

文章编号: 1000-4734(2009)01-0103-06

一株黑曲霉对磷矿石的风化作用

谌书^{1, 2}, 刘丛强², 连宾²

(1 西南科技大学 固体废物处理与资源化省部共建教育部重点实验室, 四川 绵阳 621010)

(2 中国科学院 地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 以一株分离于植物根际土壤且有较强溶磷能力的真菌研究其对磷矿石的风化作用。对该菌株的 ITS 序列进行 PCR 扩增及序列测定后, 再结合该菌株的形态特征对其进行鉴定, 结果为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。用 ICP-OES 测定培养液中的 Ca^{2+} 浓度, 磷钼比色法测定可溶性磷的含量, 电子探针、透射电镜和能谱仪分析菌株作用后的残留物。培养液中的 Ca^{2+} 浓度由第 3 天的 10.02 mg/L 增加到第 30 天的 217.61 mg/L, 可溶性磷的浓度由第 3 天的 5.37 mg/L 增加到第 30 天的 921.37 mg/L。风化过程中形成了大量的次生矿物草酸钙, 大分子有机物形成的生物膜以及菌丝体穿插破坏矿物颗粒促进磷矿石的风化。表明该菌株对磷矿石有较强的风化能力, 黑曲霉生长产生的生物物理破坏作用和胞外分泌物的生化降解作用是引起磷矿石风化的主要因素。

关键词: 溶磷真菌; 磷矿石; 风化作用; 鉴定

中图分类号: P593 Q39.9; S151 **文献标识码:** A

作者简介: 谌书, 男, 1975 年生, 博士, 讲师, 主要从事环境微生物研究。E-mail: chenshu@163.com

微生物在自然界普遍存在, 其在营养元素的生物地球化学循环以及生物非必需元素的活化与固定中起相当重要的作用^[1]。磷矿石作为地球上最重要的含磷矿产资源, 其主要矿物组成是磷灰石。研究微生物对磷矿石的风化作用对认识磷的生物地球化学循环、土壤的形成与演化、土壤肥力的形成、植物的矿物营养研究中有重要意义。微生物对磷矿石的风化作用主要有微生物代谢产物造成矿物的风化溶解^[2-6], 络合作用^[7-9]和微生物的数量增多或体积增大而导致的矿物风化作用等^[5-11]。磷矿石属不可再生资源, 大规模的磷矿开采造成资源逐年减少, 而磷矿开采产生的废弃物也给生态环境带来严重影响。微生物溶解矿物具有能耗低、污染小的特点^[12], 尝试利用微生物作用的方式来解决磷矿资源开发利用与环境保护相矛盾的问题更具有经济与社会意义, 但前提必须弄清微生物与磷矿石相互作用的机制与过程。微生物对磷矿石的风化作用与所用菌种及环境条件密切相关。目前, 磷矿石的微生物风化过程中

生物物理作用的研究关注不多^[13-14]。本文利用一株分离自植物根际有较强溶磷能力的真菌研究其对磷矿石的风化作用。探讨真菌对磷矿石风化作用机制, 分析风化作用过程中的生物物理作用。为磷矿石的开发利用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 磷矿石

磷矿石采自贵州省开阳县, 磷矿石经岩石薄片显示磷灰石矿物以椭球状集合体形式存在, 颗粒大小 0.05~0.1 mm 左右, 颗粒支撑和基质支撑, 胶结物为胶磷矿; 磷矿石样品中还含有少量的方解石、粘土矿物等副矿物。根据 X 射线衍射结果得出其矿物组成为: 磷灰石 91.1%; 石英 1.98%, 高岭石 1.7%, 伊利石 2.46%, 蒙脱石 2.45%, 非晶质 0.31%。其化学成分分析见表 1。

收稿日期: 2008-08-06

基金项目: 国家“973”项目(2006CB403200); 中科院知识创新工程项目(KZCX3-SW-140)

表 1 磷矿石的化学成分(%)
Table 1. Element composition of the apatite

CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	TO ₅	MnO ₂	其他
51.37	0.47	0.14	0.31	1.04	0.63	2.90	36.46	0.07	0.05	6.56

1.2 菌种分离纯化与鉴定

从中国科学院地球化学研究所园区内植物根际取土样,在含无机磷的固体培养基上利用稀释平板法分离到多株溶磷性真菌,以培养基上溶磷圈大小为根据(溶磷圈大则溶磷能力强),从中筛选出一株溶磷能力较强的菌株,按菌落及菌丝的形态特征进行初步鉴定;然后对该菌株的 ITS 序列进行 PCR 扩增(ITS 序列引物为 ITS3 和 ITS4),将扩增产物测序,获得的 ITS 序列在 Genbank 中比对^[15],此菌株与 *Aspergillus niger* strain UWFP 515 相似性达到 100%,认定该菌株为黑曲霉(*Aspergillus niger*),此结果提交到 GenBank 此菌株编号为 DQ834378。以上过程所用试剂皆购于 Bio-Rad 公司。

1.3 真菌与矿粉作用

在 250 mL 三角瓶中,加入 100 mL 马铃薯蔗糖培养基及磷矿石粉(过 100 目筛)5 g 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。冷却后,无菌操作接入事先准备好的真菌悬液 1 mL(悬液中孢子数浓度约为 10⁵ mL⁻¹),同时设定不接菌种的对照组,置 25 °C 培养,设 6 个重复。

1.4 Ca²⁺ 浓度及可溶性磷的测定

用电感耦合等离子体—发射光谱仪(美国 Varian 公司 Vista MPX 型, ICP-OES)测定培养液中的 Ca²⁺ 浓度,用磷钼比色法测定培养液中的可溶性磷的质量浓度。

1.5 残留物分析

电子探针及 EDS 分析:风化作用 30 天后的固体残留物经冷冻干燥后,将其分散在导电胶上,在表面喷镀导电碳膜,最后用电子探针及 EDS 仪进行分析(日本岛津 EPMA-1600 型电子探针,仪器的工作参数为:加速电压 25 kV 速流 0.25 nA 扫描二次电子成像;EDS 的工作参数为:加速电压 25 kV 速流 0.45 nA 束斑直径 0.1 μm)。

透射电镜分析:将风化作用 30 天后液体样品充分摇匀,取一小滴液体样品于微筛铜网上,自然凉干后,用透射电镜和能谱仪分析培养液中有物质与矿物间相互作用过程(日本 NEC 公司 JEM-2000 FXII 透射电镜,仪器工作参数:加速电压 160 kV 速流 8.2 μA 能谱仪:Oxford Link ISIS EM-ASID20 扫描成像系统)。

2 结果与讨论

2.1 培养液中 Ca²⁺ 质量浓度和可溶性磷的质量浓度变化特征

每 3 d 取培养液过滤,测定滤液中 Ca²⁺ 质量浓度和可溶性磷的质量浓度。图 1 显示黑曲霉作用下,培养液上清液中主要 Ca²⁺ 和可溶性磷的质量浓度随时间的变化特征。

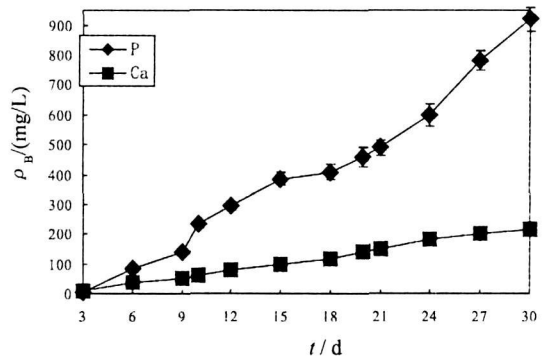


图 1 黑曲霉对磷矿石风化作用过程中 Ca²⁺ 和可溶性磷的质量浓度随时间的变化特征 (n=6 P<0.05)。

Fig. 1. The variation characteristics of the contents of Ca²⁺ and dissolved P in supernatant with time during the process (n=6 P<0.05).

图 1 表明,在此作用阶段内, Ca²⁺ 和可溶性磷的质量浓度均随着培养时间的增加而增加, Ca²⁺ 质量浓度由第 3 天(第一次取样)时的 10.02 mg/L(处理组浓度减去相应对照组浓度)增加到第 30 天的 217.61 mg/L,可溶性磷的质量浓度由第 3 天时的 5.37 mg/L 增加到第 30 天的 921.37 mg/L。

White law 等人^[5]研究 *Penicillium radicum* 对不同的磷灰石的溶解作用时发现, 当作用到第 20 天时, 从 CaHPO_4 溶出的可溶性磷的质量浓度达到 475 mg/L 。通过比较可认为黑曲霉在此培养条件下对磷矿石有较强的风化能力。

2.2 固体残留物的电子探针扫描分析

对未经黑曲霉作用和经黑曲霉作用 30 天后的残体进行电子探针扫描及 EDS 分析, 结果见图 2。

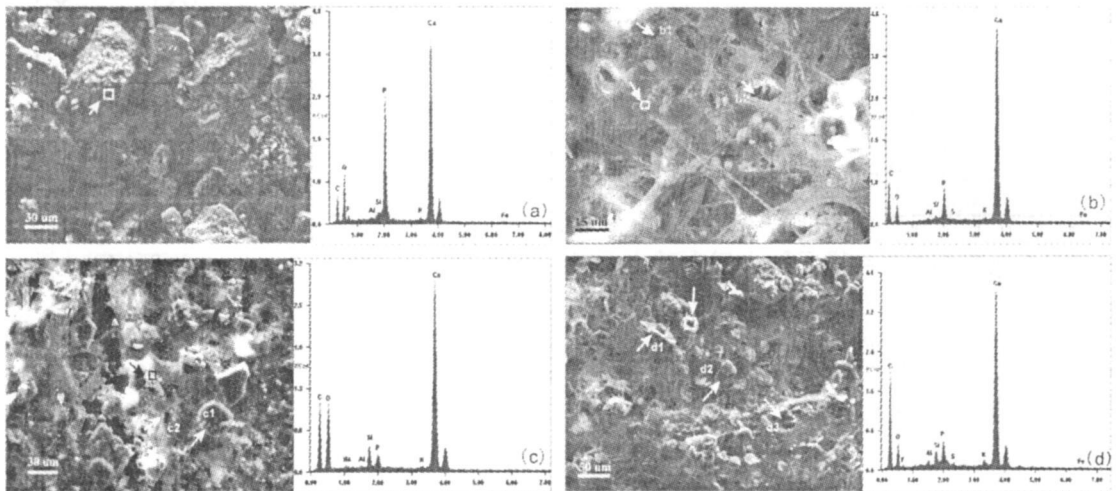


图 2 菌体矿物复合体的电子探针及相应 EDS 图 (图中箭头所指矩形区为能谱仪分析区)。

(a) 未经作用的矿粉; (b-d) 作用 30 天后形成的菌体矿粉复合体

Fig. 2 Electron probe and EDS images of the compounds of *mycelium* and minerals (The rectangle area represents EDS analytic point). a illustrates unprocessed mineral powder, b-d illustrates processed mineral powder after 30 days.

图 2 (a) 表示未经作用的磷矿石粉, 矿粉颗粒的棱角分明, 大小不等, 且大的矿粉颗粒较多。图 2 (b-d) 为直接风化作用后的扫描图, 从图可以看出: 矿粉颗粒被菌丝紧紧的包裹; 黑曲霉生长产生的分泌物将矿粉颗粒胶连, 矿粉颗粒呈现出已无规则状。大颗粒矿石表面被分泌物溶蚀, 形成较多如图 2 (b) 中 b2 和图 2 (d) 中 d3 样的溶蚀坑, 菌体矿物复合体中形成较多细小的溶蚀洞, 增加了黑曲霉菌丝及其代谢物与其它矿石颗粒接触的面积。从图 2 (b) 和图 2 (c) 可发现较多大小规则成串状的颗粒体, 如图 2 (b) 的 b1 和图 2 (c) 的 c1 和 c2 处, 分布在矿石颗粒与菌丝体周围。b1 和 c2 处的串状颗粒穿过溶蚀洞缠绕住矿石颗粒; c1 处的串状颗粒穿过大的矿石颗粒后伸向其它矿石颗粒; 图 2 (c) 中能谱仪分析区域的串状颗粒包裹矿石颗粒。经能谱仪分析球状颗粒, 其结果是类似于草酸钙的次生矿物。草酸钙的生成与 Burford 等人研究真菌对矿物岩石的生物风化作用时次生矿物的生成促进风化的结论一致^[1]。草酸钙颗粒的排列比较规则, 产生此现象的原因

是菌丝体处于生长期时, 附着在菌丝体上, 当菌丝体解体后, 也就保留原来的存在形态, 该结果是此次研究中的新发现。因而, 可从串状次生矿物的分布形态推测菌丝对矿粉颗粒的机械破坏作用过程: 即串状次生矿物穿透矿粉颗粒进行破坏作用 [图 2 (b), 图 2 (c)]; 串状次生矿物缠绕在矿石颗粒上, 可认为菌丝体和大分子有机物形成的生物膜将矿石包裹而溶蚀矿物; 这是菌丝对矿物进行生物物理破坏作用的佐证。图 2 (d) 中颗粒经能谱仪成分分析可推测为草酸钙晶体颗粒 (图 2 (d) 中方框区域为能谱分析区), 它以扁平的盘状形态出现, 因此可认为黑曲霉成因的草酸钙有多种形态, 有盘状、球状 [图 2 (d) 中 d2] 等。Waner 和 Haack^[16] 研究水体环境中金属迁移转化的生物地球化学控制作用时, 认为矿物结晶与水体环境中有机物种类, 环境条件等有关。因此, 形成草酸钙不同晶形的原因可能与黑曲霉不同的生长时期的代谢分泌物, 培养环境有密切相关。真菌作用形成的草酸钙在生物化学和地球化学作用过程中有重要的影响, 一方面它可成为生态系统中的钙库,

另一方面它可能对磷的生物地球化学循环产生重要影响^[8 17 18]。

2.3 培养液中有有机成分与矿物间的相互作用过程的透射电镜分析

黑曲霉与磷矿石粉风化作用 30天后, 培养液

中有机成分与矿物间相互作用的微观过程如图 3 所示: 首先, 矿物被生物膜包裹; 然后, 菌丝体和大分子有机物风化剥蚀矿物; 之后, 菌丝体与矿物进一步发生相互作用。

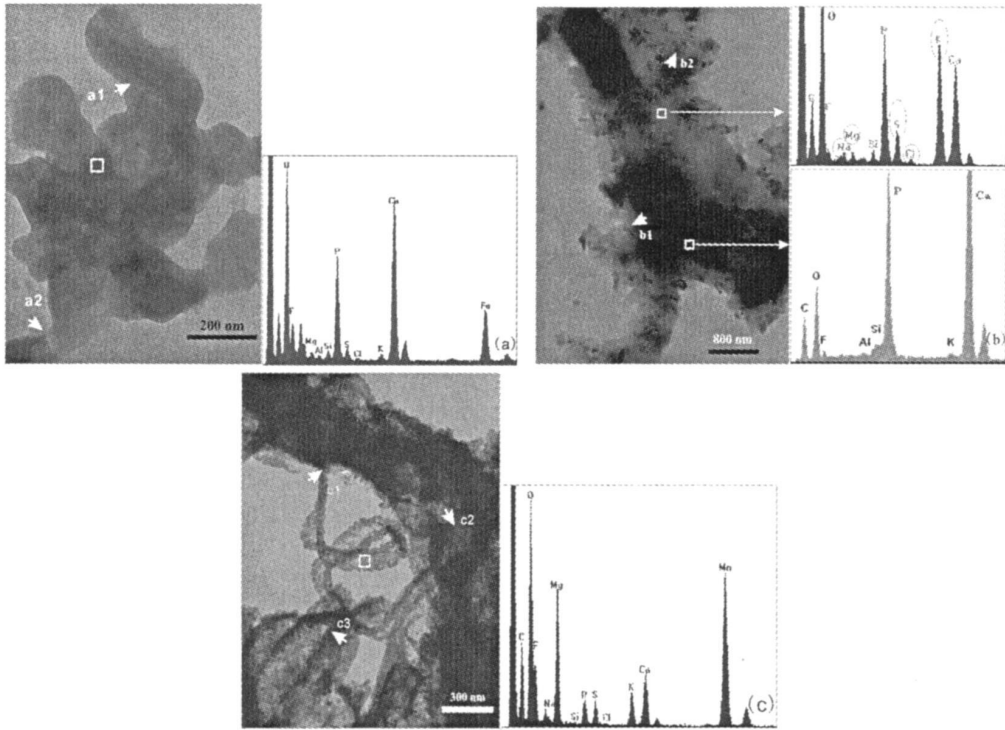


图 3 黑曲霉对矿物风化过程透射电镜照片 (图中矩形区为能谱仪分析区):

a 矿物被生物膜包裹; b 菌丝体和大分子有机物风化剥蚀矿物; c 菌丝体与矿物相互作用过程

Fig 3 TEM micrographs of weathering of phosphorite rock by fungi (The rectangle area represents EDS analytic point). a minerals enclosed by biofilm; b minerals suffering from weathering denudation by mycelium and macromolecular organic compounds; c mycelium eroded minerals

图 3 (a) 表示矿物被黑曲霉分泌的大分子有机物如多糖类物质包裹形成生物膜, 生物膜内对矿物进行风化作用, 图中颜色较深处为矿物成分 (右边为方框区域的能谱图, 分析表明其主要成分为磷灰石, 其中铁元素的含量相对较高), 颜色较浅处为有机成分, 矿物已呈现出无规则状; 图中 a₁ 处显示柱状形的磷灰石矿物已被有机物完全包裹。Jaya Singh et al. 和 Seneyra 研究了不同的溶磷真菌和细菌对磷灰石的溶解, 发现能形成生物膜的微生物溶解磷灰石的能力强, 因此生物膜的形成将促进矿物的风化^[19]。图 3 (a) 中 a₂ 显示出矿物晶体被有机物交联的状态。

图 3 (b) 表示菌丝体及黑曲霉分泌物风化剥蚀矿物的过程, b₁ 处显示有机物从矿物边缘处风化剥蚀矿物晶体, 产生出大量且小的剥落碎片, 剥落碎片与大分子有机物充分混合; b₂ 处为菌丝体穿插矿物晶体, 将大的矿物晶体风化剥蚀成小碎屑块, 菌丝体以及有机物将碎屑块交结成团。图 3 (b) 右边为方框区域的能谱图, 图中 P 和 K 含量相对较高, 且出现了磷矿石能谱图 (图 3 b 右下部所示) 上不存在的 Na, Mg, Si, S 和 Cl 元素, 这些元素都是生物体生长所需, 因而可认为生物有机成分与溶蚀的矿物成分形成了菌体-矿物复合物。

图 3 (c) 表示菌丝体与矿物晶体相互作用的

微观过程, 9 和 2 处显示出菌丝穿插矿物晶体, 其中部分菌丝体缠绕矿物晶体进行破碎作用; Jong'an 等研究结果认为真菌菌丝能伸入钾长石矿物颗粒中促成矿物孔洞的形成^[20]。菌丝表面有较多的 10~20 μm 的小颗粒, 对菌丝体附着的小颗粒物进行能谱分析(图 9 右下部分所示), 结果表明其中 Mn 和 Mg 的质量含量较高, 但不知其矿物类型, 可能是菌丝体外鞘的组成成分^[21], 其作用是增强菌丝的抗压能力, 利于菌丝的机械破坏作用。

通过黑曲霉对磷矿石风化的微观过程的分析, 表明菌丝体和大分子有机物形成生物膜以及菌丝体的机械破坏和剥蚀作用是造成磷矿石风化的重要原因。

3 结 语

(1) 以风化作用时培养液中离子浓度的变化

特征及风化过程的微观分析表明, 黑曲霉对磷矿石有较强的风化作用。

(2) 黑曲霉分泌的胞外大分子物质可直接或间接地促进矿物风化, 一方面通过胞外大分子物质的络合作用直接破坏矿物晶格中的某些化学键, 如草酸钙的大量产生, 促进了磷的释放和钙积累; 另一方面胞外大分子物质对矿粉颗粒的黏附作用也有利于矿物的风化。

(3) 黑曲霉菌丝体的生物物理作用是造成矿物风化的重要因素。其中菌丝的穿插破碎矿物以及菌丝和分泌物形成生物膜包裹矿物等是以往研究所关注不够的地方。

总之, 黑曲霉生长产生的生物物理破坏作用和胞外分泌物的生化降解作用是引起磷矿石风化的主要因素。

参 考 文 献:

- [1] Burford E P, Fomina M, Gadd G M. Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals [J]. *Mineral Magazine* 2003, 67: 1127-1155.
- [2] 郑少奎, 杨敏, 关晓辉, 等. 矿石之微生物脱磷机理的初步研究 [J]. *高校地质学报*, 2000, 6(2): 345-348.
- [3] 林启美, 王华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探 [J]. *微生物学通报*, 2001, 28(2): 26-30.
- [4] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展 [J]. *土壤肥料*, 2001, 3: 7-11.
- [5] Whiteley M A, Harden T J, Healy K R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum* [J]. *Soil Biology and Biochemistry* 1999, 31: 655-665.
- [6] Nahas E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1996, 12: 567-572.
- [7] Drever J I, Stillings L L. The role of organic acids in mineral weathering [J]. *Colloids Surface* 1997, 120: 167-181.
- [8] Gadd G M. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes [J]. *Advances in Microbial Physiology* 1999, 41: 47-92.
- [9] Anna R, Bård M D L, Andøy F S T, et al. Mycelial growth and substrate acidification of ectomycorrhizal fungi in response to different minerals [J]. *FEMS Microbiology Ecology* 2003, 47: 31-37.
- [10] Müller B, Bugstaller W, Stasser H, et al. Leaching of zinc from an industrial filter dust with *Penicillium*, *Pseudomonas* and *Corynebacterium*. Citric acid is the leaching agent rather than amino acids [J]. *Journal of Industrial Microbiology* 1995, 14: 208-212.
- [11] Sterfvinger K. Fungi as geobiotic agents [J]. *Geomicrobiology Journal* 2000, 17: 97-124.
- [12] Cameselle C, Ricard M T, Nünz M J, et al. Iron removal from kaolin: Comparison between "in situ" and "two-stage" bioleaching processes [J]. *Hydrometallurgy* 2003, 68: 97-105.
- [13] Money N P. Biophysics: Fungus punches its way in [J]. *Nature* 1999, 401: 332-333.
- [14] Money N P, Howard R J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure and pathogenicity using a new method of turgor measurement [J]. *Fungal Genetics and Biology* 1996, 20: 217-227.
- [15] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res* 1997, 25: 3389-3402.
- [16] Warren L A, Haack E A. Biogeochemical controls on metal behavior in freshwater environments [J]. *Earth Science Reviews* 2001, 54: 261-320.
- [17] Jacobs H, Boswell G P, Rizk K, et al. Solubilization of calcium phosphate as a consequence of carbon translocation by *Rhizoctonia solani*

- [J. FEMS Microbiology Ecology 2002 40: 65-71.
- [18] Jacobs H, Boswell G P, Rizk et al. Solubilization of metal phosphates by Rhizoctonia solani[J. Mycological Research 2002 106: 1468-1479.
- [19] Jayasinghachari H S, Seneviratne G. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal rhizobial biofilms[J. Soil Biology and Biochemistry 2006 38: 405-408.
- [20] Jonnans A G, van Breemen N, Lundsbergundstam U et al. Rock-eating fungi[J. Nature 1997 389: 682-683.
- [21] Jackson S L, Heath IB. Roles of calcium ions in hyphal tip growth[J. Microbiology Review 1993 57: 367-382.

EFFECT OF A STRAIN OF *Aspergillus Niger* ON WEATHERING OF PHOSPHORITE

CHEN Shu², LIU Cong-qiang, LIAN Bi-jia

(1 Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle Ministry of Education
(Southwest University of Science and Technology), Mianyang 621010 China)

2 The State Key Laboratory of Environmental Geochemistry Institute of Geochemistry Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002 China)

Abstract The aim of this study is to examine the effect of a phosphate solubilizing fungus isolated from the rhizosphere of plant on the weathering of phosphorite rock. The fungal ITS sequence was amplified by the PCR method with general primers of ITS₅ and ITS₄ and sequenced. The fungus was identified by the methods of identifying morphologic features and comparing ITS sequences in Genbank. The fungus was *Aspergillus niger*. The supernatant liquid collected at different incubation periods was determined for the concentrations of Ca²⁺ by ICP-OES, the concentrations of soluble phosphorus by the molybdenum phosphorus colorimetric method. The residues were microscopically analyzed by electron probe and TEM. The result indicated the concentrations of Ca²⁺ in the supernatant liquid rose from 10.02 mg/L on the third day to 217.61 mg/L on the 30th day, and the amount of the soluble phosphorus increased from 5.37 mg/L on the third day to 921.37 mg/L on the 30th day. During weathering, many secondary minerals such as calcium oxalate were produced. Biofilm was formed by macromolecular metabolites and fungal mycelium eroded minerals, thus accelerating weathering. The fungal mycelium eroded minerals and accelerated weathering. Based on experimental results, it is concluded that it had a stronger effect on the weathering of phosphorite rock, and the mechanical breakage of the mycelium growth and biodegradation of extra-cellular macromolecules are the main reasons for mineral bio-weathering.

Key words: Phosphate solubilizing fungus; phosphorite rock weathering; identification