



添加中、微量元素及组合对促生菌剂促生特性的影响研究

付卫刚 姚拓

Effects of the addition of medium and trace elements and their combinations on the growth promoting properties of microbial inoculants

FU Weigang, YAO Tuo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0431>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

若尔盖高寒草地优势牧草植物根际促生菌的筛选及特性

Isolation, screening, and characterization of dominant plant growth-promoting rhizobacterial species in Zoige alpine grassland
草业科学. 2023, 40(2): 319 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0534>

高寒地区牧草根际促生菌的筛选与特性

Screening and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere of forage species in an alpine region
草业科学. 2022, 39(9): 1752 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0553>

耐盐促生菌的筛选及其对狗牙根耐盐性的影响

Screening and identification of salt-tolerant and growth-promoting microbial strains in the rhizosphere and their effect on the salt tolerance of Bermuda grass
草业科学. 2022, 39(11): 2297 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0114>

5株植物根际促生菌功能特性及培养条件

Functional characteristics and culture conditions of five plant growth-promoting rhizobacteria strains
草业科学. 2022, 39(1): 30 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0105>

盐胁迫下根际促生菌对醉马草种子萌发的影响

Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on *Achnatherum inebrians* seed germination during salt stress
草业科学. 2023, 40(2): 419 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0325>

植物根际促生菌发酵液中植物激素含量的液液萃取-高效液相色谱测定法

Determination of plant hormones in bacterial fermentation products of plant growth-promoting rhizobacteria by liquid-liquid extraction high-performance liquid chromatography
草业科学. 2022, 39(10): 2222 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0649>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0431

付卫刚, 姚拓. 添加中、微量元素及组合对促生菌剂促生特性的影响研究. 草业科学, 2024, 41(12): 2859-2868.

FU W G, YAO T. Effects of the addition of medium and trace elements and their combinations on the growth promoting properties of microbial inoculants. Pratacultural Science, 2024, 41(12): 2859-2868.

添加中、微量元素及组合对促生菌剂 促生特性的影响研究

付卫刚, 姚拓

(甘肃农业大学草业学院/草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为筛选可提升促生菌剂有效活菌数和促生特性的营养元素, 本文通过在促生菌剂中添加不同种类和浓度的中、微量元素及其组合, 探索不同元素的最佳添加量及添加后对菌剂有效活菌数、固氮酶活性、溶磷能力和分泌吲哚乙酸 (IAA) 的影响。结果表明: 1) 当钼、硼、锰和镁添加浓度分别为 100、100、5 和 10 mg·L⁻¹ 时, 菌剂的有效活菌数较未添加分别增加了 23.53%、77.65%、81.88% 和 148.71%。2) 正交试验表明, 最佳组合为 A₁B₀C₀D₁, 即钼 50 mg·L⁻¹、锰 5 mg·L⁻¹、镁 10 mg·L⁻¹ 和硼 50 mg·L⁻¹, 其中硼元素起主导作用。3) 通过测定单一元素及不同组合对促生菌剂促生特性的研究结果显示, 单一元素或不同元素组合添加对菌剂的固氮酶活性、溶磷能力和分泌 IAA 能力均存在不同程度的影响。综合评价得出, 影响菌剂促生特性综合能力表现为: 单一元素处理中, 添加 5 mg·L⁻¹ 锰的处理表现最优; 添加元素组合的处理中, 组合 A₅ (钼 100 mg·L⁻¹、硼 150 mg·L⁻¹、锰 5 mg·L⁻¹、镁 5 mg·L⁻¹) 最优。本研究结果可用于完善促生菌剂的配方。

关键词: 促生菌剂; 硼; 钼; 锰; 镁; 有效活菌数; 促生特性

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2024)12-2859-10

Effects of the addition of medium and trace elements and their combinations on the growth promoting properties of microbial inoculants

FU Weigang, YAO Tuo

(Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education / College of Pratacultural Science,
Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: This study was conducted to screen the nutrient elements that can enhance the effective viable count and growth promoting properties of microbial inoculants. By adding different types and concentrations of media and trace elements and their combinations to the microbial inoculants, we explored the optimal amendment amount of different elements and their effects on the effective viable bacterial counts of the inoculants, nitrogen-fixing enzyme activity, phosphorus solubilizing capacity, and secretory indoleacetic acid (IAA). The results showed that when molybdenum (Mo), boron (B), manganese (Mn), and magnesium (Mg) were added at 100, 100, 5, and 10 mg·L⁻¹, the effective viable bacteria counts of the microbial inoculants were increased by 23.53%, 77.65%, 81.88%, and 148.71%, respectively. The orthogonal test showed that the best combination was A₁B₀C₀D₁ (Mo 50 mg·L⁻¹, Mn 5 mg·L⁻¹, Mg 10 mg·L⁻¹, and B 50 mg·L⁻¹), with boron playing a leading role. The addition of a single element or different combination of elements had different effects on the nitrogenase activity,

收稿日期: 2023-08-09 接受日期: 2023-10-10

基金项目: 国家燕麦荞麦产业技术体系项目 (CARS-07-C-1); 国家牧草产业技术体系项目 (CARS-34)

第一作者: 付卫刚 (1997-), 男, 甘肃陇西人, 在读硕士生, 研究方向为草地微生物多样性及其资源利用。E-mail: 2397722599@qq.com

通信作者: 姚拓 (1968-), 男, 甘肃镇原人, 教授, 博士, 主要从事农业应用微生物及制剂研发、农业废弃物资源化利用等研究。

E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

<http://cykx.lzu.edu.cn>

phosphorus solubilization ability, and IAA secretion ability of the microbial inoculants. The comprehensive evaluation showed that the rankings of the overall ability to influence the growth promoting properties of the microbial inoculants were as follows: among the single-element treatments, the addition of $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn was the best performer, and among the treatments with a combination of elements added, the best performer was the combination of A₅ (Mo $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, B $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Mn $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and Mg $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). In summer, the results of this study can be used to improve the formulation of microbial inoculants.

Keywords: microbial inoculants; B; Mo; Mn; Mg; viable bacteria count; growth promoting properties

Corresponding author: YAO Tuo E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

近年来, 农业微生物的研究和应用已成为加快农业创新发展、提升农业科技竞争力的主导力量, 国际农业强国已将微生物组列入农业领域五大亟待突破的方向之一^[1]。微生物肥料作为安全环保无公害的新型生物产品, 有望成为化肥的主要替代品。微生物肥料主要通过肥料中功能微生物的新陈代谢实现固氮、溶磷、分泌激素等作用或通过诱导植物体产生吲哚乙酸 IAA, 活化土壤养分, 增加植物营养元素供应量等, 从而直接或间接促进植物生长^[2-3]。

作为一种生物产品, 微生物肥料的施用效果会受到土壤环境、气候条件、作物种类等因素的影响, 存在促生效果不佳或者不稳定的情况^[4-5], 因而如何有效提高微生物肥料的施用效果成为当下研究的重点。目前, 对微生物肥料的研究主要集中在高效促生菌株的筛选及其特性的测定方面, 关于微生物肥料高效配方及养分强化的相关研究较少。因此, 筛选可提升促生菌剂施用效果, 完善复合菌剂配方, 进而获得高效微生物肥料产品显得尤为重要。

中、微量元素作为微生物生长和发育必需的营养物质, 对微生物的生长和代谢具有促进作用^[6]。前期研究表明, 钼是固氮酶中钼铁蛋白的组分之一, 在固氮酶的活性调节中具有重要作用, 钼的缺少会降低生物固氮能力^[7]; 硼是固氮菌固氮不可缺少的元素之一, 且多数研究证明在硼存在的条件下, 微生物的固氮能力会增强^[8]; 此外, Gao 等^[9]研究发现, 适宜浓度下, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 的增殖均有促进作用。目前关于中微量元素对于促生菌作用的研究主要集中在单一元素添加至培养基后对单一菌株的影响, 而对于中、微量元素在促生菌剂中添加的研究较少。基于此, 本研究拟将 4 种元素 (钼、

硼、锰和镁) 添加至促生菌剂中, 研究不同元素及其组合的加入是否影响菌剂的促生能力, 以期筛选可增强促生菌剂特性的中、微量元素, 进一步完善菌剂配方, 提升菌剂的使用效果, 为我国农业生产提供优质高效的微生物肥料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌剂

供试菌剂由甘肃农业大学草地应用微生物团队提供, 分别由蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) CY1、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CY3、产黄假单胞菌 (*Pseudomonas synxantha*) CM1 按照一定比例 (配方正在申请专利) 混合后制得的复合菌剂。

1.1.2 供试中、微量元素

供试元素为硼 (H_3BO_3)、钼 [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$]、镁 ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 和锰 ($\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$), 均购于国药集团有限公司。

1.1.3 供试培养基

LB 液体培养基用于菌株活化、菌剂制备和 IAA 含量测定, 无氮培养基^[10] (nitrogen free medium, NFM) 用于测定菌剂的固氮酶活性; 无磷培养基^[11] (pikovskaky, PKO) 用于菌剂溶磷能力的测定。

1.2 研究方法

1.2.1 中、微量元素最佳添加浓度筛选

将中、微量元素各配制为 100 mL 母液待用。将促生菌剂放置于 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床振荡培养, 48 h 后调节菌液 $\text{OD}_{600} = 2.0 \pm 0.02$, 添加至促生菌剂中将母液稀释为不同浓度梯度的稀释液, 均取 1 mL 添加至上述菌剂中制成含不同元素不同浓度 (如: 添加 1 mL 的硼酸, 使菌剂中硼含量分别为 0、10、50、100、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的复合菌剂 (表 1), 添加等

表 1 中、微量元素添加浓度梯度设置
Table 1 Medium and trace element mixture add concentration gradient setting

类型 Type	名称 Name	添加浓度 Concentration gradient/(mg·L ⁻¹)
微量元素 Trace element	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0, 20, 50, 100, 200
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0, 5, 10, 20, 50
	H ₃ BO ₃	0, 10, 50, 100, 200
中量元素 Medium element	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0, 5, 10, 20, 50

体积无菌去离子水作为对照, 放置于 180 r·min⁻¹、28 °C 恒温摇床振荡培养, 测定不同时间 OD₆₀₀ 值, 选择 OD₆₀₀ 最高的浓度处理作为最佳添加量^[9]。

1.2.2 4 种元素筛选结果验证及不同处理菌剂有效活菌数测定

将 1.2.1 中筛选的最佳浓度添加至促生菌剂, 通过测定有效活菌数验证 1.2.1 中的筛选结果, 同时通过测定不同时间的 OD₆₀₀ 值探究不同元素最佳添加后对促生菌剂 OD 值的影响。有效活菌数测定参考国家标准 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》^[12], 每个处理 3 次重复。

1.2.3 4 种元素组合对促生菌剂 OD₆₀₀ 的影响

本文采用 4 因素 3 水平 L₉(3⁴) 正交表 (表 2), 以钼、硼、锰和镁的质量浓度为 4 个因素, 以 0 水平对应值为中间值设置 3 个水平共计 9 个组合进行正交试验, 正交试验后从表中选择 OD 值最高的 3 个组合进行后续研究。

表 2 正交试验设计
Table 2 Orthogonal experimental design

因素 Factor	水平 Factor level		
	-1	0	1
A: (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	50	100	150
B: MnSO ₄ ·H ₂ O	1	5	9
C: MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	10	15
D: H ₃ BO ₃	50	100	150

1.2.4 4 种元素及其组合对促生菌剂促生特性的影响

筛选的 4 种单一元素及 3 种组合分别为 A₂ (钼 150 mg·L⁻¹, 硼 50 mg·L⁻¹, 锰 5 mg·L⁻¹, 镁 15 mg·L⁻¹)、A₅ (钼 100 mg·L⁻¹, 硼 150 mg·L⁻¹, 锰 5 mg·L⁻¹, 镁 5 mg·L⁻¹) 和 A₆ (钼 100 mg·L⁻¹, 硼 50 mg·L⁻¹, 锰 9 mg·L⁻¹,

镁 10 mg·L⁻¹), 将其按照最佳添加浓度添加至促生菌剂中制成含不同浓度不同元素的复合菌剂。

菌剂固氮特性测定参照王振龙等^[10]的方法: 将培养 24 h 后的菌剂吸取 200 μL 菌液接种于盛有半固体 NFM 培养基中, 以不接菌培养基为对照, 28 °C 培养 48 h 后将棉花塞换成橡胶塞, 用无菌注射器抽出 1 mL 气体并注入 1 mL 乙炔, 28 °C 培养 48 h 后用气象色谱仪 (Agilent 7890A, 美国) 测定 C₂H₄ 出峰时间及峰面积百分比, 计算固氮酶活性。

菌剂溶磷特性测定参照 Liu 等^[11]的方法: 将制备好的菌液接种于装有 20 mL PKO 液体培养基的锥形瓶中, 放置于 28 °C、180 r·min⁻¹ 条件下培养 12 d 后, 测定其 pH 后, 离心, 取上清液 1 mL 与 19 mL NaHCO₃ 溶液混合后, 置于摇床摇动 30 min。准确吸取滤液 5 mL, 再加入 5 mL 钼锑抗显色液于 50 mL 容量瓶中。用紫外可见光分光光度计测定 OD₆₀₀, 参照标准曲线计算溶磷量。

菌剂分泌 IAA 特性测定参照姚拓^[13]的方法: 采用 Salkowski 比色法, 将培养后的菌液接种于装有 20 mL 液体培养基的锥形瓶中, 摇床培养 10 d 后, 吸取 10 mL 离心, 取上清液 5 mL 加 5 mL S2 比色液, 暗处理 30 min 后迅速用分光光度计测定 530 nm 下的吸光值, 在标准曲线上查出待测液的 IAA 浓度。

1.3 数据分析

采用 SPSS 进行正交试验设计并进行极差和方差分析, 用平均值±标准误表示测定结果, 使用 SPSS PRO 进行数据标准化处理, 并以熵权法计算各指标的权重并排序, 用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 4 种元素最佳添加量筛选

不同种类和浓度的中、微量元素添加对菌剂的 OD 值影响不同 (图 1)。与未添加元素相比, 添加钼后 0~8 h 内处理间无明显差异, 超过 8 h 后未添加钼的菌液 OD 值逐渐下降, 其余处理则仍处于上升趋势; 当培养时间超过 16 h 时, 添加 100 mg·L⁻¹ 钼的菌剂 OD 值仍处于上升趋势, 其余处理则开始下降; 此后添加 100 mg·L⁻¹ 钼的菌剂 OD 值均高于其他处理, 效果最优 (图 1A)。硼添加后, 菌剂的 OD 值呈现先升高后降低的趋势, 在 0~8 h 处理间无明显差

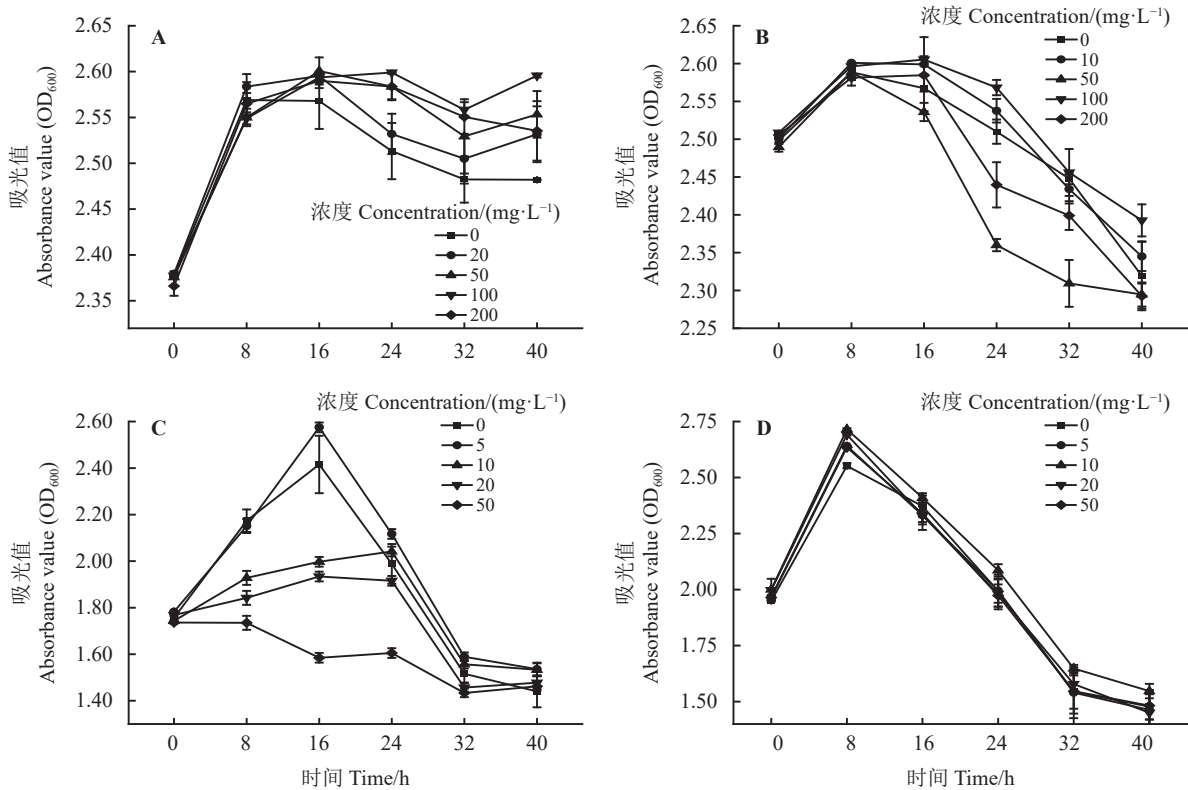


图1 4种元素不同浓度添加对菌剂 OD_{600} 的影响

Figure 1 Effects of the addition of four elements on the microbial inoculant OD_{600}

A、B、C、D图分别为钼、硼、锰和镁元素添加量筛选。

Figure A, B, C and D show the content screening of elements Mo, B, Mn, and Mg, respectively.

异, 超过8 h后添加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和未添加硼的菌液 OD 值开始下降, 当培养时间超过16 h时, 添加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼的菌剂 OD 值均高于其他浓度, 效果最优(图1B)。

与未添加相比, 锰添加后菌剂 OD 值表现为低浓度升高, 高浓度下降(图1C)。当添加浓度为 $0\sim 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 培养 $0\sim 16\text{ h}$ 间菌剂的 OD 值逐渐升高, 其中添加量为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理最高, 其余处理均低于未添加; 当超过24 h后, OD 值均开始下降; 培养时间延长至40 h时, 处理间无明显差异, 但添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 仍高于未添加, 因此选择 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为最佳添加量。同理, 菌剂添加镁(图1D)培养至8 h时, 各处理的 OD 值均高于未添加, 随着培养时间的延长, 各处理菌剂的 OD 值均开始降低, 且趋势一致, 其中添加量为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的菌剂 OD 值最高, 因此选择该浓度进行后续试验。

2.2 4种元素筛选结果验证及不同处理菌剂有效活菌数测定

4种元素分别以最佳添加量添加后, 菌剂的

OD 值均表现为先升高后降低的趋势(表3)。当培养至24 h时各菌剂间无显著差异($P > 0.05$), 培养至48 h时添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 锰的菌剂 OD 值最高; 培养至72 h, $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 锰处理的菌剂 OD 值显著高于其他处理($P < 0.05$); 培养时间延长至84 h时, 添加了中、微量元素的菌剂 OD 值均高于CK, 其中添加了 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 锰的处理最高, 且显著高于CK($P < 0.05$); 当培养时间延长至108 h时, 除添加了钼和镁的菌剂, 其余处理的 OD 值均显著高于CK($P < 0.05$), 由此可见, 添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 锰的菌剂 OD 效果最优。

与CK相比, 添加 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的锰可显著提高菌剂有效活菌数($P < 0.05$), 添加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钼、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镁后菌剂的有效活菌数分别较CK增加了23.53%、77.65%、81.88% ($P > 0.05$), 与前期筛选结果一致(图2)。

2.3 4种元素组合对促生菌剂的影响

单因素试验发现, 不同元素添加对促生菌剂促进作用不同, 为考察各因素之间的关系及影响, 进

表 3 4 种元素最适添加条件下对菌剂 OD₆₀₀ 的影响
Table 3 The influence of four elements on the microbial inoculant OD₆₀₀ under optimal amendment conditions

时间 Time/h	0 (CK)	100 mg·L ⁻¹ H ₃ BO ₃	100 mg·L ⁻¹ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	5 mg·L ⁻¹ MnSO ₄	10 mg·L ⁻¹ MgSO ₄
0	2.112 ± 0.004Fa	2.107 ± 0.004Fa	2.113 ± 0.006Fa	2.107 ± 0.005FGa	2.120 ± 0.005Ea
12	2.682 ± 0.003Abc	2.664 ± 0.008Ac	2.706 ± 0.009Aa	2.724 ± 0.006Aa	2.686 ± 0.001Ab
24	2.567 ± 0.004Ba	2.573 ± 0.025Ba	2.578 ± 0.010Ba	2.600 ± 0.023Ba	2.562 ± 0.002Ba
36	2.474 ± 0.001Cb	2.454 ± 0.004Cc	2.475 ± 0.010Cb	2.496 ± 0.001Ca	2.475 ± 0.001BCb
48	2.427 ± 0.008Cbc	2.406 ± 0.004CDc	2.442 ± 0.009CDab	2.468 ± 0.005Da	2.420 ± 0.012Cbc
60	2.366 ± 0.009Dab	2.352 ± 0.024Db	2.376 ± 0.006Dab	2.406 ± 0.013Da	2.381 ± 0.001Cab
72	2.241 ± 0.014Eb	2.244 ± 0.035Eb	2.244 ± 0.008Eb	2.317 ± 0.027Ea	2.248 ± 0.000Db
84	2.055 ± 0.009Gb	2.105 ± 0.046Fab	2.074 ± 0.005Fb	2.184 ± 0.043Fa	2.096 ± 0.014Eb
96	1.849 ± 0.030Hb	2.018 ± 0.034Ga	1.920 ± 0.047Gab	2.073 ± 0.043Ga	1.998 ± 0.082Fab
108	1.886 ± 0.370Hb	2.061 ± 0.413Ga	1.975 ± 0.569Gab	2.098 ± 0.040Ga	1.980 ± 0.057Fab

同列不同大写字母表示相同处理在不同时间差异显著($P < 0.05$), 同行不同小写字母表示相同时间不同处理间差异显著($P < 0.05$); 下表同。

Different capital letters within the same column indicate significant differences for the same treatment among different times at the 0.05 level, and different lowercase letters within the same row indicate significant differences for the same treatment among different times at the 0.05 level; This is applicable for the following tables as well.

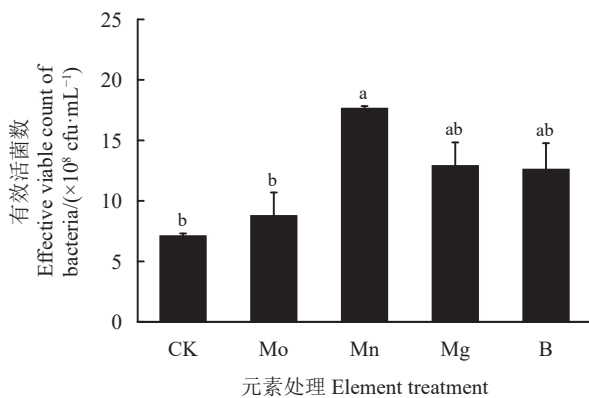


图 2 单一中、微量元素对促生菌剂有效活菌数的影响

Figure 2 Effects of single medium and trace elements on the effective viable number of microbial inoculants

CK 表示未添加中微量元素; Mo 代表钼元素; Mn 代表锰元素; Mg 代表镁元素; B 代表硼元素, 下图同。

CK indicates that no trace element is added; Mo stands for molybdenum; Mn stands for manganese; Mg stands for magnesium; B stands for boron. This is applicable for the following figure as well.

进一步优化各因素的最佳添加量, 单选取各元素最佳的添加浓度范围进行正交试验(表 4)及方差分析(表 5)。依据 R 值判断, 影响菌剂增殖的因素顺序为 $D > C > A > B$, 4 个因素对菌剂 OD 值的影响均极显著 ($P < 0.01$)。因此, 综合极差分析和方差分析, 促生菌剂添加中、微量元素最佳组合为 $A_1B_0C_0D_{-1}$, 即 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 钼、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 锰、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镁和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼。

挑选最优的 A_2 、 A_5 和 A_6 3 个组合进行初步试验发现, A_6 最优。通过后期进一步验证, 测得添加 A_6 后菌剂的 OD 值为 2.540, 较正交结果降低了 3.52%, 偏差结果在可接受范围内。

2.4 4 种元素及其组合对促生菌剂促生特性的影响

添加 4 种元素均可提高菌剂固氮酶的活性, 与 CK 相比, 添加硼、锰和镁后, 菌剂的固氮酶活性显著高于 CK ($P < 0.05$), 添加钼对菌剂固氮酶活性较 CK 可提高 25.55% ($P > 0.05$) (图 3A)。当 4 种元素组合后, 与 CK 相比, 组合 A_2 、 A_5 和 A_6 对菌剂固氮酶活性无显著提升作用 ($P > 0.05$) (图 3A)。单一元素与 4 种元素组合相比, 促生菌剂添加单一元素对固氮酶活性的提升效果强于元素组合 A_2 。

与 CK 相比, 添加单一中微量元素后对菌剂分泌 IAA 的影响不同 (图 3B), 添加锰可显著提升菌剂分泌 IAA 的能力 ($P < 0.05$), 添加硼和镁则对菌剂分泌 IAA 有所抑制 ($P > 0.05$)。当 4 种元素组合后发现, 组合 A_6 可显著提升菌剂分泌 IAA 的能力。3 种元素组合间相比较, A_6 显著优于 A_2 和 A_5 。

与 CK 相比, 单一中微量元素添加对菌剂溶有机磷无显著影响, 其中, 添加钼和镁对菌剂溶解有机磷的能力具有一定的抑制作用 ($P > 0.05$), 而锰添

表4 正交试验及极差分析结果
Table 4 Results of orthogonal test and range analysis

序号 Number	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (A)	MnSO ₄ (B)	MgSO ₄ (C)	H ₃ BO ₃ (D)	OD ₆₀₀
A ₁	1	-1	0	1	2.484
A ₂	1	0	1	-1	2.517
A ₃	1	1	-1	0	2.391
A ₄	0	-1	1	0	2.452
A ₅	0	0	-1	1	2.517
A ₆	0	1	0	-1	2.540
A ₇	-1	-1	-1	-1	2.497
A ₈	-1	0	0	0	2.514
A ₉	-1	1	1	1	2.508
K ₁	2.506	2.478	2.468	2.518	
K ₂	2.503	2.516	2.513	2.452	
K ₃	2.464	2.480	2.492	2.503	
R ²	0.042	0.032	0.045	0.066	
主次顺序 Primary and secondary order			D > C > A > B		
最优水平 Optimal level			A ₋₁ B ₀ C ₀ D ₋₁		

K_i 为各因素同一水平试验指标之和, $i = 1, 2, 3$; R 为极差, 计算方法是各因素 K_i 的最大值减去 K_i 的最小值; 表中“0、-1、1”表示表2正交试验设计中水平编号。

K_i is the sum of test indexes at the same level of all factors, $i = 1, 2, 3$; R is the range, calculated by subtracting the minimum K_i value from the maximum K_i value of each factor; “0, -1, 1” in the table indicate the horizontal numbers in the orthogonal test design shown in Table 2.

表5 方差分析结果
Table 5 Results of variance analysis

项目 Item	平方和(SS) Sum of squares	自由度(df) Degree of freedom	均方(MS) Mean square	F	P
A	0.010	2	0.005	10.342	***
B	0.008	2	0.004	8.637	***
C	0.009	2	0.004	9.252	***
D	0.021	2	0.011	22.090	***
Error	0.009	18	0.000		

$R^2 = 0.848$, 调整后 $R^2 = 0.781$; ***表示 $P < 0.01$ 。

$R^2 = 0.848$, adjusted $R^2 = 0.781$; ***, $P < 0.01$.

加后菌剂溶有机磷能力较 CK 可提升 11.50% (图 3C)。当 4 种元素组合后, 与 CK 相比, 组合 A₅ 可提升菌剂溶解有机磷的能力, 较 CK 可提升 142.46% ($P <$

0.05), A₆ 和 A₂ 无显著影响 ($P > 0.05$) (图 3C)。单一元素处理间相比, 添加锰的效果显著优于添加镁; 3 种组合间相比, A₅ 最优。此外, 测量菌液的 pH 发现, 菌剂均为酸性, pH 介于 3~4, 与菌剂溶有机磷能力无显著相关性 (图 3C)。

与 CK 相比, 添加单一元素硼、锰和镁可提升菌剂溶解无机磷的能力, 其中添加硼提升作用显著 ($P < 0.05$), 添加钼则抑制了菌剂溶无机磷的能力 ($P < 0.05$) (图 3D)。4 种元素组合后, 组合 A₅ 和 A₆ 可显著提升菌剂溶无机磷能力 ($P < 0.05$)。单一元素与组合相比较, A₆ 效果最优。此外, 测量菌液的 pH 发现, 菌剂均为酸性, 其中添加钼元素后菌剂的 pH 显著高于 ($P < 0.05$) 其他处理 (图 3D)。同时, pH 与菌剂的溶无机磷能力呈现显著负相关性, 即 pH 越低, 溶无机磷的能力越强。

2.5 4 种元素及其组合对促生菌剂促生特性的综合评价

将数据标准化处理后进行权重计算, 固氮酶标准化的权重为 27.437%, 无机磷标准化的权重为 10.607%, IAA 标准化的权重为 30.803%, 有机磷标准化的权重为 31.15% (表 6)。其中, 溶有机磷能力的权重较其他性状权重占比高, 说明在各不同处理中, 添加不同元素及组合后菌剂的溶有机磷能力的差异较大, 相对于其他促生特性, 对评价结果有更大的影响。

综合 4 种菌剂的能力分析发现, 与 CK 相比, 菌剂添加单一中微量元素及其组合后, 对菌剂综合能力影响排序为 锰 > A₅ > A₆ > 硼 > 钼 > 镁 > A₂; 其中单一元素最优为 锰, 组合最优为 A₅ (表 7)。

3 讨论

3.1 单一元素及组合添加对促生菌剂 OD 值及有效活菌数的影响

中、微量元素作为生物生长的必需物质, 对于微生物的生长具有十分重要的意义。不同种类的中、微量元素对微生物的影响不同, 同一种中、微量元素对不同微生物的影响也不同^[6]。本研究通过将不同浓度的中、微量元素添加至促生菌剂发现, 低浓度时可促进菌株增殖, 但到达一定浓度后其效果开始减弱甚至表现为抑制, 其中, 当钼、硼、锰和镁

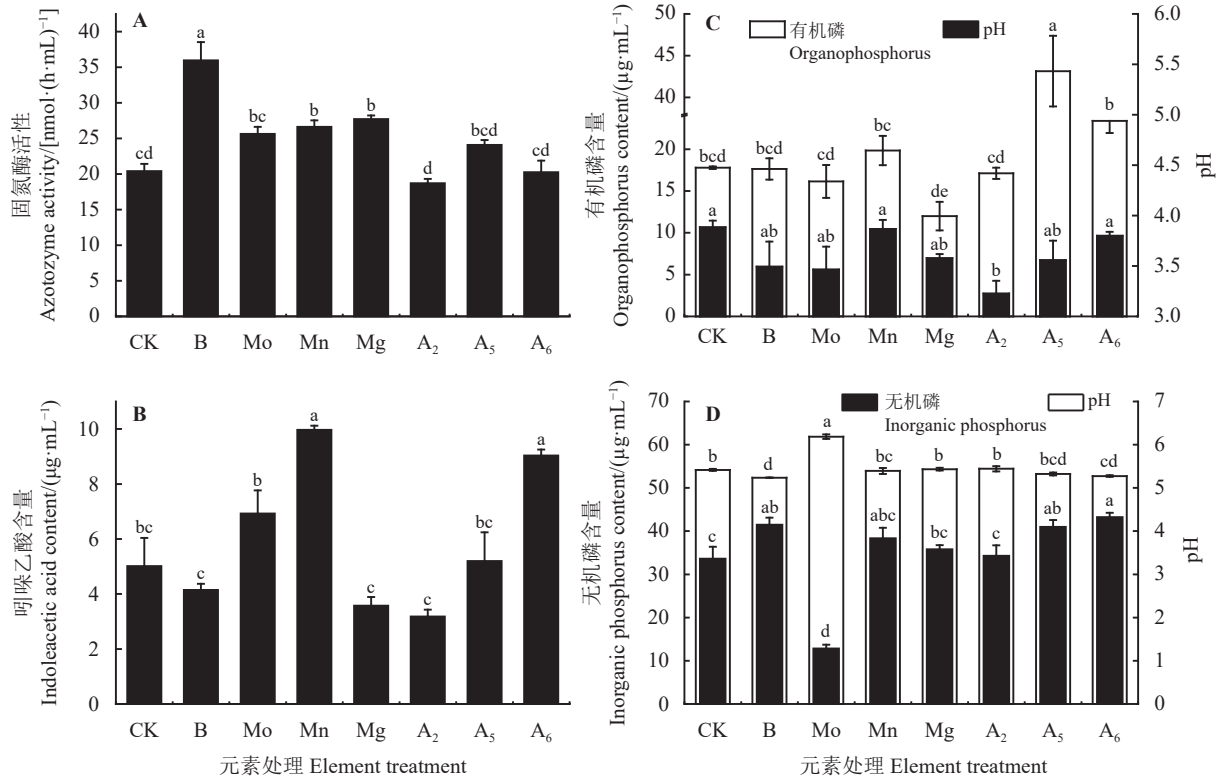


图 3 不同元素及其组合对促生菌剂促生特性的影响

Figure 3 Effects of different elements and their combinations on growth-promoting properties of microbial inoculants

图中 A₂、A₅、A₆ 表示表 4 正交试验中的组合 2、组合 5、组合 6。

A₂, A₅, and A₆ in the figure represent combination 2, combination 5, and combination 6 shown in the orthogonal test in Table 4.

表 6 各处理的权重分析结果

Table 6 Weight analysis results of each process

项目 Item	信息熵值e Information entropy value e	信息效用值d Information utility value d	权重 Weight/%
无机磷含量 Inorganic phosphorus content	0.931	0.069	10.607
固氮酶活性 Nitrogen fixing enzyme activity	0.822	0.178	27.437
IAA 含量 IAA content	0.800	0.200	30.803
有机磷含量 Organic phosphorus content	0.798	0.202	31.153

4 种元素浓度分别为 100、100、5 和 10 mg·L⁻¹ 时对菌剂的效果最好。此外, 本研究在不同供试元素各自最适添加量条件下进行较长时间培养发现, 随着培养时间延长至 96 h, 各处理的 OD 值均高于 CK。通过计算活菌数发现, 添加 4 种元素均可提升菌剂的有效活菌数, 推测是添加一定量营养元素后, 菌剂中的营养物质提升, 使菌剂中的菌株可以更好地生长, 从而提升有效活菌数, 这与多粘类芽孢杆菌^[9] 和内生根瘤菌^[14] 在添加趋势和浓度的研究结果类似, 其中部分浓度存在差异, 其原因可能是不同微生物对元素的利用和适应能力不同。

3.2 单一元素及其组合添加对促生菌剂促生性能的影响

微生物在生长及其次级代谢过程中钙、镁、硼、锰、钼等起到极其重要的作用^[15], 是各种酶的辅助因子及激活剂^[16]; 硼是固氮细菌固氮所必需的微量元素, 在根瘤菌与宿主共生关系建立、表面多糖的形成以及根瘤菌侵染等过程中发挥着重要作用^[17]; 钼是固氮酶的组成因子, 其在低浓度处理下可以提升甘蔗 (*Saccharum sinensis*) 体内的固氮菌的固氮酶活性^[7]; 锰可促进地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 产表面活性物质^[18]。本研究发现, 当菌剂中分别添

表 7 不同元素及其组合对促生菌剂促生特性影响的综合排名

Table 7 Comprehensive ranking of the effects of different elements and their combinations on the growth-promoting properties of microbial inoculants

处理 Treatment	综合评价 Comprehensive evaluation	排名 Ranking
CK	0.241	7
B	0.474	4
Mo	0.322	5
Mn	0.601	1
Mg	0.241	6
A ₂	0.126	8
A ₅	0.587	2
A ₆	0.511	3

加 100、100、5 和 10 mg·L⁻¹ 的硼、钼、锰和镁时均可提升促生菌剂的固氮酶活性, 其中 100 mg·L⁻¹ 的硼提升效果最显著, 其次为镁和锰, 而 4 种元素组合后无明显变化。其主要原因可能为: 1) 添加 4 种元素后可提升菌剂中固氮菌的数量, 导致菌剂固氮能力增强。2) 硼作为放线菌和根瘤菌固氮必需的微量元素, 可能亦是本菌剂中固氮细菌固氮所必需的元素, 适量的添加提升了本菌剂中固氮促生菌的固氮能力, 因此其固氮能力有所提升且固氮效果最佳^[19]。3) 钼、镁、锰等作为生物酶的激活剂和前体, 适量的添加可作为本菌剂中固氮酶的前体和激活剂, 提升固氮酶活性^[20]。此外, 前人研究发现, 过量的中、微量元素添加后不仅不会对微生物产生正向作用, 反而会抑制微生物的生长和代谢^[21], 在本研究中, 当 4 种元素组合后, 促生菌剂种含有的中、微量元素总量上升, 可能产生了轻微抑制作用, 导致菌剂中某一菌株的生长或代谢受到影响, 因此处理组中的组合 A₂ 和 A₆ 添加至菌剂后, 其固氮酶活性无明显变化。

相关研究表明, 吲哚乙酸作为主要生长素参与植物许多生理过程, 是植物生长发育的关键诱导因子^[22]。刘璐等^[23] 研究发现, 培养基中添加镁离子可显著提升产 IAA 菌产 IAA 的能力; 贾西贝等^[24] 通过优化产 IAA 菌的培养条件发现, 不同金属离子添加对短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 分泌 IAA 的影响不同。本研究发现, 锰和组合 A₆ 添加可提升菌剂分泌 IAA 能力, 其原因可能是锰和组合 A₆ 添加后

可促进菌剂中产 IAA 能力强的菌株数量增多^[25], 导致菌剂分泌 IAA 增多, 或锰和组合 A₆ 的添加可促进菌株合成色氨酸, 后色氨酸经吲哚-3-乙酰胺或吲哚-3-丙酮酸途径合成吲哚乙酸, 继而促进 IAA 合成^[26]。

大量研究发现, 外界环境如矿质营养、土壤微生物的相互抑菌作用、载体类型、土壤特性、溶磷菌与其他微生物间的交互作用、竞争能力以及在根际定殖能力等都会对溶磷菌的溶磷能力产生影响^[27-28]。本研究中添加单一或组合中微量元素后, 菌剂的溶磷能力各不相同, 其中添加了硼、组合 A₅ 和 A₆ 的菌剂溶无机磷能力显著提升且 pH 降低, 而添加了钼的菌剂溶无机磷能力被显著抑制且 pH 显著升高, 其余两种单一元素和组合 A₂ 添加后无显著影响, 其原因可能为添加硼、组合 A₅ 和 A₆ 后菌剂中有机酸和 H⁺ 的含量升高, 因此对难溶性无机磷的溶解能力增强^[29]。有机磷溶解主要依靠酶解作用, 某些溶磷微生物主要分泌植酸酶、核酸酶和磷酸酶, 将有机磷转化为无机磷, 为微生物和植物生长提供磷源^[30]。本研究中添加单一中微量元素对菌剂的溶有机磷能力无显著影响, 而补加不同元素的组合后菌剂溶有机磷的能力显著增强, 其原因可能是元素组合添加后, 几种元素互相作用可提升有机酸对磷酸钙中的 Ca²⁺、Al³⁺ 等金属离子发生螯合作用, 从而将磷酸钙中的 PO₄³⁻ 释放出来^[31], 或是几种元素组合添加后可促进菌剂中菌株对 Ca²⁺ 的吸收能力增强, 从而使溶磷能力增强, 具体原因需进一步探究。

4 结论

促生菌剂添加钼、硼、锰和镁分别为 100、100、5 和 10 mg·L⁻¹ 时, 可提升菌剂的有效活菌数, 且对菌剂的固氮酶活性、溶磷能力和分泌植物激素能力具有一定的促进作用。

4 种元素进行正交组合后添加, 组合 A₅ (钼、硼、锰、镁为 100、150、5、5 mg·L⁻¹) 可提升菌剂的溶磷能力, 组合 A₆ (钼、硼、锰、镁为 100、50、9、10 mg·L⁻¹) 可提升菌剂分泌 IAA 能力和溶无机磷能力, 两种组合均对菌剂固氮酶活性无显著影响。

综合分析结果表明, 促生菌剂添加单一元素为 5 mg·L⁻¹ 锰最好; 添加元素组合为 A₅ (钼 100 mg·L⁻¹、硼 150 mg·L⁻¹、锰 5 mg·L⁻¹、镁 5 mg·L⁻¹) 最优。

参考文献 References:

- [1] 周杨, 邓名荣, 杜娟, 宋仲骞, 吴清平, 朱红惠. 我国农业微生物产业发展研究. *中国工程科学*, 2022, 24(5): 197-206.
ZHOU Y, DENG M R, DU J, SONG Z J, WU Q P, ZHU H H. Development of agricultural microbial industry in China. *Strategic Study of CAE*, 2022, 24(5): 197-206.
- [2] TIMMUSK S, BEHERS L, MUTHONI J, MURAYA A, ARONSSON A. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 49.
- [3] GOSWAMI D, THAKKER J N, DHANDHUKIA P C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food and Agriculture*, 2016, 2(1): 1127500.
- [4] OROZCO-MOSQUEDA M C, FLORES A, ROJAS-SÁNCHEZ B, URTIS-FLORES C A, MORALES-CEDEÑO L R, VALENCIA-MARIN M F, CHÁVEZ-AVILA S, ROJAS-SOLIS D, SANTOYO G. Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, 2021, 11(6): 1167.
- [5] BATISTA B D, SINGH B K. Realities and hopes in the application of microbial tools in agriculture. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(4): 1258-1268.
- [6] MEMOLI V, EYMAR E, GARCÍA-DELGADO C, ESPOSITO F, SPERANZA C P, MEMOLI V, EYMAR E, DE MARCO A, BARILE R, MAISTO G. Soil element fractions affect phytotoxicity, microbial biomass and activity in volcanic areas. *Science of the Total Environment*, 2018, 636(SEP. 15): 1099-1108.
- [7] 韦莉萍, 李杨瑞, 杨丽涛. 钼对甘蔗体内固氮菌的固氮酶活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2007, 55(1): 118-122.
WEI L P, LI Y R, YANG L T. Effect of molybdenum on nitrogenase activity of nitrogen-fixing bacteria in sugarcane. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2007, 55(1): 118-122.
- [8] 陈永岗. 硼对根瘤菌胞外多糖和吲哚乙酸分泌的调控研究. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2020.
CHEN Y G. Regulation of boron on the secretion of extracellular polysaccharides and indoleacetic acid of rhizobia. Master Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020.
- [9] GAO Y G, LIANG J, XIAO R X, ZANG P, ZHAO Y, ZHANG L X. Effect of four trace elements on *Paenibacillus polymyxa* Pp-7250 proliferation, activity and colonization in *ginseng*. *AMB Express*, 2018, 8(1): 164.
- [10] 王振龙, 姚拓, 李明源, 李青璞, 柴加丽, 张琛, 张银翠. 若尔盖高寒草地优势牧草植物根际促生菌的筛选及特性. *草业科学*, 2023, 40(2): 319-328.
WANG Z L, YAO T, LI M Y, LI Q P, CHAI J L, ZHANG C, ZHANG Y C. Isolation, screening, and characterization of dominant plant growth-promoting rhizobacterial species in Zoige alpine grassland. *Pratacultural Science*, 2023, 40(2): 319-328.
- [11] LIU X T, CHAI J L, ZHANG Y C, ZHANG C, LEI Y, LI Q P, YAO T. Halotolerant rhizobacteria mitigate the effects of salinity stress on maize growth by secreting exopolysaccharides. *Environmental and Experimental Botany*, 2022, 204: 105098.
- [12] 中国国家标准化管理委员会. 农用微生物菌剂 GB 20287—2006. 北京: 中国标准出版社, 2006.
Standardization Administration of China. Microbial Inoculants in Agriculture GB 20287—2006. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [13] 姚拓. 植物根际促生菌研究与应用. 北京: 中国农业出版社, 2021.
YAO T. Research and Application of Plant Rhizosphere Growth-Promoting Bacteria. Beijing: China Agriculture Press, 2021.
- [14] 苗阳阳. 外源物质对苜蓿内生根瘤菌运移定殖的影响研究. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2017.
MIAO Y Y. Effects of exogenous materials on the migration and colonization of rhizobia in alfalfa. Master Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [15] 牛登飞, 童群义. 金属离子对短梗霉多糖发酵的影响. *食品工业科技*, 2009, 30(9): 154-157.
NIU D F, TONG Q Y. Study on effects of metal ions on pullulan production by *Aureobasidium pullulan*. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(9): 154-157.
- [16] 王华, 李静, 王冬梅, 郭书贤, 薛刚. 金属离子对斯达油脂酵母发酵产油脂的影响. *中国食品学报*, 2010, 10(2): 67-74.
WANG H, LI J, WANG D M, GUO S X, XUE G. Effects of metal ions on lipid production by fermentation with *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 10(2): 67-74.
- [17] ARORA N K, KHARE E, SINGH S, MAHESHWARI D K. Effect of Al and heavy metals on enzymes of nitrogen metabolism of fast and slow growing rhizobia under explanta conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26: 811-816.
- [18] 于亚男. 金属离子和氨基酸对地衣芽孢杆菌产生物表面活性剂的影响. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2019.
YU Y N. Effects of metal ions and amino acids on surfactants produced by *Bacillus licheniformis*. Master Thesis. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.
- [19] BOLAÑOS L, REDONDO-KMIETO M, BONILLA I, WALL L G. Boron requirement in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and

- Frankia symbiotic* relationship. Its essentiality for *Frankia* BCU110501 growth and nitrogen fixation. *Physiologia Plantarum*, 2010, 115(4): 563-570.
- [20] 余茜, 张国丽, 敖晓琳. 金属离子对微生物蛋白酶活性的影响及机理. *中国食品学报*, 2019, 19(4): 287-294.
YU Q, ZHANG G L, AO X L. Effect and mechanism of metal ions on the activity of microbial protease. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(4): 287-294.
- [21] 纪明山, 王毅婧. 地衣芽孢杆菌生防菌株 SDYT-79 发酵条件优化. *沈阳农业大学学报*, 2011, 42(2): 164-169.
JI M S, WANG Y J. Optimization of fermentation conditions of antagonistic *Bacillus licheniformis* SDYT-79 strain. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2011, 42(2): 164-169.
- [22] 江绪文, 李贺勤, 谭勇. 藿香内生细菌 HX-2 的鉴定、耐性及对宿主植物的促生作用. *草业学报*, 2018, 27(1): 161-168.
JIANG X W, LI H Q, TAN Y. Identification, tolerance to abiotic stress and host plant effects of endophytic bacteria HX-2 from *Agastache rugosa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(1): 161-168.
- [23] 刘璐, 唐文竹, 李宪臻. 一株产吲哚乙酸菌的筛选、鉴定与优化. *大连工业大学学报*, 2019, 38(4): 239-243.
LIU L, TANG W Z, LI X Z. Screening, identification and optimization of IAA producing bacteria. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2019, 38(4): 239-243.
- [24] 贾西贝, 王琦琦, 李杨, 褚贵新, 孙燕飞. 一株产吲哚乙酸耐盐促生菌的分离、鉴定及发酵条件优化. *中国酿造*, 2019, 38(11): 37-42.
JIA X B, WANG Q Q, LI Y, CHU G X, SUN Y F. Isolation, identification and fermentation conditions optimization of a salt-tolerant, growth-promoting and indoleacetic acid-producing bacterium. *China Brewing*, 2019, 38(11): 37-42.
- [25] 韩桂琪, 王彬, 徐卫红, 陈贵青, 王慧先, 张海波, 张晓璟, 熊治庭. 重金属 Cd、Zn、Cu、Pb 复合污染对土壤微生物和酶活性的影响. *水土保持学报*, 2010, 24(5): 238-242.
HAN G Q, WANG B, XU W H, CHEN G Q, WANG H X, ZHANG H B, ZHANG X J, XIONG Z T. Effects of heavy metal combined pollution on soil microbial indicators and soil enzymatic activity. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2010, 24(5): 238-242.
- [26] 陈永岗, 康文娟, 吴芳, 阿芸, 师尚礼, 张翠梅, 李自立. 硼对根瘤菌胞外多糖和吲哚乙酸分泌的调控研究. *草业学报*, 2021, 30(5): 42-51.
CHEN Y G, KANG W J, WU F, A Y, SHI S L, ZHANG C M, LI Z L. Boron promotes secretion of extracellular polysaccharides and indole-3-acetic acid by *Rhizobium*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(5): 42-51.
- [27] 王玉书. 外源物质对无机磷细菌生长和溶磷作用的影响. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018.
WANG Y S. Effects of exogenous substances on growth and phosphate dissolution of phosphorus solubilizing bacteria. Master Thesis. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [28] 李海云, 姚拓, 张榕, 张洁, 李智燕, 荣良燕, 路晓雯, 杨晓蕾, 夏东慧, 罗慧琴. 红三叶根际溶磷菌株分泌有机酸与溶磷能力的相关性研究. *草业学报*, 2018, 27(12): 113-121.
LI H Y, YAO T, ZHANG R, ZHANG J, LI Z Y, RONG L Y, LU X W, YANG X L, XIA D H, LUO H Q. Relationship between organic acids secreted from rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria in *Trifolium pratense* and phosphate-solubilizing ability. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(12): 113-121.
- [29] CHEN Y P, REKHA P D, ARUN A B, SHEN F T, LAI W A, YOUNG C C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(1): 33-41.
- [30] 李琦, 杨晓蕾, 李晓林, 申友磊, 李建宏, 姚拓. 高寒草地燕麦根际解植酸磷促生菌鉴定及其优势菌假单胞菌属菌株功能特性. *生物技术通报*, 2023, 39(3): 243-253.
LI Q, YANG X L, LI X L, SHEN Y L, LI J H, YAO T. Identification of phytate phosphorus-solubilizing PGPB in *Avena sativa* rhizosphere from alpine grassland and functional characteristics of dominant genus *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(3): 243-253.
- [31] 李海云, 姚拓, 张榕, 李智燕, 荣良燕, 路晓雯, 杨晓蕾, 夏东慧, 罗慧琴. 红三叶根际溶磷菌的筛选与培养基优化. *草业学报*, 2019, 28(1): 170-179.
LI H Y, YAO T, ZHANG R, LI Z Y, RONG L Y, LU X W, YANG X L, XIA D H, LUO H Q. Isolation and screening of phosphate-solubilizing bacteria from the rhizosphere of *Trifolium pratense* and culture medium optimization. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(1): 170-179.

(责任编辑 张瑾)