

研究报告

拉恩氏菌 W25 对缓冲容量的响应及其产酸特性

李娜¹ 乔志伟² 洪坚平^{1*} 谢英荷¹ 张铁全³

(1. 山西农业大学 资源环境学院 山西 太谷 030801)

(2. 山西省环境科学研究院 山西 太原 030027)

(3. Greenhouse and Processing Crops Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Harrow, N0R 1G0)

摘要:【目的】进一步了解拉恩氏菌 W25 的溶磷机理和对土壤缓冲容量的响应。【方法】在液体摇瓶培养过程中, 采用调节培养液 pH 的方法研究模拟土壤的缓冲容量对拉恩氏菌 W25 溶磷量的影响; 通过单因子试验和 HPLC 相结合的方法, 研究不同碳源、磷源条件下 W25 的溶磷能力及产酸特性。【结果】拉恩氏菌 W25 在磷酸三钙培养液中培养 120 h 后有效磷含量达到最大值, 培养液有效磷含量与培养液 pH 变化之间呈极显著负相关性($P<0.01$); W25 在培养第 48–96 h 具有较强的缓冲能力, 培养液有效磷含量加碱处理与未加碱处理差异不显著($P<0.05$), 从第 120 h 开始, 缓冲能力开始减弱, 在 168 h 后基本丧失了缓冲能力; W25 在不同碳源条件下溶磷能力差异显著($P<0.05$), 依次为葡萄糖>乳糖>蔗糖>甘露醇>淀粉, 不同磷源中培养液有效磷含量差异极显著($P<0.01$), 依次为磷酸三钙>磷酸铁>磷酸铝>磷矿粉; 不同碳源、磷源条件下 W25 培养液中有机酸的种类和浓度差异较大, W25 溶磷能力的大小不仅与产酸的种类有关, 而且也与产酸的浓度有关。【结论】研究结果为更深入研究拉恩氏菌溶磷机理提供条件, 为拉恩氏菌的应用提供理论基础。

关键词: 拉恩氏菌, 溶磷能力, 缓冲容量, 碳, 磷, 产酸特性

Solubilization ability of *Rahnella* sp. W25 under buffering condition and its acetic-producing characteristics

LI Na¹ QIAO Zhi-Wei² HONG Jian-Ping^{1*} XIE Ying-He¹ ZHANG Tie-Quan³

(1. College of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

(2. Environmental Science Research Institute of Shanxi Province, Taiyuan, Shanxi 030027, China)

(3. Greenhouse and Processing Crops Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Harrow, N0R 1G0)

Abstract: [Objective] Objectives of this study were to further understand the mechanism on phosphate solubilization of *Rahnella* sp. W25 and its solubilization ability under buffering condition. [Methods] Regulating pH of nutrient solution was conducted in the process of liquid shake flask culture to research the influence of buffer capacity on the phosphate solubilizing ability of *Rahnella* sp. W25 under simulation soil condition. Research the solubilizing ability and acetic-producing characteristics under different carbon and phosphorus sources condition though single factor text and

基金项目: 国家公益性行业磷细菌肥研制科研专项项目(No. 201103004-5); 国家自然科学基金项目(No. 31272257)

*通讯作者: ✉: hongjpsx@163.com

收稿日期: 2015-05-22; 接受日期: 2015-07-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-07-20

HPLC. **[Results]** The result showed that the available phosphorus content reached up to its maximum after cultivated 120 h in the solution of tricalcium phosphate. The change of available phosphorus content and pH in solution showed significant negative correlation ($P<0.01$). At cultivated 48–96 h, strain W25 had stronger buffering capacity and the difference of available phosphorus content between regulating pH using and without using NaOH was not significant ($P<0.05$). Strain W25 weaken after cultivated 120 h and basically lost buffering capacity after cultivated 168 h. The solubilizing ability showed significant different under different carbon sources ($P<0.05$). The order of solubilization ability as follows: glucose>lactose>sucrose>mannitol>starch. It also showed extremely significant different under different phosphorus sources ($P<0.01$). The order was tricalcium phosphate>iron phosphate>aluminum phosphate>ground phosphate rock. The type and concentration of organic acids were dissimilar under different carbon and phosphorus sources conditions. The solubilization ability of strain W25 was both related to the type and concentration of organic acids. **[Conclusion]** Results of this study could provide the condition of deeply researching mechanism on phosphate solubilization and the theoretical basis of application of *Rahnella* sp..

Keywords: *Rahnella* sp., Phosphate solubilization ability, Buffering capacity, Carbon, Phosphorus, Acetic-producing characteristics

磷是植物生长所必需的矿质元素，在植物生长、发育等生命活动中起着积极的作用^[1]。山西的土壤以石灰性土壤为主，大部分磷素由于被固定而处于无效状态^[2]，土壤中可被植物吸收利用的磷仅占全磷量的 1%^[3]。磷肥施入土壤后，土壤胶体对无机磷有强烈的吸附和固定作用^[4]，也导致磷肥利用率低。土壤中的溶磷微生物可以将土壤中难溶态磷转换为有效态磷^[5]，达到提高土壤磷素有效性、使作物增产的目的^[6-8]。

近年来，国内外学者对土壤溶磷微生物做了大量的报道，研究主要集中在溶磷微生物的分离筛选和鉴定、促生作用以及溶磷机理，对芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[9-11]、假单胞菌属 (*Pseudomonadaceae*)^[12-13]、欧文氏菌属 (*Erwinia*)^[14]、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)^[12,15]、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)^[13]、黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等的研究较多，而拉恩氏菌 (*Rahnella* sp.) 作为溶磷菌的研究较少，李桂娥等^[16]关于拉恩氏菌 JZ-GX1 分泌植酸酶降解植酸盐以及其对马尾松苗的促生效应进行了研究；Vyas 等^[17]从沙棘根际土壤中分离筛选出溶磷菌，经鉴定为拉恩氏菌，并证明其有较强的促生作用，可以提高农业生产力。大量的研究表明，溶磷微生物具有产酸的能力，这些酸能与铁、铝、钙等离子螯

合，将难溶态磷溶解转化，产酸机理是溶磷微生物溶磷机理中最重要的一个方面^[18-19]。溶磷微生物的溶磷能力主要受菌株自身特性的影响，同时也与其生长环境有关，如碳源、氮源、碳氮比、及温度、pH 等。但是，关于土壤缓冲作用对其影响研究得较少。本课题组在前期研究中从石灰性土壤中分离筛选获得了一株拉恩氏菌 W25^[20]，并研究了其溶磷特性及不同氮源条件下产酸的种类和浓度，但其在不同碳源、磷源条件下的产酸情况尚未清楚；此外，关于拉恩氏菌在土壤中的缓冲性能也有待研究。基于以上因素，本试验对拉恩氏菌 W25 在土壤中的缓冲性能及在不同碳源及磷源条件下的产酸情况做了深入的研究，为了解拉恩氏菌的溶磷机理及溶磷菌肥的制作和应用方面提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株拉恩氏菌 W25 是本课题组在前期工作中从山西省太谷县石灰性褐土中筛选出的具有溶磷能力的菌株，经过鉴定该菌株为拉恩氏菌属 (*Rahnella* sp.)^[20]。

1.2 培养基

菌株活化培养基、液体发酵培养基(NBRIP)和对难溶态磷酸盐溶解测定的培养基参照文献[20]。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的活化: 将在活化培养基上培养 48 h 的菌接入无菌水中, 充分振荡摇匀, 制成菌悬液, 菌数大于 10^8 CFU/mL。

1.3.2 菌株对磷酸三钙的溶解动态: 在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 已灭菌的 NBRIP 液体培养基, 接种菌悬浮液 1 mL, 于 30 °C、150 r/min 振荡培养。分别于 24、48、72、96、120、144、168 h 取发酵液在 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定发酵液中有有效磷含量(采用 NaHCO_3 浸提-钼锑抗比色法测定,下同)和 pH (采用 pH 计直接测定,下同), 并设置不接菌处理, 每个处理重复 3 次。

1.3.3 模拟缓冲容量条件下菌株的溶磷效果: 在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 已灭菌的 NBRIP 液体培养基, 接种菌悬浮液 1 mL, 于 30 °C、150 r/min 振荡培养。分别在第 24、48、72、96、120、144、168 h 测定培养液 pH, 当培养液 pH 降至 7.0 以下, 用已经灭菌的 0.01 mol/L 的 NaOH 调节至 7.0, 通过这种方法来模拟土壤的缓冲容量对菌株溶磷能力的影响。所有的步骤均严格在无菌条件下操作。

1.3.4 不同碳源和磷源对菌株溶磷量的影响: 在 NBRIP 培养基中, 分别以蔗糖、甘露醇、乳糖、淀粉等质量代替葡萄糖为碳源, 其他成分不变, 接菌培养, 测定培养液有效磷含量, 确定最佳碳源; 确定最佳碳源以后, 以磷矿粉、磷酸铝、磷酸铁、磷

酸二氢钾为磷源替换磷酸三钙, 接菌培养, 测定培养液有效磷含量。

1.3.5 不同碳源、磷源下菌株发酵液有机酸的测定: 不同碳氮、磷源发酵液 1 mL, 在 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 针孔滤膜, 滤液进行 HPLC 测定, 确定有机酸的种类和浓度。仪器型号为: 安捷伦 1100; 色谱条件为: 色谱柱反相 C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm), 流动相: 甲醇和 1 mmol/L KH_2PO_4 (2:98, 体积比), 波长: 214 nm, 流速: 0.7 mL/min, 进样量: 20 μL , 柱温: 25 °C。出峰顺序依次为草酸, 甲酸, 乳酸, 乙酸, 琥珀酸, 丙酸。

1.4 数据分析

通过对实验数据的采集整理, 结合 Excel、SAS V8.1 软件等工具对实验数据进行了处理与统计分析。

2 结果与分析

2.1 拉恩氏菌 W25 的溶磷能力

图 1 为在磷酸三钙液体发酵液中, 拉恩氏菌 W25 有效磷含量及 pH 的动态变化。

由图 1 可知, W25 在培养 0–48 h 之内培养液有效磷含量迅速增加, 从 30.14 mg/L 增加到 307.17 mg/L; 在 48–96 h 培养液有效磷含量仍然持续缓慢增加, 从 307.17 mg/L 增加到 397.10 mg/L; 在培养 120 h 后, 有效磷达到最大值 403.42 mg/L; 120–144 h 之间培养液有效磷含量开始呈现减小的

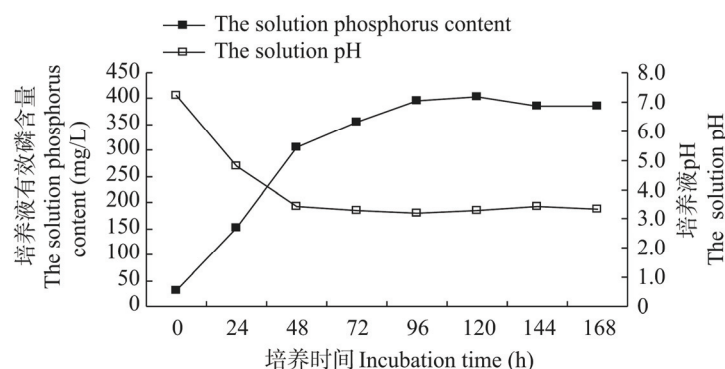


图 1 拉恩氏菌 W25 在磷酸三钙培养液中有有效磷的动态变化及培养液 pH 的变化

Figure 1 Dynamic change of available phosphorus content and pH of *Rahnella* sp. W25 in the solution of tricalcium phosphate

趋势,从 403.42 mg/L 降低到 385.30 mg/L;在培养 168 h 后培养液有效磷含量基本不变。在 0–168 h 之内,培养液的 pH 总体上呈现先降低后上升的趋势,在培养 96 h 时培养液 pH 降到最低值,为 3.20,在培养 96–168 h 之内培养液 pH 又有所回升。

在整个培养周期内,培养液有效磷含量与培养液 pH 变化之间的相关系数为 -0.94 ,呈极显著负相关性($P<0.01$)。菌株在培养 48 h 之内,培养液中营养物质丰富,生长繁殖快,W25 产酸的能力较强,培养液中有效磷含量增加迅速,pH 迅速下降;在培养后期由于营养物质的缺乏和环境条件的改变,培养液有效磷减少、pH 升高。

2.2 缓冲容量对拉恩氏菌 W25 溶磷能力的影响

液体摇瓶培养过程中利用 NaOH 调节培养基的 pH,模拟土壤的缓冲容量对解磷效果的影响,表 1 为模拟土壤缓冲条件下拉恩氏菌 W25 培养液有效磷含量和 pH 的变化。

由表 1 可以看出,培养 24 h 后 W25 培养液 pH 从 7.00 迅速下降到 4.82,培养液有效磷含量增加到 152.33 mg/L;用 0.01 mol/L 灭菌的 NaOH 调节 pH 至 7.0 后,发现第 48 h 培养液 pH 又重新回落到 3.81,

培养液有效磷含量与未加碱处理相比,仅降低 3.6%,差异不显著($P<0.05$);继续用 NaOH 调节,培养液 pH 始终处于碱性状态,在第 72 h 和 96 h,培养液中营养物质丰富,W25 生长旺盛,产酸能力较强,外界对其影响较小,因而在模拟土壤缓冲条件下,W25 缓冲作用比较强,培养液有效磷含量加碱处理与未加碱处理相比分别降低 4.8%和 3.9%,差异仍不显著($P<0.05$),从第 120 h 开始,由于营养物质的消耗和环境条件的改变,加碱后,培养液 pH 降低幅度减慢,培养液有效磷含量也显著减少($P<0.05$),在培养第 120、144 和 168 h,加碱处理与未加碱调节培养液相比分别降低了 14.7%、48.4%和 64.9%,可见,随培养时间的变化,缓冲作用减弱,在第 168 h 基本上不具有缓冲性能,培养液 pH 的变化会显著影响培养液有效磷含量的变化。

2.3 不同碳源、磷源条件下对拉恩氏菌 W25 溶磷能力的影响

图 2 和图 3 为拉恩氏菌 W25 培养液在不同碳源、磷源条件下的有效磷含量。碳源分别为葡萄糖、蔗糖、淀粉、乳糖、甘露醇;磷源分别为磷酸三钙、磷矿粉、磷酸铝、磷酸铁。

表 1 培养条件下拉恩氏菌 W25 培养液有效磷含量和 pH 的变化

Table 1 Change of available phosphorus content and pH in the culture of *Rahnella* sp. W25 under cultivating conditions

培养时间 Incubation time (h)	有效磷 Available phosphorus content (mg/L)		pH	
	–NaOH	+NaOH	–NaOH	+NaOH
24	152.33±5.37g	152.33±5.37g	4.82±0.06b	4.82±0.06b
48	307.17±7.39d	256.23±15.84e	3.41±0.05g	3.81±0.01e
72	354.69±9.68bc	337.78±14.73c	3.28±0.03h	3.44±0.03f
96	397.10±13.93a	385.63±7.57a	3.20±0.05j	3.35±0.04gh
120	403.42±11.76a	344.42±13.04bc	3.31±0.06gh	4.14±0.13d
144	385.30±30.51ab	198.64±7.11f	3.45±0.07fg	4.66±0.08c
168	385.50±11.21a	135.41±18.37h	3.34±0.04gh	6.65±0.10a

注: –NaOH: 未用 0.01 mol/L 灭菌的 NaOH 调节培养液 pH; +NaOH: 用 0.01 mol/L 灭菌的 NaOH 调节培养液 pH. 表中数据为 3 个数值的平均值±其标准差,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

Note: –NaOH: Regulating culture pH without using 0.01 mol/L NaOH been sterilized; +NaOH: Regulating culture pH using 0.01 mol/L NaOH been sterilized. Data in the table are means±standard deviation. Different letters represent significant difference at $P<0.05$. The same below.

试验选用的碳源, 包括单糖(葡萄糖)、双糖(乳糖, 蔗糖)、多糖(淀粉)和糖醇(甘露醇), 可以在一定程度上反映 W25 对不同糖类的利用情况, 而且这几种糖类在土壤中也比较常见^[21-22]。由图 2 可知, 不同碳源中以葡萄糖为碳源时 W25 的溶磷作用最强, 其培养液有效磷含量显著高于其它碳源 ($P<0.05$), 葡萄糖为碳源时 W25 培养液有效磷含量比乳糖、蔗糖、甘露醇、淀粉为碳源时高出 34.12%、37.83%、68.87%、412.20%。可见, W25 对碳源的利用以单糖为主, 双糖次之, 对多糖利用率较低。

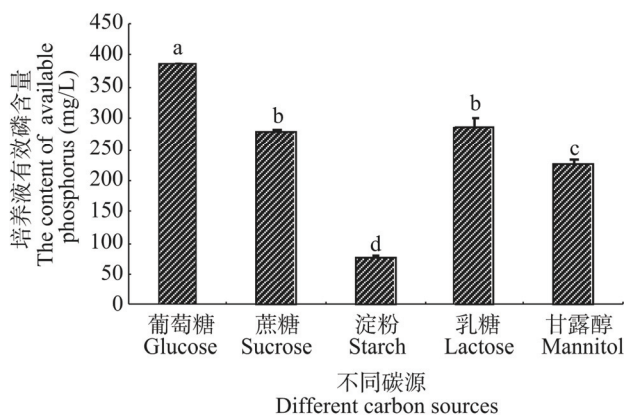


图 2 不同碳源条件下拉恩氏菌 W25 培养液有效磷含量
Figure 2 Available phosphorus content in the culture of *Rahnella* sp. W25 under the condition of different carbon sources

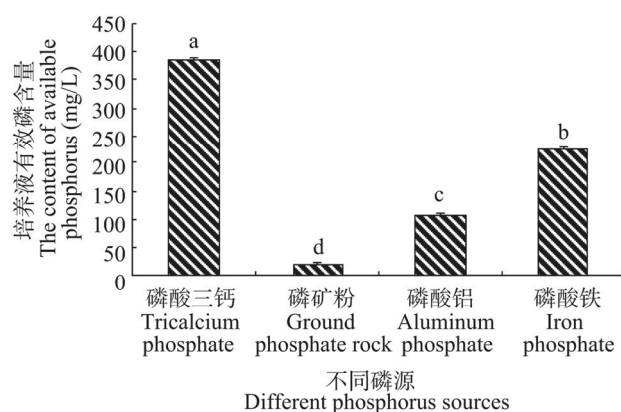


图 3 不同磷源条件下拉恩氏菌 W25 培养液有效磷含量
Figure 3 Available phosphorus content in the culture of *Rahnella* sp. W25 under the condition of different phosphorus sources

由图 3 可知, 不同磷源中培养液有效磷含量差异极显著 ($P<0.01$), 依次为磷酸三钙>磷酸铁>磷酸铝>磷矿粉, 以磷酸三钙为磷源时 W25 的溶磷作用最强, 其有效磷含量比磷酸铁、磷酸铝、磷矿粉为磷源时高出 18.02、2.60、0.72 倍。可见, W25 对磷源的利用以磷酸三钙利用率最高。

2.4 不同碳源、磷源对拉恩氏菌 W25 产酸性能的影响

2.4.1 不同碳源条件下拉恩氏菌 W25 产酸的种类和浓度:

以硫酸铵为氮源, 磷酸三钙为磷源, 葡萄糖、甘露醇、蔗糖、乳糖、淀粉分别为碳源, 测定不同碳源条件下 W25 培养液中有机酸的种类和浓度, HPLC 分析结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出, 不同碳源条件下 W25 培养液中有有机酸的种类和浓度差异较大, 以葡萄糖、蔗糖、乳糖为碳源 W25 培养液中有两种有机酸, 分别为甲酸和乙酸、乳酸和丙酸、草酸和琥珀酸; 以甘露醇、淀粉为碳源, W25 培养液中只有一种有机酸, 分别为琥珀酸、草酸, 其浓度分别为 248.86 mg/L 和 28.47 mg/L。

拉恩氏菌 W25 溶磷能力的大小不仅与产酸的种类有关, 还与产酸的浓度有关。以乳糖、淀粉为碳源均产生草酸, 以乳糖为碳源产生的草酸浓度比以淀粉为碳源高 59.73 mg/L, 且以乳糖为碳源还产生浓度为 436.93 mg/L 的琥珀酸, 可见, 以乳糖为碳源的溶磷量显著高于以淀粉为碳源的溶磷量。以甘露醇、乳糖为碳源均产生琥珀酸, 以乳糖为碳源产生的琥珀酸浓度比以甘露醇为碳源高 188.07 mg/L, 且以乳糖为碳源还产生浓度为 88.2 mg/L 的草酸, 可见, 以乳糖为碳源的溶磷量显著高于以甘露醇为碳源的溶磷量。

2.4.2 不同磷源条件下拉恩氏菌 W25 产酸的种类和浓度:

以硫酸铵为氮源, 葡萄糖为氮源, 磷酸三钙、磷酸铝、磷酸铁、磷矿粉、磷酸二氢钾分别为磷源, 测定不同磷源条件下拉恩氏菌 W25 培养液中有有机酸的种类和浓度, HPLC 分析结果如表 3 所示。

表 2 不同碳源条件下拉恩氏菌 W25 产酸的种类和浓度
Table 2 The type and concentration of acid produced by *Rahnella* sp. W25 under the condition of different carbon sources

碳源 Different carbon sources	有机酸含量 Organic acid (mg/L)					
	草酸 Oxalic acid	甲酸 Formic acid	乳酸 Lactate acid	乙酸 Acetic acid	琥珀酸 Succinate acid	丙酸 Propionate acid
葡萄糖 Glucose	—	412.22a	—	163.99d	—	—
甘露醇 Mannitol	—	—	—	—	248.86c	—
蔗糖 Sucrose	—	—	104.15e	—	—	374.03b
乳糖 Lactose	88.20f	—	—	—	436.93a	—

注：—：未检出。

Note: —: Not detected.

表 3 拉恩氏菌 W25 在磷源中产生有机酸的种类和浓度
Table 3 The type and concentration of organic acid produced by *Rahnella* sp. W25 under the condition of different phosphate sources

磷源 Different phosphorus sources	有机酸含量 Organic acid (mg/L)				
	草酸 Oxalic acid	甲酸 Formic acid	乙酸 Acetic acid	乳酸 Lactate acid	琥珀酸 Succinate acid
磷酸三钙 Tricalcium phosphate	—	412.22a	163.99d	—	—
磷酸铝 Aluminum phosphate	126.16f	—	—	—	—
磷酸铁 Iron phosphate	255.73c	118.44e	—	—	251.62c
磷矿粉 Ground phosphate rock	—	315.20b	—	159.53d	—

注：—：未检出。

Note: —: Not detected.

从表 3 可以看出, 不同磷源条件下 W25 培养液中有机酸的种类和浓度差异较大, 以磷酸铁为磷源产生草酸、甲酸、琥珀酸 3 种有机酸, 以磷酸三钙、磷矿粉为磷源 W25 培养液中有 2 种有机酸, 分别为甲酸和乙酸、甲酸和乳酸; 以磷酸铝为磷源, W25 培养液中只有 1 种有机酸, 为草酸, 其浓度为 126.16 mg/L。

W25 溶磷能力的大小不仅与产酸的种类有关, 而且也与产酸的浓度有关。以磷酸铝、磷酸铁为磷源均产生草酸, 以磷酸铁为磷源产生的草酸浓度比以磷酸铝为磷源的高 129.57 mg/L, 且以磷酸铁为磷源还产生浓度为 118.44 mg/L 的甲酸和浓度为

251.62 mg/L 的琥珀酸, 所以, 以磷酸铁为磷源的溶磷量显著高于以磷酸铝为磷源的溶磷量。

3 结论与讨论

本实验得出拉恩氏菌 W25 在磷酸三钙培养液中有效磷含量与培养液 pH 呈极显著负相关 ($P<0.01$), 这与席琳乔等^[23]的研究结果一致, 但是也有研究表明培养液有效磷含量与培养液 pH 并无直接关系, 林启美等^[24]和杨慧等^[14]研究表明, 溶磷菌株的溶磷量与培养液 pH 不具有相关性, 造成这一结果的原因是不同溶磷微生物的溶磷机理不同, 溶磷微生物溶磷机理具有多样性^[25-26]。

碳源、氮源和磷源是影响溶磷微生物生长和溶磷能力发挥最主要的营养物质,前人研究溶磷微生物的溶磷作用主要考虑碳源、氮源、磷源及 C/N 比和 C/P 比^[27-31]对其的影响,而很少研究溶磷微生物在土壤中的缓冲性能,土壤的缓冲容量是影响溶磷微生物溶磷效果的原因之一,外界环境改变后,土壤的理化性状不会马上变化,具有缓冲作用,当溶磷微生物施入土壤,其分泌的质子和有机酸可能会被中和,或者与土壤中的金属离子反应,其溶磷能力受到影响。虞伟斌等^[32]通过液体摇瓶模拟了缓冲容量对溶磷菌溶磷能力的影响,结果表明假单胞菌 K3 在培养前期具有较强的抗缓冲能力,在培养后期 K3 缓冲能力较弱或者丧失了抗缓冲的能力,缓冲容量对溶磷菌溶磷量有很大的抑制作用,本试验对拉恩氏菌 W25 进行了研究,也得出了相同的结论,在培养前期培养液营养物质丰富,W25 抗缓冲能力强,随培养时间的变化,缓冲作用减弱,在第 168 h 基本上不具有缓冲性能,培养液 pH 的变化显著影响 W25 的溶磷作用。

目前,关于不同碳源、磷源对溶磷菌溶磷效果的影响已有研究。焦子伟等^[33]研究了不同碳源条件下拉恩氏菌 HX2 对无机磷的溶解作用,结果表明以 D-山梨醇为碳源溶磷量最低,以木糖最高。刘文干等^[34]等研究发现,洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)在以还原糖为碳源的情况下溶磷能力高于非还原糖。贺梦醒等^[35]研究表明芽孢杆菌(*Bacillus*)以淀粉为碳源解磷能力较高。本试验中 W25 在不同碳源条件下对磷酸三钙均有一定溶解作用,但溶磷量差异较大,对不同碳源利用率的大小依次为葡萄糖>乳糖>蔗糖>甘露醇>淀粉,这进一步说明了 W25 有较强的溶磷能力,且在以葡萄糖为碳源的情况下溶磷效果更好,因此在将 W25 制成生物菌肥时可适量地配入葡萄糖;Whitelaw 等^[36]研究发现在不同种类的磷酸盐条件下,在葡萄糖浓度相同时,培养液有效磷含量相差可达 47.5 倍,本试验中 W25 以磷酸三钙为磷源的溶磷能力

是以磷矿粉为磷源溶磷能力的 19 倍。

溶磷微生物种类繁多,分布不均匀,溶磷能力差异也大,因此溶磷微生物的溶磷机理也是复杂多样的,目前研究较多且公认的是产酸机理^[37],分泌低分子量有机酸类物质是微生物溶磷的重要机理之一^[38-39]。目前溶磷菌产生的酸主要有草酸、柠檬酸、乙酸、乳酸、丙酸和琥珀酸^[40],这些有机酸一方面可以直接与难溶态磷酸盐发生溶解作用,将难溶态磷酸盐转换为有效态磷酸盐,另一方面,可以与难溶态磷酸盐中的钙镁铝铁螯合,将难溶态磷酸盐溶解,置换出磷酸根^[19]。Chen 等^[26]研究发现溶磷细菌可以产生柠檬酸、葡萄糖酸、琥珀酸、丙酸、乳酸,还有 3 种未知酸,认为微生物溶磷能力与分泌有机酸密切相关。本试验条件下,W25 除产生草酸、乙酸、丙酸、乳酸、琥珀酸外,在以葡萄糖为碳源的情况下,以磷酸三钙、磷矿粉、磷酸铁为磷源都产生甲酸。不同碳源、磷源通过影响产生有机酸的种类和浓度进而影响溶磷能力^[41],溶磷菌溶磷能力的发挥,不仅与产酸的种类有关,还与产酸的浓度有关,这是因为不同有机酸与难溶态磷的作用方式不同,不同有机酸对难溶态磷酸盐的溶解能力也不同,菌株在培养液中产生某种有机酸对难溶态磷酸盐溶解和螯合作用较弱,即使产量比较大,溶磷能力也不强^[42]。乔志伟等^[20]研究了 W25 在不同氮源条件下其产酸种类和浓度,但对于不同碳源、磷源条件下的产酸情况尚未清楚,本实验对 W25 进行了进一步研究,结果表明以乳糖为碳源的溶磷量显著高于以淀粉为碳源的溶磷量,以乳糖、淀粉为碳源均产生草酸,乳糖为碳源产生的草酸浓度比以淀粉为碳源高 59.73 mg/L,并且在乳糖为碳源条件下还产生浓度为 436.93 mg/L 的琥珀酸。

本课题组在前期研究中从石灰性土壤中分离、纯化、鉴定得到拉恩氏菌 W25,并研究了其溶磷特性;本实验在此基础上,对 W25 在土壤中的缓冲性能及在不同碳源及磷源条件下的产酸情况做了深入地研究,研究结果可以为更深入研究拉恩氏菌

溶磷机理提供条件,为拉恩氏菌的应用提供理论基础;在接下来的工作中我们将根据以上在液体试验条件下得到的结果,将拉恩氏菌 W25 制成微生物菌肥应用到在实际生产中,研究其在土壤中的作用。

参考文献

- [1] Lu JL, Chen LS, Cao YP. Scientific Fertilization Required[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2008: 7-10 (in Chinese)
陆景陵, 陈伦寿, 曹一平. 科学施肥必读[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008: 7-10
- [2] Lu WJ, He ZL, Xu JP, et al. The microbial transformation and utilization of sparingly-soluble phosphate in calcareous soils[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1999, 5(4): 377-383 (in Chinese)
陆文静, 何振立, 许建平, 等. 石灰性土壤难溶态磷的微生物转化和利用[J]. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(4): 377-383
- [3] Gao XB, Lu LP. New Type of Fertilizer Application Technique[M]. Jinan: Shandong Science and Technology Publishing House, 1997: 72-73 (in Chinese)
高贤彪, 卢丽萍. 新型肥料施用技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1997: 72-73
- [4] Lai L, Hao MD, Peng LF. Development of researches on soil phosphorus[J]. Research of Soil and Water Conservation, 2003, 10(1): 65-67 (in Chinese)
来璐, 郝明德, 彭令发. 土壤磷素研究进展[J]. 水土保持研究, 2003, 10(1): 65-67
- [5] Chen Q, Zhang WX, Zhao H, et al. Advance in research and application of some functional microbes in bio-organic fertilizer[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2010, 16(2): 294-300 (in Chinese)
陈谦, 张维新, 赵海, 等. 生物有机肥中几种功能微生物的研究及应用概况[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(2): 294-300
- [6] Jiang XM, Xia XH, Yu XH, et al. Effects of phosphorus-dissolving microbes fertilizer on growth of eggplant and utilization of available phosphorus in soil in the vinyl tunnel[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2012, 39(6): 685-688 (in Chinese)
蒋欣梅, 夏秀华, 于锡宏, 等. 微生物解磷菌肥对大棚茄子生长及土壤有效磷利用的影响[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2012, 39(6): 685-688
- [7] Hao J, Hong JP, Liu B, et al. Different phosphate solubilizing bacteria research on the effects of growth and yield of pea[J]. Crops, 2006, 22(1): 73-76 (in Chinese)
郝晶, 洪坚平, 刘冰, 等. 不同解磷菌群对豌豆生长和产量影响的研究[J]. 作物杂志, 2006, 22(1): 73-76
- [8] Hu XF, He YS, Yue N, et al. Effects of different phosphate solubilizing bacteria bio-fertilizers on growth of maize seedling and available phosphorus concentration in soil[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2012(11): 74-77 (in Chinese)
胡晓峰, 何元胜, 岳宇, 等. 不同溶磷菌生物有机肥对玉米苗期生长和土壤磷养分的影响[J]. 湖南农业科学, 2012(11): 74-77
- [9] Zhong CQ, Huang WY. Effects and mechanism of P-solubilizing bacillus P17 strain on phosphorus solubilization of different phosphate rocks[J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(6): 931-937 (in Chinese)
钟传青, 黄为一. 磷细菌 P17对不同来源磷矿粉的溶磷作用及机制[J]. 土壤学报, 2004, 41(6): 931-937
- [10] Wang YQ, Yang CD, Wang Y, et al. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata*[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 101-109 (in Chinese)
王玉琴, 杨成德, 王颖, 等. 针茅内生细菌菌株265ZY4的鉴定及其生物学功能[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 101-109
- [11] Yu X, Liu X, Zhu TH, et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(4): 437-446
- [12] Huang J, Sheng XF, He LY. Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth-promoting endophytic bacteria of two crops[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(6): 710-716 (in Chinese)
黄静, 盛下放, 何琳燕. 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 710-716
- [13] Luan LY. Study on screening and solubilizing mechanism of organic-phosphorus solubilizing bacteria from the rhizosphere soil of grapevine[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest Agriculture and Forestry University, 2009 (in Chinese)
栾丽英. 葡萄根际高效溶有机磷细菌的筛选及其溶磷特性初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009
- [14] Yang H, Fan BQ, Gong MB, et al. Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain P21[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(1): 51-56 (in Chinese)
杨慧, 范丙全, 龚明波, 等. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 51-56
- [15] Liu YH, Wu YX, Yang SC, et al. Screening of phosphorus-solubilizing strain *Burkholderia cenocepacia* and optimizing of phosphate-dissolving culture condition[J]. Journal of South China Agricultural University, 2015, 36(3): 78-82 (in Chinese)
刘云华, 吴毅歆, 杨绍聪, 等. 洋葱伯克霍尔德德溶磷菌的筛选和溶磷培养条件优化[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 78-82
- [16] Li GE, Wu XQ. Study on enzymology characteristics of phytase secreted by efficient phytate-degrading rhizobacteria *Rahnella aquatilis* JZ-GX1[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2014, 34(3): 90-93, 116 (in Chinese)
李桂娥, 吴小芹. 高效植酸盐降解细菌水拉恩氏菌 JZ-GX1的植酸酶特性研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 34(3): 90-93, 116
- [17] Vyas P, Joshi R, Sharma KC, et al. Cold-adapted and rhizosphere-competent strain of *Rahnella* sp. with broad-spectrum plant growth-promotion potential[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(12): 1724-1734
- [18] Zhao XR, Lin QM, Li BG. The relationship between rock phosphate solubilization and pH and organic acid production of microorganisms[J]. Journal of Microbiology, 2003, 23(3): 5-7 (in Chinese)
赵小蓉, 林启美, 李保国. 微生物溶解磷矿粉能力与 pH 及分泌有机酸的关系[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 5-7
- [19] Rashid M, Khalil S, Ayub N, et al. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2004, 7(2): 187-196
- [20] Qiao ZW, Hong JP, Xie YH, et al. Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of *Rahnella* sp. Phosphate-solubilizing bacteria in calcareous soil[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(8): 2294-2300 (in Chinese)
乔志伟, 洪坚平, 谢英荷, 等. 石灰性土壤拉恩氏溶磷细菌

- 的筛选鉴定及溶磷特性[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2294-2300
- [21] Wang Q, Zhang YF, Chen XM. The distribution of carbohydrate in forest soil organic matter of cold water nature reserve[J]. Journal of Heilongjiang Vocational Institute of Ecological Engineering, 2011, 24(3): 28-30 (in Chinese)
王强, 张玉峰, 陈晓梅. 凉水自然保护区森林土壤有机质中糖类的分布[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报, 2011, 24(3): 28-30
- [22] Xia YF, Zhang WH, Wang R, et al. Effect of soil organic nutrition matter on yield and quality of Fuji apple[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19(4): 868-877 (in Chinese)
夏燕飞, 张文会, 王荣, 等. 土壤有机营养对“红富士”苹果果实产量和品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(4): 868-877
- [23] Xi LQ, Wang JF, Ma JP, et al. Determination for solubilizing phosphate ability and organic acids secretion of phosphobacteria in the cotton rhizosphere[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 70-74 (in Chinese)
席琳乔, 王静芳, 马金萍, 等. 棉花根际解磷菌的解磷能力和分泌有机酸的初步测定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 70-74
- [24] Lin QM, Zhao XR, Sun YX, et al. Interaction between cellulose-decomposing microorganisms and inorganic phosphobacteria[J]. Chinese Journal of Ecology, 2001, 20(3): 69-70 (in Chinese)
林启美, 赵小蓉, 孙炎鑫, 等. 纤维素分解菌与无机磷细菌的相互作用[J]. 生态学杂志, 2001, 20(3): 69-70
- [25] Sun CX, Chen LJ, Wu ZJ. Persistence of Bt toxin in soil and its effects on soil phosphatase activity[J]. Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(5): 761-765 (in Chinese)
孙彩霞, 陈利军, 武志杰. Bt 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2004, 41(5): 761-765
- [26] Chen YP, Rekha PD, Arun AB, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 34(1): 33-41
- [27] Yi YM, Huang WY, Ge Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1059-1065
- [28] Zhao XR, Lin QM, Li BG. Effect of C, N sources and C/N ratio on the solubilization of rock phosphate by some microorganisms[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2002, 8(2): 197-204 (in Chinese)
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
- [29] Xiao CQ, Chi RA, Huang XH, et al. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines[J]. Ecological Engineering, 2008, 33(2): 187-193
- [30] Dixon-Hardy JE, Karamushka VI, Gruzina TG, et al. Influence of the carbon, nitrogen and phosphorus source on the solubilization of insoluble metal compounds by *Aspergillus niger*[J]. Mycological Research, 1998, 102(9): 1050-1054
- [31] Tang L, He XB, Lin YH, et al. Algicidal effect of four kinds of white-rot fungi on *Microcystis aeruginosa* under different exogenous conditions[J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 478-488 (in Chinese)
唐黎, 何兴兵, 林永慧, 等. 不同外源条件对4种白腐真菌溶藻效果的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 478-488
- [32] Yu WB, Yang XM, Shen QR, et al. Mechanism on phosphate solubilization of *Pseudomonas* sp. K₃ and its phosphate solubilization ability under buffering condition[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(2): 354-361 (in Chinese)
虞伟斌, 杨兴明, 沈其荣, 等. K₃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
- [33] Jiao ZW, Wu WL, Guo YB. Effect of glucose dehydrogenase on mineral phosphate solubilization with different carbon sources in *Rahnella aquatilis* HX2[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(2): 268-274 (in Chinese)
焦子伟, 吴文良, 郭岩彬. 不同碳源条件下 GDH 对植物促生菌 HX2 溶解无机磷影响的研究[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(2): 268-274
- [34] Liu WG, He YQ, Zhang K, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 326-333 (in Chinese)
刘文干, 何圆球, 张坤, 等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 326-333
- [35] He MX, Gao Y, Hu ZX, et al. Screening, identification, and phosphate-solubilizing capability of phosphate-solubilizing bacterial strain B25[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(1): 235-239 (in Chinese)
贺梦醒, 高毅, 胡正雪, 等. 解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. 应用生态学报, 2012, 23(1): 235-239
- [36] Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(5): 655-665
- [37] Park JH, Bolan N, Megharaj M, et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185(2/3): 829-836
- [38] Behbahani M. Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 124(3): 393-399
- [39] Fang TT, Deng GF, Liu HZ, et al. Filtration and identification of the bacteria for decomposing phosphorite powder[J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities (Natural Science Edition), 2010, 28(1): 30-32 (in Chinese)
方亭亭, 邓桂芳, 刘华中, 等. 一株磷矿粉分解细菌的筛选与鉴定[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2010, 28(1): 30-32
- [40] Patel DK, Archana G, Kumar GN. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. dhrrs in the presence of different sugars[J]. Current Microbiology, 2008, 56(2): 168-174
- [41] Reyes I, Bernier L, Simard RR, et al. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 28(3): 281-290
- [42] Agnihotri VP. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1970, 16(9): 877-880