

DOI: 10.11766/trxb202505230237

CSTR: 32215.14.trxb202505230237

刘冲, 刘洋, 王丹, 卢钰升, 谷峻, 朱晓璇, 温书恒, 王勇, 朱子昕, 李雅莹, 顾文杰. 产碱菌株筛选及其改良酸化土壤的作用[J]. 土壤学报, 2025,

LIU Chong, LIU Yang, WANG Dan, LU Yusheng, GU Jun, ZHU Xiaoxuan, WEN Shuheng, WANG Yong, ZHU Zixin, LI Yaying, GU Wenjie. Screening of Alkali-Producing Strains and Their Amendment Effect on Acidic Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025,

产碱菌株筛选及其改良酸化土壤的作用*

刘冲¹, 刘洋^{1,2}, 王丹¹, 卢钰升¹, 谷峻², 朱晓璇¹, 温书恒^{3†}, 王勇³, 朱子昕³, 李雅莹¹, 顾文杰^{1,4†}

(1. 广东省农业科学院农业资源与环境研究所/农业农村部南方植物营养与肥料重点实验室/广东省养分资源循环利用与耕地保育重点实验室/广东省土壤微生物与耕地保育工程技术研究中心, 广州 510640; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; 3. 广东植物龙生物技术股份有限公司, 珠海 519050; 4. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室茂名分中心, 广东茂名 525000)

摘要: 耕地土壤酸化治理对保障国家粮食安全和农业可持续发展具有重要意义。微生物在土壤改良中具有重要的应用价值, 然而产碱功能微生物及其改良酸性土壤的机理研究还较为缺乏。本研究通过系统筛选从华南酸化土壤中分离出 109 株产碱细菌(芽孢杆菌属占 65%)和 24 株产碱真菌(木霉属占 33%), 发现细菌的产碱能力与稳定性均高于真菌, 其中纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis* LW-3)改良酸性土壤的效果最佳。室内模拟试验表明, 持续培养 15 周内, 连续多次接种该菌可使土壤 pH 升高 1.5 个单位, 交换性铝含量降低 23.46%, 水解性酸减少 31.80%。基因组学分析揭示, *L. fusiformis* LW-3 携带完整脲酶基因簇(*ureABCEFGD*), 其可能通过增强土壤脲酶和蛋白酶活性, 代谢释放氨; 并通过碳酸氢根消耗氢离子, 降低土壤活性酸和潜性酸含量, 协同改良酸性土壤。田间试验证实, 施用 *L. fusiformis* LW-3 菌剂后, 小白菜生长期土壤 pH 稳定提高 0.2 个单位, 产量提高 11.6%~14.7%。本研究阐明了产碱菌通过产碱代谢、酶活性调控及酸形态转化等多途径协同改良酸化土壤的机制, 发现产碱菌 *L. fusiformis* LW-3 在改良酸性土壤方面具有良好的应用前景, 为产碱菌应用于耕地酸化治理提供了支撑。

关键词: 土壤; 酸化; 产碱微生物; 纺锤形赖氨酸芽孢杆菌; 小白菜

中图分类号: S153

文献标志码: A

Screening of Alkali-Producing Strains and Their Amendment Effect on Acidic Soil

LIU Chong¹, LIU Yang^{1,2}, WANG Dan¹, LU Yusheng¹, GU Jun², ZHU Xiaoxuan¹, WEN Shuheng^{3†}, WANG Yong³, ZHU Zixin³, LI Yaying¹, GU Wenjie^{1,4†}

(1. Institute of Agricultural Resources and Environment, Guangdong Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer in South Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Key Laboratory of Nutrient Cycling and Farmland Conservation/Guangdong Engineering Research Center of Soil Microbes and Cultivated Land Conservation, Guangzhou 510640, China; 2. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 3. Guangdong Geolong Biotechnology Co., Ltd., Zhuhai 519050, China; 4. Maoming Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Maoming, Guangdong 525000, China)

* 广东省重点领域研发计划项目(2023B0202010027)、国家重点研发计划项目(2023YFD1702200)和“十四五”广东省农业科技创新九大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2023SDZG08)共同资助 Supported by the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (No. 2023B0202010027), the National Key R&D Program of China (No. 2023YFD1702200) and the Open Competition Program of Top Nine Critical Priorities of Agricultural Science and Technology Innovation for the 14th Five-Year Plan of Guangdong Province (No. 2023SDZG08).

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: 13527238772@163.com; guwenjie0818@163.com;

作者简介: 刘冲(1990-), 男, 陕西扶风人, 博士, 助理研究员, 主要从事土壤酸化防控研究。E-mail: liuchong1990@gdaas.cn.

收稿日期: 2025-05-23; 收到修改稿日期: 2025-08-01; 网络首发日期(www.cnki.net):

Abstract: 【Objective】 Managing soil acidification in farmland soils is of great significance to ensure national food security and sustainable agricultural development. Microorganisms have important application value in soil improvement. However, the research on alkali-producing microorganisms and the mechanism of improving acid soil is still lacking. This study aimed to systematically explore the mechanisms of acidified soil remediation by alkali-producing microorganisms, with a focus on overcoming the limitations of functional microbial resource scarcity and field application technology gaps. 【Method】 Systematic screening was employed to isolate alkali-producing microorganisms from acidic soils in South China. Indoor simulation experiments evaluated its pH elevation capacity through repeated inoculation. Genomic analysis revealed its urease gene cluster (*ureABCEFGD*), and field trials assessed the effects of single-dose application on soil pH and crop yield.

【Result】 We screened 109 alkali-producing bacterial strains (65% belonging to *Bacillus* spp.) and 24 fungal strains (33% *Trichoderma* spp.). The alkali-producing ability and stability of alkali-producing bacteria were generally stronger than those of fungi, with *Lysinibacillus fusiformis* LW-3 identified as a key strain. Within 15 weeks of continuous culture, repeated inoculation of *L. fusiformis* elevated soil pH by 1.5 units, reduced exchangeable aluminum by 23.46%, and decreased hydrolytic acid by 31.80%. Genomic analysis revealed that *L. fusiformis* LW-3 carried a complete urease gene cluster (*ureABCEFGD*). *Lysinibacillus fusiformis* LW-3 could ameliorate acid soil by enhancing soil urease and protease activities, metabolizing ammonia, consuming hydrogen ions through bicarbonate, and reducing the content of active and potential acids in soil. Field application confirmed that soil pH stably increased by 0.2 units and enhanced Chinese cabbage yield by 11.6%.

【Conclusion】 This study elucidated a multi-pathway synergy mechanism for acidified soil remediation, including alkali production, enzymatic activity regulation, and acid speciation transformation. These findings indicate that the strain *L. fusiformis* LW-3 has good application prospects in acid soil amendment, providing technical support for alkaline-producing microbiome-driven soil acidification management.

Key words: Soil; Acidification; Alkali producing microorganisms; *Lysinibacillus fusiformis*; Pakchoi

耕地土壤酸化已成为制约我国南方红壤区耕地产能提升的主要障碍因素。据统计,我国土壤 pH<6.5 的酸性土壤面积约 3.11×10^6 km², 约占陆域国土面积的 32.4%, 与第二次全国土壤普查相比,我国酸性土壤总面积增加 6.45×10^5 km², 增加幅度达 26.2%^[1], 呈现出分布区域广、面积大的特点。以广东省为例,近 30 年来,全省农田土壤 pH 平均下降了 0.30 个单位,其中严重酸化区域降幅达 0.55 个单位^[2]。自然条件下,土壤酸化进程非常缓慢,然而,酸沉降、氮肥过量施用、作物带走阳离子等多重因素促使该进程显著加快^[3-5], 导致以交换性铝 (Al³⁺) 为主的潜性酸成为红壤酸的主要形态,改良难度巨大^[6]。2025 年中央一号文件强调“加强南方酸化退化耕地治理”, 凸显耕地土壤酸化治理在保障国家粮食安全与推动农业绿色发展的战略意义。

近年来,关于酸性土壤的研究取得了许多重要进展,主要集中在土壤酸化空间分布、成因机制、耐酸作物品种筛选、酸害阈值界定及改良产品与技术的研发等诸多方面^[1]。针对酸化土壤改良,大部分研究仍聚焦于以石灰质材料为核心的无机-有机结合、水肥一体化养分控制和氮素转化调控等技术措施^[1, 7-8]。尽管这些方法在短期内可取得一定的成效,但普遍存在可持续性差、土壤结构破坏、返酸风险高及修复成本高等问题^[1]。微生物修复作为一种绿色、安全、可持续的土壤改良手段,因其环境友好性和生态兼容性而备受关注^[9]。微生物不仅能通过促进矿质土粒团聚作用改良土壤结构,还可分泌碱性代谢产物,调节土壤 pH, 在酸性土壤生物改良制剂开发方面具有广阔的应用前景^[10]。尤其是部分耐酸、耐铝微生物在酸化土壤改良方面展现出较好的应用潜力^[11-14]。但总体来看,已有研究挖掘的改酸微生物资源仍相对匮乏,有关微生物提升土壤 pH 的机制知之甚少,在农业生产实践中的应用案例亦鲜有报道。随着微生物组学技术的快速发展,亟需系统筛选并培育具备高效产碱能力的微生物菌株,以建立精准高效的绿色生物修复体系。

本研究首先从华南典型酸性土壤中筛选产碱功能微生物,再通过室内模拟和盆栽试验,评估产碱菌提高土壤 pH 的能力,以及改良酸化土壤的效果,并结合全基因组测序与关键酶活性分析,探讨其代谢产碱的潜在机制;通过田间试验,验证其实际应用效果,并进一步评估其推广应用潜力。

研究旨在破解产碱微生物资源匮乏及应用技术不成熟的瓶颈,探索以产碱微生物为核心的酸化土壤绿色治理新模式,为南方酸性耕地的改良提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试微生物培养基材料

(1) NA 培养基: 营养琼脂 33 g·L⁻¹, 琼脂 18 g·L⁻¹, 121℃灭菌 30 min。(2) PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 琼脂 18 g·L⁻¹, pH 6.5, 121℃灭菌 30 min。(3) LB 培养基: 蛋白胨 10 g·L⁻¹, NaCl 10 g·L⁻¹, 酵母膏粉 5 g·L⁻¹, pH 7.0, 121℃灭菌 30 min。(4) PDB 培养基: 去皮马铃薯 200 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, pH 6.5, 121℃灭菌 30 min。

1.2 产碱微生物的分离与鉴定

基于广东省耕地土壤酸化状况及其分布区域,分别在兴宁、中山、台山、高要、仁化、龙门、英德、麻章、揭东和雷州等县市耕地质量监测点采集土壤样品,进行产碱菌的分离与鉴定。采用酸碱指示剂法高通量筛选产碱菌: 首先称取 5 g 新鲜土壤于无菌水中振荡分散,并制备系列稀释悬浮液(10⁴~10⁶),取约 100 μL 涂布于 NA 培养基平板上筛选产碱细菌,30℃下培养 48 h;取约 100 μL 涂布于 PDA 培养基平板上筛选产碱真菌,30℃下培养 96 h。从最大稀释度的平板上挑选不同形态的单菌落,进行分离纯化;然后挑取单菌落,加入含 100 μL 酚红指示剂的 96 孔板中,指示剂颜色变红的菌株为潜在产碱候选菌株。将候选细菌单菌落按 1%接种量接种于 LB 液体培养基中,30℃下培养 48 h;将候选真菌单菌落按 1%接种量接种于 PDB 液体培养基中,30℃下培养 96 h。测定菌液 pH,将能使培养基 pH 升高的菌株确定为潜在产碱菌^[11]。使用 DNA 快速提取试剂盒(方舟生物安全科技有限公司,中国)提取各菌株的 DNA,采用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因全长序列,PCR 扩增程序为: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 15 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 共 35 个循环, 72℃后延伸 5 min^[15]。采用引物 ITS1F(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增真菌 ITS 区域,PCR 扩增程序为: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 15 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 共 35 个循环, 72℃后延伸 5 min^[16]。

1.3 菌株的产碱能力测定

潜在产碱菌株产碱能力测定: 细菌在 NA 平板上 30℃下培养 24 h 后,刮取菌落配制菌悬液 OD₆₀₀ 为 1.0,再按照体积比为 5%的接种量,将 2.5 mL 菌悬液接种于 47.5 mL LB 液体培养基中。真菌在 PDA 平板上 30℃下培养 96 h 后,刮取菌落配制菌悬液 OD₆₀₀ 为 1.0,再按照体积比为 5%的接种量,将 2.5 mL 菌悬液接种于 47.5 mL PDB 液体培养基中。30℃下摇床培养 7 天,分别在第 0、24、48、72、120、168 h 测定菌液的 pH 和 OD 值。LB 液体培养基和 PDB 液体培养基初始 pH 均为 7.0±0.1。未接种的 LB 液体培养基和 PDB 液体培养基为空白对照。

菌株的产氨能力测定: 在 6、12、18、24、30、36、48、60、72、84、96 h 分别采集发酵液,测定其 OD₆₀₀ 和 pH。发酵液经离心(8000 r·min⁻¹, 5 min)收集上清液,用 Berthelot 法测定铵的含量^[17]。

基因组测序: 选择产碱菌 GDAAS 13472,在上海美吉生物医药科技有限公司进行菌株的全基因组测序。具体流程: 使用磁珠法细菌 DNA 提取试剂盒(上海美吉逾华生物医药科技有限公司,中国)提取菌株 DNA,使用 PacBio Sequel IIe 和 Illumina NovaSeqX plus 进行全基因组测序。对于 Illumina 测序,制备的文库在 Illumina NovaSeqX plus 上进行双端测序(2×150 bp)。利用 PacBio Sequel IIe 和 Illumina 测序平台生成的数据进行生物信息学分析。

1.4 土壤培养试验

供试土壤采自广东省台山市斗山镇唐美村农田, 土壤类型为红壤, 剔除石块和作物残体, 风干并过 2 mm 筛。土壤 pH 4.04, 有效磷 4.00 mg·kg⁻¹, 速效钾 57.00 mg·kg⁻¹, 铵态氮 7.97 mg·kg⁻¹, 硝态氮 6.76 mg·kg⁻¹。加入纯水使其含水量为田间最大持水量的 70%, 稳定 2 周。

将筛选的产碱菌株在 30℃ 下 NA 培养基中培养 24 h, 刮取菌体制备悬液, OD₆₀₀ 为 1.0。再按照体积比为 5% 的接种量, 将菌悬液接种于 NB 液体培养基中, 30℃ 下摇床培养 2 天, 视为接种菌液。

试验设 3 个处理, 分别为 (1) 加入等量无菌水对照 (CK); (2) 单次接种产碱菌剂; (3) 8 次接种产碱菌剂 (每两周接种 1 次), 每个处理 3 个重复。称取 500 g 供试土壤, 分别装入盆钵 (内径 15.3 cm, 高 13.8 cm) 中, 按照试验设计向相应处理盆钵的土壤表面均匀地滴加无菌水或 50 mL 接种菌液, 25℃ 下培养 15 周, 期间通过称重法及滴加无菌水保持土壤湿度, 每周采集 5 g 土壤样品测定 pH。培养结束时, 测定土壤交换性酸总量、交换性铝、交换性氢和水解性酸含量, 以及脲酶、碱性磷酸酶、蔗糖酶、纤维素酶、过氧化氢酶和蛋白酶活性。

1.5 田间试验

选取两个典型的酸化耕地进行田间试验, 分别位于广东省汕尾市海丰县 (简称 HF, 22.888233°N, 115.347054°E) 和广东省江门市台山市 (简称 TS, 22.188875°N, 112.681774°E)。海丰县土壤 pH 4.55, 碱解氮 94.20 mg·kg⁻¹, 有效磷 20.54 mg·kg⁻¹, 速效钾 99.00 mg·kg⁻¹。台山市土壤 pH 4.48, 碱解氮 88.69 mg·kg⁻¹, 有效磷 52.94 mg·kg⁻¹, 速效钾 59.00 mg·kg⁻¹。

试验设常规施肥和施用产碱菌剂 2 个处理, 每个处理 3 次重复, 小区面积为 20.7 m² (7.4 m×2.8 m), 随机区组设计, 独立灌排水, 其他田间管理同常规栽培, 小白菜品种为港优黑叶白菜 (广州市越秀区广联种子行)。根据试验地的基础土壤检测结果, 采用广东省叶菜推荐施肥技术指标体系确定施肥量, 其中海丰县推荐施肥量为: 尿素 380.8 kg·hm⁻²、过磷酸钙 481.3 kg·hm⁻²、氯化钾 160.4 kg·hm⁻², 试验实施期为 2025 年 1 月 28 日至 3 月 12 日。台山市为: 尿素 386.8 kg·hm⁻²、过磷酸钙 334.3 kg·hm⁻²、氯化钾 191.9 kg·hm⁻², 试验实施期为 2025 年 2 月 1 日至 3 月 27 日。过磷酸钙作为基肥一次性施入, 尿素、氯化钾分三次施入。在施用产碱菌剂处理的小区, 分别在播种前和播种 2 周后, 在土壤表面淋施稀释 50 倍的产碱菌液, 每次用量为 299.9 L·hm⁻²。收获时每个处理随机选取 30 株小白菜, 测定鲜重, 计算产量。同时采集 0~20 cm 土层土壤, 测定土壤 pH、交换性酸和交换性铝含量。

1.6 分析方法

土壤 pH (土水比为 1: 2.5) 采用 pH 计 (PB-10, Sartorius, 德国) 测定。土壤交换性酸总量、交换性氢、交换性铝和水解性酸含量测定参考邓小华等^[18]的方法。土壤脲酶活性采用靛酚蓝比色法, 碱性磷酸酶采用对硝基苯磷酸二钠比色法, 蔗糖酶和纤维素酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法, 过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法, 蛋白酶采用加勒斯江法测定^[19]。

1.7 数据处理

使用 Microsoft Excel 软件进行全部数据的整理和分析。利用 SPSS 19.0 统计数据, 采用单因素方差分析 (ANOVA)、邓肯多重极差检验和 t 检验比较不同处理之间各项指标的差异。采用 Origin 2024b 和 Adobe Illustrator CS6 绘图。利用上海美吉生物的生信云平台 (www.majorbio.com) 进行菌株全基因组圈图的绘制。采用 R 语言软件 (v4.2.1) GGEbiplots 包绘制 GGE 双标图^[20]。产碱菌株 GDAAS 13472 被鉴定为 *Lysinibacillus fusiformis* LW-3, 其与亲缘微生物的平均核苷酸同源性 (ANI) 的计算参考 Hu 等^[21]的方法。

2 结果

2.1 产碱微生物的筛选及其产碱特性

从本地区不同酸化程度的土壤中共筛选出潜在产碱菌 133 株，其中，产碱细菌 109 株，主要为芽孢杆菌 (*Bacillus*)，共 71 株，占 65%，其次为普里斯特氏菌 (*Priestia*)、赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus*)、尼氏芽孢杆菌 (*Neobacillus*)、近芽孢杆菌 (*Peribacillus*)、奇异假芽孢杆菌 (*Fictibacillus*) 和微杆菌 (*Microbacterium*) (图 1a)。产碱真菌 24 株，主要为木霉菌 (*Trichoderma*)，共 8 株，占 33%，其次为季也蒙迈耶氏酵母 (*Meyerozyma*)、毛霉菌 (*Mucor*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、青霉菌属 (*Penicillium*) 和犁头霉 (*Absidia*) (图 1b)。

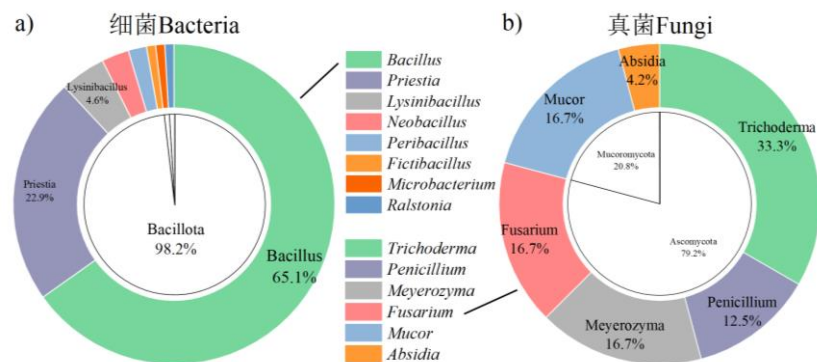
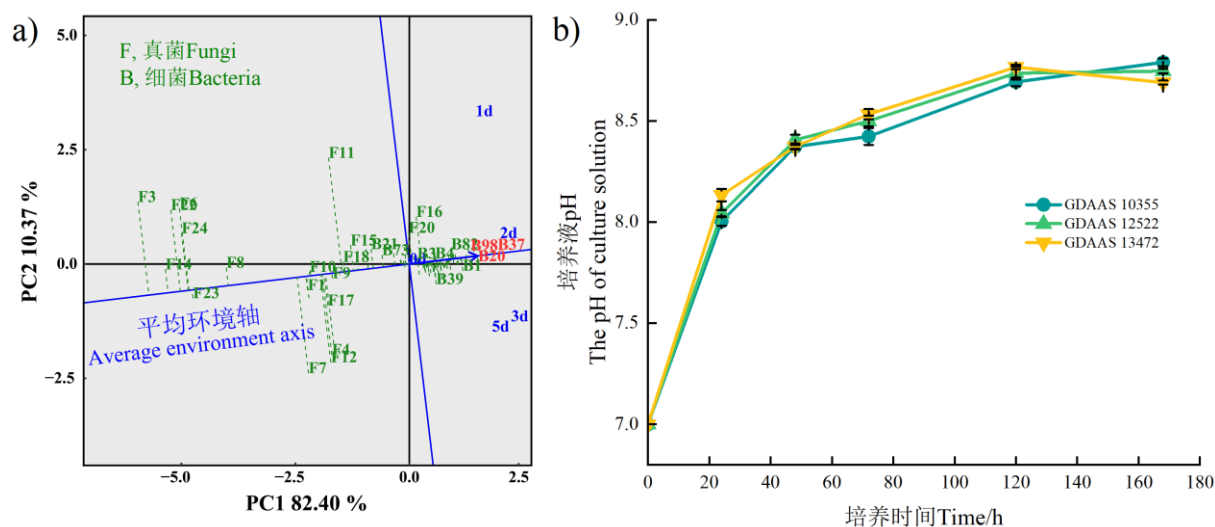


图 1 筛选出的潜在产碱细菌 (a) 和产碱真菌 (b) 菌株及其比例

Fig. 1 The screened potential alkali-producing bacteria and fungi and their classification

为筛选产碱能力强和稳定性高的产碱菌，利用双标图分析了不同潜在产碱菌在不同培养时间下的产碱能力差异，主成分 1 和主成分 2 解释了总变异的 92.77%，拟合度较高 (图 2a)。由图 2a 可知，潜在产碱微生物的产碱能力沿着平均环境轴的箭头方向逐渐增大，产碱细菌 (B) 更接近平均环境轴及其箭头方向，而大部分真菌 (F) 远离平均环境轴及其箭头，说明产碱细菌的产碱能力与稳定性均强于真菌。其中，B20 (GDAAS 10355)、B37 (GDAAS 12522) 和 B98 (GDAAS 13472) 等菌株的产碱能力和稳定性最优 (图 2a)。经鉴定，发现上述三株菌株均属于纺锤形赖氨酸芽孢杆菌。通过摇瓶试验发现，筛选出的 3 株纺锤形赖氨酸芽孢杆菌均能有效提高培养液的 pH，培养 1 周内，培养液的 pH 分别提升 1.79、1.75 和 1.69 个单位 (图 2b)。其中，GDAAS 13472 提升 pH 最快，培养 24 h 可提升 1.13 个单位。



注: GDAAS 10355、GDAAS 12522 和 GDAAS 13472 为三种产碱菌的菌株编号。下同。(a) 细菌和真菌产碱能力双标图; (b) 纺锤形赖氨酸芽孢杆菌的培养液 pH。Notes: GDAAS 10355, GDAAS 12522, and GDAAS 13472 are strain numbers for three alkali-producing bacteria. The same below. (a) Biplots of the alkali-producing ability of bacteria and fungi; (b) Changes of pH of the *Lysinibacillus fusiformis* culture medium.

图 2 产碱菌的产碱能力

Fig. 2 The ability of alkali-producing microorganisms to produce alkali

2.2 接种产碱菌后土壤 pH 的变化

对照土壤 (CK) 的 pH 在 15 周培养期间均无明显变化, 稳定在 3.99~4.03。一次和 8 次接种 3 种产碱菌后, 土壤 pH 显著提高(图 2)。其中, 仅接种一次产碱菌处理下, 土壤 pH 在 1 周内从 3.99~4.02 提高至 4.15~4.19, 较对照提高了 0.13~0.17 个单位, 且土壤 pH 随培养时间的增加未见明显变化(图 3a)。8 次接种 3 种产碱菌处理下, 土壤 pH 均呈直线提高, 培养结束时 pH 达到 5.31~5.42, 3 种产碱菌之间无显著性差异(图 3b)。与 1 次接种相比, 8 次接种产碱菌处理下, 土壤 pH 提高了 1.16~1.23 个单位。

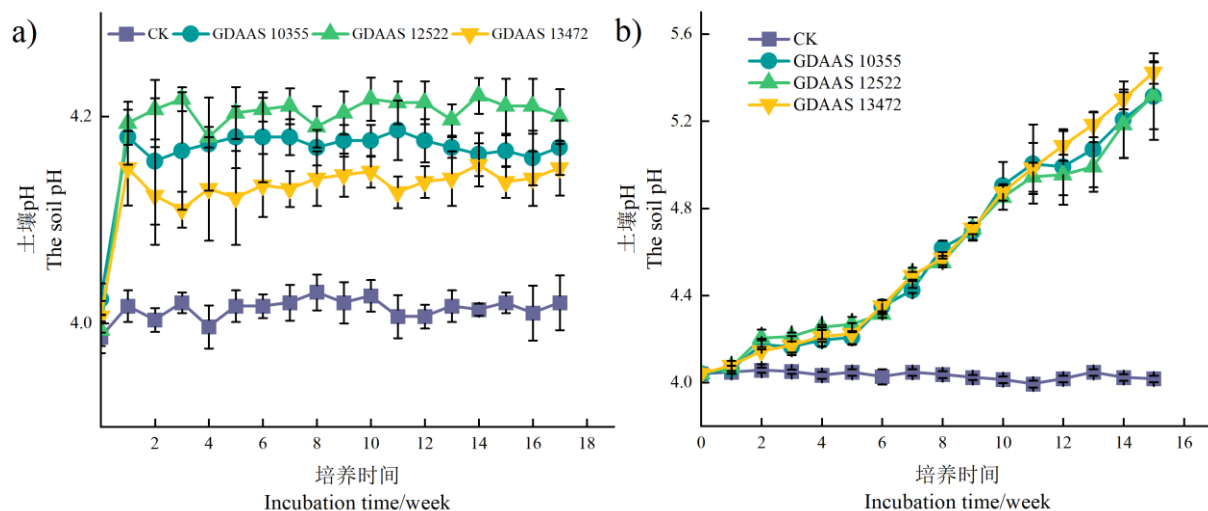


图 3 一次 (a) 和多次 (b) 接种 3 种产碱菌后土壤 pH 的变化

Fig. 3 Changes in soil pH after one (a) and multiple (b) inoculation with three types of alkali-producing bacteria

对于土壤酸而言, 供试土壤中交换性酸主要为交换性铝, 占交换性酸总量的 89.0%。多次接种 3 种产碱菌后, 土壤潜性酸均有不同程度的降低。其中, GDAAS 13472 处理效果最佳, 土壤交换性酸

总量、交换性铝和水解性酸含量均显著降低 ($P<0.05$), 与对照相比分别降低了 23.44%、23.46%和 31.80%(表 1)。此外, 与对照相比, 3 种产碱菌处理下土壤碳酸氢根含量均显著增加了 48.45%、77.46%和 40.0% ($P<0.05$)。

表 1 8 次接种 3 种产碱菌后土壤潜性酸和碳酸氢根含量的变化

Table 1 Changes in soil potential acid and bicarbonate content following 8 inoculations with 3 alkali-producing bacteria

处理 Treatment	交换性酸总量 Total exchangeable acids / (cmol·kg ⁻¹)	交换性氢 Exchangeable hydrogen / (cmol·kg ⁻¹)	交换性铝 Exchangeable aluminum / (cmol·kg ⁻¹)	水解性酸 Hydrolytic acid / (cmol·kg ⁻¹)	碳酸氢根 Bicarbonate / (mg·kg ⁻¹)
CK	2.73 ± 0.22ab	0.30 ± 0.08a	2.43 ± 0.13ab	6.54 ± 0.17a	35.5 ± 4.64b
GDAAS 12522	2.52 ± 0.17b	0.25 ± 0.03a	2.27 ± 0.17b	5.39 ± 0.11b	52.7 ± 11.5a
GDAAS 10355	2.90 ± 0.06a	0.27 ± 0.04a	2.62 ± 0.07a	5.65 ± 0.21b	62.8 ± 4.64a
GDAAS 13472	2.09 ± 0.12c	0.24 ± 0.01a	1.86 ± 0.12c	4.46 ± 0.38c	49.7 ± 4.64a

注: 表中数据均为平均值±标准差(SD)(n=3), 同列不同字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$), 下同。Note: the data in the table are mean ± standard deviation (n=3). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

2.3 接种产碱菌后土壤酶活性的变化

与对照相比, 3 种产碱菌处理下土壤脲酶、蔗糖酶、蛋白酶和纤维素酶活性均有提升趋势, 碱性磷酸酶活性有所下降, 而过氧化氢酶和赖氨酸脱羧酶活性无显著变化。其中, GDAAS 13472 处理下, 土壤脲酶、蔗糖酶、蛋白酶活性提升幅度最高, 与对照相比分别增加了 140.79%、155.68%和 208.33% (表 2)。

表 2 8 次接种 3 种产碱菌培养 15 周后土壤酶活性的差异

Table 2 Differences in soil enzyme activity following 8 inoculations with 3 alkali-producing bacteria cultured for 15 weeks

处理 Treatment	脲酶 Urease / (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase / (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	蔗糖酶 Sucrase / (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	过氧化氢酶 Catalase / (mL·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	蛋白酶 Protease / (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	纤维素酶 Cellulase / (μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase / (U·g ⁻¹)
CK	30.4 ± 0.93b	172 ± 9.35a	458 ± 50.9c	3.25 ± 0.41a	0.12 ± 0.02c	8.79 ± 0.46b	0.36 ± 0.002ab
GDAAS 12522	61.7 ± 8.07a	152 ± 11.26b	857 ± 71.2b	3.91 ± 0.62a	0.27 ± 0.02b	8.84 ± 2.19b	0.36 ± 0.003ab
GDAAS 10355	69.2 ± 9.98a	146 ± 2.59b	886 ± 20.8b	3.29 ± 0.59a	0.28 ± 0.05b	11.00 ± 0.38b	0.36 ± 0.002a
GDAAS 13472	73.2 ± 0.61a	151 ± 9.84b	1171 ± 66.0a	3.35 ± 0.41a	0.37 ± 0.04a	14.30 ± 0.35a	0.34 ± 0.02b

2.4 产碱菌生长过程中产氨特性及全基因组测序

为揭示产碱菌提升 pH 的机理, 研究了 GDAAS 13472 液体培养体系中 pH 和铵含量的关系。随着培养时间的延长, 产碱菌 GDAAS 13472 的生长曲线与培养体系 pH 和铵含量均呈现出先迅速增长后平缓的趋势(图 4a~图 4c)。通过线性拟合发现, 培养培养体系中铵含量与产碱菌的生物量($R^2=0.95$, $P<0.01$)和 pH ($R^2=0.95$, $P<0.01$)存在显著的线性正相关关系(图 4d), 表明产碱菌生长过程中释放的铵可能对提升体系 pH 具有重要贡献。

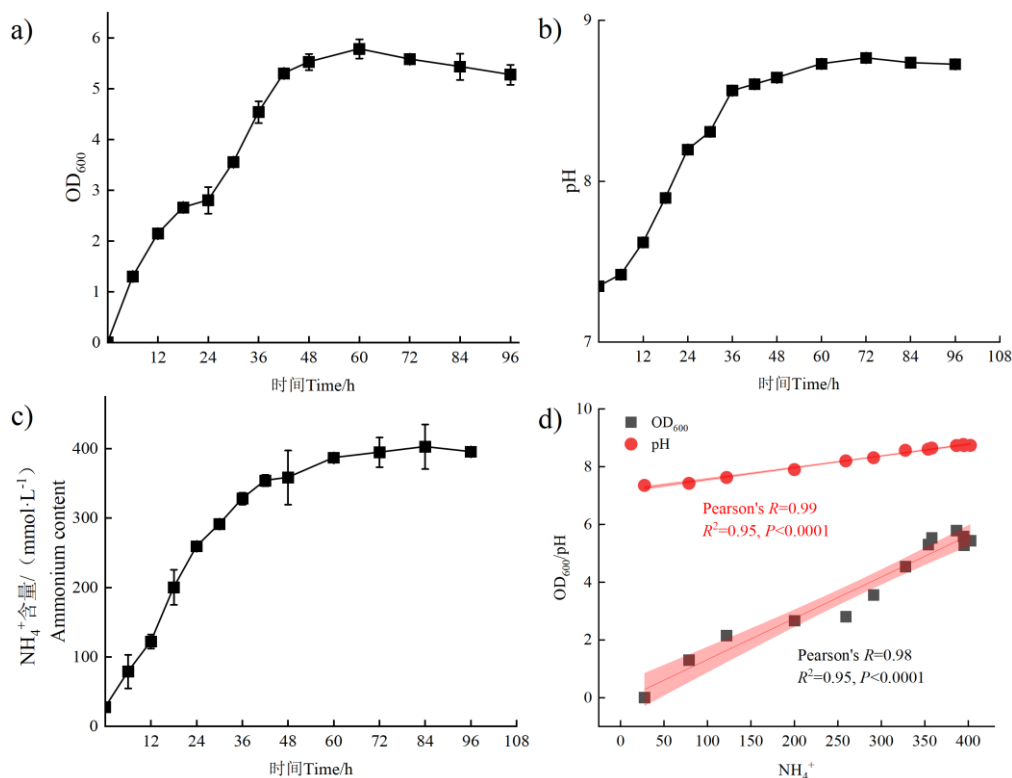


图 4 产碱菌的生长曲线 (a)、pH (b) 和铵含量 (c) 及其相关性 (d)

Fig. 4 Growth curve (a), pH (b), and ammonium ion (c) of alkali-producing microorganisms and their correlation(d)

对 GDAAS 13472 菌株进行全基因组测序, 通过系统发育树和同源分析, GDAAS 13472 菌株被鉴定为纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus fusiformis* LW-3) (图 5a)。*L. fusiformis* LW-3 基因组大小为 4.59 Mb, 平均 GC 含量为 37.5%。预测基因数为 4 512 个, 均为蛋白编码基因 (CDS)。RNA 编码基因 154 个, 其中 10 个编码 rRNA, 48 个编码 tRNA, 96 个编码非编码 RNA (图 5b)。平均核苷酸一致性 (ANI) 分析揭示了 *L. fusiformis* LW-3 与其他物种之间的显著差异, 以及与 *L. fusiformis* 的分类相似性 (ANI 值=97.3%), 在基因组水平上证实了 *L. fusiformis* LW-3 属于 *L. fusiformis* (图 5c)。进而通过产碱菌的基因组功能注释, 发现 *L. fusiformis* LW-3 拥有完整的脲酶基因簇 *ureABCEFGD*。

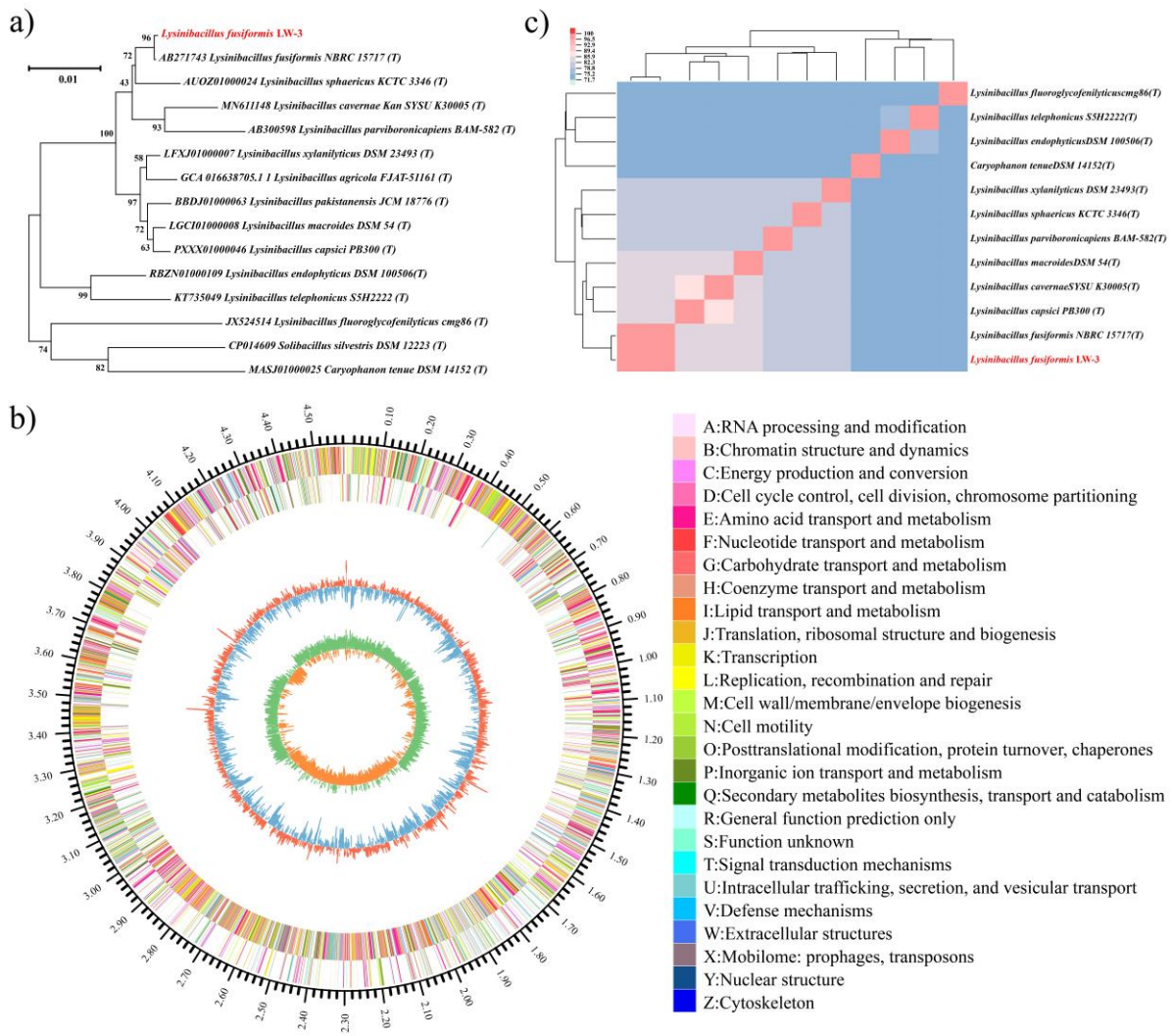


图 5 基于 16S rRNA 的微生物分类分析 (a); *Lysinibacillus fusiformis* LW-3 的全基因组圈图 (b); 基于成对平均核苷酸一致性 (ANI) 的微生物聚类热图 (c)

Fig. 5 Taxonomic analysis based on 16S rRNA (a); circular genome visualization of *L. fusiformis* LW-3 (b); pairwise ANI (%) based cluster heatmap (c)

2.5 接种产碱菌对酸性土壤生长的小白菜的影响

表 3 结果显示,施用产碱菌 *L. fusiformis* LW-3 (GDAAS 13472) 菌剂的两种酸性土壤 pH 显著提高 ($P<0.05$)。其中,TS 土壤 pH 提高了 0.18 个单位,而 HF 土壤 pH 提高了 0.21 个单位。土壤交换性酸总量分别降低了 14.4% 和 23.6%,交换性铝含量分别降低了 18.9% 和 21.1%。小白菜产量分别增加了 11.6% 和 17.9%。

表 3 接种产碱菌对酸性土壤生长的小白菜的影响

Table 3 Effects of inoculating alkali-producing bacteria on the growth of pakchoi in acidic soil

试验地 Field trial location	处理 Treatment	小白菜产量 Yield of pakchoi (kg·mu ⁻¹)	土壤 pH Soil pH	交换性酸总量 Total exchangeable acids (cmol·kg ⁻¹)	交换性铝 Exchangeable aluminum (cmol·kg ⁻¹)
海丰县	对照	494.41 ± 39.58	4.62 ± 0.07	1.54 ± 0.01	1.29 ± 0.02
HF	<i>L. fusiformis</i> LW-3	612.45 ± 11.20*	4.79 ± 0.05*	1.17 ± 0.05**	1.04 ± 0.06*
台山市	对照	318.02 ± 27.99	4.51 ± 0.04	1.40 ± 0.07	1.09 ± 0.09

TS	<i>L. fusiformis</i> LW-3	393.06 ± 25.77*	4.72 ± 0.06*	1.20 ± 0.06*	0.86 ± 0.06*
----	---------------------------	-----------------	--------------	--------------	--------------

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 产碱微生物资源及产碱特性

酸化土壤改良对于恢复土壤健康、提升农作物产量至关重要。微生物在调节土壤 pH、构建团聚体结构、促进养分循环等方面发挥关键生态功能，是土壤改良的重要生物资源^[22]。本研究发现，产碱细菌的产碱能力与稳定性均强于真菌，这可能是由于真菌具有更高的渗透胁迫耐受能力，酸化提高了真菌在酸性土壤中的竞争力^[23]。细菌产生胞外酶的最佳 pH 为中性到碱性，而真菌则在酸性条件下表现较好^[24]。本研究筛选出的产碱菌以芽孢杆菌属为主，这与许多已有研究一致。例如，Zhang 等^[11]从镉污染土壤中分离鉴定了一株产碱芽孢杆菌 XT-4，在温室盆栽试验中，接种 XT-4 显著提高了根际土壤 pH。Hu 等^[21]从金矿周边的重金属污染土壤中分离出赖氨酸芽孢杆菌 TSBLM，在酸性土壤中接种该菌株后，Cu 和 Pb 转化为碳酸盐结合态，同时土壤 pH 得到提高。王麒等^[13]从水稻土中筛选到球形赖氨酸芽孢杆菌 WH07，发现其可使土壤 pH 升高 0.19~0.95 个单位。此外，针对酸性土壤中的潜性酸，Zhang 等^[12]在 pH 3.6~8.7 的稻田土壤中分析了 Al^{3+} 和携带耐铝基因的细菌群落，发现酸性土壤中耐铝微生物主要包括梭菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、脱硫杆菌属和脱硫孢菌属等。由此可见，芽孢杆菌类群在酸性土壤中具有广泛的适应性及潜在的改良作用。芽孢杆菌的优势可能与其形成结构致密、耐逆性强的内生孢子结构有关^[25]，该结构有助于其在强酸性条件下维持细胞完整性并抵御外界胁迫^[26]。此外，芽孢杆菌可通过质子泵将过量 H^+ 排出细胞外，或合成碱性代谢物中和胞内酸性，从而维持胞内 pH 稳态^[27]。尽管已有部分研究揭示了产碱菌的基础作用机制，但大多仍停留于实验室阶段，缺乏田间验证^[22]。本研究通过室内与田间验证，明确表明 *L. fusiformis* LW-3 具备稳定的产碱能力，可显著缓解土壤酸化并促进作物生长，具有良好的应用前景。

关于微生物提升胞外 pH 的机制研究仍处于初步探索阶段^[27]。部分研究认为，微生物可通过代谢特定的底物（如尿素、精氨酸等）产生氨、多胺或多肽等碱性物质，从而提高胞外环境的 pH。例如，Zhang 等^[11]推测芽孢杆菌 XT-4 的赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸脱羧酶可分别将赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸转化为尸胺、胍丁胺和腐胺等碱性物质。此外，菌株 XT-4 可利用柠檬酸作为碳源和能量源，柠檬酸盐水解产生碱性碳酸盐或碳酸氢盐^[11]。本研究通过产氨分析、酶活性测定与基因组功能注释，发现 *L. fusiformis* LW-3 拥有完整的脲酶基因簇 *ureABCEFGD*，其代谢产生的氨溶于水后形成 NH_4^+ 和 OH^- ，这与 Hu 等^[21]的研究结果一致。赖氨酸芽孢杆菌 TSBLM 具有完整的脲酶基因簇（*ureABCEFGD*），其编码的脲酶与尿素在最低能位点结合，该菌通过分解尿素产生 NH_4^+ ，而 NH_4^+ 的水解使 pH 升高^[21]。与之不同的是，本研究发现产碱菌 *L. fusiformis* 处理后土壤中碳酸氢根含量显著增加，表明 *L. fusiformis* 还可通过产生 HCO_3^- 消耗 H^+ ，这一过程亦可对缓解酸化作出贡献。也有研究发现类似的现象，Nie 等^[28]发现恶臭假单胞菌 Y-9 在 3-羟基丙酸代谢过程中可消耗氢离子，这导致培养基 pH 持续上升。由此可见，*L. fusiformis* LW-3 可能通过脲酶催化尿素水解生成氨（ NH_3 ），氨溶于水后形成铵离子（ NH_4^+ ）和氢氧根离子（ OH^- ），中和土壤中的 H^+ ，从而提升 pH。此外，碳酸氢根可与氢离子反应产生二氧化碳和水，消耗土壤中的氢离子，从而进一步减轻土壤酸化（图 6）。

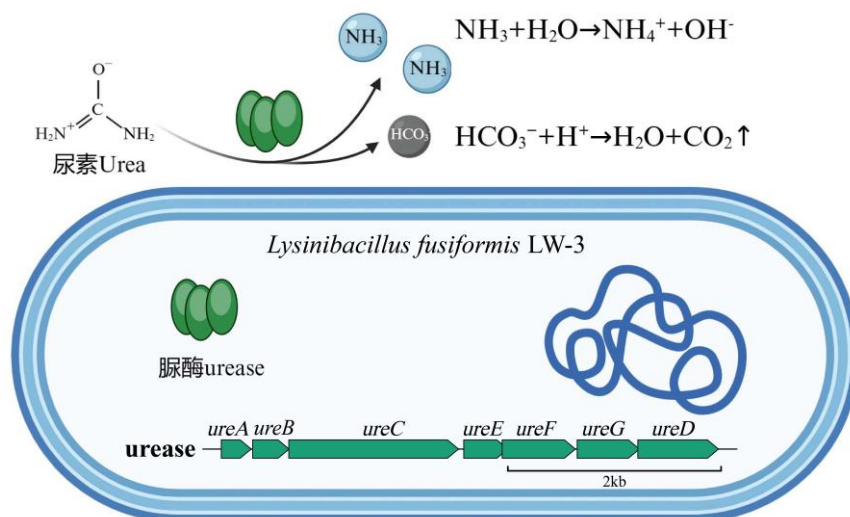


图 6 *Lysinibacillus fusiformis* LW-3 的潜在产碱机理

Fig. 6 Potential alkali-producing mechanism of *Lysinibacillus fusiformis* LW-3

3.2 产碱微生物对酸性土壤的改良及作物响应

本研究发现,土壤中的酸主要以交换性铝的形态存在于固相部分,而产碱菌 *L. fusiformis* 可有效降低土壤交换性铝的含量,缓解铝离子对作物的毒害。与之类似,荧光假单胞菌处理对土壤酸化亦有抑制作用,这主要是由于细菌上的有机阴离子与 H^+ 结合形成中性分子并降低溶液中 H^+ 的活性,该菌还抑制了土壤酸化过程中可溶性铝和交换性铝的增加,说明有机阴离子质子化可能是微生物抑制土壤酸化的主要原因^[10]。近期, Liu 等^[9]发现铜绿假单胞菌细胞表面丰富的阴离子官能团能中和土壤中的 H^+ ,这种胞外质子化过程是提高土壤 pH、抑制酸化的主要机制。赵学强等^[11]认为氮肥过量施用是旱地土壤酸化的主要诱因,这主要是由于硝态氮未被植物吸收或淋溶所致。尽管产碱菌产生的铵离子经硝化可能释放 H^+ ,但本研究仍然发现小白菜收获期土壤 pH 显著升高,这可能是由于 *L. fusiformis* 产氨和消耗 H^+ 造成的碱化效应强于铵离子硝化产生的酸化效应。Philippot 等^[29]认为,提高氨化作用可通过消耗氢离子提高土壤 pH。此外,本研究还发现接种 *L. fusiformis* 后,土壤蔗糖酶和蛋白酶活性显著增强,这表明 *L. fusiformis* 还可通过分泌蛋白酶分解蛋白质或氨基酸以释放氨,增加碱性物质积累,而蔗糖酶可增强土壤碳源供应,支持微生物代谢和有机碳的矿化,为植物和微生物提供能量。综上所述,产碱菌 *L. fusiformis* 可通过产氨、消耗 H^+ 两个过程实现对活性酸的抑制,通过降低土壤交换性铝的含量实现对潜性酸的抑制,从而实现对酸性土壤的改良作用,促进作物生长。相同使用成本下,与石灰改良等传统方法相比,产碱菌具有绿色、安全、可持续的优势。此外,通过田间施用方式的优化(如田头原位发酵-水肥一体化),可大幅降低其使用成本及操作难度。然而,产碱菌对土壤 pH 的作用机制及对土壤微生物群落结构与作物根际互作关系仍有待深入研究,以期为其在不同农田生态条件下的广泛应用奠定基础。

4 结论

本研究系统筛选出一批具有产碱能力的细菌和真菌,并验证了以 *L. fusiformis* LW-3 为代表的产碱菌具有较强的改良酸化土壤的能力。通过接种产碱菌可有效提升土壤 pH,显著降低土壤交换性酸总量、交换性铝及水解性酸含量,并提高土壤脲酶、蔗糖酶和蛋白酶等关键酶的活性。综合分析表明,产碱菌 *L. fusiformis* 主要通过代谢产氨、激活酶活性与促进碳酸氢根生成等机制协同调控土壤酸碱环境,实现对活性酸和潜性酸的双重抑制,从而实现酸化土壤的生态修复。田间试验进一步证实,

L. fusiformis LW-3 的施用可稳步提升土壤 pH, 降低土壤交换性酸和交换性铝含量, 缓解土壤酸化并促进作物增产, 具备良好的生产应用前景。研究结果为产碱菌在酸性耕地治理中的推广应用提供了理论基础与技术支持。

参考文献 (References)

- [1] Zhao X Q, Pan X Z, Ma H Y, et al. Scientific issues and strategies of acid soil use in China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(5): 1248-1263. [赵学强, 潘贤章, 马海艺, 等. 中国酸性土壤利用的科学问题与策略[J]. 土壤学报, 2023, 60(5): 1248-1263.]
- [2] Zheng C. Spatial and temporal changes of soil acidification and analysis of its influencing factors in Guangdong Province[D]. Taigu, Shanxi: Shanxi Agricultural University, 2019. [郑超. 广东省土壤酸化时空变化及其影响因子解析[D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2019.]
- [3] Wu Z F, Sun X M, Sun Y Q, et al. Soil acidification and factors controlling topsoil pH shift of cropland in Central China from 2008 to 2018[J]. Geoderma, 2022, 408: 115586.
- [4] Zeng M F, de Vries W, Bonten L T C, et al. Model-based analysis of the long-term effects of fertilization management on cropland soil acidification[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(7): 3843-3851.
- [5] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. Science, 2010, 327(5968): 1008-1010.
- [6] Xu R K, Ji G L. Chemical species of aluminum ions in acid soils [J]. Pedosphere, 1998, 8(2): 127-133.
- [7] Chen D L, Wang X X, Carrión V J, et al. Acidic amelioration of soil amendments improves soil health by impacting rhizosphere microbial assemblies[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2022, 167: 108599.
- [8] Ma B, Lü X F, Cai Y J, et al. Liming does not counteract the influence of long-term fertilization on soil bacterial community structure and its co-occurrence pattern[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 123: 45-53.
- [9] Liu C Y, Jiang M T, Yuan M M, et al. Root microbiota confers rice resistance to aluminium toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils[J]. Nature Food, 2023, 4(10): 912-924.
- [10] Nkoh J N, Yan J, Xu R K, et al. The mechanism for inhibiting acidification of variable charge soils by adhered *Pseudomonas fluorescens*[J]. Environmental Pollution, 2020, 260: 114049.
- [11] Zhang J, Wang X, Zhang L X, et al. Reducing cadmium bioavailability and accumulation in vegetable by an alkalizing bacterial strain[J]. Science of the Total Environment, 2021, 758: 143596.
- [12] Zhang N, Ma Z Y, Li D, et al. Soil pH filters the association patterns of aluminum-tolerant microorganisms in rice paddies[J]. mSystems, 2022, 7(1): e0102221.
- [13] Wang Q, Li K, Peng C L, et al. Effects of *Lysinibacillus sphaericus* WH07 on improving soil and soil microecology in gleyed paddy field[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024, 43(4): 169-181. [王麒, 李奎, 彭成林, 等. 球形赖氨酸芽孢杆菌 WH07 对潜育化水稻土的改良效果和土壤微生态的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 169-181.]
- [14] Wang C, Zhao X Q, Aizawa T, et al. High aluminum tolerance of *Rhodotorula* sp. RS1 is associated with thickening of the cell wall rather than chelation of aluminum ions[J]. Pedosphere, 2013, 23(1): 29-38.
- [15] Monciardini P, Sosio M, Cavaletti L, et al. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42(3): 419-429.
- [16] Yan K, You Q, Wang S Y, et al. Depth-dependent patterns of soil microbial community in the E-waste dismantling area[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 444: 130379.
- [17] Ma Y, Zhu Y H, Zhao D L, et al. Interference removal in ammonium measurement of fermentation broth by Berthelot color reaction[J]. Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2006, 32(3): 282-284, 304. [马悦, 朱贻华, 赵东玲, 等. 利用 Berthelot 颜色法测定发酵液中铵离

子的干扰排除[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2006, 32(3): 282-284, 304.]

[18] Deng X H, Zhang L H, Chen J, et al. Effects of amendment application on physicochemical properties of acidic soil, growth and quality of flue-cured tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(6): 14-20. [邓小华, 张龙辉, 陈金, 等. 改良剂对酸性土壤理化特性及烤烟生长和品质的影响[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(6): 14-20.]

[19] Guan S Y. Soil enzyme and its research method[M]. Beijing: Agriculture Press, 1986. [关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.]

[20] Yan W K. Optimal use of biplots in analysis of multi-location variety test data[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(11): 1805-1819. [严威凯. 双标图分析在农作物品种多点试验中的应用[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 1805-1819.]

[21] Hu X S, He B H, Liu Y C, et al. Genomic characterization of a novel ureolytic bacteria, *Lysinibacillus capsici* TSBLM, and its application to the remediation of acidic heavy metal-contaminated soil[J]. Science of the Total Environment, 2024, 927: 172170.

[22] Shu S Q, Luo H, Shi X J, et al. Functional mechanisms and application prospects of acid-tolerant bacteria in ameliorating acidic soils[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2424-2440. [舒思祺, 罗欢, 石孝均, 等. 耐酸细菌在酸性土壤改良中的功能机制与应用前景[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2424-2440.]

[23] Ren M L, Xu J N, Geng M D, et al. Soil bacteria and fungi on tropical mountainsides: Joint effects of weathering, climate, and chemical factors[J]. Environmental Research, 2024, 263: 120027.

[24] Wang C Q, Kuzyakov Y. Mechanisms and implications of bacterial-fungal competition for soil resources[J]. The ISME Journal, 2024, 18(1): wrac073.

[25] Mols M, Abee T. *Bacillus cereus* responses to acid stress[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(11): 2835-2843.

[26] Fan M, Huang S Q, Li Y L, et al. Flagella and motility-related properties of *Bacillus*: A review[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1832-1845. [范萌, 黄升泉, 李昱龙, 等. 芽孢杆菌鞭毛及其运动相关特性的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1832-1845.]

[27] Nie M, Yang Y R, Li Z L. Research progress in the mechanisms of maintaining intracellular and extracellular pH homeostasis in microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 1-13. [聂铭, 杨裕然, 李振轮. 微生物胞内外 pH 稳态维持机制研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 1-13.]

[28] Nie M, Li K L, Li Z L. β -alanine metabolism leads to increased extracellular pH during the heterotrophic ammonia oxidation of *Pseudomonas putida* Y-9[J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 356.

[29] Philippot L, Chenu C, Kappler A, et al. The interplay between microbial communities and soil properties[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 22(4): 226-239.

(责任编辑: 檀满枝)