

雅致小克银汉霉与芽孢杆菌联合降解 义马煤产腐植酸

陈林勇^{1,2,3}, 刘建民¹, 崔宇翔^{2,3}, 任恒星^{1,2,3}, 赵 晗^{2,3}, 赵 娜^{2,3}, 宋燕莉^{2,3}, 关嘉栋^{2,3}, 牛江露^{2,3},
李国富^{1,2,3}, 王保玉^{1,2,3}, 何 环^{4,5}

(1. 河南理工大学 资源环境学院, 河南 焦作 454000; 2. 煤与煤层气共采国家重点实验室, 山西 晋城 048000; 3. 易安蓝焰煤与煤层气共采技术有限公司, 山西 晋城 048000; 4. 中国矿业大学 化工学院, 江苏 徐州 221116; 5. 中国矿业大学 煤炭加工与高效洁净利用教育部重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘 要:微生物降解是煤炭清洁高效利用的重要方式之一, 但真菌细菌联合培养对煤的降解效果尚无定论。以雅致小克银汉霉 (*Cunninghamella elegans*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 为降解菌, 以硝酸氧化的义马煤为底物进行了煤的联合降解实验。利用紫外-可见分光光度计、pH 计、电感耦合等离子体质谱仪对降解液的吸光度 A_{450} 、pH、金属元素 (Cr、As、Mn、Pb、Co、Ni、Cu、Zn、Mo) 质量浓度进行测定。利用元素分析仪、红外光谱仪、气质联用仪对产物腐植酸进行分析。研究结果显示雅致小克银汉霉 (*Cunninghamella elegans*)、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)、混合菌的腐植酸产率分别为 58.17%、61.00%、67.17%, 混合菌降解液的 pH 与细菌接近, 混合菌降解的腐植酸样品中检出细菌的特征性产物而真菌的特征性产物则未检出, 说明两株菌联合强化了碱性环境, 提高了硝酸氧化煤的降解率, 降解过程中细菌起主导作用。金属元素 (Cr、As、Mn、Pb、Co、Ni、Cu、Zn、Mo) 在降解过程中从煤迁移到了降解液, 其中 Cr、As、Pb、Ni、Cu、Mo 的质量浓度与 A_{450} 拟合的判定系数 (R^2) 大于 0.6, 说明降解液中这 6 种金属元素的质量浓度可表征降解率的相对大小。化学提取腐植酸与生物提取腐植酸均富含羧基、羟基、羰基等活性官能团、长链脂肪酸 (C16、C18) 和 4 种吡咯衍生物, 生物提取腐植酸还含有分子量较小的脂肪酸 (C3、C4、C5、C13、C14、C15)、2 种吡咯衍生物和吡喃等含氮化合物, 生物提取腐植酸的 C、H 元素质量分数高于化学提取腐植酸。

关键词:雅致小克银汉霉; 芽孢杆菌; 微生物降解; 金属元素; 义马煤

中图分类号: P618.11 文献标志码: A 文章编号: 0253-9993(2023)11-4224-09

Humic acid production from the degradation of Yima coal by *Cunninghamella elegans* combined with *Bacillus* sp.

CHEN Linyong^{1,2,3}, LIU Jianmin¹, CUI Yuxiang^{2,3}, REN Hengxing^{1,2,3}, ZHAO Han^{2,3}, ZHAO Na^{2,3}, SONG Yanli^{2,3},
GUAN Jiadong^{2,3}, NIU Jiangu^{2,3}, LI Guofu^{1,2,3}, WANG Baoyu^{1,2,3}, HE Huan^{4,5}

(1. Institute of Resources and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China; 2. State Key Laboratory of Coal and CBM Co-mining,

收稿日期: 2022-11-02 修回日期: 2023-02-09 责任编辑: 钱小静 DOI: 10.13225/j.cnki.jccs.2022.1581

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (42230804, 42172187)

作者简介: 陈林勇 (1988—), 男, 陕西安康人, 高级工程师, 硕士。E-mail: chenlinyong0225@126.com

通讯作者: 刘建民 (1979—), 男, 河南许昌人, 副教授, 博士。E-mail: liujianmin519@163.com

引用格式: 陈林勇, 刘建民, 崔宇翔, 等. 雅致小克银汉霉与芽孢杆菌联合降解义马煤产腐植酸[J]. 煤炭学报, 2023, 48(11): 4224-4232.

CHEN Linyong, LIU Jianmin, CUI Yuxiang, et al. Humic acid production from the degradation of Yima coal by *cunninghamella elegans* combined with *bacillus* sp.[J]. Journal of China Coal Society, 2023, 48(11): 4224-4232.



移动阅读

Jincheng 048000, China; 3. Yi'an Lanyan Coal and Coalbed Methane Simultaneous Extraction Technology Co., Ltd., Jincheng 048000, China; 4. School of Chemical Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China; 5. Key Laboratory of Coal Processing and Clean Utilization of Ministry of Education, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Biodegradation is one of the important ways for the clean and efficient utilization of coal. However, the effectiveness of degradation by the combination of fungi and bacteria has not been well understood. In the present study, the combined degradation of the Yima coal was tested. The coal samples were firstly oxidized with nitric acid, followed by cultured in the media of *Cunninghamella elegans* and *Bacillus* sp.. The absorbance of A_{450} , pH and metallic element (Cr, As, Mn, Pb, Co, Ni, Cu, Zn, Mo) contents of the degradation solution were determined by UV-visible spectrophotometry, pH meter and inductively coupled plasma mass spectrometry, respectively. The humic acid was analyzed by element analyzer, Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that the humic acid yields of *C. elegans*, *Bacillus* sp. and their mixture were 58.17%, 61.00% and 67.17%, respectively. The pH of the degradation solution of mixed strains was similar to that of the bacteria. The characteristic products of the bacteria degradation were detected in the humic acid samples derived from mixed strains, while the opposite was true for the fungi. It was suggested that the combination of the two strains enhanced the alkaline environment and improved the degradation rate of nitric acid-treated coal. The bacteria played a leading role in the degradation process. Metallic elements (Cr, As, Mn, Pb, Co, Ni, Cu, Zn, Mo) were transferred from coal to the degradation solution during the degradation process, and the contents of Cr, As, Pb, Ni, Cu and Mo were fitted with A_{450} , the coefficient of determination (R^2) were greater than 0.6. It indicated that the contents of these six metal elements in the degradation solution could represent the degradation rate. Chemically extracted humic acid and biologically extracted humic acid were rich in the active functional groups such as carboxyl, hydroxyl, carbonyl, long-chain fatty acids (C16, C18) and four pyrrole derivatives. The biologically extracted humic acid also contained fatty acids (C3, C4, C5, C13, C14, C15), of smaller molecular weight, as well as nitrogen-containing compounds such as two pyrrole derivatives and a furan. The contents of C and H elements in the biologically extracted humic acid were higher than that in the chemically extracted humic acid.

Key words: *Cunninghamella elegans*; *Bacillus* sp.; biodegradation of coal; metallic elements; Yima coal

自 20 世纪 80 年代 COHEN 等^[1]发现微生物可将褐煤降解为黑色液滴以来, 微生物溶煤作为煤的清洁高效利用的技术手段之一引起了国内外学者的广泛关注, 基于微生物溶煤的地下煤炭原位生物开采技术被认为是煤炭化学开采关键技术之一^[2]。经过近 40 a 的发展, 已经有上百种与煤降解相关的微生物被分离出来, 研究涵盖了褐煤^[3]、亚烟煤^[4]、硬煤^[5]、风化煤^[6]等各种煤, 降解的机理可概括为碱性物质^[7]、生物氧化酶^[8-9]、螯合剂^[10]、表面活性剂^[11]、酯酶^[12]作用。煤的生物降解液可被酸沉淀, 沉淀的主要成分为腐植酸 (HA)^[4, 13]。腐植酸的产率通常有 3 种计算方法: 第 1 种是通过实验前后煤的质量差来计算^[14-15], 当煤因颗粒较小或被菌丝包裹等原因不易收集时该方法引起的误差较大; 第 2 种方式是通过降解液的酸沉淀产物即腐植酸的质量来衡量^[16]; 第 3 种途径是以降解液在 450 nm 处的吸光度来表征^[17], 相对于前 2 种方法, 测量吸光度仅需少量发酵液, 因此更适用于实验过程的监测, 用于反映实验所处的阶段。

微生物与煤的作用方式可分为单一菌降解、真菌

细菌联合培养和菌群发酵^[18]。然而对于真菌细菌联合培养对煤的降解作用尚无定论。卢丽丽^[12]的研究表明混合菌种对煤的降解率大于单一菌种对煤的降解率, 王龙贵等^[19]、张明旭等^[20-21]的研究具有类似的结论。李非杨^[16]的研究则显示相对单一菌种来说, 混合菌对预处理风化煤的液化并未达到很好的效果。MAKA 等^[22]报道了一种真菌细菌组合对煤的降解作用, 但未做混菌与纯菌的对比。

武俐等^[23]发现 As、Ba、Co、Ni 和 Pb 等微量元素在煤生物气化过程中从煤中转移到了降解液, 导致降解液微量元素的质量浓度升高。接种嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 的煤矸石, 其锰铬等金属元素的释放明显增加^[24]。这些研究表明在煤的微生物降解过程中金属元素会发生迁移转化, 而目前对煤的好氧降解过程中金属元素在煤与降解液之间的转移研究较少。

笔者利用从腐木中分离得到的一株真菌和一株细菌开展了联合降解义马煤研究, 对降解液及其酸沉淀产物腐植酸进行了分析, 为深入分析煤的真菌细菌

联合降解过程提供参考。

1 材料与方法

1.1 煤样与菌源

(1) 硝酸氧化煤。河南义马煤, 破碎筛分至 80~120 目 (0.125~0.200 mm), 80 °C 烘干 48 h。在 500 mL 烧杯中加入煤样 100 g、7.6 mol/L 硝酸 150 mL, 反应过程中将烧杯放入室温水避免反应物溢出, 同时不断搅拌至黄烟消失后静置反应 24 h, 用纯水清洗煤至上清液 pH > 6 后将煤样在 80 °C 下烘干 72 h 备用。

(2) 菌源。实验室分离的真菌雅致小克银汉霉 (*Cunninghamella elegans*), 简称 F11; 细菌芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*), 简称 B1。

1.2 培养基

(1) PDA 培养基。市售 PDB(环凯生物) 培养基干粉 24 g、琼脂粉 25 g、纯水定容至 1 L。

(2) LB 培养基。蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g、酵母粉 5 g、纯水定容至 1 L。LB 固体培养基另加入琼脂粉 12 g。

1.3 实验方法

1.3.1 真菌细菌混合物联合降解

用接种环从保存的 F11 斜面上刮取适量菌丝转入含有 5 mL 无菌水的离心管中, 充分震荡离心管使菌液均匀, 取 200 μ L 菌液滴加于 PDA 培养基, 用涂布棒均匀涂布, 30 °C 恒温倒置培养 5 d, 菌丝铺满平板。

用接种环从保存的 B1 斜面上蘸取少量菌体转入含有 5 mL 无菌水的离心管中, 充分震荡离心管使菌液均匀, 取 200 μ L 菌液滴加于 LB 固体培养基, 用涂布棒均匀涂布, 30 °C 恒温倒置培养 2 d, 菌落铺满平板。

在 250 mL 三角瓶中加入 150 mL LB 培养基, 湿热灭菌后, 用打孔器分别接入 4 孔真菌 (4F)、3 孔真菌+1 孔细菌 (3F1B)、2 孔真菌+2 孔细菌 (2F2B)、1 孔真菌+3 孔细菌 (1F3B)、4 孔细菌 (4B)、50 孔真菌+1 孔细菌 (50F1B), 放入恒温振荡器在 30 °C、150 r/min 条件下恒温振荡培养 4 d, 加入 2 g 灭菌的硝酸氧化煤振荡均匀, 静置 4 h 后取上清液测 pH、吸光度 A₄₅₀ 作为第 0 天的数据。放入恒温振荡器在 30 °C、150 r/min 条件下继续培养, 每 4 d 取降解液测 pH、吸光度 A₄₅₀(尤尼柯, UV-4802)。对照组 (CK) 的培养基中不接种。每组实验做 3 个平行样。

1.3.2 降解液中金属元素质量浓度测定

待 A₄₅₀ 稳定后 (A₄₅₀ 为降解液在 450 nm 处的吸光度), 将降解液在 10 000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液, 按照 HJ 700—2014《水质 65 种元素的测定 电感耦合等离子体质谱法》测上清液中 Cr、As、Mn、Pb、

Co、Ni、Cu、Zn、Mo 的质量浓度。

1.3.3 腐植酸收集与分析

待 A₄₅₀ 稳定后, 将降解液在 10 000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液, 用盐酸将上清液 pH 调至 2 以下^[15], 静置沉淀 24 h, 10 000 r/min 下离心 10 min, 收集沉淀 (腐植酸), 在 80 °C 下烘干 48 h 后称重, 根据腐植酸的质量计算产率。

腐植酸产率计算公式为

$$\eta_i = \frac{M_i - M_{CK}}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中, η_i 为实验组 i 的腐植酸产率, i 取 1F3B、2F2B、3F1B、50F1B、4B、4F; M_i 为实验组 i 的腐植酸质量, g; M_{CK} 为对照组 CK 的腐植酸质量, g; M_0 为实验启动时加煤的质量, g。

取烘干后的腐植酸 1 g 加入 5 mL 甲醇, 50 °C 浸泡萃取 72 h^[25]。萃取完成后, 将上清液用氮吹仪在 45 °C 浓缩至 1 mL, 采用气质联用仪 (Agilent 7890A-5795C) 进行组分分析。色谱柱采用 Agilent VF-WAXms(30 m×250 μ m×0.25 μ m), 载气为高纯度的氦气, 进样量 0.8 μ L, 柱流速 1.0 mL/min, 柱子初始温度 60 °C, 保持 2 min, 以 10 °C/min 的速率升温至 250 °C, 保持 20 min。分析完成后用 NIST08 数据库进行有机物鉴定。

采用岛津 IRAffinity-1S 对腐植酸进行红外光谱扫描, 样品与溴化钾质量比为 1 : 200, 扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} , 扫描 24 次, 分辨率 0.5 cm^{-1} 。

2 结果与讨论

2.1 产物元素分析

研究表明, 煤的硝酸氧化反应可以将煤中的脂肪结构、酚羟基和醌结构氧化破裂生成腐植酸、草酸和小分子脂肪酸^[26], 煤的微生物好氧降解产物是腐植酸^[27]。因此经过盐酸沉淀后对照组的产物是化学提取的腐植酸 (chemically extracted humic acid, cHA), 实验组是生物提取的腐植酸 (bio-extracted humic acid, bHA)。由表 1 可知, 原煤经过硝酸氧化后氮、氧质量分数升高, 这是因为煤硝酸氧化反应过程中存在着硝化反应^[26]。DONG 等^[28]的研究说明褐煤好氧降解过程中腐植酸 (bHA) 结合了培养基中的氮, VERHEYEN 等^[29]研究发现原煤氧化过程中 40% 的氢生成了脂肪化合物, 其中乙酸、丁二酸和丙二酸是主要产物。本文所用 LB 培养基中的蛋白胨和酵母粉都是富含氮元素的试剂, 由表 1 可知氮、氢质量分数呈现出 bHA > cHA > 氧化煤的趋势, 说明 bHA 和 cHA 均可结合培养基中的氮且在微生物的作用下 bHA 结合氮能力大

于 cHA, 腐植酸生成的过程中还富集了煤中的氢元素, 这一现象与文献[30-31]一致。

表 1 样品元素分析

样品	N _{daf}	C _{daf}	H _{daf}	S _{daf}	O _{daf}
原煤	0.91	56.67	3.36	0.63	17.86
氧化煤	3.64	51.72	2.76	0.51	23.77
cHA(CK)	7.14	34.57	3.17	0.46	20.34
bHA(50F1B)	7.69	45.61	3.58	0.73	20.63
bHA(3F1B)	7.77	40.34	3.49	0.54	22.10
bHA(2F2B)	7.70	39.06	3.25	0.51	23.70
bHA(1F3B)	7.73	45.01	3.45	0.56	25.14
bHA(4B)	7.87	43.45	3.54	0.53	25.56
bHA(4F)	7.71	41.00	3.36	0.51	24.93

2.2 降解机理分析

以实验结束时的吸光度及腐植酸质量作图, 结果如图 1 所示, 2 组数据变化趋势一致。经相关性分析可知其相关系数为 0.998, 说明 2 者间存在强相关性。将吸光度与产物质量进行线性拟合, 如图 2 所示, 判定系数 $R^2=0.997$, 说明吸光度可以指示煤的降解程度[32]。

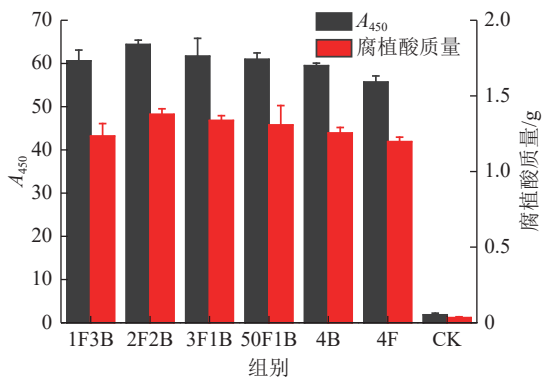


图 1 不同组降解液吸光度与腐植酸质量变化趋势

Fig.1 Trend of absorbance of degradation solution and humic acid quality in different groups

实验组 (1F3B、2F2B、3F1B、50F1B、4B、4F) 及对照组 (CK) 的产物质量分别为 1.23、1.38、1.34、1.31、1.25、1.20、0.03 g, 根据式 (1) 计算得混合菌 (1F3B、2F2B、3F1B、50F1B) 降解的产物产率分别为 60.00%、67.17%、65.17%、63.67%, 真菌 (4F)、细菌 (4B) 分别为 58.17%、61.00%, 降解率整体上呈现出混合菌大于纯菌、细菌大于真菌的规律。

实验过程中各组的 pH 变化规律如图 3 所示, 对照组 (CK) 的 pH 从 5.33 缓慢降低到 4.46 后稳定, 与文献报道的现象一致[31, 33], 而实验组的 pH 从第 4 天

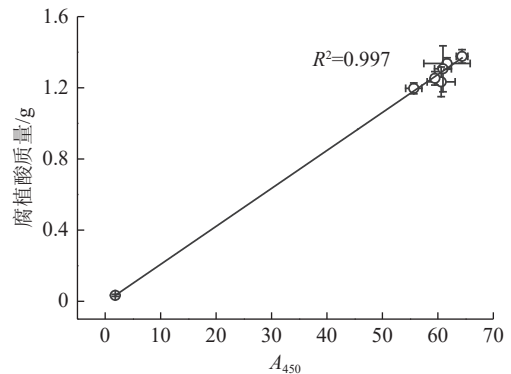


图 2 不同组降解液吸光度与腐植酸质量拟合

Fig.2 Fitting of absorbance of degradation solution and humic acid quality in different groups

至实验结束在 7.86~8.72 的碱性范围内波动, 说明真菌、细菌及其混合物在实验过程中产生了碱性物质。纯菌作用下的 pH 始终略低于混合菌, 结合吸光度变化规律 (图 4) 可知相应的混合菌的降解率高于纯菌, 说明真菌细菌联合降解煤时具有相互促进的作用, 混合菌产生的碱性物质比纯菌多, 碱性物质在煤降解过程中发挥了重要作用。实验启动时, 真菌实验组的 pH 与其他实验组相差约 1, 而吸光度则约为其他实验组的 1/3, 也说明了碱性物质对煤降解产生了重要影响。

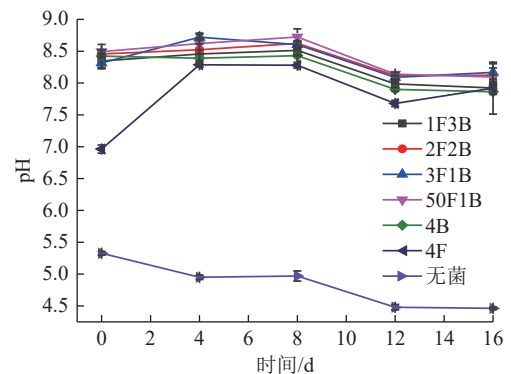


图 3 不同组降解液 pH 变化趋势

Fig.3 Trend of pH in different degradation solutions

2.3 降解液金属元素变化规律

如图 5 所示, Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Pb 等 9 种金属元素在对照组 (CK) 中均检出, 说明即使无微生物的降解作用也会有一定量的金属元素从煤中迁移到降解液中, 这是因为强酸氧化处理过的煤即使无生物或化学试剂的作用也可在水中部分溶解[34]。

Cr、Co、Ni、Cu、Zn、As、Mo、Pb 等 8 种金属元素在实验组降解液中质量浓度高于对照组 (CK), 说明真菌、细菌及其混合物在降解煤的同时具有促进金属元素从煤中向降解液中迁移的作用, 这与武俐等[23]在煤的生物气化过程中发现的 As、Ba、Co、Ni 和 Pb 等

金属元素元素从煤中转移到了降解液的现象类似。
将金属元素质量浓度与吸光度进行线性拟合, 结

果如图 6 和表 2 所示, Cr、As、Pb、Ni、Cu、Mo 等 6 种金属元素与 A_{450} 拟合的判定系数 (R^2) 大于 0.6 且

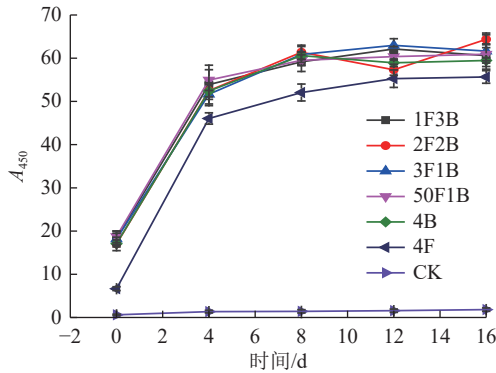


图 4 不同组降解液吸光度变化趋势
Fig.4 Trend of absorbance in different degradation solutions

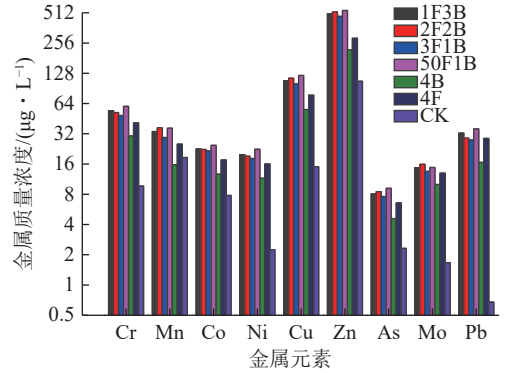


图 5 降解液中金属元素质量浓度分布
Fig.5 Distribution of metal element content in degradation solution

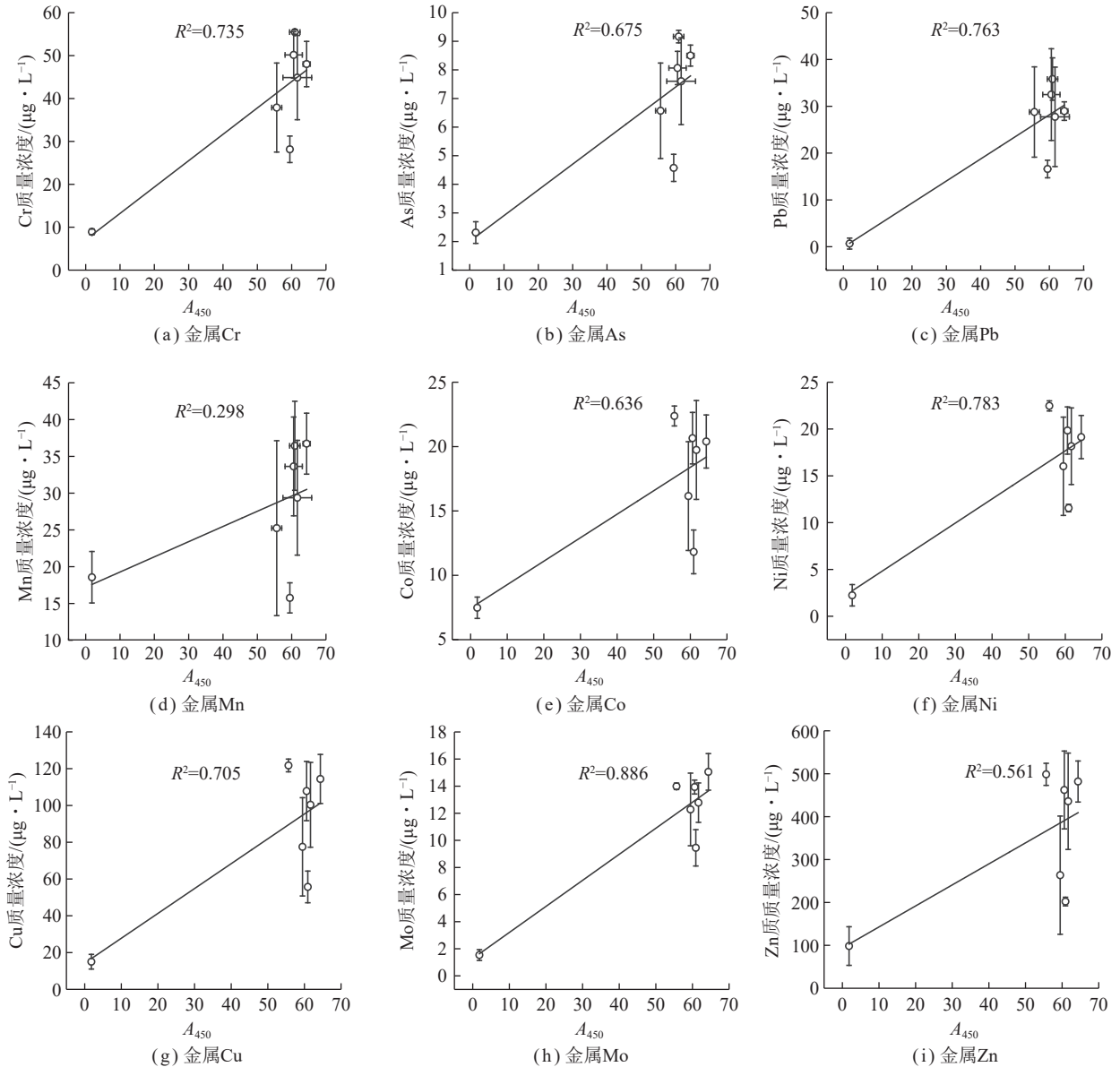


图 6 金属元素质量浓度与吸光度拟合

Fig.6 Fitting of metal element content and absorbance

表 2 金属元素与吸光度拟合参数
Table 2 Fitting parameters of metal elements and absorbance

元素	Cr	As	Mn	Pb	Co	Ni	Cu	Zn	Mo
R^2	0.735	0.675	0.298	0.763	0.553	0.706	0.621	0.471	0.847
F 检验	13.844	10.369	2.122	16.073	6.196	12.025	8.195	4.455	27.739
概率 $P > F$	0.014	0.023	0.205	0.010	0.055	0.018	0.035	0.089	0.003

模型检验结果为显著, 即 Cr、Ni、Cu、As、Mo、Pb 与 A_{450} 正相关, 也即煤降解液中的金属元素 Cr、Ni、Cu、As、Mo、Pb 质量浓度越高, 相应的煤降解率也越高。

如图 6(d) 所示, Mn 元素在对照组 (CK) 中质量浓度高于细菌实验组 (4B), 与吸光度间无显著的相关关系。对照组中含有锰元素说明煤中含有该元素。一方面由上文分析可知细菌 (4B) 实验组的煤发生了降解, 因此煤中的 Mn 元素会转移至降解液中导致 Mn 元素质量浓度升高。另一方面, 微生物分离过程中发现真菌 F11 和细菌 B1 均可使苯胺蓝平板褪色而苯胺蓝可以指示锰过氧化物酶的存在, 说明两株菌均可产生锰过氧化物酶。研究表明锰过氧化物酶的反应需要 Mn 的参与^[35-36], 因此降解液中的锰因参与反应而导致质量浓度降低。综上所述, 在煤的降解过程中 Mn 元素存在着释放与利用平衡。混合菌实验组的 Mn 元素质量浓度高于对照组 (CK) 且与之存在显著

差异 ($P < 0.05$), 说明真菌与细菌混合具有协同作用, 锰元素的释放大于利用, 因此在降解液中的质量浓度升高, 这与 pH 分析的结果一致。Co、Zn 的质量浓度与吸光度间无显著的相关关系, 具体原因还有待进一步研究。

2.4 腐植酸甲醇萃取物 GCMS 分析

由图 7 及表 3 可知, 2、3、9、11、13、14、18、19 号峰为对照组及实验组共有的峰, 对应的化合物为乙二酸、十六烷酸、十八烷酸、吡咯、4 种吡咯衍生物。

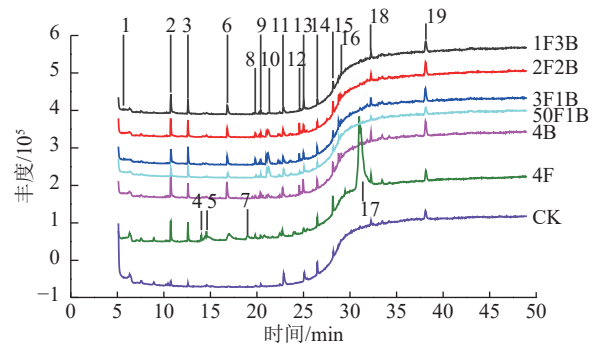


图 7 不同组腐植酸甲醇萃取物 GCMS

Fig.7 GCMS of methanol extracts of humic acid in different groups

由对照组、4F、4B 组的色谱图 (图 7) 可知, 7、17 号峰仅出现在 4F 实验组, 因此对应的化合物十八甲基环九硅氧烷、顺-13-二十二碳烯酸为真菌特征性产

表 3 腐植酸甲醇萃取物 GCMS 定性结果

Table 3 GCMS qualitative results of methanol extracts of humic acid

序号	出峰时间/min	化合物	分子式	分布
1	5.66	N-乙基吡咯	C_6H_9N	混合菌、4B
2	10.73	乙二酸(二甲酯)	$C_4H_6O_4$	实验组、对照组
3	12.59	吡咯	C_4H_5N	实验组、对照组
4	14.03	丁二酸(二甲酯)	$C_6H_{10}O_4$	4F
5	14.50	丁二酸(二甲酯)	$C_6H_{10}O_4$	2F2B、3F1B、50F1B、4B、4F
6	16.83	苯乙酸(甲酯)	$C_9H_{10}O_2$	混合菌、4B
7	18.99	十八甲基环九硅氧烷	$C_{18}H_{54}O_9Si_9$	4F
8	19.81	3-Acetoxy-3-hydroxypropionicacid(methylester)	$C_6H_{10}O_5$	4F
8	19.83	12-甲基十三烷酸(甲酯)	$C_{15}H_{30}O_2$	3F1B
8	19.83	丁酸(甲酯)	$C_5H_{10}O_2$	4B
8	19.84	(S)-12-甲基十四烷酸(甲酯)	$C_{16}H_{32}O_2$	2F2B
9	20.40	2-吡咯甲酸(甲酯)	$C_6H_7NO_2$	实验组、对照组
10	21.03	(S)-12-甲基十四烷酸(甲酯)	$C_{16}H_{32}O_2$	2F2B、50F1B
10	21.19	十五烷酸(甲酯)	$C_{16}H_{32}O_2$	3F1B、50F1B
10	21.22	12-甲基十三烷酸(甲酯)	$C_{15}H_{30}O_2$	2F2B
10	21.26	Methyl9-methyltetradecanoate	$C_{16}H_{32}O_2$	50F1B
10	21.35	2-甲基正戊酸	$C_6H_{12}O_2$	1F3B

续表

序号	出峰时间/min	化合物	分子式	分布
11	22.80	十六烷酸(甲酯)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	实验组、对照组
12	24.55	吡咯烷乙酸乙酯	C ₈ H ₁₅ NO ₂	2F2B、3F1B、4B
12	24.58	Pyrrole,2-methyl-5-phenyl-	C ₁₁ H ₁₁ N	50F1B
13	25.01	十八烷酸(甲酯)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	实验组、对照组
14	26.48	(S)-(+)-2-吡咯烷酮-5-甲酸(甲酯)	C ₆ H ₉ NO ₃	实验组、对照组
15	28.16	Pyrazolo[5,1-c][1,2,4]benzotriazin-8-ol	C ₉ H ₆ N ₄ O	4F、4B
15	28.17	2-氰基咪喃	C ₅ H ₃ NO	1F3B、2F2B
15	28.18	N-Phenyl-2-diazo-2-cyanoacetamide	C ₉ H ₆ N ₄ O	3F1B
15	28.21	异补骨脂素	C ₁₁ H ₆ O ₃	对照组
16	29.07	4-羟基苯乙酸(甲酯)	C ₉ H ₁₀ O ₃	混合菌、4B
17	30.98	顺-13-二十二碳烯酸	C ₂₂ H ₄₃ NO	4F
18	32.25	(9Cl)-六氢-3-甲基吡咯并[1,2-A]吡嗪-1,4-二酮	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	实验组、对照组
19	38.14	六氢吡咯并[1,2-A]吡嗪-1,4-二酮	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	实验组、对照组

物。1、6、16号峰仅出现在4B实验组,对应的N-乙基吡咯、苯乙酸、4-羟基苯乙酸为细菌的特征性产物。结合混合菌实验组的色谱图可知,细菌的特征性产物在混合菌实验组中检出而真菌的特征性产物则未检出,说明混合后细菌占主导作用。由图3可以看出,在整个实验周期内尤其是第4天之前混合菌降解液的pH始终与细菌降解液接近,也从侧面说明混合后细菌占主导作用。

4、5、8、10、12号峰在对照组未检出,其中4、5号峰定性为丁二酸,8、10号峰为长链脂肪酸(C13、C14、C15)、挥发性脂肪酸(C3、C4、C5),12号峰为2种吡咯衍生物。与对照组的cHA相比,除了共有的十六烷酸(C16)、十八烷酸(C18)、4种吡咯衍生物之外,实验组的bHA中含有更多脂肪链较短、分子量较小的脂肪酸和种类更丰富的吡咯衍生物。GHANI M J等^[13]的研究表明相对于cHA,bHA的分子量和芳香性降低,与本文的研究结果类似。

15号峰在实验组及对照组均可定性为芳香族化合物,在对照组为含氧稠杂环化合物,在实验组中为含氮稠杂环化合物或有含氮官能团的化合物,说明bHA的含氮化合物更多,与元素分析的结果一致。

2.5 腐植酸红外光谱分析

如图8所示,各组产物的红外光谱图相似,3500~2000 cm⁻¹有一个弥散的强吸收谱带,对应羧基COOH的O—H和NH⁺伸缩振动^[37]。2362 cm⁻¹处为羧基的氢键缔合伸缩振动^[38-39]。1720、1666 cm⁻¹处为羰基C=O的伸缩振动^[37,40-41]。1543、1407 cm⁻¹处苯环骨架振动^[37]。说明腐植酸大分子的基本结构含有芳香环并富含羧基、羟基、羰基等活性官能团。

如前文所述,实验组含有更多的含氮稠杂环化合物或含氮官能团,其中吡咯、咪喃和噻吩的结构是与苯环类似封闭的芳香共轭体系^[42]。杂环的骨架吸收峰与苯环相似^[43],因此在1407 cm⁻¹处吸收峰比对照组强。

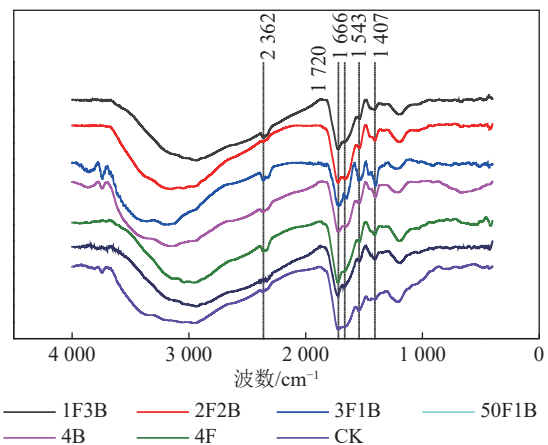


图8 不同组腐植酸红外光谱

Fig.8 FTIR of humic acid in different groups

3 结 论

(1) 雅致小克银汉霉 (*C. elegans*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 均可通过碱性物质作用机理实现硝酸氧化煤的降解,腐植酸产率分别为58.17%、61.00%。两株菌混合具有协同作用,腐植酸产率可提高到67.17%。

(2) 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 的特征性产物在混合菌实验组中检出而雅致小克银汉霉 (*C. elegans*) 的特征性产物则未检出,混合菌降解液的pH始终与芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 降解液接近,说明混合后芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 占主导作用。

(3) 在煤的生物降解过程中 Cr、As、Mn、Pb、Co、Ni、Cu、Zn、Mo 等 9 种金属元素从煤迁移到了降解液中, 其中 Cr、Ni、Cu、As、Mo、Pb 等 6 种与吸光度 A_{450} 具有显著的正相关性, 可以表征煤降解率的相对大小。Mn 在煤的生物降解过程中存在释放与利用平衡。

(4) cHA 与 bHA 均富含羧基、羟基、羰基等活性官能团、含有长链脂肪酸、4 种吡咯衍生物。同时, bHA 还含有分子量较小的脂肪酸 (C3、C4、C5、C13、C14、C15) 及含氮化合物, bHA 结合氮、富集氢的能力大于 cHA。

参考文献(References):

- [1] COHEN M S, GABRIELE P D. Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticola*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44(1): 23–27.
- [2] 葛世荣. 深部煤炭化学开采技术[J]. 中国矿业大学学报, 2017, 46(4): 679–691.
GE Shirong. Chemical mining technology for deep coal resources[J]. *Journal of China University of Mining & Technology*, 2017, 46(4): 679–691.
- [3] FENG Xin, SUN Jinghong, XIE Yuhong. Degradation of Shanxi lignite by *Trichoderma citrinoviride*[J]. *Fuel*, 2021, 291: 120204.
- [4] ADNAN S M, ALI M I, FATIMA N, et al. Evaluation of humic acids produced from Pakistani subbituminous coal by chemical and fungal treatments[J]. *Fuel*, 2020, 278: 118301.
- [5] FAKOUSSA R M. Production of water-soluble coal-substances by partial microbial liquefaction of untreated hard coal[J]. *Resources Conservation & Recycling*, 1988, 1(3–4): 251–260.
- [6] OLAWALE J T, EDEKI O G, COWAN A K. Bacterial degradation of coal discard and geologically weathered coal[J]. *International Journal of Coal Science & Technology*, 2020, 7(2): 405–416.
- [7] QUIGLEY D R, WARD B, CRAWFORD D L, et al. Evidence that microbially produced alkaline materials are involved in coal biosolubilization[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1989, 20(1): 753–763.
- [8] MAJEKE B M, COLLARD F X, TYHODA L, et al. The synergistic application of quinone reductase and lignin peroxidase for the deconstruction of industrial (technical) lignins and analysis of the degraded lignin products[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 319: 124152.
- [9] SHI Kaiyi, LIU Yi, CHEN Peng, et al. Contribution of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase in lignite degradation by mixed white-rot fungi[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2021, 12(7): 3753–3763.
- [10] COHEN M S, FELDMAN K A, BROWN C S, et al. Isolation and identification of the coal-solubilizing agent produced by *Trametes versicolor*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(11): 3285–3291.
- [11] YIN Sudong, TAO Xiuxiang, SHI Kaiyi. The role of surfactants in coal biosolubilisation[J]. *Fuel Processing Technology*, 2011, 92(8): 1554–1559.
- [12] 卢丽丽. 活性污泥中降解煤菌种的选育及其降解效果研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2017: 40.
LU Lili. Screening of microorganism from activated sludge for biodegradation of coal and degradation effect research[D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2017: 40.
- [13] GHANI J M, AKHTAR K, KHALIQ S, et al. Characterization of humic acids produced from fungal liquefaction of low-grade Thar coal[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 107: 1–12.
- [14] KANG Hongli, LIU Xiangrong, ZHANG Yaowen, 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*, 2021, 43(10): 1162–1180.
- [15] AKIMBEKOV N, DIGEL I, QIAO Xiaohui, et al. Lignite biosolubilization by *Bacillus* sp. RKB 2 and characterization of its products[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2020, 37(3): 255–261.
- [16] 李非杨. 风化煤的微生物液化工艺研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018: 47.
LI Feiyang. Research on microorganism liquefaction process of weathered coal[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018: 47.
- [17] SOBOLCZYK-BEDNAREK J, CHOIŃSKA-PULIT A, ŁABA W. Biosolubilization of low-rank coal by the newly isolated strain *Streptomyces fulvissimus* K59[J]. *Fuel*, 2021, 301: 121082.
- [18] 高同国, 姜峰, 杨金水, 等. 低阶煤降解微生物菌群的分离及降解产生的黄腐酸特性研究[J]. 腐植酸, 2011, 2(2): 6–10.
GAO Tongguo, JIANG Feng, YANG Jinshui, et al. Isolation of low-rank coal degraded bacterial consortia and characterization of the degraded fulvic acids[J]. *Humic Acid*, 2011, 2(2): 6–10.
- [19] 王龙贵, 张明旭, 欧泽深, 等. 菌种的选育及用于煤炭降解转化试验研究[J]. 中国矿业大学学报, 2006, 35(4): 504–509.
WANG Longgui, ZHANG Mingxu, OU Zeshen, et al. Experimental study of the cultivation and application of fungus for transformation and biodegradation of coal[J]. *Journal of China University of Mining & Technology*, 2006, 35(4): 504–509.
- [20] 张明旭, 徐敬尧, 欧泽深. 几种真菌对煤炭的固体溶媒转化研究[J]. 安徽理工大学学报(自然科学版), 2008, 28(4): 58–61.
ZHANG Mingxu, XU Jingyao, OU Zeshen. Study on coals transformation in the way of solid dissolution by some epiphytes[J]. *Journal of Anhui University of Science and Technology(Natural Science)*, 2008, 28(4): 58–61.
- [21] 张明旭, 王龙贵, 欧泽深, 等. 几种木质素降解菌的筛选及其协同作用降解煤炭的研究[J]. 煤炭学报, 2007, 32(6): 634–638.
ZHANG Mingxu, WANG Longgui, OU Zeshen, et al. Selection of several degradation lignin funguns and the experimental study of their cooperation to biodegradation of coal[J]. *Journal of China Coal Society*, 2007, 32(6): 634–638.
- [22] MAK A, SRIVASTAVA V J, KLLBANE J J, et al. Biological solubilization of untreated North Dakota lignite by a mixed bacterial and a mixed bac-terial/fungal culture[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1989, 20(1): 715–729.
- [23] 武俐, 王海坡, 李鹏, 等. 生物成气中离子和微量元素变化特征及健康风险评估[J]. 煤炭学报, 2021, 46(3): 994–1002.

- WU Li, WANG Haipo, LI Peng, et al. Variation characteristics of typical ions and trace elements and health risk assessment in the process of coal gasification by microorganism[J]. *Journal of China Coal Society*, 2021, 46(3): 994–1002.
- [24] 程博, 何环, 谭添, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌淋溶煤矸石过程中铁锰铬形态的释放特征[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(7): 4404–4410.
- CHENG Bo, HE Huan, TAN Tian, et al. Liberation characteristics of iron manganese and chromium fraction in coal gangue during *Acidithiobacillus ferrooxidans* bioleaching process[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(7): 4404–4410.
- [25] 宫贵贞. 煤在NaOCl水溶液中的选择性氧化和产物的精细分离[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2011: 146.
- GONG Guizhen. Selective oxidation of coals in aqueous NaOCl solution and fine separation of the products[D]. Xuzhou: China University of Mining & Technology, 2011: 146.
- [26] 汪文化. 煤炭、生物质选择性催化氧化制备化学品的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013: 8.
- WANG Wenhua. A study on conversion of coal and biomass to chemicals by selective oxidation[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013: 8.
- [27] 郝建秀, 丁志伟, 刘倩, 等. 褐煤解聚产物利用及分离研究进展[J]. *煤炭学报*, 2022, 47(4): 1679–1691.
- HAO Jianxiu, DING Zhiwei, LIU Qian, et al. Research progress on utilization and separation of depolymerized products of lignite[J]. *Journal of China Coal Society*, 2022, 47(4): 1679–1691.
- [28] DONG Lianhua, YUAN Hongli. Nitrogen incorporation into lignite humic acids during microbial degradation[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(7): 484–490.
- [29] VERHEYEN T V, JOHNS R B. Analysis of peroxytri-fluoroacetic acid oxidation products from Victorian brown coal[J]. *Analytical Chemistry*, 1983, 55(9): 1564–1568.
- [30] KWIATOS N, MARZENA J K, BARTOSZ S, et al. Improvement of efficiency of brown coal biosolubilization by novel recombinant *Fusarium oxysporum* laccase[J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 133.
- [31] GAO Tongguo, FENG Jiang, YANG Jinshui, et al. Biodegradation of leonardite by an alkali-producing bacterial community and characterization of the degraded products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 2581–2590.
- [32] 刘敏, 李建涛, 刘向荣. 煤的微生物降解率与降解液吸光度的关系拟合[J]. *化学与生物工程*, 2021, 38(1): 17–21.
- LIU Min, LI Jiantao, LIU Xiangrong. Relationship fitting between biodegradation rate of coal and absorbance of degradation liquid[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2021, 38(1): 17–21.
- [33] DAVID Y, BAYLON M G, PAMIDIMARRI S D, et al. Screening of microorganisms able to degrade low-rank coal in aerobic conditions: Potential coal biosolubilization mediators from coal to biochemicals[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, 22(2): 178–185.
- [34] FAKOUSSA R M. The influence of different chelators on the solubilization/liquefaction of different pre-treated and natural lignites[J]. *Fuel Processing Technology*, 1994, 40(2–3): 183–192.
- [35] 王若楠, 邱小倩, 刘亮, 等. 微生物降解低阶煤的研究及产物腐植酸的应用[J]. *腐植酸*, 2017, 6(6): 3–9.
- WANG Ruonan, QIU Xiaoqian, LIU Liang, et al. Research on microbial degradation of low-rank coal and application of biodegradation product humic acid[J]. *Humic Acid*, 2017, 6(6): 3–9.
- [36] PAMIDIMARRI S D, DAVID Y, CHAE C G, et al. Advances in the biological treatment of coal for synthetic natural gas and chemicals[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2016, 33(10): 2788–2801.
- [37] 翁诗甫, 徐怡庄. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 3版. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- [38] 何选明. 煤化学[M]. 2版. 北京: 冶金工业出版社, 2010.
- [39] 李艳红. 云南典型褐煤的结构特性及腐植酸物化性质的研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2019: 83.
- LI Yanhong. Structure characteristic of Yunnan typical lignites and physico-chemical properties of humic acids [D]. Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2019: 83.
- [40] CHEN Fan, HE Huan, ZHAO Shangming, et al. Analysis of microbial community succession during methane production from baiyinhua lignite[J]. *Energy & Fuels*, 2018, 32(10): 10311–10320.
- [41] 杨杰, 刘向荣, 徐云龙. 多噬香鞘氨醇单胞菌降解陕西神府褐煤的工艺条件及产物研究[J]. *煤炭转化*, 2021, 44(2): 62–70.
- YANG Jie, LIU Xiangrong, XU Yunlong. Study on technological conditions and products of Shanxi Shenfu lignite degradation by *Sphingomonas polyaromaticivorans*[J]. *Coal Conversion*, 2021, 44(2): 62–70.
- [42] 彭安顺. 有机化学[M]. 济南: 山东人民出版社, 2012.
- [43] 李安敏. 材料分析测试技术与方法[M]. 成都: 电子科技大学出版社, 2019.