

高效解磷解钾菌 NX-11 菌株的分离筛选、鉴定及最佳培养条件的确定

麻瑞阳¹ 张爱民^{2,3} 惠小双¹ 代 萌¹ 王 雯¹ 朱宝成¹

(1. 河北农业大学 生命科学院 河北 保定 071001; 2. 河北大学 生物技术中心 河北 保定 071001;

3. 河北农业大学 植物保护学院 河北 保定 071001)

摘要: 分离筛选具有高效解磷解钾效果的菌株并进行鉴定及培养条件优化。采用鉴别培养基进行菌株分离筛选,通过生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列分析进行菌种鉴定,并对其发酵培养基和培养条件进行正交试验确定最佳培养条件。筛选出高效解磷解钾菌株 NX-11。测序结果表明,NX-11 与 *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* 亲缘关系接近。确定其最佳发酵培养基配方为:淀粉 5.0%、黄豆饼粉 1.5%、 MgSO_4 0.07%、 NaCl 0.05%;最佳培养条件为:种龄 20 h、装量 30 mL/250 mL 三角瓶、接种量 4%、pH 值 8.0、培养温度 37 °C、摇床转速 200 r/min。

关键词: 枯草芽孢杆菌;解磷;解钾;正交试验

中图分类号:S432.4 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2013)02-0202-07

Screening Identification and Sporulation Conditions Optimization of NX-11 Strain Having the Ability of Solubilizing Phosphorus and Potassium

MA Rui-yang¹ ZHANG Ai-min^{2,3} HUI Xiao-shuang¹ DAI Meng¹ WANG Wen¹ ZHU Bao-cheng¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Biological Technology Center of Hebei University, Baoding 071001, China; 3. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Bacteria having the efficient activity on solubilizing phosphate and potassium have been isolated for its utilization as a biological fertilizer. The most efficient strain named NX-11 was chosen for further study. NX-11 was identified as *Bacillus subtilis* after a series of physiological and biochemical experiments, morphological observation and 16S rRNA gene sequence analysis. The solubilization ability of NX-11 was tested in the condition of pure culture. The results showed that the optimal medial components were composed of 5.0% starch, 1.5% soybean cake powder, 0.07% MgSO_4 , 0.05% NaCl . The optimal culture conditions were at temperature 37 °C with initial pH 8.0 and incubation time 20 h, inoculum's volume 40 mL/L, medium volume 30 mL in 250 mL flask and 200 r/min.

Key words: *Bacillus subtilis*; Phosphate solubilization; Potassium solubilization; Orthogonal test

近年来,随着农业可持续发展战略的实施,克服单一施用化肥给农作物品质、生态环境造成的危害,保证无公害绿色食品、有机食品安全无污染生产的全过程,成为社会的焦点。微生物肥料由于具有增加土壤多样性、改善农产品品质的特性,其研究及开发得到了高度重视^[1-2]。微生物肥料种类繁多,按照微生物的作用机理可分为根瘤菌肥料、自生固氮菌肥料、解磷细菌肥料、解钾细菌肥料、抗生素肥料

和复合微生物肥料^[3]。高效解磷解钾菌株可以有效利用土壤中的难溶性磷、钾矿物,并将其转化为可以被作物吸收利用的速效磷、钾,从而起到提高作物产量、改善作物品质、减少施肥对环境的影响,还能在一定程度上改善土壤的理化性质,降低生产成本等作用^[4]。

本研究主要从各地土壤中分离出具有高效解磷解钾能力的菌株,从中筛选出解磷解钾功效较好的

收稿日期:2013-01-18

基金项目:河北省科技支撑项目(No. 06207125-2)

作者简介:麻瑞阳(1987-),男,河北保定人,硕士,主要从事微生物与生化药学研究。

通讯作者:朱宝成(1962-),男,河北献县人,教授,博士生导师,主要从事应用微生物学研究。

NX-11 菌株, 对其进行了生理生化鉴定及 16S rRNA 同源性分析, 对其芽孢产率进行了优化, 为其在农业生产中的推广应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

土壤材料采自内蒙包头向日葵地。K-1 菌株 - 胶质芽孢杆菌 ACCC10012 (*Bacillus mucilaginosus*) 菌株, 由河北农业大学生物制药实验室保存。

1.2 细菌的分离和筛选

1.2.1 样品采集 取土壤样品 1.0 g, 放入 10 mL 无菌水中, 80 °C 水浴 20 min, 然后进行梯度稀释。

1.2.2 菌种分离 取稀释倍数为 10^{-2} 与 10^{-4} 在平板上进行涂布, 将涂布好的平板 37 °C 倒置培养, 过夜, 用灭菌竹签挑去不同形态的单菌落, 转接于 NA 斜面上, 37 °C 培养后 4 °C 保藏。

1.2.3 平板解磷解钾效果测定(初筛) 将斜面保藏的菌株用竹签挑取, 以十字接种法接到以下 3 种选择性培养基平板进行菌株活性的测定。

无机磷平板培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 0.3 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, 葡萄糖 10 g, MnSO_4 (1%) 1 mL, FeSO_4 (1%) 1 mL, 琼脂 20 g, 自来水 1 000 mL, pH 值 7.2。

有机磷平板培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, CaCO_3 3.5 g, 葡萄糖 10 g, MnSO_4 (1%) 1 mL, FeSO_4 (1%) 1 mL, 卵磷脂 0.2 g, 琼脂 20 g, 自来水 1 000 mL。

改良钾细菌平板培养基: 蔗糖 0.75 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15 g, Na_2HPO_4 0.30 g, MgSO_4 0.075 g, 钾铝酸矿 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

37 °C 培养 3 ~ 7 d, 观察菌株生长情况和分解圈大小筛选菌株。

1.2.4 摇瓶解磷解钾效果测定(复筛) 采用无机磷液体培养基、有机磷液体培养基、改良钾细菌液体培养基这 3 种液体培养基进行菌株的复筛。

无机磷液体培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 0.3 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, 葡萄糖 10 g, MnSO_4 (1%) 1 mL, FeSO_4 (1%) 1 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.2。

有机磷液体培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, CaCO_3 3.5 g, 葡萄糖 10 g, MnSO_4 (1%) 1 mL, FeSO_4 (1%) 1 mL, 卵磷脂 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL。

改良钾细菌液体培养基: 蔗糖 0.75 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15 g, Na_2HPO_4 0.30 g, MgSO_4 0.075 g, 钾铝酸矿

10 g, 蒸馏水 1 000 mL。

接种初筛菌株后, 28 °C, 180 r/min 培养 7 d, 用四苯硼钠法^[5]测定发酵液中可溶性钾的含量, 用钼锑抗比色法^[5]测定发酵液中可溶性磷含量。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 生理生化鉴定 参照文献[6-7]进行以下生理生化鉴定试验: 唯一碳源试验、唯一氮源试验、氧化酶试验、硝酸盐还原试验、甲基红试验、柠檬酸盐利用、产氨试验、V-P 试验、65 °C 生长、过氧化氢酶(接触酶)试验、糖醇发酵试验、淀粉水解试验、需氧性试验等。

1.3.2 16S rRNA 基因序列分析 16S rRNA 基因序列分析使用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行菌落 PCR, 引物序列: 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3'; 1492r: 5'-ACGGCAACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 产物送测序, 将得到的序列用 GenBank 中的 BLAST 进行比对分析。

1.4 产芽孢条件的优化

1.4.1 斜面菌种培养 NA 培养基: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%。

斜面菌种的制备: 将配制好的 NA 培养基分装试管, 115 °C 湿热灭菌 30 min。灭菌后趁热摆斜面。在超净台上, 用接种针从活化的菌种斜面上挑取少量菌, 划线接种于培养基斜面上, 37 °C 培养 24 h。

1.4.2 种子培养 种子培养基: 蛋白胨 10 g/L, 葡萄糖 10 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, NaH_2PO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。将培养基装入内放玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

种子培养: 在超净台中无菌操作, 用灭菌的竹签斜面上刮洗菌泥, 接种于装有种子培养基的三角瓶中, 振荡后制成均匀的菌悬液。摇瓶容量为 250 mL, 装量为 50 mL, 在 37 °C 摇床转速 200 r/min 培养 24 h, 血球计数板测定种子的含菌量。

1.4.3 发酵培养 发酵培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 7 g/L, 葡萄糖 20 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, NaH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L。

发酵培养: 将配制好的发酵培养基装入内装玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 装量为 50 mL。121 °C 湿热灭菌 15 min。在超净台上, 用灭菌的移液枪将培养好的液体菌种按 6% 的接种量接种于装有发酵培养基的三角瓶中, 37 °C 200 r/min 摇床培养 72 h。

1.4.4 单因素试验 基础培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 7 g/L, 葡萄糖 20 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, NaH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L。

单因素试验: 分别用 20 g/L 蔗糖、麦芽糖、淀

粉、麦麸、玉米粉、糊精代替基础发酵培养基的葡萄糖作为碳源,基础培养基中其他成分不变,200 r/min摇床培养,72 h 取样观察芽孢生成情况。

将氮源 I (酵母膏 7 g/L): 分别替代为蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸膏、酪蛋白、豆饼粉、尿素和 (NH₄)₂SO₄。

氮源 II (蛋白胨 10 g/L): 分别替代为蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸膏、酪蛋白、豆饼粉、尿素和 (NH₄)₂SO₄。其他成分不变。在 37 ℃、200 r/min 摇床上培养,72 h 后开始取样观察。

将无机盐I(MgSO₄ 0.5 g/L): 分别替代为 MgSO₄、(NH₄)₂SO₄、CaSO₄、FeCl₃、ZnSO₄、MoSO₄、NaCl 和 MnSO₄。

无机盐 II ((NH₄)₂SO₄ 2 g/L): 分别替代为 (NH₄)₂SO₄、MgSO₄、NaCl、CaSO₄、FeCl₃、ZnSO₄、MoSO₄ 和 MnSO₄。在 37 ℃、200 r/min 摇床上培养,72 h 后开始取样观察。

1.4.5 正交试验 出发培养基: 单因素试验中确定的碳源、氮源和无机盐配比。

培养基浓度正交试验: 以单因素试验中确定的

出发碳源、氮源和无机盐按照正交试验表配制不同浓度的发酵培养基,于发酵终点测定菌体含量和芽孢含量,计算芽孢形成率。

培养条件正交试验: 以最适碳源淀粉、氮源黄豆饼粉、无机盐 MgSO₄、NaCl 配制培养基,研究 pH、种龄、装量及接种量对芽孢杆菌芽孢形成的影响。

以上试验每处理均重复 3 次,芽孢形成率的数值为: $\bar{X} \pm SD$ 。

1.4.6 测定方法 活菌总数计数和芽孢染色法采用文献[8]介绍的方法。芽孢平板计数是在 80 ℃水浴加热 15 min 后,采用平板菌落计数法检测芽孢的形成量芽孢形成率即芽孢形成数与活菌总数的比值^[9]。

2 结果与分析

2.1 高效解磷解钾菌株的分离和筛选

2.1.1 平板解磷解钾效果测定 从内蒙包头向日葵地土壤中筛选得到的 NX-11 菌株对无机磷,有机磷,钾长石均有分解圈形成(表 1)。

表 1 高效解磷解钾菌株的筛选结果

Tab.1 Results of efficient solution of phosphorus and potassium screening

菌株号 No. ot strain	无机磷 Inorganic phosphorus	有机磷 Organic phosphorus	钾 Potassium	菌株号 No. ot strain	无机磷 Inorganic phosphorus	有机磷 Organic phosphorus	钾 Potassium
NX-11	+	+	+	BY-19	-	-	-
	+	+	+		-	-	-
	+	+	+		-	-	-
CX-21	-	-	-	CC-34	+	+	-
	-	-	-		+	+	-
	-	-	-		-	+	-
NX-31	-	-	-	CX-7	+	+	-
	-	+	-		+	+	-
	-	-	-		+	-	-
NX-33	+	-	-	CX-14	+	+	-
	+	-	-		+	+	-
	-	-	-		+	-	-
NX-43	-	-	-	BY-3	+	+	+
	-	-	-		+	+	+
	-	-	-		+	+	-
NX-42	+	-	+	CX-9	+	+	-
	+	-	+		+	+	-
	-	-	-		-	+	-

注: + 表示有分解圈; - 表示无分解圈。
Note: + Means a decomposition; - Means no decomposition.

2.1.2 摇瓶解磷解钾效果测定 利用四苯硼钠法和钼锑抗比色法分别测量发酵液中可溶性钾和磷的含量,可以确定 NX-11 菌株对于无机磷的分解效果

较为显著,可溶性磷含量达到对照组 K-1 的 10 倍以上;对钾长石分解次之,可溶性钾含量较对照组提高了 14%;对有机磷的分解导致发酵液中可溶性磷含

量提高了 10% (表 2)。

表 2 摇瓶解磷解钾效果测定

Tab. 2 Determination of the effects of shake flask solution of phosphorus and potassium

菌株号 No. of strain	有机磷 Organic phosphorus	无机磷/($\times 10^{-1}$) Inorganic phosphorus	钾 Potassium
NX-11	0.193	0.235	0.017
	0.193	0.237	0.016
	0.192	0.236	0.017
BY-3	0.063	0.347	0.019
	0.063	0.348	0.019
	0.063	0.347	0.015
CX-44	0.175	0.228	0.018
	0.177	0.227	0.018
	0.176	0.227	0.019
CX-7	0.106	0.254	0.014
	0.106	0.251	0.014
	0.105	0.246	0.015
对照 K-1	0.088	0.214	0.015
Control	0.087	0.214	0.014
group K-1	0.088	0.214	0.014

2.2 NX-11 菌株的鉴定

2.2.1 NX-11 菌株的生理生化特征 细胞杆状,成链状排列,端口成圆形,芽孢椭圆或圆形,单芽孢,兼性好氧,能利用葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖和 D-甘露糖产酸。葡萄糖产气,最适生长温度 35~37℃,菌落成乳白色,边缘整齐,表面有皱褶、隆起,菌落表面干燥,革兰氏阳性菌,菌落不透明,M R 试验、V P 试验、过氧化氢酶试验均为阳性,可利用丙二酸盐。

2.2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析 菌株 NX-11 与 *Bacillus* 属成员具有较高的序列相似性,构建系统发育树表明,亲缘关系与 NR_027552 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10 最近,相似性达到了 99.71%。因此,鉴定 NX-11 菌株为枯草芽孢杆菌枯草亚种(图 1)。

2.3 高效解磷解钾菌株 NX-11 的产芽孢条件优化

2.3.1 碳源单因素试验 使用淀粉作为单一碳源,在经过 72 h 发酵后,芽孢产率最高,达到 84.30%;其次是加入玉米粉的培养基,而使用其他碳源的培养基效果略差(图 2),因此,选取淀粉为出发碳源进行正交试验。

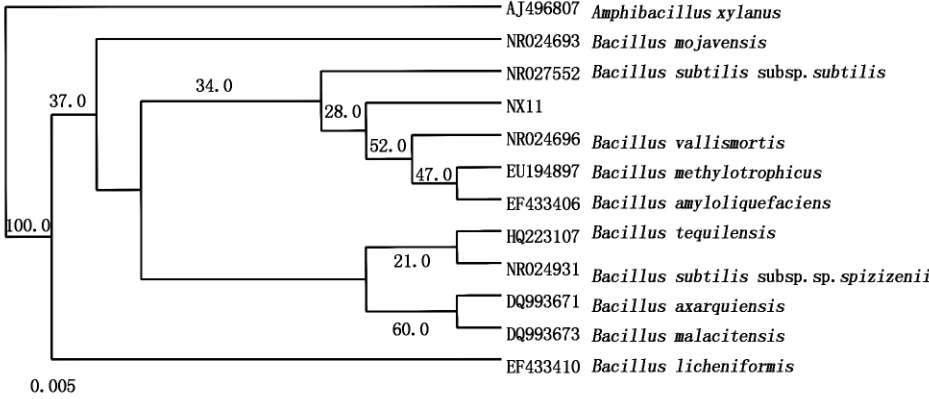


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 NX-11 与相关菌株的系统发育树

Fig.1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain NX-11 and related species

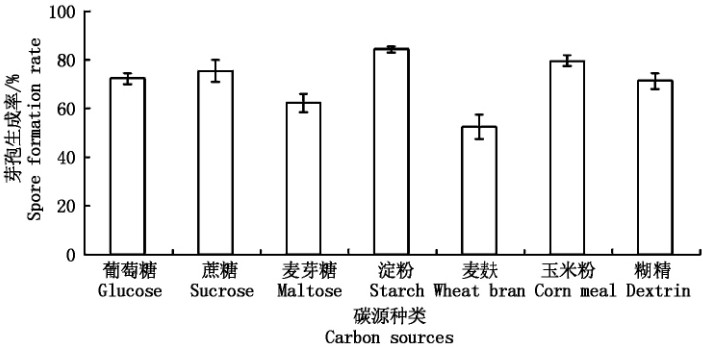


图 2 不同碳源对 NX-11 菌株芽孢形成率的影响

Fig.2 Effect of different carbon sources on spore formation rate of NX-11

2.3.2 氮源单因素试验 通过 2 次氮源单因素试验(图 3、4),确定使用黄豆饼粉作为氮源的培养基

芽孢生成率最高,分别达到 85.26%、86.73%,同时出于成本考虑,确定黄豆饼粉为出发氮源进行正交

试验。

2.3.3 无机盐的单因素试验 通过 2 次无机盐单因素试验(图 5、6)确定 MgSO_4 和 NaCl 为 NX-11 菌

株产生芽孢的培养基最佳无机盐组合,芽孢生成率高达 89.15% 和 83.17%,因此,选取该组合进行正交试验。三价铁盐芽孢生成率较低,仅达到不足 50%。

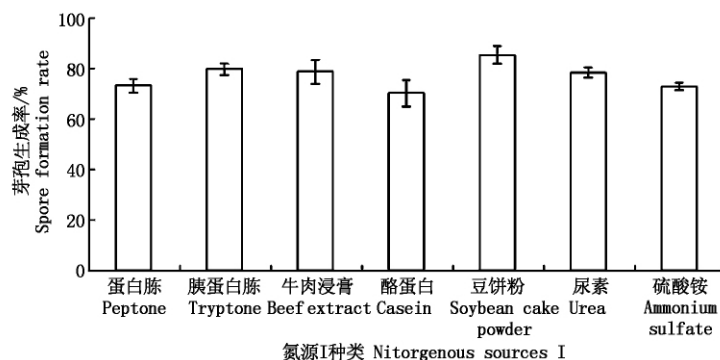


图 3 不同氮源 I 对 NX-11 菌株芽孢生成率的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogen sources I on spore formation rate of NX-11

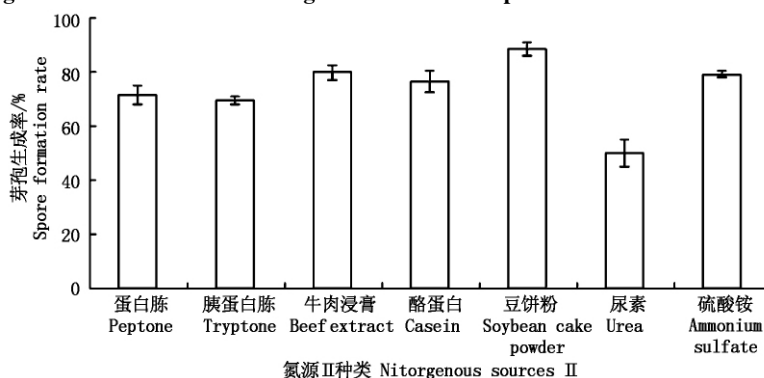


图 4 不同氮源 II 对 NX-11 菌株芽孢生成率的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen sources II on spore formation rate of NX-11

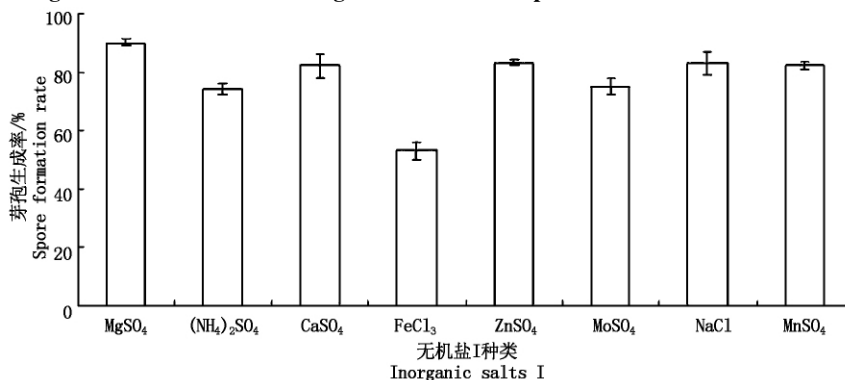


图 5 不同无机盐 I 对 NX-11 菌株芽孢形成率的影响

Fig. 5 Effect of different inorganic salts I on spore formation rate of NX-11

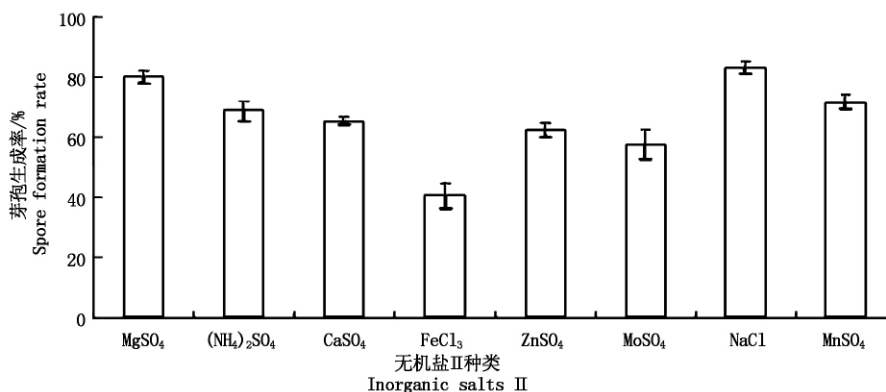


图 6 不同无机盐 II 对 NX-11 菌株芽孢形成率的影响

Fig. 6 Effect of different inorganic salts II on spore formation rate of NX-11

2.3.4 培养基浓度正交试验 经单因素试验条件优化后,综合分析各因素对 NX-11 菌株芽孢形成率的影响,进行了培养基主要成分浓度及培养条件等的正交试验,并对试验数据进行方差分析(表 3)。从表 3 可以看出,各因素极差大小为 $R_A > R_C > R_D > R_B$,培养 72 h 后各因素对菌株芽孢生成率的影响为: $A > C > D > B$,其中以碳源影响最为显著,无机盐影响次之,氮源最次。培养基最优组合为 A2B3C3D2。但

是在正交试验表中没有此组合,需要进行验证试验。正交试验表中的试验 6 为相近组合,且在正交试验中该组芽孢形成率最高,因此,选用试验 6 与最佳组合培养基进行验证试验。结果显示,最优组合培养基芽孢形成率为 95.35%,而试验 6 芽孢形成率为 93.58%。因此,选择的最优组合培养基浓度为:5% 淀粉,1.5% 豆饼粉,0.07% $MgSO_4$,0.05% NaCl。

表 3 培养基浓度正交试验结果

Tab.3 Orthogonal test results of medium concentration

试验号 Test No.	碳源(A) / % Carbon sources	氮源(B) / % Nitrogen sources	硫酸镁(C) / % $MgSO_4$	氯化钠(D) / % NaCl	芽孢生成率 / % Spore formation rate
1	2	0.5	0.02	0.02	82.51 ± 0.33
2	2	0.7	0.05	0.05	77.52 ± 0.83
3	2	1.5	0.07	0.07	89.86 ± 0.95
4	5	0.5	0.05	0.07	76.67 ± 5.42
5	5	0.7	0.07	0.02	86.48 ± 0.15
6	5	1.5	0.02	0.05	94.13 ± 0.19
7	7	0.5	0.07	0.05	85.90 ± 1.98
8	7	0.7	0.02	0.07	62.85 ± 0.18
9	7	1.5	0.05	0.02	79.73 ± 2.37
K1	83.3	79.83	79.74	82.91	
K2	85.76	83.3	77.97	85.85	
K3	76.16	87.91	87.41	76.46	
极差 R Range R	9.6	8.08	9.44	9.39	
优组合 Excellent combination	A2	B3	C3	D2	

注: K 代表平均值, R 代表极差。表 4 同。
Note: K stands for average, R stands for range. The same as Tab. 4.

表 4 培养条件正交试验结果

Tab.4 Orthogonal test results of culture condition

试验号 Test No.	种龄(A) / h Inoculum's age	装量(B) / mL Bottle filling	接种量(C) / % Inoculum's size	D pH	芽孢形成率 / % Spore formation rate
1	16	30	4	6	91.60 ± 0.34
2	16	50	6	7	86.04 ± 0.63
3	16	100	8	8	91.49 ± 0.37
4	18	30	8	7	92.87 ± 0.35
5	18	50	4	8	79.81 ± 0.30
6	18	100	6	6	92.65 ± 0.11
7	20	30	6	8	98.31 ± 0.22
8	20	50	8	6	95.22 ± 0.18
9	20	100	4	7	96.64 ± 0.17
K1	89.93	94.22	93.29	89.46	
K2	88.26	87.08	87.66	92.51	
K3	96.65	93.56	89.57	92.89	
极差 R Range R	8.39	7.14	5.62	3.43	
优组合 Excellent combination	A3	B1	C1	D3	

2.3.5 培养条件正交试验 以培养基浓度正交试验得到的优化培养基,对 NX-11 菌株进行培养条件正交试验(表 4)。对表 4 中数据分析得知,各因素极差大小为 $R_A > R_B > R_C > R_D$,培养条件对芽孢生

成率的影响为 $A > B > C > D$,种龄对芽孢形成率影响最为显著,装量次之,由此推断, NX-11 菌株产生芽孢的条件与菌体发育程度以及培养基中溶解氧的多少有较为密切的联系。培养条件最优组合为

A3B1C1D3。在所设计的正交试验表中没有出现与最优组合相同的试验条件,因此,选取与最优组合最相似也是芽孢产率最高的设计试验 7 与最优组合进行验证试验。最优组合芽孢生成率达到 97.78%,而试验 7 芽孢生成率为 97.54%,因此,最佳培养条件为种龄 20 h,装量 30 mL/250 mL,接种量 4%,pH 值 8.0。

3 讨论

随着社会对环境保护的日益重视,现代生态农业、绿色农业、有机农业的蓬勃发展,生产绿色、安全、无公害食品的发展趋势,微生物肥料在农业生产中将发挥出其应有的经济效益和生态效益,这将为生产开发高效优质的微生物肥料提供一个极好的发展机遇。微生物肥料既有有机肥的长效,又有化肥的速效,还有自身的增效,是一种保护生态环境,维护人类健康的理想肥料^[10-15]。

本研究筛选得到的 NX-11 菌株同时具有较强的磷钾降解能力,是一些其他微生物肥料所不具备的。

NX-11 菌株作为芽孢杆菌,其芽孢具有极强的抗热、抗辐射、抗化学药物和抗静水压等一些特殊的性质,易于保藏和使用等优点,因此,在工业化和商品化生产中对于其他菌种具有较大优势。对其发酵培养基进行优化后,芽孢产率得到大幅度提高,并且发现 NX-11 菌株对营养要求低,原材料来源广泛、成本低,适用于工业生产。

参考文献:

[1] 林启美,王 华,赵小蓉,等.一些细菌和真菌的解磷能

力及其机理初探[J].微生物学报,2001,28(2):26-29.

[2] 马春浩.解磷微生物及其应用研究综述[J].安徽农学通报,2007,13(4):34-36.

[3] 陈华癸.土壤微生物学[M].上海:上海科学技术出版社,1983.

[4] 蒋宝贵.解磷解钾自生固氮菌的分离筛选及鉴定[J].华中农业大学学报,2005,24(1):43-48.

[5] 中国土壤学会编.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,1999.

[6] 东秀珠.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.

[7] RE 布坎南,NE 吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].9 版.北京:科学出版社,1994:274-290.

[8] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:30-31,81-83.

[9] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992:104.

[10] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业出版社,2000.

[11] 邵春花,董云中.为生物肥料与生态农业[J].农业环境与发展,2002(3):12-13.

[12] 杜慧平,刘利军,闫双堆.微生物对矿山复垦地土壤基质的改良作用[J].山西农业科学,2011,39(1):43-46.

[13] 王文庆,史清亮,白建军,等.微生物肥料对山药土壤生态特征及病情指数的影响[J].山西农业科学,2010,38(12):37-39,56.

[14] 张朝轩,杨天仪,吴淑杭,等.微生物肥料对土壤生态及葡萄叶片叶绿素荧光特性的影响[J].天津农业科学,2011,17(1):92-95.

[15] 胡 可,王利宾,王永富.生物有机肥的发展与展望[J].山西农业科学,2011,39(12):1334-1336.