白旭皓,杨　洋,董永华,等. 糖酸类化合物的解磷机理研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):269 – 275.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2020.09.051

糖酸类化合物的解磷机理研究

白旭皓[1,2], 杨　洋[1,2], 董永华[3], 廖鲜艳[1], 郝　健[2]
(1. 上海大学生命科学学院,上海 200444;2. 中国科学院上海高等研究院,上海 201210;3. 上海市农产品质量安全中心,上海 200335)

摘要:葡萄糖酸、木糖酸和 2 – 酮基葡萄糖酸等糖酸类化合物是生物解磷中的重要化学物质,但是其解磷机制尚不完全清楚。为了全面解析这一机制,利用克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)发酵法制备糖酸化类合物,并测定糖酸类化合物与钙、镁离子形成配合物的规律。将钙、镁离子与糖酸类化合物配制成不同比例的溶液,利用离子电极测定溶液中游离钙、镁离子的浓度。结果表明,糖酸类化合物可以与钙、镁离子形成稳定的配合物,从而明显降低溶液中游离钙、镁离子的浓度;乙酸、乳酸等有机酸不与钙、镁离子形成稳定的配合物;葡萄糖酸根、2 – 酮基葡萄糖酸根、木糖酸根与钙离子形成的配合物的稳定常数分别为 66.1、109.7、19.2 L/mol,与镁离子形成的配合物的稳定常数分别为 106.3、161.2、23.8 L/mol;与纯水相比,用 4.84×10^{-1} mol/L 葡萄糖酸钠、木糖酸钠、2 – 酮基葡萄糖酸钠水溶液溶解磷酸钙,磷酸根质量浓度从 14.4 mg/L 分别提高到 204.6、238.9、82.0 mg/L;用 4.84×10^{-1} mol/L 葡萄糖酸钠、木糖酸钠、2 – 酮基葡萄糖酸钠水溶液溶解磷酸镁,磷酸根质量浓度从 18.3 mg/L 分别提高到 318.7、1034.4、207.6 mg/L。以土壤为样品的试验结果表明,糖酸类化合物同样具有提高磷酸根质量浓度的效果。由研究结果可以看出,配合作用是糖酸类化合物解磷的重要机制,糖酸类化合物有望成为高效解磷剂。

关键词:葡萄糖酸;2 – 酮基葡萄糖酸;木糖酸;磷酸钙;磷酸镁;解磷机理
中图分类号:S13　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2020)09 – 0269 – 07

磷是植物生长中不可或缺的三大元素之一[1],是植物体内结构化合物的重要组成元素,可参与细胞的物质运输、信息交流和能量交换等生命活动,如果在植物生长过程中缺少磷元素,会影响细胞的分裂增殖和其他生命活动[2]。磷具有极强的化学反应性,使得土壤中的磷元素多以难溶性磷酸盐的形式存在,导致磷在农业生产中普遍缺乏[3]。施用可溶性磷酸盐是为植物提供磷的主要途径,但是由于磷酸根易与土壤中的钙、镁等其他金属离子形成难溶性化合物而固定在土壤中,降低了磷的使用效率。据统计,约有 80% 的磷肥最终转化为难溶性化合物而无法被植物吸收利用[4]。因此,减少磷的沉淀、增加土壤中有效磷的含量,成为农业生产中长期关注的研究热点。

研究发现,土壤中存在的细菌[5]、真菌[6]、放线菌[7]等多种微生物的代谢物可以将难溶性磷酸盐转化为可溶性形态。关于微生物的溶磷机制,主要有氢质子交换[8]、螯合理论[9]、磷酸酶蛋白理论[10]和氧化还原理论[11]。合成有机酸是微生物溶磷的重要化学基础,而具有合成葡萄糖酸、2 – 酮基葡萄糖酸能力的微生物通常具有优良的溶磷效果[12 – 15]。利用微生物溶解土壤中的难溶性磷酸盐不仅绿色可持续,而且成本较低,具有较高的应用价值。克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)属于肠杆菌科克雷伯氏菌属,广泛存在于水、植物、土壤及动物中,是重要的根际微生物[16 – 18]。该菌种生长繁殖速度快、代谢旺盛、代谢产物丰富,是一种重要的工业微生物[19]。克雷伯氏肺炎杆菌等微生物中存在 1 条直接氧化葡萄糖的途径,该途径位于细胞的周质空间,葡萄糖经过氧化形成葡萄糖酸,葡萄糖酸进一步氧化形成 2 – 酮基葡萄糖酸。在酸性条件下培养克雷伯氏肺炎杆菌,发现其发酵液中积累了大量 2 – 酮基葡萄糖酸[20]。此外研究发现,以葡萄糖酸脱氢酶失活突变株为生产菌株可以合成大量葡萄糖酸[21];以木糖为底物可以合成相应的木糖酸[22];以生物质水解液等为底物,可以获得葡萄糖酸和木糖酸的混合物。

不同于利用微生物进行解磷效果研究的工

收稿日期:2019 – 04 – 09
基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFE0112700)。
作者简介::白旭皓(1992—),男,陕西榆林人,硕士研究生,主要从事微生物代谢研究。E – mail:baixuhao@sari.ac.cn。
通信作者:郝　健,博士,副研究员,主要从事微生物代谢研究。Tel:(021)20325163;E – mail:haoj@sari.ac.cn。

作[23-25]，本研究利用克雷伯氏肺炎杆菌发酵法制备糖酸类化合物，对糖酸类化合物与钙离子、镁离子形成的配合物进行研究，根据图 1 的解磷机制（糖酸根离子与钙离子形成配合物，减少了游离钙离子，进而使磷酸钙溶解平衡向右移动，使磷酸根的溶解度增大），测定配合物的稳定常数，以定量确定这些糖酸类化合物通过与金属离子形成配合物进而溶解磷的机制。

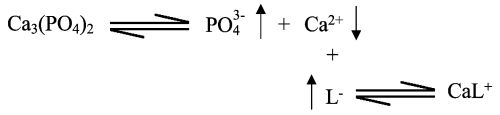


图1　糖酸类化合物与钙离子形成配合物进而解磷的机制

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

土壤取自上海市浦东新区海科路川洋河畔，除去表层垂直厚度约为 5 cm 的土壤，并除去植物残根、石块等杂物，用洁净的塑料袋储存。2－酮基葡萄糖酸钠和木糖酸钠由笔者所在实验室发酵制备；其他化学试剂均为分析纯商业产品。

1.2　主要仪器

pH 电位计，德国赛多利斯；小型高速离心机、高速离心机，德国 Eppendorf；ZWY－2102C 恒温振荡摇床，上海智城分析仪器制造有限公司；PXS－270 型离子计、钙离子电极，雷磁上海仪电科学仪器股份有限公司；ZDP－A2160A 全自动新型电热培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；Biostat A Plus 发酵罐，德国赛多利斯。

1.3　糖酸钠盐的制备

以笔者所在实验室已经构建的菌株 *K. pneumoniae*－ΔbubA 为生产菌株，采用 5 L 发酵罐，以两段法发酵制备 2－酮基葡萄糖酸[26]。在第 1 阶段，搅拌桨转速为 500 r/min，发酵温度为 37.0 ℃，通气量为 0.8 N·m^3/h，用 30% 质量分数的 NaOH 调节发酵液的 pH 值为 7.00。待菌体生长到 $D_{600\ nm}$ 约为 6.0 时，进入第 2 阶段的发酵，将搅拌桨转速提升为 800 r/min，控制发酵液的 pH 值为 5.00。在发酵过程中通过高效液相色谱及时检测底物葡萄糖的质量浓度，当其质量浓度为 20～30 g/L 时，补加底物葡萄糖。

2－酮基葡萄糖酸发酵培养基配方如下：100 g/L 葡萄糖，4 g/L 玉米浆，5 g/L 硫酸铵，5 g/L 酵母提取物，5 g/L 氯化钙，3 g/L 三水合乙酸钠，0.4 g/L 氯化钾，0.1 g/L 七水硫酸镁，0.02 g/L 七水硫酸亚铁，0.01 g/L 一水合硫酸锰。

从发酵液中提取 2－酮基葡萄糖酸钠，按照图 2 的流程进行分离提纯以获取纯度较高的 2－酮基葡萄糖酸钠晶体。以木糖为底物替代葡萄糖，采用与 2－酮基葡萄糖酸钠相同的方法制备木糖酸钠。

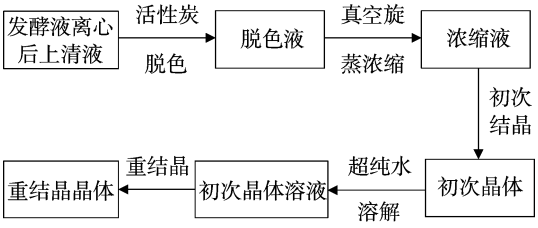


图2　2-酮基葡萄糖酸钠分离提纯过程

1.4　糖酸根与钙、镁离子配合物稳定常数的测定

配制 $CaCl_2$ 浓度梯度为 5.0×10^{-3}、2.5×10^{-3}、1.0×10^{-3}、5.0×10^{-4}、2.0×10^{-5} mol/L 的标准溶液，分别向其中滴加 1～2 滴饱和硝酸钾溶液以维持溶液的离子强度，用离子电极测得 pX^{2+}（X^{2+} 表示二价阳离子），根据相应的 pX^{2+} 绘制钙离子浓度标准曲线，用相同的方法绘制镁离子浓度标准曲线。在 250 mL 锥形瓶中加入 5 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液，然后向其中加入 45 mL 去离子水，振荡混匀。用 50 mL 滴定管向混合溶液中滴加 0.1 mol/L 葡萄糖酸钠溶液，用电极测定并记录溶液的 pX^{2+} 变化，根据标准曲线计算溶液中的游离钙离子浓度。2－酮基葡萄糖酸根、木糖酸根与钙离子、镁离子结合的研究方法同上。

根据 Nelson 等的报道[27-28]，使糖酸根与钙离子按 1∶1 结合形成配合物，钙离子与糖酸根形成配合物的稳定常数 K 的计算公式：

$$K=\frac{[CaL^+]}{[Ca^{2+}][L^-]}=\frac{(n_{Ca^{2+}}-[Ca^{2+}]\times V)/V}{[Ca^{2+}][(n_L-(n_{Ca^{2+}}-[Ca^{2+}]\times V)]/V}=\frac{(n_{Ca^{2+}}-[Ca^{2+}]\times V)}{[Ca^{2+}][n_L-(n_{Ca^{2+}}-[Ca^{2+}]\times V)]}。\quad(1)$$

式中：$n_{Ca^{2+}}$ 为溶液中总钙的物质的量，mol；$[Ca^{2+}]$ 为平衡时溶液中钙离子的浓度，mol/L；n_L 为溶液中总糖酸的物质的量，mol；V 为溶液总体积，L；$[L^-]$ 为平衡时糖酸根离子的浓度，mol/L。

镁离子与糖酸根按照 1∶1 的物质的量之比结合，其平衡常数 K 的计算表达式同式(1)。

1.5　用糖酸钠溶液溶解磷酸钙和磷酸镁

准确称取于 105.0 ℃干燥 3 h 的磷酸钙固体粉末 0.50 g、葡萄糖酸钠固体 1.50 g(4.84 mmol),用去离子水溶解后转移到 100 mL 容量瓶中定容,再将溶液转移至 250 mL 锥形瓶中,用橡胶塞封口,配制成葡萄糖酸根与总钙物质的量之比为 1∶1 的体系。用同样方法配制葡萄糖酸根与总钙物质的量比分别为 0∶1、2∶1、4∶1、6∶1、8∶1、10∶1 的体系。于 25.0 ℃、200 r/min 的恒温振荡培养箱中进行溶解,每天取样,将样品于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤,采用钼蓝比色法测定滤液中的磷酸根含量[29]。用 2-酮基葡萄糖酸钠和木糖酸钠溶液溶解磷酸钙以及用糖酸钠溶液溶解磷酸镁采用与上述相同的方法。

1.6　用糖酸钠溶液溶解土壤中的磷元素

(1)土壤中有效磷浓度的测定。称取 10.00 g 风干土壤于 50 mL 离心管中,然后加入 30 mL 水,盖紧盖子,漩涡振荡 1~2 min,静置 30 min,用 5 mol/L $NaHCO_3$ 溶液浸提土壤中的有效磷并测定其有效磷浓度[30]。(2)土壤中总磷浓度的测定。土壤中含磷矿物质和有机磷化合物在高温下与高氯酸作用,全部转化为正磷酸盐。采用钼蓝比色法测定其中的磷酸根浓度,即土壤中的总磷浓度。称取 1.00 g 土壤样品置于消解管中,加入少量水润湿,再加入 8 mL 浓硫酸过夜浸泡处理;然后向其中加入 0.5 mL 高氯酸,用红外消解炉于 120 ℃消解 120 min 后静置至室温,向其中多次少量加入去离子水,并转移至 100 mL 容量瓶内,振荡混匀,待其冷却至室温后再定容。采用钼蓝比色法测定所得溶液中的磷酸根浓度,即为土壤样品中的全磷浓度[31]。(3)糖酸解磷试验。分别称取 6 份土壤样品于烧杯中,每份 10.00 g,加入 0.05 mol/L 葡萄糖酸钠溶液,使溶液总体积为 100 mL,得到的葡萄糖酸钠溶液终浓度分别为 1×10^{-3}、2×10^{-3}、4×10^{-3}、6×10^{-3}、8×10^{-3}、1×10^{-2} mol/L,在 25 ℃、200 r/min 条件下振荡,每天取样并测定溶液中的磷酸根浓度。用 2-酮基葡萄糖酸钠和木糖酸钠溶解土壤中难溶性磷酸盐的方法与用葡萄糖酸钠溶解土壤中难溶性磷酸盐的方法相同。

2　结果与分析

2.1　糖酸钠盐的制备以及分离纯化

按照“1.3”节中的操作步骤,利用葡萄糖制备 2-酮基葡萄糖酸钠。经过 42 h 的发酵,底物葡萄糖完全被消耗,发酵液中产生了 166.0 g/L 2-酮基葡萄糖酸钠,底物转化率为 0.91 g/g。

以木糖为底物时,经过 120 h 的发酵,产生的木糖酸钠质量浓度为 207.8 g/L,底物转化率为 0.82 g/g。将发酵液按照图 2 中糖酸钠分离提纯的步骤进行分离纯化,根据液相检测结果,每步收集的糖酸钠质量和回收率见表 1。2-酮基葡萄糖酸钠在脱色步骤中损失较多,回收率为 93.2%;其他步骤中产品的回收率都较高,重结晶后晶体的纯度为 98.9%。此外,木糖酸钠脱色后的回收率为 93.4%,重结晶后晶体的纯度为 99.0%。

表 1　糖酸钠的分离提纯及其回收率

项目	2-酮基葡萄糖酸钠提取过程				木糖酸钠提取过程			
	体积(L)	产物质量浓度(g/L)	2-酮基葡萄糖酸钠质量(g)	回收率(%)	体积(L)	产物质量浓度(g/L)	木糖酸钠质量(g)	回收率(%)
发酵液	2.95	166.0	489.7	—	2.75	207.8	571.6	—
活性炭脱色	2.85	160.2	456.6	93.2	2.63	203.0	534.0	93.4
初次结晶			437.2(446.8)	95.8			513.9(523.3)	96.2
重结晶			420.3(425.0)	96.1			499.6 (504.6)	97.2
总回收率	—	—	—	85.8	—	—	—	87.4

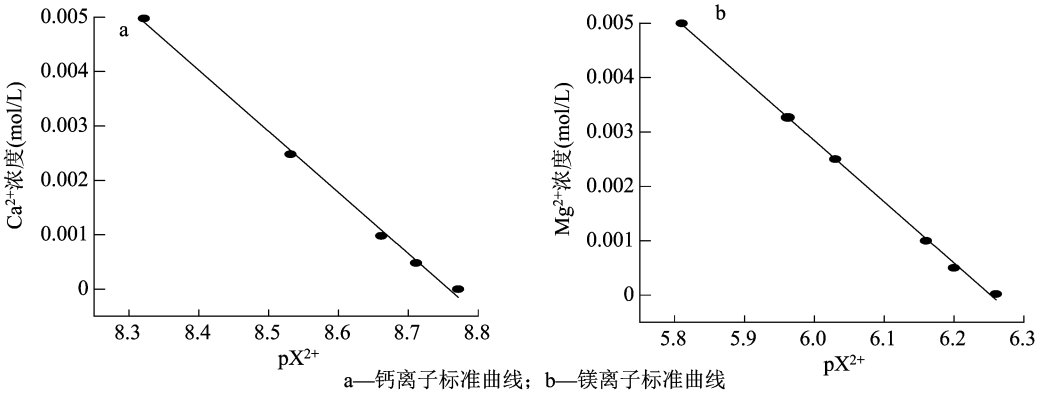
注:括号内数据为直接称量所得晶体质量,对应的括号外数据为由实际浓度计算得出的纯物质质量。

2.2　基于离子电极法测定钙离子和镁离子的标准曲线

用离子电极法测得钙离子和镁离子的标准溶液;测得的 pX^{2+} 与对应离子浓度的标准曲线见图 3,其中钙离子浓度(y_1)与 pX^{2+}(x_1)之间的关系式:$y_1=-0.011\ 2x_1+0.098\ 4$,$r^2=0.997\ 2$;镁离子浓度($y_2$)与 pX^{2+}(x_2)之间的关系式:$y^2=-0.011\ 3x_2+0.070\ 4$,$r^2=0.998\ 7$。

2.3　糖酸根与钙离子、镁离子的结合及其稳定常数的测定

按照“1.4 节”中所列方法,向氯化钙、氯化镁溶液中滴加糖酸钠溶液,用离子电极测定离子浓度



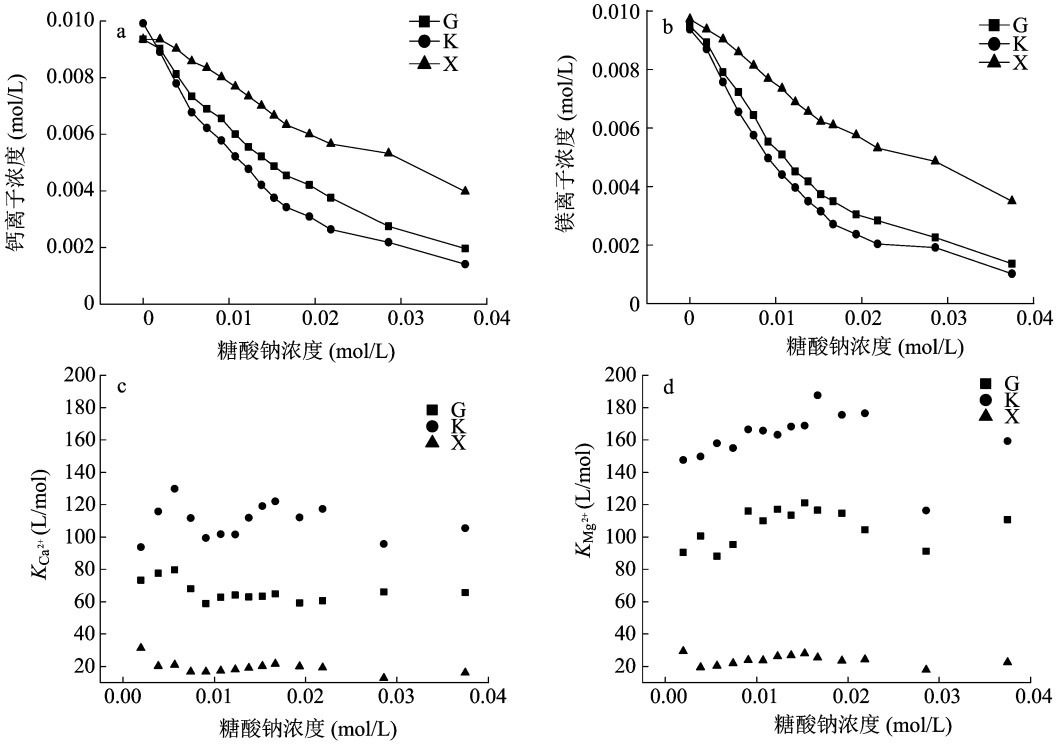
a—钙离子标准曲线；b—镁离子标准曲线

图3　离子电极法测定的钙离子和镁离子标准曲线

(图 4 - a、图 4 - b)。根据式(1),计算得到糖酸根与钙离子、镁离子形成的配合物的稳定常数。

由图 4 - c 可知,钙离子与葡萄糖酸根形成的配合物的稳定平衡常数为 58.8 ~ 79.7 L/mol,平均为 66.1 L/mol;钙离子与 2 - 酮基葡萄糖酸根形成的配合物的稳定常数为 93.6 ~ 129.8 L/mol,平均为 109.7 L/mol;钙离子与木糖酸根结合的平衡常数为 12.7 ~ 31.3 L/mol,平均为 19.2 L/mol。总体看出,糖酸根与钙离子形成的配合物的稳定性排序如下:2 - 酮基葡萄糖酸 > 葡萄糖酸 > 木糖酸。

由图 4 - d 可知,镁离子与葡萄糖酸根形成的配合物的稳定常数为 88.0 ~ 121.0 L/mol,平均为 106.3 L/mol;镁离子与 2 - 酮基葡萄糖酸根形成的配合物的稳定常数为 116.3 ~ 187.5 L/mol,平均为 161.2 L/mol;镁离子与木糖酸根形成的配合物的稳定常数为 17.9 ~ 29.4 L/mol,平均为 23.8 L/mol。总体看出,糖酸根与镁离子形成的配合物稳定性排序如下:2 - 酮基葡萄糖酸 > 葡萄糖酸 > 木糖酸。



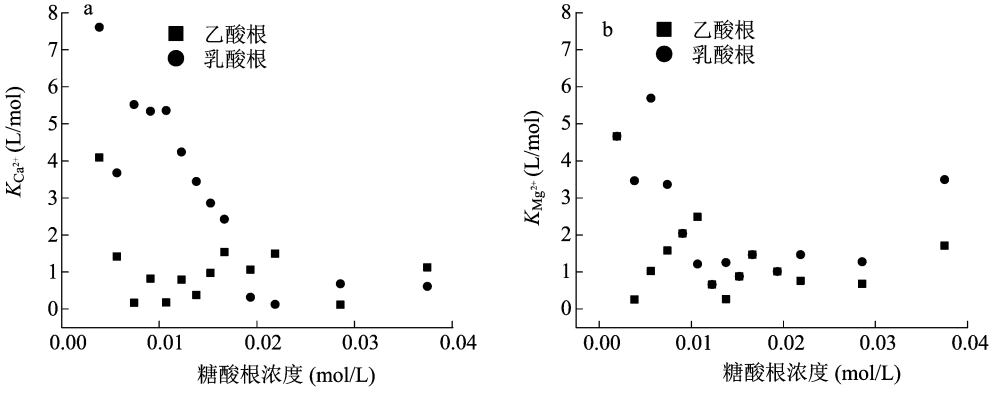
a—糖酸钠与游离钙离子浓度关系；b—糖酸钠浓度与游离镁离子浓度关系；c—糖酸根与钙离子配合物稳定常数；d—糖酸根与镁离子配合物稳定常数。G—葡萄糖酸钠；K—2-酮基葡萄糖酸钠；X—木糖酸钠；下图同

图4　糖酸根与钙、镁离子配合物稳定常数测定结果

2.4　乙酸钠和乳酸钠溶解磷酸钙和磷酸镁

为了对比其他小分子有机酸化合物的溶磷效果,本试验测定了乙酸钠和乳酸钠与钙离子、镁离子形成配合物的稳定常数,测定方法与糖酸试验相

同。由图 5－a 可以看出，钙离子与乙酸根形成的配合物的稳定常数为 0.1～4.1 L/mol，平均为 1.1 L/mol；乳酸根与钙离子形成的配合物的稳定常数为 0.1～7.6 L/mol，平均为 3.2 L/mol。由图 5－b 可以看出，镁离子与乙酸根形成的配合物的稳定常数为 0.3～4.7 L/mol，平均为 1.4 L/mol；镁离子与乳酸根形成的配合物的稳定常数为 0.7～5.7 L/mol，平均为 2.3 L/mol。从配合物的稳定常数可以看出，乙酸根、乳酸根与钙离子、镁离子形成配合物的能力较弱，或不形成配合物。



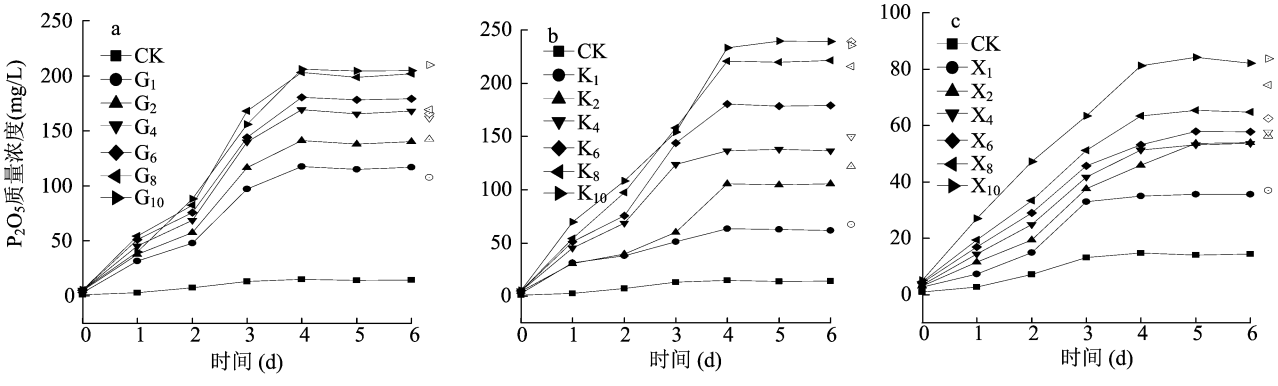
a—糖酸根与钙离子配合物稳定常数；b—糖酸根与镁离子配合物稳定常数

图5　乙酸根、乳酸根与钙、镁离子配合稳定常数的测定结果

2.5　糖酸钠溶解磷酸钙和磷酸镁

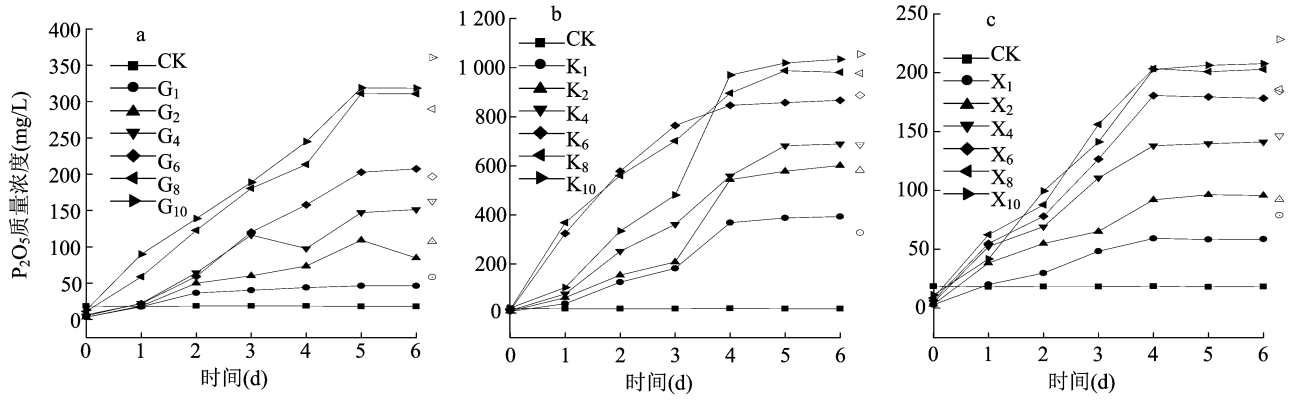
按照“1.5”中所述方法，用不同浓度的糖酸钠溶液溶解磷酸钙和磷酸镁。由图 6、图 7 可以看出，与空白对照组相比，糖酸钠溶液能够有效促进磷酸钙、磷酸镁的溶解，并且在一定范围内随着糖酸钠浓度的增加，磷酸根浓度（以 P_2O_5 计，下同）也在增加。在 0～4 d，混合溶液中的磷酸根浓度逐渐增大，在 4～6 d 时，磷酸钙和磷酸镁的溶解达到稳定，溶液中的磷酸根浓度达到最大值。

当糖酸浓度为 4.84×10^{-1} mol/L 时，即糖酸与总钙的物质的量之比为 10∶1 时，用葡萄糖酸钠、2－酮葡萄糖酸钠、木糖酸钠溶液溶解磷酸钙，溶液中的磷酸根质量浓度分别为 204.6、238.9、82.0 mg/L。用葡萄糖酸钠、2－酮基葡萄糖酸钠、木糖酸钠溶液溶解磷酸镁，溶液中的磷酸根质量浓度分别为 318.7、1 034.4、207.6 mg/L。这些都远大于磷酸钙、磷酸镁在水溶液中的磷酸根质量浓度（分别为 14.4、18.3 mg/L）。此外，当磷酸钙和磷酸镁的溶解达到稳定时，用电极测定溶液中的钙、镁离子浓度，计算得到此时溶液中的磷酸根浓度，结果显示，该计算所得磷酸根浓度与实际测得溶液中的磷酸根浓度误差在 20% 范围内。



a—葡萄糖酸钠溶解磷酸钙；b—2-酮基葡萄糖酸钠溶解磷酸钙；c—木糖酸钠溶解磷酸钙。CK—对照；G_1、G_2、G_4、G_6、G_8、G_{10}—葡萄糖酸根浓度与总钙浓度的比值分别为1、2、4、6、8、10；K_1、K_2、K_4、K_6、K_8、K_{10}—2-酮基葡萄糖酸根浓度与总钙浓度的比值分别为1、2、4、6、8、10；X_1、X_2、X_4、X_6、X_8、X_{10}—木糖酸根浓度与总钙浓度的比值分别为1、2、4、6、8、10；图7同。曲线末端数据表示达到平衡时，根据测得的钙离子浓度，计算得到溶液中磷酸根浓度

图6　糖酸钠溶解磷酸钙的动态过程

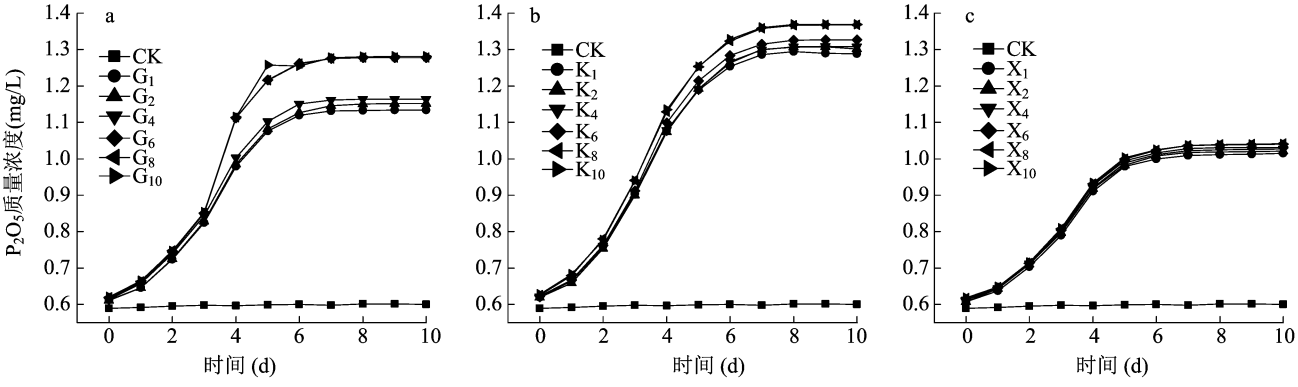


a—葡萄糖酸钠溶解磷酸镁；b—2-酮基葡萄糖酸钠溶解磷酸镁；c—木糖酸钠溶解磷酸镁。
曲线末端数据表示达到平衡时根据测得的镁离子浓度计算得到的溶液中的磷酸根浓度

图7　糖酸钠溶解磷酸镁的动态过程

2.6　糖酸溶解土壤中的磷元素

土壤样品呈弱碱性，其 pH 值为 8.08，有效磷含量为 12.1 mg/kg，总磷含量为 712.2 mg/kg。用系列浓度梯度的糖酸钠溶液溶解土壤中的磷，从图 8 可以看出，10 d 后土壤中的难溶性磷酸盐的溶解达到平衡；空白对照组使用纯水溶解，土壤中磷酸根的质量浓度为 0.6 mg/L；在试验组中使用糖酸钠后，土壤中的磷酸根质量浓度均大于对照组；在利用 1.0×10^{-2} mol/L 糖酸钠溶解磷酸盐达到平衡时，葡萄糖酸钠、2－酮基葡萄糖酸钠、木糖酸钠溶解的土壤中的磷酸根质量浓度分别为 1.3、1.4、1.0 mg/L，平均大约是对照土壤样品的 2 倍。



a—葡萄糖酸钠溶解土壤磷；b—2-酮基葡萄糖酸钠溶解土壤磷；c—木糖酸钠溶解土壤磷。CK—空白对照组；G_1、G_2、G_4、G_6、G_8、G_{10}—葡萄糖酸钠溶液浓度分别为1.0×10^{-3}、2.0×10^{-3}、4.0×10^{-3}、6.0×10^{-3}、8.0×10^{-3}、10.0×10^{-3} mol/L；K_1、K_2、K_4、K_6、K_8、K_{10}—2-酮基葡萄糖酸钠溶液浓度分别为1.0×10^{-3}、2.0×10^{-3}、4.0×10^{-3}、6.0×10^{-3}、8.0×10^{-3}、10.0×10^{-3} mol/L；X_1、X_2、X_4、X_6、X_8、X_{10}—木糖酸钠溶液浓度分别为1.0×10^{-3}、2.0×10^{-3}、4.0×10^{-3}、6.0×10^{-3}、8.0×10^{-3}、10.0×10^{-3} mol/L

图8　糖酸钠溶解土壤磷的动态过程

3　结论

本研究结果表明，不同于乳酸、乙酸，葡萄糖酸、2－酮基葡萄糖酸、木糖酸能与钙离子、镁离子形成稳定的配合物，从而降低溶液中游离钙、镁离子质量浓度。钙、镁离子质量浓度的降低，使得磷酸钙与磷酸镁的溶解平衡发生移动，增加了溶液中磷酸根的质量浓度，这是微生物解磷的一种重要机制。因此通过生物发酵法制备的糖酸类化合物，有望成为一种解磷剂应用于农业中。

参考文献：

[1] Baliah N T, Pandiarajan G, Kumar B M. Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu[J]. Tropical Ecology, 2016, 57(3): 465－474.

[2] Zeng Q W, Wu X Q, Wang J C, et al. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate－solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS－FJ9 under different levels of soluble phosphate[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(4): 844－855.

[3] Holford I C R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants[J]. Australian Journal of Soil Research, 1997, 35(2): 227－240.

[4] Lopez - Bucio J, de la Vega O M, Guevara - Garcia A, et al. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(4): 450 - 453.

[5] Rodriguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. Biotechnology Advances, 1999, 17(4/5): 319 - 339.

[6] Bolan N S. A critical - review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants[J]. Plant and Soil, 1991, 134(2): 189 - 207.

[7] Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, et al. Screening for rock phosphate solubilizing *Actinomycetes* from Moroccan phosphate mines [J]. Applied Soil Ecology, 2008, 38(1): 12 - 19.

[8] Xu R K, Zhu Y G, Chittleborough D. Phosphorus release from phosphate rock and a iron phosphate by low - molecular - weight organic acids[J]. Journal of Environmental Sciences, 2004, 16(1): 5 - 8.

[9] Abou - Shanab R A, Ghozlan H, Ghanem K, et al. Behaviour of bacterial populations isolated from rhizosphere of *Diplachne fusca* dominant in industrial sites[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6/7): 1095 - 1101.

[10] Liba C M, Ferrara F I, Manfio G P, et al. Nitrogen - fixing chemo - organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria - deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(5): 1076 - 1086.

[11] Barak Y, van Rijn J. Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium Paracoccus denitrificans[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1209 - 1212.

[12] Vassilev N, Fenice M, Federici F. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variabile* P16[J]. Biotechnology Techniques, 1996, 10(8): 585 - 588.

[13] Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth - promoting bacterium *Azospirillum* spp. [J]. The Science of Nature, 2004, 91(11): 552 - 555.

[14] Kumar C, Yadav K, Archana G, et al. 2 - ketogluconic acid secretion by incorporation of *Pseudomonas putida* KT 2440 gluconate dehydrogenase (gad) operon in *Enterobacter asburiae* PSI3 improves mineral phosphate solubilization[J]. Current Microbiology, 2013, 67(3): 388 - 394.

[15] Hwangbo H, Park R D, Kim Y W, et al. 2 - ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* [J]. Current Microbiology, 2003, 47(2): 87 - 92.

[16] Biswas J K, Banerjee A, Rai M, et al. Potential application of selected metal resistant phosphate solubilizing bacteria isolated from the gut of earthworm (*Metaphire posthuma*) in plant growth promotion[J]. Geoderma, 2018, 330: 117 - 124.

[17] Sachdev D P, Chaudhari H G, Kasture V M, et al. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2009, 47(12): 993 - 1000.

[18] Liu Y, Wang H, Sun X L, et al. Study on mechanisms of colonization of nitrogen - fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and the formation of biofilm[J]. Current Microbiology, 2011, 62(4): 1113 - 1122.

[19] Riggs P J, Chelius M K, Iniguez A L, et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28(9): 829 - 836.

[20] Wang D X, Wang C H, Wei D, et al. Gluconic acid production by gad mutant of *Klebsiella pneumoniae* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(8): 132 - 142.

[21] Wei D, Xu J Q, Sun J S, et al. 2 - ketogluconic acid production by *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.6366[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(6): 561 - 570.

[22] Liu H, Valdehuesa K N G, Nisola G M, et al. High yield production of *D* - xylonic acid from *D* - xylose using engineered *Escherichia coli* [J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 244 - 248.

[23] Deubel A, Gransee A, Merbach W. Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2000, 163: 387 - 392.

[24] Gaind S. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat[J]. Microbiological Research, 2016, 193: 94 - 102.

[25] Qian T T, Yang Q, Jun D C F, et al. Transformation of phosphorus in sewage sludge biochar mediated by a phosphate - solubilizing microorganism [J]. Chemical Engineering Journal, 2019, 359: 1573 - 1580.

[26] Sun Y H, Wei D, Shi J P, et al. Two - stage fermentation for 2 - ketogluconic acid production by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(6): 781 - 787.

[27] Nelson J B, Essington M E. The association constants of H^+ and Ca^{2+} with 2 - keto - *D* - gluconate in aqueous solutions [J]. Journal of Solution Chemistry, 2005, 34(7): 789 - 800.

[28] Vavrusova M, Munk M B, Skibsted L H. Aqueous solubility of calcium L - lactate, calcium D - gluconate, and calcium *D* - lactobionate: importance of complex formation for solubility increase by hydroxycarboxylate mixtures [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(34): 8207 - 8214.

[29] Page A L, Miller R H, Keeney D R, et al. Methods of soil analysis [M]. 2nd. Madison, USA: American Society of Agronomy, 1982: 416 - 426.

[30] Moughli L, Westfall D G, Boukhial A. Use of adsorption and buffer capacity in soil testing for phosphorus[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1993, 24(15/16): 1959 - 1974.

[31] Tavakkoli E, Fatehi F, Coventry S, et al. Additive effects of Na^+ and Cl^- ions on barley growth under salinity stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(6): 2189 - 2203.