

真菌筛选及降解光 - 氧氧化褐煤工艺条件优化研究

李建涛^{1,3}, 刘向荣², 杨杰², 王之宇^{1,3}

(1. 商洛学院 化学工程与现代材料学院, 陕西 商洛 726000; 2. 西安科技大学 化学与化工学院, 陕西 西安 710054; 3. 陕西省尾矿综合利用重点实验室, 陕西 商洛 726000)

摘要: 为了获得降解褐煤的高效降解菌株, 对五种真菌和四种光 - 氧氧化褐煤进行菌 - 煤匹配试验, 筛选出的优势菌株为黄孢原毛平革菌。通过单因素试验探讨了黄孢原毛平革菌降解光 - 氧氧化内蒙古胜利褐煤的工艺条件, 确定的较佳工艺条件为: 加煤量为 0.3 g/20 mL, 接种量为 1.5 mL/20 mL, 降解时间为 16 d, 培养箱振荡频率为 210 r/min, 煤样粒度为 $-0.15+0.075$ mm, 降解温度为 30℃; 依此条件, 研究了黄孢原毛平革菌对光 - 氧氧化云南昭通褐煤、光 - 氧氧化山西浑源褐煤和光 - 氧氧化内蒙古元宝山褐煤的降解效果, 结果表明, 此条件下, 黄孢原毛平革菌对三种光 - 氧氧化褐煤的降解效果均有一定程度的提升。

关键词: 熔真菌; 褐煤; 煤的微生物降解; 光 - 氧氧化预处理

doi:10.3969/j.issn.1000-6532.2020.05.011

中图分类号: TD951; TQ533 文献标志码: A 文章编号: 1000-6532 (2020) 05-0082-06

我国是煤炭生产和消费大国, 随着社会的发展和进步, 环境问题越来越受到人们的广泛关注。因此, 对于煤, 特别是褐煤的高效清洁利用也成为当前科学研究的热点之一^[1-3]。煤的微生物降解是褐煤清洁高效利用的前沿技术, 因其设备要求简单, 转化条件温和, 能耗低等优点, 极具发展前景^[4-6]。该技术发展至今, 还未实现工业化的最根本的问题是微生物对煤的降解率低, 高效降解菌缺乏。降解率低, 使得降解产物的量不够丰富, 导致研究对象的匮乏及进一步应用受限, 从而极大的阻碍了煤微生物降解技术的发展。有研究^[7]发现, 自然界褐煤在风化降解过程中, 不同时期微生物类群存在明显的演替现象, 即放线菌为褐煤风化初期的主要作用菌, 随之是细菌, 真菌则

在褐煤风化的后期起主要作用。可见, 煤的微生物降解是分步进行的, 多种菌在不同阶段, 起不同作用的协同过程。这一研究结果表明, 要提高煤的微生物降解率, 单个菌株的作用往往有限, 只有通过多种菌株的协同配合才能实现高降解率这一目的。由此, 我们设想建立煤的微生物分级降解的方法, 以实现微生物对煤的协同作用和高效降解。本研究首先筛选出能够降解褐煤的真菌菌株, 并利用单因素方法研究降解的工艺条件, 为低阶煤的分级降解方法的建立提供支撑。

1 试验部分

1.1 煤样及预处理

试验用煤样为内蒙古胜利褐煤 (SLH)、云

收稿日期: 2020-03-04; 改回日期: 2020-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21373158) 和陕西科技厅中澳合作项目 (2013KW17)

作者简介: 李建涛 (1979-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为矿物加工。

通讯作者: 刘向荣 (1966-), 女, 教授, E-mail: liuxiangrongxk@163.com。

南昭通褐煤 (ZTH)、山西浑源褐煤 (HYH) 和内蒙古元宝山褐煤 (YBH)。各煤样在 60℃ 条件下, 烘干 3 h, 经破碎、粉磨和筛分得到粒度范围均为 -0.15+0.075 mm 的煤样。利用自行设计加工的旋转床光化学反应器^[8] 分别对各煤样进行光-氧氧化预处理, 预处理条件为: 加煤量 20 g, 煤样粒

度 -0.15+0.075 mm, 紫外光强度 150 W, 马达转速 120 r/min, 氧化时间 42 h, 通氧时间 40 min。得到光-氧氧化内蒙古胜利褐煤 (GSLH)、光-氧氧化云南昭通褐煤 (GZTH)、光-氧氧化山西浑源褐煤 (GHYH) 和光-氧氧化内蒙古元宝山褐煤 (GYBH)。光-氧氧化褐煤的工业分析和元素分析结果见表 1。

表 1 煤样的工业分析和元素分析 /%

Table 1 Proximate and ultimate analysis of lignite samples

煤样	工业分析				元素分析				
	Mad	Aad	Vad	FC*	Cad	Had	Nad	St,ad	O*
GSLH	5.15	9.74	43.39	41.72	54.86	4.67	0.68	0.47	24.43
GZTH	13.39	8.03	49.35	29.23	47.89	5.03	3.31	0.72	21.63
GHYH	11.57	14.33	47.45	26.65	49.01	3.82	0.86	0.37	20.04
GYBH	9.14	3.82	41.97	45.07	65.42	4.85	0.94	1.27	14.56

*表示该数值由差减法得到。

1.2 菌株及复壮

(1) 菌株及培养基

试验选用绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、裂褶 (*Schizophyllum commune*)、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 和云芝 (*Coriolus versicolor*) 5 株真菌菌种, 前两株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 后三株购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。所用培养基为改良马丁培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母粉 2 g, 葡萄糖 20 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, (固体培养基加琼脂 15 g), 蒸馏水 1000 mL, pH 值 = 6.2 ~ 6.6。

(2) 菌株的活化及复壮

将斜面保藏的 5 株真菌: 绿色木霉 (TV)、黑曲霉 (AN)、裂褶 (SC)、黄孢原毛平革菌 (PC) 和云芝 (CV), 分别用接种针挑取少许接种至装有 10 mL 改良马丁培养基的试管中, 然后将试管放入恒温振荡培养箱中, 在 30℃、振荡频率 160 r/min 条件下, 培养 2 d。分别在倒好的改良马丁培养基平板上划线, 置于人工气候培养箱中, 在温度 30℃, 相对湿度 80% 条件下, 培养 2 d, 观察无杂菌后, 用接种针挑少量菌体放入 50 mL 无菌水和玻璃珠的锥形瓶中充分振荡, 用接种环蘸取一

孔接种于装有 10 mL 培养基的试管中, 将试管放入恒温振荡培养箱, 在 30℃、振荡频率 160 r/min 条件下, 培养 2 d, 用接种环蘸取一孔接种至装有 100 mL 改良马丁液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于恒温振荡培养箱, 相同条件培养 2 d, 所得 5 种菌液作为筛选试验母菌液。

1.3 菌-煤匹配筛选试验

GSLH、GZTH、GHYH 和 GYBH 四种煤样, 取试管若干, 每个试管装改良马丁液体培养基 20 mL, 分别做无菌的空白对照试验和 5 种真菌对 4 种光-氧氧化褐煤的降解试验。除空白以外的试管, 用接种环分别蘸取复壮好的 5 种真菌菌液各一孔接种, 放入恒温振荡培养箱中, 在 30℃, 振荡频率 160 r/min 条件下, 培养 2 d, 接种的培养基变浑浊, 所有试管分别加粒度为 -0.15+0.075 mm 的煤样 0.2 ± 0.0002 g, 放入恒温培养箱中, 继续振荡培养 25 d, 对每个试验设置三组平行试验。试验结束后, 三组平行试验的降解液分别离心 (10000 r/min, 10 min), 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 以去离子水为参比, 检测滤液在 450 nm 处的吸光度, 求得三组平行试验的 A450 平均值作为指标^[9-10]。分别比较 5 种真菌对 4 种光-氧氧化褐煤降解液吸光度的大小, A450 最大者为

优势菌株，用于后续试验。

1.4 单因素试验设计

本试验煤种为内蒙古胜利褐煤，煤样预处理方式为光 - 氧化预处理，菌种为 1.3 筛选的优势真菌菌株，培养基为改良马丁培养基，培养温度 30℃。除此之外，对加煤量、接种量、培养时间和振荡转速 4 个条件进行探讨，确定较佳值。

各工艺条件的单因素试验设计具体如下：分别称取一定量 (0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 g) GSLH 煤样，粒度为 $-0.15+0.075$ mm，液体培养基 20 mL。接种一定量的黄孢原毛平革菌 (PC) 母菌液 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0) mL，培养箱温度为 30℃，一定振荡频率下 (60、110、160、210、260) r/min，培养一定时间 (6、8、10、12、14、16、18、20) d。培养结束后，三组平行试验的产物分别离心 (10000 r/min, 15 min)，上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，以去离子水为参比，检测滤液在 450 nm 处的吸光度，求得三组平行试验的 A450 平均值作为指标，A450 值最大者为对应变量的较佳值。

1.5 三种褐煤的降解试验

利用菌株筛选试验确定的降解菌，根据单因素确定的菌株降解 GSLH 的较佳工艺条件对 GZTH、GHYH 和 GYBH 进行降解试验，每个试验设置三组平行试验。培养结束后，三组平行试验分别离心 (10000 r/min, 15 min)，上清液经 0.222 μm 微孔滤膜过滤，以去离子水为参比，检测降解液在 450 nm 处的吸光度，求得三组平行试验的 A450 平均值作为指标，评价降解效果。

2 结果及讨论

2.1 菌株筛选结果

图 1 是菌 - 煤匹配试验结果柱状图，其中 C 表示培养基对光 - 氧化褐煤的溶煤效果，TV、AN、SC、PC 和 CV 表示 5 种真菌 GSLH、GZTH、GHYH 和 GYBH 的降解液吸光度 A450 值。

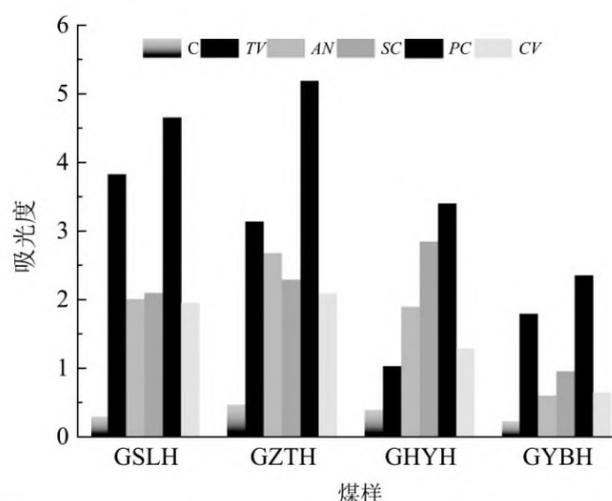


图 1 五种真菌降解四种光 - 氧化褐煤结果
Fig. 1 Results of five fungi degrading on four lignites

由图 1 可见，培养基 C 对光 - 氧化褐煤的溶解均较低，5 株真菌对 4 种光 - 氧化褐煤均有不同程度的降解。其对光 - 氧化内蒙古胜利褐煤的降解能力强弱顺序为 $PC > TV > SC > AN > CV$ ，对光 - 氧化云南昭通褐煤的降解能力强弱顺序为 $PC > TV > AN > SC > CV$ ，对光 - 氧化山西浑源褐煤的降解能力强弱顺序为 $PC > SC > AN > CV > TV$ ，对光 - 氧化内蒙元宝山褐煤的降解能力强弱顺序为 $PC > TV > SC > CV > AN$ 。由此可知，虽然 5 种真菌降解光 - 氧化褐煤能力的顺序有差别，但 5 种真菌对 4 种光 - 氧化褐煤的降解能力最强者均为黄孢原毛平革菌 (PC)。因此，将黄孢原毛平革菌 (PC) 确定为降解光 - 氧化褐煤的优势真菌菌株，用于后续试验。

2.2 单因素试验结果

(1) 加煤量

图 2 是加煤量对黄孢原毛平革菌降解光 - 氧化内蒙胜利褐煤降解效果的影响。

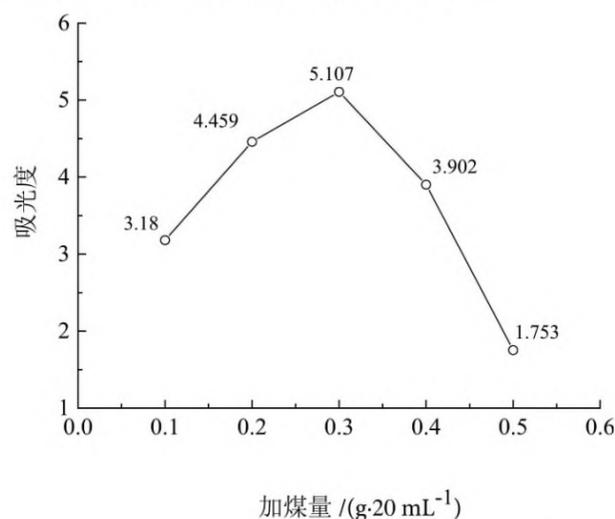


图 2 加煤量对降解液吸光度的影响

Fig. 2 Effect of coal amount on A450 of degradation liquid

由图 2 可见，随着加煤量的增加，指标 A450 值先增大后减小，当每 20 mL 培养基的加煤量为 0.3 g 时，A450 达到最大值 5.107，加煤量大于 0.3 g 后，A450 值急剧下降。原因可能是加煤量较少时，菌株分泌的降解煤活性物质与煤中的活性点充分作用后还有过剩，虽然降解率达到极大值，然而降解产物的浓度相对较低；当加煤量为 0.3 g 时，菌株生长过程中分泌的降解煤活性物质与煤中的活性点相互作用程度比较充分，降解率虽然可能未达到加煤量为 0.1 g 时的降解率，但由于二者相互作用充分，致使相同体积（这里是 20 mL）情况下的降解产物浓度较大，故而 A450 值较大；再增大加煤量，由于煤浆浓度过大会抑制菌株的生长，导致菌株生长不旺盛，分泌降解煤活性物质减少，引起 A450 值减小。因此，加煤量为 0.3 g/20 mL 为较佳加煤量。

(2) 接种量

图 3 是接种量对黄孢原毛平革菌降解光 - 氧氧化内蒙古胜利褐煤的影响。

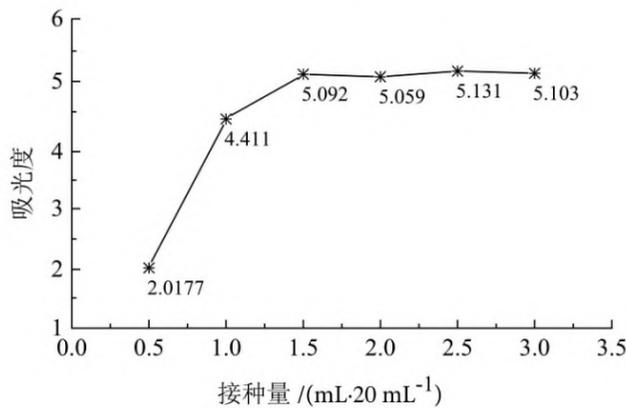


图 3 接种量对降解液吸光度的影响

Fig. 3 Effect of inoculation size on A450 of degradation liquid

由图 3 可以看出，随着接种量的增大，降解液的吸光度 A450 迅速增大，当接种量达到 1.5 mL/20 mL 时，降解液的 A450 值达到 5.092，再增大接种量，A450 值变化较小，故而将 1.5 mL/20 mL 确定为较佳接种量。

(3) 培养时间

图 4 是培养时间对黄孢原毛平革菌降解光 - 氧氧化内蒙古胜利褐煤的影响。

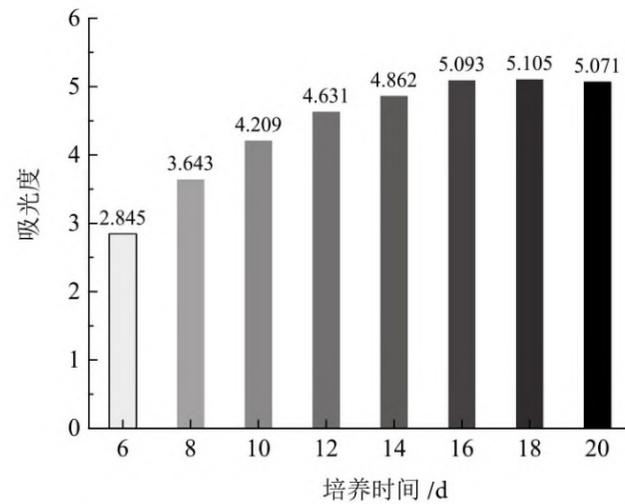


图 4 培养时间对降解液吸光度的影响

Fig. 4 Effect of incubation time on A450 of degradation liquid

由图 4 可见，随着培养时间的延长，降解液的吸光度 A450 值逐渐增大，当培养时间达到 16 d 时，降解液的 A450 值达到 5.093，再延长培养时间对降解效果的影响不大，基于降解效率的考虑，培养时间确定为 16 d。

图 5 是培养箱振荡频率对黄孢原毛平革菌降解光 - 氧氧化内蒙古胜利褐煤的影响。

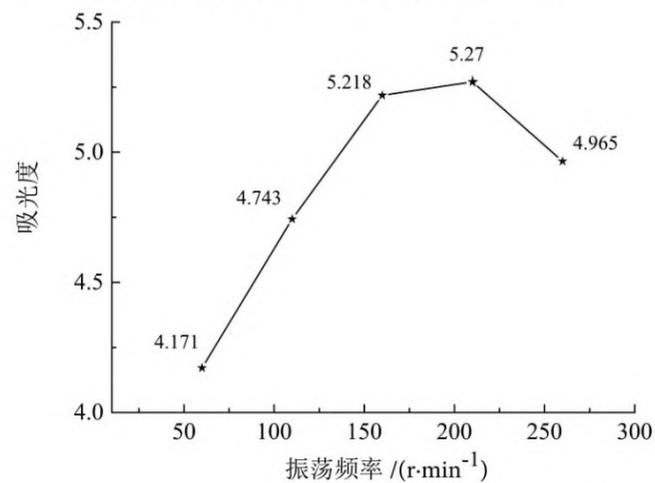


图 5 振荡频率对降解液吸光度的影响

Fig. 5 Effect of oscillation frequency on A450 of degradation liquid

由图 5 可见，随着振荡频率的增大，降解液的吸光度 A450 值先增大后减小，最大值出现在 210 r/min 频率处，降解液吸光度在此振荡频率下达到 5.270。原因可能是随着振荡频率的增大，培养基的气液界面交替越频繁，使得培养基中的氧含量相对充分，有利于黄孢菌的生长繁衍，菌能够分泌出较多的降解煤活性物质，有利于煤的降解；其次振荡频率越大，降解煤活性物质与煤中的作用点接触更充分，同样有利于煤的降解。当振荡频率过大时，虽有利于氧气的溶解及降解煤活性物质与煤中活性

作用点的充分接触,但剧烈的振荡可能导致黄孢菌生长的不适应,后者可能是主要影响因素,从而使黄孢菌产生降解煤活性物的能力降低,故振荡频率不宜过高,振荡频率 210 r/min 为宜。

2.3 优势菌降解三种褐煤效果

图 6 是按照单因素确定的较佳工艺条件,利用黄孢原毛平革菌对 GZTH、GHYH 和 GYBH 进行降解试验,所得降解液在 450 nm 处的吸光度值。

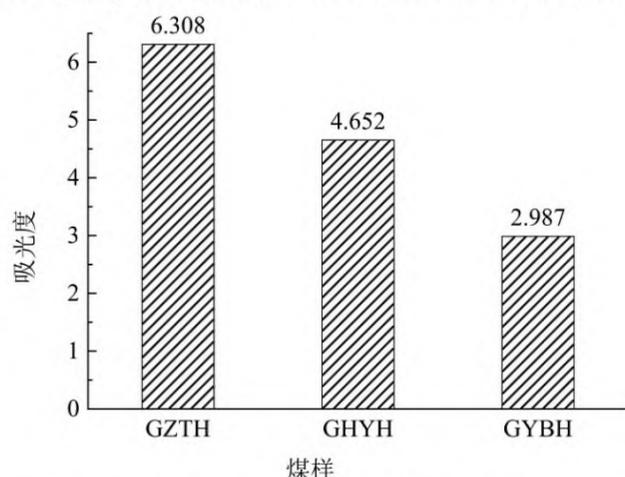


图 6 三种光 - 氧化褐煤的降解液 450 nm 吸光度值
Fig. 6 Absorbance at 450 nm of degradation liquid of three photooxidized lignites

由图 6 可见黄孢原毛平革菌在单因素确定的较佳工艺条件下,对三种光 - 氧化褐煤的降解液吸光度分别为: 6.308、4.652 和 2.987,这比菌煤匹配试验中,黄孢原毛平革菌对三种光 - 氧化褐煤的降解液吸光度均有一定程度的提高(分别为: 5.192、3.407 和 2.987)。可见,以光 - 氧化内蒙古胜利褐煤(GSLH)为样本,经过单因素试验确定的黄孢原毛平革菌降解 GSLH 的较佳条件是黄孢原毛平革菌降解 GZTH、GHYH 和 GHYH 的较佳工艺条件,具有一定程度的普适性。

3 结 论

(1) 菌 - 煤匹配试验筛选出的降解光 - 氧化褐煤的优势真菌菌株为黄孢原毛平革菌。

(2) 经单因素试验确定的黄孢原毛平革菌降解光 - 氧化内蒙胜利褐煤的较佳工艺条件为: 加煤量为 0.3 g/20 mL, 接种量为 1.5 mL/20 mL, 降解时间为 16 d, 培养箱振荡频率为 210 r/min, 煤样粒度为 $-0.15+0.075$ mm, 降解温度为 30℃。

(3) 按照单因素确定的较佳工艺条件,利用黄孢原毛平革菌对光 - 氧化云南昭通褐煤、光 -

氧化山西浑源褐煤和光 - 氧化内蒙古元宝山褐煤进行了降解试验,结果表明,降解效果均有一定程度的提升,可见该条件是这三种光 - 氧化褐煤的较优降解条件。

参考文献:

- [1] 袁红莉,杨金水,王风芹,等. 不可再生能源物质褐煤的生物可持续发展问题展望 - 微生物转化与利用研究 [J]. 世界科技研究与发展, 2002, 24: 13-18.
- [2] Yuan H L, Yang J S, Wang F Q, et al. Prospects of biological sustainable development of lignite, a non-renewable energy material: Research on microbial transformation and Utilization [J]. World Science and Technology Research and Development, 2002, 24: 13-18.
- [3] Sekhohola LM, Igbini EE, Cowan AK. Biological degradation and solubilisation of coal[J]. Biodegradation, 2012: 1-14.
- [4] Ghani MJ, Rajoka MI, Kalsoom A. Investigations in fungal solubilization of coal: mechanisms and significance[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2015, (20): 634-642.
- [5] 尹苏东,陶秀祥. 微生物溶煤研究进展 [J]. 洁净煤技术, 2005, 11(4): 34-38.
- [6] Yin S D, Tao X X. Progress in microbial lytic coal research [J]. Clean Coal Technology, 2005, 11(4): 34-38.
- [7] 李建涛,刘向荣,杨杰,等. 微生物降解低阶煤的光氧化预处理工艺条件优化 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(12): 17-20.
- [8] Li J T, Liu X R, Yang J, et al. Optimization of photooxidation pretreatment conditions for microbial degradation of low-order coal [J]. Chemical and Biological Engineering, 2019, 36(12): 17-20.
- [9] 王龙贵,张明旭,欧泽深,等. 白腐真菌对煤炭的降解转化试验 [J]. 煤炭学报, 2006, 31(2): 241-244.
- [10] Wang L G, Zhang M X, Ou Z S, et al. Degradation and transformation experiment of white rot fungus on coal [J]. Acta Coal Sinica, 2006, 31(2): 241-244.
- [11] 袁红莉,陈文新,木村真人. 褐煤风化过程中微生物群落的演替 [J]. 微生物学报, 1998, 38(6): 411-416.
- [12] Yuan H L, Chen W X, Kitamura T. Succession of microbial community during lignite weathering [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1998, 38(6): 411-416.
- [13] 李建涛,刘向荣,蔡会武,等. 实验室用旋转床光化学反应器 [P]. 中国专利: ZL201621380305.0. 2017-06-20.
- [14] Li J T, Liu X R, Cai H W, et al. Rotary bed photochemical reactor for laboratory [P]. China: ZL201621380305.0. 2017-06-20.
- [15] Gokcay CF, Kolankaya N, Dilek FB. Microbial solubilization of lignites[J]. Fuel, 2001, 80: 1421-1433.
- [16] David Y, Baylon MG, Pamidimarri SDVN, 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: 178-185.

(下转 157 页)

Application of Suspending and Vibrating Cone Concentrator to Concentration of Micro-fine Tungsten of Tieshanlong Tungsten Tailings in Jiangxi Province

Wen Xiaomao¹, Wang Jinmin¹, Tian Min²

(1. Jiangxi Tieshanlong Tungsten Co., Ltd., Ganzhou, Jiangxi, China;

2. Zhengzhou Institute of Multipurpose Utilization of Mineral Resources, Chinese Academy of Geological Sciences, Zhengzhou, Henan, China)

Abstract: At present, Tieshanlong Tungsten industry has been using the traditional process to recover tungsten resources in tungsten slime. However, the tungsten slime tailings always contains about 0.24% tungsten. In order to recover tungsten resources as much as possible and improve the efficiency, the company experimental research on tungsten resource recovery in tungsten slime tailings. Research shows that, the suspension cone concentrator is the best equipment to recover the fine-grained tungsten in the tungsten slime tailings. Under the conditions of 20% ore concentration, rough selection of cone frequency 14Hz, rotation frequency 14Hz; selected cone frequency of 16Hz, which can be obtained the Tungsten concentrate with WO_3 25.12% and 68.09% recovery rate. Based on experimental research, Tieshanlong Tungsten industry has been conducted industrial production. Trial production for one month, the process is stable and can produce tungsten concentrate with 24% WO_3 and 67% recovery rate. According to production practices, by the end of 2019, Tieshanlong tungsten industry had produced 50.54 standard tons of tungsten slime products, which creates greater economic benefits for the company.

Keywords: Suspended vibration cone concentrator; Tungsten fine mud tailings; Finely graded tungsten; Production application

////////////////////////////////////
(上接 86 页)

Screening of Fungi and Condition Optimization for Biodegradation of Photooxidized Lignite

Li Jiantao^{1,3}, Liu Xiangrong², Yang Jie², Wang Zhiyu^{1,3}

(1. College of Chemical Engineering and Modern Materials, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an, Shaanxi, China; 3. Shaanxi Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Tailings Resources, Shangluo, Shaanxi, China)

Abstract: In order to obtain high-efficiency biodegradation strain for lignite, five fungi and four photooxidized lignites were tested by fungi-coal matching experiments. The dominant strain selected was *Phanerochaete chrysosporium*, and then the single factor experiments were carried out to determine the process conditions of biodegradation of photooxidation Inner Mongolia Shengli lignite by *Phanerochaete chrysosporium*. Finally, the optimum process conditions determined were as follows: coal slurry mass concentration of 0.3 g/20 mL, inoculum size of 1.5 mL/20 mL, incubation time of 16 d, oscillation frequency of 210 r/min, coal particle size of $-0.15+0.075$ mm and incubation temperature of 30°C. According to these conditions, the degradation effects of *Phanerochaete chrysosporium* degrading GZTH, GHYH and GYBH were studied. The results showed that under the conditions, the degradation effects of *Phanerochaete chrysosporium* degrading the three lignites were all improved to some extent.

Keywords: Fungi; Lignite; Coal biodegradation; Photooxidation pretreatment