

高效解硅菌的分离鉴定及其促生能力

张成凯¹, 蒙悦¹, 殷志秋¹, 康耀卫², 苑莹³, 王丹丹^{*1}, 解志红^{*1}

1 山东农业大学资源与环境学院土肥资源高效利用国家工程研究中心, 山东 泰安 271018

2 康生元(肇庆)生物科技有限公司, 广东 肇庆 526000

3 河北萌帮水溶肥料股份有限公司, 河北 石家庄 050000

张成凯, 蒙悦, 殷志秋, 康耀卫, 苑莹, 王丹丹, 解志红. 高效解硅菌的分离鉴定及其促生能力[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4740-4751

Zhang Chengkai, Meng Yue, Yin Zhiqiu, Kang Yaowei, Yuan Ying, Wang Dandan, Xie Zhihong. Isolation, identification, and growth-promoting ability of efficient silicate-solubilizing strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4740-4751

摘要:【背景】硅具有提高作物抗逆性、提高产量及改善品质的能力而被广泛报道, 但传统施肥对硅肥的忽略使耕地土壤有效硅含量不断降低, 因此建立高效提高土壤有效硅的方式尤为重要。

【目的】土壤中有效硅的含量影响作物对硅的吸收利用, 通过施用具有解硅能力的土壤微生物实现土壤有效硅的持续活化, 不仅对作物产量和品质有重要意义, 同时也可减少化肥的施用。【方法】利用选择培养基进行土壤解硅菌的富集、分离纯化, 并测定其解硅能力、耐盐碱性、耐低氧性、解磷、解钾、解纤维素能力; 利用孔雀绿染色及沙黄溶液复染法测定高效解硅菌芽孢形成率, 最后通过盆栽试验探究高效解硅菌株对玉米的促生作用。【结果】筛选获得 2 株高效解硅菌, 分别为菌株 MB22 及 MB35-5, 16S rRNA 基因序列测定鉴定为 *Priestia aryabhatai*。培养液有效硅浓度分别为空白处理的 1.5 倍和 1.7 倍, 为对照菌株胶质类芽孢杆菌 *Paenibacillus mucilaginosus* 3016 处理的 1.1 倍和 1.2 倍。2 株高效解硅菌表现出较好的耐盐碱性, MB35-5 功能最强, 在 pH 10.0、10% NaCl、10% KNO₃ 条件下培养液有效硅浓度为 0.28–0.37 mmol/L。MB22 和 MB35-5 产芽孢率分别为 68% 和 55%, 分别为对照菌株 3016 的 1.69 倍和 1.37 倍。MB35-5 对磷、钾和纤维素都有一定的活化利用能力。盆栽试验表明, 2 株菌均显著提升了玉米株高及根系干重, 其中 MB35-5 促生效果最好, 平均株高是空白处理的 1.39 倍, 是对照菌株 3016 处理的 1.14 倍, 根系干重为空白处理的 1.37 倍, 是对照菌株 3016 处理的 1.24 倍。【结论】筛选得到 2 株高效解硅菌 MB22 和 MB35-5, 其中高芽孢率的 MB35-5 还具有解磷、解钾、降解纤维素和促生功能, 同时具备耐盐碱、耐低氧

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1002702); 山东省重点研发计划(2021CXGC010804); 山东省自然科学基金(ZR2021QC175, ZR2021QC208)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFD1002702); Key Research and Development Program of Shandong Province (2021CXGC010804); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QC175, ZR2021QC208)

*Corresponding authors: E-mail: WANG Dandan: wangddnan@163.com; XIE Zhihong: zhxie@yic.ac.cn

Received: 2022-04-11; Accepted: 2022-05-20; Published online: 2022-06-30

等抗逆性, 表明该菌株具有进一步试验和研发的潜势。

关键词: 解硅细菌; 芽孢杆菌; 耐盐碱细菌; 芽孢形成率; 促生

Isolation, identification, and growth-promoting ability of efficient silicate-solubilizing strains

ZHANG Chengkai¹, MENG Yue¹, YIN Zhiqiu¹, KANG Yaowei², YUAN Ying³,
WANG Dandan^{*1}, XIE Zhihong^{*1}

1 National Engineering Research Center for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

2 Kangshengyuan (Zhaoqing) Biotechnology Limited Company, Zhaoqing 526000, Guangdong, China

3 Hebei Mengbang Water Soluble Fertilizer Limited Company, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Abstract: [Background] Silicon, which improves the stress resistance, yield, and quality of crops, has been widely reported. However, the conventional neglect of silicon fertilizer results in the continuous decrease in the content of available silicon in arable land. Therefore, it is an urgent task to raise the content of soil available silicon. **[Objective]** The content of available silicon in soil affects the absorption and utilization of silicon by crops. Silicate-solubilizing microorganisms can continuously activate available silicon in soil, which helps improve crop yield and quality and reduce the application rate of chemical fertilizer. **[Methods]** Selective media were used for the enrichment, isolation, and purification of soil silicate-solubilizing strains, and the silicate-solubilizing ability, saline-alkaline tolerance, low-oxygen tolerance, phosphate-solubilizing ability, potassium-releasing ability, and cellulose-degrading ability were determined. With malachite green as the primary stain and safranin as counterstain, the spore yield of high-efficiency silicate-solubilizing strains was measured. Finally, the maize growth-promoting ability of efficient silicate-solubilizing strains was investigated through pot experiment. **[Results]** Two efficient silicate-solubilizing strains were obtained, MB22 and MB35-5. They were identified as *Priestia aryabhatai* by 16S rRNA sequencing, and the concentration of available silicon in the culture of them was 1.5 and 1.7 folds that of the blank control, and 1.1 and 1.2 folds that of the control *Paenibacillus mucilaginosus* 3016, respectively. MB22 and MB35-5 showed high saline-alkaline tolerance, particularly MB35-5. Specifically, under the conditions of pH 10, 10% NaCl, and 10% KNO₃, the concentration of available silicon in the culture of MB35-5 was 0.28–0.37 mmol/L. The spore yield of MB22 and MB35-5 was 68% and 55%, respectively, 1.69 folds and 1.37 folds of the control strain, respectively. MB35-5 had phosphate-solubilizing ability, potassium-releasing ability, and cellulose-degrading ability. Pot experiment showed that the two strains significantly increased the plant height and root dry weight of maize plants, especially MB35-5. To be specific, the average height of plants treated by MB35-5 was 1.39 times that of blank treatment and 1.14 times that of plants treated by control strain. The root dry weight of plants treated by MB35-5 was 1.37 times that of the blank treatment and 1.24 times that of plants treated by control strain 3016. **[Conclusion]** The silicate-solubilizing strains MB22 and MB35-5 were screened out. Among them, MB35-5 with high

spore yield also showed phosphate-solubilizing ability, potassium-releasing ability, cellulose-degrading ability, and growth-promoting function, as well as the saline-alkaline tolerance and low-oxygen tolerance. Thus, this strain should be further tested and developed.

Keywords: silicate-solubilizing strain; *Bacillus*; saline-alkaline-tolerant bacteria; spore yield; promoting plant growth

硅是地壳中含量最多且对植物生长有显著促进作用的有益元素^[1-2],已被很多报道证明可提高植物抵抗生物和非生物胁迫的能力^[3-5]。硅肥的施用不仅对玉米、水稻等粮食作物的产量及品质有显著的提高作用^[6-7],而且可降低大量元素肥料减施对粮食产量的影响^[8]。有研究表明,全球农作物每年可从土壤中吸收多达2.24亿t硅^[9],而硅在土壤中主要以不溶性硅酸盐的形式存在,植物从土壤或营养液中以 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 的形式吸收硅, $\text{Si}(\text{OH})_4$ 在溶液中的最大溶解度约为2 mmol/L,其在土壤溶液中的浓度通常在0.1–0.6 mmol/L之间^[10],这使得土壤有效硅补充尤为重要。市售硅肥有矿渣基硅酸盐肥料(硅酸钙肥料)、多孔水化硅酸钙、可溶性硅酸盐(如钠和钾硅酸盐),以及其他天然来源如硅灰石和橄榄石等,但对于大田作物生产仍存在高成本问题^[11]。硅灰石冶炼的副产品、铁矿和锰矿等相对廉价的资源正被用作硅肥,但仍存在环境污染问题。相比之下,高效硅酸盐细菌的开发与使用将提供更环保、经济、可持续的选择,以提高作物对硅的利用率,并最终提高农业产量。

硅酸盐细菌(silicate bacteria)是一类具有分解硅酸盐矿物能力的细菌的总称,包括伯克霍尔德菌(*Burkholderia eburnea*)^[11]、假真菌样芽孢杆菌(*Bacillus pseudomycooides*)^[12]、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)^[13]等。对于分解硅酸盐矿物的机制,主要有酸解^[14]、胞外大分子络合物^[15]等,硅酸盐细菌可分泌有机酸和无机酸降低介质微环境pH,通过质子对硅酸盐矿物

中阳离子的交换作用破坏矿物结构,进而实现对硅酸盐矿物的风化作用^[16-17]。硅酸盐细菌产生的胞外蛋白质、多糖可促进其在矿物表面附着,形成生物膜,进而促进细菌对矿物的风化^[18];除此之外,荚膜多糖还可通过吸附 SiO_2 来影响固相和液相平衡,从而加速 SiO_2 溶解,提高溶液有效硅含量^[18]。另外硅酸盐矿物的存在可诱导硅酸盐细菌的部分基因表达上调,这些基因可能与硅酸盐矿物的水解有关^[19]。有研究表明,硅酸盐细菌通过趋化作用或自由扩散到达矿物表面,进而附着在矿物表面,通过胞外聚合物形成生物膜,进而加速矿物溶解^[20]。在实际应用中,硅酸盐细菌的研究主要集中于对磷、钾元素的活化作用^[21-22]和对电解锰渣、钒钛磁铁矿土、铝土矿、煤矸石等的脱硅再利用^[23-25],对硅的活化及其对玉米生长的影响报道较少。胶质类芽孢杆菌是一类常见的硅酸盐细菌,具有促进植物生长的特性,被广泛用于农业生产^[26],对照菌株 *Paenibacillus mucilaginosus* 3016 作为胶质类芽孢杆菌的模式种,已被验证具有促生提高产量的作用^[27]。由此本实验旨在以胶质类芽孢杆菌 3016 为对照菌株,通过对土壤菌株的筛选,得到能够高效降解硅酸盐矿物的微生物菌株,并对其进行抗逆性和玉米促生能力研究,为该菌株的开发提供理论基础和菌种来源。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

样品于2020年5月取自山东省莱阳市和广东省茂名市农田。

1.2 玉米种子

玉米品种为郑丹 958。

1.3 培养基

LB 培养基用于细菌培养, 硅酸盐培养基用于解硅菌筛选^[28], 有机磷和无机磷培养基用于溶磷能力测定^[29], 羧甲基纤维素钠培养基用于降解纤维素能力测定^[30], 缺钾培养基用于解硅能力测定^[31]。

1.4 高效解硅菌的筛选与鉴定

1.4.1 菌株的富集与分离

来源于不同地区的土壤样品按 1% (质量体积分数) 接种于液体硅酸盐培养基中, 于 30 °C、180 r/min 条件下培养 3 d 后稀释涂布, 共设置 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 浓度梯度, 涂布于硅酸盐固体培养基, 30 °C 连续培养 3 d; 挑取可产生解硅圈的菌株, 反复划线分离纯化, 得到具有解硅能力的菌株。

1.4.2 解硅能力测定

水解圈试验。将筛选得到的菌株接种于硅酸盐固体培养基中, 设置细菌 3016 为阳性对照, 30 °C 培养 3 d, 冲洗掉菌落, 测定解硅圈的直径, 单位 mm, 并计算评价解硅能力。

解硅能力=解硅圈直径+ X

X 为加权系数, 根据菌株解硅圈的透明程度, 相应地为 -2、-1、0、1、2 钾长石降解试验。分别将对照菌株 3016 和筛选所得 2 株解硅菌接种至 LB 液体培养基中, 于 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 24 h, 得到种子液。吸取 100 μ L 种子液于 100 mL 解钾培养基中, 于 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 5 d。取上述培养液 4 °C、4 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液。通过硅钼蓝比色法^[32]测定培养液中有效硅含量。

1.4.3 菌株形态观察

将筛选所得菌株接种到 LB 培养基平板上, 30 °C 培养 48 h, 观察菌落的大小、形状、颜色、

光泽度、隆起形状、透明度和边缘特征等。

1.4.4 菌种鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化菌株的 DNA, 利用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。PCR 反应体系 (20 μ L): DNA 模板 1 μ L, $2\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 补充 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 70 s, 共 35 个循环。将 PCR 产物送睿博兴科生物技术(青岛)有限公司测序。将 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 进行同源性比较分析, 鉴定相似物种, 通过 MEGA 11.0 软件, 建立系统发育树。

1.5 菌株抗逆性测定

1.5.1 水解圈试验

菌株耐盐碱性能测定: 将 MB22、MB35-5 和对照菌株 3016 分别接种到条件为 pH 7.0、pH 10.0、5% NaCl、10% NaCl、5% KNO₃、10% KNO₃ (均为质量体积分数) 的硅酸盐固体培养基上 30 °C 培养 5 d, 观察菌株是否生长, 同时测定菌株在相应条件下的解硅能力, 按 1.4.2 中公式计算。

菌株耐缺氧性测定: 采用三菱瓦斯化学株式会社生产的二氧化碳和微需氧 Anaeropack, 将氧气浓度控制在 20%、15% 和 10%, 将 MB22、MB35-5 和对照菌株 3016 分别接种到硅酸盐固体培养基上, 于不同氧浓度的条件下 30 °C 培养 5 d, 测定菌株在缺氧条件下的生长情况及解硅能力。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The primers and sequences

| 引物名称 | 引物序列 | 引物长度 |
|--------|-------------------------|------------------|
| Primer | Primer sequence (5'→3') | Primer size (bp) |
| 27F | AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG | 20 |
| 1429R | GGTTACCTTGTTACGACTT | 19 |

1.5.2 钾长石摇瓶试验

调节解钾培养基 pH 为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 按 1.4.2 方法测定菌株在碱性条件下的解硅能力。

在解钾培养基中分别加入 5% NaCl、10% NaCl、5% KNO₃、10% KNO₃ (均为质量体积比), 按 1.4.2 方法测定菌株在盐胁迫下的解硅能力。

1.6 高效解硅菌促生效应测定

1.6.1 磷、钾降解能力测定

将筛选所得菌株分别接种至有机磷、无机磷和解钾培养基, 30 °C 培养 7 d, 观察透明圈产生情况。

1.6.2 纤维素降解能力测定

将所得菌株分别点种在 CMC-Na 固体培养基, 30 °C 培养 3 d。向长有菌落的平板上缓慢加入刚果红染液, 待刚果红染液全部浸没平板和菌株后, 静置染色 20 min, 缓慢吸出多余染液后, 缓慢加入生理盐水, 待全部浸没平板和菌株后, 静置 30 min, 缓慢吸出多余液体。观察透明圈产生情况。

1.7 芽孢形成率测定

将菌株培养 48 h 后置于 80 °C 环境中 15 min, 室温下冷却, 在无菌的条件下, 将洁净载玻片灼烧杀菌, 标识出标本区域, 滴加磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L、pH 7.2), 用接种环刮取 2-3 个菌落, 均匀地涂抹在磷酸盐缓冲液内, 晾干固定后, 滴 7.6% 孔雀绿溶液覆盖菌膜表面, 染色 15-20 min, 水洗脱色, 晾干后复染, 滴加 0.5% 沙黄溶液, 染色 2-3 min, 倾去染液后用水冲去染液并用滤纸吸干残液, 晾干即制成芽孢菌落标本。干燥后用油镜观察, 芽孢呈绿色, 芽孢囊及营养体为红色。观察至少 3 个视野, 计数每个视野中的芽孢数和细菌数, 记录并计算出芽孢数平均值(A)和细菌数平均值(B), 按照下式计算镜检芽孢率:

镜检芽孢率: $N=A/(A+B) \times 100\%$

式中: N : 样品的镜检芽孢率; A : 样品的镜检视野中芽孢数的平均值; B : 样品的镜检视野中细菌数的平均值。

1.8 玉米促生能力测定

取山东农业大学南校试验田的表层土, 于 101 kPa 高温高压灭菌 20 min 后分装 1 500 g 至花盆中; 用 70% (体积分数) 的酒精消毒玉米种子 3 min, 然后用 5% (有效氯含量, 体积分数) 的次氯酸钠溶液浸泡 3 min, 无菌蒸馏水冲洗种子 3 次, 在湿润的无菌滤纸平板上催芽后种植; 将对照菌株 3016、MB22 和 MB35-5 分别接种至 LB 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 24 h 后, 于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 2 min, 弃去上清液, 无菌水重悬至菌悬液 OD_{600} 值为 1, 每盆加入 15 mL 菌液, 分别记为 3016 组、MB22 组和 MB35-5 组。无菌处理组加入等量无菌水; 每 2 周灌溉 70 mL 霍格兰营养液, 每个处理设置 3 个重复; 培养 30 d 后从盆栽中取出完整玉米植株, 将植株表面残留土壤冲洗干净, 测定植株株高, 烘干后测量根系干重。

2 结果与分析

2.1 高效解硅菌的形态及其系统发育树特征

在 LB 固体培养基上生长 48 h, MB22 菌落呈圆形, 米黄色不透明, 表面光滑, 中央凸起, 边缘规则; 直径 1-2 mm。MB35-5 菌落呈现圆形, 米黄色不透明, 中央突起, 边缘规则, 直径 1-2 mm (图 1)。通过对其进行革兰氏染色可知 MB22 和 MB35-5 均为革兰氏阳性菌。

对 MB22 和 MB35-5 进行 16S rRNA 基因测序, 将 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 进行同源性比对分析, MB22 与 MB35-5 均与 *Priestia aryabhatai* 相似性大于 99%, 通过 MEGA 11.0 软件构建系统发育树(图 2)。

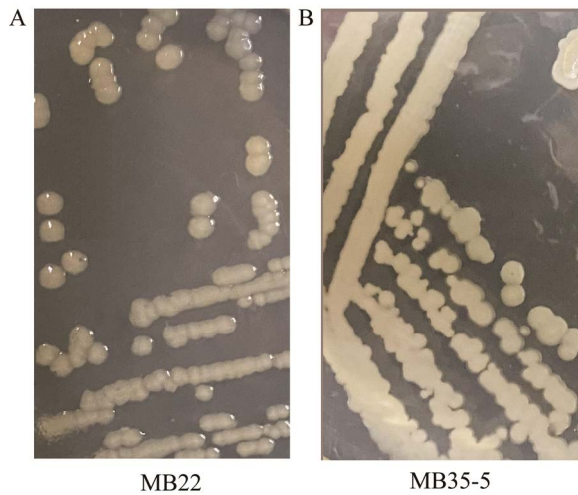


图1 MB22 (A)和MB35-5 (B)两株菌的菌落形态
Figure 1 Colony morphology of MB22 (A) and MB35-5 strains (B).

2.2 高效解硅菌的解硅能力

2.2.1 水解圈试验

通过富集与分离方法, 从土壤中筛选获得206株具有解硅功能的菌株, 测定解硅能力后获得2株高效解硅菌株, 即MB22和MB35-5(图3), 其解硅能力分别为6.5和4.5, 分别较对照菌株3016解硅能力2.0高225%和125%, 差异显著($P < 0.05$)。

pH 10.0条件下MB22和MB35-5的解硅能力分别为2.5和2.3; 菌株MB22在5% NaCl、10% NaCl、5% KNO₃和10% KNO₃条件下解硅能力分别为3.5、1.5、3和3, 菌株MB35-5分别为2.7、0.5、1和1, 10%氧浓度条件下MB22

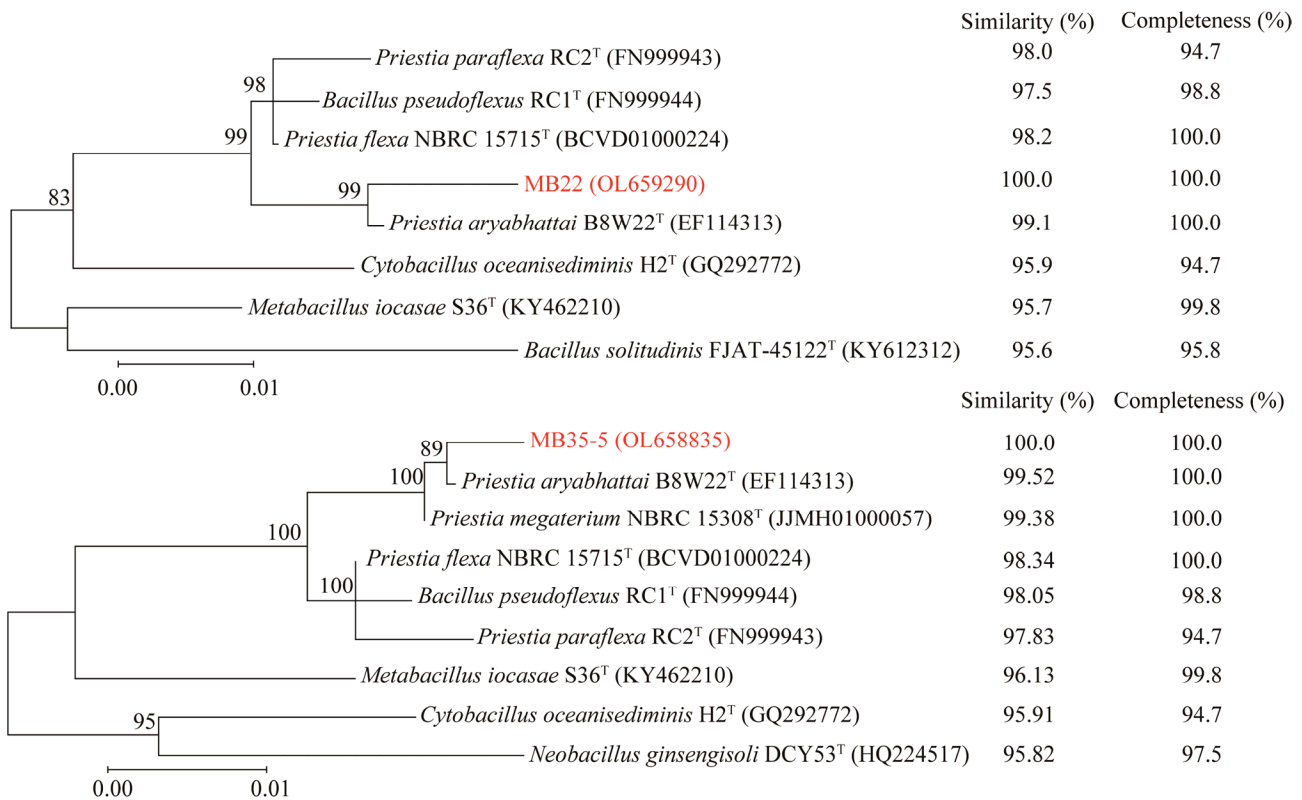


图2 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 分支处数值表示经邻接法1000次计算后构建进化树的bootstrap数值; 括号中序号表示菌株GenBank登录号

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence. The value at the branch represents the bootstrap value of the evolutionary tree constructed by the adjacency method after 1000 calculations. The serial number in parentheses indicates the GenBank accession No. of the strain.

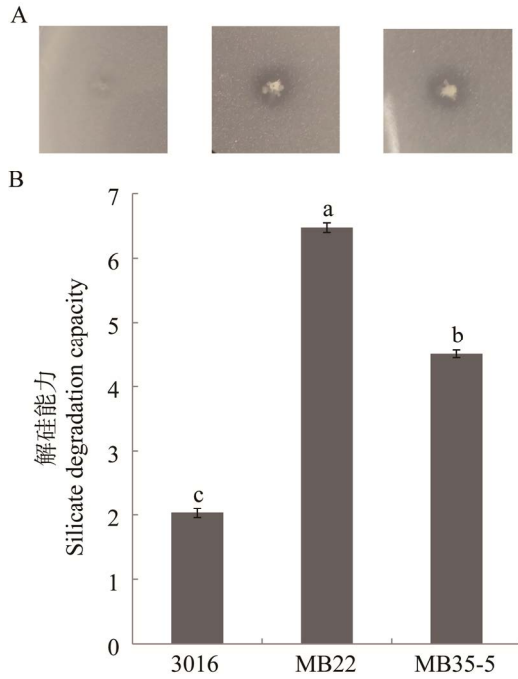


图3 硅酸盐培养基自然 pH 条件下各菌株解硅效果 A: 各菌株水解圈效果图; B: 各菌株解硅能力。不同小写字母表示差异显著。下同

Figure 3 Desilication effect of various strains under natural pH value of silicate medium. A: Effect diagram of hydrolytic cycle of each strain; B: Silicate degradation ability of each strain. Different lowercase letters indicate significant differences. The same below.

和 MB35-5 可正常生长, 其解硅能力分别为 1.5 和 1.5, 而对照菌株在上述条件下解硅能力均为 0 (图 4)。表明 MB22 和 MB35 均有较强的抗逆性。

2.2.2 钾长石硅活化能力

在 pH 7.0 条件下, MB22 和 MB35-5 均显著提高培养液的有效硅含量, MB35-5 效果最佳 (图 5), 培养液有效硅含量为 0.36 mmol/L, 为无菌对照组的 1.67 倍, 差异显著 ($P < 0.05$)。在碱性环境和盐胁迫条件下, MB22 和 MB35-5 均保持对钾长石的降解能力, MB35-5 效果最佳, 在 pH 10.0 条件下, 培养液有效硅含量为 0.32 mmol/L, 为无菌对照组的 1.22 倍, 差异显著 ($P < 0.05$); 在 10% NaCl 和 10% KNO₃ 的条件下

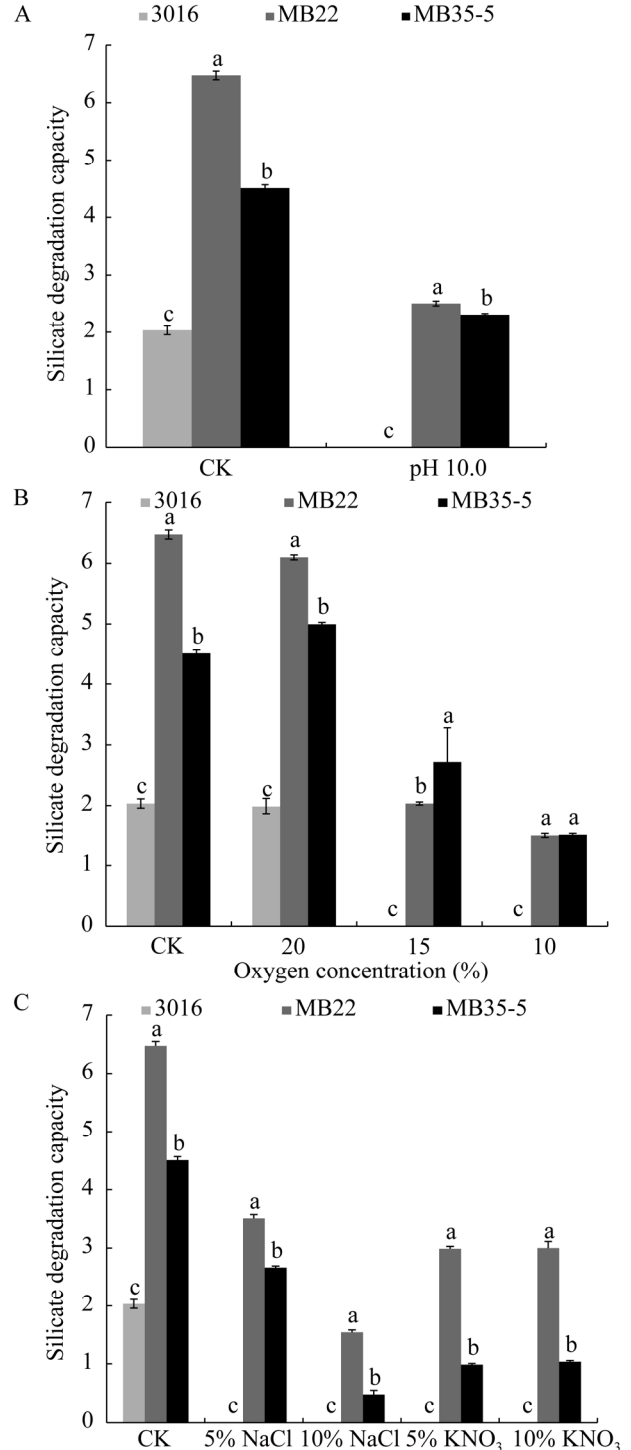


图4 各菌株在不同条件下的解硅能力 A: pH 值; B: 氧浓度; C: 盐浓度

Figure 4 The silicon dissociation ability of each strain under different conditions. A: pH values; B: Oxygen concentrations; C: Salt concentrations.

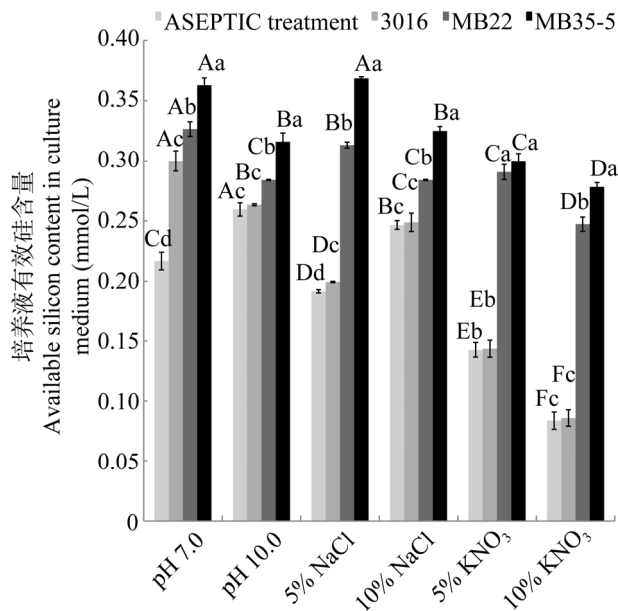


图 5 不同胁迫下培养液有效硅含量 大写字母表示不同胁迫处理间同一菌株处理的差异显著性($P<0.05$),小写字母表示同一胁迫处理下不同菌株处理的差异显著性($P<0.05$)

Figure 5 Available silicon content in culture medium under different stress. Uppercase letters represent the difference significance of the same strain treatment among different stress treatments ($P<0.05$), lowercase letters represent the difference significance of different strain treatment under the same stress treatment ($P<0.05$).

培养液有效硅含量为 0.32 mmol/L 和 0.28 mmol/L, 为无菌对照组的 1.32 倍和 3.31 倍, 差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 解硅菌磷、钾及纤维素降解能力

MB35-5 可降解钾长石, 证明其具有降解土壤中铝硅酸盐矿物的能力, 可释放其中钾元素; 同时在有机磷、无机磷和 CMC-Na 培养基中均可产生水解圈(图 6), 证明 MB35-5 具有一定的解磷和降解纤维素的功能; MB22 未出现水解圈。

2.4 解硅菌芽孢形成率

菌株 MB22 和 MB35-5 的芽孢率分别为 68.03% 和 55.12%, 较对照菌株 3016 芽孢率 40.36% 分别高 68.56% 和 36.57%, 差异显著 ($P<0.05$), 表明 MB22 和 MB35-5 具有较强的抗性。

2.5 高效解硅菌促进了玉米生长

MB22 和 MB35-5 对玉米株高和地下部干重均有显著的促进作用, 对照菌株 3016 对株高有显著的促进作用(图 7); 其中 MB35-5 的促进效果最好, 株高和地下部干重分别为 56.13 cm 和 81 g, 分别为无菌处理(CK)的 1.39 和 1.37 倍, 差异显著 ($P<0.05$), 分别为对照菌株 3016 处理的 1.14 倍和 1.24 倍, 差异显著 ($P<0.05$)。

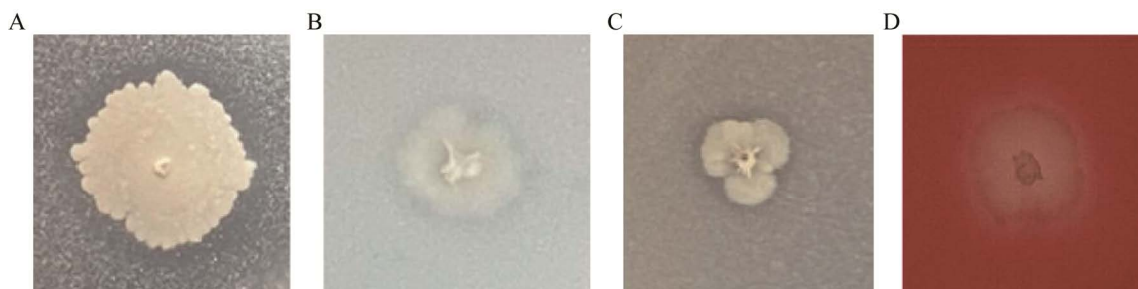


图 6 磷、钾及纤维素降解能力测定 A: 钾长石降解; B: 磷酸钙降解; C: 卵磷脂降解; D: 纤维素降解

Figure 6 Determination of phosphorus, potassium and cellulose degradation capacity. A: Degradation of potassium feldspar; B: Degradation of calcium phosphate; C: Degradation of lecithin; D: Degradation of cellulose.

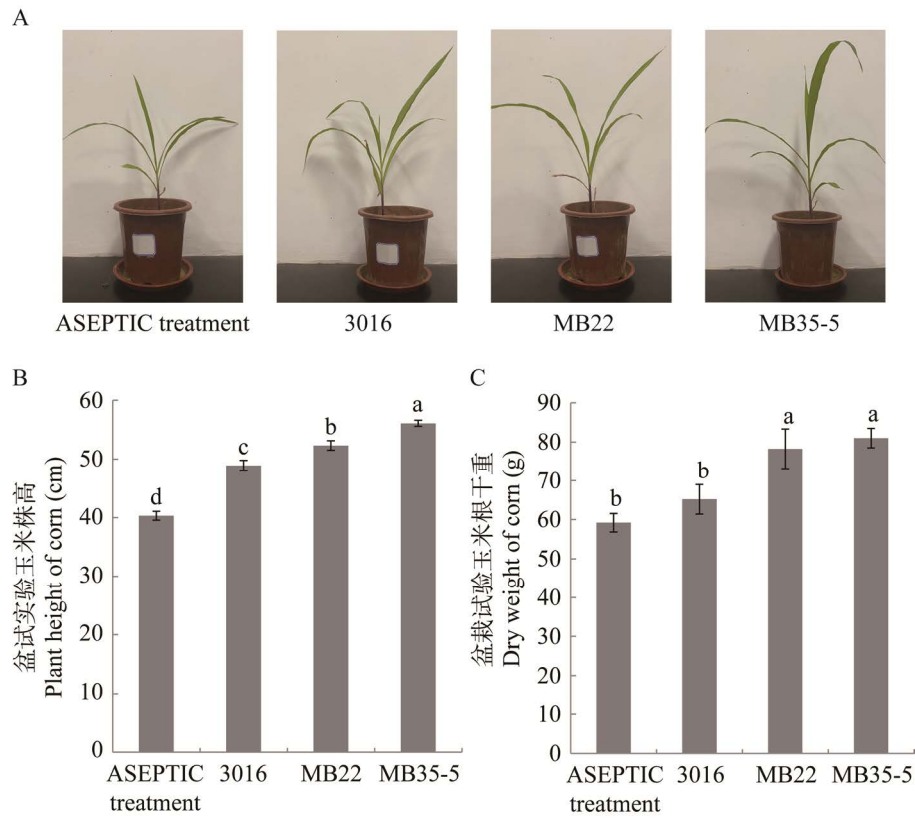


图 7 各菌株处理对玉米生长状况的影响 A: 玉米植株长势; B: 株高; C: 根干重

Figure 7 Effects of each strain treatment on maize growth . A: Growth status of maize plants; B: Plant height; C: Dry root weight.

3 讨论与结论

硅对提高植物产量品质、抗病抗逆等作用已经被广泛地报道^[33-34], 近期多项研究表明施用硅肥可提高玉米产量、提高抗逆性^[35-36]。自 2010 年起, 玉米成为我国播种面积最大的粮食作物, 在获得巨大产量的同时也伴随着化肥的大量使用^[37], 在农业可持续发展和减肥减药的政策背景下, 如何在保证产量的前提下减少化肥的投入成为近年来研究的热点。硅肥的使用可在一定范围内替代大量元素肥料的使用^[8], 但市售硅肥对于大田生产仍存在成本高、环境污染的特点, 同时叶面喷施硅肥效果也有待改善^[38]。植物根围促生菌也同样可一定程度上替

代化肥的作用, 并提高作物产量和抗逆性。通过微生物提高土壤硅活性, 从而促进玉米生长并减少化肥的使用, 对于我国农业可持续发展、保障粮食安全和生态环境具有非常重要的理论和应用价值。

在钾长石摇瓶实验中, 不接菌培养液中有一定的有效硅含量, 可能是矿物在振荡培养过程中通过碰撞而产生物理风化或硅氧四面体层间 K^+ 析出, 导致层间引力减小, 增加了游离硅的产生^[31]; pH 10.0 较中性条件下有效硅含量显著增加, 可能是在 pH 9.0–11.0 条件下, H_4SiO_4 分解为 H_3SiO_4 和 H_2SiO_4 , 增加了溶解度^[11], Na^+ 的增加可能与 H^+ 具有相似的增加交换性 K^+ 的产生作用, 从而降低硅氧四面体的层间引力,

增加游离硅含量; K^+ 的增加抑制了硅氧四面体间 K^+ 的析出, 从而降低游离硅含量^[39]。同时, 培养液中的可溶性 K^+ 可促进细菌的增殖, 从而促进对钾长石矿物的风化作用。本实验筛选所得菌株培养液 pH 在 7.0–9.0 之间, 其解硅特性可能来源于产生的胞外大分子物质, 吸附 SiO_2 或促进 K^+ 析出, 作用机制尚有待进一步研究; 同时, 其促进作物生长的作用可能由于增加了生长介质中活性硅含量, 相关机制及在生产中的实践应用还需进一步研究。

综上所述, 本研究筛选得到 2 株高效解硅菌 MB22 和 MB35-5, 其中高产芽孢率的菌株 MB35-5 还具有解磷、解钾、降解纤维素和促生功能, 同时抗逆性强, 耐盐碱、耐低氧, 表明该菌株具有进一步试验和研发的潜势, 后续我们将进一步进行田间试验, 以期为玉米生产提供优异的微生物菌剂。

REFERENCES

- [1] 刘春成, 李中阳, 胡超, 曾智, 吴海卿, 崔丙健, 樊向阳, 刘源, 马欢欢, 马天, 等. 逆境条件下硅肥调控效应研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2021(4): 337-346
Liu CC, Li ZY, Hu C, Zeng Z, Wu HQ, Cui BJ, Fan XY, Liu Y, Ma HH, Ma T, et al. Advances in the regulation effects of silicon fertilizer under adversity stress[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2021(4): 337-346 (in Chinese)
- [2] 杨国英, 郭智, 盛婧, 王国栋, 王鑫, 陈留根. 不同生育时期施用硅肥对优质食味粳稻产量和品质的影响[J]. 中国稻米, 2021, 27(1): 68-74, 79
Yang GY, Guo Z, Sheng J, Wang GD, Wang X, Chen LG. Effects of silicon fertilizer applied at different stages on grain yield and quality of japonica rice with good eating quality[J]. China Rice, 2021, 27(1): 68-74, 79 (in Chinese)
- [3] Sohail ML, Zia Ur Rehman M, Rizwan M, Yousaf B, Ali S, Anwar ul Haq M, Anayat A, Waris AA. Efficiency of various silicon rich amendments on growth and cadmium accumulation in field grown cereals and health risk assessment[J]. Chemosphere, 2020, 244: 125481
- [4] Besharat S, Barão L, Cruz C. New strategies to overcome water limitation in cultivated maize: results from sub-surface irrigation and silicon fertilization[J]. Journal of Environmental Management, 2020, 263: 110398
- [5] Zhang MY, Riaz M, Liu B, Xia H, El-desouki Z, Jiang CC. Two-year study of biochar: achieving excellent capability of potassium supply via alter clay mineral composition and potassium-dissolving bacteria activity[J]. Science of the Total Environment, 2020, 717: 137286
- [6] 刘天昊, 张翼飞, 王怀鹏, 杨克军, 张津松, 孙逸珊, 肖珊珊, 徐荣琼, 杜嘉瑞, 李佳宇, 等. 叶面喷施硅肥对寒地玉米干物质积累分配及产量品质的调控效应[J]. 作物杂志, 2021(4): 112-117
Liu TH, Zhang YF, Wang HP, Yang KJ, Zhang JS, Sun YS, Xiao SS, Xu RQ, Du JR, Li JY, et al. Regulating effects of foliar spraying silicon fertilizer on dry matter accumulation and translocation, grain yield and quality of maize in cold region[J]. Crops, 2021(4): 112-117 (in Chinese)
- [7] 苏庆旺, 苍柏峰, 白晨阳, 李韞哲, 宋泽, 李俊材, 吴美康, 魏晓双, 崔菁菁, 武志海. 施硅量对旱作水稻产量和干物质积累的影响[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(1): 87-95
Su QW, Cang BF, Bai CY, Li YZ, Song Z, Li JC, Wu MK, Wei XS, Cui JJ, Wu ZH. Effect of silicon application rate on yield and dry matter accumulation of rice under dry cultivation[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2022, 36(1): 87-95 (in Chinese)
- [8] 朱从桦, 李其勇, 程明军, 李星月, 郭展, 张鸿. 氮磷钾减量配施硅肥对玉米养分吸收、利用及产量的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2018(1): 56-63
Zhu CH, Li QY, Cheng MJ, Li XY, Guo Z, Zhang H. Effects of reducing nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer combined with silicon fertilizer on nutrient absorption, utilization and yield of maize[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2018(1): 56-63 (in Chinese)
- [9] Tubana BS, Babu T, Datnoff LE. A review of silicon in soils and plants and its role in US agriculture[J]. Soil Science, 2016, 181(9/10): 393-411
- [10] Coskun D, Deshmukh R, Sonah H, Menzies JG, Reynolds O, Ma JF, Kronzucker HJ, Bélanger RR. The controversies of silicon's role in plant biology[J]. The New Phytologist, 2019, 221(1): 67-85
- [11] Raturi G, Sharma Y, Rana V, Thakral V, Myaka B, Salvi P, Singh M, Dhar H, Deshmukh R. Exploration of silicate solubilizing bacteria for sustainable agriculture and silicon biogeochemical cycle[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166: 827-838

- [12] Pramanik P, Goswami AJ, Ghosh S, Kalita C. An indigenous strain of potassium-solubilizing bacteria *Bacillus pseudomycooides* enhanced potassium uptake in tea plants by increasing potassium availability in the mica waste-treated soil of north-east India[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(1): 215-222
- [13] Vasanthi N, Saleena LM, Raj SA. Silica solubilization potential of certain bacterial species in the presence of different silicate minerals[J]. *Silicon*, 2018, 10(2): 267-275
- [14] 仇刚, 何琳燕, 陈亮, 赵飞, 黄智, 盛下放. 一株分解硅酸盐矿物芽孢杆菌的筛选及其生物学特性研究[J]. *土壤*, 2009, 41(4): 676-679
Qiu G, He LY, Chen L, Zhao F, Huang Z, Sheng XF. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus* from surfaces of weathered feldspar[J]. *Soils*, 2009, 41(4): 676-679 (in Chinese)
- [15] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探[J]. *土壤学报*, 2002, 39(6): 863-871
Sheng XF, Huang WY. Mechanism of potassium release from feldspar affected by the strain NBT of silicate bacterium[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(6): 863-871 (in Chinese)
- [16] Meena VS, Maurya BR, Verma JP. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils?[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(5/6): 337-347
- [17] Matias PC, Mattiello EM, Santos WO, Badel JL, Alvarez V VH. Solubilization of a K-silicate rock by *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. *Minerals Engineering*, 2019, 132: 69-75
- [18] Liu WX, Xu XS, Wu XH, Yang QY, Luo YM, Christie P. Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture[J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2006, 28(1/2): 133-140
- [19] Chen S, Lian B, Liu CQ. Effect of *Bacillus mucilaginosus* on weathering of phosphorite and a preliminary analysis of bacterial proteins[J]. *Chinese Journal of Geochemistry*, 2008, 27(2): 209-216
- [20] 韩苗, 朱晓艳, 陈国伟, 万小铭, 王钢. 解钾菌及其释钾微观机制的研究进展[J]. *土壤学报*, 2022, 59(2): 334-348
Han M, Zhu XY, Chen GW, Wan XM, Wang G. Advances on potassium-solubilizing bacteria and their microscopic potassium solubilizing mechanisms[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(2): 334-348 (in Chinese)
- [21] 姜雄. 解磷、解钾细菌的筛选及其性能研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2020
- Jiang X. Screening of phosphate-dissolving bacteria and its properties[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2020 (in Chinese)
- [22] Meena VS, Zaid A, Maurya BR, Meena SK, Bahadur I, Saha M, Kumar A, Verma R, Wani SH. Evaluation of potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): enhancing K-bioavailability and optimizing K-fertilization of maize plants under Indo-Gangetic Plains of India[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(36): 36412-36424
- [23] 陈振兴, 李佳, 杜冬云, 叶恒朋, 蓝际荣, 吕莹. 硅酸盐细菌对电解锰渣中有效硅的活化研究[J]. *硅酸盐通报*, 2018, 37(11): 3581-3586
Chen ZX, Li J, Du DY, Ye HP, Lan JR, Lyu Y. Study on activation of effective silicon in electrolytic manganese slag by silicate bacteria[J]. *Bulletin of the Chinese Ceramic Society*, 2018, 37(11): 3581-3586 (in Chinese)
- [24] 陈振兴. 硅活化细菌的选育及其活化电解锰渣中硅的研究[D]. 武汉: 中南民族大学硕士学位论文, 2019
Chen ZX. Isolation of silica activating bacteria and its activation of effective silica in electrolytic manganese slag[D]. Wuhan: Master's Thesis of South-central University for Nationalities, 2019 (in Chinese)
- [25] 单宇. 铝土矿高效脱硅细菌的筛选及脱硅性能研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
Shan Y. The effects of high efficient silicon releasing bacteria on silicon remove from bauxite and its mechanisms[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [26] Wang Y, Cai ZL, Zhang YM, Zheng QS. Green recovery of vanadium from vanadium-bearing shale under the biological action by *Bacillus mucilaginosus* and its effect on mineral dissolution[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(1): 107048
- [27] 王璇. 胶质类芽孢杆菌 3016 全基因组测序及菌种水平特异分子标识的筛选和鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2011
Wang X. Genome sequencing of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016 and screening/identification of special molecular marker at species level[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [28] Kang SM, Waqas M, Shahzad R, You YH, Asaf S, Khan MA, Lee KE, Joo GJ, Kim SJ, Lee IJ. Isolation and characterization of a novel silicate-solubilizing bacterial strain *Burkholderia eburnea* CS₄-2 that promotes growth of japonica rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin)[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2017, 63(3): 233-241

- [29] 杨存斌. 高效解磷细菌的分离筛选及其与磷矿物相互作用研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2009
Yang CB. Isolation of phosphate-solubilizing bacteria and the interaction between phosphate minerals and the bacteria[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- [30] 刘霄. 高效降解玉米秸秆复合菌群的构建及其降解效果研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2019
Liu X. Construction and effectiveness of a high efficient complex microbial system for corn straw degradation[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [31] 仇刚. 高效硅酸盐矿物分解细菌的分离筛选及其与硅酸盐矿物相互作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2008
Qiu G. Isolation of silicate mineral-solubilizing bacteria and the interaction between silicate mineral and the bacteria[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- [32] 于辉, 翟庆洲, 杨辉. 硅钼蓝分光光度法测定环境水样中的硅[J]. 兵工学报, 2009, 30(9): 1268-1270
Yu H, Zhai QZ, Yang H. Spectrophotometric determination of silicon in environmental water sample with silicomolybdate blue[J]. Acta Armamentarii, 2009, 30(9): 1268-1270 (in Chinese)
- [33] Sun YK, Xu JQ, Miao XY, Lin XS, Liu WZ, Ren HY. Effects of exogenous silicon on maize seed germination and seedling growth[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 1014
- [34] Wang ZY, Zhu WQ, Chen FR, Yue L, Ding Y, Xu H, Rasmann S, Xiao ZG. Nanosilicon enhances maize resistance against oriental armyworm (*Mythimna separata*) by activating the biosynthesis of chemical defenses[J]. Science of the Total Environment, 2021, 778: 146378
- [35] 王怀鹏, 张翼飞, 杨克军, 王玉凤, 陈天宇, 吴琼, 尹雪巍, 武鹏, 杨丽, 庞晨, 等. 硅肥不同喷施浓度对玉米抗倒伏性能及产量构成的调控效应[J]. 玉米科学, 2020, 28(3): 111-118
Wang HP, Zhang YF, Yang KJ, Wang YF, Chen TY, Wu Q, Yin XW, Wu P, Yang L, Pang C, et al. Regulating effects of different silicon fertilizer concentrations for foliar application on maize lodging resistance and yield components[J]. Journal of Maize Sciences, 2020, 28(3): 111-118 (in Chinese)
- [36] 许佳琦. 外源硅缓解玉米干旱胁迫的生理机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2021
Xu JQ. Physiological mechanism of exogenous silicon alleviating drought stress in maize[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2021 (in Chinese)
- [37] 杨清夏, 李欢, 龙光强, 赵平, 吴开贤, 何澍然. 基于有机肥和菌肥的玉米减肥增效研究[J]. 生态科学, 2022, 41(4): 196-203
Yang QX, Li H, Long GQ, Zhao P, Wu KX, He SR. Study on reducing fertilizer and increasing use efficiency of maize based on organic fertilizer and bacterial fertilizer[J]. Ecological Science, 2022, 41(4): 196-203 (in Chinese)
- [38] 刘莹. 硅调控对春玉米产量、氮肥利用效率和抗倒性能的影响[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2020
Liu Y. Effects of silicon regulation on yield, nitrogen utilization efficiency and lodging resistance of spring maize[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2020 (in Chinese)
- [39] Chen YF, Yang H, Shen ZZ, Ye JR. Whole-genome sequencing and potassium-solubilizing mechanism of *Bacillus aryabhatai* SK₁-7[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 722379