菜豆根瘤菌对土壤无机磷的活化释放作用*

张　亮　黄建国†
（西南大学资源环境学院，重庆　400716）

摘　要　以土壤为磷源，通过液体培养研究了 7 株菜豆根瘤菌（*Rhizobium* sp.）对土壤磷的利用。结果表明，菜豆根瘤菌能释放大量的氢离子，使液体培养基的 pH 大幅度降低，氢离子的浓度至少提高 20 倍以上。根瘤菌分泌有机酸的种类与数量因菌株不同而异，这些有机酸包括甲酸、乙酸、草酸、丁二酸、柠檬酸、苹果酸和乳酸等，大部分根瘤菌能分泌乙酸。在接种根瘤菌的液体培养基中，全磷含量显著高于不接种的液体培养基，土壤无机磷总量则显著降低。由于土壤是培养基磷的唯一来源，故根瘤菌可促进土壤无机磷的溶解释放。相关分析表明，培养基的 pH 与土壤无机磷总量呈极显著正相关（$r = 0.893^{**}$，$n = 8$），说明根瘤菌分泌的氢离子可能是溶解土壤无机磷的原因之一。接种根瘤菌显著降低土壤闭蓄态磷，土壤中的铁磷、铝磷和钙磷因菌株不同而降低，其原因可能与有机酸分泌的数量和种类有关。根瘤菌既能释放氢离子又可分泌多种有机酸的现象表明其活化土壤无机磷的方式具有多样性，可能有益于豆科植物利用不同形态的难溶性磷，使之适应各种不同的低磷土壤。

关键词　菜豆根瘤菌；土壤；磷
中图分类号　S154.3　　**文献标识码**　A

磷是植物生长发育的必需营养元素之一。大多数土壤的含磷量较低，且以难溶状态存在[1]。磷肥施入土壤之后，由于存在物理、化学、生物等多种固定过程，当季利用率通常只有施用量的 10%～20%[2]，活化利用土壤中的难溶性磷对于改善植物磷素营养有重要意义。微生物不同程度地参与土壤磷的活化，它们对土壤难溶性磷的溶解作用日益引起人们重视。

目前，有关微生物活化土壤难溶性磷的研究多局限在芽孢杆菌（*Bacillaceae*）、真菌和放线菌[3]。前苏联蒙金娜于 1935 年最早从土壤中分离出一株解磷的巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*），具有分解核酸和卵磷脂的能力[4]。Paul 和 Sundara Rao[5] 从豆科植物的根际分离得到多株芽孢杆菌，它们能溶解 $Ca_3(PO_4)_2$，其中巨大芽孢杆菌的溶磷能力最强。此外，某些真菌也具有溶解无机磷的能力，它们主要是链霉菌（*Streptomyces*）和 AM 真菌（Arbuscular mycorrhizal fungus）[6]。进一步的研究发现，溶磷微生物一般均能分泌有机酸，如甲酸、乙酸、柠檬酸和丁二酸等。在这些有机酸中，甲酸和乙酸的电离常数最大，能电离出氢离子，溶解氟磷灰石、氯磷灰石、羟磷灰石等磷酸钙盐，释放磷酸根[7-8]；高碳有机酸能与铁铝形成稳定络合物，进而溶解粉红磷铁矿、高磷铁矿石、水铝矿等铁铝磷酸盐[9-10]。就根瘤菌而言，其不仅具有固氮作用而且还能溶解磷矿粉和分解卵磷脂[11]，但有关研究相对较少，其溶磷机理尚待施入探讨。从多方面研究根瘤菌可以全面了解根瘤菌的作用，更好地应用于农业生产。

菜豆（如四季豆、拉巴豆等）是重庆市的主要豆科蔬菜和饲料作物。本文选用从当地土壤中分离获得的 7 株菜豆根瘤菌，研究了其对紫色土无机磷的溶解作用，目的是探索根瘤菌改善菜豆磷素营养的可能机理，多方面了解其生物学功能。

1　材料与方法

1.1　供试材料

菜豆根瘤菌［*Rhizobium* sp.（Phaseolus）］保存于西南大学资源环境学院微生物实验室，菌株是从菜豆属菜豆［*Phaseolus vulgaris* Linn.］植物根际周围

* 中央高校基本科研业务费专项 XDJK（2010D002）资助
† 通讯作者，E-mail：huang99@swu.edu.cn
作者简介：张　亮（1987—），男，安徽太和人，硕士，主要从事资源环境微生物方向研究。Tel：13500387976，E-mail：liangzai0061@126.com
收稿日期：2011－06－13；收到修改稿日期：2011－09－28

分离获取。取其中的 7 株为供试菌株，分别编号为 R－1、R－2、R－3、R－4、R－5、R－6 和 R－7。先将根瘤菌固体培养基蒸汽灭菌（121℃±1℃，30 min），冷却后分别接种供试菌株，30℃±1℃斜面培养 4 d。培养基组成为：蒸馏水 1 000 ml、琼脂 20 g、甘露醇 10 g、酵母粉 1.0 g、KH_2PO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、NaCl 0.1 g、$CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 g、微量元素液 4 ml（每 1 000 ml 含 H_3BO_3 5.0 g，Na_2MoO_4 5.0 g，dH_2O）、pH 6.8～7.2。然后，再接种至盛有 50 ml（KCl 代替 KH_2PO_4）的根瘤菌液体培养基中，摇床培养（28℃±1℃、128 r min^{-1}）3 d 备用。

供试土壤为侏罗纪紫色砂泥岩发育的灰棕紫泥。蒸汽灭菌后的土壤 pH 6.15、有机质 14.96 g kg^{-1}、全氮 1.07 g kg^{-1}、全磷 0.89 g kg^{-1}、全钾 16.32 g kg^{-1}、铝磷 70.36 μg g^{-1}、铁磷 29.87 μg g^{-1}、闭蓄态磷 214.8 μg g^{-1}、钙磷 279.0 μg g^{-1}、有效磷 20.01 mg kg^{-1}、速效钾 92.59 mg kg^{-1}。风干土壤，磨细过 100 目筛，取 1.000 0 g 土壤置于两端开口的直径为1 cm的塑料管中部，然后两端塞入玻璃纤维，将土壤夹在中间，再用微孔滤膜（孔径 0.22 μm）密封两端，121℃蒸汽灭 150 min 备用。在振荡培养根瘤菌时，将盛有土壤的塑料管放入液体培养基中，水分子、无机离子、低分子有机酸等均可顺利进出与土壤接触，而土壤又不会穿过玻璃纤维和滤膜而进入溶液，根瘤菌亦不能穿过玻璃纤维和滤膜进入土壤中。

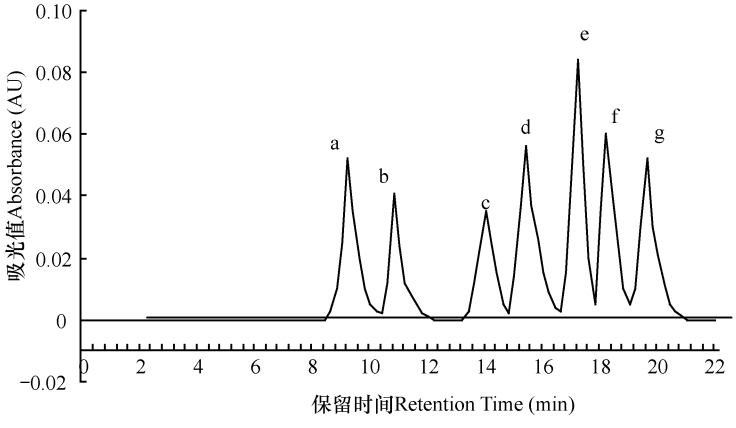
1.2　试验设计

取 250 ml 三角瓶，加入 50 ml KCl 代替 KH_2PO_4 的根瘤菌液体培养基，蒸汽灭菌（121℃±1℃，30 min），冷却。接入 1 ml1.1 节中制备的菌悬液，再加 1 个装有土壤的灭菌塑料管；不接种的液体培养基为对照，余同接种处理，重复 6 次。摇瓶培养（28℃±1℃、128 r min^{-1}）7 d，备测有关项。

1.3　测定项目与方法

将液体培养基摇匀，用 PHS-3C 精密酸度计测定 pH；取 10 ml 液体培养基用 H_2SO_4-H_2O_2 消化，钼蓝比色法测定消化液的含磷量；另取 20 ml 将液体培养基于 10 000 r min^{-1} 离心 8 min，钼蓝比色法测定上清液的无机磷含量。

利用高效液相色谱仪（日本 HITACHI 公司生产）测定液体培养基中的有机酸含量。色谱条件为：Diode Array L-7455 紫外检测器，Ion-300 有机酸分析专用柱（Phenomenex，Torrance，CA，USA），流动相：2.5 mmol L^{-1} 硫酸，流速：0.5 ml min^{-1}，进样量：20 μl 样液（样液先经硫酸酸化），紫外检测波长：210 nm，柱温：35℃，压力：450 psi。测定的有机酸包括草酸、柠檬酸、苹果酸、丁二酸、乳酸、甲酸、乙酸，其出峰时间依次为 9.20、10.83、14.06、15.36、17.03、18.09、19.65 min（图 1）。



a:草酸；b:柠檬酸；c:苹果酸；d:丁二酸；e:乳酸；f:甲酸；g:乙酸
a: oxalic acid; b: citric acid; c: malic acid; d: succinic acid; e: lactic acid;f: formic acid; g: acetic acid

图 1　有机酸的标准色谱图

Fig. 1　Standard chromatogram of organic acids

从塑料管中取出土壤，风干后用 Olsen 法提取，钼蓝比色法测定土壤中的有效磷含量[12]；土壤无机磷组分测定参照文献[13]。该方法将土壤无机磷分为：1 mol L^{-1} NH_4Cl 浸提疏松态磷，0.5 mol L^{-1} NH_4F 浸提 Al-P，0.1 mol L^{-1} NaOH 浸提 Fe-P，0.3 mol L^{-1} 柠檬酸钠＋1.0 g $Na_2S_2O_4$＋0.5 mol L^{-1} NaOH 浸提的闭蓄态磷（O-P），0.5 mol L^{-1}（1/2H_2SO_4）浸提 Ca-P。

1.4 数据处理

用 Excel 2003 对试验数据进行基本计算，SPSS 18.0进行统计分析，不同处理间的差异显著性用单因素方差分析进行比较，使用 Pearson 法进行双因素相关分析。

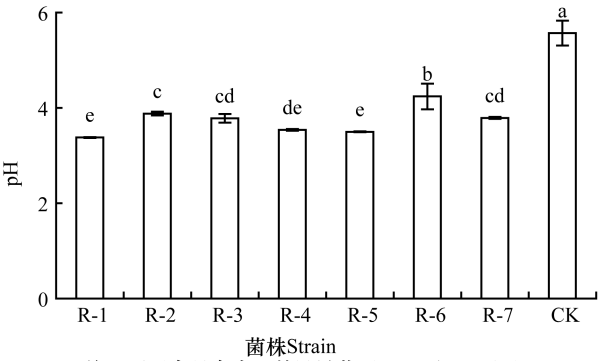
2 结果与分析

2.1 根瘤菌对培养基 pH 的影响

图 2 可见，培养 7 d 之后，液体培养基的 pH 显著低于对照（不接种），但菌株不同，液体培养基的 pH 降幅也不一样。接种 R－1 之后，液体培养基的 pH 为 3.38，降幅最大；接种 R－6，培液体养基的 pH 为 4.24，降幅最小；其余菌株培养基的 pH 介于 3.50 和 4.00 之间。

2.2 根瘤菌的有机酸分泌

试验检测了液体培养基中的甲酸、乙酸、草酸、乳酸、丁二酸、柠檬酸、苹果酸等 7 种有机酸（表 1）。在不接种的液体培养基中（对照），检测到草酸、苹果酸和柠檬酸。值得注意的是，根瘤菌不同菌株分泌有机酸的种类和数量也不一样。在接种 R-1、R-4、R-5 的液体培养基中，草酸含量显著高于对照，这 3 株根瘤菌能分泌草酸；在接种 R-1、R-4、R-5、R-6的液体培养基中，苹果酸含量显著高于对照，这 4 株根瘤菌能分泌苹果酸；在 R-4 和 R-6 的液体培养基中，柠檬酸含量高于对照，这 2 株根瘤菌能分泌柠檬酸。此外，大多数根瘤菌能分泌乙酸（R-2 除外），R-1、R-2、R-7 能分泌丁二酸；R-1、R-2、R-4、R-5 能分泌甲酸；R-4、R-5、R-6 能分泌乳酸。从 7 种有机酸的总量看，R-4 的分泌量最高，R-1 和 R-5 次之，R-6 和 R-7 居第三，R-2 和 R-3 最低。



注：不同字母者表示差异显著（$p<0.05$），下同；Note: Different letters mean significant difference at $p<0.05$. The same below

图 2 液体培养基的 pH 变化

Fig. 2 Variation of pH in liquid culture mediums

表 1 液体培养基中有机酸的含量

Table 1 Contents of organic acids in liquid culture mediums（μg ml^{-1}）

菌株 Strain	草酸 Oxalic acid	苹果酸 Malic acid	丁二酸 Succinic acid	甲酸 Formic acid	乙酸 Acetic acid	柠檬酸 Citric acid	乳酸 Lactic acid	总量 Total content
R-1	91.66a	40.01b	9.01a	13.32a	2.95b	49.07c	ND	206.0b
R-2	39.09c	15.38cd	13.90a	8.27a	ND	ND	ND	76.64d
R-3	41.73c	15.14cd	ND	ND	18.83a	ND	ND	75.70d
R-4	76.79b	50.68a	ND	12.86a	3.03b	99.03a	20.17b	262.6a
R-5	64.94b	43.15a	ND	13.46a	3.35b	43.17c	29.42a	197.5b
R-6	34.78c	20.50c	ND	ND	1.08b	72.68b	11.41c	140.5c
R-7	40.03c	10.90d	9.71a	ND	18.53a	43.30c	ND	122.5c
CK	30.55c	10.59d	ND	ND	ND	40.45c	ND	81.59d

注：在同一列中，有不同字母者表示差异显著（$p<0.05$），下同；ND 表示未检测出 Note: In each column, data followed by different letters are significantly different at $p<0.05$. The same below; ND indicates not detected

2.3 培养基中磷的形态与含量

表 2 可见，培养 7 d 之后，液体培养基中的无机磷含量因菌株不同而异。在接种 R－4 和 R－1 的液体培养基中，无机磷含量显著高于对照组，分别较对照提高 20.50% 和 18.96%；其余菌株培养基中的无机磷含量与对照相似，变化于 4.60～5.63 μg ml^{-1}之间。

除接种 R-3 之外，液体培养基中的全磷含量显著高于对照，较对照提高 14.01%～31.08%，但接种不同菌株之间无显著差异，变化于 18.66～21.89 μg ml^{-1}之间。

培养基中的全磷减无机磷等于有机磷，主要存在于根瘤菌细胞中（简称根瘤菌细胞磷）。接种 R-2、R-5、R-6 和 R-7 之后，液体培养基中的有机磷

显著高于对照，分别提高了 29.43%、41.15%、30.82% 和 28.91%；但接种 R-1、R-3 和 R-4 之后，液体培养基中的有机磷尽管较对照有所增加，但差异未达显著水平，变化于 12.81 ~ 13.19 μg ml^{-1}之间。

表 2　根瘤菌培养液中的磷形态与含量

Table 2　Forms and contents of phosphorus in the liquid culture mediums inoculated with *Rhizobium* (μg ml^{-1})

菌株 Strain	无机磷 Inorganic phosphorus	有机磷 Organic phosphorus	全磷 Total phosphorus
R-1	6.15a	13.08bcd	19.23a
R-2	4.60b	14.91abc	19.51a
R-3	5.47ab	13.19bcd	18.66ab
R-4	6.23a	12.81cd	19.04a
R-5	5.63ab	16.26a	21.89a
R-6	4.71b	15.07abc	19.78a
R-7	4.61b	14.85abc	19.46a
CK	5.17b	11.52d	16.70b

2.4　土壤无机磷组分及有效磷含量

培养 7 d 之后，土壤无机磷组分及含量见表 3。在液体培养基中接种根瘤菌，土壤铝磷、铁磷、钙磷和闭蓄态磷不同程度地降低。其中，除 R-4 之外，6 株根瘤菌显著降低土壤中的铝磷，降幅变化于 13.46% ~ 34.51% 之间。除 R-4 和 R-6 之外，5 株根瘤菌显著降低土壤中的铁磷，降幅变化于 9.80% ~ 15.54% 之间。接种菌株均显著降低土壤中的闭蓄态磷，降幅变化于 30.75% ~ 51.43% 之间。除 R-3 和 R-6 外，其余 5 株根瘤菌显著降低土壤中的钙磷，降幅变化于 15.33% ~ 26.90% 之间。从土壤无机磷总量看，根瘤菌都能显著降低土壤中的无机磷总量，降幅变化于 18.45% ~ 33.76% 之间，接种 R-5 降幅最大，接种 R-3 降幅最低，其余菌株介于二者之间。

土壤有效磷的含量因根瘤菌菌株不同而异。与不接种相比，R-1 和 R-4 显著增加土壤有效磷含量，培养 7 d 后分别增加了 17.01% 和 23.64%，其余菌株土壤中的有效磷与对照相似。

表 3　土壤中无机磷组分及有效磷的变化

Table 3　Variations of the fractions of inorganic phosphorus and available phosphorus in the soil (μg g^{-1})

菌株 Strains	铝磷 Al-P	铁磷 Fe-P	闭蓄态磷 O-P	钙磷 Ca-P	无机磷总量 Total inorganic P	有效磷 Available phosphorus
R-1	59.40bc	26.32bc	142.8b	219.1cd	447.6bc	28.41a
R-2	59.35bc	26.59bc	144.1b	218.7cd	448.8bc	24.65b
R-3	44.95d	26.32bc	140.2b	268.1ab	479.5b	24.51b
R-4	64.27ab	28.16ab	102.4b	226.2cd	421.1cd	30.02a
R-5	56.05bc	24.90c	104.6b	203.9d	389.5d	27.33ab
R-6	56.00bc	27.40abc	115.1b	249.8abc	448.3bc	23.90b
R-7	54.29c	26.50bc	146.0b	236.2bcd	463.0b	23.61b
CK	68.64a	29.48a	210.9a	278.9a	587.9a	24.28b

2.5　各因素的相关分析

表 4 可见，培养液中的 pH 与铁磷、闭蓄态磷、钙磷和土壤无机磷总量呈显著或极显著正相关，相关系数分别为 0.766*、0.801*、0.758*、0.893** ($n = 8$)。根瘤菌的草酸分泌量与有机酸分泌总量呈极显著正相关($r = 0.847^{**}$, $n = 8$)。

表 4 试验各因素的相关系数

Table 4 Correlation coefficients among experimental factors

磷形态 Phosphorus Forms	铝磷 Al-P	铁磷 Fe-P	闭蓄态磷 O-P	钙磷 Ca-P	无机磷总量 Total inorganic P	草酸 Oxalic acid	有机酸总浓度 TOA	pH
铝磷 Al-P	1.000							
铁磷 Fe-P	0.676	1.000						
闭蓄态磷 O-P	0.364	0.566	1.000					
钙磷 Ca-P	-0.026	0.655	0.653	1.000				
无机磷总量 Total inorganic P	0.342	0.736*	0.944**	0.849**	1.000			
草酸 Oxalic acid	0.138	-0.309	-0.459	-0.636	-0.548	1.000		
有机酸总浓度 TOA	0.275	-0.130	-0.645	-0.603	-0.623	0.847**	1.000	
pH	0.487	0.766*	0.801*	0.758*	0.893**	-0.668	-0.553	1.000

注:TOA = Total organic acids; *, ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上相关性达到显著水平 Note: *, ** show that correlations are significant at the 0.05 and 0.01 level, respectively

3 讨 论

液体培养基中的全磷包括无机磷和有机磷,后者主要存在根瘤菌细胞中(简称根瘤菌细胞磷)。在根瘤菌液体培养基中,各接种处理全磷含量均显著高于对照;大部分处理根瘤菌细胞磷含量显著增加;部分处理无机磷含量显著增加。与此同时,土壤无机磷总量(铁磷、铝磷、闭蓄态磷、钙磷四者之和)则显著降低。由于土壤磷是培养基中磷的唯一来源,说明根瘤菌可促进土壤磷的溶解释放,以无机磷或根瘤菌细胞磷的形式存在于液体培养基中。值得注意的是,在根瘤菌的液体培养基中,各处理土壤闭蓄态磷均显著降低。磷酸盐颗粒表面包闭铁铝氧化物后形成闭蓄态磷,一般难于被植物吸收利用[14-15],说明根瘤菌具有活化土壤无效磷的作用,这可能是菜豆等豆科植物利用难溶性磷能力较强的原因之一。此外,根瘤菌菌株不同,土壤中的钙磷、铁磷、铝磷发生不同程度地降低,说明根瘤菌利用土壤不同形态的无机磷因菌株不同而异。在接种 R-1 和 R-4 的处理中,土壤有效磷含量显著增加;而在接种其余菌株的处理之中,土壤有效磷含量无显著变化,进一步说明根瘤菌菌株不同活化无机磷的能力也不一样。

研究表明,磷细菌在溶解无机磷酸盐的过程中,能分泌草酸、柠檬酸、琥珀酸、甲酸、丙酸等多种有机酸,从而活化土壤中的难溶性磷,提高有效磷的含量[16]。也有学者认为,微生物的溶磷作用可能与质子分泌有关,使介质 pH 降低,从而溶解磷酸盐。*Penicilliumauran tiosriseunrl* 和 *Pseudom onas* sp. 能够溶解羟磷灰石和氯磷灰石等无机磷酸盐,其机制不是生成有机酸,而是通过呼吸作用或 NH_4^+ 同化产生的质子,溶解难溶性的无机磷[17]。Wallander[18] 曾报道,溶磷微生物能通过呼吸作用释放 CO_2,降低其周围的 pH,溶解磷酸盐。*Penicillium radicum* 不仅促进小麦生长,而且还能溶解 $CaHPO_4$、$Ca_3(PO_4)_2$、$FePO_4 \cdot 4H_2O$、$AlPO_4$ 等,其机理是分泌葡萄糖酸等有机酸,既能降低 pH,又能螯合 Al^{3+}[19]。在本试验中,绝大多数根瘤菌均能分泌乙酸(R-2 除外),因菌株不同分泌草酸、甲酸、柠檬酸、乳酸、丁二酸和苹果酸,说明它们的溶磷机理可能有所差异。需要指出的是,由于草酸(HOOC-COOH)中的两个羧基的电子互相吸引,产生共轭作用,其酸度约是甲酸的 100 倍,乙酸的 1 000 倍;乙酸也属于较强的有机酸,其电离常数为 1.8×10^{-5} (25℃),大于碳酸(4.3×10^{-7})100 倍,它们电离产生的氢离子有益于钙镁磷酸盐溶解。

供试根瘤菌均大幅度降低液体培养基的 pH,至少降低了 1.33 个单位,即氢离子浓度增加了约 20 倍。但是,接种根瘤菌之后,液体培养基中的有机酸最高仅增加 2.22 倍(R-4),说明根瘤菌分泌氢离子的数量远远超过所有有机酸离解产生的氢离子。相关分析表明,培养基的 pH 与土壤无机磷总量呈极显著正相关($r = 0.893^{**}$, $n = 8$),溶解钙镁磷酸

盐的机理还可能与根瘤菌细胞的质子分泌有关。这是因为在酸性条件下，钙镁磷酸盐溶解度提高。但是，溶解铝磷、铁磷和闭蓄态磷可能与有机酸分泌有关，因为柠檬酸和草酸络合 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 的能力极强，并且 Fe^{3+}、Al^{3+} 分别和柠檬酸、草酸的 $\log K_{稳}$ 最低为 7.26，最高达到 25.00[20]。其中，$[Al(C_2O_4)_3]^{3-}$ 和 $[Fe(C_2O_4)_3]^{3-}$ 的稳定常数分别为 2.0×10^{16} 和 3.9×10^{16}。所以，草酸能络合铁铝磷酸盐和铁铝氧化物胶膜中的 Al^{3+}、Fe^{3+}，导致铁铝磷酸盐和闭蓄态磷释放，提高生物有效性[21]。溶磷菌在生长过程中分泌大量的柠檬酸、草酸和乳酸等有机酸，是溶解铝磷和铁磷的主要原因[22-23]。因此，供试根瘤菌与大多数磷细菌一样，均能分泌有机酸，产生相似溶磷机理。除此之外，根瘤菌还能直接分泌氢离子，直接溶解钙镁磷酸盐。因此，根瘤菌兼具分泌氢离子和多种有机酸的能力，以多种方式活化土壤不同形态的无机磷，可能使相应的豆科植物适应多种不同低磷土壤。Shen 等[24]报道，在低磷环境中，豆科植物的根系能分泌氢离子和多种有机酸，从而获得土壤中的无机磷，根际 pH 的变化与土壤的缓冲能力、微生物的活动和植物的基因型有关[25-26]。Ding 等[27]发现菌根真菌与根瘤菌在促进大豆根际酸化的过程中具有协同效应，根瘤与菌丝周围酸化情况均不同程度的增加。在本试验中，根瘤菌能分泌大量的氢离子和有机酸，推测豆科植物根系分泌氢离子和有机酸部分来源于根瘤，根瘤可能参与了土壤无机磷的活化作用。并且通过微生物间的协同作用，增强豆科植物根际酸化程度，有益于豆科植物利用不同形态的无机磷，使之适应不同的低磷环境。

总之，根瘤菌除固氮之外，还能活化土壤中的无机磷，它们对土壤闭蓄态磷、铝磷、铁磷、钙磷的活化能力因菌株不同而异，根瘤菌活化土壤无机磷的机理具有多样性。培养基中的 pH 降低可能是根瘤菌能利用土壤钙镁磷酸盐的原因之一；分泌有机酸有益于铁磷、铝磷和闭蓄态磷的溶解释放。

参 考 文 献

[1] 唐勇，陆玲，杨启银，等．一株磷细菌发酵条件的研究．南京师范大学报：自然科学版，2001，24(1)：83—87. Tang Y, Lu L, Yang Q Y, et al. Studies on the fermentation condition about a kind of phosphate-solubilizing bacterium (In Chinese). Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition, 2001, 24(1): 83—87

[2] 程明芳，何萍，金继运．我国主要作物磷肥利用率的研究进展．作物杂志，2010(1)：12—14. Cheng M F, He P, Jin J Y. Advance of phosphate recovery rate in Chinese main crops (In Chinese). Crops, 2010(1): 12—14

[3] 李剑峰，张淑卿，师尚礼，等．解磷根瘤菌液体培养基类型，浓度及透气条件的比较．草原与草坪，2010，30(1)：28—32. Li J F, Zhang S Q, Shi S L, et al. Ventilation conditions on phosphorus-dissolving *Rhizobia* (In Chinese). Grassland and Turf, 2010, 30(1): 28—32

[4] 王义，贺春萍，郑肖兰，等．土壤解磷微生物研究进展．安徽农学通报，2009，15(9)：60—64. Wang Y, He C P, Zheng X L, et al. Research progress of phosphate-solubilizing microorganisms in soil (In Chinese). Auhui Agricultural Science Bulletin, 2009, 15(9): 60—64

[5] Paul N B, Sundara Rao W V. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphereof some cultivated hegumes. Plant and Soil, 1971, 35: 127—132

[6] 石璟，刘兆辉，江丽华，等．一株解磷真菌的解磷能力及其生长曲线研究．安徽农业科学，2008，36(22)：9 363—9 364，9 371. Shi J, Liu Z H, Jiang L H, et al. Study on phosphate-dissolving ability of one phosphate solubilizing fungi and its growth curve (In Chinese). Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(22): 9 363—9 364, 9 371

[7] Whitelaw M A, Harden T J, Bender G L. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. Australian Journal of Soil Research, 1997, 35(2): 291—300

[8] Banik S, Dey B K. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. Plant and Soil, 1982, 69(3): 353—364

[9] Hu H Q, Tang C X, Rengel Z. Role of phenolics and organic acids in phosphorus mobilization in calcareous and acidic soils. Journal of Plant Nutrition, 2005, 28(8): 1 427—1 439

[10] Feng K, Lu H, Sheng H, et al. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils. Pedosphere, 2004, 14(1): 85—92

[11] 张希涛，康丽华，马海宾，等．具有解磷能力的相思根瘤菌的筛选．林业科学研究，2008，21(5)：619—624. Zhang X T, Kang L H, Ma H B, et al. Selection of acacia rhizobium which have the ability to dissolve phosphorus (In Chinese). Forest Research, 2008, 21(5): 619—624

[12] 杨剑虹，王成林，代亨林．土壤农化分析与环境监测．北京：中国大地出版社，2008. Yang J H, Wang C L, Dai H L. Soil agro-chemistry analysis and environmental monitoring (In Chinese). Beijing: Earth Press of China, 2008

[13] 鲍士旦．土壤农化分析．北京：中国农业出版社，2000. Bao S D. Soil and agro-chemistry analysis (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2000

[14] Pheav S, Bell R W, Kirk G J D, et al. Phosphorus cycling in rainfed lowland rice ecosystems on sandy soils. Plant and Soil, 2005, 269: 89—98

[15] 丁怀香，宇万太．土壤无机磷分级及生物有效性研究进展．土壤通报，2008，39(3)：681—686. Ding H X, Yu W T. Review on soil inorganic-P fractionation and the influential factors

on P bioavailability (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2008, 39(3): 681—686

[16] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 2006, 34: 33—41

[17] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27(3): 257—263

[18] Wallander H. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil, 2000, 218: 249—256

[19] Whitelaw M A, Harden T J, Helyar K R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31: 655—665

[20] 宋金凤, 宋利臣, 崔晓阳,等. 低分子有机酸/盐对森林暗棕壤铁的释放效应. 土壤通报, 2008,39(2): 315—320. Song J F, Song L C, Cui X Y, et al. Effects of low molecular weight organic acids/salts on iron release of dark brown forest soil (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 2008,39(2): 315—320

[21] 龚松贵, 王兴祥, 张桃林,等. 低分子量有机酸对红壤无机磷活化的作用. 土壤学报, 2010, 47(4): 692—697. Gong S G, Wang X X, Zhang T L, et al. Release of inorganic phosphorus from red soils induced by low molecular weight organic acids (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(4): 692—697

[22] 李育彪, 龚文琪, 皮科武,等. 溶磷菌在高磷铁矿石除磷技术中的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(13): 6 825—6 827. Li Y B, Gong W Q, Pi K W, et al. Research progress on dephosphorization of dhosphate-solubilizing microorganism in high phosphorus iron ore (In Chinese). Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(13): 6 825—6 827

[23] Hinsinger P, Gobran G R, Gregory P J, et al. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytol, 2005, 168: 293—303

[24] Shen J B, Yuan L X, Zhang J L, et al. Phosphorus dynamics: From soil to plant. Plant Physiology, 2011, 156: 997—1 005

[25] Raghothama K G. Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 665—693

[26] Vance C P, Uhde-Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytol, 2003, 157: 423—447

[27] Ding X D, Sui X H, Wang F, et al. Synergistic interactions between *Glomus mosseae* and *Bradyrhizobium japonicum* in enhancing proton release from nodules and hyphae. Mycorrhiza, 2012, 22: 51—58

EFFECT OF *RHIZOBIUM PHASEOLI* ON MOBILIZATION AND RELEASE OF INORGANIC PHOSPHORUS IN SOIL

Zhang Liang Huang Jianguo†

(*College of Resources and Environment*, *Southwest University*, *Chongqing* 400716, *China*)

Abstract Seven strains of *Rhizobium* sp. were cultured in liquid mediums using soil as the sole source for phosphorus to investigate effect of the strains on mobilization and release of phosphorus in soil. The control treatment was set in the same way except inoculation of *Rhizobia*. Results suggest that the bacteria released a large amount of hydrogen ions, thus making the concentration of the ions multiplied by at least 20 times, which resulted in a significant decrease in pH of the solution. Different strains of *Rhizobia* released different types and amounts of organic acids, including oxalic acid, malic acid, succinic acid, formic acid, acetic acid, citric acid and lactic acid. However, most of the strains exuded acetic acid. The treatments were significantly higher than the control in total phosphorus in the liquid culture mediums, while the total inorganic phosphorus in the soil immersed in the liquid behaved otherwise. Taking into account the soil being the sole phosphorus source, it could be concluded that *Rhizobia* could promote mobilization and release of inorganic phosphorus from the soil. Correlation analysis shows that total phosphorous was extremely positively related to pH of the liquid ($r = 0.893^{**}$, $n = 8$), suggesting that the secretion of hydrogen ions from the bacteria is one of the causes for dissolution of inorganic phosphorus in soil. Inoculation of *Rhizobia* reduced occluded phosphorus in the soil remarkably, and also Al-P, Fe-P and Ca-P but to an extent varying with the stains of *Rhizobia*, which might be attributed to the different amounts and types of organic acids they could secret. The phenomenon of *Rhizobia* releasing hydrogen ions and a variety of organic acids suggests that inorganic phosphorus in the soil is mobilized in a number of ways, which demonstrates that inoculation of *Rhizobia* may help legume crops make use of various forms of unavailable phosphorus in the soil, thus making them adapted to different soils low in phosphorus.

Key words *Rhizobium phaseoli*; Soil; Phosphorus