

## 样品磷化氢含量与某些微生物群落及酶活的关系

刘志培, 王宝军, 贾省芬, 刘双江

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 探讨了样品中磷化氢含量与不同微生物群落及几种酶活性的关系。结果表明, 样品的磷化氢含量与厌氧微生物总量、有机磷细菌、反硝化细菌、碱性磷酸酶活性及脱氢酶活性呈显著的正相关关系, 其相关系数( $R^2$ )分别达到了 0.93, 0.90, 0.69, 0.79 和 0.82; 而与好氧异养微生物总量、无机磷细菌、硫酸盐还原菌、酸性磷酸酶的关系不大。此结果说明, 相关类群的微生物在磷化氢的产生中可能起重要的作用。

**关键词**: 磷化氢含量; 有机磷细菌; 反硝化细菌; 碱性磷酸酶; 脱氢酶

**中图分类号**: Q936 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2006)04-0608-05

磷化氢( $\text{PH}_3$ )是 Devai 等 1988 年首次在自然环境中检测到它的存在<sup>[1]</sup>, 自此这种还原性气态磷化合物不断在各种环境中发现, 如土壤<sup>[2]</sup>、沼泽<sup>[3]</sup>、稻田土壤<sup>[4]</sup>、大气<sup>[5]</sup>、海底沉积物<sup>[6,7]</sup>、淡水湖沉积物<sup>[8]</sup>等。这些研究成果表明, 磷化氢广泛存在于自然环境中, 同时在磷的生物地球化学循环中的确存在价态的变化, 而且这种价态变化在磷循环中可能起重要的作用<sup>[3,4,9]</sup>, 这与传统的磷循环理论明显不同。磷化氢在样品中的含量差异非常大, 从  $3 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[5]</sup> 到  $21307 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[8]</sup> 不等, 但造成这种差异以及磷化氢的产生机制尚不清楚。虽然在他们的综述中, Roels 和 Verstraete<sup>[10]</sup>提出了生物产生磷化氢的观点, 但由生物还原磷酸盐形成磷化氢一直受到质疑<sup>[11]</sup>, 至今为止的任何试图分离能够还原磷酸盐到磷化氢的微生物都以失败告终。俞志明等<sup>[7]</sup>报道磷化氢含量与有机磷化合物含量密切相关, 在我们<sup>[8]</sup>的前期工作中, 发现磷化氢含量与总有机碳、还原糖、有机磷化合物含量密切相关, 但没有见到有关磷化氢含量与微生物群落及活性相关分析的报道。在本文中, 主要探讨磷化氢含量与相关的微生物种群如好氧异养菌总量、厌氧异养菌总量、硝化细菌、反硝化细菌、硫酸盐还原菌、无机磷细菌、有机磷细菌, 以及磷酸酶和脱氢酶的关系, 为探讨微生物在磷化氢形成中的作用以及富集分离磷酸盐还原菌提供线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

共采集不同厌氧环境样品 12 个, 具体

为太湖底泥 6 个[具体采样位点为 T1( $120^\circ 13' 20.8'' \text{E}$ ,  $31^\circ 32' 30.1'' \text{N}$ )、T2( $120^\circ 12' 45.9'' \text{E}$ ,  $31^\circ 30' 20.3'' \text{N}$ )、T3( $120^\circ 02' 16.8'' \text{E}$ ,  $31^\circ 27' 10.7'' \text{N}$ )、T4( $120^\circ 13' 14'' \text{E}$ ,  $31^\circ 13' 50'' \text{N}$ )、T5( $119^\circ 57' 25'' \text{E}$ ,  $31^\circ 12' 35'' \text{N}$ )和 T6( $120^\circ 26' 11'' \text{E}$ ,  $31^\circ 01' 57'' \text{N}$ ), 底泥表层以下 10 ~ 15 cm, T1 位点有陆源排污口]; 京郊稻田土壤 4 个(分别为相距约 100 m 的 4 个位点表层以下 0 ~ 5 cm、5 ~ 10 cm、10 ~ 15 cm 和 15 ~ 20 cm)和某污水处理厂污泥(初次沉淀污泥和浓缩污泥), 每个分成 2 份。其中 1 份装入聚四氟乙烯瓶中, 密封以隔绝空气, 瓶外包三层黑色塑料袋以避光, 置于  $-70^\circ \text{C}$  下保存, 用于磷化氢的测定; 另一份装入采样袋中, 用于化学分析和微生物分析。样品的 pH、氧化还原电势( $E_h$ )采用 pH 计实时测定, 含水率采用  $105^\circ \text{C}$  烘干至恒重计算, 并以此计算样品的其他指标<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 培养基** ①LB 培养基: 用于好氧异养菌总量和厌氧异养菌总量的测定。②硝化培养基: 用于硝化细菌的测定, 其组成为( $\text{g/L}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.0; NaCl, 2.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.05;  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.01;  $\text{CaCO}_3$ , 5.0; pH 7.5。③反硝化培养基: 用于反硝化细菌的测定, 其组成为( $\text{g/L}$ ): 葡萄糖, 10.0;  $\text{KNO}_3$ , 2.0; 酒石酸钾钠, 0.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7.4 ~ 7.6。④培养基 E: 用于硫酸盐还原菌的测定, 其组成为( $\text{g/L}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.0;  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0; 如酸钠, 3.5; 酵母粉, 1.0; Ascorbic acid, 0.1; Thioglycollic

acid, 0.1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5. pH 用 NaOH 调到 7.6, 最后 3 种组分通过过滤除菌, 在培养基灭菌后加入。

⑤无机磷培养基:用于无机磷细菌的测定其组成为(g/L): 葡萄糖, 10.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3; NaCl, 0.3; KCl, 0.3;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.03;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.03;  $(\text{Ca})_2(\text{PO}_4)_2$ , 10; 琼脂粉, 15。⑥有机磷培养基:用于有机磷细菌的测定, 其组成为(g/L): 葡萄糖, 10.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3; NaCl, 0.3; KCl, 0.3;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.03;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.03;  $\text{CaCO}_3$ , 10; 磷酸甘油酯, 2.0; 琼脂粉, 15。

1.2 磷化氢的测定

样品的处理与分析按照文献[12]所述的方法进行, 气相色谱条件与文献[13]所述相同, 每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

1.3 微生物群落的计数测定

好氧异养菌总量、厌氧异养菌总量、硝化细菌、反硝化细菌和硫酸盐还原菌的计数测定采用最大可能数法(MPN)[15]; 无机磷细菌和有机磷细菌的计数测定采用菌落计数法(CFU)[15]。

1.4 脱氢酶(DH)的测定

脱氢酶(DH)的测定按照文献[16]所述方法进行。将 2g 土壤与 2mL 三苯基四氮唑氯化物(TTC)溶液( $0.1\text{g TTC } 100\text{mL}^{-1}$ ,  $100\text{mmol/L Tris buffer}$ , pH 7.6) 在无氧试瓶中于  $30^\circ\text{C}$  温箱中静置培养 24h, 加入 20mL 丙酮室温黑暗下继续培养 2h, 过滤后测定滤液在 546nm 处的吸收值。根据吸收值, 从甲替(TF, TTC 的还原产物)标准曲线查出其含量。脱氢酶酶活单位(U)定义为在上述条件下每还原  $1\mu\text{g}$  TTC 所需的酶(土壤)量。

1.5 磷酸酶的测定

磷酸酶的测定按照文献[17]所述方法进行, 酸性磷酸酶的测定采用乙酸盐缓冲液(pH 5.0,  $0.1\text{mol/L}$ ), 碱性磷酸酶的测定采用 Tris-HCl 缓冲液(pH8.5,  $0.1\text{mol/L}$ )。磷酸酶酶活单位(U)定义为文

献所述标准条件下每分钟释放  $1\mu\text{mol PO}_4^{3-}$  所需的酶(土壤)量。

2 结果

2.1 样品的磷化氢含量及其与某些微生物种群的关系

在所有样品中均检测到了磷化氢[8], 最低的是来自于太湖 T5 位点的沉积物( $14.85 \pm 2.25 \text{ ng/kg}$ ), 最高的是来自于污水处理厂的沉淀污泥( $21307.4 \pm 57.81 \text{ ng/kg}$ )比已报道的最高样品( $685 \text{ ng/kg}$ )[7]高出很多。为了探讨样品磷化氢含量差异与微生物种群及其数量的关系, 首先分析了样品的好氧异养菌总量及厌氧异养菌总量, 结果表明, 样品的磷化氢含量与好氧异养菌总量的关系不大(表 1), 其相关性系数( $R^2$ )只有 0.40, 但与厌氧异养菌总量的关系非常密切(图 1-A), 其与厌氧异养菌总量之对数的相关性系数( $R^2$ )达到了 0.92, 说明了样品的厌氧微生物数量越高其磷化氢含量也越高, 表明了厌氧微生物在磷化氢产生和积累中的作用。好氧异养菌及厌氧异养菌分别是所有好氧菌及厌氧菌的总称, 各有很多的种群, 为了探讨哪些种群的微生物与磷化氢含量具有关系, 进一步测定样品中不同类群厌氧微生物及好氧微生物的种群数量, 特别是与磷代谢相关的类群及主要的厌氧微生物类群, 并分析它们与样品磷化氢含量的关系, 表 1 的结果表明, 磷化氢含量与无机磷细菌(IPB)、硝化细菌及硫酸盐还原菌(SRB)之间的相关性系数( $R^2$ )均小于 0.4, 说明样品中这些微生物种群数量的多少与其磷化氢含量的关系不大, 表明这些微生物种群在磷化氢的产生中不具有重要的作用, 但样品的磷化氢含量与其有机磷细菌(图 1-B)及反硝化细菌(图 1-C)之间呈显著的正相关关系, 相关性系数( $R^2$ )分别达到了 0.90 和 0.69, 说明环境样品中有机磷细菌数量越高其磷化氢含量也越高, 表明了该类群微生物在磷化氢产生中的作用, 而有机磷细菌是环境中与有机磷化合物

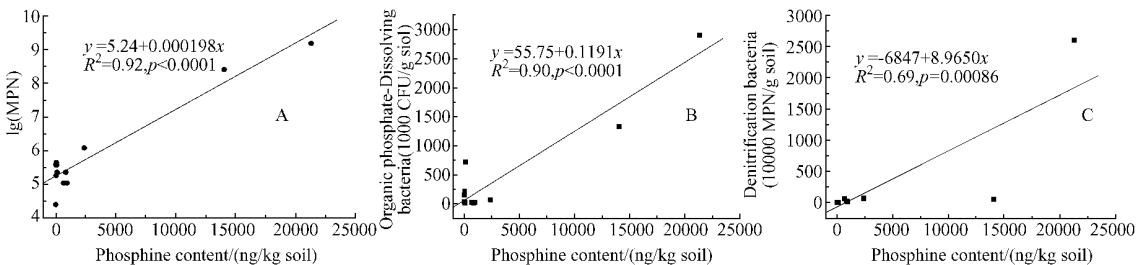


图 1 磷化氢含量与厌氧微生物(A)、有机磷细菌(B)和反硝化细菌(C)的相关性分析

Fig.1 Relationships between phosphine contents and anaerobic microbes (A), organic phospho © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

代谢相关的微生物种群,该结果与磷化氢含量与有机磷化合物含量呈正相关关系的结果<sup>[7,8]</sup>相吻合的;此外,结果还表明,样品中的反硝化细菌数量越高其

磷化氢含量也越高,即反硝化细菌越多越有利于磷化氢的产生,说明了反硝化细菌在磷化氢产生中的作用。

表 1 样品的磷化氢含量、某些微生物种群含量及相关性

Table 1 Phosphine content and numbers of some microbial populations of samples					
Sample	PH <sub>3</sub> ( ng/kg )	AHB( MPN/g ) <sup>a</sup>	IPB( CFU/g ) <sup>b</sup>	Nitrified( MPN/g )	SRB( MPN/g ) <sup>c</sup>
Sediment					
T1	37.73 ± 4.32	8.5 × 10 <sup>6</sup>	5.6 × 10 <sup>5</sup>	2.8 × 10 <sup>4</sup>	1.7 × 10 <sup>6</sup>
T2	49.37 ± 5.57	4.8 × 10 <sup>6</sup>	3.8 × 10 <sup>5</sup>	2.9 × 10 <sup>4</sup>	3.6 × 10 <sup>5</sup>
T3	62.12 ± 5.46	1.7 × 10 <sup>7</sup>	1.8 × 10 <sup>5</sup>	8.2 × 10 <sup>4</sup>	3.5 × 10 <sup>5</sup>
T4	124.12 ± 6.78	1.5 × 10 <sup>6</sup>	1.5 × 10 <sup>3</sup>	1.5 × 10 <sup>4</sup>	1.1 × 10 <sup>3</sup>
T5	14.85 ± 2.25	4.1 × 10 <sup>6</sup>	1.6 × 10 <sup>2</sup>	1.0 × 10 <sup>2</sup>	1.5 × 10 <sup>4</sup>
T6	66.70 ± 5.13	3.7 × 10 <sup>5</sup>	2.2 × 10 <sup>2</sup>	3.7 × 10 <sup>1</sup>	7.4 × 10 <sup>4</sup>
Paddy soil					
0 ~ 5cm	2394.49 ± 15.66	2.6 × 10 <sup>7</sup>	8.2 × 10 <sup>5</sup>	8.2 × 10 <sup>5</sup>	1.2 × 10 <sup>6</sup>
5 ~ 10cm	950.44 ± 8.94	1.1 × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup>	3.7 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>6</sup>
10 ~ 15cm	672.60 ± 7.55	1.1 × 10 <sup>7</sup>	0	1.1 × 10 <sup>6</sup>	2.3 × 10 <sup>5</sup>
15 ~ 20cm	856.38 ± 7.36	1.1 × 10 <sup>7</sup>	0	3.7 × 10 <sup>4</sup>	1.8 × 10 <sup>5</sup>
Activated sludge					
Precipitated	21307.4 ± 57.81	2.6 × 10 <sup>8</sup>	0	1.2 × 10 <sup>6</sup>	2.6 × 10 <sup>8</sup>
Concentrated	14055.5 ± 43.76	1.5 × 10 <sup>10</sup>	0	1.5 × 10 <sup>7</sup>	3.2 × 10 <sup>9</sup>
Correlation coefficients ( R <sup>2</sup> )					
	—	0.40( P = 0.028 )	0.055( P = 0.46 )	0.30( P = 0.066 )	0.31( P = 0.060 )

<sup>a</sup> : AHB , Aerobic heterotrophic bacteria. <sup>b</sup> : IPB , Inorganic phosphate-dissolving bacteria. <sup>c</sup> : SRB , Sulfate-reducing bacteria.

2.2 磷化氢含量与某些酶活性的相关性分析

我们的初步研究结果<sup>[8]</sup>,样品的磷化氢含量与其总碳、还原糖、有机磷化合物含量呈显著的正相关关系,为了探讨样品磷化氢含量与这些化合物代谢相关的酶类的关系,分析测定了样品的脱氢酶活性及磷酸酶活性,并分析了它们与磷化氢含量的关系,结果(图 2-A)表明,磷化氢含量与脱氢酶活性呈显著的正相关性,其相关性系数( R<sup>2</sup> )达到了 0.82,说明样品的脱氢酶活性越高其磷化氢含量也越高,脱氢酶是一类能够酶促脱氢反应的酶类,可以使各种

有机物如碳水化合物(还原糖)、有机酸、氨基酸、醇类、胡敏酸等脱氢,产生 NADH 等化合物,作为供氢体为生化过程的还原反应提供充足的还原力,而磷化氢含量与脱氢酶活性呈显著的正相关关系,表明了磷化氢的产生是一个还原过程。图 2-B 的结果表明,磷化氢含量与碱性磷酸酶活性呈显著正相关性,其相关性系数( R<sup>2</sup> )达到 0.79,碱性磷酸酶的活性越高其磷化氢含量也越高,但与酸性磷酸酶活性关系不大,其相关性系数( R<sup>2</sup> )只有 0.40(图 2-C)。

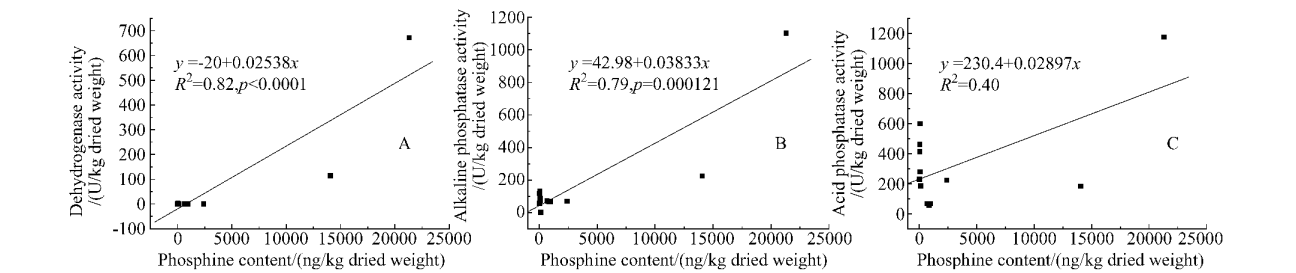


图 2 磷化氢含量与脱氢酶活性 (A)、碱性磷酸酶活性 (B) 和酸性磷酸酶活性 (C) 的相关性分析

Fig.2 Relationships phosphine contents and dehydrogenase activity (A), alkaline phosphatase activity (B) and acidic phosphatase activity (C).

3 讨论

微生物是生态系统的最重要的组成部分,更是元素的生物地球化学循环的推动者之一,如果没有微生物的存在则所有元素的生物地球化学循环将无法进行和完成,生态系统中的微生物群落结构和种

群数量以及微生物的代谢活性和酶活性表征着生态系统的功能及营养元素循环的速率和强度,不同的微生物群落具有不同的生态学功能,同时生态环境条件也对微生物群落的组成及功能产生深刻的影响,在好氧条件下主要以好氧菌的好氧呼吸为主,而在厌氧条件下主要以厌氧菌的厌氧呼吸为主,如硫

酸盐还原菌和反硝化细菌进行的产硫化氢作用和脱氮作用,将  $\text{SO}_4^{2-}$  或  $\text{NO}_3^-$  还原,如果环境中存在一类能将  $\text{PO}_4^{3-}$  还原产生  $\text{PH}_3$  的微生物,那么这一过程也应在厌氧或缺氧条件下进行,已有很多研究报道证实磷化氢主要来源于厌氧环境<sup>[3,9,18]</sup>,特别是厌氧发酵过程可以产生磷化氢<sup>[19]</sup>更值得注意,众所周知,厌氧发酵过程是一个厌氧微生物的代谢过程,从侧面反映了微生物在磷化氢产生中的作用,我们的结果表明,磷化氢含量与好氧微生物的关系不大(表1),但与厌氧微生物数量的对数之间的相关系数( $R^2$ )达到了0.9(图1-A),说明它们之间的关系非常密切,该结果表明样品的微生物数量越高其磷化氢含量也越高,也就是越有利于磷化氢的产生和积累,说明了厌氧微生物在磷化氢的形成中发挥了重要的作用,进一步分析磷化氢含量与不同厌氧微生物群落的相关性发现,磷化氢含量与其他厌氧微生物群落的关系不大(表1),只有与反硝化细菌数量呈现一定的相关性,其相关系数( $R^2$ )为0.6(图1-C),反硝化细菌是一群既能进行好氧呼吸又能进行厌氧硝酸盐呼吸的兼性厌氧微生物,表现更多的代谢多样性,他们在磷化氢产生中可能有一定的作用,但还有待于进一步探讨。在所分析的微生物群落中,磷化氢含量还与有机磷细菌数量密切相关,其相关系数( $R^2$ )达到了0.9(图1-B),而与其他微生物群落的关系并不密切。有机磷细菌是一类能够进行有机磷化合物分解代谢的微生物,他们分解有机磷化合物释放磷素,但所释放的磷并不是以简单的磷酸盐形式存在,该结果也与俞志明等<sup>[7]</sup>以及我们前期<sup>[8]</sup>的磷化氢含量与有机磷化合物含量密切相关的结果相吻合。在我们的探讨中还发现,磷化氢含量与脱氢酶活性及碱性磷酸酶活性密切相关,相关系数( $R^2$ )分别为0.82和0.79(图2-A、B),脱氢酶是一类能够酶促脱氢反应的酶类,在生态系统中主要起着氢的中间传递体的作用,可以使各种有机物如碳水化合物(还原糖)、有机酸、氨基酸、醇类、胡敏酸等脱氢,特别是碳水化合物和有机酸更易于脱氢,在脱氢过程中离析的氢可以转移给氧或其他受氢体,更重要的是可以形成  $\text{NAD(P)H}$  等还原性辅酶,为生态系统的还原反应(如硫酸盐还原、硝酸盐还原,可能包括磷酸盐还原)提供充足的还原力。可以设想,在生态系统中,厌氧微生物(反硝化细菌)、有机磷细菌、脱氢酶、碱性磷酸酶等或通过有机偶联作用在磷化氢的产生中都扮演重要的角色。

致谢 南京大学王晓蓉教授等在样品的磷化氢分析测试提供了大力帮助,在此表示衷心的感谢!

## 参考文献

- [1] Devai I, Felföldy L, Wintter I, et al. Detection of phosphine: new aspects of the phosphorus cycle in the hydrosphere. *Nature*, 1988, **333**: 343–345.
- [2] Eismann F, Glindemann D, Bergmann A, et al. Soils as source and sink of phosphine. *Chemosphere*, 1997, **35**(3): 523–533.
- [3] Devai I, Delaune RD. Evidence for phosphine production and emission from Louisiana and Florida marsh soils. *Org Geochem*, 1995, **23**: 277–279.
- [4] Han SH, Zhuang YH, Liu JA, et al. Phosphorus cycling through phosphine in paddy field. *The Science of the Total Environment*, 2000, **258**: 195–203.
- [5] Liu JA, Cao HF, Zhuang YH, et al. Phosphine in the urban air of Beijing and its possible sources. *Water Air and Soil Pollution*, 1999, **116**: 597–604.
- [6] Gassmann G, Schorn F. Phosphine from harbor surface sediment. *Naturwissenschaften*, 1993, **80**: 78–80.
- [7] Yu ZM, Song XX. Matrix-bound phosphine: a new existent of phosphorous compounds found in Jiao-dong Gulf. *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47**: 1596–1599.
- [8] 刘志培, 贾省芬, 王保军, 等. 样品的磷化氢含量差异及其影响因素. *环境科学学报*, 2004, **24**(5): 852–857.
- [9] Glindemann D, Bergmann A. Phosphine in the lower terrestrial troposphere. *Naturwissenschaften*, 1996, **83**: 131–133.
- [10] Roels J, Verstraete W. Biological formation of volatile phosphorus compounds. *Bioresource Technology*, 2001, **79**: 243–250.
- [11] Glindemann D, Eismann F, Bergmann A, et al. Phosphine by biocorrosion of phosphide-rich iron. *Environ Sci Pollut Res*, 1998, **5**(2): 71–74.
- [12] Gassmann G. Phosphine in the fluvial and marine hydrosphere. *Marine Chemistry*, 1994, **45**: 197–205.
- [13] Niu X, Wang X, Xu W, et al. Determination of phosphine in eutrophication water. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2003, **31**(3): 378.
- [14] Postgate JRFrs. *The Sulphate-reducing Bacteria*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Cambridge University Press, 1984.
- [15] Levin MA. *Microbial Ecology: Principle, Methods and Applications*. New York: McGraw-Hill Inc, 1992.
- [16] Alef K. Soil respiration. In: SH Mickelson Alef, ed. *Methods of Soil Analysis*. WI: Madison, 1994, 228–233.
- [17] Xu GH, Zheng HY. *Manual of Soil Microbial Analytical Methods*. ed. Beijing: China Agriculture Press, 1986.
- [18] Glindemann D, Stottmeister U, Bergmann A. Free phosphine from the anaerobic biosphere. *Environ Sci Pollut Res*, 1996, **3**(1): 17–19.
- [19] Eismann F, Glindemann D, Bergmann A, et al. Balancing phosphine in manure fermentation. *J Environ Sci Health*, 1997, **B33**(6): 955–968.

## Relationships between phosphine content of samples and their microbial populations and enzyme activities

LIU Zhi-pei<sup>\*</sup>, WANG Bao-jun, JIA Sheng-fen, LIU Shuang-jiang<sup>\*</sup>

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** : The relationships between phosphine content and various microbial floras, activities of different enzymes were investigated. The results indicated that the phosphine content of samples from various environments was positively related to total anaerobic microorganisms, organic phosphate compounds-dissolving bacteria, denitrifying bacteria, alkaline phosphatase activity and dehydrogenase activity of the samples. The correlation coefficients ( $R^2$ ) for these were 0.93, 0.90, 0.69, 0.79 and 0.82, respectively. The results also showed that the phosphine content was not related to total aerobic microorganisms, inorganic phosphate compounds-dissolving bacteria, sulfate-reducing bacteria, acidic phosphatase activity. In addition to formerly results, the results might infer that the formation of phosphine was due to the reduction of organic phosphate compounds by anaerobic heterotrophic microbes, especially the denitrifying bacteria by using reducing sugar.

**Keywords** : Phosphine content; Organic phosphate-dissolving bacteria; Denitrifying bacteria; Alkaline phosphatase activity; Dehydrogenase activity

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30170007); Chinese Academy of Sciences (KZCX1-SW-12)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel 86-10-62527118; Fax 86-10-62652317; E-mail liusj@sun.im.ac.cn; liuzhp@sun.im.ac.cn

Received : 14 October 2005/Accepted : 5 December 2005/Revised : 6 April 2006