

高效分解磷尾矿粉复合微生物菌剂的制备

范志平^{1,2}, 王修俊^{1,2*}, 程艳波², 曲源²

(1. 贵州大学 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州大学 化学与化工学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为了制备能够高效分解磷尾矿粉的复合微生物菌剂, 对具有较好解磷效果的黑曲霉、乳酸菌、醋酸菌和巨大芽孢杆菌进行复配, 并对复配后的解磷效果进行研究。结果表明, 上述 4 种菌的最佳复合配方为黑曲霉 5%、乳酸菌 4%、醋酸菌 3%、巨大芽孢杆菌 5%, 在此条件下, 分解后的磷尾矿粉速效磷含量为 2 442.50 mg/kg, 磷转化率达到 78.7%, 明显优于单菌株解磷效果。

关键词: 磷尾矿粉; 发酵; 解磷; 复合微生物

中图分类号: TQ442 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)11-0072-04

Preparation of Compound Microorganisms with Efficient Decomposition of Phosphate Tailings Powder

FAN Zhi-ping^{1,2}, WANG Xiu-jun^{1,2*}, CHENG Yan-bo², QU Yuan²

(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy,

Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The proportion and phosphate-dissolving effect of compound microorganisms which were composed of *Aspergillus niger*, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria and *Bacillus megaterium* were studied. The results showed that the optimal proportion of compound microorganisms was as follows: *Aspergillus niger* 5%, lactic acid bacteria 4%, acetic acid bacteria 3% and *Bacillus megaterium* 5%. Under this condition, the content of dissolved phosphorus was 2 442.50 mg/kg, and the phosphorus conversion rate reached 78.7%, which was better than the single strain.

Key words: phosphate tailings powder; fermentation; phosphate-dissolving; compound microorganisms

我国是磷矿盛产大国, 但是 80% 磷矿为中低品位^[1-2], 为了满足湿法磷酸工艺对原料矿石的品位要求, 通过各种选矿技术对磷进行富集, 每生产 1 t 磷精矿, 将产生 0.44 t 尾矿^[3-5], 由于尾矿没有太大的经济价值, 每年被大量丢弃, 造成巨大的资源浪费, 环境也受到了严重的破坏^[6-7]。

目前, 世界上对磷尾矿的二次回收主要采用稀酸浸出法, 该法成本较高, 且磷回收率较低^[8]。因

此, 探寻回收磷尾矿的新方法显得尤为重要。迄今未见关于采用生物发酵法回收磷尾矿的有关报道。为此, 本研究以磷尾矿为主要原料, 并辅以水稻秸秆和酱油渣废弃资源, 在酱油渣提供氮源、秸秆利于培养基透气且提供有机质的条件下, 利用具有较好解磷效果的微生物黑曲霉、乳酸菌、醋酸菌和巨大芽孢杆菌对磷尾矿粉进行发酵解磷^[9], 确定 4 种菌株的最佳解磷复合配方, 制备出解磷复合微生物菌剂, 为

收稿日期: 2013-01-17

基金项目: 贵州省科技厅社会发展科技攻关项目(黔科合 SY[2010]3041)

作者简介: 范志平(1988-), 男, 四川眉山人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品发酵。E-mail: 416374232@qq.com

* 通讯作者: 王修俊(1965-), 男, 贵州铜仁人, 教授, 博士, 主要从事发酵工艺方面的研究。E-mail: wangxiujun678@sohu.com

后期生产含磷生物肥料提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 黑曲霉、乳酸菌、醋酸菌均由贵州大学贵州省发酵工程与生物制药重点实验室提供,巨大芽孢杆菌由中国工业微生物菌种保藏中心提供。

1.1.2 发酵原料 磷尾矿粉(含磷量 3 103.8 mg/kg)^[9]由贵州瓮福(集团)有限责任公司提供,水稻秸秆采自贵阳市郊农田,酱油渣由贵阳市味苑园食品有限公司提供。

1.1.3 主要培养基 黑曲霉种子液培养基采用 PDA 培养基;乳酸菌种子液培养基采用 MRS 液体培养基;醋酸菌种子液培养基:葡萄糖 10 g,酵母膏 10 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 0.5 g,水 1 000 mL,无水乙醇 35 mL;巨大芽孢杆菌种子液培养基:氯化钠 5 g,牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,水 1 000 mL,pH 值 7.0。

1.1.4 主要试剂 磷酸二氢钾产自天津市福晨化学试剂厂,钼酸铵产自天津市化学试剂四厂,酒石酸锑钾产自成都金山化学试剂有限公司,浓硫酸产自遵义高等师专化学试剂厂,盐酸、硝酸、无水乙醇购自重庆川江化学试剂厂,左旋抗坏血酸产自天津市大茂化学试剂厂,2,4-二硝基酚产自天津市科密欧化学试剂厂,蛋白胨购自上海博微生物科技有限公司,硫酸锰购自成都金山化学试剂有限公司,琼脂购自杭州微生物试剂有限公司,氯化钠购自天津市巴斯夫化工有限公司,柠檬酸购自重庆川东化工有限公司,偏钒酸铵产自天津市化学试剂四厂。

1.1.5 主要仪器及设备 生化培养箱产自上海博讯实业有限公司医疗设备厂,净化工作台购自上海索谱仪器有限公司,恒温恒湿箱产自上海博讯实业有限公司医疗设备厂,手提式压力蒸汽消毒器产自北京市永光明医疗仪器厂,电子天平购自上海良平仪器仪表有限公司,精密酸度计购自上海虹益仪器仪表有限公司,恒温振荡器购自常州澳华仪器有限公司,722 分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司,台式离心机产自上海安亭科学仪器厂,马福炉产自洛阳市永泰实验电炉厂。

1.2 解磷菌发酵解磷试验

分别称取在 105 ℃下烘干至恒质量的磷尾矿粉 5 g、酱油渣 5 g、水稻秸秆粉 5 g,置于 250 mL 三角瓶中,加入无菌水 35 mL,在手提式压力蒸汽消毒器

中 121 ℃灭菌 20 min,冷却,在超净工作台中接种解磷菌菌液。接种后置于 30 ℃培养箱中培养 72 h,然后测定 pH 值和速效磷含量。

1.2.1 解磷菌接种量的单因素试验 在灭菌后的装有磷尾矿粉、酱油渣和水稻秸秆粉的三角瓶中,按 1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 接种量分别接入黑曲霉、乳酸菌、醋酸菌和巨大芽孢杆菌,然后置于 30 ℃培养箱中培养 72 h,测定 pH 值和速效磷含量。

1.2.2 解磷菌接种量的正交试验 在单因素试验结果的基础上,对黑曲霉、巨大芽孢杆菌、乳酸菌、醋酸菌 4 种菌的接种量进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定最佳接种量组合。

1.3 固态发酵培养基 pH 值的测定

将发酵后的培养基搅拌均匀取出,称取 1 g 于小烧杯中,加入 10 mL 无菌水,浸泡,测定 pH 值。

1.4 固态发酵培养基中速效磷含量的测定

参照文献[10]中的方法进行速效磷含量的测定,具体方法如下。

1.4.1 试样溶液制备 称取 5.00 g 发酵后的培养基置于 250 mL 三角瓶内,加入 100.0 mL 25 ℃的 2% 柠檬酸溶液,加塞,在 25 ℃下振荡 30 min,用无磷滤纸过滤到干燥的三角瓶中,弃去最初的少量滤液,用无磷活性炭脱色,得到无色清液。同一试样做 3 个平行测定。以不加发酵后培养基的清液为空白溶液。

1.4.2 磷标准曲线 分别吸取 50 $\mu\text{g/mL}$ 的磷标准溶液 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL 置于 7 个 50 mL 容量瓶中,加入等体积的去离子水,加水至 30 mL,加入 2 滴 2 g/L 的 2,4-二硝基酚指示剂溶液,用 100 g/L 氢氧化钠溶液和 5% 硫酸溶液调节溶液至刚呈微黄色,加入 10.0 mL 钒钼酸铵试剂,摇匀加水定容,获得含磷 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。在室温(15 ℃以上)条件下,放置 20 min(最长不超过 4 h),于 440 nm 波长处测定吸光度。磷质量浓度 C ($\mu\text{g/mL}$)和吸光度 A 之间关系为 $A = 4.7032C + 0.033(R^2 = 0.9994)$ 。

1.4.3 速效磷含量测定 吸取 2.00 mL 试样溶液放入 50 mL 容量瓶中,加水至 30 mL,然后按照 1.4.2 方法进行。速效磷含量 $= (C \times V \times D) / m$,其中, C 为磷质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$); V 为显色液体积,50 mL; D 为分取倍数,即试样提取液/分取体积,100/2; m 为样品质量(g)。

1.5 对比试验

按照 1.2 配制固态发酵培养基,根据正交试验确定的最佳复合菌接种量接种复合菌菌液,30℃ 发酵 72 h,测定速效磷含量,以不接种复合菌的固体培养基作为空白试验组,测定发酵前后培养基的 pH 值;在固态发酵培养基中不加磷尾矿粉,接种复合菌菌液后于 30℃ 发酵 72 h,测定速效磷含量,同时以不接种复合菌且不加磷尾矿粉的固体发酵培养基作为空白试验组。

2 结果与分析

2.1 解磷菌接种量的单因素试验结果

2.1.1 黑曲霉接种量 由图 1 可知,随着黑曲霉接种量的增加,速效磷含量先增加后下降,当接种量增加至 5% 时,速效磷含量最高,为 2 248.27 mg/kg。这是因为黑曲霉在发酵过程中产生了柠檬酸等有机酸,其与 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 等离子螯合而使难溶性磷酸盐溶解。因此,黑曲霉接种量以 5% 为宜。

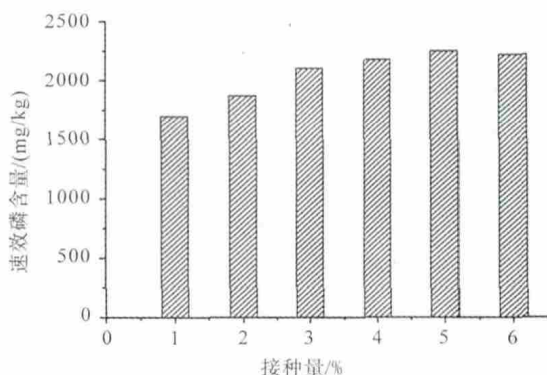


图 1 黑曲霉接种量对解磷效果的影响

2.1.2 乳酸菌接种量 由图 2 可知,随着乳酸菌接种量的增加,速效磷含量先逐渐增加后微幅下降,当接种量增加至 3% 时,速效磷含量最高,为 2 016.75 mg/kg。这是因为乳酸菌在发酵过程中产生乳酸等有机酸使难溶性磷酸盐溶解。因此,乳酸菌接种量以 3% 为宜。

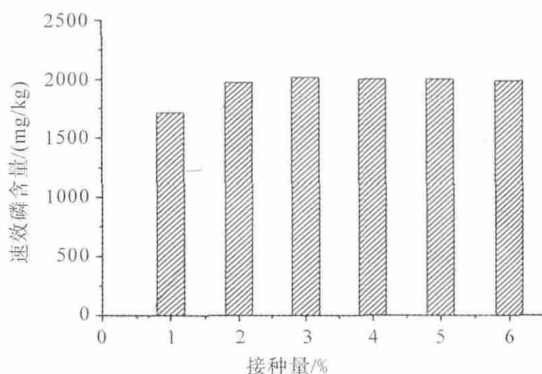


图 2 乳酸菌接种量对解磷效果的影响

2.1.3 醋酸菌接种量 由图 3 可知,随着醋酸菌接种量的增加,速效磷含量先增加后微幅下降,当接种量增加至 3% 时,速效磷含量最高,为 1 727.20 mg/kg。这是因为醋酸菌在发酵过程中产生醋酸等有机酸将难溶性磷酸盐溶解。因此,醋酸菌接种量以 3% 为宜。

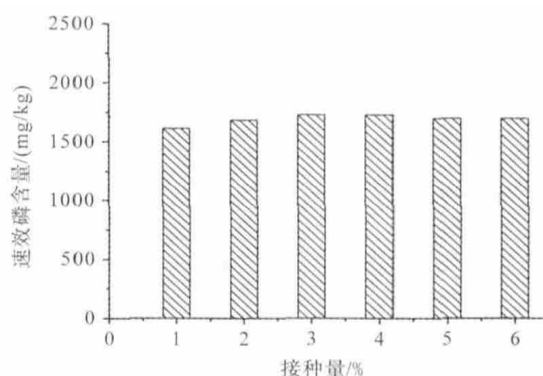


图 3 醋酸菌接种量对解磷效果的影响

2.1.4 巨大芽孢杆菌接种量 由图 4 可知,随着巨大芽孢杆菌接种量的增加,速效磷含量先增加后微幅下降,当接种量增加至 4% 时,速效磷含量最高,为 2 031.19 mg/kg。这是因为巨大芽孢杆菌在发酵过程中产生有机酸溶解难溶性磷酸盐。因此,巨大芽孢杆菌接种量以 4% 为宜。

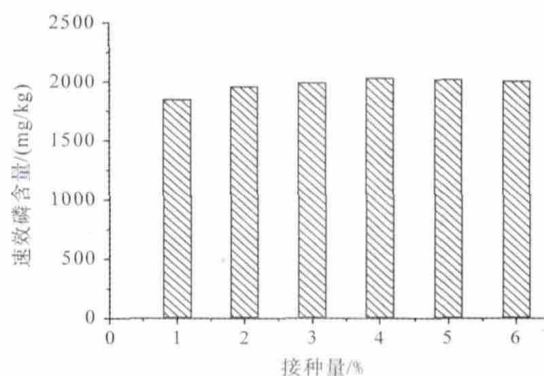


图 4 巨大芽孢杆菌接种量对解磷效果的影响

2.2 解磷菌接种量的正交试验结果

由表 1 和表 2 可知,黑曲霉接种量对复合菌解磷效果的影响最大,达显著水平,其次是乳酸菌接种量和巨大芽孢杆菌接种量,醋酸菌接种量对复合菌解磷效果影响最小,最佳组合为黑曲霉 5%、乳酸菌 4%、醋酸菌 3%、巨大芽孢杆菌 5%,在此条件下进行验证试验,3 次测得速效磷含量分别为 2 441.37、2 442.61、2 443.52 mg/kg,平均值为 2 442.50 mg/kg,均高于表 1 中的试验结果。

表 1 解磷菌接种量的正交试验结果

试验号	因素				速效磷含量/(mg/kg)
	黑曲霉接种量/%	乳酸菌接种量/%	醋酸菌接种量/%	巨大芽孢杆菌接种量/%	
1	4	2	2	3	2 105.62
2	4	3	3	4	2 161.51
3	4	4	4	5	2 204.85
4	5	2	3	5	2 422.12
5	5	3	4	3	2 407.65
6	5	4	2	4	2 436.50
7	6	2	4	4	2 306.27
8	6	3	2	5	2 392.93
9	6	4	3	3	2 393.02
k_1	2 157.327	2 278.003	2 311.683	2 302.097	
k_2	2 422.090	2 320.697	2 325.550	2 301.427	
k_3	2 364.073	2 344.790	2 306.257	2 339.967	
R	264.763	66.787	19.293	38.540	

表 2 解磷菌接种量的正交试验方差分析结果

变异来源	偏差平方和	df	F 值
黑曲霉接种量	116 209.740	2	195.650*
乳酸菌接种量	6 863.668	2	11.556
醋酸菌接种量	593.966	2	1.000
巨大芽孢杆菌接种量	2 919.917	2	4.916
误差	593.97	2	

注: * 表示在 0.05 水平上差异显著。

2.3 对比试验结果

由图 5 可知,磷尾矿粉经复合菌发酵分解后,速效磷含量较未接种复合菌处理显著增加了 1 196.95 mg/kg。

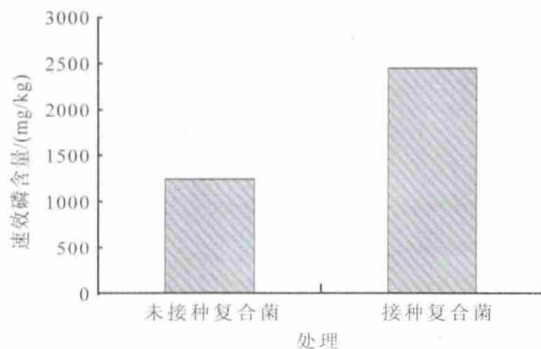


图 5 2 种处理含尾矿粉培养基的速效磷含量

由图 6 可知,发酵后培养基 pH 值有所降低,这主要是因为复合菌发酵产生有机酸。

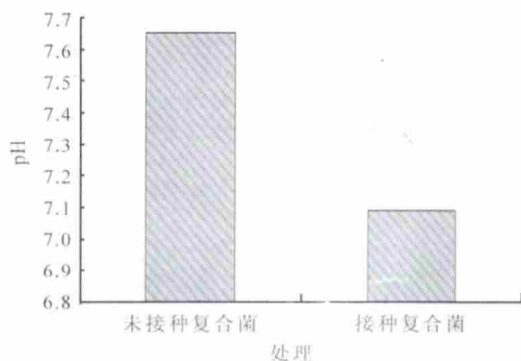


图 6 2 种处理培养基的 pH 值变化

由图 7 可知,复合菌分解了秸秆和酱油渣中的部分有机磷。由图 5 和图 7 对比可知,复合菌主要分解的是磷尾矿粉中的难溶性无机磷,在生长繁殖过程中也分解了酱油渣和水稻秸秆中的有机磷。

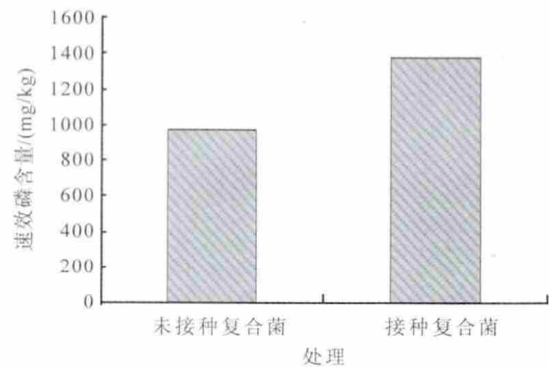


图 7 2 种处理无尾矿粉培养基的速效磷含量

3 结论

本研究结果表明,4 种菌的最佳复合配方为黑曲霉 5%、乳酸菌 4%、醋酸菌 3%、巨大芽孢杆菌 5%,接种发酵后速效磷含量为 2 442.50 mg/kg,磷尾矿中磷的转化率达到 78.7%,明显优于单菌株解磷效果。通过不接复合菌和不加磷尾矿粉对照试验,发现复合菌在固态发酵过程中主要分解磷尾矿粉中的无机磷,同时微生物生长代谢过程中也分解了水稻秸秆和酱油渣中的有机磷,固态发酵后 pH 值较发酵前略有下降。

本研究利用生物法处理磷尾矿粉生产含磷生物肥料,并利用了水稻秸秆和酱油渣 2 种废弃资源,成本低,不污染环境,并且能实现变废为宝,具有较高的研究价值和开发利用前景。

参考文献:

- [1] 孙洪丽,刘全军,林文军.我国磷矿发展现状及可持续性发展[J].云南冶金,2006,35(4):13-15.
- [2] 曲源,王修俊,邱树毅,等.有效微生物解磷工艺研究[J].广东农业科学,2010(10):97-98.
- [3] 黄芳,王华,李军旗,等.高镁磷尾矿的物性测试和研究[J].化工矿物与加工,2009(10):6-8.
- [4] 贺周初.我国磷资源开发利用现状与发展方向探讨[J].矿冶工程,2012,32(6):128-131.
- [5] 高晓明,胡宏,解田.瓮福高镁低品位磷尾矿渣工艺特性的研究[J].贵州化工,2010,35(6):4-6.
- [6] 王金玲,叶力佳,申士富.选磷尾矿中磷的综合回收[J].中国有色金属,2012(22):66-67.
- [7] 李露莉,邱树毅,王义娟,等.一株黑曲霉转化低品位磷尾矿能力的研究[J].中国农学通报,2010,26(20):335-338.
- [8] 黄芳.高镁磷尾矿回收利用磷、镁的应用基础研究[D].昆明:昆明理工大学,2010.
- [9] 曲源.基于生物技术的磷资源利用:含磷生物肥料的研制[D].贵阳:贵州大学,2011.
- [10] 马桂英,王修俊,牛立群,等.酱油渣降解磷尾矿粉的条件优化[J].广东农业科学,2011(23):104-106.