

采用固体发酵与微生物浸出相结合利用白云鄂博富钾板岩的方法

郑春丽^{1,2}, 陈敏洁^{1,2}, 袁浩容^{1,2}, 王建英^{1,2}, 张雪峰^{1,2}

(1. 内蒙古科技大学 数理与生物工程学院; 2. 白云鄂博多金属资源综合利用
利用省部共建国家重点实验室, 内蒙古 包头 014010)

摘要:为了解决白云鄂博地区富钾板岩资源生态化利用的问题,采用固体发酵与微生物浸出相结合的方法对富钾板岩的利用进行了研究.研究发现,可以同时制备出固体和液体两种肥料.肥效验证结果表明,液体与固体肥料均能显著提高番茄种子的发芽率及发芽势,MDA_{施肥}在西红柿生长期间的各个时间段都显著低于MDA_{不施肥},说明所生产肥料可显著提高番茄的生长效率并可增加其抗损伤能力,证明用微生物分解白云鄂博地区富钾板岩制备复合肥料是生态、环保、可行的方案.

关键词:微生物浸出;巨大芽孢杆菌;胶质芽孢杆菌;富钾板岩;复合肥料

中图分类号:TF18; X37

文献标志码:A

白云鄂博矿矿产资源丰富,全矿区钾资源总量可达16.74亿吨^[1-3],矿石中不仅含有K、Si等元素,还含有B、Cu、Fe、Zn、稀土等多种微量元素^[2].因此,如何综合利用白云鄂博的富钾板岩是一项意义深远的工作.上海化工研究院,曾利用白云鄂博富钾板岩为原料,通过食盐法实验室制取氯化钾,可使80%的K₂O转变为KCl,再利用KCl-NaCl-H₂O三元体系,可得到90%以上的KCl产品^[4].包钢冶金研究所,曾利用富钾板岩实验生产钾肥,余渣制作白水泥,但制取钾肥的实验因故未进行^[2].贵阳地质化学研究所,通过利用富钾板岩在室内制取矿物复合钾肥的实验,认为白云鄂博含钾岩石是一种农业上有开发前景的资源^[2].综上所述,提取以钾肥为主产品及副产品的研究工作取得了一定的成绩,但各项试验由于能耗大、经济成本核算过高、环境污染大等原因,仍然停留在小型试验阶段.因此,白云鄂博钾资源能否开发利用尚难定论.我们以生态化利用为突破口,采用微生物分解和固体发酵相结合的方法,制取含多种矿物质元素的生物肥料.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

富钾板岩矿粉(来自白云鄂博矿,粉碎后取过74 μm(200目)筛矿粉备用)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*, AS1.459; GIMCC)、胶质芽孢杆菌(*Bacillus muniluginosus*, AS1.231; GIMCC)、EM菌剂(市售)、西红柿种子(超杂20,购自农科院).

1.2 方法

1.2.1 目标微生物的菌液制备

1.2.1.1 巨大芽孢杆菌菌液制备

收稿日期:2014-12-25;修回日期:2015-06-19.

基金项目:国家自然科学基金(51264029);环保公益性行业科研专项项目(201309005);内蒙古青年科技英才支持计划(NJYT-14-B12);内蒙古科技大学创新基金-青年学术骨干培养专项(2014QNGG05);内蒙古自治区科技计划资助项目.

第1作者简介(通讯作者):郑春丽(1979-),女,内蒙古兴安盟人,内蒙古科技大学副教授,博士,研究方向:资源与环境生物学;Email: zhengchunli1979@163.com.

巨大芽孢杆菌接种在固体培养基1中(蛋白胨0.5%、牛肉膏0.3%、NaCl 0.5%、琼脂2%,调pH至7.0~7.2),30℃恒温培养箱中活化2~3d,然后转入液体培养基1中(葡萄糖1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%、NaCl 0.03%、KCl 0.03%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5%,调pH至7.0~7.3),30℃,200 r/min摇床培养5~6d,得到巨大芽孢杆菌菌液^[5-8]。

1.2.1.2 胶质芽孢杆菌菌液制备

胶质芽孢杆菌接种在固体培养基2中(KH_2PO_4 0.02%、 K_2HPO_4 0.08%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、 $\text{NaMO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 微量、酵母膏0.05%、甘露醇2%、 FeCl_3 微量、琼脂1.5%,调pH至7.2),30℃恒温培养箱中活化2~3d,然后转入液体培养基2中(蔗糖1%、酵母膏0.05%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%、 MgSO_4 0.01%、KCl 0.01%、 Na_2HPO_4 0.01%、 CaCO_3 0.1%、调pH至6.8~7.2),30℃,200 r/min摇床培养5~6d,得到胶质芽孢杆菌菌液^[5-8]。

1.2.2 液体和固体复合肥料的制备

肥料制备过程主要为固体堆置发酵、微生物浸出、固液分离三个步骤^[9-10]。固体堆置发酵中,准备4份发酵底物(由矿粉、麦麸和糠的混合物、糖蜜、豆饼粉、EM制剂按一质量比100:75:17:17:15混合均匀)分别放置于4个发酵装置中堆置发酵。微生物浸出中,三个发酵装置中接入发酵底物10%的复合菌剂(复合菌剂分成三种,分别是胶质芽孢杆菌菌液与EM制剂等体积混合,巨大芽孢杆菌菌液与EM制剂等体积混合,胶质芽孢杆菌菌液加巨大芽孢杆菌菌液与EM制剂等体积混合,为保证目标菌液效果,在接入菌液前期采用平板计数法测定三种菌液含菌量,保证目标菌液在使用时有效活菌数均大于或等于100亿cfu/ml),一个发酵装置加入发酵底物10%的蒸馏水(作为空白对照)进行生物浸出,分别编号为“胶质”、“巨大”、“混合”、“空白”。发酵一定时间,固液分离。液体部分抽滤后得到液体肥料,固体部分干燥造粒后得到固体肥料。

1.2.3 矿物质元素含量测定

测量液体肥料中的部分矿质元素含量,K含量测定参考火焰原子吸收分光光度法测量^[11-13],所用仪器为北京普析通用仪器有限责任公司生产的原子吸收分光光度计,型号:TAS-990;P、Si、Ca、Cu、Mn、Fe、Nb、Mg、Ga、La、Ce等元素含量由内蒙古科技大学省部共建重点实验室代测,所用仪器为Thermo Scientific公司所生产的iCAP 6300。

1.2.4 肥效验证

1.2.4.1 液体肥对西红柿种子萌发的影响

选取饱满、均匀西红柿种子30粒,经70%的酒精消毒2min均匀摆放于铺有三层滤纸的培养皿(直径120mm)内,置于微电脑控制光照培养箱(GZX-150BS-III)中,恒温控制25℃黑暗培养^[14]。将处理后的种子分为两组,分别用F H₂O(供试水样,取编号为“混合”试验组的液体肥料稀释100倍得到的液体,pH 6.83)、D H₂O(实验室水样,pH 7.17)处理,分别记为“施液体肥”组和“施蒸馏水”组,每个处理重复3次。按照规范培养12d,期间每天补水1次,用小水壶喷施,直到三层滤纸湿润为止,多余水分用吸管吸取。种子萌发以培根突破种皮为准。从第一粒种子萌发起,每隔24h记录其发芽数、根长(种子贴于滤纸面生长部分)、茎长(种子垂直于滤纸面生长部分),最后测定丙二醛(MDA)含量,MDA含量采用硫代巴比脱酸(TBA)法测定^[15-16]。

1.2.4.2 固体肥拌土盆栽试验

取编号为“混合”试验组的固体肥料作为试验肥料,再取较为贫瘠的黄土经洗涤、消毒、烘干后待用。

取12个花盆(直径180mm)分为2个试验组,分别为“施肥”组和“不施肥”组。按实验肥料与黄土质量比为1:2混合均匀。“施肥”组每个花盆中装入1.5kg混合土样,“不施肥”组每个花盆中装入1.5kg黄土^[17]。每个花盆中接入经70%酒精消毒后的西红柿种子20颗。从种入种子开始起,每隔10d记录其破土苗数、株高,记录时间为50d。每隔10d测量第20~50d叶片丙二醛(MDA)含量。盆栽试验期间不再施肥,每隔2d浇一次水(D H₂O),直到用手指按压土表层有轻微积水现象为止。

1.2.4.3 发芽率及发芽势的测定

发芽种子的标准:在水培实验中,芽长达到种子长度的1/2即为发芽种子,在盆栽实验中种子破土成功即为发芽种子。水培实验中按公式(1)、(2)计算,盆栽试验中按公式(3)、(4)计算^[14]。

$$\text{发芽势}(GE_1)(\%) = \frac{6 \text{ d 发芽的种子数}}{\text{供试的种子数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{发芽率}(GP_1)(\%) = \frac{12 \text{ d 发芽的种子数}}{\text{供试的种子数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{发芽势}(GE_2) = \frac{30 \text{ d 发芽的种子数}}{\text{供试的种子}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{发芽率}(GP_2)(\%) = \frac{50 \text{ d 发芽的种子数}}{\text{供试的种子}} \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与讨论

2.1 液体肥料和编号“混合”固体肥料部分矿物质元素含量

测量编号分别为“胶质”、“巨大”、“混合”、“空白”的4种液体肥料中的部分矿物质元素含量、部分稀土元素含量和稀土总量. 其结果如表1、表2所示.

表1 液体肥料部分矿物质元素含量 mg/L

编号	CK	C _{Cu}	C _{Mn}	C _{Nb}	CP	C _{Si}	C _{Fe}	C _{Mg}	C _{Ca}
巨大	10162.4±152.4	0.064±0.0096	90.38±13.56	0.022±0.0033	26.19±3.93	42.33±6.35	100.1±15.01	627.8±93.73	1.73±0.26
胶质	9129.1±136.9	0.042±0.0063	51.96±7.79	0.023±0.0033	33.48±5.02	64.93±9.74	213.4±32.01	626±93.9	1.49±0.22
混合	10924.0±163.9	0.029±0.0044	40.77±6.12	0.019±0.0029	25.99±3.89	60.89±9.13	165.2±24.78	696.6±104.49	1.82±0.27
空白	8188.8±1228.	0	87.98±13.20	0.015±0.0023	40.78±6.11	56.15±8.4	217.9±32.68	627.8±	1.73±0.26

注:表中为平均值±偏差

表2 液体肥料部分稀土元素含量和稀土总量 mg/L

编号	C _{REO}	C _{Ga}	C _{La}	C _{Ce}
巨大	1.52±0.23	0.021±0.003	0.31±0.05	0.40±0.06
胶质	2.01±0.30	0.014±0.002	0.28±0.04	0.40±0.06
混合	1.77±0.27	0.016±0.002	0.35±0.05	0.56±0.08
空白	1.48±0.22	0.016±0.002	0.29±0.04	0.44±0.07

注:表中为平均值±偏差

由上表可知,液体浸出液中含有较高的K,并还含有Cu、Mn、Nb、P、Si、Fe、Mg、Ca等微量元素,同时还浸出了一定量的稀土元素.说明采用固体发酵、微生物浸出的工艺可以提取出富钾板岩矿石中的有益元素.但是在“空白”组液体肥料中也含有各种金属元素,这可能是由于空白组样品,虽然没有添加巨大芽孢杆菌和胶质芽孢杆菌,但是也添加了EM菌剂,说明在培养过程中,EM菌剂的作用也很大.详细分析各种矿物质元素的释放做如下几点讨论:①对于K的释放,接种单一目标微生物有促进作用,同时接种两种目标微生物促进释放作用更明显.②对于Cu的释放,接种单一目标微生物有促进作用,同时接种两种目标微生物也有促进作用,但接种单一目标微生物促进效果好于同时接种两种目标微生物.③对于Mn的释放,只接种巨大芽孢杆菌促进效果不明显,只接种胶质芽孢杆菌有抑制作用,同时接种两种目标微生物也有抑制作用.④对于Fe的释放,只接种胶质芽孢杆菌促进效果不明显,只接种巨大芽孢杆菌和同时接种两种目标微生物有抑制作用.⑤对于REO的释放,单一接种胶质芽孢杆菌有促进作用,但单一接种巨大芽孢杆菌或同时接种两种目标微生物促进效果不明显.⑥对于Ce的释放,同时接种两种目标微生物有促进作用,但单一接种目标微生物促进效果不明显.⑦对于P的释放,单一接种目标微生物和同时接种两种目标微生物都有抑制作用.⑧对于Nb、Mg、Ca、Ga、La的释放,单一接种目标微生物和同时接种两种目标微生物促进和抑制效果都不明显.

测量编号为“混合”固体肥料中部分矿质元素含量.其结果如表3所示.

表3 编号为“混合”固体肥料部分矿物质元素含量 mg/g

元素	C _{m,K}	C _{m,Zn}	C _{m,Mn}	C _{m,P}	C _{m,Nb}	C _{m,Mo}	C _{m,Cu}
含量	18.715±0.3125	0.3025±0.0212	2.8325±0.075	60.3±3.25	0.1604±0.0005	0.1138±0.0027	0.2078±0.054

注:表中为平均值±偏差

表 4 编号为“混合”固体肥料部分矿物质元素含量

mg/g

元素	$C_{m, Si}$	$C_{m, Mg}$	$C_{m, Ca}$	$C_{m, La}$	$C_{m, Ce}$	$C_{m, Fe}$
含量	0.1272 ± 0.0095	24.24 ± 2.23	57.11 ± 2.934	1.144 ± 0.0325	2.4957 ± 0.0731	67.25 ± 4.075

注:表中为平均值±偏差

2.2 肥效验证

2.2.1 液体肥料验证

为验证液体肥料效果,根据液体肥料矿质元素含量和西红柿种子萌发所需矿质元素含量,将编号为“混合”的液体肥稀释 100 倍得到测试样本。

以发芽势、发芽率为典型指标,研究液体肥料对种子发芽指标的影响,结果如表 3 所示:在水培试验中,种子 $GE_1 F H_2O > GE_1 D H_2O$,且发芽势这一指标存在显著性差异($P < 0.05$),说明 $F H_2O$ 较 $D H_2O$ 能促进了种子的发芽,有效缩短种子的休眠期。但是发芽率和根长这两个指标的差别不大。而在培养后期茎长却有了较大的生长趋势,这可能是由于发芽初期主要是生根的生长,而在发芽初期,西红柿种子主要是物理吸水 and 分解自身营养物质供幼根等基本结构发育,此阶段对外界的营养依靠较少^[14,17],因此,根长这一指标 $F H_2O$ 处理和 $D H_2O$ 无显著性差异。而在后期主要是茎的生长,此期间种子恰好需要大量营养元素^[14,17], $F H_2O$ 中不但含有多种植物生长所必须矿质元素,还含有促进植物生长的稀土元素^[18-19],因此,茎长这一指标 $F H_2O$ 处理和 $D H_2O$ 存在显著性差异, $F H_2O$ 显著促进了茎长的生长($P = 0.05$)。

表 5 种子发芽指标

%

指标	$F H_2O$	$D H_2O$
GE_1	$90.15 \pm 4.11 a$	$56.67 \pm 6.23 a$
GP_1	$90.15 \pm 4.11 a$	$93.33 \pm 5.35 a$

注:表中为平均值±偏差

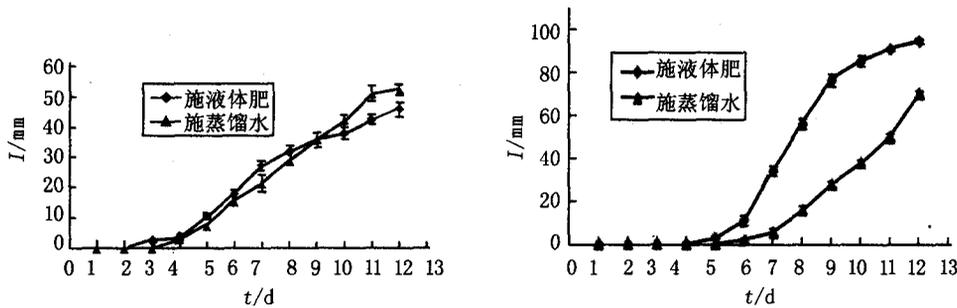


图 1 水培实验中施肥料与不施肥料情况下植物根长、茎生长情况

2.2.2 固体肥料验证

为验证液体肥料效果,用编号为“混合”的固体肥料作为测试样本。

在盆栽试验结果如表 2 所示, GE_2 施肥 $> GE_2$ 不施肥, GP_2 施肥 $> GP_2$ 不施肥,且两个指标都存在显著性差异($P < 0.05$),说明固体肥料可以显著缩短种子休眠期,能促进种子发芽。其主要原因可能是固体肥料中不仅含多种微量元素以及含有稀土元素,并且还含有发酵过程中产生的有机酸和有机质的营养元素^[18-19],其促进种子发芽。并且在西红柿生长期间,“不施肥”组西红柿植株和叶片都有发紫的现象,这可能是缺少各

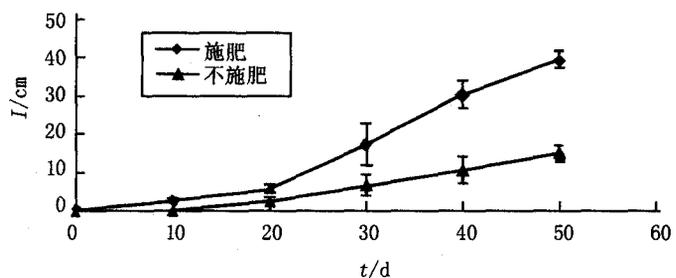


图 2 盆栽实验中施肥料与不施肥料情况下植物株高生长变化情况

种氨基酸的表现^[18],说明“不施肥”组没有给西红柿提供足够的营养元素以用于合成氨基酸,而“施肥”组却可以给西红柿提供足够的营养元素.在生长时间超过50 d后,“不施肥”组西红柿逐渐染病、凋亡,“施肥”组并没有出现染病、凋亡现象,说明此固体肥有助于西红柿抗病.

2.2.3 MDA含量

MDA通常用来表示细胞膜过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱,其含量常用来衡量活性氧清除系统正常代谢与否,可用来间接判断植物所处生长环境的好坏^[14,15,17,19].水培处理12 d幼苗MDA和盆栽试验50 d的植株叶片MDA含量如图三所示.水培试验中,MDA含量这一指标,F H₂O处理和D H₂O存在显著性差异($P=0.05$), $MDA_{F H_2O} < MDA_{D H_2O}$,说明F H₂O提供西红柿种子的生长环境优于D H₂O.盆栽试验中,MDA_{施肥}在西红柿生长期间的各个时间段都显著低于MDA_{不施肥},并且“施肥”组MDA含量比较稳定,随生长时间增加改变不大,而“不施肥”组MDA含量却随生长时间增加而增加.说明“施肥”组提供的生长环境优于“不施肥”组,并且“施肥”组所提供环境随时间改变不大,“不施肥”组所提供环境却随时间改变变得越来越差.

表6 土壤理化指标

样品	mg/L			pH
	$c_{总钾}/(mg/L)$	$c_{总氮}/(mg/L)$	$c_{总磷}/(mg/L)$	
试验肥料	2119.87	556.05	23.80	6.86
黄土	2992.25	62.3	1.18	6.75

表7 种子发芽指标 %

指标	施肥	不施肥
GE ₂	85±5.54 a	15±3.51 a
GP ₂	90.00±7.75 a	20±1.14 a

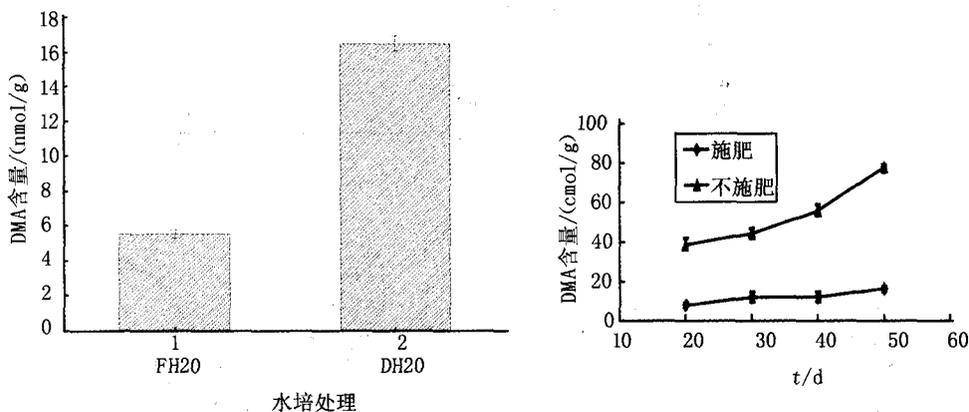


图3 水培与盆栽实验中施肥料与不施肥料情况下丙二醛含量变化情况

3 结论

3.1 本研究发酵产生的液体即制备液体肥料,固体残渣即制备固体肥料,制备过程简单,零排放,是目前最为环保的利用富钾板岩的方式.

3.2 通过液体、固体肥料的验证,表明所制备的液体、固体复合肥料都可以显著缩短西红柿种子休眠期,促进西红柿生长,改善西红柿生长环境,提高西红柿抗病、抗衰老的能力.

3.3 在制备复合肥料的过程中,稀土元素的释放浓度,恰是促进植物生长所需的浓度,因此,稀土元素在肥料中可能起到至关重要的作用,但是具体的作用效果,还需进一步的实验验证.

参 考 文 献

- [1] 马鸿文,杨静,王英滨,等.白云鄂博富钾板岩制取碳酸钾技术的实验研究[G]//中国矿物岩石地球化学学会.2004年全国岩石学与地球动力学研讨会.中国海南海口,2004年全国岩石学与地球动力学研讨会论文摘要集,2004:175-179.
- [2] 史美玲,屈茹.白云鄂博矿产资源概况及开发利用设想[J].科技信息,2012(27):45-46.
- [3] 郭财胜,李梅,柳石刚,等.白云鄂博稀土、铌资源综合利用现状及新思路[J].稀土,2014,35(1):96-100.
- [4] 江苏省丰县钾肥试验.食盐法自钾长石制取氯化钾扩大试验[J].化肥工业,1977(S1):94-96.
- [5] 唐亮,张进忠,于萍萍,等.硅酸盐细菌的分离、纯化、鉴定及生物学特性研究[J].山东农业科学,2008(1):71-73.

- [6] 罗华元,常寿荣,王绍坤,等.云烟高端品牌植烟区根际土壤高效解钾菌的筛选[J].西南农业学报,2011,24(5):1813-1817.
- [7] 胡洲,吴毅歆,毛自朝,等.硅酸盐细菌的分离、鉴定及其生物学特性研究[J].江西农业大学,2013,35(3):609-614.
- [8] 李佳,爱民,王伟,等.几株硅酸盐细菌菌株的分离及解钾、解硅活性[J].湖北农业科学,2013,52(21):5147-5152.
- [9] 连滨.利用低品位含钾岩石生产的生物钾肥及其生产方法[P].中国专利:200810300135,2008.
- [10] 尹升华,吴爱祥,王洪江,等.微生物浸出低品位矿石技术现状与发展趋势[J].矿业研究与开发,2010,30(1):46-49.
- [11] 李力,冯瑞华,关大伟,等.火焰原子吸收法测定微生物肥料中总钾含量的研究[J].中国土壤与肥料,2009(9):87-90.
- [12] 曹勇,沈治荣,杜勇军,等.复混肥料中钾含量的测定——火焰原子吸收光度法[J].化肥工业,2010,37(1):32-35.
- [13] 张岷.复混肥中钾含量测定方法探讨[J].中氮肥,2010(5):34-37.
- [14] 闫红,金君哲,刘洪禄,等.再生水对西红柿发芽及其抗氧化酶系统影响的研究[J].灌溉排水学,2011,30(5):47-51.
- [15] 马书燕,李吉跃,彭祚登.干旱胁迫对柔枝松幼苗丙二醛含量的影响[J].安徽农业科学,2012,40(4):2099-2100.
- [16] 陈旭光,郭相平.石膏粉改良滨海高钠盐粉土及对盆栽西红柿生长、产量和品质影响研究[J].中国农村水利水电,2013(10):169-172.
- [17] 郭道宇,董志,宫辉力,等.再生水对作物种子萌发、幼苗生长及抗氧化系统的影响[J].环境科学学报,2006,26(8):1337-1342.
- [18] 孔跃,于福庆,孙祥武,等.生物有机肥对西红柿生长及品质影响效应初探[J].华北农学报,2007,22(增刊):111-114.
- [19] 周芸.花生施用氨基酸稀土微肥效果试验[J].农业研究与应用,2013(3):20-22.
- [20] 刘起丽,张建新,田雪亮,等.水杨酸类稀土配合物对三种植物病原菌的抑制作用研究[J].稀土,2014,35(1):35-38.

The Method For Solid-state Fermentation Combined with Bioleaching in the Utilization of K-rich Slate

ZHENG Chunli^{1,2}, CHENG Minjie^{1,2}, YUAN Haorong^{1,2}, WANG Jianying^{1,2}, ZHANG Xuefeng^{1,2}

(1. School of Mathematics, Physics and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China; 2. Key Laboratory of Integrated Exploitation of Bayan Obo Multi-Metal Resources, Baotou 014010, China)

Abstract: For eco-utilization of K-rich slate in Bayan obo, we employed solid-state fermentation combined with bioleaching in the utilization of K-rich slate. The results shown that solid and liquid fertilizer can be prepared at the same time. The verification of fertilizer efficiencies shown that these two fertilizers both can improve the germination rate and germination potential of tomato seeds, and MDA being higher when fertilization. It is illustrated that the two fertilizers can improved the growth efficiencies of tomatos and abilities to resist damage. So it is an ecological, environmental friendly and feasible scheme.

Keywords: bioleaching; solid-state fermentation; K-rich slate; fertilizer