

煤的预处理对高阶煤微生物溶解的影响

王 英¹ 王 力¹ 王学民²

(山东科技大学化学与环境工程学院 青岛 266510)¹ (山东新汶矿业集团 泰安 271233)²

摘要:研究了煤的溶胀预处理和氧化预处理对微生物溶煤的影响, 以及两种预处理方法处理过的煤样在固态培养基和液态培养基中的溶煤效果。考察了预处理方法、培养基选择、接种量等因素对溶煤作用的影响, 得出了溶煤效果较好的适宜条件, 并且对微生物溶煤的作用机理做了初步的探讨。

关键词:微生物溶煤, 菌种, 煤预处理, 高阶煤

中图分类号: TQ536 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0081-05

The Effect of Pretreatment on Microbial Solubilization of High-rank Coal

WANG Ying¹ WANG Li¹ WANG Xue-Min²

(Shandong University of Science and Technology, Institute of Chemistry and
Environment Engineering, Qingdao 266510)¹

(Shandong Xinwen Group of Mining Industry, Taian 271233)²

Abstract: In this paper, the effect of coal swelling and oxidation pretreatment on microbial solubilization, coal after pretreatment liquefies in solid culture medium and liquid culture medium are studied. At the same time, the microbial solubilization is affected by pretreatment, incubation medium and the amount of incubation, we conclude better conditions and discuss bio-solubilization mechanism.

Key words: Bio-solubilization of coal, Strain, Coal pretreatment, High-rank coal

我国煤炭资源丰富, 石油和天然气相对短缺, 以新能源、可再生能源为主的后续能源的开发和利用, 还需要一段相当长的技术准备和过渡期。因此, 在未来相当长的一段时期, 煤炭仍将是我国的主要能源。随着煤炭资源的开发利用, 煤的生物转化技术在国际上越来越受到人们的重视。国外研究者的试验研究仅局限于低阶煤, 对高阶煤的溶解或液化效果较差^[1]。实际上, 在煤的微生物液化过程中, 使用的菌种不同, 对不同的煤样, 其分泌的溶煤活性物也不同。新汶高阶煤的微生物转化利用研究开辟了一条能源转化利用的新途径。试验分别采用高能辐射、超声波、溶剂溶胀和酸预处理等方法, 以松弛煤大分子间的作用力, 提高微生物的溶煤转化率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 实验所用菌种 A、B 是本实验室从环境中分离筛选所得。

1.1.2 培养基: 固体培养用改性的 CZAPECK DOX - medium 琼脂培养基^[1], 其组成为: 谷氨酸钠 20g, 硝酸钠 30g, 葡萄糖 10g, 磷酸氢二钾 2g, 硫酸镁 0.5g, 氯化钾 0.5g, 琼脂 15 ~ 20g, 吐温 80 0.15g, 去离子水定容至 1,000mL, pH 7.0。液体培养用

通讯作者 Tel: 0532-86057103, E-mail: wanglisudust@126.com

收稿日期: 2005-07-01, 修回日期: 2005-08-15

改性的 CZAPECK DOX - medium 培养基, 其组成为: 谷氨酸钠 20g, 硝酸钠 30g, 葡萄糖 10g, 磷酸氢二钾 2g, 硫酸镁 0.5g, 氯化钾 0.5g, 吐温 80 0.15g, 去离子水定容至 1,000mL, pH 7.0。两种培养基在接种使用前均需经 1×10^5 pa 灭菌 20min。

1.1.3 煤样: 试验用的煤样是新汶精煤, 粒度为 1mm ~ 3mm。在微生物溶煤试验前, 大部分煤样经过高能辐射、超声波、溶剂溶胀和酸预处理, 使煤样呈中性, 烘干备用。经过这样的预处理不仅可以松弛煤大分子间的作用力, 而且改变了其空隙结构, 使溶煤活性物更容易攻击煤基质。

1.2 方法

1.2.1 煤样的预处理: (1) 氧化预处理: 取浓度为 4 mol/L HNO_3 , 将煤和硝酸以 3:5 的质量比做四个试样 A、B、C、D, 再将煤与 2mol/L HNO_3 以 1:3 的质量体积比作试样 A、B、C、D。分别将试样放入磁力搅拌器中处理 6h, 使煤样均匀润湿。将处理过的试样置于超声波容器中, 辐射处理时间分别为 20、30、40、50min。煤与 3% H_2O_2 以 1:4 质量体积比混合, 在磁力搅拌器中处理 6h 做 3 个试样 A、B、C。取出后, 用水洗至滤液无色、pH 大于 5.5, 再放入 95% 乙醇中浸泡 30min, 然后用真空泵过滤, 放在真空干燥箱烘干备用。取 6 mol/L HNO_3 , 将其与煤以 1:2 的质量体积比做五个试样 A、B、C、D、E^[2], 并在磁力搅拌作用下处理 6h。将处理过的 A、B、C、D、E 试样置于超声波容器中, 辐射处理时间分别为 20、30、40、50、60min, 其它同上。(2) 溶胀预处理: (a) 液氨溶胀法: 煤样 (1 ± 0.0002) g, 放置于 140℃ 的鼓风烘箱中烘干 50min。以煤与溶剂质量体积比 1:4 的比例做五个试样 A、B、C、D、E, 分别在磁力搅拌作用下进行溶胀处理 6h^[3]。将充分溶胀过的煤与溶剂的混合物置于超声波发生器中, 辐射处理一定时间后取出。在超声波发生器中预处理时间分别为 30、40、50、60、70min, 再放入微波炉中辐射处理。然后在烘箱里蒸发溶剂、干燥到一定程度后, 研磨至小于 100 目, 再在真空下蒸发溶剂, 直至溶剂蒸发完全, 将煤样经高压灭菌后装入煤样磨口瓶中, 放入干燥器中备用; (b) 四氢呋喃 (THF)、吡啶溶胀法^[4]: 以煤与溶剂质量体积比 1:4 的比例做 3 个试样 A、B、C, 分别在磁力搅拌作用下处理 6h。然后将处理过的 A、B、C 试样置于超声波容器中分别辐射处理 20、30、40min, 再放于微波炉中处理, 烘干后高压灭菌。

1.2.2 固体培养菌溶解煤: 在培养皿内的改性的 CZAPECK DOX - medium 培养基表面上接种, 于 28℃, 相对湿度大于 80% 的条件下, 培养 7d, 待菌丝体长成之后, 加入定量煤样, 定时观察煤样是否溶解。

1.2.3 液体培养物溶煤: 在 250mL 锥形瓶中加入 50mL CZAPECK DOX - medium 培养液。每瓶用 5mL 培养 7d 的菌丝悬液接种。于 28℃, 以 150r/min 摇动速度进行摇瓶培养。培养 7d 后, 先后用 940r/min 的低速离心机离心和 0.45 μm 孔径的有机滤膜过滤, 得到的无细胞液以 0.1g/10mL 比例加入煤粒样品, 当煤溶解后, 测定滤液的 A_{450} , 以确定煤的溶解程度。煤溶解程度的确定, 通过离心分离收集煤残渣, 烘干并称重后与加入煤样干重差计算得出。

1.2.4 培养基的选择: 使用 SMA 固体培养基接种各菌种、溶解预处理的煤样进行了大量的试验, 结果发现煤样均不溶解, 只有用含氮培养基煤样才溶解。同时用加藜芦醇作诱导的 SMA 培养基 (pH 值 3.5 ~ 4.0) 接种各菌种、溶解预处理的煤样, 只有一个菌种能溶解煤样。原因是菌种产生的黄漆酶在有氧情况下可以直接氧化非酚类物质

(藜芦醇 B. O. 4 木质素二聚体) 而不需其它介质的参与。黄漆酶催化酚类芳香族化合物成苯氧自由基, 然后再经过自由基之间的聚合、歧化、脱质子化、水的亲核进攻等非酶促进反应最终导致烷基-芳基断裂, Ca 氧化, 酚的去甲氧基化等, 这与微生物溶煤的酶学机理相符; 而含氮培养基有高的氮含量, 培养基的氮含量高会形成较高浓度的铵离子, 从而由于介质的碱化使得煤中有机质易于从煤的网状结构中溶出。

为了验证微生物溶煤的碱性机理, 我们用 SMA 培养基, 观察 A 的生长过程、无细胞液溶煤过程中以及其空白样的 pH 值变化。如图 1 所示, 加煤样之前, 二者的 pH 值基本一致, 为 9.0 左右。但加入煤样后, 培养液的 pH 值下降到 5.39 后又回升, 最终接近 9.0, 而其空白样的 pH 值相对比较稳定。这说明 A 的溶煤遵循碱溶机理, 微生物在生长过程中产生碱性物质。在溶煤过程中, 液化煤的量随培养基的 pH 的升高而增大, 而培养基 pH 升高程度与培养基中所含的多肽和多胺的量有关, 而这些氨、多胺和一些类似的化合物参与煤的液化过程。

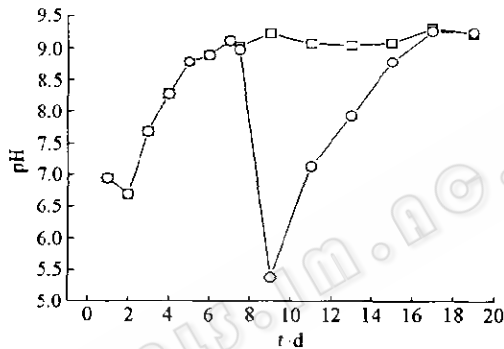


图 1 菌种 A 在溶煤过程中 pH 值的变化曲线
—□— 空白样的 pH 值变化曲线, —○— 加煤样的 pH 值变化曲线

2 结果与讨论

2.1 煤样的预处理

大量试验结果表明, 用液氨、THF 和吡啶预处理的煤样都不溶, 表明煤样经溶胀预处理后的溶解效果极差。表 1 给出了煤样经氧化预处理后在含氮培养基上的溶煤效果。由此可见: (1) 经过氧化预处理的煤, 明显受到培养菌的溶解作用。硝酸氧化增加了煤的氧含量, 并改变煤的一些结构, 使其容易受到培养菌代谢产生的溶煤活性物的攻击而发生溶解。而双氧水、氨水、THF、吡啶经过溶胀预处理方式几乎没有发生溶解。(2) 同一种预处理方法的不同煤样溶煤程度也是不同的, 经过 2 mol/L 硝酸氧化处理的气煤有较好的溶解, 经过 6mol/L 硝酸氧化处理的煤样溶解效果最好。

表 1 经氧化预处理后煤粒在含氮培养基上的溶煤效果

煤种	A	B	C	D	E
2 mol/L KHNO ₃	+	+	+++	-	
3% H ₂ O ₂	-	-	-		
6 mol/L HNO ₃	+++	+++	+++	+++	+++
25% HNO ₃	-	-	-	-	

注: - 不溶, + 微溶, ++ 部分溶, +++ 充分溶解, A、B、C、D、E 代表试样在超声波发生器中预处理时间分别为 20、30、40、50、60min

2.2 接种量和菌丝生长曲线的确定

在摇瓶 SMB 培养液中, A 和 B 菌丝体干重的测量结果绘于图 2, A 在培养 5d 后, 菌丝体生长比前几天更快, 而 B 的生长比较平稳, 对菌种的生长可认为以 7d 为最佳时间。

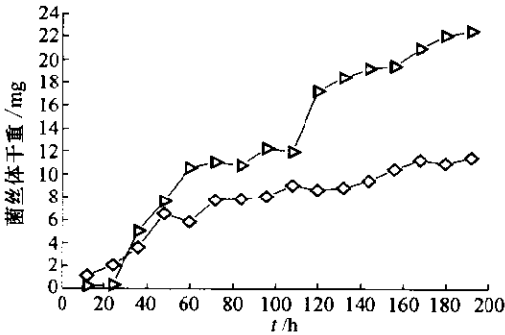


图 2 A、B 两菌种的生长曲线
—△— A 的生长曲线, —◇— B 的生长曲线

接种量为 2、4、6、8mL/瓶时, 菌球较小且彼此相差不大(表 2)。这可能是因为在培养基组成和用量相同的情况下, 接种量较大时, 所含菌丝体碎片较多, 因而形成的菌球较多, 每个菌球对应的营养量较少, 其尺寸较小。菌球在长大过程中, 内部细胞逐渐为外部细胞所包围, 这样内部细胞就会因营养供应不足和代谢受阻而死亡, 故溶煤活性物主要是由外部细胞产生的。所以, 菌球较小时, 由于比表面积较大, 单位体积菌球产生的溶煤活性物较多, 溶煤效果较好; 菌球较大时, 由于比表面积较小, 单位体积菌球产生的溶煤活性物较少, 溶煤效果较差。因此, 为了充分发挥微生物的溶煤作用, 在用液体摇瓶培养微生物时, 应注意适宜接种量的选取, 使生成的菌球较小为宜。观察不同接种量的溶煤效果, 4~6mL 溶煤率较高, 一般实验中采用 5mL 接种量。

表 2 接种量不同时吸光度

接种量 (mL)	4	6	8	10
A_{450}	0.429 ₁₅₀	0.747 ₂₀₀	0.436 ₁₀₀	0.719 ₁₀₀

2.3 液体溶煤效果

在 250mL 三角烧瓶中加入 50mL SMB 培养液, 每瓶用 5mL 培养 7d 并经破碎的菌丝悬浮液接种到含氮培养液中继续培养, 以 150r/min 摇动速度进行摇瓶培养, 然后接种到含 50mL 含氮培养液中培养 7d, 离心过滤的滤液加入经 6 mol/L HNO₃ 处理的气煤, 表 3 给出了溶煤 14d 后吸光度的变化情况。

表 3 6mol/L HNO₃ 硝化气煤的吸光度 (稀释 70 倍)

煤样	A	B	C	D	E
A_{450}	0.685	0.772	0.525	0.309	0.449

注: A、B、C、D、E 分别代表试样在超声波发生器中处理时间为 20、30、40、50、60min

结果表明, 6 mol/L HNO₃ 硝化气煤在超声波发生器中预处理 30min 后的吸光度值最高, 在含氮培养基中的溶解效果最好。

3 结论

(1) 试验的菌种在含氮培养基中的溶煤效果最好, 微生物在生长过程中产生碱性物质, 在溶煤过程中, 液化煤的量随培养基的 pH 的升高而增大, 而培养基 pH 升高程度与培养基中所含的多肽和多胺的量有关, 而这些氨、多胺和一些类似的化合物参与煤的液化过程, 符合溶煤的碱溶机理。

(2) 经过氧化预处理的煤, 明显受到培养菌的溶解作用, 本试验的最佳溶煤预处理方案是硝酸氧化预处理。硝酸氧化会增加煤的氧含量, 并改变煤的某些结构, 使其容易受到培养菌代谢产生的溶煤活性物的攻击而发生溶解。

(3) 经液氨、THF、吡啶溶胀预处理的煤几乎没有发生微生物的溶解作用, 原因有待进一步研究。

(4) 进行微生物溶煤试验, 用液体摇瓶培养微生物时, 应使生成的菌球较小为宜, 以充分发挥微生物的溶煤作用。

参考文献

- [1] Laborda F, Fernandez M, Luna I N, *et al.* Fuel Processing Technology, 1997, 52: 95 ~ 107.
- [2] Laborda F, Monistrol I F, Luna N, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 49 ~ 56.
- [3] 倪献智, 王 力, 陈丽慧, 等. 煤炭转化, 2003, 26 (4): 37 ~ 41.
- [4] Haoquan H, Guangyan S, Guohua C. Fuel Processing Technology, 2000, 28: 33 ~ 44.