

## 褐煤风化过程中微生物群落的演替\*

袁红莉 陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

木村真人

(日本名古屋大学农学部 名古屋)

**摘要** 对采自辽宁省前屯煤矿的6种不同风化程度的褐煤样品进行扫描电子显微镜观察发现:刚采掘出来的褐煤表面几乎没有微生物存在。经5个月、1年及4年堆积风化的褐煤中也只见到休眠孢子和少量菌丝。将褐煤样品在潮湿状态下培养10天后,扫描电镜观察发现:刚采出来的褐煤及经5个月风化的褐煤表面有大量放线菌生长,而且菌落周围有褐煤被降解迹象。经1年风化的褐煤中除有大量放线菌及细菌生长外,真菌也有所增加。而在经4年风化褐煤中主要是真菌明显增加。平板计数结果同样说明褐煤风化过程中微生物存在演替现象:放线菌为褐煤初期降解的主要微生物,随后是细菌,在风化程度较高的褐煤中,真菌则为优势降解菌。三株优势放线菌为诺卡氏菌(*Nocardia* sp.),束丝放线菌(*Actinosynnema* sp.)和链霉菌(*Streptomyces* sp.)。两株优势细菌均为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)。两株曲霉为栖土曲霉(*A. terricola*)及赭曲霉(*A. ochraceous*),为褐煤风化过程的优势真菌。

**关键词** 褐煤, 风化, 微生物, 演替

**分类号** Q938

煤是我们的主要燃料之一,但煤的直接利用伴随许多环境问题,尤其是一些结构简单的煤如褐煤。近年来煤的加工如脱硫、脱氮、去灰分,尤其是煤的液化愈来愈受到重视。自1982年美国科学家Cohen和Gabriele首次报道了两株担子菌能将褐煤转化为黑色液体这一现象<sup>[1]</sup>开始,世界上许多科学工作者开始探索用微生物来降解煤,以便更有效地利用煤资源,已相继从经多年风化的煤中以及堆放煤的环境中分离出一系列能降解煤的微生物:如细菌中的芽孢杆菌、假单胞杆菌及节杆菌属的一些种;真菌中的青霉、曲霉、毛霉及许多担子菌;放线菌中的链霉菌等。微生物降解煤的机制目前主要报道有两种:一是微生物分泌胞外酶<sup>[2,3]</sup>,另一种是微生物产生碱性物质提高培养基的pH<sup>[4]</sup>。虽然在机制问题上还存在争议,但这些工作说明微生物可以降解煤。虽然细菌、放线菌以及真菌中的一些种已从煤或煤环境中分离出来,但这些不同的微生物种类是不同研究者从不同地方、不同风化程度的煤中所分离出来的。为了搞清楚褐煤风化过程中微生物的区系特征,我们用扫描电子显微镜直接观察方法及平板计数法对采自辽宁省前屯煤矿的六种不同风化程度褐煤中

\*国家自然科学基金资助项目(项目编号39370028)。

收稿日期:1996-07-16

微生物的种类及数量首次进行了研究,并分离、鉴定了优势微生物种类。

## 1 材料和方法

### 1.1 褐煤样品

6种不同风化程度的褐煤样品均于1993年6月采自辽宁省前屯煤矿。分别为:(a)刚采出来的褐煤(刚采出), (b)采出堆放5个月的褐煤(5个月), (c)采出堆放1年的褐煤(1年), (d)采出堆放4年的褐煤(4年)。将褐煤过筛,4℃保存。本研究中采用小于4mm样品作分析。

### 1.2 褐煤中微生物的培养

少量各褐煤样品分别放入一个放有灭菌滤纸片的灭菌培养皿内,加少量蒸馏水以保持水分,30℃培养10d。

### 1.3 扫描电子显微镜观察褐煤表面微生物特征

经10d培养及未经培养的褐煤样品(原褐煤)用双面胶带固定于金属座上。先用2% glutaraldehyde在0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.4)中固定2h(4℃),再用1% Osmium tetroxide固定2h(4℃)。用酒精脱水后,进行临界点干燥(日立,HCP-1, Tokyo, Japan),喷金,最后用JEOL JSM-720扫描电子显微镜在20kV电压下进行观察。

### 1.4 褐煤中微生物计数

1g原褐煤及经加蒸馏水培养10d的褐煤样品在灭菌的研钵中与少许洗净、灭菌的石英砂混和,充分研磨后悬浮于100ml灭菌生理盐水中(0.85%)得 $10^{-2}$ 稀释液,再依次稀释成 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 及 $10^{-6}$ 稀释液。取相应浓度稀释液接种以下二种培养基平板:(a)10倍稀释的牛肉汁、蛋白胨培养基用来分离总细菌和放线菌,30℃培养10d。(b)马丁氏培养基用来分离总真菌数,28℃培养7d。

### 1.5 优势微生物鉴定

对培养基(a)和(b)上生长的菌落进行计数后,挑取优势菌落进行纯化、鉴定。细菌鉴定系在形态观察及生理生化特性基础上,对其辅酶类型及细胞壁中脂肪酸组分及含量进行化学分析<sup>[5,6]</sup>。放线菌除进行形态观察外,对其细胞壁中氨基酸及主要糖类型进行化学分析<sup>[5,7]</sup>。真菌主要是用电子显微镜观察其分生孢子、分子孢子梗形状及菌落形状,颜色。

## 2 结果和讨论

### 2.1 扫描电子显微镜观察结果

刚采出来的褐煤:表面几乎观察不到微生物存在。经加水培养10天后,可观察到大量细菌和放线菌生长,而且在这些菌的周围有褐煤被降解的迹象(图1)。培养前后均观察不到真菌菌丝。经5个月堆积风化的褐煤:培养前,可看到有细菌、放线菌孢子及少量真菌菌丝。经加水培养10天后,放线菌菌丝明显增加(图2),细菌也有所增加,真菌增加不明显。经1年堆积风化褐煤:培养前只观察到少量细菌,放线菌孢子及真菌孢子和菌丝。经加水培养10天后,放线菌和细菌明显增加(图3)。真菌菌丝也有少量增加。经4年堆积风化褐煤:培养前只能观察到少量较短的真菌菌丝,细菌及放线菌存在。经加水培养10天后,真菌菌丝的数量及长度都明显增加,而细菌和放线菌数量与经5个月及1年堆放的样品中数

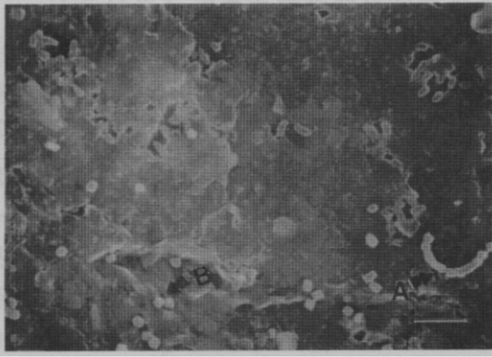


图1 刚采出来的褐煤样品经加水培养10天后生长的细菌及放线菌(图中比例尺为5μm)

Fig.1 Bacteria(B) and actinomycetes(A) on lignite samples just excavated after 10d incubation (Bar=5μm)

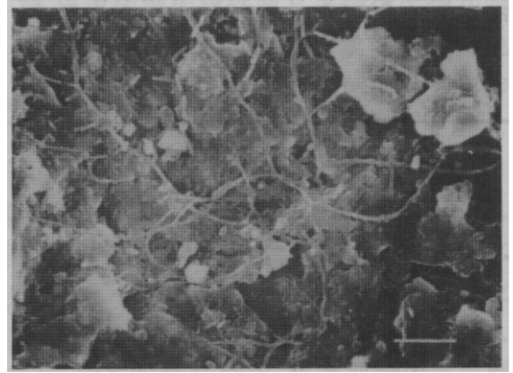


图2 风化5个月的褐煤样品加水培养10天后生长的放线菌(图中比例尺为10μm)

Fig.2 Actinomycete hyphae on lignite samples excavated 5 months before sampling after 10d incubation (Bar=10μm)



图3 风化1年的褐煤样品加水培养10天后生长的细菌和放线菌(图中比例尺为5μm)

Fig.3 Bacteria (B) and actinomycetes (A) on lignite samples excavated 1 year before sampling after 10d incubation (Bar=5μm)



图4 风化4年的褐煤样品加水培养10天后生长的真菌菌丝(图中比例尺为5μm)

Fig.4 Fungal hyphae on lignite samples excavated 4 years before sampling after 10d incubation (Bar=5μm)

量相比增加不是很明显(图4)。这些结果说明在褐煤风化过程中均存在放线菌、细菌及真菌,它们在分解褐煤中起重要作用。但放线菌和细菌在褐煤风化的最初阶段起作用大,而真菌则为风化程度较高的褐煤中的作用菌。

### 2.2 平板计数结果

为进一步从数量上对各类群菌进行考查,在10倍稀释牛肉汁、蛋白胨及马丁氏培养基上计算细菌、放线菌、真菌数目,结果如表1。总的来说褐煤中细菌、放线菌及真菌数量随褐煤风化程度增高呈增加趋势。刚采出来的褐煤样品中的各种微生物数量都较小,经5个月堆积风化后,放线菌数量明显增大,放线菌与细菌数目的比也明显增大(从0.075增至0.52)。随风化程度的进一步加大,放线菌与细菌的数量比反而逐渐减小。随褐煤风化程度加深,真菌数量及真菌与细菌的数量比都呈增大趋势。经4年堆积的褐煤中的真菌数量

明显高于其他样品中的真菌数量。

表1 褐煤中微生物数量及比率\*

Table 1 Numbers (CFU/g) and ratios of microorganisms in different lignites

样品 Sample	细菌 Bacteria(B)	放线菌 Actinomycetes (A)		真菌 Fungi (F)	
		数量 Number	与细菌比 A/B(%)	数量 Number	与细菌比 F/B(%)
刚采出 Just excavated	$1.6 \times 10^5$	$1.2 \times 10^4$	0.075	$< 10^2$	—
5个月 Excavated 5 months	$2.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	0.52	$1.2 \times 10^2$	0.057
1年 Excavated 1 year	$3.2 \times 10^6$	$2.4 \times 10^5$	0.075	$1.6 \times 10^3$	0.050
4年 Excavated 4 years	$2.4 \times 10^6$	$1.6 \times 10^5$	0.066	$4.5 \times 10^4$	1.9

\* 表中数值为三次计数平均值。

Each value is the mean of 3 replicates.

考虑到各堆放阶段煤的水含量不大,可能影响各类微生物的正常发育,因此对各样品加水培养 10d,再行计数,也可看出微生物利用煤作营养的增殖情况。各种不同堆放时期的褐煤经加水培养 10d 后所测得的微生物数量如表 2 所示。比较表 1 及表 2 可以看出:各个样品经加水培养 10d 后,细菌、放线菌及真菌数量都增大。且三种类型微生物在不同风化程度的褐煤中增加趋势不同。在刚采出来及经 5 个月风化褐煤中放线菌和细菌数量明显增加,特别是放线菌,在刚采出来的样品中增大 283 倍,在经 5 个月风化的样品中增加

表2 褐煤经培养10d后微生物数量及增加倍数

Table 2 Microbial numbers (CFU/g) after incubation and ratios of microbial numbers before and after incubation in different lignites

样品 Sample	细菌 Bacteria(B)		放线菌 Actinomycetes (A)			真菌 Fungi (F)		
	数量 Number	增大倍数*	数量 Number	增大倍数 Ratio	与细菌比 A/B(%)	数量 Number	增大倍数 Ratio	与细菌比 F/B(%)
刚采出 Just excavated	$2.0 \times 10^7$	125	$3.4 \times 10^6$	283	0.17	$3.3 \times 10^2$	—	0.002
5个月 Excavated 5 months	$2.7 \times 10^6$	13	$3.4 \times 10^6$	31	1.26	$1.0 \times 10^3$	8.3	0.037
1年 Excavated 1 year	$4.2 \times 10^6$	1.3	$2.0 \times 10^5$	0.83	0.048	$1.1 \times 10^4$	6.8	0.26
4年 Excavated 4 years	$3.4 \times 10^6$	1.4	$2.6 \times 10^5$	1.6	0.076	$3.2 \times 10^5$	7.1	9.4

\* 培养10天后微生物数量与培养前数量的比。

Ratios of microbial numbers after a 10-day incubation compared to those before incubation.

31 倍。放线菌与细菌的数量比在刚采出来褐煤中从 0.075 增至 0.17,在经 5 个月风化褐煤中从 0.52 增至 1.26。经 10 天培养后,各个样品中真菌数量也增大。但在刚采出来及经 5 个月堆放的褐煤中真菌数量的增大量明显少于放线菌及细菌。真菌与细菌的数量比也依然很小。在经 4 年堆放的褐煤中,真菌数量明显高于其他样品,真菌与细菌数量之比也大大增加了。

这些结果与扫描电镜观察所得结论基本一致:褐煤的微生物降解是多种微生物共同作用的复杂过程,在不同的分解阶段起作用的主要微生物类群不同。几个实验结果都说明:放线菌是褐煤降解初期的主要微生物,随之是细菌,而真菌则在褐煤降解的后期起作用。

### 2.3 褐煤中优势微生物的分离、鉴定

从菌落形态可以看出,褐煤中微生物种类比较单一,而且不同样品中优势菌落不同。从菌落形态及颜色上观察,优势细菌主要有三类。它们在不同堆放时期褐煤中所占的比例如表3所示。 $B_1$ 类型主要存在于刚采出来的及风化5个月的褐煤中, $B_2$ 类型主要在风化1年及4年褐煤中占优势, $B_3$ 则主要存在于风化4年的褐煤中,风化1年的褐煤中也不少。对各种类型细菌进行纯化、鉴定,结果表明:除形态、生理生化特性外, $B_1$ 类型菌所含的醌类是MK-8( $H_4$ ),细胞壁类型是IV型,即含有meso-型二氨基庚二酸,含有阿拉伯糖及半乳糖,不含木糖,含枝菌酸。 $B_2$ 及 $B_3$ 类型细菌所含醌类主要为MK-9( $H_2$ ),细胞壁中含赖氨酸,脂肪酸组成主要为异甲基分枝型,反甲基分枝型及直链饱和型。根据《伯杰氏细菌系统学手册》所描述特征,将 $B_1$ 定为诺卡氏菌(*Nocardia* sp.)<sup>[10]</sup>, $B_2$ 和 $B_3$ 均定为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)<sup>[9]</sup>。从各个样品分离到的放线菌非常单一,两种优势放线菌在各个样品中总和达到95%以上。其中一种白色菌落的( $A_1$ )在刚采出来及经5个月风化的褐煤中占优势,而另一种灰色菌落的( $A_2$ )在风化4年的褐煤中占优势,分化1年的褐煤中两种菌都很多。对两种放线菌细胞壁中氨基酸及糖类分析表明: $A_1$ 细胞壁属III型,二氨基庚二酸为meso型; $A_2$ 细胞壁为I型,二氨基庚二酸为LL型。它们均不含阿拉伯糖、半乳糖及木糖。 $A_1$ 气生菌丝上产生的孢子在水环境中具有游动性。结合形态特征,将 $A_1$ 定为束丝放线菌(*Actinosynnema* sp.), $A_2$ 定为链霉菌(*Streptomyces* sp.)<sup>[8]</sup>。

表3 优势细菌在不同褐煤中的出现频率(%)

Table 3 Occurrence and frequency (%) of the three dominant kinds of bacteria in different lignites

菌落类型 Colony type	刚采出的样品 Samples just excavated	采出5个月的样品 Samples excavated 5 months	采出1年的样品 Samples excavated 1 year	采出4年的样品 Samples excavated 4 years
$B_1$	50~75	75~80	<5	<1
$B_2$	5~10	5~10	55~65	40~50
$B_3$	<5	<5	10~15	15~20

根据菌落、分子孢子头及分生孢子梗特征,将在1年堆积风化褐煤中占优势的真菌定为栖土曲霉(*Aspergillus terricola*);在4年堆积风化褐煤中占优势的真菌定为赭曲霉(*Aspergillus ochraceous*)。

研究中所分离、鉴定的微生物都能在以褐煤为唯一底物的纯净琼脂培养基上生长,说明它们是真正的褐煤降解菌。

本研究首次揭示了褐煤风化过程中不同微生物类群存在明显的演替现象: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;并分离、鉴定了褐煤风化过程的优势放线菌、细菌及真菌。这为进一步研究利用微生物降解褐煤打下重要基础。

## 参 考 文 献

- [1] Cohen M S, Gabriele P D. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**:23~27.
- [2] Pyne J W, Stewart D L, Fredrickson J *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**:2844~2848.
- [3] Scott C D, Lewis S N. *Appl Biochem Biotechnol*, 1988, **18**:403~412.
- [4] Quigley D K, Ward B, Crawford D L *et al.* *Appl Biochem Biotechnol*, 1989, **20 / 21**:753~763.
- [5] 驹形和男. 微生物的化学分类实验法. 东京:学会出版中心,1993. 143~172
- [6] Ikemoto S, Kuraishi H, Komagata K *et al.* *J Gen Appl Microbiol*, 1978, **24**:199~213.
- [7] 日本放线菌学会. 放线菌鉴定方法. 东京:学会出版中心,1985.
- [8] Williams S T, Sharp M E, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 4*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1989. 2350~2560.
- [9] Jones D, Collins M D. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1986. 1286~1298.
- [10] Goodfellow M, Lechevalier M P. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 4*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1989. 2430~2533.

## MICROBIAL SUCCESSION ON LIGNITE ALONG WITH WEATHERING

Yuan Hongli Chen Wenxin

(Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Makoto Kimura

(School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya Japan)

**Abstract** Six different weathered lignite samples were examined by scanning electron microscopy. Few microorganisms were observed on lignite just excavated and only spores and short hyphae were observed on lignite samples excavated 5 months, 1 year and 4 years before sampling. When lignite samples were moistened with distilled water and incubated for 10 days, actinomycetes proliferated significantly on lignite samples that were just excavated or excavated 5 months before sampling. The growth of bacteria was observed on lignite samples excavated 1 year before sampling. Fungi increased in length and in number on lignite samples excavated 4 years before sampling. These findings of microbial succession on lignite samples along with weathering were consistent with results of the plate count method; actinomycetes are the first colonizers, then bacteria and fungi are the last degrader. The dominant microorganisms were *Actinosynnema* sp., *Streptomyces* sp. and *Nocardia* sp. among actinomycetes, two *Arthrobacter* sp. among bacteria and two *Aspergillus* sp. among fungi.

**Key words** Lignite, Weathering, Microorganism Succession