

# 紫外-微波复合诱变选育溶煤菌株 及其溶煤产物分析

赵玮钦, 马骁, 侯彬彬, 岳子林, 周安宁\*

(西安科技大学 化学与化工学院, 陕西 西安 710054)

**摘要:**生物转化是煤炭清洁温和利用的有效途径之一.为提高神府煤的生物溶解率及产物定向转化的选择性,分别用沙门氏菌、黄杆菌、大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌及云芝菌对神府煤进行溶解.以最佳溶煤菌为出发菌株,利用紫外-微波复合诱变,选育更高效的溶煤菌株进行煤的生物转化,用 FTIR 和 GC/MS 对溶煤产物进行了分析.结果表明,紫外-微波复合诱变对云芝菌具有明显的诱变效应,复合诱变后的云芝菌对神府煤具有最好的溶解效果,其溶煤率从原来的 41.3% 提高到 54.2%.FTIR 和 GC/MS 分析表明,神府煤经生物转化,产物的芳香类物质相对含量降低,而烷烃、酰胺、烯烃、醇及醚类物质含量增多.

**关键词:**紫外;微波;诱变选育;溶煤菌株;产物分析

**中图分类号:**TQ536

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9102(2018)01-0084-08

## UV/Microwave Compound Mutation Breeding Coal Solubilization Strains and Analysis of its Product Composition

Zhao Weiqin, Ma Xiao, Hou Binbin, Yue Zilin, Zhou Anning

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, China)

**Abstract:** Bioconversion is one of the effective, clean and moderate ways to utilize coal. To increase Shenfu coal bio-solubilization and selectivity of its bioconversion products, Shenfu coal was dissolved respectively by coal solubilization strains such as *Salmonella*, *F. odoratum*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus* and *Coriolus versicolor*. The most optimal coal solution strain was used as starting strain, and was bred by UV/microwave compound mutation, the biodegradation products were characterized by FTIR and GC/MS analysis. The results showed that, *Coriolus versicolor* have the highest ability for coal solubilization, and the coal solubilization rate of *Coriolus versicolor* increased from 41.3% to 54.2% after UV/microwave compound mutation. FTIR and GC/MS analysis further show the biodegradation products of aromatic substances relatively decrease, and paraffin, amide, olefins, alcohols, and ethers matter content increase.

**Keywords:** UV; Microwave; Mutation breeding; Coal solubilization strains; Product analysis

20 世纪 80 年代以来,微生物转化作为一种绿色温和的煤炭转化方式受到国内外研究者的广泛关注<sup>[1-2]</sup>.煤的微生物转化主要是利用真菌、细菌和放线菌等的生物作用实现煤炭的大分子解聚、液化和气化<sup>[3-4]</sup>.菌种选育对提高煤炭的生物溶煤率非常重要,诱变选育可以提高菌种突变率,加速育种进程,从而创造人类需要的新菌种.Taloria<sup>[5]</sup>等人利用紫外诱变对酿酒酵母进行选育后,其乙醇产率从原来的

收稿日期:2016-07-16

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(51304158)

\* 通信作者, E-mail: psu564@139.com



8% (v/v) 提升至 12% (v/v). 郭文逸<sup>[6]</sup>等人对地衣芽孢杆菌进行紫外诱变提高了丁二醇的产量. Jiang<sup>[7]</sup>等人从褐煤矿中分离出的芽孢杆菌对褐煤的溶解率可达 36.77% 以上. 孟庆宇<sup>[8]</sup>从神府煤矿洗煤水中分离出溶煤效果较好的菌株, 而从自然环境中分离, 经过简单筛选获得的溶煤菌株虽然具有一定的溶煤能力, 但是要达到某种特定代谢产物的大量积累, 以获得更好的溶煤效果, 则需要对菌株进行改良, 解除或突破微生物的代谢调控<sup>[9-10]</sup>. 徐敬尧<sup>[11]</sup>用紫外和微波诱变对球红假单胞菌的原生质体进行诱变选育, 将其应用于煤的生物转化, 结果其转化率显著提高.

本研究选用多种菌种进行溶煤实验, 以溶煤率最高的云芝菌为出发菌株, 利用紫外-微波复合诱变技术对其进行诱变选育, 以获得具有更高溶煤率的突变菌株, 并在分级萃取基础上, 采用 FTIR 及 GC/MS 分析方法对其溶煤产物的结构进行分析, 以期选育出具有高效溶煤率和选择性菌种, 为煤的高效生物转化做出有益的探索.

## 1 实验部分

### 1.1 实验主要试剂与仪器

葡萄糖,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{VB}_1$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ , 正己烷, 二氯甲烷, 苯, 丙酮, 甲醇. 盐酸均为分析纯,  $\text{KBr}$  为光谱纯.

BSA224S 型电子天平, BL-50A 型立式压力蒸汽灭菌器, BC-360 型生化培养箱, HZQ-F100 型全温振荡培养箱, SW-CJ-1FD 型超净工作台, ML-36-4 型电热板, 101-3 型电热鼓风干燥箱, XPM- $\phi 100 \times 4$  型行星四筒研磨机, Spectra GX FT-IR spectrometer 型红外光谱仪, 5975C/7890A 型气质联用仪.

### 1.2 实验材料

#### 1.2.1 煤样

本实验用神府煤样采自陕煤神木集团张家峁矿. 煤样经破碎、筛分, 选取粒度小于 0.2 mm 的煤样, 用 5 mol/L 的  $\text{HNO}_3$  在室温下氧化 24 h, 用去离子水洗至中性<sup>[11]</sup>, 在 75 °C 鼓风干燥箱中干燥后灭菌, 备用. 煤质分析见表 1.

表 1 神府煤煤质分析

工业分析/%				元素分析/%				
$M_{\text{ad}}$	$A_{\text{ad}}$	$V_{\text{daf}}$	$FC_{\text{ad}}$	$\omega(\text{C}_{\text{ad}})$	$\omega(\text{H}_{\text{ad}})$	$\omega(\text{O}_{\text{ad}})$	$\omega(\text{N}_{\text{ad}})$	$\omega(\text{S}_{\text{ad}})$
4.8	6.43	36.39	56.47	68.29	4.22	26.56	0.77	0.16

#### 1.2.2 菌种来源及培养条件

实验所用沙门氏菌、黄杆菌、大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌及云芝菌由西安科技大学化学与化工学院实验室保存. 分别用选取的七株菌对氧化煤样进行溶煤实验, 以溶煤率最高的菌株作为诱变出发菌株. 培养条件: 温度 37 °C, 液体培养摇床转速 130 r/min. 菌株培养采用综合马铃薯培养基, 生物溶煤实验采用牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[12]</sup>.

### 1.3 菌种诱变

#### 1.3.1 紫外诱变

以云芝菌为出发菌株, 选取培养 24 h 的云芝菌稀释至  $10^6$  个/mL, 分别吸取 0.5 mL 涂布于马铃薯固体平板培养基, 置于不同波长的紫外灯下 20 cm 处, 诱变时间为 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 s. 诱变后避光恒温培养 24 h, 以未诱变的平板菌落数为对照, 计算不同处理时间的致死率, 致死率的计算方法:

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照菌落数} - \text{诱变后菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100\%. \quad (1)$$

#### 1.3.2 微波诱变

选取培养 24 h 的云芝菌稀释至  $10^6$  个/mL, 吸取 0.5 mL 涂布于马铃薯固体平板培养基, 用频率为 2 450 MHz 的微波炉采用不同功率进行诱变, 通过每 10 s 换 1 次水的低温热分散法消除热效应, 诱变时间



为 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 s. 诱变后恒温培养 24 h, 以未诱变的平板菌落数为对照, 根据式(1) 计算不同处理时间的致死率.

### 1.3.3 紫外和微波复合诱变

取稀释好的云芝菌 0.5 mL 涂布于马铃薯固体平板培养基, 经紫外诱变后继续进行微波诱变作为复合诱变方式, 用不同波长的紫外诱变复合不同功率的微波诱变, 诱变时间为 30, 60 s. 诱变后恒温培养 24 h, 以未诱变的平板菌落数为对照, 根据式(1) 计算不同处理时间的致死率.

## 1.4 生物溶煤转化过程

### 1.4.1 生物溶煤方法

采用上述实验菌种, 包括诱变菌种. 采用液体溶煤方法进行煤的生物转化. 具体实验过程为先取若干试管, 分别加入 5 mL 的液体培养基, 高压灭菌消毒, 接入溶煤菌后恒温振荡培养 3 d. 加入 0.1 g 已灭菌的煤样, 置于恒温振荡培养箱继续培养 14 d 后对其溶煤产物进行离心, 分离收集残煤, 在 80 ℃ 下真空干燥残煤至恒重, 称重. 在离心的上清液中加入 1 mol/L 的 HCl 溶液观察是否有沉淀生成, 酸沉淀物经洗涤、离心、干燥, 称重后备用.

在 SK3200H 超声波发生器中依次用 25 ml 的正己烷、二氯甲烷、苯和丙酮对溶煤产物的酸沉淀进行分级萃取, 每级萃取时间至少 1 h, 萃取液经旋蒸后对其进行 GC/MS 检测, 原煤(RC) 经同样的方式萃取作为对照, 具体萃取流程见图 1, 各组分的酸沉淀率和萃取率见图 2.

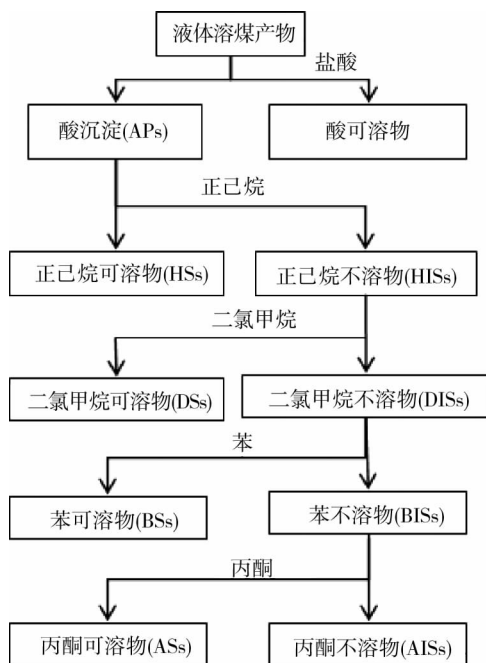


图1 溶煤产物的萃取流程

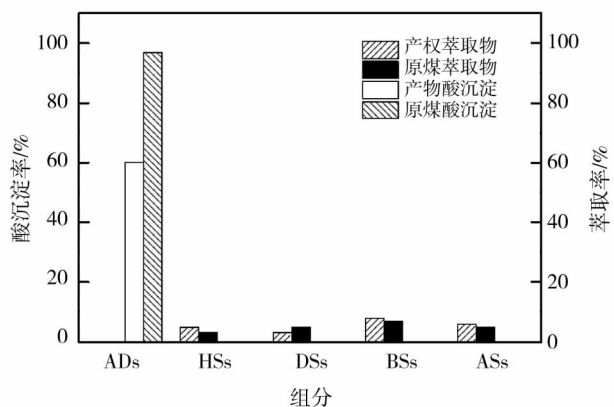


图2 各组分的酸沉淀率和萃取率

### 1.4.2 溶煤率和萃取率的计算方法

煤的生物转化率  $\eta_0$  为

$$\eta_0 = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\%. \quad (2)$$

式中:  $\eta_0$  为转化率, %;  $W_0$  为转化前煤样的质量, g;  $W_1$  为转化后残煤的质量, g.

酸沉淀率  $P$  为

$$P = \frac{W_{APs}}{W_0(1 - M_{ad} - A_{ad}) \times \eta_0} \times 100\%. \quad (3)$$

式中:  $P$  为溶煤产物的酸沉淀率, %;  $W_{APs}$  为酸沉淀的质量, g;  $M_{ad}$  为水分, %;  $A_{ad}$  为灰分, %.



萃取率  $X$  为

$$X_i = \frac{G_i - G_0}{G_{i-1}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:  $X_i$  为各级萃取率,%;  $G_i$  为称量瓶加  $i$  萃取物的质量,g;  $G_0$  为称量瓶质量,g;  $G_{i-1}$  为  $i$  上一级萃取物的质量,g;  $i = \text{HSs, DSs, BSs, Ass.}$

## 1.5 结构分析及表征

### 1.5.1 FTIR 分析

在 Spectra GX FT-IR spectrometer 型红外光谱仪上分析样品的官能团,采用 KBr 压片法,扫描范围为  $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$  分辨率为  $4\text{ cm}^{-1}$ ,扫描次数为  $15\text{ s}^{-1}$ .

### 1.5.2 GC/MS 分析

研究样品的 GC/MS 分析是在 5975C/7890A 型气质联用仪上进行的,测定条件为选择 HP-5MS 型毛细管柱,分析器为四极杆质量分析器,电子轰击电压  $70\text{ eV}$ ,氦气为载气,流量  $1.0\text{ ml}$ ,分流比  $20:1$ ,进样温度  $300\text{ }^\circ\text{C}$ ,质量扫描从  $30 \sim 500\text{ amu}$ .

产物组成结构的相对含量  $\sum \varphi$  为

$$\sum \varphi = P \times \sum (\varphi_i \times X_i) \quad (5)$$

式中:  $\sum \varphi$  为产物的总相对含量,%;  $P$  为溶煤产物的酸沉淀率,%;  $\varphi_i$  为某结构占各萃取组分的相对含量,%.

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶煤菌种的初步筛选

分别用沙门氏菌(SE)、云芝菌(CV)、黑曲霉菌(AN)、金黄色葡萄球菌(SA)、大肠杆菌(EC)、黄杆菌(FO)及枯草杆菌(BS)溶解神府煤,不同菌种对神府煤的转化率如图3所示,图3中同时给出 CV 菌溶煤前后溶煤混合物的照片.

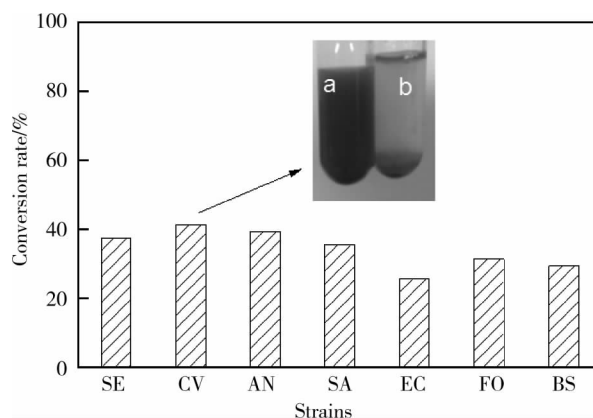
由图3可见,大肠杆菌对神府煤的转化率最低,为  $25.5\%$ ;云芝菌的转化率最高,为  $41.3\%$ ,而且从图3的照片可以看出经微生物作用后,培养液的颜色相比于转化前明显加深.云芝与黑曲霉菌属于真菌,其他菌种属于细菌.真菌能降解的底物具有广泛性,降解的化学过程通常是利用酶促反应产生底物自由基,再以链式的反应方式继续降解<sup>[13-14]</sup>,真菌分泌到胞外的降解酶包括木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶等<sup>[15]</sup>,这些胞外酶对具有类木质素结构的低阶煤具有降解作用,能对木质素结构中的大分子芳香结构攻击,使煤中大分子芳香结构断开,形成较小的小分子物质使其溶解,真菌对溶煤体系的适应性很强,因此,选用云芝菌做为诱变出发菌株.

### 2.2 云芝菌的诱变选育

#### 2.2.1 紫外诱变的影响

以云芝菌为出发菌株,分别采用波长为  $254\text{ nm}$  和  $365\text{ nm}$  紫外线对其进行不同时间的诱变处理,诱变结果如图4所示,图4中同时给出不同波长紫外在相同诱变时间后的菌落照片.

由图4可见,诱变  $60\text{ s}$  时,  $254\text{ nm}$  的紫外诱变对云芝菌的致死率为  $99.6\%$ ,而  $365\text{ nm}$  紫外诱变对云芝菌的致死率仅为  $78.9\%$ ,从图4的 a, b 这2幅照片中可以看出两种波长在同样的诱变时间下,对云芝菌的致死效应差异很大,诱变  $60\text{ s}$  以后,  $254\text{ nm}$  的紫外诱变将云芝菌基本全部致死,而  $365\text{ nm}$  紫外诱变的



a:生物转化后; b:生物转化前

图3 不同菌种对转化率的影响



致死率还在继续上升,由于紫外诱变使 DNA 分子的相邻嘧啶形成共价结合的嘧啶二聚体,使双链结构发生畸变,阻碍碱基之间的正常配对以引起微生物的突变和死亡,而核酸的最大紫外吸收波长为 254 nm,因此 365 nm 的紫外诱变效果不显著,因此 254 nm 的紫外对云芝菌的诱变效果最明显,故紫外诱变时间选用 60 s。

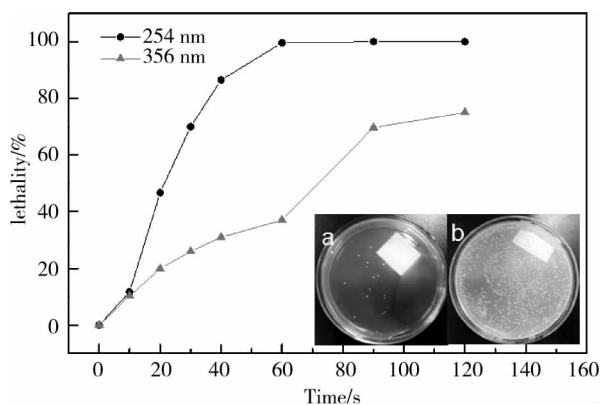
### 2.2.2 微波诱变的影响

以云芝菌为出发菌株,分别采用功率为 100 和 400 W 的微波对其进行不同时间的诱变处理,诱变结果如图 5 所示,图 5 中同时给出不同功率微波在相同诱变时间后的菌落照片。

如图 5 所示,微波诱变 30 s 时,采用 400 W 的微波对云芝的诱变致死率为 95.8%,而采用 100 W 的微波对云芝菌的诱变致死率仅为 60%,从图 5 的 2 照片中可以看出在同样的诱变时间下,不同功率对云芝菌的致死效应差异也很大,诱变 30 s 以后,400 W 的微波将云芝菌全部致死,而 100 W 微波诱变到 90 s 以后才全部将云芝菌致死,由于微波能引起细胞内极性分子转动,强烈的转动摩擦使得细胞内 DNA 分子受损,最终引起 DNA 分子结构变化导致遗传变异,从而引起微生物的生理生化变异<sup>[16]</sup>,使其迅速致死,因此 100 W 微波诱变的诱变效果弱于 400 W,故微波诱变时间选用 30 s。

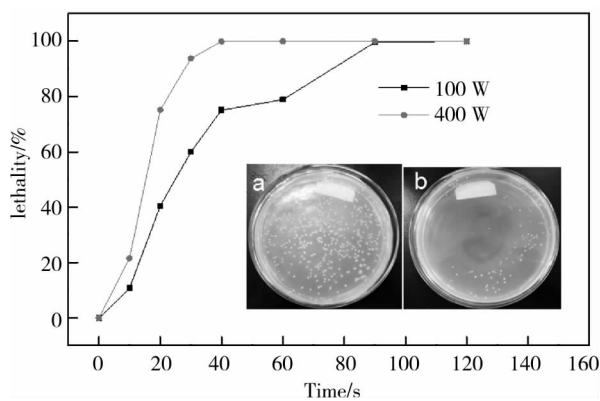
### 2.2.3 紫外-微波复合诱变的影响

分别用 4 种不同的复合诱变方式对云芝菌进行诱变,其诱变后菌落的生长形态如图 6 所示。



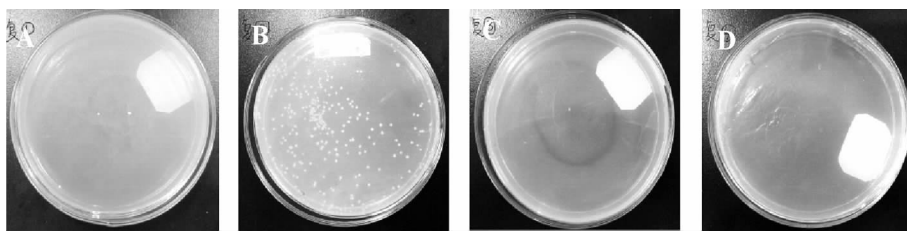
a: 254 nm 紫外诱变 60 s; b: 365 nm 紫外诱变 60 s

图 4 紫外波长对云芝菌的影响



a: 100 W 微波诱变 30 s; b: 400 W 微波诱变 30 s

图 5 微波功率对云芝菌的影响



A: 254 nm 紫外诱变 60 s, 100 W 微波诱变 30 s; B: 365 nm 紫外诱变 60 s, 100 W 微波诱变 30 s; C: 254 nm 紫外诱变 60 s, 400 W 微波诱变 30 s; D: 365 nm 紫外诱变 60 s, 400 W 微波诱变 30 s

图 6 紫外-微波复合诱变的菌落生长形态

由图 6 可见,4 种复合诱变方式的致死率依次为 99.9%, 81.9%, 100.0%, 100.0%, 其致死率均比单独条件下诱变的致死率高,说明复合诱变的诱变效果非常明显,复合诱变具有协同效应,云芝菌在复合诱变下存活率低,发生突变的概率最大,这是由于菌体在经过紫外光和微波场的处理后,微波诱变效应和紫外诱变效应都对菌体有协同诱变效应,大大提高了菌种的突变率.因此采用 254 nm 紫外诱变 60 s 复合 100 W 微波诱变 30 s 的复合方式对云芝菌的诱变效果最好。

### 2.3 煤的生物转化

采用 2.2.3 复合诱变 A 中得到的 3 个菌落,分别将这 3 个菌落培养后用 1.4.1 的方法进行溶煤实验,



结果发现菌落3的转化率最高,由此可见,采用254 nm紫外诱变60 s复合100 W微波诱变30 s的方式对云芝诱变后,得到的3株菌与未诱变的云芝菌相比,其对神府煤的溶煤率均有所提升,其中菌落3对神府煤的溶煤率达到了54.2%,本课题组王永娟<sup>[17]</sup>曾研究云芝对光氧化煤的转化率为23.13%,与之相比复合诱变生物转化率提高了134.3%,这表明在复合诱变条件下,云芝菌对煤的溶解效果增加,菌种经紫外-微波复合诱变后,发生突变导致其与降解煤炭相关的酶活增加,使溶煤率上升。

## 2.4 溶煤产物的结构分析

由图7可见,原煤在 $2\,920\text{ cm}^{-1}$ 为次甲基- $\text{CH}_2$ 对称伸缩振动, $2\,848\text{ cm}^{-1}$ 为次甲基- $\text{CH}_2$ 不对称伸缩振动, $1\,600\text{ cm}^{-1}$ 可能是羧酸根或芳烃 $\text{C}=\text{C}$ 或氢键缔合羰基- $\text{C}=\text{O}$ ,但原煤经生物转化后酸沉淀物的FTIR光谱特征发生了明显变化,在 $3\,417\text{ cm}^{-1}$ 附近的氢键缔合的羟基官能团明显加强, $2\,920$ 与 $2\,848\text{ cm}^{-1}$ 附近的次甲基明显减弱, $1\,707\text{ cm}^{-1}$ 附近出现较强的羰基- $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, $1\,200\sim 1\,300\text{ cm}^{-1}$ 附近酚类 $\text{C}-\text{O}$ 或芳香醚官能团明显减弱, $1\,157$ 和 $1\,080\text{ cm}^{-1}$ 附近出现较强的醇类或脂肪醚类官能团,结合较强的羟基及其它官能团特征,可以推断生物转化后酸沉淀物中有醇、醚及含羰基类物质生成。

用1.4.1中的方法将ADs萃取得到HSs,DSs,BSs及Ass这4种萃取组分,采用GC/MS对其进行结构分析,图8为各萃取组分的总离子流色谱图,可以明显看出产物萃取物比原煤萃取物的总离子流色谱图多出一些峰,说明产物出现了一些原煤萃取物中没有的物质,为进一步分析产物的组成,将每种萃取组分中物质的相对含量结合萃取率,根据式(2)~式(5)计算得到产物和原煤萃取物结构组成的相对含量如图9所示。

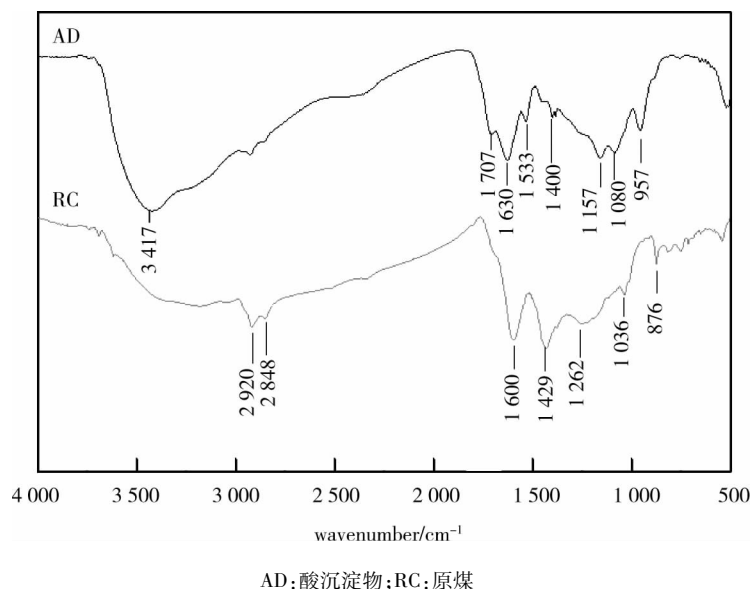


图7 原煤及溶煤产物的红外光谱图

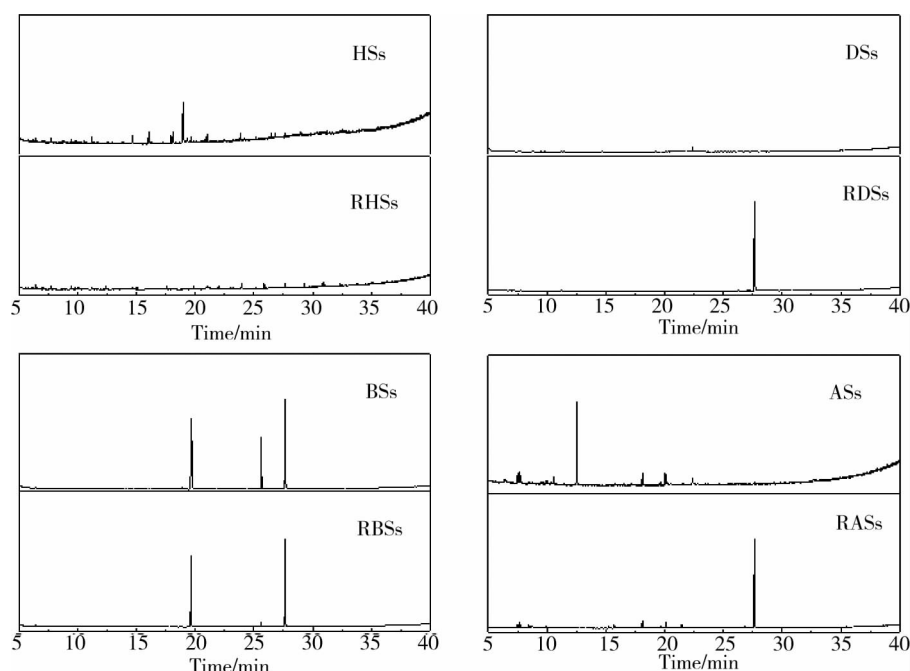


图8 不同溶剂萃取组分总离子流色谱



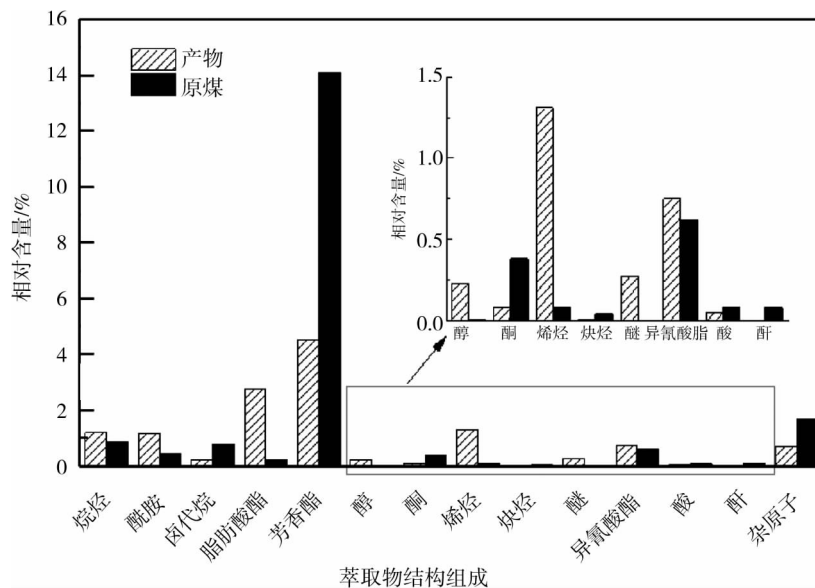


图9 萃取物结构组成的相对含量

图9所示,溶煤产物与原煤萃取组分中主要含有芳香酯和脂肪酸酯类物质,其余组分的相对含量较少.产物比原煤萃取组分中的烷烃、酰胺类、脂肪酸酯、醇、烯烃、醚及异氰酸酯的相对含量高,而卤代烷、芳香酯、酮、炔烃、酸及酸酐类物质的相对含量低于原煤.这说明经微生物作用,使煤的大分子结构解聚成为小分子烷烃类物质释放出来,导致烷烃、醚类物质含量增多;微生物的分泌物中富含氨基,容易与羧酸发生酰胺反应<sup>[18]</sup>,导致产物中酰胺类物质增多,酸类物质含量减少;微生物作用下,芳香类物质中的芳环结构被打开<sup>[19]</sup>,导致产物中的芳香类物质相对含量减少,烯烃的含量增多.微生物分泌的一些酶还可以氧化酮类物质,使产物中酮类物质含量降低,这与 FTIR 的分析结果相符.D.LCrawford 和 J.C Gupta<sup>[20]</sup>曾假设水解酶也可以攻击煤的结构,在产物中没有检测到酸酐类物质,说明在微生物作用下该类物质可能发生了水解作用.此外,产物中还检测到己二酸二辛酯的相对含量为 0.91%,与原煤相比,其相对含量提高约 5.35 倍,这种化合物有低温增塑剂、橡胶柔软剂、合成润滑油等用途<sup>[21-22]</sup>.

GC/MS 测得含羟基官能团的化合物较少,可能是这些物质为高极性或高相对分子质量的化合物或者是萃取物中低丰度信号被高丰度信号淹没而无法分析<sup>[23]</sup>.理论上,丙酮能从煤中萃取出类木质素的物质如树脂或氢化松香酸<sup>[24]</sup>,但是本实验只检测到了芳香酯、烷烃以及酰胺类的少量物质,这可能是试剂不纯或萃取操作时间不足引起的,这将会在以后进一步实验验证.

### 3 结论

1) 沙门氏菌、黄杆菌、大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌及云芝菌对煤的溶解率普遍较低,其中真菌的溶煤率比细菌的溶煤率高,云芝菌的溶煤率最高,约为 41.3%.

2) 紫外-微波复合诱变具有协同效应,最佳复合诱变条件为 254 nm 波长的紫外诱变 60 s 后复合 100 W 的微波诱变 30 s,诱变后的云芝菌溶煤率从 41.3% 提高到 54.2%.

3) 神府煤经生物转化产物中,芳香类物质相对含量降低,烷烃、酰胺、烯烃、醇及醚类物质增加,产物中己二酸二乙基己酯是一种具有良好生物降解性能及良好的润滑性能的增塑剂,也可作为绿色润滑油基础油.因此,在随后的研究工作中有必要进一步探讨影响其产率的关键因素.

### 参考文献:

- [1] Fakoussa R M, Frost P J. In vivo-decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus trametes versicolor[J].



- Applied Microbiology & Biotechnology, 1999, 52(1):60-65.
- [2] Gao Z. Sustainable development and upgrading mode of coal industry in China[J]. International Journal of Mining Science & Technology, 2012, 22(3):335-340.
- [3] 石开仪,陶秀祥,尹苏东,等.抚顺褐煤的微生物溶煤[J].中国矿业大学学报,2007,36(3):339-342.
- [4] 陈慧,陶秀祥,石开仪,等.一株自选溶煤真菌特性及其溶煤条件研究[J].中国矿业大学学报,2009,38(1):119-124.
- [5] Taloria D, Samanta S, Das S, et al. Increase in bioethanol production by random UV mutagenesis of *S. cerevisiae* and by addition of Zinc Ions in the alcohol production Media[J]. APCBEE Procedia, 2012(2):43-49.
- [6] 郭文逸,潘学玮,尤甲甲,等.紫外诱变筛选低自溶高产2,3-丁二醇的地衣芽孢杆菌突变子[J].食品与发酵工业,2015,41(6):41-46.
- [7] Jiang F, Li Z, Lv Z, et al. The biosolubilization of lignite by *Bacillus* sp. Y7 and characterization of the soluble products[J]. Fuel, 2013, 103: 639-645.
- [8] 孟庆宇,周安宁,王永娟,等.神府煤生物转化用溶煤菌株的优选研究[J].化学与生物工程,2008,25(9):30-33.
- [9] 曲音波.微生物技术开发原理[M].北京:化学工业出版社,2005:52-59.
- [10] Kirschvink J L. Microwave absorption by magnetite: A possible mechanism for coupling nonthermal levels of radiation to biological systems[J]. Bioelectromagnetics, 1996, 17(3):187-194.
- [11] 徐敬尧,张明旭.球红假单胞菌原生质体的微波诱变及其煤炭降解转化[J].中国矿业大学学报,2014,43(1):132-138.
- [12] 王永娟.神府煤生物转化高效菌株的优选研究[D].西安:西安科技大学,2008.
- [13] 司静,李伟,崔宝凯,等.真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展[J].生物技术通报,2011(2):48-55.
- [14] 张博.东北白腐真菌高效产酶及降解多环芳烃特征研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2014.
- [15] 张明旭,王龙贵,欧泽深,等.几种木质素降解菌的筛选及其协同作用降解煤炭的研究[J].煤炭学报,2007,32(6):634-638.
- [16] 马双忱,姚娟娟,金鑫,等.微波化学中微波的热与非热效应研究进展[J].化学通报,2011,74(1):41-46.
- [17] 王永娟,李慧.云芝对光氧化预处理神府煤的生物转化[J].煤炭学报,2008(11):1305-1308.
- [18] Jiang K, Schädler L S, Siegel R W, et al. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation[J]. J Mater Chem, 2004, 14(1):37-39.
- [19] 范芳芳.白腐真菌漆酶基因表达调控及其功能研究[D].武汉:华中科技大学,2013.
- [20] Crawford D L, Gupta R K. Microbial depolymerization of coal[J]. Microbial Transformations of Low Rank Coals,1993:65-92.
- [21] Kolwzan B, Gryglewicz S. Synthesis and biodegradability of some adipic and sebacic esters[J]. Journal of Synthetic Lubrication, 2003, 20(2):99-107.
- [22] Chaibakhsh N, Rahman M B A, Vahabzadeh F, et al. Optimization of operational conditions for adipate ester synthesis in a stirred tank reactor[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010, 15(5):846-853.
- [23] Lazaro M J, Herod A A, Kandiyoti R. Comparison of fractionation of a coal tar pitch by solvent solubility and by planar chromatography[J]. Fuel, 1999, 78(7):795-801.
- [24] Fakoussa R M, Hofrichter M. Biotechnology and microbiology of coal degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52:25-40.