

磷石膏土壤改良剂的制备与发酵工艺优化^①

许维东¹, 周家庆¹, 李慈娟², 汪 峰³, 曹 慧^{1*}

(1 南京农业大学生命科学学院/农业农村部农业环境微生物工程重点实验室, 南京 210095; 2 宣城市农业农村局种植业管理服务中心, 安徽宣城 242000; 3 宁波市农业科学研究院, 浙江宁波 315040)

摘要: 以市售土壤改良剂和磷石膏为基质, 以溶磷菌为接种剂, 采用单因素试验、Plackett-Burman 试验和中心组合设计(Central composite design) 试验等方法优化半固体发酵工艺, 结合氨水矿化 CO₂技术制备了磷石膏土壤改良剂。结果表明: 在料水比 1:5、初始 pH 8.05、温度 52.33 °C、培养时间 7 d 和溶磷菌接种量 0.75% 发酵条件下, 磷石膏土壤改良剂发酵液中可溶性磷含量达 143.71 mg/L; 在氮硫比 3、反应温度 35 °C 和反应时间 4 h 条件下, 磷石膏与氨水和 CO₂反应, 土壤改良剂中可溶性硫含量为 12.67 g/L。总体上, 通过半固体发酵法制备的磷石膏土壤改良剂能够有效调节土壤 pH、增加可溶性磷酸盐和硫酸盐含量和提高土壤固碳量, 对土壤改良和地力提升具有重要意义。

关键词: 磷石膏; 土壤改良剂; 发酵; 参数优化; 矿化反应

中图分类号: S156.2 文献标志码: A

Preparation and Fermentation Process Optimization of Phosphogypsum Soil Amendments

XU Weidong¹, ZHOU Jiaqing¹, LI Cijuan², WANG Feng³, CAO Hui^{1*}

(1 College of Life Sciences/Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Planting Management Service Center, Xuancheng City Agriculture and Rural Affairs Bureau, Xuancheng, Anhui 242000, China; 3 Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo, Zhejiang 315040, China)

Abstract: This study utilized commercially available soil conditioners and phosphogypsum as substrates, and phosphate-solubilizing bacteria as inoculants. Methods such as single-factor experiments, screening experimental design (Plackett-Burman design), and central composite design (CCD) were used to optimize the semi-solid fermentation process, combined with ammonia mineralization CO₂ technology to prepare a phosphogypsum soil conditioner. Results indicated that under conditions of a material-to-water ratio of 1:5, an initial pH of 8.05, a temperature of 52.33 °C, a cultivation time of 7 days, and an inoculum amount of 0.75%, the soluble phosphorus content in the soil conditioner reached 143.71 mg/L. Under conditions of a nitrogen-to-sulfur ratio of 3, a reaction temperature of 35 °C, and a reaction time of 4 hours, the soluble sulfur content in the soil conditioner was 12.67 g/L. Phosphogypsum soil conditioner produced via semi-solid fermentation effectively adjusts soil pH, increases the content of soluble phosphates and sulfates, and improves soil carbon sequestration, which is of significant importance for soil improvement and fertility enhancement.

Key words: Phosphogypsum; Soil amendment; Fermentation; Parameter optimization; Mineralization reaction

磷石膏是湿法生产磷酸时产生的工业固体副产物, 每生产 1 t 磷酸就会产生 4~5 t 的磷石膏^[1]。磷石膏的主要成分为 CaSO₄·2H₂O, 含有钙、镁、氟等磷酸盐和硅酸盐, 还有少量的重金属和放射性物质^[2]。在全球范围内, 大量堆存的磷石膏不仅占用了农田和

林地, 影响土地资源的利用, 还引起了严重的环境污染问题。磷石膏中残存有酸性物质、重金属和放射性元素, 产生的酸性渗滤液可能会渗入地下水和土壤, 引起土壤酸化和水体污染^[3]。近年来, 磷石膏的利用取得了一定进展, 如作为建筑材料, 具有一定的市场

①基金项目: 宁波市公益类科技计划项目(2021S018)资助。

* 通信作者(hcao@njau.edu.cn)

作者简介: 许维东(1998—), 男, 安徽合肥人, 博士研究生, 研究方向为微生物生态学。E-mail: 2024216018@stu.njau.edu.cn

需求；作为土壤改良剂，能够改善土壤结构，增加土壤的透气性和保水性；作为水泥生产中的缓凝剂，可以调节水泥的凝结时间，改善水泥的性能^[4]。整体来说，磷石膏的利用现状正在逐步改善，资源化利用途径逐渐拓宽。而目前磷石膏农用研究方面仍然面临很多问题，如钙磷营养元素未得到充分利用，化学处理方法存在二次污染等。因此，开展磷石膏资源高值利用研究，具有重要的理论和实际意义^[5]。

施用土壤调理剂是一种改良盐碱性土壤的有效措施。它通过调节土壤酸碱度，改善土壤理化性质来促进作物对水分和养分元素的吸收，从而促进作物的生长^[6-7]。国内外对土壤改良剂的研发和使用日益增加，针对不同土壤类型，已开发出多种类型的改良剂，例如，以石灰、磷酸钙、硫酸铁等为原料制备的矿物土壤改良剂，能够调节土壤酸碱度，提供植物所需的营养元素^[8-9]；以微生物制剂为原料制备的生物土壤改良剂，能够增加土壤微生物活性，促进有益微生物生长^[10]；以石膏、沙子、粉煤灰等为原料制备的物理土壤改良剂，能够改善土壤质地，增加土壤通气性和排水性^[11]。

基于以上，本研究以商品化土壤改良剂和磷石膏为基质，拟采用半固体发酵法和氨水矿化 CO₂技术，改性商品化土壤改良剂，制备磷石膏土壤改良剂。且为提高产品品质和降低生产成本，拟通过单因素试验、Plackett-Burman 试验和基于响应面分析法的中心组合设计(Central composite design, CCD)探究影响发酵工艺的显著性因素并预测最优发酵条件，优化半固体发酵工艺，以为磷石膏资源化利用提供新的途径，为土壤改良和地力提升提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试磷石膏取自安徽省宁国市司尔特肥业股份有限公司，其主要成分为 CaSO₄ 76%、磷 0.64%，含水率 18%，pH 5.8。市售土壤改良剂购买自沃农肥业有限公司，主要成分为复合菌、有机硅和菜粕，有效活菌数 $\geq 2 \times 10^{10}$ cfu/g，含水率 $\leq 10\%$ 。

供试土壤样品采自司尔特肥业股份有限公司的磷石膏长期贮存地，堆放时间 25 年以上。土壤样品于 2023 年 3 月采集，采用 5 点采样法采集 0~10 cm 土样，混合均匀，去除石块和根茎等杂质后，留取土壤样品约 5 kg，置于-20℃冰箱保存。

供试菌株 XP61、XP81 和 XP10，为溶磷菌，由本试验筛选，用于进行发酵试验。溶磷菌能够将磷石

膏中难溶的 Ca₃(PO₄)₂ 转变成植物可以利用的可溶性磷酸盐，进而增加磷石膏土壤改良剂中可溶性磷含量。菌株保藏于南京农业大学环境微生物实验室，命名为 *Bacillus* sp. XP61, *Enterobacter* sp. XP81, *Bacillus* sp. XP10。

蒙金娜无机磷培养基(g/L): 葡萄糖 10 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, FeSO₄·7H₂O 0.03 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, Ca₃(PO₄)₂ 5 g, MnSO₄·7H₂O 0.03 g, 琼脂 15 g, pH 自然, 118℃灭菌 30 min, 用于筛选溶磷菌。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 用于纯化和接种溶磷菌。

1.2 溶磷菌的筛选

采用钼锑抗比色法筛选具有高效溶磷能力的菌株。首先，取 10 g 供试土壤样品加入 100 mL 的三角瓶中，再加入 40 mL 蒙金娜无机磷液体培养基富集培养 7 d；采用稀释平板涂布法，对土壤富集液进行梯度稀释至 10⁻⁵，吸取 100 μL 稀释液涂布于蒙金娜无机磷固体培养基上，在 30℃ 培养箱中培养 7 d；挑取产生明显透明圈的菌落，划线纯化 3~6 代，直至培养皿上长出单菌落。然后，将单菌落接种于 LB 液体培养基中培养至指数生长期(约 1×10⁸ cfu/mL)，吸取 100 μL 菌悬液加入 5 mL 蒙金娜无机磷液体培养基中。同时设置不接菌悬液的对照组，每组设 3 个重复。在恒温振荡摇床上连续培养 3、7 和 11 d 后，各取 2 mL 菌液，在 10 000 r/min 的离心机上离心 10 min，去除菌体，吸取 0.5 mL 上清液，采用钼锑抗比色法测定样品的 OD₇₀₀ 值，并根据磷标准曲线计算各菌液中的磷含量，减去对照组中的磷含量，即可得到不同培养时期菌株的溶磷量。

1.3 溶磷菌种子液的制备及发酵体系的构建

向 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 蒙金娜无机磷液体培养基，灭菌后将活化的溶磷菌转接到液体培养基中；将培养基置于 30℃、180 r/min 摆床中培养 24 h，吸取菌液并划线培养获取单菌落；挑取单菌落转移至 100 mL LB 液体培养基中，恒温培养 16 h 制成种子液，用于菌种发酵培养^[12]。

称取碾磨过筛后的市售土壤改良剂 27 g 和磷石膏 3 g 作为磷石膏土壤改良剂发酵基质，装入 250 mL 锥形瓶中，再按试验设定比例添加溶磷菌种子液和无菌水，搅拌均匀，并在试验设定的条件下静置发酵。

1.4 试验方法

单因素试验：为探究料水比、初始 pH、发酵温度、发酵时间和接种量 5 个因素对磷石膏土壤改良剂

发酵进程中磷含量的影响, 每个因素设置 5 个水平进行试验。其中, 料水比设置为 3、4、5、6、7, 初始 pH 设置为 5、6、7、8、9, 发酵温度设置为 30、37.5、45、52.5、60 °C, 发酵时间设置为 5、6、7、8、9 d, 接种量设置为 0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5%。单因素试验过程中, 其他因素采用中值, 每组试验设置 3 次重复。

Plackett-Burman 试验: Plackett-Burman 试验是针对多因子对于因变量显著性影响的筛选试验, 主要通过比较各因子高低水平对响应变量的影响差异来区分各因子的显著性^[13]。本研究采用 Plackett-Burman 试验分析发酵因素对发酵液中溶磷量的影响。上述 5 个影响因子分别取高(1)和低(-1)2 个水平进行优化, 以溶磷量作为单一响应值, 确定对溶磷量影响显著的因素。利用 Minitab17 软件构建了 12 组试验处理, 每组设置 3 个重复, 各因素的高低水平如下: 料水比为 1:4、1:6; 初始 pH 为 7、9; 发酵温度为 45、60 °C; 发酵时间为 6、8 d; 接种量为 0.5%、1%。

CCD 试验: CCD 试验是指基于响应面分析方法的中心组合设计试验。本研究使用 Design-Expert 13 软件设计 CCD 试验, 分析 Plackett-Burman 试验获得的显著影响因素之间的交互关系对发酵液中溶磷量的影响, 以获得最优的发酵参数。CCD 试验中选取显著影响因素的低(-1)、中(0)、高(1)3 个水平, 共 13 组处理进行试验, 每组设置 3 个重复, 各因素水平设置如下: 初始 pH 为 7、8、9; 发酵温度为 45、52.5、60 °C。

氨水矿化 CO₂ 试验: 由于磷石膏中主体成分为硫酸钙, 通过氨水矿化 CO₂ 反应, 可将磷石膏中的硫酸钙转化成可溶性的硫酸铵^[14], 进而去除硫酸钙, 提高土壤改良剂中硫酸根离子含量。将 Plackett-Burman 试验后的最优发酵产物转入可密封的西林瓶中, 加入一定量的氨水, 并通入 CO₂ 气体, 探究氮硫比、反应温度及反应时间对硫酸钙分解的影响。其中, 氮硫比设置为 2、2.5、3、3.5, 反应温度设置为 25、30、35、40 °C, 反应时间设置为 2、3、4 和 5 h。

发酵产物提取和测定: 发酵结束后, 将氨水矿化 CO₂ 反应后的发酵产物置于 150 r/min 摆床中, 常温下提取 30 min; 随后吸取 2 mL 发酵液转入离心管中, 在转速 12 000 r/min 下离心 10 min, 将上清液转入干净的离心管中。采用钼锑抗比色法测定上清液中磷含量^[15], 即为磷石膏土壤改良剂中可溶性磷含量, 并采用铬酸钡还原法测定上清液中硫含量^[16]。根据测得的发酵液中的磷含量, 计算得到发酵工艺后培养基

中可溶性磷含量, 减去磷石膏初始可溶性磷含量 (25.5 ± 1.3) mg/L, 即得到发酵工艺后培养基中可溶性磷的净增加量。

磷石膏土壤改良剂其他理化参数测定: pH 测定参考土壤 pH 测定方法; 可溶性氟采用选择性电极法测定^[17]; 含水率采用烘干法测定。

1.5 数据处理与统计分析

试验数据采用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析, 结合 Duncan、LSD 等方法进行多重比较, 并以 $P < 0.05$ 作为具有显著性差异的判断标准。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌溶磷效果

本研究通过钼锑抗比色法测定, 筛选得到 10 株溶磷菌(图 1A)。其中溶磷量较高的 5 株菌, 分别命名为 XP61、XP62、XP81、XP82 和 XP10。菌株 XP61 第 11 天溶磷量最高, 为 85.57 mg/L; 菌株 XP62 第 11 天溶磷量最高, 为 57.95 mg/L; 菌株 XP81 第 7 天溶磷量最高, 为 103.34 mg/L; 菌株 XP82 第 3 天溶磷量最高, 为 89.07 mg/L; 菌株 XP10 第 7 天溶磷量最高, 为 64.22 mg/L

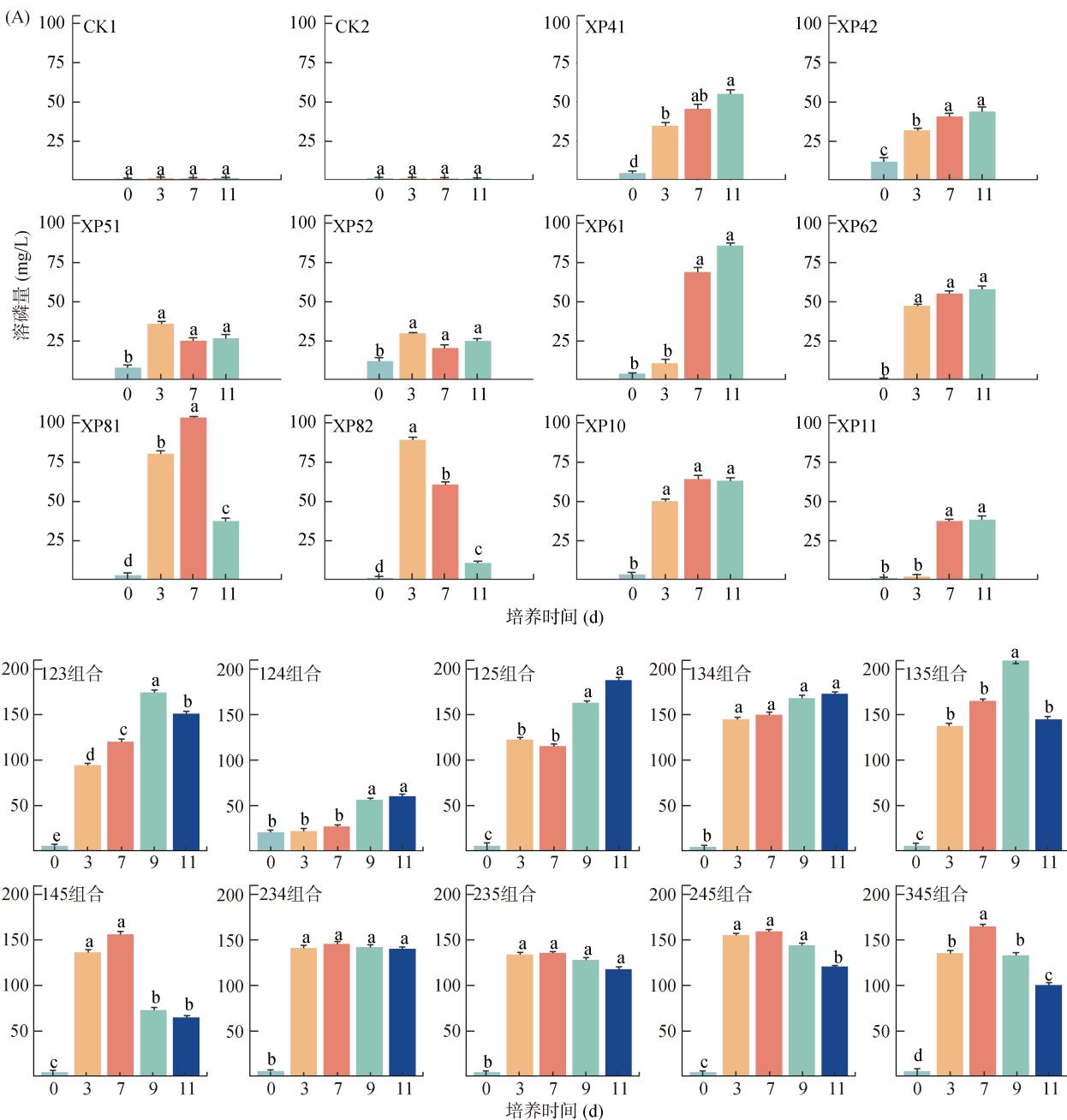
将挑选的 5 株菌株进行混合溶磷, 溶磷菌 XP61、XP62、XP81、XP82 和 XP10 各自编号为 1、2、3、4 和 5, 测定任意 3 株溶磷菌混菌后的溶磷量, 结果如图 1B 所示。可见, 135 组合在第 9 天时溶磷量最高, 为 201.2 mg/L, 因此, 选择菌株 XP61、XP81 和 XP10 进行后续发酵试验。

2.2 磷石膏土壤改良剂发酵单因素试验结果

设置不同的试验因子和因子水平, 测定不同因素下磷石膏改良剂发酵液中的溶磷量, 结果见表 1。不同因子水平下, 发酵液中溶磷量存在显著差异, 优化前反应体系中溶磷量为 38.05 mg/L, 优化后反应体系中最高溶磷量为 144.32 mg/L, 是优化前的 3.79 倍。不同初始 pH 和温度处理下, 反应体系中溶磷量差异显著, 最高溶磷量分别是最低溶磷量的 1.54 倍和 3.68 倍, 而其他试验因子不同水平下溶磷量差异不显著。

2.3 Plackett-Burman 试验结果

Plackett-Burman 试验设计表和试验结果见表 2。不同参数组合下发酵液中溶磷量差异明显, 其中第 4 组处理下溶磷量最高, 为 135.93 mg/L。根据试验结果和回归系数表绘制标准化效应的 Pareto 图(图 2), 可以更加直观地观察到不同因素对发酵的影响程度。由图 2 可知, 各因素对于半固体发酵的影响程度为:



(图 B 中, 组合中的 1、2、3、4、5 分别表示 XP61、XP62、XP81、XP82、XP10; 柱图上方不同小写字母表示不同培养时间之间差异显著($P<0.05$))

图 1 单菌(A)与混菌(B)溶磷效果
Fig. 1 Phosphorus solubilization under single bacteria (A) and mixed bacteria (B)

表 1 不同发酵参数对磷石膏土壤改良剂溶磷量的影响

Table 1 Effects of different fermentation parameters on dissolved phosphorus content from phosphogypsum soil amendment

料水比		初始 pH		温度		培养时间		接种量	
因子水平	溶磷量 (mg/L)	因子水平	溶磷量 (mg/L)	因子水平 (°C)	溶磷量 (mg/L)	因子水平 (d)	溶磷量 (mg/L)	因子水平 (%)	溶磷量 (mg/L)
1 : 3	91.42 ± 6.27 a	5	76.05 ± 4.3 b	30	66.25 ± 1.07 b	5	128.54 ± 0.55 b	0.5	141.61 ± 4.85 ab
1 : 4	86.48 ± 8.35 ab	6	69.60 ± 3.27 b	37.5	38.05 ± 0.77 c	6	140.64 ± 9.56 ab	0.75	144.32 ± 15.68 a
1 : 5	93.25 ± 8.28 a	7	57.41 ± 0.88 c	45	45.97 ± 0.41 c	7	142.55 ± 3.42 a	1	131.49 ± 5.39 b
1 : 6	84.27 ± 2.76 ab	8	88.40 ± 2.46 a	52.5	140.2 ± 6.04 a	8	137.49 ± 7.06 ab	1.25	127.89 ± 1.83 b
1 : 7	76.55 ± 3.32 b	9	69.63 ± 1.54 d	60	58.08 ± 10.37 b	9	119.49 ± 16.49 b	1.5	139.11 ± 0.31 ab

注: 表中同列不同小写字母表示同一试验因子不同水平下差异显著($P<0.05$)。

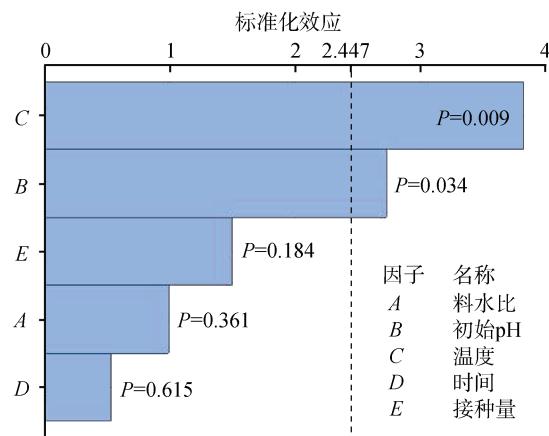
$C>B>E>A>D$, P 值分别为 0.009、0.034、0.184、0.361 和 0.615, 其中初始 pH(B) 和温度(C) 的 $P<0.05$, 表明初始 pH 和温度是磷石膏土壤改良剂发酵的显著影响因素, 后续将选取这 2 个因素进一步优化。

表 2 磷石膏土壤改良剂 Plackett-Burman 试验设计表及试验结果

Table 2 Experimental design and results of Plackett-Burman experiment for phosphogypsum soil amendment

运行序	区组	A	B	C	D	E	溶磷量(mg/L)
1	1	1	-1	1	-1	-1	108.76
2	1	1	1	-1	1	-1	31.10
3	1	1	-1	-1	-1	1	76.90
4	1	1	-1	1	1	-1	135.93
5	1	-1	-1	-1	1	1	37.03
6	1	-1	1	-1	-1	-1	56.54
7	1	-1	-1	1	1	1	105.51
8	1	1	1	-1	1	1	39.32
9	1	-1	1	1	1	-1	89.96
10	1	1	1	1	-1	1	62.44
11	1	-1	1	1	-1	1	48.46
12	1	-1	-1	-1	-1	-1	49.63

注: 区组是一种类别变量, 用来解释响应变量中未被因子解释的变异。表中 A 表示料水比, B 表示初始 pH, C 表示温度, D 表示时间, E 表示接种量。



(图中的虚线表示显著性分界线, 超过此虚线表明影响显著)

图 2 磷石膏土壤改良剂 Plackett-Burman 试验 Pareto 图

Fig. 2 Pareto chart of phosphogypsum soil amendment Plackett-Burman experiment

2.4 CCD 试验结果

通过 Design-Expert 13 软件设计 CCD 试验(表 3)。对试验数据进行拟合分析, 获得溶磷量和显著影响因素之间的多元二次回归方程: 溶磷量=142.37+3.89B-1.58C+2.83BC-35.01B²-30.69C²。方差分析结果表明(表 4), 该模型的 $P<0.01$, 模型因变量与各因素之间

关系显著, 所建模型可靠, 可以用该模型分析和预测发酵液中最大溶磷量。

表 3 磷石膏土壤改良剂 CCD 试验设计表及试验结果
Table 3 Experimental design and results of CCD experiment for phosphogypsum soil amendment

运行序列	变量		溶磷量(mg/L)
	C: 温度(%)	B: 初始 pH	
1	52.5	8	144.26
2	52.5	8	141.56
3	45	9	70.94
4	52.5	8	136.84
5	45	7	73.49
6	52.5	8	146.25
7	45	8	90.31
8	52.5	8	142.95
9	60	8	78.64
10	52.5	9	84.64
11	60	9	78.54
12	52.5	7	67.01
13	60	7	69.77

表 4 磷石膏土壤改良剂 CCD 试验方差分析

Table 4 Variance analysis for CCD experiment of phosphogypsum soil amendment

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	13 531.42	5	2 706.28	77.98	<0.000 1	显著
C	19.92	1	19.92	0.574	0.473 4	
B	121.31	1	121.31	3.5	0.103 7	
BC	32.04	1	32.04	0.9231	0.368 7	
C ²	6 552.07	1	6 552.07	188.8	<0.000 1	
B ²	8 528.92	1	8 528.92	245.76	<0.000 1	
残差值	242.93	7	34.7			
失拟项	192.73	3	64.24	5.12	0.074 3	不显著
纯误差	50.2	4	12.55			
总计	13 774.35	12				

注: $R^2=0.9824$ 、 $R^2_{\text{Adj}}=0.9698$ 、 $R^2_{\text{Pre}}=0.8948$ 。

响应面曲线的 3D 效果图见图 3。该图显示了显著影响因子之间的交互作用对磷石膏土壤改良剂半固体发酵的影响, 同时也预测了显著影响因子是否存在最佳值。该模型预测的最佳发酵条件: 温度 52.33 °C、初始 pH 8.05, 理论最大溶磷量为 142.50 mg/L。为验证模型预测的溶磷量与实际溶磷量的拟合程度, 以优化后的工艺参数进行 3 次重复试验, 试验测得的最大溶磷量为 143.71 mg/L, 与理论值接近, 表明此模型有效。

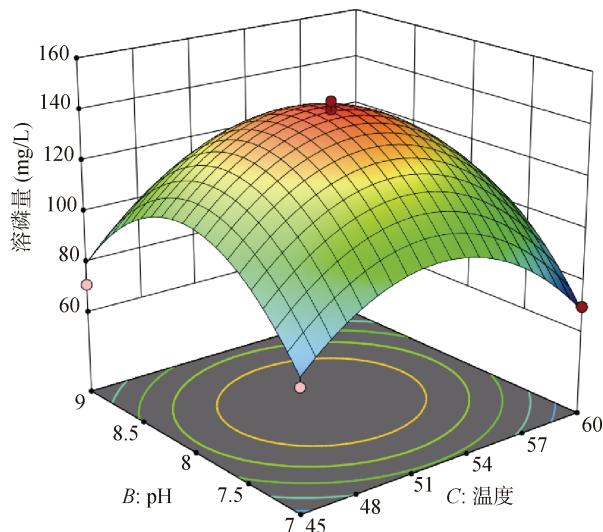
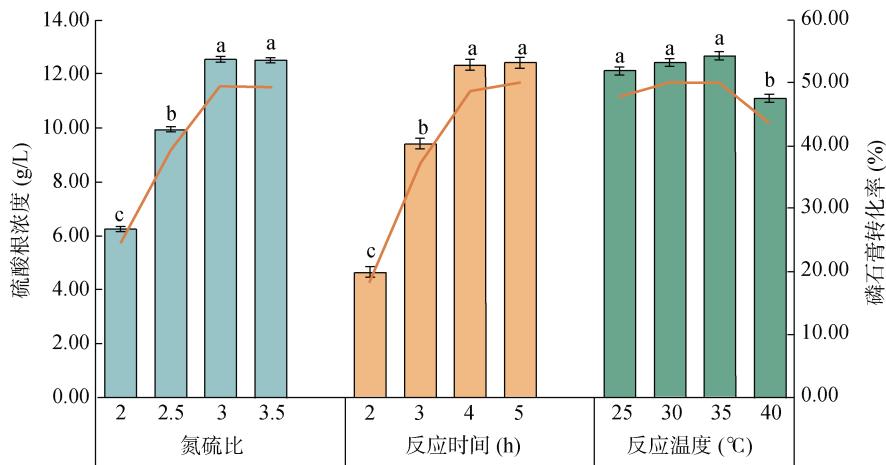


图 3 交互作用对磷石膏土壤改良剂发酵培养基溶磷量的影响

Fig. 3 Effect of interaction on phosphorus solubilization from fermentation medium of phosphogypsum soil amendment

2.5 氨水矿化 CO_2 反应结果

采用铬酸钡还原法测定氨水矿化反应后磷石



(图中柱图表示硫酸根浓度, 折线表示磷石膏转化率; 柱图上方不同小写字母表示同一因子不同水平下差异显著($P<0.05$))

图 4 不同反应参数对磷石膏土壤改良剂发酵液中硫酸根含量的影响

Fig. 4 Effects of different reaction parameters on sulfate ion content in phosphogypsum soil amendment fermentation broth

表 5 磷石膏土壤改良剂的部分理化参数
Table 5 Partial physicochemical parameters of phosphogypsum soil amendments

pH	可溶性磷 (mg/kg)	可溶性硫 (g/kg)	可溶性氟 (%)	含水率 (%)
6.2	718.54	63.33	<0.18	18.4

3 讨论

溶磷菌通过分泌有机酸或磷酸酶的方式转化磷石膏中难溶性磷, 进而提高反应体系中的可溶性磷含量。杨美英等^[18]对筛选到的溶磷菌的溶磷机制研究

膏土壤改良剂发酵液中硫酸根离子浓度, 结果如图 4 所示。当氮硫比为 3, 反应 4 h 后, 硫酸根离子浓度达到最高。方差分析表明, 氮硫比为 3 和 3.5 处理与氮硫比为 2 和 2.5 处理之间存在显著差异, 反应 4 h 和 5 h 处理下硫酸根离子浓度显著高于其他处理组。在不同的反应温度下, 硫酸根离子浓度也存在差异, 在 35°C 下反应 4 h 后, 硫酸根离子浓度达 12.67 g/L, 此时磷石膏的转化率为 50.02%, 继续提高反应温度, 发酵液中硫酸根离子浓度降低。因此, 确定最适反应时间为 4 h, 最适反应温度为 35°C。

2.6 磷石膏土壤改良剂养分参数

在最优发酵参数料水比 1:5、pH 8.05、温度 52.33°C、溶磷菌接种量 0.75% 和培养时间 7 d 条件下, 采用氨水矿化 CO_2 反应处理发酵产物, 在氮硫比 3、反应温度 35°C 和反应时间 4 h 条件下, 最终获得的发酵产物属性见表 5。其中, 可溶性磷含量为 718.5 mg/kg, 可溶性硫含量为 63.33 g/kg, 可溶性氟质量分数小于 0.18%, 含水率为 18.4%, pH 为 6.2。

发现, 菌株 WJ1、WJ3 和 WJ6 可通过生成次级代谢产物 α -酮戊二酸来转化难溶性磷酸盐。Karim 等^[19]从富营养化水体中筛选到两株溶磷菌, 发现菌株 LW-17 和 9410-O 通过磷酸酶作用来分解无机磷, 进而提高水中可溶性磷含量。本研究中的溶磷菌与 Karim 等^[19]的菌株为同一属, 推测该溶磷菌也可能是通过分泌磷酸酶的方式转化难溶性磷。其主要机理是: 溶磷菌分泌磷酸酶, 磷酸酶作用于 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 等难溶性磷酸盐, 断裂钙离子与磷酸根离子之间的离子键, 进而释放可溶性磷^[20-21]。此外, 溶磷菌的溶磷量

越高, 其溶磷能力越强。苏辉兰等^[22]分离筛选出可以将难溶性磷转化成可溶性磷的菌株 W3, 溶磷量达 148.57 mg/L。本研究中, 溶磷菌 XP61、XP81 和 XP10 的单菌溶磷量分别为 85.57、103.34 和 64.22 mg/L, 通过混菌正交优化后, 3 株溶磷菌的混合溶磷量达 221.32 mg/L, 显著高于单菌溶磷量。由于不同菌株作用效果存在差异, 混菌之间互利协同作用使酶系比例协调, 同时提高了酶量, 使得混菌发酵的溶磷能力得到提升^[23]。

固体发酵过程中, 料水比、初始 pH、发酵时间、发酵温度和混菌比例等因素对发酵产物的产量和品质影响很大^[24]。本试验发现, 发酵温度和初始 pH 是磷石膏土壤改良剂发酵过程中的显著影响因素, 选择合适的发酵温度和初始 pH 是提高发酵效率的关键^[25]。本研究中, 溶磷量随发酵温度变化呈现先增高后降低的趋势, 这可能是因为发酵温度的变化会影响微生物自身的生长, 并且微生物中多数的化学反应是在酶的催化下完成的, 不同的酶均有最适的温度, 温度的变化会抑制菌体的生长, 减缓酶促反应速率, 影响代谢产物的合成^[26]。pH 的变化不仅会影响酶的活性, 还会改变微生物细胞膜所带电荷的状态, 进而改变细胞膜的通透性, 影响微生物对营养物质的吸收和代谢产物的释放^[27]。而其他发酵因子如料水比、发酵时间和溶磷菌接种量等, 并不是发酵过程中影响溶磷量的显著因素。发酵基质中含水量过高会影响物料的溶氧能力和松散性, 加快发酵热量的散失; 含水量过低则会降低物料的溶解量, 影响养分的传递和微生物对基质的利用效率^[28]。此外, 虽然较低的菌体接种量会延长物料的发酵时间, 但是随着发酵时间的延长, 在发酵体系中最终会达到一个稳定的、最大的微生物量^[29]。

磷石膏的主要成分为二水硫酸钙, 在水中的溶解度很低, 仅为 1.8 g/L。采用氨水矿化 CO₂技术可将硫酸钙碳酸化, 可提高磷石膏土壤改良剂中可溶性硫含量。本研究从对磷石膏转化效率影响较大的因子进行优化, 获得了较高的可溶性硫酸盐含量。根据化学反应式, 理论上氮硫比为 2 时, 硫酸钙可被全部转化, 但由于氨水本身易挥发, 且发酵基质中其他成分可能会吸收部分氨水, 导致当氮硫比为 2 时, 硫酸钙不能完全反应, 需要适当增加氨水的用量; 而过高浓度的氨水会增加溶液黏度, NH₄⁺吸附在磷石膏表面反而会抑制硫酸钙的溶解^[30]。因此, 优化试验参数后, 在氮硫比为 3 处理下, 溶液中可溶性硫酸根离子浓度最高。此外, 过高的反应温度同样会加快氨水挥发,

导致磷石膏不能充分反应。与黄岩等^[31]的研究结果相比, 本研究虽然未考虑 CO₂ 浓度对试验结果的影响, 但在试验中持续通入了足量的 CO₂, 增加了 CO₂ 在液相中的停留时间, 使其与磷石膏基质充分反应, 确保了磷石膏能够达到最大转化率。Lee 等^[32]对磷石膏矿化反应参数进行优化, 发现在加压条件下磷石膏在 10 min 内转化率可达 95% 以上。增加压力可以增大 CO₂ 与磷石膏接触反应概率, 提高转化率, 但加压后容易引起细胞膜破裂, 致使发酵细菌原生质外渗而引起细胞死亡^[33]。本研究为保证土壤改良剂中细菌的数量和活性, 未对矿化反应进行加压。而在常压条件下, 部分碳酸钙遇到溶有 CO₂ 的水会转化为可溶性的碳酸氢钙, 导致滤液中的 Ca²⁺物质的量增多, 抑制硫酸钙转化率^[34-35], 这也是导致本研究中磷石膏转化率较低的原因。经过各单因素试验优化后, 本试验中磷石膏转化率为 50.02%, 即 1 t 磷石膏理论上可以吸收固定 106.22 kg CO₂, 这可能是农田土壤固碳增汇良好的后备材料。

4 结论

本研究以市售土壤改良剂和磷石膏为原料, 采用半固体发酵工艺制备磷石膏土壤改良剂, 在单因素试验获得较优发酵参数的基础上, 利用 Plackett-Burman 试验筛选得到具有显著性影响的发酵因素为初始 pH 和温度, 进一步利用 CCD 试验获得显著影响因素和可溶性磷含量之间的回归方程, 绘制响应面曲线, 得到最佳发酵参数组合: 发酵温度 52.33 °C、初始 pH 8.05, 该条件下可溶性磷含量为 142.50 mg/L。在氮硫比 3、反应温度 35 °C 和反应时间 4 h 条件下, 磷石膏土壤改良剂与氨水和 CO₂ 反应后, 可溶性硫含量为 12.67 g/L, 可固定 106.22 kg CO₂。总体上, 本研究制备的土壤改良剂, 可以有效调节土壤 pH、增加可溶性磷酸盐和硫酸盐含量, 进而提高土壤固碳增汇能力, 对土壤改良和地力提升具有重要意义。

参考文献:

- [1] Msila X, Labuschagne F, Barnard W, et al. Radioactive nuclides in phosphogypsum from the lowveld region of South Africa[J]. South African Journal of Science, 2016, 112(1/2): 5.
- [2] 国亚非, 赵泽阳, 张正虎, 等. 磷石膏的综合利用探讨[J]. 中国非金属矿工业导刊, 2021(4): 4-7.
- [3] 王维, 许向群, 李杰, 等. 磷石膏与铜尾渣的高效耦合固定/稳定化处理[J]. 硅酸盐通报, 2021, 40(5): 1601-1609.

[4] 田键, 范跃辉, 黄志林, 等. 磷石膏的综合利用现状及建议[J]. 建材世界, 2018, 39(4): 38–40, 51.

[5] 蒋建亚, 张苏花, 付旭东, 等. 磷化工废渣磷石膏的特性及其资源化利用[J]. 山西建筑, 2021, 47(9): 1–4.

[6] 张黎明, 邓万刚. 土壤改良剂的研究与应用现状[J]. 华南热带农业大学学报, 2005(2): 32–34.

[7] 卢维宏, 王要芳, 刘娟, 等. 磷石膏无害化改性及其在农田土壤改良中的应用研究进展[J]. 土壤, 2023, 55(4): 699–707.

[8] 李明珠, 田荣荣, 李然, 等. 脱硫石膏改良剂治理盐碱地的专利技术进展[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2024, 64(10): 1759–1770.

[9] 梁鹏飞, 郭全恩, 曹诗瑜, 等. 盐渍化土壤改良剂对草坪根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. 土壤, 2023, 55(1): 140–146.

[10] 张晨燕, 付甫刚, 谭文超, 等. 多物质联用对磷石膏中磷的固定效果与机理分析[J]. 环境工程技术学报, 2024, 14(1): 194–203.

[11] 王辰, 梁惠祺, 别泉泉, 等. 煤矸石土壤改良剂的研究与进展[J]. 中国煤炭, 2021, 47(12): 49–56.

[12] 路书山, 刘浩, 赵燕洲, 等. 菜粕和豆粕混合生产氨基酸水溶肥的发酵工艺优化[J]. 生态与农村环境学报, 2023, 39(9): 1231–1238.

[13] 孟雅红, 李辉. Plackett-Burman 设计和响应面法优化超声协同酶法提取鸡油菌多糖工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(21): 242–248.

[14] 张红星, 谭晓婷, 王奕晨, 等. 磷石膏-废氨水对 CO₂ 矿化能力的研究[J]. 磷肥与复肥, 2017, 32(10): 10–13.

[15] 张飞龙. Olsen 法测定土壤中有效磷的方法优化及检测研究[J]. 西藏农业科技, 2016, 38(4): 33–37.

[16] 王少明, 刘翠兰. 氧化—还原法测定水中的 SO₄²⁻[J]. 水资源保护, 1991, 8(2): 57–59.

[17] 孙瑞刚, 李连香, 宿立明. 不同预处理条件对土壤可溶性氟测定结果的影响研究[J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2013, 11(1): 48–52.

[18] 杨美英, 王春红, 武志海, 等. 大豆根际溶磷菌分离鉴定及溶磷过程中有机酸的分泌[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(5): 38–44.

[19] Karim M A, Akhter N, Hoque S. Proteolytic activity, growth and nutrient release by *Bacillus cereus* LW-17[J]. Bangladesh Journal of Botany, 2014, 42(2): 349–353.

[20] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 286–294.

[21] 陈哲, 吴敏娜, 秦红灵, 等. 土壤微生物溶磷分子机理研究进展[J]. 土壤学报, 2009, 46(5): 925–931.

[22] 苏辉兰, 莫雪雪, 余炳锋, 等. 贡柑果园高效解磷菌的筛选及其解磷条件优化[J]. 北方园艺, 2019(5): 101–107.

[23] 徐颖宣, 徐尔尼, 冯乃宪, 等. 微生物混菌发酵应用研究进展[J]. 中国酿造, 2008, 27(9): 1–4.

[24] Lenz J, Höfer M, Krasenbrink J B, et al. A survey of computational and physical methods applied to solid-state fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 9–17.

[25] 王粟, 史凤梅, 李家磊, 等. 响应面法优化生物炭与牛粪混合厌氧发酵工艺[J]. 中国沼气, 2020, 38(1): 19–24.

[26] 何明川, 钮徐融, 曾舒泉, 等. 一株烟草黑胫病拮抗菌 Y12 的鉴定及发酵条件优化[J]. 山东农业科学, 2022, 54(8): 130–136, 143.

[27] 闫征, 王昌禄, 顾晓波. pH 值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 35–38.

[28] Knudsen G R. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets[J]. Phytopathology, 1990, 80(8): 724.

[29] 王芳, 李学文, 廖亮, 等. 响应面法优化油菜籽粕中硫苷酶解工艺及其降解产物抑菌作用的初步研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 264–268, 273.

[30] 程晨. 不同溶液体系下磷石膏的溶解行为及其调控[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2023.

[31] 黄岩, 朱梓涵, 周子安, 等. 柠檬酸行业废石膏与 CO₂ 的协同矿化与工艺模拟[J]. 中国环境科学, 2024, 44(11): 6241–6249.

[32] Lee M G, Jang Y N, Ryu K W, et al. Mineral carbonation of flue gas desulfurization gypsum for CO₂ sequestration[J]. Energy, 2012, 47(1): 370–377.

[33] 董永胜, 杨亲正, 贾士儒. 压力对啤酒酵母生长及某些发酵性能的影响[J]. 酿酒科技, 2007(11): 38–40.

[34] 刘冬梅, 庄昭霖, 王青, 等. 磷石膏矿化固定 CO₂ 制备碳酸钙微粉[J]. 化工进展, 2025, 44(1): 66–74.

[35] 钟汝永. 扑朔迷离的碳酸氢钙[J]. 化学教学, 2014(10): 78–79.