

高效溶磷黑曲霉菌株筛选、溶磷机制及其条件的研究

汤树德 石晶波 高强俊

(黑龙江八一农垦大学, 密山)

为了使土壤和肥料中的磷更有效地利用, 通过定向筛选的高效溶磷黑曲霉 AN2-7 菌株, 可进行高比例磷矿粉的固体发酵或菌液溶浸的方法制成生物磷肥。或将其孢子粉直接接种土壤, 进行大豆盆栽试验及黑曲霉溶磷机制和条件试验, 现报道如下。

材 料 和 方 法

用 pH3.0 的草酸-糖-无机盐琼脂平板培养基, 分离黑曲霉菌株。磷含量的测定用喹钼柠

酮容量法测定。柠檬酸含量的测定用五溴丙酮比色法。草酸的测定采用草酸钙-高锰酸钾滴定法。磷矿粉用湖北省荆襄产品(含全磷 16.5%, 水溶磷 0.28%、枸溶磷 1.42%)和摩洛哥产品(含全磷 33.5%、水溶磷 0.55%、枸溶磷 6.94%)。

结 果

一、AN2-7 菌株溶磷效率和肥效

1. 溶磷效率: 结果见表 1, 磷矿粉加入量

表 1 不同菌株的溶磷效率(1978)

结 果 菌株代号	项 目	终 pH	水相 P_2O_5 (毫克/100 毫升)	滤渣枸溶 P_2O_5 (毫克/毫升)	有效磷总和		培养天数
					毫克/毫升	百分数	
无菌对照		5.50	0.32	2.45	2.8	100	4
M ₃₁		2.49	59.8	27.9	87.7	3132	4
FO ₂₈		1.50	58.8	42.4	101.2	3614	4
AN2-7		1.24	94.5	44.0	138.5	4946	4

表 2 磷肥中有效磷的分析*(1979)

结 果 发酵 产物 名称	项 目	水溶 P_2O_5 (%)	枸溶 P_2O_5 (%)	有效磷总和 (%)
固体发酵产物 I		2.35	11.93	14.28
固体发酵产物 II		2.45	12.87	15.32
液体发酵产物		0.66	15.43	16.09

* 固体发酵产物 I: 有机材料: 矿粉=1:1; 固体发酵产物 II: 有机材料: 矿粉=1.5:1; 液体发酵物中矿粉占菌液量 20%, 以新鲜材料计算。

为 2%。

表 1 说明, AN2-7 菌株具有产酸力强、溶

磷率高的特点。它生长快、抗污染力强, 可以利用农村产品和下脚料(如麸糠、秸秆、麦草、糟渣、粉渣、酒糟)作碳、氮源生长。它可通过固体发酵或液体发酵制得磷肥。其有效磷分析结果见表 2。

2. 大豆盆栽结果: 盆栽肥效试验结果见表 3。

表 3 说明, 生物磷肥对大豆生长和产量的效果比对照为高, 能显著地促进大豆根系和有效根瘤着生。AN2-7 菌孢子粉可同玉米秸粉和磷矿粉直接播于盆土中。

二、黑曲霉菌溶磷机制的探讨

实验表明, 在高比例矿粉发酵物中枸溶磷

表 3 磷肥对大豆生长和产量影响*(1979)

项目 不同处理	植株地上部分	根部干重	有效瘤干重	叶绿素含量	相对产量
	干重(克/株)	(克/株)	(克/株)	(%)	
无肥(对照)	1.154	0.661	—	1.804	100
磷矿粉(荆襄产)	2.060	0.500	0.030	1.568	127
过磷酸钙	1.945	0.579	0.039	1.846	137
玉米秸+磷矿粉	1.180	0.445	0.047	1.818	151
玉米秸+磷矿粉+AN ₂₋₇	2.498	0.900	0.204	2.068	168
菌液溶浸生物磷肥	2.103	0.773	0.103	2.056	134
固体发酵生物磷肥	2.180	0.866	—	2.034	146

* 以全磷计算施磷量为 P₂O₅ 0.2625 克/公斤干土;玉米秸用量为 2%;大豆品种为钢 6634-7-8,盛花期调查。

表 4 AN₂₋₇ 菌静止培养的溶磷效率(1979)

项目 矿粉量 (%)	水相 P ₂ O ₅		残渣枸溶 P ₂ O ₅		有效磷总和		磷转化率 (%)
	mg/100ml	矿粉基准 (%)	mg/ml	矿粉基准 (%)	mg/100ml	矿粉基准 (%)	
0.5	168.0	33.6	5.7	1.10	173.7	34.74	00
1.0	236.5	23.7	16.7	1.67	253.2	25.32	72.4
1.5	270.0	18.0	17.6	17.6	287.6	19.17	44.7
2.0	216.0	18.3	24.7	24.7	241.2	12.08	17.5

占有效磷 88.9—93.7%;水溶磷很少。而在低量矿粉发酵物中,水溶磷占有效磷的 87.9—93.8%,见表 4,试验 30℃静止培养 7 天。

说明随发酵产物中矿粉比例增高,水溶磷含量降低、枸溶磷变幅度很小,转化率急剧下降。

我们认为,黑曲霉的溶磷过程,起初可能主要产物是水溶性一价磷酸盐,但在过量矿粉存在下,一价磷酸盐和矿粉中的三价磷酸盐继续反应生成枸溶性二价磷酸盐。

我们认为黑曲霉的溶磷过程,是以有机酸

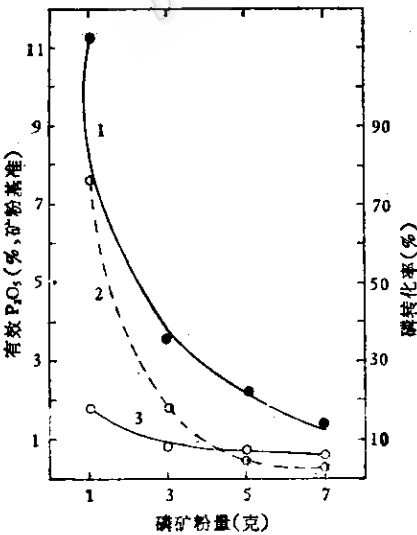


图 1 草酸溶液浸提磷矿粉的结果

1.水相磷, 2.磷转化率, 3.滤渣枸溶磷

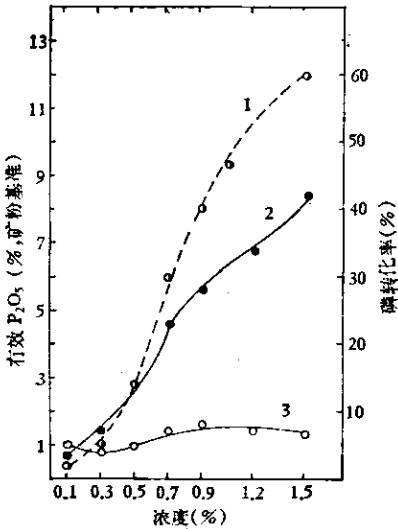


图 2 不同浓度草酸溶液的溶磷率

1.磷转化率, 2.水相磷, 3.滤渣枸溶磷。

表5 不同 pH 值对溶磷效率的影响*(1978)

结果项目 菌株	起始 pH	水相 P_2O_5 (mg/100ml)	滤渣溶 P_2O_5 (mg/100ml)	有效磷总和 (mg/100ml)	磷转化率 (%)
AN2-7	5.5	189.5	2.6	186.1	42.7
	7.5	227.8	2.5	230.3	58.6
FO28	5.5	270.0	8.1	278.1	78.1
	7.5	310.0	13.6	323.6	95.6
G_2B_3	5.5	120.0	25.5	145.5	27.1
	7.5	210.0	16.3	226.3	65.1

* AN2-7 菌静止培养 7 天, FO28 和 G_2B_3 静止培养 10 天后加 1% 矿粉溶浸 24 小时。

的酸解为主的化学反应平衡过程, 其溶磷效率决定于有机酸的产率及其化学反应平衡常数。

为了证明上述推论, 我们以 1% 草酸溶液 100ml 分别浸提 1.3.5.7 克磷矿粉, 结果见图 1。

结果表明, 黑曲霉的溶磷过程是以有机酸的酸解为主导的化学反应过程, 其溶磷效率决定于有机酸的产率及反应的平衡常数。酸解反应是一个可逆的反应, 在溶磷反应进行过程中, 还存在着络合和沉淀的反应, 并促进溶磷作用。

用 10 株黑曲霉菌株的溶磷实验证明, 不同菌株的溶磷效率同其培养物中草酸含量呈正相关 ($r = 0.9326$, $P < 0.01$)。用不同浓度草酸溶液浸提 2 克磷矿粉, 35℃ 平衡 24 小时测定, 结果见图 2。

三、黑曲霉 AN2-7 的草酸代谢和溶磷条件

1. pH 对草酸代谢和溶磷效率的影响: 提高培养基的起始 pH 值可促进草酸的生成^[1,3]。结果见表 5。

据报道, pH 值低于 5.5 时生成草酸脱羧酶可将草酸转化成甲酸和水^[2]。所以在培养基中添加碳酸钙, 避免 pH 值急剧下降, 有利于溶液中大量积累草酸钙, 见图 3。

2. 磷矿粉添加时间对黑曲霉溶磷效率的影响: 在黑曲霉的培养过程中, 加入磷矿粉取代

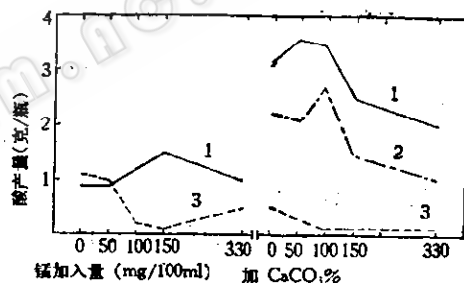


图3 不同条件下有机酸的产量(AN2-7 静止培养)

1. 草酸总量, 2. 草酸钙量, 3. 柠檬酸量

碳酸钙, 可大幅度提高溶磷率, 见表 6。

3. 锰离子对产有机酸的影响: 在培养黑曲霉过程中加入适量锰离子, 可抑制柠檬酸合成,

表6 磷矿粉添加时间对 AN2-7 菌生长和溶磷的影响(1979)

结果项目 处理	菌丝体干重 (克/瓶)	分生孢子 生长量	终止 pH	水相 P_2O_5		溶磷率	
				mg/100ml	矿粉基准 (%)	测定值	对照
无菌加20%磷矿粉	—	—	6.00	132	0.66	100	—
培养终加20%磷矿粉	2.67	++++	1.80	322	1.61	244	100
接种时加20%磷矿粉	1.35	+	3.22	634	3.17	480	197
分次加磷矿粉	2.03	++	3.10	1340	6.70	1015	416

注: 30℃静止培养 10 天。

同时可促进草酸生成。图 3 表明, 培养液中草酸产率和锰离子浓度呈正相关, 与柠檬酸呈负相关, 有碳酸钙存在时, 锰离子的效应则显著减少。而用 1% KMnO_4 溶液代替自来水调节固体发酵材料水分时, 也能提高发酵产物中枸溶性磷的含量 5.4—7.3%。

4. 发酵时间和温度对溶磷效率的影响: 试验表明, 菌液直接溶浸矿粉, 如增高溶浸温度, 能提高溶磷速率。而在相同溶浸温度时, 随溶浸时间的延长, 其溶磷效率也明显提高。在固体发酵 30°C 条件下, 发酵 3 周比 2 周有效磷高

27.1%, 而以结晶松散的高品位磷矿粉发酵只提高有效磷量 5.7%。说明溶磷化学反应的平衡时间同磷矿粉结晶组成和品位有紧密联系。

参 考 文 献

- [1] V. W. Cochrane: *Physiology of Fungi*, 陈驹声等译, 真菌生理学, 科学出版社, 北京, 1963 年, 第 132 页。
- [2] H. J. Rehm: *Industrielle Mikrobiologie*, 徐浩译, 工业微生物学, 科学出版社, 北京, 1975 年, 第 301、328 页。
- [3] С. П. Костынев: *Избранные Труды по физиологии и биохимии микроорганизмов II*, 周丰译, 微生物的生理学生物化学著作集, 第二卷, 科学出版社, 北京, 1964 年, 第 142 页。