sup>	2.35 <sup>b</sup>	1.51 <sup>a</sup>	19.04 <sup>b</sup>
0.0/2.5	1.18 <sup>e</sup>	2.78 <sup>a</sup>	1.41 <sup>ab</sup>	18.50 <sup>b</sup>
0.0/5.0	2.05 <sup>b</sup>	1.53 <sup>cd</sup>	1.54 <sup>a</sup>	20.66 <sup>a</sup>
0.0/10.0	2.00 <sup>bc</sup>	1.51 <sup>cd</sup>	1.30 <sup>abcd</sup>	17.57 <sup>b</sup>
2.5/0.0	2.65 <sup>a</sup>	2.17 <sup>b</sup>	1.54 <sup>a</sup>	18.90 <sup>b</sup>
5.0/0.0	1.72 <sup>bcd</sup>	1.24 <sup>cde</sup>	0.78 <sup>defg</sup>	10.59 <sup>def</sup>
10.0/0.0	1.22 <sup>e</sup>	0.96 <sup>e</sup>	0.93 <sup>bcef</sup>	9.57 <sup>fgh</sup>
2.5/2.5	1.50 <sup>cde</sup>	1.45 <sup>cde</sup>	0.74 <sup>efg</sup>	10.34 <sup>defg</sup>
2.5/5.0	1.40 <sup>de</sup>	1.54 <sup>cd</sup>	1.07 <sup>abcde</sup>	12.85 <sup>c</sup>
2.5/10.0	1.87 <sup>bcd</sup>	1.57 <sup>c</sup>	1.33 <sup>abc</sup>	12.33 <sup>cd</sup>
5.0/2.5	1.99 <sup>bc</sup>	1.43 <sup>cde</sup>	1.19 <sup>abcde</sup>	11.92 <sup>cde</sup>
5.0/5.0	1.83 <sup>bcd</sup>	1.29 <sup>cde</sup>	1.12 <sup>abde</sup>	11.14 <sup>cde</sup>
5.0/10.0	1.08 <sup>e</sup>	1.00 <sup>de</sup>	0.36 <sup>gh</sup>	9.96 <sup>efg</sup>
10.0/2.5	1.38 <sup>de</sup>	1.19 <sup>cde</sup>	0.84 <sup>cdefg</sup>	9.11 <sup>fgh</sup>
10.0/5.0	1.11 <sup>e</sup>	0.91 <sup>e</sup>	0.56 <sup>fgh</sup>	8.31 <sup>gh</sup>
10.0/10.0	0.41 <sup>f</sup>	0.38 <sup>f</sup>	0.21 <sup>h</sup>	7.72 <sup>h</sup>

注: 同一列中, 不同小写字母表示处理组间有差异显著性( $P<0.05$ ; Duncan 检验)。下同。

Note: The different small letters followed by the data in the same column indicate significant difference at the 0.05 level. The same below.

表 3 Ni 的 6 种形态与紫花苜蓿根、茎、叶积累 Ni 量的相关分析  
Table 3 The correlation analysis between the concentration of Ni's six forms and Ni content in alfalfa

部位 Part	Ni					
	水溶态 H <sub>2</sub> O	交换态 EX	碳酸盐结合态 CARB	铁锰氧化物结合态 Fe-Mn	有机物结合态 OM	残渣态 RF
根 Root	0.481*	0.666**	0.357	-0.278	-0.225	-0.201
茎 Stem	0.466*	0.777**	0.369	-0.348	-0.244	-0.408
叶 Leaf	0.598**	0.901**	0.337	-0.421	-0.557*	-0.424

注: “\*”表示在 0.05 上显著相关, “\*\*”在 0.01 上显著相关。

Note: “\*” means significant difference at the 0.05 level, and “\*\*” means significant difference at the 0.01 level.

铁锰氧化态和有机物结合态含量均降低。将 EDTA/CA 对土壤中有效态 Ni 含量的影响进行析因设计分析(见表 1)。CA、EDTA 单独作用以及二者交互作用对土壤中有效态 Ni 含量的影响均表现为高度显著( $P<0.05$ )。

## 2.2 EDTA/CA 对紫花苜蓿生长的影响

从表 2 可知, CA 单独作用时, 实验组生物量与对照组相比变化不大; EDTA 单独作用时, 当 EDTA 的添加量为 5.0 和 10.0 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 其处理

组的生物量分别是对照组生物量的 0.63 和 0.52 倍, 均显著小于对照组生物量 ( $P<0.05$ ), 株高也显著小于对照组 ( $P<0.05$ ); EDTA 和 CA 联合施加时, 当 EDTA 添加量为 2.5 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 添加 CA 可以适当降低对植物的毒害作用, 但当 EDTA 的添加量为 5.0 和 10.0 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 再添加 CA 则会加大对紫花苜蓿的毒害作用。其中 10.0/10.0 处理组的生物量下降严重, 仅为对照组的 0.17 倍。株高的变化趋势与生物量相同, 最小株高在 10.0/10.0 处理组, 仅

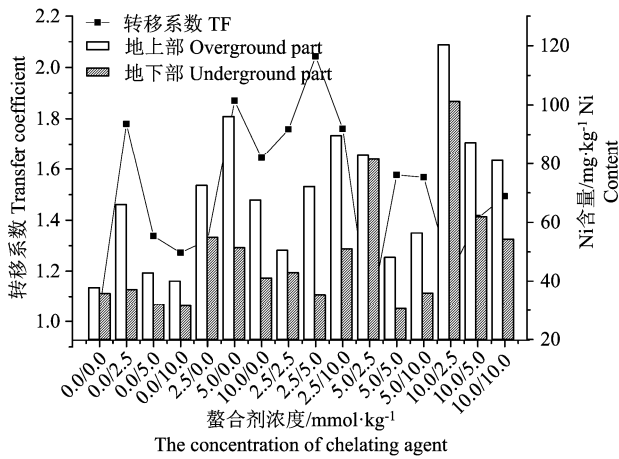


图 2 EDTA-CA 对紫花苜蓿转运 Ni 能力的影响  
Figure 2 The influence of EDTA-CA on Ni's TF

为对照组的 0.41 倍 (表 2)。说明高浓度的 EDTA 和 CA 配比会对紫花苜蓿产生较大毒害作用。

2.3 土壤中各形态 Ni 与植物富集 Ni 量的相关分析

采用 Tessier 法分析供试土壤中 Ni 的 6 种形态, 结果 (表 3) 显示, 紫花苜蓿根、茎、叶中 Ni 的含量与土壤中 Ni 水溶态和交换态的百分含量均有很好的相关性, 其中与交换态达到了极显著相关 ( $P < 0.01$ )。土壤中 Ni 的铁锰氧化物结合态、有机结合态以及存在与土壤晶格中的残渣态与植物各部吸收均呈负相关关系, 且相关性较差。相关性分析也可以从另一方面反映植物对重金属 Ni 各个形态吸收和富集的难易程度。多数螯合剂的使用正是通过改变土壤中重金属的形态分布进而加强植物对重金属的富集效果。

表 4 EDTA/CA 对紫花苜蓿中叶绿素的含量的影响

Table 4 Effect of EDTA/CA on the chlorophyll content in alfalfa

EDTA-CA 处理 EDTA/CA treatment	叶绿素 a Chla	叶绿素 b Chlb	类胡萝卜素 Carotenoids
0.0/0.0	0.96±0.18 <sup>c</sup>	0.52±0.07 <sup>cd</sup>	0.11±0.02 <sup>b</sup>
0.0/2.5	1.12±0.16 <sup>b</sup>	0.64±0.10 <sup>b</sup>	0.12±0.02 <sup>b</sup>
0.0/5.0	0.90±0.05 <sup>c</sup>	0.50±0.02 <sup>cd</sup>	0.10 <sup>b</sup>
0.0/10.0	0.72±0.05 <sup>de</sup>	0.42±0.03 <sup>de</sup>	0.11 <sup>b</sup>
2.5/0.0	0.37±0.01 <sup>hi</sup>	0.20±0.01 <sup>g</sup>	0.06 <sup>cd</sup>
5.0/0.0	0.46±0.05 <sup>ghi</sup>	0.33±0.01 <sup>ef</sup>	0.05 <sup>cd</sup>
10.0/0.0	0.34±0.01 <sup>i</sup>	0.22±0.01 <sup>g</sup>	0.04 <sup>d</sup>
2.5/2.5	0.53±0.02 <sup>fgh</sup>	0.33±0.02 <sup>ef</sup>	0.06 <sup>cd</sup>
2.5/5.0	0.57±0.03 <sup>efg</sup>	0.32±0.03 <sup>ef</sup>	0.07±0.01 <sup>c</sup>
2.5/10.0	0.46±0.05 <sup>ghi</sup>	0.29±0.04 <sup>f</sup>	0.07±0.01 <sup>c</sup>
5.0/2.5	0.76±0.04 <sup>d</sup>	0.52±0.03 <sup>cd</sup>	0.09±0.01 <sup>b</sup>
5.0/5.0	0.66±0.08 <sup>def</sup>	0.50±0.13 <sup>cd</sup>	0 <sup>e</sup>
5.0/10.0	0.56±0.02 <sup>efg</sup>	0.42±0.13 <sup>de</sup>	0 <sup>e</sup>
10.0/2.5	0.71±0.09 <sup>de</sup>	0.53±0.03 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>
10.0/5.0	0.42±0.07 <sup>ghi</sup>	0.37±0.04 <sup>ef</sup>	0 <sup>e</sup>
10.0/10.0	0.65±0.02 <sup>def</sup>	0.55±0.01 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>

注: “0” 为本实验条件下未检出。Note: “0” is not detected under the experimental conditions.

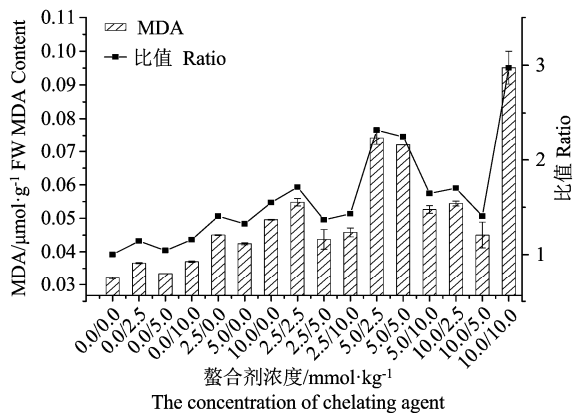


图 3 EDTA/CA 对紫花苜蓿叶中丙二醛的含量的影响  
Figure 3 Effect of EDTA/CA on the content of malondialdehyde in leaves of alfalfa

2.4 EDTA/CA 对紫花苜蓿转运 Ni 的能力的影响

转运系数 (TF) 指植物地上部重金属含量与植物地下部重金属含量的比值, 转运系数越大植物将重金属元素从根系向地上部各器官转移的能力就越大。由图 2 可见, EDTA 和 CA 能够显著提高重金属 Ni 从紫花苜蓿根部向地上部的迁移能力。CA 单独作用时, CA 最佳作用浓度为 2.5 mmol·kg<sup>-1</sup>。EDTA 单独作用时, 其最佳作用浓度为 5.0 mmol·kg<sup>-1</sup>。EDTA 和 CA 联合施加时, 转运系数最高出现在 2.5/5.0 处理组, 最大值为 2.04, 是对照组的 194.3% 倍, 紫花苜蓿在 Ni 量最高是 10.0/2.5 处理组, 是对照组的 3.18 倍, 但此组实验条件下由于 Ni 的水溶态和交换态含量高, 对紫花苜蓿的毒害作用大, 紫

花苜蓿生物量仅是对照组 0.58 倍, 虽单位含量高, 但由于生物量少而总富集量不高。分析可知, 添加 EDTA/CA 浓度在一定范围内, 可显著促进紫花苜蓿对重金属 Ni 的吸收, 但浓度较大时, 一方面土壤中有效 Ni 含量增大, 增大了 Ni 对紫花苜蓿毒害作用, 降低植物的生物量及吸收强度, 从而降低整体紫花苜蓿对 Ni 的富集, 影响其吸收富集能力, 另一方面, 大浓度的 EDTA/CA 可能因改变土壤的理化性质或者与 Ni 形成了不易于植物吸收的大分子螯合物, 反而降低了紫花苜蓿对 Ni 的富集效果<sup>[19]</sup>。

### 2.5 EDTA/CA 对 Ni 污染土壤中紫花苜蓿叶绿素含量的影响

由表 4 可知, CA 单独作用时, 紫花苜蓿叶绿素 a、b 的含量在 CA 浓度为 2.5 mmol·kg<sup>-1</sup> 时含量最大, 最大值分别为 1.12 mg·g<sup>-1</sup> 和 0.64 mg·g<sup>-1</sup>, 分别比对照组增大了 16.67% 和 18.75%, 此时类胡萝卜素的含量变化不显著; EDTA 单独作用时, 叶绿素 a、b 及类胡萝卜素的含量均减小, 最小值出现在 10.0 mmol·kg<sup>-1</sup>, 叶绿素 a、b 及类胡萝卜素的含量比对照组依次降低了 64.58%、57.69% 和 63.64%。EDTA 和 CA 联合施加时, 分析结果表明: 紫花苜蓿叶绿素含量均减小, 与 CA 交互施加可适当降低同浓度 EDTA 单独作用时对紫花苜蓿叶绿素的毒害作用。

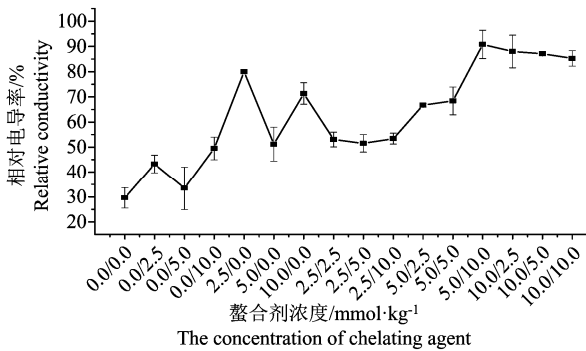


图 4 EDTA/CA 对紫花苜蓿叶片中相对电导率的影响  
Figure 4 Effect of EDTA/CA on the relative conductivity of alfalfa leaves

### 2.6 EDTA/CA 对 Ni 污染土壤中紫花苜蓿丙二醛含量的影响

植物在器官衰老或遭受逆境时, 往往会发生膜脂过氧化作用, 丙二醛 (MDA) 是膜脂氧化的主要产物, 其含量可以在一定程度上反映植物遭受逆境伤害的程度<sup>[20]</sup>。图 3 中的折线为各个处理组紫花苜蓿中的 MDA 含量与对照组 MDA 含量的比值。由图 3 可知, 相同浓度的 EDTA 和 CA 单独作用于紫花苜蓿时, EDTA 处理组的 MDA 含量大于 CA 组。EDTA 和 CA 联合施加时, 5.0/2.5 处理组的 MDA

含量是对照组的 2.32 倍。MDA 的最大值出现在 10.0/10.0 处为 0.095 μmol·g<sup>-1</sup> (FW), 是对照组的 3.0 倍, 此处理组下的紫花苜蓿已出现明显枯黄死亡现象。因此在实际应用中, 既要考虑植物的富集效果, 还要考虑植物的生物性。分析不同 EDTA/CA 浓度处理下土壤中 Ni 水溶态的含量和对应的紫花苜蓿中的 MDA 含量的相关性, Pearson 相关系数为 0.805 (P<0.01), 说明紫花苜蓿膜脂过氧化作用和土壤中水溶态 Ni 含量极相关。

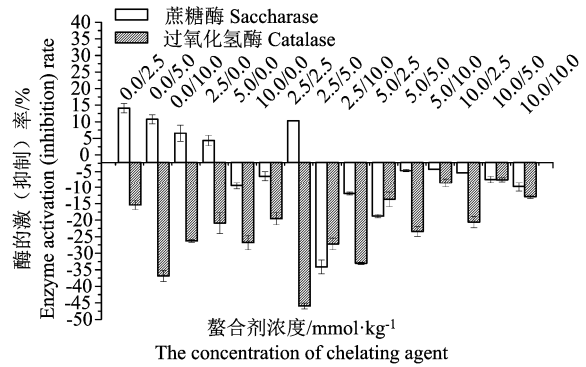


图 5 EDTA/CA 对土壤酶的活性的影响  
Figure 5 Effect of EDTA/CA on the activity of soil enzyme

### 2.7 EDTA/CA 对 Ni 污染土壤中紫花苜蓿细胞质膜通透性的影响

植物细胞有一层细胞膜包围, 正常情况下细胞质膜对物质具有选择性, 对维持细胞的微环境和正常的生理代谢起着重要的作用, 当植物受到逆境影响时, 细胞质膜首先遭到损伤或者破坏, 膜的选择性降低或丧失, 通透性增大从而使细胞内电解质外渗加剧, 细胞浸提液的电导率 (EC) 增大, 植物的电导率越大则受损越严重<sup>[18]</sup>。相对电导率公式: 相对电导率=样品电导值/煮沸电导值×100%。

实验结果显示 (图 4), EDTA 单独施加时, 紫花苜蓿的相对电导率与对照组相比均增大, 其中 2.5/0.0 处理组的相对电导率是对照组的 2.70 倍, 在该实验条件下, 紫花苜蓿的相对电导率 Y (%) 与土壤中水溶态 Ni 量 X (mmol·kg<sup>-1</sup>) 相关性好 (图 4)。线性关系式为: Y = -7.8236X + 182.2, 相关系数 r = 0.9998。此结果与紫花苜蓿中 MDA 的分析结果相似, 说明 EDTA 和 CA 对紫花苜蓿生理指标的影响多是通过活化土壤中重金属 Ni, 增加其水溶态含量, 进而干扰紫花苜蓿的生长。EDTA 和 CA 联合施加时, 紫花苜蓿细胞膜通透性与对照组相比均有不同程度的增大, 相对电导率最大值在 5.0/10.0 处为 90.8%, 比对照组增加了 206.3%, 此时紫花苜蓿细胞膜破坏严重。EDTA 添加浓度为 2.5 mmol·kg<sup>-1</sup> 时

若与 CA 交互作用于紫花苜蓿, 可降低紫花苜蓿的相对电导率, 但若 EDTA 的施加浓度增大至 5.0 或者 10.0 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 与 CA 交互使用二者则协同对紫花苜蓿细胞壁产生毒害作用。

## 2.8 EDTA/CA 对 Ni 污染土壤酶活性的影响

土壤酶的活性在一定程度上可以反映土壤中重金属的污染情况, EDTA 和 CA 对土壤酶的影响结果如图 5 所示。图 5 中纵坐标正值表示激活率, 负值则表示抑制率。激活(抑制)率=(实验组酶活性-对照组酶活性)/对照组酶活性×100%, 此数值大于零表现为激活, 小于零则为抑制。CA 单独作用时, 对蔗糖酶的效果表现为激活。蔗糖酶激活率  $Y$  (%) 与 CA 添加量  $X$  (mmol·kg<sup>-1</sup>) 的关系式为:  $Y = -0.9849X + 16.223$ , 相关系数为 -0.992。EDTA 单独作用于蔗糖酶时, 除在 2.5/0.0 处理组表现为激活作用, 其余浓度表现为抑制作用。添加 CA 或 EDTA 对过氧化氢酶均有不同程度的抑制作用。经分析过氧化氢酶的抑制率与土壤中水溶态 Ni 含量显著相关, Pearson 相关性为 0.643 ( $P < 0.01$ )。进一步说明 EDTA 和 CA 是通过活化土壤中重金属 Ni 向其水溶态转化, 增大了重金属 Ni 的毒性, 进而抑制过氧化氢酶的活性的; 而蔗糖酶活性与土壤中各形态的 Ni 量没有明显的相关性, 是各种因素共同作用的结果。

## 3 结论

通过紫花苜蓿盆栽实验, 研究了螯合剂 EDTA、CA 单独及联合施用对供试土壤中 Ni 的形态分布、紫花苜蓿多个生理指标以及土壤酶活性的影响, 结果表明:

(1) EDTA/CA 的联合施加能显著活化土壤中 Ni, 可以显著提高有效态, 特别是水溶态 Ni 的含量。供试土壤中施加 EDTA/CA 浓度为 2.5/5.0 mmol·kg<sup>-1</sup> 时, 紫花苜蓿转运系数最大。当 EDTA 或 CA 单独作用于土壤中 Ni 时, EDTA 的活化效果优于 CA。

(2) 实验中紫花苜蓿中叶绿素含量及其相对电导率与土壤中水溶态 Ni 含量均显著相关。当 EDTA 单独作用时, 紫花苜蓿的相对电导率  $Y$  与对应条件下的水溶态 Ni 含量  $X$  的线性关系式为:  $Y = -7.8236X + 182.2$ , 相关系数  $r = 0.9998$ 。

(3) 供试土壤中施加不同配比的 EDTA/CA 对土壤过氧化氢酶表现为抑制作用。当 CA 单独作用于土壤蔗糖酶时, 其激活率  $Y$  与土壤中 CA 的添加量  $X$  有显著相关性 ( $P < 0.01$ )。二者满足:  $Y = -0.9849X + 16.223$ , 相关系数为 -0.992。

(4) 在被 Ni 污染的土壤中将 CA 与 EDTA 进

行合适的配比后施加, 既可以减少螯合剂的用量, 降低 EDTA 的毒副作用又可以较好地提高紫花苜蓿富集土壤中重金属 Ni 的效果。

## 参考文献:

- [1] LI Z, MA Z, VAN DER KUIJP T J, et al. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment[J]. *Sci Total Environ*, 2014, 468/469: 843-853.
- [2] 姚艳娟, 常江. 和县有机蔬菜基地土壤重金属监测与评价[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(3): 427-433.
- [3] 张蓉, 谢贻兵, 花日茂, 等. 合肥及周边城市污水污泥重金属含量和农用潜在生态风险评价[J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(2): 280-285.
- [4] ZHANG T, WEI H, YANG X H, et al. Influence of the selective EDTA derivative phenyldiaminetetraacetic acid on the speciation and extraction of heavy metals from a contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2014, 109: 1-6.
- [5] 钱春香, 王明明, 许燕波. 土壤重金属污染现状及微生物修复技术研究进展[J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2013, 43(3): 669-674.
- [6] 丁竹红, 胡忻, 张宇峰. 螯合剂对小麦幼苗吸收金属以及土壤金属形态的效应[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(1): 97-101.
- [7] 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.
- [8] MEERS E, LESAGE E, LAMSAL S, et al. Enhanced phytoextraction: I. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal mobility in a calcareous soil[J]. *Int J Phytoremediation*, 2005, 7(2): 129-142.
- [9] HADI F, BANO A, FULLER M P. The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zeamays* L.): the role of plant growth regulators (GA 3 and IAA) and EDTA alone and in combinations[J]. *Chemosphere*, 2010, 80(4): 457-462.
- [10] 常夏源, 童仁军, 司友斌, 等. 某再生铅工业园区周边土壤中铅和镉的生物可给性及其对人体的健康风险评估[J]. *安徽农业大学学报*, 2014, 41(6): 1055-1060.
- [11] 金前, 贾会娟, 李雪玲, 等. 二甲戊灵胁迫下的土壤酶活性变化[J]. *新疆农业科学*, 2015, 52(5): 889-894.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [13] TESSIER A, CAMPBELL P G C, BISSON M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals[J]. *Anal Chem*, 1979, 51(7): 844-851.
- [14] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [15] 关松荫. 土壤酶活性测定: 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [16] 李得孝, 员海燕, 郭月霞, 等. 混合液浸提法测定玉米叶绿素含量的研究[J]. *玉米科学*, 2006, 14(1): 117-119.
- [17] 蔡庆生. 植物生理学实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2013.
- [18] 杨猛, 魏玲, 庄文锋, 等. 低温胁迫对玉米幼苗电导率和叶绿素荧光参数的影响[J]. *玉米科学*, 2012, 20(1): 90-94.
- [19] 黎诗宏, 梁斌, 李忠惠. 螯合剂对龙葵修复成都平原 Cd 污染土壤的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(10): 1917-1922.
- [20] 王晓维, 黄国勤, 徐健程, 等. 铜胁迫和间作对玉米抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(10): 1890-1896.