

榆林页岩生物模拟产气条件优化和产气机理

王梦真^{1#}, 曹玥^{1#}, 何环^{1*}, 孙强², 黄再兴³

1 中国矿业大学 化工学院, 江苏 徐州

2 西安科技大学 地质与环境学院, 陕西 西安

3 中国矿业大学, 炼焦煤资源绿色开发全国重点实验室, 江苏 徐州

王梦真, 曹玥, 何环, 孙强, 黄再兴. 榆林页岩生物模拟产气条件优化和产气机理[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2514-2528.

WANG Mengzhen, CAO Yue, HE Huan, SUN Qiang, HUANG Zaixing. Optimization of simulated biogenic gas production conditions and study of gas production mechanism of shale[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(6): 2514-2528.

摘要: 【目的】研究页岩生物产气的影响因素和产气机理。【方法】以榆林页岩为研究对象, 利用实验室前期富集的产甲烷微生物作为功能菌群, 通过正交试验优化页岩的生物产气条件。采用气相色谱(gas chromatography, GC)、X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、傅里叶变换红外光谱(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)、拉曼光谱(Raman spectroscopy, Ram)以及核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)分析了页岩的生物模拟产气特征, 并对产气前后页岩的理化性质变化进行了分析。【结果】页岩最优产气条件为: 接种量 15%、页岩粒度小于 0.125 mm、培养温度 35 °C, 50 d 累计净产甲烷量为 81.22 μmol/g 页岩。产气前后工业和元素分析结果表明, 产甲烷菌通过消耗页岩中的有机组分来产气。XRD 分析结果显示, 页岩中无机矿物组分也参与了厌氧降解产气过程。FT-IR 与拉曼光谱显示, 页岩有机物多为长链脂肪烃。产气时, 部分化合物的羰基、醚键反应生成含羧基的中间产物。产气后, 页岩样品的 D、G 峰不明显, 表明干酪根的石墨化程度与成熟度增加。NMR 结果表明, 脂肪醇或脂肪胺在产气过程中被微生物利用。【结论】榆林页岩中的有机组分可以被微生物利用产生甲烷, 同时无机矿物组分也被消耗。产气过程中, 有机组分的化学结构发生变化, 生成较小的化合物。

关键词: 页岩; 生物产气; 产甲烷菌; 产气优化; 有机组分

资助项目: 国家自然科学基金(42172187)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42172187).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: hehuan6819@cumt.edu.cn

Received: 2024-12-28; Accepted: 2025-03-12; Published online: 2025-05-07

Optimization of simulated biogenic gas production conditions and study of gas production mechanism of shale

WANG Mengzhen^{1#}, CAO Yue^{1#}, HE Huan^{1*}, SUN Qiang², HUANG Zaixing³

1 School of Chemical Engineering & Technology, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu, China

2 College of Geology and Environment, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an, Shaanxi, China

3 National Engineering Research Center of Coal Preparation and Purification, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To study the influencing factors and mechanism of biogenic gas production in shale. [Methods] The shale in Yulin was chosen as the object of this study, and methanogens specifically enriched by our research team in the preliminary stage were used as functional microbiota. An orthogonal design was adopted to optimize the biogenic gas production conditions. The simulated biogenic gas production characteristics and changes in physical and chemical properties of the shale before and after gas production were comprehensively analyzed by gas chromatography (GC), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), Raman spectroscopy (Ram), and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). [Results] The optimal conditions for gas production from shale were as follows: 15% inoculum, a shale particle size of less than 0.125 mm, and an incubation temperature of 35 °C, under which a cumulative methane yield of 81.22 $\mu\text{mol/g}$ shale was achieved within 50 days. Industrial and elemental analyses conducted before and after gas production revealed that methanogens consumed the organic components of shale to produce methane. XRD results indicated that the inorganic mineral components in shale also contributed to the anaerobic degradation process associated with gas production. FT-IR and Ram results showed that the organic matter in shale was mostly long-chain aliphatic hydrocarbons. During gas production, the carbonyl and ether bonds in some compounds reacted to form intermediate metabolites containing carboxyl groups. After gas production, the D and G peaks in the shale samples were not obvious, indicating that the graphitization degree and maturity of kerogen in the shale increased. In addition, NMR results confirmed that fatty alcohols or fatty amines were utilized by microorganisms in gas production. [Conclusion] Microorganisms can utilize the organic components of the shale to produce gas, while also consuming the inorganic mineral components. This leads to chemical structure organic components, leading to formation of smaller compounds after gas production.

Keywords: shale; biogas; methanogens; optimization of gas production conditions; organic components

页岩气是赋存于暗色泥页岩或高碳泥页岩层系中的非常规天然气, 其商业化开发已深刻影响全球能源格局^[1]。自北美页岩气革命成功推动区域经济转型以来^[2-3], 全球页岩气产量持续

攀升, 预计 2040 年将达到 $1.1 \times 10^{12} \text{ m}^3$, 其中中国将发展成为仅次于北美的第二大页岩气产区^[4]。基于成因分类, 页岩气可分为生物成因、热成因及混合成因三类^[5], 其中生物成因气源于

微生物对页岩中有机质的降解^[6], 主要赋存于低成熟度、高孔隙度盆地体系^[7]。依据形成阶段差异, 生物成因气又可进一步区分为原生型与次生型, 前者形成于早期成岩环境, 依赖多种微生物的协同代谢作用^[8]。其生物地球化学过程遵循 4 个阶段的连续反应机制: 水解发酵阶段由水解细菌分泌胞外酶将大分子有机物(如碳水化合物、蛋白质、脂类)降解为单糖、氨基酸及脂肪酸等小分子物质; 酸化阶段通过发酵菌群将水解产物转化为短链脂肪酸和醇类, 并伴随 CO₂/H₂ 生成; 产氢产乙酸阶段由产乙酸菌主导, 实现脂肪酸/醇类氧化生成乙酸; 最终产甲烷阶段由古菌通过乙酸裂解或 CO₂ 还原等途径完成甲烷合成^[9]。

我国页岩气开发取得了显著进展, 已在四川盆地涪陵区块实现工业化开采。然而生物成因气生成体系具有显著环境敏感性: 微生物酶系统的稳定性较低, 其代谢活性容易受物化条件波动影响, 导致产气条件不稳定。研究表明, 温度、基质粒度、氧化还原电位、pH 值及营养元素配比等参数均显著影响生物甲烷生成^[10]。尽管微生物强化技术在煤层气开发中已展开较多研究, 但针对页岩生物产气的研究仍显不足^[11-12], 特别是产气微生物作用下页岩基质物化属性演变规律仍有待解析^[13]。阐明该生物地球化学过程不仅可为工艺参数的定向优化提供参考, 也能为评估页岩生物强化产气提供理论依据^[14-15]。

中国页岩气资源主要分布于南方、中东部、西北及青藏四大区域^[16], 其中四川盆地、鄂尔多斯盆地等富有机质页岩层系展现出较好的生物产气潜力^[17]。陕西榆林地区广泛发育暗色页岩层, 局部纯黑色层段有机碳含量高, 其独特的地球化学特征为生物成因气研究提供了理想载体。本研究基于实验室富集的产甲烷功能菌群, 采用 L₉(3⁴) 正交试验设计系统解析接种量(5%–15%)、页岩粒度(0.125–1.000 mm)、培养温度(25–45 °C)等关键参数对产气效率的耦合影

响。结合气相色谱(gas chromatography, GC)、X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、傅里叶变换红外光谱(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)、拉曼光谱(Raman spectroscopy, Ram)及核磁共振(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)等多种表征手段, 优化微生物强化页岩产气的条件, 解析页岩基质在生物降解过程中的物化性质演变规律, 以期页岩气资源生物增效开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用页岩样品取自陕西省榆林市延长组新鲜露头, 经机械破碎后依次通过标准筛网分级, 获得 3 种特征粒径样品(<0.125 mm、0.500–1.000 mm、>1.000 mm)。产甲烷菌群来源于煤层水富集培养物, 优势菌属包含梭菌属(*Clostridium* spp.)、地杆菌属(*Geobacter* spp.)、嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum* spp.)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* spp.)、脱硫杆菌属(*Desulfobacter* spp.)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium* spp.)及甲烷微菌属(*Methanomicrobium* spp.)^[18], 具体培养基配方见参考文献[19]。

1.2 产气条件正交优化设计

基于单因素预实验结果, 采用 L₉(3⁴) 正交试验筛选关键参数(接种量、温度、粒径)的优化组合。各因素水平设置如下: 接种量(*A*)的体积分数为 5%、10%、15%, 温度(*B*)为 25、35、45 °C, 页岩粒度(*C*)为 >1.000 mm (大颗粒)、0.500–1.000 mm (中颗粒)、<0.125 mm (小颗粒)(表 1)。

试验流程: 向 250 mL 厌氧瓶注入 100 mL 灭菌培养基, 添加 20 g 不同粒径页岩样品, 经 121 °C 灭菌 20 min 后, 通过 0.22 μm 无菌滤膜补充维生素、Na₂S·9H₂O 及 NaHCO₃^[19], 最后按预设接种量接入产甲烷菌群培养液。将厌氧瓶置于恒温培养箱培养 40 d, 利用气相色谱仪(安

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factor and level of orthogonal experiment design

Factors	A: Inoculum (%)	B: T/°C	C: Particle size (mm)
Level 1	5	25	>1.000 (large)
Level 2	15	35	0.500–1.000 (middle)
Level 3	10	45	<0.125 (small)

捷伦科技有限公司)定量分析甲烷产量。

1.3 页岩生物模拟产气特征研究

在正交优化确定的最佳条件下, 于 500 mL 厌氧瓶中进行放大实验 test group (TG, 300 mL 培养基, 50 d 产气周期)。设置 2 组对照: bacterial group (BG, 仅含菌群无页岩基质)与 substrate group (SG, 含页岩基质未接种菌群), 每组设 3 个生物学重复。每 10 d 通过气相色谱检测甲烷累积量, 并采用无菌注射器采集 15 mL 培养液, 使用多参数分析仪(上海仪电科学仪器股份有限公司)测定 pH、氧化还原电位(Eh)及电导率(electrical conductivity, EC), 以解析产气过程的化学微环境变化。

1.4 页岩生物产气前后物化性质表征

产气结束后, 通过真空抽滤回收页岩残渣, 用无菌水洗涤 3 次后于 80 °C 烘干至恒重。依据国标 GB/T212—2021^[20]和 GB/T 476—2023^[21]、GB/T 19227—2008^[22]进行样品的工业分析(水分、灰分、挥发分、固定碳)和元素分析(C、H、O、N、S)。采用 X 射线衍射仪(Bruker D8 Advance, Cu-K α 辐射, 扫描速率 4°/min, 2 θ =5–55°)分析其中的矿物组成, 通过 MDI Jade 6 (v6.5)软件计算石英、长石、黏土矿物等相对含量。

1.5 页岩生物产气前后有机组分结构分析

利用傅里叶变换红外光谱(Bruker VERTEX 80V, KBr 压片法, 分辨率 4 cm⁻¹, 扫描范围 400–4 000 cm⁻¹)分析样品中的有机官能团, 结合 Peakfit 4.12 软件对特征峰(如 950–1 800、2 800–2 980、2 980–3 730 cm⁻¹)进行分峰拟合。

通过激光共焦拉曼光谱仪(Bruker SENTERRA II, 532 nm 激光源, 功率 10 mW, 积分时间 30 s)获取 D 峰(约 1 350 cm⁻¹)与 G 峰(约 1 580 cm⁻¹)的强度比(ID/IG), 比较分析产气前后碳结构有序度变化。采用 600 MHz 核磁共振仪(Bruker ADVANCE III HD, ¹³C CP/MAS 模式, 转速 12 kHz)分析样品中的烷基碳、芳香碳及含氧官能团分布。

2 结果与讨论

2.1 页岩生物模拟产气正交试验结果

页岩生物产气正交试验结果如表 2 所示, 甲烷产量范围为 8.71–30.93 μ mol/g 页岩, 表明不同参数组合对产气效率具有明显调控作用。极差分析结果表明, 各因素对甲烷产量的影响权重排序为: 接种量(A)方差(range A, RA)=12.843>粒度方差(range C, RC)=8.740>温度方差(range B, RB)=3.755, 这与煤生物产气体系中温度^[23]主导的研究结论形成对比, 可能源于页岩有机质赋存形态与矿物组成的特异性^[17]。

微生物接种量(A)作为主导因素, 其极差值(RA=12.843)表明初始菌群浓度对有机质生物转化效率具有决定性作用。当接种量从 5% 增至 15% 时, 产甲烷量提升 240%, 这与功能菌群丰度增加缓解底物竞争抑制的机制相关^[18]。页岩粒度(RC=8.740)可通过调控基质传质效率影响产气量, <0.125 mm 的细颗粒因比表面积增大(–15.8 m²/g)更利于微生物-矿物界面反应^[24–26]。温度对产气效率的弱相关性(RB=3.755)表明中温条件(35–45 °C)可能接近产甲烷菌群的最适代谢区间^[27], 与 Rathi 等^[28]在 60 °C 下的高活性表现不同, 这可能与本研究菌群的嗜中温特性有关^[18]。其中, 实验组 8 (A₃B₂C₃: 接种量 15%、35 °C、<0.125 mm)获得最大甲烷产量(30.93 μ mol/g 页岩), 其参数组合与赵星程等^[24]在褐煤体系中的优化结果(35 °C、0.125–0.109 mm)较一致, 但却优于 Guo 等^[26]在不同粒径煤颗粒(<0.075,

表2 正交试验结果及直观分析结果

Table 2 Result of orthogonal experiment and visual analysis

Test number	A: Inoculum (%)	B: T/°C	C: Particle size (mm)	Methane production (μmol/g shale)	Average value	Range
1	5	25	>1.000	9.10	9.829	12.843
2	5	35	0.500–1.000	11.67	16.295	
3	5	45	<0.125	8.71	20.056	
4	10	25	<0.125	27.87	18.610	3.755
5	10	35	>1.000	13.95	18.851	
6	10	45	0.500–1.000	18.35	15.096	
7	15	25	0.500–1.000	18.86	13.761	8.740
8	15	35	<0.125	30.93	22.672	
9	15	45	>1.000	18.23	22.501	

0.106–0.150, 0.180–0.250, 0.500–0.600) mm 中的产气表现, 这可能归因于页岩中矿物对微生物的界面催化作用^[29]。最近也有研究人员提出微量元素^[30]及石墨添加剂^[31]可强化页岩产气, 这也为后续工艺优化提供了潜在方向。

2.2 页岩生物模拟产气特征分析

页岩生物产气过程中甲烷产量及体系参数动态变化如图 1 所示。实验组(TG)甲烷产量呈现典型两阶段特征(图 1A): 10–20 d 为指数增长期(日均产气量 4.38 μmol/g), 30 d 达峰值 87.67 μmol/g; 30–50 d 进入稳定期(累计增长 <5%), 表明可降解有机质已接近耗尽。通过扣除背景值(BG 组 6.45 μmol/g), 实验组净甲烷产量为 81.22 μmol/g 页岩, 显著高于 SG 组(未检出甲烷数据未呈现), 证实页岩生物降解是甲烷生成的唯一有效途径。

实验组(TG) pH 值呈先升后降趋势(图 1B): 0–40 d 从 7.12 升至 7.71 (ΔpH=0.59), 与产甲烷菌消耗 H⁺合成 CH₄的代谢特征较一致^[32]; 40–50 d 回落至 7.48 (ΔpH=0.23), 表明酸化阶段挥发性脂肪酸的累积^[33]。尽管 TG 组 pH 波动幅度(0.59)小于 BG 组(ΔpH=1.75), 但组间差异未达统计学显著性($P=0.903$), 这可能来源于页岩中碳酸盐矿物的缓冲作用^[34](表 3)。

电导率(EC)数据变化显示(图 1C), 三组 EC

值均维持在 6.92–9.20 μS/cm 区间波动, 组间差异不显著($P=0.593$) (表 3)。这表明体系离子浓度主要受培养基组分调控, 而微生物-页岩相互作用对离子迁移的贡献可能不明显。整体来看, TG 组 EC 值(7.15±0.77) μS/cm 始终高于 SG 组(7.58±0.66) μS/cm, 表明微生物活动可促进页岩中可溶盐类的浸出。

氧化还原电位(Eh)动态显示(图 1D), TG 组 0–20 d 维持强还原环境($Eh<-300$ mV), 与产甲烷菌最适代谢区间(–225 mV)^[35]相符; 20 d 后 Eh 跃升至正电位(0–140 mV), 标志着产甲烷主导阶段向氧化还原平衡态过渡。尽管 Eh 演变与甲烷产量呈现时间同步性(20 d 转折点), 但组间差异未达显著水平($P=0.947$) (表 3), 这可能与金属矿物(如黄铁矿)的氧化还原缓冲效应有关^[36]。

2.3 页岩生物产气前后工业分析和元素分析

产气前后页岩的工业分析与元素组成变化如表 4 所示。从表 4 中结果可以看出, 挥发分含量下降 0.05% (V_{daf}), 印证了有机质的生物消耗(与甲烷产量 81.22 μmol/g 页岩形成定量对应)^[34], 而灰分微降 0.07% 表明矿物相的局部溶解^[37]。C/H 比值降低, 表明除甲烷外, 部分碳可能以 CO₂ 形式释放或参与胞外多糖合成^[38], 试验中通过气相色谱检测到的 CO₂ 累积(未显示

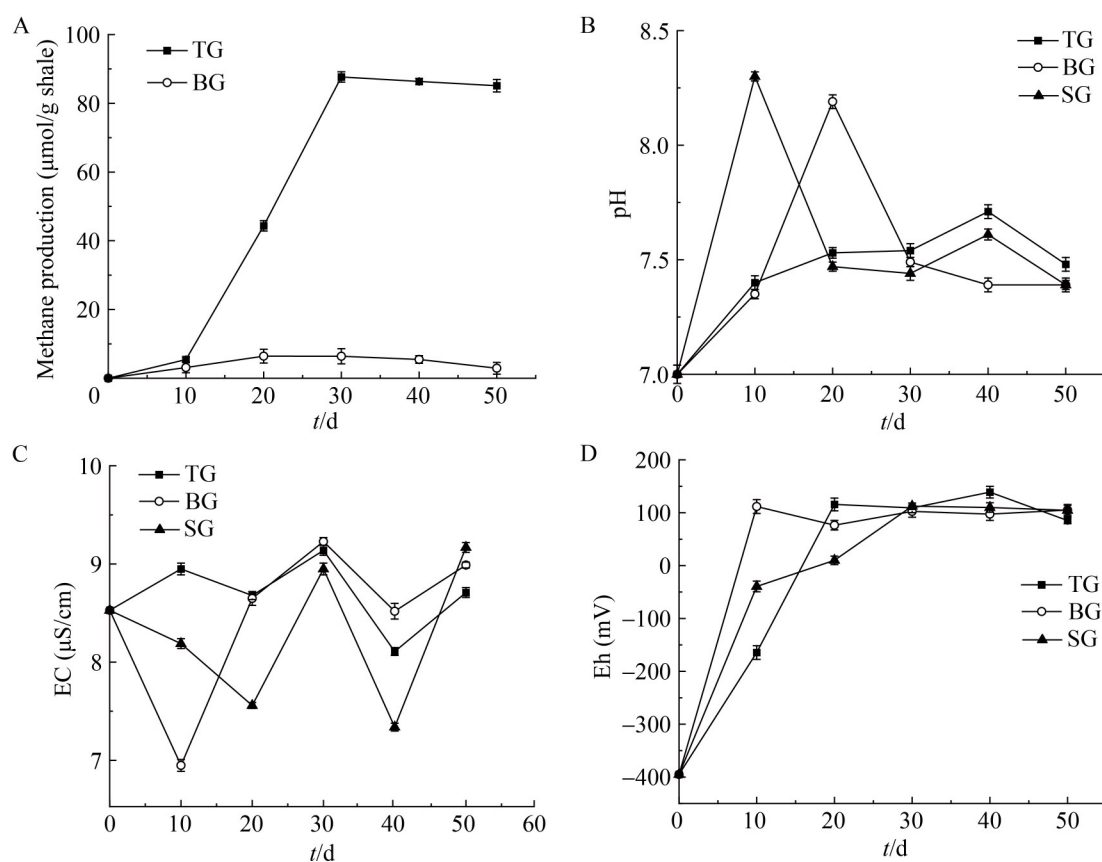


图1 页岩生物产气过程中CH₄含量(A)、pH (B)、EC (C)和Eh (D)变化曲线

Figure 1 Dynamic changes of CH₄ content (A), pH (B), EC (C), and Eh (D) during shale biogas production.

表3 页岩生物产气过程特征变量的方差分析结果

Table 3 ANOVA results of characteristic variables during shale biogas production

Variable	Inter-class variance	Variance between groups	F value	P value	Significance
CH ₄	851.261	6 749.673	7.929	0.018	*
pH	0.131	0.013	0.103	0.903	ns
EC	0.436	0.236	0.542	0.593	ns
Eh	41 888.622	2 278.207	0.054	0.947	ns

*: $P < 0.05$; ns: 不显著。

*: $P < 0.05$; ns: Not significant.

数据)也支持该结果。氮元素的生物富集现象较为突出,与产气前相比其含量增长超过2倍,这与产甲烷菌群增殖的氮源需求直接相关^[39]。正交试验中高接种量(15%)的优化条件与此结果相互印证,表明氮代谢是维持菌群活性的关键限制因素。硫元素的剧烈变化则与体系氧化还原状

态演变密切相关: Eh从-349 mV跃升至正电位(图1D),驱动含硫矿物(如黄铁矿)发生氧化反应,释放的硫酸盐可能通过硫酸盐还原菌与产甲烷菌的电子竞争机制影响产气路径^[36-40]。另一方面,挥发分含量下降,这可能是由于页岩中轻质有机组分降解所致^[38]。该现象在煤生物

气化体系中也曾被观测到^[40],表明页岩与煤在有机质降解行为上具有共性规律。

2.4 页岩生物产气前后物相组成分析

XRD 分析结果如图 2 和表 5 所示,从结果可以看出,产气后页岩矿物组成的变化主要表现在石英、钾长石和黏土矿物的相对含量变化上,而斜长石则呈现微弱增长趋势。产气后,石英的相对含量明显增加,表明其在微生物作用下的稳定性。石英作为硅酸盐矿物的主要成分,化学性质稳定,在微生物代谢过程中不易被溶解或转化,其含量的增加可能与产气过程中其他矿物的选择性消耗有关,例如黏土矿物和钾长石的溶解或蚀变^[41]。黏土矿物和钾长石的相对含量在产气后均呈现下降趋势。黏土矿

物的减少可能与微生物代谢产物的化学作用密切相关。例如,产甲烷菌群中的产氢产乙酸菌在代谢过程中释放的氢离子,可能与黏土矿物(如高岭石)表面的羟基发生反应,破坏其晶体结构,进而加速黏土矿物的溶解^[42]。这一过程不仅改变了矿物组成,还可能释放对产甲烷菌具有抑制作用的金属离子(如 Al^{3+}),但本研究中黏土矿物含量降幅有限,其抑制作用未对产气效率产生显著影响^[42]。钾长石的减少则可能与微生物代谢产生的有机酸对矿物的酸性蚀变作用有关^[43]。斜长石含量的微弱增长可能与体系酸碱环境的动态平衡相关。微生物产气初期, pH 的上升(图 1B)可能抑制斜长石的酸性溶解,而后期 pH 回落则可能促进其部分溶解,但整体表

表4 产气前后页岩的工业分析与元素分析

Table 4 Proximate and ultimate analysis of shale before and after biogas production

Shale samples	Proximate analysis (%)				Ultimate analysis (%)				
	M_{ad}	A_{d}	V_{daf}	FC_{d}	O_{daf}	C_{daf}	H_{daf}	N_{daf}	$\text{S}_{\text{t,d}}$
Raw	0.73	96.29	2.94	0.04	72.15	14.09	12.75	0.67	0.01
Residual	0.85	96.22	2.89	0.04	74.40	11.87	11.60	2.05	0.09

M: 水分; A: 灰分; V: 挥发分; FC: 固定碳; O: 氧元素含量; C: 碳元素含量; H: 氢元素含量; N: 氮元素含量; St: 全硫; ad: 空气干燥基; d: 干燥基; daf: 干燥无灰基。

M: Moisture; A: Ash content; V: Volatile matter; FC: Fixed carbon; O: Oxygen content; C: Carbon content; H: Hydrogen content; N: Nitrogen content; St: Total sulfur; ad: Air dry base; d: Dry base; daf: Ash-free dry.

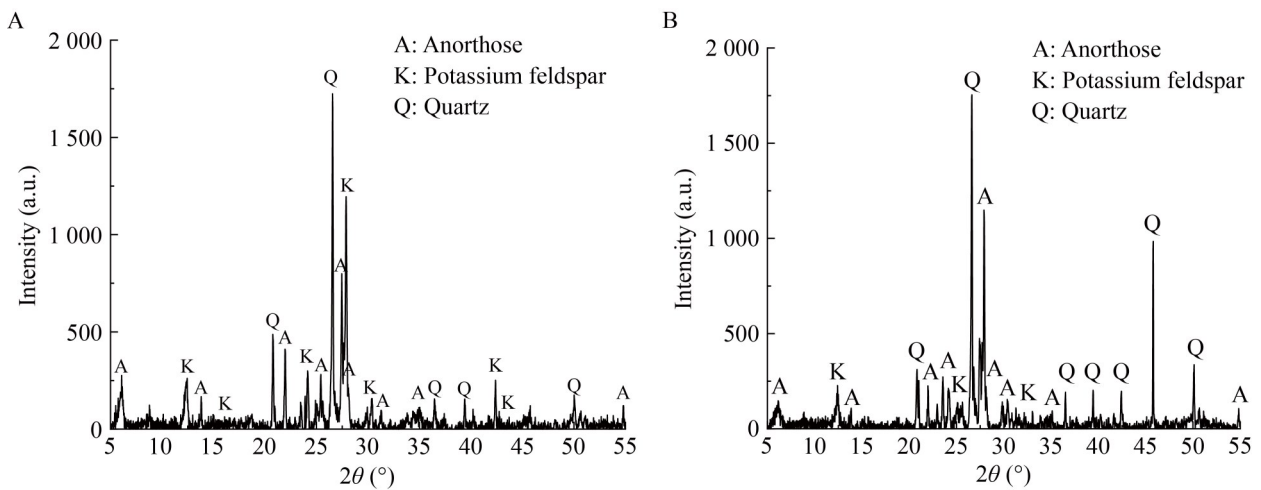


图2 产气前(A)、后(B) XRD图谱

Figure 2 XRD spectra before (A) and after (B) gas production.

表5 产气前后页岩的XRD全岩分析结果

Table 5 XRD analysis of shale before and after gas production

Shale samples	Quartz	Potassium feldspar	Plagioclase	Clay minerals
Raw (%)	26.2	14.2	29.1	30.5
Residual (%)	31.6	10.7	29.8	28.0

现为相对稳定性。这与张生等^[41]的研究结果较一致,即石英在碱性条件下更稳定,而斜长石的稳定性受 pH 波动影响较小。页岩中碳酸盐矿物的缺失降低了其 pH 缓冲能力,引起实验组 pH 波动幅度($\Delta\text{pH}=0.59$)明显高于含碳酸盐的煤体系^[37]。这种弱缓冲环境可能加剧硅酸盐矿物(如钾长石)的酸性蚀变,释放的 Na^+ 、 Ca^{2+} 等离子通过离子交换作用促进有机质解吸,间接增强微生物对页岩有机质的利用效率。该结果与产甲烷量在 20 d 达峰(图 1A)较为一致,表明矿物成分演变与产气之间存在一定的协同作用。

2.5 页岩生物产气前后 FT-IR 分析

页岩生物产气前(raw)、后(residual)有机质转化的 FT-IR 光谱如图 3、图 4 所示。整体上看,产气前后出峰位置基本一致,从分峰结果来看页岩生物产气前后有机官能团发生了选择

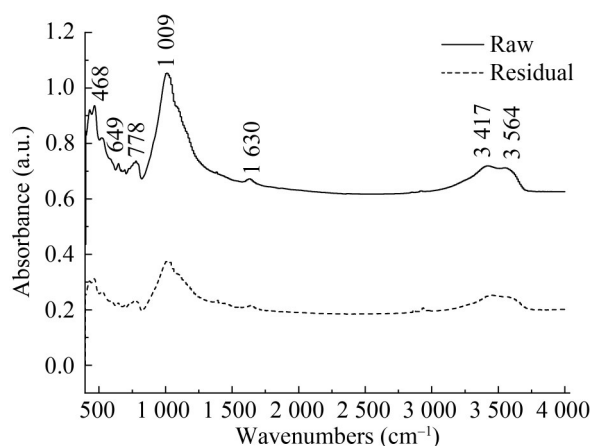


图3 页岩生物产气前后红外光谱图

Figure 3 FT-IR of shale before and after biogas production.

性的变化,具体表现为脂肪族含氧官能团(羰基和醚键)的减少,芳香骨架结构的相对稳定和羟基官能团多样的增加。产气后,在 $950\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ 范围内(图 4A、4B),羰基($\text{C}=\text{O}$, $1707\text{--}1799\text{ cm}^{-1}$)的特征峰降低,尤其是 1752 cm^{-1} 处脂肪醛 $\text{C}=\text{O}$ 峰消失最为明显^[44],微生物通过代谢途径将脂肪醛转化为短链脂肪酸,这一过程可能涉及 β -氧化等经典生物化学路径,其中长链脂肪族组分被逐步裂解为乙酸、 H_2/CO_2 等甲烷前体^[45]。醚键($\text{C}-\text{O}$, $1029\text{--}1162\text{ cm}^{-1}$)的强度下降,与 Guo 等^[46]的研究一致,其证实甲氧基($\text{C}-\text{O}-\text{C}$)的断裂是微生物产气过程中的关键步骤。芳香骨架振动峰($1598\text{--}1638\text{ cm}^{-1}$)在产气前后保持稳定(图 4A、4B),表明微生物对稠环芳烃(如苯环、萘环)的降解能力有限。尽管拉曼光谱显示芳香环边缘缺陷位点被部分活化(ID/IG 值下降)(图 5),但 FT-IR 数据表明整体芳环骨架未发生明显变化。张昊鹏等^[47]在褐煤生物产气体系中发现类似规律,其 FT-IR 数据显示芳环缩合度(R/C 值)在生物降解后增加,表明芳香结构的化学惰性同样是限制页岩生物气潜力的主要因素。在 $2800\text{--}2980\text{ cm}^{-1}$ 区间(图 4C、4D)是脂肪链上的碳氢键的振动吸收,当前结果表明样品中以长链脂肪烃为主而支链较少,这可能也是导致其产甲烷较少的原因。

在 $2980\text{--}3730\text{ cm}^{-1}$ 范围主要是羟基的振动吸收,产气前页岩主要对应烷烃 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动(2982.61 cm^{-1})、烯烃 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动(3080.29 cm^{-1})及不同类型的 $-\text{OH}$ 伸缩振动(图 4E)。产气后振动谱图较为相似,且 $-\text{OH}$ 伸缩振动类型更加多样(图 4F)。由此可见,陕西榆林页岩中含有丰富的羟基,产甲烷菌混合菌群的产气过程中使页岩中 $-\text{OH}$ 进一步增多,页岩更亲水,许多生物酶与羟基结合并发挥作用,产气过程中页岩表面官能团的改变向着更有利于微生物与页岩结合的方向发展。

2.6 页岩产气前后的 Ram 结果分析

页岩产气前后的拉曼光谱如图 5 所示。产

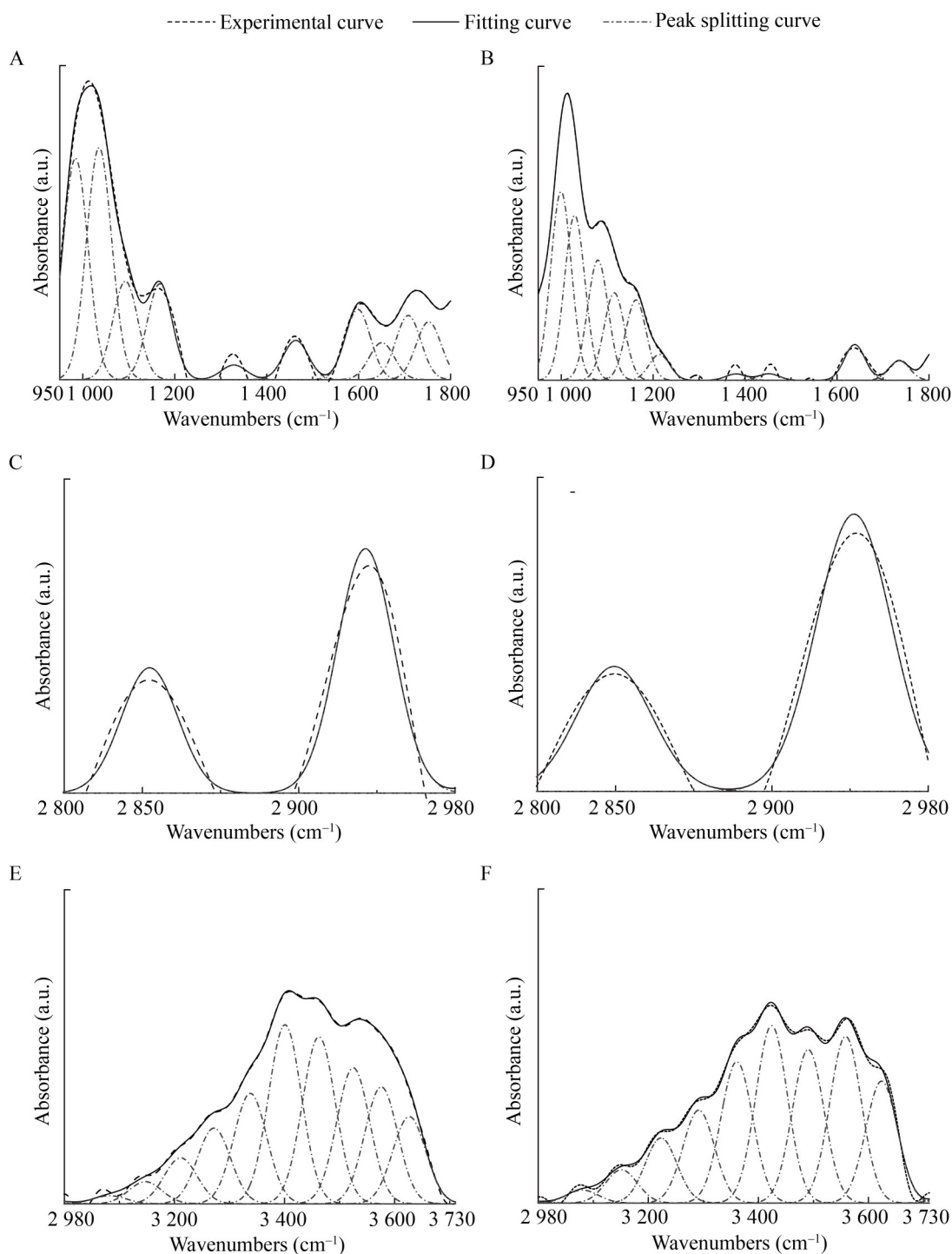


图4 页岩生物产气前后红外光谱分峰拟合结果。A、B: 950–1 800 cm⁻¹范围内产气前、后分峰拟合谱图；C、D: 2 800–2 980 cm⁻¹范围；E、F: 2 980–3 730 cm⁻¹范围。

Figure 4 Peak fitting results of FT-IR spectra of shale before and after biogas production. A, B: Peak fitting in 950–1 800 cm⁻¹ range (before and after gas production); C, D: 2 800–2 980 cm⁻¹ range; E, F: 2 980–3 730 cm⁻¹ range.

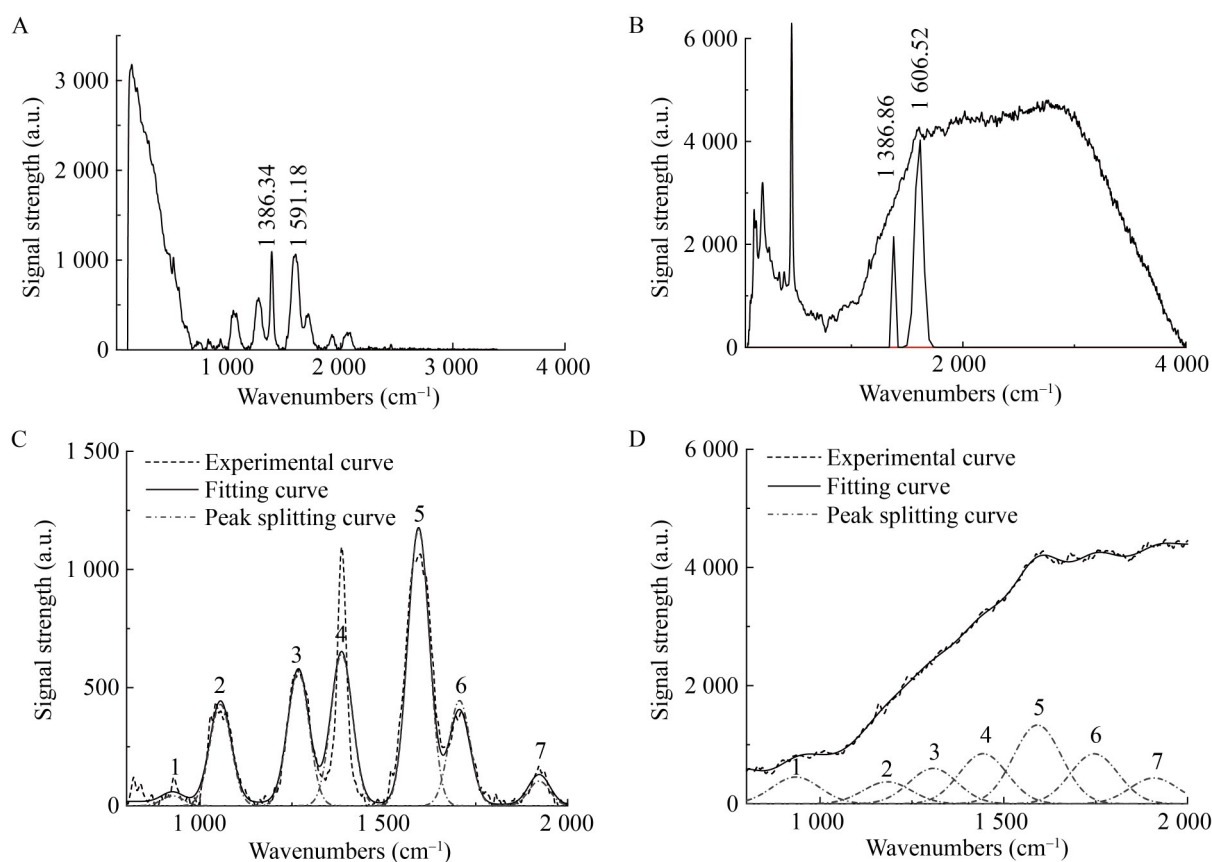


图5 页岩产气前后拉曼光谱与分峰拟合结果。A、B分别为页岩产气前、后原始拉曼光谱；C、D为对应分峰拟合结果。

Figure 5 Raman spectra and peak fitting results of shale before and after biogas production. A, B: Raw Raman spectra before and after gas production; C, D: Corresponding peak fitting results.

气前 ID/IG 值为 1.03 (图 5A), 说明页岩干酪根具有中等石墨化程度 (Raman 半定量参数 $R1=0.58$), 其芳香环以 4–6 环稠合结构为主。产气后 ID/IG 值为 0.42 (图 5B), ID/IG 值减小, 同时 G 峰从 1591.18 cm^{-1} 位移至 1606.52 cm^{-1} , 说明产气过程中页岩干酪根石墨化程度有所增加。微生物通过氧化裂解破坏芳香环边缘的 C–C 键, 将大环结构(>4 环)解聚为小环(2–3 环)或直链烃^[48–49]。产气前后分峰拟合结果(图 5C、5D)进一步显示, 代表半焦炭交联结构的 1386 cm^{-1} 峰(峰 2)强度降低, 而代表小芳香环的 1452 cm^{-1} 峰(峰 4)的相对贡献增强。这种结构转变释放的脂肪族侧链(如 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)可能成为产气阶段的

重要碳源。此外, 羰基峰(1735 cm^{-1} , 峰 5)在产气后增强, 表明芳香环边缘的氧化修饰产生大量酮基/羧酸基团, 这些官能团的增加也为微生物提供了更多的作用位点, 利于生物产气^[49]。与 FT-IR 结果对比发现, 拉曼光谱对芳香结构变化的敏感性更高, 这与其纳米级空间分辨率($\sim 1\text{ }\mu\text{m}^2$)密切相关。结合页岩产气结果, 前期(10–30 d)产气较快, 后期趋缓(>30 d), 这种差异表明, 页岩有机质的降解具有显著的空间异质性: 微生物会优先攻击颗粒表面和裂隙处的活性位点(表面支链或活性官能团), 而体相结构(芳香结构)的降解程度有限^[50]。这一发现为优化页岩预处理工艺(如粉碎、化学氧化)提供了理论依据,

通过增加表面活性位点暴露可提升生物气产量。

2.7 页岩产气前后的 NMR 结果分析

页岩产气前后的碳谱和氢谱如图 6 所示。碳谱(图 6A、6B)在 45–50 ppm 区域的放大分析显示, 产气后该区间峰形展宽(图 6B)且呈现精细位移变化, 处于 46.95 ppm 和 47.17 ppm 的 2 处小尖峰向高场轻微位移到 46.92 ppm 和 47.14 ppm,

表明脂肪链末端(如 $-\text{CH}_3$)的电子云密度增加, 可能与邻近含氧基团(如羧酸)的诱导效应相关; 而 47.38 ppm 和 47.59 ppm 的 2 处峰向低场位移到 47.33 ppm 和 47.54 ppm 处, 反映了脂肪链中间段($-\text{CH}_2-$)的氧化修饰(如羟基化), 导致局部电子云密度降低^[51]。这些变化表明脂肪链末端(如 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)的化学环境异质性增加。这一现象可

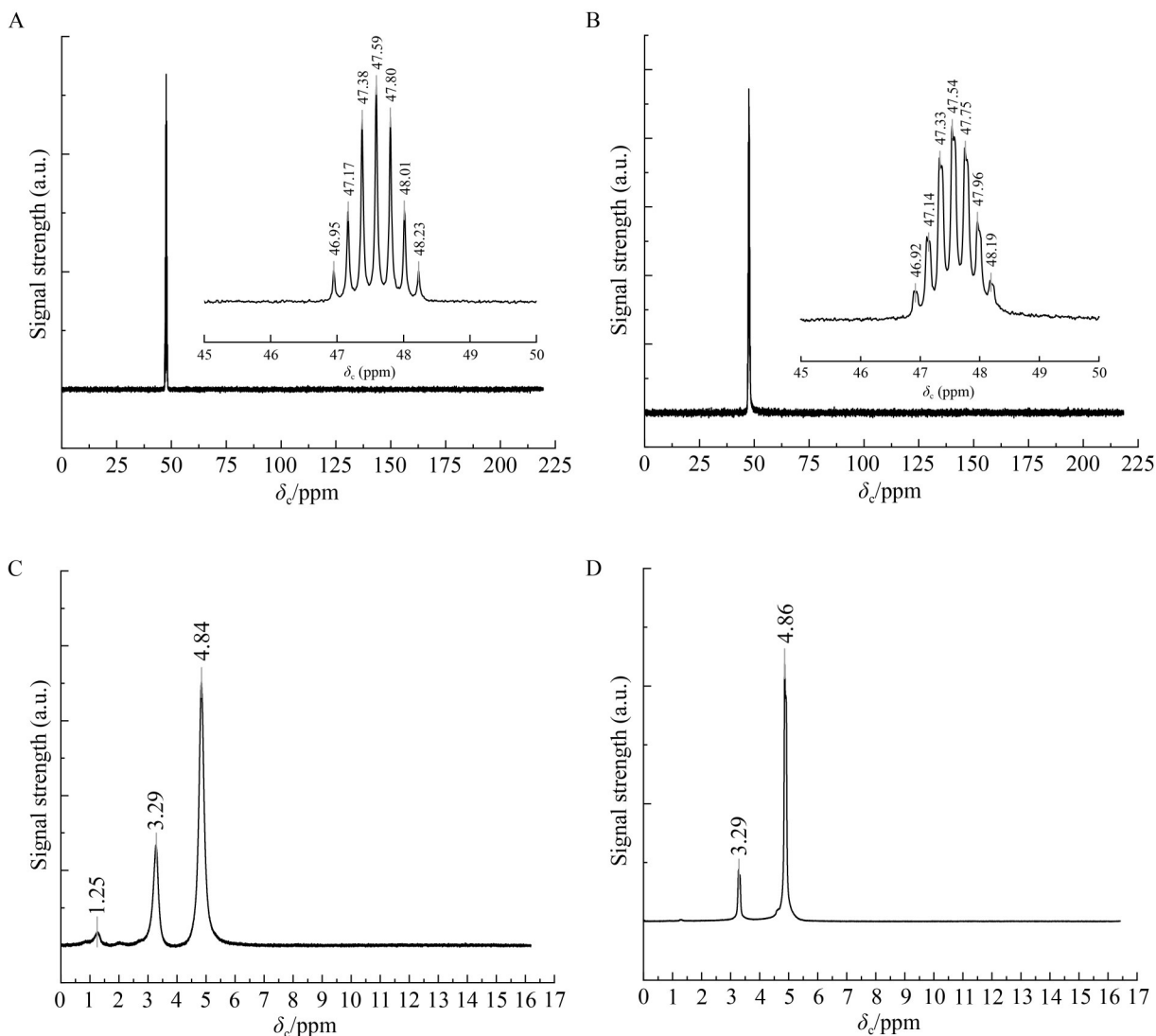


图6 页岩生物产气前后核磁共振碳谱(^{13}C NMR)与氢谱(^1H NMR)。A、B为产气前、后碳谱; C、D为对应氢谱。黑色曲线为原始谱图, 灰色直线标记特征峰位。

Figure 6 ^{13}C and ^1H NMR spectra of shale before and after biogas production. A, B: ^{13}C NMR spectra before and after gas production; C, D: Corresponding ^1H NMR spectra. Black curves represent raw spectra and gray lines indicate characteristic peaks.

能源于微生物代谢过程中对长链烷烃的逐步截短,生成不同链长的中间产物(如 C_{10} – C_{14} 片段),导致碳信号分布范围扩大,印证了微生物通过 β -氧化途径将长链烷烃裂解为短链片段(如乙酰辅酶 A)的代谢机制^[49]。相比之下,芳香碳区(100–160 ppm)信号较稳定,进一步表明缩合芳烃的芳香核未被降解,微生物代谢主要集中在脂肪链及边缘取代基^[48-49]。从图 6C 中可以看出,产气前氢谱的主要出峰位置在 4.84、3.28、1.25 ppm 处,说明存在 3 种不同的 H 结构。¹H NMR 谱图(图 6C、6D)的变化表明微生物代谢对页岩有机质氢分布产生影响。产气前,1.25 ppm 处尖锐的共振峰对应长链烷烃末端甲基($-\text{CH}_3$)的氢原子,其信号强度表明此类结构在原始页岩中广泛存在。产气后该峰完全消失,直接证明微生物通过 β -氧化途径选择性裂解脂肪链末端甲基,将其转化为甲烷前体(如乙酸、 H_2/CO_2)^[45-49]。这一过程与元素分析中 H 含量下降 1.15% (表 4)的结果相互验证,共同证明长链烷烃作为产气初期关键碳源的作用。3.29 ppm 处 $-\text{OH}$ 峰的减弱反映羧酸类代谢产物的极性氢($-\text{COOH}$)比例上升,该类产物的积累可能通过改善页岩-微生物界面润湿性优化传质效率^[51-53]。

3 结论

(1) 页岩生物产气的正交试验结果表明,影响页岩产气的 3 个因素主次顺序为接种量>页岩粒度>培养温度,产甲烷菌利用页岩产气的最优条件为:接种量 15%,页岩粒度小于 0.125 mm,培养温度 35 °C。在此条件下培养 50 d 后,累计净产甲烷量为 81.22 $\mu\text{mol/g}$ 页岩。

(2) 页岩生物产气的工业分析和元素分析结果表明,页岩相对挥发分含量由 2.94% 变为 2.89%,碳元素相对含量从 14.09% 变为 11.87%,说明产甲烷菌可以利用页岩中的有机质进行生物产气。XRD 结果表明,页岩生物产气前后物相组成相对含量发生变化,表明无机矿物组分参与了页岩的生物产气过程。

(3) 产甲烷混合菌群未利用页岩中的芳香类有机物产气,部分有机化合物中的羰基和醚键参与反应生成含羧基的中间产物。产气后页岩结构发生改变:大的芳香环分解为小芳香环,干酪根石墨化程度和成熟度降低,羟基含量减少。

作者贡献声明

王梦真:数据分析、图片绘制、撰写初稿;曹玥:样品采集、实验设计、实验测试、论文修改;何环:论文思想、框架指导、撰写与修改;孙强:数据处理;黄再兴:论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] MIDDLETON RS, GUPTA R, HYMAN JD, VISWANATHAN HS. The shale gas revolution: barriers, sustainability, and emerging opportunities[J]. *Applied Energy*, 2017, 199: 88-95.
- [2] 杨玉峰. 美国页岩气发展对全球天然气市场的影响[J]. *国际石油经济*, 2009, 17(12): 35-38, 89-90.
YANG YF. The effect of American shale gas development on the global natural gas market[J]. *International Petroleum Economics*, 2009, 17(12): 35-38, 89-90 (in Chinese).
- [3] LE MT. An assessment of the potential for the development of the shale gas industry in countries outside of North America[J]. *Heliyon*, 2018, 4(2): e00516.
- [4] 邹才能, 赵群, 董大忠, 杨智, 邱振, 梁峰, 王南, 黄勇, 端安祥, 张琴, 胡志明. 页岩气基本特征、主要挑战与未来前景[J]. *天然气地球科学*, 2017, 28(12): 1781-1796.
ZOU CN, ZHAO Q, DONG DZ, YANG Z, QIU Z, LIANG F, WANG N, HUANG Y, DUAN AX, ZHANG Q, HU ZM. Geological characteristics, main challenges and future prospect of shale gas[J]. *Natural Gas Geoscience*, 2017, 28(12): 1781-1796 (in Chinese).
- [5] DALY RA, BORTON MA, WILKINS MJ, HOYT DW, KOUNTZ DJ, WOLFE RA, WELCH SA, MARCUS DN, TREXLER RV, MacRAE JD, KRZYCKI JA, COLE DR, MOUSER PJ, WRIGHTON KC. Microbial metabolisms in a 2.5-km-deep ecosystem created by hydraulic fracturing in shales[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16146.
- [6] 董大忠, 王玉满, 李新景, 邹才能, 管全中, 张晨晨, 黄金亮, 王淑芳, 王红岩, 刘洪林, 拜文华, 梁峰, 吝文, 赵群, 刘德勋, 邱振. 中国页岩气勘探开发新突破及发展前景

- 思考[J]. 天然气工业, 2016, 36(1): 19-32.
- DONG DZ, WANG YM, LI XJ, ZOU CN, GUAN QZ, ZHANG CC, HUANG JL, WANG SF, WANG HY, LIU HL, BAI WH, LIANG F, LIN W, ZHAO Q, LIU DX, QIU Z. Breakthrough and prospect of shale gas exploration and development in China[J]. *Natural Gas Industry*, 2016, 36(1): 19-32 (in Chinese).
- [7] 苏现波, 夏太平, 赵伟仲, 伏海蛟, 郭红光, 何环, 鲍园, 李丹, 魏国琴. 煤层气生物工程研究进展[J]. *煤炭科学技术*, 2020, 48(6): 1-30.
- SU XB, XIA DP, ZHAO WZ, FU HJ, GUO HG, HE H, BAO Y, LI D, WEI GQ. Research advances of coalbed gas bioengineering[J]. *Coal Science and Technology*, 2020, 48(6): 1-30 (in Chinese).
- [8] 郭鑫, 宋燕莉, 赵娜. 浅析影响沁水煤田煤微生物产甲烷条件的因素[J]. *能源与节能*, 2017(10): 61-62, 66.
- GUO X, SONG YL, ZHAO N. Analysis of the factors influencing methane production from coal microorganism in coal field of Qinshui Coalfield[J]. *Energy and Energy Conservation*, 2017(10): 61-62, 66 (in Chinese).
- [9] 张娜, 尹雪峰, 王子琛, 刘浩, 黄敏婕, 王浩, 梁东旭, 胡佳楠. 微生物增产煤层气作用机理及影响因素研究进展[J]. *过程工程学报*, 2024, 24(6): 636-646.
- ZHANG N, YIN XF, WANG ZC, LIU H, HUANG MJ, WANG H, LIANG DX, HU JN. Research progress on the mechanism and influencing factors of microorganisms to increase coalbed methane production[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2024, 24(6): 636-646 (in Chinese).
- [10] 武俐, 曹斌, 赵同谦, 罗永涛, 李鹏. 分子筛与黏土对低阶煤生物成气的增效研究[J]. *煤炭转化*, 2021, 44(3): 42-49.
- WU L, CAO B, ZHAO TQ, LUO YT, LI P. Study on synergistic effect of molecular sieve and clay on biogenic gas generated from low-rank coal[J]. *Coal Conversion*, 2021, 44(3): 42-49 (in Chinese).
- [11] 左承未, 张瀚, 贾振福, 徐栋, 朱卫平. 低渗页岩储层压裂及一体化压裂液研究现状[J]. *化学工程师*, 2024, 38(8): 80-84.
- ZUO CW, ZHANG H, JIA ZF, XU D, ZHU WP. Research status of low permeability shale reservoir fracturing and integrated fracturing fluids[J]. *Chemical Engineer*, 2024, 38(8): 80-84 (in Chinese).
- [12] 吴永辉, 姜振学, 吴建发, 梁兴, 石学文, 包书景, 吴伟, 徐亮, 唐相路, 韩云浩. 渝西地区高含水页岩气藏特征、形成机理及地质意义[J]. *天然气工业*, 2024, 44(8): 58-71.
- WU YH, JIANG ZX, WU JF, LIANG X, SHI XW, BAO SJ, WU W, XU L, TANG XL, HAN YH. Characteristics, formation mechanism and geological implications of high water-cut shale gas reservoirs in western Chongqing area[J]. *Natural Gas Industry*, 2024, 44(8): 58-71 (in Chinese).
- [13] LIU XY, WANG L, LI YF, ZHANG BH. The succession of microbial community in CSTR hydrogen production system[J]. *Advanced Materials Research*, 2010, 113/114/115/116: 1297-1301.
- [14] 单爱琴, 张燕婷, 肖洁, 冯启言, 高波. 废弃矿井微生物群落演替特征实验研究[J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(4): 31-37.
- SHAN AQ, ZHANG YT, XIAO J, FENG QY, GAO B. Experimental study of microbial community succession characteristics in abandoned mine groundwater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 42(4): 31-37 (in Chinese).
- [15] 夏汉平, 黄娟, 孔国辉. 油页岩废渣场的生态恢复[J]. *生态学报*, 2004, 24(12): 2887-2893.
- XIA HP, HUANG J, KONG GH. Ecological restoration of oil shale waste dumps[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(12): 2887-2893 (in Chinese).
- [16] 甘会春, 沙亚南, 李海庆, 周国兴. 我国页岩气研究概况及江苏地区潜力分析[J]. *能源与环保*, 2017, 39(4): 78-82.
- GAN HC, SHA YN, LI HQ, ZHOU GX. Research situation of shale gas in our country and analysis of potential of Jiangsu area[J]. *China Energy and Environmental Protection*, 2017, 39(4): 78-82 (in Chinese).
- [17] 罗胜元, 陈孝红, 刘安, 李海. 中扬子宜昌地区下寒武统水井沱组页岩气地球化学特征及其成因[J]. *石油与天然气地质*, 2019, 40(5): 999-1010.
- LUO SY, CHEN XH, LIU A, LI H. Geochemical features and genesis of shale gas from the Lower Cambrian Shuijingtuo Formation shale in Yichang block, Middle Yangtze region[J]. *Oil & Gas Geology*, 2019, 40(5): 999-1010 (in Chinese).
- [18] 何环, 黄新颖, 黄再兴, 张倩, 陈子豪, 赵晗, 任恒星, 黄冠华. 高岭土对煤生物产气的影响及微生物群落响应[J]. *煤田地质与勘探*, 2022, 50(6): 1-10.
- HE H, HUANG XY, HUANG ZX, ZHANG Q, CHEN ZH, ZHAO H, REN HX, HUANG GH. Effect of Kaolin on biogenic coalbed methane production and the response of microbial community[J]. *Coal Geology & Exploration*, 2022, 50(6): 1-10 (in Chinese).
- [19] 李啸宇, 何环, 张倩, 赵晗, 任恒星, 陈林勇, 朱术云, 徐智敏, 黄再兴. 黄铁矿对煤生物产气和微生物群落结构的影响[J]. *微生物学报*, 2023, 63(6): 2185-2203.
- LI XY, HE H, ZHANG Q, ZHAO H, REN HX, CHEN LY, ZHU SY, XU ZM, HUANG ZX. Influence of pyrite on biogenic coal bed methane production and microbial community structure[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(6): 2185-2203 (in Chinese).
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. 煤的工业分析方法: GB/T 212—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Proximate analysis of coal: GB/T 212—2001[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004 (in Chinese).
- [21] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 煤中碳和氢的测定方法: GB/T 476—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of carbon and hydrogen in coal: GB/T 476—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [22] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委

- 员会. 煤中氮的测定方法: GB/T 19227—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of nitrogen in coal: GB/T 19227—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [23] 尤陆花. 新疆低阶煤产甲烷过程微生物多样性及产甲烷条件优化[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2014.
- YOU LH. Microbial diversity and optimization of methane production conditions in low-rank coal in Xinjiang[D]. Urumqi: Xinjiang University, 2014 (in Chinese).
- [24] 赵星程, 王博, 冯炘, 解玉红. 褐煤生物甲烷产气量影响因素的初步探究[J]. 煤炭技术, 2018, 37(10): 106-109.
- ZHAO XC, WANG B, FENG X, XIE YH. Preliminary study on influencing factors of biomethane gas production from lignite[J]. Coal Technology, 2018, 37(10): 106-109 (in Chinese).
- [25] GUPTA P, GUPTA A. Biogas production from coal via anaerobic fermentation[J]. Fuel, 2014, 118: 238-242.
- [26] GUO HY, LIU XL, BAI Y, CHEN SL. Impact of coal particle size on biogenic methane metabolism and its significance[J]. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2016, 13(2): 1297-1301.
- [27] 苏现波, 吴昱, 夏大平, 陈鑫. 温度对低煤阶煤生物甲烷生成的影响[J]. 煤田地质与勘探, 2012, 40(5): 24-26.
- SU XB, WU Y, XIA DP, CHEN X. Effect of temperature on biological methane generation of low rank coal[J]. Coal Geology & Exploration, 2012, 40(5): 24-26 (in Chinese).
- [28] RATHI R, LAVANIA M, SINGH N, SARMA PM, KISHORE P, HAJRA P, LAL B. Evaluating indigenous diversity and its potential for microbial methane generation from thermogenic coal bed methane reservoir[J]. Fuel, 2019, 250: 362-372.
- [29] PARK SY, LIANG YN. Biogenic methane production from coal: a review on recent research and development on microbially enhanced coalbed methane (MECBM)[J]. Fuel, 2016, 166: 258-267.
- [30] CHEN H, QIN Y, DENG Z, GENG M, LI GZ, SANG GJ, XIA DP. Factors influencing biogenic gas production of low-rank coal beds in the Jiergalangtu Sag, Erlian Basin[J]. Natural Gas Industry B, 2019, 6(1): 1-6.
- [31] WANG Q, GAO FB, SU XB, JIN Y, ZHAO WZ, GUO HY, SU LN, XU LW, SHI XW, DING LZ, YU SY. Graphite-enhanced methanogenesis in coal measure shale anaerobic digestion: implications for increasing gas yield and CO₂ utilization[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 503: 158202.
- [32] 苏现波, 徐影, 吴昱, 夏大平, 陈鑫. 盐度、pH对低煤阶煤层生物甲烷生成的影响[J]. 煤炭学报, 2011, 36(8): 1302-1306.
- SU XB, XU Y, WU Y, XIA DP, CHEN X. Effect of salinity and pH on biogenic methane production of low-rank coal[J]. Journal of China Coal Society, 2011, 36(8): 1302-1306 (in Chinese).
- [33] RAY S, KUPPAM C, PANDIT S, KUMAR P. Biogas upgrading by hydrogenotrophic methanogens: an overview[J]. Waste and Biomass Valorization, 2023, 14(2): 537-552.
- [34] 阮倩雯, 王乾, 苏现波, 赵伟仲, 高富博. 煤系页岩总有机碳含量与成熟度对厌氧发酵产甲烷性能的影响[J]. 煤炭学报, 2024, 49(12): 4883-4896.
- RUAN QW, WANG Q, SU XB, ZHAO WZ, GAO FB. Investigation on the effects of total organic carbon content and maturity of coal measure shale on biomethane production performance in the anaerobic digestion system[J]. Journal of China Coal Society, 2024, 49(12): 4883-4896 (in Chinese).
- [35] 乔留虎, 夏大平, 唐书恒, 张松航, 张文东. 低煤阶煤产气量的pH和Eh控制[J]. 煤田地质与勘探, 2016, 44(4): 73-76.
- QIAO LH, XIA DP, TANG SH, ZHANG SH, ZHANG WD. The control of pH and Eh of the gas production of low rank coal[J]. Coal Geology & Exploration, 2016, 44(4): 73-76 (in Chinese).
- [36] 张勋, 陈天虎, 王进, 岳正波. 铁氧化物对有机质厌氧产甲烷过程的影响及其机制[J]. 地球科学, 2018, 43(S1): 136-144.
- ZHANG X, CHEN TH, WANG J, YUE ZB. Influence of iron oxides on methanogenic process of organic matter and related mechanism[J]. Earth Science, 2018, 43(S1): 136-144 (in Chinese).
- [37] 张倩, 何环, 刘冬雪, 孙强, 黄华洲, 占迪, 黄再兴, 陶秀祥. 大柳塔长焰煤中灰分 and 无机矿物对生物产气的影响[J]. 微生物学报, 2020, 60(6): 1232-1245.
- ZHANG Q, HE H, LIU DX, SUN Q, HUANG HZ, ZHAN D, HUANG ZX, TAO XX. Effect of ash and inorganic minerals in Dalita long-flame coal on biogas production[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(6): 1232-1245 (in Chinese).
- [38] LI YQ, WANG ZX, HE ZY, LUO S, SU DF, JIANG H, ZHOU HJ, XU Q. Effects of temperature, hydrogen/carbon monoxide ratio and trace element addition on methane production performance from syngas biomethanation[J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122296.
- [39] WANG ZZ, WANG S, HU YS, DU B, MENG JZ, WU GX, LIU H, ZHAN XM. Distinguishing responses of acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens to ammonia stress in mesophilic mixed cultures[J]. Water Research, 2022, 224: 119029.
- [40] GONG SG, IZON G, PENG YB, CAO YC, LIANG QY, PECKMANN J, CHEN DF, FENG D. Multiple sulfur isotope systematics of pyrite for tracing sulfate-driven anaerobic oxidation of methane[J]. Earth and Planetary Science Letters, 2022, 597: 117827.
- [41] 张生, 李统锦. 石英溶解动力学研究进展[J]. 世界地质, 1996, 15(4): 8-13.
- [42] LIU D, DONG HL, AGRAWAL A, SINGH R, ZHANG J, WANG HM. Inhibitory effect of clay mineral on methanogenesis by *Methanosarcina mazei* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*[J]. Applied Clay Science, 2016, 126: 25-32.
- [43] 向婉丽, 陆现彩, 陆昀乔, 李娟, 张蕊, 陈笑夜, 刘欢. 含方解石铜矿石微生物氧化作用的实验研究[J]. 矿物岩

- 石地球化学通报, 2014, 33(6): 764-771.
- XIANG WL, LU XC, LU YQ, LI J, ZHANG R, CHEN XY, LIU H. Experimental study on the microbial oxidation of chalcopyrite in calcite-bearing ore[J]. Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry, 2014, 33(6): 764-771 (in Chinese).
- [44] 于春梅, 张楠, 滕海鹏. FTIR 和 Raman 技术在煤结构分析中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(7): 2050-2056.
- YU CM, ZHANG N, TENG HP. Investigation of different structures of coals through FTIR and Raman techniques[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(7): 2050-2056 (in Chinese).
- [45] THAUER RK, KASTER AK, SEEDORF H, BUCKEL W, HEDDERICH R. Methanogenic Archaea: ecologically relevant differences in energy conservation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 579-591.
- [46] GUO HG, HAN Q, ZHANG JL, LIANG WG, HUANG ZX, URYNOWICZ M, ALI MI. Available methane from anthracite by combining coal seam microflora and HO pretreatment[J]. International Journal of Energy Research, 2021, 45(2): 1959-1970.
- [47] 张昊鹏, 张丹, 何环, 任义, 陈林勇, 刘健, 黄再兴. H₂O₂ 预处理胜利褐煤镜质组的生物产气研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1960-1971.
- ZHANG HP, ZHANG D, HE H, REN Y, CHEN LY, LIU J, HUANG ZX. Biogas production of vitrinite from Shengli lignite pretreated with H₂O₂[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1960-1971 (in Chinese).
- [48] CHEN R, BAO YX, ZHANG YJ. A review of biogenic coalbed methane experimental studies in China[J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 304.
- [49] VICK SHW, GONG S, SESTAK S, VERGARA TJ, PINETOWN KL, LI ZS, GREENFIELD P, TETU SG, MIDGLEY DJ, PAULSEN IT. Who eats what Unravelling microbial conversion of coal to methane[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(7): fiz093.
- [50] VINSON DS, BLAIR NE, MARTINI AM, LARTER S, OREM WH, McINTOSH JC. Microbial methane from *in situ* biodegradation of coal and shale: a review and reevaluation of hydrogen and carbon isotope signatures[J]. Chemical Geology, 2017, 453: 128-145.
- [51] WANG Q, YE JB, YANG HY, LIU Q. Chemical composition and structural characteristics of oil shales and their kerogens using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR)[J]. Energy & Fuels, 2016, 30(8): 6271-6280.
- [52] TONG JH, HAN XX, WANG S, JIANG XM. Evaluation of structural characteristics of Huadian oil shale kerogen using direct techniques (solid-state ¹³C NMR, XPS, FT-IR, and XRD)[J]. Energy & Fuels, 2011, 25(9): 4006-4013.
- [53] COKAR M, FORD B, KALLOS MS, GATES ID. New gas material balance to quantify biogenic gas generation rates from shallow organic-matter-rich shales[J]. Fuel, 2013, 104: 443-451.