

董星治,李立新,柳参奎,等.嗜碳酸盐新型微藻 JB6 液体肥对水稻的促生效果[J].黑龙江农业科学,2022(8):36-41.

嗜碳酸盐新型微藻 JB6 液体肥对水稻的促生效果

董星治¹,李立新¹,柳参奎²,卜媛媛¹

(1. 东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150006; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院,浙江 临安 311300)

摘要:为探究嗜碳酸盐新型微藻 *Chlorella* sp. JB6 缓解盐碱环境对水稻生长胁迫的能力,以水稻长白 9 号为材料,采用耐盐微藻 JB6 生物肥在温室环境下喷灌土壤,研究不同剂量藻肥对盐碱胁迫下禾本科水稻生长情况的影响。结果表明:水培试验中,处理液 pH 为 8.5 时对水稻幼苗生长有明显的抑制作用;土培试验中,耐盐微藻 JB6 对盐胁迫下的水稻生长有一定的缓解作用,不同浓度的藻肥缓解效果不同。其中藻肥浓度为 100% 处理下,水稻的株高、叶片色泽都显著高于对照;藻肥浓度为 50% 处理下,对盐胁迫下水稻生长的缓解效果最佳。耐盐微藻 JB6 对水稻根际土壤 pH 也有一定的改善,藻肥浓度为 50% 时效果最显著。由此可见,嗜碳酸盐新型微藻 JB6 具有缓解盐胁迫的能力,50% 浓度藻肥缓解水稻盐碱胁迫效果最佳。

关键词:水稻;嗜碳酸盐新型微藻;盐碱胁迫

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



水稻为禾本科稻属植物,是最主要的农作物之一^[1]。近年来为了提高盐碱地利用效率,种植水稻被作为植物改良盐碱土的有效措施,盐碱地种植水稻不但可以使土壤表层盐分逐渐下沉,而且水稻的根系还可以吸收土壤中的盐分并分泌有机酸,改善土壤板结^[2]。但水稻为盐敏感作物,盐胁迫会抑制水稻叶片生长,大大减少分蘖和地上部干重,还会影响体内各种酶的功能^[3]。同时,在盐胁迫下水稻还会产生某些生理生化反应,包括膨压丧失,代谢改变和质外体酸化失效,最终会导致产量降低。前人研究表明,土壤盐度较高时,播种后 45 d 水稻的地上部干重与对照相比减少了 61%,植株分蘖数减少了 29%。持续 14 d 的盐胁迫可使水稻幼苗生物量降低 26%,成熟期总生物量约降低 31%^[4]。因此,提高水稻耐盐碱特性至关重要。近年来,国内各育种机构成功选育了一系列优良的耐盐水稻品种,如辽盐 2 号、盐丰 47、长白 6 号和津源 101 等。除培育耐盐品种外,微藻生物肥也作为促进盐碱地水稻生长的有效措施被证实并应用。研究表明,在水稻田接种固氮蓝藻可提供氮肥促进水稻健壮生长,提高穗粒数和结实

率,使稻谷增产 10%~30%^[5]。

我国东北松嫩平原的盐碱化土壤中的碳酸盐主要以 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 为主,由于碳酸盐的水解作用使土壤的 pH 较高,俗称苏打盐碱土^[6]。碳酸盐逆境对植物生长的抑制作用是所有盐胁迫中最严重的,除对植物存在盐离子胁迫外,还会升高土壤 pH,对植物造成碱胁迫。碱胁迫会导致植物细胞中的 K^+ 浓度下降,进而影响植物细胞渗透压平衡,严重影响植物生长发育^[7],因此只有极少数植物可以在这样的土壤环境中生存。除一些常见的耐盐碱植物如碱茅、羊草、蒙古柳等^[8],盐碱土壤中还存在着大量的微藻,其生存形式对盐碱土壤微生物群落稳定性起到重要作用。本课题组前期从我国东北极端盐碱土中分离出 20 种微藻,并用不同浓度的 NaCl 和 NaHCO_3 进行简单的抗逆特性分析^[9]。结果表明,在一定浓度的碳酸盐逆境下微藻 JB6 的生长状况、干重和叶绿素含量都有很大提高^[10],通过后续研究结果证实微藻 JB6 为嗜碳酸盐微藻,其可能是以 NaHCO_3 作为营养来源,使其叶绿素含量升高,光合速率提高,促进其快速生长^[4]。但目前对微藻 JB6 对盐碱环境下水稻的促生效果鲜见报道。

微藻是界于原核生物与真核生物之间的一类低等自养放氧植物^[11]。其生长速度快,具有极强的环境适应力,且分布范围广,种类众多,因此在大多数环境中无处不在^[12]。微藻由于其丰富的营养物质含量,被广泛应用于生物能源、废水处

收稿日期:2022-05-26

基金项目:教育部创新团队支持项目子项目(IRT17R99)。

第一作者:董星治(1999—),女,硕士研究生,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:15124535021@163.com。

通信作者:卜媛媛(1983—),女,博士,博导,副教授,从事植物逆境生物学研究。E-mail:yuanyuanbu@nefu.edu.cn。

理、食品工业、化妆医药等众多领域。其中,在微藻改善盐碱环境方面,微藻细胞分泌的胞外多糖粘液层,对 Na^+ 有强吸附能力,还能将土壤颗粒聚积在一起,防治水风侵蚀^[13]。还可以为异养微生物的生长繁殖提供碳源和氮源。微藻对氮磷的吸附能力很强,如蓝藻具有从空气中固氮的能力^[14]。利用微藻改良盐碱地不仅投入低,而且能优化土壤结构,使土壤性质从根本上得到改善^[15]。

本研究探究了微藻 JB6 对碳酸盐逆境的耐受程度,并通过施用不同浓度的微藻液体肥,探究微藻 JB6 对盐碱胁迫下水稻生长情况的影响,旨在为提高水稻在盐碱环境中的抗逆性和微藻生物治碱提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用土壤采集于大庆市肇源县超等乡共和村($45^\circ39'42''\text{N}, 124^\circ34'14''\text{E}$)。

供试水稻品种为长白 9 号,由中国科学院东北地理与农业生态研究所提供。

微藻 *Chlorella* sp. JB6 从松嫩平原安达碱斑地区采集并分离获得,于 Bold's basal medium (BBM) 液体培养基, $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摆床培养。温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 光/暗光周期 $16 \text{ h}:8 \text{ h}$, 光强 2000 lx 培养。

普通微藻 *Chlorella vulgaris* FACHB-1072 从中国科学院水生生物研究所购买。

1.2 方法

1.2.1 微藻碳酸氢钠处理 将 1 mL 的微藻 JB6 细胞(初始细胞浓度 $1 \times 10^8 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{OD}_{750 \text{ nm}} = 0.8$)分别在 0 和 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠处理的 30 mL BBM 液体培养基中培养 15 d , 分别在不同浓度碳酸氢钠处理的第 0 天、第 3 天、第 10 天及第 15 天观察并记录藻细胞培养基颜色变化。

1.2.2 微藻液体肥制备 将微藻 JB6 培养至生长对数期(7 d), 此时藻细胞培养液中包括水、残留培养基养分、微藻分泌物、尸体和微藻活细胞等, 将整个藻细胞培养液作为微藻液体肥。设置不同藻肥浓度:100% 藻肥处理(未稀释对数期微藻藻液)、50% 藻肥处理(50% 未稀释对数期微藻藻液+50% 水)。

1.2.3 盐碱土浸提液制备 将从大庆肇源县实验基地采集到的土壤阴干后过 $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ 筛并充分混匀。混匀后取 2 L 盐碱土倒入 4 L 自来水, 充分搅拌, 放置 12 h (期间充分搅拌 3 次), 最后用

滤纸过滤除去杂质, 得到试验用盐碱土浸提液^[16]。

1.2.4 水稻种子消毒及催芽 用干净的镊子挑选颗粒饱满, 颜色金黄的水稻种子进行试验。先用 70% 酒精摇动清洗 40 s , 用无菌水漂洗 3 次以上, 尽可能洗去残留酒精。用 5% 次氯酸钠消毒 20 min (可置于转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的小型摇床上, 最长消毒时间不超过 20 min), 倒掉次氯酸钠溶液, 用无菌水漂洗。再重复此步骤一次, 无菌水漂洗至无刺鼻气味方止。将清洗干净的种子播种在培养皿上, 内铺两层无菌水完全湿润的滤纸, 每天向培养皿内添加少量的无菌水, 保证水稻种子处于最适萌发温度 30°C , 湿度 78% , 光照 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光强 3000 lx 。

1.2.5 水稻水培试验 将消毒并催芽后的水稻幼芽移至 96 孔板自来水中, 经 28°C 培养 3 d , 待大多数水稻幼芽生长至 $5 \sim 7 \text{ cm}$ 时, 挑选长势均匀、无污染的水稻幼芽, 置于 pH 为 8.5 的盐碱土浸提液中。

1.2.6 水稻土培试验 将消毒并催芽后的水稻幼芽移至 96 孔板自来水中, 经 28°C 培养 $5 \sim 7 \text{ d}$, 水稻幼苗生长至三叶期后将其移栽至 pH 8.5 的盐碱土中。共设置 4 个处理: 盐碱土 + 100% 藻肥处理、盐碱土 + 50% 藻肥处理、盐碱土 + BBM 培养基处理、盐碱土 + 自来水处理, 于水稻生长周期内采用喷灌的方式施加各组处理液, 灌溉量为每株 $20 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.7 数据分析 采用 Excel 2021 对所有数据进行统计整理及作图, 应用 SPSS 26.0 进行方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 碳酸盐逆境对微藻 JB6 和 FACHB-1072 生长的影响

通过微藻培养液颜色的深浅变化可以直观地看出微藻的生长情况。如图 1 所示, 在正常 BBM 培养基($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$)中的微藻 FACHB-1072 和 JB6 均为较均匀的绿色, 随着培养时间的增加, 培养液颜色逐渐加深, 在第 15 天时颜色最深; 经 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 处理后, 微藻 JB6 的颜色随着时间变化显著加深, 而 FACHB-1072 则从第 3 天时开始褪绿, 至培养第 10 天时, FACHB-1072 已经完全褪绿, 培养液呈白色。由此可以看出, 碳酸盐逆境下微藻 JB6 可以正常生长, 而 FACHB-1072 的生长则受到明显抑制。

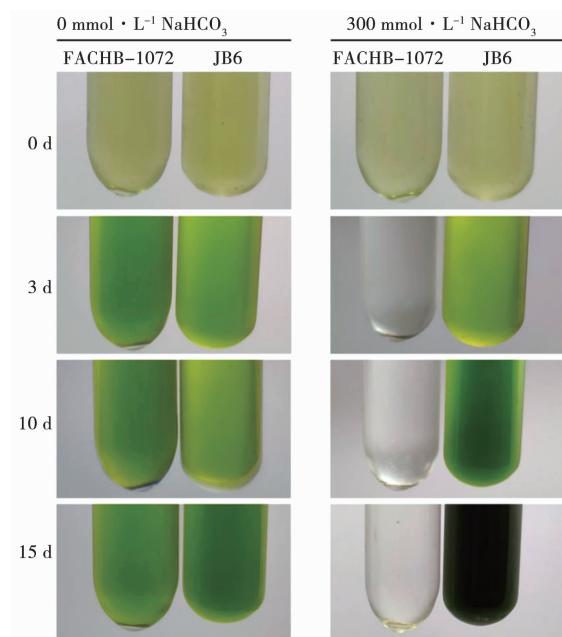


图 1 碳酸氢钠对 FACHB-1072 和 JB6 生长情况的影响

2.2 盐碱胁迫对水稻幼苗生长的影响

由图 2 可知,对照(自来水)培养 7 d 后的水稻幼苗,可以正常生长;而盐碱土浸提液处理 7 d 后的水稻幼苗,与对照相比,根茎伸长明显受到抑制,叶片失绿。由此可知,在 pH8.5 浸提液条件下会严重抑制水稻幼苗的生长。



图 2 盐碱胁迫对水稻幼苗生长的影响

2.3 微藻 JB6 液体肥对盐碱环境下水稻生长的影响

由图 3 可知,盐碱土处理中的水稻从试验第 10 天开始生长受到抑制,地上部分长度几乎不再变化,施加不同浓度藻肥可缓解盐碱胁迫对水稻生长的抑制作用。不同浓度的微藻 JB6 液体肥对水稻生长情况的影响不同,施用浓度为 50% 藻肥时的水稻生长情况要显著优于施用 100% 藻肥处理。在处理达到 20 d 时,施用 50% 藻肥处理水稻的平均株高最高,为 24 cm。

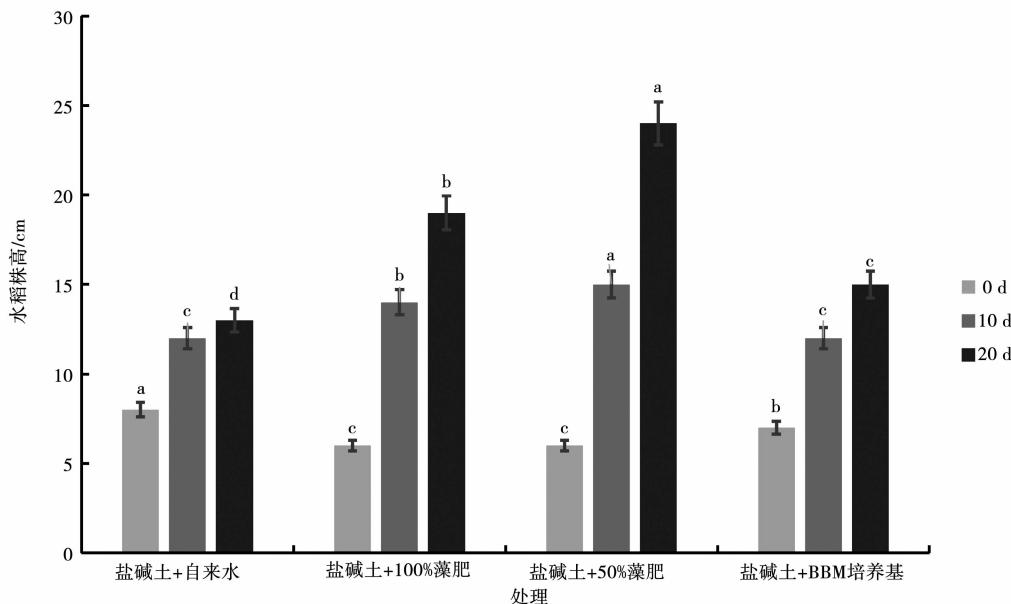


图 3 不同浓度藻肥对盐碱土培养水稻株高的影响

注:不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下同。

由图 4 可知, 施加 BBM 培养基的水稻株高变化与对照组相比变化较明显, 施加不同浓度藻肥处理的水稻株高变化与对照组相比变化较明显, 且施加藻肥的水稻与对照组相比叶片生长更加旺盛。

2.4 微藻 JB6 液体肥对盐碱环境下水稻根际土壤 pH 的影响

由图 5 可知, 试验第 20 天时, 施加 BBM 培养

基的水稻根际土壤 pH 与对照(盐碱土+自来水)相比差异显著($P < 0.05$), 施加不同浓度藻肥的水稻根际土壤 pH 与对照相比差异显著($P < 0.05$)。其中, 施用 100% 藻肥的处理 pH 由 8.50 降为 7.39, 施用 50% 藻肥的处理 pH 由 8.50 降低为 7.17。

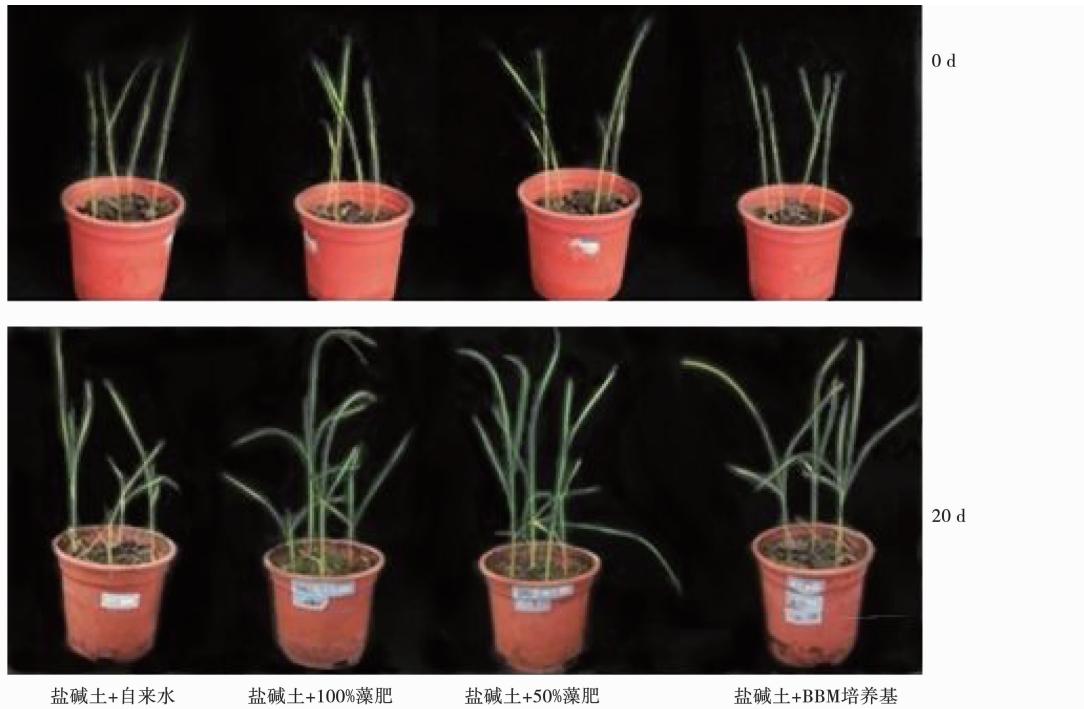


图 4 不同浓度藻肥处理对盐碱胁迫下盆栽水稻生长的影响随时间变化生长情况

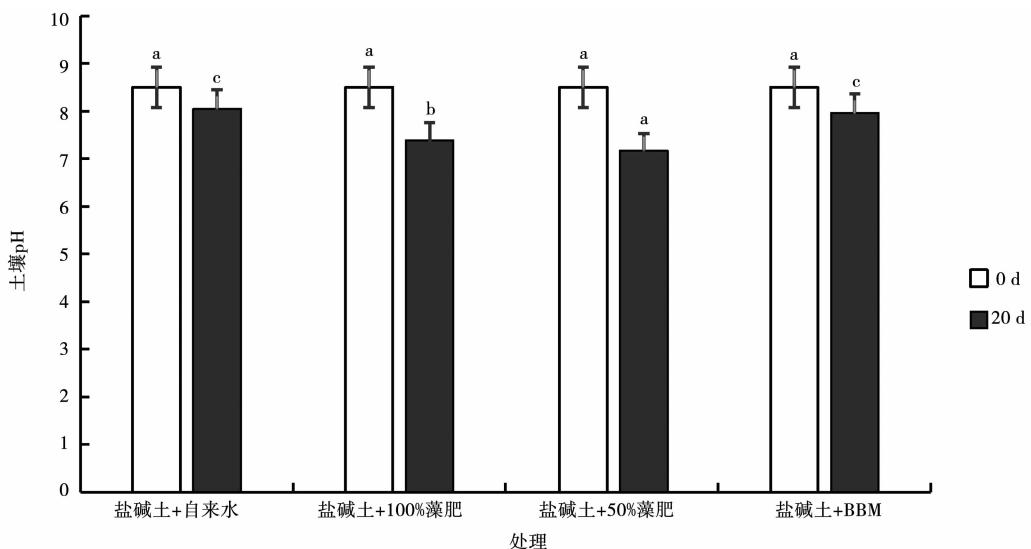


图 5 不同浓度藻肥对盐碱环境下水稻根际土壤 pH 的影响

3 讨论

我国土壤盐渍化现象日趋加重,而水稻属于不耐盐碱作物,土地盐渍化加重必将成为影响我国水稻生长和粮食产出的一大阻碍。前人研究表明,在授粉和受精阶段,土壤盐害会导致水稻不育,降低花粉活力,还会延迟水稻抽穗,这些都对产量性状产生了不良影响^[17]。粒数和千粒重是评估谷物产量的关键参数。在水稻生殖生长期,盐胁迫可以降低花粉活力、穗数、粒数、粒重,造成产量显著下降^[18]。目前改良松嫩平原盐碱地的措施主要有水利措施、物理与耕作农艺措施、化学措施、生物措施几大类。于其他措施相比,生物措施具有经济、高效和可持续等优点^[19]。其中的微生物肥治理盐碱地,主要是通过微生物肥中的有益微生物在其生命活动中不断释放出可供植物利用的迟效态氮磷钾,能有效改善盐碱地土壤的理化性质,提高土壤肥力,改善土壤的生态环境^[20],在通过植被恢复改良盐碱地的方法中起着重要作用。藻类肥料作为微生物肥料的一种,近年来被大量关注。微藻液体肥之所以可以作为改良盐碱土壤的微生物。一方面,微藻可以增强植株对营养物质的吸收和利用。另一方面,微藻可以促进作物生长、提高抗逆能力及产量与品质。前人研究表明,固氮蓝藻能够提高土壤中有机质和土壤氮含量,使土壤中 Na^+ 交换率降低了 86.28%,土壤 pH 下降到 8.0 以下,改变了根际微生物构成,促进了植物生长,这说明固氮蓝藻对生态修复盐碱化土壤具有一定的作用。蓝藻作为能在极端盐碱环境生存的耐盐耐干旱微藻,也被证实可通过提高土壤中碳、氮、磷、钾、镁阳离子交换能力和土壤持水量来修复盐碱地^[21]。多个研究表明,蓝藻液体肥具有促进植物生长的作用。蓝藻液体肥在水稻种植中,能显著促进水稻生长,提高产量和稻米品质,其蛋白质含量比化肥种植的水稻高出 55.8%,直链纤维素和胶稠度分别高出 9.3% 和 7.9%^[22];蓝藻与绿藻混合制备的微藻液体肥在桃树种植中,可显著提高平均单果重,增加可溶性固形物含量,大幅提升产品品质^[23]。

本课题组前期试验表明,微藻 JB6 作为一种从极端碳酸盐环境中分离出的藻种,在一定浓度的碳酸盐逆境下其生长状况、干重和叶绿素含量都有很大的提高,进而能够提高其光合速率,促进

其快速生长。同时,微藻 JB6 体内的 ROS 清除酶活性升高^[24]。本研究表明,耐碳酸盐逆境微藻 JB6 制成的微藻液体肥可显著缓解盐碱胁迫对水稻生长的影响,盐碱土处理施用 50% 藻肥时缓解效果最为显著,水稻株高为 24 cm,植株色泽、株高、根长等方面均与对照组有明显差异。这可能是由于微藻 JB6 体内 ROS 清除酶活性升高,分泌胞外多糖降低环境 pH,提高了土壤中固氮酶活性,具体情况有待进一步研究。同时,微藻液体肥还对水稻根际土壤 pH 有一定的影响,其中施用 50% 藻肥的土壤 pH 降低最为显著,pH 由 8.5 降至 7.17。综上所述,微藻 JB6 制成的液体肥具有缓解盐碱胁迫和改善盐碱土 pH 的作用,可将其作为生物治盐碱藻种进一步研究应用。

4 结论

试验结果表明,微藻 JB6 对碳酸盐逆境表现出高度耐受性;pH 为 8.5 的盐碱土浸提液对水稻生长有明显的抑制作用,通过施加藻肥后盐碱环境中水稻株高随着不断提高,发现不同浓度的微藻 JB6 藻肥可以缓解盐碱胁迫对水稻生长的抑制,其中施用 50% 藻肥时缓解效果较好。同时,藻肥对水稻根际土壤 pH 也有一定的降低作用,施用 50% 藻肥时对土壤 pH 的改善情况较好。因此,微藻 JB6 具有作为微藻肥料改善盐碱土壤的能力,50% 浓度藻肥处理改善效果最佳。

参考文献:

- [1] 王昊.耐盐碱水稻品种筛选及遗传分析[D].哈尔滨:东北林业大学,2019.
- [2] TANAKA S, IKEDA K, MIYASAKA H. Enhanced tolerance against salt-stress and freezing-stress of *Escherichia coli* cells expressing algal *bcl1* gene[J]. Current Microbiology, 2001, 42: 173-177.
- [3] RAO A R, DAYANANDA C, SARADA R, et al. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 560-564.
- [4] PIWPUAN N, ZHAI X, BRIX H. Nitrogen nutrition of *Cyperus laevigatus* and *Phormium tenax*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, nitrate reductase activity and N uptake kinetics[J]. Aquatic Botany, 2013, 106: 42-51.
- [5] MAAS E V, GRIEVE C M. Sodium-induced calcium deficiency insalt-stressed corn[J]. Plant Cell and Environment, 2010, 10(7): 559-564.
- [6] ASKARI H, EDQVIST J, HAJHEIDARI M, et al. Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves

- [J]. Proteomics, 2006, 6(8): 2542-2554.
- [7] COSTELLOE J F, POWLING J, REID J R W, et al. Algal diversity and assemblages in arid zone rivers of the Lake Eyre Basin, Australia[J]. River Research and Applications, 2005, 21: 337-349.
- [8] MIYASAKA H, OHNISHI Y, AKANO T, et al. Excretion of glycerol by the marine *Chlamydomonas* sp. strain W-80 in high CO₂ cultures[J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1998, 85: 122-124.
- [9] 王娟. 东北苏打土壤藻类资源筛选与抗逆性分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [10] 乔坤. 极端耐 NaHCO₃ 微藻的鉴定及 ACBP 抗逆机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- [11] ENGELSBERGER W R, SCHULZE W X. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings[J]. Plant Journal, 2012, 69: 978-995.
- [12] FORDE B G. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: An update[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 21: 30-36.
- [13] HACHIYA T, SAKAKIBARA H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68: 2501-2512.
- [14] GARCIA M C, LAMATTIA L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells[J]. Plant Physiology, 2002, 128: 790-792.
- [15] GLASS A D, BRITTO D T, KAISER B N, et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 855-864.
- [16] 袁辉, 李萍芳, 陈勇, 等. 玉竹根际土壤浸提液对蔬菜种子萌发与生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(23): 58-61, 78.
- [17] AZEDO-SILVA J J, OSORIO F F, CORREIA M J. Effects of soil drying and subsequent re-watering on the activity of nitrate reductase in root and leaves of *Helianthus annuus* [J]. Functional Plant Biology, 2004, 31: 611-621.
- [18] 王洋, 张瑞, 刘永昊, 等. 水稻对盐胁迫的响应及耐盐机理研究进展[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(2): 105-117.
- [19] 张海欧, 孙小梅, 王迎国. 盐碱地的生态化治理研究进展 [J]. 农技服务, 2022, 39(4): 88-91.
- [20] KANAMORI T, KANOU N, ATOMI H, et al. Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2532-2539.
- [21] 柳参奎. 中国东北盐碱地植物原色图鉴[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2006.
- [22] BHARDWAJ K K R. Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkali soils[J]. Plant and Soil, 1975, 43: 377-385.
- [23] 王荣敏. 施用微藻肥液对不同桃品种果实品质的影响[J]. 果树实用技术与信息, 2019(2): 17-19.
- [24] 王敏. 碳酸盐逆境下微藻 *Nannochloris* sp. JB17 的生长、油脂积累及转录组动力学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.

Effects of A New Carbonate-Philic Microalgae *Chlorella* sp. JB6 Liquid Fertilizer on Rice Growth

DONG Xing-ye¹, LI Li-xin¹, LIU Shen-kui², BU Yuan-yuan¹

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150006, China; 2. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract: In order to explore the ability of a new carbonate-philic microalgae *Chlorella* sp. JB6 to alleviate the growth of rice in soils with extremely high salt and alkaline. *Oryza sativa* L. Changbai 9 was used as experimental materials, we analyzed the effect of salt-tolerant microalgae JB6 biofertilizer on the growth of salt-stressed rice by sprinkler irrigation. The results showed that in the hydroponic experiment, when the pH of the treatment solution was 8.5, the growth of rice seedlings was significantly inhibited. In soil culture experiment, salt-tolerant microalgae JB6 had a certain mitigation effect on rice growth under salt stress, and different concentrations of algal fertilizer had different mitigation effects. Under the treatment of 100% algal fertilizer, the growth of rice was alleviated, and the plant height and leaf color were significantly higher than those of the control group. Algae fertilizer concentration of 50% treatment, the best mitigation effect on rice growth under salt stress. Salt-tolerant microalgae JB6 also improved the pH of rice rhizosphere soil, and the effect was the most obvious when the concentration of algae fertilizer was 50%. Thus, the addition of *Chlorella* sp. JB6 biofertilizer could effectively alleviate the inhibition of salt stress on plants, and 50% algae fertilizer had the best effect on alleviating salt alkali stress in rice.

Keywords: rice; microalgae; saline-alkali stress