

国家自然科学基金(编号 50344037) ;

教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号 20020290006) 资助项目

安徽省教育厅自然科学基金(编号 2005kj010)

微生物脱除煤炭中的黄铁矿硫

Microbe Get Rid of Pyrite Sulfur from Coal

张东晨 著

合肥工业大学出版社

内 容 提 要

本书系统地论述了煤炭生物脱硫的微生物学基本知识和微生物脱除煤中黄铁矿硫的研究方法。书中通过选择相同类型、不同生长环境下微生物（煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌）以及不同类型的微生物（草分枝杆菌）作为脱硫菌，采用生物浸出和生物选择性絮凝，对微生物脱除煤炭中黄铁矿硫进行了研究。

在对脱硫微生物的生物学研究中，将磁化技术用于煤炭脱硫菌种的研究，探讨了磁化与非磁化培育对脱硫菌生长的作用及影响。书中在脱硫菌种的分子生物学方面进行了一些探索性研究。研究中应用多种现代表面分析技术，如 XRD、SEM/TEM 及 FTIR 等，对细菌和氧化剂分别在煤与黄铁矿表面的作用进行分析研究，并对煤中黄铁矿的微生物脱硫机理及煤炭微生物脱硫的工艺实践等进行了深入的分析论述。

本书可供矿物加工、资源环境及矿物生物工程等专业的本科生、硕士生和有关科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物脱除煤炭中的黄铁矿硫/张东晨著. —合肥:合肥工业大学出版社, 2005. 6

ISBN 7-81093-272-1

I. 微... II. 张... III. 煤炭—脱硫—技术 IV. X701.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 062877 号

微生物脱除煤炭中的黄铁矿硫

张东晨 著

责任编辑 陆向军

出 版 合肥工业大学出版社
地 址 合肥市屯溪路 193 号
邮 编 230009
电 话 总编室 0551-2903038
 发行部 0551-2903198
版 次 2005 年 7 月第 1 版
印 次 2005 年 7 月第 1 次印刷

开 本 787×1092 1/16
印 张 10.5
字 数 255 千字
发 行 全国新华书店
印 刷 中国科学技术大学印刷厂
网 址 www.hfutpress.com.cn
E-mail press@hfutpress.com.cn

ISBN 7-81093-272-1/X·4

定价 25.00 元

如果有影响阅读的印装质量问题,请与出版社发行部联系调换

科技創新，
把煤炭
能源。成為
潔淨

陳清如
二〇〇五年
六月
徐州

陳清如 中國工程院院士

序

煤炭是我国分布最广、储量最多的能源资源，我国是世界上最大的煤炭生产和消费国，煤炭在今后相当长的时期内将是我国能源的主体。

我国煤炭中高硫煤的储量较多，其中黄铁矿硫是煤中硫分的主要组成部分，高硫煤燃烧所产生的 SO_2 等排放物是导致大气污染和酸雨的主要原因。因此，大力发展洁净煤技术，减少 SO_2 等污染物的排放量，促进能源与环境的可持续、协调发展，已成为我国以煤炭为主的能源生产和消费结构下解决环境问题的一个必然选择。

煤炭生物脱硫是应用于煤炭工业的一项生物工程新技术，它以能耗小、成本低、污染小等优点，受到世界各国的普遍重视，目前已成为国内外煤炭脱硫研究开发的重点。

微生物脱除煤炭中的黄铁矿硫一书，通过选择煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌以及草分枝杆菌作为脱硫菌，采用生物浸出和生物选择性絮凝对微生物脱除煤炭中黄铁矿硫进行研究。将磁化技术用于煤炭脱硫菌种的研究，探讨了磁化与非磁化培育对脱硫菌生长的作用及影响。并在脱硫菌种的分子生物学等方面进行一些有益的探索性研究。在研究过程中应用先进的 XDR、SEM/TEM 及 FTIR 等表面分析技术对煤与黄铁矿表面的细菌和氧化剂的作用等进行了深入的研究，得到了很多有价值的认识和研究结论。

张东晨博士多年从事矿物加工和洁净煤技术的研究。近年来主要是对煤炭生物脱硫这一新型交叉学科中具有前瞻性的研究课题进行研究。这本书具有较强的系统性，并具有多项创新性的研究成果。相信该书的出版必将会推动煤炭生物脱硫理论和实践的研究更深入地进行，并推动我国洁净煤技术的更快发展。

张东晨博士学风严谨、勤奋努力、刻苦钻研。祝愿张东晨博士的研究不断深入，在煤炭生物脱硫的研究领域取得新的、更大的成就。

安徽理工大学副校长、教授、博士生导师：张明旭

2005 年 4 月 20 日

前 言

煤炭是我国最主要的能源，煤炭脱硫是我国国民经济发展中一个亟待解决的重要研究课题。把生物技术用于煤炭脱硫的研究，则是近年来迅速发展起来的一门新型交叉学科——矿业生物工程技术中的一项具有前瞻性的研究。

本书系统地论述了煤炭生物脱硫的微生物学基本知识和微生物脱除煤中黄铁矿硫的研究方法。书中首次通过选择相同类型、不同生长环境下微生物（煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌 *T. f* 菌）以及不同类型的微生物（草分枝杆菌 *M. phlei* 菌）作为脱硫菌，采用生物浸出和生物选择性絮凝，对微生物脱除煤炭中黄铁矿硫进行了研究。

在对脱硫微生物的生物学研究中，本书首次将磁化技术用于煤炭脱硫菌种的研究，探讨了磁化与非磁化培育对矿质化学营养脱硫菌生长的作用及影响。研究表明：磁化作用对矿质化学营养脱硫菌的生长具有促进作用。书中还在脱硫菌种的分子生物学方面进行了一些探索性研究，证实并得出了一些有价值的结论。研究中应用了多种现代表面分析技术，如 XRD、SEM/TEM 及 FTIR 等，对细菌和氧化剂分别在煤与黄铁矿表面的作用进行分析研究，这对进一步研究生物脱硫乃至化学生物联合脱硫等具有一定的参考价值。书中还对煤中黄铁矿的微生物脱硫机理及煤炭微生物脱硫的工艺实践等进行了分析和论述。

由于笔者水平有限，书中的疏漏与谬误之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

作 者

2005 年 4 月

目 录

1 绪论

1.1 煤炭中硫的赋存形态及我国煤炭中硫的分布状况	1
1.2 煤炭脱硫的意义与方法	2
1.2.1 煤炭在我国中的地位及煤炭脱硫的意义	2
1.2.2 煤炭脱硫技术的分类及煤炭生物脱硫的特点	4
1.3 煤炭微生物脱硫的基本方法及特点	5
1.3.1 生物浸出法	5
1.3.2 生物表面氧化处理法	5
1.3.3 生物选择性絮凝法	6
1.4 国内外煤炭微生物脱硫技术的研究现状与进展	6
1.4.1 国外煤炭生物脱硫研究现状	6
1.4.2 国内煤炭生物脱硫研究现状	7
1.5 微生物脱煤中黄铁矿硫的依据及意义	8
1.5.1 煤炭微生物脱硫存在的主要问题	8
1.5.2 微生物脱煤中黄铁矿硫的依据及意义	8
1.6 微生物脱煤中黄铁矿硫的主要研究内容及创新点	10
1.6.1 主要研究内容	10
1.6.2 主要特点与创新之处	10

2 煤炭生物脱硫的微生物学基础

2.1 微生物的分类和命名	11
2.2 微生物的特点	12
2.3 微生物的形态大小和结构功能	12
2.3.1 细菌的个体形态	13
2.3.2 细菌的大小	13
2.3.3 细菌的细胞结构	14
2.3.4 细菌的培养特征	18
2.3.5 细菌的物理化学性质	20
2.4 微生物的营养与产能代谢	22
2.4.1 微生物的营养	22
2.4.2 微生物的培养基	27
2.4.3 营养物质进入微生物细胞的方式	28
2.4.4 微生物的产能代谢	29
2.5 微生物的生长	31

2.5.1	微生物的生长繁殖	31
2.5.2	微生物的生存因子	33
2.5.3	其他对微生物不利的环境因子	37
2.6	煤炭脱硫微生物	41
3	煤炭生物脱硫试验材料、研究方法 & 主要仪器设备	
3.1	试验材料	44
3.1.1	试验用煤样的类型及主要煤质特征	44
3.1.2	试验用菌种的类型及主要生物特征	44
3.2	试样的准备与分析方法	45
3.2.1	试样准备及粒度分析	45
3.2.2	煤样中全硫及形态硫的分析测定	46
3.2.3	煤样中黄铁矿 FeS_2 赋存状态的显微分析	47
3.3	脱硫微生物的培养与检测方法	48
3.3.1	脱硫微生物培养、分离纯化及扩大培养方法	48
3.3.2	脱硫微生物基本生物特性的研究方法	48
3.3.3	脱硫微生物磁化培育的研究方法	50
3.3.4	脱硫微生物分子生物学研究方法	51
3.4	黄铁矿及煤表面氧化剂和细菌氧化的研究方法	52
3.4.1	扫描电镜法 (SEM) / 透射电镜法 (TEM)	52
3.4.2	X 射线衍射法 (XRD)	52
3.4.3	傅里叶变换红外光谱法 (FTIR)	53
3.5	煤炭微生物脱硫的研究方法	54
3.5.1	微生物浸出脱硫的研究方法	54
3.5.2	浸出脱硫效果的预测方法	54
3.5.3	微生物选择性絮凝脱硫的方法	56
3.6	试验仪器及设备	57
3.6.1	煤与黄铁矿试样粒度及成分分析测试设备	57
3.6.2	煤与黄铁矿试样表面形貌与成分分析设备	57
3.6.3	微生物培养与分析检测设备	58
3.6.4	脱硫微生物分子生物学试验设备	58
4	脱硫微生物的培养及其生物学特性研究	
4.1	脱硫微生物菌种的培养基	59
4.1.1	培养基配制的原则及主要类型	59
4.1.2	脱硫微生物培养基的组成	60
4.2	氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 的生物学研究	60
4.2.1	氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 菌种的分离纯化与扩大培养	60
4.2.2	氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 菌落特征及菌体形态学研究	62

4.2.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 培养中沉淀产物的 XRD 分析	63
4.3 草分枝杆菌 (M. phlei) 的生物学研究	64
4.3.1 草分枝杆菌 (M. phlei) 的活化与培养	64
4.3.2 草分枝杆菌 (M. phlei) 菌落特征及菌体形态学研究	65
4.3.3 草分枝杆菌 (M. phlei) 的红外光谱 (FTIR) 分析	66
5 微生物的遗传变异与脱硫菌种的选育改良	
5.1 微生物的遗传变异	68
5.1.1 遗传变异的物质基础	68
5.1.2 微生物的变异	70
5.2 脱硫微生物菌种选育的遗传学原理	71
5.2.1 酶的组成及其催化特性	71
5.2.2 硫杆菌属氧化无机硫的生化途径	72
5.2.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对黄铁矿 (FeS_2) 氧化的生化机制	73
5.2.4 脱硫微生物基因变异与育种	73
5.3 脱硫微生物菌种的遗传改良	74
5.3.1 脱硫菌遗传学育种方法	74
5.3.2 脱硫菌基因转移系统的构建	76
5.3.3 脱硫菌质粒的分离及限制性酶切分析	77
5.3.4 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 嵌合 (重组) 质粒的构建	77
5.3.5 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 重组质粒的筛选与检测	78
6 脱硫微生物磁化培育试验研究	
6.1 脱硫微生物磁化培养试验内容及试验过程	79
6.1.1 磁化装置的特点及磁化培养参数 (磁感应强度) 的测定	79
6.1.2 T. f 菌培养基的装瓶量与接种菌量的确定	79
6.1.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 磁化与非磁化培养的比较	79
6.1.4 相同类型不同生长环境下微生物 (煤与非煤系 T. f 菌) 的磁化比较	79
6.1.5 不同类型微生物 (T. f 菌及 M. Phlei 菌) 的磁化比较	80
6.1.6 磁化程度 (磁化时间和切割磁力线速度) 对细菌磁化培育的影响	80
6.2 脱硫微生物磁化培育试验结果与分析	80
6.2.1 氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 培养基的装瓶量与接种菌量试验分析	80
6.2.2 氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 磁化与非磁化培养的比较与分析	81
6.2.3 相同类型不同生长环境下 (煤与非煤系) T. f 菌磁化培养的比较分析	83
6.2.4 不同类型微生物 (T. f 菌、M. Phlei 菌) 的磁化作用结果的比较分析	83
6.2.5 磁化程度 (磁化时间和回旋振荡频率) 对微生物磁化培育的影响分析	84
6.3 脱硫微生物磁化培育的磁生物学效应分析	85
6.3.1 磁场直接或间接地影响 DNA	85
6.3.2 磁场影响微生物细胞的生理机能与新陈代谢	85

6.3.3 磁场影响水的结构和性质及生物膜的通透性	85
7 煤炭脱硫微生物菌种的分子生物学试验研究	
7.1 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 质粒 DNA 的抽提试验	87
7.1.1 质粒小量抽提试剂盒组成与试验菌样类型	87
7.1.2 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 质粒 DNA 抽提试验步骤与试验过程	88
7.2 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 质粒 DNA 抽提物的琼脂糖凝胶电泳试验	88
7.2.1 琼脂糖凝胶电泳试验的试剂类型与试验过程	88
7.2.2 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 质粒抽提物琼脂糖凝胶电泳试验结果	89
7.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 分子生物学试验结果分析	90
8 煤与黄铁矿表面氧化前后 XRD、SEM/TEM 及 FTIR 研究	
8.1 煤与黄铁矿表面细菌 (T. f 菌) 氧化前后的 XRD 及 TEM 研究	92
8.1.1 试验条件及试验内容	92
8.1.2 煤与黄铁矿表面 T. f 菌氧化前后 XRD 及 TEM 试验结果与分析	92
8.2 黄铁矿表面氧化剂 (H_2O_2) 氧化前后的 XRD 及 SEM 研究	95
8.2.1 试验条件及试验内容	96
8.2.2 黄铁矿表面 H_2O_2 氧化前后的 XRD 及 SEM 试验结果与分析	96
8.3 煤与黄铁矿表面细菌 (T. f 菌) 氧化作用前后的 FTIR 分析	99
8.3.1 高硫煤表面 T. f 菌氧化作用前后的 FTIR 谱图	99
8.3.2 黄铁矿表面 T. f 菌氧化作用前后的 FTIR 谱图	101
8.3.3 煤与黄铁矿表面 T. f 菌氧化作用 FTIR 图谱解析与结果分析	103
9 微生物脱除煤中黄铁矿硫的试验研究	
9.1 脱硫微生物 (T. f 菌) 浸出法脱硫的试验研究	105
9.1.1 煤炭生物浸出脱硫试验方案与试验条件的确定	105
9.1.2 微生物 (T. f 菌) 浸出法脱除煤中黄铁矿硫的试验	106
9.1.3 微生物 (T. f 菌) 浸出脱硫试验结果分析	113
9.1.4 煤炭生物浸出脱硫试验结果的 GM 预测	113
9.2 脱硫微生物 (M. Phlei 菌) 选择性絮凝脱硫的试验研究	117
9.2.1 试验方案的选择与试验条件的确定	117
9.2.2 微生物 (M. phlei) 选择性絮凝脱除煤中黄铁矿的试验	117
9.2.3 微生物选择性絮凝脱硫试验结果计算与分析	118
10 煤炭脱硫微生物脱硫机理的研究	
10.1 微生物在矿物表面的吸附	120
10.1.1 微生物吸附现象、类型及作用机理	120
10.1.2 微生物吸附过程动力学	123

10.2	微生物 (T. f 菌) 在黄铁矿表面的氧化机理	124
10.2.1	黄铁矿 (FeS ₂) 表面 T. f 菌氧化的类型及机理	124
10.2.2	微生物 (T. f 菌) 铁氧化生长动力学	125
10.3	微生物 (M. phlei 菌) 选择性絮凝脱硫机理	127
10.3.1	微生物 (M. phlei 菌) 表面组成及性质对絮凝作用的影响	127
10.3.2	微生物 (M. phlei 菌) 对煤表面的疏水性絮凝以及电性中和机理	128
11	煤炭微生物脱硫的工艺实践	
11.1	煤炭微生物脱硫技术的开发现状	129
11.1.1	国内外煤炭微生物脱硫技术的开发与应用研究	129
11.1.2	微生物脱硫工艺过程	131
11.1.3	煤炭微生物脱硫技术经济分析	136
11.2	煤炭微生物脱硫技术应用存在的问题及发展前景	137
11.2.1	煤炭微生物脱硫技术应用存在的主要问题	137
11.2.2	煤炭微生物脱硫技术的应用发展展望	138
12	结 论	
12.1	煤炭微生物脱硫的研究及脱硫菌种的选择方面	139
12.1.1	关于煤炭生物脱硫的研究方向及内容	139
12.1.2	对煤炭生物脱硫菌种的研究	139
12.2	脱硫微生物的磁化培育及菌种的分子生物学研究方面	140
12.2.1	对脱硫微生物菌种的磁化培育研究	140
12.2.2	对脱硫微生物菌种的分子生物学研究	140
12.3	煤与黄铁矿表面氧化的 XRD、SEM/TEM 及 FTIR 的研究方面	141
12.4	微生物脱除煤中黄铁矿硫的试验研究方面	141
12.4.1	对微生物 (T. f 菌) 浸出法脱除煤中黄铁矿硫的研究	141
12.4.2	对微生物 (M. phlei 菌) 选择性絮凝脱除煤中黄铁矿硫的研究	142
12.5	煤炭微生物脱硫机理的研究方面	142
12.5.1	对微生物在矿物表面吸附的研究	142
12.5.2	对微生物 (T. f 菌) 在黄铁矿表面氧化机理的研究	142
12.5.3	对微生物 (M. phlei) 选择性絮凝煤脱除黄铁矿硫机理的研究	143
12.6	本论著的主要研究成果及创新点	143
	参考文献	145
	后记	151

1 绪 论

1.1 煤炭中硫的赋存形态及我国煤炭中硫的分布状况

煤炭中硫的赋存状态如图 1-1 所示^[1]。从形态上看,煤中所含硫分可以分为有机硫和无机硫,无机硫主要以矿物质形态存在,其中绝大部分是黄铁矿(FeS_2)。此外,煤中无机硫还包括少量的单质硫和含量在 0.2% 以下的硫酸盐硫。黄铁矿密度约为 $5\text{g}/\text{cm}^3$,在煤中的嵌布粒度大到 $25\mu\text{m}$,最小可达到 $0.1\mu\text{m}$ 以下,其中 $-16\mu\text{m}$ 的黄铁矿以细粒浸染状分布。煤中的有机硫富集在煤炭的有机基质中,与煤中的碳元素以共价化学键的形式结合。主要以与煤的碳原子相结合成的硫醇、亚硫酸盐、二硫化物等形式存在于煤中。煤炭中硫的组成如图 1-2 所示^[2]。

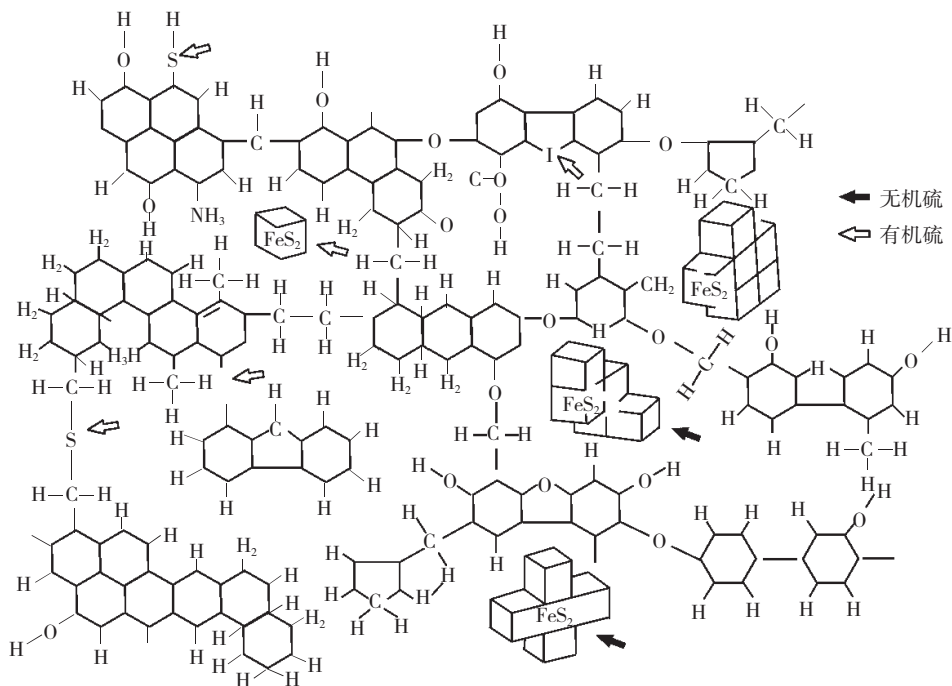


图 1-1 煤炭中硫的赋存状态

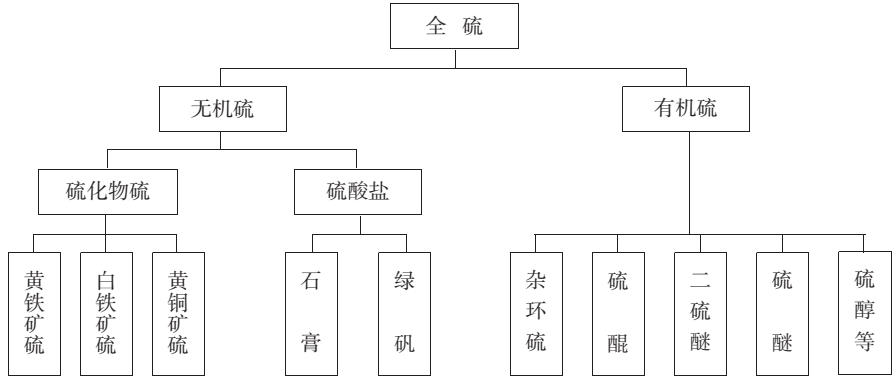


图 1-2 煤炭中硫的组成

我国的煤炭资源分布广泛，种类齐全，储量丰富，已探明的储量达 1.03 万亿吨，其中动力煤占 72.71%，炼焦煤占 25.69%，其中类型不明的煤占 1.60%。中国的煤炭储量仅次于前苏联和美国，居世界第 3 位。我国煤炭资源的平均硫分约为 1.11%，从总体上看含硫不高。全国商品煤硫分以低硫为主，全硫不大于 1% 的占商品煤总量的 70% 以上，全硫大于 3% 的高硫煤和大于 2% ~ 3% 的中高硫煤分别只占商品煤总量的 6.36% 和 4.76%，两者合计占 11.03%。中国高硫煤所占比例虽然不高，但由于煤炭资源总量很大，高硫煤占有的绝对量仍然很大。特别是随着对低硫煤炭的不断开采，高硫煤在煤炭资源总量中所占的相对份额也在不断增加。

我国煤炭中硫的分布很不均匀，总的情况是：低阶煤的硫分普遍较低，而高阶煤的硫分相对较高。不同牌号煤中的硫分以低阶的褐煤、不粘煤、长焰煤以及气煤、1/3 焦煤最低，其平均硫分均低于 0.8%，高阶的贫煤和焦煤的硫分较高，而其他炼焦煤以及无烟煤的硫分相对较低^[3]。

在全国尚未利用的煤炭储量中，硫分小于 1% 的低硫及特低硫煤占 50.3%，主要分布在陕西、内蒙古和新疆；硫分在 1% ~ 2% 的低硫煤和中硫煤占 34.2%，主要分布在山西、陕西和内蒙古地区；含硫大于 2% 的中高硫和特高硫煤占 15.5%（其中硫分大于 3% 的特高硫煤占 4.9%），大多分布在山西、贵州、内蒙古、四川、重庆、陕西和山东。

因此，我国煤炭资源中硫分布的总趋势是南部地区含硫高，北方地区含硫低；深部煤层含硫高，浅部煤层含硫低；变质程度高的烟煤、无烟煤含硫高，变质程度低的褐煤含硫低。高硫煤主要集中在两广、两湖及贵州、四川、浙江和山东等地区。

1.2 煤炭脱硫的意义与方法

1.2.1 煤炭在我国中的地位及煤炭脱硫的意义^[4]

煤炭是我国分布最广、储量最多的能源资源，在我国的国民经济和社会发展中占有极其重要的地位。我国煤炭资源丰富，是世界上最大的煤炭生产和消费国，在能源生产和消费中煤炭占 70% 左右，是我国最主要的能源。

根据《国民经济和社会发展“九五”计划和 2010 年远景目标纲要》，21 世纪的前十年，我国经济将持续快速发展，发展速度保持在 6% ~ 7% 以上，为保证能源与经济的协

调发展，我国能源工业将保持快速发展的势头，能源的生产和消费量将会有较大增长。

但是煤炭工业中一直存在一个亟待解决的问题，即由于煤中含硫和其他矿物质，用作燃料在燃烧过程中要向大气中释放出高浓度的 SO₂等有害气体和烟尘，对人体健康和动植物生长都会造成不利影响，对环境造成严重的污染。表 1－1^[5]说明了自 1994～2002 年我国大气污染状况未得到根本改善，而且随着煤炭产量的增加，大气污染变得越来越严重。表 1－2^[5]说明了燃煤污染是十分严重的。

表 1－1 不同年份 SO ₂ 、烟尘排放量对照表			万 t
年份	SO ₂ 排放量	烟尘排放量	
1994 年	1825	1414	
1995 年	2370	1720	
1996 年	2328	1552	
1997 年	2346	1873	
1998 年	2090	1452	
1999 年	1857	1159	
2000 年	1995	1165	
2001 年	1947	1069	
2002 年	1926	1012	

注：表中数据引自历年国家环保总局《中国环境状况公报》。

表 1－2 燃煤排放物污染情况		
燃煤排放物	占燃料燃烧源、工业废气源、流动源等总排放量的百分比	
SO ₂	85	
酸雨	82	
粉尘	70	
NO _x	60	
CO	71	
CO ₂	85	

注：表中数据引自中国工程院《先进能源技术咨询研究总报告 2001 年》。

能源消费结构中对煤炭的过分依赖加剧了环境污染。煤炭的生产和利用是对大气污染、酸雨等区域性环境问题以及气候变化等全球性环境问题的主要影响因素。我国约有 85%的煤炭用于直接燃烧，而 85%的 SO₂、70%的烟尘排放都与燃煤有关，燃烧产生的排放物（包括烟尘、SO₂、NO_x、CO₂等）成为我国大气污染的主要来源。有关资料显示，近年来日趋严重的酸雨，其主要来源就是煤中硫化物经燃烧后释放到大气中的 SO₂造成的。据报道，我国长江以南已出现大面积酸雨区，全国的酸雨面积超过 30%。酸雨频繁的西南和中南地区其中心区域的 pH 值甚至低于 4.0，酸雨出现的频率大，不仅腐蚀设备、污染大气，还严重破坏生态环境，如四川、贵州的一些地方就出现森林死亡、植被退化等

生态环境破坏问题。而在炼铁时,由于煤中含硫会降低焦炭的质量,煤中硫每上升 0.1%,焦比要升高 1.2%~2%,生铁产量就要下降 2%,因此严重影响钢铁产品的产量和质量。此外,煤炭中的硫对煤的自然也有一定的促进作用。

煤炭在今后相当长的时期内将是我国能源的主体,其在一次能源结构中的主导地位不会有太大改变。由于煤炭的开发和加工利用已成为我国环境污染物排放的主要来源,而随着煤炭消费量的增加,面临的环境问题会更多。因此,为了促进能源与环境的协调发展,减少 SO_2 等污染物的排放量,已成为我国以煤为主的能源生产和消费结构下解决环境问题的一个必然选择。

随着大气污染防治法律、法规和标准体系的建立,对大气环境质量的检测日益严格,人们的环保意识也日渐增强。国家环保总局会同有关部门划定了酸雨和 SO_2 污染控制区,制订了对两控区内煤炭、电力等重点行业 SO_2 污染的控制规划。1998 年 1 月 12 日,国务院批准《酸雨控制区和 SO_2 污染控制区划分方案》,2002 年国家环保总局发布的《“两控区”酸雨和二氧化硫污染防治“十五”计划》,更加明确了治理酸雨和 SO_2 的目标和措施。

根据国家有关部门的规定,炼焦和发电用煤的含硫量必须在 1% 以下,一般用煤含硫量必须在 1.5% 以下。在这种要求下,煤炭企业都千方百计降低煤炭的含硫量,以满足对产品的要求和减少对环境的污染。我国是一个发展中国家,研究和开发出高效和低成本的煤炭脱硫技术,将具有重要的经济和环保意义。

1.2.2 煤炭脱硫技术的分类及煤炭生物脱硫的特点

煤炭和脱硫技术总体上分为煤燃烧前脱硫、燃烧中脱硫和燃烧后脱硫三种^{[6]~[10]},其中:

(1) 燃烧后脱硫技术又称烟气脱硫技术,该技术发达国家研究的比较多。烟气脱硫的效率较高,脱硫效果较好,但其一次性投资运行费用较高,为电厂的 1/3 左右。由于成本高,所以我国目前应用较少。

(2) 燃烧中脱硫技术主要指向炉内喷入钙系脱硫剂的煤炭燃烧技术和添加固硫剂的型煤技术。其中沸腾燃烧固硫方法主要是利用脱硫剂如 CaO 在床层温度下热解进行固硫反应。利用该方法脱硫,要达到较高脱硫效果 Ca/S 的摩尔比必须大于 10,因此如何提高脱硫剂的利用率,降低 Ca/S 比,同时又达到较高的脱硫效果,是沸腾燃烧脱硫的研究课题。而流化床燃烧固硫是用于煤炭脱硫的又一种燃烧技术,它能实现炉内固硫和低温燃烧,从而降低 SO_2 的排放量。燃烧中脱硫普遍存在效率不高,且有易结渣、磨损和堵塞等问题。

(3) 燃前脱硫技术主要包括通过洗选减少硫分、灰分,以降低 SO_2 的排放的选煤技术、水煤浆技术、型煤技术和动力煤配煤技术等。对于我国这样的发展中国家来说,煤的燃前脱硫,尤其是通过选煤来降低煤的含硫量具有非常重要的意义。选煤是洁净煤技术的源头技术,既能脱硫又能降灰,同时还可以提高热能利用效率,并且选煤的费用又远远低于燃中和燃后脱硫。

煤的燃前脱硫又分为物理法、化学法和生物法三种。其中:

(1) 物理法脱硫是依据煤炭颗粒与含硫化合物在密度、表面化学性质、磁性和导电性等的差异而去除煤中无机硫的方法,包括重选、浮选和高梯度磁选脱硫等。物理脱硫法

工艺成熟,成本较低,易于实现工业化生产。但缺点是不能同时去除煤中有机硫,而且无机硫的晶体结构、大小及分布等会影响脱硫效果和煤炭回收率。

(2) 化学法脱硫的原理是通过氧化剂把硫氧化或把硫置换而达脱硫的目的。尽管它可以脱除大部分无机硫(不受硫的晶体结构、大小和分布的影响)和相当部分的有机硫,但是必须高温、高压并使用腐蚀性沥滤剂,经常需要在一定的酸碱条件下进行,对煤的性质影响较大,如引起煤的粘结性变差、发热量降低等,同时因过程能耗大、设备复杂,因此未能投入实际工业应用。

(3) 生物法脱硫的原理是利用特定微生物能够选择性地氧化有机硫或无机硫的特点,去除煤中的硫元素,包括浸出和表面氧化等方法。生物脱硫的优点是既能专一地脱除结构复杂、嵌布粒度很细的无机硫(如黄铁矿硫),同时又能脱除部分有机硫,且反应条件温和、设备简单、成本低。其中煤炭生物脱硫是应用于煤炭工业的一项生物工程新技术。虽然生物脱硫尚存在一些缺点,如传统脱硫细菌生长慢、脱硫时间长等。但与物理法、化学法相比,微生物脱硫以其能耗小,成本低、污染少等优点,受到世界各国的普遍重视,目前已成为国内外煤炭脱硫研究开发的重点。

1.3 煤炭微生物脱硫的基本方法及特点^[11~14]

1.3.1 生物浸出法

微生物浸出法脱除煤中黄铁矿的过程,实质是一个生物氧化过程,在这个过程中微生物作为一种催化剂转化不溶性无机物黄铁矿为可溶性形式,从而获得生长代谢所必需的能量。生物浸出通过两个途径进行,即直接作用与间接作用。主要是利用嗜硫菌对黄铁矿晶格的直接氧化或通过细菌代谢产物对黄铁矿晶格的间接氧化作用,使不溶性黄铁矿转化成可溶性硫酸进入溶液,而达到脱硫目的。

该法优点是装置简单,只需在煤堆上面撒上含有微生物的水,通过水浸透在煤中实现煤的微生物脱硫。生成的硫酸在煤堆的底部收集,从而达到从煤中去除硫的目的。缺点是处理时间较长(30天一批煤),且浸出废液若不能及时处理,很容易成为二次污染。

为了提高浸出效率,开发了空气搅拌式反应器,即利用空气对煤粉和含微生物的反应溶液进行搅拌脱硫。该法对微生物损伤小,还可以迅速提供微生物生长所需要的 CO_2 和 O_2 ,因此处理时间可以缩短。

1.3.2 生物表面氧化处理法

为了克服浸出法脱硫时间长的缺点,有人把微生物处理技术与浮选法相结合,发展出煤炭生物表面氧化浮选脱硫技术,即把微生物加入到煤泥水溶液中,由于微生物附着在黄铁矿颗粒表面,使其表面氧化,或微生物本身的表面性质影响,使黄铁矿表面的疏水性变成亲水性,不易附着于气泡之上,从而进入尾矿。与此同时,微生物却难以附着在煤颗粒表面,因此煤粒仍保持疏水性特点,从而把煤和黄铁矿分开。有报道,该方法在试验中微生物仅在数秒内就能起作用,脱硫时间只需数分钟即可,从而可大幅度缩短处理时间。此外,该方法在脱除煤中黄铁矿时,矿物质也同时作为尾矿,因此可达到同时脱硫脱灰的目的。

的。但是它与浸出法相比，煤炭回收率较低。

1.3.3 生物选择性絮凝法

与微生物表面氧化浮选法不同，微生物选择性絮凝法是采用本身疏水的细菌吸附于煤表面，通过细菌的吸附，使煤粒形成稳定的絮团，而这种菌很少吸附到黄铁矿表面。其实是利用细菌对不同矿物絮凝能力的不同，即选择性吸附能力的差异，来实现煤与黄铁矿的分离。该法的关键是能够筛选培育出具有选择性絮凝作用的微生物菌种。

除了以上煤炭生物脱硫基本方法外，还有如细菌油团聚法和生物-非生物脱硫法^[22]等，目前还都处在实验室研究阶段。

1.4 国内外煤炭生物脱硫技术的研究现状与进展^[23~93]

1.4.1 国外煤炭生物脱硫研究现状

煤炭微生物脱硫的研究可追溯到应用微生物选矿的历史。1947年，Clomer A. R 和 Hiwkle M. E^[50]从煤矿酸性矿坑水中发现并证实化能自养细菌氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*，简称 T. f 菌）能够促进氧化并溶解煤中黄铁矿，这被认为是微生物湿法冶金研究的开始。此后，人们对生物湿法冶金的理论和应用展开了广泛的研究。

1958年美国用细菌浸出铜和1966年加拿大用细菌浸出钨的研究获得成功，随后有20多个国家开展了微生物选矿的研究。Temple K. L.^[51]（1953）、Leathen W. W.^[52]（1958）等首先将 T. f 菌用于煤炭脱黄铁矿硫的研究。Silverman M. P.^[53]（1961）研究了 T. f 菌的生长特性及对黄铁矿的氧化机制，证实了 T. f 菌能够加速黄铁矿的氧化。Kargi F.^[54]（1984）发现并证实嗜热硫叶菌（*Sulfobacillus*）具有更好的脱硫效果，可脱除绝大部分煤中黄铁矿和部分（40%的）有机硫。Fecko P.^[55]（1991）等采用 T. f 菌对前捷克的 CSA 矿、Zizko 矿和 Masinn Gorkii 矿的褐煤进行了黄铁矿脱除试验，脱除率在 90% 以上。Steveus^[56]（1993）利用 T. f 菌对伊利诺的烟煤进行了脱除黄铁矿的试验，据报道在回收率为 95% 的情况下，黄铁矿的脱除率可达 87%，Tijen O.^[57]（1996）利用 T. f 菌对土耳其褐煤进行了脱矿试验，据报道，黄铁矿脱除率达 90% 以上，有机硫脱除率也可达 50%。

另外，进入 20 世纪 80 年代后，国外开始把微生物脱硫研究转向应用性试验，并成立了一些公司^{[19][20]}，如美国 Artech 公司和 Hattelle 公司。日本在煤炭生物脱硫方面也进行了许多研究。从 20 世纪 90 年代开始，日本中央电力工业研究所从土壤中分离出一种铁氧化硫杆菌，用于脱除煤中黄铁矿硫。他们还把生物处理技术与选煤技术结合起来，研究了微生物浮选脱硫技术。同时在煤水浆中进行了添加丝状菌青霉试验，也成功脱除煤中硫。此外，欧共体内德国 Essen 的 Deut Montan Technologie（DMT）、意大利 Cagliari 大学采矿和矿物处理系、荷兰 Delft 技术大学和英国的实验室也都开展了生物脱硫的研究。1991 年由欧共体资助在意大利 Enichem Anic 煤矿开展了浸出法微生物脱硫的连续性中试研究，处理能力 50kg/h 原煤，该装置的成功运转为浸出法脱硫提供了大量参数，也标志着煤炭生物脱硫正由试验室走向应用。据报道，运用该装置，约三周时间，可脱除约 90% 的无机硫，但由于脱硫时间长，浸出法的经济性受到质疑。

在煤有机硫的脱除方面,据报道,Chandra D 等^[58] (1979) 用一种混合细菌的丰富培养物,脱除煤中有机硫达 16.5% ~ 19.9%。Isbister J. D 等^[59] (1983) 用二苯噻吩 (Dibenzothiophene, 即 DBT) 作为培养物,分离到一株假单胞菌 CB1, 其脱除有机硫高达 18% ~ 47%。之后又用饰变法培育出一株代号 CB2 的改良菌种,并用 CB1/CB2 的混合菌株获得更高的脱硫效果。美国的 Artech 公司研究开发出能脱煤中有机硫的微生物 CBI 菌株,实验室脱除 18% ~ 47% 有机硫。美国气化工工艺研究所 (IGT) 培育出一种混合菌种 IGT - S_8 , 用于脱除伊利诺煤田 IBC - 101 煤中的有机硫。当将该煤磨细到小于 200 目,经过三周用混合菌种 IGT - S_8 处理,可脱除煤中的有机硫达 64%。1994 年,德国在小型电厂进行微生物脱硫试验,也能从煤中脱除一定量的有机硫。

国外在脱硫微生物遗传学研究方面,利用基因重组等手段构建高效脱硫工程菌的研究取得较大进展。Mao M. W. H (1980) 首次从 *T. f* 菌和兼性自养嗜热硫杆菌中分离出质粒。Holmes D. S 等人^[60] (1984) 将一个 *T. f* 菌的质粒在大肠杆菌中进行克隆试验。Rowlings D. E 等人^[61] (1985) 将所构建的一个 *E. Coli* 和 *T. f* 菌的重组质粒,成功地在 *E. Coli* 和 *T. f* 菌中复制和表达,从而丰富了自养菌遗传学研究内容,对于自养与异养菌之间基因信息表达的研究具有重要意义。为用基因工程改造浸矿细菌提供了可能。另外根据资料介绍^[17], Abduitaishid (1987) 等和 Alam (1988) 通过连续诱变和筛选,获得了具有很强降解有机硫能力的 *E. coli* 菌株,用于构建高效脱硫工程菌的研究。

近年来,许多国家加快了对煤炭微生物脱硫技术的研究,美国在此方面的研究处于领先地位。近来,由美国能源部提供资金,采用遗传工程方法,研究开发能够更快、更完全脱除煤中有机硫的微生物。如美国 Energy Biosystem Cooperation 应用通过基因技术改良的微生物,进行与煤中有机硫类型相近的石油中硫脱除的生产试验。可以预见,基因工程技术将为煤炭脱硫技术的应用做出重大贡献。

1.4.2 国内煤炭生物脱硫研究现状

国内开展煤炭生物脱硫研究与国外相比起步较晚,但近年来取得一些进展。1990 年中科院生物研究所徐毅等^[62] 用从松藻煤矿分离到的 *T. f* - 4 菌处理黄铁矿,8 天可脱除 70% 左右的黄铁矿硫,使煤中总硫从 2.45% 降至 1.12%。1992 年钟慧芳等^{[63][64]} 用同一菌株在实验室规模中,脱除南桐煤矿中 86.11% ~ 95.16% 的黄铁矿硫。此外,中国矿业大学周雪娇等^[65] 也作过类似的研究。

钟慧芳等^[66] 在煤有机硫的脱除方面作了许多有益工作,1993 年他们利用从河北任丘油田分离到的四株异养菌 D - 1 - 1、D - 2 - 1、D - 2 - 1 和 D - 2 - 3,经鉴定分别为门多隆假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*) 和争论产碱菌生物变型 I (*Alcaligenes paradoxus* biovar I),15 天脱除煤中有机硫达 22.2% ~ 32.0%。这是我国应用异养菌脱除煤中有机硫的良好开端,为今后开发更有效脱除有机硫的微生物提供了借鉴。

中国环境科学研究院的潘涔轩^[19] 领导的研究小组将煤炭洗选与微生物脱硫相结合,在前人研究基础上,试验了微生物浮选脱硫的方法,其工艺设计路线既体现了选煤快速、设备简单的优点,又充分考虑了微生物脱硫的自身特点。

安徽理工大学张明旭等^[67~74] (1997、1999、2001) 通过选择不同微生物种类和不同浮选物料为研究对象,模仿实际浮选的不同条件,探索了利用微生物表面调整、改性预处

理、抑制浮选中黄铁矿浮出，进行了大量试验，得出一些极有价值的结论和研究规律。

此外，东北大学魏德洲等（2001、2002）^[75~79]、中国矿业大学张兴、李雷等（1992、1993、2001）^[80~83]、云南大学刘晶（1996年）^[17]、山东大学马翠卿（1997）^[84]、南京理工大学杨凌霄（1998）^[85]等在微生物脱除煤中硫的研究方面进行过一些有益的工作，总结出一些有价值的试验研究规律。

在脱硫微生物遗传学方面，山东大学微生物研究所金漠松、颜望明等^[86~93]进行了一些研究。据报道，他们曾在 *E. coli* 与 *T. t* 菌之间成功建立一个接合转移系统，对脱硫菌遗传特性研究进行了有益的探索。

1.5 微生物脱煤中黄铁矿硫的依据及意义

1.5.1 煤炭微生物脱硫存在的主要问题

目前，利用微生物脱除煤炭中硫的方法主要存在以下几个方面的问题：

（1）煤炭生物脱硫机理的研究。虽然目前对微生物脱硫机理，包括脱硫微生物的生物代谢机制及生长动力学，细菌对煤炭中黄铁矿的吸附氧化模型等做了一些研究，但还有很多问题没有弄清，特别是微生物对煤中有机硫的脱除机理方面，由于煤炭中有机硫有多种结构及存在形式，具有不同的脱硫代谢机制，机理更加复杂，脱除也更加困难，因此脱硫机理还有待于更深入的研究。

（2）传统的煤炭脱硫微生物菌种，存在着生长繁殖时间长、细菌生长慢、菌量低、嗜酸等问题。

（3）脱硫微生物菌种的性能及脱硫效果，高脱硫效果的煤炭微生物脱硫菌株还不多。现已发现的煤炭脱硫菌中大多数或者只能脱无机硫，或者只能脱有机硫，两者均可脱除，并且有较好效果的菌株很少。

（4）菌株稳定的脱硫作用和更强的环境适应性。据报道有的菌株虽有较好的脱硫效果，但是脱硫的稳定性不高，结果的重现性差。

（5）煤炭微生物脱硫方法的研究。目前现有几种脱硫方法，如浸出法和表面氧化浮选法各自都有一定局限性，因此应广泛研究煤炭生物脱硫的新方法。

1.5.2 微生物脱煤中黄铁矿硫的依据及意义

针对煤炭微生物脱硫存在的问题，可以考虑以下思路和途径来加以解决：

通过对微生物生理生长等基础特性的研究，一方面采用多菌种培育方法，研究和培育更多新型性能优良的煤炭脱硫微生物；另一方面，利用现代分子生物学等手段，对现有脱硫菌进行改良，以解决传统煤炭脱硫菌生长繁殖慢、菌量低等问题。同时，通过对不同类型和不同生长条件下相同类型微生物的脱硫效果的研究，了解和掌握使脱硫微生物具有更稳定脱硫效果和更强的环境适应性的影响因素和条件。此外，还应在继续坚持对现有生物脱硫方法研究的同时，积极探索煤炭生物脱硫的新方法。

从煤中硫的赋存形态看，煤中无机硫和有机硫在煤中所占比例，根据煤种不同而有所差别。煤中无机硫以黄铁矿硫（ FeS_2 ）为主，其次还有白铁矿、砷黄铁矿以及少量的单

质硫和硫酸盐。煤中有机硫主要为芳香族和脂肪族组分，包括噻吩型硫化物、硫醇、硫醚、二硫醚、硫醌和杂环硫等，其中以噻吩型硫化物型和硫醇型为主要存在形态，特别以二苯噻吩（DBT）在煤中的含量高，它们在煤中与碳原子以共价键结合，是煤分子构造中的一部分，因此是较无机硫更难降解的有机化合物。

目前，一般认为脱硫微生物对黄铁矿有两个作用：直接氧化和间接氧化。直接氧化是指微生物直接溶化黄铁矿，间接氧化指直接氧化后的生成物起纯化学反应，而导致的溶解作用。由于无机硫在煤中的类型与结合形式相对单纯，因此对无机硫微生物脱除的研究进展较快。

相比之下，对有机硫的脱除要困难得多，原因是：一方面煤中有机硫本身就是碳网中的有机组成部分，要想除去比脱除无机硫复杂，往往要破坏碳网结构；另一方面有机硫本身又有不同的结构型式，具有不同的脱硫代谢机理。由于有机硫的脱硫机理目前尚不完全清楚，同时，筛选能够特异性除去煤中有机硫，而不破坏碳架的特异性降硫微生物也有困难，因此当前生物脱硫研究普遍偏重于煤中无机硫的去除。

我国煤中硫分布状况是：南方煤炭硫分高，北方煤炭硫分低，高硫煤和中高硫煤主要集中在华南、西南和中南等地区。高硫煤中硫的形态绝大部分是硫铁矿硫（主要是黄铁矿），有机硫含量相对较少，而硫酸盐硫含量极少，这表明我国高硫煤多以硫铁矿硫为主，占煤全硫含量的60%以上，尤其是重庆地区的南桐、天府、松藻等矿务局及贵州的六枝、林东等地的高硫煤多以黄铁矿为主。因此在目前各种脱硫技术中，针对去除黄铁矿而开发的煤炭脱硫技术就具有重大的实用价值。随着煤炭深度开采和西南部煤炭资源的开发，高硫煤产量将逐年上升。开展以脱除煤中黄铁矿为主的煤炭脱硫技术的研究更具有较大的现实意义。

生物技术领域是21世纪有极大发展前景的重要领域，而矿业生物技术则是将生物技术引入矿业工程领域的一门新型交叉学科，将生物技术与矿业技术相结合，必将为传统的矿业工程技术领域注入崭新的活力，将会极大促进矿业技术获得新的更快速的发展。

本论著选定煤炭生物脱硫作为研究方向，以煤炭中黄铁矿硫的脱除为重点，采用传统菌种氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）、革兰氏阴性菌和新型菌种草分枝杆菌（*Mycobacterium phlei*）、革兰氏阳性菌等不同种类脱硫微生物，对煤炭脱硫进行研究，从微生物的培育及细菌的生理生长等基本生物特性的研究出发，通过对不同类型和不同生长环境条件下的相同类型微生物脱硫效果的研究和对比，探索采用不同生物脱硫方法对煤炭脱硫的作用与影响，并从脱硫微生物菌种新的培育方法以及菌种的遗传特性分子生物学等方面进行一些探索性研究，同时在煤炭生物脱硫机理方面进行深入分析探讨。在研究过程中，更多地借助于各种先进和现代化的分析、测试的设备和仪器进行研究，以便获得更多有价值的煤炭生物脱硫的研究资料和数据，为更深入地研究打下坚实的基础和做好必要的科研积累工作。

1.6 微生物脱煤中黄铁矿硫的研究内容及创新点

1.6.1 主要研究内容

当前,在可用于煤炭生物脱硫的微生物中,对于其中最具代表性的、脱除煤中无机黄铁矿硫的硫杆菌属氧化亚铁杆菌(*T. f.*),以往已有了一些研究,因此具备了对其做进一步研究的基础与条件。又由于*T. f.*菌的脱除对象是煤炭中的黄铁矿硫,而我国煤炭又以含无机硫(主要是黄铁矿硫)为主。所以选定*T. f.*菌作为本课题煤炭生物脱硫研究菌种之一,通过对不同生长环境与条件(煤系与非煤系)下的*T. f.*菌进行研究,研究在各种不同条件下*T. f.*菌的生物特性及对煤中黄铁矿硫脱除的影响因素等。

*T. f.*菌属硫杆菌属,革兰氏阴性。由于其所具有特殊生理特性和生长代谢机能,因此在煤炭脱硫方面具有巨大的潜在应用价值。但此菌由于生长缓慢、代期长、细胞获得率低等原因,使其应用受到限制。改善菌种培养条件,提高细菌的生长繁殖速度,将会使之更好地适应实际应用的要求。因此,本课题在对煤与非煤系*T. f.*菌分离、培养及生物形态学特性等的研究基础上,采用了磁化培育方法对脱硫微生物*T. f.*菌进行培养,对在不同条件下磁化培育的效果及磁化作用下的磁生物效应机理进行深入分析探讨的同时,还采用分子生物学方法对*T. f.*菌的生物遗传特性进行了研究,为进一步研究菌种的遗传改良提供了一定的依据。

煤炭生物脱硫技术的关键之一在于获得并采用性能优良、生长迅速的脱硫菌种。本课题在煤炭脱硫新菌种(*M. phlei*)的研究和煤炭生物脱硫新方法(选择性絮凝)方面进行了探索研究。草分枝杆菌(*M. phlei*)属革兰氏阳性的原核生物细胞,不仅无毒无害,而且还具有较高的负电性和高度疏水性等许多独特的表面物理化学性质。本论著利用*M. phlei*菌对含无机黄铁矿的高硫煤进行选择性的絮凝脱硫,探索研究一种能脱除煤中黄铁矿硫的新菌种和选择性絮凝脱硫新方法。

1.6.2 主要特点与创新之处

本论著研究的主要特点及创新之处是:在煤炭脱硫菌种的选择上,既采用传统的煤炭脱硫菌(*T. f.*),革兰氏阴性菌,又采用了新型微生物菌种(*M. phlei*),革兰氏阳性菌。我们注意到,*T. f.*菌在金属矿和煤炭领域虽分别有一定的研究,但把煤与非煤系*T. f.*菌放在一起所做的对比研究,国内外以往未见报道。而对于*M. phlei*菌,国内目前尚无把此菌用于煤炭脱硫领域研究的报道。据国外资料和研究,由于此菌具有独特的表面性质,因此极有可能成为性能优良的煤炭脱硫新菌种。在煤炭生物脱硫的方法上,既采用了传统的浸出法脱硫,又探索采用了生物选择性絮凝脱硫新方法,并取得较好的脱硫效果。在煤炭脱硫菌种的培育上首创性地探索采用了磁化培育的微生物培养新方法,并在脱硫菌种的遗传特性分子生物学方面做了一些探索性研究。另外,在研究过程中充分地借助和采用了各种现代分析测试仪器、设备,使研究手段和方法更具先进性。

2 煤炭生物脱硫的微生物学基础

2.1 微生物的分类和命名

微生物 (Microorganism) 并不是生物分类学上的名词, 它是包括所有形体微小 ($< 0.1\text{mm}$) 的单细胞, 或个体结构简单的多细胞, 或没有细胞结构的低等生物的通称。微生物包括病毒、细菌、蓝细菌或蓝绿藻等原核生物的藻类、真菌等真核生物, 它们均属原生生物界, 是有别于植物界和动物界的第三界生物。其中细菌属裂殖菌纲。

按照微生物客观存在的生物属性 (如个体形态及大小、染色反应、菌落特征、细胞结构、生理生化反应, 与氧的关系、血清学反应等) 和它们的亲缘关系, 从大到小按界、门、纲、目、科、属、种对微生物进行分类。把属性类似的微生物列为同一界。在界内, 根据类似微生物之间的差异, 再列为门, 依次类推, 直至分到种。“种”是微生物分类的最小单位。种内微生物之间的差别很小, 有时为了区分种内微生物之间细微差异, 常用株表示, 但“株”并不是分类的单位。此外, 为了研究工作的方便, 在两个分类单位之间还可以增加亚门、亚纲、亚目、亚科、亚属、亚种及变种等次要分类单位。每一属生物或每一种微生物都有一个严格的、科学的名称。

微生物的每一类群都有各自的分类系统, 如细菌分类系统、酵母菌分类系统、霉菌分类系统等。目前, 人们公认比较全面的分类系统有三个, 其一是前苏联的克拉西尼科夫 (Красильников) 所著的《细菌和放线菌的鉴定》(1949) 中的分类, 另一个是法国的普雷沃 (Prevot) 所著的《细菌分类学》(1961) 中的分类, 第三个是美国细菌学家协会所属的伯杰鉴定手册董事会组织世界各国有关专家学者编定的《伯杰细菌鉴定手册》(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 中的分类。(伯杰细菌鉴定手册) 首次出版于 1923 年, 此后多次再版, 1957 年的第 7 版和 1974 年的第 8 版被译成多种语言的版本, 在世界各国得到了广泛应用, 这本手册的英文版第 9 版已于近期间世。

微生物的命名是采用生物学中的二名法, 即用两个拉丁字命名一个微生物的种, 种的名称是由一个属名和一个种名组成, 属名在前, 用拉丁文名词表示, 第一个字母大写, 种名在后, 用拉丁文形容词表示, 第一个字母不大写, 如氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)。

为了避免同物异名或同名异物的现象发生, 在微生物的名称之后常加上命名人的姓, 如大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia colicastellani* and Chalmers) 等。如果一种细菌只鉴定到属, 没有鉴定到种, 则该细菌的名称只有属名, 没有种名, 此时应在属名的后面加上单词 species (种类) 的缩写 sp (单数) 或 spp. (复数) 以示标记, 如杆菌、极毛杆菌、土壤杆菌等。

2.2 微生物的特点

在生命科学研究和工业应用研究领域广泛采用微生物作为材料和对象的根本原因，就是由于微生物个体一般是一个能自我增殖、多功能和大交换面积的单细胞反应体系。微生物的特点可概括为：体积小、面积大；吸收快、转化快；生长旺、繁殖快；易变异、适应性强；种类多、分布广等五大特征。

通常，微生物的个体都极其微小，大多数微生物的直径在 $1\mu\text{m}$ 以下，所以微生物个体的大小都用微米 (μm) 作为度量单位。正是由于微小体积，使得微生物都具有极大的比表面。也正是由于其具有巨大的比表面，才导致微生物与环境间可以发生广泛的相互关系，有利于微生物对矿物表面发生作用。

微生物因具有吸收快、转化快、生长旺、繁殖快等特点，为其快速生长繁殖和产生大量代谢产物提供了物质基础。微生物对营养物的快速吸收转化，体现出的是一种强大的生化反应能力，使其具有极强的氧化代谢和吸收转化功能。又由于绝大多数微生物是以裂殖方式繁殖，繁殖速度惊人，其中又以二等分裂的细菌（如大肠杆菌）最为突出。在适宜的环境中，微生物繁殖一代，快的仅需十几分钟，慢的也只需十几小时，这为其适应工业生产规模提供了必要的条件。

另外，微生物种类繁多、分布广泛，充满了整个地球。从生物圈、土壤圈、水圈，直至大气圈、岩石圈，到处都有微生物的踪迹。例如在万米深的海底有硫细菌生存，70 ~ 80km 的高空能采集到细菌和真菌。微生物分布和种类的广泛与多样性，为寻找到更多、效果更好的脱硫微生物创造了更多机会。

由于微生物个体一般都是单细胞，加之它们具有繁殖快、数量多及与外界环境接触密切等原因，即使其变异的频率极低（一般为 $10^{-5} \sim 10^{-10}$ ），也可在短时间内出现大量的变异后代。因此微生物的变异性使其具有极强的适应能力，尤其是对极端环境有惊人的适应能力，诸如抗热性、抗寒性、抗盐性、抗干燥、抗酸性、抗缺氧、抗辐射及抗毒性等。利用其易变异的特点，人为地采用物理（如紫外线）和化学（如化学剂）的方法，有可能得到具有更强脱硫功能突变基因的微生物菌株，从而培育出性能更加优良的脱硫菌。

2.3 微生物的形态大小和结构功能

微生物类群庞大、种类繁多，包括了细胞型和非细胞型（如病毒）。细胞型按其细胞结构又可分为原核微生物和真核微生物。细胞是绝大多数生物的基本结构单元。真核细胞有核膜和核仁，遗传物质以染色体形式存在，原核细胞没有核膜和核仁，没有真正的核结构，其遗传物质只是一条裸露的 DNA。

原核微生物包括细菌门和蓝绿细菌门中的所有微生物。细菌门包括真细菌纲、立克次氏体纲、粘细菌纲、螺旋体纲和支原体纲。其中真细菌又包括真细菌亚纲和放线菌亚纲。下面以细菌为重点，详细介绍细菌的形态、大小、细胞结构及其功能。

细菌是一类细胞小而短（直径约 $0.5\mu\text{m}$ ，长约 $0.5 \sim 5\mu\text{m}$ ）、结构简单、细胞壁坚韧、以二等分裂方式繁殖和水生性较强的原核微生物。通常所说的细菌包括真细菌亚纲中的所

有微生物，它们被广泛地应用于工业、农业、医药、环境工程等众多领域。与其他纲的微生物相比，细菌的种类最为繁多，在微生物生态系统中数量也最大，各有关的学科领域均把它们作为主要研究对象。细菌是自然界中分布最广、数量最多、与人类关系十分密切的一类微生物，它也是脱硫微生物学研究和应用的主要对象之一。

2.3.1 细菌的个体形态

细菌是单细胞微生物，它的形态就是细胞的形态，主要形态有球、杆、螺旋状三种基本类型，分别被称为球菌（Coccus）、杆菌（Bacillus）和螺旋菌（Spirobacteria）。细菌个体形态的多样性主要是由于细菌分裂后细胞的排列方式不同所致。

（1）球菌。球菌（图 2-1，A）依据细胞的排列方式又细分为单球菌（如脉微球菌），双球菌（如肺炎双球菌），4 个球叠在一起形成田字形的四联球菌（如四联策球菌），8 个球垒叠成立方体的八叠球菌（如甲烷八叠球菌），多个球连成链条状的链球菌（如乳链球菌）以及多个球呈不规则排列组成一串葡萄状的葡萄菌（如金黄色葡萄菌）等。

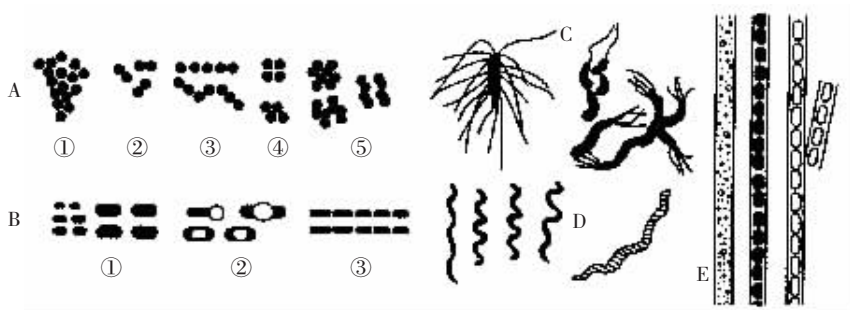


图 2-1 细菌的形状

A—球菌：1—葡萄球菌；2—双球菌；3—链球菌；4—四联球菌；5—八叠球菌

B—杆菌：1—单杆菌；2—链杆菌；3—棒状菌；4—芽孢杆菌

C—螺旋菌；D—螺旋体；E—丝状细菌

（2）杆菌。杆菌（图 2-1，B）有长杆菌、短杆菌（有的近似球菌）、芽孢杆菌（如枯草芽孢杆菌、溶纤维芽孢梭菌）等，按其细胞排列可分为单杆菌、双杆菌和链杆菌等。

（3）螺旋菌。螺旋菌（图 2-1，C）呈螺旋卷曲状，螺旋的圈数的螺距因菌种不同而异。螺旋不满一圈的称为弧菌，例如脱硫弧菌和逗号弧菌等。

除了上述三种基本形态外，在水生环境、潮湿土壤以及活性污泥中还普遍存在丝状菌，这种菌的分类特征是丝状体。常见的丝状菌有球衣菌属、纤发菌属、发硫菌属、贝日阿托菌属、亮发菌属等。

在正常生长条件下，细菌的形态是相对稳定的。然而，培养基的化学组成、浓度、pH 值以及培养温度和培养时间等因素的变化，常常会引起细菌的形态改变，或者死亡，或者细胞破碎，或者出现畸形。还有少数细菌是多形态的，有周期性的发育史。

2.3.2 细菌的大小

细菌的大小一般用测微尺在显微镜下直接测量，并依据菌种的不同采用不同的特征尺

寸来表示。例如，球菌的大小用直径表示，杆菌和弧菌的大小用其宽度和长度来表示，螺旋菌则用其宽度和弯曲长度表示。大多数球菌的大小为 $0.5\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$ ，杆菌为 $0.5\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m} \sim 5.0\mu\text{m}$ ，螺旋菌为 $0.25\mu\text{m} \sim 1.70\mu\text{m} \times 2.00\mu\text{m} \sim 60.00\mu\text{m}$ 。几种常见细菌的大小如表 2-1 所示。

表 2-1 几种细菌的大小

细菌名称	直径, μm	长度, μm
大肠埃希氏杆菌	0.4 ~ 0.7	1.0 ~ 3.0
水生黄杆菌	0.5 ~ 0.7	1.0 ~ 3.0
奇异贝日阿托氏菌	15 ~ 21	段殖体 5 ~ 13
胃八叠球菌	3.5 ~ 4.0	
金黄色葡萄球菌	0.8 ~ 1.0	

细菌的大小除了因菌种而异外，还随菌龄而有所变化。刚分裂的新细菌较小，随着发育而逐渐增大，直到发育完全。然后，随着细菌的老化，其形体又逐渐变小。例如，培养 4h 的枯草芽孢杆菌比培养 24h 的枯草芽孢杆菌长 5 倍 ~ 7 倍，但菌的宽度却变化不大。

2.3.3 细菌的细胞结构

细菌虽然是单细胞微生物，但其内部结构却非常复杂（图 2-4），既有一般结构，又有特殊结构。一般结构包括细胞壁、细胞质膜（原生质膜）、细胞质（原生质）、内含物和核物质，为所有细菌共有。特殊结构有芽孢、荚膜、衣鞘和鞭毛等，为某些细菌所特有，是细菌的分类物征。此外，光合细菌还具有光合作用片层。细菌的结构如图 1-3 所示。下面分别介绍各个结构及其功能。

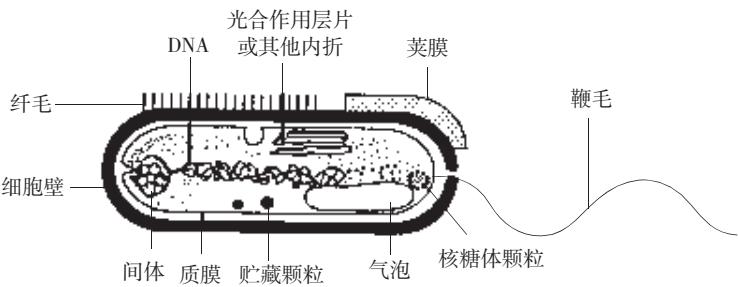


图 2-2 细菌细胞结构模式图

(1) 细胞壁

细胞壁是包在细胞表面最外层的、具有坚韧而略带弹性的薄膜。它约占菌体干重的 10% ~ 25%。

细胞壁为一多层结构，由于它的化学组成和内部结构的不同，使得不同的细菌对结晶紫有不同的着染力。基于这一差异，将细菌分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类。前者的细胞壁是一个约 20nm ~ 80nm（纳米）厚的肽聚糖（包含 D-氨基酸、胞壁酸和二氨基庚二酸三种成分）多层结构，其中含有磷壁酸及少量蛋白质和脂肪；后者的细胞壁是

一个约 10nm 厚的多层结构，由肽聚糖层和外壁层组成，肽聚糖层约 2nm ~ 3nm 厚，紧贴细胞质膜，在它的外表呈波浪形，由脂多糖、脂蛋白和脂类组成。上述两类细菌细胞壁的化学组成如表 2 - 2 所示。

表 2 - 2 细菌细胞壁的化学组成

细 菌	壁厚 nm	肽聚糖%	磷壁酸	脂多糖	蛋白质%	脂肪%
革兰氏阳性菌	20 ~ 80	40 ~ 90	+	-	约 20	1 ~ 4
革兰氏阴性菌	10	10	-	+	约 60	11 ~ 22

细胞壁的主要功能是固定细菌的细胞形态，保护脆弱的原生质体，避免渗透压引起原生质膜破裂。细胞壁还是一种有效的分子筛，它可以阻挡某些分子进入和保留在革兰氏阴性菌的细胞壁和细胞质膜之间的蛋白质内。此外，细胞壁还为鞭毛提供支点，使鞭毛摆动。

(2) 细胞质膜（原生质膜）

细胞质膜是紧靠细胞壁内侧包围着细胞质的一层柔软而富有弹性的薄膜，它的自重占菌体干重的 10%，含有 60% ~ 70% 的蛋白质、30% ~ 40% 的脂类和 2% 左右的多糖。所含的脂类是磷脂，由磷酸、甘油、脂肪酸和含氮碱组成。

细胞质膜是一种半渗透膜，它既能阻止大分子通过，又具有选择性渗透作用，可以有选择地使某些小分子逆浓度梯度而进入细胞，从而维持细胞的渗透压梯度和溶质的转移。

其次，细胞质膜上有合成细胞壁和形成横膈膜组分的酶，可以在膜的表面合成细胞壁。细胞质膜上还有琥珀酸脱氢酶、还原型烟酰胺腺或还原型辅酶、脱氢酶、细胞色素氧化酶、电子传递系统、氧化磷酸化酶及三磷酸腺苷酶等，是氧化代谢和能量产生的部位。

另外，细胞质膜上的鞭毛基粒，为鞭毛提供了附着部位。

(3) 细胞质及其内含物

细胞质是指细胞质膜以内除了核物质（核区）以外的无色透明的黏稠复杂胶体，又称为原生质，是由蛋白质、核酸、脂类、多糖、无机盐和水组成的。幼龄菌的细胞质稠密、均匀，富含核糖核酸（RNA），占固体物的 15% ~ 20%，嗜碱性、易被碱性和中性染料着染。成熟细胞的细胞质中形成了各种贮藏颗粒，有的还产生气泡。老龄菌的细胞因营养缺乏，其中的核糖核酸被细菌作为氮源和磷源利用而含量降低，所以细菌着色不均匀。根据这一特点，可以借助染色的均匀程度来判断细菌的生长阶段。

细胞质中的内含物质包括核糖体、内含颗粒和气泡。

核糖体是分散在细胞质中的亚微颗粒，是合成蛋白质的部位，它由核糖核酸（RNA）和蛋白质组成，其中 RNA 占 60%，蛋白质占 40%，其直径约为 20nm。

内含颗粒是在细菌生长期间，由于营养物质过剩而形成的一些颗粒贮藏物，例如异染粒、聚 β 羟基丁酸（PHB）颗粒、硫粒、肝糖（多糖）粒和淀粉粒等。异染粒由多聚偏磷酸盐、核糖核酸、蛋白质、脂类和 Mg^{2+} 组成，在生长的细胞中含量较多，老龄细胞中被作为碳源和磷源利用。PHB（poly - β - hydroxybutyrate）颗粒是一种被一单层蛋白质膜包围的聚酯类脂溶物质，这不溶于水。肝糖粒和淀粉粒均能用碘液染色，前者被染成红褐色，后者被染成深蓝色，这两种颗粒都可以用为碳源和能源利用。硫粒是贝日阿托氏菌、

发硫菌、紫硫螺菌及绿硫菌等一些利用 H_2S 作能源的细菌，在氧化 H_2S 为元素硫积累在菌体内时形成的。当外界缺乏 H_2S 时，这些细菌将体内的硫粒氧化成 SO_{12} ，从中获得能量。应该指出的是，上述各种内含颗粒并非在一个菌体内都同时存在，通常一个菌体内仅含有一种或两种。一般来说，当环境中缺乏氮源而碳源和能源又过剩时，细胞内将积累大量内含颗粒，有时可达细胞干重的 50%，甚至会因 PHB 的异常增加而导致某些细菌死亡。

气泡仅在某些特殊菌种（如紫色光合细菌和蓝绿细菌）体内存在，尤其是专性好氧的嗜盐细菌体内气泡最多。这些细菌借助于气泡来调节自身的浮力。在浓盐水中氧气较少，气泡使细菌漂浮在水表面而接触空气，以便吸收所需的氧气。

(4) 核物质

细菌的核没有核膜和核仁，其成分是脱氧核糖核酸（DNA）纤维，它是由一条环状双链 DNA 分子高度折叠缠绕而成。DNA 的长度可达菌体长度的 1000 倍，但由于高度紧密折叠，只占菌体的一部分，大电子显微镜下显示出一个透明、不易着色的纤维状物质区域，习惯上将该区域称为似核结构，亦称为细菌染色体。似核结构一般呈球状，棒状或哑铃状，在分裂时还可能呈其他形状。

细菌的似核结构与真核生物的核一样，携带着细菌的全部遗传信息。所以它的功能是决定遗传性状和传递遗传性状，是重要的遗传物质。

(5) 荚膜

许多细菌能分泌一种粘性物质于细胞壁的表面，完全包围并封住细胞壁，使细菌与外界环境有明显的边缘，这层粘液性物质称为荚膜（图 2-3）。荚膜能相对稳定地附着在细胞壁上，它的有无是细菌分类鉴定的依据之一。

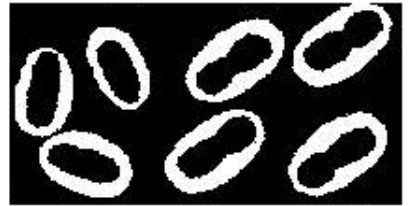


图 2-3 巨大芽孢杆菌的荚膜

荚膜的化学成分绝大部分是水，其含量高达 90%~98%，其中的固体物成分是多糖（单体有 D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖、L-鼠李糖、L-岩藻糖等）和多肽（单体为 D-谷氨酸）。有的荚膜还含有脂类或脂类蛋白质复合体。

荚膜的功能主要是保护细菌免受干燥的影响，保护致病菌免受宿主吞噬细胞的吞食，增强细菌的侵染力，吸附环境中的有机物、无机固体物和胶体物等。其次，荚膜作为细胞外的贮藏物质，当缺乏营养物质时，可用为能源、碳源或氮源而被细菌利用。

(6) 粘液层

有些细菌不产生荚膜，但能分泌多糖粘性物质，疏松地附着在细胞壁的表面，与外界环境没有明显的边缘，这就是粘液层，它具有生物吸附作用。

(7) 菌胶团

有些细菌由遗传性的决定，在纯培养或混合培养过程中，菌体之间按一定的排列方式互相粘集在一起，由公共荚膜包藏形成一定形态的细菌集团，称为菌胶团。菌胶团的形状（图 2-4）有垂丝状（a）、分枝状（b）、蘑菇形（c）、球形（d）和椭圆形（e），也有呈不规则形状的，动胶菌中的枝状动胶菌和垂（悬）丝状动胶菌具有典型的分枝状菌

胶团结构和垂丝状菌胶团结构。菌胶团的形成与否是细菌分类鉴定的依据之一。



图 2-4 菌胶团的几种形态

(8) 芽孢 (spora)

好氧性芽孢杆菌属、厌氧性梭状芽孢杆菌属、芽孢杆菌属、芽孢八叠球菌属和芽孢弧菌属中的所有细菌都产生芽孢。

芽孢是在上述细菌体内形成的一个圆形、椭圆形或圆柱形的内生孢子。有的细菌在其发育过程的某一阶段必然产生芽孢 (如枯草芽孢杆菌)，而有的细菌则在一定环境条件下才产生芽孢。芽孢形成的位置、形状和大小是相对稳定的，可作为细菌分类鉴定的依据之一。例如，枯草芽孢杆菌的芽孢位于细胞的中央或接近中央，其直径不大于营养细胞的宽度。梭状芽孢杆菌的芽孢同样是位于细胞中央，但直径却大于营养细胞的宽度，使菌体呈中间大，两头小的梭状，菌名也恰恰是因此而得。还有些菌，它们的芽孢位于细胞的一端，呈鼓锤状。芽孢着生的位置如图 2-5 所示。

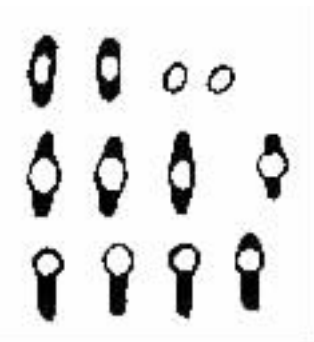


图 2-5 细菌的芽孢

芽孢对不良环境 (如高温、低温、干燥、光线和化学物质等) 有很强的抵抗力。例如，细菌的营养细胞在 $70 \sim 80$ 条件下，煮 10min 即死亡，而芽孢则在 $120 \sim 140$ 的高温条件下，还能生存几个小时。又如，营养细胞在 5% 的苯酚溶液中很快死亡，而芽孢却能耐受 15d。

芽孢内的大多数酶都处于不活动的休眠状态，代谢活力极低，是一个休眠体。并且由于芽孢对不良环境有很强的抵抗力，所以又把它称为抵御恶劣环境的休眠体。

绝大多数能运动的细菌都具有鞭毛，所以鞭毛可谓是细菌的运动器。

鞭毛是从细胞质膜上的鞭毛基粒长出、穿过细胞壁伸向体外的细长、波浪形丝状物 (图 2-6)。直径为 $0.01 \mu\text{m} \sim 0.2 \mu\text{m}$ ，长度为 $2 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ 。鞭毛的着生部位、数目和排列方式是菌种的特征，是细菌分类鉴定的依据之一。如图 2-6 所示，常见的有单鞭毛 (一端和两端着生)、一束鞭毛 (一端和两端着生) 和周生鞭毛三种。其中端部着生的鞭毛还有极端生和来极端生之分。鞭毛的运动一般认为是细胞质膜上的三磷酸腺苷酶水解三磷酸腺苷提供能量，通过鞭毛基粒传递到鞭毛而产生的。

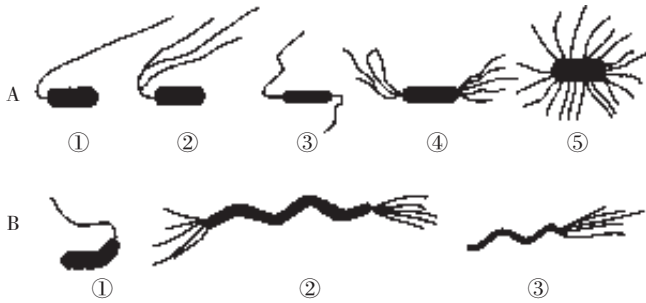


图 2-6 细菌鞭毛的着生位置

A - 杆菌；① - 极端生；② - 亚极端生；③ - 两极端生；④ - 两束极端生；⑤ - 周生；
B - 弧菌；① - 单根极端生；② - 两束极端生；③ - 束极端生

2.3.4 细菌的培养特征

细菌在不同的状态（固体、半固体、液体）的培养基上生长时，会表现出不同的培养特征。

(1) 细菌在固体培养基表面上的菌落特征

以稀释平板法和平板划线法将呈单个的细菌接种到固体培养基平板上，再给予合适的培养条件，细菌便能迅速生长繁殖。由于受固体表面和深度的限制，细菌不能自由扩散生长、繁殖起来的细菌群体聚集在一起，形成一个由无数个细菌组成的、肉眼可见的群体，称为菌落。各种细菌在一定的培养条件下形成的菌落特征千姿百态（图 2-7），其主要差异包括菌落的大小、形状、光泽、颜色、质地软硬程度、透明度等。菌落特征可以作为细菌分类鉴定和依据，例如，具有荚膜的细菌，菌落表面光滑、湿润、粘稠；不具荚膜的细菌为粗糙菌落，表面干燥、皱褶、平坦；贝日阿托氏菌在含醋酸钠、硫化钠及过氧化氢的培养基上长成平坦、半透明圆盘或椭圆状的菌落，其菌体（毛发体）活跃滑行。

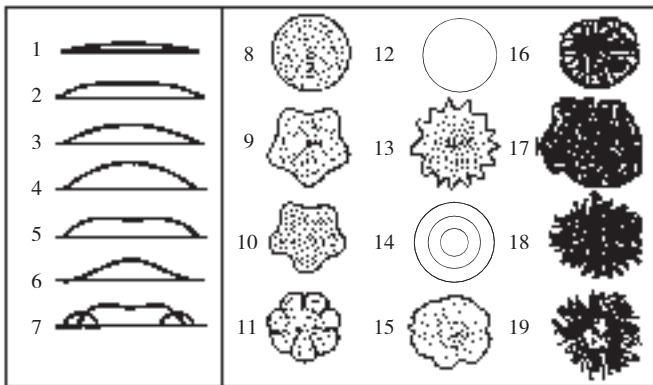


图 2-7 细菌菌落特征

纵剖面：1 - 扁平淡；2 - 隆起；3 - 低凸起；4 - 高凸起；5 - 脐状；6 - 草帽状；7 - 乳头状

表面结构，形态及边缘：8 - 圆形，边缘整齐；9 - 不规则，边缘波浪；10 - 不规则，颗粒状，边缘叶状；11 - 规则，放射状，边缘花瓣形；12 - 规则，边缘扇边状；13 - 规则，边缘齿状；14 - 规则，有同心环，边缘完整；15 - 不规则，似毛毯状；16 - 规则，似菌丝状；17 - 不规则，卷发状，边缘波状；18 - 不规则，丝状；19 - 不规则，根状

将细菌接种在琼脂斜面培养基上，会在接种线上长成一片密集细菌群落，叫菌苔。不同属、种细菌苔形状如图 2-8 所示。

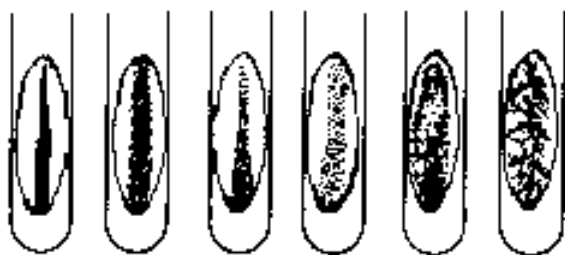


图 2-8 在斜面培养基上的生长特征

某些细菌用穿刺接种法接种到明胶培养基上，能产生明胶酶水解胆胶，由地明胶被水解形成一定形态的溶菌区（图 2-9），因而可作为分类鉴定试验项目之一。

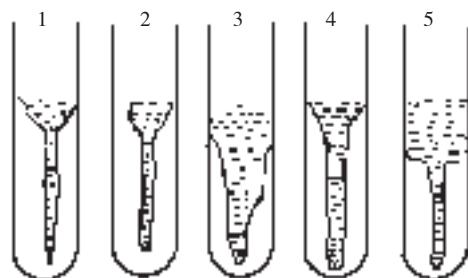


图 2-9 在明胶穿刺培养基中的生长

1 - 火山口状；2 - 芜著状；3 - 漏斗状；4 - 囊状；5 - 层状

（2）细菌在半固体培养基中的培养特征

以穿刺法将细菌接种至 0.3% ~ 0.5% 琼脂的半固体培养基中观察其生长情况时，如果是无鞭毛、不运动的细菌，则只能在穿刺线上生长；而有鞭毛、能运动的细菌不仅在穿刺线上生长，并且还能向穿刺线的周围扩散生长。不同属种的细菌扩散生长的状态如图 2-10 所示；依此可以判断细菌有无鞭毛及能否运动。也可借穿刺培养法被步判断细菌的呼吸类型，生长在培养基表面的为好氧菌；生长在穿刺线上部的为好氧和微量好氧菌；沿整流器条穿刺线生长的为兼性厌氧菌；在穿刺线底部生长的为厌氧菌。整条穿刺线生长的为兼性厌氧菌；在穿刺线部生长的为厌氧菌。

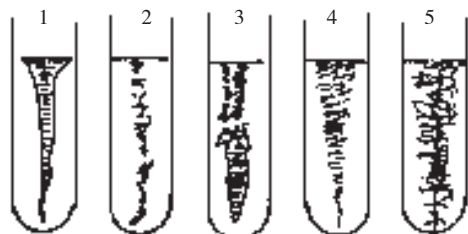


图 2-10 在琼脂穿刺培养基中生长

1—丝状；2—念珠状；3—乳头状；4—绒毛状；5—树状

(3) 细菌在液体培养基中的培养特征

细菌在液体培养基中要以自由扩散生长，其生长状态随细菌属、种而异（图 2-11）。有些细菌使培养基浑浊，菌体均匀分布于培养基中，有些细菌则互相凝聚成大颗粒沉在底部，培养基非常清澈。细菌在液体培养基中的培养特征同样是分类鉴定的依据之一。

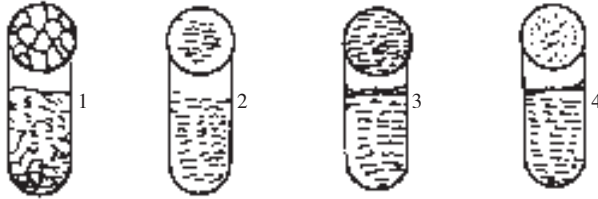
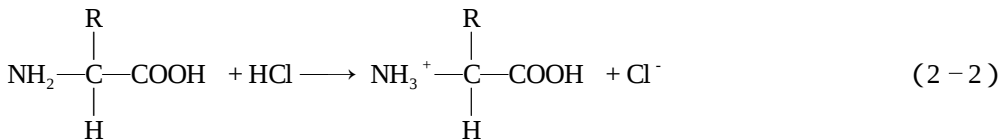
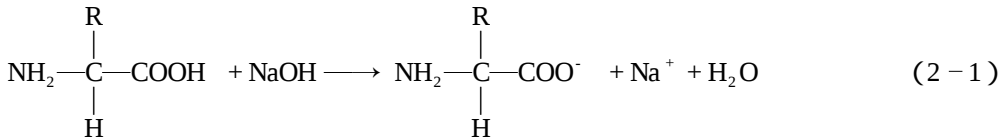


图 2-11 在肉汤表面上的生长
1—絮状；2—环状；3—菌膜；4—膜状

2.3.5 细菌的物理化学性质

(1) 细菌表面电荷和等电点

细菌体内的蛋白质是由多种氨基酸组成的。氨基酸是一种两性电解质，它在碱性溶液中带负电，在酸性溶液中带正电，即：



在某一 pH 值的溶液中，氨基酸呈电中性，此时细菌表面所带的正电荷和负电荷相等，这一 pH 值即是细菌的等电点，它可以根据细菌在不同 pH 值条件下对一定染料的着色性，或根据细菌对阴、阳离子的亲和性，或者根据细菌在不同 pH 值电场中泳动方向（电泳法）来测定。革兰氏阳性菌的等电点为 pH = 2 ~ 3，革兰氏阴性菌的等电点为 pH = 4 ~ 5。所以，在绝大多数的情况下，细菌表面是带负电的。

(2) 细菌的染色

由于细菌菌体细胞微小且透明，在光学显微镜下，菌体与背景反差很小，不容易看清楚细菌的形态和结构。要能够详细观察其形态和构造，通常要对细菌用染料染色，以增加菌体与背景的反差，以便于在显微镜下观察。

细菌的染色是基于带有相反电荷的菌体表面和染料离子，因静电吸引而彼此结合在一起的原理进行的。所用的染料按其带电状态，可分为碱性染料和酸性染料两大类。常用的碱性染料有结晶紫、龙胆紫、复红、蕃红、美蓝、甲基紫、中性红、孔雀绿等；常用的酸性染料有酸性品红、刚果红、曙红等。在通常的培养条件下，细菌带负电，而碱性染料带

正电，因而在研究工作中大都采用碱性染料染色。

细菌的染色方法可归结为简单染色法和复合染色法两大类。简单染色法只用一种染料染菌体，目的仅仅是为了增加反差，便于观察。复合染色法简称复染色法，它是用两种或两种以上的染料染色，以鉴别不同性质的细菌，所以又叫鉴别染色法。主要的复染色法有革兰氏染色和抗酸性染色法两种，前者是微生物尤其是细菌分类鉴定的主要染色方法，在研究工作中广为应用，而后者则多在医学上采用。

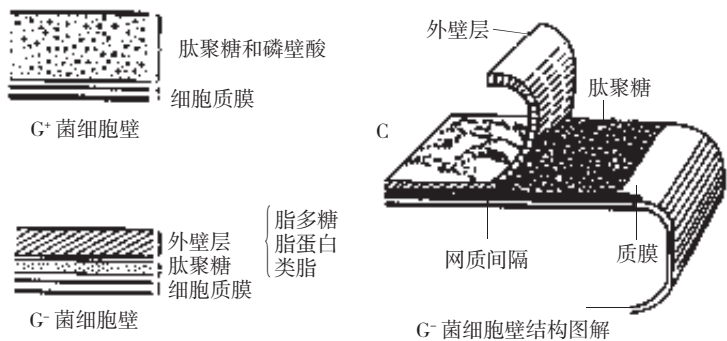
革兰氏染色法是丹麦的细菌学家克里斯琴·革兰氏（Christain Gram）于 1884 年创造的。其染色步骤是：用接种环取少量细菌在干净的载玻片上涂布、固定后，先后草酸铵结晶紫染色，用弱酸性媒染剂（碘—碘化钾溶液）处理后用乙醇脱色，最后用蕃红液复染。如果细菌能保持草酸铵结晶紫与碘的复合物不被乙醇脱除而呈紫色者称为革兰氏阳性菌；被乙醇脱色，用蕃红液复染后呈红色者称为革兰氏阴性菌。

革兰氏染色是一种常用的重要染色方法。由于不同细胞壁的化学组成和结构不同，使得不同的细菌对结晶紫有不同的着染力。基于这一差异，可将细菌分为革兰氏阳性菌（G⁺）和革兰氏阴性菌（G⁻）。上述两类细菌细胞壁的化学组成如表 2-3 所示。

表 2-3 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁化学组成的比较

细 菌	壁厚度 /nm	肽聚糖 /%	磷壁酸 /%	脂多糖 /%	蛋白质 /%	脂肪 /%
革兰氏阳性菌	20 ~ 80	40 - 90	+	-	约 20	1 ~ 4
革兰氏阴性菌	10	10	-	+	约 60	11 ~ 22

由表可知：革兰氏阳性菌（G⁺）细胞壁含大量的肽聚糖（包含氨基酸，胞壁酸和二氨基庚二酸三种成分），独含磷壁酸，不含脂多糖。革兰氏阴性菌（G⁻）含极少肽聚糖、独含脂多糖，不含磷壁酸。两者的不同还表现在各成分的含量不同。尤其是脂肪含量最明显，革兰氏阳性菌含脂肪量为 1% ~ 4%，而革兰氏阴性菌含脂肪量为 11% ~ 22%。如图 2-12 所示。



A 革兰氏阳性菌的细胞壁 B 革兰氏阴性菌的细胞壁 C 革兰氏阴性菌细胞壁的图解

图 2-12 细菌细胞壁的结构图

不同细菌的细胞壁结构及组成的差异是导致细菌表面电性及疏水性等性质差异的主要原因。而具有特殊表面性质的细菌（如 *M. phlei* 菌等）会有选择地与矿物发生作用。这是实现煤炭脱硫的又一重要依据。

(3) 细菌悬浮液的稳定性

决定细菌悬浮液稳定性的不是细菌本身的性质，而是菌体解离层的 R 型（粗糙型）和 S 型（光滑型）的型别。R 型具有强电解质，悬浮液不稳定，易发生凝聚现象。S 型和类朊型菌的悬浮液则很稳定，只有当电解质的浓度很高时才发生凝聚现象。若把细菌看作一种胶粒，则 R 型菌起疏水性胶粒的作用。S 型菌起亲水性胶粒的作用。当它们吸附在固体表面时，将会改变固体颗粒的表面疏水程度。

(4) 细菌的多相胶体性质

细菌的细胞中含有多种蛋白质，它们的成分和功能各不相同，因而常常把细胞质称为多相胶体。其中某一相吸引某一组化学物质进行生化反应时，另一相又吸收另一组物质。所以，在细菌的细胞中可以同时进行几种性质不同的生化反应。

(5) 细菌的密度和自重

细菌的密度与菌体所含的物质有关。蛋白质的密度为 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ ，糖的密度为 $1.4\text{g}/\text{cm}^3 \sim 1.6\text{g}/\text{cm}^3$ ，核酸的密度为 $2.0\text{g}/\text{cm}^3$ ，无机盐的密度为 $2.5\text{g}/\text{cm}^3$ ，脂类的密度小于 $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ ，所以整个菌体的密度在 $1.07\text{g}/\text{cm}^3 \sim 1.09\text{g}/\text{cm}^3$ 之间。由于细菌的化学组成随环境而变化，所以细菌的密度也因生长环境的不同而异。

通常将群体细菌的自重除以细菌的数目，求得每个细菌的自重。一般来说，单个细菌的自重约为 $1 \times 10^{-9}\text{mg} \sim 1 \times 10^{-10}\text{mg}$ 。

(6) 细菌的渗透压

渗透压是阻止水分子通过半渗透膜进入水溶液的压力。如果用半渗透膜将两种浓度不同的水溶液隔开，低浓度溶液中的水分子就会透过半透性膜进入高浓度溶液，从而使高浓度溶液一侧的液面升高，当两液面的高度差产生的压力足以阻止水继续通过半渗透膜时，渗透即停止，这个压力就是通常所说的渗透压。溶液的浓度越高、溶质的分子越小渗透压越大。此外，离子溶液的渗透压要比分子溶液的大。

大细菌体内，磷酸盐、磷酸酯、嘌呤、嘧啶等以高度浓缩的状态存在，细菌的细胞质膜又是一半渗透膜，所以使细菌体内都具有一定的渗透压。通常革兰氏阳性菌的渗透压约为 $2\text{MPa} \sim 2.5\text{MPa}$ ，革兰氏阴性菌的渗透压约为 $0.5\text{MPa} \sim 0.6\text{MPa}$ 。

当细菌的渗透压等于其体内渗透压的溶液（如 $0.5\% \sim 0.85\%$ NaCl 溶液）中生长时，形态和大小都保持正常，且长势良好。这种溶液称为等渗透溶液或生理盐水。当细菌在渗透压低于其体内渗透压的溶液（低渗透液，如 0.01% NaCl 溶液）中生长时，溶液中的水分子大量渗入细菌体内，使其细胞发生膨胀，严重时会导致细胞破裂。当细菌在渗透压高于其体内渗透压的溶液（高渗溶液，如 20% NaCl 溶液）中生长时，菌体内的水分子大量渗到体外溶液中，致使细胞因失水而发生质壁分离，甚至会造成细菌死亡的严重后果。

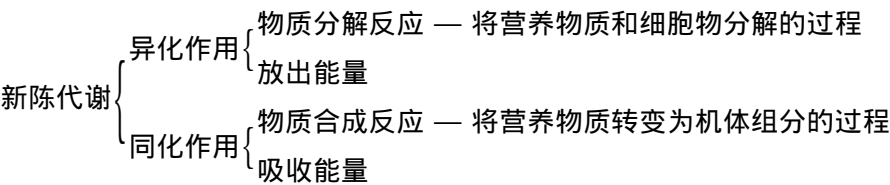
2.4 微生物的营养与产能代谢

2.4.1 微生物的营养

新陈代谢是生命的基本特征之一，微生物同其他生物一样不断进行新陈代谢。而微生物摄取和利用营养物质的过程即为营养（Nutrition）。营养过程是微生物生命活动的重要

特征。只有吸收营养，才能进一步代谢，从而实现微生物的生长、发育和繁殖。有些脱硫过程也正是在营养过程中完成的。

新陈代谢包括同化和异化作用。异化作用为同化作用提供物质基础和能量，同化作用为异化作用提供基质。



微生物所需要的营养物质的种类和数量要根据其化学组成及生理特性而定。

(1) 微生物的化学组成

微生物机体质量的 70% ~90% 为水分，其余 10% ~30% 为干物质。

①水分。不同类型的微生物水分含量不同。例如，细菌含水 75 ~ 85g/100g，酵母菌含水 70 ~ 85g/100g，霉菌含水 85 ~ 90g/100g，芽孢含水 40g/100g。

②干物质。微生物机体的干物质由有机物和无机物组成（表 2-4）。有机物占干物质质量的 90% ~ 97%，包括蛋白质、核酸、糖类及脂类。无机物占干物质质量的 3% ~ 10%，包括 P、S、K、Na、Ca、Mg、Fe、Cl 和微量元素 Cu、Mn、Zn、B、Mo、Co、Ni 等。C、H、O、N 是所有生物体的有机元素。糖类和脂类由 C、H、O 组成，蛋白质由 C、H、O、N、S 组成，核酸由 C、H、O、N、P 组成。

表 2-4 微生物的有机物组成 占干重的百分比/%

微生物	蛋白质	碳水化合物（糖类）	脂肪	灰分
细 菌	50.00 ~ 93.70	12.00 ~ 28.00	0.40 ~ 35.60	1.34 ~ 13.86
酵母菌	31.20 ~ 82.50	35.00 ~ 60.00	1.72 ~ 5.00	6.50 ~ 10.17
霉 菌	13.70 ~ 43.60	8.00 ~ 40.00	2.50 ~ 23.00	5.95 ~ 12.20

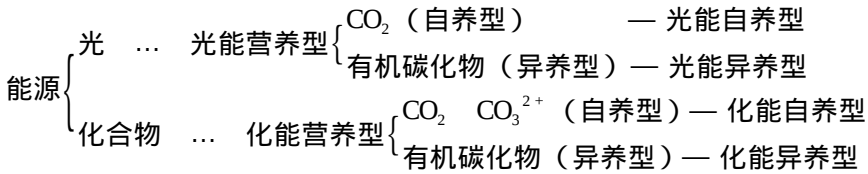
根据微生物有机元素组成分析数据（表 2-5），可得出化学组成实验式。例如细菌和酵母菌为 $C_5H_8O_2N$ ，霉菌为 $C_{12}H_{18}O_7N$ 。也有资料报道，细菌、原生动物和霉菌的化学组成实验式分别为 $C_5H_7O_2N$ 、 $C_7H_{14}O_3N$ 和 $C_{10}H_{17}O_6N$ 。微生物的化学组成实验式不是分子式，它只是用来说明组成有机体的各种元素之间有一定的比例关系。如， $C_5H_8O_2N$ 是表明细菌机体的 $n_C:n_H:n_O:n_N=5:8:2:1$ ，在培养微生物时可按比例供给营养。

表 2-5 微生物的有机物组成 占干重的百分比/%

元素	细菌	酵母菌	根霉
C	50.40	49.80	47.90
H	6.78	6.70	6.70
O	30.52	31.10	40.16
N	12.30	12.40	5.24

(2) 微生物的营养物及营养类型

微生物需要的营养物质有水、碳素营养源、氮素营养源、无机盐及生长因子。微生物种类繁多，营养条件各异。根据碳素来源不同，可将微生物分为自养型（利用 CO_2 ）及异养型（利用有机物）两大类；根据能量来源的不同，又可将其分为光能营养型（利用日光能）及化能营养型（利用无机或有机物氧化作用所产生长的化学能）两大类。一般来说，以能源、碳源不同分为四大类型。另外，微生物中还有些是属于兼性营养类型。



①水

水是微生物的组分，又是微生物代谢过程中必不可少的溶剂。它有助于营养物质的溶解和吸收，保证细胞内、外各种生物化学反应在溶液中正常进行。

②碳源和能源

凡能供给微生物碳素营养的物质，称为碳源。碳源的主要作用是构成微生物细胞的含碳物质（碳架）和供给微生物生长、繁殖及运动所需要的能量。从简单的无机碳化合物到复杂的有机含碳化合物，都可作为碳源。例如，糖类、脂肪、氨基酸、蛋白质、脂肪酸、丙酮酸、柠檬酸、淀粉、纤维素、半纤维素、果胶、木质素、醇类、醛类、烷烃类、芳香族化合物（如酚、萘、菲及蒽等）、氰化物（如氰化钾、氰氢酸和丙烯腈），各种低浓度的染料等。少数微生物还能以 CO_2 或 CO_3^{2-} 中的碳素为唯一的或主要的碳源。可见，自然界蕴藏着丰富的碳源。微生物最好的碳源是糖类，尤其是葡萄糖、蔗糖，它们最容易被微生物吸收和利用。许多碳源可同时作能源。

微生物细胞中的碳素含量相当高，占干物质质量的 50% 左右。可见，微生物对碳素的需求量最大。根据微生物对各种碳素营养物质同化能力的不同，可把微生物分为无机营养微生物和有机营养微生物两种。凡是有光合色素的微生物，例如藻类、光合细菌及原生动物中的植物性鞭毛虫，均属于无机营养微生物。大部分细菌、放线菌、酵母菌、霉菌、病毒等属于有机营养微生物。

A. 无机营养微生物

无机营养也称为无机自养。这一类型的微生物具有完备的酶系统，合成有机物的能力强， CO_2 、 CO 和 CO_3^{2-} 中的碳素为其唯一的碳源，能利用光能或化学能在细胞内合成复杂的有机物，以构成自身的细胞成分，而不需要外界供给现成的有机碳化合物。因此，这类微生物又称自养型微生物。根据能量来源不同，自养型微生物又分为光能自养型微生物和化能自养型微生物。

- 光能自养微生物 它们利用阳光（或灯光）作为能源，依靠体内的光合色素，利用 CO_2 和 H_2O 或 H_2S 合成有机物，构成自身细胞物质。

- 化能自养微生物 化能自养微生物不具有光合色素，不能进行光合作用。合成有机物所需的能量来自于它们氧化 S 、 H_2S 、 H_2 、 NH_3 、 Fe 等时，通过氧化磷酸化（氧化磷酸化是指利用生物氧化过程中释放出为的能量，合成 ATP 等含高能磷酸键化合物的作用，是生物体内能量转换的重要方式）产生的 ATP。 CO_2 是化能自养微生物的唯一碳源。化能

自养微生物有亚硝化细菌、硝化细菌、好氧的硫细菌（硫化细菌和硫磺细菌）及铁细菌。

自养微生物有严格自养微生物和兼性自养微生物两种。

B. 有机营养微生物

有机营养微生物也称为异养微生物。这类微生物具有的酶系统不如自养微生物完备，它们只能利用有机碳化合物作为碳素营养和能量来源。糖类、脂肪、蛋白质、有机酸、醇、醛、酮及碳氢化合物、芳香族化合物等都有可作为异养微生物的碳素营养。异养微生物有腐生性和寄生性两种，前者占大多数。

异养微生物又分为光能异养微生物和化能异养微生物。光能异养微生物是以光为能源，以有机物为供氢体，还原 CO_2 ，合成有机物的一类厌氧微生物，也称为有机光合细菌。化能异养微生物是一群依靠氧化有机物产生化学能而获得能量的微生物。它们包括绝大多数的细菌、放线菌及全部的真菌。

C. 混合营养微生物

混合营养微生物是既可利用无机碳（ CO_2 、 CO_3^{2-} 等）作为碳素营养，又可以利用有机碳化合物作为碳素营养，即为兼性自养微生物。例如，氢细菌属（Hydrogenomonas）、贝日阿托氏菌属（Beggiatoa）、发硫菌属（Thiothrix）、亮发菌属（Leucothrix）、新型硫杆菌（Thiobacillus novellus）、反硝化硫杆菌（Thiobacillus denitrificans），上述细菌既可以 S 、 H_2S 为能源，也能以低浓度的乙酸钠、琥珀酸及葡萄糖为能源和碳源。据报道，硝化细菌的某些株能以乙酸为碳源。

③氮源

凡是能够供给微生物氮素营养的物质称为氮源。氮源有 N_2 、 NH_3 、尿素、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾、硝酸钠、氨基酸和蛋白质等。氮源的作用是提供微生物合成蛋白质的原料。根据对氮源要求的不同，将微生物分为四类。

A. 固氮微生物

这类微生物能利用空气中的氮分子（ N_2 ）合成自身的氨基酸和蛋白质。如固氮菌、根瘤菌和固氮蓝藻。

B. 利用无机氮作为氮源的微生物

能利用氮（ NH_3 ）、铵盐（ NH_4^+ ）、亚硝酸盐（ NO_2^- ）、硝酸盐（ NO_3^- ）的微生物有亚硝化细菌、硝化细菌、大肠杆菌、产气杆菌、枯草杆菌、铜绿色假单胞菌、放线菌、霉菌、酵母菌及藻类等。

C. 需要某种氨基酸作为氮源的微生物

这类微生物叫氨基酸异养微生物。如乳酸细菌、丙酸细菌等。它们不能利用简单的无机氮化物合成蛋白质，而必须供给某些现成的氨基酸才能生长繁殖。

D. 从分解蛋白质中取得铵盐或氨基酸的微生物

这类微生物如氨化细菌、霉菌、酵母菌及一些腐败细菌，它们都有分解蛋白质的能力，产生 NH_3 、氨基酸和肽，进而合成细胞蛋白质。

④无机盐

无机盐的生理功能包括构成细胞组分，构成酶的组分和维持酶的活性，调节渗透压、氢离子浓度、氧化还原电位等，供给自养微生物能源。

微生物需要的无机盐有磷酸盐、硫酸盐、氯化物、碳酸盐、碳酸氢盐。这些无机盐中

含有钾、钠、钙、镁、铁等元素，其中，微生物对磷和硫的需求量最大。此外，微生物还需要锌、锰、钴、钼、铜、硼、钒、镍等微量元素。

磷 所有微生物都有需要磷酸盐。磷对微生物的生长、繁殖、代谢都起着极其重要的作用：A. 磷是微生物细胞合成核酸、核蛋白、磷脂及其他含磷化合物的重要元素。B. 磷是辅酶 I (NAD)、辅酶 II (NADP)、辅酶 A、辅羧化酶、各种磷酸腺苷 (AMP、ADP、ATP) 等的组分。C. 磷在糖代谢磷酸化过程中起关键性作用。D. 磷酸腺苷中的高能磷酸键在能量贮存和传递中起重要作用。E. 磷酸盐是重要的缓冲剂，能调节 pH。F. 磷酸盐可促进巨大芽孢杆菌的芽孢发芽和发育。

硫 硫是胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸的组分。硫胺素、生物素、辅酶 A、谷胱甘肽等都含有巯基 (—SH，也称硫氢基)。硫和硫化物是好氧硫细菌的能源。好氧硫细菌从无机硫化物和有机硫化物的氧化过程中取得能源、硫元素和供氢体。

镁 镁是己糖磷酸化酶、异柠檬酸脱氢酶、肽酶、羧化酶等的活化剂，是光合细菌菌绿素和藻叶绿素的重要组分。镁在细胞中起稳定核糖体、细胞质膜和核酸的作用。如果缺镁，核糖体和细胞质膜会遭受破坏，微生物将停止生长。不同微生物对镁的需求量不同。革兰氏阳性菌对镁的需求量比革兰氏阴性菌大 10 倍。例如，枯草芽孢杆菌需要质量浓度 25ml/L 的镁，蕈状芽孢杆菌需要 4025ml/L。而革兰氏阴性的灵杆菌需要 4 ~ 6ml/L。

重金属钴和镍与镁有拮抗作用。当镁的浓度较低，镍的质量浓度为 0.2mg/L 时，将会完全抑制产气杆菌的生长；当镁的质量浓度增加到 20ml/L 时，镍的抑制作用极小。

微生物需要的镁源有硫酸镁及其他镁盐

铁 铁是过氧化氢酶、过氧化物酶、细胞色素、细胞色素氧化酶等的组分。不同的微生物对铁的需求量不同。如，大肠杆菌需铁 2ml/L，污水生物处理中的活性污泥需铁量为 2ml/L，破伤风杆菌、梭状芽孢杆菌等厌氧菌需铁量为 0.5 ~ 0.6ml/L。铁是铁细菌的能源，铁细菌在氧化铁的过程中获得能量。

缺铁对大肠杆菌的影响表现在两方面：其一，影响酶的合成。若大肠杆菌缺铁，就不能合成甲酸脱氢酶，也就不能催化甲酸分解为 H_2 和 CO_2 。这样，分解葡萄糖时，只产酸不产气。其二，影响细胞分裂。例如，大肠杆菌在分裂时若缺铁，则其核物质只增长、延长而不分裂，整个细胞呈丝状生长。若在污水生物处理中大肠杆菌出现丝状生长，就会引起活性污泥丝状膨胀，造成活性污泥在二沉池中的沉淀效果差，活性污泥随水流失，影响出水质量。

铁是细胞色素和铁氧化还原蛋白的氧化还原反应中必不可少的电子载体，在电子传递体系中起至关重要的作用。

钙 钙是微生物重要的阳离子，是蛋白酶的激活剂，是细菌芽孢的重要组分。钙使芽孢具有耐热性，钙离子还起稳定细胞壁的作用。

钾 钾是微生物重要的阳离子，是酶的激活剂。钾离子对磷的传递、ATP 的水解、苹果酸的脱羧反应等起重要作用。

微量元素 微量元素是微生物维持正常生长发育所必需的，包括锰、锌、钴、镍、铜、钼、钒、碘、溴、硼等。它们极微量就可刺激微生物的生命活动。许多微量元素是酶的组分，或是酶的激活剂。微生物对微量元素的需求量极小，一般培养基中微量元素的质量浓度达到 0.1mg/L 就够了。天然有机物一般都含上述微量元素，当用它们配培养基时，

不需再另外添加微量元素。过量的微量元素会引起微生物中毒。单独一种微量元素过量，其毒性更大。

锰是黄嘌呤氧化酶的组分；铜是多酚氧化酶、乳糖酶及抗坏血酸氧化酶的组分；钴参与维生素 B_{12} 的组成；锌是乙醇脱氢酶和乳酸氢酶的活性基，是酶的激活剂；钼与钒促进固氮作用。

镍、钴、钼对产甲烷菌的生长具有特别意义，尤其是镍。例如，嗜热自养甲烷杆菌要形成 1g 细胞干物质，需要培养基中 $NiCl_2$ 的浓度为 150n mol/L、 $CoCl_2$ 的浓度为 20n mol/L 和 Na_2MoO_4 的浓度为 20n mol/L。镍是产甲烷菌的 F_{430} 和一氧化碳脱氢酶的组分，促进产甲烷菌的生长和甲烷的形成。培养基中镍的浓度可达 100 ~ 500n mol/L，其中有 50% ~ 70% 的镍用于合成 F_{430} ，其余吸收的镍被结合在蛋白质部分。

微量元素之间有协同作用，也有拮抗作用。铁、锌和锰可促进铜的作用，锰却抵消锌的促进作用。

⑤ 生长因素

微生物在具有上述各种物质后仍生长不好，则需供给生长因子。微生物需要的生长因子有 B 族维生素、维生素 C、氨基酸、嘌呤、嘧啶、生物素及烟酸等。氨基酸被吸收后参与合成蛋白质。嘌呤和嘧啶进入细胞后，先转变为核苷和核苷酸，进而参与合成核酸和辅酶。

多数异养微生物及自养微生物有合成生长因子的能力。例如，酵母菌能合成核黄素，链霉菌和丙酸杆菌能合成维生素 B_{12} 。酵母浸出液、动物肝浸出液和麦芽浸出液含各种生长因子。

⑥ 碳氮磷比

水、碳源、氮源、无机盐及生长因子为微生物共同需要的物质。由于不同微生物细胞的元素组成比例不同，对各营养元素的比例要求也不同，这里主要指碳氮比（或碳氮磷比）。如，根瘤菌要求碳氮比为 11.5: 1，固氮菌要求碳氮比为 27.6: 1，霉菌要求碳氮比为 9: 1，土壤中微生物混合群体要求碳氮比为 25: 1；污（废）水生物处理中好氧微生物群体（活性污泥）要求碳氮磷比为 $BOD_5: N: P = 100: 5: 1$ ，厌氧消化污泥中的厌氧微生物群体对碳氮磷比要求 $BOD_5: N: P = 100: 6: 1$ ；有机固体废物、堆肥发酵要求的碳氮比为 30: 1，碳磷比为 (75 ~ 100): 1。为了保证污（废）水生物处理和有机固体废物生物处理的效果，要按碳氮磷比配给营养。城市生活污水能满足活性污泥的营养要求，不存在营养不足的问题。但有的工业废水缺某种营养，当营养量不足时，应供给或补足。某些工业废水（如酒精废水）缺氮；洗涤剂废水磷过剩，也缺氮。对此可用粪便污水或尿素补充氮。若有的废水缺磷，则可用磷酸氢二钾补充。但如果工业废水不缺营养，就切勿添加上述物质，否则会导致反驯化，影响处理效果。

2.4.2 微生物的培养基

微生物的培养基是指培养微生物时，根据各种微生物的营养需要，将水、碳源、氮源、无机盐和生长因素按一定比例配制而成的微生物营养物。

配制培养基时，首先按配方称取各种营养物质，取所需要量的蒸馏水（去离子水或自来水，视实验要求而定）加入容器中，然后将培养基的成分按照缓冲化合物，无机元

素、微量元素、维生素及其他生长因素的顺序逐一加入，待每一种成分完全溶解后方可加下一种成分，否则会引起沉淀物形成。为了避免产生金属沉淀物，可加入适量的 EDTA（乙二胺四乙酸）或 NTA（氮川三乙酸）等螯合剂，与金属离子结合，使其保持溶解状态。EDTA 的常用浓度为 0.01%。待全部营养物质都溶解后，用 10% 的 NaOH 或 HCL 调整 pH。由于在微生物的培养过程中会产生有机酸、CO₂ 和 NH₃ 等因而会引起培养基 pH 值的改变。加入缓冲化合物的目的，就是要保持培养基 pH 值稳定。常用的缓冲化合物有 K₂HPO₄、KH₂PO₄、NaHCO₃ 等。调好 pH 值后，置高压蒸气灭菌锅内灭菌 20min ~ 30min，备用。

任何一种培养基均可配制成液体、半固体（凝胶）和固体三种。培养基按配方配好后不加凝固剂（如琼脂、明胶、硅胶等），即为液体培养基；如果加入 1.5% ~ 3.0% 的凝固剂，即成为固体培养基；如虹加入 0.2% ~ 0.5% 的凝固剂，即成为半固体培养基。

根据实验目的和用途的不同，培养基可分为四类：

（1）基础培养基。由牛肉膏、蛋白胨、氯化钠按一定比例配制而成。pH 偏碱性，大多数微生物均可在其上生长。

（2）选择培养基。利用微生物对各种化学物质敏感程度的差异，在培养基中加入染料、胆汁酸盐、金属盐类、酸、碱或抗生素等其中的一种，用以抑制非目的微生物的生长并使所有分离的微生物生长繁殖的培养基，叫选择培养基。例如，在培养基中加入胆汁酸盐，可以抑制革兰氏阳性菌，有利于革兰氏阴性菌的生长。麦康盖培养基为含胆汁酸盐的糖发酵培养基，用于大肠菌群（革兰氏阴性杆菌）的培养，可使肠道中革兰氏阳性的肠球菌和产气荚膜杆菌受抑制不能生长，从而，大肠杆菌群被选择出来。乳糖发酵培养基也是适合于大肠菌群生长的选择培养基。

（3）鉴别培养基。几种细菌由于对培养基中某一成分的分解能力不同，其菌落通过指示剂显示出不同的颜色而被区分开，这种起鉴别和区分不同细菌作用的培养基，叫鉴别培养基。例如，大肠菌群中的大肠埃希氏菌、枸橼酸盐杆菌、产气杆菌、副大肠杆菌等均能在远藤氏培养基上生长，但他们对乳糖的分解能力不同：前三者能分解乳糖，但分解能力有强有弱，大肠埃希氏菌分解能力最强，菌落呈紫红色带金属光泽；枸橼酸盐杆菌次之，菌落呈紫红色或深红色；产气杆菌第三，菌落呈淡红色。副大肠杆菌不能分解乳糖，菌落无色透明。这样，这四种菌被鉴别区分开来了。常用的鉴别培养基还有醋酸铅培养基、伊红—美蓝（EMB）培养基等。

（4）加富（富集）培养基。由于样品中细菌数量少，或是对营养要求比较苛刻不易培养出来，故用特别的物质或成分促使微生物迅速生长。这种用特别物质或成分配制而成的培养基，称为加富培养基。所用的物质有植物（青草或干草）提取液、动物组织提取液、土壤浸出液、血和血清等。

2.4.3 营养物质进入微生物细胞的方式

微生物没有专门的摄食器官或细胞器（原动物、微型后生动物除外）。各种营养物质依靠细胞质膜的功能进入细胞。第二章中已述及细胞质膜的基本结构。它们是疏水的膜蛋白与不连续的脂双层的镶嵌结构，其上有许多小孔，双层膜中还有由碳氢链组成的非极性区。微生物的营养物质各种各样，有水溶性和脂溶性，有小分子和大分子。不同营养物

质进入细胞的方式也不同，概括有以下四种方式：

(1) 单纯扩散

单纯扩散是物理过程，不包括细胞的主动代谢。杂乱运动的、水溶性的溶质分子（水、无机盐、 O_2 、 CO_2 ）通过细胞质膜中含水的小孔从高浓度区向低浓度区扩散，不与膜上的分子发生反应。这种扩散是非特异性的，扩散速度慢。脂溶性物质被磷脂层溶解而进入细胞，因而脂溶性物质比水溶性物质易透过细胞质膜。单纯扩散的结果使某种化合物在细胞内的浓度与在细胞外的趋于相等。这一过程不需消耗能量。

(2) 促进（成）扩散

单纯扩散是被动的运输过程，营养物透过细胞质膜的速度慢，不能满足微生物对营养物质的需要。有些非脂溶性物质，如糖、氨基酸、金属离子等，不能通过由碳氢组成的非极性区。然而，微生物另具有一些特殊的生理结构，能帮助上述物质顺利而快速地通过细胞质膜。这些特殊的结构即位于细胞质膜上的特异性蛋白质，它们在细胞质膜外表面与营养物质发生可逆性结合，携带营养物质通过细胞质膜进入细胞，然后与营养物质分离，它本身再返回细胞质膜外表面与另一营养物质可逆性结合，如此不断循环因特异蛋白具有运载功能，故称为载体蛋白。载体蛋白具有类似酶的特异性，能使某些分子通过，而另一些相近的分子不能通过，彼此竞争。例如：甘氨酸的吸收被丙氨酸抑制，反之亦然。由于载体蛋白质与酶极相似，因而把它归为酶类，叫渗透酶。细胞质膜上有多种渗透酶，一种渗透酶运送一类物质通过细胞质膜进入细胞。所以，促进扩散是利用渗透酶将营养物质从细胞质膜的外表面运送到细胞质膜的内表面并释放的过程，这一过程依靠浓度梯度驱动，不消耗能量，渗透酶起加速运输的作用。促进扩散多见于真核生物，如红细胞和酵母菌中糖的运输。

(3) 主动运输

当微生物细胞内所积累的营养物质的浓度高于细胞外的浓度时，营养物质就不能按浓度梯度扩散到细胞内，而是逆浓度梯度被“抽”进细胞内。这一过程需要渗透酶和消耗能量。渗透酶在这过程中起着改变平衡点的作用（这点与一般酶不同）。这种需要能量和渗透酶的逆浓度积累营养物的过程，叫主动运输。

(4) 基团转位

基团转位是又一种需要代谢能量的运输方式。通过基团转位进入细胞的物质有糖（葡萄糖、甘露糖、果糖及糖的衍生物 N—乙酰葡萄糖胺）、嘌呤、嘧啶、乙酸等。

2.4.4 微生物的产能代谢

微生物在其生长、繁殖过程中，需要吸收营养物质合成细胞组分。微生物的产能代谢就是为合成细胞组分及维持生命活动提供所需要的能量。

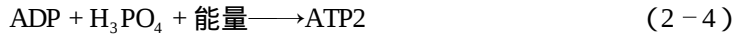
(1) 产能代谢与呼吸的关系

微生物呼吸作用的本质是氧化与还原的统一过程。在这一过程中，包含着能量的产生和转移。由此可见，微生物的呼吸与其产能代谢是紧密联系的。微生物的呼吸有好氧呼吸、无氧呼吸和发酵三种类型。它们都是氧化还原反应，微生物的产能代谢正是通过三种氧化还原反应实现的，微生物也正是从这些氧化还原反应中获得生命活动所需要的能量。

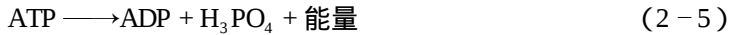
微生物通过产能代谢获得的能量，一部分变为热散发掉，一部分供合成反应和生命的

其他活动所需，另有一部分能量被贮存在 ATP 中，以备生长、运动等用。

ATP 是微生物能量的转移中心。微生物把从呼吸过程中获得的能量用于细胞组分的合成时，需要通过 ATP 来实现。在好氧呼吸、无氧呼吸和发酵过程中，微生物通过氧化磷酸化或光合磷酸化生成 ATP，即：



由上述反应式可知，ADP 是能量的载体，ATP 是能量库。它们分别含有一个和两个高能磷酸键（P—P），每摩尔高能磷酸键含有 31.4KJ 的能量。当微生物合成细胞组分时，ATP 分解，放出能量，供其使用，即：



ATP 只是一种短期的贮能物质。微生物长期贮有的形式是在体内形成淀粉、糖原、聚β—羟基丁酸（缩写为 PHB）、异染料及硫粒等，以备缺探测营养时用。

(2) 产能代谢

在微生物体系中，能量的释放和 ATP 的生成都是通过呼吸实现的。根据最终电子受体或最终受氢体的不同，微生物的呼吸可分为发酵、好氧呼吸和无氧呼吸三种。

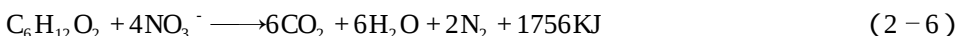
①发酵。在无外在电子受体时，微生物能使底物中的一些有机物发生部分氧化，以基中间代谢产生作为最终电子受体，其产生为低分子有机物，释放少量能量，其余的能量保留在最终产物中。这种没有外在电子受体时，微生物对能源的氧化称为发酵。例如，葡萄糖逐步分解即通常所说的糖酵解过程。糖酵解途径几乎是所有具有细胞结构的生物所共有的主要代谢途径，以称为 EMP 途径或 E—M 途径。

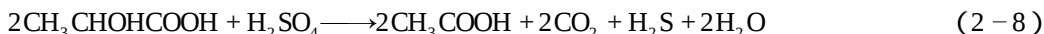
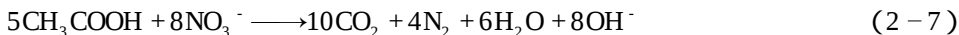
糖酵解的电子受体是辅酶 NAD，它接受两个电子后变成 NADH_2 。糖酵解的产生是 ATP、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 和 CO_2 。微生物每氧化 1mol 葡萄糖需要消耗 2mol 的 ATP 提供能量，氧化后生成 2mol 的 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、2mol 的 CO_2 和 4mol 的 ATP。所以微生物每氧化 1mol 葡萄糖的最终产物是 2molATP、2mol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 和 2mol CO_2 。

②好氧呼吸。当存在外在最终电子受体分子氧（ O_2 ）时，底物可全部被氧化成 CO_2 和 H_2O ，并产生 ATP。这种有外在最终电子受体 O_2 存在时，微生物对能源的氧化称为好氧呼吸（如呼吸作用）。

在好氧呼吸过程中，能源氧化释放出的电子首先转移给 NAD，使 NAD 还原为 NADH_2 ； NADH_2 再氧化释放出电子，恢复成 NAD，将电子转移给电子传递体系，电子传递体系再将电子转移给最终电子受体 O_2 ， O_2 得到电子被还原，与从能源上脱下来的 H^+ 结合，生成 H_2O 。底物氧化释放出的能量，同样是贮存在 ATP 中。

③无氧呼吸。当外在的最终电子受体不是氧分子，而是其他无机化合物时，微生物对能源的氧化称为无氧呼吸。无氧呼吸的氧化底物一般为有机物，最终电子受体通常是 NO_2^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 等，在底物被氧化成 CO_2 的同时，生成 ATP，贮存能量。例如，微生物通过无氧呼吸对葡萄糖、乙酸和乳酸的氧化过程可表示为：





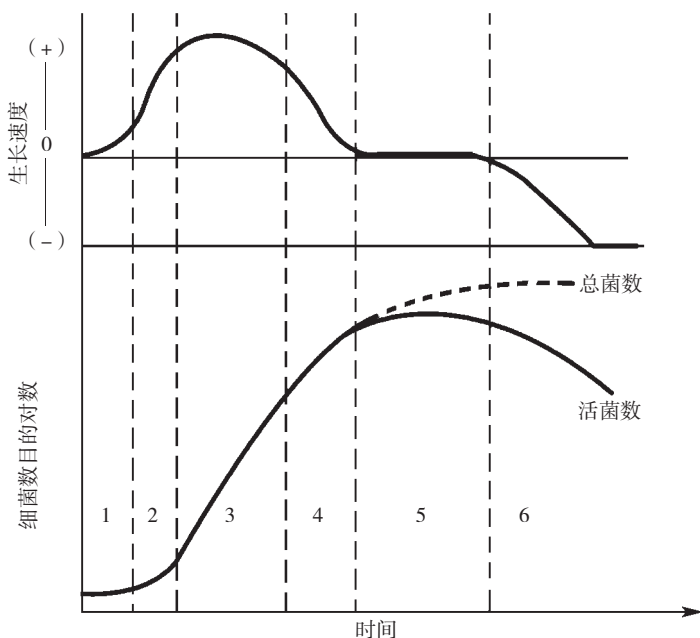
2.5 微生物的生长

2.5.1 微生物的生长繁殖

微生物在适宜的环境条件下，不断吸收营养物质，按照自己的代谢方式进行新陈代谢活动。正常情况下，当同化作用（指在新陈代谢过程中，生物体将从食物中摄取的养料转换成自身的组织物质，并储存能量的过程）大于异化作用（指在新陈代谢过程中，生物体将自身的组织物质分解以释放能量或排出体外的过程）时，微生物的细胞质量不断增长，即为生长。细胞个体生长的过程称为发育。当细胞个体生长到一定程度时便发生分裂，使得个体数目增加，这就是单细胞微生物的繁殖（裂殖）。两次细胞分裂之间的时间，即为微生物的世代时间，脱硫菌、氧化亚铁硫杆菌的世代时间为 6.5 ~ 15 小时。微生物的生长与繁殖是交替进行的。

在一定的培养条件下，每一种微生物的世代时间都是一定的。然而当培养条件变化时，微生物的世代时间也随之而改变。对于多细胞微生物，如果只是细胞数目增加，个体数目不增加，就称为生长；如果细胞数目和个体数目都增加，则称为繁殖。

微生物生长过程中，其生长速度不是始终如一，而是会随时间呈现出有规律的变化。如果以培养时间为横坐标，以单位容积培养液中菌量的对数值或生长速度为纵坐标，即可得到细菌的生长曲线，如图 2-13 所示。了解细菌的生长曲线对于掌握细菌（包括脱硫菌）的生长规律非常重要。



1, 2—延迟期; 3—对数期; 4, 5—恒定期; 6—衰亡期

图 2-13 细菌生长曲线

根据微生物速度的不同，可将菌体生长划分为 4 个时期：

(1) 延迟期，又称停滞期。将少量微生物接种到某一种培养基中时，它们并不能立即生长繁殖，而需要经过一段适应期，此后它们才能在新的培养基中生长繁殖。通常把这段适应时间称作延迟期。经过这一时期，一部分微生物逐渐适应了新的生活环境，开始生长繁殖；而另一部分却会因环境不适而死亡。

这一时期内细菌生长速度近乎于零，细菌数几乎不变。处于延迟期细胞的特点是代谢活跃，外观表现为细胞粗长。此时的细胞对外界不利因素的影响较敏感。延迟期太长不利于工业生产，应尽量设法缩短延迟期。常用的措施有增加接种量及采用最适菌龄（即对数期）的细菌。

(2) 对数期，又称指数期。此期最显著的特点是细菌细胞数目以稳定的速率按几何级数增加。这一时期的生长特点是微生物具有恒定的最大细胞分裂速率或倍增速率。细菌个体的增加呈现出 $20 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$ 的规律。若分批培养中单位体积培养基内细胞的初始数目为 N_0 ，则经 n 次分裂后，细胞数 N 即为 N_0 的 2^n 倍，于是有：

$$\lg N = \lg N_0 + n \lg 2 \quad (2-9)$$

所以，细胞的分裂次数 n 可表示为：

$$n = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2 \quad (2-10)$$

细胞在 1h 内的分裂次数称为分裂速率，记为 V ，则：

$$V = \frac{n}{t} = \frac{\lg N - \lg N_0}{(t_N - t_0) \lg 2} \quad (2-11)$$

式中 t ——细胞分裂 n 次所用的时间；

t_N ——培养基中细胞数目为 N 时所对应的时刻；

t_0 ——培养基中细胞数目为 N_0 时所对应的时刻。

细胞分裂 1 次的时间间隔称为世代时间，记为 g ，则：

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{V} \quad (2-12)$$

综合上述各式，得：

$$\lg N = \lg N_0 + (V \lg 2) t \quad (2-13)$$

式 (2-18) 表明，微生物在指数生长期，其个体数目的对数与时间呈直线关系。直线的斜率为分裂速率 V 的 $\lg 2$ 倍。细胞代谢最活跃、繁殖最快。处于对数期的微生物，个体形态和生理特征比较一致。根据细菌在生长期各自生理特性，研究脱硫微生物菌种遗传和代谢性能以及煤炭脱硫研究中接种的菌种都应采用处于对数生长期的菌体。

(3) 恒定期，又称稳定期或最高生长期，此时菌量最多。整个培养物中活细胞总数处于动态平衡，从外表看此时细菌的生长速度趋于零。

(4) 衰亡期。继恒定期后，细胞死亡速度超过繁殖速度，群体中活菌总数逐渐下降，出现“负生长”。到最后，活菌按几何级数下降，所以又被称为“对数死亡”段。

微生物生长动力学的研究，就是通过批量培养方法来确定微生物的世代时间 g 、分裂

速度 V、产量、延滞期持续时间等一系列有关微生物生长的动态参数。

2.5.2 微生物的生存因子

(1) 温度

温度是微生物的重要生存因子。在适宜的温度范围内，温度每升高 10℃，酶促反应速度将提高 1~2 倍，微生物的代谢速率和生长速率均可相应提高。适宜的培养温度使微生物以最快的生长速率生长。过高或过低的温度均会降低代谢速率及生长速率。

在适宜的温度范围内微生物能大量生长繁殖。根据一般微生物对温度（t）的最适生长需求，可将微生物分为四大类。以细菌为例，分为四类（表 2-6）：嗜冷菌、嗜中温菌、嗜热菌及嗜超热菌。大多数细菌是嗜中温菌，嗜冷菌和嗜热菌占少数。

表 2-6 低温、中温和高温细菌的生长温度范围 单位

细菌	最低温度	最适温度	最高温度
嗜冷菌	- 5 ~ 0	5 ~ 10	20 ~ 30
嗜中温菌	5 ~ 10	25 ~ 40	45 ~ 50
嗜热菌	30	50 ~ 60	70 ~ 80
嗜超热菌	55℃ 以上	70 ~ 105	110 ~ 113

嗜热菌或嗜超热菌是特殊的微生物，这两类菌包括芽孢杆菌和嗜热古菌。它们还可细分，如表 2-7 所示：凡在 55℃ ~ 75℃ 生长良好，在 37℃ 以下不能生长的为专性嗜热菌；凡在 55℃ ~ 75℃ 生长良好，在 37℃ 以下能生长的为兼性嗜热菌；75℃ 以上生长良好的为超嗜热菌，如古菌（表 2-8）。

表 2-7 嗜热菌的分类及其生长温度 单位

嗜热菌类型	嗜热菌		
	嗜超热菌	中度嗜热菌（55℃ ~ 75℃）	
		专性嗜热菌	兼性嗜热菌
生长温度	75℃ 以上生长良好	75℃ 以下不能生长	75℃ 以下能生长

表 2-8 几种微生物的生长最高温度 单位：

微生物	原生动物	真核藻类	真菌	蓝细菌	细菌	古菌
温度	45 ~ 50	56	60	70 ~ 73	> 90	113

表 2-9 几种菌体所适应的温度（℃）范围和最适温度 单位：

微生物	假单胞菌	硫氰氧化杆菌	维氏硝化杆菌	硝化球菌属	亚硝化球菌属	动胶团属
温度范围	25 ~ 35	27 ~ 33	10 ~ 37	15 ~ 30	2 ~ 30	10 ~ 45
最适温度	30		28 ~ 30	25 ~ 30	20 ~ 25	28 ~ 30

嗜冷微生物（亦叫低温性微生物），尤其是专性嗜冷微生物能在 0℃ 生长。有的在摄

氏零下几度甚至更低也能生长。它们的最适宜温度在 5 ~15 之间。所以，在低温下冷藏的肉、牛奶、蔬菜、水果等仍有可能被嗜冷细菌或嗜冷霉菌引起变质，甚至腐烂。只有使食物冻结，才能破坏微生物生长。即使在南、北极终年冰冻（夏季只有几个星期不冰冻）的环境中仍然有细菌生长。在冰河的表面和雪原地区经常能看见到一种嗜冷藻，叫雪藻。大多数雪藻属于 *Chlamydomonas ni-valis*，其孢子呈现鲜艳的红色。

嗜冷微生物能在低温生长的原因是：①嗜冷微生物具备更有效地催化反应的酶；②其主动输送物质的功能运转良好，使之能有效地集中必需的营养物质。③嗜冷微生物的细胞质膜含有大量的不饱和脂肪酸，在低温下能保持半流动性。

低温对嗜中温和高温的微生物生长不利。在低温条件下，微生物的代谢极微弱，基本处于休眠状态，但不致死亡。嗜中温微生物在低于 10 的温度下不生长，因为蛋白质合成的启动受阻，不能合成蛋白质。又由于许多酶对反馈抑制异常敏感，很易和反馈抑制剂紧密结合，从而影响微生物的生长。处于低温下的微生物一旦获得适宜温度，即可恢复活性，以原来的生长速率生长繁殖。

(2) pH

微生物的生命活动、物质代谢与 pH 密切关系。不同的微生物要求不同的 pH（表 2-10）。大多数细菌、藻类和原生动物的最适 pH 为 6.5 ~ 7.5，它们的 pH 适应范围在 4 ~ 10 之间。细菌一般要求中性和偏碱性。某些细菌，例如氧化硫硫杆菌和极端嗜酸菌，需在酸性环境中生活，其最适 pH 为 3，在 pH 以 7.5 ~ 8.0 最适宜。酵母菌和霉菌要求在酸性或偏碱性的环境中生活，最适 pH 范围在 3 ~ 6，有的在 5 ~ 6，其生长极限在 1.5 ~ 10 之间。凡对 pH 变化适应性强的微生物，对 pH 要求不甚严格；而对 pH 变化适应性不强的微生物，则对 pH 要求严格。

表 2-10 几种微生物的生长最适 pH 和 pH 范围

微生物种类	pH		
	最低	最适	最高
圆褐固氮菌（ <i>Azotobacter chroococcus</i> ）	4.5	7.4 ~ 7.6	9.0
大肠埃希氏菌（ <i>Escherichia coli</i> ）	4.5	7.2	9.0
放线菌（ <i>Actinomyces</i> sp.）	5.0	7.0 ~ 8.0	10.0
霉菌（mold）	2.5	3.8 ~ 6.0	8.0
酵母菌（yeast）	1.5	3.0 ~ 6.0	10.0
小眼虫（ <i>Euglena gracilis</i> ）	3.0	6.6 ~ 6.7	9.9
草履虫（ <i>Paramaccum</i> sp.）	5.3	6.7 ~ 6.8	8.0

表 2-11 几种嗜酸微生物

嗜酸微生物	最低 pH	最适 pH	最高 pH
细菌			
氧化硫硫杆菌（ <i>Thiobacillus thiooxidans</i> ）	<1.0	3.0	-

(续表)

嗜酸微生物	最低 pH	最适 pH	最高 pH
(<i>Thiobacillus pros perus</i>)	1		4
(<i>Thiobacillus albertis</i>)	2		4
氧化铁细螺菌 (<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>)	1.5	2.5 ~ 3.0	4.0
(<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>)	1.1	2	5.0
嗜酸硫杆菌 (<i>Thiobacillus oicidophpHilus</i>)	2		4
(<i>Thiobacillus cuprinus</i>)	3		4
嗜酸嗜热原质体 (<i>Thermoplasma acidophilum</i>)	0.5		4
(<i>Acidianus in fernus</i>)	1		6
(<i>Metallosphaera sedula</i>)	1.0		4.5
硫化叶菌 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)	1	4	6
(<i>Thermofilum pendens</i>)	4.0	5	6.7
(<i>Thermoproteus tenax</i>)	2.5	5 ~ 6.5	6
(<i>Pyrodictium occultum</i>)	5	5.5	7
(<i>Thermodiscus maritimus</i>)	5	5.5	7

在培养微生物的过程中,随着微生物的生长繁殖和代谢活动的进行,培养基的 pH 会发生变化,有的由碱性变酸性,有的由酸性变碱性。其原因有多方面。例如,大肠杆菌在 pH 为 7.2 ~ 7.6 的培养基中生长,分解葡萄糖、乳糖产生有机酸这会引起培养基的 pH 下降,培养基变酸。微生物在含有蛋白质、蛋白胨及氨基酸等中性物质培养基中生长,这些物质可经微生物分解,产生 NH_3 和胺类等碱性物质,使培养基 pH 上升。另外,由于细胞选择性地吸收阳离子或阴离子,也会改变培养基的 pH。如,用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作无机氮源,当 NH_4^+ 被菌体吸收用于合成氨基酸和蛋白质后,剩下 SO_4^{2-} 会使 pH 下降;尿素经细菌分解产生 NH_3 ,会使培养基 pH 上升;用 NaNO_3 作氮源时, NO_3^- 被吸收后,培养基的 pH 值会上升。因此,在考虑培养基成分时,要加入缓冲性物质,如磷酸盐 (KH_2PO_4 和 K_2HP_4) 等。

pH 值给微生物生长带来的不利影响主要表现在:

①由于 pH 值的改变,会引起微生物表面的电荷改变,进而影响它们对营养物质的吸收;

②pH 值的改变会影响培养基中有机化合物的电离,从而改变它们渗入微生物细胞的难易程度,因为大多数离子状态化合物比分子状态化合物更容易渗入微生物的细胞;

③pH 值的改变会影响酶的活性,进而影响微生物细胞内生物化学过程的正常进行。

(3) 氧化还原电位

氧化还原电位通常用符号 Eh 表示,其单位是 V 或 mV。氧化环境具有正电位,还原环境具有负电位。在自然界中, Eh 的上限是 +0.82V,此时环境中存在浓度很高的氧气 (O_2),而且没有利用 O_2 的系统存在;其下限是 -0.4V,是充满氢气 (H_2) 的环境。一般

来说,好氧微生物要求的 E_h 为 $+0.3 \sim +0.4V$, E_h 低于 $+0.1V$ 时,生长困难;兼性厌氧微生物在 $E_h > +0.1V$ 时进行好氧呼吸,在 $E_h < +0.1V$ 时进行无氧呼吸;厌氧微生物则要求 E_h 为 $-0.2 \sim -0.25V$ 。

(4) 溶解氧的浓度

根据微生物的呼吸与分子氧的关系,可以把它们分为好氧微生物、兼性厌氧(或兼性好氧)微生物和厌氧微生物三大类。

好氧微生物只能在有氧存在的条件下生存。属于这一类的微生物主要有芽孢杆菌属、假单胞菌属、动胶菌属、黄杆菌属、微球菌属、球衣菌属、硝化细菌、硫化细菌、大多数放线菌、霉菌及原生动物等。当氧供应不足时,这类微生物的生长会受到严重影响。

兼性厌氧微生物具有脱氢酶和氧化酶,所以它们既能在无氧条件下生活,也能在有氧条件下生存。属于这一类的微生物主要有酵母菌和硝酸盐还原菌等。

厌氧微生物只能在无氧条件下生存,它们进行发酵或无氧呼吸。属于这一类的微生物主要有梭状芽孢杆菌属、脱硫弧菌属、产甲烷菌等。它们要求极低的氧化还原电位,所以接种和培养均需在无氧条件下进行。

(5) 水的活度与渗透压

①水的活度

一切生物生活都需要水。不同环境中水的含量是有变化的。水的可利用性既取决于水的含量,也取决于水被吸附的紧密程度和有机体把水移进体内的效力大小。溶质变成水合物的程度也影响水的可利用性。水的活度 a_w 是表示水被吸附和溶液因子对水可利用性影响的一种指标。水的活度 a_w 表示在一定温度(如 $25^\circ C$)下,某溶液或物质在与一定空间空气相平衡时的含水量与空气饱和水量的比值,用小数表示。它与相对湿度相对应。相对湿度是含水量与空气饱和水量的比值,用小数表示。它与相对湿度相对应。相对湿度是气象学概念,表示在一定温度下空气的含水量对空气饱和水量的比值,用百分率表示。用测定蒸气相中相对湿度的方法得到溶液或物质的 a_w 。如空气的相对湿度为 75% ,此刻溶液或物质的 a_w 为 0.75 。不同物质在相同浓度下的 a_w 不同。

水的活度分基质的水活度(受吸附的影响)和渗透压的水活度(受溶质相互作用的影响)。对于在食品、土壤、固体培养基上生长的微生物及空气微生物,基质的水活度比渗透压的水活度重要,它们普遍受到基质的水活度的影响。例如,土壤微生物的活性明显受土壤水状态的影响。

大多数微生物在 a_w 为 $0.95 \sim 0.99$ 时生长最好。嗜盐细菌属(*Halobacterium*)的细菌很特殊,它们在 a_w 低于 0.80 的含 $NaCl$ 的培养基中生长最好。少数霉菌和酵母菌在 a_w 为 $0.60 \sim 0.70$ 时仍能生长。在 a_w 为 $0.60 \sim 0.65$ 时大多数微生物停止活动。

②渗透压

任何两种浓度的溶液被半渗透膜隔开,均会产生渗透压。如,用半渗透膜将质量浓度为 $10g/L$ 的盐溶液与质量浓度为 $20g/L$ 的盐溶液隔开,质量浓度为 $10g/L$ 的盐溶液中的水分子透过半渗透膜进入质量浓度为 $20g/L$ 的盐溶液中,质量浓度为 $20g/L$ 的盐溶液中的水分子也有透过半渗透膜进入质量浓度为 $10g/L$ 的盐溶液中,但量少,于是质量浓度为 $20g/L$ 的盐溶液一侧的液面升高。当两液面差产生的压力足够阻止水再流动时,渗透停止,这时出现的两液面高差间的压力就是渗透压。

溶液的渗透压决定于其浓度。溶质的离子或分子数目越多渗透压越大。在同一质量浓度的溶液中, 含小分子溶质的溶液渗透压比含大分子溶质的溶液大, 例如, 质量浓度为 50g/L 的葡萄糖溶液的渗透压大于质量浓度为 50g/L 的蔗糖溶液的渗透压。离子溶液的渗透压比分子溶液大。通过测定某溶液的渗透压。可算出该溶液中溶质的分子量。培养基中无机盐的渗透压为 $(0.5 \sim 1) \times 101\text{kPa}$, 加入糖及其他成分后产生的总渗透压为 $(3.5 \sim 7) \times 101\text{kPa}$ 。在细菌体中磷酸盐、磷酸酯、嘌呤、嘧啶等以高度浓缩的状态存在, 革兰氏阳性菌在菌体内还浓聚某些氨基酸, 使得细菌体内的渗透压较高, 约 $(20 \sim 25) \times 101\text{kPa}$; 革兰氏阴性菌的渗透压低些, 约 $(5 \sim 6) \times 101\text{kPa}$ 。培养基的渗透压通常不会大于菌体内的渗透压, 即使略大一些也无妨, 因为细菌的细胞壁和细胞质膜有一定的坚韧性和弹性, 对细菌有保护作用。

2.5.3 其他对微生物不利的环境因子

(1) 辐射

除无线电波外, 其他辐射一般都有生物学效应。例如, 波长小于 1000nm 的红外线可以被光合细菌用作能源; 波长为 380nm ~ 760nm 的可见光是藻类进行光合作用的主要能源。紫外线、X 射线和 γ 射线对微生物都有一定程度的杀伤作用。实践中应用的紫外线灭菌方法就是基于这一原理。紫外线的波长范围为 200nm ~ 390nm, 波长为 260nm 左右的紫外线杀菌力最强, 这是因为微生物细胞中的核酸、嘌呤、嘧啶以及蛋白质等对紫外线的吸收能力特别强, DNA 和 RNA 对紫外线的吸收波峰就在 260nm 处, 当这些物质吸收大量的紫外线时, 会引起 DNA 的结构发生变化, 使其失去复制能力, 从而导致微生物死亡。用于灭菌的紫外线灭菌灯是低压水银灯, 能产生强烈的、波长为 253.7nm 的紫外线, 其杀菌力强且稳定。然而, 由于紫外线的穿透力较差, 不能穿透不透明的物质, 甚至连一层玻璃都穿不透, 所以它只能用来对空气和照射到的物体表面进行灭菌。

(2) 超声波对微生物的影响

频率在 20000Hz 以下的声波人听得见, 频率超过 20000Hz 的声波人听不见, 叫超声波。超声波具有强烈的生物学作用, 几乎所有的细菌体都能被超声波所破坏, 只是敏感程度各有不同。超声波的杀菌效果与其频率, 处理时间, 细菌的大小、形状及菌数有关。超声波频率高, 杀菌效果好; 杆菌比球菌易被超声波杀死; 大杆菌比小杆菌易被杀死。小的细菌可能躲在超声波的波节处而不受损伤, 因而在超声波处理过程中, 小部分细菌仍可存活。

超声波杀菌的机制尚不清楚。一般认为, 在超声波作用下, 细胞内含物受到强烈振荡, 胶体发生絮状沉淀, 凝胶液化或乳化, 从而失去生物活性。再者, 溶液受超声波作用产生空腔, 引起巨大的压力变化, 使细菌死亡; 同时, 溶于溶液中的气体变成无数极微小的气泡迅速猛烈地冲击细菌, 使之破裂。

利用超声波破坏菌体, 制成细菌裂解液, 用于研究细菌的结构、化学组成、酶活性等, 也可应用超声波从组织中提取病毒。利用频率为 800 ~ 1000kHz 的超声波治疗疾病, 能引起致病生物体发生破坏性改变。

(3) 重金属对微生物的影响

重金属汞、银、铜、铅及其化合物可有效地杀菌和防腐, 它们是蛋白质的沉淀剂。其

杀菌机理是与酶的—SH 基结合，使酶失去活性；或与菌体蛋白结合，使之变性或沉淀。

当二氯化汞（HgCl₂）的质量浓度为 20 ~ 5mg/L 时，对大多数细菌有致死作用。自然界中有些细菌能耐汞，甚至能转化汞。如：腐臭假单胞菌能耐质量浓度小于 2mg/L 的汞。

硫酸铜对真菌和藻类的杀伤力较强。用硫酸铜与石灰配制成的波尔多液，在农业上可用以防治某些植物病毒。在废水生物处理过程中，用化学法测定曝气池混合液中的溶解氧时，可在 1L 混合液中加 10ml 质量浓度为 1g/L 的硫酸铜抑制微生物的呼吸。

铅对微生物有毒害。将微生物浸在质量浓度为 1 ~ 5g/L 的铅盐溶液中几分钟内就会死亡。

(4) 极端温度对微生物的影响

极端温度是指超高温或超低温。超高温是指在微生物最高生长温度以上的温度，对微生物有致死作用。

极端温度对微生物的不利影响主要表现在破坏微生物机体的基本组成物质——蛋白质、酶蛋白和脂肪。蛋白质被高温严重破坏而发生凝固，为不可逆变性，犹如鸡蛋煮熟后不能再孵化出小鸡一样。因此，微生物经超高温处理后必须死亡。超高温致微生物死亡的原因除蛋白质凝固变性外，还可能是由于细胞质膜含有受热溶解的脂类，当用超高温处理时，细胞质膜的脂肪受热溶解使膜产生小孔，引起细胞内含物泄漏而致死。

超高温的杀菌效果与微生物的种类，数量，生理状态，芽孢有、无及 pH 都有关系。例如，无芽孢杆菌在 80 ~ 100 时几分钟之内几乎全部死亡；有芽孢的杆菌在 100 时营养细胞先死亡，其芽孢在 100 煮 2h 也难以死亡。此外，高温杀菌所需作用时间的长短与温度高低有关。如，无芽孢杆菌在 80 ~ 100 作用下几分钟即死；在 70 时作用时间需 10 ~ 15min，在 60 时则需要 30min 才行。各种芽孢杆菌的致死温度如表 2 - 12 所示。高温杀菌效果与菌龄有关。一般幼龄菌比老龄菌敏感，例如，在 53 加热大肠杆菌 15min，菌龄为 2.75h 的菌数下降数为 62h 菌龄的 2000 倍，菌龄为 62h 的菌数仅下降至原菌数的 1/12。高温杀菌效果还与 pH 有关。通常在酸性条件下细菌易被杀死。高温杀菌效果与菌体含水量有关。干细胞（例如孢子）比湿细胞更抗热，因为致死温度与菌体蛋白质含水量有关。由表 2 - 13 看出：含水量为 50g/100g 的蛋白质在 56 就凝固，含水量为 18g/100g 的蛋白质在 80 ~ 90 才凝固，不含水的蛋白质的凝固温度高达 160 。

表 2 - 12 各种芽孢杆菌的致死温度 单位：

	炭疽杆菌	蜡状芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌
湿热灭菌温度/	105	100	100	120 ~ 121
杀菌时间/min	5 ~ 10	6	6 ~ 17	12

表 2 - 13 蛋白质含水量与其凝固温度的关系 单位：

蛋白质含水量/ (g/100g)	凝固温度/	蛋白质含水量/ (g/100g)	凝固温度/
50	56	6	145
25	74 ~ 80	0	160 ~ 170
18	80 ~ 90		

在微生物科研、教学实验及发酵工业中，培养基和所用一切器皿都需先经灭菌后才能使用。

灭菌是通过超高温或其他物理、化学因素将所有微生物的营养细胞和所有的芽孢或孢子全部杀死。灭菌方法有干热灭菌法和湿热灭菌法。消毒是用物理、化学因素杀死致病细菌（有芽孢和无芽孢的细菌），或者是杀死所有微生物的营养细胞或一部分芽孢。消毒法有巴斯德消毒法和煮沸消毒法两种。消毒效果取决于消毒时的温度和消毒时间。

（5）极端 pH 对微生物的影响

过高或过低的 pH 对微生物生长繁殖不利，表现在以下几方面：

①pH 过低（ $\text{pH} = 1.5$ ），会引起微生物体表面由带负电变为带正电，进而影响微生物对营养物质的吸收。

②过高或过低的 pH 还可影响培养基中有机化合物的离子作用，从而间接影响微生物。因为细菌表面带负电荷，非离子状态化合物比离子状态化合物更容易渗入细胞。当处于中性或碱性环境中时，乙酸呈离子状态，带负电荷；根据同电相斥的原理，带负电荷的物质不能渗入带负电荷的细胞内。在酸性环境中，乙酸未离子化而呈中性；根据异电相吸原理，未离子化的乙酸能进入带负电荷的细胞。乙酸对有些微生物有毒并抑制其生长。碱性物质的情况正相反：在碱性环境中它不离子化，比较易渗入细胞；在酸性环境中离子化，不能渗透入细胞中。

③酶只有在最适宜的 pH 时才能发挥其最大活性，极端的 pH 使酶的活性降低，进而影响微生物细胞内的生物化学过程，甚至直接破坏微生物细胞。

④过高或过低的 pH 均降低微生物对高温的抵抗能力。

（6）干燥对微生物的影响

干燥能使菌体内蛋白质变性，引起代谢活动停止，所以干燥会影响微生物的活性以至生命力。由于微生物种类、所处的环境、干燥程度等条件不同，微生物的反应也不同。细菌的芽孢、藻类和真菌的孢子及原生动物的胞囊都比营养细胞抗干燥。干燥细胞的代谢处于停滞状态，在不受热和其他外界因素干扰时，干燥细胞一直呈休眠状态，长期存活，若供给潮气则很快复活。此外，地衣（真菌和藻类的共生体）抵抗极低水活度的干燥环境的能力很强。

鉴于在极低水活度、极干燥的环境中微生物不生长，干燥就成为保藏物品和食物的好方法。可用灭菌的沙土管保存菌种、孢子，也可用真空冷冻干燥保存菌种。

（7）若干有机物对微生物的影响

醇、醛、酚等有机化合物能使蛋白质变性，是常用的杀菌剂。

①醇

醇是脱水剂和脂溶剂，可使蛋白质脱水、变性，溶解细胞质膜的脂类物质，进而杀死微生物机体。一般化学杀菌剂的杀菌力与其浓度成正比，但乙醇例外，体积分数为 70% 的乙醇杀菌力最强。乙醇浓度过低无杀菌力；纯乙醇因不含水很难渗入细胞，又因它可使细胞表面迅速失水，表面蛋白质沉淀变性形成一层薄膜，阻止乙醇分子进入菌体内，故不起杀菌作用。

甲醇杀菌力差，对人有毒，不宜作杀菌剂。一定浓度的醇（包括甲醇、乙醇、丙醇、丁醇）可作为微生物的碳源和能源。在废水生物脱氮处理工艺中，缺碳源时常用甲醇作碳

源。

丙醇、丁醇及其他高级醇的杀菌力均比乙醇强，但由于不溶于水，不能作杀菌剂。

②甲醛

甲醛是很有效的杀菌剂，对细菌、真菌及其孢子和病毒均有效。甲醛是气体，质量浓度为 $370 \sim 400\text{g/L}$ 的甲醛水溶液称为福尔马林，其蒸气有强烈的刺激性，有杀菌和抑菌作用。可用福尔马林蒸熏、消毒厂房及无菌室，用量为每立方米空间 10mL 。质量浓度为 50g/L 的甲醛水溶液在 $1 \sim 2\text{h}$ 可杀死炭疽杆菌的芽孢。甲醛溶液是动物组织和原动物标本的固定剂。甲醛与蛋白质的氨基（ $-\text{NH}$ ）结合而干扰细菌的代谢机能。

③表面活性剂

A. 酚

酚是表面活性剂，酚与其衍生物能引起蛋白质变性，并破坏细胞质膜。苯酚又名石炭酸，质量浓度为 1g/L 时能抑制微生物生长（指未经驯化的微生物）。 10g/L 的石炭酸溶液在 20min 内可杀死细菌； $30 \sim 50\text{g/L}$ 的石炭酸溶液几分钟可杀死细菌， 50g/L 的石炭酸溶液可作喷雾消毒空气，细菌芽孢和病毒在 50g/L 的石炭酸溶液中能存活几小时。

甲酚的杀菌力比其他酚强几倍，但它难溶于水，易与皂液或碱液形成乳浊液，叫来苏尔。 $10 \sim 20\text{g/L}$ 的来苏尔常用于消毒皮肤， $30 \sim 50\text{g/L}$ 的来苏尔用于消毒桌面和用具。

B. 染料

孔雀绿、亮绿、结晶紫等三苯甲烷染料及吡啶黄（acriflavine）都有抑菌作用。革兰氏阳性菌对上述染料的反应比革兰氏阴性菌敏感。例如，结晶紫质量浓度为 $(3.3 \sim 5.0) \times 10^{-4}\text{g/L}$ 时抑制革兰氏阳性菌，需浓缩 10 倍才能抑制革兰氏阴性菌。培养基中加入适合某种微生物生长又能抑制另一种微生物生长的某一浓度染料，制成选择性培养基，就可将需要的微生物培养出来。 10^{-5}g/L 的孔雀绿可抑制金黄色葡萄球菌； $3.3 \times 10^{-3}\text{g/L}$ 时抑制大肠杆菌。 10^{-4}g/L 的结晶紫可杀死念珠霉和圆酵母菌， 10^{-6}g/L 时则起抑制作用。将 10^{-6}g/L 的亮绿加入培养基可抑制革兰氏阳性菌，将大肠杆菌鉴别出来。

（8）抗生素对微生物的影响

许多微生物在代谢过程中产生能杀死其他微生物或抑制其他微生物生长的化学物质，即抗生素。抗生素有广谱和狭谱之分。氯霉素、金霉素、土霉素和四环素可抑制许多不同种类的微生物，称广谱抗生素。青霉素只能杀死或抑制革兰氏阳性菌，多粘菌素只能杀死革兰氏阴性菌，称狭谱抗生素。抗生素主要用做药品。在分离微生物时，可在培养基中加入某种合适的抗生素，用以抑制杂菌生长，使所需的微生物正常生长。杀死或抑制细菌生长的抗生素对人体无毒性或毒性很小。一种抗生素只对某些微生物有作用，而对另一些微生物无效，这是因为不同的抗生素对生物的作用部位不同的缘故。

抗生素对微生物的影响有以下四方面：

①抑制微生物细胞壁合成：青霉素先抑制革兰氏阳性菌肽聚糖的合成，进而阻碍细胞壁合成；菌体失去细胞壁的保护作用，又因革兰氏阳性菌体内渗透压高于环境中渗透压，于是水分子大量渗入菌体，使细菌膨胀或崩解而死亡。革兰氏阴性菌细胞壁的肽聚糖含量很低，因此只受到部分损伤；菌体内的渗透压与环境中的渗透压相近，细菌不会受低渗透压影响。人和动物的细胞不具细胞壁，不含肽聚糖，所以不受青霉素的损害。多氧霉素阻碍真菌细胞壁中几丁质的合成，故抑制真菌生长，对藻类（细胞壁含纤维素）没有损害

作用。

②破坏微生物的细胞质膜：多粘菌素中的游离氨基与革兰氏阴性菌细胞质膜中的磷酸根（ PO_4^{3-} ）结合，损伤其细胞质膜，破坏了细胞质膜的正常渗透屏障功能，使菌体内的核酸等重要成分泄出，导致细菌死亡。磷脂、肥皂可降低多粘菌素的杀菌力。制霉菌素和二性霉素 B 对细菌不起作用。

③抑制蛋白质合成：氯霉素、金霉素、土霉素、四环素、链霉素、卡那霉素、新霉素、庆大霉素、嘌呤霉素及春日霉素等都能与核糖核蛋白结合，抑制微生物蛋白质合成。同时，上述广谱抗生素能与酶组分中的金属离子结合，抑制酶的活性。因受上述两方面影响，许多微生物的生长受到抑制。

④干扰核酸的合成：争光霉素（即博来霉素）与 DNA 结合，干扰 DNA 复制。丝裂霉素（自力霉素）与 DNA 分子双链之是互补的碱基形成交联，影响 DNA 双链的分开，从而破坏 DNA 的复制。放线菌素 D（更生霉素）只与双链 DNA 结合，阻碍遗传信息的转录与 RNA 的合成，但不阻止单链 DNA 的合成，因此，放线菌素 D 不抑制单链 DNA 和单链 RNA 病毒。

2.6 煤炭脱硫微生物^{[15][16][17]}

1894 年，Miyoshi 在硫泉中发现一种无色小杆菌，可氧化氢、硫、硫代硫酸盐等成为硫酸，而被称为硫化细菌。1921 年，人们首次从土壤中分离到氧化硫硫杆菌（*Thiobacillus thiooxidans*）。1947 年，Colmer A. R 和 Hinkle M. E 从煤矿酸性废水中首次分离到能氧化亚铁和无机硫化物的氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）。至今，已发现对煤中硫有脱除作用的微生物有八大类，十几种。各类菌种特征及几种主要脱硫微生物的生长特征见表 2-14^[18]、2-15^[19]。

表 2-14 用于生物脱硫的各类菌种特征表

菌种 特征	Thiobacillus 属	Leptospirillum 属	Sulfobacillus 属	Acidianus , Sulfurococcus , Metallosphaera 属
形状	棒状	弧形	棒状	球形
细胞壁	革兰氏阴性	革兰氏阴性	革兰氏阳性	革兰氏阴性
营养类型	独立和兼性自养型	独立自养型	兼性自养型	兼性自养型
能量来源	Fe^{2+} , S^0 , 硫化物和含硫有机物	Fe^{2+} , Fe_2S	Fe^{2+} , S^0 , 硫化物和含硫有机物	Fe^{2+} , S^0 , 硫化物和含硫有机物
生存温度	2 ~ 40	2 ~ 40	20 ~ 60	40 ~ 90
pH 值	1.2 ~ 5.0	1.0 ~ 5.0	11.1 ~ 5.0	1.0 ~ 5.8

表 2-15 几种主要脱硫微生物的生长特性

脱硫菌种	最适温度 /	最适 pH	营养	能源	脱硫形态
<i>T. ferrooxidans</i>	25 ~ 35	2 ~ 3	自养	单质硫、硫化物硫、 2 价铁	黄铁矿
<i>T. thiooxidans</i>	25 ~ 30	2 ~ 3	自养	单质硫、硫化物	黄铁矿
<i>S. acidocaldarius</i>	60 ~ 70	1.5 ~ 2.5	兼性、自养	单质硫、硫化物 2 价铁、有机硫	黄铁矿 有机硫
<i>Acidicanus</i>	60 ~ 70	1.5 ~ 2.5	兼性、自养	单质硫、硫化物	黄铁矿
<i>S. brierleyi</i>	55 ~ 80	1.0 ~ 5.0	兼性、自养	2 价铁、有机硫	无机硫 有机硫
<i>Pseudomonas</i>	25 ~ 35	中性	异养	有机物	有机硫
<i>Escherichia</i>	中温	中性	异养	有机物	有机硫

从细胞形状、细胞壁类型、营养类型、无机或有机质代谢途径和生长温度看，这些微生物分属不同的生物学种系，具有各自独立的进化途径，如图 2-14 所示^[21]。

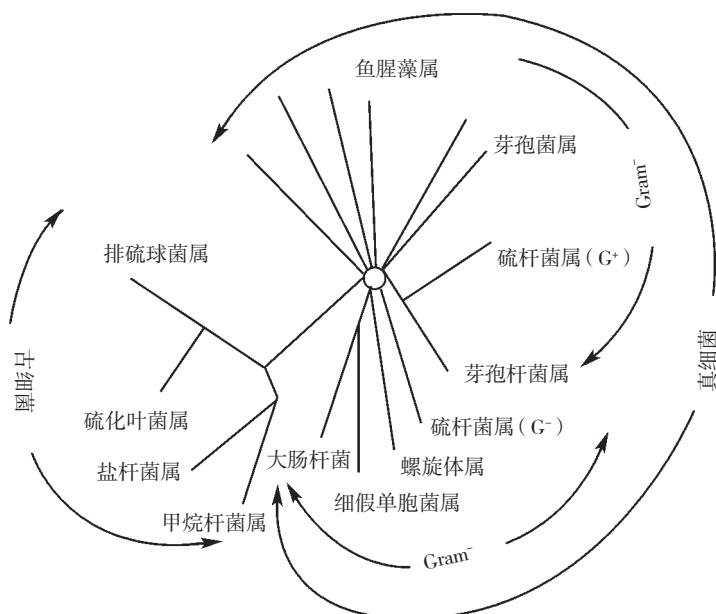


图 2-14 脱硫微生物进化树

某些嗜酸的无机化能自养细菌，如硫杆菌属（*Thiobacillus*）和硫螺菌属（*Leplospirillum*）、中等嗜热的 G^+ 硫杆菌属（*Sulfobacillus*）和极喜热的古细菌硫化叶菌属（*Sulfolobus*），均具有明显的脱硫能力。这些细菌的共同特征是，在需氧条件下能够氧化 Fe^{2+} 、 S^0 的无机硫化物，通常将还原性硫化物氧化成 SO_4^{2-} ，使环境变酸，并放出热量。因此，用

于脱除无机硫的化能自养菌多生长在酸热环境中。

具有脱除有机硫能力的微生物有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 及根瘤菌属 (*Rhizobium*) 等。微生物对有机硫的代谢作用有较大差异, 如化能自养嗜酸热的古细菌 (*Sulfolobus*) 菌属和异养的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的突变株 CBI, 可将 DBT 中的硫氧化到 SO_4^{2-} , 而大多数异养菌, 只能在中性 pH 值和常温条件下生长, 对有机硫的脱除主要是通过氧化煤中大分子的外围芳环使 C - C 键断裂形成分子量较小的可溶性含硫产物从煤中脱出, 只有少数异养菌能够高选择性地使 C - S 键断裂, 使煤中有机硫以 SO_4^{2-} 形式脱除。如美国的 IGT 筛选出的能特异降解煤中有机硫的玫瑰色红球菌 (*Phodococcus rhchorous*) 和球形芽孢杆菌 (*Bacillus Sphaericus*)。此外还有关于大肠杆菌 (*E. coli*) 和链霉菌 (*Streptomyces*) 以及白腐菌 (*White rot fungus*) 等微生物脱除煤中有机硫的报道。

3 煤炭生物脱硫试验材料、研究方法
及主要仪器设备

3.1 试验材料

3.1.1 试验用煤样的类型及主要煤质特征

试验用煤样取自四川重庆南桐矿务局，一种是干坝子选煤厂入洗原煤，其煤为红岩矿煤，煤种为 1/3 焦煤。另一种是砚石台矿煤，煤种为瘦煤。

南桐矿区位于重庆东南，跨南川、綦江两县。矿区煤炭探明储量 37 亿吨，其中保有储量 31 亿吨。含煤地层属上二叠系龙潭组。煤种和煤质以中富灰、富高硫肥煤、焦煤和气煤为主，有少量瘦煤和贫煤。商品煤硫分 $S_{t,d}$ 大于 3% 的几乎占该区商品煤量的 40%，硫分大于 2% ~ 3% 的中高硫分煤亦占 12.8% 左右。其硫分高的原因是由于该矿区属海陆交互相沉积的晚二叠世时期形成，其含煤系多为乐平煤系或黔阳煤系。高硫煤中硫以硫铁矿硫为主，有机硫所占比例不到 40%，如表 3-1 所示。试验用高硫煤中黄铁矿样挑自原煤煤堆及跳汰尾矿，硫分 $S_{t,d}$ 为 30%。

表 3-1 南桐高硫煤中硫及其组成部分

名称 \ 硫分%	$S_{t,d}$ %	$S_{p,d}$ %	$S_{s,d}$ %	$S_{o,d}$ %	$S_{o,d}$ 占 $S_{t,d}$ %
南桐矿务局	3.69	2.21	0.11	1.38	37.40

3.1.2 试验用菌种的类型及主要生物特征

(1) 氧化亚铁硫杆菌 (Thiobacillus ferrooxidans，简称 T. f)

试验中所用非煤系 T. f 菌取自中南大学矿物工程系生物实验室保存菌种，该菌种原来自广东某铜矿。煤系 T. f 菌采自四川南桐矿务局干坝子选煤厂和砚石台煤矿。各点所采原始菌样及其 pH 值如表 3-2 所示。

表 3-2 原始菌样 (T. f) 各采点 pH 值

采样点 \ 地点	多年硫精矿底流 pH	矿坑水 pH	煤堆渗水 pH
干坝子选煤厂	3	4	5.5
砚石台矿	3	4	6

氧化亚铁硫杆菌主要生物特性^[94]：

短杆菌， $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ ，具有圆钝的末端，单生或对生，成短链者较少。严格化能自养，好氧嗜酸，革兰氏阴性。代时约为 6.5 ~ 15h。

利用氨作为氮源，利用硝酸盐缓慢。

氧化亚铁硫杆菌以培养基中的亚铁离子 Fe^{2+} 或硫化物作为能源。靠氧化基质中的 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} 和低价态硫为硫酸根而获取能量，同时以空气中的 CO_2 为碳源。利用空气中的 CO_2 ，并吸收培养基中的 N、P、K 等无机营养，合成菌体细胞。

氧化亚铁硫杆菌的亚铁液体培养基开始保持清澈，在培养过程中由于三价铁的产生，使液体培养基迅速由琥珀色转变为红褐色，并产生高铁水合物沉淀。

该菌最适宜生长的 pH 值：2.5 ~ 3.5，适宜的生长温度 28 ~ 35。

(2) 草分枝杆菌 (*Mycobacterium phlei*，简称 *M. phlei*)

试验中所用 *M. phlei* 菌来自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。菌种编号为 AS4. 1180。草分枝杆菌主要生物特性^[94]：

短杆菌，杆长 1.0 ~ 2.0 μm ，很少更长。化能异养，革兰氏阳性。菌壁含有较多分枝菌酸和脂类，为抗菌菌。

在固体培养基上稀释接种培养 2 ~ 5 天，一般产生粗糙的深黄色到橙色的菌落。生长温度为 22 ~ 52，生长的 pH 值为 5 ~ 6。该菌对所有动物都不致病。

3.2 试样的准备与分析方法

3.2.1 试样准备及粒度分析

试验前首先将红岩矿和砚石台矿高硫煤样烘干，然后分别进行破碎、筛分试验^{[95][96]}。先把煤样破碎至 1mm 以下，再对煤样筛分，筛分序列分别为：+ 40 目（+ 0.35mm）、40 ~ 60 目（0.35 ~ 0.25mm）、60 ~ 120 目（0.25 ~ 0.125mm）、120 ~ 200 目（0.125 ~ 0.075mm）、200 ~ 320 目（0.075 ~ 0.045mm）、—320 目（- 0.045mm）。结果见表 3-3、表 3-4。

表 3-3 红岩矿煤样筛分各粒级粒度组成

粒度 (网目)	重量 (克)	产率 (%)	灰分 (%)	硫分 (%)	累 计		
					产率 (%)	灰分 (%)	硫分 (%)
+ 40	52.0	52.26	18.38	2.902	52.26	18.38	2.902
40 ~ 60	13.0	13.07	16.88	2.729	65.33	18.08	2.867
60 ~ 120	17.5	17.59	16.64	2.679	82.92	17.77	2.827
120 ~ 200	7.5	7.54	16.58	2.629	90.46	17.67	2.811
200 ~ 300	5.0	5.03	18.06	2.822	95.49	17.70	2.812
~ 320	4.5	4.52	20.22	3.058	100.00	17.81	2.823
合计	99.5	100.00	17.81	2.823			

表 3-4 砚石台矿煤样筛分各粒级粒度组成

粒度 (网目)	重量 (克)	产率 (%)	灰分 (%)	硫分 (%)	累 计		
					产率 (%)	灰分 (%)	硫分 (%)
+40	45.0	45.45	14.14	3.065	45.45	14.14	3.065
40~60	10.0	10.10	14.32	2.867	55.55	14.17	3.029
60~120	18.0	18.18	18.26	2.388	73.73	15.18	2.871
120~200	12.0	12.12	13.52	2.470	85.85	14.95	2.814
200~300	9.0	9.09	13.52	2.306	94.94	14.81	2.765
~320	5.0	5.05	13.80	2.405	100.00	14.76	2.747
合计	99.0	100.00	14.76	2.747			

3.2.2 煤样中全硫及形态硫的分析测定^[97]

(1) 煤中全硫的测定

煤样中全硫按照《煤中全硫的测定方法》(GB/T214 - 96) 中高温燃烧库仑滴定法进行测定。该方法的要点是将煤样在 1150 高温和催化剂作用下, 于净化的空气流中燃烧分解, 煤中硫生成 SO₂ 并被以电解碘化钾和溴化钾溶液所产生的碘和溴进行滴定。电生碘和电生溴所消耗的电量由库仑积分仪积分, 根据法拉第电解定律 (电生 1 克当量的任何物质需消耗 96500 库仑电量), 即可计算出煤中全硫含量。

(2) 煤中形态硫的测定方法

对于煤中形态硫的测定, 国标的测定方法较为繁琐。为此我们采用一种相对简便、快速的方法: 即先测出煤中全硫 S_{t ad} 和灰分 A_{ad(1)}, 然后用酸溶的方法除去煤中的硫酸盐和硫铁矿硫后, 再测定煤样的全硫 S_{t ad} 和灰分 A_{ad(2)}。然后按下式算出煤中有机硫 S_{o ad}:

$$S_{o ad} = \frac{100 - A_{ad}^{(1)}}{100 - A_{ad}^{(2)}} \cdot S_{t ad} \quad (\%) \tag{3-1}$$

计算出有机硫 S_{o ad} 后, 再用酸解前煤样的全硫 S_{t ad} 减去机硫 S_{o ad}, 即得到煤样中无机硫 S_{p ad} 的含量。计算公式如下:

$$S_{p ad} = S_{t ad} - S_{o ad} \quad (\%) \tag{3-2}$$

上述测定煤中有机硫的方法要点是: 首先, 基于煤中硫酸盐能溶于稀酸, 而硫铁矿硫及含硫有机物不受稀盐酸的作用。因此先准确称取分析煤样 1 克, 放入 250ml 烧杯中加 0.5~1ml 乙醇润湿, 然后加入 50ml 浓度为 5mol/L 的盐酸浸泡 30min, 并加热至微沸, 再用滤纸过滤, 并用蒸馏水冲洗煤样 3 次。将用盐酸浸取过的残煤连同滤纸加入 1: 7 硝酸 50ml, 煮沸 30min, 其中的硫铁矿硫 (如黄铁矿、白铁矿) 都氧化成三价铁离子。用滤纸过滤, 并用热水冲洗 3 次至 pH 为中性。烘干并测定煤样全硫 S_{t ad}, 经换算后得到煤样有机硫 S_{o ad}。

用该方法测定煤中有机硫与采用国标测定方法进行过实测比较, 结果表明该方法测定结果与国标法测定值误差较小。

3.2.3 煤样中黄铁矿 FeS_2 赋存状态的显微分析^[98]

四川南桐矿务局高硫煤样的特点是以黄铁矿硫为主（约 2/3 以上）。试样为南桐矿务局红岩矿煤样，采用普通光学显微分析法，研究不同粒级高硫煤样中黄铁硫的形态及其赋存状况。

选取红岩矿高硫煤样中块样（大块和小块）以及自然级与破碎级不同粒度（+40、40~60 目、60~120 目、120~200 目、200~320 目、~320 目）的粉样共 6 个粒级，将块样和粉样分别进行抛光制样，制成反射光片，然后置于物镜为 32 倍的显微光度计下，油浸反射光下观测、拍照及分析。

试验结果见附录中的照片及图版说明。

由试样显微照片可见，块样（大块 25[#]、小块 26[#]）中煤中有机组成以镜质组为主，含量在 90% 以上，可见少量惰质组，含量在 5% 左右，壳质组未见。矿物以 FeS_2 为主约占总体积的 3%。黄铁硫 FeS_2 常见以微粒及微粒集合体形式散布于基质镜质体中，有时也可见较大的块体及球体嵌布于煤中。

煤样自然级 28[#]（+40 目）和破碎级 34[#]（+40 目）中，可见大的 FeS_2 块体从煤粒中分离，但仍有不少球粒状，粒径在几十微米的 FeS_2 镶嵌于煤粒中，而粒径为几微米的 FeS_2 绝大多数仍散布于煤粒，偶尔可见到分离出的 FeS_2 微粒。

由自然级 31[#]（120~200 目）可见，随粒度减小，煤粒中几十微米的黄铁矿几乎全部分离出来成为单体，而几微米的 FeS_2 微粒多数仍散布于煤中。破碎级 38[#]（200~320 目）及 39[#]（~320 目）表明，此时黄铁矿几乎全部由煤中解离，均以单体形态出现，煤粒中几乎未见黄铁矿。

由上可见，随着煤粒粒度减小，煤样中黄铁矿多以单体形式从煤中分离。通过对不同粒级试样进行全片搜索及统计计算，得到不同粒径煤样中黄铁矿解离程度的统计结果，如图 3-1 所示。

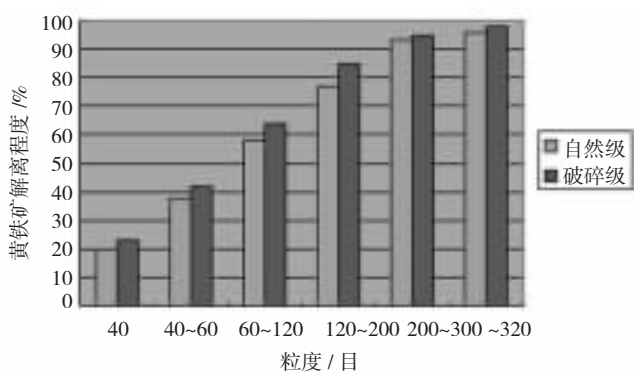


图 3-1 红岩煤样（自然级与破碎级）不同粒级 FeS_2 解离度统计

3.3 脱硫微生物的培养与检测方法

3.3.1 脱硫微生物培养、分离纯化及扩大培养方法^{[15][16]}

(1) 氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌)

对采集和获取到的煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌 (T. f)，先分别用 Silverman 培养基进行培养。因这种培养基中 Fe^{2+} 的含量为 9g/L，所以又称之为 9k 培养基。用 9k 培养基培养出来的微生物是以氧化亚铁硫杆菌为主的混合菌种，培养液中仍含有杂菌，须进行分离纯化，才能获得目的菌株的纯培养。方法有稀释涂布平板法和终点稀释法等。终点稀释法简便，但有可能分离出的纯培养并不是所希望的菌种。因此研究中我们采用的是稀释涂布平板法。经过平板分离即可获得氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 的纯培养菌株。

氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 的扩大培养仍采用 9k 培养基，先用 5mol/L 的 H_2SO_4 调节培养基的 pH 值为 2，再在培养基中接种一定量的纯 T. f 菌，然后将培养液置于生化培养箱，30℃ 充气旋回振荡培养，每隔 9 天转种一次。在培养过程中，定期观测其生长情况，同时测定细菌浓度及培养基 pH 值的变化等。

(2) 草分枝杆菌 (M. phlei)

草分枝杆菌 (M. phlei) 来自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心，原本即为纯种，不需要进行分离纯化。

该菌种由于是采用真空冷冻干燥保存，保藏期较长，使用时需对其进行恢复培养。具体方法是：先用无菌吸管吸取 0.3 ~ 0.5ml 适宜的液体培养基，滴入安瓿管中，轻轻振荡，使冻干菌体溶解呈悬浮状。再吸取全部菌体悬浮液，移植于斜面培养基上，并置于生化培养箱中，恒温旋回振荡培养，从而使菌种恢复正常生长。

活化后的草分枝杆菌 (M. Phlei) 在液体培养基中进行培养。培养条件如下：首先在 250ml 三角烧瓶中加入 100ml 培养基，120℃ 高温灭菌后接种一定量的纯种 M. Phlei。然后在 37℃，120 转/分钟的旋回振荡器上进行振荡培养。此外，将该菌划线接种至营养琼脂培养基上，用于菌落形态等生物学特性的观测研究。

3.3.2 脱硫微生物基本生物特性的研究方法^[99~102]

当获得纯培养细菌后，可以通过染色，在生物光学显微镜下观察微生物的形态和结构。细菌先用主要的染色液着色后，经过脱色剂脱色，再用复染剂染色，即为复染色法。该法可以将不同种的细菌染成不同的颜色。常用的复染色法有革兰氏染色法和抗酸染色法。

(1) 革兰氏染色法 (Gram stain)

该方法由丹麦细菌学家 Christian Gram 首创，其操作程序是：先将涂片后的细菌标本固定，用草酸铵结晶紫初染，再加鲁哥氏碘液媒染，此时各种菌均被染成深紫色。然后用 95% 乙醇脱色，其中有的细菌脱去紫色，有的仍保持紫色。最后用番红（沙黄）复染。

通过此染色法可将细菌分为两大类：不被乙醇脱色仍保留紫色为革兰阳性菌 (G^+ 菌)，若被乙醇脱色后再被复染成红色，为革兰氏阴性菌 (G^- 菌)。目前认为，细胞壁结构与化学组成上的差异是染色反应不同的主要原因。

(2) 抗酸染色法 (acid - fast stain)

分枝杆菌属的细菌多为抗酸性细菌，一般染色法不易着色，须用抗酸染色法。方法是：将固定的标本片用 5% 石炭酸复红液加热，并延长染色时间，以促使菌体着色，然后用 3% 的盐酸酒精脱色，最后经美蓝复染。

抗酸性细菌一量着色，则能抵抗盐酸酒精的脱色，故保持红色；非抗酸性细菌则被脱色而复染成蓝色。目前认为，抗酸性染色的差异可能与菌体表面所含的分枝菌酸、脂类等成分有关。

(3) 细菌形态大小及菌落特征的显微观测

细菌 (bacterium) 是具有细胞壁的单细胞原核细胞型微生物。在正常的培养生长条件下有相对恒定的形态，了解和掌握细菌的形态与菌落等特征，对认识与鉴别细菌具有重要意义。由于细菌形体微小，通常以微米 (μm) 为测量单位。须借助于生物光学显微镜，放大数百倍，甚至在放大 1000 倍的油镜下才能看清。观察细菌所使用油镜的基本原理是：当光线从标本玻片经空气进入镜头时，由于介质密度不同而发生折射现象，因此进入物镜中的光线很少，结果视野暗，特像不清晰。而在玻片上加上折光率与玻片 ($R = 1.52$) 相近的香柏油 ($R = 1.515$)，就可避免光线的分散，加强视野亮度，获得清晰的物像。

细菌是单细胞微生物，它的形态就是细胞的形态。其主要形态有球、杆、螺旋状，分别被称为球菌、杆菌和螺旋菌。我们在研究中所采用的细菌为氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 和草分枝杆菌 (*M. phlei*)，杆菌 (*bacillus*) 呈杆状或圆柱形，在细菌中种类最多，其长短、大小、粗细差异很大。一般来说，杆菌长 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ ，宽 $0.5 \mu\text{m}$ ，同一种杆菌的粗细较为稳定，但它的长度常随培养时间、条件等变化而呈较大变化。

细菌是肉眼看不见的微小生物，如把细菌接种到固体培养基上，培养一段时间，就会在培养基表面形成肉眼可见的菌落。不同种的细菌形成的菌落形态各不相同，同一菌种也常因不同培养基和不同培养时间而长成不同形态的菌落。但同一菌种在同一培养基上所形成的菌落形态，有一定的稳定性和专一性，它是辨别菌种的主要依据。

菌落的形态特征包括菌落的大小、形状 (隆起状态、边缘状态及表面状态)，表面的光泽、质地、颜色、透明程度、厚度、粘稠度、致密度等等。

(4) 细菌数量的测定方法

细菌数量的测定方法有：测定细菌总量的比浊法和直接镜检计数的载玻片涂片染色法、计数器法等等。比浊法是根据细菌悬浮液的透光量间接地测定细菌的数量。细菌悬浮液的浓度在一定范围内与透光度成反比，与光密度成正比，所以可用光电比色计测定菌液，用光密度 (OD) 表示样品菌液浓度。此法简便快速，但是只能检测含有大量细菌的悬浮液，得出相对的细菌数目，对颜色太深的样品，不适合用此法测定。

载玻片涂片染色法是将一定量 (0.01ml) 菌液均匀涂布于载玻片一定面积 (1cm^2) 内，经固定染色后，在显微镜下借镜台测微尺测得视野的面积。从细菌涂布的总面积得知视野的总数，然后从几个视野的平均细菌数可计算出每毫升原液中的细菌数。

计数器法是直接在显微镜下计算细菌数的方法。计数时使用血球计数板。血球计数板构造如图 3-2 所示。它是由四条平行槽构成了个平台，中间的平台较宽，其中间又被一短槽隔成两半，每边平台面各有一个含 9 个大格的方格网，中间大格为计数室。计数室长

和宽各为 1mm，中间平台下陷 0.1mm，故盖上盖玻片后计数室的容积为 0.1mm³。

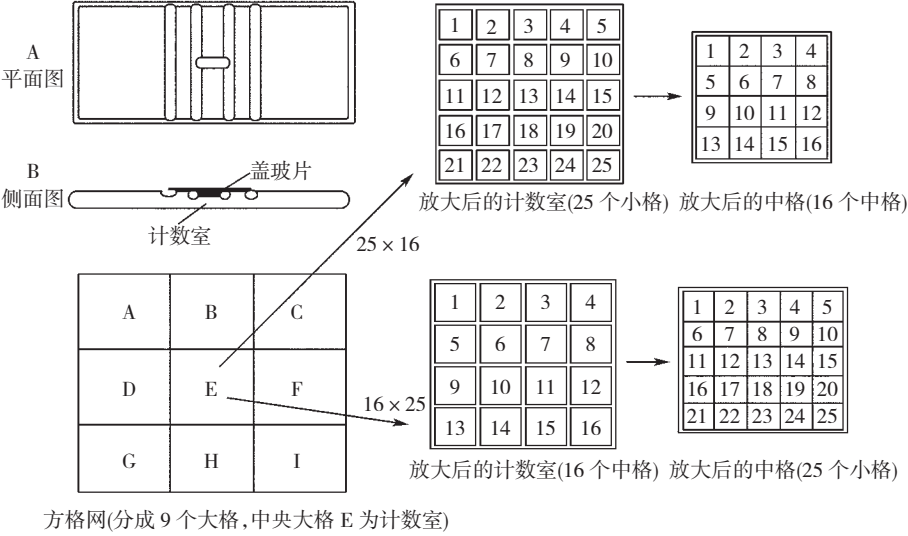


图 3-2 血细胞计数板构造示意图

常见血球计数板的计数室有两种规格。一种是 16 × 25 型，称为麦氏血球计数板，共有 16 个中格，每个中格分为 25 小格。另一种是 25 × 16 型，称为希里格式血细胞计数板，共有 25 个中格、每个中格又分成 16 个小格。不论哪种规格的血球计数板，其计数室的小格均由 400 个小方格组成。我们采用的是希里格式血球计数板（25 × 16 型），在显微镜下直接计算菌量，方法是先测定左上、右上、左下、右下及中间大格（共 80 个小格）内的细胞。计数时当遇到大格线上的细菌时，一般只计此大格的上方及右方线上的细菌（或只计下方或左方线上的细菌），再按下列公式计算每毫升菌液中所含的细菌数：

$$\text{细菌细胞数/ml} = (80 \text{ 小格内细菌细胞数} / 80) \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \quad (3-3)$$

在镜检计数中，我们借助于 DMB5 型数码显微分析系统中的 Motic Images Advanced 3.0 分析软件所具有单色分割和自动计数功能，对菌数进行测定。不仅大大提高了计数速度，而且减少了常规显微镜下人工计数易造成误差，计数精度有了明显提高。

在对细菌计数过程中，为消除由于背景色差而造成的计数误差，计数时采用了以下方法：先对菌样测定菌数 N_1 ，再将该菌样稀释 10 倍，用同样方法测定菌数 N_2 ，然后按下式计算实际菌样中的细菌数 n ：

$$n = 10 (N_1 - N_2) / 9 \quad (3-4)$$

3.3.3 脱硫微生物磁化培育的研究方法^[103~115]

生物磁学是研究物质磁性和磁场与生命活动和生物特性之间相互联系、相互影响的一门学科。将磁学方法和技术应用于生物技术中，就形成了生物磁技术。将生物磁场、磁性、磁生物效应等应用于工农业及医疗、环保等领域，就形成了应用生物磁学^[13]。在矿业领域，将生物磁技术与矿物加工相结合，就形成了矿物磁生物技术。矿物磁生物学主要研究磁场或磁化水等磁化作用对矿业微生物的生物效应等。近年来生物磁技术和应用生物

磁学的进展是十分显著和引人瞩目^[14~20]。但到目前为止,国内外对矿物磁生物技术的研究却少见报道。

在生物磁学研究中,所用外磁场主要有恒定磁场、脉冲旋转磁场^[21]、电磁场^[22~24]以及磁化水^[25]等。磁处理大致可分三类,第一类是应用磁场直接处理生物体,即把不同的微生物直接置于不同强度的磁场中处理一定时间,然后测定各项磁化作用指标。第二类是利用磁场处理水,提供微生物的生长、代谢等,一段时间后再检测生物体各项指标。第三类是用磁场和磁化水复合,先后对微生物进行处理。

磁化处理参数主要有磁场的磁感应强度大小、作用时间长短;交变磁场的变化频率与作用时间、磁化水过程中的磁场强度、水切割磁力线的次数或频度等。磁化处理参数因不同的生物体及磁化目的而异。磁场可在很宽的范围内($10 \sim 10^4$ GS)对生物产生影响。这些影响包括临界磁场效应,磁场累积效应,磁致滞后效应,磁致发育效应以及磁场影响生物体内的磁水效应等^[1]。

根据以往的研究,脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)对脱除煤中黄铁矿硫具有较好的效果。但由于该菌有生长缓慢、代期长等缺点,限制了其在工业中的应用。因此,我们重点选择氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)作为磁化培育菌种,进行磁化培育的试验研究,内容包括:磁化与非磁化作用环境对脱硫微生物 *T. f* 菌作用效果比较;相同类型不同生长环境下煤系与非煤系 *T. f* 菌,和不同类型微生物 *T. f* 菌和 *M. phlei* 菌的磁化作用效果进行比较;以及磁化深度(磁化时间及切割磁力线速度)对 *T. f* 菌培养生长的影响等。同时还对脱磁微生物的磁生物效应作用机理进行分析探讨。

3.3.4 脱硫微生物分子生物学研究方法^[116~120]

脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌(*T. f* 菌)由于其所具有的特殊生物代谢机制,因此在煤炭脱硫和细菌冶金等方面具有巨大的潜在应用价值。但是,由于该菌生长缓慢、7~11天达到一个生长周期、代期长(代时为6.5~1.5小时)、细胞得率低以及酸性培养和代谢产酸等,使其在工业上应用受到了限制^[116]。

利用包括基因工程在内的现代分子生物学研究方法和手段,对氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)的遗传学特性进行研究,有目的地对 *T. f* 菌种进行遗传改良,以改善该菌种的各种品质。若使其既具有 *T. f* 菌优良的降硫特性,又具有生长繁殖快速和适应中性生长环境等优点,将能使 *T. f* 菌更好地适应实际工业应用的要求。

作为生物遗传的物质基础,DNA(脱氧核糖核酸)是生物遗传信息的基因分子载体。原核生物细菌的遗传物质由双链环状分子的拟核大环染色体DNA和附加体小环质粒DNA组成。自从Mao(1980年)和Holmes(1984年)等报道了从氧化亚铁硫杆菌和兼性自养嗜酸硫杆菌中发现并分离到质粒以来,虽然对硫杆菌中质粒DNA的具体功能还不完全了解,但有人据此认为质粒DNA在硫杆菌中存在较为普遍^[117]。

为了氧化亚铁硫杆菌菌种的遗传改良研究,我们利用了现代分子生物学的有关试验研究手段,对氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)脱硫遗传物质的遗传背景进行了分子生物学水平上的基础性探索研究,重点对氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)的质粒DNA进行了抽提试验,并进行抽提物的琼脂糖凝胶电泳试验与分析。

传统的碱变性抽提法(碱裂解法)和煮沸裂解法抽提质粒DNA,虽然方法成熟可靠,

但费时^[118~120]。为此, 试验中我们采用的是柱式质粒小量抽提试剂盒进行质粒 DNA 的抽提。该方法的优点是经济快速, 每个抽提可以在 20min 内完成, 且无需酚抽提、无需乙醇沉淀、无需 $C_{50}Cl$ 离心, 洗脱体积小。

抽提物的琼脂糖凝胶电泳, 选择在水平式凝胶电泳仪上进行。利用紫外数码图像分析仪及其附带的 GSM 凝胶电泳图像分析系统 2.0, 对凝胶电泳结果进行拍照与分析。

3.4 黄铁矿及煤表面氧化剂和细菌氧化的研究方法^[121~124]

3.4.1 扫描电镜法 (SEM) /透射电镜法 (TEM)

扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope) 简称扫描电镜 (SEM), 是利用聚焦电子束在样品上扫描时激发的某些物理信号 (如二次电子), 来调制一个同步扫描的显像管在相应位置的亮度而成像的一种显微镜。它可以用来检验和分析固体样品的显微结构特征。对固态物质表面结构做出定性显微分析。

扫描电镜的原理是聚焦电子束 (称初级束) 诱导产生的二次电子被收集极收集, 流过电阻产生电压降, 经过放大器放大后调制同步扫描的显像管的亮度。其工作过程为: 从电子枪发出的电子束经两级聚束镜, 经偏转线圈和物镜射到样品上。用同一扫描信号发生器控制聚焦电子束 (初级束) 和显像管的扫描, 即扫描电镜的初级束和显像管的显示电子束作同步扫描。扫描电镜初级束与样品相互作用激发的二次电子等物理信号经放大后调制显像管的亮度。二次电子是指入射电子及背散射电子在与样品原子相互作用 (散射) 过程激发的低能电子 (能量从 0 ~ 50eV), 这种电子在整个作用体积内都产生, 但由于其能量低, 在逸出过程易被样品吸收, 而只有在近表层产生的二次电子才能逸出表面, 因此其主要来自表层。

扫描电镜由电子、光学系统、扫描系统、信号检测系统、图像显示和记录系统、电源系统及真空系统等部分组成。其主要参数包括: 放大倍数、分辨率和景深等。

扫描电镜的特点: (1) 样品制备简单, 能直接观察样品的原始表面, 样品消耗小、损伤小、污染轻; (2) 扫描景深大、图像立体感强, 放大倍数范围宽, 且连续可调。

透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope) 简称透射电镜 (TEM), 以电子束代替光速, 样品做得很薄, 以致高能电子 (50 ~ 200Kev) 可以穿透样品。根据样品不同位置的电子透过强度不同或电子透过晶体样品的衍射方向不同, 经过后面电磁透镜的放大后, 在荧光屏上显示出图像。

透射电镜分为聚束系统 (聚光系统) 和成像系统两部分。前者使用阴极发出的电子束聚焦后投射到样品上, 阳极的作用是加速从阴极发出的电子。电子透镜的放大作用主要靠成像系统, 它由物镜、中间透镜和投影镜组成。

透射电镜的主要性能指标包括分辨率、放大倍数、加速电压和景深与焦深等。图像上尚能分辨开的相邻两点在试样上的距离称为透射电镜的点分辨率。放大倍数是指图像相对于试样的线性尺寸的放大倍数。加速电压指阳极对阴极电压, 一般在 50 ~ 200KV。加速电压愈高, 电子穿透能力愈强, 分辨率愈高。

3.4.2 X 射线衍射法 (XRD)

物质从结构的角 度可分为晶体和非晶体。X 射线衍射分析法是根据晶体对 X 射线衍射特征 (衍射线的方向和强度) 来鉴定结晶物质物相的方法。当 X 光速照射至物质上时, 就被物质中的电子所散射。由于每种物相都具有自身特点的晶体结构, 因此, 就具有特定的衍射图谱, 即特定的衍射线线位分布与强度分布。

X 光衍射仪是由 X 光机、测角仪、探测仪、记录器和操纵系统等部分组成。它利用探测器探测 X 光衍射仪, 利用后续电子线路记录 X 光衍射线。典型的 X 光衍射图是测试从低角度到高角度的全部衍射线, 即全图。根据国际粉末衍射标准联合委员会 (JCPDS) 提供的各种物相的标准卡片 (PDF 卡片), 将分析试样的 X 射线衍射数据与标准衍射卡片相对照, 就能找出试样中所包含的物相种类。

粉末 X 射线衍射分析法鉴定物相方法简单而有效, 根据衍射图谱能准确地辨认晶体本身, 确定其化学组成和晶体结构形态, 这些独特优点是其他物理化学方法不能或不易做到的, 如很多矿物存在同质多像 (石英、方解石), 它们的化学组成相同, 但由于结构不同, 其衍射图谱完全不同。用其他方法不易鉴别, 但用 X 射线衍射法很容易鉴别。X 射线衍射法既可以定性地分析试样中包含何种相, 还可以根据物相特征峰的强弱, 对混合物相进行定量分析。

3.4.3 傅里叶变换红外光谱法 (FTIR)

红外光在可见光区和微波光区之间, 波长 λ 为: $0.75\mu \sim 1000\mu$, 通常将红外区划分为: 近红外光区 ($0.75 \sim 2.5\mu\text{m}$)、中红外光区 ($2.5 \sim 25\mu\text{m}$) 和远红外光区 ($25 \sim 1000\mu\text{m}$)。一般说的红外光谱就是指中红外光区的红外光谱。

红外光谱 (Infrared Spectrometry, 简称 IR) 又称为分子振动转动光谱, 也是一种分子吸收光谱。当样品受到频率连续变化的红外光照射时, 分子吸收了某些频率的辐射, 并由其振动或转动运动引起的偶极矩的净变化, 产生分子振动和转动能级从基态向激发态的跃迁, 使相应于这些吸收区域的透射光强度减弱。通过记录红外光的百分透射比与波数 ν 或波长 λ 关系的曲线, 就得到红外光谱。

红外光谱一般纵坐标为百分透射比 T%, 吸收峰向下, 向上则为谷; 横坐标是波长 λ (μm) 或波数 ν (cm^{-1})。 λ 与 ν 之间的关系为: ν (cm^{-1}) = $10^4/\lambda$ (μm), 因此中红外区的波数范围是 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。近年来红外光谱均采用波数等间隔分度, 称为线性波数表示法。

Fourier 变换红外光谱分析 (FTIR) 是利用傅里叶变换红外光谱仪进行的, 其核心部件是迈克尔逊干涉仪, 由固定平面镜、分光器和可调凹面镜组成。由光源发出的红外光经过固定平面反射镜后, 由分光器分为两束: 50% 的光透射到可调凹面镜, 另外 50% 的光反射到固定平面镜。可调凹面镜移动至两束光的光程差为半波长的偶数倍时, 这两束光发生相长干涉, 干涉图由红外检测器获得, 经过计算机傅里叶变换处理后得到红外光谱图。

用于红外光谱法测试的试样一般应符合以下要求:

(1) 试样应是单一组分的纯物质 (纯度 $>98\%$), 这样才便于与纯化合物的标准光谱对照;

(2) 试样中不应含有游离水，水本身有红外吸收，会严重干扰样品谱；

(3) 试样的浓度和测试厚度应选择适当，以使光谱图中大多数吸收峰的透射比处于 10% ~ 80% 范围内。

固体试样的制样方法常用压片法：将 1 ~ 2mg 试样与 200mg 纯 KBr 研细混匀，置于模具中，用 $(5 \sim 10) \times 10^7 \text{ Pa}$ 压力在油压机上压成透明薄片。试样和 KBr 都应经干燥处理，研磨到粒度小于 $2 \mu\text{m}$ ，以免散射光影响。KBr 在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 光区内不产生吸收，因此可测绘全波段光谱图。红外光谱分析对气、液、固体样品均可测定，具有用量少、分析速度快、不破坏试样等特点。

3.5 煤炭微生物脱硫的研究方法

3.5.1 微生物浸出脱硫的研究方法

在实验室进行微生物浸出脱硫试验，通常采用的摇瓶试验法。从微生物学的角度，摇瓶法是一种分批培养方法。这种培养方法一般是利用锥形烧瓶和恒温培养箱及生物振荡器进行，先后在反应器（锥形瓶）中一次性加入培养基，然后接种并在一定条件下培养，此后直到培养结束不再加任何物料。浸出结束后放出培养液进行处理。

浸出试验中锥形瓶一般多用 100 ~ 500ml，在瓶中加入不同粒度的高硫煤样 5 ~ 20g，并按 10: 1 比例加入培养基。为避免试样中耗酸的碳酸盐等矿物造成 pH 值迅速升高，应先用硫酸调矿浆 pH 值，使之稳定在 1.5 ~ 2.5 之间。pH 值稳定后才能进行细菌接种。接种量根据菌种的浓度，一般为 1 ~ 15ml，之后放入恒温摇床进行恒温振荡培养，振荡频率以 100 ~ 200 次/min 为宜，过低易沉淀，过高易使培养液溅出。

试验开始前先测定矿浆 pH 值等，并取样分析，然后按一定时间间隔定时取样并分析。每次取样前补加蒸馏水以补偿水的蒸发损失。在煤炭浸出脱硫试验中，我们主要考察了不同生长环境下煤与非煤系 T. f 菌和不同培养环境下磁化与非磁化培育 T. f 对煤炭中黄铁矿硫的脱除效果，以及煤样粒度、浸出时间等对煤炭脱硫的影响等方面内容。

3.5.2 浸出脱硫效果的预测方法^[125]

煤炭浸出脱硫效果的预测采用的是灰色预测方法。灰色预测是一种对含有不确定因素的系统进行预测的方法，它是根据过去及现代已知的或非确定的信息，建立一个从过去引申到将来的灰色模型（Grey Model），从而预测系统未来发展变化的趋势。

灰色模型，简称 GM 模型。对于 n 阶 h 个变量的 GM 模型记作 GM (n, h)。其中 GM (1, 1) 模型为单变量一阶线性动态模型，主要解决单序列的预测问题。GM 模型的建模机理：对于含有一定误差影响，呈离散状态的原始数据，采取先对数据作累加生成和累减生成处理，形成单调增减序列，淡化随机性误差影响，再拟以微分方程进行建模。通过对模型值的还原，即生成的逆运算，求得预测值。

GM 预测方法的特点是：可以不涉及原始数据分布的先验特性，对于无规律或服从任何分布的任意光滑离散的原始序。通过作有限次数据生成，均可转化为有规律的序列。另外，它对原始数据列长度的要求不高。

(1) 数据累加

累加是将原始序列通过累加得到生成序列。方法是：将原始序列的第一个数据作为生成序列的第一个数据，将原始序列的第二个数据加到生成序列的第一个数据上，其和作为生成序列的第二个数据，将原始序列的第三个数据加到生成序列的第二个数据上，其和作为生成序列的第三个数据，按此规则进行下去，便可得到生成列。

记原始序列为： $x^{(0)} = \{x^{(0)}(1), x^{(0)}(2), \dots, x^{(0)}(n)\}$ ，上标 0 表示为原始序列。

记一次累加生成列为： $x^{(1)} = \{x^{(1)}(1), x^{(1)}(2), \dots, x^{(1)}(n)\}$ ，其中：

$$x^{(1)}(k) = \sum_{i=1}^k x^{(0)}(i) \quad (k = 1, 2, \dots, n) \quad (3-5)$$

同理，m 次累加生成列为：

$$x^{(m)}(k) = \sum_{i=1}^k x^{(m-1)}(i) \quad (3-6)$$

(2) 数据累减

方法是将生成列前后两个数据相减，所得数据序列为累减生成序列。累减是累加的逆运算，累减可将累加生成列还原成非生成列，在建模中获得增量信息。

若 $x^{(r)}$ 为原始序列 $x^{(0)}$ 作 r 次累加生成的生成序列，则有：

$$x^{(r-1)}(k) = x^{(r)}(k) - x^{(r)}(k-1) \quad (k = 1, 2, \dots, n) \quad (3-7)$$

对生成序列 $x^{(r)}$ 作 r 次累减生成则得到原始数列 $x^{(0)}$ 。

(3) GM(1, 1) 预测模型的建立

设有原始序列 $x^{(0)}$ 为：

$$x^{(0)} = \{x^{(0)}(1), x^{(0)}(2), \dots, x^{(0)}(n)\}$$

建立白化形式微分方程：

$$\frac{dx^{(1)}(t)}{dt} + ax^{(1)}(t) = u \quad (3-8)$$

式中： a, u 为模型待定参数，可根据最小二乘法来确定。

$$a = [a \ u]^T = (B^T B)^{-1} B^T Y_N \quad (3-9)$$

式中：

$$B = \begin{bmatrix} -\frac{1}{2}[x^{(1)}(1) + x^{(1)}(2)] & 1 \\ -\frac{1}{2}[x^{(1)}(2) + x^{(1)}(3)] & 1 \\ \dots\dots\dots & \dots\dots\dots \\ -\frac{1}{2}[x^{(1)}(n-1) + x^{(1)}(n)] & 1 \end{bmatrix}$$

$$Y_N = [x^{(0)}(2) \ x^{(0)}(3) \ \dots \ x^{(0)}(n)]^T$$

解微分方程，求出参数 a 后，可得累加后的预测模型：

$$x^{(1)}(k+1) = (x^{(0)}(1) - u/a)e^{-ak} + u/a \tag{3-10}$$

进行累减生成，即还原得原始序列的预测模型：

$$x^{(0)}(k+1) = x^{(1)}(k+1) - x^{(1)}(k) \tag{3-11}$$

(4) 预测模型精度检验

灰色预测模型精度采用的是后验差方法进行检验。

由预测模型计算，得到原始序列模型值为：

$$x^{(0)} = \{x^{(0)}(1) \ x^{(0)}(2) \ x^{(0)}(n)\}$$

残差序列 e 为：

$$e = \{e(1) \ e(2) \ \dots \ e(n)\}$$

其中：

$$e(k) = x^{(0)}(k) - \bar{x}^{(0)}(k) \qquad (k = 1 \ 2 \ \dots \ n) \tag{3-12}$$

记原始序列 $x^{(0)}$ 与残差序列 e 的方差分别为 S_1^2 , S_2^2 , 即有：

$$S_1^2 = (1/n) \sum_{k=1}^n [x^{(0)}(k) - \bar{x}^{(0)}]^2 \qquad \text{其中 } \bar{x}^{(0)} = (1/n) \sum_{k=1}^n x^{(0)}(k) \tag{3-13}$$

$$S_2^2 = (1/n) \sum_{k=1}^n [e(k) - \bar{e}]^2 \qquad \text{其中 } \bar{e} = (1/n) \sum_{k=1}^n e(k) \tag{3-14}$$

$$\text{后验差比值 : } C = S_2/S_1 \tag{3-15}$$

$$\text{小误差频率 : } P = \{ |e(k) - \bar{e}| < 0.6744S_1 \} \tag{3-16}$$

按上述两指标 C、P，把预测模型等级划分为四等，作为检验预测模型精度标准^[125]。

表 3-5 灰色 GM 预测模型精度等级表

预测精度等级	P	C
1. 好	≥0.95	≤0.35
2. 合格	≥0.8	≤0.5
3. 勉强	≥0.7	≤0.65
4. 不合格	<0.7	>0.65

3.5.3 微生物选择性絮凝脱硫的方法^[126~128]

微生物选择性絮凝是在一个含有两种或两种以上悬浮组分的稳定矿浆悬浮液中，加入某种微生物絮凝剂。由于不同矿物表面活性不同，生物絮凝剂分子会在不同矿物组分之间产生有选择的吸附作用，通过氢键力、范德华力等，利用桥联或架桥而形成絮团并沉降，同时另一种或几种矿物组分仍分散在矿浆悬浮液中不受或很少受影响，从而达到使不同矿

物组合分离的目的。生物选择性絮凝各阶段情况如图 3-3 所示。

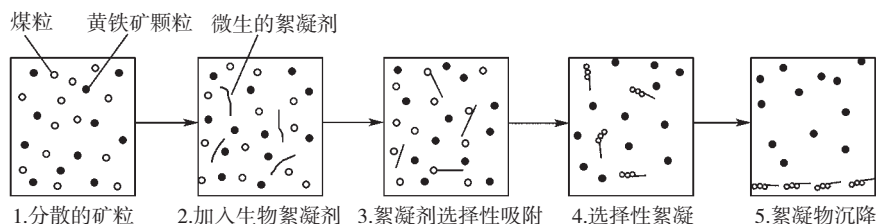


图 3-3 煤炭微生物选择性絮凝过程示意图

试验中选择草分枝杆菌 (*M. phlei*) 作为煤炭选择性絮凝脱硫用生物絮凝剂, 是基于该菌所具有的较强的疏水性和较高的负电性等表面特性。试验主要考察了 *M. phlei* 菌对煤样选择性絮凝, 从而脱除黄铁矿硫的效果, 并探讨了其絮凝作用机理。

3.6 试验仪器及设备

3.6.1 煤与黄铁矿试样粒度及成分分析测试设备

- (1) XSB - 70A 型 $\phi 200$ 标准筛振筛机;
- (2) SP - 100 $\times$ 100 型颚式破碎机;
- (3) XPM - $\phi 120 \times 3$ 三头研磨机;
- (4) KZDL - 3 型快速智能定硫仪 (测硫范围: 0% ~ 10%);
- (5) MHXS - 4 型高温电炉;
- (6) SARTORIUS 型电子天平 (精度为万分之一) 等等。

3.6.2 煤与黄铁矿试样表面形貌与成分分析设备

- (1) D/max - 3B 型 X 射线衍射仪 (日本理学 Rigaku 公司)

分析方式与测试条件: 定性分析, 连续扫描 (速度为 $3^\circ/\text{min}$) 采样间隔 0.02° 。分析标准: 利用粉末衍射联合会国际数据中心 (JCPDS - ICDD) 提供的各种物质标准粉末衍射资料 (PDF), 并按照标准分析方法进行对照分析。

- (2) S250MK III 扫描电子显微镜 (英国剑桥)

性能指标: 分辨率 60A, 放大倍数 20 万倍, 加速电压 40KV。

图像分析模式: 二次电子像; 激发电压为 15kV。

主要附件: AN10000 能谱仪。

- (3) JEM - 200CX 透射电子显微镜 (日本电子)

性能指标: 分辨率 2.04A, 放大倍数 45 万倍, 加速电压 200KV。

图像分析模式: 二次电子像; 激发电压为 80kV。

主要附件: 超高分辨扫描台及多功能样品台。

- (4) VECTOR33 型红外光谱仪 (德国 BRUKER 公司)

性能指标: Scanner Velocity: 6 ~ 100KHZ; Beamsplitter: KBr;

X - axes : Wavenumber/ cm^{-1} , Y - axes : transmittance/%。

分析软件 : OPUS/IR。

(5) MPV - SP 型显微光度计 (德国 Leitz 公司)

物镜 4 ~ 100X , 目镜可调。附带普通 135 照相机。

3.6.3 微生物培养与分析检测设备

(1) HH - BII360 - S 型电热恒温培养箱 (温度范围 : 室温 ~ 60) ;

(2) 101 - 1 - S 型电热恒温鼓风干燥箱 (最高工作温度 : 300) ;

(3) LD4 - 2 型电动低速离心机 (最高转速 4000 转/min) ;

(4) YQ02 - 30 型 30 升旋片式真空泵 ;

(5) DHS - 25 型数显酸度计 ;

(6) HY - 5A 型旋回式及 HY - 2A 型数显经复式振荡器 (频率 : 60 ~ 360 次/min , 无级调速) ;

(7) YXQ. SG41. 280 型手提式压力蒸汽灭菌器 (工作压力 : 0.15MPa) ;

(8) HX - 8800 型空气泵 (空气流量 : 1.5 升/min) ;

(9) KCJ - 5 型可控磁力搅拌器 (搅拌速度 : 150 - 800 转/min) , 连续可调 , 水浴温控范围 : 室温 ~ 100 ;

(10) 581 - G 型光电比色计 ;

(11) DMB5 数码显微分析系统 (加拿大 Motic 公司) ;

性能指标 : 130 万像素数码成像 , 分辨率 : 1280×1024 活动像素 , 最大扫描速度 (16MHz) : 40 帧/秒 (640×480)、12 帧/秒 (1280×1024)。分析软件 : Motic Images Advanced3.0 ;

(12) 磁化装置 (平均磁感应强度 : 250GS) ;

(13) CT5 型高斯计 (测量范围 : 0 ~ 25KGS , 精度 : $100\text{GS} \pm 5\%$) ;

(14) Darling 数码照相机 (像素 : 80 万)。

3.6.4 脱硫微生物分子生物学试验设备

(1) TGL - 16H 型高速离心机 (最高转速 : 20000 转/min) ;

(2) DY - 1 型水平式凝胶电泳仪 ;

(3) Thermo LabsysTems 可调试移液器 , 规格 : 5 ~ 40ul、40 ~ 200ul ;

(4) ZF 型紫外分析仪 ;

(5) Sk - 1 型混匀器 ;

(6) Hema 紫外数码凝胶图像分析系统 (附带 GSM 电泳图像分析系统软件 2.0) ;

(7) Eppendorf 管 (规格 1.5ml、2.5ml) ;

(8) WMK - 04 型恒温水浴器 (温度范围 0 ~ 100)。

4 脱硫微生物的培养及其生物学特性研究

4.1 脱硫微生物菌种的培养基

4.1.1 培养基配制的原则及主要类型

(1) 配制培养基原则

培养基是人工配制的适合不同微生物生长繁殖或者积累代谢产物的营养基质，它是根据各种微生物的营养需要，将水、碳源、氮源、无机盐和生长因素等按一定比例配制而成的微生物营养物。培养基是进行科学研究及应用等方面的基础。

由于各种微生物所需要的营养不同，所以，培养基的种类有很多，目前约有数千种各种类型培养基。配制微生物培养基的原则是：

①营养物质应满足微生物的需要。不同营养类型微生物对营养的需求差异较大，应根据所培养菌种对各营养要素的不同要求进行配制。如自养微生物的培养基成分是无机物，因为它们有较强的生物合成能力，可将简单的无机物及 CO_2 合成自己细胞的糖、脂肪、蛋白质、核酸、维生素等复杂物质。而异养菌培养基成分必须含有有机物。

②各种营养物的浓度及配比应适当。营养物浓度太低不能满足微生物生长的需要，太高又会抑制微生物的生长。各种营养物质之间的配比也直接影响菌体的生长繁殖和代谢物的积累，特别是 C 与 N 之比的影响最为明显。一般来说，培养基中各种营养要素的比例为： $\text{H}_2\text{O} > \text{C} > \text{N} > \text{P} > \text{S} > \text{其他元素} > \text{生长因子}$ 。

③调节适宜的酸碱度。大多数细菌、放线菌的 pH 值为中性至微碱性，即 pH 值 7.0 ~ 8.5，酵母菌 pH 为 3.8 ~ 6.0，霉菌 pH 在 4.0 ~ 5.8 之间。但对具体微生物来说，往往会突破上述界限。如脱硫微生物 T.f 菌最佳生长 pH 值为 1.5 ~ 3.5。而微生物在生长和代谢过程中可引起培养基酸碱度变化，如氧化铁硫杆菌在培养中会产生 H_2SO_4 ，进一步提高培养基的酸度，所以为了维护培养基稳定的 pH 值，一般在配制培养基时加入一些缓冲剂或不溶性的磷酸盐，如磷酸氢盐、磷酸二氢盐、磷酸盐等。

④对于某些特殊要求的培养基，如用于观察和定量测定微生物生长用的合成培养基，为避免产生沉淀物，可加入适量的 EDTA（乙二胺四乙酸）或 NTA（氮川三乙酸）等螯合剂。EDTA 常用浓度为 0.01%。

⑤由于生产中培养基用量很大，所以如何寻找价廉易得的原料，也是培养基配制时应考虑的问题。

(2) 培养基的基本类型及作用

培养基按照其制成物理状态可分为液体和固体以及半固体培养基，其中液体培养基常用于大规模的工业生产以及生理代谢等基本理论研究。液体培养基中加一定的凝固剂，便成为固体培养基。常用凝固剂有琼脂、明胶、硅胶等。固体培养基为微生物的生长提供了

一个营养表面，在这个营养表面上生长的微生物可形成单个菌落。因此，固体培养基在微生物分离、鉴定、计数、保藏等方面起着相当重要的作用。

含少量琼脂的培养基（0.2% ~ 0.5%）称为半固体培养基，主要用于观察细菌运动特征、鉴定菌种等。

4.1.2 脱硫微生物培养基的组成

（1）氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）

工业生产或试验研究使用的 T. f 菌，一般都用西弗门（Silverman）或利森（Leathen）培养基进行培养。因 Silverman 培养基中 Fe^{2+} 的含量为 9g/L，所以又称为 9K 培养基。有时根据需要也可配制 9K/2 或 9K/4 培养基对 T. f 菌进行培养。试验中，我们采用的是 9K 培养基对 T. f 菌培养。

9K 培养基的配方为：

溶液 1：把 3g 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1g 的 KCl、0.5g 的 K_2HPO_4 、0.5g 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.01g 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶于 700mL 的蒸馏水中；

溶液 2：把 44.2g 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 300mL 的蒸馏水中，再加入 1mL 10N 的硫酸溶液。

将溶液 1 在 0.1MPa 下灭菌 30min，溶液 2 在 0.05MPa 下灭菌 30min，在使用前把两种已灭过菌的溶液混合，用硫酸将培养基的 pH 值调至 2.5 左右。

（2）草分枝杆菌（*Mycobacterium phlei*）

试验研究中，对草分枝杆菌的培养基，我们采用的是中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供的培养基配方，其成分组成：蛋白胨 10 克；牛肉提取物 3 克；NaCl 5 克；琼脂 15.0 克；蒸馏水 1.0 升；pH 7.0。

培养基的灭菌步骤：将装有液体培养液的锥形瓶塞上棉塞，罩上牛皮纸，用皮筋套紧。先检查高压灭菌锅内是否有足够的水，至少应使水面超过加热丝，放好锅内桶后，放入要灭菌的培养基，盖好锅盖，并将周围圆螺钉拧紧，打开放汽阀。插上电源，预热 5 分钟，将锅内空气赶出后，关闭放汽阀，待压力升高，当温度指到 121℃，压力为 0.15MPa 时，使温度压力恒定（放气），此时灭菌计时开始，约半小时后，然后关掉电闸，等锅内自然冷却，放空，打开锅盖，取出培养基。

4.2 氧化亚铁硫杆菌（T. f）的生物学研究

4.2.1 氧化亚铁硫杆菌（T. f）菌种的分离纯化与扩大培养

试验中，我们对取自中南大学矿物工程系生物实验室的非煤系 T. f 菌和采自四川南桐矿务局干坝子选煤厂和砚石台煤矿的煤系 T. f 菌进行了培养、分离纯化与扩大培养。

对采集和获取到的煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌（T. f），分别用 Silverman 培养基（9k 培养基）进行培养。原始菌液中的 T. f 菌浓度很低，首先需要进行 T. f 菌的繁殖。繁殖在 100mL 的三角锥形瓶中进行。配好的 9K 培养基用蒸气消毒 15min，然后在无菌操作下分装于数个事先洗净并灭过菌的 100ml 的三角瓶中。每瓶中装培养基 20 或 30ml，用洗

净干燥的吸液管分别取 1 ~ 5ml (或 5 ~ 10ml) 原始菌液接种至各三角瓶中。塞好棉塞置于 20 ~ 30 °C 下恒温振动培养约 7 ~ 10 天。

由于细菌的生长繁殖,三角瓶中培养基的颜色会由浅绿变为红棕色,最后在瓶底出现高铁沉淀。变化最快,颜色最深的三角瓶中细菌的浓度较自然环境中的细菌浓度大大增加,约可达 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL。如图 4-1 所示。

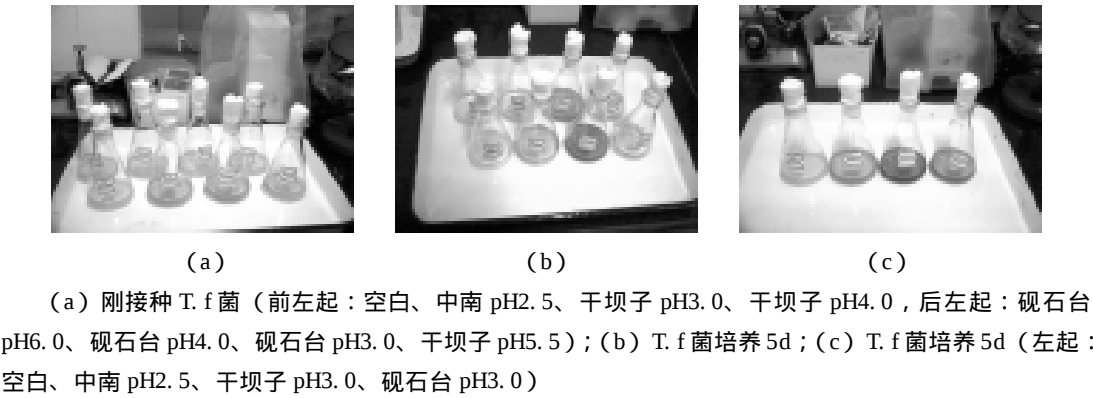


图 4-1 氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 的液体培养基培养

用 9K 培养基培养出来的微生物是以氧化亚铁硫杆菌为主的混合菌种,培养液中仍可能含有杂菌,须进行分离纯化,才能获得目的菌株的纯培养。方法有稀释涂布平板法和终点稀释法等。终点稀释法简便,但有可能分离出的纯培养并不是所希望的菌种。因此,研究中我们采用的是稀释涂布平板法,如图 4-2 所示。

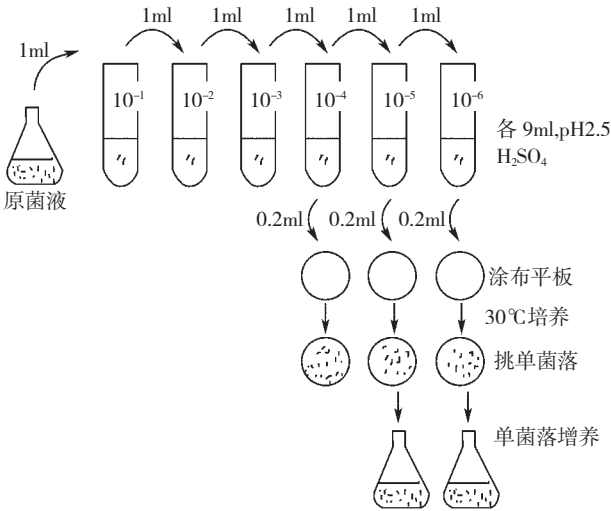


图 4-2 *T. f* 菌稀释涂布平板分离法示意图

具体步骤如下:取已繁殖好的菌液 1ml,用 pH2.5 的稀硫酸溶液稀释,每次稀释 10 倍,依次稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度的稀释液。

然后制备 9K 琼脂固体培养基,将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度的稀释液各 0.2ml,分别接种到 3 个盛有 9K 琼脂固体培养基的培养皿中,涂布均匀,于生化培养箱中倒置培养,直

至固体培养基表面出现铁锈色圆点状小菌落。

将单独小菌落挑起，每个小菌落分别接种在 4 ~ 6ml 的 9K 培养基的小试管中，或接种到盛有以硫化矿代替 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的 9K 培养基的小锥瓶中，振动恒温培养（28 ~ 30 、160 次/min），直至溶液变成棕色。

经过平板分离即可获得氧化亚铁硫杆菌（T. f）的纯培养菌株。如图 4 - 3 所示。

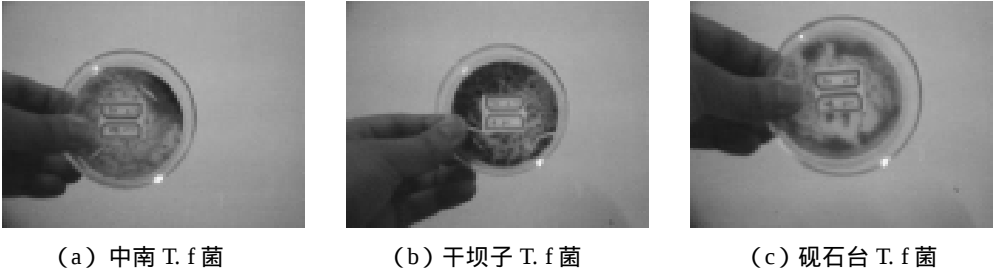


图 4 - 3 氧化亚铁硫杆菌（T. f）在固体培养基上的培养

氧化亚铁硫杆菌（T. f）的扩大培养仍采用 9k 培养基，先用 5mol/L 的 H_2SO_4 调节培养基的 pH 值为 2，再在 9K 液体培养基中接种一定量的纯 T. f 菌，然后将培养液置于生化培养箱，30 充气旋回振荡培养，每隔 9 天转种一次。在培养过程中，定期观测其生长情况肉眼观察。如有该菌生长，则培养基中的亚铁将被氧化成高铁，培养基的颜色会由浅绿色变为红棕色，最后产生高铁沉淀。如图 4 - 4 所示。

同时，通过显微镜观察细菌的形成及是否具有 T. f 菌的形态特征，并测定细菌浓度及培养基 pH 值的变化等。



图 4 - 4 氧化亚铁硫杆菌（T. f）的扩大培养

4. 2. 2 氧化亚铁硫杆菌（T. f）菌落特征及菌体形态学研究

(1) T. f 菌的菌落特征

固体平板培养 1 ~ 2 周后，平板表面开始出现微小菌落。菌落表面干燥、圆形、薄，直径约为 0.8 ~ 1.0mm，边缘不规则，中央呈褐色，边缘颜色稍浅，较难挑取。随着生长。菌落直径增至 1.2 ~ 1.5mm，同时菌落颜色转变为深褐色（Mishra 称之为第二期生长），长老的菌落深深地包埋于培养基中，仅表面稍凸。

由于 T. f 菌氧化 Fe^{2+} 的终产物为红褐色 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ，该物质积累于菌落中央而成为菌落特征之一。 Fe^{2+} 浓度高，细菌氧化 Fe^{2+} 生成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的数量多，因而菌落生长早期便表现红褐色特征。反之只有经 T. f 菌一定时间的氧化积累， $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的量才足以表现肉

眼观察所见的红褐色。因此所谓第二期生长，实际为 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的积累作用。

(2) T. f 菌的革兰氏染色法及菌体形态与运动性的观察鉴定

观察细菌的形态可用单染色法或复染色法（革兰氏染色法）。细菌经过染色后，即可在光学显微镜下观察微生物的形状和结构。

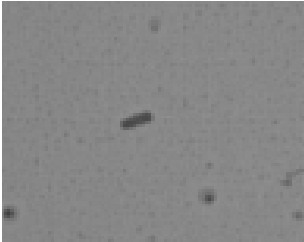
革兰氏染色法是一种复染色法，应用结晶紫与番红两种不同性质的染料进行染色。染色成败的关键在于严格掌握酒精的脱色程度和使用新鲜幼龄的菌体进行涂片。

其操作步骤如下：

- ①涂片。将待检细菌按简单染色法涂片、风干、固定。固定时通过火焰两次即可。
- ②初染。加草酸氨结晶紫染液染色 1min 水洗。
- ③碘液固定。滴加鲁哥氏碘液冲去残水，覆盖涂片 1min，水洗。
- ④酒精脱色。用 95% 酒精滴洗涂片处，至流洗出的酒精不呈现出紫色时，立即用水冲净酒精，脱色时间约 20s，视涂片厚薄而略有差异。
- ⑤用番红（或沙黄）染色液染色 1~2min，水洗。风干后镜检。

T. f 菌染色较难，涂片后必须用强染色剂，如石碳酸复红或草酸铵结晶紫，且作用时间较长（约 3min 以上），菌体才能被染上颜色。此现象已被 Leathen 和 Siilvermun 等报道。

石碳酸复红染色，油镜（10 × 100 倍）下观察、拍照。如图 4-5 所示。可以看到细菌成短杆状，两端钝圆，大小约 $(0.5 \sim 0.8) \times (1.0 \sim 1.5) \mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性。在进行活体镜检时，可看到该细菌运动剧烈，不断在作波浪形螺旋翻滚运动，具有较强活动能力。该类细菌以单极生鞭毛运动。细菌多为单个，偶或连成双体。



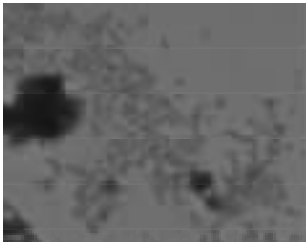
(a) 中南 T. f 菌（个体）



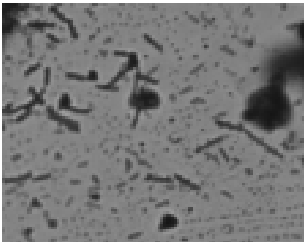
(b) 干坝子 T. f 菌（个体）



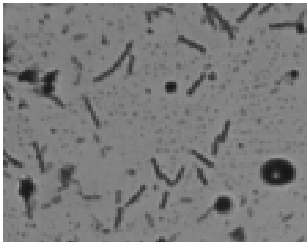
(c) 砚石台 T. f 菌（个体）



(d) 中南 T. f 菌（群体）



(e) 干坝子 T. f 菌（群体）



(f) 砚石台 T. f 菌（群体）

图 4-5 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 革兰氏染色显微观测

4.2.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 培养中沉淀产物的 XRD 分析

我们对取自中南大学的非煤系 T. f 菌和采自四川南桐矿务局的煤系 T. f 菌，在培养过程中产生的沉淀产物进行取样，经过干燥、制样后，用 X 射线衍射仪进行测定。沉淀产

物的 X 射线衍射 (XRD) 谱图分析结果表明, 氧化亚铁硫杆菌培养中沉淀产物的主要成分为: 黄钾铁矾 $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ 和黄铵铁矾 $\text{NH}_4\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$, 如图 4-6 所示。

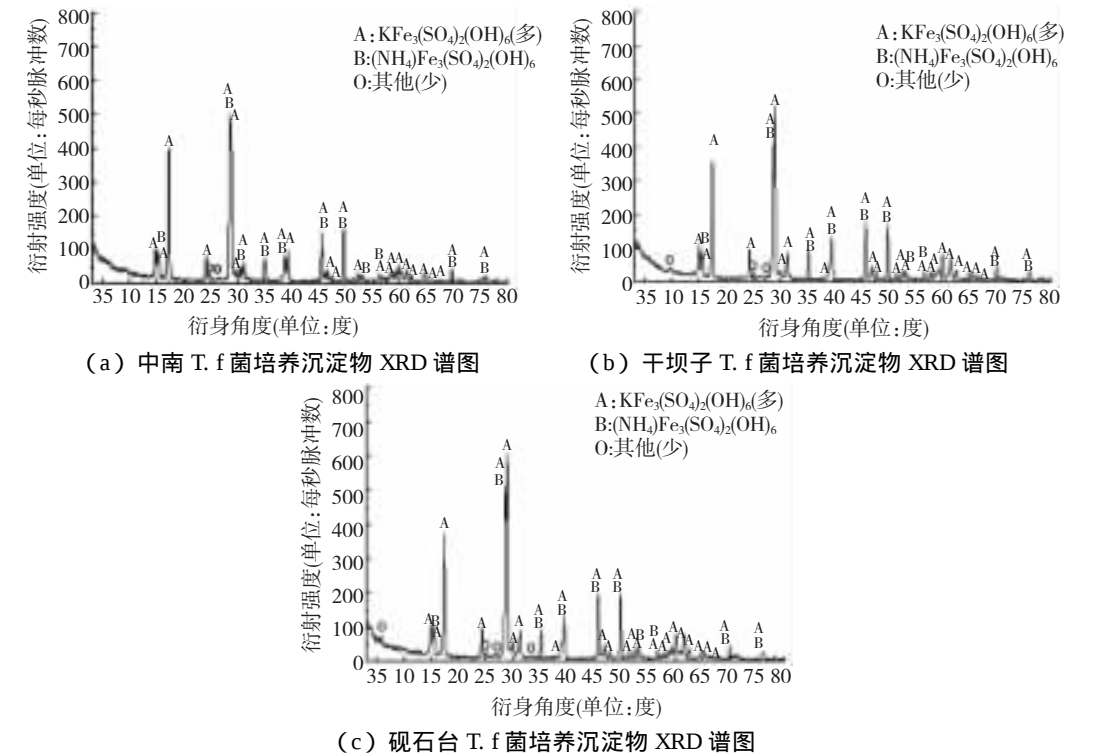


图 4-6 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 培养沉淀产物 XRD 图谱

4.3 草分枝杆菌 (M. phlei) 的生物学研究

4.3.1 草分枝杆菌 (M. phlei) 的活化与培养

草分枝杆菌 (M. phlei) 是来自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心的纯种菌株。该菌种原采用的是真空冷冻干燥保存, 保藏期较长, 使用时先对其进行恢复培养。具体方法是: 先用无菌吸管吸取 0.3 ~ 0.5ml 适宜的液体培养基, 滴入安瓿管中, 轻轻振荡, 使冻干菌体溶解呈悬浮状。再吸取全部菌体悬浮液, 移植于斜面培养基上, 并置于生化培养箱中, 恒温旋回振荡培养。经过数次转种, 从而使菌种恢复正常生长。

活化后的草分枝杆菌 (M. Phlei) 在液体培养基中进行培养。培养条件及步骤如下: 首先在 250ml 三角烧瓶中加入 100ml 培养基, 120 °C 高温灭菌后接种一定量的纯种 M. Phlei。然后在 37 °C、120 转/分钟的旋回振荡器上进行振荡培养。此外, 将该菌划线接种至营养琼脂培养基上, 用于菌落形态等生物学特性的观测研究。

4.3.2 草分枝杆菌 (M. phlei) 菌落特征及菌体形态学研究

(1) 草分枝杆菌 (M. phlei) 固体培养基上菌落形态特征的观察

方法：取草分枝杆菌（*M. phlei*）的固体培养产物（图 4-7），选择单个菌落进行无菌切片，将菌落置于玻片上，干燥。显微镜（10 × 10 倍）下观察典型菌落的形态特征（图 4-8）。



图 4-7 *M. phlei* 菌菌落分布

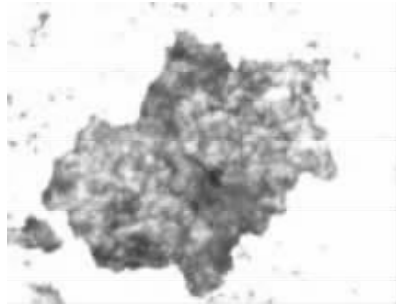


图 4-8 *M. phlei* 菌单个菌落

(2) 草分枝杆菌（*M. phlei*）的染色与观察

①革兰氏染色。方法同前：将细菌标本固定，先用结晶紫初染，再加碘液媒染，然后用 95% 乙醇脱色，最后用复红液复染。风干后加香柏油，置于显微镜油镜（10 × 100 倍）下观察（图 4-9）。

②抗酸染色法染色。方法：抗酸染色法制片同革兰氏染色（Grain s stain），固体菌落用 0.9% 的生理盐水化开。染色时将固定的标本片用 5% 石炭酸复红液加热，并延长染色时间，以促使菌体着色，然后用 3% 盐酸酒精脱色，最后经美蓝复染。风干后加香柏油，置于显微镜（10 × 100 倍）油镜下观察（图 4-10）。

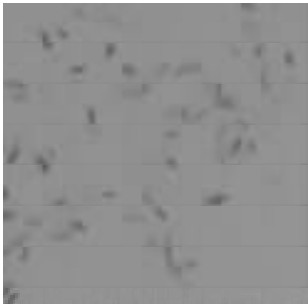


图 4-9 *M. phlei* 菌革兰氏染色

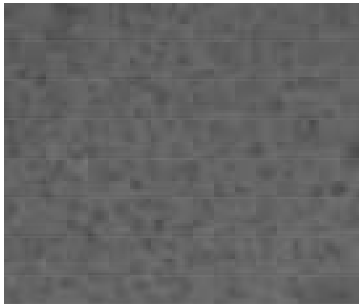


图 4-10 *M. phlei* 菌抗酸染色

(3) 草分枝杆菌（*M. phlei*）的培养生长及细菌的形态特征分析

草分枝杆菌（*M. phlei*）在固体培养基上培养 3 天后，开始形成深黄并逐渐转为橙色的菌落，见图 3-8。菌落表面粗糙，少数菌落柔软呈奶油状。菌落中心圆顶状，附近有暗色颗粒，边缘不规则。

草分枝杆菌（*M. phlei*）在液体培养基中培养 72h 后，每隔 24h 采用血球计数板，在显微镜下测定细菌浓度，结果如图 4-11 所示。

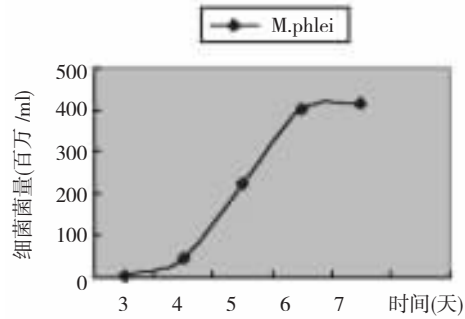


图 4-11 草分枝杆菌 (M. phlei) 培养过程中细菌菌量的变化

由图 4-9 可见，革兰氏染色中，草分枝杆菌 (M. phlei) 不被乙醇脱色，仍保留紫色，应为革兰氏阳性菌 (G+)。抗酸性染色中，抗酸性细菌一旦着色，则能抵抗盐酸酒精的脱色，故保持红色，而非抗酸性细菌则被脱色而复染成蓝色。图 4-10 中，草分枝杆菌 (M. phlei) 由于其菌体内及表面多含有分枝菌酸和脂类等成分，抗酸染色结果为红色，因此为抗酸性细菌。

4.3.3 草分枝杆菌 (M. phlei) 的红外光谱 (FTIR) 分析

(1) 红外光谱 (FTIR) 谱图

从草分枝杆菌 (M. phlei) 固体培养基上取一定量的菌样，经干燥、制样，用红外光谱仪进行测定，结果如图 4-12 所示。

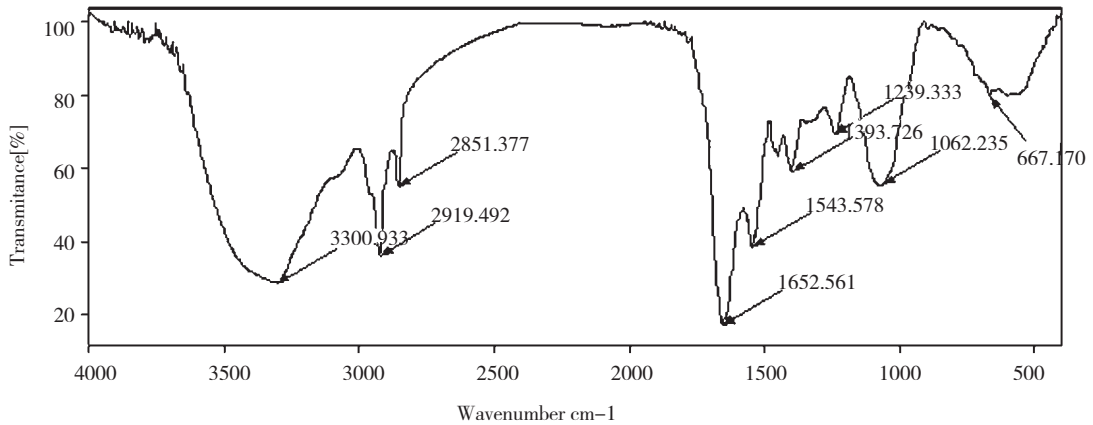


图 4-12 1#样品 (M. phlei 菌) 红外光谱谱图

(2) 红外光谱 (FTIR) 图谱解析

草分枝杆菌 (M. phlei) 的红外光谱图谱解析^{[135][136]}：

波数	可能的官能团
3300	氢键的缔合或酚羟基，—OH 或—NH（胺类）
2919，2851	环烷烃或脂环烃上氢的吸收峰—CH3
1652	这是一个很强的吸收峰，可能归因于氢键化的羰基—COO 与芳香环 C=C 双键吸收相重叠的结果，也可能由于缩合芳环被 CH ₂ 所连

接

1543 芳烃的振动

1393 —CH₃

1239 , 1062 —C—O

667 芳香环的吸收峰

由红外光谱分析结果可知，草分枝杆菌（*M. phlei*）表面含有环烷烃、脂环烃、芳香环等多种有机官能团。这些官能团具有高度的疏水性，因此草分枝杆菌（*M. phlei*）是一种强疏水性微生物。另外，由于其菌体表面还含有—OH 或—NH、—COO 等多种离子化基团，使其带有较强的电性。

5 微生物的遗传变异与脱硫菌种的选育改良

5.1 微生物的遗传变异^{[13][16]}

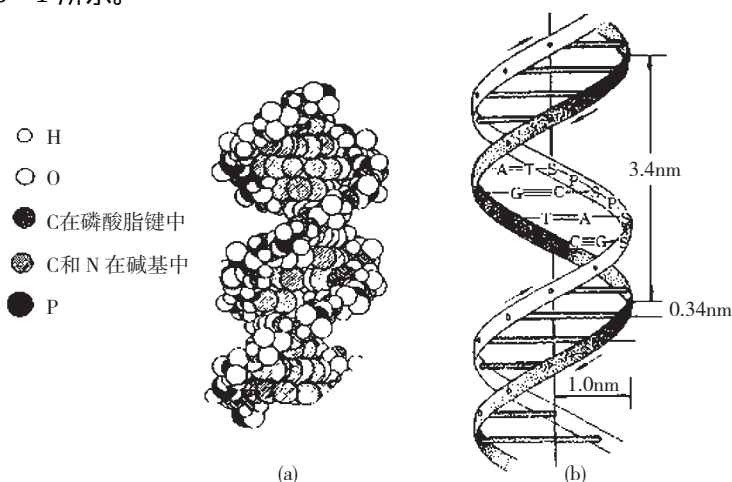
5.1.1 遗传变异的物质基础

(1) DNA 的结构和复制

微生物的遗传性是指亲代生物将其特征传给子代的潜力，当子代生活在适宜的环境条件下时，就可出现与亲代相似的形态与生理等特征。微生物的遗传性既有稳定的一面，又有变异的一面，称为遗传的变异性。

除了少数病毒的遗传物质是核糖核酸（RNA）外，包括细菌在内的各种生物的遗传物质都是脱氧核糖核酸（DNA）。从分子遗传学角度看，亲代是通过脱氧核糖核酸（DNA）将决定各种遗传性状的遗传信息传给子代的。子代有了一定结构的 DNA，便产生一定形态结构的蛋白质，由一定结构的蛋白质就可决定子代具有一定形态结构和生理生化性质的遗传性状。

DNA 是高分子化合物，一个 DNA 分子是由多个单核苷酸组成，每个核苷酸由磷酸、脱氧核糖以及碱基所构成。其中碱基包括：T（胸腺嘧啶 thymine）、A（腺嘌呤 adenine）、G（鸟嘌呤 guanine）、C（胞嘧啶 cytosine）四种。沃特森（Watson）和克里克（Crick）（1953）首先认为 DNA 是两条多核苷酸链彼此互补，并排列方向相反的，以右手旋转方式围绕同一根主轴而互相盘绕形成的，具有一定空间距离的双螺旋结构。每条核苷酸链上的碱基以氢键与另一条多核苷酸链上的四种碱基彼此互补相配（A 配 T，C 配 G），构成碱基配对，如图 5-1 所示。



(a) DNA 的双螺旋结构模型；(b) 模型的图解（S-糖；P-磷酸）

图 5-1 DNA 的双螺旋结构模型及其图解

一个 DNA 分子可以含几十万或几百万碱基对。特定的种或菌株的 DNA 分子，其碱基顺序固定不变，保证了遗传的稳定性。一旦 DNA 的个别部位发生了碱基排列顺序的变化，都会导致遗传性状的变化。在现代细菌分类鉴定中，通常是采用测定 G + C 百分含量来确定属、种或菌株。

原核微生物的 DNA 只与很少量蛋白质结合，也没有核膜包围，只是单纯由一条 DNA 细丝构成环状的染色体，处在细胞中央，高度折叠形成具有空间结构的一个核区。由于含有磷酸根，所以带有很高的负电荷。

生物的遗传因子基因（gene）是 DNA 分子上一个具有特定核苷酸顺序的核酸区段，是生物体内储存遗传信息的、有自我复制能力的遗传功能单位。它按功能可分为三种：结构基因，编码蛋白质或者酶的结构，控制蛋白质或者酶的合成；操纵基因，操纵着结构基因的表达；调节基因，用于控制结构基因。

基因控制遗传性状，但不等于遗传性状。任何一个遗传性状的表现都是在基因控制下的个体发育结果。从基因型到表现型必须通过酶催化的代谢活动来实现。基因直接控制酶的合成，即控制生化反应步骤和新陈代谢，从而决定了遗传性状的表现。

DNA 分子以特有的半保留方式进行复制，以确保 DNA 复制精确，并保证一切生物遗传性的相对稳定。其复制过程如下：首先是 DNA 分子中的两条多核苷酸链之间的氢键断裂，彼此分开成两条单链；然后各自以原有的多核苷酸链为模板，根据碱基配对的原则吸收细胞中游离的核苷酸，按照原有链上的碱基排列顺序，各自合成出一条新的互补的多核苷酸链。新合成的一条多核苷酸链和原有的多核苷酸链又以氢键连接成新的双螺旋结构，如图 5-2 所示。

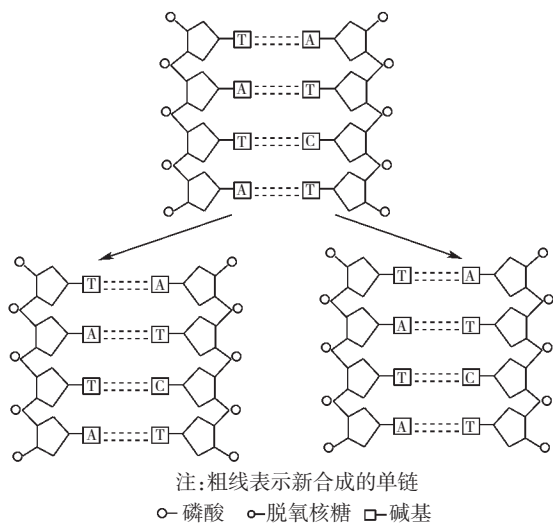


图 5-2 DNA 的半保留复制示意图

DNA 的复制和遗传信息传递的基本规则，称为分子遗传学的中心法则。不论是细胞生物还是非细胞生物，贮存在 DNA 上的遗传信息都通过 DNA 转录为 RNA，将遗传信息传给后代，并通过 RNA 的中间作用，指导蛋白质的合成。如图 5-3 所示。生物体内蛋白质是生物体各种生理功能的执行者。蛋白质没有自我复制能力，它是通过 DNA 分子结构上的遗传信息来合成的。

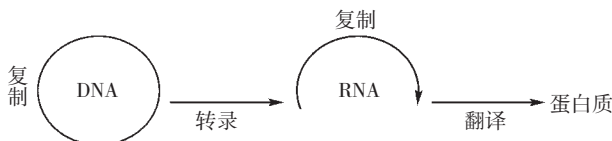


图 5-3 遗传信息的传递方向

(2) DNA 的变性和复性

DNA 的双螺旋结构由碱基对中的碱基之间的氢键维持。当双链 DNA 受热或其他因素作用下，两条链之间的结合力被破坏而分开成单链 DNA，即为 DNA 变性。DNA 变性常采用对 DNA 溶液缓慢加热以促使其变性。除此之外，提高 pH 值也是使双链 DNA 变性的有效方法。如当温度升到 92.6 或 pH 达到 11.3 时，所有氢键消失，双链 DNA 彻底分开成单链 DNA，DNA 完全变性。

变性 DNA 溶液经过适当处理后重新形成天然 DNA 的过程称为复性或退火。用高温使 DNA 变性后，再缓慢降至自然温度，变性的 DNA 会变性成天然双链 DNA，如图 5-4 所示。复性的双链 DNA 是随机结合的。因此，复性后的 DNA 不可能全部是原来的 DNA。

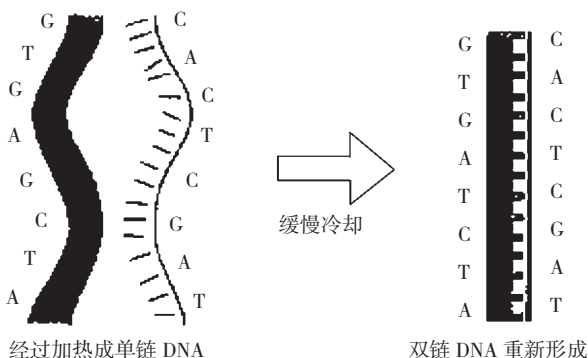


图 5-4 变性 DNA 重新形成双链 DNA 的过程

5.1.2 微生物的变异

微生物较之高等生物容易发生变异，是因为微生物个体微小，结构简单，比表面大，与外界环境联系极为密切，容易接受外界的影响；加上微生物繁殖迅速，在较短的时间内可以接受外界对其产生的多次影响，因而易发生变异。

(1) 非遗传型变异

它是在微生物的 DNA 没有改变的情况下发生的某些性状的改变。这类变异由于未改变其 DNA，所以是可逆的，一旦该诱导条件不复存在时，该变异性就不复存在。

(2) 遗传型变异

它是由于微生物个体的 DNA 发生改变而导致某些性状的改变。这种变异多涉及个别细胞，是不可逆的，能相对稳定地遗传。它有以下几种类型：

基因突变 (gene mutation)。生物体性状发生了可遗传的变化视为突变，包括基因突变和染色体畸变。微生物中以基因突变最为常见。它是由于 DNA 链上的一对或几对碱基发生变化而引起的。当微生物的 DNA 被某种因素引起碱基的缺失、置换或插入，改变了

基因内部原有的碱基排列顺序，从而引起其后代表现型的改变。当后代表现出和亲代显然不同、能遗传的性状时，就发生了突变。突变能在自然情况或人工条件下发生，前者为自发突变，后者为诱发突变（诱变）。自发突变率较低，通常每 $10^6 \sim 10^9$ 个细菌细胞分裂一次时，可发生一次突变。而采用某些物理与化学因素，如紫外线、X 射线、氮芥、亚硝基胍等作用于微生物时，能显著提高其突变频率，这种作用即为诱变（induction）。具有诱变作用的因素为诱变剂或突变物（mutagen）。

基因重组（gene recombination）。将两个不同性状个体细胞内的遗传基因转移至一个个体细胞内，并使之发生遗传性变异的过程为基因重组。原核微生物中的转化、转导、溶原转换和接合等都是基因重组在细胞水平上的反映。其中：转化（transformation）是指受体细胞直接吸收了来自供体细胞的游离 DNA 片段，并把它整合到自身的基因中，从而获得了供体细胞部分遗传性状的过程。转导（transduction）是通过温和噬菌体的介导，将供体菌中的 DNA 片段携带入受体细胞中，从而使受体细胞获得供体菌的部分遗传性状。接合（conjugation）是指两个完整的细胞直接接触，由供体菌传递大段 DNA（包括质粒）遗传信息的过程。

对微生物遗传变异本质与过程深入研究，使驯化育种、诱变育种、杂交育种、质粒育种及基因工程育种的方法和技术得以迅速发展，这必将极大地促进脱硫微生物育种及菌种的遗传改良。

5.2 脱硫微生物菌种选育的遗传学原理^{[12][15][17][18][20][24][26][92][116]}

5.2.1 酶的组成及其催化特性

微生物细胞内的遗传物质上储存着能催化所有生化反应所需的酶，以及调节酶活性的信息。酶是生物体内合成的，催化生物化学反应，并传递电子、原子和化学基团的生物催化剂。酶的组成分为两类，一类是单成分酶，只含蛋白质。另一类是全酶，全酶中除酶蛋白以外还含有辅基或辅酶。酶蛋白的功能是催化生物化学反应，而辅基和辅酶的功能是传递电子、原子或化学基团，其中的金属离子还起激活剂的作用。

酶的催化特性可归纳为以下几个方面：

（1）酶可以加速生物化学反应，缩短反应达到平衡点的时间，但不能改变平衡点。酶在参与反应前后，其性质和数量不发生任何变化。

（2）酶的催化具有专一性，一种酶只能催化一种或一类化学反应，生成一定产物。

（3）酶的催化作用条件温和，在常温、常压和接近中性的水溶液中即可发生，不需要特殊条件。

（4）酶对环境条件极为敏感。高温、强酸、强碱都能使失去活性； Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 等重金属离子能钝化酶，使之失活。

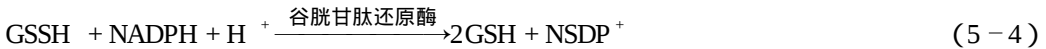
（5）酶的催化效率极高，比无机催化剂的催化效率高几千倍至百亿倍。由于酶的催化效率高，因此酶能降低反应的能阈和反应物所需的活化能。

在一定条件下，酶所催化反应的反应速度称为酶活力。其中，反应速度通常用单位时间内底物的减少量或产物的增长量表示。酶的活力用国际单位（u）表示，即在温度

25 、最适 pH 值、最适的缓冲溶液和最佳底物浓度等条件下，每分钟能使一微摩尔底物转化的酶量定为一个酶活力单位。在固定条件下，每毫克酶或每毫升酶液所具有的酶活力称为酶比活力。在实际应用中欲调控微生物的活动性，实质上是在于调控微生物体内酶的活性。

5.2.2 硫杆菌属氧化无机硫的生化途径

研究认为，硫杆菌属是从对无机硫化物的氧化过程中获得能量，而硫化物的氧化是通过微生物氧化酶的作用，生成元素硫，再反应生成亚硫酸盐。目前对于硫杆菌氧化元素硫的机制，人们比较倾向于 Suzuki I (1965 年) 提出的硫氧化模式。模式中元素硫在还原型谷胱甘肽 (GSH) 参与下 (式 5-1)，由硫氧化酶催化，氧化生成亚硫酸盐 (式 5-2)。亚硫酸盐可被继续氧化成硫酸盐，也可与硫缩合形成硫代硫酸盐 (式 5-3)。所生成的氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 可在谷胱甘肽还原酶作用下，生成还原型谷胱甘肽 (式 5-4)。

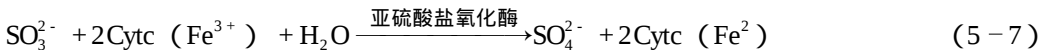


元素硫氧化生成亚硫酸盐后，可再氧化成硫酸盐。氧化途径有两条：

(1) 亚硫酸盐以磷酸腺苷硫酸盐为中间体，通过一系列酶的催化，被氧化成硫酸盐：

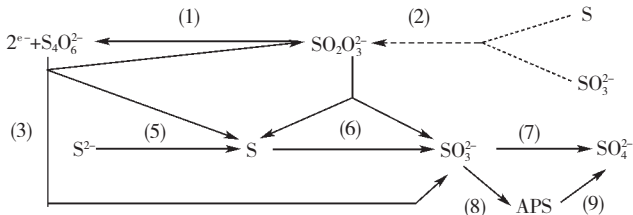


(2) 亚硫酸盐通过以细胞色素 C (Cyt c) 为电子受体的亚硫酸盐氧化酶的作用，被氧化成硫酸盐：



(式 4-3) 生成的硫代硫酸盐可在氧化酶作用下形成四硫酸盐，四硫酸盐再还原割裂成亚硫酸盐，元素硫和硫代硫酸盐、或硫代硫酸盐直接还原割裂形成元素硫和亚硫酸盐，最终氧化成硫酸盐。

硫杆菌属氧化的生化途径可用图 5-5 表示。



(1) 硫代硫酸盐氧化酶；(2) 非酶缩合；(3) 还原割裂（高细胞浓度，低氧分压）；(4) 还原割裂；(5) 硫化物氧化酶；(6) 硫氧化酶；(7) 亚硫酸盐氧化酶；(8) APS 还原酶；(9) ADP 硫酸化酶。

图 5-5 硫杆菌氧化无机硫化物的生化途径

5.2.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对黄铁矿 (FeS_2) 氧化的生化机制

根据 Tributsch H 等^[143] (1981) 提出的生化分子机理，氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 是利用某种酶在硫化物 (FeS_2) 表面断开化学键，形成脱除或转移硫的载体，此种酶可被 T. f 菌循环使用。近年来，从酶学和遗传学角度研究生物脱硫过程的分子机理取得一定进展。菌株中存在一定的酶催化基因已被证明。何正国等^[92] (2000 年) 还对氧化亚铁硫杆菌的铁和硫氧化系统及其分子遗传学进行了研究。许多研究都认为，在水和氧存在作用下，黄铁矿 FeS_2 可氧化为 SO_3^{2-} 和 Fe^{3+} ，但速度非常缓慢。当有嗜酸性的铁硫氧化细菌 (T. f) 存在时，在细菌作用下， Fe^{2+} 被细菌迅速氧化成铁离子 Fe^{3+} 。在酸性条件下，铁离子 Fe^{3+} 是强氧化剂，它可直接氧化黄铁矿 (FeS_2)，生成元素硫 S；元素硫 S 再被细菌氧化，最终形成硫酸。整个反应体系呈一循环状态，能持续不断地进行下去，直到不再具备反应条件为止。反应过程如图 5-6 所示。

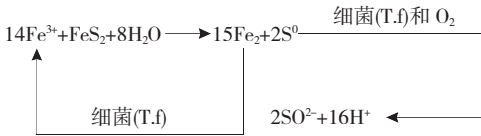


图 5-6 T. f 菌对 FeS_2 氧化的生化作用机制

5.2.4 脱硫微生物基因变异与育种

脱硫微生物菌体内部的每一步生化反应都是由特定的酶催化，每种酶都由特定基因编码，基因可能会发生变异。变异既可以是基因突变引起，也可以是通过细菌体内重组或者附加体等外源遗传物质的整合而引起 DNA 改变，由此产生新的基因，从而引起生物内生化途径的改变，产生出新菌株。原理如图 5-7 所示。这就是采用遗传学方法育种的理论基础。

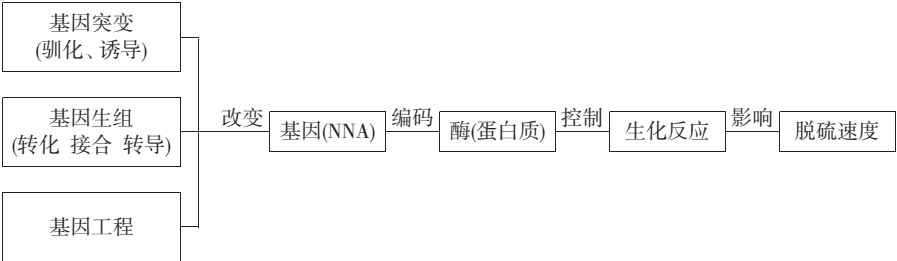


图 5-7 脱硫微生物遗传学育种原理

5.3 脱硫微生物菌种的遗传改良^[137~142]

5.3.1 脱硫菌遗传学育种方法

(1) 驯化育种

驯化育种是在外界条件逐渐改变的情况下，对脱硫菌进行多次转移培养，最后培育出适应性和耐受性都较强的目的菌株。驯化育种是一种定向培育的育种方式，其遗传学理论依据是基因的自发突变。研究表明，氧化亚铁硫杆菌（*T. f.*）经过驯化后，可提高其对黄铁矿（ FeS_2 ）脱除能力。在具体培养过程中，一般先用黄铁矿粉和硫酸亚铁共同作为能源基质，再逐步减少硫酸亚铁的量，经过数次生长周期的转种，可以得到基本上是以黄铁矿为代谢能源的驯化 *T. f.* 菌。

驯化方式还可以培育出适应其他有害成分如 Ag、Hg、As 等的适应菌，以及对某种矿物具有选择性作用的微生物菌株。培育时间较长是驯化育种的主要缺点。

(2) 诱变育种

诱变育种是使用诱变剂使细胞内的遗传物质发生变化，引起突变，并筛选出符合要求的变异菌株的一种育种方法。一般诱变育种的程序包括：菌株的选择、菌悬浮液的制备、诱变处理和变异菌株的筛选。

目前，在微生物诱变育种实践中应用较多的诱变剂有紫外线、X 射线、 γ 射线以及氮芥、乙基磺酸乙酯、N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍和 N-甲基-N-亚硝基脲等。在处理方法上，往往将多种诱变剂同时使用，或是将一种诱变剂多次重复使用。通过采用诱变剂处理均匀分散的细胞群，能大幅度提高菌株的突变率，从而达到菌种选育的目的。

(3) 接合、转化、转导及质粒育种

通过供体菌和受体菌的完整细胞间的直接接触而传递大段 DNA 的过程称为接合，又称细菌杂交。接合在革兰氏阳性菌中较为常见。有接合作用的细菌是有性别分化的，与一种 F 质粒或 F 因子（性因子）有关。受体菌直接吸收供体菌的 DNA 片段，然后同源配对交换，从而获得供体菌的部分遗传性状的过程称为转化。转化后的受体菌称为转化子。转化与亲缘关系和感受态的建立有关。而通过缺陷噬菌体的媒介，将供体细胞的 DNA 片段携带到受体细胞中，从而使后者获得部分供体细胞遗传性状的过程称为转导。转导后的受体菌为转导子。

对于把遗传信息引入细菌，就目前所知在嗜酸性硫杆菌中尚未发现有噬菌体；而通过广泛寄主的 F 质粒接合转移研究虽有一些报道，但都是在中性硫杆菌中发生的，而在嗜酸性硫杆菌中很少见。原因主要是由于细菌的接合是需要菌体相互接触的耗能过程，必须同时满足供体菌和受体菌双方能量需求。此外，两者生理特性差异不能过大，如大肠杆菌与 *T. f.* 菌，由于两者生理特性差异极大，前者最适生长 pH 值为 7.5，后者为 2.5；前者利用有机物生长，属异养菌，亚铁对其生长有强烈的抑制作用；而后者利用亚铁，在无机培养基上生长，有机物特别是氨基酸等对其生长有抑制作用，因此两者通过直接接合难度较大。但也有采用菌膜配对接合成功的报道。

因此，采用转化途径较为现实。转化方式主要适用于细菌一类的原核细胞，它是将带

有外源 DNA 片段的外源重组体导入受体细胞，严格就是感受态的大肠杆菌细胞捕获和表达质粒载体 DNA 分子的过程。选择转化系统就是以嗜酸硫杆菌的原始质粒为起点，建造重组质粒载体，使之既能在大肠杆菌中，也能在硫杆菌中复制和表达遗传信息。

质粒是原核生物中除染色体外，另一种较小的、携带少量遗传基因的环状 DNA 分子，也称为染色体外 DNA。它们在细胞分裂过程中能复制，将遗传性状传给后代。有的质粒独立存在于细胞质中，有的和染色体结合称为附加体。

质粒在原核微生物的生长中不像染色体，它常常因某种外界因素影响，发生质粒丢失或转移。某种细菌一旦丧失质粒，就会丧失由该质粒决定的某些性状，但菌体不死亡。质粒从供体细胞转移到不含该质粒的受体细胞中，使受体细胞具有该质粒决定的遗传性状。质粒的这些性状可以利用来培育优良菌种。质粒育种就是将两种或多种微生物通过细胞结合成或融合技术，使供体菌的质粒转移到受体菌内，使受体菌保留自身功能质粒，同时获得供体菌的功能质粒，即培育出具有两种功能质粒的新菌种。

(4) 原生质体融合

就是通过人为的方法，使遗传性状不同的两细胞的原生质体发生融合，进而发生遗传重组，以产生同时带有双亲性状，遗传稳定的遗传子的过程。原生质融合又称细胞融合，在革兰氏阳性菌中较为容易。它对培育脱硫微生物的优良菌株是一项有价值的技术。能进行原生质体融合的细胞极其广泛，不仅包括目前脱硫方面常用的原核生物中的细菌类，也包括脱硫中正在探索的真核微生物中的酵母菌和霉菌等。

原生质体融合的原理是：两个有选择性遗传标志的突变体，在高渗溶液中，用适当的脱壁酶（细菌可用溶菌酶处理），除去细胞壁；再将形成的原生质体离心聚集，并加入促融合剂（如聚乙二醇 PEG）以促进融合；然后在高渗溶液中稀释，涂在能使其再生细胞壁或进行分裂的培养基上；待形成菌落后，通过影印接种，将其接种到各种选择性培养基上，鉴定它们为融合子。最后测定其他生物生化性能，如图 5-8 所示。

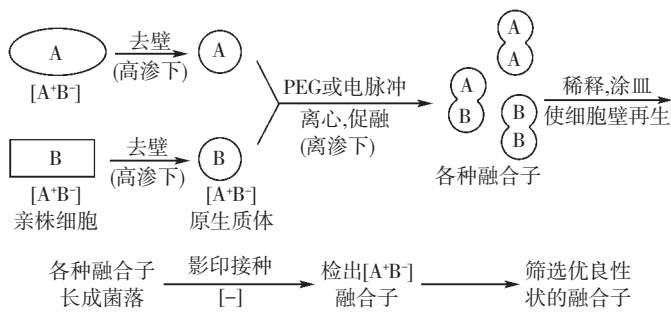


图 5-8 原生质体融合原理示意图

(5) 基因工程育种

基因水平上的遗传工程称为基因工程。基因工程育种是一种体外 DNA 重组技术，它是用人为方法将所需要的某一供体菌的遗传物质 DNA 分子提取出，在离体条件下进行切割后，再把它和作为载体 DNA 分子连接起来，得到重组 DNA。然后导入某一更易生长、繁殖的受体细胞中，使该外源的遗传物质在其中进行正常的复制与表达，从而获得一种新菌种。

基因工程育种是人们在分子生物学理论指导下进行的一种自觉的，能像工程一样可事先设计和控制的育种技术，它是一种人工的、离体的、分子水平的遗传重组新技术，也是一种最新、最有前途的定向育种新技术。

脱硫微生物基因工程育种的主要步骤：

①目的基因的获取。从目前对脱硫微生物的研究来看，各种脱硫菌的形态、性状和作用都不同。如有的只脱无机硫，有的只脱有机硫；有的既可脱无机硫又可脱有机硫；有的生长代谢快，有的生长代谢慢；对环境的要求，有的需酸性环境，有的需中性环境等。在进行基因工程育种操作时，首先必须取得有生产意义的目的基因。目的基因的获取可从适当的供体细胞的 DNA 中分离。

②载体的选择。载体必须具备有自我复制能力，能在受体细胞中大量繁殖，也必须有选择性遗传标志，并且要有限制性内切核酸切口，从而使目的基因能固定整合到载体 DNA 的一定位置上。对脱硫微生物来说，像 *T. f* 菌、*T. t* 菌、*E. coli* 菌和 *R. S* 菌等原核受体细胞可作为载体的主要是细菌质粒。

③目的基因和载体的体外重组。采用限制性核酸内切酶处理，并在外界连接酶作用下，使供体的目的基因与载体的 DNA 片段接合，形成一个完整的复制能力的环状重组载体嵌合体。

④重组载体引入受体细胞内使其基因扩增和表达。受体细胞可以是各种脱硫的微生物细胞。目前受体细胞最广泛采用的是 *E. coli* 菌。由于它又具有某些脱硫和捕收功能，作为脱硫菌基因工程育种的受体细胞较为合适。重组载体被引入受体细胞后，通过自我复制而获得大量扩增，使受体细胞表达出供体基因所提供的部分遗传性状，从而构成“工程菌”。

5.3.2 脱硫菌基因转移系统的构建

由于细菌的遗传物质是由质粒和染色体 DNA 组成，因此对氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 遗传物质脱硫能力的研究，集中在 *T. f* 菌对亚铁和硫的氧化作用是与拟核染色体 DNA 有关，还是与质粒 DNA 有关的问题上。根据文献报道^[86]，质粒在硫杆菌中普遍存在，然而在某些氧化硫硫杆菌 (*T. t*) 和氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 中缺乏质粒，这可以间接地说明在硫杆菌中，硫和亚铁的氧化机能不是质粒所编码和决定的。对于已经分离出的硫杆菌质粒，目前虽然对其所编码的具体性状还不完全了解，然而它们的存在为用基因工程方法改造硫杆菌的性状提供了必备的基因载体。

氧化亚铁硫杆菌极端嗜酸及生长速度低等特点，使得对其遗传学研究的难度较大。主要原因是：首先，由于 *T. f* 菌多生活在含铁的酸性条件下，使多数抗生素失效，因此缺乏可供选择的遗传标记。其次，*T. f* 菌生长缓慢，细胞获得率低，在固体培养基上也难以形成较大的菌落，因此缺乏足够的细胞材料，给蛋白酶的分离和质粒 DNA 的提取等遗传学操作带来一定困难。所以，对 *T. f* 菌遗传学的研究主要应围绕着基因工程载体的构建及 (*T. f*) 菌遗传基因的克隆及在大肠杆菌中的表达几个方面开展。

了解硫杆菌的遗传物质脱硫能力的遗传背景、研究氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 的质粒以及构建基因工程载体等，就是为了用基因工程手段有目的地改造 *T. f* 菌。为此，必须建立可将外源基因引入 *T. f* 菌的遗传转移系统。选择转移系统的关键是要有合适的载体。作为

基因的载体必须具备的条件，首先是能够自我复制，即是一个复制子；其次要有可供选择的遗传标记；再就是要有尽可能多的单一的限制性内切酶的位点，以便克隆（clone）外源 DNA。

目前对已分离的 *T. f* 菌质粒所编码的具体性状还不十分清楚，同时具有极少可供选择的标记，因此构建符合要求的载体，必须对现有质粒加以改造。其方法是从大肠杆菌（*E. coli*）引入，即利用 *E. coli* 菌现有的质粒如 pBR322 和 pBR325 等与 *T. f* 菌质粒进行重组。将氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）质粒的复制原点完整地组合进去，构建成一个在大肠杆菌和 *T. f* 菌中都能复制，同时又携带有选择性标记和多个单一限制性内切酶酶切位点的质粒载体。

5.3.3 脱硫菌质粒的分离及限制性酶切分析

（1）试验菌株培养

对获取脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）可采用固体平板培养及稀释涂布平板的方法进行分离纯化。培养条件为：9K 培养基，pH2.5，28℃，振荡培养。对于大肠杆菌（*E. coli*），可以采用 LB 培养基，37℃，振荡培养。

（2）氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）质粒的提取与纯化

纯化后的 *T. f* 菌经大量培养，去除沉淀后，用大容量离心机离心沉降收集菌体。质粒的提取可参照分子生物学基础实验。纯化用 1mol/L NaCl 超速离心法纯化，20℃，40000r/min 离心 6 小时，倒去上清液，沉淀用 TE 缓冲液（pH7.6）溶解，备用。

（3）氧化亚铁硫（*T. f*）质粒的限制性酶切分析

用于质粒酶切分析的限制性内酶有：BamH I、EcoRI、Hind III、Pst I、KpnI、SalI、San3A I、XhoI、Pvu II、Bgl II、BclI、RNase 等。对氧化亚铁硫杆菌提取的质粒进行限制性酶切，然后对采用不同的限制性内切酶酶切的结果进行琼脂糖凝胶电泳。

琼脂糖凝胶电泳采用：Tris - 醋酸缓冲液（40mmol/L Tris；20mmol/L 醋酸；20mmol/L EDTA）；琼脂糖凝胶浓度 0.8% ~ 1.5%（含溴化乙锭 EB0.4ug/ml）；100v；电泳。凝胶用 EB 染色；在紫外分析仪上观察并拍照，可得质粒酶切电泳图。根据酶切泳分析结果，推断 *T. f* 菌质粒上存在的单一酶切位点，并通过双酶切确定各切点的位置关系，从而绘出质粒限制性酶切图谱。

5.3.4 氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）嵌合（重组）质粒的构建

将 *T. f* 菌质粒与 *E. coli* 菌质粒（pBR322 或 pBR325）采用限制性内切酶（如 *pst*）酶解，混合后用 DNA 连接酶转化到 *E. coli* 菌（HB101）。

具体操作可按照以下程序进行：

（1）选择 *E. coli* 菌（HB101）为受体细胞，收集在对数生长期的菌体。可将培养好的细胞放入冰浴中冷冻 10min，离心 4000r/min，5min，收集沉淀细胞。

（2）将沉淀细胞重新悬浮在预冷、无菌的 50mmol/L CaCl₂ 和 Tris - HCl（pH8）中，放置冰浴 5min，同样离心收集沉淀细胞，然后重新悬浮即为感受态细胞。冰冻备用。

（3）取出冰冻感受态细胞，在其中加入连接反应的混合物（重组 DNA 质粒），在 42℃ 水浴中作 2min 的热冲击，立即经过适当的稀释，涂布在培养基上，37℃ 下培养。

(4) 控制转化条件, 使每个细胞只进入一个重组体质粒 DNA 分子。如果转化频率低, 一般可能是由于载体分子插入的 DNA 片段间的连接作用无效, 结果降低了有功能的质粒 DNA 实际数量, 或者是由于含有插入外源 DNA 片段的载体分子较大, 而导致转化频率下降。为了提高转化频率, 须采用有效措施, 抑制不带有外源 DNA 片段的质粒 DNA 形成转化子菌落。可应用磷性磷酸酶处理法, 以阻止不带有插入 DNA 片段的载体分子发生自身再环化作用, 从而提高其转化功能。

5.3.5 氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 重组质粒的筛选与检测

由体外重组产生的 DNA 分子, 通过转化引入宿主后会得到大量的重组体细胞。然而在众多的重组体中, 会有多种类型的重组 DNA 分子, 如: 不带任何外源 DNA 插入片段, 仅仅是由线性载体分子自身连接形成的环状 DNA 分子, 由于一个载体分子与数个外源 DNA 片段构成的重组成体 DNA 分子; 带单纯由数个外源 DNA 片段彼此连接形成的多聚 DNA 分子。此类多聚 DNA 分子由于不具备复制起点和复制基因, 不能在转化子中长期存留, 最后被耗掉成为无用分子。

因此, 必须采用一定的筛选方法, 才能获得可能含有目的基因的重组体。同时对所提取的重组质粒也需要用一定方法进行检测, 以明确其是否确定具有一个插入的外源 DNA 片段。目前, 重组体的检测法有: 使用特异性探针的核酸杂交法、免疫化学法、遗传检测法、物理检测法等。其中常用的重组体分子物理检测法是凝胶电泳检测法。

凝胶电泳检测原理是: 带有插入片段的重组体质粒在相对分子量上会有所增加。而分离质粒 DNA, 并测定其分子长度是一种简便直接的方法。DNA 分子量琼脂糖凝胶电泳测定方法的具体步骤是: 质粒 DNA 经过限制性内切酶酶切后的酶切片段与 λ DNA/HindIII (标示物 MARKER, 以此片段作用为分子量标准) 同时进行电泳, 然后根据 DNA 的迁移率与分子量的对数呈线性关系, 由标准曲线计算出 DNA 片段的分子量。

质粒 DNA 的电泳迁移率是与其相对分子质量大小成比例的, 因此, 那些带有外源 DNA 插入序列的相对分子质量较大的重组体 DNA 在凝胶中迁移的速度, 就要比不具有外源 DNA 插入序列的, 相对分子量较小的质粒 DNA 泳动的缓慢。根据此差别可检测出那些含有外源 DNA 插入序列的相对分子量较大的重组质粒。最后可根据对嵌合 (重组) 质粒酶切及电泳的结果, 绘出重组质粒的限制性酶切图谱。

当氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 质粒与大肠杆菌 (*E. coli*) 质粒 (pBR322、pBR325) 成功构建嵌合 (重组) 质粒, 并能在大肠杆菌 (*E. coli*) 中进行复制, 这就为 *T. f* 菌遗传改良载体系统的建立创造了良好的基础。

若要使所构建的重组质粒真正成为适合基因工程需要的理想载体, 还需做进一步改造, 包括删除非必需区段, 引入在 *T. f* 菌生长的酸性条件下较为稳定的抗性标记等, 然后再将重组质粒转回到 *T. f* 菌中, 最终完成氧化亚铁硫杆菌 (*T. f*) 基因载体系统的构建。

6 脱硫微生物磁化培育试验研究

矿业磁生物技术研究的是磁化作用对矿业微生物的磁生物效应。本论文研究了脱硫微生物的磁化培育。基本研究方法见 3.3.3，具体研究内容如下：

6.1 脱硫微生物磁化培养试验内容及试验过程

6.1.1 磁化装置的特点及磁化培养参数（磁感应强度）的测定

试验所用磁化装置是由不消耗能源的环形磁铁构成，磁场强度恒定。在磁化培育过程中，将脱硫微生物置于环形磁铁所产生的磁场环境中进行磁化作用。该磁化装置磁场的磁感应强度 B ，经过我们采用 CT5 型高斯计测定，平均为：250 高斯（GS）或 0.025 特斯拉（Tesla）。其换算公式是：1 特斯拉 = 10^4 高斯。

6.1.2 T. f 菌培养基的装瓶量与接种菌量的确定

在培养基装瓶量一定的情况下，一般随着细菌接种量愈大，则细菌生长延迟期愈短，生长速度愈快。但细菌接种量过大，单位体积内培养基中细菌可利用的营养物减少，细菌的生长速度降低。因此，细菌培养时培养基装瓶量与菌种的接种量之间应有一个适宜的比例。试验菌种采用煤系（干坝子）氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌），采用 250ml 锥形烧瓶进行培养，氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）培养基的装瓶量分别为：80 ml、100ml、120 ml。接种量分别为：5%、10%、15%，培养 8 天，测定细菌菌量并分析。

6.1.3 氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）磁化与非磁化培养的比较

试验样品选取：（1）空白对照（1#）；（2）非煤系中南 T. f 菌（2#）；（3）煤系干坝子 T. f 菌（3#）；（4）煤系砚石台矿 T. f 菌（4#）为一组，将其分别置于四种条件下，I、II 分别为磁化条件下切割磁力线的旋回振荡（120 转/分钟）磁化培养和静置条件下的磁化培养；III、IV 分别为非磁化条件下的旋回振荡（120 转/分钟）和静置的对照培养。培养 8 天，磁化作用时间：3 小时/天。拍照、测定细菌菌量并分析。

6.1.4 相同类型不同生长环境下微生物（煤与非煤系 T. f 菌）的磁化比较

煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）菌种类型相同，但是由于来自不同生长环境，通过比较它们在一定磁化条件作用下生物磁效应的差异，研究磁化作用对煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌的效果与规律。

试验菌种样品分别为：（1）空白对照（1#）；（2）非煤系中南 T. f 菌（2#）；（3）煤系干坝子 T. f 菌（3#）；（4）煤系砚石台 T. f 菌（4#）。将它们一起置于相同的磁化培养条件下进行培养。培养 8 天，磁化作用时间：3 小时/天。拍照、测定细菌菌量并分析。

6.1.5 不同类型微生物（T. f 菌及 M. Phlei 菌）的磁化比较

氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）是化能自养菌，而草分枝杆菌（M. Phlei 菌）为化能异养菌，它们对能源与碳源的利用途径各不相同，代谢机理各异。通过对氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）与草分枝杆菌（M. Phlei 菌）进行磁化处理，研究磁场力对不同营养类型的微生物所表现出的磁生物效应。

方法：选择非煤系中南 T. f 菌（2#）和煤系干坝子 T. f 菌（3#）及 M. Phlei 菌（5#）。将它们在相同磁化条件下，分别作切割磁力线的回旋振荡（120 转/分钟）培养，培养 8 天，磁化作用时间：3 小时/天。测定细菌菌量并分析。

6.1.6 磁化程度（磁化时间和切割磁力线速度）对细菌磁化培育的影响

磁化程度包括磁化强度和磁化深度两个方面，磁化程度参数主要有：磁场的磁感应强度 B、磁化作用时间 T 及切割磁力线速度 V 等。试验所采用磁化装置的磁化环境，为结构简单、不消耗能源的环形磁铁所构成。试验中测定，恒定磁场的平均磁感应强度为 250GS。通过选择不同的磁化作用时间 T 并采用调节旋回振荡培养频率 F，以改变细菌切割磁力线速度 V，进而达到改变细菌磁化作用程度的目的。试验所选定的磁化时间分别为：0.5、1、3、6、12、24 小时/天。采用恒温回旋振荡连续培养，回旋振荡频率分别为：0（静置）、60、90、120、150 转/分钟。培养 8 天，测定细菌菌量并分析。

6.2 脱硫微生物磁化培育试验结果与分析

6.2.1 氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）培养基的装瓶量与接种菌量试验分析

培养基装量与接种量对 T. f 菌（干坝子）的生长影响见图 6-1、图 6-2。不同的培养基的装瓶量与不同的接种菌量对 T. f 菌生长的影响不同。由图 6-1 可见，随着培养基中细菌接种量的增加，细菌菌量增加，然而接种量为 10% 与 15% 细菌菌量相比较为接近。从图 6-2 可见，培养基装量增加，细菌菌量有下降趋势，原因可能由于氧化亚铁硫杆菌为严格好氧，装量太多，使培养基中溶氧量减少所致。根据试验结果，确定试验采用 10% 接种量和 100ml 培养基装量。

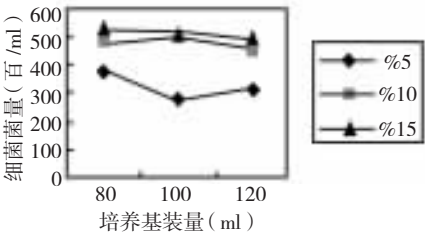


图 6-1 培养基装量与细菌菌量关系

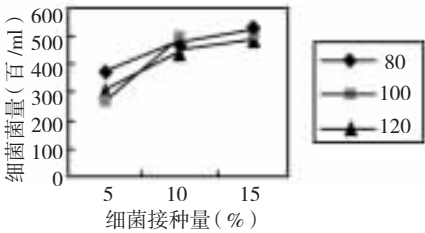


图 6-2 细菌接种量与细菌菌量关系

6.2.2 氧化亚铁硫杆菌（T. f 菌）磁化与非磁化培养的比较与分析

(1) 磁化与非磁化回旋振荡切割磁力线培养的结果对照

图 6-3 ~ 图 6-6 中从左到右依次为：磁化空白对照 (1#)、中南 T. f 菌 (2#)、干坝子 T. f 菌 (3#)、砚石台 T. f 菌 (4#)、非磁化空白对照 (1#)、中南 T. f 菌 (2#)、干坝子 T. f 菌 (3#)、砚石台 T. f 菌 (4#)。



图 6-3 T. f 菌磁化 I 与非磁化 III (2d)

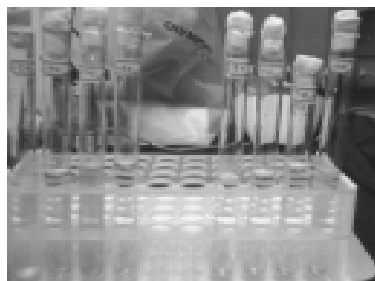


图 6-4 T. f 菌磁化 I 与非磁化 III (4d)



图 6-5 T. f 菌磁化 I 与非磁化 III (6d)



图 6-6 T. f 菌磁化 I 与非磁化 III (8d)

(2) 磁化与非磁化静置培养的结果对照与分析

图 6-7 ~ 图 6-10 中从左到右依次为：磁化空白对照 (1#)、中南 T. f 菌 (2#)、干坝子 T. f 菌 (3#)、砚石台 T. f 菌 (4#)、非磁化空白对照 (1#)、中南 T. f 菌 (2#)、干坝子 T. f 菌 (3#)、砚石台 T. f 菌 (4#)。



图 6-7 T. f 菌磁化 II 与非磁化 IV (2d)

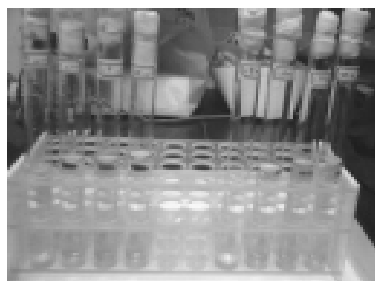


图 6-8 T. f 菌磁化 I 与非磁化 III (4d)

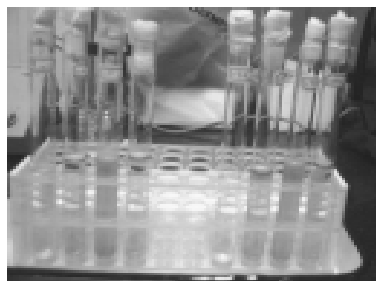


图 6-9 T. f 菌磁化 II 与非磁化 IV (6d)

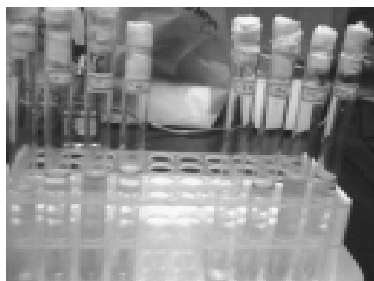
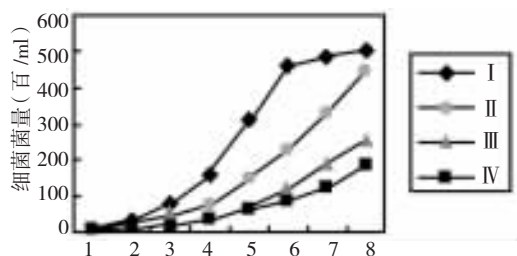


图 6-10 T. f 菌磁化 II 与非磁化 IV (8d)

选择培养中细菌生长变化最大的干坝子 T. f 菌 (3#), 分别对其在四种不同培养条件下, 细菌菌量的变化进行测定, 得到磁化与非磁化及旋回振荡 (120 转/分钟) 与静置培养下的菌量对照, 如图 6-11 所示。



I、III 分别为磁化与非磁化旋回振荡 (120 转/分钟) 培养;

II、IV 分别为磁化与非磁化静置培养。

图 6-11 干坝子 T. f 菌磁化与非磁化及旋回与静置培养的结果对照

由图 6-11 可见, 回旋振荡切割磁力线的磁化培养条件下, 细菌生长的延迟期较短, 且生长速度明显高于非磁化旋回振荡培养; 而静置磁化培养与非磁化静置条件下培养, 细菌生长情况相似, 均较慢。

将细菌静置于磁场中, 则细菌生长效果明显很差, 对此除我们做过的试验外, 其他文献^[150]中也都有相同结果的报导。我们知道, 当导体在磁场中作切割磁力线运动时, 导体内就会产生电流。那么当磁场中作切割磁力线运动的是生物体时, 由于微生物的细胞是由细胞膜、细胞质、细胞核组成, 细胞质是可以流动的透明胶状体, 当微生物的细胞作切割磁力线运动时, 细胞内就会产生电离子移动。细胞中生物电离子的移动会促进细胞质中蛋白的凝聚体水合作用增加, 从而表现出细胞质运动速度加快, 细胞保持水分的能力改变。生物电离子还可以增强呼吸氧化酶的活性, 加快了微生物体内贮藏的淀粉、脂肪和蛋白质的转化, 使呼吸作用和对营养物质吸收利用增强。

这说明生物体细胞在磁场中作切割磁力线运动时, 是将外界的物理能量转化为生物体内的生物电能, 在这种生物电能的作用下, 促使生物体的生长发育超过没有获得外界能量的生物体。而静置于相同强度磁场中的微生物, 由于没有作切割磁力线运动, 微生物细胞没有产生生物电能量, 其生长发育的速度与没有放置于磁场中相差无几。

另外, 培养基中的水经磁化处理能使水的渗透压和生物膜的通透性增强。氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 在磁化培养过程中, 培养基中一些离子如 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 以及水、氧

分子等因此更易于进入细胞。而且由于磁化水的硬度、pH 值、电导率都高于非磁化水^[115]，说明培养基中的无机盐类在磁化水中能够更好地溶解。这样更有利于氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对营养盐类的吸收以及从培养基介质中吸收各种营养物质，由于这些离子及盐类等物质既是细胞兴奋的基础，也是细胞新陈代谢与能量转换所必要的物质条件。因此在磁化作用下，T. f 菌的生长速度比非磁化有显著地提高 (约为 15% ~ 30%)。

磁场直接作用于生物体内的水分和物质，也增强了生物酶的活性，加速生物体内的生化反应。对氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 的磁化处理表明，磁化处理磁致发育效应显著，磁化具有促进氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 生长的作用。

6.2.3 相同类型不同生长环境下 (煤与非煤系) T. f 菌磁化培养的比较分析

旋回振荡磁化作用下，煤系比非煤系 T. f 菌具有较强的生长活性，如图 6-3 ~ 图 6-6 所示。具体表现为：细菌生长的延迟期短，生长速度快。相同培养时间下，细菌菌量较高 (图 6-12)。

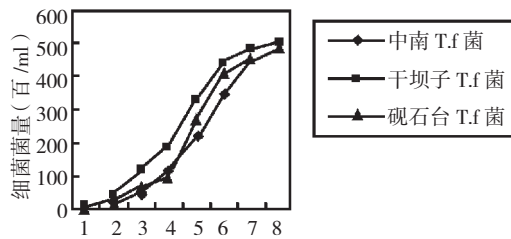


图 6-12 煤系与非煤系 T. f 菌磁化培养的比较

6.2.4 不同类型微生物 (T. f 菌、M. Phlei 菌) 磁化作用结果的比较分析

T. f 菌 (干坝子) 和 M. Phlei 菌的磁化作用结果如图 6-13 所示。

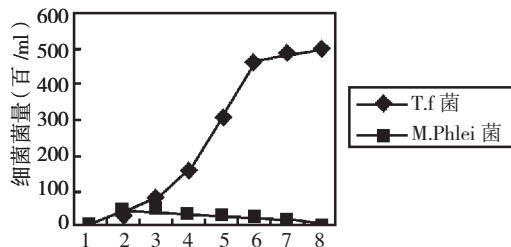


图 6-13 不同类型微生物 (T. f 菌、M. Phlei 菌) 的磁化作用结果

自养菌氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 与异养菌草分枝杆菌 (M. Phlei) 磁化作用后，对细菌浓度的测定结果表明，经相同磁场强度处理后的菌样中：

- (1) T. f 菌细菌浓度增加较快；
- (2) 而 M. Phlei 菌细菌总数开始略有增加，随着时间延长有缓慢下降的趋势。

磁化作用促进自养微生物 T. f 菌生长，试验结果与有关文献报导相一致^[154]。原因可能与 T. f 菌生物体自身的代谢机能有关，T. f 菌以培养基中的亚铁离子 Fe^{2+} 或硫化物作为能源。靠氧化基质中的 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} 和低价态硫为硫酸根而获取能量，铁离子表现为顺磁

性，磁场通过对铁离子的磁化作用，会促进铁离子的氧化还原反应过程。同时，这些铁离子又处于生物酶的活动中心，会影响酶的活性，使酶的活性增强，进而提高酶的反应速度，加速细胞的新陈代谢。

磁化处理引起异养菌 *M. Phlei* 菌总数下降的现象，原因可能是：

(1) *M. Phlei* 菌属异养菌，异养微生物的能量与碳源均为有机物。磁场的直接作用引起其培养基中的 BOD、COD 降低，使异养微生物的能量和碳素营养物质减少，导致 *M. Phlei* 菌的死亡速度大于增殖速度，于是出现负增长现象。

(2) 磁场力直接作用于 *M. Phlei* 菌细胞内的水和酶，从而使细胞内酶钝化或失活。据报导^[154]，磁场力能强烈影响异养生物的生理系统，磁化处理可使异养菌的尿酶、葡萄糖磷酸复位酶钝化，从而使细菌的新陈代谢作用受阻。

磁化处理对化能自养微生物氧化亚铁硫杆菌生长的促进作用和对化能异养菌草分枝杆菌生长的抑制作用，说明不同类型微生物在磁场力的作用下可表现出不同的生物效应。

6.2.5 磁化程度（磁化时间和回旋振荡频率）对微生物磁化培育的影响分析

在平均磁感应强度为 250GS 磁化条件作用下，磁化处理作用时间对干坝子 *T. f* 菌生长的影响如图 6-14 所示，其中，回旋振荡频率：120 转/分钟，培养时间：5 天。不同的回旋振荡频率（切割磁力线的速度）对 *T. f* 菌生长的影响如图 5-15 所示，其中，磁化时间：3 小时/天，培养时间：5 天。

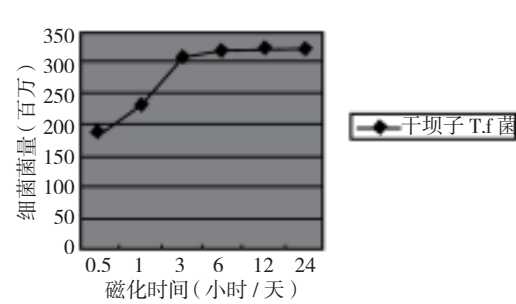


图 6-14 磁化时间对 *T. f* 菌生长的影响

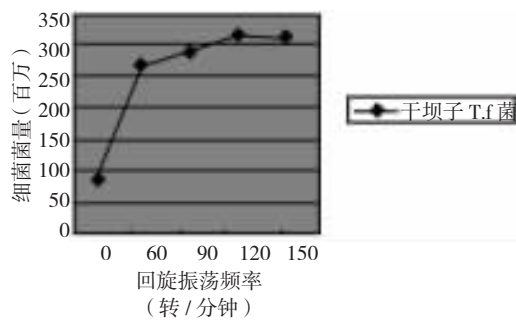


图 6-15 回旋振荡频率（切割磁力线的速度）对 *T. f* 菌生长的影响

试验表明，在适当的磁感应强度和回旋振荡切割磁力线等磁化条件下，随着磁化时间的增加，对细菌的生长起促进作用；但这种促进作用不是无限制的。

原因是：由于生物细胞的化学成分与构造特点，决定了生物细胞在接受外界物理能量转化为生物电荷能量时，都有一个极限容量值。当细胞获得的能量达到这个极限容量值时，延长磁场作用时间，提高回旋振荡频率，增加单位时间切割磁力线次数，生物体细胞的生物电荷不可能再增加或增加很少。各类生物细胞的大小、细胞质成分等各不相同，其极限容量也各不相同。虽然生物体通过切割磁力线运动，可以获得生物电能，但生物生长发育和对营养物质的吸收、转化，是一个复杂的生物化学反应过程。新增加的这部分生物电能，只能促进生物的吸收转化过程加快，而不能违背生物的基本生理生长规律，无限的加快细菌生长速度和无止境的提高细菌生长量。

在未超过临界磁场效应，适宜的磁感应强度下，由于“磁—生物电”效应只是将外

界的物理能量转化为生物体内生物电能量,使生物体细胞增强了活力,细胞的新陈代谢加快,化合作用速度加快。当这种外界的物理能量不再补充时,生物的生长发育速度会逐步恢复到没有外界能量补充时的水平。这种能量的补充并没有改变细胞的生化成分和结构,所以生物体未产生质的变化。通过观察,在试验所确定的磁化条件下,未发现因磁场效应而发生菌种变异现象。可以认为在试验中的磁化作用未影响生物的遗传基因。

6.3 脱硫微生物磁化培育的磁生物学效应分析^[150~154]

6.3.1 磁场直接或间接地影响 DNA

细胞在磁场下作切割磁力线运动时,或者静止细胞在脉冲磁场下,都可使细胞内磁通量变化,导致产生感应电流。这个电流的大小、方向、形式是导致细胞产生各种正、负效应的主要原因。

(1) 在强磁场或长时间磁场处理,将导致 DNA 中的氢键变化,进而发生 DNA 或质粒的点突变,严重时可使染色体畸变等,从而导致生物体形态和发育的遗传变异,或导致生物体死亡。(2) 然而当生物体在适当强度的磁场条件作用下,磁场则可激活与膜结合的环苷酸环化酶,导致基因活化,解除了抑制和封锁状态的基因,促使信使核糖核酸(mRNA)合成,并使各种酶的活性增强,核酸代谢加速,使得生物体核酸总量增加。

6.3.2 磁场影响微生物细胞的生理机能与新陈代谢

在强磁场的作用下,微生物菌体细胞内带电粒子的正常运动轨迹受到破坏,尤其是质量小的电子和离子,从而导致细胞内的电子和离子不能正常传递,影响了细胞的正常生理功能,对生物是有害的。而在适当强度的磁场条件下,存在于生物体内原有的蛋白质重新大量合成,特别是水解酶和氧化还原酶活性增强,使得蛋白质含量增加,酶活性增强,生理代谢反应加速。此外一些蛋白质和酶都含有金属离子,表现为顺磁性,这些离子又处于酶的活动中心。磁场通过离子作用,影响酶的活性中心,进而提高酶的反应速度,加速生物机体的新陈代谢。

在适量磁场作用下,细胞内核酸代谢旺盛,若没有大量能量供应,旺盛代谢是无法进行的。在经磁场处理的细胞中,ATP 含量增高,导致细胞呼吸作用增强,三羧酸循环中的氧化反应、电子传递和能量转换加速,从而促进生物体一系列生化反应加速。此外适量磁场的作用,导致细胞内粗糙内质网,以及植物细胞的高尔基体数量增多,加速了细胞内蛋白质、酶、脂类物质的合成和运输,为细胞物质代谢提供了充足的物质基础,加速了细胞的生长和分裂。而强磁场长时间处理,可以导致细胞内一些亚显微结构解聚,如微管蛋白,从而影响或阻止了有丝分裂的进行,因而导致细胞生长受抑制,甚至变形。

6.3.3 磁场影响水的结构和性质及生物膜的通透性

经磁化处理后获得的磁化水,其物理性质和化学性质都会发生一系列变化。众多的研究者测定了磁化水的物理化学性质后,发现磁化水的沸点、冰点、密度、粘度、表面张力、电导率、介电常数、声速、紫外线和红外线的吸收率、折射率、pH 值以及化学性质

均与未磁化处理水不同，但规律不一，有增有减。

在磁场作用下，水分子结构会发生变化。水分子在正常情况下是由氧原子和氢原子连成了一个顶角为 105° 的等腰三角形，但在磁力作用下，水分子首先作定向排列，进而氢键被拉断，键变形，顶角小于 105° ，减少了水的缔合度，水分子变小，极性增强，因而介电常数增大，溶解氧增加。由于水分子变小，水中的自由水分子增加，容易透过细胞的半透膜。当水分子恢复缔合时，放出原来吸收的能量，就可激发生物体内的活性物质，产生生物学效应。

而细胞膜在磁场的作用下，形成了许多自由基，高浓度自由基使细胞膜通透性增强，一些 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 等离子以及 H_2O 、 O_2 等易进入细胞内。这些物质既是细胞兴奋的基础，也是细胞新陈代谢与能量转换的条件，可以影响与生物活动有关的细菌生长等过程。

外磁场既可以促进生物体的生长，加速新陈代谢，增加核酸的总量，使酶活性增强，也能使生物的染色体畸变、点突变，使生物生长受抑或造成死亡。由此可见，磁生物学机理是非常复杂的过程。磁生物学机理是一个迄今为止尚待解决的问题。

7 煤炭脱硫微生物菌种的分子生物学试验研究

脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）有良好的脱硫效果，但该菌还有生长缓慢、代期长以及酸性培养和代谢产酸等缺点。利用现代分子生物学研究方法和手段，对氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）的遗传学特性进行研究，是为了有目的地对 *T. f* 菌进行遗传改良，以改善该菌种的脱硫品质及特性，使之更好地适应实际应用的要求。基本研究方法见 3. 3. 4。

7. 1 氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）质粒 DNA 的抽提试验

7. 1. 1 质粒小量抽提试剂盒组成与试验菌样类型

研究中我们采用现代分子生物学的试验研究手段，对煤炭脱硫微生物菌种从分子生物学水平上进行基础性探索研究。主要是对我们所获取的煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）脱硫遗传物质的遗传背景进行研究，重点放在对 *T. f* 菌质粒 DNA 进行抽提试验。

氧化亚铁硫杆菌（*T. f*）质粒 DNA 的抽提，采用的是上海生工生物工程有限公司编号为 SK1191 的 UNIQ - 10 柱式质粒小量抽提试剂盒。具体组成如表 7 - 1 所示。

表 7 - 1 UNIQ - 10 柱式质粒小量抽提试剂盒组成

Components	SK1191
Column	50
2 - ml Collection Tube	50
Boiled RNase A ^(a)	1mg/ml × 1
Solution I	6ml
Solution II ^(b)	12ml
Solution III	25ml
Wash Solution ^(c)	12ml
Elution Buffer ^(d)	5ml

按照要求，首次使用前要先对试剂盒中的试剂加以配制：

- (1) 先将 Boiled RNase A 全部加入到 Solution I 中，充分混匀后实验后 4 保存；
- (2) 在低温下会有沉淀出现，37 加温溶解后使用；
- (3) 首次使用前，必须在 Wash Solution 瓶中加入 4 倍体积的无水乙醇，充分混匀后使用；
- (4) Elution Buffer 为 2. 0mmol/LTris - HCl，pH8. 0 ~8. 5，实验后 4 保存。
- 试验所用菌样采用的是煤系氧化亚铁硫杆菌（干坝子 *T. f*、砚石台 *T. f*）与非煤系氧

化亚铁硫杆菌（中农 T. f）。试验前，对各菌样采用 Silverman 液体培养基进行 30℃ 恒温、140rpm/min 旋回振荡培养。我们选择氧化亚铁硫杆菌（T. f）对数生长后期至稳定生长期的菌体细胞作为质粒 DNA 抽提试验对象。

7.1.2 氧化亚铁硫杆菌（T. f）质粒 DNA 抽提试验步骤与试验过程

- （1）将培养好的 1~2ml 细菌 12,000rpm 离心 15 秒，去上清。
- （2）加 100 μ l Solution I，用枪头或振荡器充分悬浮细菌。
- （3）加入 200 μ l Solution II，立即上下颠倒 10 次，使之充分中和，室温放置 2 分钟。
- （4）加入 350 μ l Solution III，立即上下颠倒 10 次，使之充分中和，室温放置 2 分钟。
- （5）12,000rpm，离心 5 分钟。
- （6）将（5）中上清液移至套放于 2.0ml 收集管内的 UNIQ-10 柱中，10000rpm 室温离心 15s。
- （7）弃收集管中的废液，将 UNIQ-10 柱放入同一支收集管中，吸取 500 μ l Wash Solution 到 UNIQ-10 柱，10000rpm 室温离心 30 秒。
- （8）重复步骤 7。
- （9）弃收集管中的废液，将 UNIQ-10 柱放入同一支收集管中，10000rpm 室温离心 30 秒以彻底去除 Wash Solution。
- （10）将 UNIQ-10 柱放入新的洁净 1.5ml 离心管中，加入 50 μ l Elution Buffer，室温放置 2 分钟后，10000rpm 室温离心 1 分钟。离心管中溶液即为质粒 DNA 的抽提物。

7.2 氧化亚铁硫杆菌（T. f）质粒 DNA 抽提物的琼脂糖凝胶电泳试验

带电物质在电场中向相反电极移动的现象称为电泳（electrophoresis）。自从琼脂糖凝胶被引入核酸研究以来，按分子量大小分离 DNA 的凝胶电泳技术，已发展成为现代分子生物学研究方法的一种基础性技术。

7.2.1 琼脂糖凝胶电泳试验的试剂类型与试验过程

（1）试验用试剂类型及特性

① λ DNA Marker（标示物）

氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 抽提物琼脂糖凝胶电泳的 DNA 标准品（ λ DNA Marker），采用的是上海生工生物工程有限公司编号为 SM0191 的 Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker。其基本特性如下：

λ DNA 完全地含有 EcoRI 和 HindIII 片段，采用酚抽提，乙醇沉淀获得，并溶于 10mM Tris-HCl (pH 7.6)，1mM EDTA 缓冲贮液中。该 DNA Marker 包含以下 13 种碱基片段：21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 584, 1375, 947, 831, 564, 125。碱基片段电泳带分布情况如图 7-1 所示。

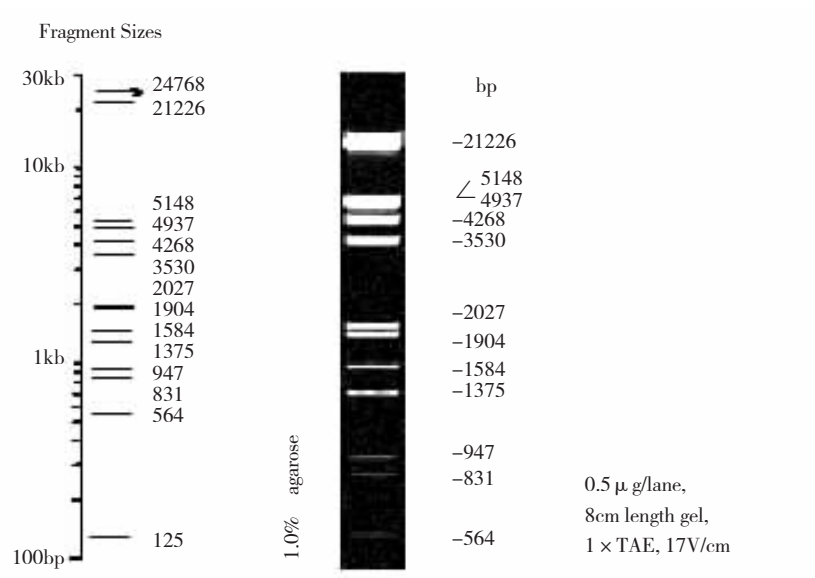


图 7-1 Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker 碱基片段电泳带分布

②琼脂糖 (Agarose)

凝胶琼脂糖采用的是上海生工生物工程有限公司编号为 AX0174 的琼脂糖 III (Agarose III), 其基本特性如下:

1. 5% 凝胶分离产物 10 ~ 40kb; 凝胶强度 $> 2000 \text{ g/cm}^2$; 胶凝温度: $37 \sim 39$; 融化温度 $90 \sim 94$ 。

(2) 水平式琼脂糖凝胶电泳试验^{[118][119][120]}

氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 质粒抽提物的琼脂糖凝胶电泳, 我们选择在 DY - 1 型水平式凝胶电泳仪上进行 (图 7-2 ~ 7-3)。电泳电场: $10 \sim 12.5 \text{ v/cm}$ 。

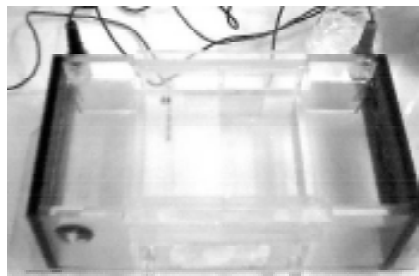


图 7-2 凝胶电泳示意图 (1)

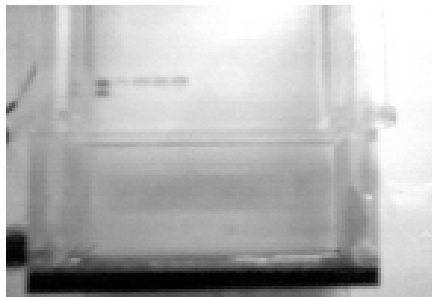


图 7-3 凝胶电泳示意图 (2)

图 7-2 中电泳带 (蓝色) 从上到下依次为: ①Marker, ②中南 T. f, ③干坝子 T. f, ④硃石台 T. f, ⑤中南 T. f (原菌液); 图 7-3 中电泳带 (蓝色) 从左到右依次为: ①Marker, ②中南 T. f, ③干坝子 T. f, ④硃石台 T. f, ⑤中南 T. f (原菌液)。

7.2.2 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 质粒抽提物琼脂糖凝胶电泳试验结果

利用 Hema 紫外数码图像分析仪 (图 7-4 ~ 图 7-5) 及其附带的 GSM 凝胶电泳图像

分析系统 2.0，对凝胶电泳结果进行拍照与分析。结果如图 7-6 ~ 图 7-7 所示。



图 7-4 Hema 紫外数码图像分析仪

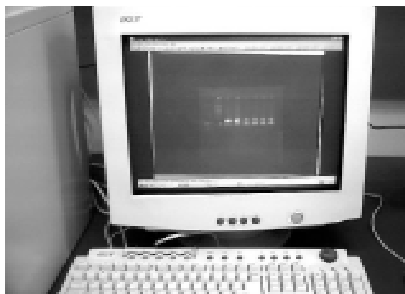


图 7-5 GSM 凝胶电泳图像分析系统

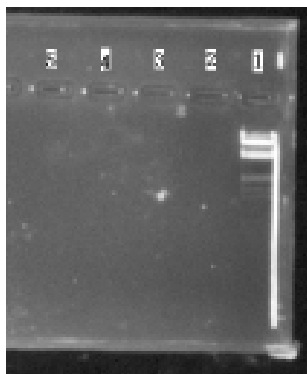


图 7-6 凝胶电泳紫外分析照片 (1)

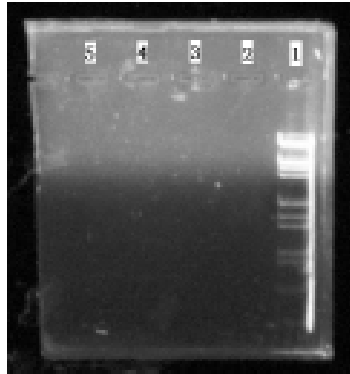


图 7-7 凝胶电泳紫外分析照片 (2)

图 7-6、图 7-7 凝胶电泳结果紫外分析照片中，从右至左所示各电泳道的标号依次为：1. Marker；2. 中南 T. f；3. 干坝子 T. f；4. 砚石台 T. f；5. 中南 T. f（原始菌种）。

7.3 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 分子生物学试验结果分析

自从 Mao (1980 年)^[86]和 Holmes (1984 年)等^[60]报导了从硫杆菌中发现质粒以来，陆续有从氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 和氧化硫硫杆菌 (T. t) 中，尤其是在氧化硫硫杆菌 (T. t) 中发现并分离到质粒的报导^{[87][88][89]}。据此有人认为质粒 DNA 在硫杆菌中存在较为普遍，然而我们通过对相同类型不同生长环境下的 T. f 菌进行的质粒抽提试验，结果表明在煤系（干坝子、砚石台）与非煤系（中南）几种氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 中均未发现有质粒。

由凝胶电泳照片可见，在电泳过程中除了标示物（Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker）有电泳带，电泳结果为阳性外，其余各菌株均未出现质粒电泳带，电泳结果为阴性。由于我们用于质粒 DNA 抽提试验的几种细菌菌液，在试验前均采用离心沉降的方法进行富集，因此排除了可能由于细菌浓度过低、抽提试验菌量少而造成的试验菌体数量的不足。且重复试验的结果相同。

因此，我们分析有两种可能：一种可能是由于试验菌株中存在的质粒较少，而致使质

粒抽提物的量不足以在凝胶电泳中显现。对此,可以采用分子生物学中 PCR 技术^[102],在分析氧化亚铁硫杆菌质粒 DNA 碱基序列的基础上,通过设计引物,对抽提物中可能存在的质粒 DNA 片段进行扩增来加以试验验证。但是由于条件所限,该试验我们暂无法进行。

另一种可能,就是我们所试验的几种氧化亚铁硫杆菌(T. f)中不含有质粒。若是这样,则显然表明氧化亚铁硫杆菌中尽管可能存在质粒,但并不普遍。因此并非像有些报导的那样氧化亚铁硫杆菌中质粒普遍存在^{[92][93]}。同时也可以认为 T. f 菌的遗传物质只是拟核染色体 DNA,而且 T. f 菌对 Fe^{2+} 、S 的氧化能力只与拟核染色体 DNA 有关。

脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌(T. f 菌)由于其所具有的特殊生物代谢机制,因此在煤炭脱硫等方面具有巨大的潜在应用价值。但是,由于该菌存在生长缓慢、代期长、细胞得率低以及酸性培养和代谢产酸等缺点,使其在工业应用上受到了一定的限制^[116]。

利用包括基因工程在内的现代分子生物学研究方法和手段,对氧化亚铁硫杆菌(T. f)的遗传学特性进行有目的的研究,就是为了对 T. f 菌种进行遗传改良,以改善菌种的生长特性,并具有更好的脱硫效能,从而使 T. f 菌能更好地适应实际工业应用的要求。我们现在所进行的只是对氧化亚铁硫杆菌遗传特性的基础性研究。研究刚刚开始,更深入的研究还有待于今后逐步开展。

8 煤与黄铁矿表面氧化前后 XRD、SEM/TEM 及 FTIR 研究

8.1 煤与黄铁矿表面细菌（T. f 菌）氧化前后的 XRD 及 TEM 研究

8.1.1 试验条件及试验内容

(1) 试样类型

- 1#煤样（红岩矿，- 200 目，2 克）；
- 2#黄铁矿样（红岩矿，- 200 目，2 克）。

(2) 煤样细菌（T. f 菌）氧化作用试验条件

- 3#中南 T. f 菌氧化作用（菌液 80ml，培养 14 天，预作用 15 分钟）；
- 4#干坝子 T. f 菌氧化作用（菌液 80ml，培养 14 天，预作用 15 分钟）；
- 5#砚石台 T. f 菌氧化作用（菌液 80ml，培养 14 天，预作用 15 分钟）。

(3) 黄铁矿样细菌（T. f 菌）氧化作用试验条件

- 6#中南 T. f 菌氧化作用（菌液 50ml，培养 14 天，预作用 15 分钟）；
- 7#干坝子 T. f 菌氧化作用（菌液 50ml，培养 14 天，预作用 15 分钟）；
- 8#砚石台 T. f 菌氧化作用（菌液 50ml，培养 14 天，预作用 15 分钟）。

8.1.2 煤与黄铁矿表面 T. f 菌氧化前后 XRD 及 TEM 试验结果与分析

（图 8-1 ~ 图 8-18）

(1) T. f 菌氧化作用前后 X 射线衍射（XRD）图谱（样品 1# ~ 8#）

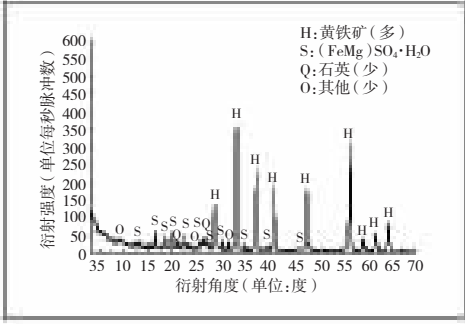
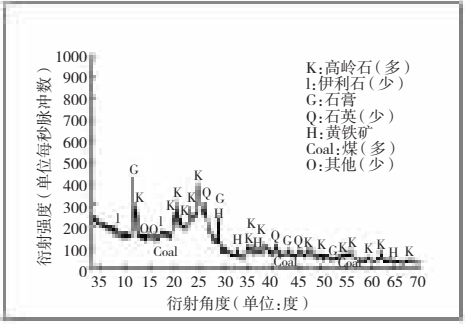


图 8-1 1#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱 图 8-2 2#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

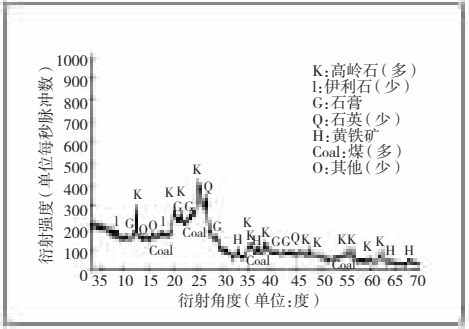


图 8-3 3#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

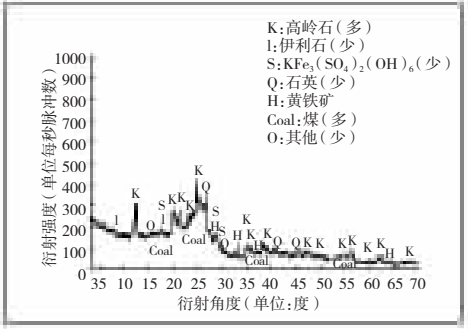


图 8-4 4#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

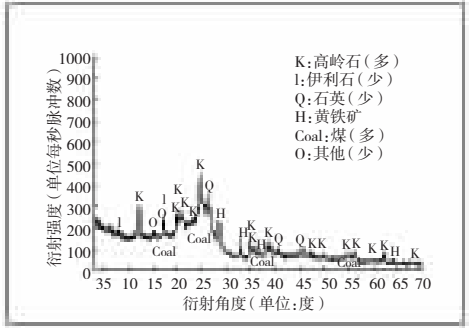


图 8-5 5#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

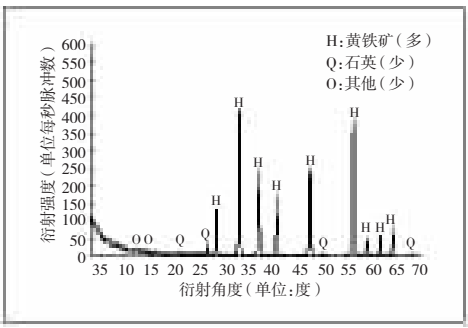


图 8-6 6#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

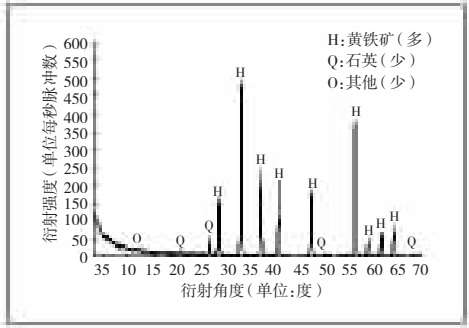


图 8-7 7#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

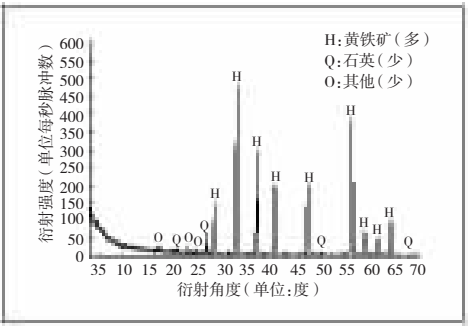


图 8-8 8#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

(2) T. f 菌氧化作用前后的 TEM 照片 (样品 1#~8#)



图 8-9 1#样品的 TEM 照片



图 8-10 1#样品的 TEM 照片



图 8-11 2#样品的 TEM 照片

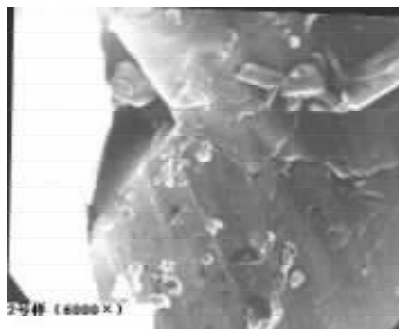


图 8-12 2#样品的 TEM 照片



图 8-13 3#样品的 TEM 照片

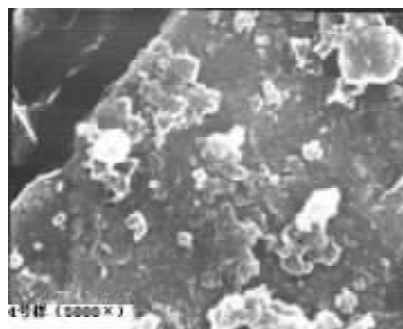


图 8-14 4#样品的 TEM 照片



图 8-15 5#样品的 TEM 照片

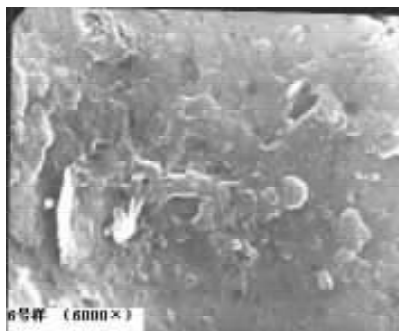


图 8-16 6#样品的 TEM 照片

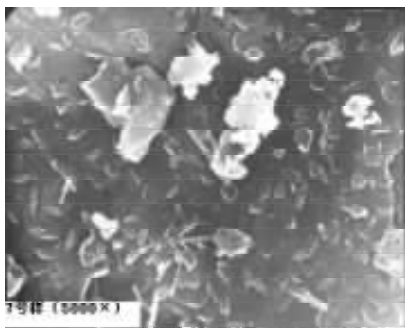


图 8-17 7#样品的 TEM 照片

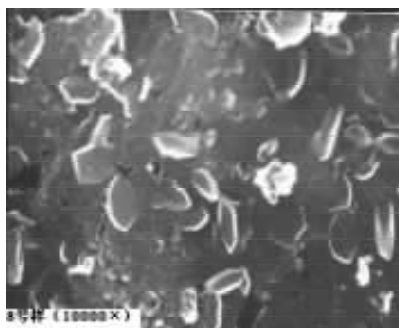


图 8-18 8#样品的 TEM 照片

(3) 煤与黄铁矿表面 T. f 菌氧化前后的 XRD 图谱及 TEM 照片分析

根据对 1#~8#样品进行 X 射线衍射 (XRD) 试验, 分别得到各样品的 XRD 谱图 (图 8-1~图 8-8)。其中: 图 8-1、图 8-2 分别是 T. f 菌作用前红岩矿煤样和黄铁矿样的 XRD 谱图, 图 8-3~图 8-5 分别是煤样在 T. f 菌 (中南、干坝子、砚石台) 作用后的 XRD 谱图, 图 8-6~图 8-8 分别是黄铁矿样在 T. f 菌 (中南、干坝子、砚石台) 作用后的 XRD 谱图。

由图 8-1 可见, 该煤样成分组成较为复杂, 在各成分含量中, 以煤 (Coal) 为主, 其他还包括有: 高岭石、石膏、黄铁矿以及少量的伊利石和石英等。黄铁矿 (FeS_2) 衍射主峰的晶面间距为 $2.70\text{\AA}$ ($1\text{\AA} = 10^{-10}\text{m}$), 衍射角度 (2θ) 在 $30^\circ \sim 35^\circ$ 之间。经细菌 (T. f 菌) 作用后的煤样的衍射图谱 (图 8-3~图 8-5) 中可见到, 黄铁矿 (FeS_2) 衍射主峰的峰值, 即衍射强度均发生了变化。

黄铁矿 (FeS_2) 的衍射特征峰及在细菌 (T. f 菌) 作用后的变化, 在图 8-2 和图 8-6~图 8-8 中表现尤为明显。在采用 XRD 测定黄铁矿 (FeS_2) 的空间结构时, 由于黄铁矿 (FeS_2) 上下、左右、前后的晶面间距不同, 衍射信息的位置不一样, 所以在不同衍射位置 (角度) 处有多个峰值。其衍射角度 (2θ) 与晶面间距 d 的关系, 可由布拉格方程确定。

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

式中, d 为晶面间距 ($\text{\AA}$); 2θ 为衍射角度 (度); λ 为 X 射线波长; n 为自然数。

由黄铁矿 (FeS_2) 细菌 (T. f 菌) 作用前后的衍射图谱可见, 由于细菌作用, 使黄铁矿 (FeS_2) 表面的超微观结构发生变化, 晶面的变化导致衍射信息改变, 从而使黄铁矿 (FeS_2) 衍射特征主峰发生变化。细菌作用前, FeS_2 衍射特征主峰衍射强度为 375 (脉冲数/s) (图 8-2), 经细菌作用之后, FeS_2 衍射特征主峰衍射强度分别为: 420 (脉冲数/s) (图 8-6, 中南 T. f 菌)、480 (脉冲数/s) (图 8-7, 干坝子 T. f 菌) 475 (脉冲数/s) (图 8-8, 砚石台 T. f 菌)。结果表明, 煤系 T. f 菌的氧化作用强于非煤系 T. f 菌。

氧化亚铁硫杆菌 (T. f 菌) 氧化黄铁矿 FeS_2 为 FeSO_4 , 而硫酸铁盐溶于水。在进行 XRD 测试之前因对试样进行过冲洗和过滤, FeSO_4 被冲洗过滤除去, 所以, 在衍射图谱 (图 8-6~图 8-8) 中均未出现 FeSO_4 衍射峰。这样就使整个样品中黄铁矿 (FeS_2) 的相对含量增加, 从而表现为黄铁矿 (FeS_2) 的衍射特征峰增强, 峰值增大。结合 1~8#样品的透射电镜 (TEM) 照片 (图 8-6~图 8-8) 可见, 细菌 (T. f 菌) 对煤样及黄铁矿样表面均发生作用, 尤其在黄铁矿 (FeS_2) 表面作用更强, 出现了明显的细菌氧化坑蚀现象, 说明 T. f 菌对煤样和黄铁矿表面是通过吸附氧化形式进行作用的。

8.2 黄铁矿表面氧化剂 (H_2O_2) 氧化前后的 XRD 及 SEM 研究

为了与细菌 (T. f) 对黄铁矿表面发生作用的形式和程度等进行比较, 特采用强氧化剂 (H_2O_2) 对黄铁矿进行氧化试验, 并对氧化作用后的试样分别进行 XRD 及 SEM 测试与分析。

8.2.1 试验条件及试验内容

(1) 试样类型

红岩矿黄铁矿粉（120 ~ 200 目、- 200 目）

(2) 氧化试验条件及内容（表 8-1）

表 8-1 黄铁矿表面氧化剂（H₂O₂）氧化试验条件

试 样 类 型 试 验 条 件	红岩矿黄铁矿	
	9#（120 ~ 200 目）	10#（- 200 目）
(1) 未氧化	9#（120 ~ 200 目）	10#（- 200 目）
(2) 浅氧化 （氧化 15 分钟）	11#（120 ~ 200 目）	12#（- 200 目）
(3) 深氧化 （氧化 3 小时）	13#（120 ~ 200 目）	14#（- 200 目）
(4) 长氧化 （自然放置 3 个月）	15#（120 ~ 200 目）	16#（- 200 目）

[注]: (1) 氧化剂: H₂O₂ 水溶液 (1.5%) 100ml (50ml 蒸馏水 + 50ml 3% H₂O₂ 水溶液);
(2) 试样过滤干燥; (3) 进行 XRD 及 SEM 分析。

8.2.2 黄铁矿表面 H₂O₂ 氧化前后的 XRD 及 SEM 试验结果与分析

(图 8-19 ~ 图 8-34)

(1) 黄铁矿表面 H₂O₂ 氧化作用前后 X 射线衍射 (XRD) 图谱 (样品 9# ~ 16#)

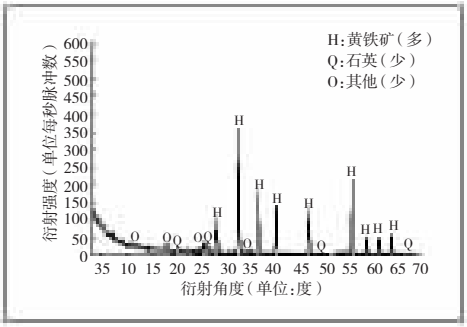


图 8-19 9#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

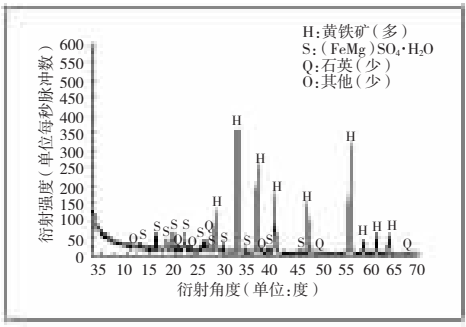


图 8-20 10#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

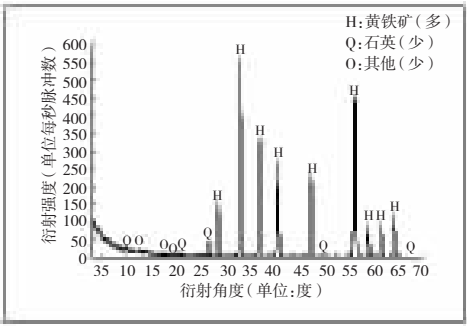


图 8-21 11#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

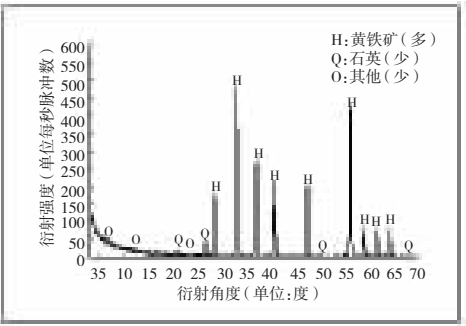


图 8-22 12#样品的 X- 射线衍射定性分析图谱

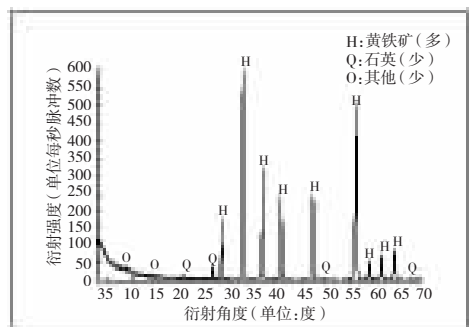


图 8-23 13#样品的 X - 射线衍射定性分析图谱

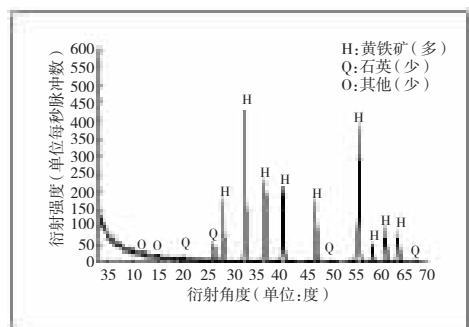


图 8-24 14#样品的 X - 射线衍射定性分析图谱

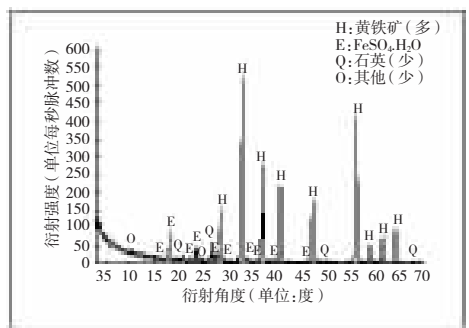


图 8-25 15#样品的 X - 射线衍射定性分析图谱

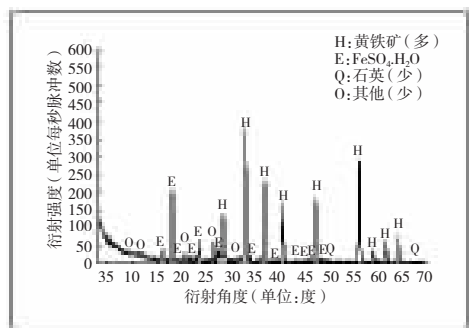


图 8-26 16#样品的 X - 射线衍射定性分析图谱

(2) 黄铁矿表面 H_2O_2 氧化作用前后 SEM 照片 (样品 9# ~ 16#)

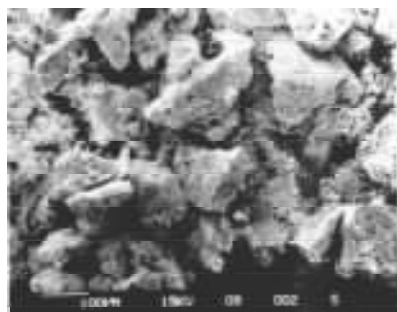


图 8-27 9#样品的 SEM 照片 (100 ×)

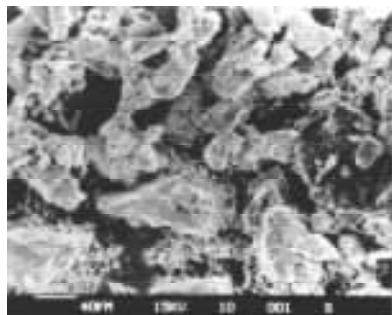


图 8-28 10#样品的 SEM 照片 (300 ×)

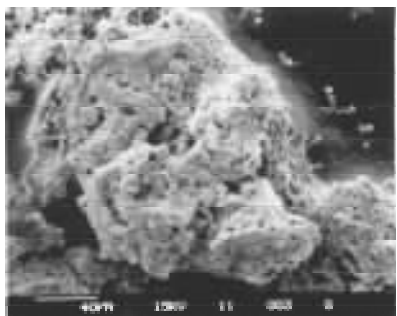


图 8-29 11#样品的 SEM 照片 (300 ×)

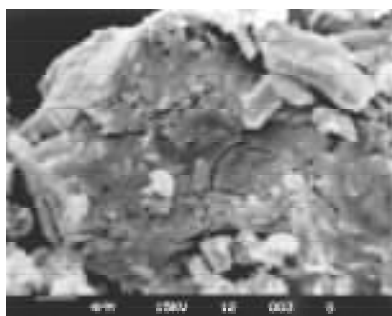


图 8-30 12#样品的 SEM 照片 (2900 ×)

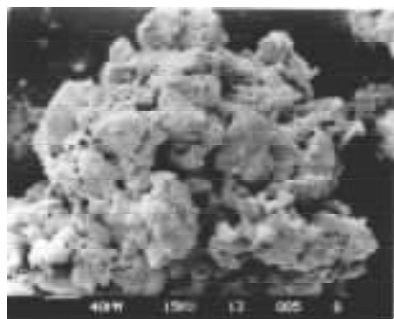


图 8-31 13#样品的 SEM 照片 (300 ×)

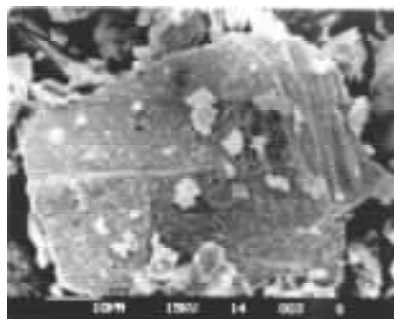


图 8-32 14#样品的 SEM 照片 (1500 ×)

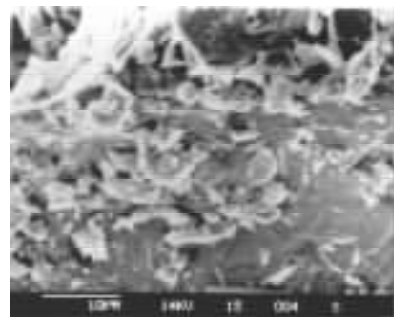


图 8-33 15#样品的 SEM 照片 (1000 ×)

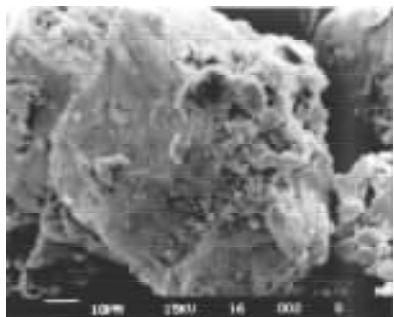


图 8-34 16#样品的 SEM 照片 (1000 ×)

(3) 黄铁矿表面 H_2O_2 氧化前后的 XRD 图谱及 SEM 照片分析

采用强氧化剂 (H_2O_2) 对黄铁矿进行氧化试验, 并对氧化作用后的黄铁矿试样分别进行 XRD 及 SEM 测试, 其结果见图 8-19 ~ 图 8-26 及图 8-27 ~ 图 8-34。

黄铁矿表面氧化剂作用的 XRD 图谱表明, 由于氧化程度不同 XRD 谱图中黄铁矿的衍射特征主峰峰值有不同变化。比较 9、11、13、15 样品 XRD 谱图, 特征主峰峰值大小顺序为: 深氧化 (600 次脉冲/秒) > 浅氧化 (550 次脉冲/秒) > 长氧化 (525 次脉冲/秒) > 未氧化 (350 次脉冲/秒)。比较 10、12、14、16 样品谱图, 特征主峰峰值大小顺序为: 深氧化 (495 次脉冲/秒) > 浅氧化 (475 次脉冲/秒) > 长氧化 (375 次脉冲/秒) > 未氧化 (350 次脉冲/秒)。根据黄铁矿表面 T. f 菌和 H_2O_2 作用谱图变化结果对比, 说明细菌对黄铁矿表面发生了氧化作用。再结合 SEM 照片发现, 黄铁矿表面经 H_2O_2 氧化作用后的变化与 T. f 菌氧化作用不同, 氧化剂的作用结果为纽扣状片起, 而细菌 (T. f) 则表现为氧化坑蚀。因此, 可以认为虽然 H_2O_2 与 T. f 菌在 FeS_2 表面均发生氧化作用, 但作用形式不同, 氧化剂为强烈的直接作用氧化, 而细菌则为相对缓和的吸附作用氧化。

8.3 煤与黄铁矿表面细菌（T. f 菌）氧化作用前后的 FTIR 分析

8.3.1 高硫煤表面 T. f 菌氧化作用前后的 FTIR 谱图

(1) 试验条件（表 8-2）

表 8-2 不同细菌（T. f 菌）作用条件下的各种煤样

1. 作用前	
2#（红岩矿高硫煤，- 200 目，2 克）	
2. 作用后	
4#（中南，菌液 20ml，培养 14 天，预作用 10 分钟）	7#（中南，菌液 40ml，培养 14 天，预作用 30 分钟）
5#（干坝子，菌液 20ml，培养 14 天，预作用 10 分钟）	8#（干坝子，菌液 40ml，培养 14 天，预作用 30 分钟）
6#（砚石台，菌液 20ml，培养 14 天，预作用 10 分钟）	9#（砚石台，菌液 40ml，培养 14 天，预作用 30 分钟）

(2) 高硫煤样 T. f 菌氧化作用的 FTIR 谱图（图 8-35 ~ 图 8-41）

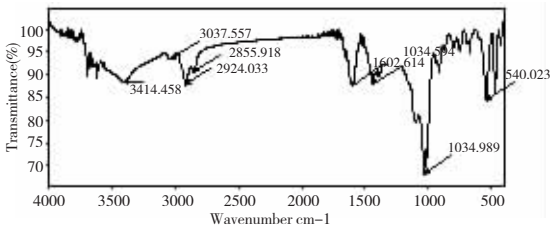


图 8-35 2#样品红外光谱

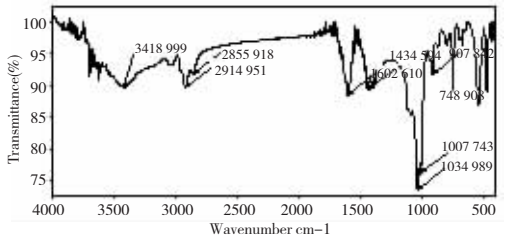


图 8-36 4#样品红外光谱

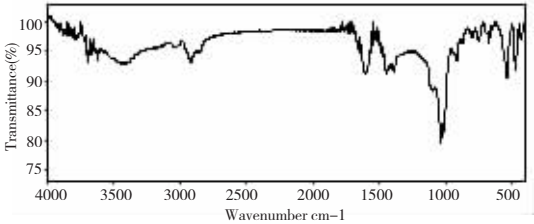


图 8-37 5#样品红外光谱

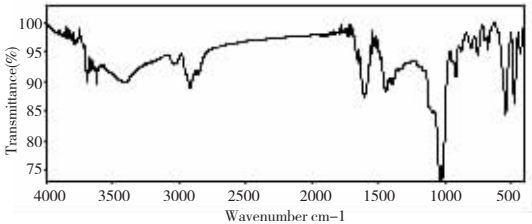


图 8-38 6#样品红外光谱

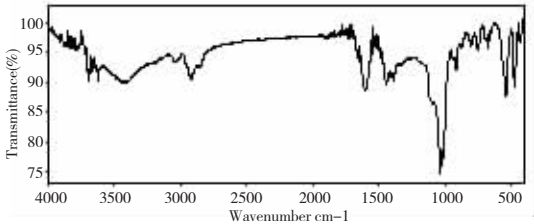


图 8-39 7#样品红外光谱

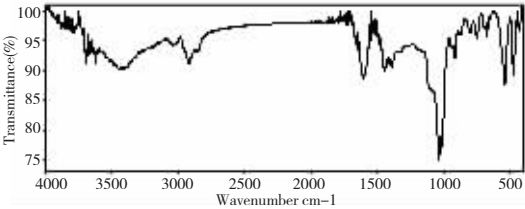


图 8-40 8#样品红外光谱

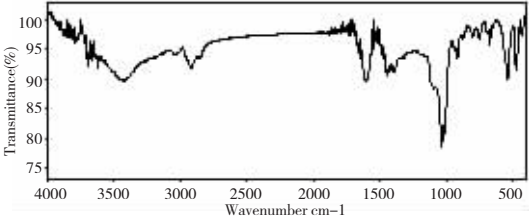


图 8-41 9#样品红外光谱

(3) 高硫煤样红外光谱对照图谱 (图 8-42 ~ 图 8-48)

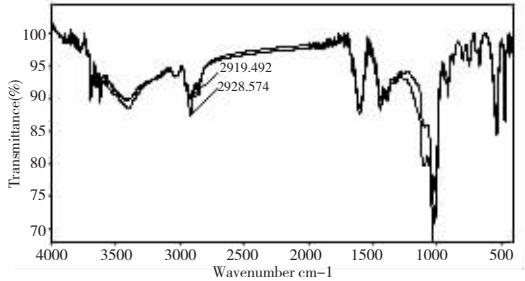


图 8-42 2# (2928.574) 与 4#样品红外光谱

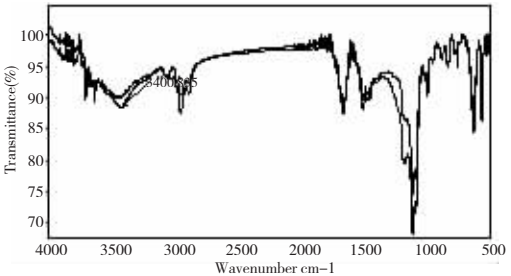


图 8-43 2# (3400.835) 与 7#样品红外光谱

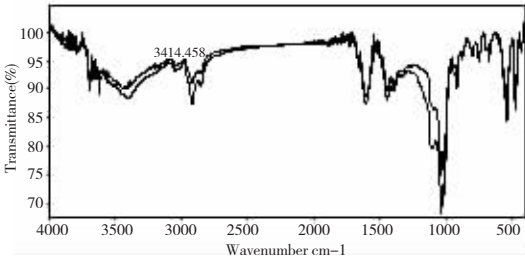


图 8-44 2#与 8# (3414.458) 样品红外光谱

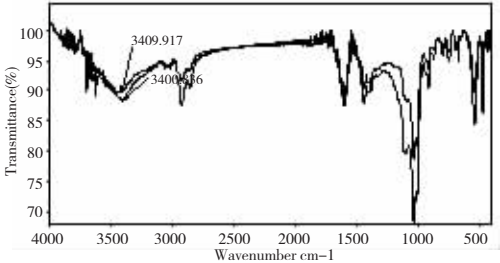


图 8-45 2# (3400.835) 与 9#样品红外光谱

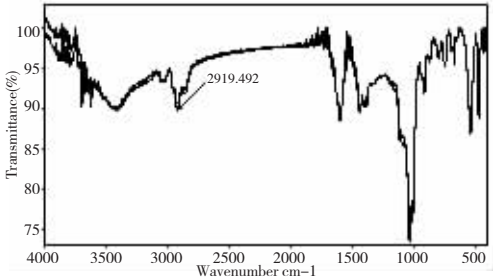


图 8-46 4# (2919.492) 与 7#样品红外光谱

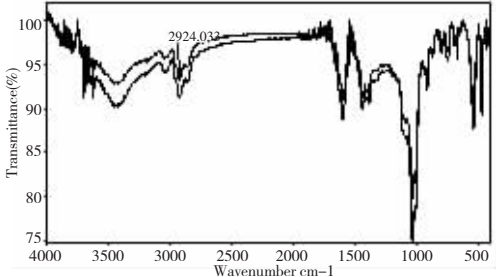


图 8-47 5#与 8# (2924.032) 样品红外光谱

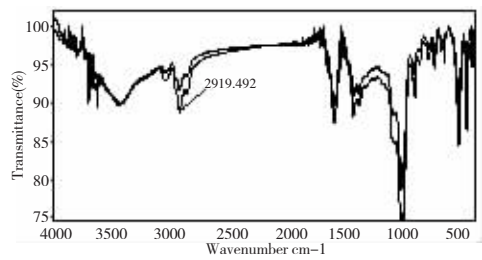


图 8-48 6# (2919.492) 与 9#样品红外光谱

8.3.2 黄铁矿表面 T. f 菌氧化作用前后的 FTIR 谱图

(1) 试验条件 (表 8-3)

表 8-3 不同细菌 (T. f 菌) 作用条件下的各种黄铁矿样

1. 作用前	
3 号样 (红岩矿黄铁矿, - 200 目, 2 克)	
2. 作用后	
10 号样 (中南, 菌液 20ml, 培养 14 天, 预作用 10 分钟)	13 号样 (中南, 菌液 40ml, 培养 14 天, 预作用 30 分钟)
11 号样 (干坝子, 菌液 20ml, 培养 14 天, 预作用 10 分钟)	14 号样 (干坝子, 菌液 40ml, 培养 14 天, 预作用 30 分钟)
12 号样 (砚石台, 菌液 20ml, 培养 14 天, 预作用 10 分钟)	15 号样 (砚石台, 菌液 40ml, 培养 14 天, 预作用 30 分钟)

(2) 黄铁矿表面 T. f 菌氧化作用的 FTIR 谱图 (图 8-49 ~ 图 8-55)

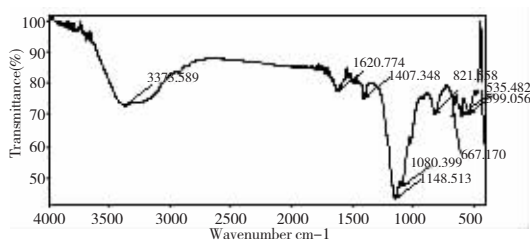


图 8-49 3#样品红外光谱

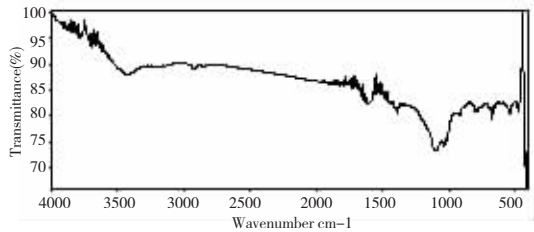


图 8-50 10#样品红外光谱

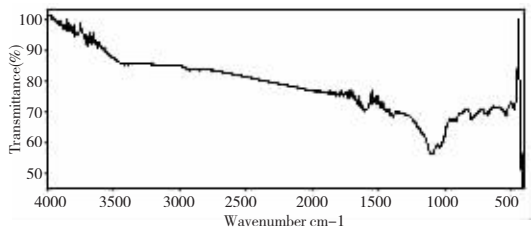


图 8-51 11#样品红外光谱

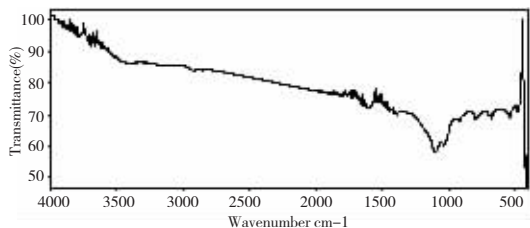


图 8-52 12#样品红外光谱

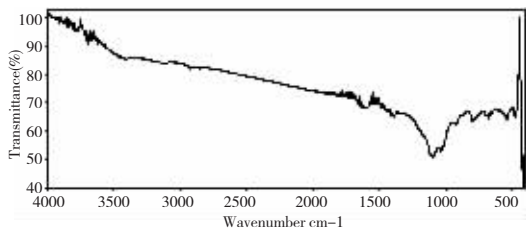


图 8-53 13#样品红外光谱

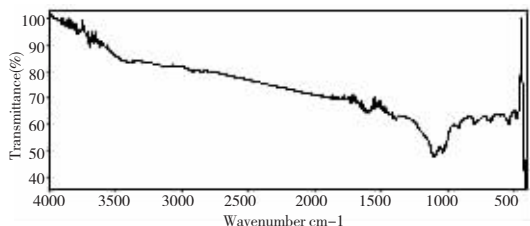


图 8-54 14#样品红外光谱

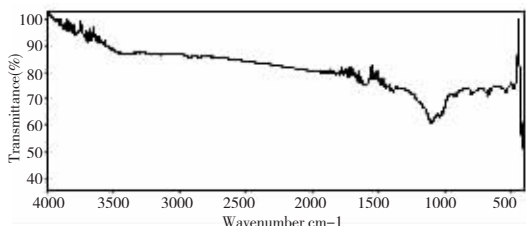


图 8-55 15#样品红外光谱

(3) 黄铁矿样红外光谱对照图谱 (图 8-56 ~ 图 8-64)

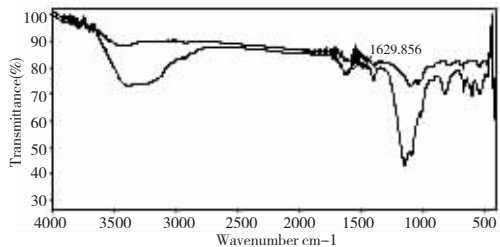


图 8-56 3# (1829.858) 与 12#样品红外光谱

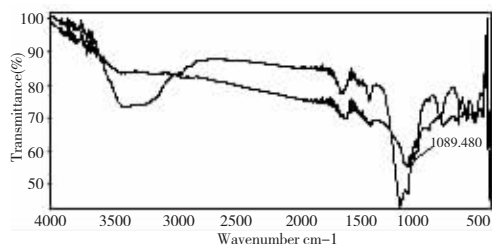


图 8-57 3#与 11# (1089.480) 样品红外光谱

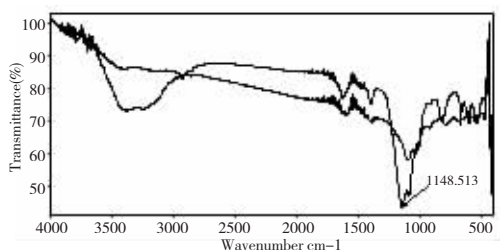


图 8-58 3# (1148.513) 与 12#样品红外光谱

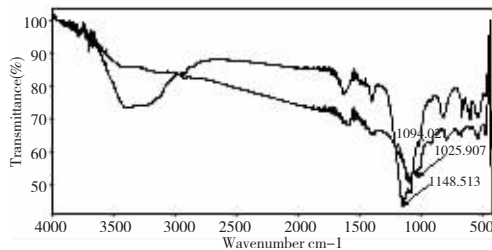


图 8-59 3# (1148.513) 与 13#样品红外光谱

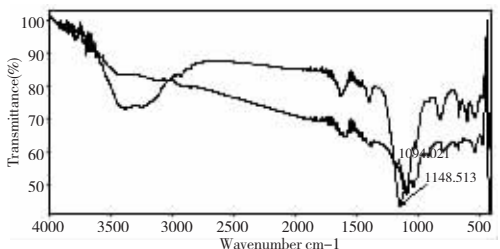


图 8-60 3# (1148.513) 与 14#样品红外光谱

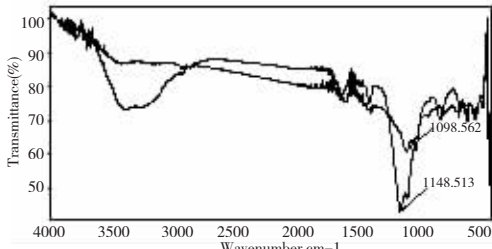


图 8-61 3# (1148.513) 与 15#样品红外光谱

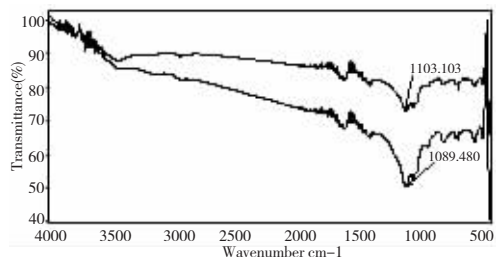


图 8-62 10#与 13# (1103.103) 样品红外光谱

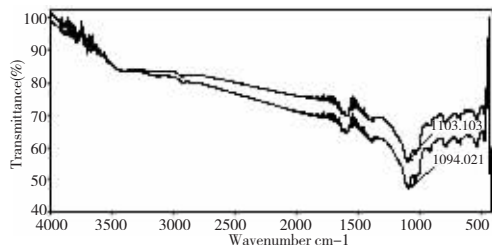


图 8-63 11#与 14# (1103.103) 样品红外光谱

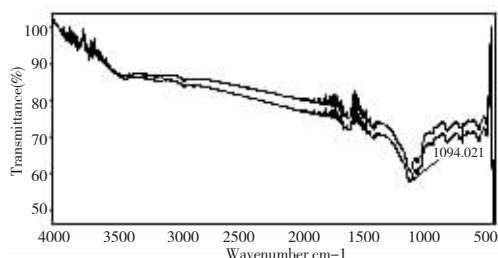


图 8-64 12# (1094.021) 与 15#样品红外光谱

8.3.3 煤与黄铁矿表面 T. f 菌氧化作用 FTIR 图谱解析与结果分析

(1) 高硫煤样 FTIR 图谱解析

2#: 波数	可能的官能团
3414	伯胺, $R-NH_2$ 或 $Ar-NH_2$
3037	芳烃的 CH
2924, 2855	环烷烃或脂环烃— CH_3
1602, 1434	羧酸盐类
1034	S=O 伸展振动吸收 (可能是亚砷类或磺酸盐类)
540	S—S 伸缩振动
4#: 波数	可能的官能团
3400	氢键的缔合或酚羟基, —OH 或 —NH (胺类)
2920 ~ 2860 (两个峰)	环烷烃或脂肪烃— CH_3
~ 1600	具有—O—取代的芳烃 C=C
1400 ~ 1500	杂环类
1050	S=O 伸缩振动 (可能是亚砷类或磺酸盐类)
900 ~ 650	属于芳烃的吸收峰
520 ~ 490	S—S 伸缩振动吸收

(2) 黄铁矿样 FTIR 图谱解析:

3#: 波数	可能的官能团
3373	O—H 或 N—H 的伸缩振动吸收
1620, 1407	杂环类
1148, 1080	C=S 伸缩振动吸收 (砷类或磺胺或磺酰胺类)

821	芳烃的碳氢
667	$\text{CH}_2\text{—S—CH}_2$ 中 C—S—C 的伸缩振动吸收
590	—S—CH 中 C—S 伸缩振动吸收
535	S—S 键吸收
10#: 波数	可能的官能团
3400	O—H 或 N—H 的伸缩振动吸收
~1600	羧基类或杂环类
1150, 1090	C=S 伸缩振动吸收 (矾类或磺胺或磺酰胺类)
680	$\text{CH}_2\text{—S—CH}_2$ 中 C—S—C 的伸缩振动吸收
600	—S—CH 中 C—S 伸缩振动吸收
540	S—S 键吸收

(3) 煤与黄铁矿表面 T. f 菌氧化作用 FTIR 试验结果分析

根据高硫煤样表面细菌 (T. f) 氧化作用前后红外光谱 FTIR 谱图 (图 7-35 ~ 图 7-41) 及对照谱图 (图 7-42 ~ 图 7-48) 可见, 其峰形相差不多, 区别主要表现在峰强 (透过率) 上。由于峰强差异的出现之处多发生在波数 $1000\text{ (cm}^{-1}\text{)}$ 附近, 说明是由于煤样中硫经细菌 (T. f) 氧化作用后被脱去, 其含量相对含量减少而致吸收减弱。

高硫煤样经细菌 (T. f) 作用前后峰形相差不多, 可能是由于煤的组成复杂, 其中含有各种无机盐和多种有机官能团等成分。而作为细菌 (T. f) 氧化作用对象的黄铁矿 (FeS_2), 在煤中含量少, 因此使煤样在细菌 (T. f) 作用前后峰形差别不十分明显。

通过对煤中的黄铁矿样采用细菌 (T. f) 作用, 并进行红外光谱 FTIR 测试, 得到 FT-IR 谱图 (图 7-49 ~ 图 7-55) 及对照谱图 (图 7-56 ~ 图 7-64)。其结果可明显看出细菌 (T. f) 作用前后的峰形差异。虽然整个峰形的变化不大, 但是峰的吸收强度发生较大变化, 特别是在波数为 1100 和 3300 附近的峰值。对照图谱解析可知, 细菌 (T. f) 作用前后, 在 1100 附近峰值发生显著变化的原因, 是由于黄铁矿表面经细菌 (T. f) 作用后, 含量变化致使透过率增加, 吸收减弱所致。而在 3300 附近的羟基峰变化较大的原因可能是样品中水分改变的结果。从图 7 ~ 7 中还可以看出, 各对比样品 (10#、13#)、(11#、14#)、(12#、15#) 峰形的差异主要就在波数 1100 附近, 且变化显著。表明当改变细菌 (T. f) 作用条件, 作用效果的变化非常明显。

9 微生物脱除煤中黄铁矿硫的试验研究

9.1 脱硫微生物（T. f 菌）浸出法脱硫的试验研究

9.1.1 煤炭生物浸出脱硫试验方案与试验条件的确定

（1）试样（煤样及菌样）准备及试验安排

试验用煤样采用四川南桐矿务局红岩矿高硫煤。煤样经破碎后进行筛分，筛分出 40 ~ 120、120 ~ 200、~ 200 目 3 个粒级；试验每次分别各取 20 克用于浸出脱硫。各粒级煤样另外分别留取一定量，进行制样、化验。测定原始煤样中各粒级硫分含量。如表 9 - 1 所示。

表 9 - 1 各粒级煤样 T. f 菌浸出前硫分

类型 硫分 粒级（目）	红岩矿煤破碎级		
	全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$
40 ~ 120	3. 178	2. 070	1. 108
120 ~ 200	2. 963	1. 991	0. 945
~ 200	2. 917	1. 944	0. 973

菌样类型为：非煤系 T. f 菌（中南）、煤系 T. f 菌（干坝子）、煤系 T. f 菌（硐石台）以及磁化作用的非煤系 T. f 菌（中南）、煤系 T. f 菌（干坝子）。

浸出试验采用 250ml 三角烧瓶，18 只，菌量及煤样装瓶量如表 9 - 2 所示。

表 9 - 2 煤炭生物浸出试验安排

粒级（目） 菌 种 类 型	40 ~ 120	120 ~ 200	~ 200
I 空白对照	煤样 20 克 + 9K 培养基 160ml	煤样 20 克 + 9K 培养基 160ml	煤样 20 克 + 9K 培养基 160ml
II 非煤系 T. f（中南）	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml
III 煤系 T. f（干坝子）	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml
IV 煤系 T. f（硐石台）	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + T. f 菌液 160ml
V 磁化 T. f（中南）	煤样 20 克 + 磁化 T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + 磁化 T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + 磁化 T. f 菌液 160ml
VI 磁化 T. f（干坝子）	煤样 20 克 + 磁化 T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + 磁化 T. f 菌液 160ml	煤样 20 克 + 磁化 T. f 菌液 160ml

9. 1. 2 微生物（T. f 菌）浸出法脱除煤中黄铁矿硫的试验

试验步骤：将装有细菌和煤样的烧瓶置于巡回振荡器（140rpm/min , ）。从第 6 天起，每隔 6 天取出 40ml 煤菌混合液，用中速滤纸过滤滤液放入 50ml 烧杯中；测 pH 值后返回各锥形瓶；煤样进行过滤清洗，并用稀 HCl 浸除黄钾（铵）铁矾；干燥；称重；制样；化验全硫及有机硫。

浸出脱硫率按下式计算：

$$\eta_i = [(S^{(1)} - S^{(2)}) / S^{(1)}] \times 100\% \tag{9-1}$$

式中， η_i ——脱硫率 % ；

$S^{(1)}$ 、 $S^{(2)}$ ——分别为煤样浸出前后的含硫（全硫、无机硫或有机硫）量 %。

(1) 煤系与非煤系 T. f 菌浸出前后浸出液 pH 的测定（表 9-3）

表 9-3 煤系与非煤系 T. f 菌浸出前后浸出液 pH 的测定值

浸出时间（天）			开始	6 天	12 天	18 天	24 天
菌 种	粒级（目）	标 指					
中南 T. f 菌	40 ~ 120 (4)	pH	2. 05	1. 81	1. 77	1. 78	1. 75
	120 ~ 200 (5)	pH	2. 05	1. 83	1. 72	1. 74	1. 69
	~ 200 (6)	pH	2. 05	1. 78	1. 76	1. 72	1. 67
干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (7)	pH	2. 14	1. 87	1. 81	1. 79	1. 74
	120 ~ 200 (8)	pH	2. 14	1. 85	1. 77	1. 75	1. 71
	~ 200 (9)	pH	2. 14	1. 85	1. 77	1. 74	1. 69
砚石台 T. f 菌	40 ~ 120 (10)	pH	2. 14	1. 88	1. 82	1. 79	1. 75
	120 ~ 200 (11)	pH	2. 14	1. 83	1. 76	1. 75	1. 73
	~ 200 (12)	pH	2. 14	1. 81	1. 73	1. 71	1. 67

(2) 煤系与非煤系 T. f 菌对各粒级煤样浸出后硫分的测定 (表 9-4)

表 9-4 各粒级煤样 T. f 菌 (煤系与非煤系) 浸出后硫分测定

菌种 \ 粒级 (目) \ 硫分			浸出时间			第 6 天			第 12 天全硫		
						全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$	全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$
I 空白对照	40 ~ 120 (1)					3.147	2.042	1.105	3.120	2.020	1.100
	120 ~ 200 (2)					2.903	1.964	0.939	2.894	1.874	0.920
	~ 200 (3)					2.802	1.832	0.970	2.745	1.798	0.947
II 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (4)					2.342	1.242	1.100	1.923	0.828	1.095
	120 ~ 200 (5)					2.135	1.195	0.940	1.726	0.796	0.930
	~ 200 (6)					2.100	1.130	0.970	1.696	0.740	0.956
III 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (7)					2.223	1.118	1.105	1.691	0.704	0.987
	120 ~ 200 (8)					2.005	1.075	0.930	1.569	0.647	0.922
	~ 200 (9)					1.957	1.000	0.957	1.505	0.561	0.944
IV 砚石台 T. f 菌	40 ~ 120 (10)					2.303	1.201	1.102	1.852	0.787	1.065
	120 ~ 200 (11)					2.092	1.155	0.937	1.668	0.756	0.912
	~ 200 (12)					2.007	1.038	0.969	1.603	0.659	0.944

表 9-4 (续) 各粒级煤样 T. f 菌 (煤系与非煤系) 浸出后硫分测定

菌种 \ 粒级 (目) \ 硫分			浸出时间			第 18 天			第 24 天全硫		
						全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$	全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$
I 空白对照	40 ~ 120 (1)					3.032	1.966	1.066	2.963	1.903	1.060
	120 ~ 200 (2)					2.709	1.803	0.906	2.652	1.765	0.887
	~ 200 (3)					2.650	1.717	0.933	2.605	1.703	0.902
II 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (4)					1.682	0.621	1.061	1.526	0.518	1.008
	120 ~ 200 (5)					1.508	0.597	0.911	1.412	0.490	0.922
	~ 200 (6)					1.448	0.523	0.925	1.386	0.456	0.930
III 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (7)					1.439	0.518	0.921	1.378	0.464	0.914
	120 ~ 200 (8)					1.312	0.448	0.864	1.281	0.381	0.900
	~ 200 (9)					1.290	0.386	0.904	1.239	0.339	0.900
IV 砚石台 T. f 菌	40 ~ 120 (10)					1.624	0.580	1.044	1.518	0.497	1.021
	120 ~ 200 (11)					1.461	0.557	0.904	1.378	0.470	0.908
	~ 200 (12)					1.400	0.474	0.926	1.329	0.416	0.913

(3) 煤系与非煤系 T. f 菌对各粒级煤样浸出脱硫率 η 的计算 (表 9-5)

表 9-5 各粒级煤样 T. f 菌 (煤系与非煤系) 浸出脱硫率 η 计算

菌种 \ 粒级 (目)		浸出时间		第 6 天			第 12 天全硫		
		脱硫率		$\eta_{t, ad}$ %	$\eta_{p, ad}$ %	$\eta_{o, ad}$ %	$\eta_{t, ad}$ %	$\eta_{p, ad}$ %	$\eta_{o, ad}$ %
I 空白对照	40 ~ 120 (1)			0.98	1.35	0.27	1.83	2.42	0.72
	120 ~ 200 (2)			2.02	1.36	0.63	2.33	5.88	2.65
	~ 200 (3)			3.94	5.76	0.31	5.90	7.51	2.67
II 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (4)			26.30	39.95	0.72	39.49	59.99	1.17
	120 ~ 200 (5)			27.95	39.98	0.53	41.75	60.02	1.59
	~ 200 (6)			28.01	41.87	0.31	41.86	61.93	1.75
III 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (7)			30.05	45.99	0.27	46.79	66.00	10.92
	120 ~ 200 (8)			32.33	46.01	1.59	47.05	67.50	2.43
	~ 200 (9)			32.91	48.56	1.64	48.41	71.14	2.98
IV 砚石台 T. f 菌	40 ~ 120 (10)			27.53	41.98	0.54	41.72	61.98	3.88
	120 ~ 200 (11)			29.40	41.99	0.85	43.70	62.03	3.49
	~ 200 (12)			31.20	46.60	0.41	45.05	66.10	2.98

表 9-5 (续) 各粒级煤样 T. f 菌 (煤系与非煤系) 浸出脱硫率 η 计算

菌种 \ 粒级 (目)		浸出时间		第 18 天			第 24 天全硫		
		脱硫率		$\eta_{t, ad}$ %	$\eta_{p, ad}$ %	$\eta_{o, ad}$ %	$\eta_{t, ad}$ %	$\eta_{p, ad}$ %	$\eta_{o, ad}$ %
I 空白对照	40 ~ 120 (1)			4.59	5.02	3.79	6.77	8.06	4.33
	120 ~ 200 (2)			8.57	9.44	4.13	10.50	11.35	6.14
	~ 200 (3)			9.15	11.68	4.11	10.70	12.40	7.30
II 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (4)			47.07	69.98	4.24	51.98	74.98	9.03
	120 ~ 200 (5)			49.11	70.02	3.59	52.35	75.39	2.43
	~ 200 (6)			50.36	73.10	4.93	52.48	76.54	4.42
III 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (7)			54.72	74.98	16.88	56.64	77.58	17.51
	120 ~ 200 (8)			55.72	77.50	8.57	56.77	80.86	4.76
	~ 200 (9)			55.78	80.14	7.09	57.52	82.56	7.50
IV 砚石台 T. f 菌	40 ~ 120 (10)			48.9	71.98	5.78	52.23	75.99	7.85
	120 ~ 200 (11)			50.69	72.02	4.34	53.49	76.39	3.92
	~ 200 (12)			52.01	75.62	4.83	54.44	78.60	6.17

(4) 煤系与非煤系 T. f 菌对各粒级煤样浸出全硫脱硫率 $\eta_{t,ad}$ 及无机硫脱硫率 $\eta_{p,ad}$

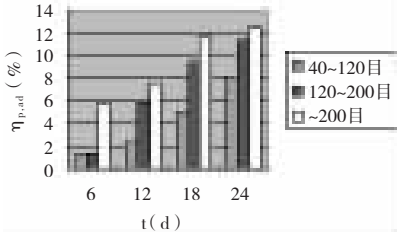
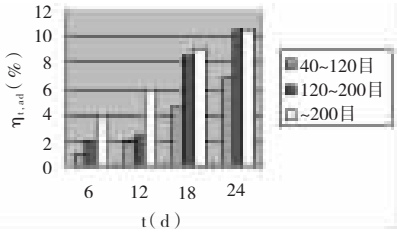


图 9-1 (a) I 空白浸出全硫脱硫率

图 9-1 (b) I 空白浸出无机硫脱硫率

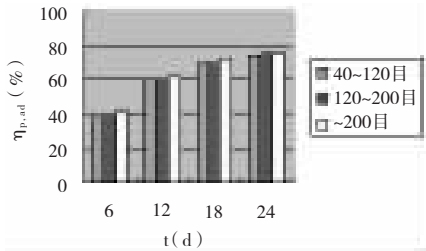
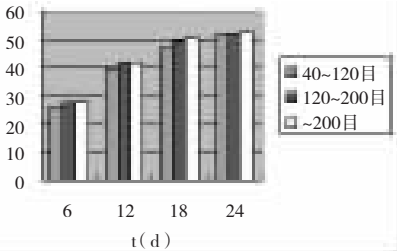


图 9-2 (a) II 中南 T. f 菌浸出全硫脱硫率

图 9-2 (b) II 中南 T. f 菌浸出无机硫脱硫率

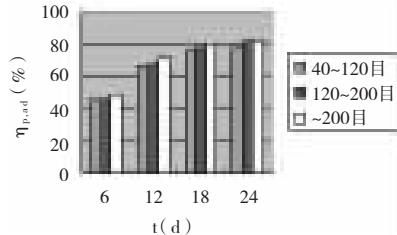
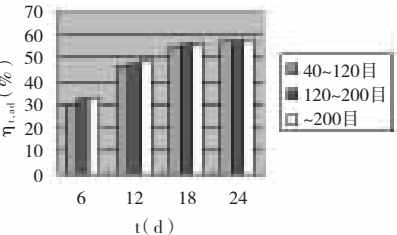


图 9-3 (a) III 干坝子 T. f 菌浸出全硫脱硫率

图 9-3 (b) III 干坝子 T. f 菌浸出无机硫脱硫率

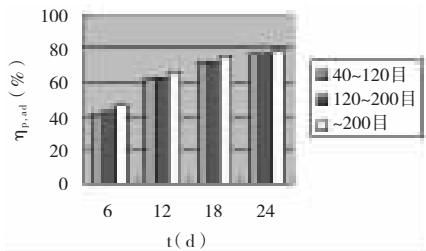
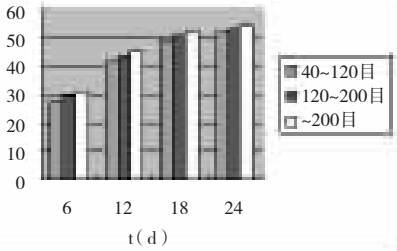


图 9-4 (a) IV 砚石台 T. f 菌浸出全硫脱硫率

图 9-4 (b) IV 砚石台 T. f 菌浸出无机硫脱硫率

(5) T. f 菌（磁化培育）对各粒级煤样浸出后硫分的测定（表 9-6）

表 9-6 各粒级煤样 T. f 菌（磁化培育）浸出后硫分测定

菌 种 \ 粒级 (目) \ 硫 分			浸 出 时 间			第 6 天			第 12 天全硫		
						全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$	全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$
V 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (1)					2. 291	1. 211	1. 080	1. 861	0. 786	1. 075
	120 ~ 200 (2)					2. 093	1. 164	0. 929	1. 634	0. 755	0. 909
	~ 200 (3)					2. 058	1. 099	0. 959	1. 634	0. 700	0. 934
VI 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (4)					2. 161	1. 077	1. 084	1. 607	0. 642	0. 965
	120 ~ 200 (5)					1. 943	1. 034	0. 909	1. 485	0. 585	0. 900
	~ 200 (6)					1. 895	0. 959	0. 936	1. 421	0. 499	0. 922

表 9-6 (续) 各粒级煤样 T. f 菌（磁化培育）浸出后硫分测定

菌 种 \ 粒级 (目) \ 硫 分			浸 出 时 间			第 18 天			第 24 天全硫		
						全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$	全硫 $S_{t, ad} \%$	无机硫 $S_{p, ad} \%$	有机硫 $S_{o, ad} \%$
V 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (1)					1. 600	0. 561	1. 039	1. 422	0. 438	0. 984
	120 ~ 200 (2)					1. 426	0. 537	0. 889	1. 308	0. 410	0. 808
	~ 200 (3)					1. 366	0. 463	0. 903	1. 282	0. 376	0. 906
VI 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (4)					1. 331	0. 430	0. 901	1. 268	0. 364	0. 904
	120 ~ 200 (5)					1. 204	0. 360	0. 844	1. 171	0. 281	0. 890
	~ 200 (6)					1. 182	0. 309	0. 873	1. 129	0. 269	0. 860

(6) T. f 菌（磁化培育）对各粒级煤样浸出脱硫率 η 的计算（表 9-7）

表 9-7 各粒级煤样 T. f 菌（磁化培育）浸出脱硫率 η 计算

菌 种 \ 粒级 (目) \ 脱 硫 率			浸 出 时 间			第 6 天			第 12 天全硫		
						$\eta_{t, ad} \%$	$\eta_{p, ad} \%$	$\eta_{o, ad} \%$	$\eta_{t, ad} \%$	$\eta_{p, ad} \%$	$\eta_{o, ad} \%$
V 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (1)					27. 91	41. 50	2. 53	41. 44	62. 03	2. 98
	120 ~ 200 (2)					29. 36	41. 54	1. 69	43. 84	62. 08	3. 81
	~ 200 (3)					29. 45	43. 47	1. 44	43. 98	63. 99	4. 01
VI 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (4)					32. 00	47. 97	2. 17	49. 43	68. 99	12. 91
	120 ~ 200 (5)					34. 42	48. 07	3. 81	49. 88	70. 62	4. 76
	~ 200 (6)					35. 04	50. 67	3. 80	51. 29	74. 33	5. 24

表 9-7 (续) 各粒级煤样 T. f 菌 (磁化培育) 浸出脱硫率 η 计算

菌 种 \ 粒 级 (目)		第 6 天			第 12 天全硫		
		$\eta_{t\ ad}$ %	$\eta_{p\ ad}$ %	$\eta_{o\ ad}$ %	$\eta_{t\ ad}$ %	$\eta_{p\ ad}$ %	$\eta_{o\ ad}$ %
V 中南 T. f 菌	40 ~ 120 (1)	49.65	72.90	6.23	55.25	78.84	11.19
	120 ~ 200 (2)	51.87	73.03	5.93	55.86	79.41	14.5
	~ 200 (3)	53.17	76.18	7.19	56.05	80.65	6.89
VI 干坝子 T. f 菌	40 ~ 120 (4)	58.12	79.23	18.68	60.10	82.42	18.41
	120 ~ 200 (5)	59.37	81.92	10.69	60.48	85.89	5.82
	~ 200 (6)	59.48	84.10	10.28	61.30	86.16	11.61

(7) 煤与非煤系 T. f 菌 (磁化培育) 对各粒级煤样浸出全硫脱硫率 $\eta_{t\ ad}$ 及无机硫

$\eta_{p\ ad}$

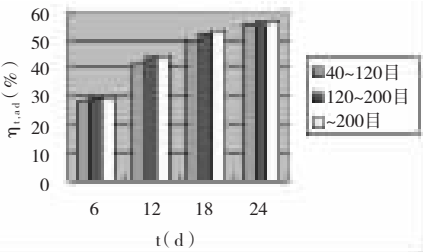


图 9-5 (a) V 中南 T. f 磁化培育
浸出全硫脱硫率

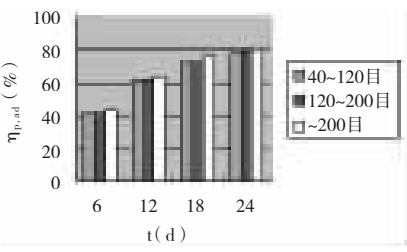


图 9-5 (b) V 中南 T. f 磁化培育
浸出无机硫脱硫率

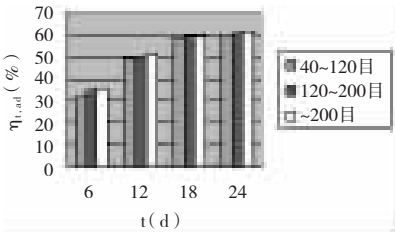


图 9-6 (a) VI 干坝子 T. f 磁化
浸出全硫脱硫率

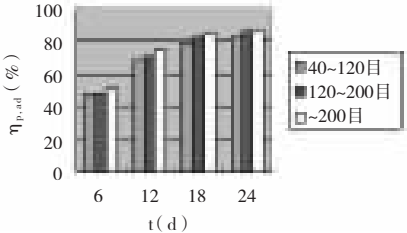


图 9-6 (b) VI 干坝子 T. f 磁化
浸出无机硫脱硫率

(8) 煤系与非煤系 T. f 菌对各粒级煤浸出脱硫效果的比较 (图 9-7 ~ 图 9-9)

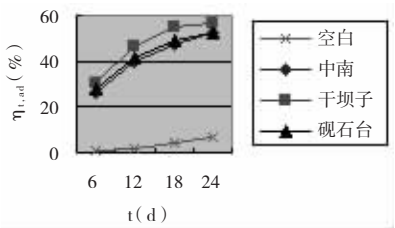


图 9-7 (a) 煤样 (40 ~ 120 目)
浸出脱除全硫比较

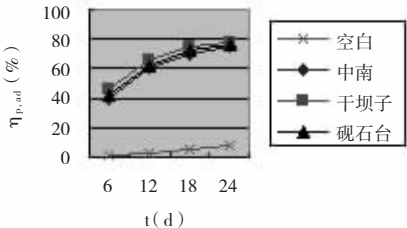


图 9-7 (b) 煤样 (40 ~ 120 目)
浸出脱除无机硫比较

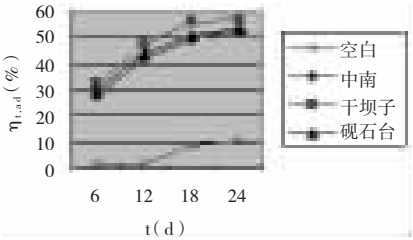


图 9-8 (a) 煤样 (120~200 目)
浸出脱除全硫比较

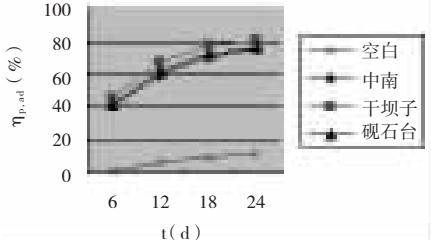


图 9-8 (b) 煤样 (120~200 目)
浸出脱除无机硫比较

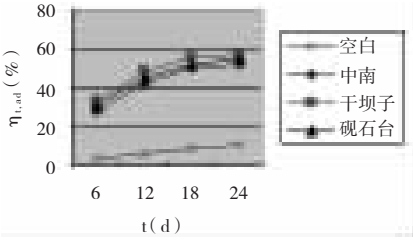


图 9-9 (a) 煤样 (~200 目)
浸出脱除全硫比较

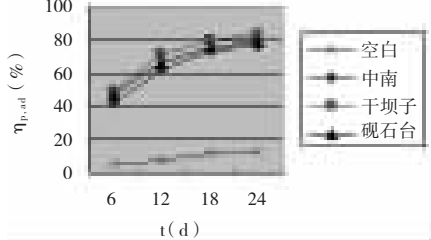


图 9-9 (b) 煤样 (~200 目)
浸出脱除无机硫比较

(9) 磁化与非磁化培育 T. f 菌对各粒级煤的浸出脱硫效果比较 (图 9-10 ~ 图 9-12)

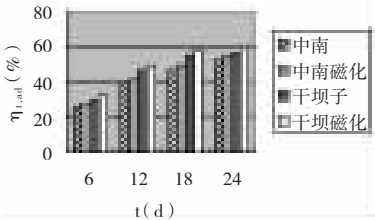


图 9-10 (a) 煤样 (40~120 目)
浸出脱除全硫比较

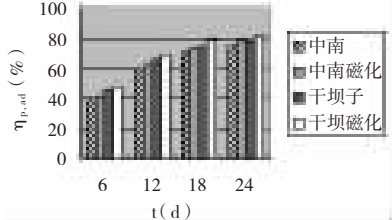


图 9-10 (b) 煤样 (40~120 目)
浸出脱除无机硫比较

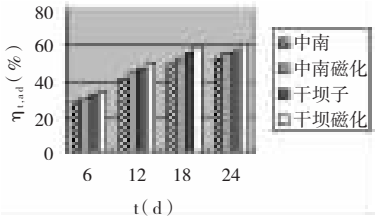


图 9-11 (a) 煤样 (120~200 目)
浸出脱除全硫比较

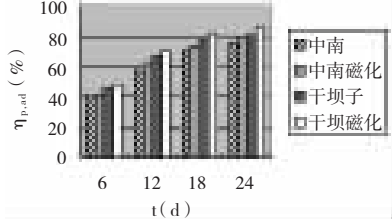


图 9-11 (b) 煤样 (120~200 目)
浸出脱除无机硫比较

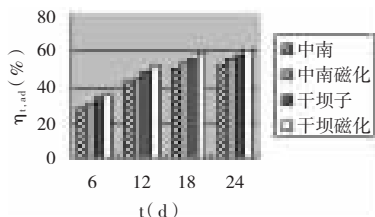


图 9-12 (a) 煤样 (~200 目)
浸出脱除全硫比较

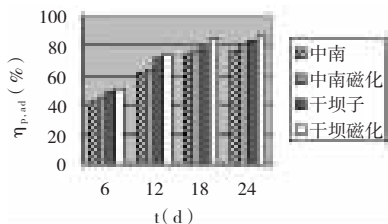


图 9-12 (b) 煤样 (~200 目)
浸出脱除无机硫比较

9.1.3 微生物 (T. f 菌) 浸出脱硫试验结果分析

由微生物氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对煤炭浸出脱硫试验结果可见, 随着浸出时间的增加, 浸出液的 pH 值降低, 表明氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对煤炭浸出脱硫是产酸的过程。从脱硫效果看, 该菌对煤样浸出 24 天, 煤样中无机硫 (黄铁矿硫) 脱除率达到: 74.98% ~86.16%, 全硫脱除率为: 51.98% ~61.30%, 有机硫脱除率 <19.00%。因此, 可以认为氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对煤中黄铁矿具有显著脱除作用, 而对煤中有机硫的脱除效果不佳。这与对该菌脱硫机理的分析及有关资料的报导是相一致的。

不同生长环境 (煤与非煤系) 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 采用不同的培育方式 (磁化与非磁化作用), 对不同煤样粒度和不同浸出时间的浸出脱硫效果存在一定差异, 主要表现为: (1) 煤系 T. f 菌 (干坝子) 脱硫效果 ($\eta_{p,ad} = 82.56\%$) 优于非煤系 T. f 菌 (中南) ($\eta_{p,ad} = 76.54\%$), 这应与该细菌的作用对象为煤炭中黄铁矿有关, 煤系 T. f 菌更易于适应煤中黄铁矿, 因此可缩短对黄铁矿脱除的作用时间。(2) 磁化培育下的 T. f 菌 (干坝子) 的浸出脱硫效果 ($\eta_{p,ad} = 86.16\%$) 优于非磁化培育下 T. f 菌 (干坝子) ($\eta_{p,ad} = 82.56\%$)。原因是磁化作用对氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 的生长有促进作用 (见第 5 章)。经磁化培育的氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 的代谢机能增强, 生长加快, 从而表现出相对较强的脱硫能力。

对同一种类型的氧化亚铁硫杆菌 (T. f), 在相同煤样粒度条件下, 浸出时间增加, 细菌与黄铁矿的作用时间增长, 无机硫 (黄铁矿硫) 脱除率提高。而在相同浸出作用时间的条件下, 不同粒度煤样中, 细粒级 (~200 目) 的脱除率高于中、粗粒级 (120 ~200 目、40 ~120 目)。根据第 2 章中对煤中黄铁矿的赋存状态及其解离程度的显微分析, ~200 目破碎级煤样 (红岩矿) 中黄铁矿的解离度大 95% 以上, 而 120 ~200 目黄铁矿解离度只有 85%、40 ~120 目黄铁矿的解离度为 65% 以下。煤中黄铁矿解离度越高, 细菌作用越充分, 试验结果表现为黄铁矿脱除率越高, 脱硫效果越显著。

9.1.4 煤炭生物浸出脱硫试验结果的 GM 预测

在利用氧化亚铁硫杆菌对煤炭进行浸出脱硫试验后, 我们采用灰色 GM 预测法对煤炭浸出脱硫率进行了预测计算。预测对象为磁化培育下, 煤系氧化亚铁硫杆菌 (V 中南 T. f 菌) 和非煤系氧化亚铁硫杆菌 (VI 干坝子 T. f 菌) 对煤样 (~200 目) 浸出脱硫效果的预测。预测原始数据如表 9-8。

表 9-8 T. f 菌 (磁化培育) 对煤样 (~200 目) 浸出脱硫率 η 的实测值

菌 种 \ 硫 分		浸 出 时 间			
		第 6 天	第 12 天	第 18 天	第 24 天
V 非煤系 (中南 T. f)	$\eta_{t, ad} \%$	29.45	43.98	53.17	56.05
	$\eta_{p, ad} \%$	43.47	63.99	76.18	80.65
VI 煤系 (干坝子 T. f)	$\eta_{t, ad} \%$	35.04	51.29	59.48	61.30
	$\eta_{p, ad} \%$	50.67	74.33	84.10	86.16

(1) 数据序列累加生成

原始序列为：

$$\begin{aligned} x_{t, \#}^{(0)} &= \{x_{t, \#}^{(0)}(1), x_{t, \#}^{(0)}(2), x_{t, \#}^{(0)}(3), x_{t, \#}^{(0)}(4)\} \\ &= \{29.45, 43.98, 53.17, 56.05\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} x_{p, \#}^{(0)} &= \{x_{p, \#}^{(0)}(1), x_{p, \#}^{(0)}(2), x_{p, \#}^{(0)}(3), x_{p, \#}^{(0)}(4)\} \\ &= \{43.47, 63.99, 76.18, 80.65\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} x_{t, \#}^{(0)} &= \{x_{t, \#}^{(0)}(1), x_{t, \#}^{(0)}(2), x_{t, \#}^{(0)}(3), x_{t, \#}^{(0)}(4)\} \\ &= \{35.04, 51.29, 59.48, 61.30\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} x_{p, \#}^{(0)} &= \{x_{p, \#}^{(0)}(1), x_{p, \#}^{(0)}(2), x_{p, \#}^{(0)}(3), x_{p, \#}^{(0)}(4)\} \\ &= \{50.67, 74.33, 84.10, 86.16\} \end{aligned}$$

一次累加生成数列为 $x^{(1)} = \{x^{(1)}(1), x^{(1)}(2), \dots, x^{(1)}(n)\}$ 其中：

$$x^{(1)}(k) = \sum_{i=1}^k x^{(0)}(i) = x^{(1)}(k-1) + x^{(0)} \quad (k = 1, 2, \dots, n)$$

$$x_{t, \#}^{(1)} \{29.45, 73.43, 126.6, 182.65\}$$

$$x_{p, \#}^{(1)} \{43.47, 107.46, 183.64, 264.29\}$$

$$x_{t, \#}^{(1)} \{35.04, 86.33, 145.81, 207.11\}$$

$$x_{p, \#}^{(1)} \{50.67, 125.00, 209.10, 295.26\}$$

(2) GM(1, 1) 预测模型的建立

根据以上原始序列 $x^{(0)}$ 及累加生成数列 $x^{(1)}$

$$x^{(0)} = \{x^{(0)}(1), x^{(0)}(2), \dots, x^{(0)}(n)\}; x^{(1)} = \{x^{(1)}(1), x^{(1)}(2), \dots, x^{(1)}(n)\}$$

建立微分方程：

$$dx^{(1)}(t)/dt + ax^{(1)}(t) = u$$

式中， a ， u 为模型待定参数，可根据最小二乘法来确定。

$$a = [a, \mu]^T = (B^T B)^{-1} B^T Y_N$$

式中，

$$Y_N = [x^{(0)}(2) \ x^{(0)}(3) \ ,..... \ x^{(0)}(n)]^T$$

$$a_{p,\mp} = [a_{\mu}]^T = [-0.0714 \quad 69.460]$$
$$x^{(1)}(k+1) = (x^{(0)}(1) - u/a) e^{-ak} + u/a$$
$$x_{n \mp}^{(1)}(k+1) = (x^{(0)}(1) - u/a)e^{-ak} + u/a = 1023.5e^{0.0714k} - 972.82$$
$$x^{(0)}(k+1) = x^{(1)}(k+1) - x^{(1)}(k)$$
$$x_{p \mp}^{(0)} = x_{p \mp}^{(1)}(k + 1) - x_{p \mp}^{(1)} = 1023.5[e^{0.0714k} - e^{0.0714(k-1)}]$$

根据预测模型进行计算，得到原始序列模型值为：

$$x^{(0)} = \{x^{(0)}(1) \ x^{(0)}(2) \ \dots \ x^{(0)}(n)\}$$

$$x_{t,\#}^{(0)} = \{30.86 \ , 45.72 \ , 50.98 \ , 56.64\}$$

$$x_{p,\#}^{(0)} = \{41.97 \ , 68.38 \ , 74.08 \ , 81.92\}$$

$$x_{t,\mp}^{(0)} = \{38.17 \ , 52.28 \ , 57.56 \ , 62.26\}$$

$$x_{p,\mp}^{(0)} = \{50.62 \ , 75.74 \ , 81.88 \ , 86.99\}$$

残差序列 e 为 : $e = \{e(1) \ e(2) \ \dots \ e(n)\}$

其中 $e(k) = x^{(0)}(k) - \bar{x}^{(0)}(k) \quad (k = 1 \ 2 \ \dots \ n)$

$$x_{t,\#}^{(0)} = \{29.45 \ , 43.98 \ , 53.17 \ , 56.05\} \quad \bar{x}_{t,\#}^{(0)} = 45.66$$

$$x_{p,\#}^{(0)} = \{43.47 \ , 66.99 \ , 76.18 \ , 80.65\} \quad \bar{x}_{p,\#}^{(0)} = 66.82$$

$$x_{t,\mp}^{(0)} = \{35.04 \ , 51.29 \ , 59.48 \ , 61.30\} \quad \bar{x}_{t,\mp}^{(0)} = 51.78$$

$$x_{p,\mp}^{(0)} = \{50.67 \ , 74.33 \ , 84.10 \ , 86.16\} \quad \bar{x}_{p,\mp}^{(0)} = 73.82$$

$$\text{所以 } e_{t,\#}^{(0)} = \{-1.41 \ , -1.74 \ , 2.19 \ , -0.59\} \quad \bar{e}_{t,\#}^{(0)} = -0.388$$

$$e_{p,\#}^{(0)} = \{1.50 \ , -1.39 \ , 2.10 \ , -1.27\} \quad \bar{e}_{p,\#}^{(0)} = -0.235$$

$$e_{t,\mp}^{(0)} = \{-3.13 \ , -0.99 \ , 1.92 \ , -0.96\} \quad \bar{e}_{t,\mp}^{(0)} = -0.790$$

$$e_{p,\mp}^{(0)} = \{0.05 \ , -1.41 \ , 2.22 \ , -0.83\} \quad \bar{e}_{p,\mp}^{(0)} = 0.0075$$

记原始序列 $x^{(0)}$ 与残差序列 e 的方差分别为 S_1^2 S_2^2 即有 :

$$S_1^2 = (1/n) \sum_{k=1}^n [x^{(0)}(k) - \bar{x}^{(0)}]^2 \quad \text{其中 } \bar{x}^{(0)} = (1/n) \sum_{k=1}^n x^{(0)}(k)$$

$$S_{1(t,\#)}^2 = [16.21^2 + 1.68^2 + 7.51^2 + 10.39^2] / 4 = 107.48 \quad S_{1(t,\#)} = 10.36$$

$$S_{1(p,\#)}^2 = [23.35^2 + 0.17^2 + 9.36^2 + 13.83^2] / 4 = 206.03 \quad S_{1(p,\#)} = 14.35$$

$$S_{1(t,\mp)}^2 = [16.74^2 + 0.49^2 + 7.70^2 + 9.52^2] / 4 = 107.60 \quad S_{1(t,\mp)} = 10.37$$

$$S_{1(p,\mp)}^2 = [23.15^2 + 0.51^2 + 10.28^2 + 12.34^2] / 4 = 198.53 \quad S_{1(p,\mp)} = 14.09$$

$$S_2^2 = (1/n) \sum_{k=1}^n [e(k) - \bar{e}]^2 \quad \text{其中 } \bar{e} = (1/n) \sum_{k=1}^n e(k)$$

$$S_{2(t,\#)}^2 = [1.022^2 + 1.352^2 + 2.578^2 + 0.202^2] / 4 = 2.3898 \quad S_{2(t,\#)} = 1.546$$

$$S_{2(p,\#)}^2 = [1.735^2 + 1.155^2 + 2.335^2 + 1.035^2] / 4 = 2.7169 \quad S_{2(p,\#)} = 1.648$$

$$S_{2(t,\mp)}^2 = [2.340^2 + 0.200^2 + 2.710^2 + 0.170^2] / 4 = 3.2222 \quad S_{2(t,\mp)} = 1.795$$

$$S_{2(p,\mp)}^2 = [0.058^2 + 1.402^2 + 2.228^2 + 0.822^2] / 4 = 1.9022 \quad S_{2(p,\mp)} = 1.379$$

后验差比值 : $C = S_2 / S_1$, 小误差频率 : $P = \{ |e(k)| - \bar{e} < 0.6744 S_1 \}$

$$C_{t,中} = S_{2(t,中)} / S_{1(t,中)} = 0.149 < 0.35 \quad P_{t,中} = \{e(k) - \bar{e} \mid < 0.6744S_{1(t,中)}\} = 1 > 0.95$$
$$C_{p,中} = S_{2(p,中)} / S_{1(p,中)} = 0.115 < 0.35 \quad P_{p,中} = \{e(k) - \bar{e} \mid < 0.6744S_{1(p,中)}\} = 1 > 0.95$$
$$C_{t,干} = S_{2(t,干)} / S_{1(t,干)} = 0.173 < 0.35 \quad P_{t,干} = \{e(k) - \bar{e} \mid < 0.6744S_{1(t,干)}\} = 1 > 0.95$$
$$C_{p,干} = S_{2(p,干)} / S_{1(p,干)} = 0.098 < 0.35 \quad P_{p,干} = \{e(k) - \bar{e} \mid < 0.6744S_{1(p,干)}\} = 1 > 0.95$$

根据检验计算结果，GM 预测模型的精度为一级。

(4) GM 模型预测计算结果（表 9-9）

表 9-9 T. f 菌对煤样（~200 目）浸出脱硫率 η 的预测值计算

时间（天） 菌种 硫分		6		12		18		24		30
		实测	计算	实测	计算	实测	计算	实测	计算	预测
V 非煤系 (中南 T. f)	$\eta_{t,ad} \%$	29.45	40.86	43.98	45.72	53.17	50.98	56.05	56.64	62.98
	$\eta_{p,ad} \%$	43.47	61.97	66.99	68.38	76.18	74.08	80.65	81.92	89.55
VI 煤系 (干坝子 T. f)	$\eta_{t,ad} \%$	35.04	48.17	51.29	52.28	59.48	57.56	61.30	62.26	67.86
	$\eta_{p,ad} \%$	50.67	70.62	74.33	75.74	84.10	81.88	86.16	86.99	93.84

9.2 脱硫微生物（M. phlei 菌）选择性絮凝脱硫的试验研究

9.2.1 试验方案的选择与试验条件的确定

采用正交试验方法设计试验方案。考察因素包括：煤样粒度 A、菌液用量 B、预接触时间 C。其他试验条件：菌液采用 M. phlei 菌 5 天的液体培养物，经离心沉淀后分离提取；煤浆浓度为 20g/L；絮凝时间为 8min。试验因素及水平如表 9-10 所示。

表 9-10 试验因素及水平

因 素	水 平		
	1	2	3
煤样粒度 A（目）	40 ~ 120	120 ~ 200	~ 200
菌液用量 B（ml）	20	40	60
预接触时间 C（秒）	0	15	30

正交试验表头设计采用 $L_9(3^4)$ 。表头设计时预留空白列，以空白列的效应做试验误差估计。试验暂不考虑各因素间的交互作用。

9.2.2 微生物（M. phlei）选择性絮凝脱除煤中黄铁矿的试验

试验步骤：首先将试样放入 500ml 量筒，加入清水，盖上量筒口，上下倒置，直至煤样在水中充分分散，配成一定浓度的煤浆。再抽取一定量菌液注入盛有煤浆的量筒内，立即盖上量筒口，上下倒置进行预接触，使细菌与煤粒充分混合接触。静置，测定煤炭絮凝

时间。最后将絮凝物取样，真空抽滤，干燥，并测定其硫分。每组试验重复一次，取其平均值作为最终结果。

草分枝杆菌（*M phlei*）絮凝试验结果见表 9－11、表 9－12。其中，脱硫率按下式计算：

$$\eta = [(S^{(1)} - S^{(2)}) / S^{(1)}] \times 100\%$$

式中， η ——脱硫率，%；
 $S^{(1)}$ 、 $S^{(2)}$ ——分别为絮凝前后煤样中黄铁矿硫 $S_{p,ad}$ 或有机硫 $S_{o,ad}$ 的含量，%。

9. 2. 3 微生物选择性絮凝脱硫试验结果计算与分析

表 9－11 微生物（*M phlei*）选择性絮凝试验结果与计算

试验序号 指 标	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$S_{t,ad}\%$	1. 704	1. 653	1. 606	1. 418	1. 402	1. 349	1. 350	1. 368	1. 408
$S_{p,ad}\%$	0. 708	0. 679	0. 602	0. 594	0. 589	0. 553	0. 561	0. 577	0. 532
$S_{o,ad}\%$	0. 996	0. 974	1. 004	0. 824	0. 813	0. 796	0. 789	0. 791	0. 876
$\eta_{FeS_2}\%$	65. 81	67. 20	70. 92	70. 17	70. 42	72. 23	71. 14	70. 32	72. 63
$\eta_o\%$	10. 11	12. 09	9. 39	12. 80	13. 97	15. 77	18. 91	18. 71	9. 97

表 9－12 草分枝杆菌（*M phlei*）絮凝试验结果计算

因 素	A	B	C	D	η_{FeS_2} %
试验号	1	2	3	4	
1	1	1	1	1	65. 81
2	1	2	2	2	67. 20
3	1	3	3	3	70. 92
4	2	1	2	3	70. 17
5	2	2	3	1	70. 42
6	2	3	1	2	72. 23
7	3	1	3	2	71. 14
8	3	2	1	3	70. 32
9	3	3	2	1	72. 63
$K_{1j, (FeS_2)}$	203. 93	207. 12	208. 36	208. 86	
$K_{2j, (FeS_2)}$	212. 82	207. 94	210. 00	210. 57	
$K_{3j, (FeS_2)}$	214. 09	215. 78	212. 48	211. 41	
R	10. 16	8. 66	4. 12	2. 55	

由正交试验结果可知，草分枝杆菌（*M phlei*）对煤中黄铁矿（ FeS_2 ）的脱除效果明显，脱除率最高达到 72. 63%，而对煤中有机硫的脱除率较低，脱除率最高只有 18. 91%。极差 R 计算结果表明，在选定的试验条件下，各因素对高硫煤中黄铁矿（ FeS_2 ）脱除影响的主次顺序依次为：A>B>C，即：煤样粒度>菌液用量>预接触时间。各因素的最优水平分别为：A₃、B₃、C₃。

试验结果方差分析：

(1) 计算总偏差平方 SS_T 和自由度 f_T

$$SS_T = \sum_{i=1}^N (\eta_i - \bar{\eta})^2 = \sum_{i=1}^N \eta_i^2 - \frac{1}{N} \left[\sum_{i=1}^N \eta_i \right]^2 = W - P = 39.262 ; f_T = N - 1 = 9 - 1 = 8$$

式中， η_i ——第 i 次试验黄铁矿脱除率， $i = 1, 2, \dots, N$ ；

K_{ij} ——第 j 列中第 i 水平下各次试验的 η_i 之和；

m_j ——第 j 列中的水平数；

n_j ——第 j 列中每个水平重复次数；

$\bar{\eta}$ ——各次试验黄铁矿脱除率 η_i 的总平均值。

(2) 计算各列的偏差平方 SS_j 和自由度 f_j

第 j 列偏差平方 SS_j

$$SS_j = n_j \sum_{i=1}^{m_j} (\overline{K_{ij}} - \bar{\eta})^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{m_j} K_{ij}^2 - \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N \eta_i \right)^2 = Q_j - P$$

$SS_A = Q_A - P = 20.430 ; SS_B = Q_B - P = 15.237 ; SS_C = Q_C - P = 2.869 ;$

$f_j = m_j - 1 ; f_A = f_B = f_C = 2$

(3) 计算误差的偏差平方 SS_e 及自由度 f_e

$SS_e = SS_T - \sum SS_j = 0.726 ; f_e = f_T - \sum f_j = 2$

(4) 计算各项偏差的均方值 S_j

$S_j = SS_j / f_j ; S_A = 10.215 ; S_B = 7.619 ; S_C = 1.435$

$S_e = SS_e / f_e = 0.363$

(5) 差异显著性检验（F 检验法）

$F_j = S_j / S_e$

试验结果的方差分析见表 9-13。

表 9-13 试验数据方差分析表

变差来源	变差平方和 SS_j	自由度 df	偏差均方值 S_j	方差比 F
A	20.430	2	10.215	28.14
B	15.237	2	7.619	20.99
C	2.869	2	1.435	3.95
D（误差 e）	0.726	2	0.363	
总和	39.262	8		

查 F 分布表， $F_{0.05(2, 2)} = 19.0$ ，结果表明：在所确定的试验条件下，煤样粒度、菌液用量对煤炭中黄铁矿的脱除有显著影响，预接触时间的影响相比较不显著。

10 煤炭脱硫微生物脱硫机理的研究

10.1 微生物在矿物表面的吸附

10.1.1 微生物吸附现象、类型及作用机理

(1) 吸附现象

吸附属于界面现象，它是物质从容积相中向相界面上浓集的一种现象^{[155][156][157]}。微生物在地球生物圈中具有分布广、数目多、个体小、比表面大等特点，而吸附是微生物生命活动的基本特征。微生物可以通过各种途径和方式吸附在不同的界面上。当微生物在矿物表面发生吸附时，它可以以其自身的性质或作用影响和改变矿物表面的物理化学性质，如疏水性、电性及矿物表面元素的氧化还原和矿物的溶解和沉淀等行为。因此，我们就可以利用不同类型和性状的微生物，在不同条件下对不同矿物吸附性质及吸附量的差异，使微生物起到氧（催）化剂或絮凝（凝聚）剂的作用，实现对矿物生物浸出和生物絮凝等目的。

由于微生物不像几何形状一定、分子组成明确的物质（如球体等），它不具有简单的几何形状，也没有简单、均匀的分子组成，有时还可能改变外形，同时细胞内发生的生化反应可以改变其表面组成及性质。因此微生物是一个形体不规则，动态变化的开放系统。研究这种复杂体系的吸附行为时，一般是将微生物视为离散的、表面存在生物大分子的胶体颗粒。因此微生物在界面上的吸附应属于胶体表面化学的研究范畴。

(2) 微生物吸附类型及特点

微生物在固体（矿物）表面上吸附可以通过直接接触，也可以通过间接接触发生。由代谢产物的桥联作用形成的吸附属于间接接触吸附。根据微生物在吸附过程中的选择性和强弱的不同，可将其吸附分为以下三种类型^[158]：

①特性永久吸附。或称为专性永久吸附。此类吸附发生在特殊表面之间，微生物对所吸附的表面具有选择性或专一性，且吸附很牢固。

②非特性永久吸附。某些细菌对所吸附的表面无选择性，但是吸附的比较牢固。

③非特性非永久吸附。发生这类吸附的微生物与矿物表面之间既无选择性，且相互作用较弱，容易脱附。

目前，对微生物在固体（矿物）表面吸附过程较为统一的看法是：首先，微生物在物理力作用下向固体表面靠近，达到一定距离并产生非特性吸附。然后，若微生物能与某种固体表面之间发生化学作用，则有可能在其上形成特性永久性吸附。

产生非特性吸附的物理力包括流体作用力、库仑力和范德华力等等。形成非特性吸附时微生物与固体表面间的距离只有几个 nm，在此距离以外是长程物理力起作用，而在此距离以内是短程力起作用。短程力主要包括短程斥力和短程引力。由相互吸附的物体之间接近到一定距离后，表面质点的电子相互排斥的电子云斥力，即为短程排斥力。若微生物

与矿物表面通过化学作用产生特性吸附, 吸附表面质点间的共价键、配位键、离子键和氢键力等均属于很强的短程吸引力。长程力主要包括有范德华作用力、静电作用力、位阻效应力和由吸附表面疏水性引起的疏水作用力, 以及偶极和磁化作用力等^[155]。长程力产生非特性吸附后并非一定导致特性吸附的产生, 但它可以为产生特性吸附创造必要的空间和时间等条件。

(3) 微生物吸附作用机理

①生物胶体 DLVO 理论

微生物(细菌)是一种生命物质, 按其程度可视为生物胶体^[160]。一般来说, 微生物表面既带有正电荷又带有负电荷。然而大多数微生物倾向有一个酸性等电点(IEP)。原因是大多数微生物表面通常所带的是阴离子基因, 如羧酸基团等。这样在非酸性 pH 值的条件下, 大多数微生物在水溶液中将呈负电性, 只有少数几种亲烷基的微生物可能具有电中性, 甚至是碱性的等电点。

根据 DLVO 理论, 处于分散体系中胶体粒子间的相互作用总势能 V_T 主要是由双电层间的静电相互作用能 V_e 和范德华作用能 V_a 构成的。即:

$$V_T = V_e + V_a \quad (10-1)$$

当带电的生物胶体细菌粒子与矿物粒子靠近时, 粒子间相互作用力 $F(h)$ 与作用势能 V 之间存在如下关系:

$$F(h) = dV/dh \quad (10-2)$$

其中, h 为两粒子间的距离。

对于一个半径为 R 的微生物粒子, 当 $h < R$ 时, 范德华作用能 V_a 及作用力 F_a 则可按式计算:

$$V_a = -A \times R / 12h \quad (10-3)$$

$$F_a = A \times R / 12h^2 \quad (10-4)$$

其中, A 为复合哈马克(Hamaker)常数。它是由细菌颗粒、(固体)矿粒及介质三者的哈马克常数确定。多数固体或液体的哈马克常数介于 $(0.4 \sim 4) \times 10^{-19} \text{ J}$ 之间。在水介质中 $A > 0$, $V_a < 0$, 范德华力为斥力。

计算细菌粒子与固体粒子(矿粒)之间的双电层间的静电作用能 V_e 时, 可通过下式的计算得出。

设细菌和矿粒的半径分别为 r_1 和 r_2 , 表面电势为 φ_1 和 φ_2 。当其表面间的距离为 h 时, 两个颗粒间的静电排斥能为:

$$V_e = r_1 r_2 \varepsilon / 4 (r_1 r_2) \{ [2\varphi_1 \varphi_2 / (\varphi_1^2 + \varphi_2^2)] \ln [(1 + \exp(-kh)) / (1 - \exp(-kh))] + \ln [1 - \exp(-2kh)] \} \quad (10-5)$$

式中, ε 为介质的介电常数; K 为德拜·休克尔(Debye-Huckel)参数; φ_1 和 φ_2 在实践中常用 ζ 电位作为其估计值。 ζ 电位可由电泳实验经换算得到。大部分细菌表面的 ζ 电位小于 50mv。

发生相互作用的细菌与矿粒表面具有不同的化学(电)性质, 因此它们属于异相作

用体系。异类粒子的双电层静电作用势能 V_e 与粒子间距离的关系如图 (10-1) 所示。若 ϕ_1 和 ϕ_2 符号相反 (曲线 4), 或某个粒子的表面电位为零 (曲线 3), 则粒子间的相互作用为引力。若 ϕ_1 和 ϕ_2 符号相同而数值大小不等, 则在两者距离较大时表现为斥力, 当粒子接近达到一定距离时, 势能又表现为引力 (曲线 2)。曲线 1 表示的是粒子表面电荷 (电位) 符号和数量相同的同类粒子的同相作用体系, 其静电势能恒为斥力。

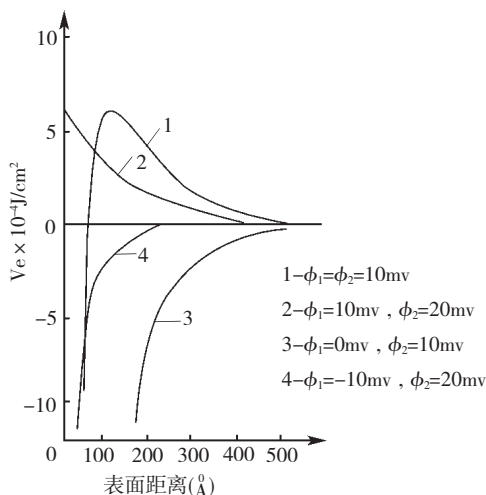


图 10-1 异质粒子 (细菌与矿粒) 双电层相互作用电势能 V_e 与粒子表面距离的关系

根据 V_a 和 V_e 表达式, 绘出的总作用势能 V_T 曲线, 就可以对给定的细菌与固体 (矿粒) 的吸附过程进行分析和估计。

②微生物对矿物表面的特性吸附

微生物能对某些矿物表面产生特性吸附, 这是因为该矿物表面往往包含有微生物生长所需要的营养及能源物质。如 *T. f* 菌在 FeS_2 表面的吸附就是因为黄铁矿中的 Fe^{2+} 、S 都是 *T. f* 菌的营养源, 由于摄取营养的需要, *T. f* 菌外膜上的某些特殊基因, 如羟基 (-OH)、羧基 (-COOH)、巯基 (-SH) 等对硫化矿表面具有强烈的键合作用, 使 *T. f* 菌能强烈吸附于黄铁矿表面。Murr L. E 等^[163] (1976)、Ohmura, N 等^[164] (1993) 都认为 *T. f* 菌能选择性吸附到黄铁矿表面。李秀艳等^[165] (2000) 进一步认为 *T. f* 菌在矿物颗粒表面上的吸附是分三个阶段进行的, 即吸附量增加阶段、稳定吸附阶段和解吸附阶段, 并认为细菌吸附是细菌直接氧化作用的前提。

DLVO 理论属于长程力理论, 只能解释相互作用的颗粒相距 2nm 以外的行为。细菌在固体表面上的特性吸附是短程立体化学力作用的结果。因此, 欲阐明细菌在固体表面的特性吸附机理, 需了解细菌表面的立体化学性质与结构, 如表面有机分子的拓扑结构、有机官能团的类型及空间分布等。细菌按革兰氏染色特性可分为革兰氏阴性菌 (G^-) 和阳性菌 (G^+) 两类。 G^+ 菌的细胞壁结构比较简单, G^- 菌的细胞壁结构相对复杂。它们共同的特点是细胞壁表面存在过剩的羧基和磷酸基团, 且带负电。然而以目前的技术尚无法获得细菌表面聚合物的拓扑结构和表面分子基团的详细分布, 因此决定了对于细菌表面基团作用的描述只能采取宏观平均的方法, 对细菌与固体表面之间的作用方式及作用强度等进行定性的分析和推断。

③微生物细胞表面分子及胞外聚合物的桥联吸附

Smith R. W 等^[166] (1992)、邓述波等^[147] (1998) 认为细菌表面生物大分子及胞外聚合物是某些吸附产生的物质基础, 这些物质与颗粒表面之间相互作用, 从而导致吸附的发生。研究发现具有这种吸附功能的微生物表面含有大量的粘多糖、蛋白质、脂类、糖蛋白、纤维素、核酸及离子化的葡聚糖和胞核酸等物质, 这些物质和吸附有着密切的关系。此外, 细胞外物质除了上述高分子聚合物外, 还有细菌生长过程中排泄的聚合物。细菌在加速生长期主要排泄的是低分子聚合物, 而在内源呼吸期主要排泄的是高分子聚合物, 这些物质可以在颗粒之间发生桥联吸附。Forster 指出, 当细胞外物质为酸性时, 离子键合是主要的吸附形式, 当胞外物质为中性时, 氢键结合是主要吸附方式。Tenney、Busch 提出了胞外高分子聚合物“架桥”吸附絮凝模型。根据这种理论, 生物高分子聚合物通过桥联(架桥)作用, 在微生物细胞与矿物颗粒之间以离子键结合而促使吸附絮凝的发生。Lyons 和 Hough 指出吸附絮凝是由于细胞壁上磷酸二酯的搭桥作用, 也有人认为这种搭桥作用是羧基^{[167][168]}。

由生物大分子桥联作用产生的吸附不能用传统的 DLVO 理论来解释。已有的研究表明, 有些特性永久吸附都起因于生物大分子的桥联作用。

10.1.2 微生物吸附过程动力学

微生物吸附动力学模型是依据细菌的吸附作用建立的。Konishi Y 等^[170] (1990) 在研究细菌 (T. f) 浸出黄铁矿时, 认为微生物吸附到矿物表面是以 Langmuir 等温吸附模型的方式实现的, 即:

$$X_A = X_{AM} K X_L / (1 + K X_L) \quad (10-6)$$

式中, X_A ——在固相表面附着的细菌量, 个/g;

X_{AM} ——达到平衡时的固相附着细菌量, 个/g;

K ——附着平衡常数;

X_L ——在液相游离的细菌量, 个/g。

常志东等^[171] (1997) 对 T. f 菌在三种不同粒级硫铁矿和含铜硫铁矿上吸附进行了测定, 并对细菌附着实验数据, 采用 Langmuir 等温吸附方程进行拟合 (图 10-2a、b)。

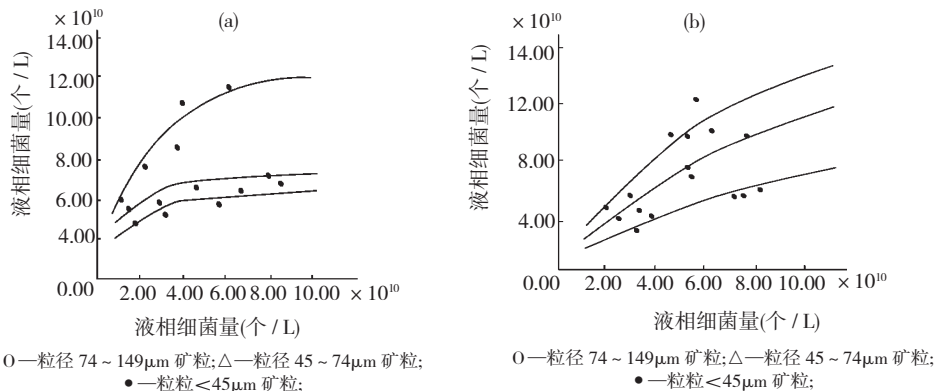


图 10-2 T. f 菌在三种不同粒级硫铁矿上 (a) 和含铜硫铁矿上 (b) 的附着曲线

结果表明, T. f 菌在硫铁矿或含铜硫铁矿上的附着可用 Langmuir 方程的形式描述。其研究还表明, 等温时随着总细菌量增大, 在固相上附着的细菌量逐渐趋于—稳定值。当达到吸附平衡时, 固相附着细菌量达到最大值, 此后增大总细菌量, 主要表现在液相游离的细菌量增大。另外, 随矿物粒径减小, 比表面增加, 固相附着细菌量增大, 平衡时固相附着细菌量也随之增大。

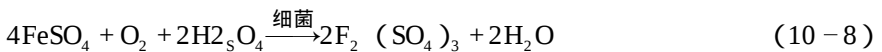
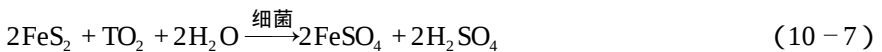
王军等^[160] (1996) 通过对细菌 (T. f) 在黄铁矿表面的吸附研究, 认为其吸附行为也服从 Langmuir 方程, 当平衡细菌浓度为 2.5×10^{10} 个/ml (对应初始细菌浓度 2.9×10^9 个/ml), 细菌达到饱和吸附, 饱和吸附密度 $\Gamma = 4.0 \times 10^{10} / \text{g}_{\text{FeS}_2}$, 饱和吸附时为 34.5% 单菌体层覆盖。

Langmuir 吸附模型假定细菌在矿物表面的吸附是由吸附细菌浓度与矿物表面可利用的有效吸附位点决定的, 而忽略了矿物裂缝等产生的内部表面积, 忽略了微生物的生长与氧化还原电位及二价铁浓度的关系, 也未考虑高铁的化学浸出作用。因此得出的结果有一定的近似性。王军等研究也认为 T. f 菌在黄铁矿表面的饱和吸附时为 34.5% 单菌体层覆盖。但考虑到比表面积测定时表面细微粗糙的影响等, 实际细菌覆盖率应大于比值。

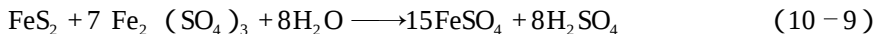
10.2 微生物 (T. f 菌) 在黄铁矿表面的氧化机理

10.2.1 黄铁矿 (FeS_2) 表面 T. f 菌氧化的类型及机理

细菌 (T. f) 对硫化矿的作用通常被分为三种: 直接氧化作用、间接氧化作用和联合作用。其中直接氧化就是指微生物 (细菌) 附着在矿粒表面上与矿粒表面的硫化矿直接发生作用, 使矿物氧化溶解。以 T. f 菌为例, 在有 O_2 和 H_2O 存在的情况下, 对黄铁矿会有如下反应:



间接氧化作用是指矿物 (FeS_2) 在细菌 (T. f) 代谢过程中所产生的硫酸高铁和硫酸作用下发生的化学溶解作用, 反应如下:



反应所生成的硫酸亚铁又被细菌氧化成硫酸铁 (Fe^{3+}), 形成新的氧化剂, 从而使间接氧化作用不断进行下去。

所谓联合作用, 其实是指细菌直接氧化作用和间接化学氧化作用共同存在的情况。Pogliani C. 等^[172] (1990) 曾设计过一个试验来研究细菌的作用方式, 他们采用在培养基中加铁和不加铁, 用细菌无法穿过的半透膜包裹矿样或者不包裹矿样, 接种或不接种细菌几种条件进行交叉试验, 最终证明了细菌的直接作用和间接作用同时存在, 且都起着重要作用。

大多数研究都既考虑吸附细菌的直接作用, 又考虑溶液的间接作用。Y. cheachang 和

A. Myerson^[173] (1982) 在研究细菌浸出黄铁矿的模型时, 就同时考虑了吸附细菌作用和溶液中的细菌的作用。S. Asai 等^[174] (1992) 在研究黄铁矿的分批浸出时, 也同时考虑了吸附细菌和游离细菌的作用, 并认为吸附细菌是起主要作用的。常志东等^[171] (1997) 采用与 S. Asai 类似的方法对硫铁矿和含铜硫铁矿的细菌浸出动力学进行了研究, 发现硫铁矿的浸出主要是因为细菌 (T. f) 对矿物表面的直接作用, 而含铜硫铁矿的浸出主要是细菌氧化 Fe^{2+} 产生的 Fe^{3+} 的间接氧化作用的结果。由此可见, 实际情况下直接作用和间接作用往往是同时存在的, 不过有时以直接作用为主, 有时又以间接作用为主。

无论直接作用还是间接作用, 都会发生由细菌作用导致的二价铁的氧化。目前对这种氧化的机理还未完全搞清楚, 但是可以确定细胞色素 (Cytochrome) 在电子由二价铁递送到氧的过程中起着很重要作用。 Fe^{2+} 的氧化可以分为以下两个半反应:



这两个反应分别在细胞的两个位置上进行, 其中第一步是与细胞外膜或周质区相联系的, 第二步与细胞内膜相联系。 $\text{Fe} - \text{cytc}$ 氧化还原酶的反应机理被称为乒乓规则, 如图 10-3 所示。

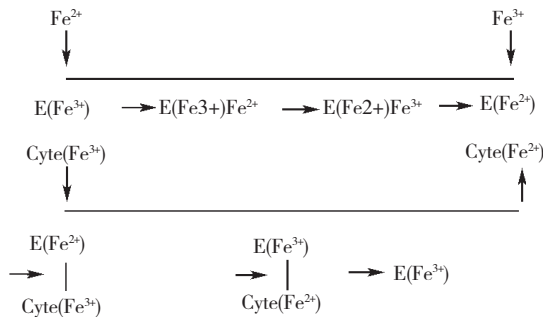


图 10-3 $\text{Fe} - \text{cytc}$ 氧化还原酶的反应机理

10.2.2 微生物 (T. f 菌) 铁氧化生长动力学

在对细菌 (T. f) 氧化机理的研究中, 有关细菌 (T. f) 氧化动力学的研究引起人们的广泛关注^{[169], [171~176]}。其内容主要有细菌生长底物 (Fe^{2+} 及 FeS_2 等) 氧化动力学和细菌生长动力学, 其中细菌生长的比生长速率是细菌生长模型的关键参数。

1916 年, Stator 提出了细菌的比生长速率 μ 的概念, 描述细菌细胞生长速率与细胞数目关系的比例系数, 即:

$$d\rho_b/dt = \mu\rho_b \quad (10-12)$$

式中, μ 为细菌细胞的比生长速率, h^{-1} ; ρ_b 为细菌细胞浓度, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; t 为时间, h 。

一般情况下, μ 不是常数, 当细菌处于生长最旺盛的对数期时, μ 达到最大值 $\mu_{\max}$ 。Lawson 和 Lacey^[177] (1970) 根据 T. f 菌摇瓶试验的结果, 在未考虑任何外界影响因素的情况下, 建立了理想状态下氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 氧化二价铁的生长模型, 即以二价铁

离子 (Fe^{2+}) 作为限制性营养物质的 Monod 方程：

$$\mu = \mu_m \rho / (K_s + \rho) \quad (10-13)$$

式中, ρ 为限制性营养物二价铁离子浓度 (mol/L)；

K_s 为培养基动力学饱和常数 (mol/L)。

由上式可见, T. f 菌的生长速率与 Fe^{2+} 浓度成正比, 对底物二价铁的利用直接与细菌的生长得率相关。该模型认为氧化亚铁硫杆菌以 Fe^{2+} 为能源, 忽略了细菌细胞的消耗及维持所需的能源, 因此是一种细菌铁氧化的理想生长动力学模型, 与实际有一定偏差。

Jones 和 Kelly^[178] (1983) 研究了 Fe^{2+} 浓度和 Fe^{3+} 浓度, 即底物的促进与抑制作用和产物的竞争性抑制作用对 T. f 菌生长的影响动力学模型：

$$\mu = \mu_{\max} / (1 + K_s / [\text{Fe}^{2+}] + K_s [\text{Fe}^{3+}] / K_i [\text{Fe}^{3+}]) \quad (10-14)$$

式中, $[\text{Fe}^{2+}]$ 、 $[\text{Fe}^{3+}]$ 分别为二价、三价铁离子浓度 (mol/l)；

K_i 为三价铁离子浓度抑制常数 (mol/l)；

其他符号意义同前。

研究表明, 不同的铁离子浓度具有不同的反应常数 K_s , 在 $[\text{Fe}^{2+}] < 56 \text{g/L}$ 时, 细菌的生长与 Fe^{2+} 浓度成正比关系；反之, 细菌的生长并不随 Fe^{2+} 浓度的增加而增加, 而且 Fe^{2+} 浓度越高, 细菌的生长得率越低。高的 Fe^{3+} 浓度对细菌的生长有抑制作用。此外, 研究还表明 Fe^{2+} 并非全部用于 T. f 菌的生长, 有部分 Fe^{2+} 用于细胞的消耗及维持。

氧的浓度在微生物氧化浸出过程中是个关键的影响因素, 氧浓度的高低不仅影响浸矿菌种的生长代谢活动, 即菌的酶活性或菌数量, 而且影响 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 的速率, 尤其是氧浓度低时, 抑制菌的生长, 使其处于亚生长状态, 降低了浸矿细菌的氧化能力。Huberts 等^[179] (1994) 结合考虑 Fe^{2+} 氧化速率、 O_2 的消耗速率及细菌生长速率之间关系, 利用 Michaelis - Menten 动力学, 建立了以氧浓度和 $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ 为限制因子的细菌生长动力学模型：

$$r_{\text{Fe}^{2+}} = q_{\text{Fe}^{2+}}^{\max} / (1 + K_s / [\text{Fe}^{2+}] + K_s [\text{Fe}^{3+}] / K_i [\text{Fe}^{2+}]) (\text{O}_2) / (K_{\text{O}_2} + [\text{O}_2]) \quad (10-15)$$

式中, $r_{\text{Fe}^{2+}}$ 为二价铁的生长速率 ($\text{mol Fe}^{2+} / \text{L/h}$)；

$q_{\text{Fe}^{2+}}^{\max}$ 为二价铁细胞最大的比氧化速率 ($\text{mol O}_2 / \text{L}$)；

K_s 、 K_{O_2} 分别为培养基和氧浓度饱和常数 (mol/l)；

$[\text{Fe}^{2+}]$ 、 $[\text{Fe}^{3+}]$ 、 $[\text{O}_2]$ 分别为二价、三价铁离子及氧的浓度 (mol/l)；

K_i 为三价铁浓度抑制常数 (mol/l)。

在 T. f 菌氧化浸矿过程中, 温度的变化不仅决定着菌群中优势菌及菌数的变化规律, 而且会影响矿物的物理化学反应速率, 对 T. f 菌的酶活性也有很大影响。Nematic M 和 Webb C A^[180] (1997) 研究并建立了温度影响 Fe^{2+} 氧化的动力学模型：

$$q_{\text{Fe}^{2+}}^{\max} = K_0 C_X [\text{Fe}^{2+}] \exp (E_a / RT) / \{ K_M' (1 + C_X / K_i) + [\text{Fe}^{2+}] + (1 - C_X / \beta) ([\text{Fe}^{2+}]^2 / \alpha) \} \quad (10-16)$$

式中, $q_{\text{Fe}^{2+}}^{\max}$ 为二价铁细胞最大比氧化速率 ($\text{mol Fe}^{2+} / \text{mol c/h}$);

K_0 、 K'_m 、 K_i 、分别为最大生长速率常数 (mol/m/h)、饱和常数 (mol/m^3)

及三价铁浓度抑制常数 (mol/l);

C_X 、 $[\text{Fe}^{2+}]$ 分别为细胞浓度 (mol/l) 和二价铁浓度 (mol/l);

α 、 β 分别为二价铁浓度常数和细胞浓度常数;

E_a 为活化能 (KJ/mol);

T 为温度 (度)。

由以上模型计算, 在温度 20 ~ 35 之间, 随着温度增加, 细菌氧化 Fe^{2+} 的速率常数增加, 铁氧化速率也增加, 其中当温度 25 ~ 30 时, 细菌氧化 Fe^{2+} 的速率最快。

最近, Boon 和 Huberts 等^[179] (1998) 结合化学计量理论、电化学理论、微生物的 Monod 生长模型等, 建立了一种以氧化还原电位为参数的细菌铁氧化生长动力学模型:

$$r_{\text{Fe}^{2+}}^{\text{chem}} = q_{\text{Fe}^{2+}}^{\max} \times C_X / (1 + K [\text{Fe}^{3+}] / [\text{Fe}^{2+}]) \quad (10-17)$$

$$\xi_{\text{Fe}^{2+}} = \xi_{\text{Fe}^{2+}}^{\max} + B [\text{Fe}^{2+}] / [\text{Fe}^{3+}] \quad (10-18)$$

$$q_{\text{Fe}^{2+}} = K_0 \exp (E_a / RT) / (1 + K_{\text{Fe}^{2+}} [\text{Fe}^{3+}] / [\text{Fe}^{2+}]) \quad (10-19)$$

式中, $r_{\text{Fe}^{2+}}^{\text{chem}}$ 为 Fe^{2+} 的化学氧化速度 ($\text{mol Fe}^{2+} / \text{L/h}$);

$\xi_{\text{Fe}^{2+}}$ 、 $\xi_{\text{Fe}^{2+}}^{\max}$ 分别为比表面积和最大比表面积的二价铁生长速率
($\text{mol Fe}^{2+} / \text{m}^2 / \text{h}$);

$q_{\text{Fe}^{2+}}$ 为二价铁细菌最大比氧化速率;

B 为黄铁矿氧化动力学常数; 其他符号意义同前。

而氧化还原电位 E_h 与 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 之间的关系可以根据能斯特方程计算得到:

$$E_h = E^0 + (RT/zF) \ln ([\text{Fe}^{3+}] / [\text{Fe}^{2+}]) \quad (10-20)$$

通过此模型就可得到各物质的反应速率和细菌生长速率之间的比例关系及 $[\text{CO}_2]$ 、 $[\text{O}_2]$ 、温度、 $[\text{Fe}^{2+}]$ 、 $[\text{Fe}^{3+}]$ 和 E_h 变化对细菌氧化浸出速率和细菌生长速率的影响。

10.3 微生物 (M. phlei 菌) 选择性絮凝脱硫机理

10.3.1 微生物 (M. phlei 菌) 表面组成及性质对絮凝作用的影响

微生物 (M. phlei 菌) 表面组成及性质对絮凝作用的产生具有十分重要的影响, 而决定细菌表面性质的主要因素是细菌菌体表面的物质组成。对草分枝杆菌 (M. phlei) 的生物学研究表明 (第3章), M. phlei 菌属于革兰氏阳性菌 G^+ 。造成染色反应不同的主要原因是由于细菌细胞壁结构与化学组成上的差异。 G^+ 菌的细胞壁结构一般较致密, 肽聚糖层较厚, 含脂质较多, 细胞壁间隙小, 通透性低。 G^+ 菌的等电点的 pH 值为 2 ~ 3, 比 G^- 菌的等电点 pH 值 4 ~ 5 低。因此在非酸性 pH 值条件下, G^+ 菌不仅呈负电性, 而且在相同 pH 值条件下比 G^- 菌带负电荷数要多。另外, 由于其菌体表面富含大量羧基基团的分

枝菌酸及脂类等物质，因此 *M. phlei* 菌经抗酸染色表明其为抗酸性细菌。

细菌的细胞壁通常是由肽聚糖层、脂蛋白、外膜及脂多糖层构成。肽聚糖层决定着细胞壁的坚硬性，它是一种主要由 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸和少量氨基酸组成的短肽聚合而成的网状结构大分子化合物；脂蛋白层由脂质部分和蛋白质部分构成，它连接在肽聚糖和外膜之间使两者成为一体；外膜是典型的磷脂双层结构，磷脂中的非极性基互相吸引朝内排列，极性基互相排斥朝外排列。脂多糖层位于外膜上，处于细胞壁最外层，脂多糖由类脂 A、核心多糖和 O-特异侧链三个部分组成，但大量的成分是类脂 A。每个类脂 A 由 2 个 N-乙酰葡萄糖胺和 5 个长链脂肪酸组成。因此，*M. phlei* 菌的表面性质主要由脂多糖层的组成决定的。从对 *M. phlei* 菌红外光谱 (FTIR) 的分析结果 (4.3.3) 可见，*M. phlei* 菌表面含有环烷烃、脂环烃、芳香环等多种有机官能团和羰基、羟基及酚羟基等离子基团。表明了 *M. phlei* 菌表面不仅含有多种疏水性的非极性基团，而且还含有大量的离子化极性基团。非极性烃基使 *M. phlei* 菌表面高度疏水，而极性的羰基等离子化基团导致细菌表面负电性。*M. phlei* 菌表面所具有的较高疏水性和较强负电性是其产生絮凝作用的重要依据。

10.3.2 微生物 (*M. phlei* 菌) 对煤表面的疏水性絮凝以及电性中和机理

微生物能够对矿物产生絮凝作用，首先，生物分子要能在矿粒表面产生吸附。根据对 *M. phlei* 菌生物特性的研究，可以认为 *M. phlei* 菌是一种阴离子型有机高聚物分子。离子型高聚物分子的吸附模式多为桥联（架桥）吸附，高聚物的长烃链上带有若干活性基团，链越长，活性基团越多，则吸附桥联作用越强。

在水中黄铁矿表面亲水，而煤表面疏水，作为一种极性大分子，疏水性微生物 (*M. phlei* 菌) 在水中与同样疏水性煤粒表面之间存在着范德华力、静电力、氢键力和化学键力等。煤粒在水中通常带负电。因此当细菌表面的范德华力克服静电斥力与煤粒相互接近后，随着距离缩短，氢键力成为重要吸附力，促使 *M. phlei* 菌在煤粒表面吸附，并通过架桥而形成絮团。亲水的黄铁矿颗粒则不会被絮凝，分散于矿浆中被除去。

絮凝剂分子在水中的伸展状态会影响絮凝剂的絮凝效果。一般认为，絮凝剂分子如果呈无规则的线团状态，则不利于吸附架桥；若絮凝剂分子能充分伸展而呈现柔性线状，则有利于絮凝。*M. phlei* 菌表面带有负电基团，如羰基等能产生静电斥力，使其分子具有良好的伸展性。同时这些离子化极性基团还能使 *M. phlei* 具有良好的水溶性，从而有利于其在煤粒上发生吸附和絮凝作用。

Van Loosdrecht 等^[181] (1987) 研究并测定了某些细菌表面的荷电量和疏水性的一般范围。其中，*M. phlei* 菌具有较高的负电性和较强的疏水性（接触角为 $65^{\circ} \sim 70^{\circ}$ ），并认为如果生物体和固体表面的电荷及其疏水性作用有助于吸附的话，微生物体就会吸附在固体（矿物）表面。Smith R. W 和 Misra M 等^[182] (1991) 认为微生物及其衍生物（细胞分裂物和溶解物）作为矿物絮凝剂的前提是，微生物体本身或者衍生物在矿物表面产生吸附。他们还认为，用 DLVO 理论不能充分地解释这种吸附絮凝，因此，必须考虑疏水性作用对絮凝的影响。他们通过对两种不同煤样 (ILNo. 6 和 KYNo. 9) 的微生物絮凝试验研究，并经计算得出疏水性作用能量大约是化合作用能量的 3 倍^[183]，从而证明疏水性作用是絮凝发生的主要原因。

11 煤炭微生物脱硫的工艺实践

11.1 煤炭微生物脱硫技术的开发现状

11.1.1 国内外煤炭微生物脱硫技术的开发与应用研究

自从 1947 年美国的 Clomer A. R 和 Hiwkle M. E 发现并证实化能自养细菌 *Thiobacillus ferrooxidans* 能够促进氧化并溶解煤炭中存在的黄铁矿以来,对生物湿法冶金的理论和应用的研究获得较快发展。

1958 年美国用细菌浸出铜和 1966 年加拿大用细菌浸出铀的研究和工业应用成功之后,全世界有 20 多个国家相继开展了微生物选矿的研究。国外在煤炭微生物脱硫研究的许多方面都做了大量工作,其中包括对细菌与煤炭中黄铁矿相互作用的机理研究、能够用来脱硫的菌种及其对黄铁矿硫氧化能力的研究和细菌生长的动力学及细菌与黄铁矿相互作用的动力学的研究。

进入 20 世纪 80 年代,国外开始把微生物脱硫研究工作转向应用性研究和试验,美国矿务局与 PETC 合作对匹兹堡煤进行了两种堆沥试验,一是将 23 吨粒度 $< 5\text{cm}$ 的粗煤在室内沥滤,一年后大约 50% 黄铁矿硫被脱除;二是采用了两个 10 吨的粒度为 $6 \sim 18\text{mm}$ 的精煤,分别在室内和室外进行堆沥。结果表明,室内与室外无明显差异。1991 年,欧共体内的德国 Essen 的 Deutsche Montan Technologie (DMT)、意大利 Cagliari 大学采矿和矿物处理系、荷兰 Delft 技术大学和英国的试验室,在考察了生物法脱硫的可行性和限制因素后,在意大利的 Eni Chem Anic 煤矿开展了浸出法微生物脱硫的连续性中试研究。

与此同时,在欧共体资助下的一个干燥处理量为 50kg/h 的微生物脱黄铁矿中试装置在意大利托雷斯港建成,并于 1992 年 9 月开始试验。实验采用 T. f 菌作为煤炭脱硫菌,在分成两组的 6 个体积为 7.5m^3 的搅拌槽式生物反应器中,对粒度 $< 40\mu\text{m}$ 的煤料进行处理。试验煤浆的固体浓度范围是 $6.5\% \sim 41.5\%$,达到稳态的时间约为 10 天。在煤浆流速为 $6.94 \times 10^{-2}\text{dm}^3/\text{s}$ (250L/h) 时,在前 5 个反应器内脱除 90% 以上黄铁矿约为 6.254 天,相应于黄铁矿铁的溶解速率为 $36\text{mg}/\text{dm}^3 \cdot \text{h}$,黄铁矿生物溶解速率常数 $1.53 \times 10^{-2}\text{h}^{-1}$ 。生物反应器处理 1 吨干燥煤耗电 $200\text{kW} \cdot \text{h}$ 。

该装置的成功运行为浸出法微生物脱硫获得了大量参数,标志着煤炭微生物脱硫工作正由试验室走向应用。研究结果充分证明了微生物脱硫技术的可行性,约 2 周的时间,可脱除约 90% 的无机硫。

从 20 世纪 90 年代开始,日本中央电力工业研究所从土壤中分离出一种铁氧化硫杆菌,用于脱除煤炭中黄铁矿硫。他们还把生物处理技术与选煤技术结合起来,研究了微生物浮选脱硫技术。同时在煤水浆中进行了添加丝状菌青霉试验,也成功脱除煤炭中硫。1994 年,德国的研究者们在小型电厂进行了微生物脱硫试验。

在煤有机硫的脱除方面，Chandra 等用一种混合细菌的丰富培养物脱除煤炭中有机硫达 16.5% ~ 19.9%。Isbister 等曾采用二苯噻吩（Dibenzothiophene, DBT）分离到一株假单胞菌 CBI，用于脱除煤中的有机硫高达 18% ~ 47%。他们还用 *Ps. Putida* 的突变体 CBI 在一个日处理 1135kg 煤的小型中试装置上进行试验，生物反应器为简单的空气搅拌槽。ARCTECH^[59]也曾用 CBI 在一个煤处理量为 4.54kg/d 的小型装置上对各种煤进行试验，有机硫的脱除率为 10% ~ 29%。美国气化工工艺研究所（IGT）培育了混合菌种 IGT-S₀ 来脱除伊利诺斯煤的有机硫，当把煤磨细到小于 200 目时，能脱除 64% 的有机硫。

Kargi^[184]（1986）设计出一种两步脱硫工艺，如图 11-1 所示。对于一种煤炭，其总含硫量 4.2%，其中黄铁矿含硫 2.3%、有机硫 1.9%、煤浆浓度 20%，采用极喜热的酸热硫化叶菌 *S. acidocaldarius* 进行脱硫。过程分为两步：首先在 70 和 pH = 2.5 的条件下，在第一个反应器中停留 4 ~ 6 天，几乎可以完全脱除黄铁矿硫，然后送至第二个反应器中，停留时间 4 周，可以脱除有机硫 40%，处理的煤渣硫含量由 4.2% 降至 1.14%。第二步所需微生物菌种在含 DBT 的介质中单独培养，反应在厚度为 0.2m 的浅池中进行。

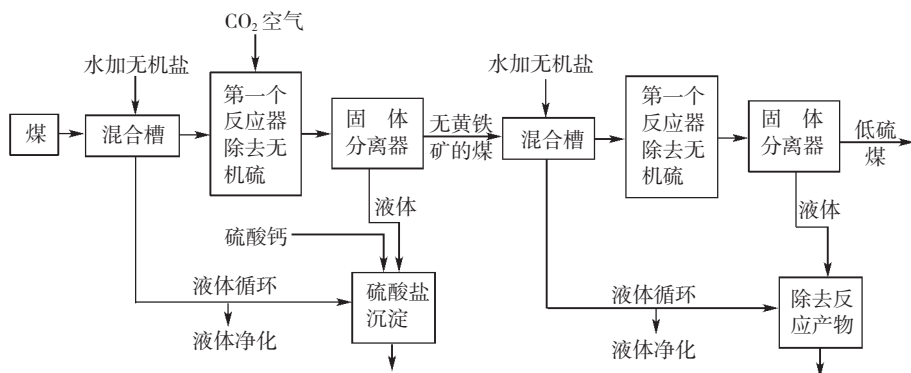


图 11-1 用酸热硫化叶菌脱除煤中硫的工艺流程

国内，20 世纪 90 年代中国环境科学研究院的潘涇轩领导的项目研究小组将煤炭的洗选和煤的微生物脱硫结合起来，在前人研究、试验的基础上，研究出一条适合我国国情的高效低成本的脱硫方法，即浮选法微生物脱硫，它的基本原理是微生物脱硫的表面处理法。工艺流程如图 11-2 所示^[185]。

其中，试验采用的煤样是宁夏石炭井矿务局的煤样和煤科总院煤质室提供的湖南辰溪煤样，采用的人工模拟煤样由大武口选煤厂的浮选精煤与兖州的黄铁矿配合而成，采用的细菌为来自韩国的氧化亚铁硫杆菌，采用的起泡剂为甲基异丁基甲醇，疏水捕集剂为煤油。其工艺设计路线既体现了选煤快速、设备简单的优点又充分考虑了微生物脱硫的自身特点，是一种新型的脱硫技术。

该项目研究组在总结前人研究的各种浮选柱的基础上，结合氧化亚铁硫杆菌的特点设计了合适的浮选柱。通过试验研究发现，浮选法微生物脱硫可提高煤中无机硫的去除率。无机硫含量愈高，浮选微生物脱硫效率就愈高。如：无机硫含量较低的大武口煤，微生物浮选法脱硫与一般浮选法脱硫相比，无机硫去除率提高了约 14.7%，而无机硫含量较高的湖南辰溪煤则提高了约 31.4%。

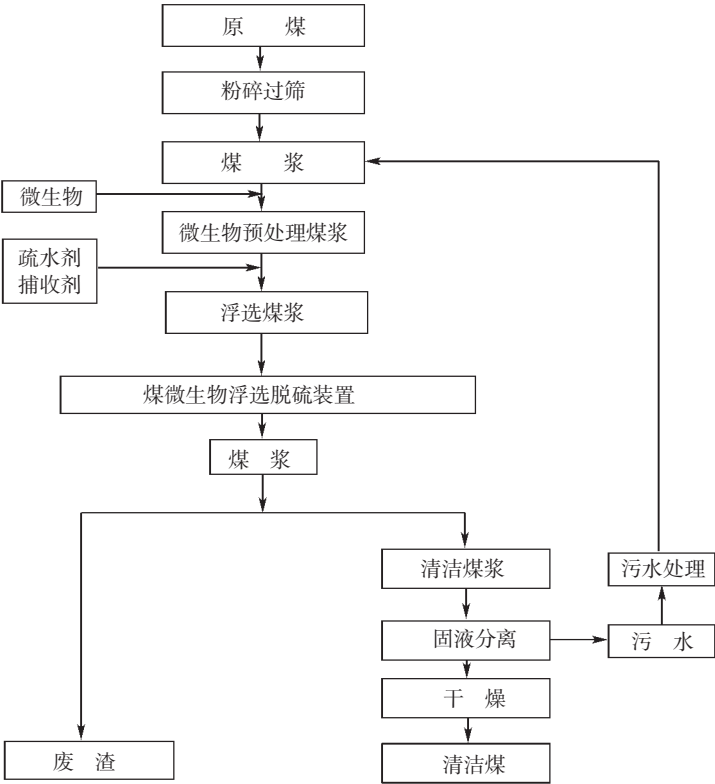


图 11-2 煤炭微生物浮选脱硫工艺流程

从国内外的情况看来，微生物法脱除黄铁矿的试验已达中试规模，而脱有机硫的试验仍处于实验室阶段。新的脱硫概念和方法还在不断提出，如微生物表面吸附与浮选相结合脱除黄铁矿^[186]、微生物选择性絮凝脱除煤中黄铁矿硫^[187]、厌氧菌用于煤脱硫以及采用非水有机溶剂为介质的微生物脱有机硫等^[188]。

11. 1. 2 微生物脱硫工艺过程

(1) 生物浸矿脱硫工艺

目前，根据矿石和浸出剂相互接触的方式，可将细菌浸矿方法分为以下两类：

一类：浸出剂若在矿石层中移动，则可分成堆浸法、地浸法和槽浸法三种。

另一类：浸出剂若与矿石颗粒同时移动，可以分为机械搅拌出法、空气搅拌出法和混合搅拌浸出法三种。

①微生物堆浸

矿物堆浸可能是最古老的湿法冶金方法，300 多年以前西班牙人就用于铜的回收。堆浸工艺矿石处理量大，所用时间都是异乎寻常的长，例如：槽浸每天可处理 5000t 矿石，浸出时间约为 50h，槽容积 2000cm³；而堆浸可以处理 1000 万 t 的矿堆，浸出时间 2 ~ 5 个月。虽然时间长，但由于矿物微生物堆浸是一种投资低、生产费用低的工艺。所以仍然受到人们的青睐，并得到迅速的发展和应用。

微生物堆浸（heap leaching）是一个包括物理、化学和生物现象相互作用的复杂工艺过程，它一般多在地面上进行。该工艺通常利用斜坡地形，将采出的未经破碎或经过破碎

加工的矿石堆在不透水的地基上，形成矿石堆，在矿堆表面喷洒细菌浸矿剂进行浸出，在低处建集液池收集浸出液。有的利用微生物浸矿剂在矿山附近形成废矿堆上直接浸出，也有的直接从尾矿堆浸出尾矿中的残留金属。

该浸出工艺的特点是规模大，浸出时间长。对于大量贫矿，一般都不经过破碎，直接由矿井口或露天采场运入矿堆场地。矿物的粒度也比较大，最大直径可达到数百毫米，其中也有相当数量粒度小于数十毫米的矿石。由于粒度大，浸出时间也较长，一般为数十天至几个月，有时甚至要数年才能完成浸出作业。这种堆浸工艺的生产成本比较低，广泛用于处理大量贫矿、废矿和尾矿。

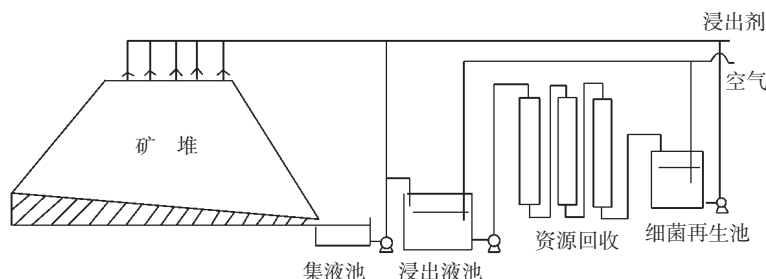


图 11-3 矿石微生物堆浸工艺流程示意图

对于品位较高的富矿，如要求回收率高和在较短时间内回收有用矿物时一般将矿石破碎成 50 ~ 50mm 以下，在不透水地面上堆成一定几何形状的矿堆进行浸出，浸出周期一般为数十天到数百天。一般来说，矿物的微生物堆浸工艺流程如图 11-3 所示。

在细菌堆浸的过程中，需要控制的主要工艺参数是溶液的酸度，当 $\text{pH} > 2$ 时，会产生沉淀的铁的化合物，但是当酸度太高时，例如： $\text{pH} < 1.0$ ，也对细菌生长不利。此外，维持细菌浸矿的营养供应，也是需要控制的工艺条件。一般来说，在细菌浸矿过程中，钾、镁等无机盐可以满足工艺要求，但有时常常缺少氮、磷等，应当检测并加以补充。

细菌浸矿周期较长，为强化浸出过程，矿堆中必须有充足的氧气和二氧化碳来源，可以采用轮流布液法，矿堆交替润湿和干燥，从而有利于矿物毛细管的收缩和扩散作用，有利于浸出液的排出和浸矿剂的吸入，使空气自然吸入矿堆内部，从而强化细菌堆浸过程，缩短浸出周期。

②微生物搅拌浸出

微生物搅拌浸出一般用于处理富矿或精矿。在进行浸出前，先将待处理矿石磨到 - 200 目占 90% 以上。为了保证浸出矿浆中微生物具有较高的活性，矿浆的固体浓度大都保持在 20% 以下。搅拌的作用是使矿物颗粒与浸出剂充分混合，增加矿粒与微生物的接触机会。搅拌的方式有机械搅拌和空气搅拌两种，机械搅拌比空气搅拌更容易使矿浆均匀混合，尤其是对于密度较大的矿物原料，采用机械搅拌更为必要。搅拌的另一个作用是增加矿浆中的空气含量，为微生物提供充足的氧和二氧化碳。

其次，由于微生物浸出的反应时间较长，一般要用多个搅拌槽串联起来操作，延长矿粒在设备中的停留时间，原则上讲，搅拌速度越高，传质效果越好，矿浆中吸入的空气也越多。但由于微生物是通过吸附在矿料表面来催化矿石的浸出速度，太激烈的搅拌有可能使微生物从矿粒上脱落，从而降低浸出速度，所以搅拌速度不能太高。一般来说，合适的

搅拌速度由矿物的溶解速度、耗氧速度和矿物的密度等因素决定。对于特定的矿石，通常需要通过试验来确定适宜的搅拌速度。

在某些情况下，单纯借机械搅拌吸入的空气，并不能满足微生物对氧和二氧化碳的需求，这时就需要另外向浸出槽中通入空气或含有 CO_2 的混合气体。这种机械搅拌加通气的浸出槽是微生物搅拌浸出的主要设备形式。此外，仅靠压缩空气搅拌的微生物浸出设备，目前在生产中有了应用，帕丘卡浸出槽和管式反应器是这类设备的两种典型代表。

另外，在这里还应指出的是，由于微生物都有着自身的适宜生长温度，所以，为了提高微生物浸矿速度，在微生物浸出设备上一般都配有加热和保温装置，尤其是在气候比较寒冷的地区。另一方面，由于硫化物的氧化反应是放热反应，所以当采用微生物技术浸出高品硫化矿时，为了防止反应过程释放出的热时导致矿浆升浊过高，影响微生物生长，需要在浸出设备上安装冷却设施，帮助散热。

③微生物地浸

地浸，又称作原地浸出或者溶浸采矿，是一种湿法冶金提取工艺，它是通过地面钻孔至矿体，然后由地面注入浸矿剂到矿体中。浸矿剂在多孔的矿体中循环，并保持足够的时间溶解有价矿物，最后经一组生产井（孔）用泵将含有价成分的浸出液抽到地面并加以回收。

采用微生物地浸是在注入浸矿剂的矿体中接种细菌，或者通过专门设备在地面制备细菌浸矿剂，然后用泵注入地下进行浸出。通常细菌地浸时需浸矿剂中加入细菌生长所需的营养成分，具体加什么样的营养物质及加多少，视地下矿物组成情况及浸出液分析结果而定。此外，还需空气压缩机通过钻孔向矿体鼓入空气和二氧化碳，以利细菌的生长。

目前，国外采用地浸回收铜、铀、碳酸钾、天然碱（ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）等，但细菌地浸的报道不多。由于细菌地浸对提高生产率、扩大有用矿产的工业储量有很大潜力，同时投资费用低，可以迅速回收投资，对环境污染最小，所以，细菌地浸越来越受到人们的重视。

④微生物槽浸

微生物槽浸法是一种渗滤浸出过程，通常在渗滤池或者槽中进行，一般用于处理品位高的矿物或精矿，矿物粒度比堆浸小，一般为小于 3 或 5mm，每个浸出槽一次装矿数十吨至数百吨，浸出周期为十天至数百天。

矿物微生物槽浸有两种方式：一种是连续喷洒浸出剂，同时连续排出浸出液，在矿物中不存留多余溶液。另一种是在喷洒浸出剂时不排出浸出液，使浸出剂浸没矿物，并浸出一段时间，然后排出浸出液。按这种方式进行操作，可使浸出剂与矿物有更多的接触时间，但这种浸矿方式，矿物的透气性不如第一种方法好。

(2) 生物氧化预处理浮选脱硫工艺

以前的研究人员认为，用微生物处理煤炭中的硫，必须将煤炭中的硫氧化成易溶于水的硫酸，因而多采用浸出法。但对一个火力发电厂来说，每天要将几千吨的煤脱硫，最关键的是脱硫效率，即脱硫时间。为此，从 20 世纪 90 年代开始，日本电力工业中央研究所的研究人员把微生物处理技术与选煤技术结合起来，开发了微生物浮选脱硫技术，即微生物表面处理法。

实验方法是把煤粉碎成微粒并与水混合，在其悬浮液下面吹进微细胞，煤和黄铁矿的

表面均附着气泡。由于空气和水的浮力作用，两者一起浮于水面不能分开。如果将微生物加到水溶液中，由于微生物附着在黄铁矿微粒的表面，使得黄铁矿的表面由疏水性变成亲水性，与此同时，微生物却难以附着在煤炭颗粒表面而仍保持其疏水表面的特点。在浮选柱中气泡的推动下，煤炭颗粒上浮而黄铁矿颗粒则下沉至底部，从而把煤和黄铁矿分开。

这种方法可以大大地缩短处理时间。实验表明，试验所采用的微生物为硫杆菌氧化亚铁硫杆菌，它对黄铁矿有很强的专一性，能在数秒钟之后就起作用，显著地抑制黄铁矿的悬浮性。经过 3~30 分钟的处理能去除约 80% 的黄铁矿，并且还可以去除一部分灰分。英国科学家用此法脱硫，整个过程数分钟就可完成，脱硫效率达 50%，但与浸出法相比，煤炭的回收率较低。

矿物表面积越大，微生物与之接触的机会越多，对反应有利。但对于含黄铁矿不均匀的煤炭，在磨细过程中会产生部分不含黄铁矿的煤粒，这些煤粒占据部分细菌，使含黄铁矿煤粒中的细菌数相对减少，对脱硫反而不利。所以合理的磨煤细度与煤中黄铁矿含量及分布情况有关。此外，还与煤浆浓度和煤的黄铁矿含量及所用细菌及细菌浓度有关，细菌脱硫推荐工艺流程如图 11-4 所示。

如果煤中含黄铁矿较少，可通过一步浮选工序，选出部分含硫低的煤，减少细菌脱硫的负荷。酸处理的目的是中和煤中的碱性物，以适宜于细菌生长，同时也可以提高煤粒受细菌作用的敏感性。反应器 I 用来除去无机硫，这里加入的是无机培养基，并接种可氧化黄铁矿的细菌。反应器 II 用以除去有机硫，所用的细菌是可氧化各种有机硫的混合培养基，这里要加入有机营养，最好用某种便宜的代用品，例如玉米浆等。

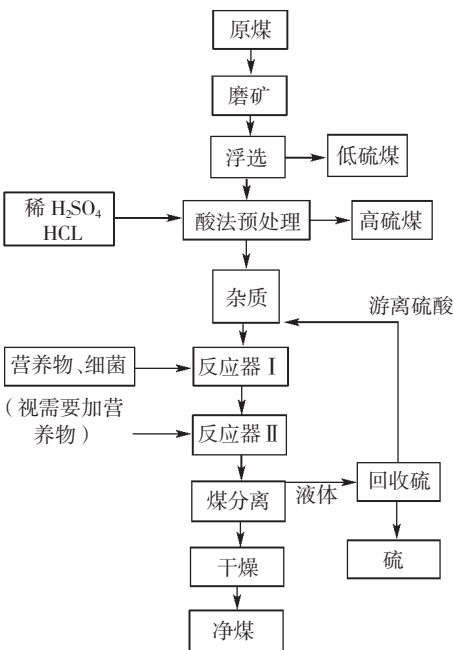


图 11-4 煤炭细菌脱硫推荐流程

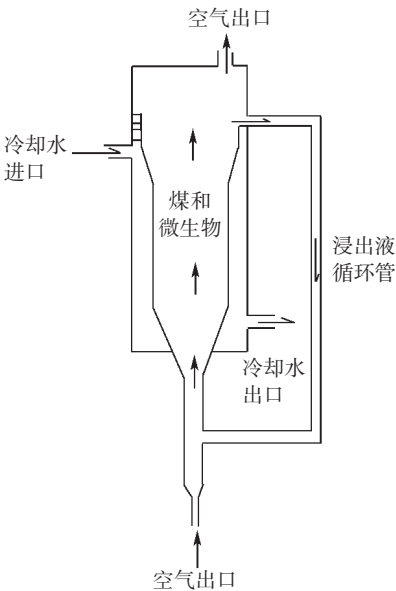


图 11-5 空气搅拌式反应器

(3) 用于脱硫的生物反应器

① 脱硫反应器的研究

A. 浸出法。浸出法是在微生物作用下将煤中无机硫变成硫酸而脱除的一种方法。最

简易的堆积浸出，即将含微生物的水喷洒在贮煤场的块煤上，在微生物的作用下煤中无机硫最终变成硫酸并随废水渗漏到煤堆底部除去。该法简单、经济，但处理时间较长，一般需数月时间。为了缩短浸出时间，有采取空气搅拌式浸出反应器（图 11-5）。

该装置的特点是利用气泡的搅拌使粉末状煤与含微生物的反应液间的接触作用增强，且对微生物的损伤减少，同时能及时补充微生物繁衍所需的 CO_2 和 O_2 ，提高脱硫效率，处理时间缩短至半天至几周，目前已有管道式及水平式的转滚浸出反应器的研究报道。

B. 表面氧化法。表面氧化法是采用泡沫浮选法，利用矿物表面性质差异的一种分离技术。其基本原理是将细微的空气泡自煤粉悬浮液的下部引入，具有亲水表面的矿物颗粒下沉，黄铁矿颗粒表面原本是疏水的，在微生物表面氧化作用下变成亲水颗粒下沉，而煤炭颗粒仍带疏水性而上浮。这样，除去沉降的黄铁矿颗粒便脱除了硫。

该法的关键是粉碎煤炭，使其中的黄铁矿尽量裸露于煤炭表面，以利于微生物的表面氧化作用。因无需进一步使黄铁矿化学变化，故处理时间仅需数分钟便可，而且在脱硫的同时可除去灰分。多采用浮选机或浮选柱作为脱硫反应器。

②脱硫工艺设计

A. 空气搅拌脱硫工艺。图 11-6 为工业规模的空气搅拌脱硫工艺流程图，包括微生物浸出反应工段、煤制品工段及废水处理工段。浸出反应工段的反应品中装有供微生物繁殖必需的营养盐和煤浆，微生物脱硫与繁殖同时进行；反应液依次自串联的多级浸出反应器中流出，停留时间约 10 余天，再经分离便得到精制煤煤，含硫酸的废液在处理工段加石灰中和成硫酸钙（石膏）除去。

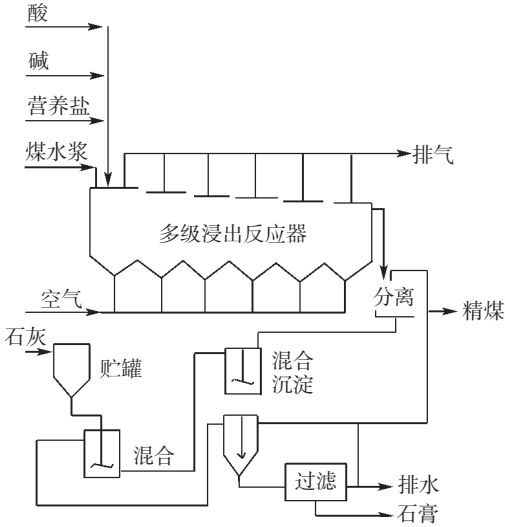


图 11-6 工业规模空气搅拌脱硫设备流程图

B. 表面氧化脱硫工艺。图 11-7 为表面氧化脱硫工艺流程图，包括微生物供给工段和物理精选煤工段。培养微生物所需的能由工段产生的黄铁矿（尾砂）供给；在物理精选煤工段，煤与微生物充分接触，煤中黄铁矿作为尾矿被分离，煤炭脱水后成精制煤。由于表面氧化法产生硫酸废液量少，故废水处理较简单。

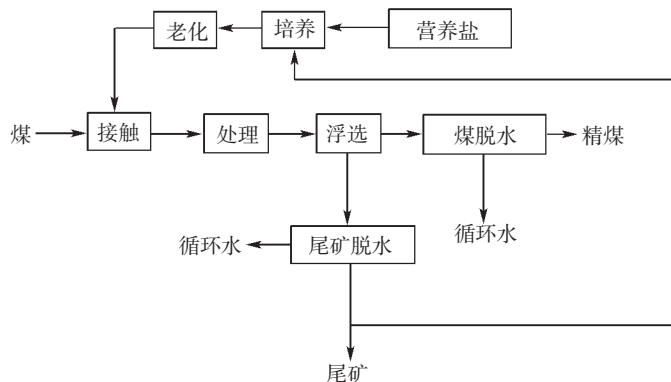


图 11-7 生物表面氧化浮选脱硫系统流程图

11.1.3 煤炭微生物脱硫技术经济分析

鉴于煤炭微生物脱硫目前未完全工业化，根据有关资料^[6]，按不同的处理规模进行投产后经济性预测。其中假设煤中黄铁矿去除率为 90% 左右，处理成本包括电费、药剂费、维修费及人工费等，经济性预测经果列入表 11-1。

表 11-1 微生物脱硫的经济效益

处理方法		试算规模/（万吨/年）	处理成本/百万日元	成本设定年份
微生物方法	浸出脱除	10	17 ~ 16	1986
		100	7.5 ~ 13	1986
		0.8	10	1986
		120t/h	17	1986
	表面氧化法	32	9.7 ~ 14.1	1985
		100	14.7	1990
化学法		约 125	54 ~ 150	1985
烟气脱硫法		约 230	20 ~ 40	1985

由表 11-1 所列的经济分析结果可见：微生物脱硫法比化学法经济，与烟气脱硫法相当，同时，微生物脱硫条件温和，设备投资费用较低，因此从经济上分析是可行的。

Detz 等人^[16]（1979）用含黄铁矿硫 2% 的原煤，设计了一个 8000 吨/天处理量的煤脱硫工厂（图 11-8）。煤浆浓度为 20%，28℃，18 天，氧化亚铁硫杆菌脱除煤炭中黄铁矿硫 93%，煤回收率 99%。对各项消耗，包括投资的折算等详细计算表明，细菌处理 1 吨煤炭的成本费为 9.48 美元，如果将粉碎（1.37 美元/吨）和加工成煤球（2.05 美元/吨）的费用计入，成本费为 12.9 美元/吨，与其他方法比较，微生物法成本费最低，见表 11-2。

表 11-2 煤燃烧前后脱硫方法成本比较

方 法		美元/吨	估算者
燃 烧 前 脱 硫	微生物法	12.9	德策等（1979 年）
	巴特尔（Battle）水热法	20	同 上
	TRW 高铁沥滤法	20	同 上
	肯奥科特（Kenocott）沥滤法	22	同 上
	OTISCA - deep 清洁法	48 ~ 56	D. 凯勒（D. Keller，1984 年）
	燃烧后脱硫	16	德策等（1979 年）

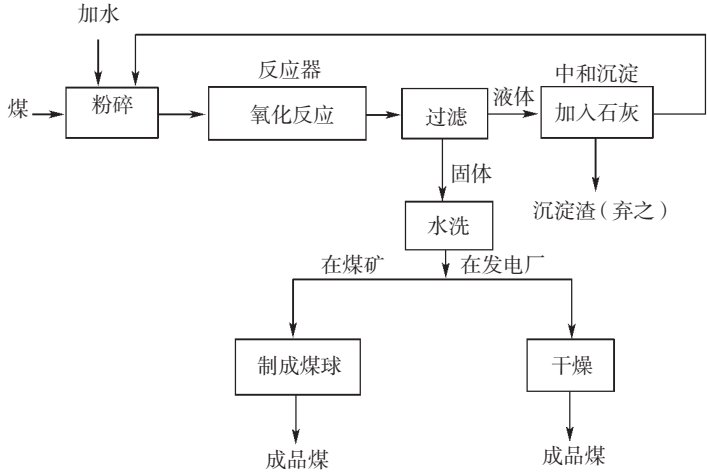


图 11-8 日处理 8000 吨煤的细菌脱硫工程示意图

Kargi 等人对设计出的两步脱硫工艺，也进行了初步经济分析：固定资本和运转费用约为 7000 万美元，每吨煤 17 美元，每小时可加工 120 吨煤炭，可供一个 250 千瓦的发电厂使用。

潘涔轩等人通过对煤炭微生物浮选脱硫工艺试验结果进行经济分析表明，该技术的经济可行性十分显著，运行成本很低，脱除 1 千克硫不到 0.5 元，随着技术的发展，还可进一步降低运行费用。

11.2 煤炭微生物脱硫技术应用存在的问题及发展前景

11.2.1 煤炭微生物脱硫技术应用存在的主要问题

(1) 传统的煤炭脱硫微生物繁殖慢，反应时间长。例如实验室浸滤一般需要几天或几周，堆沥可达几个月，难以保证脱硫工艺的稳定性与高效性，因此有必要寻找更多的煤炭脱硫新菌种及对传统的煤炭脱硫菌进行改良，开发高效和连续的生物脱硫新工艺。同时为了保持工业生产所需的细菌浓度，还要提高在工业条件下微生物的生长速率，以稳定脱硫效果，适应工业生产的要求。

(2) 目前煤炭微生物脱硫多是在酸性条件下进行，这给工业应用带来一系列诸如环保、腐蚀等问题。一方面，为了解决环境保护及资源回收利用等问题，酸性浸出废液的处理技术尚有待开发。另一方面，为了减少酸性工艺环节，降低酸度，要加快培育或改良适应中性条件的脱硫菌。

(3) 用于脱除煤中有机硫的微生物菌种的活性、选择性及生长条件等目前仍很难满足放大试验的要求。煤中有机硫的存在形式复杂，而目前对煤中有机硫脱除的研究多是以 DBT 为模型物，因此应对有机硫与煤的复杂性有充分考虑和研究。

(4) 微生物对煤的结构和物化性能，如对煤热值、表面积、孔结构、粘结性等的影响等需要进一步地研究和考察。

(5) 技术经济方面，传统脱硫微生物生长慢，培养基成本高，对于廉价的煤炭来说，

在工业生产上必须寻找廉价的替代培养基。此外，脱硫产生的酸性废液对装置材质的要求较高，浆态沥滤过程的动力消耗较大。

11.2.2 煤炭微生物脱硫技术的应用发展展望

我国是一个发展中国家，煤炭在今后相当长的时期内将是我国能源的主体，随着我国经济的持续快速发展，煤炭消费量不断地增加，面临的由燃煤造成的环境问题将会更加严峻。为了促进能源与环境的协调发展，减少 SO_2 等污染物的排放量，必须研究和开发出高效和低成本的煤炭脱硫技术。

微生物法脱硫是人工加速自然界硫循环的过程，尽管还存在一些问题，但其对生态环境的效益是其他脱硫过程无可比拟的。与现行的其他煤燃烧前脱硫或烟气脱硫技术相比都更具经济竞争力。为了尽快获得工业应用，今后的开发重点将是筛选更具煤炭脱硫活性的菌种，特别是能够同时脱除煤炭中无机硫和有机硫的菌种。脱硫过程的放大和工业化将取决于菌种的脱硫性能，特别是稳定性等因素。对此，现代分子生物学及基因工程技术将发挥重要的作用。

应该看到，我国在煤炭微生物法脱硫应用领域的研究尚有待深入，因此开发适合我国国情的煤炭微生物脱硫技术过程具有广阔的应用前景，这对满足日益增长的煤炭能源需求和日益严格的环保法规等具有重要意义。在我国高硫煤中，硫的含量中绝大部分是黄铁矿硫，占煤全硫含量的 60% 以上，尤其是重庆地区的南桐、天府、松藻等矿务局及贵州的六枝、林东等地的高硫煤多以黄铁矿为主。因此在目前的各种脱硫技术中，针对去除黄铁矿而开发的煤炭微生物脱硫技术就具有重大的实用价值，在较短时间内实现工业应用的可能性很大。

近年来，国内外对煤炭微生物脱硫技术进行了大量的基础性和应用性开发研究，在无机硫脱除机理、菌种筛选培育、反应器的设计开发等方面都取得了有实用价值的成果，并进行了半工业性试验。今后的研究重点应注重脱硫微生物的改良，培育出能脱除有机硫的优良菌种，进一步提高微生物脱硫效率，并亦考虑二次产物的妥善处置，使这项技术能尽快应用于实际工业生产。微生物脱硫技术是一种投资少、能耗低、污染少的煤炭脱硫新方法，对于减少燃煤 SO_2 的发生量、拓宽煤炭的应用范围具有重要的意义。

12 结 论

12.1 煤炭微生物脱硫的研究及脱硫菌种的选择方面

12.1.1 关于煤炭生物脱硫的研究方向及内容

21 世纪是世界生物工程技术快速发展的重要时期。矿物生物工程技术是把矿物加工与生物工程技术相结合的一门新型交叉学科,其中煤炭生物加工技术是矿物生物技术中一个重要而崭新的研究领域。把煤炭生物加工技术作为研究方向,从而把本论文的研究定位于现代科技发展中前沿性的研究课题,具有一定的前瞻性。

本论著在导师的指导下进行选题,并把论著的具体研究内容定为微生物脱除煤炭中黄铁矿硫的研究,这是根据我国高硫煤主要以黄铁矿硫为主的实际情况做出的决定。论著研究把握住煤炭脱硫这一我国国民经济发展过程中亟待解决的重要研究课题,具有较大的潜在应用意义。

12.1.2 对煤炭生物脱硫菌种的研究

煤炭生物脱硫的效果在很大程度上取决于所选择的脱硫菌种及脱硫方法。本论文研究中选定采用两种微生物,氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)和草分枝杆菌(*M. phlei*)作为煤炭脱硫微生物菌种加以研究,这是我们经过反复考虑和广泛比较后确定的。主要考虑了这两种微生物所具有的特点。

对氧化亚铁硫杆菌(*T. f*)来说,把该菌作为脱硫菌进行研究,在金属矿和非金属矿的脱硫方面虽均有过一些,但是我们注意到,以往对 *T. f* 菌的研究是在以上两个领域内分别进行的。把煤系与非煤系 *T. f* 菌放在一起进行的煤炭脱硫的对比研究以往未见报道。而对于草分枝杆菌(*M. phlei*)来说,目前国内还没有把此菌用于煤炭脱硫的报道。根据国外有关报道及我们的研究结果,由于 *M. phlei* 菌具有较强的疏水性和较高的负电性等表面性质,因此极有可能成为性能优良的煤炭脱硫新菌种。

从生物学特性方面考虑,选定 *T. f* 菌和 *M. phlei* 菌作为本论文研究菌种,是因为 *T. f* 菌为严格化能自养型、革兰氏阴性菌,而 *M. phlei* 菌则为化能异养型、革兰氏阳性菌。这两种细菌由于细胞结构、细胞壁组成和性质及培养条件不同等而有较大差异。因此,本论文通过对两种不同类型和性质的微生物脱硫效果的研究,对于广泛研究并选择性能优良的煤炭生物脱硫菌种,具有较大的参考价值。

12.2 脱硫微生物的磁化培育及菌种的分子生物学研究方面

12.2.1 对脱硫微生物菌种的磁化培育研究

近年来,生物磁技术和应用生物磁学的研究进展十分引人注目。但是,目前国内外对矿物磁生物技术的研究却少见报道。矿物磁生物技术是将生物磁技术与矿物加工相结合,主要研究磁场或磁化水等磁化作用对矿业微生物的生物效应等。

根据以往的报道及我们的研究,脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌(T.f)对于脱除煤中黄铁矿硫具有较好的效果。但是该菌存在生长较慢、代期长等缺点。考虑到T.f菌的生长特点,特别是该菌对 Fe^{2+} 独特的氧化代谢机制,因此,我们重点选择氧化亚铁硫杆菌(T.f)作为研究菌种,进行磁化培育的试验研究。通过对磁化与非磁化环境对T.f菌作用效果的比较、相同类型不同生长环境下的煤系与非煤系T.f菌以及不同类型微生物T.f菌和M.phlei菌的磁化作用效果和磁化时间和切割磁力线速度等磁化深度对T.f菌培养生长的影响等研究。结果表明,磁化环境对微生物的生长有明显影响,磁化作用对T.f菌的生长具有一定的促进作用。对此,我们还从脱硫微生物磁生物效应作用机理方面进行了深入的分析探讨。并得到以下主要认识:磁化作用能够直接或间接影响微生物细胞遗传物质DNA、影响微生物细胞的生理机能与新陈代谢以及影响水的结构和性质及生物膜的通透性等。

12.2.2 对脱硫微生物菌种的分子生物学研究

氧化亚铁硫杆菌(T.f)由于其所具有的特殊生物代谢机制,因此在煤炭脱硫和细菌冶金等方面具有较大的潜在应用价值。但是该菌也有生长缓慢、代期长、细胞获得率低以及酸性培养和代谢产酸等缺点。利用包括基因工程技术在内的现代分子生物学研究方法和手段,对T.f菌的遗传特性进行研究,有目的地对T.f菌进行遗传改良,就是为了改善该菌种的生长特性及其脱硫品质。

作为生物遗传的物质基础,DNA(脱氧核糖核酸)是生物遗传信息的基因分子载体,原核生物细胞的遗传物质由拟核染色体DNA和附加体质粒DNA组成。根据资料报道,在氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌和兼性自养嗜酸硫杆菌中存在质粒,因此有人认为质粒DNA在硫杆菌中的存在较为普遍。

本书运用现代分子生物学的试验方法和手段,对氧化亚铁硫杆菌(T.f)脱硫遗传物质的遗传背景进行了分子生物学水平的基础性探索研究。在所做的质粒抽提及其琼脂糖凝胶电泳的试验中并没有发现质粒,因此对于质粒在硫杆菌中普遍存在的观点提出了质疑。同时研究结果表明,氧化亚铁硫杆菌(T.f)对 Fe^{2+} 、S等的氧化能力只是与拟核染色体DNA有关,而T.f菌的遗传物质就是拟核染色体DNA。这也与有关方面进行研究而得出的结论是一致的。

12.3 煤与黄铁矿表面氧化的 XRD、SEM/TEM 及 FTIR 的研究方面

针对煤中黄铁矿 (FeS_2) 能够在氧化亚铁硫杆菌作用下被氧化的情况, 我们借助于 XRD、SEM/TEM 和 FTIR 等多种现代表面分析测试技术, 对煤与黄铁矿表面经细菌 (T. f) 及氧化剂 (H_2O_2) 作用前后, 表面微观结构的变化进行了深入比较与分析, 并得出了以下主要结论。

XRD 的结果表明, 试验用高硫煤样的成分组成复杂, 其以煤为主, 还包括高岭石、石膏、黄铁矿以及少量伊利石和石英等。细菌 (T. f) 在煤和黄铁矿表面作用前后的黄铁矿 XRD 衍射特征峰峰值 (衍射强度) 发生明显变化, 反应出氧化亚铁硫杆菌对黄铁矿的作用结果。另外作用条件不同, 细菌 (T. f) 对黄铁矿的氧化作用程度也不同。结合 SEM/TEM 照片进行分析可知, 氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 在黄铁矿表面的氧化作用大多表现为“坑蚀”氧化现象, 这表明 T. f 菌对煤中黄铁矿表面多是通过吸附氧化作用形式进行的。

为了进行对比分析, 我们采用强氧化剂 (H_2O_2) 对黄铁矿进行氧化试验, 并对氧化前后的黄铁矿样表面进行了 XRD 和 SEM 的研究和分析。试验结果表明, 氧化剂 (H_2O_2) 在黄铁矿 (FeS_2) 表面氧化形式与细菌 (T. f) 在黄铁矿 (FeS_2) 表面氧化形式不同。从黄铁矿表面微观结构变化来看, 氧化剂氧化的结果多为纽扣状的片起, 表现为强烈的直接作用氧化, 而细菌 (T. f) 氧化则为氧化坑蚀, 表现为相对缓和的吸附作用氧化。

改变试验方法, 采用 FTIR 分析技术对煤与黄铁矿表面细菌 (T. f) 作用前后的微观结构变化进行对照, 其结果与 XRD、SEM/TEM 的分析是一致的。

12.4 微生物脱除煤中黄铁矿硫的试验研究方面

12.4.1 对微生物 (T. f 菌) 浸出法脱除煤中黄铁矿硫的研究

根据氧化亚铁硫杆菌 (T. f) 对高硫煤的浸出脱硫试验结果, 在浸出过程中, 浸出液的 pH 值降低, 表明 T. f 菌的浸出脱硫是产酸的过程。T. f 菌对煤样的浸出脱硫效果为: 浸出 24 天, 煤中无机硫 (黄铁矿) 脱除率为 74.98% ~ 86.16%, 全硫脱除率为 51.98% ~ 61.30%, 而有机硫的脱除率小于 19.00%。

不同生长环境 (煤与非煤系) 以及不同培育方式 (磁化与非磁化) 下 T. f 菌的浸出脱硫效果不同, 表现为煤系 T. f 菌的浸出脱硫效果优于非煤系 T. f 菌, 磁化培育下的 T. f 菌的浸出脱硫效果要优于非磁化培育下的 T. f 菌。

不同煤样粒度和浸出时间的浸出脱硫效果也存在差异。对于同一种类型的 T. f 菌, 在相同煤样粒度条件下, 浸出时间增加, 黄铁矿脱除率提高。而在相同浸出时间条件下, 细粒级 (~200 目) 的脱硫率要高于中、粗粒级 (120 ~ 200 目和 40 ~ 120 目)。由第 2 章中的研究知, ~200 目破碎级煤样中黄铁矿的解离度大约是 95%。因此, 解离度越高, 黄铁矿的脱除率也越高。

对 T. f 菌煤炭浸出脱硫效果的预测结果表明, 随着浸出时间延长, 脱硫率将会提高。

但脱硫率的增加将会有有一个极限值。在试验煤样粒度条件下, 最大脱硫率应与煤中黄铁矿的解离度有关。

12.4.2 对微生物 (M. phlei 菌) 选择性絮凝脱除煤中黄铁矿硫的研究

微生物 (M. phlei) 选择性絮凝脱除煤中黄铁矿的实质, 就是利用 M. phlei 菌表面所具有的较强疏水性和较高负电性的特点, 当将其加入矿浆中后, 疏水性的 M. phlei 菌能有选择性地作用于疏水性的煤粒表面, 与煤粒一起形成大而紧密的絮团, 并发生沉降, 从而与亲水性的黄铁矿分离, 最终实现脱除煤中黄铁矿的目的。

研究中采用正交试验方法安排试验方案。在考察 M. phlei 菌选择性絮凝脱硫效果的同时, 也考察了煤样粒度、菌液用量及细菌絮凝的预接触时间等因素对选择性絮凝脱硫效果的影响, 试验结果表明, 草分枝杆菌 (M. phlei) 具有良好的选择性絮凝脱除煤中黄铁矿硫的效果, 在煤样粒度 - 200 目, 菌液用量 60ml 及预接触时间为 15 秒的条件下, 黄铁矿的脱除率达到 72.62%。试验结果的方差分析表明, 在所确定的试验条件下, 煤样粒度和菌液用量对煤炭中黄铁矿硫的选择性絮凝脱除具有显著影响, 而预接触时间的影响相比较不显著。

12.5 煤炭微生物脱硫机理的研究方面

12.5.1 对微生物在矿物表面吸附的研究

对微生物在矿物表面的吸附研究表明, 吸附是一种界面现象, 它是微生物生命活动的基本特征。微生物能通过各种方式和途径吸附于不同界面上, 微生物在界面上的吸附应属于胶体表面化学的范畴。当微生物在矿物表面发生吸附时, 它就能以其自身的性质或作用, 影响和改变矿物表面的疏水性、电性等表面性质, 以及矿物表面元素的氧化还原和矿物的溶解、沉淀等行为。这样, 通过利用不同类型和性状的微生物, 如我们在研究中采用的 T. f 菌和 M. phlei 菌, 在不同条件下对不同矿物 (如黄铁矿和煤) 吸附性质和吸附量的差异, 使微生物起到氧化 (催化) 剂或絮凝 (凝聚) 剂的作用, 从而达到对矿物生物浸出和生物选择性絮凝的目的。

12.5.2 对微生物 (T. f 菌) 在黄铁矿表面氧化机理的研究

研究认为, T. f 菌在黄铁矿表面的氧化有直接氧化和间接氧化, 直接氧化即细菌直接吸附在矿物表面, 与矿物表面的硫化矿发生直接作用, 使硫化矿氧化溶解。间接氧化即溶液中细菌 (T. f) 在代谢过程中产生硫酸高铁和硫酸, 在其作用下矿物 (硫化矿) 发生的化学溶解作用。

有关研究证明了直接氧化和间接氧化作用共同存在于细菌 (T. f) 氧化硫化矿的过程中。而无论是直接作用还是间接作用, 都会发生由细菌 (T. f) 作用而导致的二价铁的氧化。目前研究认为, 细胞色素 (Cytochrome) 在电子由二价铁递送到氧的过程中起着关键作用。而有关细菌 (T. f) 的生长底物 (Fe^{2+} 、 FeS_2) 氧化动力学和细菌 (T. f) 生长动力学等细菌 (T. f) 铁氧化生长动力学的研究, 以及把细菌生长的比生长速率作为细菌生

长过程动力学中关键参数的研究等,为深入研究并揭示细菌(T.f)对硫化矿的氧化作用机理的实质等起到了重要的作用。

12.5.3 对微生物(M.phlei)选择性絮凝煤脱除黄铁矿硫机理的研究

研究认为,微生物(M.phlei)表面组成及性质,对絮凝作用的产生起着十分重要的作用,而决定细菌表面性质的主要因素是细菌菌体表面的物质组成。对草分枝杆菌(M.phlei)的生物学特性及红外光谱等研究表明,M.phlei作为矿物絮凝剂的前提是微生物菌体本身或其衍生物能在矿物表面上产生吸附。M.phlei表面具有较强的疏水性和较高的负电性是其能对煤产生选择性絮凝作用的主要原因,而疏水性作用则是絮凝作用的关键。

12.6 本论著的主要研究成果及创新点

(1) 本论著选择传统脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌(T.f)和新型脱硫微生物草分枝杆菌(M.phlei)用于煤炭脱硫的研究,通过对两种不同类型和性质的微生物生物学特性及对煤炭脱硫效果的研究,为广泛研究并选择性能优良的煤炭脱硫菌种提供了重要的科学依据。

(2) 本论著首次把煤系与非煤系氧化亚铁硫杆菌(T.f)放在一起,进行了煤炭浸出脱硫效果的对比试验研究,结果表明:不同生长环境(煤与非煤系)下的T.f菌的浸出脱硫效果不同,表现为:小于200目煤样浸出24天,煤系T.f菌(干坝子)的黄铁矿浸出脱硫率($\eta_{p,ad}=82.56\%$)优于非煤系T.f菌(中南)($\eta_{p,ad}=76.54\%$)。

(3) 本论著还在国内首次探索性地研究了草分枝杆菌(M.phlei)选择性絮凝脱除煤中黄铁矿硫的新方法。试验结果表明:草分枝杆菌(M.phlei)具有良好的选择性絮凝脱除煤中黄铁矿硫的效果,在煤样粒度小于200目,菌液用量60ml及预接触时间为15秒的条件下,黄铁矿的脱除率 $\eta_{p,ad}$ 达到72.62%。

(4) 本论著首次将磁化技术用于煤炭生物脱硫的研究领域,探索性地研究了煤炭脱硫微生物磁化培育的新方法。研究结果表明:磁化环境对微生物的生长有明显影响,磁化作用对脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌(T.f)的生长具有一定的促进作用,表现为在一定培养时间条件下,磁化培育下的细菌量高于非磁化培育。而且磁化培育下的T.f菌(干坝子)的黄铁矿浸出脱硫率($\eta_{p,ad}=86.16\%$)优于非磁化培育下T.f菌(干坝子)的浸出脱硫率($\eta_{p,ad}=82.56\%$)。磁化培育下的T.f菌表现出较强的脱硫能力。

(5) 本论著在煤炭脱硫微生物菌种的遗传改良分子生物学方面进行了一些探索性研究。运用现代分子生物学的试验方法和手段,对氧化亚铁硫杆菌(T.f)脱硫遗传物质的遗传背景进行了分子生物学水平的基础性探索研究。在所进行的T.f菌质粒抽提及其琼脂糖凝胶电泳的试验中没有发现质粒。因此,对于质粒在硫杆菌中普遍存在的这种观点提出了质疑。

(6) 本论著在研究中采用XRD、SEM/TEM和FTIR等多种现代表面分析测试技术,对煤与黄铁矿表面经细菌(T.f)及氧化剂(H_2O_2)作用前后,表面微观结构的变化进行了深入比较与分析研究,结果表明:氧化亚铁硫杆菌(T.f)在黄铁矿表面的氧化作用与氧化剂(H_2O_2)在黄铁矿表面的氧化作用不同。T.f菌的氧化结果大多表现为“坑蚀”,这表明T.f菌对煤中黄铁矿表面多是通过吸附氧化作用形式进行的。

后 记

本书所涉及的研究工作是在导师中国工程院院士、中国矿业大学陈清如教授和安徽理工大学副校长、博士生导师张明旭教授的精心指导下完成的。从选题、研究及至论著撰写、修改和定稿，始终得到导师的悉心指导。导师开阔的眼界、渊博的知识、严谨创新的学风、一丝不苟的精神和宽厚随和的师者风范给作者留下了深刻的印象。作者在事业上的每一点进步无不铭刻着导师的心血与关怀。在本书完稿即将出版前夕，陈清如院士欣然为本书题词，张明旭教授在百忙之中为本书作序，表现出前辈大家对作者的关怀厚爱和殷切期望。在此谨向导师致以崇高的敬意和衷心的感谢。

在研究过程中得到中国矿业大学化工学院博士生导师欧泽深教授、陶秀祥教授、骆振福教授、谢广元教授、张兴教授的热情关心和大力帮助，在此深表感谢。

感谢中南大学邱冠周校长、矿物工程系刘星新教授、柳建设教授、徐竞老师为本课题的研究提供菌种及其他支持与帮助。

感谢四川南桐矿务局干坝子选煤厂周继工程师在煤样及菌种采集等方面给予的大力支持和帮助。

在X射线衍射分析、显微光度分析、扫描及透射电镜的测试分析研究中得到中国矿业大学分析测试中心王超老师、高贺凤老师、张井老师、于冰老师的热情指导与大力帮助。在红外光谱测试分析中得到安徽理工大学化工系李寒旭教授、武成利老师的热情帮助，在此深表感谢。

感谢安徽理工大学医学分院李朝品教授、李庆教授、王健教授对本人在进行微生物学研究和分子生物学研究时所给予的热情支持、指导和大力帮助。

安徽理工大学材料科学与工程系的领导和老师在研究及论著写作过程中给予了热情关心、大力支持和多方面的帮助，在此致以衷心的感谢。

特别感谢父母、妻女在我整个研究期间的理解、支持和帮助，从而使我能够专心致志地从事研究和进行论著的写作。

感谢国家自然科学基金项目、教育部高等学校博士点基金项目及安徽省教育厅自然科学基金项目的资助。

作者愿借此机会向本书所引用文献的作者们表示衷心感谢。

张东晨
于2005年7月

参 考 文 献

- [1] 宋志伟等. 我国煤炭脱硫技术现状及展望 [J]. 国外金属矿选矿, 2000 (1): 6~8
- [2] 何京东等. 我国煤炭中硫的分布及脱硫发展方向 [J]. 国外金属矿选矿, 1999 (5): 30~33
- [3] 李瑞. 中国煤中硫的分布 [J]. 洁净煤技术, 1998. 4 (1): 44~47
- [4] 曹征彦. 中国洁净煤技术 [M]. 北京: 中国物资出版社, 1998
- [5] 陈清如. 我国燃煤大气污染的防治 [J]. 苏州科技学院学报 (工程技术版), 2003 (1): 1~7
- [6] 雷仲存. 工业脱硫技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001
- [7] 张鸿波等. 当前我国煤炭脱硫方法的应用 [J]. 国外金属矿选矿, 2002 (8): 20~22
- [8] 马涛. 关于煤中脱硫法的探讨 [J]. 内蒙古煤炭经济, 2001 (1): 85~88
- [9] 李娟等. 煤脱硫的理论探讨 [J]. 云南建材, 2002 (1): 36~37
- [10] 秦建华. 选煤是当前我国煤炭脱硫的首选方法 [J]. 选煤技术, 2000 (2): 10~12
- [11] 杨颐康. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986
- [12] 岑沛霖等. 工业微生物学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000
- [13] 周群英等. 环境工程微生物学 [M] (第二版). 北京: 高等教育出版社, 2001
- [14] 马文漪等. 环境微生物工程 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1998
- [15] 魏德洲. 资源微生物技术 [M]. 北京: 冶金工业出版社, 1996
- [16] 童雄. 微生物浸矿的理论与实践 [M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997
- [17] 刘晶. 煤炭脱硫微生物—氧化亚铁硫杆菌的研究 [D]. 云南大学, 1996
- [18] 倪建宇等. 原煤燃烧前脱硫技术的研究进展 [J]. 地质地球化学, 1997 (3): 64~69
- [19] 康淑云. 微生物脱硫技术进展 [J]. 中国煤炭, 1999 年 5 期: 21~28
- [20] 刘生玉等. 煤炭微生物脱硫的研究现状和前景 [J]. 煤炭转化, 1997 (2): 20~24
- [21] 李国辉等. 煤的微生物脱硫研究进展 [J]. 化学进展, 1997 年 1 期: 79~87
- [22] 陈敏等. 生物—非生物煤炭脱硫新技术的研究 [J]. 环境科学, 1995 年 2 期: 23~26
- [23] 辜敏等. 煤的温和净化脱硫方法研究进展 [J]. 煤化工, 1999 (2): 29~34
- [24] 邱建辉等. 生物脱硫的研究进展 [J]. 微生物学报, 2001 (5): 650~653
- [25] 陆卫平. 微生物脱除煤中的硫 [J]. 生物工程学报, 1986 年 1 期: 1~5
- [26] 冷远服. 微生物煤脱硫研究现状 [J]. 生物工程进展, 1992 年 6 期: 42~46
- [27] 裘荣庆. 微生物冶金的应用和研究现状 [J]. 国外金属矿选矿, 1994 年 8 期: 45~49
- [28] 吴根等. 微生物脱硫技术的现状及发展前景 [J]. 环境保护, 2001 (1): 21~23
- [29] 魏以和等. 矿物生物技术的微生物学基本方法 [J]. 国外金属矿选矿, 1996 (1): 14~27
- [30] 张彤等. 煤的微生物浮选法脱硫技术 [J]. 上海环境科学, 1997 年 3 期: 17~19
- [31] 方兆珩. 矿业中的生物技术 [J]. 国外金属矿选矿, 1998 年 6 期: 26~28
- [32] 刘汉钊等. 生物浮选法的发展与方向 [J]. 国外金属矿选矿, 1998 年 11 期: 2~6
- [33] 刘汉钊等. 微生物在矿物工程上应用的新进展 [J]. 国外金属矿选矿, 1999 (12): 9~12
- [34] 童雄等. 微生物在选矿中的最新应用 [J]. 云南冶金, 1999 (4): 20~25
- [35] 印海南. 煤炭微生物浮选脱硫新工艺 [J]. 山西煤炭, 2000 (4): 32~34
- [36] 刘剑峰. 生物脱硫技术的进展 [J]. 国外油田工程, 2001 (12): 37~38
- [37] 夏金兰等. 绿色化学和矿物资源高效利用 [J]. 矿冶工程, 2001 年 2 期: 1~3
- [38] 张学才等. 煤炭生物加工现状与展望 [J]. 煤炭科学技术, 2001 年 6 期: 1~4

- [39] 姜成英等. 石油和煤微生物脱硫技术的研究进展 [J]. 过程工程学报, 2001 (1): 80 ~ 85
- [40] 徐复铭等. 用白腐菌脱除重庆高硫煤中硫的研究 [J]. 煤炭学报, 1999 (4): 424 ~ 428
- [41] 格朗杰. 用细菌沥滤法脱硫 [J]. 选煤技术, 1986 (1): 54 ~ 57
- [42] Arpad E. Torma 生物湿法冶金的现状和未来的挑战 [J]. 国外金属矿选矿, 1990 (10): 1 ~ 7
- [43] A. 宫特蔓. 各类型煤对细菌脱除黄铁矿作用的适应性研究 [J]. 选煤技术, 1991 (5): 47 ~ 51
- [44] II. M. 索洛日金. 细菌在矿业工程中的应用 [J]. 国外金属矿选矿, 1991 年 5 期: 1 ~ 10
- [45] A. Elsayy 等. 煤中有机硫生物脱硫系统述评 [J]. 矿业译丛, 1992, 1: 18 ~ 20
- [46] 大村直也. 煤的微生物脱硫法 [J]. 选煤技术, 1992, 2: 47 ~ 50
- [47] Z. 沃尔辛克依等. 用细菌浸出法脱除与煤致密共生的硫的方法及特点 [C]. 第七届国际选煤会议译文集, 225 ~ 233
- [48] 原田种臣. 微生物在矿业中的应用 [J]. 国外金属矿选矿, 1993 年 4 期: 29 ~ 35
- [49] P. K. 莎玛等. 在异养细菌和矿质化学营养细菌作用下硫化矿物的生物浮选 [J]. 国外金属矿选矿, 2001, 2: 37 ~ 42
- [50] Colmer A. R & Hinkle M. E, The role of microorganisms in acid mining drainage, a preliminary report [J]. Science, 1947, 106: pp253 ~ 256
- [51] Temple K. L., et al. Appl Microbiol, 1953, 1: 255 ~ 258
- [52] Lenth W. W., et al. Appl Microbiol, 1958, 1: 61 ~ 68
- [53] Silverman M. P., et al. Appl Microbiol, 1961, 9: 491 ~ 496
- [54] Frkri Kargi. Microbial Desulfurization of Coal. Advanced in Biotechnological Process 3, 1984: 241 ~ 272
- [55] Fecko P., et al. Fuel. 1991, Vol70, No. 10: 1187 ~ 1195
- [56] 舒新前等. 微生物浸滤法脱除煤中黄铁矿硫 [J]. 煤炭转化, 1996 (4): 26 ~ 28
- [57] Tijen. O& Zbas Bozdemir, et al. Biodesulfurization of Turkish Lignite. Fuel, 1996, Vol 75, No. 13: 1596 ~ 1600
- [58] Chandra D., Roy P., Mishra A. K et al. Fuel, 1979, 58: 549 ~ 550
- [59] Isbister J. D., et al. Appl Environ Microbiol, 1983, 123: 463
- [60] Holmes D. S., Lobos J. H., Bopp L. H., Welch G. C., Cloning of a Thiobacillus ferrooxidans plasmid in Escherichia coli (abstract). J Bacteriol 1984 Jan; 157 (1): 324 ~ 326
- [61] Rawlings D. E., Pretorius I., Woods D. R. Expression of a Thiobacillus ferrooxidans origin of replication in Escherichia coli (abstract). J Bacteriol 1984 May; 158 (2): 737 ~ 738
- [62] 徐毅, 钟慧芳等. 微生物脱除煤炭中黄铁矿硫 [J]. 微生物学报, 1990, 30 (2): 134 ~ 140
- [63] 钟慧芳等. 黄铁矿的细菌氧化 [J]. 微生物学报, 1987 年 27 卷 3 期: 264 ~ 270
- [64] 钟慧芳等. 利用微生物进行煤炭脱硫 [J]. 环境科学学报, 1992 年 12 卷 2 期: 216 ~ 222
- [65] 周雪娇. 硕士学位论文 [D]. 中国矿业大学北京研究生部, 1986
- [66] 钟慧芳等. 微生物脱除煤炭中有机硫的研究 [J]. 微生物学报, 1995, 35 (2): 130 ~ 135
- [67] 张明旭. 中国煤的微生物表面调整—浮选法脱除黄铁矿的研究 [D]. 中国矿业大学 (北京校区), 1999. 5
- [68] 张明旭等. 利用微生物调整表面强化煤炭中细粒黄铁矿的脱硫技术 [J]. 国外金属矿选矿, 1997 年 8 期: 46 ~ 52
- [69] 张明旭等. 皖南高硫煤微生物—浮选法脱硫的研究 [J]. 煤炭学报, 2001 (6): 671 ~ 675
- [70] 张明旭等. 煤炭微生物脱硫新技术—细菌表面改性预处理 [J]. 中国煤炭, 1997 年第 23 卷第 2 期: 30 ~ 34
- [71] 王勇. 煤炭生物浮选脱硫及其机理的研究 [D]. 淮南工业学院, 1999. 5

- [72] 唐军. 微生物改性—浮选脱硫的研究与分析软件的开发 [D]. 淮南工业学院, 1999. 5
- [73] 唐军. 矿物生物技术在煤炭脱硫中的应用 [J]. 矿业科学技术, 1998 (1): 29 ~ 32
- [74] 李队员. 大肠杆菌作为浮选药剂的应用研究 [D]. 安徽理工大学, 2002 年 5 月
- [75] 魏德州等. 燃煤微生物预处理浮选脱硫的试验研究 [J]. 东北大学学报 (自然科学版), 2002 (5): 477 ~ 479
- [76] 魏德州等. 生物技术在煤炭脱硫过程中的应用 [J]. 岩石矿物学杂志, 2001 (4): 467 ~ 470
- [77] 周志付. 燃煤微生物预处理浮选脱硫的试验研究 [D]. 东北大学, 2002. 1
- [78] 周志付, 魏德州等. 微生物预处理浮选脱硫对煤样热值的影响 [J]. 中国电力, 2002 (2): 35 ~ 37
- [79] 李喜坤等. 红阳三矿煤炭生物浸出脱硫研究 [J]. 有色矿冶, 2001, 17 (2): 11 ~ 13
- [80] 李雷, 张兴. 煤粒度和煤浆浓度对微生物法煤炭脱硫的影响 [J]. 环境科学, 1992, 13 (1): 32 ~ 36
- [81] 张兴, 李雷. 煤炭微生物脱硫的研究 [J]. 现代化工, 1993 (1): 23 ~ 24
- [82] 张兴等. 3 种细菌对煤中黄铁矿抑制作用的研究 [J]. 中国矿业大学学报, 2001 年 30 卷 6 期: 604 ~ 607
- [83] 张兴, 李雷. 影响煤炭微生物脱硫因素的研究 [J]. 环境科学研究, 1992, 5 (6): 14 ~ 18
- [84] 马翠卿. 微生物脱有机硫的模式反应系统的前期研究 [D], 山东大学, 1997
- [85] 杨凌霄. 微生物煤炭脱硫 [D]. 南京理工大学, 1998. 3
- [86] 颜望明. 浸矿细菌的遗传工程 [J]. 微生物通报, 1987, 16 (3): 173 ~ 175
- [87] 金松谟, 颜望明. 氧化硫硫杆菌质粒的分离 [J]. 微生物学通报 1988, 15 (1): 20 ~ 21
- [88] 金松谟, 颜望明. 氧化硫硫杆菌 pTt54 质粒的限制性酶切分析及其在大肠杆菌中的克隆 [J]. 微生物学通报 1990, 17 (3): 141 ~ 144
- [89] 颜望明. 氧化硫硫杆菌启动子功能片段在大肠杆菌中的克隆和表达 [J]. 遗传学报, 1990, 17 (2): 143 ~ 147
- [90] 刘振盈, 颜望明. 氧化亚铁硫杆菌质粒 pTf—52 限制图谱和嵌合质粒 pSDF—1 的构建 [J]. 山东大学学报 (自然科学版) 1990, 25 (3): 389 ~ 394
- [91] 韩涛, 颜望明. 氧化亚铁硫杆菌启动子片段的克隆及酶切分析 [J]. 山东大学学报 (自然科学版) 1993, 28 (4): 474 ~ 481
- [92] 何正国、李雅芹等. 氧化亚铁硫杆菌的铁和硫氧化系统及其分子遗传学 [J]. 微生物学报, 2000 年 40 卷 5 期: 563 ~ 566
- [93] 林建群, 颜望明等. 氧化亚铁硫杆菌基因转移系统研究进展 (综述) [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7 (2): 193 ~ 196
- [94] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯等. 伯杰细菌鉴定手册 [M] (第八版). 北京: 科学出版社, 1984
- [95] 张恩广主编. 筛分破碎及脱水设备 [M]. 北京: 煤炭工业出版社, 1991
- [96] 煤炭科学研究总院北京煤化学研究所编. 煤炭试验标准及其说明 [M]. 北京: 中国标准出版社, 1991
- [97] 杨金和等编. 煤炭化验手册 [M] (1998 年版). 北京: 煤炭工业出版社, 1999
- [98] W. E. Straszheim 等. 从图像分析深入认识煤中的黄铁矿硫 [J]. 矿业译丛, 1992 (1): 1 ~ 4
- [99] 唐珊熙主编. 微生物学及微生物学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998
- [100] 光学仪器丛书《生物显微镜》编写组. 生物显微镜 [M]. 北京: 机械工业出版社, 1977
- [101] 张惠康. 微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [102] 黄秀梨. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000

- [103] 毛宁, 黄谚谿. 生物磁技术在工农业的应用及其机理探讨 [J]. 激光生物学报, 1998, 7 (4): 306~309
- [104] 钟科学等. 生物磁学的研究进展 [J]. 化学传感器, 1996, 16 (2): 87~91
- [105] 朱传征. 磁化学及其进展 [J]. 化学教育, 1995 (4): 4~7
- [106] 黄秀铭. 生物磁化工程发展的可行性与必要性 [J]. 生物磁学, 2002 年: 35
- [107] 卢什高. 磁场处理农作物种子的生物体效应及其机制研究进展 [J]. 种子, 1990 (3): 47~49
- [108] 毓华等. 磁场处理对植物早期代谢的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1991 (18): 234~240
- [109] 王书良. 磁化水浸种对玉米增产效果的研究 [J]. 种子, 1994 (5): 52~53
- [110] 陈海燕. 用磁处理水可提高动物及作物产量 [J]. 吉林水利, 1990 (10): 43~45
- [111] 黄伯若. 脉冲旋转恒定磁场对革兰氏菌影响的实验研究 [J]. 医学物理, 1987, 4 (1): 78~79
- [112] 宋雪怡. 高频电磁场对金黄色葡萄球菌的影响 [J]. 中华理疗杂志, 1993 (1): 16~19
- [113] 李振杰. 极低频电磁场生物学影响的评价 [J]. 海军军事医学, 1994, 15 (3)
- [114] 王保义等. 脉冲电磁场对细胞的特异性作用研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 1996, 13 (2): 133~135
- [115] 刘振英. 磁化水对生物体的影响 [J]. 兰州医学院学报, 1983 (3): 40~45
- [116] 邱冠周等. 浸矿细菌的育种及工业应用 [J]. 国外金属矿选矿, 1998 (6): 29~33
- [117] 刘晶等. 氧化亚铁硫杆菌脱硫能力的遗传背景初探 [J]. 云南大学学报 (自然科学版) 1998, 20 (3): 206~207
- [118] 马建岗. 基因工程学原理 [M]. 西安交通大学出版社, 2001
- [119] 冯斌, 谢先芝. 基因工程技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001
- [120] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [121] I. 戈尔茨坦, 张大同. 扫描电子显微镜技术与 X 射线显微分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1988
- [122] 陆家和等. 现代分析技术 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1995
- [123] 北京大学化学系仪器分析教学组. 仪器分析教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1997
- [124] 陈培榕, 邓勃. 现代仪器分析实验与技术 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1999
- [125] 邓聚龙. 灰色控制系统 [M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1985
- [126] 煤炭科学研究院唐山分院. 选煤技术标准手册 (上册) 1987
- [127] 张明旭. 煤泥水处理 [M]. 徐州: 中国矿业大学出版社, 2000
- [128] 周振英, 刘炯天. 选煤工艺试验研究方法 [M]. 徐州: 中国矿业大学出版社, 1991
- [129] 张惠康. 微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [130] 胡岳华等. 氧化亚铁硫杆菌的细菌学描述 [J]. 湿法冶金, 1996 年 4 期: 36~40
- [131] 孙先锋等. 氧化亚铁硫杆菌的分离及其生长条件的研究 [J]. 西北大学学报 (自然科学版) 2000 年 2 期: 143~146
- [132] 张在海等. 氧化亚铁硫杆菌的菌落分离研究 [J]. 矿产综合利用, 2001 (1): 19~22
- [133] 张冬艳. 氧化亚铁硫杆菌的菌数测定法 [J]. 内蒙古工业大学学报, 1996 (1): 62~65
- [134] 袁欣等. 非金属矿物的微生物加工技术研究 (I) [J]. 中国非金属矿工业导刊, 2000 年 3 期: 12~14
- [135] 沈淑娟. 波谱分析法 [M]. 山东东营: 华东化工学院出版社, 1992
- [136] 于世林, 李寅蔚. 波谱分析法. 重庆: 重庆大学出版社 [M] (第二版), 1994
- [137] 张在海等. 氧化亚铁硫杆菌遗传选育方法探讨 [J]. 湿法冶金 1999 (4): 28~31
- [138] 刘晶等. 氧化亚铁硫杆菌脱硫能力的遗传背景初探 [J]. 云南大学学报 (自然科学版) 1998, 20 (3): 206~207

- [139] 黄翠芬. 遗传工程理论与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [140] Holmes D S, Lobos J H, Bopp LH, Welch G C, Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli* (abstract). *J Bacteriol* 1984 Jan; 157 (1): 324 ~ 326
- [141] Rawlings D E, Pretorius I, Woods D R. Expression of a *Thiobacillus ferrooxidans* origin of replication in *Escherichia coli* (abstract). *J Bacteriol* 1984 May; 158 (2): 737 ~ 738
- [142] Barros M E, et al. *J Bacteriol* 1985, 164 (3): 1386 ~ 1389
- [143] Tributsch H, Bennett J. C. *J Chem. Technol Biotechnol*, 1981, 31 (10): 627 ~ 635
- [144] 徐浩等编. 工业微生物学及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1990
- [145] 柳建设等. 氧化亚铁硫杆菌生长过程中铁的行为 [J]. 湿法冶金, 1998 (2): 29 ~ 31
- [146] 何良菊等. Fe^{2+} , NH_4^+ 对氧化亚铁硫杆菌氧化黄铁矿的影响 [J]. 黄金学报, 1999 年 4 期: 278 ~ 280
- [147] 邓述波等. 微生物絮凝剂的研究和应用 [J]. 国外金属矿选矿, 1998 (1): 15 ~ 18
- [148] 杨慧芬等. 微生物选矿药剂的应用现状及发展方向 [J]. 矿产综合利用, 2001 (1): 32 ~ 35
- [149] 张传福等. 氧化亚铁硫杆菌生长迟缓期的影响因素 [J]. 中南工业大学学报, 1999 年 5 期: 489 ~ 492
- [150] 周安琪等. 磁—生物电效应对生物影响机理的探讨 [J]. 天津农林科技, 2002 年 6 月第 3 期 (总第 167 期): 5 ~ 7
- [151] 钱留华. 细菌代谢类型的特点 [J]. 生物学通报, 1996, 31 (1): 25 ~ 26
- [152] 戴祖玉. 磁化水对生物细胞的作用 [J]. 兰州大学学报 (自然科学版), 1985, 21 (18): 45 ~ 48
- [153] 王荫棠. 磁场对生物酶活性的影响 [J]. 中华物理医学杂志, 1987, 9 (1): 36 ~ 39
- [154] 郭迎松等. 磁处理对水体生物性质影响的研究 [J]. 武汉水利电力大学学报, 1997 年 6 月第 30 卷第 3 期: 93 ~ 95
- [155] 卢寿慈, 翁达. 界面分选原理及应用 [M]. 冶金工业出版社, 1992 年 1 月
- [156] 郭梦雄. 浮选. 中国矿业大学出版社 [M]. 1989 年 5 月
- [157] 蔡璋. 浮游选煤与选矿. 煤炭工业出版社 [M]. 1991 年 8 月
- [158] 王文生等. 微生物在矿物表面吸附的意义及研究方法 [J]. 国外金属矿选矿, 1998 年 3 期: 37 ~ 40
- [159] K. C. Marshall, Bacterial adhesion in natural environments, in MICROBIAL ADHESION TO SURFACE, New York, Academic Press, 1980
- [160] 王军等. 细菌对硫化矿可浮性影响的研究 [J]. 国外金属矿选矿, 1996 (5): 4 ~ 10
- [161] R. W. Smith et al. 微生物在选矿中作为选矿药剂的应用 [J]. 国外金属矿选矿. 1996 (6): 46 ~ 49
- [162] 袁欣等. 非金属矿物的微生物加工技术研究 II - 黄铁矿的微生物浮选 [J]. 中国非金属矿工业导刊, 2000 年 4 期: 17 ~ 20
- [163] Murr L. E and Berry V. K, Direct observation of selective attachment of bacterial on low grade sulphide ores and other mineral surface, *Hydrometallurgy*, 1976, 2: 11 ~ 24
- [164] Ohmura N et al. Selective adhesion of *thiobacillus ferrooxidans* to pyrite, *Appl. eEnviron. Micro.* 1993, 59 (12): 4044 ~ 4050
- [165] 李秀艳等. 含砷金精矿生物预氧化过程中细菌吸附的作用 [J]. 东北大学学报 (自然科学版), 2000, 21 (6): 641 ~ 644
- [166] Smith R. W. et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 53 (11): 3709 ~ 3714
- [167] Beavan M. J and Can J. *Microbiol*, 1979, 25: 888 ~ 895
- [168] Jayatissa P. M. and Rose A. H. J. *Microbiol*, 1976, 96: 165 ~ 174

- [169] 徐晓春等. 硫化矿生物浸出动力学模型的研究 [J]. 国外金属矿选矿, 2001 (11): 5 ~ 9
- [170] Konishi Y, Asai s, Katch H. Bacterial dissolution of pyrite by thiobacillus ferrooxidans. Biotechnol Bioeng, 1990, 5: 231 ~ 237
- [171] 常志东等. 氧化亚铁硫杆菌对硫化矿和含铜硫化矿浸矿动力学研究 [J]. 湿法冶金, 1997 (3): 4 ~ 8
- [172] 张广积等. 生物氧化浸矿机理和动力学 [J]. 国外金属矿选矿, 2000 年 6 期: 17 ~ 20
- [173] Yun CheaChang and Allan S. Myerson Growth Models of the continuous bacterial Leaching of Iron Pyrite by Thiobacillus ferrooxidans. Biotechnology and Bioengineering 1982, vol X X IV: 889 ~ 902
- [174] Satoru Asai et al. Kinetics Model for Batch Bacterial dissolution of Pyrite Particle by Thiobacillus ferrooxidans. Chemical Engineering Science, 1992 Vol47. No1: 133 ~ 139
- [175] 阎小波等. 氧化亚铁硫杆菌生长动力学参数 [J]. 中国有色金属学报, 2000 (3): 440 ~ 443
- [176] Nemati M and Webb C. A Kinetic Model For Biological oxidation of ferrousion by Thiobacillus ferrooxidans. Biotechnology and Bioengineering. 1997, 53: 478 ~ 486
- [177] Lacey D. T, Lawson F. Kinetics of the liquid - phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium Thiobacillus ferrooxidans. Biotechnol Bioeng 1970, 12: 29 ~ 50
- [178] Jones C. A, Kelly D. P. Growth of Thiobacillus ferrooxidans on ferrous ion in chemical culture: influence of product and substrate inhibition. J chem. Tech Biochnol, 1983, 33 (B): 241 ~ 261
- [179] Hubert R. Modeling of ferrous sulfate oxidation by iron oxidizing bacteria - a chemiosomotic and electrochemical Approach PhD Thesis, South Africa, 1994
- [180] Nemati M, et al. Biological oxidation of ferrous sulphate Thiobacillus ferrooxidans: a review on the kinetic aspects. Biochem Eng J, 1998, 1: 171 ~ 190
- [181] Van loosdrecht et al. The role of Bacterial cell wall Hydrophobicity in Adhesion. Applied and Environmental Microbiology 1987, v53: 1893 ~ 1897
- [182] Smith R. W and Misra M. Mineral Bioprocessing: An Overview. Mineral Bioprocessing 1991: 3 ~ 26
- [183] Misra M & Smith R. W et al. Novel Microorganism for selective separation of coal from ash and pyrite. Seventh quarterly technical progress report, 1995
- [184] Kargi F, Robinson J M, Fuel, 1986, 65, 397 ~ 399
- [185] 潘涇轩. 高硫煤微生物浮选工艺的可行性研究. 国家环境保护总局, 1998. 4
- [186] 大村直也, 斋木博. 化学工学, 1994, 58, 561 ~ 562
- [187] 张东晨等. 煤炭学报, 2005 年第 29 卷第 5 期, 585 ~ 589
- [188] Finnerty W R, Prep Paper ACS Petro Chem. , 1993, 38, 282 ~ 285