

一株曲霉 *Aspergillus 2TCiF2* 溶解磷矿粉的动态

赵小蓉 林启美 赵紫鹃 李保国

(中国农业大学 资源与环境学院, 北京 100094)

摘要 研究了在液体纯培养条件下, 磷矿粉用量对一株曲霉 *Aspergillus 2TCiF2* 菌株溶磷活性的影响及其动态变化。结果表明, 磷矿粉的用量超过 20 g L^{-1} 时, 溶磷量显著降低 ($P < 0.05$), 溶磷率由低于 2 g L^{-1} 时的 100% 降至 50 g L^{-1} 时的 7%。磷矿粉的用量为 10 g L^{-1} 时, 在培养初期菌体生长缓慢, 第 3 天才迅速生长, 溶磷活性也急剧提高, 第 14 天后几乎没有溶磷活性, 培养液的 pH 在第 3 天开始下降, 第 5 天降至最低并维持在 pH 4 左右。培养过程中有机酸分泌也发生变化, 前期主要分泌柠檬酸和乙酸, 后期主要为乙酸和苹果酸。

关键词 曲霉 *Aspergillus 2TCiF2*; 磷矿粉; 溶磷动态

中图分类号 Q 939.96; S 153.6

文章编号 1007-4333(2003)03-0043-04

文献标识码 A

Dynamics of rock phosphate solubilization by *Aspergillus 2TCiF2*

Zhao Xiaorong, Lin Qimei, Zhao Zijuan, Li Baoguo

(College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The effect of the rock phosphate concentration in the media on phosphate-solubilizing activity and the dynamics of rock phosphate solubilization by one isolate of *Aspergillus 2TCiF2* were studied under liquid pure culture conditions. The results showed that the solubilization capacity was significantly reduced when more than 20 g rock phosphate was added into one liter of the medium. The solubilization rate decreased from 100% at the rock phosphate concentration of $< 2 \text{ g L}^{-1}$ to 7% at the concentration of 50 g L^{-1} . The fungus initially grew very slowly and had very low activity of solubilizing the rock when the rock concentration was 10 g L^{-1} . The activity increased sharply after the third day following fast growth. However, the fungus had hardly the solubilization activity after 14 d incubation. The pH of the medium decreased at the third day incubation. It reached to the lowest level at 5th day and maintained at about pH 4. The organic acid production also changed during the 21 d incubation. The fungus produced citric acid and acetic acid during early growth, but acetic acid and malic acid at later stage.

Key words *Aspergillus 2TCiF2*; rock phosphate; dynamic of phosphate solubilization

天然磷矿粉是磷肥的主要来源, 可直接作为磷肥施用到酸性土壤, 但碱性土壤的效果一般很差, 如果接种某些溶磷微生物, 也有较好的效果^[1]。即使施用可溶性磷肥, 由于迅速转化为钙、铁、铝等多种难溶性磷酸盐, 磷肥的利用效率一般都低于 25%。近几年, 我国磷肥的施用量不断增加, 土壤出现明显的磷素富集, 导致土壤养分不平衡, 而且磷素流失污染水体。因此活化土壤磷素提高利用效率, 对于农业生产和环境保护具有非常重要的意义^[2]。

微生物可促使磷矿粉分解, 并释放出可溶性磷。

Ghani et al^[3]利用硫杆菌产生的硫酸使磷矿粉中的磷释放出来, 其可浸提磷比不处理增加 9~15 倍。我们曾将微生物与磷矿粉一起进行固体发酵, 发现可将磷矿粉中 3% 左右的磷释放出来。利用生物溶解磷矿粉, 生产具有生物活性的磷肥, 不仅节省硫酸等工业原材料, 而且还避免对环境的污染。

研究表明, 在为数众多的溶磷微生物中, 曲霉的溶磷活性很高^[4]。我们的研究也表明, 曲霉不但有较强的溶解磷矿粉的活性, 而且还有较强的溶解难溶性磷酸铝、磷酸铁的能力^[5]。本研究选择溶磷能

收稿日期: 2002-11-21

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1999011803)

作者简介: 赵小蓉, 博士研究生; 林启美, 教授, 博士生导师, 主要从事土壤和环境微生物生态学研究, E-mail: linqm@cau.edu.cn

力较强的一株曲霉,分析磷矿粉用量对其溶磷活力的影响,同时了解其溶磷的动态变化和原理,为进一步探讨微生物对磷矿粉施用的作用机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

为本研究室从土壤中分离得到的溶磷能力较强的曲霉 *Aspergillus* 2TGF2^[5]。

1.2 培养基

1) 菌株活化培养基: PDA 固体培养基。

2) 摇瓶液体培养基: 蔗糖 10.0 g, KNO₃ 0.76 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.03 g, 蒸馏水加至 1 L, pH 7.0 ~ 7.5; 磷矿粉 (< 0.018 mm) 用量分别为 0、1、2、5、10、20 和 50 g L⁻¹。

1.3 磷矿粉用量对溶磷的影响

将在 PDA 平板上培养 7 d (28 ℃) 的曲霉 2TGF2 菌株制备成孢子悬浮液 (10⁶ cfu · mL⁻¹), 取 1 mL 接种于 50 mL 含不同质量浓度磷矿粉的液体培养基中, 28 ℃ 下旋转振荡培养 (160 r · min⁻¹) 7 d 后, 将培养液过滤, 测定菌体质量。滤液在 4 ℃ 下离心 (9 000 g) 20 min, 测定上清液的含磷量和 pH。同时做不接种对照。重复 4 次。

1.4 溶磷动态

取 1 mL 孢子悬浮液, 接种于 50 mL 液体培养基中, 磷矿粉用量为 10 g L⁻¹, 28 ℃ 下旋转振荡培养 (160 r · min⁻¹) 21 d, 于 0、1、3、5、7、9、11、14、17 和 21 d 取样, 将培养液过滤, 测定菌体质量。滤液在 4 ℃ 下离心 (9 000 g) 20 min, 测定上清液的含磷量、pH 和有机酸种类及含量。同时做不接种对照。重复 4 次。

1.5 测定方法

上清液磷含量用钼锑抗比色法测定, 溶磷量为扣除对照值, 用 P mg L⁻¹ 表示, 溶磷率为 100 g 磷矿粉所溶解出来的水溶性磷量。培养液的 pH 用 pH S-29A 测定, 有机酸用岛津 LC-10A 高效液相色谱测定 (紫外检测器 SPD-10A, 柱箱 CTO-10A), 色谱条件: 分析柱 RP-ODS-C18; 检测波长 214 nm; 流动相为 pH 2.23 磷酸二氢钾缓冲液; 流速 0.7 mL · min⁻¹; 柱温 27 ℃。菌体质量用烘干法测定, 先用滤纸过滤, 并用蒸馏水冲洗 3 次, 于 80 ℃ 烘 8 h, 冷却后称重, 用 mg · mL⁻¹ 表示。磷矿粉全磷含量 (P) 用 1 HNO₃ 测定, 为 10.3%^[6]。

2 结果与讨论

2.1 磷矿粉用量对溶磷活性和菌体生长的影响

磷矿粉用量对 *Aspergillus* 2TGF2 的溶磷量影响显著: 低于 20 g L⁻¹ 时, 溶磷量随着磷矿粉用量的增加而增多, 峰值达 490 mg L⁻¹, 继续增加磷矿粉到 50 g L⁻¹ 时, 其溶磷量逐渐降低到 400 mg L⁻¹ 左右。随着磷矿粉加入量的增加, 溶磷率从磷矿粉用量为 < 2 g L⁻¹ 时的 100% 降至 50 g L⁻¹ 时的 7% 左右 (图 1)。

Narsian & Patel^[4] 也发现真菌 *Aspergillus aculeatus* 的溶磷量随着磷矿粉加入量的增加而降低, 溶磷活性最高时的磷矿粉用量为 P₂O₅ 0.5 g L⁻¹。Asea et al^[7] 报道不同青霉菌株对培养基中磷矿粉用量的敏感程度不同, 且与 N 源有关: 当以 NH₄⁺ 为 N 源时, 随着磷矿粉质量浓度的增加, *Penicillium bilaji* 溶磷活性降低, 而 *Penicillium fuscum* 溶磷活性增强; 当以 NO₃⁻ 为 N 源时, 磷矿粉用量从 1 g L⁻¹ 增至 2 g L⁻¹ 时, 溶磷活性增强。

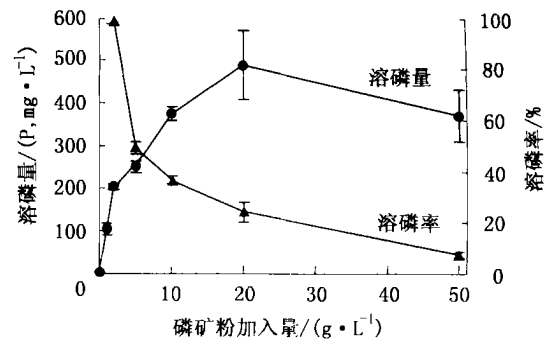


图 1 磷矿粉加入量对 2TGF2 溶解磷矿粉的影响

Fig. 1 Effect of rock phosphate addition on phosphate solubilization by 2TGF2

张永奎等^[8]报道磷矿粉用量超过 20 g L⁻¹ 时, 由于氟浓度增加而抑制细菌 *Hst* 的生长, 溶磷量大幅度降低。本研究发现菌体生长确实受到磷矿粉用量的影响 (图 2), 磷矿粉用量低于 5 g L⁻¹ 时, 随着磷矿粉用量增加, 菌体生长量增加。说明当磷矿粉用量少时, 菌体生长受缺磷的限制, 当提高磷矿粉的用量时, 菌体大量生长。但继续增加磷矿粉的用量直至 50 g L⁻¹ 时, 菌体质量没有显著变化, 说明菌株生长所需的磷已足够, 而磷矿粉中其他成分也没有对 *Aspergillus* 2TGF2 造成危害。

赵小蓉等^[9]报道微生物的溶磷量与生长量没有直接关系, 本研究也验证了这一结论。虽然当磷矿

粉用量超过 20 g L^{-1} 时, 供试菌株的溶磷量大幅度降低, 但其菌体生长量并没有发生显著的变化。

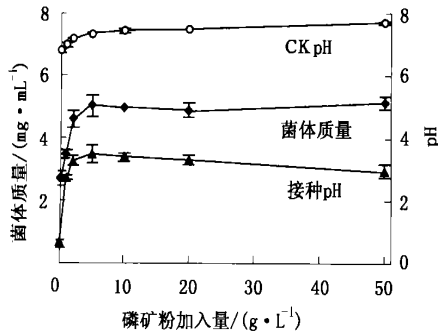


图 2 磷矿粉加入量对 2TGf2 生长及 pH 的影响
Fig. 2 Effect of rock phosphate addition on 2TGf2 growth and the medium pH

磷矿粉的化学组成主要是 Ca、Mg、Na、P、C、O 和 F 等元素, CaO 占 56% 左右。微生物在代谢过程中产生质子和有机酸等物质, 通过交换、水解、络合、螯合等反应, 使磷矿粉分解, 释放出磷酸盐, 同时也释放出钙、镁、钠等离子, 其水解将使培养液的酸度降

低。磷矿粉加入量从 1 g L^{-1} 增至 2 g L^{-1} 时, 培养液的 pH 升高^[8]。本研究也得到类似的结果, 培养液的 pH 值随着磷矿粉用量的增加而提高, 超过 5 g L^{-1} 时, 培养液的 pH 值基本保持在 5 左右(图 2)。

2.2 溶磷动态

在培养开始 3 d 内, 曲霉 2TGf2 生长非常缓慢, 第 3 天时菌体质量只有 0.06 mg mL^{-1} , 但第 5 天骤增至 2.49 mg mL^{-1} , 以后不再生长。磷的释放在培养 3 d 后直线增加, 第 14 天时达到 631.21 mg L^{-1} , 在此期间, 每天的溶磷量为 74.72 mg L^{-1} , 以后的 7 d 培养期间, 几乎没有磷的释放(图 3)。这说明该菌株的溶磷活性表现在 3~14 d 培养期间, 在以后的培养期间, 可能由于碳源物质耗竭, 菌体不再生长繁殖。Molla et al^[10]对 9 株细菌和 1 株放线菌进行了 15 d 的培养, 发现 *Bacillus* sp. 等一些细菌的溶磷能力在 11 d 达到高峰, *Streptomyces* sp. 放线菌 15 d 后仍呈上升趋势。Illmer & Schinner^[11]也发现溶磷量不是平稳地上升, 而是表现出明显的波动, 微生物的溶磷能力与其生长并不完全吻合。

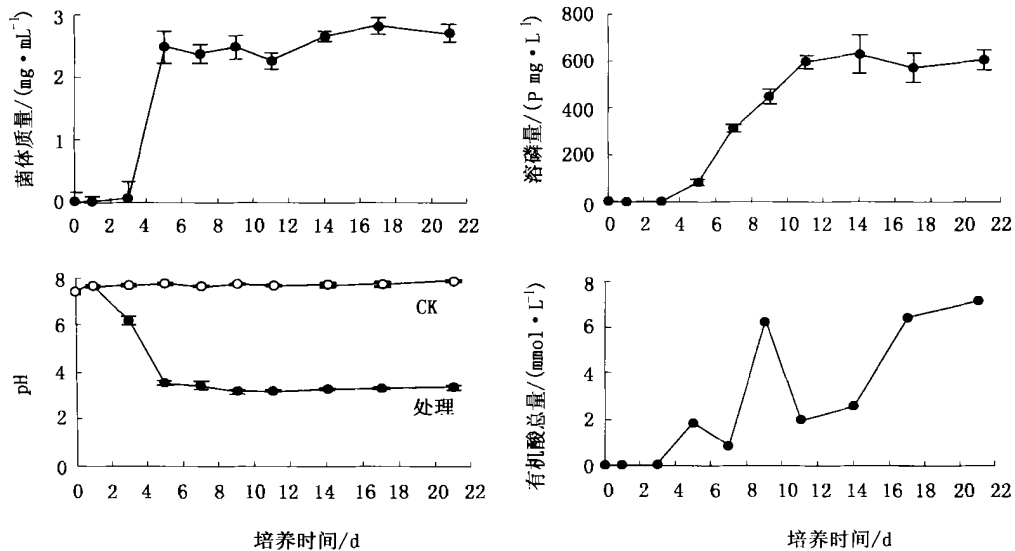


图 3 曲霉 2TGf2 溶磷动态

Fig. 3 The dynamics of the phosphate solubilization capacity of *Aspergillus 2TGf2* during 21 d incubation

培养液的酸度也随培养时间而变化, 并且基本上与菌体生长吻合。第 1 天培养液的 pH 变化很小, 第 3 天降至 6.24, 第 5 天降低到 3.59, 以后基本不变(图 3)。菌体生长基本停止, 菌体仍然在消耗和分泌有机酸, 并且分泌有机酸的种类发生了巨大的变

化。培养期间, 菌体在不同生长阶段分泌的有机酸的种类和数量有明显变化(图 3, 表 1), 有机酸总量随着培养时间的延续而增加, 5 d 前主要产生柠檬酸和乙酸, 但以后主要产生乙酸和苹果酸, 尤其是乙酸的产生量在第 9 天就达到 4.52 mmol L^{-1} , 虽然第

11天又降低到 1.19 mmol L^{-1} ,但以后又有所上升,培养结束时达到 6.52 mmol L^{-1} 。在此期间还产生其他有机酸,但数量很少。显然,菌株在培养期间因蔗糖的耗竭转而利用所分泌的有机酸,同时可能发

生有机酸代谢的变化。Vassilev et al^[12]发现在能源物质缺乏时, *Aspergillus niger* 能够利用柠檬酸, Salle^[13]报道微生物能够利用简单的碳水化合物、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、乳酸、醋酸和草酸。

表1 曲霉 2TGf2 分泌有机酸的种类及分泌量

培养时间/d	苹果酸	乳酸	乙酸	顺丁烯二酸	柠檬酸	丁二酸	反丁烯二酸	有机酸总量
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0.058	0	0	0.058
5	0	0	0.722	0	1.147	0	0.004	1.873
7	0.705	0.114	0	0.005	0	0	0	0.825
9	1.251	0.492	4.519	0.017	0	0	0	6.280
11	0.580	0	1.187	0.029	0	0.218	0	2.014
14	0.285	0	2.269	0.029	0	0	0	2.583
17	0.394	0	5.834	0.028	0.181	0	0	6.438
21	0.388	0.186	6.516	0.035	0.060	0	0	7.185

3 结论

曲霉 2TGf2 溶解磷矿粉的能力受培养基中磷矿粉浓度的影响,过多的磷矿粉会降低菌株溶解活性。培养期间菌株分泌大量的有机酸,某些有机酸可作为碳源物质而被再利用。菌株生长量与其溶磷量并不完全吻合,生长量在培养的第5天达到最大值,而溶磷量在第14天左右才达到最高峰。

参 考 文 献

- [1] Azcon J M, Barea J M, Hayman D S. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria [J]. Soil Biol Biochem, 1976, 8: 135~138
- [2] Brookes P C. Loss of phosphorus in drainage water [A]. In: Tunney H, Carton O T, Brookes P C, et al. Phosphorus Loss from Soil to Water [C]. UK: Biddles Ltd, 1998. 253~273
- [3] Ghani A, Rajan S S S, Lee A. Enhancement of phosphate rock solubility through biological processes [J]. Soil Biol Biochem, 1994, 26: 127~136
- [4] Narsian V, Patel H H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer [J]. Soil Biol Biochem, 2000, 32: 559~565
- [5] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 溶磷菌对4种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 250~255
- [6] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 166~185
- [7] Asea P E A, Kucey R M N, Stewart J W B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil [J]. Soil Biol Biochem, 1988, 20: 459~464
- [8] 张永奎, 王安, 陈茂春, 等. 细菌分解磷矿粉探索研究 [J]. 矿产综合利用, 2000, (6): 32~34
- [9] 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]. 植物营养与施肥学报, 2002, 8(2): 197~204
- [10] Molla M A Z, Chowdhury A A. Microbial mineralization of organic phosphate in soil [J]. Plant and Soil, 1984, 78: 393~399
- [11] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms [J]. Soil Biol Biochem, 1995, 27(3): 257~263
- [12] Vassilev N, Baca M T, Vassileva M, et al. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium [J]. Appl Microbiol Biotech, 1995, 44: 546~549
- [13] Salle A J. 细菌学基本原理 [M]. 黄梧芳, 张镜宇, 曹晖译. 北京: 科学出版社, 1964. 208~212