

任友花,王羿超,李娜,等.微生物肥料高效解磷菌筛选及解磷机理探究[J].江苏农业科学,2016,44(12):537-540.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.158

微生物肥料高效解磷菌筛选及解磷机理探究

任友花¹,王羿超¹,李娜¹,李雪²,殷海松³,乔长晟^{1,2}

(1. 天津科技大学天津市工业微生物重点实验室/工业发酵微生物教育部重点实验室,天津 300457;

2. 天津北洋百川生物技术有限公司,天津 300457;3. 天津市现代职业技术学院,天津 300350)

摘要:芽孢杆菌已被广泛应用于微生物肥料的生产。以巨大芽孢杆菌 11433 作为出发菌株,对其进行紫外诱变,根据平板解磷圈直径与菌落直径比值进行初筛,再根据解磷能力进行复筛,并最终获得一株高效解磷菌。该菌株的摇瓶试验结果表明,发酵 3 d 后,pH 值从 7.00 降到了 4.03,其解磷含量可达到 46.79 $\mu\text{g/mL}$,较出发菌株 11433 的产量提高了 115.62%,且其遗传稳定性良好。以得到的高产菌 11433-D 作为研究对象,对其解磷机理进行分析。发现有机酸的产生促进了解磷量的提高且使发酵液 pH 值降低。气相色谱质谱和高效液相色谱检测发现,巨大芽孢杆菌发酵液中的主要代谢产物为葡萄糖酸、乙酸、丙酸。

关键词:巨大芽孢杆菌;诱变育种;解磷机理;高效液相色谱

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0537-03

磷在农业中起到重要作用,土壤有效磷的缺乏导致植物减产^[1-2]。磷肥的施用能够促进各种代谢正常进行,植物生长发育良好,同时可提高植物的抗寒性和抗旱性。肥料中 70% 以上的水溶性磷与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等结合,转化为难溶性磷酸盐,很难被植物吸收利用^[3]。然而巨大芽孢杆菌不但能分解有机磷物质,而且也能分解难溶性磷化合物^[4]。因此,在农业上常被用来做磷细菌肥料。

紫外线是一种使用最早、沿用最久、应用广泛、效果明显的物理诱变剂。尽管几十年来,不断有各种新的诱变剂出现和应用,但到目前为止,经诱变处理后得到的微生物肥料高产菌中,有 80% 左右是通过紫外线诱变后筛选获得的。紫外线迄今仍然是微生物育种中最常用和有效的诱变剂之一^[5-6]。卢金珍等研究表明,采用蒙金娜有机磷培养基对巨大芽孢杆菌进行紫外诱变,其解磷能力达到 16.85 mg/mL ,比出发菌株提高了 117.7%^[7]。

微生物溶解无机磷的机理复杂,研究认为,一些微生物解磷主要是其分泌质子的溶解作用,另一些猜测认为是小分子有机酸的酸溶和螯合作用。虞伟斌等研究表明,有机酸的螯合作用是解磷菌 K_3 解磷的主要机理^[8]。研究表明,巨大芽孢杆菌有机酸主要代谢产物是葡萄糖酸、乳酸和乙酸^[9]。伊盛研究发现,产气肠杆菌在溶磷过程中可能是主要通过增强细胞内 TCA 循环而增加体系能量,从而获得较多种类和含量的有机酸^[10]。

本试验以解磷能力较强的巨大芽孢杆菌 11433 为出发菌株,进行紫外诱变,获得高效解磷菌株,进而对解磷菌发酵液

中的有机酸与溶磷量的关系进行了探索,为该菌株在微生物肥料中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验主要仪器(表 1)和主要试剂

衍生化试剂:甲氧基铵盐酸盐/吡啶溶液(色谱纯,Fluka 公司),色谱纯 N -甲基- N -(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA),(购自 Fluka 公司);色谱纯吡啶(纯度:99.8%),购自美国 Sigma 公司。试验用水为 Milli-Q 超纯水。葡萄糖酸、乙酸、柠檬酸等标准样品,分析纯。

表 1 主要试验仪器

仪器名称	型号	生产厂商
数显 pH 计	FE20	北京汇中顺成科技有限责任公司
紫外可见分光光度计	752	天津市拓普仪器有限公司
高效液相色谱	Agilent1100	Agilent Technologies
气相-质谱联用仪	6980	Agilent Technologies
电子天平	SC6010	梅特勒-托利多常州衡器有限公司
摇床	SKY-2102	苏坤实业有限公司

1.2 菌株与培养基

菌种来源:巨大芽孢杆菌 11433,中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号 1.223。

营养琼脂培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 5 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂 20 g/L,pH 值 7.0~7.2,121 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 灭菌。

种子培养基:葡萄糖 10 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L,尿素 1.5 g/L,酵母粉 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.41 g/L,pH 值 7.0,121 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 灭菌。

无机磷发酵培养基:葡萄糖 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L, NaCl 0.3 g/L, KCl 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L,pH 值 7.0~7.5,121 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 灭菌。

无机磷固体培养基:葡萄糖 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L,

收稿日期:2015-10-21

基金项目:天津市科技计划(编号:14ZCZDTG0025)。

作者简介:任友花(1989—),女,山东临沂人,硕士研究生,主要研究方向微生物发酵制剂。E-mail:renyouhua123456@163.com。

通信作者:乔长晟,博士,教授,主要研究方向为生物高分子及食品生物学。Tel:(022)25328451;E-mail:qiaochangsheng@tust.edu.cn。

NaCl 0.3 g/L, KCl 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值 7.0 ~ 7.5, 121 °C 20 min 灭菌。

1.3 高效解磷菌的筛选

1.3.1 种子液制备 将 4 °C 斜面保存的巨大芽孢杆菌活化, 将其分别划线于营养琼脂培养基上, 37 °C 培养 24 h, 挑取活化的菌落, 接于种子培养基, 37 °C、200 r/min 培养 20 h。

1.3.2 发酵培养 将种子液按 5% 接种量接入无机磷发酵培养基, 37 °C、200 r/min 摇床培养 4 d, 同时设置不接种作为对照培养。

1.3.3 菌株的诱变处理方法 菌株的诱变处理采用紫外诱变方法, 诱变处理的流程为: 出发菌株孢子悬液→紫外诱变→根据解磷圈直径与菌落直径比值初筛→摇瓶复筛→斜面保存、遗传稳定性试验。

将磁力搅拌器置于功率为 30 W 的紫外灯下 30 cm 处, 打开紫外灯, 以稳定波长预先照射 20 min 杀菌。无菌移液管移取 1 mL, 放入盛有 99 mL 无菌水的三角瓶中, 振荡 5 min 充分摇匀, 使细菌分散。将样品稀释成为 10^{-2} CFU/mL 菌悬液。取 5 mL 制作的孢子悬液于直径 7 cm 带有转子的平皿中。将平皿放在诱变箱的磁力搅拌器上, 开启磁力搅拌器, 打开皿盖, 分别照射 0、15、30、45、60、75、90、120 s。将照射处理的孢子悬液分别进行梯度稀释, 取各照射剂量 10^{-8} ~ 10^{-5} 稀释度的孢子悬液 0.1 mL 分别涂布平皿, 每个梯度做 3 个平行。37 °C 避光的环境下, 将平皿倒置培养 18 ~ 26 h, 观察平皿上解磷圈和菌落的生长情况。以未经紫外线处理(处理 0 s)的孢子悬浮液涂布平皿作对比, 计算致死率, 以紫外照射时间为横坐标, 致死率为纵坐标绘制致死率曲线。

1.3.4 解磷菌的筛选

1.3.4.1 解磷菌的初筛 根据诱变存活菌株在解磷培养基上形成的解磷圈直径与菌落直径比值观察诱变效果, 筛选比值大于出发菌株 15% 的为正突变, 小于 15% 的为负突变, 进行复筛。

1.3.4.2 解磷菌的复筛 采用“1.3.1”节和“1.3.2”节的方法摇瓶培养, 加入 0.5% 质量浓度经酸洗碱洗后的无磷活性炭, 发酵液 15 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 据国标 NY 412—2000 中所述方法以钼锑抗比色法测定速效磷含量。以菌株发酵液含磷量减去不接菌的空白对照发酵液含磷量衡量菌株的解磷能力, 同时测定菌株不同时间段的 pH 值变化。

1.3.4.3 遗传稳定性试验 将筛选出的高产菌株 D 在斜面培养基上连续转接 5 代, 根据钼锑抗比色法测定有效磷含量, 检测其遗传稳定性。

1.3.5 种子生长曲线测定 本试验以菌株 11433-D 为研究对象, 将甘油管保存的孢子悬液 0.8 mL 接种于种子培养基, 37 °C、200 r/min 摇床培养 18 h 得到一级种子液。按 2% 的接种量将一级种子液接种至含 300 μL 培养基的生长板中, 37 °C 条件下在全自动生长曲线分析仪上培养 48 h, 每隔 2 h 取样测定 1 次 $D_{600\text{nm}}$, 3 个平行样。试验结束后, 根据培养过程中不同时间的吸光度, 绘制 $D_{600\text{nm}}$ 与培养时间(h)的关系曲线。

1.4 解磷机理的探讨

1.4.1 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)测定有机酸 无

机磷发酵液离心—冷冻干燥—衍生化—气质检测。

1.4.1.1 样品的处理 取 5 mL 发酵液在 10 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清 100 μL , 加入 10 μL 内标混合液, 混匀后真空冷冻干燥。

1.4.1.2 样品的衍生化 冻干后样品加 50 μL 甲氧基铵盐酸盐/吡啶溶液(20 mg/mL), 涡旋使冻干的样品充分溶解, 置于 40 °C 水浴反应 80 min; 加 80 μL MSTFA(*N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺溶液, 混合均匀, 置于 40 °C 水浴反应 80 min; 将衍生化后的样品 10 000 r/min 离心 5 min; 取上清液 100 μL 装于进样瓶中, 并编号, 室温放置 2 h, 准备进行 GC-MS 检测。

1.4.1.3 主要色谱条件 色谱柱: 硅色谱柱[DB-5MS, 30 m(长)×0.25 mm(内径)×0.25 μm (膜厚)], 购自 J&W Scientific, Folsom, CA, USA; 进样量: 1 μL ; 采用柱后分流技术, 分流比为 1:10; 载气: 高纯氦气(纯度: 99.999 5%), 购自北京氦普北分气体工业有限公司; 恒压模式: 91 kPa; 进样口温度: 280 °C; 柱温箱升温程序: 进样后炉温在 70 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 的速度升温到 290 °C, 保持 3 min, 再降温到 70 °C; GC-MS 接口温度: 280 °C。

1.4.1.4 主要质谱条件 电离方式: 电子轰击电离(EI⁺); 离子源温度: 250 °C; 电子轰击能量: 70 eV; 离子电流: 40 μA ; 扫描质量范围: 50 ~ 800 *m/z*。

1.4.2 HPLC 法测定有机酸

1.4.2.1 色谱条件 高效液相色谱仪: Agilent technologies 1200 series; 检测器: 紫外检测器; 色谱柱: Prevail 有机酸柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸调 pH 值至 2.5 的 25 mmol/L K_2HPO_4 溶液; 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 210 nm; 进样量: 5 μL ; 柱温: 20 °C。

发酵液中有机酸的测定: 取发酵液 5 mL, 10 000 r/min 离心, 取上清液, 稀释 10 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 利用高效液相色谱测定所产有机酸。

1.4.3 测量指标 对发酵液每隔 12 h 取样测定 1 次, 测定 pH 值、有机酸和有效磷含量, 并且对发酵液进行平板计数。

发酵液 pH 值用 pH 计测定。解磷能力据国标 NY 412—2000 中钼锑抗比色法测定有效磷含量。计数根据稀释涂布平板法计数。有机酸采用仪器 GC-MS 和 HPLC 测定。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变筛选高效解磷菌

2.1.1 紫外诱变的致死率曲线 由图 1 可见, 紫外照射时间为 45 s 时, 致死率达到了 72%, 当照射时间分别为 15 s 和 30 s 时, 致死率分别为 30% 和 51%。对于不同的菌株, 在不同的致死率下, 其正突变率不容易确定, 所以为了增加高效磷细菌筛选的概率, 本研究采取高、中、低 3 个致死率下对应的照射时间 45、30、15 s 分别对菌株 11433 的孢子悬液进行处理, 处理完毕后 3 个致死率下的菌液混合均匀, 用于高产菌株的筛选。

2.1.2 初筛、复筛高效解磷菌 在照射功率为 30 W、照射距离为 30 cm 条件下对 11433 进行紫外诱变, 选取照射时间为 15、30、45 s 以及经照射后三者的混合液在黑暗条件下进行稀

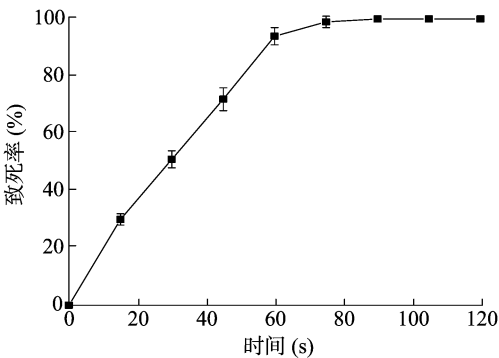


图1 紫外诱变的致死率曲线

释涂布平板,分别标记为 A、B、C 和 D。根据菌落在平板上产生的解磷圈直径与菌落直径的比值,筛选比值大于出发菌株 15% 的为正突变,小于 15% 的为负突变,鉴定诱变效果(表 1)。

表 1 解磷菌初筛					
编号	总菌落数	正向菌落数	负向菌落数	正突变率 (%)	负突变率 (%)
A	110	24	11	21.80	10.00
B	98	17	9	17.30	9.18
C	83	11	4	20.75	7.55
D	72	18	5	25.00	6.94

根据初筛菌株,选取表 1 中的正向突变菌株测定解磷能力。根据 4 个菌株的解磷能力,其中 D 菌株的解磷能力最强。结果发现,经摇床培养 12 h 诱变菌株的有效磷含量比出发菌株高出 36%,培养 24~72 h 突变菌株 D 有效磷含量比出发菌株高出 48%~115.62%,其中培养 72 h 有效磷含量达到最大,为 46.79 μg/mL,比出发菌株高出 115.62%。培养 72~84 h 时,解磷能力有所下降,pH 值也逐步升高(图 2)。

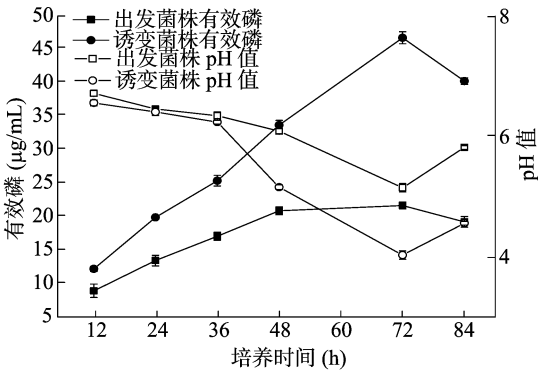


图2 解磷能力

2.1.3 高产菌株 11433-D 的遗传稳定性试验 将筛选出的高产菌株 D 在斜面培养基上连续传代 5 次,解磷量稳定在 43.29~46.71 μg/mL(表 2),表明该菌株的遗传性能稳定。

表 2 11433-D 的遗传稳定性					
传代数	1	2	3	4	5
产量 (μg/mL)	46.71	45.96	44.67	43.29	44.55

2.1.4 菌株种子生长曲线的确定 测定 11433-D 的生长曲线,有利于了解种子的生长状态,对指导发酵生产具有重要意义。从图 3 可以看出,菌体在培养 8 h 左右达到对数生长期,根据试验安排,选取处于对数生长期中期,18 h 左右的种

子液进行接种试验,此时的种子液为乳白色,并具有特殊气味,染色镜检时,菌丝体致密。

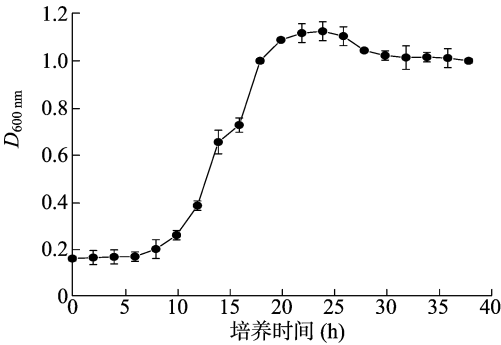


图3 生长曲线

2.2 解磷机理研究

根据气相色谱-质谱联用仪的测定结果(表 3),对发酵液中的有机酸进行分析,发现峰值最高的是葡萄糖酸,峰值最低的是乙酸,匹配度较高的是硬脂酸、棕榈酸和葡萄糖酸,匹配度较低的是戊酸、2-丁烯酸。由于在解磷作用发挥主要功能的是小分子有机酸,所以对匹配度相对较高的有机小分子酸(葡萄糖酸、乙酸、丙酸、丁酸)进行液相分析,以期在发酵液中快速检测到有机酸。结果发现,菌株产生 3 种有机酸,分别为葡萄糖酸、乙酸和丙酸。

表 3 气相色谱-质谱联用仪对主要解磷菌的有机酸检测结果			
样品名字	匹配度 (%)	峰高	保留时间 (min)
葡萄糖酸	91	628.295	7.159
乙酸	72	220.095	9.592
丙酸	91	322.145	11.812
戊酸	64	231.129	13.292
丁酸	72	262.142	14.953
正十五烷酸	70	314.264	18.916
2-丁烯酸	62	260.126	19.277
2-异丙基苹果酸	90	392.187	26.693
花生四烯酸	86	376.280	28.222
棕榈酸	98	328.280	37.069
硬脂酸(十八酸)	99	356.311	40.801

通过对解磷菌 11433-D 发酵液中解磷能力、活菌数进行检测,发现 0~12 h 菌处于对数生长期,菌数快速增到 8 × 10⁹ CFU/mL,pH 值下降到 6.56,12~36 h 菌体生长处于稳定期,菌数维持在 3 × 10¹⁰ CFU/mL,达到最大值,发酵液中有有机酸以葡萄糖酸为主,此外,还有乙酸和丙酸。36~84 h 主要产生葡萄糖酸,且 36 h 开始有少量乙酸分泌,48 h 开始产生丙酸。发酵液 pH 值伴随有机酸的分泌一直在下降。12~84 h 发酵液中有有效磷含量从 12.25 μg/mL 上升至 46.58 μg/mL。试验发现解磷量与 pH 值、小分子有机酸有关。

3 结论

本研究采用紫外诱变对巨大芽孢杆菌进行诱变处理,获得 1 株高效突变菌株 11433-D,该菌株解磷量达 46.79 μg/mL,比出发菌株高出 115.62%,经连续传代 5 次,其遗传稳定性非常高。经 GC-MS 和 HPLC 检测发现,该菌能产生葡萄糖酸、乙酸和丙酸。有机酸的变化直接影响磷含

黄盼盼,沈建新. 江苏省泰州地区农村环境治理现状及改善对策[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):540-543.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.159

江苏省泰州地区农村环境治理现状及改善对策

黄盼盼¹, 沈建新²

(1. 南京农业大学金融学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院, 江苏南京 210014)

摘要:农村生态环境保护是社会主义新农村建设的重要组成部分,农业现代化的实现应当在保护农业生态环境的大前提下进行。江苏省泰州市由于其优越的地理位置与自然环境,以及对农业科技、企业现代化管理方法的运用,农业产业化建设成效明显,近年来农村经济得到了长足发展,无公害农业、绿色农产品发展势头良好,极大地促进了农民增收。通过分析泰州市农村生态环境治理的现状,总结其环境问题的成因,并提出对策。

关键词:农村;生态环境;农业现代化;社会主义新农村建设

中图分类号: F323.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0540-04

农村生态环境保护是社会主义新农村建设的重要组成部分,农业现代化的实现应当在保护农业生态环境的大前提下进行。2015年我国开始实施的新《环境保护法》更是将绿色低碳生活作为公民义务予以强调,作为一部行政法律,新《环境保护法》规定虚报污染情况的领导干部以及重大环境违法事件的主要负责人必须引咎辞职。这些法律法规的实施,表明了国家对于保护生态环境、实现可持续发展的决心。加强农村生态环境保护,留住绿水青山,才能实现金山银山。江苏省泰州市地处江苏省中部,西南部与江苏省镇江市、无锡市、常州市、苏州市4市相望,东临南通市,西接扬州市,北与盐城市、淮安市毗邻,是苏中地区入江达海5条巷道的交汇处。泰州市生态环境良好,有国家卫生城市、国家环保模范城市、国家园林城市的美誉;雨热同期的亚热带季风气候以及冲击平原地貌使得泰州市农业发展具有得天独厚的优势。绿色农业、有机农业对生态环境有更高的要求。作为农业大市,2016

年上半年泰州市实现农林牧副渔业总产值147.45亿元,其中农业总产值74.98亿元,占农林牧副渔业总产值的50.8%。自2013年江苏省被确定为全国拉网式农村环境综合整治试点工作试点省份以来,泰州市顺应发展绿色农业、有机农业的潮流,在农村生态环境治理方面取得了丰硕成果,但是农村生态环境系统复杂、治理难度大。长期以来,泰州市对农村生态环境重视程度不够,使得农村生态环境问题日益突出。2016年7月,笔者通过对泰州市农村生态环境治理现状进行实地考察发现,泰州市农村地区生态环境质量总体良好,大气状况、水体质量不断改善,但仍然存在大范围的土壤污染问题。本研究探讨了泰州市农村生态环境治理现状及存在问题,并提出相应对策,旨在为改善泰州市农村生态环境状况,实现农业可持续发展提供依据。

1 泰州市农村生态环境治理现状及存在问题

1.1 大范围的土壤污染

土壤污染来源广、治理难度大,是农村生态环境治理的重要组成部分。随着工业化、城市化的发展,工业和生活废水排放、污水灌溉以及农用机械尾气排放,都会造成土壤污染。污染物不仅会改变土壤结构、功能、组织,抑制农作物生长,导致农作物减产甚至绝收,还会通过食物链,迁移至动物、人体内,危害人类健康。赵瑾等对泰州市72份蔬菜中重金属铅、镉含

收稿日期:2016-09-27

基金项目:江苏省农业科学院科研基金(编号:2015A611502)。

作者简介:黄盼盼(1992—),女,甘肃庆阳人,硕士研究生,主要从事农业经济管理研究。E-mail:18252017508@163.com。

通信作者:沈建新,研究员,主要从事农村金融研究。E-mail:sjxjaas@126.com。

量的变化。试验结果为更好地研究解磷菌在土壤中发挥作用奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 柯春亮,陈宇丰,周登博,等. 香蕉根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力[J]. 微生物学通报,2015,42(6):1032-1042.
- [2] Zaidi A, Khan M S, Ahemad M, et al. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes[M]//Microbial strategies for crop improvement. Berlin: Springer, 2009: 23-50.
- [3] 鲁如坤,时正元. 土壤积累态磷研究 II. 磷肥的表现积累利用率[J]. 土壤,1995(6):286-289.
- [4] 陈廷伟. 解磷巨大芽孢杆菌分类名称、形态特征及解磷性能述评[J]. 土壤肥料,2005(1):7-9,38.

- [5] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [6] 陈红歌,刘新育,张世敏,等. 木聚糖酶高产菌株的诱变[J]. 微生物学通报,2004,31(6):33-36.
- [7] 卢金珍,许宁,熊汉国. 高效解磷突变株的选育[J]. 湖北农业科学,2010,49(2):327-329.
- [8] 虞伟斌,杨兴明,沈其荣,等. K_3 解磷菌的解磷机理及其对缓冲容量的响应[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(2):354-361.
- [9] 吴海燕,金荣德,范作伟,等. 解磷巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的溶磷机理探讨[J]. 吉林农业大学学报,2014,36(2):171-175.
- [10] 伊 颢. 高效解磷细菌的筛选及解磷机理的研究[D]. 大连:大连理工大学,2011.