

产多糖溶磷细菌对难溶性 Ca-P 的活化特性

易艳梅, 黄为一*

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室/生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以肠杆菌 EnHy-401、节杆菌 ArHy-505、固氮菌 AzHy-510 和巨大芽孢杆菌 P17 为材料, 比较了 4 种溶磷细菌在摇瓶培养条件下对不同难溶性 Ca-P 中的磷活化能力。结果表明, 4 种溶磷细菌均能促使难溶性 Ca-P 中的磷活化, 但 3 种产多糖的溶磷细菌 (EnHy-401、ArHy-505、AzHy-510) 对难溶性 Ca-P 的活化能力普遍强于不产多糖的溶磷细菌 (P17), 肠杆菌 EnHy-401 对 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 和 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 中的磷活化率分别达 61.53%、63.40% 和 4.32%。在产多糖的溶磷细菌中, 有机酸和多糖均高的菌株活化磷的能力最高, 3 种产多糖的溶磷细菌活化难溶磷酸钙能力的大小顺序依次为肠杆菌 EnHy-401、节杆菌 ArHy-505、固氮菌 AzHy-510。结果还表明, 产多糖的溶磷细菌对难溶磷的活化作用是由分泌有机酸和多糖的协同作用实现的, 多糖对磷的吸持推动了磷的溶解平衡向溶解方向移动, 且该协同作用受胞外多糖持磷能力和环境中 C/N 的影响, 单位体积发酵液中多糖持磷量与菌株的磷活化能力呈正相关。在本试验条件下, C/N 值高时, 多糖产量高, 有机酸分泌多, 活化磷的能力就强。同一菌株只有在最适于产有机酸和产多糖的 C/N 值下, 才能表现出最佳的溶磷效果。

关键词: 溶磷细菌; 难溶性磷酸钙; 多糖; 磷活化

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 02-0049-06

Characteristics of insoluble calcium phosphate activated by phosphate solubilizing bacteria producing exopolysaccharide

YI Yan-mei, HUANG Wei-yi*

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture/
College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The capacities of phosphate solubilizing bacteria (PSB) which was *Enterobacter* sp. EnHy-401, *Arthrobacter* sp. ArHy-505, *Azotobacter* sp. AzHy-510 and *Bacillus megaterium* P17 to activate insoluble calcium phosphates were investigated, respectively. It was found that all tested strains could activate poorly soluble calcium phosphate well, but PSB (EnHy-401, ArHy-505 and AzHy-510) producing exopolysaccharide (EPS) had higher ability of phosphate solubilization than PSB isolate P17 without producing EPS. 61.53, 63.40 and 4.32 percent of the phosphorus were released from $\text{Ca}_3\text{-P}$, $\text{Ca}_8\text{-P}$ and $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ by EnHy-401, respectively. There were also significant differences among the PSB isolates producing EPS, the strain with higher ability of producing organic acid and EPS showed stronger ability compared with that isolates producing lower organic acid and EPS to dissolve insoluble calcium phosphates, and PSB EnHy-401 showed the maximum solubilization in Ca-P, followed by ArHy-505 and AzHy-510. Further studies showed that EPS might be another factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate except for organic acid, and the increase of P-solubilization brought by EPS attributed to the participation of EPS led to the change in homeostasis of P-solubilization, pushing it towards P dissolved by holding free phosphorus in the medium, consequently resulting in greater phosphorus released from insoluble phosphate. The synergistic effects of EPS and organic acid on Ca-P solubilization were also affected by C/N in the medium. In general, the higher C/N, the more quantity of organic acid and EPS would be produced, and the higher phosphorus contents would be activated. These strains showed strongest ability to dissolve phosphates when supplied fitter C/N for organic acid and EPS production in the medium.

Key words: phosphate solubilizing bacteria (PSB); poorly soluble calcium phosphate; exopolysaccharide (EPS); phosphorus activating

磷素是植物生长发育过程中必需的三大营养元素之一。全世界土壤平均含磷量约为 0.04%, 在这些磷素中, 80% ~ 90% 呈难溶态^[1], 主要以原生矿物存在或以次生的磷酸铁铝矿物沉积。其余的

收稿日期: 2007-05-25

作者简介: 易艳梅, 副教授, 从事微生物肥料及微生物生态学研究, E-mail: hunanyianmei@163.com。* 通讯作者: 黄为一, E-mail: huangwy@njau.edu.cn。

10% ~ 20% 中绝大部分呈缓效状态, 真正能为作物直接吸收的速效磷不到 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。为满足作物对磷素的营养需求, 根据磷矿品位的不同, 原生矿物一般被加工成磷铵、过磷酸钙、重钙、钙镁磷肥等化学磷肥^[2], 也可以通过部分酸化将原生矿物制成缓释性磷肥^[3], 但这些磷肥进入土壤后, 大部分很快被固定, 其形式随土壤类型而异。在石灰性土壤和非石灰性旱作土壤中主要以 Ca-P 形式存在, 难溶状态的 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 在石灰性土壤中占 Ca-P 的 70% 左右, 较易溶解的缓效态磷 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 仅占 10%, 而 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 是非石灰性旱作土壤中的重要固定状态^[4]。在含 Al、Fe 丰富的土壤中, 除了 Ca-P 外, Al-P 和 Fe-P 是固定 P 的另一重要形式。这些不同形式的难溶性磷酸盐是土壤中外施磷肥当季利用率 (10% ~ 20%) 低下的重要原因之一^[5], 在我国土壤中已累计高达 6 000 万 t^[6]。如何发挥土壤中这些潜在磷素资源的作用, 一直是国内外相关学者研究的热点。Shen 等^[7]从植物角度研究 Al-P、Fe-P 的活化, 发现 Al-P、Fe-P 的溶解主要是磷胁迫诱导植物根系分泌大量的柠檬酸、酒石酸以及草酸所致。溶磷微生物对难溶性磷酸盐的溶解机制, 普遍被认为是溶磷微生物产生有机酸和质子的结果^[8-9], 也不排除有磷酸酶作用的可能^[10]。但在某些微生物溶磷试验中, 有机酸的多少与溶解磷的量并不成正比, 与 pH 值的高低相关性不大^[11], 所以仅从产有机酸和质子多少的角度去解释不同菌株间溶磷能力的差异具有较大的难度。

石灰性土壤在我国北方分布广泛, 因此作为其主要固定态磷形式的 Ca-P 的生物活化受到广泛重视。范丙全等^[12]以草酸青霉 P8 为材料研究了丝状真菌对石灰性土壤中固定态磷的活化, 郝晶等^[13]专门针对石灰性土壤进行解磷菌的分离和筛选, 但对这些微生物解磷能力大小的本质和规律尚未研究。本试验选择不同的微生物, 对它们活化不同形式难溶性 Ca-P 的能力进行了研究, 并对其活化难溶性 Ca-P 的机制做了初步探索, 试图阐明被固定化磷肥的生物活化规律, 从理论上寻求提高磷肥利用率的有效措施。

1 材料与方法

1.1 菌株和难溶性磷酸钙

供试菌株: 肠杆菌 (*Enterobacter* sp.) EnHy-401、节杆菌 (*Artrobacter* sp.) ArHy-505、固氮菌 (*Azotobacter* sp.) AzHy-510 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) P17, 均由本实验室分离保藏。

供试难溶性 Ca-P: 实验室合成的磷酸三钙 ($\text{Ca}_3\text{-P}$)、磷酸八钙 ($\text{Ca}_8\text{-P}$)、氟磷灰石即十钙磷 ($\text{Ca}_{10}\text{-P}$), 经化学分析测定, 其磷素 (P) 含量分别为 199.9、193.9、196.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 培养基

种子培养基: 葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, KH_2PO_4 1 g, 去离子水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.5。

发酵培养基为 NBRIP^[7], 其中磷源分别为 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$, 加入量皆为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在考察 C/N 值对其活化能力影响时, 将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数调整为 0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%, 使培养液中 C/N 值分别达到 100.0、50.0、33.3、25.0 和 20.0, 发酵 5 d 后分析 C/N 值对菌株活化 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 的效果以及相关因素的影响。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株对难溶性磷酸钙 (Ca-P) 的活化效果测定 取 100 mL 三角瓶, 每瓶各加入 3 mL 种子培养液, 接入已经活化好的斜面菌种, 摇瓶培养至对数生长期 (约 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)。按 5% 接种量分别接入发酵培养液 (250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基), 接种后在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养, 以接同体积的种子培养液为对照, 每个处理均设 3 个重复。培养 5 d 后将培养液先定容, 然后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 倒出上清液, 测定上清液的速效磷、pH 值, 并将 5 mL 上清液过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜, 用于有机酸种类分析用, 同时取 10 mL 提取多糖, 并测定多糖被提取前后发酵液中速效磷量。

1.3.2 离体条件下胞外多糖对难溶性磷酸钙的活化试验 提取溶磷细菌在活化 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 过程中所分泌的胞外多糖, 纯化后分别配制成含多糖 0、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的 NBRIP 培养液各 100 mL, 均分为 2 份, 一份加入 10.5 mg 柠檬酸, 使 NBRIP 培养液中柠檬酸浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 另一份不加柠檬酸。各处理在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养 48 h 后, 用定量滤纸滤去磷酸钙, 滤液在 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 测定上清液中速效磷 (Pi) 含量。每个处理设 3 个重复。

1.4 测定方法

1.4.1 磷含量 采用钼蓝比色法^[14]测定上清液中磷的含量。磷的活化效率以 1 kg 难溶 Ca-P 中被活化

的磷占总磷的百分数表示。

1.4.2 培养液酸度 用 pH 计 (PHS-3C) 测定。

1.4.3 有机酸分析 采用 HPLC 法, 其色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-AQ C₁₈, 缓冲液为 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵 (pH 2.8), 柱温 35 °C, 流速 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长 214 nm。

1.4.4 多糖的提取 将发酵液滤液离心 (4 000 r·min⁻¹, 10 min), 去菌体, 用 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀 4 h, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 将沉淀冷冻干燥至恒重。

1.5 数据分析

采用 SAS 和 SPSS 统计软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 菌株对不同形式难溶性 Ca-P 的活化作用

从表 1 可见, 供试的 4 种细菌 EnHy-401、ArHy-505、AzHy-510 和 P17 均可以明显活化难溶性 Ca-P 中的磷。但菌株对不同形式难溶性 Ca-P 的活化能力存在着很大差异。4 个供试菌株对 Ca₈-P 的活化能力都最强, 其次是 Ca₃-P, 而 Ca₁₀-P 被活化的程度最小, 原因可能与难溶性磷酸盐本身的溶解度以及颗粒的晶型结构有关。在相同 pH 条件下, Ca₈-P 的溶解度比 Ca₃-P 的略强, 但远大于 Ca₁₀-P 的溶解度^[15], 同时 Ca₈-P 的颗粒密度低, 比表面积大, 有多孔结构, 在溶液中易成悬浮状态, 有利于被发酵液中的溶磷相关因子所作用。

表 1 不同溶磷细菌对不同难溶性 Ca-P 固定磷的活化效果 (n=3)

Table 1 Solubilization of insoluble calcium phosphates by four bacteria strains

磷酸盐 Phosphates	菌株 Strains	pH	溶磷量/mg·L ⁻¹ Phosphate solubilization	磷的活化率/% P activation	胞外多糖产量/g·L ⁻¹ Exopolysaccharide yield
Ca ₃ -P	EnHy-401	4.32 ± 0.02 ^a	632.62 ± 23.09 ^a	61.53 ± 2.31 ^a	4.18 ± 0.12 ^a
	ArHy-505	5.34 ± 0.04 ^c	428.90 ± 15.38 ^b	34.14 ± 1.51 ^b	3.69 ± 0.11 ^b
	AzHy-510	4.69 ± 0.05 ^b	229.03 ± 15.23 ^c	21.12 ± 1.42 ^c	3.39 ± 0.13 ^c
	P17	4.51 ± 0.02 ^b	91.73 ± 8.07 ^d	9.00 ± 0.81 ^d	—
Ca ₈ -P	EnHy-401	4.01 ± 0.06 ^a	681.83 ± 21.90 ^a	63.40 ± 2.27 ^a	4.58 ± 0.13 ^a
	ArHy-505	5.37 ± 0.05 ^c	480.59 ± 12.68 ^b	34.10 ± 1.31 ^b	4.19 ± 0.09 ^b
	AzHy-510	4.58 ± 0.03 ^b	349.30 ± 10.38 ^c	30.90 ± 1.07 ^c	3.65 ± 0.12 ^c
	P17	4.45 ± 0.02 ^b	187.76 ± 9.51 ^d	12.40 ± 0.98 ^d	—
Ca ₁₀ -P	EnHy-401	3.42 ± 0.04 ^a	69.34 ± 3.75 ^a	4.32 ± 0.38 ^a	0.97 ± 0.12 ^a
	ArHy-505	3.89 ± 0.03 ^b	56.38 ± 4.29 ^b	3.00 ± 0.43 ^b	0.85 ± 0.09 ^a
	AzHy-510	3.97 ± 0.02 ^b	45.11 ± 2.49 ^c	1.82 ± 0.25 ^c	0.52 ± 0.06 ^b
	P17	3.86 ± 0.02 ^b	40.19 ± 2.16 ^c	1.44 ± 0.22 ^c	—

注: 同列不同上标字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Different superscript letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same as in the Table 2.

此外, 在以难溶性 Ca-P 为唯一磷源的发酵培养液中, 能产生胞外多糖的溶磷细菌 EnHy-401、ArHy-505、AzHy-510 的活化能力都强于不产多糖的溶磷细菌 P17, 其中肠杆菌 EnHy-401 对 Ca₃-P、Ca₈-P 和 Ca₁₀-P 中的磷活化率分别达到 61.53%、63.40% 和 4.32%, 远高于对 Al-P 和 Fe-P 具有良好溶磷效果的 P17 菌株^[16]。3 种产多糖溶磷细菌活化磷的能力从大到小依次为肠杆菌 EnHy-401、节杆菌 ArHy-505、固氮菌 AzHy-510。

2.2 有机酸、pH 与菌株溶磷的关系

由于难溶性 Ca-P 在酸性介质中易溶解, 所以人们普遍认为微生物对无机磷的活化主要是质子和有机酸的作用。但不同学者所用试验材料的不同导致结论有异。Illmer 等^[8]发现 1 株假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 在溶磷过程中不分泌有机酸, 其释放出的质子是其溶磷的原因, 并用化学方法证实 Ca₃-P 的溶解主要由质子引起。Lin 等^[17]也发现 *Burkholderia cepacia* CC-A174 菌株溶解 Ca₃-P 主要是由分泌葡萄糖酸的质子引起。Agnihotri^[18]则认为分泌有机酸是溶磷的原因, 其中主要是草酸和柠檬酸起作用。有的研究还发现溶磷细菌中的磷酸酶影响磷矿粉的溶解^[16]。但赵小蓉等^[19]认为微生物产生的非有机酸类物质可以作用于重金属, 可能有溶磷作用。在本试验中, 供试菌株对磷的活化强度与 pH 之间不存在相关性, 在 pH 皆为 4.5 左右的条件下, 菌株 AzHy-510 和 P17 对 Ca₃-P 的活化差异显著, AzHy-510 对磷的活化

率比 P17 高 1.5 倍；节杆菌 ArHy-505 在活化 Ca₃-P 和 Ca₈-P 时，pH 分别比 AzHy-510 的高 0.65 和 0.79，但活化率比 AzHy-510 高 13.1% 和 3.2%。另外在含 Ca₁₀-P 的发酵液中，所用菌株都使 pH 下降到 4.0 以下，但活化 Ca₁₀-P 的能力却很小（表 1）。在供试的 4 个菌株中，有机酸并不是在每种菌株解磷过程中都起关键作用，巨大芽孢细菌 P17 所产可滴定有机酸总量比 ArHy-505 还高（图 1），与溶磷相关性大的柠檬酸、苹果酸和琥珀酸分泌量比 ArHy-505 多（表 2），但对 Ca₃-P 形式磷的活化率远低于可产生多糖的 ArHy-505 菌株，只产少量有机酸但能产生一定量多糖的固氮菌 AzHy-510 对 Ca-P 的活化率比 P17 高了 1.5 倍（图 1、表 1）。

表 2 不同菌株在活化 Ca₃-P 时产生的主要有机酸

Table 2 Organic acids produced in glucose-Ca₃-P broth after five days incubation by strains mg · L⁻¹

菌株 Strains	草酸 (葡萄糖酸) Oxalic (gluconic acid)	酒石酸 Tartaric acid	苹果酸 Malic acid	乳酸 Lactic acid	柠檬酸 Citric acid	琥珀酸 Succinic acid	反丁烯二酸 Fumaric acid
EnHy-401	1 519.9 ± 34.2 ^a	—	229.9 ± 9.3 ^a	0.000 4 ^c	177.7 ± 9.4 ^b	143.0 ± 7.3 ^c	21.1 ± 1.2 ^a
ArHy-505	1 050.9 ± 14.3 ^b	—	—	1 386.3 ± 21.7 ^a	102.8 ± 9.1 ^c	—	—
AzHy-510	1.2 ± 0.13 ^d	10.5 ± 1.4	—	0.000 4 ^c	—	206.8 ± 8.3 ^b	2.3 ± 0.1 ^b
P17	568.1 ± 10.3 ^c	—	139.8 ± 8.6 ^b	54.0 ± 3.4 ^b	201.7 ± 12.5 ^a	728.9 ± 19.2 ^a	—

由此可见，表观 pH 与实际有机酸的分泌以及溶磷能力并不具有统一性，这种不统一性暗示我们，在产多糖溶磷细菌的代谢物中存在有机酸物质以外的溶磷因子，这种因子可能就是胞外多糖，它通过某种方式在一定程度上参与了溶磷作用，并形成了产多糖溶磷细菌在活化难溶性磷酸钙中的优势。

2.3 多糖与溶磷的关系

提取 3 种产多糖溶磷细菌在含 Ca₃-P 发酵液中所产生的多糖，并测定多糖被提取前后发酵液中速效磷 (Pi) 含量（表 3）。从表 3 可看出，3 种菌株发酵液的 Pi 含量在多糖提取前后都存在差异，但菌株间差异程度不一样。为进一步确证这种差异的由来，采用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮法处理多糖，然后测定消煮液中的 Pi（多糖中 Pi），发现多糖中含有一定量的磷，并且多糖中 Pi 与多糖提取前后发酵液中的上清液 Pi 之差存在很好的相关性，相关系数达 0.968。提示：发酵液中多糖提取前后 Pi 之差可以视为多糖吸持 Pi 的量，菌株间多糖提取前后 Pi 量的差异程度预示着菌株在该条件下所产多糖吸持 Pi 能力的不同。在 pH 为 5.0 的条件下，EnHy-401、ArHy-505、AzHy-510 所产多糖对溶液中 Pi 的吸持率分别为 66.62%、60.54% 和 58.91%，持 Pi 量则分别达 423.91、258.80 和 134.37 mg · L⁻¹。多糖对溶液中游离磷的这种吸持行为改变了单纯有机酸对磷酸钙的活化动态平衡，并推动解磷平衡向难溶磷的溶解方向移动，表现出磷酸钙活化过程中多糖与有机酸之间的协同效应。此效应的强弱与菌株所产多糖性质与产量有关（图 2 和图 3）。从表面上看，吸持磷能力强的多糖对有机酸溶磷的协同效应强于持磷能力弱的多糖；多糖的含量高，协同效应明显。

多糖是一种结构上变化多样的物质，它在细胞识别、信息传递和基因表达调控方面起重要作用^[20]，其分子结构中因含有大量具有络合重金属离子的阴离子官能团，使其广泛用于含重金属污水的处理上^[21]，并认为可以协同有机酸、氨基酸溶解钾矿石^[22]。郭丹钊^[23]曾报道细菌的胞外多糖可对肥料中养分元素进行吸附，在一定程度上增强土壤对肥料的吸持能力，使肥料在土壤中停留的时间延长，达到提高肥料利用率的目的。因此可以认为溶磷细菌的胞外多糖通过吸持溶液中的 PO₄³⁻ 是微生物提高溶磷能力的重要步骤，多糖对有机酸溶解的有效磷的立即吸持，影响了单纯有机酸溶磷的平衡，使平衡向磷溶解方向移动，因此多糖是促进磷有效化的重要因子。

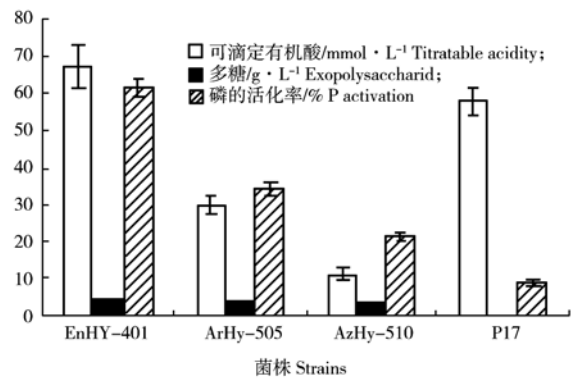


图 1 溶磷细菌所产有机酸、胞外多糖与其溶磷效果的关系
Fig. 1 The relationship between solubilization of Ca₃-P and organic acid value, exopolysaccharide yield produced by phosphate solubilizing bacteria

表 3 菌株的 Ca₃-P 发酵滤液在提取多糖前后溶液中清液中 Pi 量差异及所提取多糖中 Pi 含量 (n=3)

Table 3 The dispersion of phosphorus concentration in supernatant between before and after exopolysaccharide (EPS) extracted and the amount of phosphorus in EPS mg · L⁻¹

菌株 Strains	EPSB-Pi	EPSA-Pi	EPSB-Pi 与 EPSA-Pi 之差	EPS-Pi
EnHy-401	636.32 ± 16.40 ^a	202.42 ± 10.10 ^c	423.91 ± 12.40 ^b	413.08 ± 10.90 ^b
ArHy-505	435.75 ± 10.60 ^a	186.95 ± 8.40 ^c	258.80 ± 9.80 ^b	270.14 ± 9.60 ^b
AzHy-510	220.61 ± 8.30 ^a	85.24 ± 6.80 ^c	134.37 ± 6.30 ^b	124.25 ± 7.50 ^b

注：1) EPSB-Pi：多糖提取前发酵液上清液中的 Pi 含量 Phosphorus concentration in supernatant before EPS extracted；EPSA-Pi：多糖提取后发酵液上清液中的 Pi 含量 Phosphorus concentration after EPS extracted；EPSB-Pi 与 EPSA-Pi 之差 The difference value between EPSB-Pi and EPSA-Pi；EPS-Pi：多糖被消煮后所测得的磷量 Phosphorus concentration after EPS heated。

2) 同行不同上标字母表示在 0.05 水平差异显著。Different superscript letters in the same line indicate significant difference at 0.05 level.

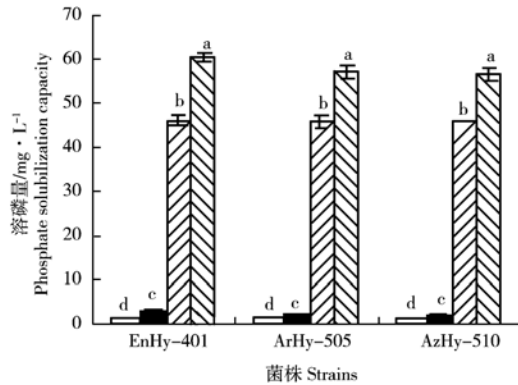


图 2 溶磷细菌胞外多糖在离体条件下对磷酸钙的活化效果
 Fig. 2 Phosphate solubilization by EPS alone or combination with organic acid

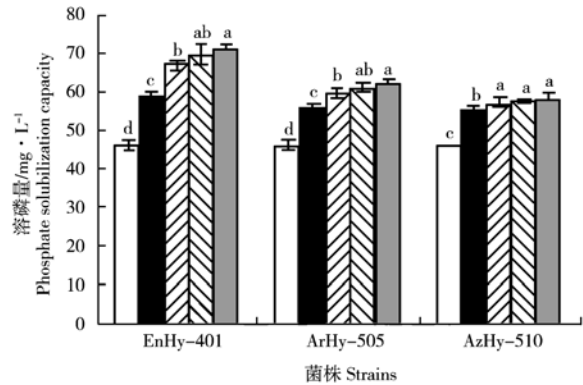


图 3 胞外多糖含量对其协同有机酸溶磷的影响
 Fig. 3 Effect of EPS contents on collaborative organic acid-soluble phosphorus

2.4 培养液中 C/N 值对菌株产有机酸与胞外多糖的影响

溶磷细菌对难溶磷的活化能力除了受到菌株自身特性影响外，往往还与菌株生长的营养条件有关。由图 4 可见，在碳量一定时，氮的质量分数直接影响到产多糖溶磷菌株分泌有机酸和产多糖的能力（图 4-A 和图 4-B），从而影响到对磷的活化效果（图 4-C）。在一定范围内，肠杆菌 EnHy-401 和节杆菌 ArHy-505 随 C/N 值的增大，有机酸和多糖分泌增多，磷的活化率提高；固氮菌 AzHy-510 则在 C/N 值为 33.3 时有机酸和多糖分泌较多，溶磷活性表现最大。但仅从量上来看，多糖相对于有机酸受 C/N 值影响较小。不同 C/N 值下所产生的有机酸和多糖量上的差异，以及所表现出来的有机酸、多糖与溶磷的协同性，再次显示出胞外多糖在产多糖溶磷细菌活化难溶磷过程中对有机酸解磷功能的影响。多糖与有机酸的协调溶磷作用受到培养液中 C/N 值的影响，菌株只有在既适合产有机酸又能分泌一定量胞外多糖的营养条件下，溶磷活性才最大。

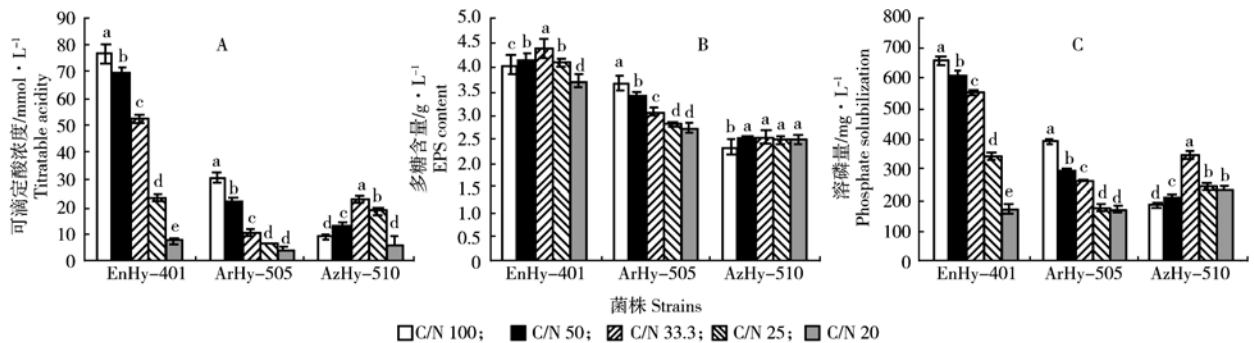


图 4 不同 C/N 值下产多糖溶磷菌株分泌有机酸量、多糖量以及对磷的活化效果
 Fig. 4 Effect of C/N on solubilization of Ca₃-P and organic acid, EPS production

3 结论

难溶磷的微生物活化强度受溶磷微生物菌株特性的影响, 3 种产多糖溶磷细菌 EnHy-401、ArHy-505、AzHy-510 对 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 和 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 的活化率都在 21% 以上, 远高于不产多糖的溶磷巨大芽孢杆菌 P17, 在难溶性 Ca-P 的生物活化中表现出较强的优势。

产多糖溶磷细菌对难溶磷的活化作用是由分泌有机酸和分泌多糖的协同作用而实现。胞外多糖对释放到溶液中游离磷的持续吸持, 推动难溶性 Ca-P 的溶解动态平衡向溶解方向移动, 从而提高溶磷效率, 表现出对有机酸溶磷的协同性。有机酸分泌多且所产多糖持磷能力强的溶磷菌株 EnHy-401 活化 Ca-P 的能力强于另 2 种产多糖溶磷细菌 ArHy-505 和 AzHy-510, 它对 $\text{Ca}_3\text{-P}$ 和 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 的活化率分别达 61.52% 和 63.35%。

产多糖溶磷细菌在溶磷过程中所表现的有机酸-多糖协同溶磷效应还受环境中 C/N 值的影响。一般情况下, C/N 值高, 有机酸分泌多, 多糖产量增多, 溶磷能力也增强。

参考文献:

- [1] Ford M C. The nature of phosphate fixation in soils [J]. Amer Soc Agron, 1933, 25: 133-144
- [2] 鲁如坤. 我国的磷矿资源和磷肥生产消费. I. 磷矿资源和磷肥生产 [J]. 土壤, 2004, 36(1): 1-4
- [3] Hammond L L, Chien S H, Mokwunye A V. Agronomic value of unacidulated and partially acidulated phosphate rocks in digenous to the tropics [J]. Adv Agron, 1986, 40: 89-139
- [4] 蒋柏藩. 石灰性土壤无机磷有效性的研究 [J]. 土壤, 1992(2): 61-65
- [5] 李寿田, 周健民, 王火焰, 等. 不同土壤磷的固定特征及磷释放量和释放率的研究 [J]. 土壤学报, 2003, 40(6): 908-912
- [6] 鲁如坤, 时正元, 顾益初. 土壤积累态磷研究. II. 磷肥的表观积累利用率 [J]. 土壤, 1995(6): 286-289
- [7] Shen H, Yan X L, Zhao M, et al. Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum-and iron-bound phosphates [J]. Environmental and Experimental Botany, 2002, 48: 1-9
- [8] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms [J]. Soil Biol Biochem, 1995, 27(3): 257-263
- [9] Sperber J. Isolation of apatite by soil microorganism producing organic acid [J]. Australia Journal of Agricultural Research, 1958, 9: 782-789
- [10] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化 [J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 111-119
- [11] 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]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 26-30
- [12] 范丙全, 金继运, 葛诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 525-530
- [13] 郝晶, 洪坚平, 刘冰, 等. 石灰性土壤中高效解磷细菌菌株的分离、筛选及组合 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 404-408
- [14] Tandon H L S, Cescas M P, Tyner E H. An acid-free vanadate-molybdate reagent for the determination of total phosphorus in soil [J]. Soil Science Society of America, 1968, 2: 48-51
- [15] 鲁如坤. 土壤-植物营养学原理和施肥 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 158-160
- [16] 钟传青. 解磷微生物溶解磷矿粉和土壤难溶磷的特性及其溶磷方式研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004
- [17] Lin T-F, Huang H-I, Shen F-T, et al. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174 [J]. Bioresource Technology, 2006, 97: 957-960
- [18] Agnihotri V P. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds [J]. Can J Microbiol, 1970, 16: 877-880
- [19] 赵小蓉, 林启美, 李保国. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(2): 197-204
- [20] Carlson R W. Rhizobium [C] // Broughton. Nitrogen Fixation. Vol. 2. Oxford: Clarendon Press, 1982: 199-234
- [21] Ozdemir G, Ceyhan N, Manav E. Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 1677-1682
- [22] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探 [J]. 土壤学报, 2002, 39(6): 863-871
- [23] 郭丹钊. 胞外多糖产生菌的筛选及其多糖特性和生物活性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004