



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118564282 B

(45) 授权公告日 2025. 06. 13

(21) 申请号 202410491804.X

C12N 1/20 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.23

C12N 11/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12M 1/00 (2006.01)

申请公布号 CN 118564282 A

C12M 1/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.08.30

C09K 3/22 (2006.01)

(73) 专利权人 山东科技大学

C12R 1/08 (2006.01)

地址 266590 山东省青岛市黄岛区前湾港  
路579号

C12R 1/10 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(72) 发明人 胡相明 刘金迪 赵艳云 冯月

C12R 1/125 (2006.01)

李晓 吴明跃 郭永翔 於孝牛

C12R 1/01 (2006.01)

程卫民 刘玉

C12R 1/385 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

(74) 专利代理机构 济南格源知识产权代理有限

(56) 对比文件

公司 37306

CN 117603653 A, 2024.02.27

CN 113355052 A, 2021.09.07

专利代理师 郭兵兵

审查员 白玉兰

(51) Int. Cl.

E21F 5/08 (2006.01)

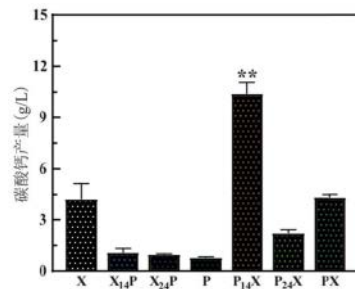
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用  
微生物促进剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于生物表面活性剂菌的  
固定化矿用微生物促进剂包括固定化生物表面  
活性剂菌、固定化矿化菌、激活液和胶结剂。首先  
通过将生物表面活性剂菌和矿化菌接种至激活  
液中,获得生物表面活性剂菌和矿化菌发酵液;  
然后通过固定化材料分别对生物表面活性剂菌  
和矿化菌进行选择性的吸附及富集,得到固定化  
生物表面活性剂菌和固定化矿化菌。所述固定化  
矿用微生物促进剂不仅能够改善微生物促进剂  
应用于煤尘时的疏水性,还能通过两株菌之间的  
互利共生实现矿化能力的提升及碳酸钙晶体形  
状的转变。此外,生物表面活性剂菌表面具有负  
电荷,能作为碳酸盐沉淀的成核位点,加速碳酸  
盐沉淀。



1. 一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,包括固定化生物表面活性剂菌、固定化矿化菌、激活液和胶结剂;所述激活液和胶结剂在使用前分别独立包装;

所述固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌的制备方法包括以下步骤:

(1) 将激活液用氢氧化钠调至pH为中性,灭菌,再将活化后的生物表面活性剂菌或矿化菌接种至灭菌后的激活液中,于培养箱中培养,得到生物表面活性剂菌发酵液或矿化菌发酵液;

(2) 分别将步骤(1)所述的生物表面活性剂菌发酵液或矿化菌发酵液依次经离心、去除上清液、加入无菌生理盐水操作,重复所述操作至少三次,得到均匀的生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液;

(3) 将固定化材料经灭菌后,加入生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液中,再加入灭菌后的激活液,密封恒温培养后,得到固定化生物表面活性剂菌液或固定化矿化菌液;

(4) 将固定化生物表面活性剂菌液或固定化矿化菌液通过过滤筛过滤,并利用冻干机进行冷冻干燥,得到固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌;

所述固定化材料的制备方法,步骤如下:

S1. 将固定物依次经蒸馏水清洗、NaOH水溶液浸泡、去离子水洗涤、干燥,得到碱处理的固定物;

S2. 将纳米二氧化钛颗粒和超疏水涂膜材料加入激活液乙醇中分散均匀,得到乳白色悬浮液;

S3. 将步骤S1所述碱处理的固定物浸泡于步骤S2所述悬浮液中,再经干燥,得到固定化材料。

2. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌的总质量与激活液、胶结剂的体积之比为(1~3)g:(65~75)mL:(5~10)mL。

3. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤(1)灭菌的条件:于121°C灭菌20 min;培养的条件:于30°C、150 rpm搅拌转速下培养48 h。

4. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤(2)所述生物表面活性剂菌菌悬液和矿化菌菌悬液的浓度分别为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  CFU/mL。

5. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤(3)中所述生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液与激活液的体积比为1:(99~105)。

6. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤(3)培养的条件:于25°C,150 rpm搅拌转速下培养24 h。

7. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤S1中NaOH水溶液的浓度为1~1.2 mol/L,浸泡时间为24 h;所述洗涤的次数为3~5次;冷冻干燥的方法为在真空冷冻干燥箱中于65°C下干燥至恒重。

8. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤S1中所述固定物为丝瓜络、秸秆、甘蔗渣、玉米芯中的至少一种;所述固定物的粒径为30~40 mm。

9. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤S2中所述超疏水

涂膜材料为石蜡、聚四氟乙烯、石墨烯中的至少一种。

10. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤S2:分别取2~5 g纳米二氧化钛颗粒和1 g超疏水涂膜材料加入100 mL乙醇中,超声分散2~4 h,得到乳白色悬浮液。

11. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,步骤S3中浸泡时间为12 h;所述干燥为在60°C的烘箱中干燥24 h。

12. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述生物表面活性剂菌选自短芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、地衣芽孢杆菌或棒状杆菌中的至少一种,细菌浓度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL;所述矿化菌选自胶冻样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、巴氏芽孢八叠球菌、球形芽孢杆菌中的至少一种,细菌的浓度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  CFU/mL。

13. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述激活液包括 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,还包括酵母提取物或蛋白胨。

14. 根据权利要求13所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述激活液包括下列重量份数的组分:酵母提取物或蛋白胨2000~3000份, $\text{NH}_4\text{Cl}$  1000~2000份, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100~150份、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  200~300份。

15. 根据权利要求1所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述胶结剂中包含可溶性钙盐和尿素。

16. 根据权利要求15所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述可溶性钙盐为甲酸钙、氯化钙、乳酸钙、醋酸钙中的至少一种。

17. 根据权利要求15所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述可溶性钙盐的摩尔浓度为0.8~1.0 mol/L。

18. 根据权利要求15所述的固定化矿用微生物促进剂,其特征在于,所述可溶性钙盐与尿素的摩尔浓度比为1:1。

19. 如权利要求1-18任一项所述的固定化矿用微生物促进剂的应用,用于煤尘固结,其特征在于,步骤如下:

分别取固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌加入灭菌后的激活液中,恒温培养后得到复合微生物发酵液,将所述复合微生物发酵液和灭菌后的胶结剂先后喷洒至煤尘;

所述固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌加入灭菌后的激活液中的方式为:先将1份固定化生物表面活性剂菌加入灭菌后的激活剂中,培养14 h后再加入1份固定化矿化菌,继续培养10 h;

所述复合微生物发酵液与胶结剂的体积比为(13~15):(1~2)。

## 一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂及其制备方法,属于煤矿防尘、抑尘技术领域。

### 背景技术

[0002] 为解决煤尘污染问题研究开发无二次污染、抑尘效果好、价格低廉的抑尘剂迫在眉睫。化学抑尘剂通过多种化学物质结合而成,不可避免地会对原有环境中微生物的生长特性产生不利影响,且不易降解、容易造成二次污染。微生物诱导碳酸盐沉淀(MICP)技术在自然界中是一种普遍的现象。据报道,通过将MICP技术作用到煤尘上,生成的具有胶凝作用的碳酸盐沉淀能够将煤尘颗粒粘结,形成固结层,最终实现煤尘防治。然而,煤尘表面含有众多的疏水基团(如脂肪烃和芳香烃),导致抑尘剂应用在煤尘上时存在润湿性差、渗透难的问题。目前,大量研究表明抑尘剂在煤尘防治领域的应用中需要添加表面活性剂,表面活性剂可以提高溶液的润湿性,从而增加抑尘材料与煤尘的接触。当喷洒微生物抑尘剂时,如果不添加表面活性剂,抑尘剂难以渗透,产生的碳酸盐沉淀只能固结煤尘表面,固结效果差,易造成二次扬尘。

[0003] 生物表面活性剂是由微生物分泌代谢合成的一种天然表面活性化合物,并具有改善物质表面润湿性能的非均相次级代谢产物。与化学表面活性剂相比生物表面活性剂具有环境友好性、易降解等特征。因此,生物表面活性剂的添加可以增强微生物抑尘剂在煤尘中的渗透、吸附和滞留。如何将生物表面活性剂菌结合矿化技术应用到微生物的煤尘防治领域成为推动微生物抑尘剂在粉尘防治领域的发展而亟待解决的问题。

### 发明内容

[0004] 本发明针对上述问题,提供了一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂及其制备方法,所述固定化矿用微生物促进剂能够在发酵过程中产生生物表面活性剂进而改善煤尘本身的疏水性;同时通过菌体共生促进矿化菌发挥矿化作用,提高抑尘效果。此外,表面具有负电荷的生物表面活性剂菌能够作为微生物诱导碳酸盐沉淀过程中碳酸盐沉淀的成核位点,加速碳酸盐沉淀。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂,包括固定化生物表面活性剂菌、固定化矿化菌、激活液和胶结剂;所述激活液和胶结剂在使用前分别独立包装。

[0007] 优选的,所述固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌的总质量与激活液、胶结剂的体积之比为(1~3)g:(65~75)mL:(5~10)mL。

[0008] 优选的,所述固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌的制备方法包括以下步骤:

[0009] (1) 将激活液用氢氧化钠调至pH为中性,灭菌,再将活化后的生物表面活性剂菌或

矿化菌接种至灭菌后的激活液中,于培养箱中培养,得到生物表面活性剂菌发酵液或矿化菌发酵液;

[0010] (2) 分别将步骤(1)所述的生物表面活性剂菌发酵液或矿化菌发酵液依次经离心、去除上清液、加入无菌生理盐水操作,重复所述操作至少三次,得到均匀的生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液;

[0011] (3) 将固定化材料经灭菌后,加入生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液中,再加入灭菌后的激活液,密封恒温培养后,得到固定化生物表面活性剂菌液或固定化矿化菌液;

[0012] (4) 将固定化生物表面活性剂菌液或固定化矿化菌液通过过滤筛过滤,并利用冻干机进行冷冻干燥,得到固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌。

[0013] 进一步优选的,步骤(1)所述灭菌条件:于121°C灭菌20min;所述培养条件:于30°C、150rpm搅拌转速下培养48h。

[0014] 进一步优选的,步骤(2)所述生物表面活性剂菌菌悬液和矿化菌菌悬液的浓度分别为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/mL。

[0015] 进一步优选的,步骤(3)中所述生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液与激活液的体积比为1:(99~105)。

[0016] 进一步优选的,步骤(3)所述培养条件:于25°C,150rpm搅拌转速下培养24h。

[0017] 进一步优选的,步骤(3)所述固定化材料的制备方法,步骤如下:

[0018] S1.将固定物依次经蒸馏水清洗、NaOH水溶液浸泡、去离子水洗涤、干燥,得到碱处理的固定物;

[0019] S2.将纳米二氧化钛颗粒和超疏水涂膜材料加入激活液乙醇中分散均匀,得到乳白色悬浮液;

[0020] S3.将步骤S1所述碱处理的固定物浸泡于步骤S2所述悬浮液中,再经干燥,得到固定化材料。

[0021] 更进一步优选的,步骤S1中所述NaOH水溶液浓度为1~1.2mol/L,浸泡时间为24h;所述洗涤的次数为3~5次;所述干燥方法为在真空冷冻干燥箱中于65°C下干燥至恒重。

[0022] 更进一步优选的,步骤S1中所述固定物为丝瓜络、秸秆、甘蔗渣、玉米芯中的至少一种;所述固定物的粒径为30~40mm。

[0023] 更进一步优选的,步骤S2中所述超疏水涂膜材料为石蜡、聚四氟乙烯、石墨烯中的至少一种。

[0024] 更进一步优选的,步骤S2:分别取2~5g纳米二氧化钛颗粒和1g超疏水涂膜材料加入100mL乙醇中,超声分散2~4h,得到乳白色悬浮液。

[0025] 更进一步优选的,步骤S3中浸泡时间为12h;所述干燥为在60°C的烘箱中干燥24h。

[0026] 优选的,所述生物表面活性剂菌选自短芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、地衣芽孢杆菌或棒状杆菌中的至少一种。

[0027] 优选的,所述矿化菌选自胶冻样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巴氏芽孢八叠球菌、解淀粉芽孢杆菌、球形芽孢杆菌中的至少一种。

[0028] 优选的,所述激活液中包括 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,还包括酵母提取物或蛋白胨。进一步优选的,所述激活液包括下列重量份数的组分:酵母提取物或蛋白胨2000~

3000份,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1000~2000份,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100~150份,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  200~300份。

[0029] 优选的,所述胶结剂中包含可溶性钙盐和尿素。

[0030] 进一步优选的,所述可溶性钙盐为甲酸钙、氯化钙、乳酸钙、醋酸钙中的至少一种。

[0031] 更进一步优选的,所述可溶性钙盐与尿素的摩尔浓度比为1:1。

[0032] 更进一步优选的,所述可溶性钙盐的摩尔浓度为0.8~1.0mol/L。

[0033] 所述基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂的应用,用于煤尘固结,步骤如下:

[0034] 分别取固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌加入灭菌后的激活液中,恒温培养后得到复合微生物发酵液,将所述复合微生物发酵液和灭菌后的胶结剂先后喷洒至煤尘。

[0035] 优选的,所述固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌加入灭菌后的激活液中的方式为:先将1份固定化生物表面活性剂菌加入灭菌后的激活剂中,培养14h后再加入1份固定化矿化菌,继续培养10h。

[0036] 优选的,所述复合微生物发酵液与胶结剂的体积比为(13~15):(1~2)。

[0037] 本发明还提供上述固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌的生产装置,按照生产工艺流程方向依次包括恒温振荡培养器、连接管、固定化细菌溶液储罐、过滤振动筛、传送带、冻干机;所述恒温振荡培养器出料口与连接管入口相连,所述连接管出口垂直设置于所述固定化细菌溶液储罐开口上方;所述过滤振动筛设置于所述固定化细菌溶液储罐出口下方,所述传送带的一端设于过滤振动筛下方,另一端设于冻干机的入口上方。

[0038] 本发明中,利用上述生产装置制备固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌的过程如下:

[0039] (1) 取1份的固定化材料加入13~15份的激活液和1~2份生物表面活性剂菌菌悬液或矿化菌菌悬液,利用恒温振荡培养器以30°C、150rpm的培养条件培养48h,得到固定化生物表面活性剂菌液或固定化矿化菌液;

[0040] (2) 通过连接管将固定化生物表面活性剂菌液或固定化矿化菌液传输到固定化细菌溶液储罐中,并落入过滤振动筛实现固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌和发酵液的分离;

[0041] (3) 固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌经过传动带传送至冻干机中,实现固定化生物表面活性剂菌或固定化矿化菌的冷冻干燥。

[0042] 本发明基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂,主要是利用生物表面活性剂菌能够在细菌的生长过程中产生生物表面活性剂,生物表面活性剂能够改善煤尘本身的疏水性,增强微生物促进剂的润湿及渗透能力。生物表面活性剂能够增加粘连作用,使得大量的微生物相互粘连形成聚集体。并且生物表面活性剂菌的表面带有负电荷可以增加成核位点,加速碳酸盐沉淀。

[0043] 通过添加尿素试剂,即在液相环境中添加矿化菌中脲酶的分解底物,能够分解产生铵根离子和碳酸根离子。可溶性钙盐能够为碳酸盐的沉淀提供钙离子,生成具有胶凝作用的碳酸盐沉淀。即本发明提供的固定化矿用微生物促进剂能够有效的为微生物诱导碳酸钙沉淀提供基础的保障,解决微生物促进剂应用在煤尘上面面临的疏水性等问题,同时也实现了绿色环保,无污染,成本低的目的。

[0044] 本发明与现有技术相比具有以下优点：

[0045] (1) 本发明固定化矿用微生物促进剂中包含对施用环境和微生物无毒害的生物表面活性剂，增大了使用过程中菌液和矿化底物的渗透，增加了煤尘固结层的厚度。

[0046] (2) 本发明制备的固定化材料具有疏水性，易清洁可循环利用，并且具有较大的比表面积，有利于细菌的均匀分布。

[0047] (3) 矿化菌在培养过程中会产生脲酶，脲酶会分解尿素，产生碳酸盐离子，产出的碳酸盐离子在使用过程中会与矿化液中的钙离子结合形成碳酸钙，绿色环保，无污染。

[0048] (4) 本发明利用细菌的矿化和乳化作用进行煤粉固化，无二次污染，成本低，效果好，在露天煤矿具有很好的应用前景，值得大范围推广。

[0049] (5) 本发明的固定化矿用微生物促进剂与化学抑尘剂和普通生物抑尘剂相比具有施工方便、绿色无污染的特点。

## 附图说明

[0050] 图1为不同接种顺序下复合微生物发酵液中细菌的生长曲线；

[0051] 图2为不同接种顺序下的固定化矿用微生物促进剂产碳酸钙量；

[0052] 图3为不同接种顺序下固定化矿用微生物促进剂产生碳酸钙的电镜图；

[0053] 图4为不同接种顺序下固定化矿用微生物促进剂在煤上的接触角；

[0054] 图5为煤粉经不同接种顺序固定化矿用微生物促进剂处理后的抗风蚀性能；

[0055] 图6为本发明实施例1中所述的材料生产装置，其中：1、恒温振荡培养器；2、连接管；3、固定化细菌溶液储罐；4、过滤振动筛；5、传送带；6、冻干机。

## 具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0057] 实施例1

[0058] 一种基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂及其制备方法。

[0059] 所述基于生物表面活性剂菌的固定化矿用微生物促进剂的制备方法包括以下步骤：

[0060] I. 固定化材料的制备方法，步骤如下：

[0061] S1. 将丝瓜络用蒸馏水清洗，放置在1mol/L的NaOH水溶液中，浸泡24h。随后用去离子水将丝瓜络洗涤5次，去除残留的NaOH。然后将碱处理的丝瓜络放置在65℃的真空冷冻干燥箱中干燥至恒重。

[0062] S2. 分别取2g纳米二氧化钛颗粒和1g石蜡加入到100mL乙醇中，超声分散2~4h，得到乳白色悬浮液。

[0063] S3. 将碱处理的丝瓜络浸入悬浮液中12h后，置于60℃的烘箱中干燥24h，得到固定化材料。

[0064] II. 固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌的制备，步骤如下：

[0065] (1) 将2000份酵母提取物、1000份 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、100份 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、200份 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 用1mol/L的氢氧化钠,调至 $\text{pH}=7$ ,置于立式高压灭菌锅 $121^\circ\text{C}$ ,灭菌20min。利用移液枪将活化后的铜绿假单胞菌和巴氏芽孢八叠球菌分别接种至灭菌后的激活液中,放置在恒温振荡培养器1中培养48h,培养条件为150rpm,  $30^\circ\text{C}$ ,分别得到生物表面活性剂菌和矿化菌的发酵液。

[0066] (2) 分别取30mL生物表面活性剂菌和矿化菌的发酵液在8000rpm的条件下离心5min,去除上清液;加入5mL无菌生理盐水在8000rpm的条件下离心5min,洗涤菌沉淀两次后去掉上清液并加入5mL无菌生理盐水得到均匀的生物表面活性剂菌和矿化菌的菌悬液。

[0067] (3) 分别称取两份1.0g、3.0g、5.0g、7.0g、10.0g洗净烘干的固定化材料置于两个100mL锥形瓶中,在高压灭菌锅中灭菌20min,用移液枪分别加入1mL生物表面活性剂菌和矿化菌的菌悬液于锥形瓶中,每个锥形瓶加入99mL的激活液,用封口膜密封瓶口,在恒温振荡培养器1中于 $25^\circ\text{C}$ ,150rpm培养24h,得到固定化生物表面活性剂菌液和固定化矿化菌液。

[0068] (4) 将固定化生物表面活性剂菌液和固定化矿化菌液通过连接管2运输至固定化细菌溶液储罐3,利用过滤振动筛4过滤,并经过传送带5传送至冻干机6进行冷冻干燥,得到固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌。

[0069] III. 取固定化生物表面活性剂菌1g、固定化矿化菌1g、激活液75mL和胶结剂5mL得到固定化矿用微生物促进剂,其中激活液和胶结剂分别独立包装。

[0070] 实验1

[0071] 将步骤II (3) 固定化生物表面活性剂菌液和固定化矿化菌液静置,收集上清液,在2000rpm下离心10min,在上清液表面以下1cm处收集最终样品,通过测量样品的OD值,计算固定化材料表面吸附的微生物细胞数量,结果如表1所示。

[0072] 表1不同质量固定化材料的微生物吸附量

	固定化材料质量 (g)	1.0	3.0	5.0	7.0	10.0
[0073]	固定化生物表面活性剂菌吸附量 (mg/g)	25.67	40.29	39.18	32.41	21.85
	固定化矿化菌吸附量 (mg/g)	17.89	26.73	28.52	23.64	15.34

[0074] 表1表明:随着固定化材料质量的增加,固定化材料吸附微生物细胞的数量呈现先增加后下降的趋势。随着煤尘质量的增加,吸附容量先增大后减小,这可能是由于微生物细胞数量不足以适应增加的固定化材料,导致整体吸附量下降。其中,当固定化材料的质量为3.0-5.0g时,固定化材料吸附的微生物细胞数量分别达到最高为39.18-40.29mg/g和26.73-28.52mg/g。因此,在制备固定化生物表面活性剂菌和固定化生物矿化菌时100mL的菌液( $1 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ )中选用固定化材料的质量为3.0-5.0g。

[0075] 实验2

[0076] 固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌同实施例1中;

[0077] 按照质量比为1:1称取1.0g、2.0g、3.0g、4.0g、5.0g、6.0g、7.0g、8.0g的固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌置于灭菌后含有75mL的激活液中,用封口膜密封瓶口,在

恒温振荡培养器1中于25℃,150rpm培养48h,测定样品的OD值,根据OD值反应不同质量下固定化细菌的生长特征,结果如表2所示。

[0078] 表2不同质量下固定化细菌的生长量

[0079]	固定化细菌质量 (g)								
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	
OD600	1.287	1.293	1.307	1.286	1.279	1.274	1.268	1.251	

[0080] 表2表明:随着固定化细菌质量的增加,不同质量下固定化细菌的生长量呈现先增加后下降的趋势,这可能是由于随着固定化细菌质量的增加,细菌在激活液中的生长量增加。然而激活液中的营养物质有限,这导致细菌之间存在竞争关系,当固定化细菌初始添加量过高时,反而导致细菌的生长量下降。因此,在选用固定化细菌培养时,固定化生物表面活性剂菌和固定化矿化菌的总质量选用1.0-3.0g。

[0081] 实验3

[0082] 取1.0g固定化生物表面活性剂菌和/或1.0g固定化矿化菌接种至灭菌后的75mL激活液中,并根据细菌的接种时间设置了一组微生物发酵液:X、X<sub>14</sub>P、X<sub>24</sub>P、P、P<sub>14</sub>X、P<sub>24</sub>X、PX,P表示接种固定化生物表面活性剂菌,X表示接种固定化矿化菌,14表示接种一株细菌14h后接种另外一株细菌,24表示接种一株细菌24h后接种另外一株细菌。将上述微生物发酵液均放置在恒温振荡培养箱中培养48h,培养条件为150rpm,30℃。在48h内每隔一段时间,在超净工作台中取200μL锥形瓶中的微生物发酵液,用酶标仪测量波长为600nm时的吸光度,反映菌的生长曲线。所测得的结果如图1所示,图1为不同接种顺序下微生物发酵液中细菌的生长曲线。

[0083] 实验4

[0084] 将实验3制备的微生物发酵液75mL加入经滤头灭菌后的氯化钙(36g/L)和尿素(20g/L)5mL混合溶液中,放置在恒温振荡培养箱中矿化7d,培养条件为150rpm,30℃。将矿化完成的复合微生物发酵液通过滤纸进行过滤,并用烘干箱于100℃进行烘干,烘干后称滤纸和沉淀总质量,记为M1;用0.7mol/L的盐酸对滤纸和沉淀进行洗涤,去除碳酸钙沉淀,烘干,称重,记为M2;碳酸钙的重量为M1-M2(表3)。

[0085] 表3不同接种顺序下的固定化矿用微生物促进剂产碳酸钙量

[0086]	处 理 方 式	碳酸钙沉淀量 (g/L)						
		X	X <sub>14</sub> P	X <sub>24</sub> P	P	P <sub>14</sub> X	P <sub>24</sub> X	PX
M1-		4.19±0.	1.07±0.	0.96±0.	0.77±0.	10.40±	2.20±0.	4.31±0.
M2		93	25	05	07	0.7	22	19

[0087] 如图2不同接种顺序下的固定化矿用微生物促进剂产碳酸钙量;结果表明:单一固定化细菌和复合固定化细菌矿化7d后,固定化矿化菌X和复合固定化细菌 $P_{14}X$ 、PX的碳酸钙产量较高。固定化矿化菌X矿化7d后碳酸钙产量为 $4.19 \pm 0.93\text{g/L}$ ,与复合固定化细菌PX相似( $4.31 \pm 0.19\text{g/L}$ )。复合固定化细菌 $P_{14}X$ 的碳酸钙产量可达 $10.4 \pm 0.70\text{g/L}$ ,分别比固定化矿化菌X和复合固定化细菌PX高148.21%和141.30%。 $P_{24}X$ 的碳酸钙产量为 $2.20 \pm 0.22\text{g/L}$ ,低于 $P_{14}X$ 。这说明当生物表面活性剂菌接种14h后再接种矿化菌会促进碳酸钙的沉淀量。

[0088] 如图3不同接种顺序下固定化矿用微生物促进剂产生碳酸钙的电镜图,其中:A为X,B为 $X_{14}P$ ,C为 $X_{24}P$ ,D为P,E为 $P_{14}X$ ,F为 $P_{14}X$ 的局部放大图,G为 $P_{24}X$ ,H为PX。由图可知:单一固定化细菌的矿化产物呈球形,属于球霏石型碳酸钙。复合固定化细菌产生的矿化产物为球霏石型和方解石型碳酸钙。其中,复合固定化细菌 $P_{14}X$ 清晰地显示出球霏石型碳酸钙与方解石型碳酸钙共存,且球霏石型碳酸钙逐渐转变为稳定的方解石型碳酸钙,说明了生物表面活性剂菌接种14h后再接种矿化菌会提高碳酸钙晶体的稳定性。

#### [0089] 实验5

[0090] 将煤粉(1g,200目)通过压片机以15MPa的压力压入煤粉样品中,制成煤饼。采用光学接触角测量仪进行接触角(座滴法)试验,比较了不同接种方式(接种方式同实验3中)培养的细菌溶液生产的生物表面活性剂对煤的润湿性影响。图4为不同接种顺序下固定化矿用微生物促进剂或水(W)对煤的润湿性影响,结果表明:水(W)在煤表面的接触角为 $78.2-77.59^\circ$ ,固定化矿化菌菌液(X)在煤表面的接触角为 $78.16-71.33^\circ$ 。固定化矿化菌菌液(X)与水(W)在煤表面的接触角最初为 $78^\circ$ 左右,但在1min内,固定化矿化菌菌液(X)的接触角减小。此外,复合菌液 $P_{14}X$ 对煤的润湿性能最好。1min后,煤表面张力下降34.27%。

#### [0091] 实验6

[0092] 称取一定质量的煤粉装入 $\Phi \times h$ 为 $10 \times 100\text{mm}$ 的量筒中,用玻璃棒夯实煤粉,使量筒中的煤粉高度为10cm,并加入5mL不同接种方式(接种方式同实验3中)下的微生物发酵液进行渗透实验。用直尺测量20min内渗透的深度,结果如表4所示。

[0093] 表4煤粉的渗透深度

处理方 式	X	$X_{14}P$	$X_{24}P$	P	$P_{14}X$	$P_{24}X$	PX
渗透深 度(cm)	1.18	3.49	3.83	2.53	5.02	4.34	4.62

[0095] 表4表明:单一固定化细菌菌液与复合固定化细菌菌液的渗透深度相比,复合固定化细菌菌液的渗透深度明显增加。复合固定化细菌菌液的渗透深度随着接种顺序的不同也表现出不同的渗透性能。其中,复合固定化细菌菌液 $P_{14}X$ 明显高于其他复合固定化细菌菌液,这说明固定化生物表面活性剂菌接种14h后再接种固定化矿化菌会促进生物表面活性剂的产生。

#### [0096] 实验7

[0097] 取18mL不同接种方式(接种方式同实验3中)下制备的微生物发酵液置于喷壶中。

用培养皿称取30g的120目煤粉,将不同接种方式下制备的微生物发酵液15mL喷洒至培养皿中的煤粉后,再次喷洒2mL胶结剂,即2mL氯化钙(36g/L)和尿素(20g/L)的混合溶液。最后,将经固定化矿用微生物促进剂处理的煤粉置于室温下自然风干,分别在第3天、第7天、第15天重复上述操作。在第20天对处理后的煤粉在风速为10m/s时进行抗风蚀实验,结果如图5所示。图5为煤粉经不同接种方式固定化矿用微生物促进剂处理后的抗风蚀性能。从图中可以看出,与用微生物促进剂处理的样品相比,用水(W)、激活剂(C)和胶结剂(J)处理的样品具有更大的风蚀质量损失。此外,采用复合固定化细菌菌液的抗风蚀性能优于采用单一固定化细菌菌液。这是由于微生物矿化和生物表面活性剂的双重作用,用复合固定化细菌菌液处理的样品的质量损失显著低于用单一固定化细菌菌液处理的样品。特别地,由P<sub>14</sub>X制备的微生物促进剂具有良好的抗风蚀性(1.55±0.91%),与单一固定化矿化菌制备的微生物促进剂相比降低了25.01±4.44%。由于微生物对底物的利用能力不同,将微生物以一定顺序接种并培养,既能充分发挥微生物间的协同代谢效应,又可以避免微生物间的生长竞争和抑制,从而获得更高的生物量和产率。

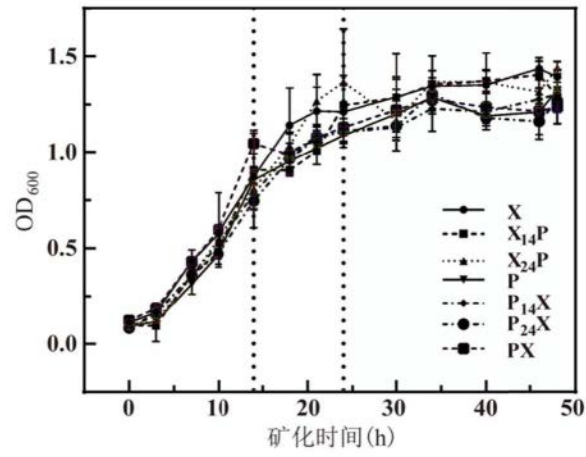


图1

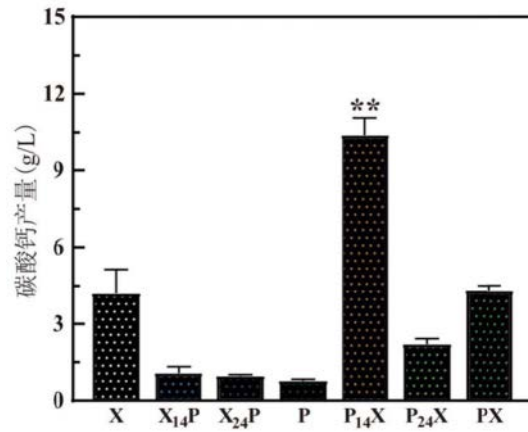


图2

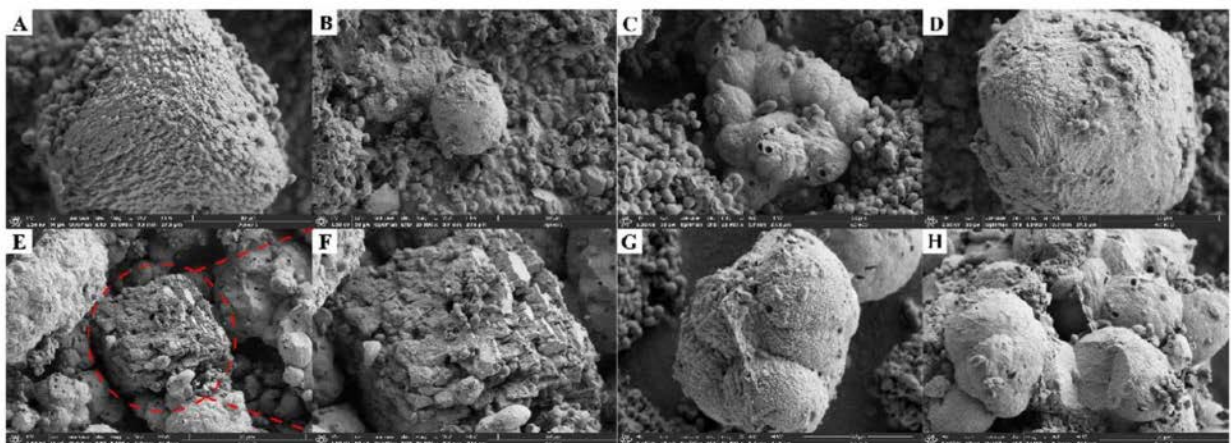


图3

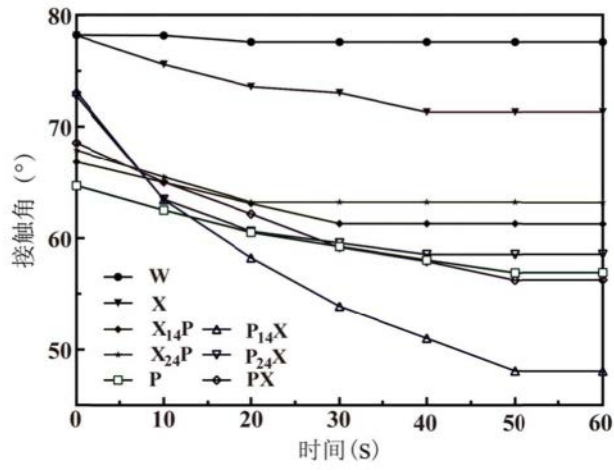


图4

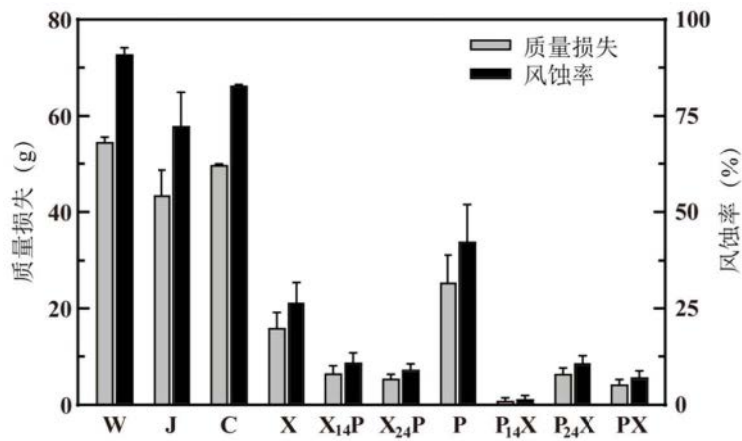


图5

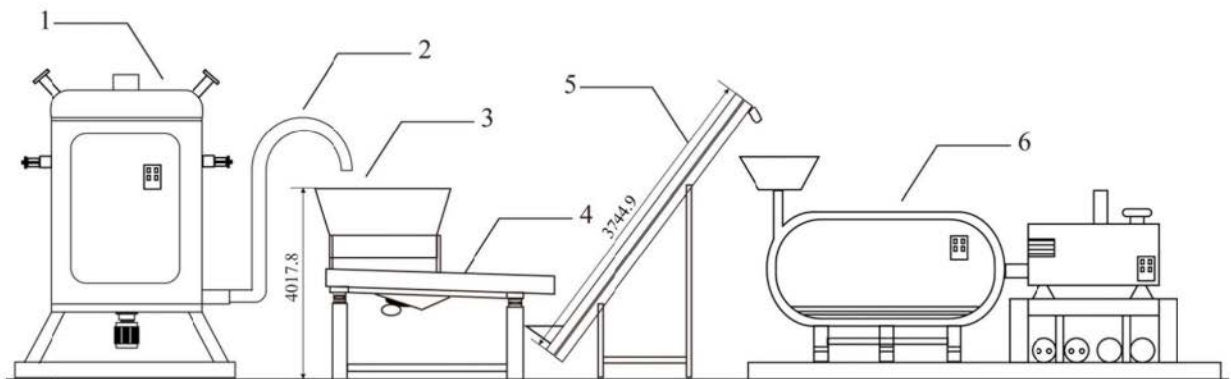


图6