

# 黑曲霉 SICU-33 的筛选、培养条件优化及初步应用

尼玛扎西<sup>1,2</sup>

(1. 西藏自治区农牧科学院农业资源与环境研究所, 西藏 拉萨 850000; 2. 省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室, 西藏 拉萨 850000)

**摘要:** 从青稞根际土壤中挖掘具有促生抗病作用的真菌菌株, 以 PGPR 真菌为研究对象, 对其进行鉴定、培养条件优化及促生效果盆栽验证。以 IAA 定量测定、拮抗病原菌和溶解无机磷效果为指标筛选具有 PGPR 功能的菌株, 通过 ITS 测序进行分子生物学鉴定, 在单因素试验基础上, 利用响应面分析中的 Box-Behnken 设计优化培养条件, 再通过盆栽试验探究菌株促生效果。结果看出, 从青稞根际土壤中分离到一株 IAA 产量达到 52.13 mg/L、能拮抗 4 种病原菌生长、溶磷圈为 2.47 cm 的真菌菌株 SICU-33, 初步鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*); 优化后的培养条件为 pH 值 7、葡萄糖浓度 20 g/L、盐浓度 15 g/L 以及培养基量 125 mL, 最终得到菌株的生物量为 2.56 g; 通过盆栽试验证明该菌株对玉米幼苗有明显促生作用。菌株 SICU-33 能有效促进玉米幼苗生长, 具有一定的应用潜力。

**关键词:** 黑曲霉, PGPR, 响应面分析, 培养基优化

中图分类号: Q949.32; S512.3

文献标志码: A

## Screening and Culture Condition Optimization of *Aspergillus niger* SICU-33 and Its Preliminary Application

Nimazhaxi<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Resources and Environment, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850000, China; 2. State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Tibet Lhasa 850000, China)

**Abstract:** To excavate fungal strains with growth-promoting and disease-resistant effects from the rhizosphere soil of highland barley, PGPR fungi were used as the research object to identify them, optimize their culture conditions, and verify their growth-promoting effects in pots. Screen strains with PGPR function using IAA quantitative determination, antagonizing pathogenic bacteria and dissolving inorganic phosphorus effects as indicators. molecular biological identification through ITS sequencing were carried out. Based on single factor experiments, use response surface analysis Box-Behnken to design and optimize culture conditions. Explore the growth-promoting effects of strains through pot experiments. The results show that one strain was isolated from the rhizosphere soil of highland barley with an IAA yield of 52.13 mg/L, which can antagonize the growth of 4 pathogens. The fungal strain SICU-33 with a phosphate zone of 2.47 cm was initially identified as black *Aspergillus niger*. The optimized culture conditions were pH 7, glucose concentration 20 g/L, salt concentration 15 g/L, and medium volume 125 mL. Finally, the biomass of strain is 2.56 g. It is proved by pot experiment that the strain has obvious growth-promoting effects on corn seedlings. Strain SICU-33 can effectively promote the growth of maize seedlings and has a certain application potential.

**Key Words:** *Aspergillus niger*; PGPR; response surface analysis; medium optimization

促生抗病(PGPR)真菌是一种生活在植物根际的非致病、非共生性腐生真菌<sup>[1]</sup>, 有改善土壤养分、提高植物抗病能力、促进植物生长从而提高农作物

产量的作用<sup>[2-3]</sup>, 且同时具备环境友好的特点<sup>[4]</sup>, 使得利用高效 PGPR 菌株制成的 PGPR 制剂成为肥料领域的研究热点。常见的植物根际促生菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、埃文氏菌属(*Eriwinia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、巴斯德氏菌属(*Pasteuria*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等<sup>[5]</sup>。

收稿日期: 2022-04-19

基金项目: 西藏自治区重点研发项目(XZ201901NB07); 西藏财政预算内项目(XZNKYZHS-2021)。

作者简介: 尼玛扎西(1972-), 男, 本科, 副研究员, 从事土壤肥料与微生物等方面的研究, E-mail: nyima313@163.com。

西藏具有独特的自然地理环境,有海拔高、紫外线强、低温低等特点。目前,西藏关于PGPR有效的菌株材料研究较少,所以,本试验以青稞根际土壤为分离材料,通过筛选得到一株高效PGPR菌株SICU-33,以此为研究对象,通过ITS测序明确其分类学地位,同时对培养条件进行优化,并进一步通过盆栽试验验证该菌株对玉米的促生作用,为后续研发PGPR菌剂及其衍生产品如生物有机肥等提供有效的菌株材料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试土壤

供试土壤来自西藏阿里地区普兰县西德村(坐标 $81^{\circ}01'31''E, 30^{\circ}30'14''N$ )青稞根际土,土壤含全氮 $1.07\text{ g/kg}$ ,碱解氮 $44.95\text{ mg/kg}$ ,总磷 $429.87\text{ mg/kg}$ ,速效磷 $7.81\text{ mg/kg}$ ,全钾 $15.63\text{ g/kg}$ ,速效钾 $223.52\text{ mg/kg}$ ,有机质 $19.85\text{ g/kg}$ ,pH值 $7.9$ 。

#### 1.1.2 供试病原菌

小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌、稻瘟病菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均为四川农业大学资源学院应用微生物学系保存的菌种。

#### 1.1.3 培养基

供试培养基为马丁氏培养基、King培养基、PDA培养基和PVK培养基<sup>[6]</sup>。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 菌株分离

称取 $5\text{ g}$ 土壤样品倒入装有 $45\text{ mL}$ 无菌水的三角瓶中,放置在 $180\text{ r/min}$ 的摇床中震荡 $30\text{ min}$ ,用微量移液器吸取 $1\text{ mL}$ 的悬液到 $9\text{ mL}$ 的无菌水试管中,用移液枪吹打混匀,吸取 $1\text{ mL}$ 土壤悬液进行10倍梯度稀释。将浓度为 $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ 的稀释液各吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 分别注入马丁氏培养基,用涂布棒涂布至培养基表面干燥,倒置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养 $3\sim 4\text{ d}$ 。选择平板上较为明显的菌落在PDA培养基上进行反复纯化。

#### 1.2.2 PGPR菌株筛选

1)产IAA特性测定。将真菌菌株接种到King培养基中,放至 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $140\text{ r/min}$ 的摇床培养 $3\text{ d}$ ,之后取 $10\text{ mL}$ 的菌液在 $8000\text{ r/min}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 $5\text{ min}$ ,去除菌体沉淀。吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的上清液于干净的白瓷板中,再加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的S1比色液于暗处混合反应 $30\text{ min}$ ,观察混合液颜色的变化。以无菌水与S1

比色液混合为对照,出现粉红色则视为产生3-吲哚乙酸,颜色越深,表示产生3-吲哚乙酸的能力越强,不变色为不产生3-吲哚乙酸。再取 $5\text{ mL}$ 菌悬液与 $5\text{ mL}$ 的S2比色液混匀,在暗处反应 $30\text{ min}$ 后,离心取上清液,在紫外分光光度计上选择波长 $530\text{ nm}$ 测吸光度,以无菌水加S2比色液为对照,每个样品设置3个重复。IAA标准曲线制作方法:配置浓度为 $0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60\text{ mg/L}$ 的IAA标准溶液;分别取不同浓度的IAA溶液,加入 $5\text{ mL}$ 的S2比色液混匀,在暗处反应 $30\text{ min}$ 后,在紫外分光光度计上选择波长 $530\text{ nm}$ 测吸光度值<sup>[7]</sup>。

2)拮抗病原菌能力的测定。将小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌、稻瘟病菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等病原菌菌株接种到液体培养基中制备菌悬液,吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的病原菌悬液至将要凝固平板中混匀,用灭菌过的镊子将无菌的牛津杯放置在培养皿的中,每个培养皿放入4个牛津杯,待其凝固后将牛津杯中凝固的培养基取出,在牛津杯中加入供试黑曲霉菌株的发酵液 $150\text{ }\mu\text{L}$ , $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 $3\sim 5\text{ d}$ 后,记录各菌株的透明圈大小<sup>[8]</sup>。

3)无机磷降解能力的测定。将滤纸片浸满菌悬液后点接到PVK培养基上, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $3\text{ d}$ ,测定无机磷溶解圈的大小,重复3次<sup>[9]</sup>。

4)高效PGPR菌株鉴定。将上述具有高效PGPR能力的菌株活化后接入PDA液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $3\text{ d}$ ,离心后挑取菌体,采用试剂盒提取DNA,然后用 $1\%$ 琼脂糖凝胶检测, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将该菌株以引物ITS1( $5' -\text{TCCGTAGGTGAAC}-\text{CTGCCG}-3'$ )/ITS4( $5' -\text{TCCTCCGCTTATTGATATGC}-3'$ )进行ITS基因片段的扩增<sup>[10]</sup>。PCR反应体系: $2\times\text{Taq PCR Master Mix } 15\text{ }\mu\text{L}$ ,引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ,模板DNA $3\text{ }\mu\text{L}$ ,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ 补齐至 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C } 5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$ , $53\text{ }^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$ , $72\text{ }^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$ ,共35个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C } 10\text{ min}$ 。扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序,将所得序列上传到NCBI网站进行比对。

#### 1.2.3 培养条件优化

1)单因素培养条件优化。以菌体生物量为响应值,以初始pH值、葡萄糖浓度、盐浓度、通气量为试验因素进行单因素试验。试验设置:培养基初始pH值为 $5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0$ ,葡萄糖浓度为 $10, 15, 20, 25, 30\text{ g/L}$ ,盐浓度为 $5, 10, 15, 20, 25\text{ g/L}$ ,培养基量为 $75, 100, 125, 150, 175\text{ mL}$ 。

2)Box-Behnken设计优化培养条件。根据单因素试验结果确定试验水平,通过Design-Expert 8.0.6软件中的Box-Behnken设计进行优化。对菌体生物量进行二次多元回归方程拟合,得到各因素与响应值之间函数关系的回归方程,根据生成响应面图确定最优的培养条件<sup>[11]</sup>。

3)培养条件优化验证。将PGPR菌株分别接入常规的以及优化后的PDA液体培养基中培养,并测定其生物量验证模型的可靠性。

#### 1.2.4 盆栽验证

盆栽试验以“苏科糯5号”玉米为供试品种,供试土壤类型采集自四川农业大学试验基地,土壤类型为灰潮土,土壤基础理化性质为:pH值7.18,全氮1.38 g/kg,碱解氮53.24 mg/kg,有效磷21.64 mg/kg,有效钾51.02 mg/kg,有机碳16.52 g/kg。

试验分别设置对照组和处理组,每个处理设置3次重复。每个花盆中装入2.5 kg供试土壤。将分离到的高效菌株SICU-33活化后接种于PDA液体培养基中,于28℃,160 r/min摇床中培养3 d,使活菌数达到1×10<sup>9</sup> CFU/mL以上,80 mL菌悬液分2次浇灌,每次10 mL,以无菌生理盐水作对照(CK)。将所有盆栽随机排放,定量浇水,定期管理,45 d后收获植株。采集样品后立即将植株洗净,用吸水纸吸干水分。对叶片数进行计数;用直尺以及卷尺测定最大叶宽、最大叶长、最大叶面积、茎粗、根长;用电子秤对植株的叶鲜质量、根鲜质量进行称定。

#### 1.2.5 数据分析

利用Microsoft Excel 2011软件对试验数据进行的初步整理和统计,通过Design Expert 8.0.6软件进行响应曲面优化分析,按照BBD(Box-Behnken Design)试验设计方法对二次多项式中各试验因素进行回归拟合,并获得回归方程。通过SPSS 16.0对数据进行方差统计分析,数据表示为平均值±标准误。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离

通过稀释涂布从青稞根际土壤样品中分离得到120株表型和菌落大小各不相同的真菌菌株,经过PDA培养基多次纯化后初步筛选出生长速度较快且无污染的菌株共90株。

#### 2.1.1 PGPR菌株筛选

对90株真菌的促生抗病能力进行测定,27株(30%)产IAA能力高于30 mg/L,8株(8.89%)具有溶磷能力,5株(5.56%)能拮抗3种及以上病原菌,同时具有两种及以上两种以上能力的菌株共6株。其中综合促生抗病特性表现最好的是SICU-33菌株,IAA产量为52.13 mg/L,位居第6,溶磷圈达到了2.47 cm,为所有菌株中溶磷圈最大,且能同时拮抗小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌、稻瘟病菌和大肠杆菌等4种病原菌(表1)。

表1 部分分离菌株的PGPR特性研究

菌株编号	IAA产量 (mg·L <sup>-1</sup> )	溶磷圈 /cm	拮抗菌圈表现				
			指示菌株1	指示菌株2	指示菌株3	指示菌株4	指示菌株5
SICU-4	61.1±1.94	1.40±0.10	-	++	+	-	-
SICU-9	50.9±5.15	1.63±0.03	+	++	++	-	++
SICU-18	33.6±0.12	nd	-	++	-	++	+
SICU-30	33.3±6.94	1.80±0.06	-	-	++	-	-
SICU-33	52.1±0.46	2.47±0.09	++	+++	+	-	+
SICU-39	30.3±0.49	1.57±0.07	-	-	-	-	-

注:nd为未检出。指示菌株1代表小麦赤霉病菌;指示菌株2代表西瓜枯萎病菌;指示菌株3代表稻瘟病菌;指示菌株4代表金黄色葡萄球菌;指示菌株5代表大肠杆菌。“+++”表示拮抗菌圈明显;“++”表示拮抗菌圈较明显;“+”表示拮抗菌圈不明显;“-”表示无拮抗圈。

2.1.2 高效PGPR菌株鉴定

将测序后返回的序列提交至NCBI进行同源性比较,寻找与其匹配的近缘菌株。由表2可知,测序菌株与近缘菌株的相似度均为100%,初步鉴定SICU-33为黑曲霉。

2.2 培养条件优化

2.2.1 不同培养条件对菌株SICU-33的影响

试验结果可以看出4个因素变化对菌体生物量的影响。根据单因素试验确定4个因素的最佳值分别是初始pH值为7.0、葡萄糖浓度为20 g/L、盐浓度为15 g/L、培养基量为125 mL(图1)。

表2 高效菌株ITS测序

种属	菌株名称	ITS 基因比对	
		近缘菌株	相似性/%
<i>Aspergillus niger</i>	SICU-33 (MN498286)	MT447518.1	100
		MT373502.1	100
		MT318165.1	100

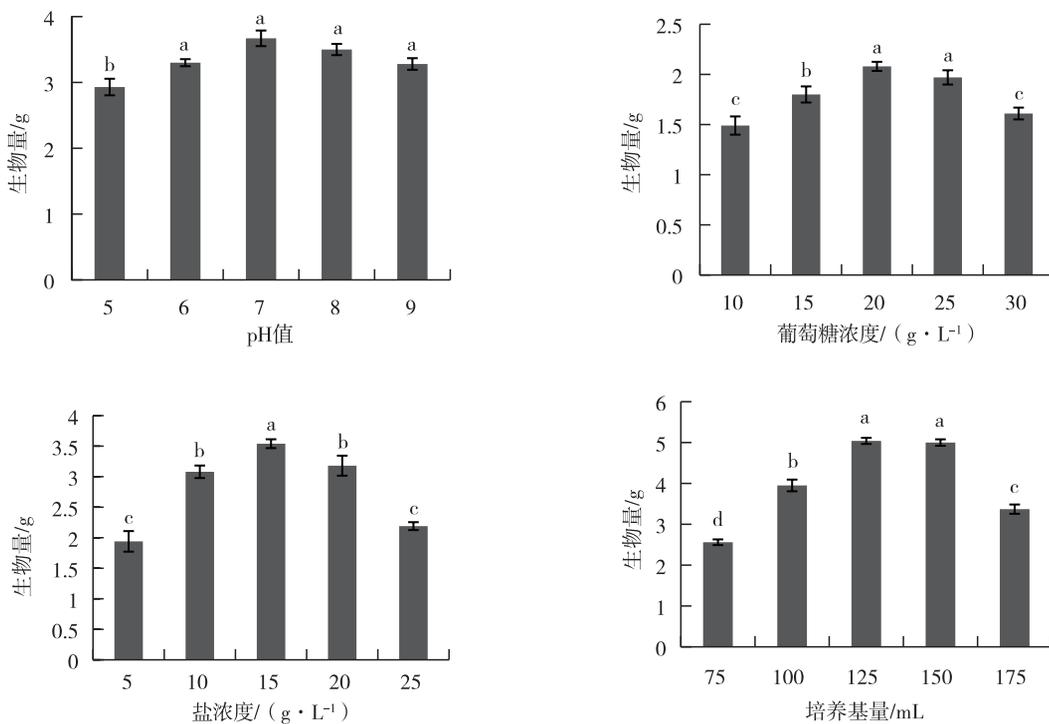


图1 不同因子对菌株生物量的影响

2.2.2 Box-Benhknen设计优化菌株SICU-33的培养条件

1)模型的建立及显著性检验。在单因素试验的基础上,建立Box-Benhknen试验因素与水平表见表3,试验结果见表4。

表3 响应面因素水平

水平	初始pH值	葡萄糖浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	盐浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	培养基容量/mL
高(1)	8	25	20	150
0	7	20	15	125
低(-1)	6	15	10	100

运用Design Expert 8.0.6软件生物量结果进行拟合,得到生物量对自变量pH值(A)、葡萄糖浓度(B)、盐浓度(C)、培养基量(D)的回归方程:  $Y=2.59-0.076A+0.15B+0.037C-0.023D-0.11AB+0.25AC-0.097AD-0.13BC-0.052BD+0.11CD-0.52A^2-0.55B^2-0.43C^2-0.48D^2$ 。

对上述回归方程进行方差分析,结果见表5。

从该模型的方差分析可知,本试验得到的生物量二次多项式模型具有高度的显著性( $p<0.0001$ ),说明该模型具有较高的可靠性;失拟项不显著( $p>$

0.05),表明方程模拟得较好,可继续进行数据分析;该多项式的校正决定系数  $R^2_{Adj}=0.895$ ,说明生物量 89.5% 的变化来源于初始 pH 值、葡萄糖浓度、盐浓度和培养基量。经方差分析,4 个因素对菌株生物量的影响程度从大到小依次为葡萄糖浓度、pH 值、盐浓度、培养基量(表 5)。

表 4 Box-Behnken 试验设计与结果

编号	初始 pH 值 (A)	葡萄糖浓度 (B) / (g·L <sup>-1</sup> )	盐浓度 (C) / (g·L <sup>-1</sup> )	容量 (D) / mL	生物量 / g
1	7	20	15	125	2.57
2	8	25	15	125	1.64
3	7	20	15	125	2.73
4	7	20	15	125	2.64
5	7	25	15	150	1.52
6	7	15	10	125	1.25
7	7	25	15	100	1.6
8	6	20	10	125	1.84
9	7	20	15	125	2.51
10	7	25	10	125	1.76
11	7	15	15	150	1.49
12	7	15	15	100	1.36
13	7	20	10	150	1.67
14	6	20	20	125	1.54
15	8	20	15	100	1.66
16	6	15	15	125	1.26
17	6	20	15	100	1.59
18	7	15	20	125	1.74
19	7	20	10	100	1.98
20	7	20	20	150	1.7
21	7	25	20	125	1.72
22	8	20	10	125	1.13
23	6	20	15	150	1.71
24	8	20	20	125	1.81
25	8	20	15	150	1.39
26	7	20	20	100	1.56
27	7	20	15	125	2.49
28	8	15	15	125	1.37
29	6	25	15	125	1.97

表 5 响应面二阶模型的方差分析

方差源	平方和	自由度	均方	p 值	显著性
模型	4.86	14	0.35	<0.000 1	**
A	0.069	1	0.069	0.082 0	
B	0.25	1	0.25	0.003 0	*
C	0.016	1	0.016	0.380 2	
D	6.075E-003	1	6.075E-003	0.587 0	
AB	0.048	1	0.048	0.138 9	
AC	0.24	1	0.24	0.003 6	*
AD	0.038	1	0.038	0.185 9	
BC	0.070	1	0.070	0.079 6	
BD	0.011	1	0.011	0.466 2	
CD	0.051	1	0.051	0.130 8	
A2	1.78	1	1.78	<0.000 1	**
B2	1.98	1	1.98	<0.000 1	**
C2	1.18	1	1.18	<0.000 1	**
D2	1.52	1	1.52	<0.000 1	**
残差	0.28	14	0.020		
失拟项	0.24	10	0.024	0.203 3	
误差项	0.039	4	9.720E-003		
总和	5.24	28			

$R^2_{Adj}=0.895$

注：“\*”表示对结果影响有统计学意义( $p<0.05$ )；“\*\*”表示对结果也影响有统计学意义( $p<0.001$ )。

2) 响应面分析。通过 Design-Expert 8.0.6 软件,得到初始 pH 值、葡萄糖浓度、盐浓度和培养基量两两交互作用的 3D 响应面曲线图见图 2。可以看出试验因素两两交互时,当其中一个因素固定时,菌体生物量随着另一个因素的增加呈现先增加后减少的趋势。在本试验中,曲面变化相对平缓但存在最高点,等高线也较为密集但呈闭合椭圆形,这说明试验因素两两之间的交互作用较不明显但有最大值。优化后的培养条件:初始 pH 值为 6.91、葡萄糖浓度为 20.71 g/L、盐浓度为 14.97 g/L 以及培养基容量为 124.44 mL,预测的菌株生物量是 2.60。

### 2.2.3 培养条件优化验证

响应面的优化结果表明,SICU-33 的最佳培养条件是初始 pH 值为 6.91、葡萄糖浓度为 20.71 g/L、盐浓度为 14.97 g/L 以及培养基容量为 124.44 mL,预测的菌株生物量是 2.60 g。为了便于实际操作,

在试验验证时将4个因素进行了轻微调整,调整后初始pH值为7、葡萄糖浓度为20 g/L、盐浓度为15 g/L以及培养基容量为125 mL。在此条件下,菌株的生物量为2.56 g,比模型预测的2.60 g减少了1.60%,变化较小,与理论预测值相差较小,验证了模型的可靠性。

2.2.4 盆栽试验

试验结果看出,青稞根际真菌SICU-33能促进玉米生长。SICU-33的叶片数与CK、SICU-9相比分别增加了15.80%,10.00%;SICU-33的茎粗与对

照、SICU-9相比分别增加了22.65%,15.18%;SICU-33的最大叶宽与对照,SICU-9相比分别增加了7.89%,4.58%;SICU-33的最大叶长与对照,SICU-9相比分别增加了21.92%,8.37%;SICU-33的叶鲜质量与对照,SICU-9相比分别增加了47.16%,22.68%;SICU-33的根鲜质量与对照,SICU-9相比分别增加了42.86%,39.60%;SICU-33的根长与对照,SICU-9相比分别增加了58.73%,32.10%(图2、表6)。

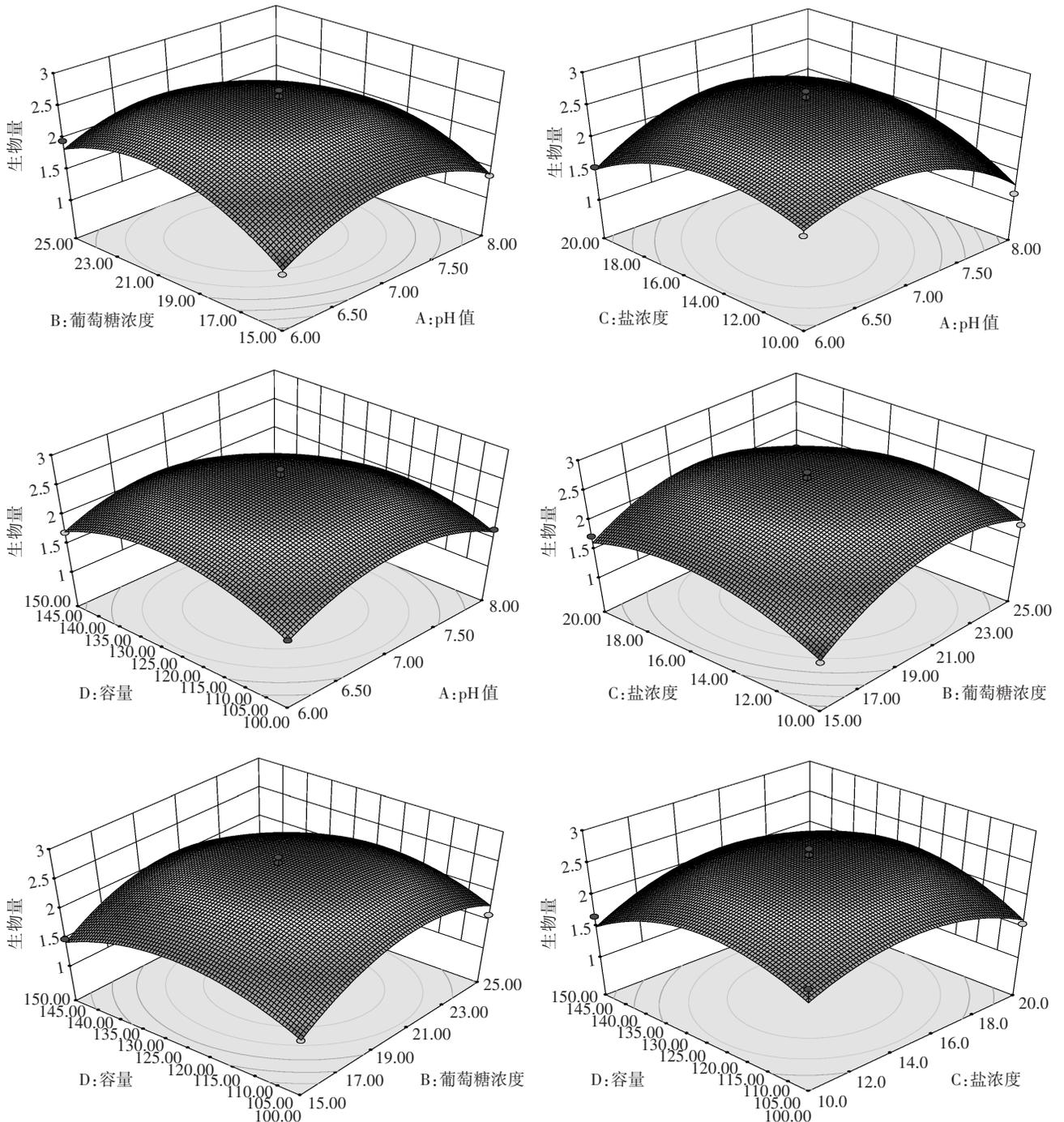


图2 试验因素两两交互对生物量影响的等高线及三维示意

表6 玉米盆栽各项指标测定

处理	叶片数	茎粗/cm	最大叶宽/cm	最大叶长/cm	叶鲜质量/g	根鲜质量/g	根长/cm
对照	6.25±0.365b	1.03±0.053b	4.23±0.125a	66.9±2.55b	19.7±2.24b	5.58±1.22b	38.4±3.60b
SICU-33	7.33±0.471a	1.27±0.047a	4.57±0.047a	81.6±3.58a	28.9±2.13a	7.97±1.03a	60.9±12.7a

### 3 讨论与结论

曲霉属(*Aspergillus*)是常见的植物根际促生真菌种类之一<sup>[12]</sup>,而黑曲霉能裂解大分子有机物和转化难溶无机物形态以便于作物吸收利用,同时还能改善土壤结构,增强土壤肥力以及提高作物产量<sup>[13]</sup>。此前已有将黑曲霉菌株应用于农作物取得积极作用的研究。如Lubna等<sup>[14]</sup>研究表明接种黑曲霉CSR3显著提高了水稻的根茎长度和生物量;孙冉等<sup>[15]</sup>从作物土壤中筛选得到黑曲霉Xj菌株能抑制多种病菌并对花生等作物有明显的促生作用;詹寿发等<sup>[16]</sup>从芒萁体内分离出的菌株MQ039具有溶磷解钾及产IAA作用,并对玉米幼苗有明显的促生作用。通过本文发现,该试验筛选的黑曲霉SICU-33具有促生抗病,增加玉米生物量的作用。

真菌菌丝能产生某些代谢物质,如抗生素、有机酸等,同时还利于营养物质和氧气的传输<sup>[17-18]</sup>。本研究中的高效PGPR菌株SICU-33最佳培养条件为:初始pH值6.91、葡萄糖浓度为20.71 g/L、盐浓度为14.97 g/L以及培养基容量为124.44 mL,预测的菌体生物量是2.601 68 g。在目前的研究中,黑曲霉培养条件优化主要应用是提高酶活,关于增加生物量的研究尚少。马放等<sup>[19]</sup>的研究中黑曲霉Y3优化后的培养基是蔗糖为10.0 g/L、NH<sub>4</sub>Cl为1.0 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O为1.0 g/L、Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O为0.5 g/L,每100 mL培养基约得到0.4 g菌体干质量。此外,黑曲霉被美国食品药品监督管理局(FDA)列入“通常认为是安全的”范围<sup>[20]</sup>,这说明黑曲霉具有促生作用以及作为微生物肥料的潜力。本试验筛选的黑曲霉SICU-33菌株,在高原农业生产上具有潜在应用价值,下一步将继续研究该菌株在野外实地应用中的时效性和稳定性等。

#### 参考文献:

[1] SALDAJENO M G B, HYAKUMACHI M. The Plant Growth-Promoting Fungus *Fusarium Equiseti* and the Arbuscular Mycorrhiza-

zal Fungus *Glomus Mosseae* Stimulate Plant Growth and Reduce Severity of Anthracnose and Damping-off Diseases in Cucumber (*Cucumis Sativus*) Seedlings [J]. *Annals of Applied Biology*, 2011, 159(1): 28-40.

[2] 刘丹丹,李敏,刘润进.我国植物根围促生细菌研究进展[J].生态学杂志,2016,35(3):815-824.

[3] BHATTACHARYYA P N, JHA D K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(4): 1 327-1 350.

[4] 陈波,丁延芹,马海林,等.樱桃根际促生细菌的筛选与鉴定[J].微生物学通报,2012,39(12):1 746-1 754.

[5] 赵晨阳,戴峰,刘述颖,等.植物根际促生菌的研究进展[J].安徽农业科学,2019,47(16):12-13,24.

[6] 周德庆.微生物学教程[M].3版.北京:高等教育出版社,2011.

[7] 李振东,陈秀蓉,李鹏,等.珠芽蓼内生菌Z5产IAA和抑菌能力测定及其鉴定[J].草业学报,2010,19(2):61-68.

[8] ZHAO S L, REN F E, LIU J L, et al. Screening, Identification and Optimization of Fermentation Conditions of an Antagonistic Actinomycetes Strain to *Setosphaeria Turcica* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 13(3):45-56.

[9] 官安东,孔宪巍,翟新可,等.枯草芽胞杆菌WY8-7的溶磷、抑菌及促生长作用[J].南京农业大学学报,2019,42(4):697-705.

[10] 郭鹏豪,刘秀丽,崔颖鹏,等.真菌通用引物Its1和Its4在丝状真菌鉴定中的价值评价[J].中国微生物生态学杂志,2013,25(8):922-924.

[11] 雷文平,吴诗敏,李彩虹,等.响应面法优化凝固型发酵椰奶工艺[J].中国酿造,2019,38(2):212-216.

[12] HYAKUMACHI M. Plant-Growth-Promoting Fungi from Turf-grass Rhizosphere with Potential for Disease Suppression [J]. *Soil Microorganisms*, 1994, 44(2):53-68.

[13] 安宝聚.高产纤维素酶黑曲霉ANSTJ01菌株的分离鉴定与生物学性状探究[D].泰安:山东农业大学,2017.

[14] LUBNA, ASAF S, HAMAYUN M, et al. *Aspergillus Niger* CSR3 Regulates Plant Endogenous Hormones and Secondary Metabolites by Producing Gibberellins and Indoleacetic Acid [J]. *Journal of Plant Interactions*, 2018, 13(1):100-111.

[15] 孙冉,张素,吴臣林,等.黑曲霉解磷能力的影响因素及培养条件优化[J].应用生态学报,2020,31(6):1963-1970.

[16] 詹寿发,卢丹妮,毛花英,等.2株溶磷、解钾与产IAA的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究[J].中国土壤与肥料,2017(3):142-151.

[17] BÉRDY J. Bioactive Microbial Metabolites [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1):1-26.

[18] 刘瑞桑,汤亚杰,白凤武.丝状真菌液体深层发酵过程菌丝聚集的调控机制[J].生物工程学报,2019,35(5):749-758.

[19] 马放,张斯,山丹.黑曲霉Y3菌丝球培养基成分优化[J].中国环境科学,2008,28(11):989-993.

[20] 姚善泾,蔡礼年,林东强.黑曲霉作为分泌蛋白细胞工厂的研究进展[J].化工学报,2019,70(10):3 690-3 703.