

# 微生物脱除煤炭中有机硫的研究\*

钟慧芳 李雅芹 刘国振 王永成 周慧玲

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 从任丘油田分离到两株异养型细菌 D-1-1 和 D-2-1, 经鉴定分别为门多隆假单胞菌 (*Pseudomonas mendocinas*) 和争论产碱生物型 I (*Alcaligenes paradoxus biovar 1*) 的菌株。它们可以利用二苯噻吩 (Dibenzothiophene, 简称 DBT) 作为生长的碳源, 将 DBT 转化为水溶性有机硫化物。两菌于 15 天内可以脱除煤炭中有机硫达 22.2—32.0%。

**关键词** 煤炭, 有机硫, 微生物脱硫

在煤炭能源净化利用领域中, 认为煤炭在燃烧前用微生物法脱除其中的硫化物, 较比用化学的和物理的方法具有投资少、运转成本低、能耗少, 可以专一性地除去极微细的分布于煤炭中的硫化物, 并减少环境污染等优点, 已受到各国的重视。煤炭中的硫化物主要有两大类: 一类为无机硫, 主要是黄铁矿硫和硫酸盐硫, 利用氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) 可以脱除煤炭中黄铁矿硫高达 90% 以上<sup>[1-3]</sup>。另一类为有机硫。主要为芳香族和脂肪族组分, 其中的二苯噻吩 (Dibenzothiophene, 简称 DBT) 是煤炭中含量高、较无机硫更难降解的有机硫化物之一。因此, 科学家们用 DBT 作为微生物的唯一碳源和能源, 分离到能够降解 DBT 的微生物, 以获得能够脱除煤炭中有机硫的微生物。目前认为微生物降解 DBT 有两条途径<sup>[4-11]</sup>, 即环状破坏途径<sup>[6,7]</sup>和特定硫途径<sup>[8-11]</sup>。在应用一些菌株脱除煤炭中有机硫的研究中, Chandra 等人<sup>[12]</sup>利用一种混合细菌的丰富培养物脱除有机硫 16.5—19.9%。Isbister 等人用 DBT 分离到一株假单胞菌 CB1 菌株 (*Pseudomonas* CB1), 脱除有机硫高达 18—47%, 取得可喜的进展。

本文报道脱除煤炭中有机硫菌株的分离及其对有机硫脱除的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品来源

分离菌株的五个油泥样品采自河北省任丘油田。

### 1.2 分离和鉴定

主要分离能够利用 DBT 的菌株。参考 Kpicki Yamada 等人<sup>[13]</sup>的工作, 确定培养基的成分 (g/L): DBT 5.0,  $\text{HN}_4\text{Cl}$  0.1,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.08,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.25,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1, 蒸馏水 1L, pH 7.0 (以后简称 DBT 培养基), 8 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟, 接种油泥样, 置于 30℃ 进行富集培养。

\* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 9 月 6 日收到。

菌株纯化: 用浓度为 0.6g/L 牛肉膏代替 DBT, 将 1.5% 琼脂粉加入培养基中制成平板, 划线接种挑取菌落获得纯菌株。根据《伯杰氏系统细菌学鉴定手册》第九版<sup>[14]</sup>和《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[15]</sup>进行鉴定。

### 1.3 DBT 代谢产物的测定

参考 Koicki Yamada 等人的方法<sup>[14]</sup>, 即取菌株 DBT 培养物, 用乙醚提取和硅胶柱分纯的方法, 获得代谢产物。

### 1.4 脱除煤炭中有机硫的试验

1.4.1 三个煤炭样品: 采自重庆煤田, 破碎至 200 目粒度, 样品硫成分分析结果见表 1。

表 1 煤碳样品硫的成分分析

Table 1 Analysis of sulfuric components in coal samples

样品 Samples	产地 Locality	总硫量 (%) Total sulfur	黄铁矿硫 (%) Pyritic sulfur	有机硫 (%) Organic sulfur	无机盐硫 (%) Sulfate sulfur
1	松藻 Song zao	2.40	1.85	0.50	0.05
8	怀化 Huai Hua	5.127	0.647	4.48	无 no
10	南桐 Nan Tong	2.44	0.64	1.80	无 no

1.4.2 摇瓶试验: 主要进行煤浆浓度、接种量等条件对菌株脱有机硫效果的影响, 置于 30℃ 旋转摇床上振荡培养。

### 1.5 分析方法

1.5.1 化学试剂: 购自 Fiuka AG · CH-9470 Buchs。

1.5.2 菌株生长: 用国产 721 型分光光度计测定。

1.5.3 分纯的菌株降解 DBT 代谢产物的测定: 用紫外分光光度计(美国 Beckman Du-7 spectrophotometer)测定。

1.5.4 煤炭含硫量用国产 ZCL 型自动测硫仪测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株分离与鉴定

利用 DBT 作为碳源的富集培养物呈红棕色, 混浊, 细菌丰富。这种红棕色培养液与三氯高铁反应, 呈现紫罗蓝色, 无菌对照则无此现象, 可能是菌株转化 DBT 的结果。通过单菌落分离获得四株纯菌株, 代号为 D-1-1、D-1-2、D-2-1 和 D-2-3。鉴定结果是: D-1-1 菌株为门多隆假单胞菌 (*Pseudomonas mendocinas*); D-1-2, D-2-1 和 D-2-3 均为争论产碱菌生物型 I (*Alcaligenes paradoxus* biovar I)。以下试验用菌株 D-1-1 和菌株 D-2-1。

## 2.2 菌株利用 DBT 代谢产物的测定

取两菌株分别在 DBT 培养基中生长 7—10 天的培养物, 离心除去多余的 DBT 和菌体。收集的上清液用乙醚提取, 用硅胶柱分纯, 获得黄色产物- I 和红色产物- I。在紫外分光光度计上测定结果分别见于图 1 和图 2。两图中的曲线 3 是两菌株 DBT 的培养物分别直接测定的结果。各呈现两个明显的吸收峰, 峰值在 396nm 和 478nm 及 391nm 和 477nm 区域。两菌株的产物- I 为曲线 1, 呈现的单一峰值分别与 396nm 和 391nm 的峰值相符; 产物- I 为曲线 2, 呈现的单一峰值分别与 478nm 和 477nm 相符。两种产物与氯化高铁反应试验结果见表 2。

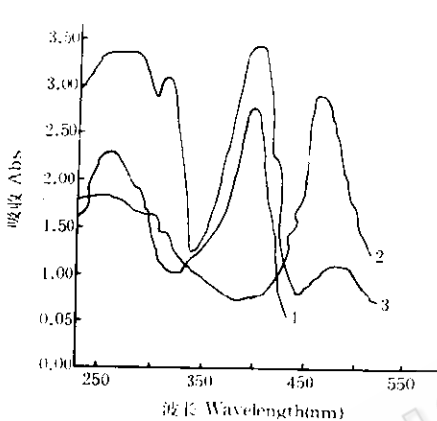


图 1 菌株 D-1-1 在 DBT 培养基中生长的培养物和产物的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of culture and products growing strain D-1-1 in DBT medium

1. 产物- I Product- I ;
2. 产物- II Product- II ;
3. DBT 培养物 DBT culture.

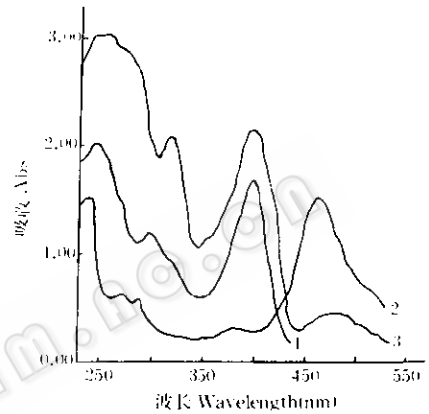


图 2 菌株 D-2-1 在 DBT 培养基中生长的培养物和产物的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of culture and products growing strain D-2-1 in DBT medium

1. 产物- I Product- I ;
2. 产物- II Product- II ;
3. DBT 培养物 DBT culture.

表 2 D-1-1 菌株转化二苯噻吩的产物分析

Table 2 Analysis of conversion products of dibenzothiophene by strain D-1-1

提纯产品 Purified product	颜色 Color	氯化高铁试验 FeCl <sub>3</sub> test	功能基 Functional group
I	黄色 Yellow	+ 紫色 Violet	酚 Phenol 烯醇 enol
II	红色 Red	+ 微红紫色 Reddish violet	酚 Phenol 烯醇 enol

产物-I 呈紫色, 产物-II 呈微红紫色, 说明产品的功能基分别属酚类和烯醇类的水溶性有机硫化物, 这是菌株转化 DBT 成水溶性有机硫化物的证据之一。该结果与日本 Yamada 等人<sup>[14]</sup>的结果相符。

为了进一步证明菌株能够转化 DBT, 用牛肉膏代替 DBT, 牛肉膏浓度 (g/L) 为: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0, 用接种环接种培养, 连续五次移种培养。结果表明, 培养液均未呈现红色或其他颜色。以不接种的 DBT 培养液和接种的牛肉膏培养液作对照, 在紫外分光光度计上测定, 均无代谢产物的特征吸收峰, 由此进一步证明由菌株 DBT 培养物得到的黄色产物-I 和红色产物-II 是菌株转化 DBT 的结果。同时发现牛肉膏可以促进菌株生长, 当牛肉膏浓度为 0.8g/L 时菌株生长 48 小时达到最佳生长状态, 即  $OD_{450}$  为 0.52—0.59, 缩短了生长时间。

### 2.3 菌株脱除煤炭中有机硫的效果

上述结果表明, 两菌可以转化 DBT 为水溶性有机硫化物, 而 DBT 是煤炭中有机硫的主要组分之一, 因此以煤炭样 No. 1、No. 8 和 No. 10 代替化学试剂 DBT, 观察菌株能否脱除煤炭中有机硫。在脱除硫试验中所用的营养液均添加 0.6g/L 牛肉膏。

**2.3.1 不同矿浆浓度对菌株脱除煤炭中有机硫的影响:** 煤炭浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25% 和 30%, 接种量 10%。浸出 12 天的结果见图 3。两菌脱除有机硫的效果均以 5% 煤浆浓度较好, 10% 煤浆浓度稍差, 而煤浆浓度越高则效果越差。两菌株对煤炭样 No. 1、No. 8 和 No. 10 的脱除有机硫效果: 菌株 D-1-1 分别为 18.0%、21.14% 和 17.7%; 菌株 D-2-1 分别为 12.0%、16.22% 和 15.0%。

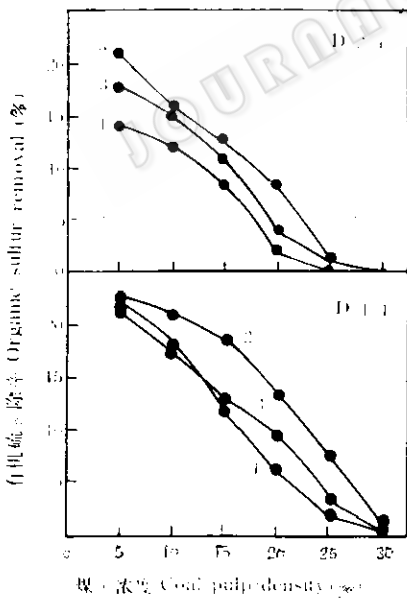


图3 煤浆浓度对菌株 D-1-1 和 D-2-1 脱除煤炭中有机硫的影响

Fig. 3 Effect of coal pulp density on the removal of organic sulfur from coal by strains D-1-1 and D-2-1

1. 煤炭样 Coal sample No. 1;
2. 煤炭样 Coal sample No. 8;
3. 煤炭样 Coal sample No. 10.

**2.3.2 不同接种量对菌株脱除煤炭中有机硫的影响:** 试验用煤浆浓度 10%, 浸出 12 天的结果见图 4。图 4 表明, 最佳接种量为 20%。两菌株对三个煤炭样的有机硫脱除率: 菌

株 D-1-1 分别为 16.0%、21.58% 和 17.78%；菌株 D-2-1 分别为 12.0%、19.58% 和 15.33%。

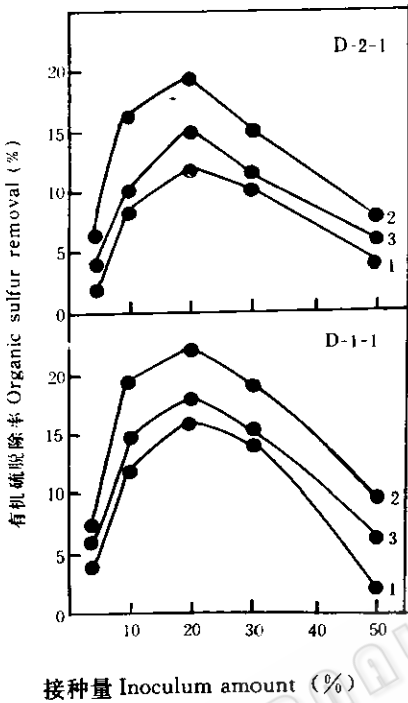


图 4 接种量对菌株 D-1-1 和 D-2-1 脱除煤炭中有机硫的影响

Fig. 4 Effect of inoculum amount on the removal of organic sulfur from coal by strains D-1-1 and D-2-1

- 1. 煤炭样 Coal sample No. 1;
- 2. 煤炭样 Coal sample No. 8;
- 3. 煤炭样 Coal sample No. 10.

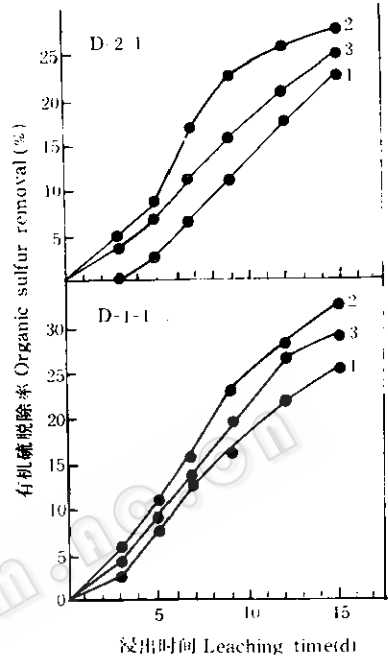


图 5 菌株 D-1-1 和 D-2-1 在最佳条件下脱除煤炭中有机硫的效果

Fig. 5 Effect of the removal of organic sulfur from coal by strains D-1-1 and D-2-1 at optimal condition

- 1. No. 1 煤炭样 Coal sample ;
- 2. No. 8 煤炭样 Coal sample ;
- 3. No. 10 煤炭样 Coal sample .

2.3.3 菌株在最佳条件下脱有机硫的效果：采用上述最佳条件，即添加牛肉膏浓度 0.8g/L，接种量 20%，最终煤浆浓度 10%，pH7.0，浸出 15 天的结果见图 5。两菌株对煤炭样 No. 1、No. 8 和 No. 10 的脱有机硫效果如下：菌株 D-1-1 分别为 25.5%、32.0% 和 28.8%；菌株 D-2-1 分别为 22.2%、27.5% 和 24.9%。

从上述结果看出，两菌株具有脱除煤炭中有机硫的能力，与 Isbister 等人<sup>[8]</sup>用菌株 CB1 有机硫脱除率 18—47% 接近。这是我国首次应用异养微生物脱除煤炭中有机硫研究的良好开端，为今后开发更有效的脱除有机硫的微生物提供了借鉴，对于煤炭能源的开

发利用和消除环境污染有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Kargi F. *Trend in Biotechnol*, 1986, 4 (11): 239—297.
- [2] Couh G R. *Biotechnology and Coal*. London: IEA Coal Research, 1987. 24—38.
- [3] Zhong Huifang, Li Yaqin. *Journal of Environmental Sciences*, 1993, 5 (1): 83—89.
- [4] Hou C T, Laskin A I. *Dev Ind Microbiol*, 1976, 17: 351—363.
- [5] Kargi F. *Adv Biotechnol Processes*, 1984, 3: 341.
- [6] Kodama K, Umehara K, Shimzu K *et al*, *Agric Biol Chem*, 1973, 37 (1): 45—50.
- [7] Afferden M Van, Schacht S, Klein J *et al*. *Arch Microbiol*, 1990, 153: 324—328.
- [8] Isbister J D, Kobylinski E A. *Microbial Desulfurization of Coal*. In: Attia Y A ed. *Processing and Utilization of High Sulfur Coal*, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. Elsevier, 1985. 627—641.
- [9] Kilbane J J, Bielaga B A: *Chemtech*, 1990, 20: 747—751.
- [10] Cmori T, Monna L, Saiki Y *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 911—915.
- [11] Gallagher J R, Olson E S, Stanley D C. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 107: 31—36.
- [12] Chandra D, Roy P, Mishra A K *et al*. *Fuel*, 1979, 58: 549—550.
- [13] Yamada K, Minoda Y, Kodama K *et al*. *Agric Biol Chem*, 1968, 32 (7): 840—845.
- [14] Krieg N R, Helt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 Baltimore, Williams and Wilkins Co. 1984.
- [15] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1984. 111—187.

## MICROBIAL REMOVAL OF ORGANIC SULFUR FROM COAL

Zhong Huifang Li Yaqin Liu Guozhen

Wang Yongcheng Zhou Huiling

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

**Abstract** Two strains of heterotrophic bacteria, D-1-1 and D-2-1, was isolated from Ren Qiu Oil Field (China) and identified as *Pseudomonas menaococcos* and *Alcaligenes paradoxus* biovar I, respectively. These strains are able to utilize Dibenzothiophene (DBT) as the carbon source for growth, and convert DBT into water-soluble organic compounds containing sulfur. They can remove 22.2—32.0% of the organic sulfur from coal samples for 15 days.

**Key words** Coal, Organic sulfur, Microbial desulfurization