

研究报告

神府矿区高效解磷菌的分离及其对煤矸石养分的活化作用

孙爱娣^{1,2}, 白雪蕊^{1,2}, 毕银丽^{*1,2,3}

1 西安科技大学 西部矿山生态环境修复研究院, 陕西 西安 710054

2 西安科技大学 地质与环境学院, 陕西 西安 710054

3 中国矿业大学(北京) 煤炭精细勘探与智能开发全国重点实验室, 北京 100083

孙爱娣, 白雪蕊, 毕银丽. 神府矿区高效解磷菌的分离及其对煤矸石养分的活化作用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2071-2086.

SUN Aidi, BAI Xuerui, BI Yinli. Isolation of efficient phosphorus-solubilizing bacteria capable of activating the nutrients of coal gangue from Shenfu mining area[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2071-2086.

摘要:【背景】煤矸石是煤炭开采过程产生的固体废物, 表面富含微生物及营养元素。【目的】从煤矸石表面筛选高效解磷菌, 并探讨不同培养条件下菌株对养分的活化效果, 进而为“煤矸石-微生物-植物”生态恢复提供种质资源和理论依据。【方法】采用以卵磷脂为磷源的培养基, 筛选煤矸石表面的解磷微生物, 通过测定解磷圈直径比菌落直径(D/d)大小分析菌株对煤矸石的速效磷释放能力; 选择并纯化解磷效果最佳的菌株, 利用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)对培养优化处理前后的煤矸石进行表征, 并在此基础上探讨菌株与煤矸石的相互作用。【结果】分离出 4 株解磷微生物, 经分子生物学鉴定均隶属于假单胞菌属(*Pseudomonas*), 其中解磷效果最佳的菌株形成的 D/d 为 3.77, 菌落大小为 2–4 mm, 呈乳白色且革兰氏染色阴性, 经过 24 h 培养后 OD_{600} 值达最高 1.70, 发酵液 pH 值为 7.95。该菌株能有效促进煤矸石养分活化, SEM 观察到解磷菌吸附在煤矸石表面, FT-IR 分析显示活化前后的煤矸石分别在波长 $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 和 $2\ 850\ \text{cm}^{-1}$ 处的官能团发生了伸缩振动。【结论】最佳解磷菌活化处理后, 煤矸石速效磷含量最高达 22.39 mg/kg。培养条件优化实验结果显示, 添加培养至对数生长期($OD_{600}=1.70$)的菌液 70 mL (煤矸石:接种量固液比=1:7)对 100 目粒径煤矸石的养分活化效果最佳。本研究筛选到的高效解磷菌不仅可以提高煤矸石养分利用效率, 还为煤矸石资源循环利用及矿山生态修复提供了一条新途径。

关键词: 高效解磷菌; 活化煤矸石; 粒径; 接种量

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1303304); 国家自然科学基金(52394194)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1303304) and the National Natural Science Foundation of China (52394194).

*Corresponding author. E-mail: ylb88@126.com

Received: 2024-08-31; Accepted: 2025-01-20; Published online: 2025-02-26

Isolation of efficient phosphorus-solubilizing bacteria capable of activating the nutrients of coal gangue from Shenfu mining area

SUN Aidi^{1,2}, BAI Xuerui^{1,2}, BI Yinli^{*1,2,3}

1 Institute of Ecological Environment Restoration in Mine Areas of West China, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, Shaanxi, China

2 College of Geology and Environment, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, Shaanxi, China

3 State Key Laboratory for Fine Exploration and Intelligent Development of Coal Resources, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Coal gangue, the solid waste produced during coal mining, has abundant microorganisms and nutrients on its surface. [Objective] In this study, we isolated efficient phosphorus-solubilizing bacteria from the surface of coal gangue and further investigated the activating effects of the strains on nutrients under various culture conditions, aiming to provide genetic resources and theoretical support for ecological restoration via the “coal gangue-microbe-plant” pattern. [Methods] The culture medium with lecithin as the phosphorus source was utilized to screen the phosphorus-solubilizing bacteria on the surface of coal gangue. The phosphorus-solubilizing ability of each strain on coal gangue was determined based on the ratio of the phosphorus solubilization zone diameter to the colony diameter (D/d). The strain with the best phosphorus solubilization effect was selected and purified. Scanning electron microscope (SEM) and Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR) were employed to characterize the coal gangue before treatment and after treatment under the optimized conditions. Furthermore, the interaction between the strain and coal gangue was investigated. [Results] Four phosphorus-solubilizing strains were isolated and they were identified as *Pseudomonas* based on molecular biological evidence. The strain with the best phosphorus-solubilizing effect showcased a D/d ratio of 3.77, a colony diameter ranging from 2 to 4 mm, a milky white color, and Gram-negative characteristics. Following 24 hours of culture, the fermentation broth showed the maximum OD_{600} value of 1.70 and pH 7.95. This strain significantly enhanced the activation of nutrients in coal gangue. SEM results indicated that the strain adhered to the coal gangue surface. FT-IR results indicated that the functional groups of coal gangue exhibited stretching vibrations at wavelengths of $1\,000\text{ cm}^{-1}$ and $2\,850\text{ cm}^{-1}$ before and after activation, respectively. [Conclusion] After the activation by the best phosphorus-solubilizing bacterium, the available phosphorus content in coal gangue reached up to 22.39 mg/kg. The best nutrient activation effect for coal gangue with a particle size of 100 meshes was achieved by adding 70 mL bacterial liquid ($OD_{600}=1.70$, solid-to-liquid ratio of 1:7) in the logarithmic growth phase. The efficient phosphorus-solubilizing strain identified in this study not only improves the nutrient utilization efficiency but also offers a new pathway for the resource recycling of coal gangue and ecological restoration in mining areas.

Keywords: efficient phosphate-solubilizing bacteria; activation of coal gangue; particle size; inoculum amount

煤炭作为我国重要能源和工业原料,随着开采强度的增加,大量煤基固废排放^[1-2],其中煤矸石是年产量最大的煤基固废^[3-4],占原煤产量的 15%–20%。露天堆放的煤矸石严重破坏采煤区生态环境^[5-6],占用耕地并导致水体和土壤污染^[7];长期暴露,煤矸石中的硫化物通过微生物催化释放有毒气体 CO^[8]。因此,促进煤矸石综合利用、减少污染及改善生态环境,已成为亟待解决的问题。目前,煤矸石的利用主要包括填坑筑路^[9]、土地复垦、发电、建筑材料^[10]、化工材料^[11]及微生物肥料等^[12],尽管在这些方面已有一定进展,但煤矸石综合利用率仍不足。

煤矸石富含有机质及植物所需的氮、磷、钾等营养元素,但大多数以难溶性的矿物形式存在,解磷微生物的研究成为煤矸石养分活化的重要方向,是其资源化利用的关键。磷是植物生长必需营养元素^[13],主要以 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 的形式被植物吸收^[14],而煤矸石中的磷主要以 P_2O_5 形式存在^[15],直接被植物吸收有效磷含量很低^[16],煤矸石的营养成分与土壤相近,为煤矸石微生物活化改良提供了可行性。近年来,研究发现,解磷菌对煤矸石养分活化机理主要是通过代谢活动分泌有机酸,与煤矸石中难溶性矿物磷发生化学反应,形成可溶性磷化合物^[17-18],酒石酸由于含两个–OH 官能团,能够与含磷矿物形成稳定的配合物,对煤矸石有效磷溶解效果最好。此外,解磷微生物在生长过程中产生磷酸酶,水解矿物磷^[19],并与其他微生物的共生作用,增强矿物磷的活化效果,促进营养元素的循环^[20]。一些研究者筛选出了高效解磷菌株嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*),并验证了对煤矸石的解磷效果,例如:巩文辉等^[21]利用嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)降解煤矸石制备矿物肥料,结果表明该菌株通过产生有机酸有

效溶解煤矸石中三斜磷钙石矿物。这些研究为煤矸石的资源化利用提供了新的思路与方法。

目前,国内外研究已探讨煤矸石的资源化利用,特别是作为植物生长基质,以改善土壤养分含量并促进植物生长,解磷微生物在农业活动中被广泛应用,以提高作物生产力^[22]。例如,Yu 等^[23]通过从土壤中筛选解磷菌并接种到土壤中,促进玉米根系生长发育,减少土壤中磷滤液的损失,提高植物对土壤磷素吸收利用。Wang 等^[24]研究筛选解磷微生物窄养单胞菌对煤矸石的养分活化作用效果,并且将煤矸石与沙土混合使用,作为植物生长基质以促进苜蓿种子的发芽率。尽管已有研究表明,煤矸石作为肥料在改善土壤质量方面具有潜力,但将其与微生物联用以活化其中的营养元素,并应用于矿山植被生态复垦的相关研究仍较稀缺^[25-26]。目前尚未有关于从煤矸石表面筛选解磷菌假单胞菌的报道。因此,筛选分离解磷微生物活化煤矸石营养物质具有重要研究意义。

本研究以神府矿区的煤矸石为原料,分离并纯化能够促进煤矸石营养元素活化的高效解磷菌,并分析菌株对难溶性磷的解磷能力及其对煤矸石中有效磷的活化效果,探讨了培养条件如煤矸石粒径和菌液添加量对解磷菌活化煤矸石效果的影响。本研究旨在深入研究微生物对煤矸石营养物质的活化作用,从而提高其养分利用效率。

1 材料与方法

1.1 样品

煤矸石样品来自陕西省榆林市神府煤矿区,其营养元素全磷含量 2.87 g/kg,速效磷 11.20 mg/kg,有机质 101.10 g/kg,Zeta 电位 –9.15 mV,pH 8.63。由表 1 可知, SiO_2 是煤矸石中的主要氧化物组分,占比 62.08%,其次是 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 和 K_2O ,三者总共占比 31.46%。

表 1 煤矸石主要氧化物含量

Table 1 The Main oxide content of coal gangue

主要氧化物 Primary oxides	含量 Concentration (%)
Na ₂ O	1.02
MgO	1.63
Al ₂ O ₃	21.29
SiO ₂	62.08
P ₂ O ₅	0.11
SO ₃	0.77
K ₂ O	3.61
CaO	1.70
TiO ₂	0.91
Cr ₂ O ₃	0.02
MnO	0.09
Fe ₂ O ₃	6.56

1.2 培养基、主要试剂和仪器

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.2, 121 °C灭菌 20 min。牛肉膏液体培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2, 121 °C灭菌 20 min。难溶性有机磷固体培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, (NH₄)₂SO₄ 0.50, NaCl 0.30, FeSO₄·7H₂O 0.03, MnSO₄·H₂O 0.03, MgSO₄·7H₂O 0.30, KCl 0.30, CaCO₃ 5.00, 卵磷脂 0.80, 酵母膏 0.80, 琼脂 20.00, pH 7.0, 121 °C灭菌 20 min。

细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Taq Plus DNA 聚合酶, BBI 生命科学有限公司。

高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 球磨机, 谷瑞仪器设备有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器有限公司; 电感耦合等离子体光谱仪, 珀金埃尔默股份有限公司; 凯氏定氮仪, 上海力晶科学仪器有限公司; 无菌净化工作台, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM), 电子株式会社; 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR), 布鲁克(北京)科技

有限公司。

1.3 高效解磷菌的分离鉴定

1.3.1 解磷菌的分离

称取 10 g 煤矸石样品, 加入 50 mL 无菌水, 振荡培养 30 min, 取上清液按梯度稀释为 10⁻¹–10⁻⁸, 分别吸取 0.1 mL 不同梯度稀释液均匀涂布在难溶性有机磷固体培养基上。分离具有溶磷圈的菌株, 将纯化后的菌液以 1% 的接种量转接入 100 mL 牛肉膏液体培养基中, 37 °C、180 r/min 恒温振荡培养, 每隔 2 h 取样测定 600 nm 处吸光度, 共取样测定 24 次, 并绘制解磷菌生长曲线^[27], 采样过程中利用 pH 计记录不同菌株培养 24 h 前后生长液的 pH。

将 4 株解磷菌接种于牛肉膏液体培养基培养至对数期, 浓度分别为 1.36×10⁹、0.94×10⁹、1.25×10⁹ 和 0.45×10⁹ CFU/mL。称取 10 g 过 100 目筛的煤矸石样品, 分别接种 4 株解磷菌菌液 50 mL, 对照组加入等体积灭菌培养基, 37 °C 恒温 180 r/min 振荡培养 3 d。活化反应结束后, 将体系于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 分离出煤矸石与反应液, 采用钼锑抗比色法测量煤矸石中的速效磷含量, 同时随活化时间变化记录间隔 1 d 的反应液 pH^[28]。

1.3.2 菌株生理生化指标的测定

将 4 株解磷菌接种于难溶性有机磷固体培养基上, 使用数字卡尺精准测量不同菌株产生的解磷圈和菌落大小, 从不同方向取多个测量值, 确保试验结果的准确性, 并计算解磷圈直径(*D*)和菌落直径(*d*)的比值(*D/d*)。观察并记录菌落的形态特征, 描述菌落的颜色、形状、表面(如平滑、凸起或皱缩)、边缘(如光滑或锯齿状)、透明度等特征。将单菌落涂抹在载玻片上进行革兰氏染色, 通过涂片固定、草酸铵结晶紫染色、碘液处理、脱色及复染显微镜观察, 根据细胞壁的颜色反应(革兰氏阳性为紫色, 革兰氏阴性为红色)判断革兰氏染色结果。

1.3.3 菌株的分子生物学鉴定

采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株的 DNA, 选择特定引物 27F (5'-AGAGTTTG ATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3') 对目的菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 具体步骤见参考文献[29], 测序结果通过 NCBI 进行序列比对分析, 利用 MEGA 软件构建菌株的系统发育树。

1.4 解磷菌活化煤矸石养分的条件优化及性能表征

1.4.1 解磷菌对不同粒径煤矸石养分活化的影响

采用球磨仪将煤矸石磨细分别过 100、80、32 和 16 目孔径的筛网, 称取不同粒径煤矸石各 10 g, 分别与 50 mL 菌液混合添加至 250 mL 锥形瓶内, 用等体积灭菌牛肉膏液体培养基作为对照, 每个处理设置 5 个重复, 37 °C、180 r/min 培养 3 d 后将锥形瓶内煤矸石与菌液混合物全部转移至离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min 分离出煤矸石与活化反应液, 将分离出的煤矸石样冷冻干燥后, 测定煤矸石速效磷、速效钾、有机质和全氮含量, 并对煤矸石样进行 SEM 观察和 FT-IR 分析。

1.4.2 不同接种量对煤矸石养分活化的影响

称取 10 g 过 100 目孔径筛网的煤矸石, 依次加入菌液 10、30、50、70 和 90 mL, 混合添加至 250 mL 锥形瓶内, 用等体积灭菌牛肉膏液体培养基作为对照, 每个处理设置 5 个重复, 37 °C、180 r/min 培养 3 d 后, 将锥形瓶内煤矸石与菌液混合物全部转移至离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min 分离出煤矸石与活化反应液, 将分离出的煤矸石样冷冻干燥后, 测定煤矸石速效磷、速效钾、有机质和全氮含量, 并对煤矸石样进行 SEM 观察和 FT-IR 分析。

1.4.3 煤矸石 pH 及养分含量测定

活化后将煤矸石样冷冻干燥, 用 pH 计测定煤矸石菌液反应液 pH, 煤矸石速效磷含量采用钼锑抗比色法测定, 速效钾含量通过碳酸铵

浸提后采用电感耦合等离子体光谱仪测定, 有机质含量采用重铬酸钾-油浴外加热法测定, 全氮含量采用凯氏定氮仪测定。

1.4.4 解磷菌菌体及煤矸石表面 SEM 观察

利用 SEM 观察解磷菌, 首先将菌株用 8.5 g/L 生理盐水清洗 3 次后添加 2% 的戊二醛溶液置于 4 °C 冰箱, 进行不同浓度梯度(50%、70%、80%、90%、95% 和 100%) 的乙醇脱水、干燥, 并观察菌液活化处理后的煤矸石样品表面的解磷菌附着情况。

1.4.5 解磷菌菌体及煤矸石 FT-IR 分析

采用 FT-IR 对解磷菌和活化后煤矸石样的官能团进行分析, 实验仪器设置条件: 扫描波长范围 300–4 000 cm^{-1} , 扫描次数 64, 分辨率 2 cm^{-1} 。

1.5 数据处理

使用软件 Excel2019 处理实验数据, 导入 Origin2021 进行绘图, 采用 IBM SPSS Statistics 软件对不同菌株的解磷能力、活化前后煤矸石营养元素含量进行单因素方差分析(Duncan 检验, $P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 高效解磷菌的筛选及生理生化特征

采用稀释涂布平板法从风化煤矸石表面分离纯化出 4 株菌株, 分别命名为 BBS-A、BBS-B、BBS-C、BBS-D, 在难溶性有机磷固体培养基上培养 15 d 观察菌落形态(图 1), 菌株 BBS-A 形状为圆形, 乳白色, 大小约 2–4 mm, 菌株表面略干燥, 扁平, 不透明。菌株 BBS-B 为圆形, 浅黄色, 大小约 5–6 mm, 菌株表面湿润, 中间凸起不透明。菌株 BBS-C 形状不规则, 白色, 大小约 4–6 mm, 表面湿润有光泽, 不透明, 边缘有齿状。菌株 BBS-D 浅棕色, 大小约 9–10 mm, 菌株表面有光泽, 中间凸起, 略微透明, 边缘不规则。在相同培养条件下菌株 BBS-A 较其

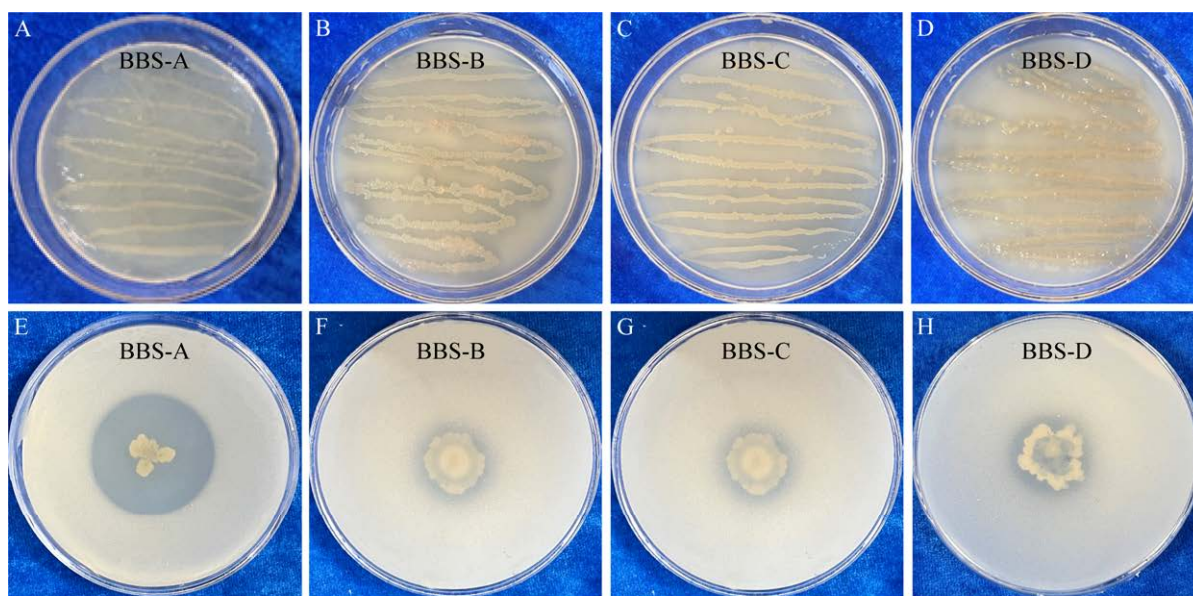


图1 解磷菌 BBS-A、BBS-B、BBS-C、BBS-D 的菌落形态及解磷能力 A-D: 菌株 BBS-A、BBS-B、BBS-C、BBS-D 的菌落形态; E-G: BBS-A、BBS-B、BBS-C、BBS-D 的菌落解磷能力。

Figure 1 The colony morphology and phosphorus-solubilizing ability of phosphorus-solubilizing bacteria BBS-A, BBS-B, BBS-C and BBS-D. A-D: The colony morphology of BBS-A, BBS-B, BBS-C and BBS-D; E-G: The phosphorus-solubilizing ability of BBS-A, BBS-B, BBS-C and BBS-D.

余3种细菌生长的菌落小,革兰氏染色均呈阴性。菌株培养15 d后的 D/d 在1.43–3.77之间(表2),4株菌的解磷能力依次是BBS-A>BBS-C>BBS-B>BBS-D。 D/d 最大的是菌株BBS-A, D/d 值为3.77,与其余3株菌差异显著,较菌株BBS-D的 D/d 增大了163.64%。

2.2 菌株分子生物学鉴定结果

利用NCBI数据库中的16S rRNA基因序列,对4株解磷菌进行同源性比对,并构建系统发育树。菌株BBS-A与基尔假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*) strain 520-20和芸苔假单胞菌(*Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca*) strain CIP 109457在同一分支上(图2),亲缘关系最近,与2株菌的相似性分别为99.46%和99.45%,可将其鉴定为基尔假单胞菌。菌株BBS-B与施氏假单胞菌(*Stutzerimonas stutzeri*) ATCC 17588相似性为98.37%,可将其鉴定为施氏假单胞菌。菌株BBS-C与韩国假单胞菌(*Pseudomonas koreensis*) strain Ps9-14和莫

拉维假单胞菌(*Pseudomonas moraviensis*) strain 1B4的相似性分别为99.79%和99.59%,且处于同一分支上,将其鉴定为韩国假单胞菌。菌株BBS-D与绿石泥分裂施蒂泽氏单胞菌(*Stutzerimonas chloritidismutans*) strain AW-1处于同一分支上,并且序列的相似性为99.86%,将其鉴定为绿石泥分裂施蒂泽氏单胞菌。

2.3 菌株的生长特性

4株解磷菌的生长特性如图3A所示,菌株BBS-A在接种0–7 h培养前期生长缓慢,经过7 h后进入对数生长期,活菌数量直线上升, OD_{600} 最高值在培养24 h达到1.70,24 h后进入稳定期,在此期间细菌数量基本维持在最大值保持平衡,28 h之后培养基中营养物质成分减少,细菌繁殖变慢,菌数明显下降,进入衰亡期;菌株BBS-B在12 h内处于稳定的对数生长期,14–28 h处于稳定生长期,并在28 h菌株BBS-B的 OD_{600} 值最大是1.21,培养28 h后菌株的数量逐渐减少;菌株BBS-C的前期生长

表 2 解磷菌生理生化特征

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of the phosphate-solubilizing bacteria

菌株编号	菌落大小	解磷圈直径/菌落直径	革兰氏染色结果	菌落形态特征
Strain ID	Colony diameter (mm)	The phosphorus solubilization zone diameter to the colony diameter (mm) <i>D/d</i>	Gram stain result	Morphological characteristics of the colony
BBS-A	2.0–4.0	3.77±0.22a	G ⁻	菌落形状为圆形，乳白色，表面略干燥，扁平，不透明 The colony has a round shape, with an off-white color, slightly dry surface, flat, and opaque
BBS-B	5.0–6.0	1.73±0.37bc	G ⁻	菌落为圆形，浅黄色，表面湿润，中间凸起不透明 The colony is round, light yellow in color, with a moist surface, raised center, and opaque
BBS-C	4.0–6.0	1.96±0.21b	G ⁻	菌落形状不规则，白色，表面湿润有光泽，不透明，边缘有齿状 The colony is irregular in shape, with a white color, moist and glossy surface, opaque, and serrated edges
BBS-D	9.0–10.0	1.43±0.13c	G ⁻	浅棕色，表面有光泽，中间凸起，略微透明，边缘不规则 The colony has a light brown color, glossy surface, raised center, slightly translucent, and irregular edges

不同小写字母代表不同处理之间采用 Duncan 检验，具有显著性差异($P<0.05$)。

Different lowercase letters represent significant differences between treatments based on the Duncan test ($P<0.05$).

曲线趋势在 6 h 开始处于对数生长期，对数生长至 20 h 并维持 2 h 后， OD_{600} 值从 1.672 开始逐渐减少并趋于 1.0 左右；菌株 BBS-D 的迟缓期在 0–6 h 之间，生长速度缓慢，6–16 h 之间细菌生长迅速，代谢旺盛，细菌数量呈指数增加，在 16 h 细菌数量最大，16–22 h 期间维持稳定，22 h 之后细菌数量开始下降，活性降低。图 3B 反映的是不同菌株培养 24 h 前后生长液的 pH 变化，灭菌后初始液体培养基 pH 值是 8.64，培养 24 h 后解磷菌生长液 pH 值均有所降低，菌株 BBS-D 降低幅度最大，依次是菌株 BBS-A、BBS-C、BBS-B。

2.4 菌株解离煤矸石效果分析

图 4A 表明，4 株菌活化处理后的煤矸石速效磷含量显著高于对照组($P<0.05$)，分别较对照组处理的煤矸石样品提高了 154.77%、134.85%、112.43%和 150.95%。解磷菌对煤矸石活化效果依次是菌株 BBS-A>BBS-D>BBS-B>BBS-C，其中解磷菌 BBS-A 的活化能力最强，活化后煤矸

石的速效磷含量高达 22.39 mg/kg，较未活化处理的煤矸石速效磷含量提升了 99.91%，解磷菌 BBS-A 活化煤矸石总磷的含量占比为 0.39%。

煤矸石与菌液混合培养 3 d，间隔 1 d 测定反应液的 pH，结果如图 4B 所示，4 株解磷菌与煤矸石反应液 pH 均呈现先降低后增加的趋势，煤矸石呈碱性，实验开始时不同解磷菌培养液 pH 在 7.56–8.22 之间，随着反应时间增加，解磷菌 BBS-A 反应液 1 d 后 pH 值由 7.95 降低至 7.10，第 3 天增加至 8.77。

2.5 活化煤矸石养分条件优化

2.5.1 解磷菌优化不同粒径煤矸石养分的效果

菌液活化处理后煤矸石养分含量较对照组均有所提高，接菌组速效磷、速效钾、有机质、全氮含量均表现为 100 目>80 目>32 目>16 目的趋势，相较于其余 3 种粒径，100 目粒径煤矸石速效磷含量达到显著性差异($P<0.05$)，较对照组提高了 18.71%，速效钾、有机质、全氮含

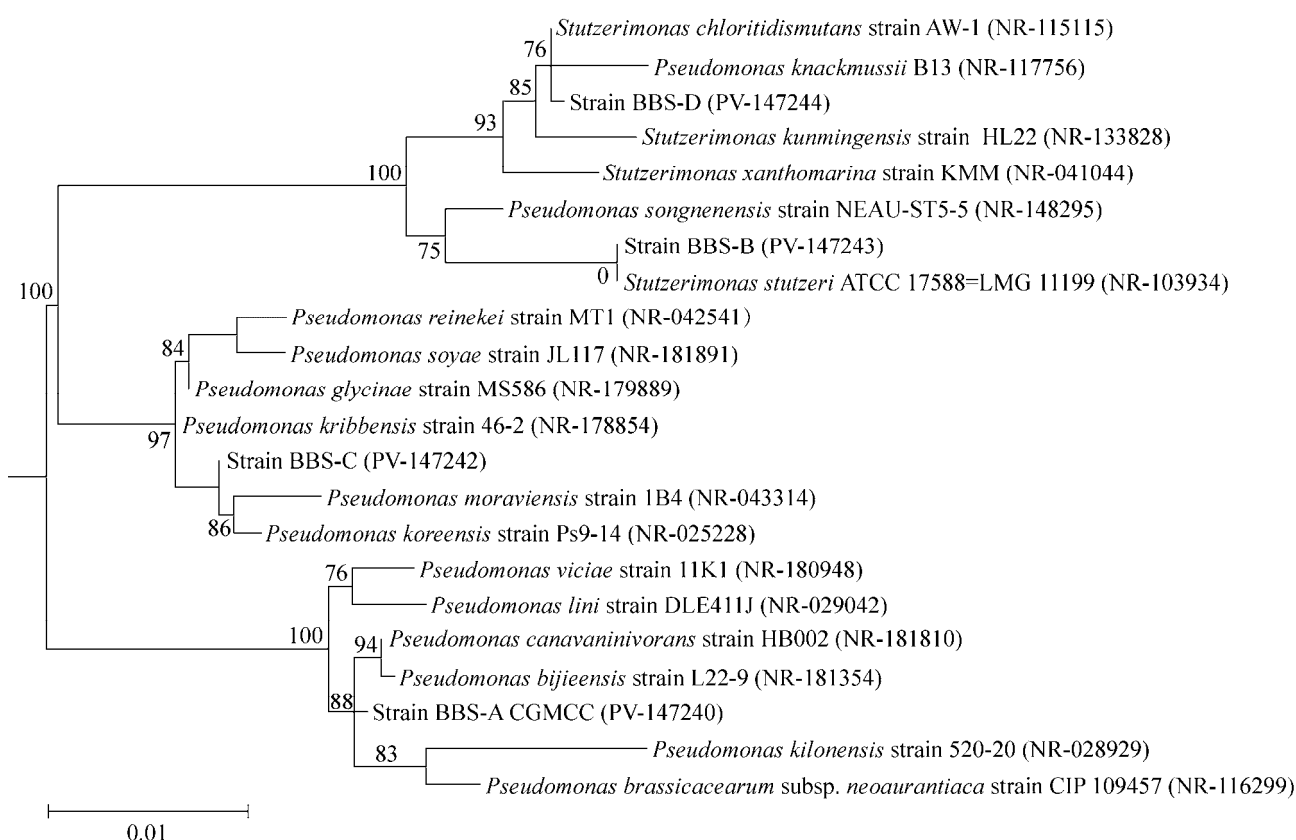


图 2 基于菌株 16S rRNA 基因序列构建的 4 株解磷菌的系统发育树 括号内序号为菌株 GenBank 登录号；进化树分支点数字表示该分支的支持度，即该分支被数据支持的程度数值越高(接近 100)，表示该分支的支持度越强，可靠性越高；进化树底部标尺表示分支长度或进化距离，数值表示的是分支之间的遗传差异或变异程度。

Figure 2 Phylogenetic tree of four phosphate solubilizing bacteria constructed based on the 16S rRNA gene sequence of bacterial strains. The number in parentheses following each strain name represents the GenBank accession number of the strain; The branch point numbers on the phylogenetic tree represent the support level of that branch, with higher values (closer to 100) indicating stronger support and greater reliability; The scale at the bottom of the tree indicates branch length or evolutionary distance, with the values representing genetic differences or variation between the branches.

量分别是 16 目煤矸石粒径的 1.19、1.12 和 1.11 倍(图 5)。不同粒径下煤矸石养分含量均随煤矸石粒径的减小而增加，综上，解磷菌 BBS-A 对不同粒径煤矸石养分活化的最佳粒径是 100 目。

2.5.2 接种量对煤矸石养分活化的影响

实验筛选最佳解磷菌 BBS-A 菌液不同添加量对煤矸石养分含量的影响如图 6 所示，添加不同量菌液活化处理的煤矸石样品养分含量较对照组均有提高，随着接种量的增加，煤矸石样品的速效磷、速效钾、有机质、全氮含量呈

现先增加后降低的趋势。煤矸石的速效磷、速效钾、全氮含量均表现为接种 70 mL 解磷菌 BBS-A 菌液时最高，速效磷含量较其余接种量分别增加了 89.94%、58.94%、9.70%、5.41%，较 CK 提高了 53.18%；速效钾含量分别是其余接种量的 1.79、1.74、1.47 和 1.01 倍，较 CK 提高了 16.05%。煤矸石有机质含量在接种量 50 mL 时最大，是接种量 70 mL 的 1.74 倍。综上所述，添加 70 mL (煤矸石:接种量固液比=1:7)解磷菌 BBS-A 菌液对煤矸石的养分活化效果最好。

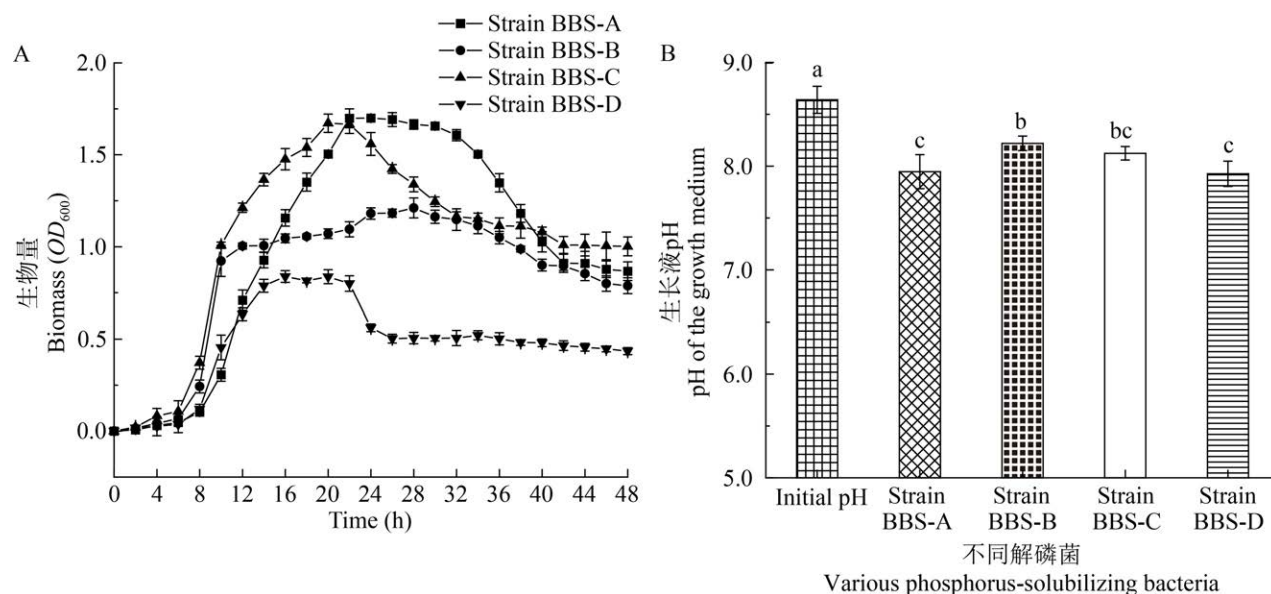


图 3 不同解磷菌生长特性 A: 4 株解磷菌随培养时间变化的生长曲线; B: 培养至 24 h 生长液的 pH 变化。不同小写字母代表不同处理之间采用 Duncan 检验, 具有显著性差异($P<0.05$)。下同。

Figure 3 Different growth characteristics of phosphate-solubilizing bacteria. A: The growth curves of four phosphate-solubilizing bacterial strains over the cultivation period; B: The pH changes of the culture broth after 24 h of cultivation. Different lowercase letters represent significant differences between treatments based on the Duncan test ($P<0.05$). The same below.

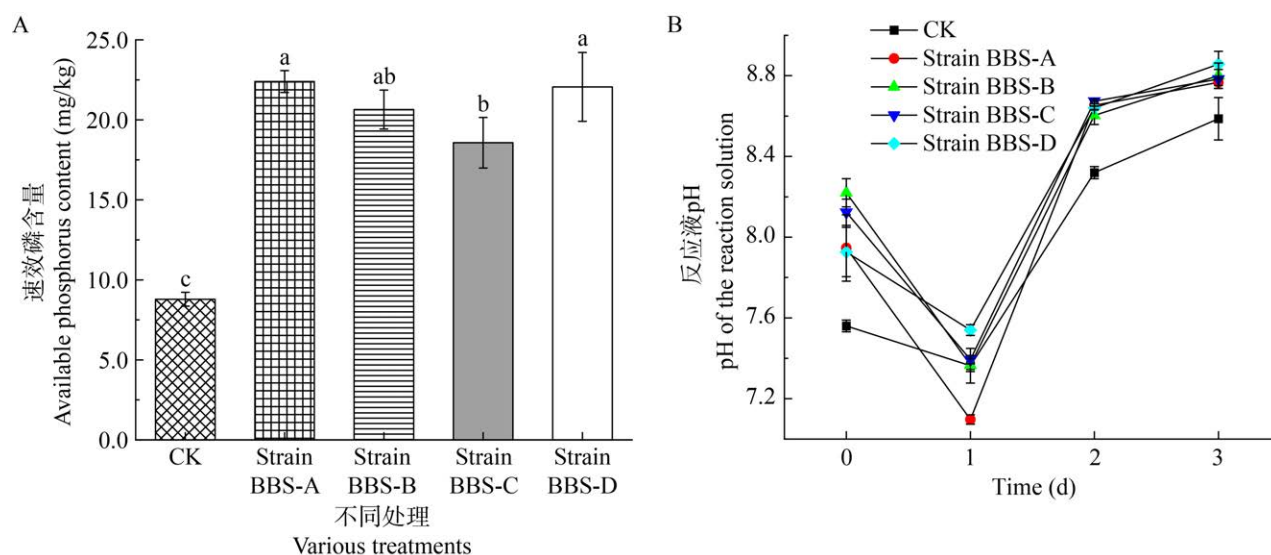


图 4 不同解磷菌活化对煤矸石速效磷及反应液 pH 变化的影响 A: 不同处理后煤矸石速效磷含量; B: 不同解磷菌活化煤矸石过程中反应液 pH 随时间变化规律。

Figure 4 Influence of different phosphate-solubilizing bacteria on the available phosphorus content of coal gangue and changes in the pH of the reaction solution. A: The available phosphorus content in coal gangue under different treatments; B: The temporal changes in the pH of the reaction solution during the activation of coal gangue by different phosphate-solubilizing bacteria.

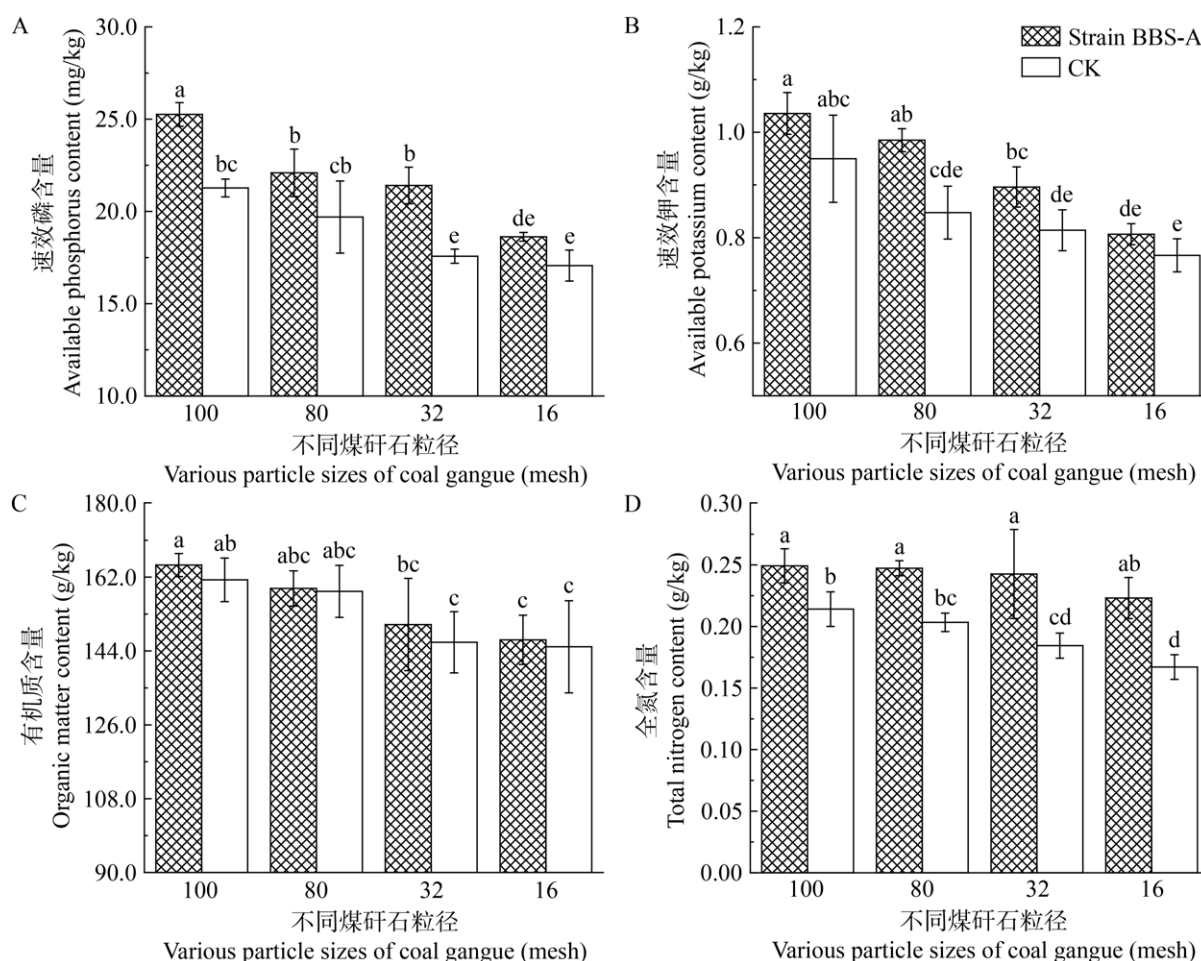


图5 解磷菌对不同粒径煤矸石活化后养分含量影响 A-D: 依次代表活化后不同粒径煤矸石的速效磷、速效钾、有机质、全氮含量。

Figure 5 The effect of phosphate-solubilizing bacteria on the nutrient content of coal gangue with different particle sizes after activation. A-D respectively represent the available phosphorus, available potassium, organic matter, and total nitrogen contents of coal gangue with different particle sizes after activation.

2.5.3 菌株及活化前后煤矸石样品 SEM 观察

对菌株 BBS-A 进行干燥固定, 通过 SEM 观察其形状特征, SEM 下观察菌株呈短杆状, 无菌丝(图 7A)。通过对比分析 SEM 得到的菌株活化前后的煤矸石表面图像, 可以观察到原始煤矸石(图 7B)完整清晰的矿物结构, 其中解磷菌活化处理后的煤矸石样表面(图 7C)有解磷菌附着。

2.5.4 煤矸石 FT-IR 分析

研究菌株 BBS-A 对煤矸石的活化作用, 进一步分析菌株 BBS-A 和活化前后煤矸石样品波

长在 $300\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的 FT-IR 测定分析见图 8, 从官能团角度分析二者之间的作用。从图 8A (波长 $300\text{--}1\,800\text{ cm}^{-1}$) 可以看出菌株 BBS-A 在波长 $1\,000\text{ cm}^{-1}$ 左右存在 C-C 官能团, 能通过静电作用和配位作用与金属离子结合, 煤矸石容易发生配位作用和静电吸附的离子有铁、铝离子。并且 $1\,000\text{ cm}^{-1}$ 处煤矸石经解磷菌菌液活化前后伸缩振动明显, 代表活化过程中发生 C-C 官能团的伸缩振动。同时图 8B (波长 $1\,800\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$) 中波长 $2\,850\text{ cm}^{-1}$ 范围内菌株 BBS-A 存在 C-H 键的伸缩振动, 菌株 BBS-A 稳定性强, 能够牢固吸附在煤矸石表面, 作用活化煤矸石。

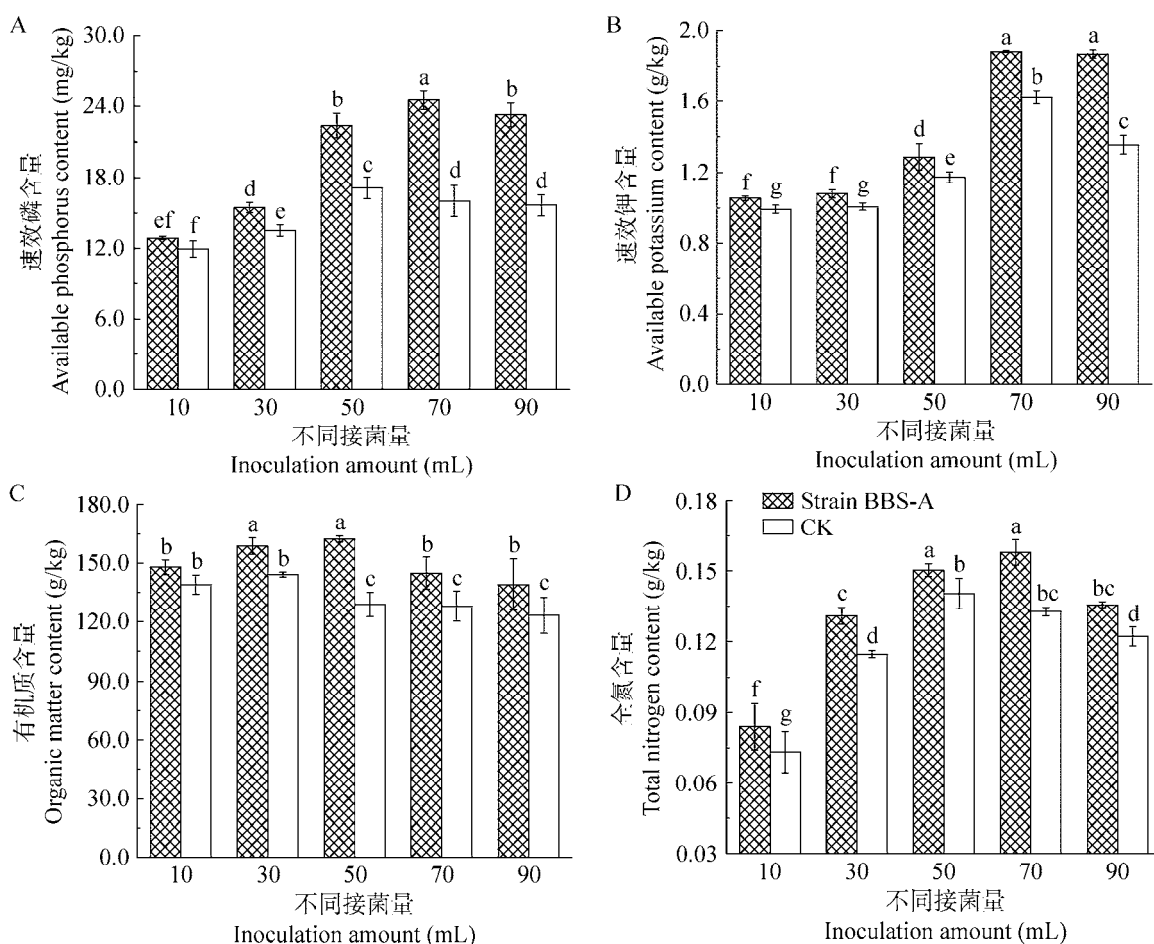


图6 接种量对活化处理后煤矸石养分含量影响 A-D:依次代表不同接菌量活化后煤矸石的速效磷、速效钾、有机质、全氮含量。

Figure 6 The effect of inoculation amount on the nutrient content of coal gangue after activation treatment. A-D sequentially represent the contents of available phosphorus, available potassium, organic matter, and total nitrogen in coal gangue activated under varying bacterial inoculation amounts.

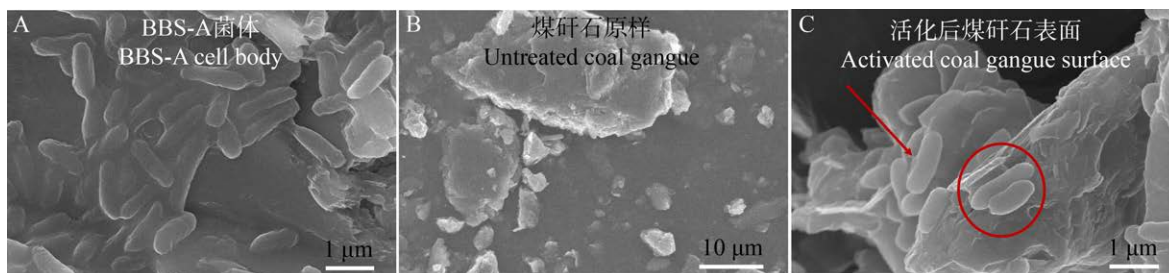


图7 菌株及活化前后煤矸石表面扫描电镜观察 A: BBS-A 菌株; B: 活化前煤矸石表面; C: 菌液活化后煤矸石表面。

Figure 7 Scanning electron microscopy (SEM) observations of the strain and coal gangue surfaces before and after activation. A: BBS-A strain; B: Surface of coal gangue before activation; C: Surface of coal gangue after activation with bacterial inoculum.

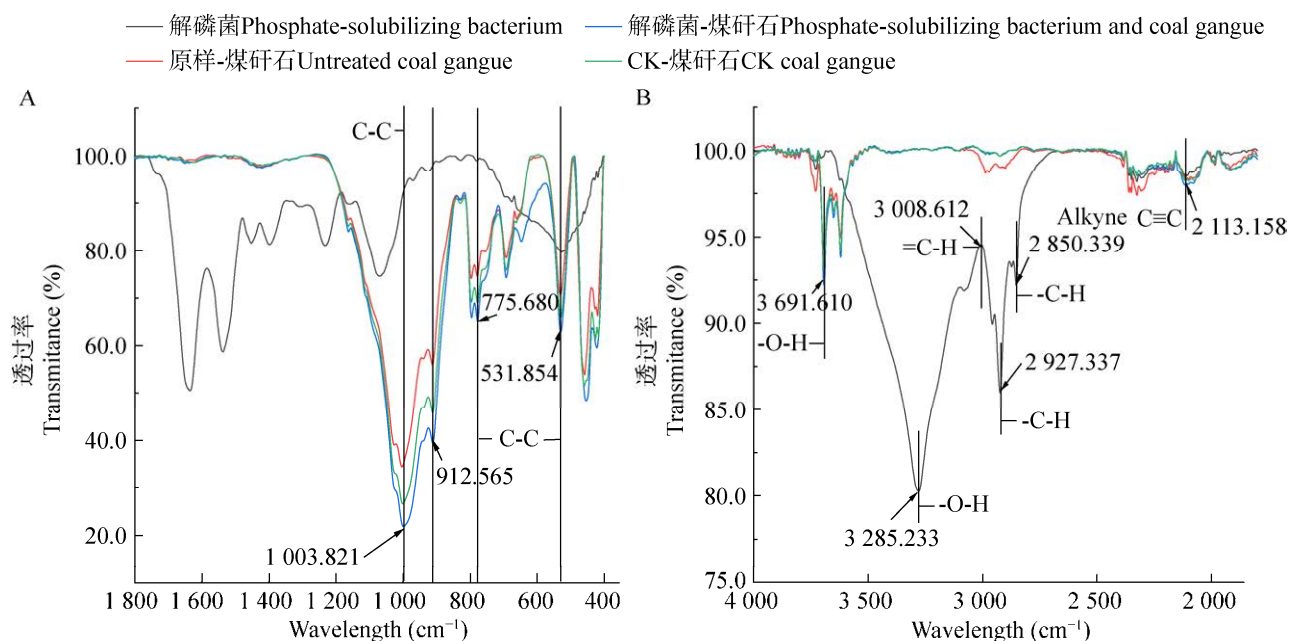


图8 菌株BBS-A及煤矸石活化样品的FT-IR分析 A:波长400–1 800 cm^{-1} 范围煤矸石及菌株FT-IR分析; B: 波长1 800–4 000 cm^{-1} 范围煤矸石及菌株FT-IR分析。

Figure 8 FT-IR analysis of strain BBS-A and coal gangue activated samples. A: FT-IR analysis of coal gangue and microbial strains in the wavenumber range of 400–1 800 cm^{-1} ; B: FT-IR analysis of coal gangue and microbial strains in the wavenumber range of 1 800–4 000 cm^{-1} .

3 讨论

3.1 解磷菌的筛选鉴定

解磷微生物的分布对植物吸收利用磷元素具有显著增强作用, 研究报道解磷菌能够通过活化煤矸石促进有效磷元素的释放增加植物生产力^[30], 目前从煤矸石筛选出的解磷菌有巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)^[31]、假单胞菌(*Pseudomonas*)^[32]、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)^[33]等。研究表明从矿物和土壤植物中均可以分离出具有解磷能力的假单胞菌, Safari 等^[34]研究恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和基尔假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*)以不同磷源为参照物溶解磷酸三钙和羟基磷灰石的能力, 结果表明2种细菌对磷酸三钙的解磷能力大于羟基磷灰石。Khan 等^[35]分离的假单胞菌对磷酸盐溶解度达到195.42 $\mu\text{g/mL}$, 接种解磷菌的番茄的根长度较对照组更长、叶绿素总量增

加, 同时观察到植物幼苗磷、蛋白质、钙等含量提高。本研究从煤矸石表面经过初筛和复筛, 筛选出一株高效解磷菌, 分子生物学鉴定为基尔假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*) BBS-A。相较于其他研究报道的解磷菌, 首先, 本研究的 D/d 为3.77, 高于一般报道的2.0–3.5范围^[36], 表明该菌株在难溶性有机磷固体培养基上具有较强的解磷效果。其次, 该菌株在培养24 h的 OD_{600} 值为1.70, 相关研究菌株培养24 h的 OD_{600} 值在1.2–1.5范围^[37], 结果表明, 假单胞菌在相同时间内能更好地增殖, 具有较强的代谢活性, 有助于加速磷酸酶的分泌, 进一步促进煤矸石中难溶性磷的释放, 从而提高解磷效率。根据解磷细菌的溶磷机理各项研究发现, 其溶解矿物磷酸盐的主要机制是分泌有机酸、酸性磷酸酶等根系分泌物^[38], 从而降低根际土壤pH, 释放难溶性磷, 提高植物可吸收利用的速效磷含量。刘辉等^[39]探索假单胞菌的解磷机制中通过

分泌主要物质草酸促进煤矸石养分释放。本试验采用煤矸石呈碱性, pH 8.63, 随着浸泡时间延长, 解磷菌活化作用煤矸石, 4 株菌与煤矸石混合培养 3 d 后反应液 pH 增加至 8.77 左右。研究资料表明, 假单胞菌属(*Pseudomonas*) 是主要的解磷菌, 同时是解磷能力较强的菌属, 广泛存在于自然界中^[40], 研究结果分析该菌株能够高效活化煤矸石。

3.2 解磷菌对煤矸石养分活化效果影响

研究表明, 利用解磷细菌处理煤矸石可提高其养分含量并促进植物生长。孔涛等^[41]研究发现菌剂混施处理不同粒径煤矸石基质种植的首蓿, 能够显著提升紫花苜蓿的生长指标和不同粒径基质养分含量。Zhu 等^[42]从煤矸石上分离出一株菌 YZ1, 鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌, 能够溶解煤矸石中的含磷矿物, 此过程中煤矸石发生矿物相转变形成稳定的羟基磷灰石, 并且煤矸石中的磷、钾、硅元素经过 YZ1 菌液浸泡处理后随煤矸石粒径减少而增加。本文研究条件优化结果表明, 100 目粒径煤矸石经菌液活化处理后, 煤矸石速效磷含量最高, 这与上述研究学者关于解磷菌活化不同煤矸石粒径的养分含量变化趋势结果一致, 煤矸石粒径越小养分含量越高, 说明煤矸石基质粒径越小, 煤矸石的比表面积大, 越有利于微生物附着, 微生物更有利于活化煤矸石, 总体而言, 孔隙较小粒径煤矸石的保水性能优于大粒径煤矸石基质。

将煤矸石作为微生物改性材料, 是煤矸石资源化利用的有效手段。盛定红等^[43]利用筛选出的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)处理煤矸石制备煤矸石肥料, 解离后的煤矸石速效磷含量是原煤矸石的 20.74 倍。研究表明解磷菌以煤矸石中的含铁矿物作为食物来源^[44], 分泌有机酸促进煤矸石中营养元素的释放^[45], 并且分解产生的铁氧化物含量随着菌体数量增加覆盖在煤矸石表面, 随着添加菌液浓度增加煤矸石中速效磷、钾、硅含量增加。本研究中筛选出的

菌株 BBS-A 在对煤矸石的解磷活化过程中表现出了显著的优势, 在煤矸石处理后的速效磷含量提升了 99.91% (活化煤矸石总磷含量的 0.39%), 这些结果表明, 假单胞菌在煤矸石的解磷效率上明显优于其他菌株, 并且其能够显著提高煤矸石中可利用的磷源, 从而为植物的生长提供更多养分。

研究表明, 在相同煤矸石添加量的条件下, 随着假单胞菌接种量由 10 mL 增加至 70 mL, 与煤矸石相互作用菌体数量相应增加, 从而增强了菌株对煤矸石养分的活化效果, 随着接种量增加至 90 mL, 活化后煤矸石速效钾和有机质含量与接种量 70 mL 之间差异不显著, 接种量过高或过低均影响解磷菌对煤矸石活化作用。这与 Hu 等^[46]研究结果一致, 微生物可以通过疏水与静电相互作用吸附在煤颗粒表面, 并且菌液添加量过多, 活化煤矸石效果减弱。Zhu 等^[47]研究解磷菌实现煤矸石中铅的固定发现, 主要是由于解磷菌分泌有机酸等代谢产物与煤矸石含磷矿物反应生成富含铅离子的磷酸盐沉淀, 促进煤矸石磷释放的同时固定铅离子。Yang 等^[48]研究发现不同煅烧温度、煅烧时间改性后的煤矸石具有较强的乙基硫醇吸附性能, 随着煅烧温度的不同, 煤矸石的 C-O 和 C=O 含量均发生不同程度的变化。谭诗咏等^[49]采用 SEM、Zeta 电位、FT-IR 表征分析表明解磷菌菌株与煤矸石存在电位差、C=O 等官能团, 通过静电作用与煤矸石中容易发生静电吸附的金属离子铝离子和铁离子产生吸附。这与本研究 SEM、FT-IR 分析结果相符。因此, 从煤矸石表面筛选高效解磷菌能够促进煤矸石养分的活化, 为微生物活化煤矸石技术提供理论依据, 后续实验将对“解磷菌-煤矸石-植物”联合生态修复效果进行综合研究, 探讨假单胞菌在活化煤矸石养分的同时如何促进植物生长和营养物质的吸收, 从而全面评估解磷假单胞菌在煤矸石养分活化和植物生长促进中的应用潜力。

4 结论

(1) 从风化煤矸石表面筛选出高效解磷菌 BBS-A 能够活化煤矸石养分, 活化后的煤矸石速效磷含量高达 22.39 mg/kg, 该解磷菌对煤矸石速效磷、速效钾、有机质、全氮含量均有不同程度的提高, 100 目粒径煤矸石、添加菌液量 70 mL (煤矸石:接种量固液比=1:7)时, 养分活化效果最佳。

(2) 通过利用 SEM 观察菌株 BBS-A 成功吸附在煤矸石表面, 煤矸石本身的多孔性结构更有利于菌株附着, 细菌活化处理改变煤矸石物理性质。解磷菌 BBS-A 含有 C-H 官能团, 其官能团的强度大和弱电极性使菌株更易于稳定地吸附在煤矸石表面。这些表征为菌株活化利用煤矸石提供了理论依据。

作者贡献声明

孙爱娣: 负责实验实施、数据整理与分析、论文撰写与修改; 白雪蕊: 负责数据处理和结果分析、论文润色修改; 毕银丽: 负责研究设计、经费支持、论文指导与润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] LI YF, LIU SH, GUAN XM. Multitechnique investigation of concrete with coal gangue[J]. Construction and Building Materials, 2021, 301: 124114.
- [2] LUO YF, ZHAO XC, ZHANG K. Coal gangue in asphalt pavement: a review of applications and performance influence[J]. Case Studies in Construction Materials, 2024, 20: e03282.
- [3] CHEN JX, GUAN X, ZHU MY, GAO J. Mechanism on activation of coal gangue admixture[J]. Advances in Civil Engineering, 2021, 2021(1): 5436482.
- [4] QIU JS, ZHU MY, ZHOU YX, GUAN X. Effect and mechanism of coal gangue concrete modification by fly ash[J]. Construction and Building Materials, 2021, 294: 123563.
- [5] ZHENG QW, ZHOU Y, LIU X, LIU M, LIAO LB, LV GC. Environmental hazards and comprehensive utilization of solid waste coal gangue[J]. Progress in Natural Science: Materials International, 2024, 34(2): 223-239.
- [6] SHAO ZL, YANG T, DENG R, SHAO HW. Monitoring burning coal gangue dump based on the 3-D thermal infrared model[J]. IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing, 2024, 17: 8979-8995.
- [7] LIU HQ, XU Q, WANG QH, ZHANG YZ. Prediction of the elastic modulus of concrete with spontaneous-combustion and rock coal gangue aggregates[J]. Structures, 2020, 28: 774-785.
- [8] ZHU Q, HU ZQ, RUAN MY. Characteristics of sulfate-reducing bacteria and organic bactericides and their potential to mitigate pollution caused by coal gangue acidification[J]. Environmental Technology & Innovation, 2020, 20: 101142.
- [9] XIE SR, PAN H, GU WZ, ZHU L, YUE D, CHEN DD, SONG TQ, JIANG ZS. Technology and engineering test of filling goaf with coal gangue slurry[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 20536.
- [10] GUAN X, CHEN JX, ZHU MY, GAO J. Performance of microwave-activated coal gangue powder as auxiliary cementitious material[J]. Journal of Materials Research and Technology, 2021, 14: 2799-2811.
- [11] LIU JH, HOU H, ZHAO L, SUN ZJ, LI H. Protective Effect of foliar application of sulfur on photosynthesis and antioxidative defense system of rice under the stress of Cd[J]. Science of the Total Environment, 2020, 710: 136230.
- [12] ZHANG JQ, HE X, YANG K, WEI Z, ZHAO XY, FANG JJ. Diffusion law of coal gangue slurry and the application of fluidized filling technology of gangue in caving area[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 13226.
- [13] BHAT MA, MISHRA AK, SHAH SN, BHAT MA, JAN S, RAHMAN S, BAEK KH, JAN AT. Soil and mineral nutrients in plant health: a prospective study of iron and phosphorus in the growth and development of plants[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2024, 46(6): 5194-5222.
- [14] PAN L, CAI BY. Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects[J]. Microorganisms, 2023, 11(12): 2904.
- [15] ZHOU JM, FU YS, PAN SW. The use of modified coal gangue for the remediation and removal of phosphorus in an enclosed water area[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2021, 23(4): 1327-1339.
- [16] YE TT, MIN XY, JIANG XZ, SUN MY, LI XJ. Adsorption and desorption of coal gangue toward available phosphorus through calcium-modification with different pH[J]. Minerals, 2022, 12(7): 801.
- [17] BENBRIK B, ELABED A, EL MODAFAR C, DOUIRA A, AMIR S, FILALI-MALTOUF A, EL ABED S, EL GACHTOULI N, MOHAMMED I, KORAICHI SI. Reusing phosphate sludge enriched by phosphate solubilizing bacteria as biofertilizer: growth

- promotion of *Zea Mays*[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 30: 101825.
- [18] RAWAT P, DAS S, SHANKHDHAR D, SHANKHDHAR SC. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21(1): 49-68.
- [19] WANG CQ, XUE L, JIAO RZ. Soil phosphorus fractions, phosphatase activity, and the abundance of *phoC* and *phoD* genes vary with planting density in subtropical Chinese fir plantations[J]. *Soil and Tillage Research*, 2021, 209: 104946.
- [20] PANG F, LI Q, SOLANKI MK, WANG Z, XING YX, DONG DF. Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1383813.
- [21] 巩文辉, 朱晓波, 李望, 张传祥. 煤矸石原生菌溶磷效果分析及产酸性性能优化[J]. *煤炭科学技术*, 2023, 51(S1): 449-460.
- GONG WH, ZHU XB, LI W, ZHANG CX. Analysis of phosphate dissolving effect and optimization of acid producing capacity of coal gangue protobacteria[J]. *Coal Science and Technology*, 2023, 51(S1): 449-460 (in Chinese).
- [22] UNNIKRISHNAN BV, BINITHA NK. Positive effect of inoculation with an *Aspergillus* strain on phosphorus and iron nutrition plus volatile organic compounds in rice[J]. *Folia Microbiologica*, 2024, 69(4): 865-874.
- [23] YU HY, WU XQ, ZHANG GZ, ZHOU FY, HARVEY PR, WANG LL, FAN SS, XIE XY, LI F, ZHOU HZ, ZHAO XY, ZHANG XJ. Identification of the phosphorus-solubilizing bacteria strain JP233 and its effects on soil phosphorus leaching loss and crop growth[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 892533.
- [24] WANG YY, LIU MW, DI ZT, CAO WL, HE SH. Feasibility analysis of bacterial-treated coal gangue for soil improvement: growth-promoting effects of alfalfa[J]. *Minerals*, 2024, 14(7): 676.
- [25] XU C, KUANG SP, HE L, WANG CX, ZU YQ. Effects of changing restoration years on soil nutrient traits and plant community diversity in a phosphate mining area[J]. *Forests*, 2023, 14(7): 1468.
- [26] 张晗昱, 李丹丹, 郑瑾, 樊金娟, 王清威, 杜显元, 任金蔓, 宋权威, 吴慧君, 谢加才. 青藏高原多年冻土区解磷菌筛选及抗逆能力评价[J]. *微生物学报*, 2024, 64(6): 1876-1890.
- ZHNG HY, LI DD, ZHENG J, FAN JJ, WANG QW, DU XY, REN JM, SONG QW, WU HJ, XIE JC. Screening of phosphorus-solubilizing strains with stress tolerance in the permafrost region of the Qinghai-Xizang Plateau[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(6): 1876-1890 (in Chinese).
- [27] ZHANG F, LIU J, JIANG L, ZHENG YB, YU LJ, DU LC. Production of the siderophore lysochelin in rich media through maltose-promoted high-density growth of *Lysobacter* sp. 3655[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1433983.
- [28] 高威, 左振宇, 李凌凌, 周圣玉, 聂静雨, 陈慧雯. 一株高效解磷菌的筛选鉴定及溶磷性能[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(9): 3873-3889.
- GAO W, ZUO ZY, LI LL, ZHOU SY, NIE JY, CHEN HW. Isolation, identification, and characterization of a phosphate-solubilizing bacterial strain[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(9): 3873-3889 (in Chinese).
- [29] SHAHID M, AHMED W, KHAN AB, SHAMS ZI, ARIF A. Identification of bacterial community in a rapid composting method using 16S rDNA genes sequencing[J]. *Biodegradation*, 2024, 35(4): 361-370.
- [30] LI HP, HAN QQ, LIU QM, GAN YN, RENSING C, RIVERA WL, ZHAO Q, ZHANG JL. Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability[J]. *Microbiological Research*, 2023, 272: 127375.
- [31] ZHONG J, HU XW, LIU XY, CUI XL, LV Y, TANG CY, ZHANG MJ, LI HX, QIU L, SUN WM. Isolation and identification of uranium tolerant phosphate-solubilizing *Bacillus* spp. and their synergistic strategies to U(VI) immobilization[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 676391.
- [32] GÖTZE S, STALLFORTH P. Structure, properties, and biological functions of nonribosomal lipopeptides from pseudomonads[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(1): 29-54.
- [33] 王应兰. 解磷微生物细菌的筛选、鉴定及其制备肥料的研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2020.
- WANG YL. Study on Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria and preparation of fertilizers[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2020 (in Chinese).
- [34] SAFARI M, MOTAMED E, KARI DOLATABAD H, ALI MOHAMMAD MODARRES SANAVY S. Nano-carriers effects on the viability and efficiency of *Pseudomonas* strains as phosphate solubilizing bacteria[J]. *Heliyon*, 2020, 6(10): e05076.
- [35] KHAN I, ZADA S, RAFIQ M, SAJJAD W, ZAMAN S, HASAN F. Phosphate solubilizing epilithic and endolithic bacteria isolated from clastic sedimentary rocks, Murree lower Himalaya, Pakistan[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(6): 332.
- [36] WANG YY, LI PS, ZHANG BX, WANG YP, MENG J, GAO YF, HE XM, HU XM. Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability[J]. *BioResources*, 2020, 15(2): 2560-2578.
- [37] WANG ZH, ZHANG HH, LIU L, LI SJ, XIE JF, XUE X, JIANG Y. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 296.
- [38] TIMOFEEVA AM, GALYAMOVA MR, SEDYKH SE. Plant growth-promoting soil bacteria: nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities[J]. *Plants*, 2023, 12(24): 4074.

- [39] 刘辉, 吴小芹, 叶建仁, 陈丹. 荧光假单胞菌的溶磷机制及其在杨树菌根际的定殖动态[J]. 林业科学, 2021, 57(3): 90-97.
LIU H, WU XQ, YE JR, CHEN D. Phosphate-dissolving mechanisms of *Pseudomonas fluorescens* and its colonizing dynamics in the mycorrhizosphere of poplars[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(3): 90-97 (in Chinese).
- [40] BAI K, WANG W, ZHANG J, YAO P, CAI C, XIE Z, LUO L, LI T, WANG Z. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and biochar application on phosphorus availability and tomato growth under phosphorus stress[J]. BMC Biology, 2024, 22(1): 211.
- [41] 孔涛, 张开, 黄丽华, 狄军贞, 王翼翔, 张加良. 菌剂混施对各粒径矸石性质及苜蓿生长的影响[J]. 煤炭学报, 2023, 48(S1): 241-251.
KONG T, ZHANG K, HUANG LH, DI JZ, WANG YX, ZHANG JL. Effects of mixed application of microbial agents on growth and substrate properties of alfalfa in coal gangue matrix with different particle sizes[J]. Journal of China Coal Society, 2023, 48(S1): 241-251 (in Chinese).
- [42] ZHU XB, GONG WH, LI W, BAI XY, ZHANG CX. Reclamation of waste coal gangue activated by *Stenotrophomonas maltophilia* for mine soil improvement: Solubilizing behavior of bacteria on nutrient elements[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 320: 115865.
- [43] 盛定红, 张景宁, 李小军, 杜鑫, 谢承卫. 煤矸石肥料的制备及应用研究[J]. 应用化工, 2023, 52(3): 960-963, 967.
SHENG DH, ZHANG JN, LI XJ, DU X, XIE CW. Study on preparation and application of coal gangue fertilizer[J]. Applied Chemical Industry, 2023, 52(3): 960-963, 967 (in Chinese).
- [44] GUAN X, LIU YJ, ZHANG XD, HOU X, YANG HS. Enhancement mechanism of microbial mineralization modified coal gangue aggregate properties[J]. Construction and Building Materials, 2024, 440: 137477.
- [45] LV Y, LI J, YE HP, DU DY, SUN P, MA MY, ZHANG TC. Bioleaching of silicon in electrolytic manganese residue (EMR) by *Paenibacillus mucilaginosus*: impact of silicate mineral structures[J]. Chemosphere, 2020, 256: 127043.
- [46] HU PF, LIANG L. The role of hydrophobic interaction in the heterocoagulation between coal and quartz particles[J]. Minerals Engineering, 2020, 154: 106421.
- [47] ZHU XB, GONG WH, LI W, ZHANG CX. Fixating lead in coal gangue with phosphate using phosphate-dissolving bacteria: Phosphorus dissolving characteristics of bacteria and adsorption mechanism of extracellular polymer[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 458: 131923.
- [48] YANG K, HU LF, ZHU JC, LUO ZG, ZHANG Z, HE J, CHEN XY. Adsorption performance of calcined coal gangue for ethyl mercaptan[J]. Energy Sources, 2023, 45(2): 4050-4063.
- [49] 谭诗咏, 邓敏, 程蓉, 舒荣波, 魏紫静, 杨刚. 解磷细菌强化煤矸石肥力及影响因素研究[J]. 环境污染与防治, 2022, 44(10): 1318-1324, 1367.
TAN SY, DENG M, CHENG R, SHU RB, WEI ZJ, YANG G. Study on enhancing the fertility of coal gangue by phosphate-solubilizing bacteria and its influencing factors[J]. Environmental Pollution & Control, 2022, 44(10): 1318-1324, 1367 (in Chinese).