



研究报告

2 株草螺菌的鉴定及其对煤矸石胁迫下香根草的促生作用

王宁^{1,2} 方青^{1,2} 吴盾³ 孙庆业^{*1,2}

1 安徽大学资源与环境工程学院 安徽 合肥 230601

2 安徽省矿山生态修复工程实验室 安徽 合肥 230601

3 安徽省煤炭地质局勘探研究所 安徽 合肥 230088

摘要:【背景】植物-微生物联合修复技术在减轻环境胁迫作用、增强植物抗性、改善矿区景观等方面发挥重要作用,其中根际促生菌可与植物相互作用,促进植物生长,增强植物对非生物胁迫的耐受性。【目的】鉴定铜尾矿中分离得到的2株根际细菌,研究其对植物生长的促生特性,测定2株菌的接种对于煤矸石胁迫下香根草的影响。【方法】对铜尾矿中分离得到的2株菌进行16S rRNA基因序列鉴定和扫描电子显微镜观察,对菌株的促生特性进行测定,并将其分别接种于覆土5 cm的煤矸石和掺土10%的煤矸石中生长的香根草根际,测定2个月后香根草的理化指标和生理学指标。【结果】菌株P5-11和P5-19经鉴定均为草螺菌(*Herbaspirillum*),2株菌均具有固氮、溶磷、产吲哚乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)和产铁载体的特性,其中P5-19的产吲哚乙酸能力约为P5-11的2倍,具有较好的促生能力;2株菌均能提高香根草的株高、生物量、氮积累量和抗氧化酶活性,并降低丙二醛积累量。【结论】2株草螺菌均具有良好的促生特性,能够促进煤矸石胁迫下香根草的生长发育,这不仅为促生菌肥的研制提供了优良菌种,也为香根草在矿区生态恢复中的应用提供了参考价值。

关键词: 草螺菌属, 促生特性, 香根草, 煤矸石, 生物修复

Identification of two *Herbaspirillum* strains and its growth-promoting effect on *Vetiveria zizanioides* L. under coal gangue stress

WANG Ning^{1,2} FANG Qing^{1,2} WU Dun³ SUN Qingye^{*1,2}

1 School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China

2 Anhui Provincial Engineering Laboratory for Mine Ecological Remediation, Hefei, Anhui 230601, China

3 Exploration Research Institute, Anhui Provincial Bureau of Coal Geology, Hefei, Anhui 230088, China

Abstract: [Background] Combined plant-microbial remediation technology plays an important role in reducing environmental stress, enhancing plant resistance and improving mining landscape. Rhizosphere microorganisms can interact with plants which can promote plant growth and enhance the tolerance of

Foundation item: Key Research and Development Programs of Anhui Province (201904a07020071)

*Corresponding author: Tel: 86-551-63861882; E-mail: sunqingye@ahu.edu.cn

Received: 25-11-2020; Accepted: 23-01-2021; Published online: 25-03-2021

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划(201904a07020071)

*通信作者: Tel: 0551-63861882; E-mail: sunqingye@ahu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-25; 接受日期: 2021-01-23; 网络首发日期: 2021-03-25

plant on abiotic stress. **[Objective]** To identify two strains of rhizosphere bacteria isolated from copper tailings, in order to study the growth-promoting properties of the two strains and determine the influence of the two strains on *V. zizanioides* grown on coal gangue. **[Methods]** 16S rRNA gene sequence identification and scanning electron microscope observation were performed on P5-11 and P5-19, the growth-promoting properties of the strains were measured. The strains were inoculated into *V. zizanioides* grown in coal gangue covered with 5 cm soil and coal gangue mixed with 10% soil. After two months, the physical and chemical indexes and physiological indexes of *V. zizanioides* were measured. **[Results]** P5-11 and P5-19 were *Herbaspirillum*, which had the functions of nitrogen fixation, phosphate-dissolving, produced indole-3-acetic acid (IAA) and siderophore. Among them, the IAA production capacity of P5-19 was about twice that of P5-11, and it had better growth-promoting properties. *Herbaspirillum* inoculation could improve plant height, biomass, total nitrogen accumulation and the antioxidant enzyme activity, and reduce the malondialdehyde accumulation. **[Conclusion]** The two strains of *Herbaspirillum* had good growth-promoting properties, which could promote the growth of *V. zizanioides* under coal gangue stress, which not only provided excellent strains for the preparation of microbial fertilizer, but also provided reference value for the application of *V. zizanioides* in the ecological restoration of mining areas.

Keywords: *Herbaspirillum*, growth-promoting properties, *Vetiveria zizanioides* L., coal gangue, bioremediation

煤矸石是采煤过程中产生的固体矿业废弃物,是煤炭工业的主要污染源之一^[1]。对煤矸石山进行复合基质-植物-细菌联合生态修复可以减少矿区固体废弃物危害,改善矿区景观^[2-3],已成为目前煤矿区生态恢复研究的重要内容之一。煤矸石的保水保肥能力弱,而且缺少植物生长所需的 N、P 等养分,煤矸石中的 Cu、Fe、Zn、Pb 等重金属的释放也会对周边土壤造成污染,不利于植物的生长^[4-5]。香根草(*Vetiveria zizanioides* L.)属多年生粗壮草本植物,生长快,管理简单,能适应各种土壤环境,具有固土、净化、截污等功能^[6-7],其应用涵盖了生态学、环境科学、水土保持学、工程学等学科。徐德聪等的研究表明,香根草的种植可改善矿业废弃物基质中的养分、微生物的组成及土壤酶的活性等^[8]。利用香根草改良废弃地能够获得很大的生态效益、经济效益和社会效益,被作为先锋植物而广泛应用于煤矿山废弃地的生态修复中。

大量研究表明,利用根际细菌与植物的相互作用不仅能促进植物生长发育^[9-11],还可以在在一定程度上增强植物对非生物胁迫的耐受性^[12-13]。

草螺菌属(*Herbaspirillum*)是一类广宿主内生固氮菌,定殖于植物体内的草螺菌不仅对宿主植物没有损害作用,而且定殖在玉米(*Zea mays* L.)、小麦(*Triticum aestivum*)、高粱(*Sorghum bicolor*)等一些禾本科作物体内还可提高作物的产量和氮含量^[14-16]。草螺菌通过与寄主植物之间复杂的分子交流,促进植物对养分的吸收^[17]。徐萧和占桂婷还发现,定殖于茶树(*Camellia sinensis*)体内的草螺菌也有助于茶树的栽培生长^[18-19]。

本文以筛选的 2 株草螺菌为对象研究其促生特性,并测定了其接种对于煤矸石胁迫下香根草的生长及抗逆性的影响,以期草螺菌用作生物菌剂促进煤矸石山上人工植物群落的构建提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

Bacterial DNA Kit, 北京康润诚业生物科技有限公司; 吲哚乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA), 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 去铁胺(Desferrioxamine B, DFOB), 中国药品生物制品检定所; 常规化学试剂均为国产分析纯, 国药集团化学试剂有限

公司。高速冷冻离心机,长沙湘智离心机仪器有限公司;恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;扫描电子显微镜, HITACHI 公司。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; MM 培养基(g/L): 磷酸氢二钠 12.8, 磷酸二氢钾 3.0, 氯化钠 0.5, 氯化铵 1.0, 葡萄糖 5.0, 1 mol/L 硫酸镁 2 mL, 1 mol/L 氯化钙 100 μ L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; MM9 培养基(g/L)^[20]: 磷酸二氢钾 3.0, 氯化钠 5.0, 氯化铵 10.0, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; T 培养基(g/L): 氯化钠 5.8, 氯化钾 3.7, 氯化钙 0.113, 六水合氯化镁 0.1, 氯化铵 1.1, 磷酸二氢钾 0.272, 硫酸钠 0.142, Tris (Trizma Base) 12.1, 葡萄糖 4.0, 烟酸 0.005, 浓盐酸调 pH 至 7.4, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; 无氮培养基 (Ashby) (g/L): 葡萄糖 10.0, 磷酸二氢钾 0.2, 硫酸钾 0.2, 氯化钠 0.2, 碳酸钙 5.0, 七水合硫酸镁 0.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; PKO 培养基(g/L): 磷酸钙 5.0, 蔗糖 10.0, 硫酸铵 0.5, 氯化钠 0.2, 氯化钾 0.3, 七水合硫酸镁 0.1, 硫酸锰 0.004, 硫酸亚铁 0.002, 酵母膏 0.5, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 菌株的鉴定

1.2.1 16S rRNA 基因测序

用 Bacterial DNA Kit 快速提取 2 株菌的 DNA, 采用 16S rRNA 基因通用引物对 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): $2 \times Taq$ PCR Master Mix 12.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 27F 和 1492R 引物 (100 μ mol/L) 各 0.1 μ L, ddH₂O 11.3 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 7 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。对 PCR 扩增产物进行回收纯化和克隆后, 送北京六合华大基因科技有限公司测序, 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库获取基因序列登录号。

在 EzBioCloud 数据库中进行序列比对^[21], 获得相似性较高的菌株序列, 并使用 MEGA 7.0 软件进行多序列比对, 并采用邻接法 (Neighbor-Joining Method) 进行聚类分析, 构建系统进化树^[22]。

1.2.2 扫描电子显微镜观察

2 株菌在 LB 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6, 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 2.5% 戊二醛固定液和磷酸缓冲液反复固定 3 次, 设置不同浓度乙醇梯度进行洗涤脱水, 再用乙酸异戊酯置换 2 次, 经 10 000 r/min 离心 10 min 后, 将离心浓缩后的菌液滴到硅片上, 置于冷冻干燥机上进行冷冻干燥, 最后用硅片碳导电胶带将其粘在载物台上, 离子溅射金后, 对菌株的大小、形状特征进行扫描电镜观察^[23]。

1.3 草螺菌根际促生特性

1.3.1 菌株产 IAA 功能的测定

基于 IAA 与 Salkowski 试剂之间的显色反应检测 2 株草螺菌产 IAA 的能力^[24]。将 IAA 的前体 L-色氨酸 (L-Trp) 以 200 μ g/mL 的浓度添加到 MM 液体培养基中, 以 0.5% 葡萄糖为碳源, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培育, 于 12、18、24、30、36、48、60、72、96、120、144 h 取样, 每个时间段设 3 个平行。4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 用 Salkowski's 比色法测定其分泌植物生长素 (IAA) 能力。

1.3.2 菌株产铁载体功能的测定

采取 Schwyn 等开发的铬天青 (Chromeazurol S, CAS) 测定法以及 Andrews 等改良的铁载体活性测定通用方法检测细菌产铁载体能力^[20,25]。为避免过量的磷酸盐或其他弱铁螯合剂的干扰, CAS 琼脂平板采用经 10 倍比稀释的 MM9 培养基; 为得到理想的平板颜色, 铁 (III) 溶液用 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌, 其他关键试剂溶液 (CAS、HDTMA、酪蛋白氨基酸等) 单独灭菌。将 2 株活化后的草螺菌 P5-11、P5-19 点接于 CAS 琼脂培养基上, 培育观察细菌的生长状况及培养基的颜色变化。吸取 50 μ L 活化后的菌液 (OD_{600} 为 0.6) 接种

于装有 100 mL T 培养基的锥形瓶中, 吸取 50 μ L 无菌水接种作为对照。在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培育, 于 3、9、15、20、24、30、36、48、60、72、96、120、144、168 h 取样, 每个时间段设置 3 个平行。样品于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液与改良的 CAS 分析溶液[Fe(III):CAS=1:6]以 1:1 混合摇匀, 25 $^{\circ}$ C 避光反应 1 h, 于 630 nm 测定吸光值, 使用基本培养基加等量 CAS 分析液作为参考。稀释铁载体去铁胺(Desferrioxamine B, DFOB)用同样的方法比色, 以纯水校零, 制作铁载体标准曲线, 测定细菌产铁载体量。

1.3.3 菌株固氮功能的测定

通过测定无氮培养基中硝态氮的含量变化表征细菌的固氮特性^[26]。取 10 μ L 活化的细菌(OD_{600} 为 0.6) 接入有 100 mL 无氮培养基(Ashby)的锥形瓶中, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 于 2、3、4、5、7、10、12、15 d 取样, 每个时间段设 3 个平行。样品于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 用紫外分光光度法测定上清液中硝态氮的含量, 间接反映 2 株草螺菌的固氮能力。

1.3.4 菌株溶磷功能的测定

吸取活化后的菌株点接在 PKO (Pikovaskaia's) 固体培养基上, 各 3 个重复, 以接种无菌水的平板为对照, 置于 30 $^{\circ}$ C 温箱中培养 7 d, 观察菌落周围光晕的形成。吸取 50 μ L 活化后的 P5-11 和 P5-19 菌悬液(OD_{600} 为 0.6)接种在 100 mL 的 PKO 液体培养基中, 每菌株 3 个重复, 以接种等量无菌水的 PKO 液体培养基作为对照, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 下培养 7 d, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 取离

心后的上清液用钼锑抗比色法^[27]测定培养液的 OD_{700} 值, 定量磷酸钙经草螺菌 P5-11、P5-19 作用后释放出的可溶性磷含量。

1.3.5 香根草盆栽实验

盆栽实验采用直径和高度均为 27 cm 的花盆。实验设计 2 种煤矸石改良处理, 一种改良处理为在煤矸石中按质量分数掺土 10%, 另一种改良处理为在煤矸石上覆盖 5 cm 土。盆栽所用煤矸石与土壤的基本理化性质见表 1。

选取生长均匀一致的幼苗(未接菌的、普通培育的)分别种植于覆盖 5 cm 土的煤矸石和掺 10% 土的煤矸石中, 每盆 3 株, 每种处理设置 4 个重复。提取煤矸石浸提液接种 2 株草螺菌, 证实它们都能够在煤矸石浸提液中生存。将 2 株相同浓度的草螺菌悬浮液(OD_{600} 为 0.6)取 50 mL 加到香根草根进行接菌实验, 在室外培养条件下定期进行浇水管理, 保持植物正常生产。香根草接菌种植实验 2 个月后测量株高, 采集植株并称重(鲜重), 保留部分植株鲜样用于测定抗氧化酶活性、渗透调节物质和膜脂过氧化产物含量, 剩余植株在 105 $^{\circ}$ C 杀青 15 min 后于 60 $^{\circ}$ C 下干燥至恒重。将植物干样粉碎消解后用微量凯氏定氮法测定植株的总氮, 用 1,2,4-氨基萘酚磺酸比色法测定植株总磷, 叶片过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性采用愈创木酚法测定, 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性基于超氧化物歧化酶抑制氮蓝四唑在光下的还原作用来确定, 还原型谷胱甘肽(Reduced Glutathione, GSH)含量基于 GSH 与二硫代双-二硝基苯甲酸在 pH 7.0 左右生成黄色

表 1 种植前基质的基本理化性质

Table 1 Basic physicochemical properties matrix before implantation

土壤类型 Soil type	pH	电导率 Electrical conductivity (μ S/cm)	含水率 Moisture content (%)	硝氮 Nitrate (mg/kg)	氨氮 Ammonia nitrogen (mg/kg)	总磷 Total phosphorus (mg/kg)	速效磷 Available phosphorus (mg/kg)
Pure soil	6.40 \pm 0.07a	1 295.00 \pm 94.12a	27.72 \pm 4.47a	6.40 \pm 0.46a	628.78 \pm 46.67a	614.27 \pm 18.77a	106.61 \pm 3.44a
Mixed soil (10%)	9.21 \pm 0.06b	529.00 \pm 4.08b	15.53 \pm 1.32b	2.05 \pm 0.07b	186.47 \pm 22.37b	165.49 \pm 3.28b	17.97 \pm 2.06b
Coal gangue (5 cm)	9.72 \pm 0.07c	323.00 \pm 62.85c	16.97 \pm 0.37b	0.78 \pm 0.07c	102.13 \pm 10.89c	125.59 \pm 5.41b	7.33 \pm 0.47c

注: 同一指标不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: The different letters in the same index mean significant difference at $P < 0.05$

物质的深浅测定,脯氨酸(Proline, Pro)含量采用磺基水杨酸提取茚 3 酮显色法测定,丙二醛(Malonaldehyde, MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定^[28-29],每个处理4个重复。根据种植2个月后香根草的生长和生理指标评价接种草螺菌对植物的促生作用和抗逆性影响。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因测序与 SEM 观察

16S rRNA 基因系统发育树如图 1 所示, EzBioCloud 数据库中的比对结果如表 2 所示。将 P5-11 和 P5-19 的测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, P5-11 与草螺菌(*Herbaspirillum*)相似性为 99.49%, P5-19 与草螺菌(*Herbaspirillum*)相似性为 99.59%, P5-11 和 P5-19 菌株均隶属于草螺菌属。2 株菌与已鉴定的 10 种草螺菌在 EzBioCloud 数据库中进行序列比对^[30], 其 16S rRNA 基因序列同源, P5-11 与 P5-19 的相似性为 98.29%, 同属于一个最小的独立分支; P5-11、

P5-19 与 *Herbaspirillum* sp. BA15 的相似性分别为 98.12%、99.93%, 亲缘关系相对较近; 2 株菌与其他草螺菌的遗传进化距离相对较远, 与最早鉴定的织片草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)呈现相对明显的遗传进化关系。

P5-11 和 P5-192 草螺菌在 LB 平板上生长的菌落呈乳白色、不透明、圆形、中央隆起、边缘整齐, 与王婷等观察到的草螺菌的形态相似^[31]。在电子扫描显微镜下观测 P5-11 和 P5-192 菌在 1.00 μm 窗口的形态, 菌体呈微曲杆状, 大小均为 (0.2–0.3) $\mu\text{m} \times (0.8–1.2) \mu\text{m}$ (图 2)。

2.2 菌株的促生性能测定

2 株菌经过含 L-色氨酸培养基的连续培养, 产 IAA 浓度随培养时间逐渐增多。P5-11 在 96 h 后达到稳定, 产 IAA 浓度为 $27.95 \pm 5.84 \mu\text{g/mL}$; 而 P5-19 在培养 72 h 后便达到稳定, 产 IAA 浓度为 $55.36 \pm 3.76 \mu\text{g/mL}$, IAA 合成量约为前者的 2 倍 (图 3A)。

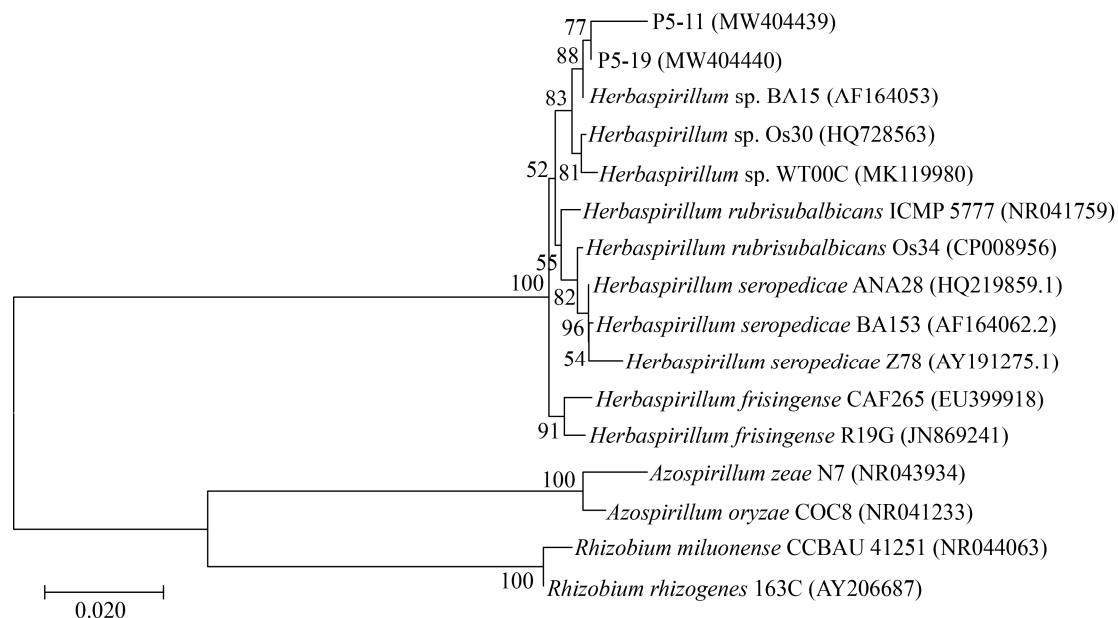


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree constructed with 16S rRNA gene sequence

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点上数字为重复 1 000 次的自展值; 0.020 标尺代表序列间分歧度

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications; Bar 0.002 represents sequence divergence

表 2 16S rRNA 基因序列比对结果
Table 2 Comparison result with the 16S rRNA gene sequence

已知菌株 Known strains	相似性 Similarity (%)	
	P5-11 (MW404439)	P5-19 (MW404440)
<i>Herbaspirillum</i> sp. BA15 (AF164053)	98.12	99.93
<i>Herbaspirillum</i> sp. WT00C (MK119980)	97.48	99.40
<i>Herbaspirillum</i> sp. Os30 (HQ728563)	97.78	99.60
<i>Herbaspirillum frisingense</i> R19G (JN869241)	96.97	98.86
<i>Herbaspirillum frisingense</i> CAF265 (EU399918)	96.77	98.66
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> ICMP 5777 (NR041759)	97.53	99.12
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> Os34 (CP008956)	97.18	98.86
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> BA153 (AF164062.2)	97.28	99.02
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78 (AY191275.1)	96.45	98.53
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ANA28 (HQ219859.1)	97.28	98.97
<i>Azospirillum zae</i> N7 (NR043934)	78.84	79.92
<i>Azospirillum oryzae</i> COC8 (NR041233)	79.23	80.73
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 (NR044063)	77.06	80.61
<i>Rhizobium rhizogenes</i> 163C (AY206687)	78.49	81.56

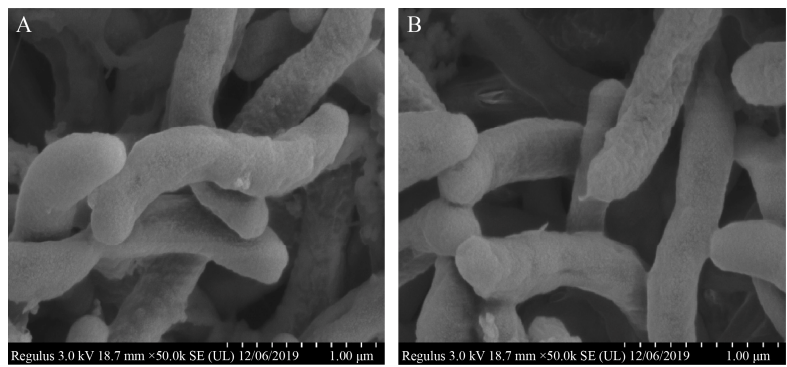


图 2 扫描电子显微镜(SEM)图像
Figure 2 Electron scanning microscope (SEM) image
Note: A: P5-11; B: P5-19

2 株草螺菌均产生铁载体, 由于细菌产生的铁载体比染料对 Fe(III)具有更高亲和力, 导致菌落周围培养基颜色由蓝色变为橙色(图 4A、4B); 通过将 2 株菌的培养基上清液与改良的 CAS 分析液反应, 定量 2 株菌产 DFOB 类铁载体量, 发现 2 株菌产铁载体浓度随培养时间逐渐增多, P5-11 与 P5-19 在 96 h 左右基本同时达到稳定, P5-11 产铁载体最大为 $7.65\pm0.26\text{ }\mu\text{mol/L}$, P5-19 产铁载体最大为 $8.60\pm0.47\text{ }\mu\text{mol/L}$, 2 株菌无显著差异。

2 株菌均能使无氮培养基(Ashby)中硝酸盐的含量随菌株生长逐渐积累, 2 株菌固氮能力相似且都于第 7 天固氮量达到最大, 每 100 mL 固氮量最大分别为 10.98 mg 和 10.70 mg。

2 株草螺菌接种于 PKO 固体培养基上, 菌落周围产生了透明圈, 表明菌株具备溶解磷酸钙和释放可溶性磷的能力(图 5A、5B)。P5-11 与 P5-19 的溶磷能力有显著差异, P5-11 每瓶溶磷量为 $3.19\pm0.16\text{ mg}$, P5-19 每瓶溶磷量为 $4.51\pm0.23\text{ mg}$, 后者溶磷酸钙的能力较强, 为前者的 1.4 倍(图 3D)。

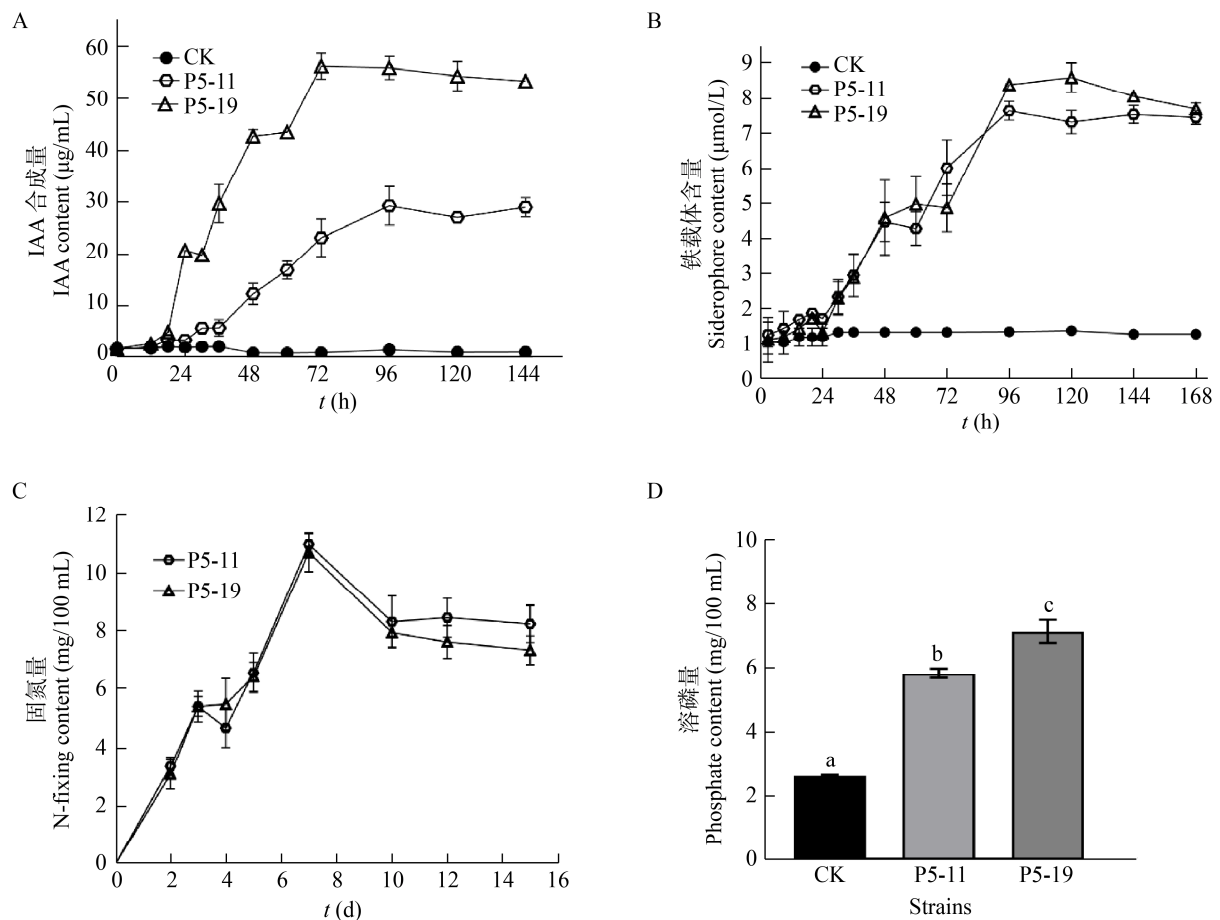


图 3 菌株的促生特性

Figure 3 Growth-promoting properties of the strains

注: A: 菌株产 IAA 浓度变化; B: 菌株产铁载体浓度变化; C: 生物固氮量变化; D: 磷酸盐增溶量, 不同小写字母代表存在显著性差异 ($P < 0.05$)

Note: A: Changes in the concentration of IAA produced by strains; B: Changes in the concentration of siderophore produced by strains; C: Changes in biological nitrogen fixation; D: Phosphate solubilization, different lowercase letters indicate significant difference level of 0.05

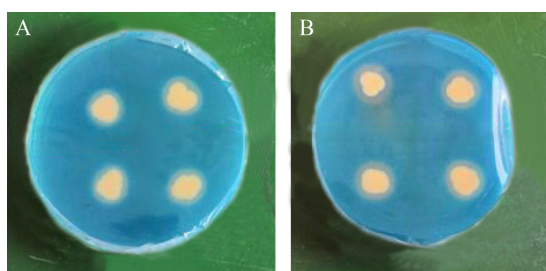


图 4 菌株产铁载体的定性检测

Figure 4 Qualitative detection of siderophore produced by strains

Note: A: P5-11; B: P5-19

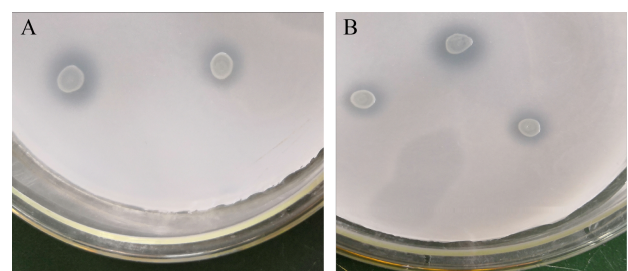


图 5 菌株溶磷能力的定性检测

Figure 5 Qualitative determination of phosphorus soluble capacity of strains

Note: A: P5-11; B: P5-19

2.3 香根草的接菌栽培实验

图6展示了香根草接种种植2个月后生长及养分指标变化。覆土5 cm改良处理中香根草的株高、生物量、植株中氮和磷含量显著高于掺土10%改良处理。与未接种相比,种植在2种基质中的香根草接种2株草螺菌均显著增加了其株高和生物量。覆土5 cm改良处理中,接种2种菌株均能显著提高香根草地上部氮含量;掺土10%改良处理中,接种

P5-19 相较接种 P5-11 对香根草中氮含量的影响更显著。接种 P5-19 可显著提高覆土5 cm改良处理中香根草地上部磷含量,但接种 P5-11 对2种改良处理中香根草地上部磷含量均无显著影响。

表3为种植2个月后生长在煤矸石逆境中香根草地上部生理指标的变化。在接种同一菌株条件下,掺土10%改良处理中的香根草体内丙二醛含量较高;在相同改良处理条件下,接种 P5-11 和

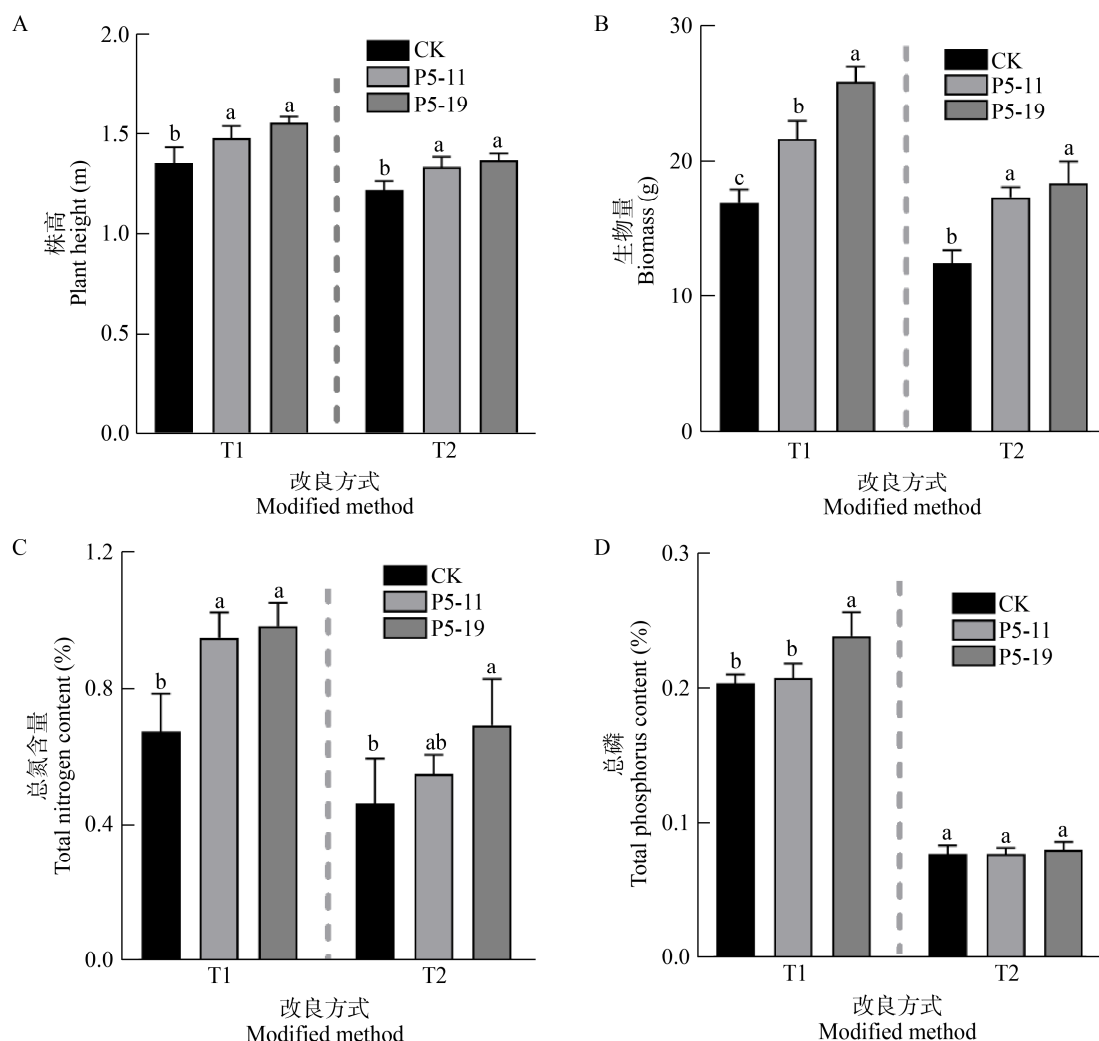


图6 煤矸石胁迫条件下菌株对香根草理化性质的影响

Figure 6 Effects of the strains on physicochemical properties of *V. zizanioides* under coal gangue stress

注: A: 接菌对香根草株高的影响; B: 接菌对香根草生物量的影响; C: 接菌对香根草总氮的影响; D: 接菌对香根草总磷的影响。T1: 在煤矸石上覆盖5 cm土; T2: 在煤矸石中掺入10%土; 不同小写字母代表存在显著性差异($P < 0.05$)

Note: A, B, C and D represent the effects of inoculation on *V. zizanioides* height, biomass, total nitrogen and total phosphorus, respectively. T1: The coal gangue was covered with 5 cm soil; T2: The coal gangue is added with 10% soil; Different lowercase letters indicate significant difference level of 0.05

表 3 接种菌株对煤矸石胁迫条件下香根草的生理学影响

Table 3 Physiological effects of inoculated strains on *V. zizanioides* under coal gangue stress

改良方式	菌株	丙二醛	脯氨酸	还原型谷胱甘肽	过氧化物酶	超氧化物歧化酶
Modified method	Strain	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	Pro ($\mu\text{g/g}$)	GSH ($\mu\text{g/g}$)	POD ($\mu\text{g(g}\cdot\text{min)}$)	SOD ($\text{U/(g}\cdot\text{h)}$)
T1	CK	3.03 \pm 0.07a	6.61 \pm 0.43a	229.08 \pm 18.47b	238.07 \pm 10.23b	320.70 \pm 12.50b
	P5-11	2.69 \pm 0.11b	6.01 \pm 0.42a	231.42 \pm 9.78b	264.27 \pm 7.08a	343.94 \pm 25.16b
	P5-19	2.33 \pm 0.12c	4.69 \pm 0.21b	280.06 \pm 28.60a	269.27 \pm 14.03a	371.04 \pm 28.60a
T2	CK	3.36 \pm 0.26a	4.21 \pm 0.45b	337.03 \pm 32.85b	164.93 \pm 15.73b	420.67 \pm 12.10a
	P5-11	2.80 \pm 0.18b	6.22 \pm 0.34a	441.47 \pm 21.91a	239.26 \pm 20.06a	444.12 \pm 16.15ab
	P5-19	2.90 \pm 0.15b	5.77 \pm 0.32a	416.99 \pm 14.70a	244.79 \pm 13.34a	469.25 \pm 18.47b

注: T1: 在煤矸石上覆盖 5 cm 土; T2: 在煤矸石中掺入 10% 土; 同一指标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: T1: The coal gangue was covered with 5 cm soil; T2: The coal gangue is added with 10% soil; The different letters in the same index mean significant difference at $P < 0.05$

P5-19 均显著降低了香根草体内的丙二醛含量。接种 2 株菌后香根草体内脯氨酸含量均降低,而在掺土 10% 改良处理中未接菌的香根草体内脯氨酸含量下降更为显著。在掺土 10% 改良处理中,接种 2 株菌均显著增加了植株体内谷胱甘肽含量;但在覆土 5 cm 改良处理中,仅在接种 P5-19 条件下植株体内谷胱甘肽的合成显著增加。2 种基质改良处理中,接种 P5-11 和 P5-19 均能够显著促进香根草体内过氧化物酶活性;相较于 P5-11,香根草接种 P5-19 对于其体内超氧化物歧化酶活性的影响更显著。

3 讨论

铜尾矿根际分离的 2 株菌 P5-11 和 P5-19 被鉴定为草螺菌(*Herbaspirillum*),该属的一些菌株可从甘蔗、玉米、小麦的内生组织中分离出来,用作禾本科植物的植物生长促生菌^[32]。例如,Andreozzi 等研究发现 *Herbaspirillum huttiense* RCA24 具有固氮、溶磷、产 IAA 等促生特性,将其高效定殖于水稻中,能够直接或间接地提高水稻的固氮能力、株高和生物量^[15]。本研究,2 株草螺菌利用其优良的促生特性不仅可以促进香根草在煤矸石上的生长,还可以增强其抗逆性以抵御环境胁迫。

本研究中,草螺菌 P5-11 和 P5-19 均具有固氮能力,接种 2 株草螺菌显著增加了香根草地上部分的氮含量。氮素固定并不是促生细菌为植物提供

的唯一益处,Sevilla 等在研究甘蔗中的 *Acetobacter diazotrophicus* PAI5 和 Nif⁻突变株时发现,促生细菌对植物生长的刺激可能与细菌产生的生长素有关^[33]。IAA 是最活跃的生长素^[34],由于其能促进植物快速反应(如细胞伸长增加)和缓慢反应(如细胞分裂和分化)而被广泛研究^[35-36]。本研究中 P5-11 和 P5-19 均能产生 IAA,2 株菌均显著提高了香根草的株高和生物量。铁载体可以高效率结合 3 价铁离子或者将难溶性的铁转变成可溶性形式,以利于植物体内分子氧的储存和运输、氮的生物固定和同化、过氧化物的分解等;在重金属污染条件下,铁载体还具有解毒作用,能够减轻植物的生长抑制,从而提高植物的促生作用^[37]。除固氮、产 IAA 外,本研究中的 2 株草螺菌还具有产铁载体的能力,菌株 P5-11 和 P5-19 最大产铁载体浓度分别为 7.65 \pm 0.26 $\mu\text{mol/L}$ 和 8.60 \pm 0.47 $\mu\text{mol/L}$ 。

Arora 等研究指出,植物处于逆境条件时会导致植物细胞产生大量的活性氧物质,通过激活植物抗氧化酶系统可抑制膜质过氧化,维护质膜结构的完整,防止活性氧自由基破坏植物细胞^[13]。丙二醛影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性^[38],外界环境胁迫会导致植物体内 MDA 含量增多,接种 2 株菌均显著减少了煤矸石基质上香根草体内 MDA 的合成,表明 2 株菌能够协助植物增强抗逆性,减轻细胞膜质过氧化程度。植物遭受胁迫还会造成体内渗透调节物质脯氨酸

(Pro)的积累^[39], 在香根草耐受范围内, 接种 2 株菌均降低了 Pro 的含量, 增强了香根草的耐受性和抵御胁迫的能力, 有助于维持植物体内酶活性。不同胁迫强度下, 还原型谷胱甘肽(GSH)的含量变化与丙二醛的含量变化呈负相关^[40]。接种 2 株菌使得香根草合成 GSH 能力显著升高, 提高了植物细胞的适应能力, 有助于维持细胞膜结构的完整性^[41]。除上述生理指标变化外, 植物应对环境胁迫还会导致体内抗氧化酶活性发生变化以适应不良环境^[42]。2 株草螺菌(*Herbaspirillum*)的接种显著提高了煤矸石逆境中香根草体内过氧化物酶活性和超氧化物歧化酶活性, 有助于清除过多的氧自由基和过氧化物, 平衡植物体内活性氧代谢系统。

4 结论

(1) 所筛选的 2 株草螺菌属(*Herbaspirillum*)菌株 P5-11 和 P5-19 均具有溶磷、固氮及产铁载体和 IAA 的能力; 接种 P5-11 和 P5-19 可显著提高香根草的株高、生物量及地上部氮含量, 提高香根草体内的某些抗氧化酶活性, 增强了香根草对环境胁迫的抗性。

(2) 在短期种植条件下, 覆土 5 cm 改良处理+接种草螺菌 P5-19 更有利于香根草在煤矸石上的生长, 对煤矸石山的生态修复效果更好。

(3) 为更好地发挥 2 株菌的促生能力, 还需找到合适的菌株载体以维持菌株活性并保证菌株与植物高效共生。

REFERENCES

- [1] Liu RQ. Analysis on the comprehensive utilization of the gangue[J]. Modern Mining, 2009(7): 140-142 (in Chinese)
刘瑞芹. 煤矸石的综合利用分析[J]. 现代矿业, 2009(7): 140-142
- [2] Niu YT. Practice of utilization of coal gangue in Huainan mining area[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2017, 35(8): 41-42, 46 (in Chinese)
牛玉亭. 淮南矿区煤矸石资源化利用实践[J]. 中国资源综合利用, 2017, 35(8): 41-42, 46
- [3] Yao Y, Deng QT, Li Y, Lu H, Zou RC. Comprehensive treatment of coal gangue and its development and utilization status[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2019, 37(12): 83-85 (in Chinese)
姚逸, 邓秋婷, 李艺, 卢海, 邹荣灿. 煤矸石的综合治理及其开发利用现状[J]. 中国资源综合利用, 2019, 37(12): 83-85
- [4] Xu L, Feng F, Liu Y, Yang YP, Zheng WD. Relationship between plant species diversity and soil chemical properties in coal gangue dump: early stage of ecological restoration in Lingwu Mining Area[J]. Coal Science and Technology, 2020, 48(4): 97-104 (in Chinese)
许丽, 丰菲, 刘莹, 杨宇平, 郑雯丹. 煤矸石山植物物种多样性与土壤化学因子的关系——以灵武矿区生态修复初期为例[J]. 煤炭科学技术, 2020, 48(4): 97-104
- [5] Zhang HR. Study on the spatial distribution and migration law of heavy metals in the soil around typical coal gangue accumulation[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Science and Technology, 2020 (in Chinese)
张昊然. 典型煤矸石堆积区土壤中重金属空间分布及迁移规律研究[D]. 西安: 西安科技大学硕士学位论文, 2020
- [6] Dudai N, Tsion I, Shamir SZ, Nitzan N, Chaimovitch D, Shachter A, Haim A. Agronomic and economic evaluation of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L.) as means for phytoremediation of diesel polluted soils in Israel[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 211: 247-255
- [7] Xu ZD, Hao J, Chen C, Wang R, Mao YY, Wang HQ, Lu Q, Cheng W. Absorption and enrichment of heavy metals in coal gangue soil by vetiver planting years[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(6): 1241-1246 (in Chinese)
许钟丹, 郝俊, 陈超, 汪瑞, 毛圆圆, 王化秋, 卢绮, 程巍. 香根草种植年限对煤矸石山土壤重金属的吸收与富集能力[J]. 西南农业学报, 2020, 33(6): 1241-1246
- [8] Xu DC, Zhan J, Chen Z, Gao Y, Xie XZ, Sun QY, Dou CM. Effects of *Vetiveria zizanioides* L. growth on chemical and biological properties of copper mine tailing wastelands[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(18): 5683-5691 (in Chinese)
徐德聪, 詹婧, 陈政, 高毅, 谢贤政, 孙庆业, 豆长明. 种植香根草对铜尾矿废弃地基质化学和生物学性质的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(18): 5683-5691
- [9] Liu HW, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, Schenk PM. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2552
- [10] Asiloglu R, Shiroishi K, Suzuki K, Turgay OC, Murase J, Harada N. Protist-enhanced survival of a plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* sp. B510, and the growth of rice (*Oryza sativa* L.) plants[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 154: 103599
- [11] Wang H, Han LZ. Identification of four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from tea

- rhizosphere[J]. Microbiology China, 2019, 46(3): 548-562 (in Chinese)
- 王欢, 韩丽珍. 4 株茶树根际促生菌菌株的鉴定及促生作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(3): 548-562
- [12] Aibibu N, Liu YG, Zeng GM, Wang X, Chen BB, Song HX, Xu L. Cadmium accumulation in *Vetiveria zizanioides* and its effects on growth, physiological and biochemical characters[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(16): 6297-6303
- [13] Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative stress and antioxidative system in plants[J]. Current Science, 2002, 82(10): 1227-1238
- [14] Alves GC, Videira SS, Urquiaga S, Reis VM. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants[J]. Plant and Soil, 2015, 387(1/2): 307-321
- [15] Andreozzi A, Prieto P, Mercado-Blanco J, Monaco S, Zampieri E, Romano S, Valè G, Defez R, Bianco C. Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(9): 3489-3504
- [16] Schlemper TR, Dimitrov MR, Silva Gutierrez FA, Van Veen JA, Silveira APD, Kuramae EE. Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent[J]. PeerJ, 2018, 6: e5346
- [17] Montañez A, Blanco AR, Barlocco C, Beracochea M, Sicardi M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 58: 21-28
- [18] Xu X. Selenate reduction and selenium enrichment of tea by the endophytic *Herbaspirillum* sp. strain WT00C[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2018 (in Chinese)
- 徐萧. 茶树内生草螺菌 WT00C 的硒酸盐还原和茶叶硒富集的研究[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2018
- [19] Zhan GT. Infection, colonization characteristics and application research in cuttage propagation of tea plant (*Camellia sinensis*) by the endophytic bacterium *Herbaspirillum* sp. WT00C and WT00F[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2016 (in Chinese)
- 占桂婷. 茶树草螺菌 WT00C 和 WT00F 的感染方式、定殖特性以及在茶树扦插繁殖中的应用研究[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2016
- [20] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [21] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617
- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [23] Su Y. Study on attached process of marine organisms and antifouling evaluation technology: research on attachment of three different bacteria using different detection techniques[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese)
- 苏艳. 海洋生物附着过程与防污评价技术的研究: 利用不同检测技术研究三种细菌的附着[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2012
- [24] Zhan SF, Lu DN, Mao HY, Xiong RL, Huang D, Chen Y. Isolation of two phosphate/potassium-solubilizing and IAA-producing strains of endophytic fungi and their plant growth promoting function[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2017(3): 142-151 (in Chinese)
- 詹寿发, 卢丹妮, 毛花英, 熊蓉露, 黄丹, 陈晔. 2 株溶磷、解钾与产 IAA 的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3): 142-151
- [25] Andrews MY, Duckworth O. A universal assay for the detection of siderophore activity in natural waters[J]. BioMetals, 2016, 29(6): 1085-1095
- [26] Lei Z. Screening and identification of *Arabidopsis* nitrate regulatory mutants[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- 雷钊. 拟南芥硝态氮调控突变体的筛选与鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014
- [27] Zhang XS. Analysis of the factors affecting the available P content in the fermentation liquid of P bacteria determined by Mo-Sb colorimetry[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(12): 4822-4823 (in Chinese)
- 张祥胜. 钼锑抗比色法测定磷细菌发酵液中有效磷含量测定值的影响因素分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4822-4823
- [28] Li XF, Zhang ZL. Experimental Guidance of Plant Physiology[M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2016 (in Chinese)
- 李小芳, 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2016
- [29] Gao JF. Experimental Guidance for Plant Physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese)
- 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [30] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S

- rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [31] Wang T, Yang S, Chen YX, Hu LL, Tu Q, Zhang L, Liu XQ, Wang XG. Microbiological properties of two endophytic bacteria isolated from tea (*Camellia sinensis* L.)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(4): 424-432 (in Chinese)
王婷, 杨升, 陈亚雪, 胡玲玲, 屠琴, 张丽, 刘雪芹, 王行国. 两株茶树内生草螺菌的微生物学特性[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 424-432
- [32] Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankiewicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects[J]. Plant and Soil, 2012, 356(1/2): 175-196
- [33] Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif^- mutants strains[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(3): 358-366
- [34] Cherif-Silini H, Silini A, Yahiaoui B, Ouzari I, Boudabous A. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1087-1097
- [35] Smulders MJ, Horton RF. Ethylene promotes elongation growth and auxin promotes radial growth in *Ranunculus sceleratus* petioles[J]. Plant Physiology, 1991, 96(3): 806-811
- [36] Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4): 425-448
- [37] Marschner P, Crowley D, Rengel Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis-model and research methods[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(5): 883-894
- [38] Li WY, Xu WH, He JP, Xiong ZT. Effects of insoluble Zn and Cd on growth, activities of antioxidant enzymes and uptake of Zn and Cd in *Vetiveria zizanioides*[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2009, 23(1): 122-126 (in Chinese)
李文一, 徐卫红, 何建平, 熊治廷. 难溶态锌、镉对香根草抗氧化酶活性及锌、镉吸收的影响[J]. 水土保持学报, 2009, 23(1): 122-126
- [39] Gu F. Effects of heat and drought stress on physiology and biochemistry of *Heimia myrtifolia*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2019 (in Chinese)
顾帆. 高温干旱胁迫对黄薇(*Heimia myrtifolia*)生理生化特性的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2019
- [40] Chen SY. Physiological roles of glutathione in plant and its significances[J]. Plant Physiology Communications, 1993, 29(3): 210-214 (in Chinese)
陈少裕. 植物谷胱甘肽的生理作用及其意义[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(3): 210-214
- [41] Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G. Plant glutathione peroxidases[J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100(2): 234-240
- [42] Gu F, Ji MC, Gu CH, Zheng G, Zheng SY. Heat and drought stress with an antioxidant defense system in *Heimia myrtifolia*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2019, 36(5): 894-901 (in Chinese)
顾帆, 季梦成, 顾翠花, 郑钢, 郑绍宇. 高温干旱胁迫对黄薇抗氧化防御系统的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(5): 894-901