

黑曲霉对含钾矿物的解钾作用与机理分析

胡 婕¹, 郁建平¹, 连 宾²

1. 贵州大学 生命科学学院, 贵阳 550025

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, 贵阳 550002

摘 要:通过测定黑曲霉(*Aspergillus niger*)对含钾矿粉的解钾量、黑曲霉作用含钾矿粉后的代谢产物(多糖、蛋白质、小分子分泌物)以及微环境中的 pH 值等,比较静置培养和震荡培养条件下黑曲霉对含钾矿粉的作用效果,并分析震荡培养下黑曲霉对含钾矿粉的风化作用机理。结果显示,震荡培养下黑曲霉对含钾矿粉的转化作用显著大于静置培养,震荡培养下黑曲霉作用含钾矿粉与否导致培养液中的代谢产物以及真菌-矿物聚集体微环境中 pH 值有显著改变。分析表明,黑曲霉生长形成的真菌-矿物聚集体、黑曲霉菌丝生长及其代谢产物、酸性微环境在含钾矿粉转化过程中发挥重要作用;黑曲霉对含钾矿粉的解钾作用应该是多种因素协同作用导致的综合效果。研究结果对完善真菌风化含钾矿物的作用机理,有效利用微生物转化低品位矿物钾技术提供了参考。

关 键 词:黑曲霉;含钾矿物;真菌-矿物聚集体;代谢产物;微环境;钾

中图分类号:P593 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-2802(2011)03-0277-09

Capability and Mechanism of Potassium Releasing from Potassium-bearing Minerals by *Aspergillus niger*

HU Jie¹, YU Jian-ping¹, LIAN Bin²

1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, 550025, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, 550002, China

Abstract: By measuring contents of released potassium, metabolites (polysaccharides, proteins, small molecules) and pH values of the micro-environment in the culture, we compare the difference of *Aspergillus niger*'s capability to release potassium from potassium-bearing mineral powders in static and dynamic cultures, and discuss the mechanism of releasing potassium from potassium-bearing mineral powders in different culture by *A. niger*. The results indicate that the capability of releasing potassium by the fungi in the liquid dynamic culture is significantly larger than that in the liquid static culture, and that metabolites and pH value of the micro-environment are also changed a lot. The analyses indicate that fungal-mineral aggregation, growth of mycelium, metabolites, and acidic microenvironment play important roles in the process of releasing potassium; many combined factors, such as bio-chemical and bio-physical factors resulted from fungal growth, affect the process of potassium releasing from minerals. The results lend a reference to deepen the current understanding of fungal weathering potassium-bearing minerals and to effectively use bio-technology to exploit low grade potassium-bearing minerals.

Key words: *Aspergillus niger*; potassium-bearing mineral; fungal-mineral aggregation; metabolite; micro-environment; potassium

钾是维持生命不可或缺的必需元素,是农作物生长必需的三大要素之一,也是常因供应不足而影响农作物品质的一个重要营养元素。土壤矿物钾一

般占土壤总钾量的 90~98%,不能直接被农作物吸收利用,只有经过漫长的风化作用后才能转变为可被植物吸收利用的有效钾^[1~2]。我国可溶性钾肥资

收稿日期:2011-04-05,05-04 改回

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2008AA06Z108);国家自然科学基金委创优群体资助项目(41021062);中国科学院“百人计划”项目

第一作者简介:胡婕(1985—),女,硕士研究生,研究方向:应用生物化学与生化分离工程。E-mail:jiehu00@163.com.

通讯作者:连宾,研究员,博导。E-mail:bin2368@vip.163.com.

源严重紧缺,钾肥供需矛盾日趋突出,因此开发利用我国储量巨大的低品位钾矿资源受到广泛关注。利用微生物转化矿物钾是一项无污染、低成本、应用前景广阔的技术,可有效缓解我国钾肥紧缺的现状。但微生物转化矿物钾的过程和影响因素多而复杂^[3~7],对微生物转化矿物钾的作用机理研究则是改进生物转化工艺和提高转化效率的重要依据。

目前,微生物对含钾硅酸盐矿物解钾作用机理研究成果已有较多的报道。如:胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)分泌的粘稠多糖与矿物钾的转化密切相关^[7,8];胶质芽孢杆菌分解转化矿物的过程中新合成的蛋白质可能直接参与了矿物的风化作用^[5,9];风化作用是由硅酸盐细菌产生的有机酸水解和络合双重作用所致^[3,10];菌种产生的多种代谢产物协同作用对钾的浸出效果明显要高于单一代谢产物的作用^[4]。胶质芽孢杆菌对硅酸盐矿物解钾作用的“综合效应”虽然能较好的解释硅酸盐细菌的解钾作用机理问题,但有关细菌解钾作用过程的细节仍然需要进一步补充和完善^[11~13]。

Lian et al^[14]研究了烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)对含钾硅酸盐矿物的解钾作用,指出在菌丝体与矿物间相互作用的界面上,可能发生很多能量与物质交换的化学反应,并提出真菌对矿物的风化作用机理包括菌丝体对矿物的吸附、包裹、吸收,菌体与矿物形成有机-矿物聚集体,菌丝体对矿物的蚀刻作用及其代谢产物对矿物的化学降解作用。而黑曲霉(*A. niger*)也已被证实对磷矿石^[15]和蛇纹石^[16]等岩石矿物都有很强的风化作用,是很好的浸矿菌种。本文在这些研究成果的基础上,开展了黑曲霉对含钾矿物解钾作用的研究,并分析黑曲霉-矿物聚集体、黑曲霉菌丝及其代谢产物在活化、转化矿物钾过程中的作用,以期完善真菌风化含钾矿物的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 黑曲霉由中国科学院地球化学研究所环境生物科学与技术研究中心提供。

1.1.2 含钾矿粉 含钾矿物取自贵州省福泉市道平镇,XRD分析其矿物组成,钾长石约占76%;X射线荧光分析其化学组成: K_2O 、 Al_2O_3 、 SiO_2 含量约为9.67%、18.06%、57.75%。粉碎并过200目筛。

1.2 方法

参照查氏培养基组分^[17],去除其中的含钾成分作为基础培养液,即: $(NH_4)_2SO_4$ 0.3 g, Na_2HPO_4

0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g,蔗糖 3 g,超纯水 100 mL。

黑曲霉种子液的制作:100 mL基础培养液中接入1环黑曲霉菌,分别置室温静置培养或震荡培养(28℃,120 r/min)1 d。静置培养制成黑曲霉菌液,设置为种子液1,在接种前先轻轻摇晃三角瓶使菌液均匀;震荡培养制成的黑曲霉菌液,设置为种子液2。

1.2.1 黑曲霉对含钾矿粉作用观察

(1)黑曲霉对含钾矿粉的趋化性和生长特征观察

设置4个对照,A:基础培养液加琼脂(2 g/100 mL)、灭菌后制成平板固体培养基;B:基础培养液、灭菌,制成平板固体培养基,在平板固体培养基右上方散少量已灭菌处理的钾矿粉;C:基础培养液加入KCl(0.12 g/100 mL),加琼脂(2 g/100 mL)、灭菌,然后制成平板固体培养基;D:基础培养液加入钾矿粉(1 g/100 mL),加琼脂(2 g/100 mL)、灭菌,制成平板固体培养基。于各个平板中心接入1环黑曲霉,置28℃培养,分别于第3天和第6天进行观察。

(2)培养液中黑曲霉对钾矿粉的作用特征

静置培养:100 mL基础培养液中加入1 g钾矿粉,灭菌后接入10 mL黑曲霉种子液1,室温静置培养,设为E;

震荡培养:配制3组培养液,F:100 mL基础培养液中加入1 g钾矿粉;G:100 mL基础培养液;H:100 mL基础培养液中加入0.12 g KCl。F、G和H 3组培养液均先灭菌,然后接入10 mL黑曲霉种子液2,28℃,120 r/min振荡培养。

1.2.2 黑曲霉的释钾作用 待测液用针头过滤器(滤膜孔径0.45 μm)过滤,使用6400-A火焰光度计测定滤液中的钾离子浓度^[18~19]。

(1)不同培养方式下黑曲霉释钾作用比较

静置培养组:100 mL基础培养液和1 g钾矿粉,灭菌后接入10 mL黑曲霉种子液1,室温静置培养;

震荡培养组:100 mL基础培养液和1 g钾矿粉,灭菌后接入10 mL黑曲霉种子液2,置恒温振荡器(28℃,120 r/min)培养;

超纯水组:100 mL超纯水,121℃高压灭菌;

无菌组:100 mL基础培养液和1 g钾矿粉,121℃高压灭菌。

以上4组处理均设置3个重复。分别在第5天、10天、15天、20天、30天取上清液,测静置和震荡两种培养方式黑曲霉作用钾矿粉释放的 K^+ 浓度。

(2)震荡培养30 d内实际释放 K^+ 量与发酵液 K^+ 含量比较:按1.2.2中震荡培养组进行培养,分

别在第5天、10天、15天、20天、30天取上清液,测得发酵液 K^+ 含量,设为(1);并小心取出黑曲霉菌丝球置于100 mL 1 mol/L 的乙酸铵溶液中,超声波震荡30 min后,过滤,测得滤液含量,设为(2),(1)+(2)即为总 K^+ 含量(实际释放 K^+ 含量)。

(3)静置培养365 d后钾矿物释放 K^+ 含量:取250 mL的三角瓶,加入100 mL基础培养液和3 g钾矿粉,高压灭菌后接入1环黑曲霉。作无菌组对照:加100 mL基础培养液和3 g钾矿粉,高压灭菌。以上处理室温静置365 d后,取上清液稀释50倍后测 K^+ 含量。

1.2.3 黑曲霉代谢产物分析

(1)多糖:按1.2.1(2),F组、H组培养5 d后,分别取上清液用以测定发酵液中多糖浓度;收集各组菌丝球,于超声波破碎机压碎后,用冷冻高速离心机7155 $\times g$ 离心20 min,过滤取压出液用以检测菌丝球微环境的多糖浓度。于TU-1901紫外可见分光光度计,苯酚-硫酸法测定多糖浓度^[20]。

黑曲霉对钾矿粉的吸附和包裹:取5个250 mL的三角瓶,分别加入100 mL基础培养液和1 g、3 g、5 g、7 g、9 g钾矿粉,121 $^{\circ}C$ 灭菌,冷却后接入10 mL黑曲霉种子液2,置28 $^{\circ}C$ 、120 r/min恒温振荡器培养5 d。每个矿粉浓度设3个平行。

黑曲霉多糖对钾矿粉的吸附^[8]:取5个250 mL的三角瓶,分别加入100 mL超纯水和1 g钾矿粉,121 $^{\circ}C$ 灭菌后,于超净台中加入0 g、0.3 g、0.5 g、0.7 g、0.9 g经紫外灯灭菌30 min的多糖(从黑曲

霉发酵液中提取,除去蛋白质、小分子杂质后干燥保存的多糖),搅拌均匀,置28 $^{\circ}C$ 、120 r/min恒温振荡器1 d后,取上清液于TU-1901紫外可见分光光度计,苯酚-硫酸法测定多糖含量^[20]。每个多糖浓度设3个平行。

(2)蛋白质:于TU-1901紫外可见分光光度计,考马斯亮蓝G250染色法测定蛋白质浓度^[21]。其余操作同1.2.3(1)。

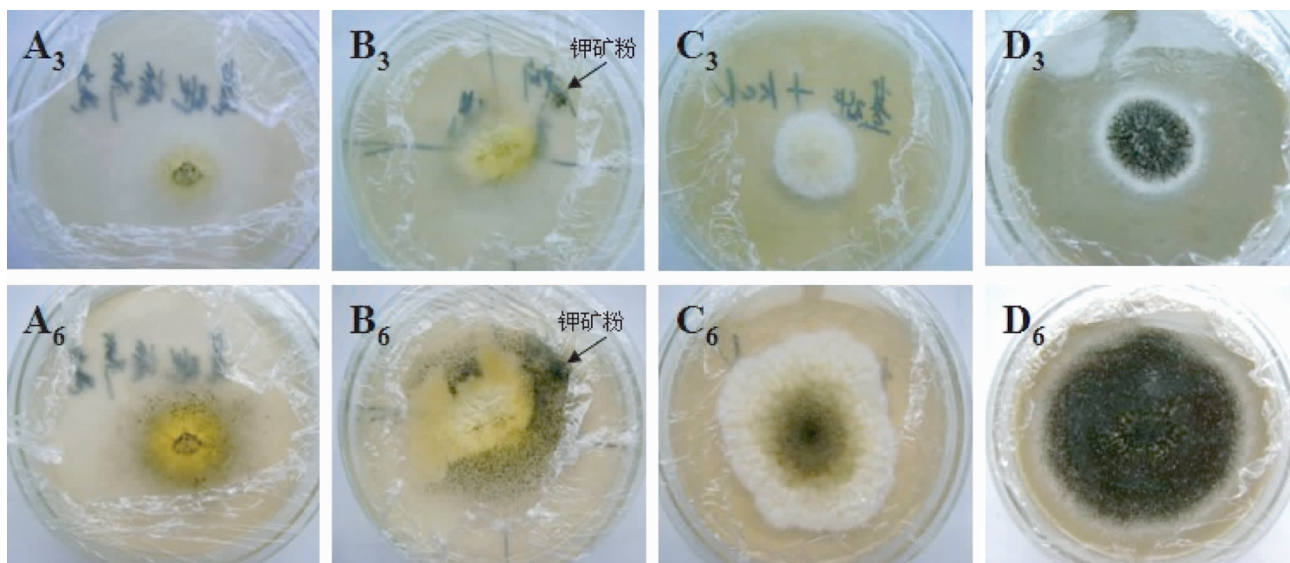
(3)小分子代谢产物:按1.2.1(2),F组和H组培养5 d后,按1.2.3(1)合并发酵液和压出液,用滤膜孔径0.45 μm 的针头过滤器过滤,使用气相色谱与质谱仪联用(GC:色谱柱为DM-FFAP(30 m \times 0.25 mm,0.25 μm),柱箱温度100 $^{\circ}C$,保持5 min,以10 $^{\circ}C/min$ 升温至220 $^{\circ}C$,保持12 min,载气为高纯He,流量1.2 mL/min,进样量1.5 μL ,进样口250 $^{\circ}C$,分流比5:1;MS:源温为200 $^{\circ}C$,扫描范围10~800 amu)测其挥发性(100~220 $^{\circ}C$)小分子成分。

1.2.4 微环境pH值 按1.2.1(2),F组、H组培养5 d后,按1.2.3(1)得到发酵液和压出液,做初始培养基对照和钾矿粉加入量为2 g/100 mL处理的对照,用PHS-25B数字酸度计测定pH值。

2 结果和分析

2.1 黑曲霉生长对含钾矿粉的作用观察

2.1.1 黑曲霉在平板上对钾矿粉的作用 黑曲霉在平板固体培养基上生长对含钾矿粉的利用表现现象见图1。



A₃-D₃、A₆-D₆ 分别代表 A-D 号在第3天、第6天黑曲霉的生长状况。其中,A₃、A₆ 显示在缺钾环境下;B₃、B₆ 显示在缺钾环境下添加少许含钾矿粉;C₃、C₆ 显示在有KCl环境下;图D₃、D₆ 显示在有钾矿粉环境下。

图1 不同钾源条件下真菌生长情况

Fig. 1 Fungal growth at different K-resource conditions on the plate medium

图 D₃、D₆ 显示,基础培养液中加入钾矿粉后制成的平板培养基,无论在第 3 天(与图 1 A₃、B₃、C₃ 比较)还是在第 6 天(与图 1 A₆、B₆、C₆ 比较)时,黑曲霉的生长最迅速,菌落呈褐黑色,丝绒状。比较图 1 B₃ 和图 1 B₆,虽然在平板中心接入黑曲霉菌,但是黑曲霉趋于顺着平板右上方撒有钾矿粉的方向生长,并把矿粉包裹起来,形成了黑曲霉-矿物聚集体。

自然环境下土壤的主要特征是贫营养性或周期性贫营养,缺乏可直接被生物利用的有效钾,但又富含潜在供钾能力的矿物钾,正好激发“饥饿”的黑曲霉菌主动攻击矿物颗粒释放有效钾供自身与其它生物利用。

2.1.2 观察液体培养黑曲霉对钾矿粉的作用 图 2E、2F 分别表示静置培养、震荡培养黑曲霉对含钾矿物的作用。图 2G 和图 2H 均为黑曲霉的纯培养,其中图 2G 因培养液缺少钾源,生长状况较差。

静置培养条件下,菌丝体生长繁殖形成一层有一定厚度的菌丝体膜(如图 2E)浮在培养液的表面,菌丝体与矿粉接触机会很小,而大量的钾矿粉沉积在三角瓶的底部,培养液浑浊。

震荡培养条件下,初期有少量的矿粉颗粒附着在菌丝表面,随着培养时间延长,菌丝生物量及其代谢产物逐渐增多,大量的矿粉颗粒被吸附、包裹进菌丝球中,形成黑曲霉-矿物聚集体(如图 2F),聚集体颗粒较大、表面呈灰白色(区别于单一菌丝球,图 2G 和图 2H),而发酵液澄清,瓶底无残留钾矿粉(区别

于图 2E 静置培养)。

形成的聚集体为菌丝及其代谢产物直接作用钾矿粉提供了便利的场所,在黑曲霉-矿物聚集体的表面和内部,菌丝与矿粉颗粒可以充分接触。

2.2 黑曲霉作用钾矿粉释放 K⁺ 实验

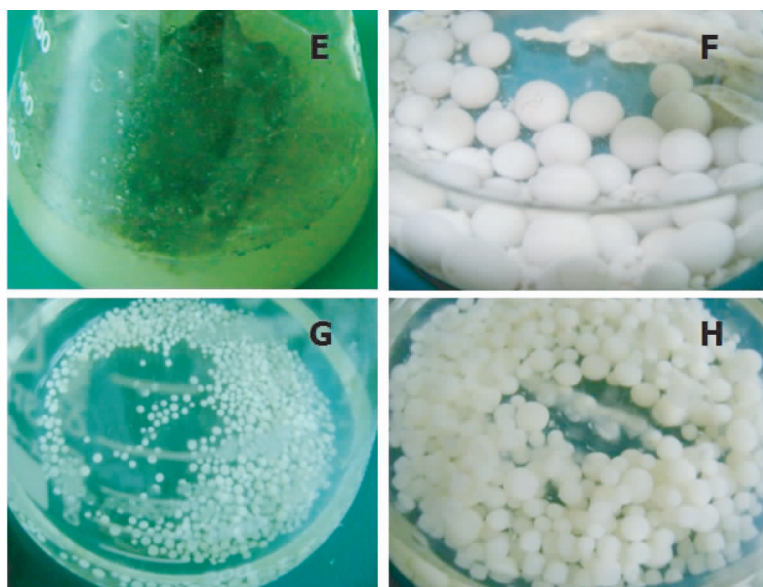
本实验采用了超纯水。用火焰光度计未检测到超纯水组含有 K⁺,可排除水体自带钾离子的干扰;无菌组、静置培养组和震荡培养组钾矿粉释放 K⁺ 浓度测定结果见图 3。

无菌组钾矿粉释放 K⁺,表明水分子能使矿物晶格层间域增大,一定程度上破坏钾矿粉的晶格,缓慢地释放离子,但是仅靠水和无机盐的作用,风化效果非常弱,到第 30 天时释放 K⁺ 浓度仅有 7×10^{-6} 。而此时,静置培养组、震荡培养组释放 K⁺ 浓度分别为 17.2×10^{-6} 、 27.9×10^{-6} ,可以看到不论是静置培养组还是震荡培养组,接入黑曲霉菌均能提高风化效果和加速钾矿粉的转化,促进可溶性钾离子释放。说明钾矿粉在培养液中达到溶解平衡后,风化作用会趋于停止,而当黑曲霉菌生长和多糖、酸性物质、蛋白质等代谢产物产生时,动态平衡被打破,钾矿粉被不断风化,使 K⁺ 释放;而且缺乏可溶性钾素养料的情况下,生命活动的要求迫使黑曲霉菌消耗 ATP 主动攻击钾矿粉,并由载体蛋白协助主动运输来完成对 K⁺ 的吸收,使风化作用持续进行。而在第 5 天、10 天、15 天时,测得的静置培养组可溶性 K⁺ 反而略低于无菌组,原因有两方面,首先,黑曲霉生长需要钾素养料,直接吸收利用一部分释放出来的 K⁺;其次,黑曲霉吸附作用强,其表面吸附了部分 K⁺ 而干扰了对 K⁺ 的测定。

另外,第 5 天、10 天、15 天、20 天、30 天时震荡培养组黑曲霉菌株对钾矿粉的转化作用均大于静置培养组。动态培养过程中,旋转振荡作用一方面使黑曲霉菌丝与矿物充分接触,一方面又加大了机械力度,说明菌丝与矿粉颗粒之间的机械作用在黑曲霉风化含钾矿物过程中起重要作用。

动态培养 30 d 内钾矿粉实际释放 K⁺ 的量与发酵液 K⁺ 含量,测定结果见图 4;静置培养 365 d 后含钾矿物释放 K⁺ 含量,测定结果见图 5。

由图 4 可见,动态培养方式下黑曲霉作用钾矿粉 30 d 后,实际释放 K⁺ 的量远高于发酵液中 K⁺ 含量,这是由于黑曲霉



E 为静置培养;F、G 和 H 系动态培养

E. static culture; F, G, and H. dynamic culture

图 2 液体培养比较

Fig. 2 The comparison of culture on liquid medium

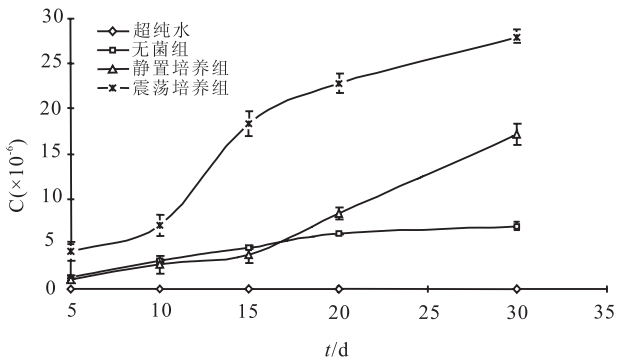


图 3 不同培养方式下钾矿粉释放 K⁺ 浓度比较

Fig. 3 Concentrations of K⁺ released from potassium-bearing mineral powders by different culture styles

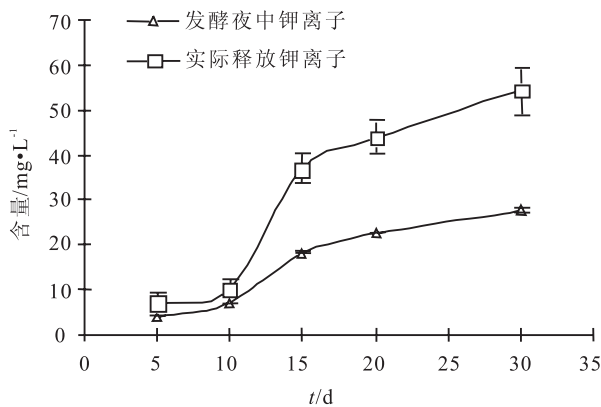


图 4 动态培养 30 d 内实际释放 K⁺ 与发酵液 K⁺ 比较

Fig. 4 The comparison of K⁺ contents of actual release and fermentation broth by dynamic culture within 30 days

作用钾矿粉释放的 K⁺ 一部分被包裹于黑曲霉-矿物聚集体内部,一部分被聚集体表面牢固地吸附,一部分成为黑曲霉菌细胞的组成物质。因此所测发酵液中的水溶性 K⁺ 含量相对不高,但以中性 1 mol/L 的乙酸铵溶液为离子交换剂时,结合超声波的震荡作用, NH₄⁺ 与聚集体吸附、包裹的大部分 K⁺ 进行交换,这部分可溶性钾进入溶液,故而此时所测的水溶性钾含量显著高于发酵液。

图 5 表明,静置培养中钾矿粉沉于三角瓶底部,黑曲霉对矿物的吸附、包裹及机械作用都很小(见图 2E),但是 365 d 后钾矿粉仍然大量被转化,是无菌组的 5 倍(此时,无菌组钾矿粉转化量仍然很少),说明此时的转化作用主要是由菌体的代谢产物来完成,这些代谢产物可能有多糖、小分子分泌物、蛋白质和酶等,它们共同营造和改变了黑曲霉作用矿物的微环境,作用不容忽视。

2.3 黑曲霉代谢产物

2.3.1 多糖 F 组培养得到的是黑曲霉-矿物聚集体, H 组培养得到的是单一的黑曲霉菌丝球。

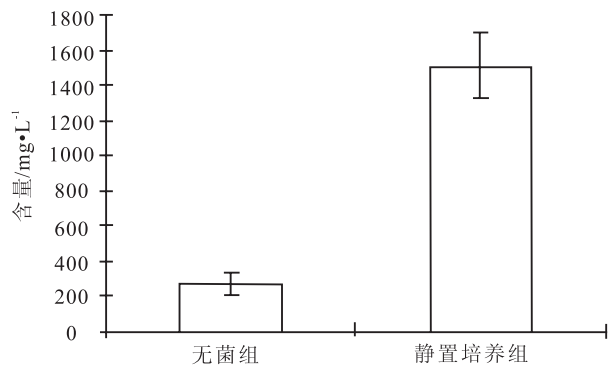
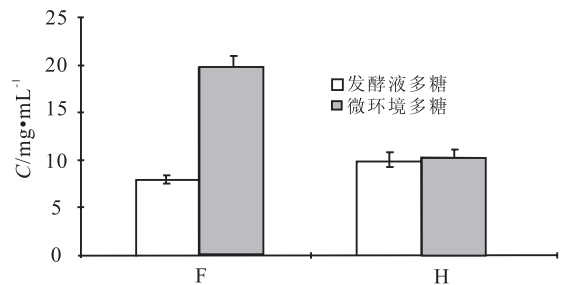


图 5 静置培养 365 d 后含钾矿粉释放 K⁺ 含量

Fig. 5 K⁺ contents released from potassium-bearing mineral powders by static culture after 365 d

图 6 表明,未与钾矿粉作用的菌丝球与发酵液的多糖浓度差异不明显,而黑曲霉作用钾矿粉过程中形成的聚集体,微环境多糖浓度却是发酵液的 2.5 倍。说明黑曲霉作用含钾矿物过程中产多糖量不但增加,而且主要是增加在黑曲霉与矿物相互作用的微环境界面。



F. 黑曲霉;作用含钾矿粉;H. 黑曲霉未作用含钾矿粉

F. *A. niger* weathering mineral powders; H. *A. niger*

图 6 微环境与发酵液多糖浓度

Fig. 6 Polysaccharide concentration in the micro-environment and fermentation broth

计算平行实验的平均值,分别得到黑曲霉对钾矿粉的吸附、包裹量和黑曲霉多糖的吸附量,结果见表 1 和表 2。

表 1 结果表明,在蔗糖为唯一碳源、(NH₄)₂SO₄ 为唯一氮源时,当钾矿粉投入量为 1 g 和 3 g 时,黑曲霉与矿粉可以完全相互包裹(参看图 2F),发酵液中不再有散状矿粉;当增加钾矿粉投入量到 5 g 以上时,瓶底有少量残留矿粉存在,然而与黑曲霉相互包裹的矿粉仍处于增多趋势,可见,黑曲霉对钾矿粉的最大吸附量并不止于 3 g/100 mL,随着钾矿粉量的增大,黑曲霉菌丝体吸附、包裹的矿粉会增多。

表 1 黑曲霉对钾矿粉的吸附和包裹

Table 1 Sorption and wrapping of potassium-bearing mineral powders by *A. niger*

钾矿粉加入量/g	1.00	3.00	5.00	7.00	9.00
是否完全吸附	+	+	-	-	-
瓶底残留钾矿粉/g	0.00	0.00	0.20	0.51	1.08
吸附钾矿粉/g	1.00	3.00	4.80	6.49	7.92

注：+吸附完全；-吸附不完全

表 2 结果表明,投入量同是 1 g 钾矿粉,当加入多糖的量增加时,矿粉对多糖的吸附量也随之增大,这说明该多糖与含钾矿物间存在相互吸附的作用。多糖具有粘合作用,通常多糖分子中阴离子或酸性基团的增加则其吸附矿物颗粒表面阳离子的能力随之增加,而对于线状分子,分子量大的比分子量小的易吸附,直链的较支链的易吸附。可见,黑曲霉吸附含钾矿物,很大程度上取决于自身在生长过程中产生的多糖作用。而且多糖能吸引水分子,对水分的保持作用,使其易于结合其它代谢产物,从而有利于矿粉的释钾作用。

表 2 黑曲霉多糖对钾矿粉的吸附

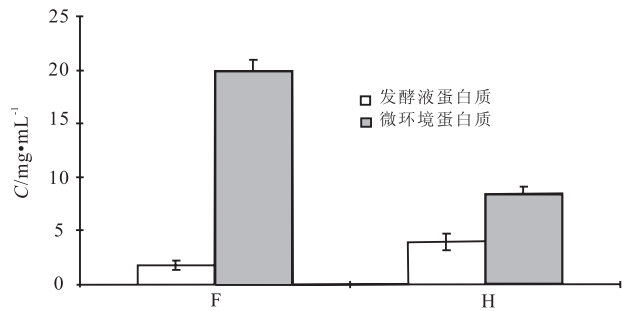
Table 2 Sorption of potassium-bearing mineral powders by polysaccharides of *A. niger*

多糖溶液 /g · 100 mL ⁻¹	0.0000	0.3000	0.5000	0.7000	0.9000
上清液多糖 /g · 100 mL ⁻¹	0.0000	0.1997	0.3327	0.4617	0.5991
吸附多糖/g	0.0000	0.1003	0.1673	0.2380	0.3009

2.3.2 蛋白质 F 组、H 组分别培养得到的是黑曲霉-矿物聚集体、单一的黑曲霉菌丝球。

图 7 表明,单一的黑曲霉菌丝球蛋白质浓度仅是发酵液浓度的 2 倍,而黑曲霉-矿物聚集体微环境中蛋白质浓度是发酵液的 11 倍,蛋白质局部浓度显著提高,浓度变化幅度更甚于多糖,说明微环境中的这些蛋白质(或酶)与钾矿粉的风化有关,这可能与其具有的络合基团有关;也可能与钾矿粉诱导菌体表达载体蛋白有关,而这类蛋白是菌体主动运输钾离子时必需的。胶质芽孢杆菌对磷矿石风化作用时会通过相关功能基因组表达实现蛋白质调节,并指出表达量增加的蛋白质点与菌体细胞的信号转导通路、代谢调控改变有关^[9];蛋白质在分解钾长石过程中起到一定作用,可能与糖蛋白有关^[5];而一些关于微生物酶作用的报导也被提出,例如碳酸酐酶^[22],对岩石具有溶蚀驱动作用。黑曲霉对含钾矿物风化

过程中产生的蛋白质(或酶)是否有类似解钾的机理需要进一步深入研究。



F. 黑曲霉作用钾矿粉; H. 黑曲霉未作用含钾矿粉

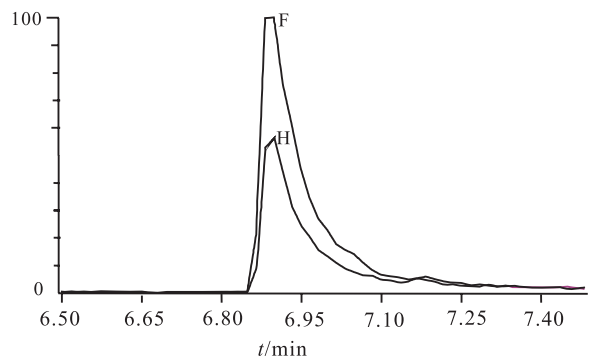
F. *A. niger* weathering mineral powders; H. *A. niger*

图 7 微环境与发酵液蛋白质浓度

Fig. 7 Protein concentration in the

micro-environment and fermentation broth

2.3.3 小分子分泌物测定 通过 GC-MS,检测到黑曲霉作用钾矿粉过程中产生的部分小分子酸性分泌物,并与未作用矿粉的黑曲霉进行比较,结果见图 8 和图 9。

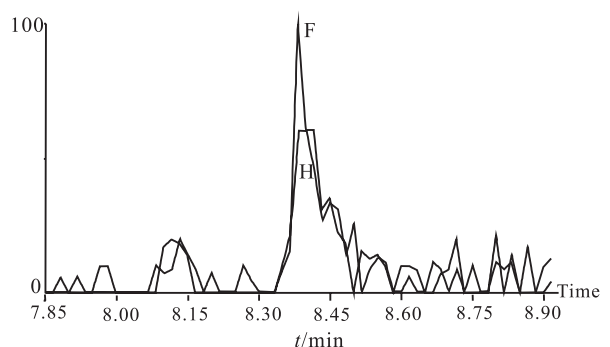


F. 黑曲霉作用钾矿粉; H. 黑曲霉未作用钾矿粉

F. *A. niger* weathering mineral powders; H. *A. niger*

图 8 乙酸峰比较图

Fig. 8 The comparison of acetic acid



F. 黑曲霉作用钾矿粉; H. 黑曲霉未作用钾矿粉

F. *A. niger* weathering mineral powders; H. *A. niger*

图 9 丙酸峰比较图

Fig. 9 The comparison of propionic acid

乙酸峰(以分子质量 60.0211 积分)强度大小为:作用钾矿粉的黑曲霉>未作用钾矿粉的黑曲霉;同样地,丙酸峰(以分子质量 74.0368 积分)强度大小为:作用钾矿粉的黑曲霉>未作用钾矿粉的黑曲霉,说明乙酸和丙酸在黑曲霉菌风化含钾矿物过程中可能参与了作用,它们在溶解钾矿粉时既有酸溶作用也有络解作用。然而乙酸和丙酸毕竟是一元

酸,络合能力低,水解能力较弱,活化矿物钾的能力小,因此,找到黑曲霉分泌物中作用含钾矿物最关键的有机酸还需要辅助其它实验手段进一步分析。

此外,通过 GC-MS 还检测到除含乙酸(保留时间为 6.90 min)、丙酸(保留时间为 8.38 min)外的其它小分子物质,结果见图 10。

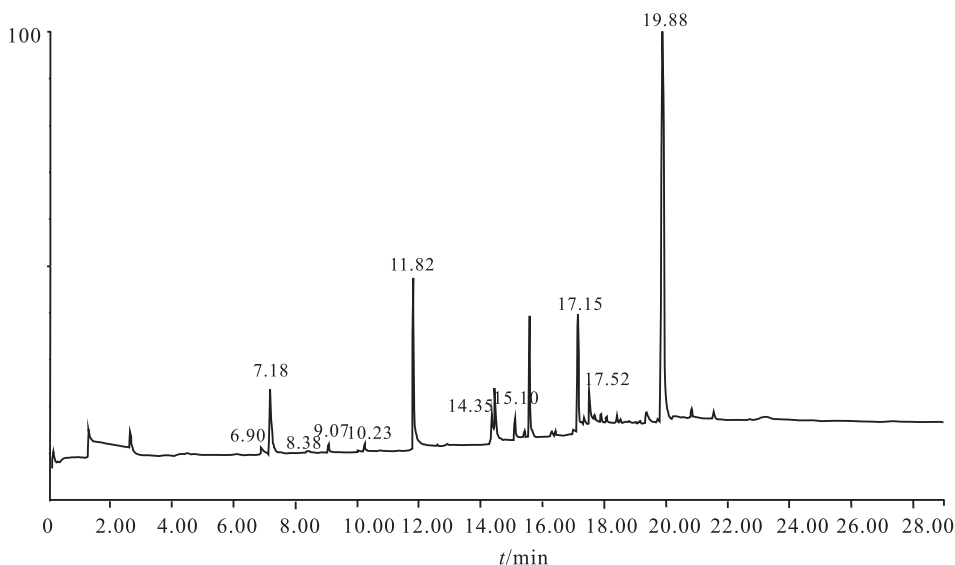


图 10 黑曲霉作用含钾粉 GC-MS 分析

Fig. 10 GC-MS analysis for the potassium-bearing mineral powders affected by *A. niger*

这些小分子分泌物包括大量的糠醛类物质,如 5-羟甲基-2-呋喃甲醛(保留时间为 15.10 min、19.88 min)、呋喃甲醛(保留时间为 7.18 min)、2,5-呋喃甲醛(保留时间为 14.35 min)、5-甲基-2-呋喃甲醛(保留时间为 9.07 min),和 1,2-环戊二酮(保留时间为 11.82 min)、丙二醇(即甘油,保留时间为 17.52 min)、糠醇(即呋喃甲醇,保留时间为 10.23 min)等物质,作用尚不清楚。

2.4 酸碱微环境

培养 5 d 后,检测黑曲霉作用钾矿粉微环境、发酵液酸碱度,并与未作用钾矿粉的黑曲霉作比较,结果见表 3。

投加 1 g 钾矿粉后培养液(F 组初始培养液)比 H 组初始培养液碱性略强,这是因为钾矿粉略偏碱性。而不论是单一的黑曲霉菌丝球、发酵液,还是作用钾矿粉 5 d 的微环境、发酵液,均比初始培养液酸性显著提高,说明黑曲霉产酸,微环境中存在大量酸性物质,可能是无机酸、有机酸,也可能是酸性多糖。当投加矿粉量增加(投加 2 g 钾矿粉),酸性物质会提供更多的氢离子置换矿粉表面和晶格中的阳离子,导致酸性相应减弱,pH 值增高(与投加 1 g 钾矿

粉比较)。

无论是投加 1 g 钾矿粉还是 2 g 钾矿粉,黑曲霉-矿物聚集体微环境均比发酵液酸性强度略弱一点,这是有机体中缓冲液的调适,较为温和的条件有利于提高酶活,催化其中的化学反应发生,其中的酸性物质也相对易发挥作用,这样的酸性微环境适宜菌体对矿粉的作用。

表 3 黑曲霉作用含钾矿粉与未作用含钾矿粉 pH 值比较

Table 3 The pH values of potassium-bearing mineral powders with or without *A. niger* weathering

	黑曲霉作用 钾矿粉(F 组)	单一黑曲 霉菌丝球(H 组)
初始培养液 pH	7.04(1 g 矿粉)	6.91
发酵液 pH	3.42(1 g 矿粉) 4.29(2 g 矿粉)	2.49
微环境 pH	3.56(1 g 矿粉) 4.44(2 g 矿粉)	2.61

3 结 论

综上所述,黑曲霉对含钾矿物的解钾作用是一种对缺钾环境的适应机制,在这个过程中,黑曲霉菌

株获得生命活动必需养料,客观上造成矿物被风化。黑曲霉对含钾矿物的解钾过程是依靠多因素的协同作用导致的综合效果:1)不断增殖的黑曲霉通过分泌多糖,吸附、包裹含钾矿物颗粒,形成较为封闭的真菌-矿物聚集集体,该聚集集体的形成使菌丝和矿物颗粒充分接触;2)黑曲霉菌丝对含钾矿物表面产生机械破坏作用,从矿物表面裂缝或棱角等脆弱的部位慢慢延伸到矿物晶格内部,导致矿物晶格变形或破坏;3)黑曲霉对钾离子的主动吸收促进钾离子进一步释放;4)黑曲霉分泌的多糖、蛋白质、有机酸等具有对含钾矿物风化的能力,这与它们都具有络合基团有关。形成络合物可降低含钾矿物水解反应的活化能,通过键极化作用可破坏含钾矿物 Si—O 等键的稳定性,加速对含钾矿物的化学降解作用;5)黑曲霉分泌物相互堆积、混合改变了黑曲霉作用含钾矿物的微环境—酸性环境,是一种有机环境,可破坏矿物内部原有的平衡,影响矿物的稳定性,有利于使含钾矿物晶格结构被破坏并释放出钾离子。

参考文献 (References):

- [1] 李凤汀,郝正然,杨则缓,张春莉. 硅酸盐细菌 HM8841 菌株解钾作用的研究[J]. 微生物学报,1997,37(1):79—81.
Li Fengting, Hao Zhengran, Yang Zeyuan, Zhang Chunli. Studies on the ability of silicate bacteria HM8841 strain dissolving potassium [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1997, 37(1): 79—81. (in Chinese with English abstract)
- [2] 周俊,朱江,储国正,胡礼军. 钾资源的地球化学背景及其开发利用[J]. 矿产综合利用,1999,4:36—40.
Zhou Jun, Zhu Jiang, Chu Guozheng, Hu Lijun. The geochemical background of potassium resources and its exploitation[J]. Multipurpose Utilization of Mineral Resources, 1999, 4: 36—40. (in Chinese with English abstract)
- [3] 盛下放,黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探[J]. 土壤学报,2002,39(6):863—871.
Sheng Xiafang, Huang Weiyi. Mechanism of potassium release from feldspar affected by the strain NBT of silicate bacterium [J]. Acta Pedologica Sinica, 2002, 39(6): 863—871. (in Chinese with English abstract)
- [4] 孙德四,周谦,赵薪萍,张强. 胶质芽孢杆菌 JXF 菌株代谢产物与脱硅作用研究[J]. 矿冶工程,2008,28(3):52—56.
Sun Desi, Wan Qian, Zhao Xinping, Zhang Qiang. Metabolites of *Bacillus Mucilaginosus* JXF and their desilicization effect [J]. Mining and Metallurgical Engineering, 2008, 28(3): 52—56. (in Chinese with English abstract)
- [5] 杜叶,周雪莹,连宾. 胶质芽孢杆菌的胞外分泌细菌的解钾作用[J]. 地学前缘,2008,15(6):107—111.
Du Ye, Zhou Xueying, Lian Bin. The extracellular secretion of *Bacillus mucilaginosus* and its capability of releasing potassium from potassium-bearing minerals[J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6): 107—111. (in Chinese with English abstract)
- [6] Basak B B, Biswas D R. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. Plant Soil, 2009, 317: 235—255.
- [7] 李福春,李莎,杨用钊,程良娟. 原生硅酸盐矿物风化产物的研究进展—以云母和长石为例[J]. 岩石矿物学杂志,2006,25(5):440—447.
Li Fuchun, Li Sha, Yang Yongzhao, Cheng Liangjuan. Advances in the study of weathering products of primary silicate minerals, exemplified by mica and feldspar [J]. Acta Petrologica et Mineralogica, 2006, 25(5): 440—447. (in Chinese with English abstract)
- [8] 周雪莹,李辉,连宾. 胶质芽孢杆菌胞外多糖在肥料矿物分解转化中的作用[J]. 矿物岩石地球化学通报,2010,29(1):63—66.
Zhou Xueying, Li Hui, Lian Bin. Effect of exo-polysaccharides produced by *Bacillus uclaginosus* during the process of fertilizer mineral degradation and transformation[J]. Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry, 2010, 29(1): 63—66. (in Chinese with English abstract)
- [9] 谌书,刘从强,连宾. 胶质芽孢杆菌对磷矿石风化作用时细菌蛋白质的双向电泳分析[J]. 微生物学通报,2009,36(3):334—338.
Chen Shu, Liu Congqiang, Lian Bin. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of bacterial proteins during *Bacillus mucilaginosus* on weathering of phosphorite [J]. Microbiology, 2009, 36(3): 334—338. (in Chinese with English abstract)
- [10] Welch S A, Ullman W J. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry[J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 1993, 57: 2725—2736.
- [11] 连宾. 硅酸盐细菌的解钾作用研究[M]. 贵阳:贵州科技出版社,1998:106.
Lian Bin. Study on the potassium releasing from minerals by silicate bacteria[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press, 1998. 106. (in Chinese)
- [12] 连宾,傅平秋,莫德明,刘从强. 硅酸盐细菌解钾作用机理的综合效应[J]. 矿物学报,2002,22(2):179—182.
Lian Bin, Fu Pingqiu, Mo Deming, Liu Congqiang. A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria[J]. Acta Mineralogica Sinica, 2002, 22(2): 179—182. (in Chinese with English abstract)
- [13] 连宾,陈骏,傅平秋,刘从强,陈焯. 微生物影响硅酸盐矿物风化作用的模拟试验[J]. 高校地质学报,2005,11(2):181—185.
Lian Bin, Chen Jun, Fu Pingqiu, Liu Congqiang, Chen Ye. Weathering of silicate minerals by microorganisms in culture experiments[J]. Geological Journal of China Universities, 2005, 11(2): 181—185. (in Chinese with English abstract)
- [14] Lian B, Wang B, Pan M, Liu C Q, Teng H H. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Geochim. Cosmochim. Ac-

- ta, 2008, 72: 87-98.
- [15] 谌书, 刘丛强, 连宾. 一株黑曲霉对磷灰石的风化作用[J]. 矿物学报, 2009, 29(1): 103-107.
Chen Shu, Liu Congqiang, Lian Bin. Effect of a strain of *Aspergillus niger* on weathering of phosphorite [J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 2009, 29(1): 103-107. (in Chinese with English abstract)
- [16] 谭媛, 董发勤, 代群威. 黑曲霉菌浸出蛇纹石尾矿中钴和镍的实验研究[J]. 矿物岩石, 2009, 29(3): 115-119.
Tan Yuan, Dong Faqin, Dai Qunwei. Study on leaching of cobalt and nickel from tail-serpentine by *Aspergillus niger* [J]. *Journal of Mineralogy and Petrology*, 2009, 29(3): 115-119. (in Chinese with English abstract)
- [17] 马放, 张斯, 山丹. 黑曲霉 Y3 菌丝球培养基成分优化[J]. 中国环境科学, 2008, 28(11): 989-993.
Ma Fang, Zhang Si, Shan Dan. Optimization of the medium composition for culturing of mycelia pellet of *Aspergillus niger* Y3 [J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(11): 989-993. (in Chinese with English abstract)
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 101-102.
Bao Shidan. *Soil agro-chemical analysis* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 101-102. (in Chinese)
- [19] 王才仁. 不同仪器对土壤速效钾和缓效钾的测定[J]. 湖南农业科学, 2008, 4: 78-80.
Wang Cairan. Different instruments to measure soil available K and slow-releasable K [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2008, 4: 78-80. (in Chinese)
- [20] 刘晓涵, 陈永刚, 林励, 庄满贤, 方晓娟. 萘酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 270-272.
Liu Xiaohan, Chen Yonggang, Lin Li, Zhuang Manxian, Fang Xiaojuan. Comparison of methods in determination of polysaccharide in *Lycium barbarum* [J]. *Food Science and Technology*, 2009, 34(9): 270-272. (in Chinese with English abstract)
- [21] 李志江. 考马斯亮蓝 G250 染色法测定啤酒中蛋白质含量[J]. 酿酒, 2008, 35(1): 70-71.
Li Zhijiang. Study on determination of protein content of beer by Coomassie Brilliant G250 dye binding [J]. *Liquor Making*, 2008, 35(1): 70-71. (in Chinese with English abstract)
- [22] 余龙江, 吴云, 李为, 曾宪东, 付春华. 微生物碳酸酐酶对石灰岩的溶蚀驱动作用研究[J]. 中国岩溶, 2004, 23(3): 225-228.
Yu Longjiang, Wu Yun, Li Wei, Zeng Xiandong, Fu Chunhua. Study on the driving effect on limestone corrosion by microbial Carbonic Anhydrase [J]. *Carsologica Sinica*, 2004, 23(3): 225-228. (in Chinese with English abstract)

· 学会之声 ·

中国矿物岩石地球化学学会第七届理事会 第四次会议暨第三次常务理事会议纪要

2011年4月6日, 我会在广州召开了第七届理事会第四次会议暨第三次常务理事会议, 近70名学会理事出席了会议, 部分专业委员会主任和副秘书长列席了会议。

会议由刘丛强理事长主持。李世杰秘书长首先汇报了我会2010年的主要工作进展。他指出, 我会2010年在学术交流、科普工作、期刊的出版、人才举荐以及组织工作等方面都取得了一些成绩, 主办了几次学术会议, 开展了侯德封奖的评选, 召开了理事会会议和2010年工作会议, 等。但也存在一些问题, 如科普工作的地域性限制, 政府职能转移的接受, 一些专业委员会多年不开展学术活动等, 最后提出了2011年学会的工作思路 and 具体设想。会议审议并原则通过了这一报告。与会理事一致认为, 学会2010年的工作是值得可能的, 尤其是几次学术会议的召开, 发挥出了学会作为学术交流的重要平台的作用; 科普活动对提高全民科学素质发挥出了积极的作用; 同时注重自身能力建设, 增强了学会的凝聚力。此外, 秘书长还传达了2011年

的主要工作部署, 汇报了中国科协第八次代表大会代表委员的选举过程以及推选结果。

我会副理事长徐义刚研究员汇报了第13届学会年会筹备情况, 就会议的一些主要安排向与会理事作了汇报。与会理事们就学术年会的组织形式、会议主题、分会场设置等提出了一些具体意见和建议。

学会挂靠单位领导、我会副理事长胡瑞忠研究员在会议也作了重要发言, 他首先肯定了学会自成立以来以来的工作, 并表示将继续一如既往地的人力、物力、财力上支持学会的工作, 同时也希望各理事单位继续支持、关注学会。

经讨论, 会议决定第14届学术年会由南京大学具体承办, 时间初步定于2013年4月。我会副理事长陈骏教授和有关人员表示, 将尽力承办好这次会议。

(刘莹 供稿)