

程娟,何环,衡曦彤,等.微生物降解昭通褐煤提高游离腐殖酸含量[J].江苏农业科学,2020,48(17):296-301.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.059

微生物降解昭通褐煤提高游离腐殖酸含量

程娟¹,何环¹,衡曦彤¹,赵阳¹,刘健²,石开仪³,曹清河⁴,李成果⁵

(1. 中国矿业大学化工学院,江苏徐州 221116; 2. 山西晋城无烟煤矿业集团有限责任公司/
煤与煤层气共采国家重点实验室,山西晋城 048012; 3. 六盘水师范学院化学与材料工程学院,贵州六盘水 553004;
4. 江苏徐淮地区徐州农业科学研究所,江苏徐州 221011; 5. 徐州快邦生物科技开发有限公司,江苏徐州 221011)

摘要:筛选到 1 株对云南省昭通褐煤降解效果较好的菌株 H3,经分子生物学鉴定,该菌株与青霉菌 *Penicillium griseopurpureum* 的相似度为 96%。通过正交试验筛选 H3 菌株生物降解昭通褐煤产游离腐殖酸的主要影响因素,结果表明,煤样粒度会明显影响 H3 菌株对煤的生物降解,并且当粒度小于 0.074 mm、反应温度为 30 ℃、反应时间为 7 d 时,菌株 H3 对褐煤的降解效果最好,经降解后褐煤中游离腐殖酸含量为 70.34%,提高 35.87%,降解率达到 56.25%。通过工业分析、X 射线衍射仪(XRD)、傅里叶红外光谱仪(FT-IR)分析了微生物降解前后褐煤性质的变化,结果表明经 H3 菌株降解后昭通褐煤的水分和固定碳含量略有上升,而挥发分和灰分含量略有下降,煤中一部分芳香环可能被真菌破坏,使其微晶结构发生变化。同时,经过微生物降解后的褐煤,部分碳碳双键和碳氮单键消失,说明原煤部分官能团被破坏。

关键词:褐煤;生物降解;游离腐殖酸;青霉菌;降解工艺优化

中图分类号: TQ536;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0296-06

我国煤炭资源较丰富,其中低阶煤含量占煤炭总储备量的 50%,低阶煤包含褐煤、长焰煤、弱黏煤、不黏煤、气煤、焦煤等^[1]。目前,直接燃烧利用低阶煤存在严重的能效和环境问题,因此实现低阶煤的清洁高效利用意义重大。低阶煤是一种富含腐殖酸的资源,其中腐殖酸的含量为 10%~80%,从中提取的腐殖酸具有较高的生化活性,属于高附加值产品,目前已在农业、工业、医药卫生、环境保护、炭材料制备等领域中广泛应用^[2-3]。提取低阶煤腐殖酸所用的传统化学方法污染大、成本高。

生物技术方法是一种环境友好型办法,近年来利用微生物降解煤获取腐殖酸的方法应用也越来越广泛^[3]。Can 等利用 RBK 7 细菌菌株对哈萨克斯坦褐煤进行降解,从中提取了腐殖酸并应用于香菜种植,发现提取的腐殖酸对土壤肥力和发芽率有改善作用^[4]。Yang 等采用 *Penicillium decumbens* P6 纯化酯酶降解褐煤,结果表明酯酶对褐煤有解聚作

用,可产生腐殖酸^[5]。Miszkiewicz 等利用尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 1101 菌株降解氧化剂预处理的褐煤,结果显示尖孢镰刀菌 1101 菌株能够提高褐煤的液化程度和游离腐殖酸含量^[6]。

煤种、菌种的选择及匹配情况是影响微生物降解煤效果的重要因素;除此之外,在煤和菌种确定的情况下,微生物降解煤的主要影响因素有煤粒度、菌接种量、溶煤时间、溶煤温度、环境温度等^[7-8]。Kang 等采用 4 种细菌对神木褐煤进行了生物降解试验,通过单因素试验、正交试验,得到最佳条件下煤的生物降解率可达 53.6%^[9]。Sabar 等从巴基斯坦低阶煤样品中分离得到 1 株真菌(AD-1 菌株),对 AD-1 菌株介导的煤降解反应进行优化,表明 AD-1 菌株在 1.5% 葡萄糖和 0.5% 加煤率的条件下培养 11 d 可以释放出煤样中大量的有机物^[10]。尹艳通过正交试验优化了多黏类芽孢杆菌降解褐煤的工艺条件,得到煤样粒度、菌液用量、降解时间、煤浆浓度等各因素的最优水平^[11]。

腐殖酸按照存在形态可分为游离腐殖酸和(钙、镁)结合腐殖酸^[12]。结合态腐殖酸生物活性较低,在农业等领域中无法直接应用,只有游离腐殖酸才具有固氮、解磷、释钾的良好作用^[13],因此提高煤质腐殖酸中水溶性游离腐殖酸含量有着重要意义。云南省昭通市褐煤储存量很丰富,其中所含

收稿日期:2019-10-18

基金项目:徐州市政策引导类计划(科技合作)(编号:KC18245)。

作者简介:程娟(1996—),女,四川南充人,硕士研究生,主要从事
矿源腐殖酸生物提取相关研究。E-mail:854272991@qq.com。

通信作者:何环,博士,副教授,主要从事煤炭生物转化相关研究,
E-mail:hehuan6819@cumt.edu.cn;曹清河,博士,研究员,主要从
事甘薯种质资源相关研究,E-mail:caqinghe@jaas.ac.cn。

的煤质腐殖酸资源有待利用。本研究从云南省昭通市褐煤煤田周边土壤中分离菌种,筛选出对褐煤有较好液化效果的真菌进行分子生物学鉴定,然后通过正交试验优化影响生物降解试验的因素,并对褐煤降解前后进行物化性质分析,以期为该地区褐煤资源的利用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 真菌的筛选鉴定

本试验采用的褐煤样品来源于云南省昭通市的露天褐煤,其中总腐殖酸、游离腐殖酸含量分别为 37.55%、34.47%。从取回昭通褐煤样品中分离真菌,将分离得到的真菌利用孟加拉红琼脂培养基^[14]培养,菌种长满平板后,在菌体表面均匀地撒上 0.3 g 褐煤样品,将平板倒置,于 28 ℃ 培养箱中培养,每隔 24 h 观察 1 次微生物对煤的降解情况。采用真菌 DNA 抽提试剂盒(HP Fungal DNA Kit,产品编号为 D3195,OMEGA 公司)提取真菌 DNA,进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。扩增条件:95 ℃ 变性 10 min;94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]切胶纯化的 PCR 产物送至广州赛哲生物科技股份有限公司测序。将菌株的基因序列与美国国家生物技术信息中心(NCBI)网中 GenBank 序列数据库进行比较,选取与之同源性最高的 5 种菌株的基因序列,采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,比较其序列同源性。

1.2 褐煤生物降解条件优化

根据前期单因素试验的结果采用正交试验进一步筛选昭通褐煤降解的最优条件。选用培养 48 h 的菌种进行平板溶煤试验,设置煤样粒度(A)、反应温度(B)、反应时间(C)等 3 个影响因素,每个因素分别设置 3 个水平,不考虑各因素的交互作用^[15-16]。如表 1、表 2 所示,正交试验采用 $L_9(3^4)$ 正交表。测定反应前后褐煤的降解率、游离腐殖酸含量,根据 GB/T 35107—2017《矿物源腐殖酸肥料中可溶性腐殖酸含量的测定》^[17]测定褐煤中游离腐殖酸的含量,降解率(η)的计算方法如下:

$$\eta = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\%。$$

式中: m_0 为反应前褐煤质量,g; m_1 为反应后褐煤质量,g。

表 1 正交试验因素及水平

水平	因素		
	A:煤样粒度 (mm)	B:反应温度 (℃)	C:反应时间 (d)
1	[0.150,0.5]	28	3
2	[0.074,0.150)	30	5
3	(0,0.074)	35	7

表 2 正交试验设计

试验号	A	B	空列	C
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

使用直径为 15 cm 的大平板,将菌种划线培养 72 h 后,菌丝布满整个平板,撒入 0.8 g 不同粒径的干燥褐煤煤样,分别放在 28、30、35 ℃ 的恒温培养箱中,按正交试验设计要求反应 3、5、7 d。反应结束后,用去离子水冲洗掉平板上残留的煤样,冲洗液于 10 000 r/min 条件下离心 10 min,随后收集沉淀物,于 70 ℃ 恒温箱中干燥至恒质量,分析褐煤的降解率和游离腐殖酸含量。

1.3 褐煤生物降解前后理化性质的分析

用去离子水将平板上生物降解后的残煤冲洗下来,在 10 000 r/min 条件下离心 10 min,将离心管中的沉淀物于 100 ℃ 干燥 3 h 后收集样品。将原煤和残煤样品研磨至粒度为 75 μm ,制备好煤样送至江苏地质矿产设计研究院进行工业分析。煤样研磨至粒度为 48 μm ,于 105 ℃ 真空干燥 2 h,采用德国布鲁克公司 D8 Advance 型 X 射线衍射(XRD)仪分析原煤和降解后残煤矿物组成;将样品与溴化钾粉按质量比 1:120 的比例混合,研磨成片剂样品,采用德国布鲁克公司 VERTEX 80 V 型傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR)对原煤和残煤样品进行分析,扫描范围为 4 000 ~ 400 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描 32 次^[18]。

2 结果与分析

2.1 真菌的筛选鉴定

从昭通褐煤中分离出 H3 菌株,将倒置平板于

30 ℃ 恒温培养箱培养 72 h 后加煤培养,观察结果如图 1 所示。H3 菌株菌落呈乳白色,菌丝不断扩大直到覆盖整个培养皿,生长后期变成暗绿色。待菌落长满培养皿,均匀撒入 0.3 g 褐煤煤样(煤样过 200

目筛,于 70 ℃ 烘箱中干燥 3 h 预处理),72 h 后观察褐煤降解情况,可以看到菌株生长状况良好,其中 H3 菌株平板上出现了明显的液滴(如图 1 - b 中箭头所示),说明该菌株对昭通褐煤具有降解效果。

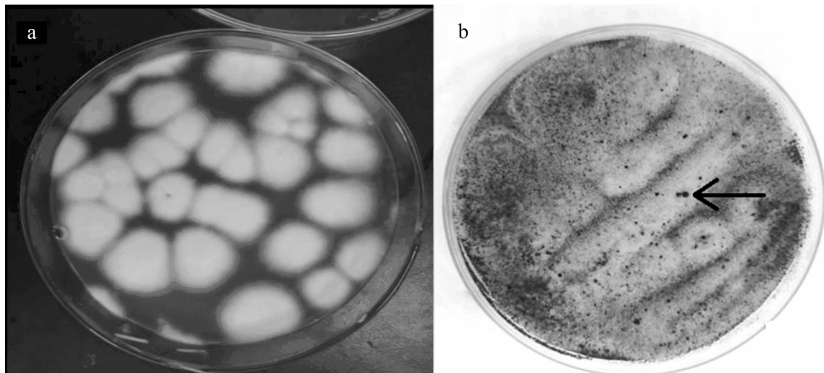


图1 菌株 H3 生长情况(a)和对昭通褐煤的生物降解情况(b)

对 H3 菌株进行分子生物学鉴定,利用 PCR 扩增 ITS 区域,测序后与 GenBank 中的已知序列进行对比,结果如图 2 所示,H3 菌株与 *Penicillium*

griseopurpureum 的部分序列相似率为 96%,期望值为 0,与原物种序列相似度为 99%,由此可以确定 H3 菌株为青霉菌属真菌。

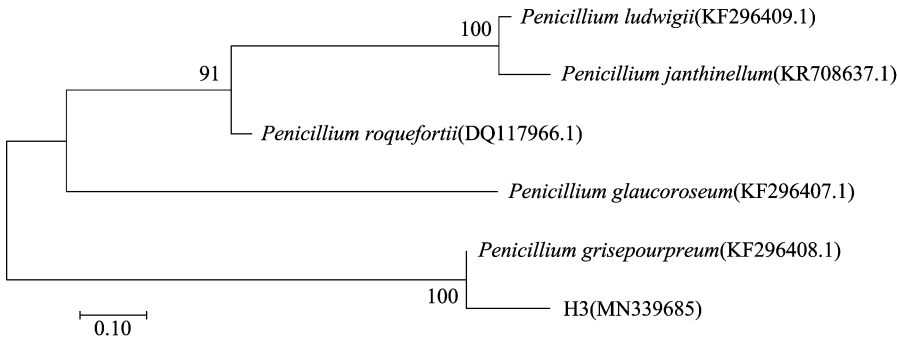


图2 菌株 H3 的系统发育树

2.2 正交试验

由表 3、表 4 分析可知,试验结果的影响因素表现为 A > C > B,即煤样粒度对该试验影响最大,其次为反应时间,反应温度影响最小。在试验条件下 A、B、C 3 个因素的最优水平组合为 A₃B₂C₃,即煤样粒度小于 0.074 mm、反应温度为 30 ℃、反应天数为 7 d,在该条件下经降解后褐煤中游离腐殖酸含量为 70.34%,相较原煤(据“1.2”节测得原煤中游离腐殖酸的含量为 34.47%)提高 35.87%,降解率达到 56.25%。

煤样粒度为 0.150 ~ 0.500 mm、0.074 ~ 0.150 mm 时,反应产生的游离腐殖酸含量基本相同,在煤样粒度小于 0.074 mm 时,游离腐殖酸含量大幅增加;煤样粒度越小,煤样与菌丝体接触的面积就越大,更容易与煤反应,加速降解作用,产生腐

殖酸^[19]。由观察结果可知,游离腐殖酸含量随着温度上升而下降,笔者推测 28 ℃ 可能是 H3 菌株的最佳生长温度,因此在 28 ℃ 时降解效果最佳,随着温度升高降解效果减弱。降解时间达到 7 d,游离腐殖酸含量相比之前最高,表明随着降解时间增长,游离腐殖酸含量不断提高,提高幅度逐渐减少,可能随着时间的延长培养基内营养物质不足,从而无法满足菌体降解煤的需要^[20]。

2.3 生物降解前后煤的物化性质

对褐煤原煤以及最佳试验条件处理后的残煤进行工业分析,如表 5 所示,反应后褐煤的灰分和挥发分含量都有所降低,固定碳含量增加,说明微生物会降解煤产生一部分腐殖酸碳,从而使固定碳含量增加。

如图 3 所示,反应前后峰的位置没有变化,说明

表 3 正交试验结果

试验号	因素				游离腐殖酸含量(%)	降解率(%)
	A	B	空列	C		
1	1	1	1	1	67.32	52.50
2	1	2	2	2	53.21	52.50
3	1	3	3	3	39.71	35.00
4	2	1	2	3	48.24	51.25
5	2	2	3	1	53.22	65.00
6	2	3	1	2	58.97	43.75
7	3	1	3	2	64.96	68.75
8	3	2	1	3	70.34	56.25
9	3	3	2	1	62.53	63.75
均值 1	53.413	60.173	65.543	52.763		
均值 2	53.477	58.923	54.660	59.047		
均值 3	65.943	53.737	52.630	61.023		
极差	12.530	6.436	12.913	8.260		

表 4 正交试验方差分析结果

因素	自由度	偏差平方和	偏差均方值	方差比
煤样粒度	2	312.42	156.21	2.58
反应温度	2	69.89	34.17	0.56
反应时间	2	279.75	139.88	2.31
误差	2	121.18	60.59	
总和	8	783.25		

其矿物组成无明显变化,但是反应后的峰强度变化较大,据 Jiang 等的研究^[21]可初步判定褐煤经过降

解后,结晶度变高。从表 6 可以看出,反应前后褐煤的片层间距从 0.171 8 nm 增加至 0.172 3 nm,增加的数值很小,基本不变;反应前后的层片堆砌厚度(L_c)从原来的 1.087 6 nm 上升至 1.116 9 nm,层片

表 5 菌株 H3 降解褐煤前后煤的物化性质分析结果

样品	水分含量(%)	灰分含量(%)	挥发分含量(%)	焦渣特征(特征代号 1~8)	固定碳含量(%)
原煤	10.47	14.75	57.09	2	36.58
残煤	11.34	14.00	56.70	2	37.24

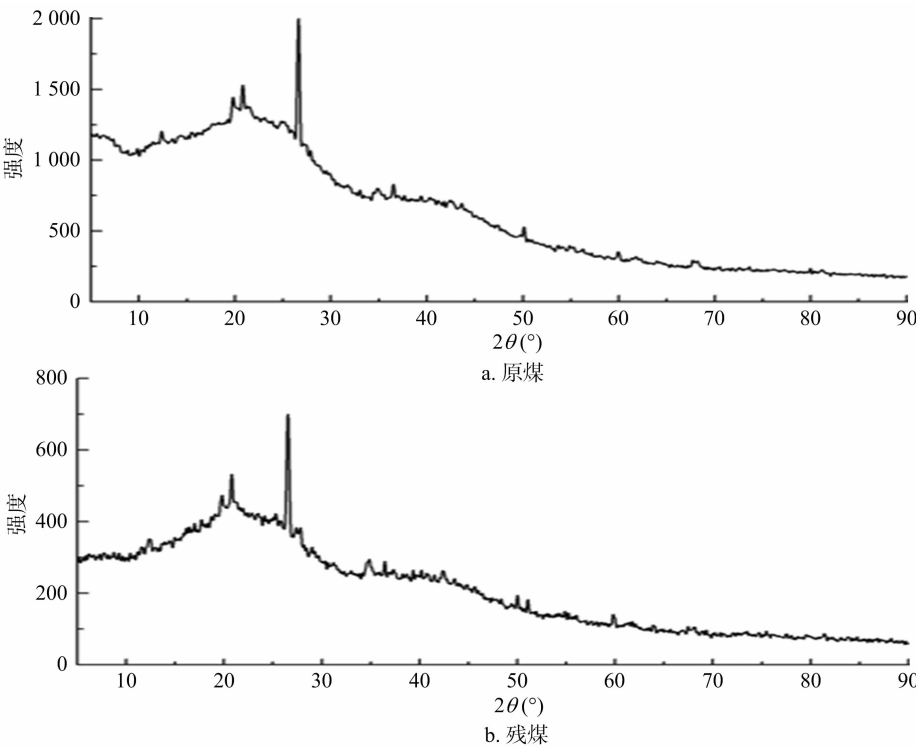


图3 菌株 H3 降解前后原煤和残煤的 XRD 分析结果

表 6 菌株 H3 降解前后煤的微晶结构参数

样品	衍射峰对应的衍射角 θ ($^{\circ}$)	层片间距 (nm)	衍射峰的半高宽 β (rad)	层片平均堆砌厚度 (nm)	层片直径 (nm)
原煤	26.644	0.171 8	0.149	1.087 6	2.129
残煤	26.565	0.172 3	0.145	1.116 9	2.186

原来的 2.129 nm 转变为 2.186 nm, L_a 随煤化程度的增加而增大。综上所述,褐煤降解前后煤的微晶结构的变化可能是微生物降解过程中降解平均堆砌厚度增高, L_c 为 1.2 nm 时,芳香层片的堆砌层数为 3~4 层,反应前后的层片直径(L_a)由了一部分芳香环,使其微晶结构发生变化^[22-23]。

如图 4、表 7 所示,结合 Choudhury 等的研

究^[24-25]对比反应前后褐煤的 FT-IR 分析结果可知,褐煤降解前后出峰的位置基本未发生变化。其中,原煤中碳碳双键吸收峰消失,可能是在微生物转化过程中双键断裂,结合氧生成了 C—O 等含氧官能团;原煤仲酰胺的 C—N 吸收峰消失,也说明降解后的褐煤部分官能团被破坏^[26-28],证明 H3 菌株对褐煤有一定的降解作用。

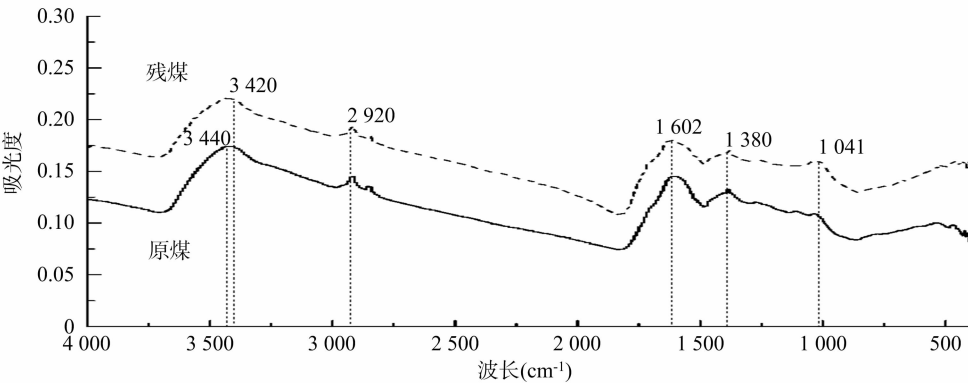


图4 原煤和残煤的红外光谱

表 7 原煤和残煤中的官能团

波数 (cm ⁻¹)	原煤中可能的官能团	波数 (cm ⁻¹)	残煤中可能的官能团
3 420	酚羟基—OH, 强而宽的吸收峰	3 440	—OH 的伸缩振动峰
2 920, 2 851	环烷烃或脂环烃的—CH ₂	2 921	C—H 的不对称伸缩振动峰
1 602	羧基或醛和酮基中 C=O	1 612	羧基或醛和酮基中 C=O 特征伸缩振动峰
1 380	C—H 的变形振动	1 376	—CH ₂ —的对称弯曲振动峰
1 260	仲酰胺的 C—N	1 041	C—O 的伸缩振动
1 107	C—O 伸缩振动		
1 024	C=C		

3 结论

本研究分离鉴定了 1 株对云南昭通褐煤有降解效果的菌株 H3,采用正交试验对 H3 菌株降解褐煤的工艺参数进行了优化并对降解前后煤的物化性质进行了分析,得出结论如下:

(1)菌株 H3 在固体平板上菌落呈乳白色,生长后期菌丝变绿,系统发育分析结果表明该菌株与 *Penicillium griseopurpureum* 序列相似率为 96%,因此将其命名为 *Penicillium griseopurpureum* H3,固体平板溶煤试验结果表明该菌株对褐煤具有较好的降解

效果。
(2)正交试验结果表明菌株降解褐煤产生游离腐殖酸的最佳条件为煤样粒度小于 0.074 mm、反应温度为 30 ℃、反应时间为 7 d,在该条件下褐煤中游离腐殖酸含量为 70.34%,提高 35.87%,降解率达到 56.25%。
(3)经菌株 H3 降解后褐煤的灰分和挥发分含量都降低,固定碳含量增加,在降解过程中产生了一部分芳香环,使得其微晶结构发生变化。同时,经过微生物转化后的褐煤,碳碳双键和碳氮单键消失,证明原煤部分官能团被破坏。

参考文献:

- [1] 张莉萍, 黑大伟. 低阶煤提质技术现状及完善途径[J]. 化工管理, 2017, 24: 137.
- [2] 张传祥, 张效铭, 程 敢. 褐煤腐殖酸提取技术及应用研究进展[J]. 洁净煤技术, 2018, 24(1): 6-12.
- [3] Valero N O, Gómez I L C, Guerra M P, et al. Production of humic substances through coal-solubilizing bacteria[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 45(3): 911-918.
- [4] Can Y, Qiao X, Akimbekov N S, et al. The solubilization of lignite by selective strains of bacteria[J]. Eurasian Journal of Ecology, 2019, 59(2): 51-59.
- [5] Yang Y, Yang J S, Li B Z, et al. An esterase from *Penicillium decumbens* P6 involved in lignite depolymerization[J]. Fuel, 2018, 214: 416-422.
- [6] Miszkiewicz H, Bielecki S, Kadłubowski S. Biosolubilization of polish chemically oxidated brown coal[J]. Engineering and Protection of Environment, 2016, 19(1): 97-108.
- [7] Bao Y, Huang H P, He D S. Microbial enhancing coal-bed methane generation potential, constraints and mechanism-a mini-review[J]. Journal of Natural Gas Science and Engineering, 2016, 35: 68-78.
- [8] Mishra S, Akcil A, Panda S, et al. Effect of span-80 and ultrasonication on biodesulphurization of lignite by *Rhodococcus erythropolis*: lab to semi-pilot scale tests[J]. Minerals Engineering, 2018, 119: 183-190.
- [9] Kang H L, Liu X R, Zhang Y W, et al. Bacteria solubilization of shenmu lignite; influence of surfactants and characterization of the biosolubilization products[J]. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 2019: 1-19.
- [10] Sabar M A, Ali M I, Fatima N, et al. Degradation of low rank coal by *Rhizopus oryzae* isolated from a Pakistani coal mine and its enhanced releases of organic substances[J]. Fuel, 2019, 253: 257-265.
- [11] 尹 艳. 平庄褐煤的微生物降解转化研究[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2013.
- [12] 钟世霞, 徐玉新, 骆洪义, 等. 超声波活化风化煤腐殖酸的影响研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2014, 45(1): 6-9.
- [13] 王洪高, 高进华, 李昆仑, 等. 腐殖酸活化原料指标评价研究[J]. 磷肥与复肥, 2019, 34(6): 28-30.
- [14] 黄 莹, 纪仁飞, 陈艳红, 等. 一株红树内生真菌的形态学及 28S rDNA 序列鉴定[J]. 激光生物学报, 2017, 26(1): 73-77.
- [15] 李非杨. 风化煤的微生物液化工艺研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [16] 冯晓霄. 新疆低价煤微生物液化研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2014.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 35107-2017 矿物源腐殖酸肥料中可溶性腐殖酸含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [18] Wang S Q, Tang Y G, Schobert H H, et al. FTIR and ¹³C NMR investigation of coal component of late permian coals from southern China[J]. Energy Fuels, 2011, 25(12): 5672-5677.
- [19] 石开仪, 何 环, 李 志. 白腐真菌 *S. commune* 对昭通褐煤生物液化研究[J]. 煤炭技术, 2016, 35(9): 276-278.
- [20] Haider R, Ghauri M A, Akhtar k. Isolation of coal degrading fungus from drilled core coal sample and effect of prior fungal pretreatment on chemical attributes of extracted humic acid[J]. Geomicrobiology Journal, 2015, 32(10): 944-953.
- [21] Jiang J Y, Yang W H, Cheng Y P, et al. Molecular structure characterization of middle-high rank coal via XRD, Raman and FTIR spectroscopy: implications for coalification[J]. Fuel, 2019, 239: 559-572.
- [22] Ahmeda M A, Blesa M J, Juan R, et al. Characterisation of an Egyptian coal by Mossbauer and FT-IR spectroscopy[J]. Fuel, 2003, 82(14): 1825-1829.
- [23] Baysal M, Yürüm A, Yildiz B, et al. Structure of some western Anatolia coals investigated by FTIR, Raman, ¹³C solid state NMR, spectroscopy and X-ray diffraction[J]. International Journal of Coal Geology, 2016, 163: 166-176.
- [24] Choudhury R, Gupta U N, Waanders F B, et al. A multi-analytical study on the sulphur components in some high sulphur Indian Tertiary coals[J]. Arabian Journal of Geosciences, 2016, 9: 100.
- [25] Qin Z H, Chen H, Yan Y J, et al. FTIR quantitative analysis upon solubility of carbon disulfide/N-methyl-2-pyrrolidinone mixed solvent to coal petrographic constituents[J]. Fuel Processing Technology, 2015, 133: 14-19.
- [26] He X Q, Liu X F, Nie B S, et al. FTIR and Raman spectroscopy characterization of functional groups in various rank coals[J]. Fuel, 2017, 206: 555-563.
- [27] Cepus V, Borth M, Seit M. IR spectroscopic characterization of lignite as a tool to predict the product range of catalytic decomposition[J]. International Journal of Clean Coal and Energy, 2016, 5: 13-22.
- [28] Cui X, Li X L, Li Y M, et al. Evolution mechanism of oxygen functional groups during pyrolysis of Datong coal[J]. Journal of Thermal Analysis Calorimetry, 2017, 129(2): 1169-1180.