

研究报告

一株煤中有机钠脱除菌的分离、优化及其作用效果

陈转明¹, 温全宝¹, 刘生玉^{*1,2}, 郭建英¹, 滕青¹

1 太原理工大学矿业工程学院, 山西 太原 030024

2 太原理工大学 原位改性采矿教育部重点实验室, 山西 太原 030024

陈转明, 温全宝, 刘生玉, 郭建英, 滕青. 一株煤中有机钠脱除菌的分离、优化及其作用效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1550-1565.

CHEN Zhuanming, WEN Quanbao, LIU Shengyu, GUO Jianying, TENG Qing. Isolation, optimization and effect of organic sodium-removing bacterium from coal[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1550-1565.

摘要:【背景】针对煤燃烧过程中碱金属钠对燃煤设备和气化效率的影响, 以及酸洗过程中产生酸性废水等问题。【目的】提出利用微生物脱除煤中有机钠的新方法。【方法】从内蒙古乌兰察布市察哈尔右翼前旗黄旗海分离、筛选一株脱除煤中有机钠的菌株, 通过形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定, 构建其系统发育树, 通过单因素试验探究细菌最适的生长条件并绘制其生长曲线, 确定煤中有机钠最佳的脱除条件, 并在最佳条件下评估其脱除效果。【结果】筛选到一株能够脱除煤中有机钠的菌株, 经鉴定为水生鞘氨醇单胞菌。该菌株的最佳生长条件为: 温度 30 °C、初始 pH 8.0、接种量 3%、装液量 100 mL、摇床转速 150 r/min、最佳碳源为葡萄糖(4 g/L)、最佳氮源为蛋白胨(13 g/L); 煤中有机钠的最佳脱除条件为: 初始 pH 8.0、装液量 80 mL、煤浆浓度 5 g/L、接种量 7%。该条件下菌株 CSW-1 对煤中有机钠的脱除率为 23.79%。

【结论】首次提出细菌脱除煤中有机钠的新方法, 为煤炭的高效清洁利用提供了新思路。

关键词: 煤; 有机钠; 水生鞘氨醇单胞菌; 筛选; 脱除效率

资助项目: 国家自然科学基金(22178245)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22178245).

*Corresponding author. E-mail: liusyut@126.com

Received: 2023-09-20; Accepted: 2023-12-22; Published online: 2024-02-06

Isolation, optimization and effect of organic sodium-removing bacterium from coal

CHEN Zhuanming¹, WEN Quanbao¹, LIU Shengyu^{*1,2}, GUO Jianying¹, TENG Qing¹

¹ College of Mining Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

² Key Laboratory of *In-Situ* Property-Improving Mining of Ministry of Education, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

Abstract: [Background] The alkali metal sodium affects coal burning equipment and gasification efficiency in the coal combustion process and acid wastewater is produced in the pickling process. [Objective] To propose a novel method for removing organic sodium from coal by microorganisms. [Methods] A bacterial strain, which was isolated and screened out from Huangqihai, Chahar Right Front Banner, Ulanqab, Inner Mongolia, was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and the 16S rRNA gene sequence, and a phylogenetic tree was constructed. The optimal growth conditions of the strain were investigated by single factor tests, and the growth curve was plotted. The optimal removal conditions of organic sodium in coal by the strain were determined, and the removal effect was evaluated under the optimal conditions. [Results] A strain that can remove organic sodium from coal was screened out and identified as *Sphingomonas aquatilis*. The strain showed the best growth performance in the medium with glucose (4 g/L) as the carbon source, peptone (13 g/L) as the nitrogen source, and initial pH 8.0 when it was cultured at 30 °C and 150 r/min with the inoculum quantity of 3% and liquid loading of 100 mL. The optimal removal conditions of organic sodium from coal were as follows: initial pH 8.0, liquid loading of 80 mL, coal slurry concentration of 5 g/L, and inoculum quantity of 7%. Under the conditions, the removal efficiency of organic sodium from coal by strain CSW-1 was 23.79%. [Conclusion] A novel method for removing organic sodium from coal by microorganisms is proposed for the first time, which provides a new idea for the efficient and clean utilization of coal.

Keywords: coal; organic sodium; *Sphingomonas aquatilis*; screening; removal efficiency

煤中碱金属钠的存在对燃烧、气化和配煤炼焦产生了许多负面影响,如燃煤锅炉尾部受热面的结渣、玷污、积灰和腐蚀^[1-2],以及在配煤炼焦过程中影响焦炭的反应性和热强度等^[3]。煤中的有机钠主要来源于成煤过程中无机钠的迁移及成煤植物^[4-5],是碱金属钠的重要组成部分。按照逐级萃取的方法,利用乙酸铵提取以羧酸盐形式存在的有机钠,以配位结构出现在煤含氮或含氧官能团上的有机钠只能通过稀盐

酸萃取^[6-7]。然而该工艺过程会产生含氯化物和硫酸盐的酸性废水,增加了工业成本,不利于经济效益的提升。Hulston 等^[8]发现机械热压脱水提质技术(mechanical thermal expression, MTE)显著降低了煤中水溶性的钠元素,而有机结合的钠元素基本不受影响。因此,亟待寻找一种能够有效、绿色且经济的脱除煤中有机钠的替代技术。

与传统的湿法冶金工艺相比,生物冶金技

术因其良好的选择性、经济性和环保性而受到越来越多的关注。该技术广泛应用于提升矿物质量、回收有价元素和去除有害金属等^[9-10]。学者们对微生物脱除煤中的硫元素进行了大量研究。杨水兰等^[11]研究了茫崖诺卡氏菌脱除云南补木嘎高硫煤中硫元素的最优工艺条件,在该条件下云南补木嘎高硫煤的脱硫率为 70.18%。Ye 等^[12]利用煤自身存在的原生微生物和外来微生物脱除煤中的硫元素,经过 36 d 的生物脱硫处理,原生微生物对黄铁矿的去除率为 77.68%,外来微生物对黄铁矿的去除率为 87.88%。Hu 等^[13]采用两步生物浸出法分别去除煤中的有机硫和无机硫,结果发现煤中有机硫的去除率在 80% 以上。可以发现,利用生物冶金技术处理煤中的硫元素取得了理想的效果。然而,尚无学者将微生物浸出技术应用于脱除煤中的有机钠元素,因此,筛选能够脱除煤中有机钠的优势菌株并研究细菌对煤中有机钠的脱除效果,对降低有机钠元素在煤炭利用中的危害具有重要价值。

从内蒙古自治区乌兰察布市察哈尔右翼前旗黄旗海的土壤样品中分离、筛选对煤中有机钠有作用效果的菌株,通过形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定,通过单因素试验探究细菌最适的生长条件,以及煤中有机钠最佳的脱除条件,并在最佳条件下评估其脱除效果,以期该菌株在煤炭高效清洁利用中发挥其应用价值。

1 材料与方 法

1.1 样 品

采样点位于内蒙古自治区乌兰察布市察哈尔右翼前旗黄旗海 (40°46'10"-41°01'05"N, 113°06'45"-113°27'40"E), 平均海拔 1 316.8 m, 该区域的盐度偏高, 属于强碱性咸水湖, 其含 水层矿化度小于 1 g/L, 为 HCO₃-Mg-Na 型水,

该水域土壤样品的物相分析如图 1 所示。其无机矿物组成主要是石英、钾长石和富钠钙长石。

煤样取自山西省汾西县正善煤矿二号煤。原煤经破碎、筛分后,以-125 μm 粒级的煤样作为试验对象,所有样品在密封条件下储存以防止氧化。通过浮选法将煤样中的灰分降低至 3.01%,煤灰的物相分析如图 2 所示,其无机矿物组成主要是石膏和石英,表明煤中基本不存在含钠的无机矿物。

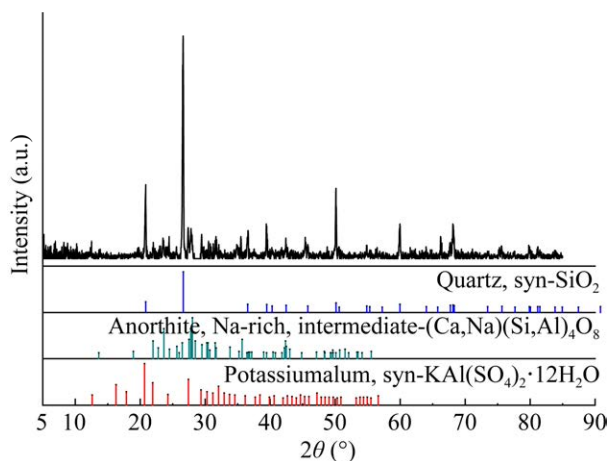


图 1 土壤中无机矿物的 X 射线衍射图谱

Figure 1 X-ray diffraction pattern of inorganic minerals in soil.

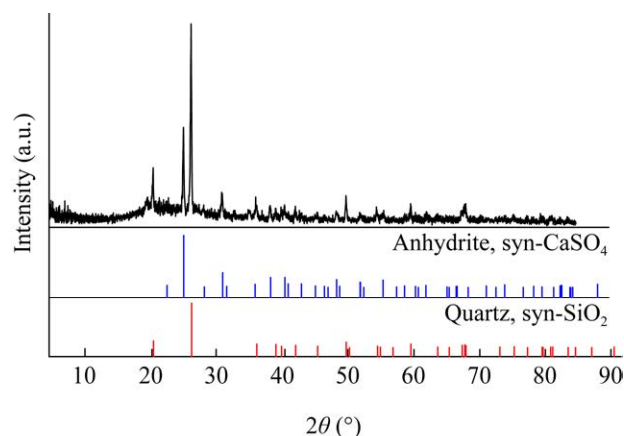


图 2 煤灰中无机矿物的 X 射线衍射图谱

Figure 2 X-ray diffraction pattern of inorganic minerals in coal ash.

1.2 培养基

富集培养基：牛肉膏蛋白胨培养基按参考文献[14]配制。复筛培养基(g/L)：牛肉膏 3.0，蛋白胨 10.0，钠长石 5.0、10.0、15.0、20.0，pH 7.4–7.6。适应性试验培养基(g/L)：牛肉膏 3.0，蛋白胨 10.0，煤 5.0、10.0、15.0、20.0，pH 7.4–7.6。种子液培养基(g/L)：葡萄糖 4.0，蛋白胨 13.0，氯化钠 5.0，pH 8.0。各液体培养基对应的固体培养基中分别加入 20.0 g/L 的琼脂。

1.3 主要试剂和仪器

牛肉膏和蛋白胨，北京博奥星生物技术有限公司；葡萄糖，天津福晨化学试剂有限公司；氯化钠和琼脂，天津市北辰方正化学试剂厂；细菌 DNA 提取试剂盒，上海玉博生物科技有限公司；PCR 聚合酶 KOD One™ PCR Master Mix，TOYOBO 公司。

恒温加热磁力搅拌器，常州国华电器有限公司；可见分光光度计，上海菁华科技仪器有限公司；智能光照培养箱，宁波江南仪器制造厂；立式高压蒸汽灭菌锅，上海三申医疗器械有限公司；离子计，上海仪电科学仪器股份有限公司；测序仪和 PCR 仪，Applied Biosystems 公司。

1.4 菌株的富集与初筛

取 10 g 土壤样品加入 90 mL 无菌水中，在磁力搅拌器上搅拌 20–30 min 至细菌与土壤充分分离，静置 30 min，用移液枪吸取土壤悬液，利用平板稀释涂布法在牛肉膏蛋白胨固体培养基上涂布并置于 30 °C 恒温培养箱中，12 h 后将平板倒置，24 h 后开始观察菌落的生长情况^[15]。根据菌落形态和颜色的差异挑取少许菌苔在牛肉膏蛋白胨固体培养基上进行平板划线，待菌苔长出后，检查其形态特征是否一致。若发现杂菌，须再次进行纯化，直到显微镜下的菌落形态不再发生改变。取纯化后的菌落接于牛肉膏蛋白胨培养基中，30 °C、150 r/min 富集培养

24 h，将富集菌液置于 4 °C 冰箱中供后续试验使用。

1.5 菌株的复筛

取不同稀释倍数(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})的富集菌液涂布于以钠长石为唯一钠源的复筛固体培养基上，钠长石的添加量依次为 5.0、10.0、15.0、20.0 g/L，并置于 30 °C 恒温培养箱中培养 48–72 h，观察菌落的生长情况，挑取在不同添加量钠长石的培养基中稳定生长的细菌接种于复筛培养基中，继续进行驯化培养。

1.6 菌株的适应性试验

取不同稀释倍数(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})的经过驯化培养的菌液涂布于菌株的适应性试验固体培养基上，煤的添加量依次为 5.0、10.0、15.0、20.0 g/L，并置于 30 °C 恒温培养箱中培养 48–72 h，观察菌落的生长情况，挑取在不同添加量煤样的固体培养基中稳定生长的细菌接种于适应性试验培养基中，继续进行适应培养。

1.7 煤中有机钠脱除试验

取 1 g 煤样置于适应性试验培养基中，设置初始 pH 7.5，装液量为 100 mL，于 121 °C 灭菌 20 min，待培养基冷却后，试验组分别接入 5 mL 菌液，于 30 °C、150 r/min 培养 10 d 后测定发酵液中的 Na^+ 浓度。

1.8 菌株的鉴定

1.8.1 形态特征观察

将菌液进行稀释平板涂布，观察其菌落的形状、颜色和表面形态等。取少量菌苔进行革兰氏、鞭毛、荚膜、芽孢染色，在光学显微镜下观察其菌体特征^[16]。

1.8.2 生理生化特性分析

根据《常见细菌系统鉴定手册》^[17]中生理生化检测方法对菌株的生理生化特性进行测定。

1.8.3 16S rRNA 基因扩增及测序

将筛选得到的菌株进行活化培养，利用细

菌 DNA 提取试剂盒提取菌株的全基因组 DNA。利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对样品 DNA 进行扩增。PCR 反应体系: 灭菌水 20 μ L, KOD OneTM PCR Master Mix 25 μ L, DNA 模板(4 ng/ μ L) 2 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 8 s, 68 $^{\circ}$ C 2 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 1 min。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物, 利用测序仪对 PCR 产物进行测序。PCR 产物条带理论大小约为 1 500 bp, 采用引物 722F (5'-AACACCAGTGGCGAAGGC-3') 和 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTTTRAGTTT-3') 从中间往两端对 PCR 产物进行测序。测得的序列与 NCBI 数据库中的模式菌株基因序列进行 BLAST 比对, 选取相关序列在 MEGA 11.0 软件中进行系统发育树的构建。

1.9 生长特性试验

1.9.1 温度

取培养 24 h 的菌液接于装液量为 100 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 初始 pH 7.5, 分别在培养温度为 20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C 的摇床中 150 r/min 培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600}), 测定 3 次, 取平均值。

1.9.2 初始 pH

取培养 24 h 的菌液接于装液量为 100 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 初始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600}), 测定 3 次, 取平均值。

1.9.3 接种量

取培养 24 h 的菌液按体积分数 1%、3%、5%、7%、9%、11% 分别接于装液量为 100 mL

的牛肉膏蛋白胨培养基中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600}), 测定 3 次, 取平均值。

1.9.4 装液量

取培养 24 h 的菌液分别接于装液量为 40、60、80、100、120、140 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600}), 测定 3 次, 取平均值。

1.9.5 摇床转速

取培养 24 h 的菌液接于装液量为 100 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 分别在转速为 100、125、150、175、200 r/min 的摇床中培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600}), 测定 3 次, 取平均值。

1.9.6 碳源

取培养 24 h 的菌液接于装液量为 100 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 该培养基中分别以牛肉膏、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸和甘露醇作为唯一碳源, 考察不同碳源对细菌生长的影响, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600})。同时考察不同碳源浓度下细菌的生长情况, 测定 3 次, 取平均值。

1.9.7 氮源

取培养 24 h 的菌液接于装液量为 100 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 该培养基中分别以蛋白胨、麦芽浸粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 作为唯一氮源, 考察不同氮源对细菌生长的影响, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 60 h, 取上清液在可见光分光光度计中测定菌液的吸光度(OD_{600})。同时考察不同氮源浓度下细菌的生长情况, 测定 3 次, 取平均值。

1.10 生长曲线的测定

取 3 mL 培养 24 h 的纯菌液接于装液量为

100 mL 的种子液培养基中, 培养基初始 pH 值为 8.0, 30 °C、150 r/min 进行培养。分别于 1、2、3、6、9、12、15、24、28、32、36、48、52、56、60、72、76、90 h 取 5 mL 菌液于 2 400 r/min 离心 10 min, 取上清液在可见光分光光度计中测定培养液的吸光度(OD_{600}), 设置平行试验。

1.11 有机钠脱除条件优化

在菌株的最佳生长条件下, 通过单因素试验确定煤中有机钠的最佳脱除条件。(1) 初始 pH: 取 5% 的菌液接于装液量为 100 mL 不含 NaCl 的种子液培养基中, 初始 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0、9.0, 煤浆浓度为 10 g/L。(2) 装液量: 取 5% 的菌液接于初始 pH 值为 8.0 不含 NaCl 的种子液培养基中, 装液量分别设置为 60、80、100、120 mL, 煤浆浓度为 10 g/L。(3) 煤浆浓度: 取 5% 的菌液接于装液量为 80 mL 不含 NaCl 的种子液培养基中, 设置煤浆浓度分别为 5、10、15、20 g/L, 初始 pH 值为 8.0。(4) 接种量: 分别取 1%、3%、5%、7% 的菌液接于煤浆浓度为 5 g/L、初始 pH 值为 8.0、装液量为 80 mL 不含 NaCl 的种子液培养基中。煤中有机钠的脱除试验在 30 °C、150 r/min 的摇床中进行, 并在 0、2、4、6、8、10 d 进行取样, 取样 3 次, 通过离子计测定发酵液中 Na^+ 浓度, 确定菌株脱除煤中有机钠的最佳条件。

1.12 有机钠脱除效果评估

在细菌脱除煤中有机钠的最佳条件下评估有机钠的脱除效果, 原煤和浸渣中有机钠的含量按照参考文献[18]测定, 有机钠的脱除效果按公式(1-3)计算。

$$\eta_{\text{HAc-coal}}(\%) = \frac{w_{1(\text{HAc-coal})} - w_{2(\text{HAc-coal})}}{w_{1(\text{HAc-coal})}} \times 100 \quad (1)$$

$$\eta_{\text{HCl-coal}}(\%) = \frac{w_{1(\text{HCl-coal})} - w_{2(\text{HCl-coal})}}{w_{1(\text{HCl-coal})}} \times 100 \quad (2)$$

$$\eta_{\text{Total-}Na^+}(\%) = \frac{[w_{1(\text{HAc-coal})} + w_{1(\text{HCl-coal})}] - [w_{2(\text{HAc-coal})} + w_{2(\text{HCl-coal})}]}{[w_{1(\text{HAc-coal})} + w_{1(\text{HCl-coal})}]} \times 100 \quad (3)$$

式中: $w_{1(\text{HAc-coal})}$ 为乙酸铵从原煤中提取的有机钠的质量分数; $w_{1(\text{HCl-coal})}$ 为盐酸从原煤中提取的有机钠的质量分数; $w_{2(\text{HAc-coal})}$ 为乙酸铵从浸渣中提取的有机钠的质量分数; $w_{2(\text{HCl-coal})}$ 为盐酸从浸渣中提取有机钠的质量分数。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与筛选结果

经过多次的分离纯化, 共获得 27 株在形状、颜色及表面形态等方面存在差异性的菌株。将这 27 株细菌在以钠长石为唯一钠源的固体培养基上进行驯化培养, 然后在不同添加量煤样的培养基中进行适应性培养, 取稀释倍数为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的发酵液涂布于不同煤种的固体培养基上, 观察其生长状况, 取生长状况较好的细菌接于适应性试验培养基中, 重复进行试验, 直到筛选出能够在不同煤种固体培养基中稳定生长的菌株。利用筛选出的 7 株细菌进行煤中有机钠的脱除试验并测定发酵液中的 Na^+ 含量, 结果如表 1 所示。菌株 CSW-1、CSZ-1、LXX-3 的发酵液中 Na^+ 含量较高, 其含量均在 100 mg/L 以上, 说明这 3 株菌对煤中有机钠有

表 1 发酵液中的钠离子浓度

Table 1 Sodium ion concentration in zymotic fluid

Strains No.	Concentration of Na^+ (mg/L)
CSW-1	138.65
CSZ-1	115.89
CLX-2	67.65
LLX-1	92.06
SYE-4	39.78
LXX-3	104.90
CZZ-2	89.67

较好的脱除效果。其中,菌株 CSW-1 的脱除效果最好,其培养液中的 Na^+ 浓度达到 138.65 mg/L。因此,选择菌株 CSW-1 作为最佳菌株,并用于后续细菌的生长条件优化和煤中有机钠的脱除试验。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 形态学特征

菌株 CSW-1 在固体培养基上菌落形态及显微镜下的菌体特征见表 2。通过平板观察,菌落呈圆形、黄色、边缘完整、不透明,表面湿润且光滑。光学显微镜下观察到细菌存在荚膜,无芽孢、鞭毛,革兰氏染色后菌体呈红色,表明筛选菌株为革兰氏阴性菌。

2.2.2 生理生化特性

菌株 CSW-1 的生理生化特性见表 3。该菌株在代谢过程中不能分解含硫有机物产生 H_2S ,细菌的 Voges-Prokauer 测试呈现阴性,表明细菌不能分解葡萄糖产生丙酮酸。细菌能够产生淀粉水解酶和过氧化氢酶,但不能分泌明胶酶来分解明胶。此外,细菌不能分解蛋白胨中的色氨酸产生吲哚,也不能利用柠檬酸盐作为其碳源。

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析

菌株 CSW-1 经 16S rRNA 基因扩增和测序,

表 2 菌株 CSW-1 的形态学特征

Table 2 Morphological characteristics of strain CSW-1

项目 Project	结果 Result
形状 Form	圆形 Circular
颜色 Color	黄色 Yellow
边缘 Margin	完整 Entire
透明度 Transparency	不透明 Opacification
表面形态 Surface texture	湿润且光滑 Moist and smooth
革兰氏染色 Gram staining	G^-
芽孢 Spore	—
鞭毛 Flagellum	—
荚膜 Capsule	+

+: 有; -: 无; G^- : 革兰氏阴性

+: Yes; -: No; G^- : Gram-negative.

表 3 菌株 CSW-1 的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain CSW-1

项目 Project	结果 Result
硫化氢 Hydrogen sulfide	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—
过氧化氢酶 Catalase	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
Voges-Prokauer	—
柠檬酸盐 Citrate	—
吲哚 Indole	—

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

获得的基因序列大小约为 1 500 bp,将所得的序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对后使用 MEGA 11.0 软件的 neighbor-joining 方法构建系统发育树(图 3)。菌株 CSW-1 与水生鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas aquatilis*) NBRC 16722 的亲缘关系最近,相似度高达 100%,结合形态特征和生理生化特性与其同属近缘模式种的比较^[19-20],进一步确定菌株 CSW-1 为水生鞘氨醇单胞菌。

2.3 生长特性试验结果

2.3.1 温度的影响

在细菌新陈代谢的过程中,酶的活性、细胞质膜的流动性以及物质的溶解等会受到温度的影响^[21-22]。在不同温度条件下对菌株 CSW-1 进行培养,稳定生长期测得的菌液吸光度(OD_{600})与温度的关系如图 4 所示,该菌株的 OD_{600} 值随温度的升高呈先增大后减小的趋势。当温度为 20、35、40 °C 时,菌株的 OD_{600} 偏低,细菌生长缓慢。低温条件下细菌的生物膜处于凝固状态,生长所需要的营养物质不能正常运输;温度偏高时,细菌中的核酸、蛋白质等会发生变性,抑制微生物的生长^[23]。在 25–30 °C 的温度条件下,菌株的 OD_{600} 整体偏高,说明该条件下细菌的生长状况良好。当温度为 30 °C 时,菌株的 OD_{600} 达到最大值,此时该菌株的代谢速度最

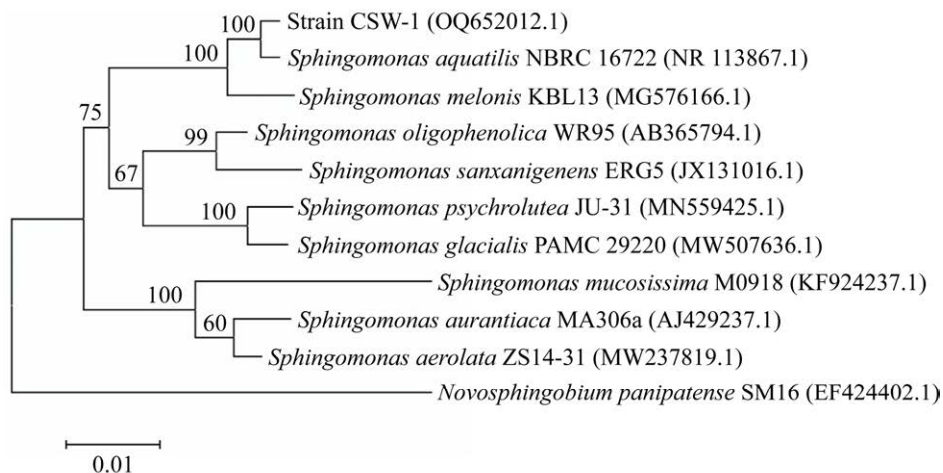


图3 基于16S rRNA基因序列构建菌株CSW-1的系统发育树 发育树节点数值表示bootstrap值；发育树标尺为0.01，表示平均每个核苷酸位置有0.01个差异；括号中序号为GenBank登录号

Figure 3 Phylogenetic tree of strain CSW-1 was constructed based on 16S rRNA gene sequence. The node value of phylogenetic tree represents the bootstrap value. The scale was 0.01, representing the difference of each nucleotide position was 0.01. The serial number in parentheses is the GenBank accession number.

快。因此，选择30℃作为菌株CSW-1的最佳生长温度。

2.3.2 初始pH的影响

初始pH直接影响到膜电位、质子动力、酶的活性，从而影响细菌对底物的利用^[24-25]。

在不同初始pH条件下对菌株CSW-1进行培养，稳定生长期测得的菌液吸光度(OD_{600})与初始pH的关系如图5所示，该菌株的 OD_{600} 值随初始pH的升高呈先增大后减小的趋势。初始pH<6.0时，菌株的 OD_{600} 偏低，细菌的生长受

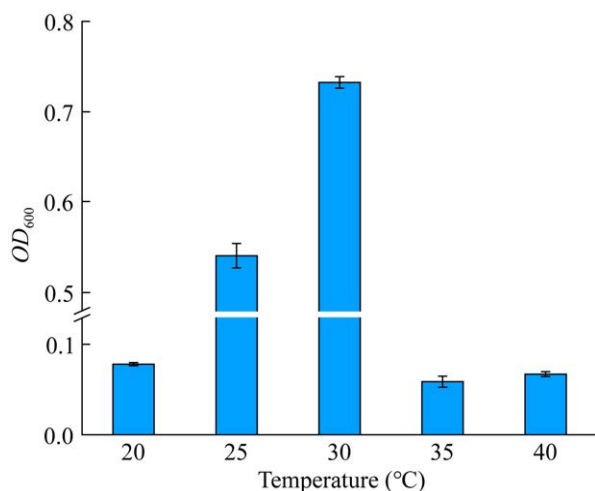


图4 温度对菌株CSW-1生长的影响

Figure 4 Effect of temperature on the growth of strain CSW-1.

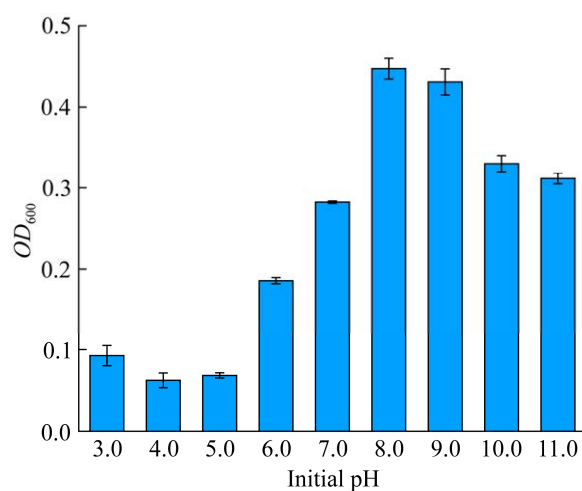


图5 初始pH对菌株CSW-1生长的影响

Figure 5 Effect of initial pH on the growth of strain CSW-1.

到抑制。当培养基的初始 pH 值在 6.0–11.0 时, 菌株 CSW-1 能稳定生长, 当初始 pH 值为 8.0 时, 菌株的 OD_{600} 达到最大值, 此时该菌株的代谢速度最快。因此, 选择 8.0 作为菌株 CSW-1 的最佳初始 pH。

2.3.3 接种量的影响

接种量的大小与培养基中细菌的生长速度紧密相关。在不同接种量条件下对菌株 CSW-1 进行培养, 稳定生长期测得的菌液吸光度 (OD_{600}) 与接种量的关系如图 6 所示。该菌株的 OD_{600} 随接种量的升高呈先增大后减小的趋势。菌株 CSW-1 在接种量为 3% 时的 OD_{600} 达到最大值, 接种量为 1% 次之。当接种量大于 3% 时, OD_{600} 呈现明显的下降趋势, 接种量的增大导致培养基底物消耗过快限制了细菌的生长。因此, 选择 3% 作为菌株 CSW-1 的最佳接种量。

2.3.4 装液量的影响

细菌培养过程中装液量直接影响培养液中的溶氧量^[26]。在不同装液量条件下对菌株 CSW-1 进行培养, 稳定生长期测得的菌液吸光度 (OD_{600}) 与装液量的关系如图 7 所示, 该菌株的 OD_{600} 随装液量的升高呈先增大后减小的趋势。装液量在 40–100 mL 时, 菌株的 OD_{600} 随装液量

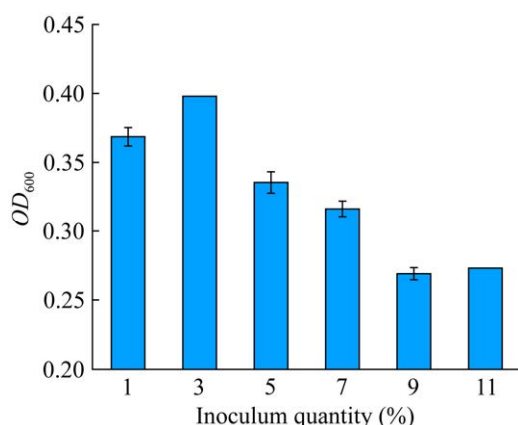


图 6 接种量对菌株 CSW-1 生长的影响

Figure 6 Effect of inoculum quantity on the growth of strain CSW-1.

的增加而升高, 随着装液量的继续增大, 培养液中的溶氧量减少, 导致细菌的 OD_{600} 呈现下降的趋势。在装液量为 100 mL 时, 培养液的 OD_{600} 达到最大值。因此, 选择 100 mL 作为菌株 CSW-1 的最佳装液量。

2.3.5 摇床转速的影响

摇床的转动干扰锥形瓶中培养液与空气的接触, 影响微生物与氧气的接触^[27]。在不同的转速条件下对菌株 CSW-1 进行培养, 稳定生长期测得的菌液吸光度 (OD_{600}) 与摇床转速的关系如图 8 所示。摇床转速在 100–150 r/min 时, 菌

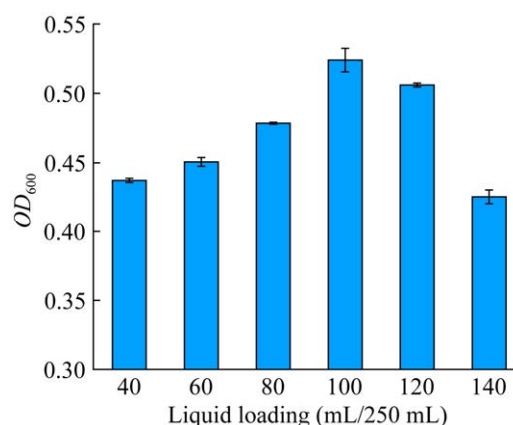


图 7 装液量对菌株 CSW-1 生长的影响

Figure 7 Effect of liquid loading on the growth of strain CSW-1.

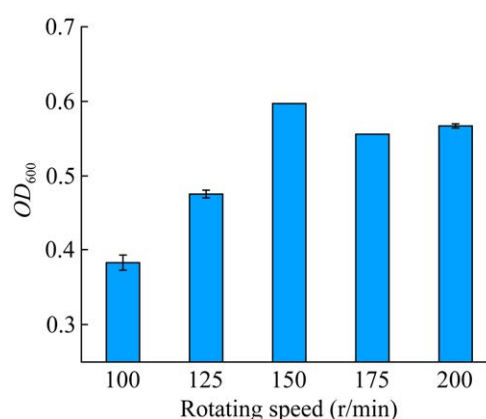


图 8 摇床转速对菌株 CSW-1 生长的影响

Figure 8 Effect of rotating speed on the growth of strain CSW-1.

株的 OD_{600} 随摇床转速的增加而升高。摇床转速增大, 锥形瓶中培养液的振荡加剧, 促进细菌与氧气的接触, 影响细菌的生长。摇床转速在 150–200 r/min 时, 菌株的 OD_{600} 呈缓慢减小的趋势。转速过大时会产生较大的剪切力而对细菌造成机械破坏, 影响细菌的生长。在摇床转速为 150 r/min 时, 培养液的 OD_{600} 达到最大值。因此, 选择 150 r/min 作为菌株 CSW-1 的最佳摇床转速。

2.3.6 碳源的影响

碳源可直接通过细胞外的酶分解后被微生物吸收, 组成细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核等细胞物质^[28]。在不同的碳源种类与浓度条件下对菌株 CSW-1 进行培养, 稳定生长期测得的菌液吸光度(OD_{600})与碳源种类和碳源浓度的关系如图 9 所示。菌株 CSW-1 对牛肉膏、葡萄糖、蔗糖和甘露醇的利用效果较好, 在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中的生长状态最佳, 基本不利用柠檬酸作为其生长的碳源。说明该菌株对单糖的利用能力最强, 其次是有机

醇、二糖等, 对有机酸的利用效果最差, 确定葡萄糖作为菌株 CSW-1 的最佳碳源。在葡萄糖添加量分别为 1、2、3、4、5 g/L 时, 培养液中的 OD_{600} 随葡萄糖添加量的增加而增加, 葡萄糖浓度较高会抑制细菌的代谢与生长^[29]。因此, 最终选择 4 g/L 作为菌株 CSW-1 的最佳碳源浓度。

2.3.7 氮源的影响

氮源是构成生物体蛋白质、核酸和其他氮素化合物的材料^[30]。在不同的氮源种类与浓度条件下对菌株 CSW-1 进行培养, 稳定生长期测得的菌液吸光度(OD_{600})与氮源种类和氮源浓度的关系如图 10 所示。菌株 CSW-1 在加入有机氮源培养基中的 OD_{600} 明显高于加入无机氮源的培养基。其中, 该菌株对蛋白胨的利用能力最强, 其次是麦芽浸粉, 确定蛋白胨作为 CSW-1 生长的最佳氮源。在蛋白胨添加量分别为 4、7、10、13、16 g/L 时, 培养液中的 OD_{600} 随蛋白胨添加量的增加而增加, 在 13 g/L 时细菌浓度达到最大值。当蛋白胨添加量大于 13 g/L 时, 细菌

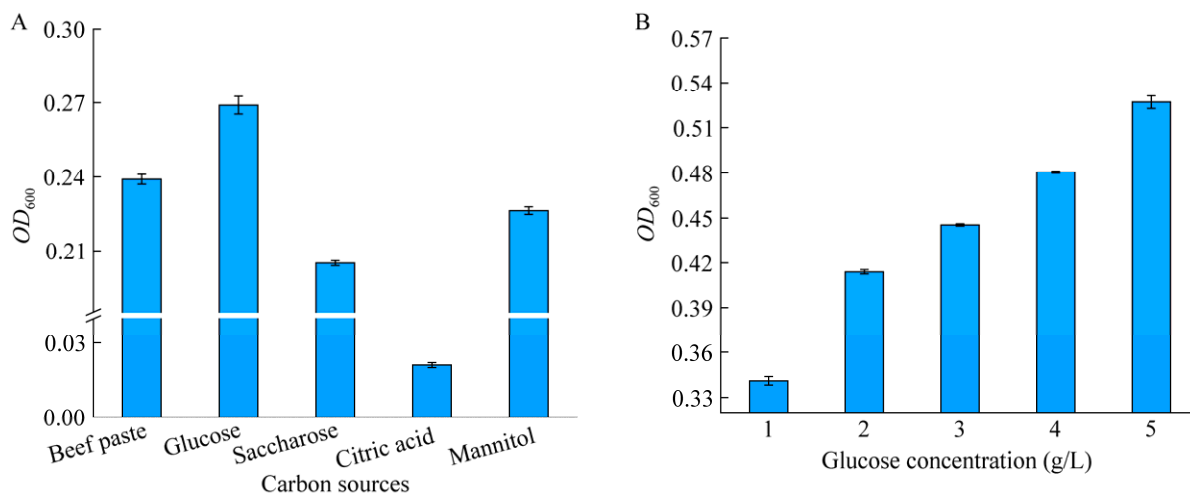


图 9 碳源对菌株 CSW-1 生长的影响 A: 碳源种类. B: 碳源浓度

Figure 9 Effect of carbon source on the growth of strain CSW-1. A: Type of carbon source. B: Concentration of carbon source.

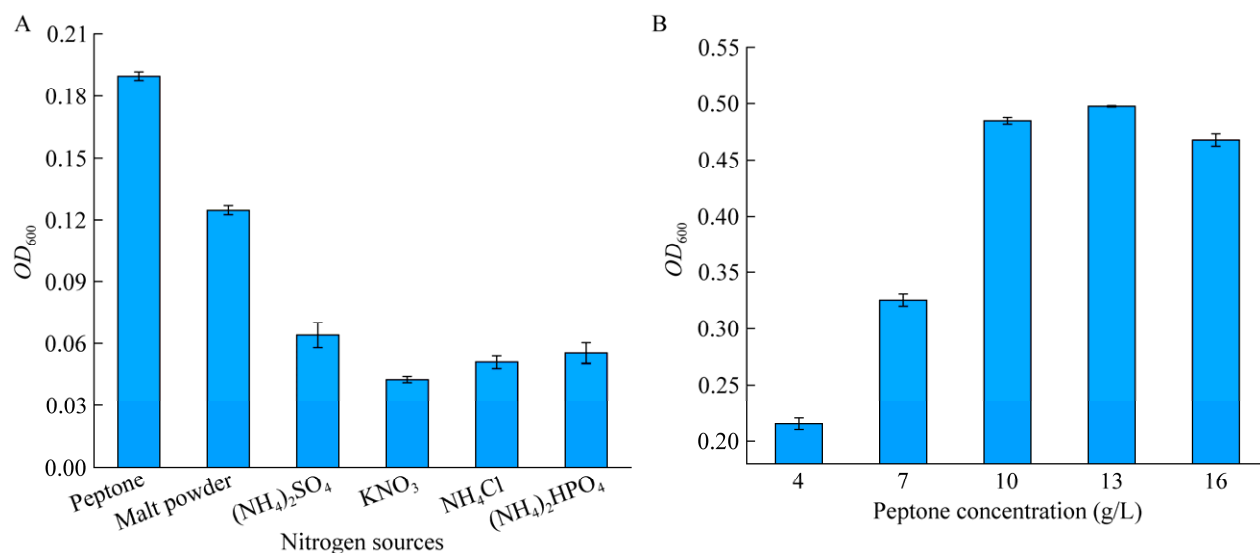


图 10 氮源对菌株 CSW-1 生长的影响 A: 氮源种类. B: 氮源浓度

Figure 10 Effect of nitrogen source on the growth of strain CSW-1. A: Type of nitrogen source. B: Concentration of nitrogen source.

浓度基本趋于稳定。因此，最终选择蛋白胨添加量为 13 g/L 作为菌株 CSW-1 生长的最佳氮源浓度。

2.4 生长曲线

生长曲线反映微生物在正常液体培养基下的生长过程，在最佳生长条件下，通过测定不同培养时间的菌液吸光度(OD_{600})来探究细菌的生长情况，菌株 CSW-1 的生长曲线如图 11 所示。该菌株在 0–6 h 处于调整期，6–48 h 处于对数生长期，菌株 CSW-1 呈快速增长的趋势，48–72 h 为生长的稳定期，72 h 后进入衰退期。

2.5 菌株脱除煤中有机钠条件优化

在菌株 CSW-1 的最佳培养条件下进行脱除煤中有机钠的条件优化试验，如图 12 所示，在细菌的浸出过程中，体系中的 Na^+ 浓度在浸出初期出现下降的趋势，培养液中游离的 Na^+ 作为细菌唯一的无机盐来源，供细菌生长、繁殖所需，出现短暂的下降。随着浸出过程的进行，细菌大量繁殖，浸出体系中营养物质匮乏，细菌及其代谢产物作用于煤分子，导致有机钠元

素的溶出，培养液中游离的钠元素增多。在浸出后期，体系中脱除的 Na^+ 可能吸附到细菌的代谢物中；当溶液中 Na^+ 浓度超过特定值时， Na^+ 通过细胞膜上的载体，以顺化学梯度扩散的方式进入细胞。此外， Na^+ 与有机溶剂(如葡萄糖)的偶联吸收也能促进 Na^+ 在细胞内的吸收；Na/H 交换蛋白将胞外钠转运到细胞内，在质膜

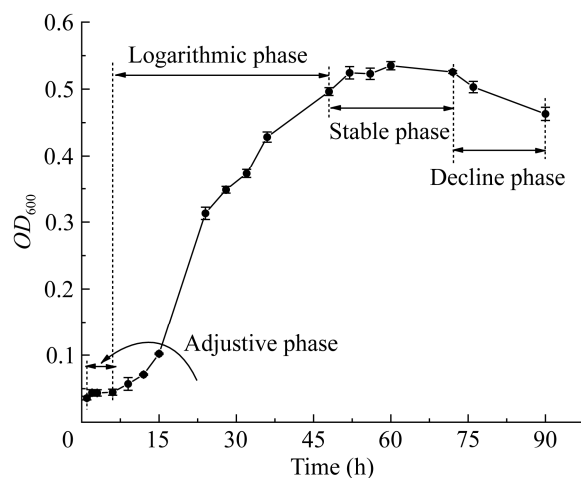


图 11 菌株 CSW-1 的生长曲线

Figure 11 Growth curve of strain CSW-1.

两侧保持合适的 Na^+ 浓度^[31-32], 导致培养液中的 Na^+ 浓度出现下降的趋势。初始 pH 对细菌脱除煤中有机钠的影响如图 12A 所示。初始 pH 值为 8.0 时细菌对煤中有机钠的脱除效果最好, 发酵液中的 Na^+ 浓度最高达 159.92 mg/L。装液量对细菌脱除煤中有机钠的影响如图 12B 所示。装液量为 80 mL 时微生物的作用效果最好,

发酵液中的 Na^+ 浓度最高达 159.89 mg/L。煤浆浓度对细菌脱除煤中有机钠的影响如图 12C 所示。煤浆浓度为 15 g/L 时发酵液中的 Na^+ 浓度最高, 但与煤浆浓度为 5 g/L 时的 Na^+ 浓度相差较小, 在考虑经济性的前提下, 最终选择煤浆浓度为 5 g/L。接种量对细菌脱除煤中有机钠的影响如图 12D 所示, 接种量为 7% 时发酵液中

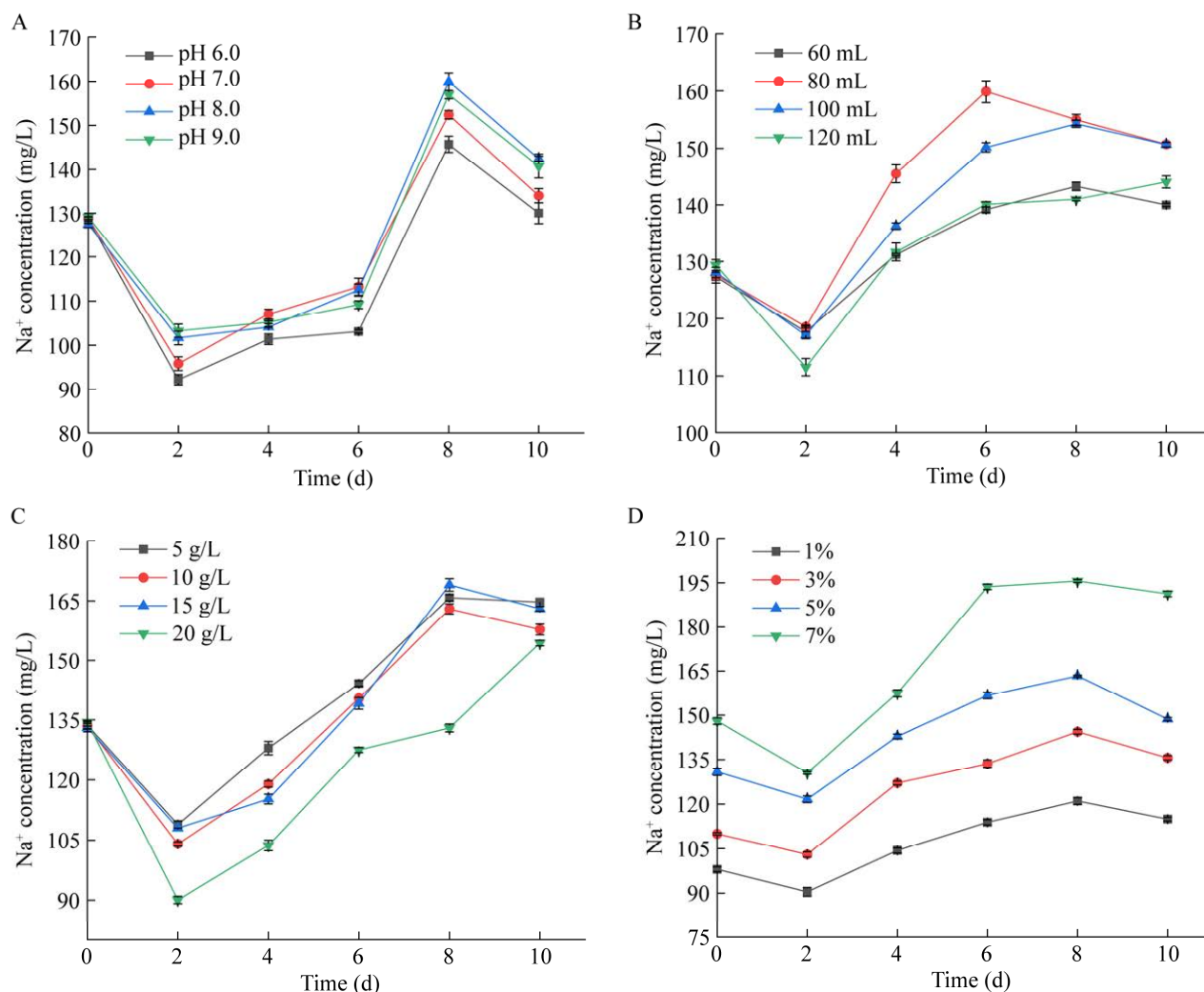


图 12 菌株 CSW-1 脱除煤中有机钠的条件优化 A: 初始 pH 对煤中有机钠脱除的影响. B: 装液量对煤中有机钠脱除的影响. C: 煤浆浓度对煤中有机钠脱除的影响. D: 接种量对煤中有机钠脱除的影响
Figure 12 Optimization of conditions for removing organic sodium from coal by strain CSW-1. A: Effect of initial pH on organic sodium removal from coal. B: Effect of liquid loading on removal of organic sodium in coal. C: Effect of coal slurry concentration on removal of organic sodium in coal. D: Effect of inoculum quantity on removal of organic sodium in coal.

的 Na^+ 浓度整体偏高。因此, 最终确定煤中有机钠的脱除条件为: 初始 pH 8.0, 装液量 80 mL, 煤浆浓度为 5 g/L, 接种量 7%。

2.6 菌株对煤中有机钠的脱除效果

在煤中有机钠的最佳脱除条件下, 菌株 CSW-1 处理前后煤中有机钠元素的含量如表 4 所示。原样中的醋酸铵溶钠(HAc-coal)、盐酸溶钠(HCl-coal)和总有机钠(Total- Na^+)的含量分别为 308、768 和 1 076 $\mu\text{g/g}$; 经细菌处理之后的煤样中醋酸铵溶钠(HAc-coal)、盐酸溶钠(HCl-coal)和总有机钠(Total- Na^+)的含量分别为 199、621 和 820 $\mu\text{g/g}$ 。菌株 CSW-1 处理前后煤样中的醋酸铵溶钠(HAc-coal)、盐酸溶钠(HCl-coal)和总有机钠的脱除率如图 13 所示。煤样中 HAc-coal

表 4 菌株 CSW-1 处理前后煤中有机钠元素的含量

Table 4 Content of organic sodium in coal before and after treatment with strain CSW-1

Item	原煤中 In raw coal ($\mu\text{g/g}$)	浸渣中 In residues ($\mu\text{g/g}$)
$w(\text{HAc-coal})$	308	199
$w(\text{HCl-coal})$	768	621
$w(\text{Total-}\text{Na}^+)$	1 076	820

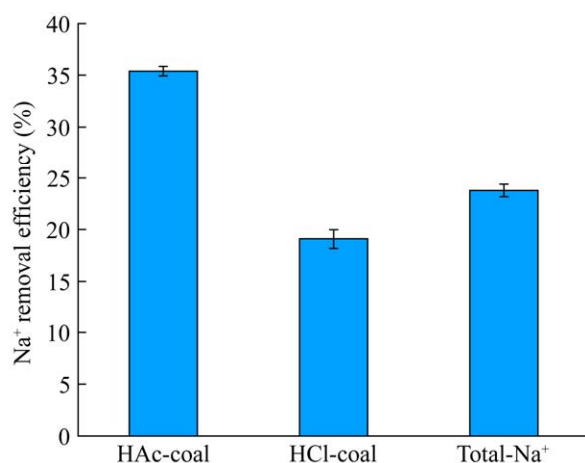


图 13 菌株 CSW-1 对煤中有机钠的脱除效果

Figure 13 Removal effect of strain CSW-1 on organic sodium in coal.

的脱除率为 35.39%、HCl-coal 的脱除率为 19.09%、煤中有机钠的总脱除率为 23.79%。微生物的作用促进了煤中芳香族结构的破坏, 煤分子中含氮或含氧官能团上有机钠元素的配位结构被破坏, 导致煤分子中有机钠元素的溶出^[33-34]。此外, 随着细菌代谢产物(如有机酸)的积累, 发酵液中的氢离子与煤分子中含氮或含氧官能团上的钠离子发生质子交换, 促进煤中有机钠元素的释放^[35]。

3 结论

经过富集、分离、纯化和筛选, 从土壤样品中筛选出一株脱除煤中有机钠的最佳菌株 CSW-1, 通过观察形态学特征发现该菌株的菌落在固体培养基上呈黄色的圆形、边缘完整、不透明、表面湿润且光滑。光学显微镜下观察到细菌无芽孢、鞭毛, 存在荚膜, 属于革兰氏阴性菌。生理生化特性结果显示该菌株在代谢过程中不能分解含硫有机物产生 H_2S , 细菌的 Voges-Prokauer 测试呈现阴性, 细菌不能分解葡萄糖产生丙酮酸。能够产生淀粉水解酶和过氧化氢酶, 但不分泌明胶酶来分解明胶。此外, 该菌株不能分解蛋白胨中的色氨酸产生吲哚, 也不能利用柠檬酸盐作为碳源。通过 16S rRNA 基因序列分析可知菌株 CSW-1 为水生鞘氨醇单胞菌, 通过单因素试验确定该菌株的最佳生长条件为: 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 初始 pH 8.0, 接种量 3%, 装液量 100 mL, 摇床转速 150 r/min, 最适碳源为葡萄糖(4 g/L), 最适氮源为蛋白胨(13 g/L), 在该条件下绘制了细菌的生长曲线并对煤中有机钠的脱除条件进行了优化, 确定煤中有机钠的最佳脱除条件为: 初始 pH 8.0, 装液量 80 mL, 煤浆浓度为 5 g/L, 接种量 7%。在该条件下, 菌株 CSW-1 对煤中有机钠的脱除率为 23.79%。本研究提出一种利用生物冶金技术脱除煤中有

机钠的新方法,对于降低煤中钠元素在煤炭燃烧、气化和配煤炼焦过程中产生的危害,以及传统有机钠脱除工艺中产生酸性废水等问题提供了一种新的研究手段。

REFERENCES

- [1] WANG JQ, YUAN YC, CHI ZH, ZHANG GX. Development and application of anti-fouling ceramic coating for high-sodium coal-fired boilers[J]. *Journal of the Energy Institute*, 2018, 91(6): 962-969.
- [2] 雍晓根, 周梓欣. 准东高钠煤沾污、结渣、腐蚀问题研究[J]. *西部探矿工程*, 2018, 30(7): 112-114.
YONG XJ, ZHOU ZX. Study on contamination, slagging and corrosion of high sodium coal in Zhundong[J]. *West-China Exploration Engineering*, 2018, 30(7): 112-114 (in Chinese).
- [3] SONG GL, YANG SB, SONG WJ, QI XB. Release and transformation behaviors of sodium during combustion of high alkali residual carbon[J]. *Applied Thermal Engineering*, 2017, 122: 285-296.
- [4] 杨承伟, 丁华, 白向飞, 唐跃刚, 何金, 袁东营. 新疆高钠煤中钠元素的地球化学研究现状[J]. *煤炭科学技术*, 2022, 50(10): 169-178.
YANG CW, DING H, BAI XF, TANG YG, HE J, YUAN DY. Geochemical research status of sodium element in high-sodium coal in Xinjiang[J]. *Coal Science and Technology*, 2022, 50(10): 169-178 (in Chinese).
- [5] 翁兴媛, 齐越超, 马志军, 关智浩, 苏文贵. CO₂-水处理准东煤钠脱除效果研究[J]. *煤炭科学技术*, 2017, 45(4): 176-180.
WENG XY, QI YC, MA ZJ, GUAN ZH, SU WG. Study on sodium removal effect with CO₂-water treatment method for Zhundong coal[J]. *Coal Science and Technology*, 2017, 45(4): 176-180 (in Chinese).
- [6] ZHU C, QU SJ, ZHANG J, WANG Y, ZHANG YH. Distribution, occurrence and leaching dynamic behavior of sodium in Zhundong coal[J]. *Fuel*, 2017, 190: 189-197.
- [7] 刘大海, 张守玉, 陈川, 涂圣康, 金涛, 郑红俊, 吴巧美, 邓文祥, 唐文蛟, 施大钟, 吕俊复. 新疆高钠煤脱钠提质过程中钠存在形式[J]. *煤炭学报*, 2014, 39(12): 2519-2524.
LIU DH, ZHANG SY, CHEN C, TU SK, JIN T, ZHENG HJ, WU QM, DENG WX, TANG WJ, SHI DZ, LYU JF. Existence form of sodium in the high sodium coals from Xinjiang during its sodium removal process[J]. *Journal of China Coal Society*, 2014, 39(12): 2519-2524 (in Chinese).
- [8] HULSTON J, FAVAS G, CHAFFEE AL. Physico-chemical properties of Loy Yang lignite dewatered by mechanical thermal expression[J]. *Fuel*, 2005, 84: 1940-1948.
- [9] SRICHANDAN H, MOHAPATRA RK, PARHI PK, MISHRA S. Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: a critical review[J]. *Hydrometallurgy*, 2019, 189: 105122.
- [10] 罗宁, 张晓伟, 柳召刚, 李健飞, 冯福山, 胡艳宏. 微生物冶金及其在稀土资源利用中的研究进展[J]. *化工矿物与加工*, 2023, 52(8): 75-82.
LUO N, ZHANG XW, LIU ZG, LI JF, FENG FS, HU YH. Research progress of microbial metallurgical technology applied in the utilization of rare earth resources[J]. *Industrial Minerals & Processing*, 2023, 52(8): 75-82 (in Chinese).
- [11] 杨水兰, 徐杰, 陈创前. 云南补木嘎高硫煤细菌脱硫工艺条件优化[J]. *西安科技大学学报*, 2022, 42(4): 780-790.
YANG SL, XU J, CHEN CQ. Optimization of bacterial desulfurization process conditions for Bumuga high sulfur coal in Yunnan Province[J]. *Journal of Xi'an University of Science and Technology*, 2022, 42(4): 780-790 (in Chinese).
- [12] YE JP, ZHANG PY, ZHANG GM, WANG SQ, NABI M, ZHANG Q, ZHANG HB. Biodesulfurization of high sulfur fat coal with indigenous and exotic microorganisms[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 197: 562-570.
- [13] HU TT, YANG Y, ZHANG MJ, GAO Y, CHENG Q, JI HJ. Biodesulfurization of coal using *Rhodococcus erythropolis* SX-12 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* GF: a two-step approach[J]. *Energy Science & Engineering*, 2019, 7(1): 162-169.
- [14] 刘雪, 温全宝, 张雷, 杨志超, 郭建英, 刘生玉. 一株钠长石分解菌的筛选及其生长特性[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5): 1801-1814.
LIU X, WEN QB, ZHANG L, YANG ZC, GUO JY, LIU SY. Screening and growth characteristics of an albite-decomposing strain[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(5): 1801-1814 (in Chinese).
- [15] 周丹丹, 马放, 王弘宇, 董双石. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(6): 837-839.
ZHOU DD, MA F, WANG HY, DONG SS. Study on

- screening method of aerobic denitrifiers[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(6): 837-839 (in Chinese).
- [16] MARZAN LW, HOSSAIN M, MINA SA, AKTER Y, CHOWDHURY AMMA. Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint[J]. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2017, 43(1): 65-74.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [18] 汉春利, 张军, 刘坤磊, 徐益谦. 煤中钠存在形式的研究[J]. *燃料化学学报*, 1999, 27(6): 95-98.
- HAN CL, ZHANG J, LIU KL, XU YQ. Modes of occurrence of sodium in coals[J]. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 1999, 27(6): 95-98 (in Chinese).
- [19] BUONAURO R, STRAVATO VM, KOSAKO Y, FUJIWARA N, NAKA T, KOBAYASHI K, CAPPELLI C, YABUUCHI E. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 6): 2081-2087.
- [20] LEE JS, SHIN YK, YOON JH, TAKEUCHI M, PYUN YR, PARK YH. *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov., and *Sphingomonas taenionensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(Pt 4): 1491-1498.
- [21] 曾晓希. 脱硅细菌的筛选、鉴定以及 *Bacillus mucilaginosus* Lv<1-2>的脱硅研究[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2006.
- ZENG XX. Screening and identification of desilicizing bacteria and study on desilicization of *Bacillus mucilaginosus* Lv<1-2>[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University, 2006 (in Chinese).
- [22] DENICH TJ, BEAUDETTE LA, LEE H, TREVORS JT. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(2): 149-182.
- [23] 张贤珍. 硅酸盐细菌在铝土矿生物脱硅中的应用与机理研究[D]. 北京: 北京科技大学博士学位论文, 2015.
- ZHANG XZ. Application of silicate bacteria in bauxite biodesilication and bioleaching mechanism[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Science and Technology Beijing, 2015 (in Chinese).
- [24] HUANG HQ, LI S, BAO SX, MO KL, SUN DM, HU YH. Expression and characterization of a cold-adapted alginate lyase with exo/endo-type activity from a novel marine bacterium *Alteromonas portus* HB161718^T[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(3): 155.
- [25] PANG YR, ZHAO YK, LI SL, ZHAO Y, LI J, HU ZH, ZHANG CY, XIAO DG, YU AQ. Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 241.
- [26] 谢东, 汪流伟, 李宁健, 李泽霖, 徐子航, 张庆华. 一株多功能菌株的发掘、鉴定及解磷条件优化[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(7): 241-253.
- XIE D, WANG LW, LI NJ, LI ZL, XU ZH, ZHANG QH. Discovery, identification and optimization of phosphorus solubilization conditions of a multifunctional strain[J]. *Bulletin of Biotechnology*, 2019, 39(7): 241-253 (in Chinese).
- [27] 肖思远, 朱文娟, 陈思宇, 兰时乐. 反硝化细菌的筛选及菌藻共培养体系除氮特性[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(8): 154-162.
- XIAO SY, ZHU WJ, CHEN SY, LAN SL. Screening of aerobic denitrifying bacteria and nitrogen removal characteristics of bacteria-algae co-culture system[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 44(8): 154-162 (in Chinese).
- [28] 惠荣耀, 丁安娜. 微生物在石油生成中的作用(一): 降解和去含氧基团[J]. *沉积学报*, 2017, 35(6): 1274-1283.
- HUI RY, DING AN. The Role of microorganisms in the oil generation (I): the degradation of macromolecular organic matter and the elimination of oxygen-containing groups[J]. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2017, 35(6): 1274-1283 (in Chinese).
- [29] 程立坤, 赵春光, 黄静, 徐庆阳, 谢希贤, 陈宁. 葡萄糖浓度对大肠杆菌发酵 L-色氨酸的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(3): 5-9.
- CHENG LK, ZHAO CG, HUANG J, XU QY, XIE XX, CHEN N. Effect of glucose concentration on L-tryptophan fermentation by *Escherichia coli*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(3): 5-9 (in Chinese).
- [30] 卫华宁, 王灵, 李涛, 王娜, 吴华莲, 向文洲. 不同

- 氮源及氮浓度对海水驯化藻株 *Asterarcys* sp. 生长及生化组成的影响[J]. 生物技术通报, 2021, 37(10): 34-44.
- WEI HN, WANG L, LI T, WANG N, WU HL, XIANG WZ. Effects of different nitrogen sources and concentrations on the growth and biochemical composition of *Asterarcys* sp. acclimated by seawater[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(10): 34-44 (in Chinese).
- [31] 王海芳. 同一物质过膜方式可能不同[J]. 生物学教学, 2013, 38(9): 63-64.
- WANG HF. The same substance may cross the membrane in different ways[J]. Biology Teaching, 2013, 38(9): 63-64 (in Chinese).
- [32] YANG Z, RAN L, YUAN P, YANG Y, WANG K, XIE LY, HUANG SL, LIU J, SONG ZH. EGFR as a negative regulatory protein adjusts the activity and mobility of NHE3 in the cell membrane of IPEC-J2 cells with TGEV infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2734.
- [33] JIANG JY, YANG WH, CHENG YP, LIU ZD, ZHANG Q, ZHAO K. Molecular structure characterization of middle-high rank coal via XRD, Raman and FTIR spectroscopy: implications for coalification[J]. Fuel, 2019, 239: 559-572.
- [34] YAN JC, LEI ZP, LI ZK, WANG ZC, REN SB, KANG SG, WANG XL, SHUI HF. Molecular structure characterization of low-medium rank coals via XRD, solid state ^{13}C NMR and FTIR spectroscopy[J]. Fuel, 2020, 268: 117038.
- [35] SUN Y, LIU SY, WEN QB, GUO JY, YANG ZC. Experimental and DFT simulation studies on the mechanism of acid and alkali promoted dissolution of albite[J]. Applied Surface Science, 2023, 641: 158475.