

# 黄铁矿对煤生物产气和微生物群落结构的影响

李啸宇<sup>1</sup>, 何环<sup>1\*</sup>, 张倩<sup>1</sup>, 赵晗<sup>2</sup>, 任恒星<sup>2</sup>, 陈林勇<sup>2</sup>, 朱术云<sup>3</sup>, 徐智敏<sup>3</sup>, 黄再兴<sup>1</sup>

1 中国矿业大学化工学院 煤炭加工与清洁利用教育部重点实验室, 江苏 徐州 221116

2 山西晋城控股集团煤与煤层气共采国家重点实验室, 山西 晋城 048000

3 中国矿业大学资源与地球科学学院, 江苏 徐州 221116

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 Xiaoyu, HE Huan, ZHANG Qian, ZHAO Han, REN Hengxing, CHEN Linyong, ZHU Shuyun, XU Zhimin, HUANG Zaixing. Influence of pyrite on biogenic coal bed methane production and microbial community structure[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2185-2203.

**摘要:** 【目的】研究煤中矿物质黄铁矿对生物产气的影响。【方法】本研究以陕西榆林煤作为生物产气底物, 以实验室前期驯化的产甲烷微生物作为出发菌群, 通过在厌氧体系中添加不同质量的黄铁矿进行煤生物模拟产气试验。利用气相色谱仪、液相色谱仪、酶标仪、傅里叶红外光谱仪和 Illumina 高通量测序平台研究产气过程中 CH<sub>4</sub> 含量、总挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs) 浓度、辅酶 F<sub>420</sub> 含量、产气前后煤中有机官能团和微生物群落结构的变化。【结果】添加适量黄铁矿在产气前期(15–22 d)能促进 CH<sub>4</sub> 生成, 而产气后期(29–50 d)会抑制产气, 而且添加 0.5%黄铁矿的在前中期的产气量比对照组高 48.1%, 累计产气量达到 193.67 μmol/g-coal。生物产气实验组反应液中的 VFAs 和辅酶 F<sub>420</sub> 浓度整体均高于对照组, 说明添加黄铁矿促进了反应体系中产酸细菌和产甲烷菌的活性。添加黄铁矿后煤中的醇和酚羟基, –NH–和–NH<sub>2</sub> 更易被微生物利用。黄铁矿添加对细菌和古菌的群落多样性有影响, 其中古菌影响较大。添加少量黄铁矿可以提升拟杆菌门(*Bacteroidota*)的群落丰度, 而添加黄铁矿较多时可以提升细菌中的芽孢杆菌门(*Bacillota*)的群落丰度。黄铁矿对体系中的嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)、硫还原菌属(*Desulfurella*)和 JGI-0000079-D21

资助项目: 国家自然科学基金(42172187); 国家重点研发计划(2019YFC1805400); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2021ZDPY0210)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42172187), the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1805400), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2021ZDPY0210).

\*Corresponding author. Tel: +86-516-83591059, E-mail: hehuan6819@cumt.edu.cn

Received: 2023-02-23; Accepted: 2023-05-30

细菌影响最为显著。添加黄铁矿后，古菌中的海拉古菌门(*Halobacterota*)和甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)丰度变化较大，黄铁矿对体系中的产甲烷古菌属 *Methanosarcina*、*Methanomassiliicoccus* 和 *Methanobacterium* 影响最为显著。【结论】添加少量黄铁矿会对煤的生物产气具有促进作用，同时会影响发酵过程中微生物群落的组成。

关键词：煤生物产气；黄铁矿；挥发性脂肪酸；辅酶 F<sub>420</sub>；微生物群落结构

## Influence of pyrite on biogenic coal bed methane production and microbial community structure

LI Xiaoyu<sup>1</sup>, HE Huan<sup>1\*</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>, ZHAO Han<sup>2</sup>, REN Hengxing<sup>2</sup>, CHEN Linyong<sup>2</sup>, ZHU Shuyun<sup>3</sup>, XU Zhimin<sup>3</sup>, HUANG Zaixing<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Coal Processing and Efficient and Clean Utilization of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Coal and CBM Co-Mining, Shanxi Jincheng Anthracite Mining Group Co., Ltd., Jincheng 048000, Shanxi, China

3 School of Resources and Geosciences, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the coal's pyrite on the biological gas production. [Methods] In present work, we took the coal obtained from Yulin City, Shaanxi Province as substrate and the methanogenic microorganisms domesticated by our laboratory as inoculation flora. The simulation biological gas production of coal was carried out by dosing different content of pyrite into the anaerobic system. The changes of CH<sub>4</sub> content, total volatile fatty acids (VFAs) concentration, coenzyme F<sub>420</sub> content, organic functional groups of coal before and after gas production and microbial community structure were investigated by gas chromatograph, liquid chromatograph, microplate reader, Fourier infrared spectrometer and Illumina high-throughput sequencing platform. [Results] The addition of pyrite could promote the production of CH<sub>4</sub> in the early stage of gas production (15–22 d), while inhibited the production of CH<sub>4</sub> in the late stage (29–50 d). The gas production of 0.5% dosage pyrite in the early and middle stages was 48.1% higher than that of the control group, and the cumulative gas production reached 193.67 μmol/g-coal. The concentrations of VFAs and coenzyme F<sub>420</sub> in the experimental group were higher than those in the control group, indicating that the addition of pyrite promoted the activities of acid bacteria and methanogens in the reaction system. After adding pyrite, alcohol and phenol hydroxyl, –NH– and –NH<sub>2</sub> in coal were more easily utilized by microorganisms. Adding pyrite could influence the community diversity of bacteria and archaea, and greater effect on the latter. Adding a small amount of pyrite could improve the community abundance of *Bacteroidota*, while more pyrite could increase the community abundance of *Bacillota*. Pyrite had the most significant impact on *Proteiniphilum*, *Desulfurella* and JGI-0000079-D21 bacteria in the system. After addition of pyrite, the abundance of

*Halobacterota* and *Methanosarcina* changed greatly. Pyrite had the most significant effect on *Methanosarcina*, *Methanomassiliicoccus* and *Methanobacterium*. **[Conclusion]** A small amount of pyrite can promote the biological gas production of coal, and affect the microbial community structure in fermentation liquid.

**Keywords:** biogenic coal bed methane; pyrite; volatile fatty acids; coenzyme F<sub>420</sub>; microbial community structure

煤层气是一种在煤化过程中形成, 并蕴藏于煤层中的以甲烷为主要成分的非常规天然气<sup>[1]</sup>, 由于煤层气在燃烧时只产生水和二氧化碳, 释放更多的热量, 具有低污染、高热值的特点, 因此煤层气作为一种清洁能源受到越来越多的关注<sup>[2]</sup>。

根据煤层气的成因, 可将煤层气分为热成因气、生物成因气和混合成因气<sup>[3]</sup>。其中热成因煤层气是煤层气藏的主要成因类型, 是泥炭在煤化过程中生成的以甲烷等烃类气体为主, 包含二氧化碳, 氮气等的混合气体<sup>[4]</sup>。生物成因煤层气是指煤中的有机物在包括真菌、细菌和古菌等多种微生物的共同作用下生成的以甲烷为主的混合气体, 又根据其成气时间的不同, 可以将生物成因煤层气分为原生生物成因气和次生生物成因气<sup>[5]</sup>。相较于热成因煤层气, 生物成因煤层气具有埋藏浅、年代新和易开发等特点, 研究表明我国新疆、淮南、鄂尔多斯, 美国粉河与圣胡安, 澳大利亚苏拉特与鲍文等含煤盆地煤层气中生物气占比较大<sup>[6-8]</sup>。通过往煤层中注入外源微生物或激活培养基可以提高煤层气产量, 有关微生物促产煤层气 (microbially enhanced coal bed methane, MECBM) 也成为当前煤层气开发领域的研究热点<sup>[9-10]</sup>。

煤的生物产气过程会受到多种因素的影响, 如 pH、温度、煤阶、煤的粒度和煤的预处理方式等<sup>[9-13]</sup>。煤是由有机物质和无机矿物组成的复杂混合物, 煤层气热成因过程中, 有机质的热催化会受到无机矿物组分如黏土矿物、碳酸盐矿物、氧化物矿物、类铁矿物和过度金

属元素等的影响<sup>[14]</sup>, 而有关无机矿物对生物成因气的影响报道不多。张倩等<sup>[15]</sup>研究表明煤中的灰分对生物产气有影响, 高灰分煤的生物产气量较低灰分煤的生物产气量少。何环等<sup>[16]</sup>发现添加 0%–1.0%高岭土对煤生物产气具有促进作用, 同时对煤中微生物群落结构也存在影响。煤的催化热解研究中发现一些天然硫铁矿、煤系黄铁矿和其他类铁矿石都有一定的催化活性, 能促进 C–C 键的断裂, 促进煤加氢液化反应<sup>[14]</sup>。在有机质的厌氧产气体系中, 添加类铁矿石也具有促进产甲烷能力。有研究人员向厌氧产气体系添加磁铁矿颗粒, 发现可以加快丙酸盐转化为甲烷的速率, 并提出磁铁矿介导的种间电子传递显著快于氢转移过程<sup>[17]</sup>。Jiménez 等<sup>[18]</sup>研究表明向猪粪和稻草共消化的厌氧系统中添加黏土对产甲烷具有促进作用。钟成等<sup>[19]</sup>发现添加针铁矿可以促进厌氧体系中丙酸钠产甲烷的过程。同时有研究表明向厌氧发酵体系中添加氧化铁-沸石可有效提高甲烷产量, 同时提高了附着在氧化铁-沸石体系表面的产甲烷菌活性<sup>[20]</sup>。Xia 等<sup>[21]</sup>研究发现黄铁矿的添加可以增加煤的生物产甲烷量, 但是其具体的原因并不清楚。可见, 含铁类矿物对煤的生物产气存在影响, 而黄铁矿是煤中常见的矿物质, 但目前黄铁矿对煤的生物产气的影响还需要进一步研究。陕西榆林是我国主要的煤炭能源基地, 低阶煤储量丰富, 开展煤的生物气化研究对拓宽该地区煤炭清洁利用途径具有一定意义。因此, 本文通过大浮沉实验得到低灰分

榆林煤, 通过往生物模拟产气体系中添加不同质量分数的黄铁矿, 监测产气过程中  $\text{CH}_4$  含量、总挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs) 浓度、辅酶  $\text{F}_{420}$  含量、煤中有机官能团和微生物群落结构变化, 以期为阐明黄铁矿对生物产气的影响规律提供试验依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

本研究采用的微生物来自实验室前期驯化培养的产甲烷混合菌群<sup>[15]</sup>, 主要包括芽孢杆菌门(*Bacillota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、弯曲菌门(*Campilobacterota*)等在内的细菌和以海拉古菌门(*Halobacterota*)、广古菌门(*Euryarchaeota*)为主的古菌。煤样取自陕西榆林, 为减少煤中原有矿物成分对产气结果的影响, 首先对所用煤样进行大浮沉实验(GB/T 478—2008), 然后选择灰分最低的煤样组(1.3–1.4  $\text{g}/\text{cm}^3$ , 灰分 4.84%), 破碎研磨至 0.125 mm 备用。试验中所用黄铁矿由中国矿业大学资源与地球科学学院提供, 经 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和 X 射线荧光光谱(X-ray fluorescence spectroscopy, XRF)分析主要成分为硫化亚铁(数据未列出)。将新鲜黄铁矿石破碎研磨至 0.125 mm 后立即使用, 试验采用培养基为厌氧产甲烷通用培养基, 配制方法见表 1<sup>[15-16]</sup>, 其中碳源用煤样替代, 配制好培养基

后在 121  $^\circ\text{C}$  下灭菌 20 min。

### 1.2 煤生物模拟产气实验

为研究黄铁矿对榆林煤生物模拟产气的影响, 根据原煤中铁元素含量并参照文献[22], 共设置 7 个黄铁矿投加梯度: 0%、0.5%、1%、2%、4%、6%、8%, 编号为 H-1、H-2、H-3、H-4、H-5、H-6、H-7, 每个梯度设置 3 组平行, 在厌氧手套箱中将黄铁矿和煤粉添加到 250 mL 厌氧瓶中, 每组加入 200 mL 培养基, 灭菌后用无菌注射器接种 20 mL 保存的混合菌液(细胞浓度约  $10^6$  个/mL), 压好铝箔盖, 然后将其放入恒温培养箱中, 在 35  $^\circ\text{C}$  下培养 50 d, 培养过程中定期检测瓶内参数的变化。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 $\text{CH}_4$ 含量检测

由于反应前期并没有甲烷产生, 直到 15 d 才检测到少量甲烷, 所以从第 15 天开始记录甲烷数据, 每隔 7 d 采用气相色谱仪(Agilent)检测厌氧瓶中的  $\text{CH}_4$  含量, 气相色谱条件如下: 气相色谱配 Carbonplot 色谱柱(60  $\text{m} \times 320 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ )和 TCD 检测器, 气密针进样, 进样量 0.5 mL。色谱进样口温度 150  $^\circ\text{C}$ , 柱箱温度 30  $^\circ\text{C}$ , 检测器温度 200  $^\circ\text{C}$ 。每次测完气体含量, 用灭菌的无菌针头对顶空的气体进行排气处理, 该记录点测得甲烷含量实际上是 7 d 区间段产甲烷总量, 单位为  $\mu\text{mol}/\text{g-coal}$ 。

表 1 产甲烷通用培养基

Table 1 Common medium for methanogenesis

Reagent	Dosage (g/L)	Reagent	Dosage (g/L)
$\text{MgCl}_2$	0.1	$\text{NaHCO}_3$	1.0
KCl	0.2	L-cysteine hydrochloride	0.5
NaCl	2.0	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_4$	0.001
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.4		

### 1.3.2 VFAs 浓度检测

产气结束后,分别取各实验组及空白组反应液 10 mL, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 按照每 1.5 mL 样品加 75  $\mu$ L (34%)磷酸的标准液进行封存, 处理完毕后, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜[生工生物工程(上海)股份有限公司]过滤, 然后密封待测。采用气相色谱(岛津)对 VFAs 进行测定, 色谱分析条件: 使用 Stabilwax-DA 30 m $\times$ 0.53 mm $\times$ 0.25 m 型毛细管柱, FID 检测器, 检测器温度为 150  $^{\circ}$ C。

### 1.3.3 辅酶 F<sub>420</sub> 含量分析检测

辅酶 F<sub>420</sub> 是一种胞内酶, 测定时需要先破碎细胞, 使酶释放出来, 具体方法: 用注射器从厌氧瓶中收集培养液 2 mL 至灭菌离心管中, 3 000 r/min 离心 20 min 后, 用移液器取上清 1.5 mL 转到新的灭菌离心管, 10 000 r/min 离心 20 min 后弃上清, 用 PBS (pH 7.2–7.4)重悬细胞, 显微计数细胞浓度达到 10<sup>7</sup> 个/mL 左右。然后对样品进行反复冻融, 破坏细胞并释放出胞内成分。用 BCA 蛋白法含量试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司]测定样品中总蛋白浓度, 确保其在 20–2 000  $\mu$ g/mL 范围内。按照试剂盒的操作流程取 10  $\mu$ L 样品加入酶标板孔, 用酶标仪 (Labsystems Multiskan MS)在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值), 通过标准曲线计算样品中辅酶 F<sub>420</sub> (CoF<sub>420</sub>)含量。

### 1.3.4 煤的 FT-IR 分析

在生物产气结束后, 经过真空抽滤收集反应后的残煤, 冷冻干燥后的煤样研磨至粒度小于 0.074 mm, 分别取原煤和残煤样品按 1:120 比例加入 KBr 用玛瑙研钵研磨后压片, 残煤样品选择 3 个梯度, 分别是 H-1 (0%)、H-2 (2%)、H-3 (8%), 然后用傅里叶红外光谱(Fourier Transform Infra-Red, FT-IR)仪(布鲁克 VERTEX 80 V)分析样品中有机官能团组成, 测试扫描波段范围为 4 000–400  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ , 为了更好

分析煤样品中官能团, 采用软件 Peakfit (V4.2) 进行分峰拟合, 拟合区间为 950–1 800  $\text{cm}^{-1}$ 、2 800–2 980  $\text{cm}^{-1}$ 、2 980–3 730 $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.3.5 微生物群落分析

在产气结束后, 将培养液摇匀, 取 40 mL 混合液放入离心管中, 13 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 保留沉淀 1–3 g, 将其密封放入 –80  $^{\circ}$ C 下冷冻 24 h, 用干冰寄送到上海美吉生物测试中心进行 Illumina 高通量测序。

细菌多样性测定引物序列如下: 338F: 5'-ACTCCTACGGGA GGCAGCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3'。

古菌多样性测定引物序列: 524F: 5'-TGYCA GC-CGCCGCGGTAA-3'; 958R: 5'-YCCGGCGTT G-AVTCCAATT-3'。

待测序结果返回后, 利用上海美吉生物测试中心的云平台(www.i-sanger.com)对所得到的微生物数据进行分析, 主要分析内容包括细菌和古菌的  $\alpha$  多样性指数,  $\alpha$  多样性指数分析在 OTU 水平上, 采用度量标准有 Chao、Shannon、Ace、Simpson、Coverage 等。细菌和古菌的物种组成分析主要包括门水平和属水平的分析, 采用冗余分析(redundancy analysis, RDA)分析了黄铁矿添加对细菌和古菌的影响, 同时对各组间差异较大的组进行属水平上的样本差异分析。通过对微生物多样性的分析, 探究添加黄铁矿对微生物群落结构的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 添加不同质量黄铁矿的煤生物产 CH<sub>4</sub> 量和累积产 CH<sub>4</sub> 量变化

添加不同质量分数黄铁矿的实验组和对照组的产甲烷量变化和累计产甲烷量如图 1 所示。从图 1A 中可以看出, 与对照组相比, 在厌氧发酵产气前期(15–22 d)添加黄铁矿质量分数为 1%

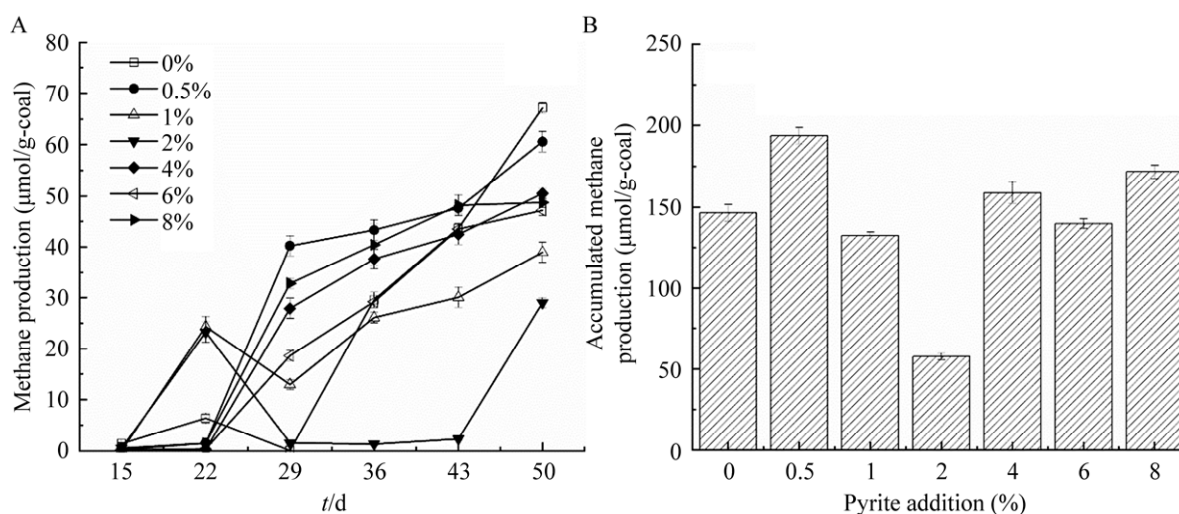


图 1 添加不同质量分数黄铁矿的产甲烷量(A)和累计产甲烷量(B)

Figure 1 Methane production (A) and cumulative methane production (B) of pyrite with different mass fractions. Error bar represents the standard deviation between parallel samples of bottles between each experimental group.

和 2% 的添加量提高了产甲烷量, 而 0.5%、4%、6%、8% 的 4 个实验组产甲烷量均小于对照组, 处于产气的抑制期。可见, 在早期添加适量的黄铁矿有利于产气, 而添加量过多或者过少均对产气有一定抑制作用。进入厌氧发酵的 22–29 d 后, 添加量为 0.5%、4%、6%、8% 四组进入产气快速上升期, 但是添加黄铁矿质量分数为 1% 和 2% 的实验组以及对照组在这个时间均出现了产气量下降的现象。在 29–50 d 产气周期, 除了 2% 试验组产气上升较慢, 其余试验组均快速上升, 但是到第 50 天, 所有实验组的产气均小于对照组, 分析原因是到产气后期, 可供利用的物质被产甲烷菌群消耗, 产气速率下降, 也可能是在该产气周期的后期黄铁矿对产甲烷有一定抑制作用。从图 1B 来看, 对照组的累积产甲烷量为 147.77  $\mu\text{mol/g-coal}$ , 实验组 0.5% 的添加量的累积产甲烷量达到了 193.67  $\mu\text{mol/g-coal}$ , 2% 的添加量的累积产甲烷量最少, 仅 57.69  $\mu\text{mol/g-coal}$ 。有研究表明, 铁作为厌氧发酵体系中常见的微量元素, 会对煤的生物产气系统的稳定性和产气的

效率存在影响<sup>[23]</sup>。其中 Moestedt 等<sup>[23]</sup>研究证明, 在适当添加微量元素如铁、钴、镍时, 会对产气具有促进作用。黄铁矿作为煤中一种常见的典型半导体矿物质, 有研究发现, 包括磁铁矿和黄铁矿在内的含铁矿物对有机质的热演化或油气的生成具有重要的影响<sup>[24]</sup>。也有研究表明, 黄铁矿-水界面上能够在厌氧环境中产生大量的活性氧组分(包括羟基自由基、过氧化氢等)<sup>[25]</sup>, 而这些活性氧组分对有机质均有较强的氧化作用<sup>[26-27]</sup>。结合图 1A 中变化趋势可见, 当少量添加黄铁矿时, 由于产生的活性氧组分对煤中有机质的活化氧化, 增加了可利用有机质的含量, 因此在产气前期对产甲烷具有一定的促进作用。但是, 随着黄铁矿的添加量的增大, 产生的活性氧组分会对体系中的厌氧微生物造成一定损害, 影响了产甲烷量<sup>[25]</sup>。随着培养时间增加, 体系中微生物的生物量增加, 因此甲烷产量逐渐提升, 但是由于黄铁矿的增加对微生物的损害作用, 整体上来看添加黄铁矿的实验组的产气速率在产气后期低于对照组, 添加黄铁矿质量分数为 0.5%、4% 和

8%的实验组的产气量高于对照组, 而添加黄铁矿质量分数为 1%、2%和 6%的实验组的产气量低于对照组。

## 2.2 添加不同浓度黄铁矿的煤生物产气体系中 VFAs 浓度变化

在煤的微生物产气的过程中, 产酸阶段发生在水解阶段之后, 是产气过程的第二阶段, 在这一阶段中, 微生物将上一阶段的底物进一步分解生成 VFAs、氢气、二氧化碳和醇类等物质<sup>[9,28]</sup>。VFAs 进一步分解可以生成乙酸等直接可被产甲烷菌利用的底物, 但是当其浓度过高会降低发酵液的 pH, 抑制产甲烷菌群的活性<sup>[11,29]</sup>, 从而对微生物的产气进程产生抑制效果。根据研究显示, 当体系中的 VFAs 浓度超过 400 mg/L 时, 就会产生抑制效果<sup>[30]</sup>。VFAs 主要以乙酸、丙酸和丁酸为主, 存在少量的戊酸和异戊酸等物质。有研究指出, VFAs 中的乙酸, 丙酸和丁酸可以进行产气, 但是己酸对产气有抑制作用<sup>[31]</sup>。图 2 是添加不同质量的黄铁矿的实验组和对照组的 VFAs 变化图, 可以看出与对照组相比, 实验组中除黄铁矿添加量为 1%的组外, 其他组的 VFAs 浓度均超过了对照组, 在添加黄铁矿的质量分数为 0.5%的实验组中, VFAs 浓度最高达到

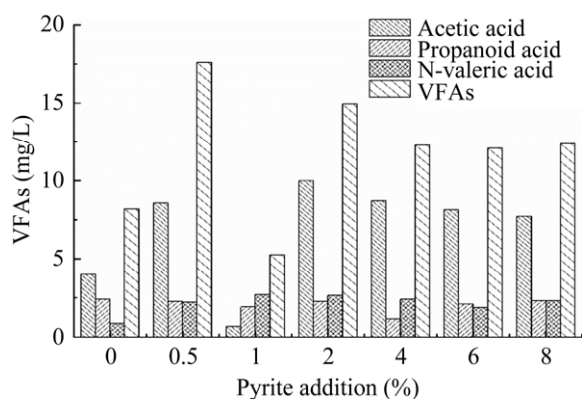


图 2 添加不同质量分数黄铁矿后 VFAs 浓度变化  
Figure 2 VFAs concentration changes after adding pyrite of different mass fractions.

17.60 mg/L, 较对照组高 112.92%。在厌氧发酵体系中, 针铁矿的添加对丙酸钠产甲烷有一定强化作用, 其可能是通过对有机质的吸附<sup>[19]</sup>和矿物直接参与电子传递<sup>[32]</sup>有关。VFAs 的变化情况说明在厌氧体系中添加适当的黄铁矿可以促进其生成, 但 VFAs 的增多并不一定能促进产气, 结合图 2 的数据分析, 在添加黄铁矿质量分数为 1%、2%、6%的实验组中的 VFAs 的浓度与对照组相比较, 添加黄铁矿质量分数为 2%和 6%的组都高于对照组, 而黄铁矿添加量为 1%的组低于对照组, 但是这 3 组的 CH<sub>4</sub> 产量低于对照组, 推测原因是添加铁矿质量分数为 2%和 6%的实验组中的乙酸含量剩余较多, 而乙酸是甲烷合成的前体物质, 因此在这两个实验组中产甲烷菌对乙酸的利用不足, 导致了 CH<sub>4</sub> 产量较低。而添加黄铁矿质量分数为 1%的实验组中, 黄铁矿的添加可能抑制了产酸细菌和产甲烷菌的生命活动, 因此 CH<sub>4</sub> 产量较低。

## 2.3 添加不同浓度黄铁矿的煤生物产气体系中辅酶 F<sub>420</sub> 浓度变化

辅酶 F<sub>420</sub> 是产甲烷菌产生的一种氧化还原辅助因子, 其含量高低能够反应体系中产甲烷菌的活性<sup>[33]</sup>。

图 3 是添加不同质量分数黄铁矿的实验组与对照组辅酶 F<sub>420</sub> 的浓度变化图。从图中可以看出, 添加黄铁矿的实验组的辅酶 F<sub>420</sub> 与对照组相比有一定波动, 其中添加黄铁矿质量分数为 1%、4%和 8%的实验组辅酶 F<sub>420</sub> 浓度高于对照组 (42.39 ng/L), 添加黄铁矿质量分数为 1%的时候最高, 达到了 46.44 ng/L。其他 3 个实验组的辅酶 F<sub>420</sub> 含量低于对照组, 最低为添加 2%黄铁矿, 此时辅酶 F<sub>420</sub> 浓度为 41.87 ng/L。可见黄铁矿的添加对辅酶 F<sub>420</sub> 浓度变化存在影响。结合图 1 与图 3, 辅酶 F<sub>420</sub> 浓度最低的实验组为添加 2%黄铁矿组, 其累计产甲烷量也最低, 可见 2%的黄

铁矿对体系中产甲烷菌的活性有一定抑制作用。添加 1% 黄铁矿时辅酶  $F_{420}$  浓度尽管最高, 但受限于 VFAs 的含量较低, 所以累计产甲烷量并不高, 可见, 黄铁矿的添加对产气的影响需要综合有机质的降解和产甲烷微生物的活性来综合考虑。

#### 2.4 添加不同浓度黄铁矿的煤生物产气后有机官能团变化

研究表明, 煤经过生物产气后, 其表面的亲水性、带电性质和官能团等均会发生改变<sup>[34-35]</sup>。为研究添加黄铁矿对煤生物产气后表面性质的影响, 采用 FT-IR 技术对煤及产气后残煤的官能团进行分析。图 4 中分别显示了黄铁矿添加量为 H-1 (0%)、H-4 (2%) 和 H-7 (8%) 产气后煤样与原煤的 FT-IR 谱图比较。可以看出 3 个梯度添加组之间出峰位置并没有明显变化, 这说明了煤被微生物利用的过程中的官能团变化大致相同。与原煤对比, 3 个梯度的实验组在  $3\,420\text{ cm}^{-1}$  的位置均未出峰, 根据煤样的红外特征吸收峰对照表,  $3\,420\text{ cm}^{-1}$  附近对应醇和酚  $-\text{OH}$  及  $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}_2$  的伸缩振动, 说明产气过程中有煤表面的醇或酚  $-\text{OH}$  或  $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}_2$  被微生物利用。

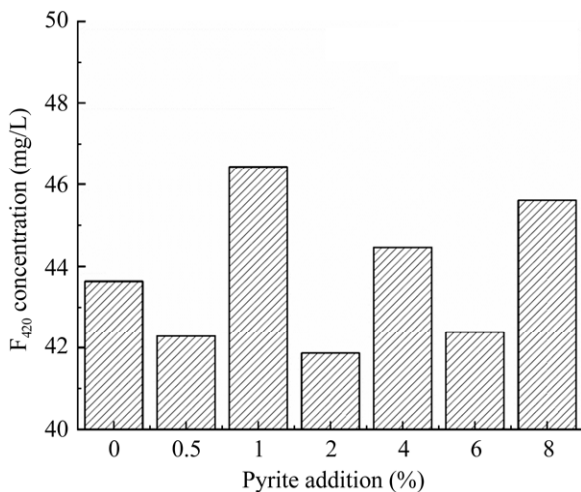


图 3 添加不同质量分数黄铁矿后辅酶  $F_{420}$  变化  
Figure 3 Change of coenzyme  $F_{420}$  after adding pyrite of different mass fractions.

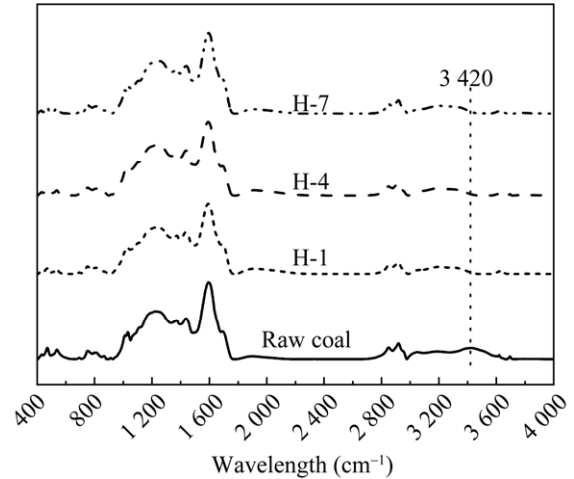


图 4 黄铁矿实验组中添加量第 1、4、7 梯度产气后煤样与原煤的红外光谱吸收峰对比(H-1: 0%; H-4: 2.0%; H-7: 8.0%)

Figure 4 Comparison of infrared spectrum absorption peaks between coal sample and raw coal after gas generation with the 1st, 4th and 7th gradient of pyrite addition in the experimental group (H-1: 0%; H-4: 2.0%; H-7: 8.0%).

为进一步比较三组实验组的煤表面官能团的变化, 对上述三个实验组 H-1 (0%)、H-4 (2%) 和 H-7 (8%) 的红外图谱进行分峰拟合, 分峰区间选择波数为  $600\text{--}1\,800\text{ cm}^{-1}$  和  $2\,600\text{--}3\,600\text{ cm}^{-1}$  两个区间, 分峰拟合结果见图 5。

结合实验组 H-1 (0%)、H-4 (2%) 和 H-7 (8%) 的红外分峰图, 并结合煤中常见的红外官能团<sup>[36]</sup>, 可以看出实验组的煤样在波数为  $2\,600\text{--}3\,600\text{ cm}^{-1}$  的区间内, 均存在胺、酰胺 ( $3\,184\text{ cm}^{-1}$ ) 的吸收峰,  $-\text{OH}$  ( $3\,200\text{--}3\,400\text{ cm}^{-1}$ ) 的吸收峰以及多个 C-H 键的吸收峰, 在出峰位置上并无明显区别, 且出峰强度也基本一致。但实验组 H-4 (2%) 在  $3\,288\text{ cm}^{-1}$  有 N-H 官能团吸收峰, 其他两组实验组在  $3\,383\text{ cm}^{-1}$  处出峰, 推测是黄铁矿的添加使得微生物对煤中的有机组分利用存在差异, 所以官能团出现变化所致。在波数  $600\text{--}1\,800\text{ cm}^{-1}$  区间, 3 个实验组出现了大量的苯环 C-H 的吸收峰 ( $600\text{--}860\text{ cm}^{-1}$ ), 同时可见 C-O 及 C-N 吸



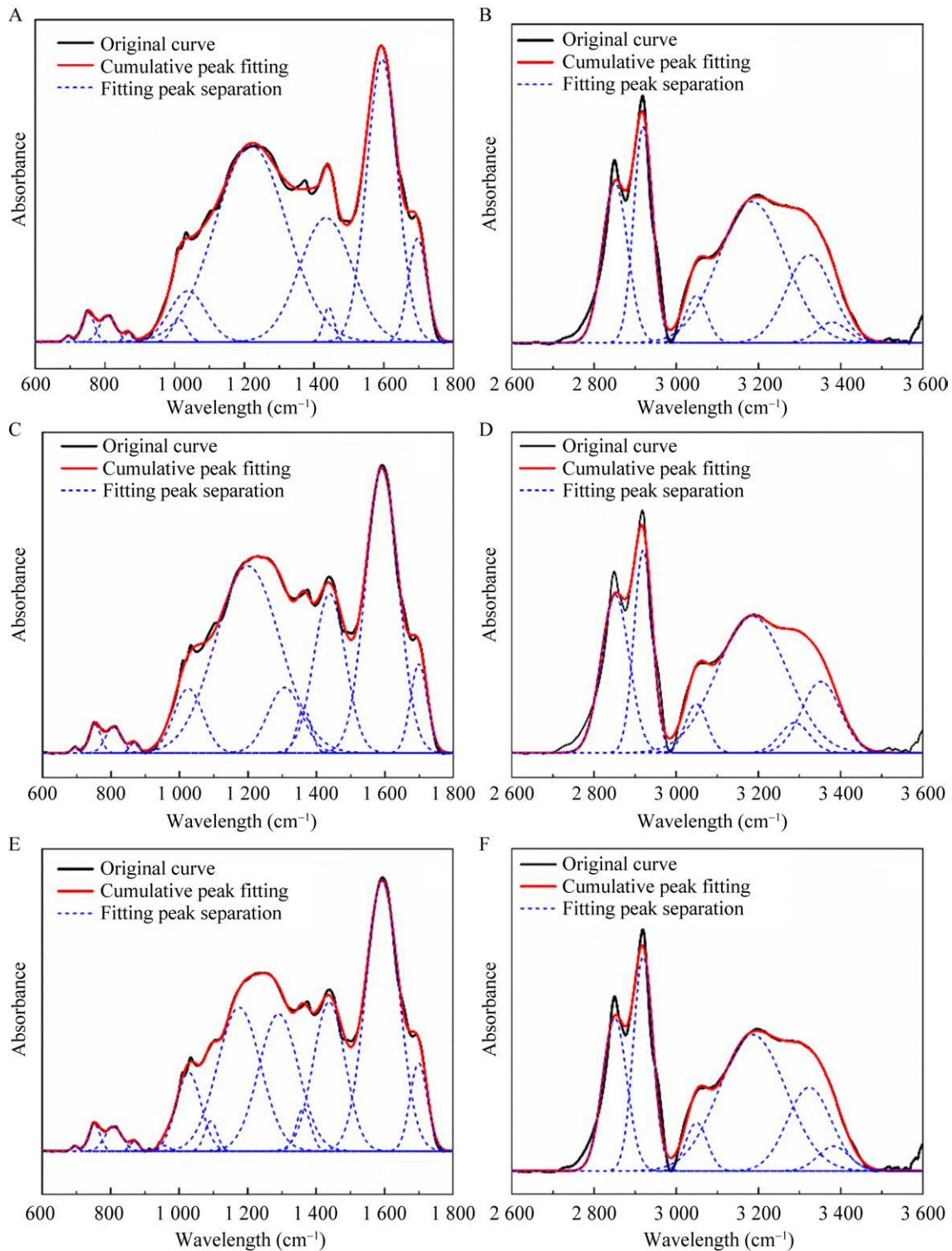


图5 实验组 H-1 (0%)、H-4 (2%)和 H-7 (8%)的红外分峰拟合图

Figure 5 Peak fitting diagram of H-1 (0%), H-4 (2%) and H-7 (8%) in the experimental group. A, B: Infrared peak splitting fitting of experimental group H-1. C, D: Infrared peak splitting fitting of H-4 in the experimental group. E, F: Infrared peak splitting fitting of H-7 in the experimental group.

收峰(1 000–1 350  $\text{cm}^{-1}$ ), 苯环 C=C 吸收峰(1 450–1 600  $\text{cm}^{-1}$ ) 以及 C=O 吸收峰(1 699  $\text{cm}^{-1}$ ), 但实验组 H-7 (8%) 在 1 175  $\text{cm}^{-1}$  和 1 290  $\text{cm}^{-1}$  处出峰, 这里是 C–O 及 C–N 出峰位置, 可能存在的物质是胺、酰胺、醇、酚等。由于本研究中并未对反应不同阶段的煤中有机官能团进行比较分析, 无法判断在厌氧产气早期黄铁矿对有机质的氧化是否会引煤中有机组成变化。不过, 从产甲烷的动态变化情况来看及 50 d 厌氧发酵后的煤样分析, 不同添加量的黄铁矿会对煤中有机质的成分和组成产生影响, 最终影响甲烷的产量。

## 2.5 添加不同浓度黄铁矿的煤生物产气后微生物群落组成变化

本次 7 组样品高通量测序结果共得到 289 026 条细菌和 327 099 条古菌 16S rRNA 基因序列。细菌和古菌的序列平均长度分别是 416.58 bp 和 429.68 bp。表 2 列出了 7 组样品(H-1: 0%、H-2: 0.5%、H-3: 1%、H-4: 2%、H-5: 4%、

H-6: 6%、H-7: 8%) 的  $\alpha$  多样性指数, 其中 Sobs、Chao 和 Ace 三个指标可以反应微生物的群落丰富度, Shannon 和 Simpson 两个指标可反映微生物群落多样性。从表 2 中可以看出, 实验组 H-4 (2%) 的细菌丰富度 Sobs 指数最高, 实验组 H-7 (8%) 的细菌丰富度 Chao 指数和 Ace 指数最高, 说明这两组产气体系中细菌种类最为丰富, 而实验组 H-3 (1%) 的古菌丰富度 Chao 指数和 Ace 指数最高, 其古菌丰富度 Sobs 指数也较高, 说明当黄铁矿添加量为 1% 时, 产气体系中古菌的种类最丰富。同时, H-1 (0%) 的细菌 Shannon 指数最高而其 Simpson 指数最低, 这说明在不添加黄铁矿时, 产气体系中细菌多样性最高, 而 H-4 (2%) 的古菌 Shannon 指数最高而其 Simpson 指数最低, 说明当黄铁矿的添加量为 2% 时, 产气体系中古菌的生物多样性最大。

结合表 2 与图 6 中的结果可以看出, 添加黄铁矿对微生物群落的多样性具有一定的影响。但

表 2 黄铁矿试验组的  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Alpha diversity index of pyrite test group

Sample	Sobs	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Coverage	
Bacteria	1	162	3.389 341	0.060 756	187.113 5	185.214 3	0.999 265
	2	164	3.266 365	0.067 084	193.859 1	191.352 9	0.998 911
	3	154	3.372 546	0.062 481	175.551 9	175.083 3	0.999 336
	4	175	3.268 652	0.066 576	192.979	190	0.999 291
	5	160	3.305 033	0.068 827	190.591 5	182.235 3	0.999 159
	6	165	3.367 911	0.059 638	183.113 1	183.071 4	0.999 343
	7	154	3.098 979	0.082 921	224.888 5	197.153 8	0.999 079
Archaea	1	39	0.815 753	0.639 567	64.513 84	55.5	0.999 69
	2	45	0.885 507	0.613 335	55.220 22	56.25	0.999 809
	3	63	0.674 428	0.721 071	160.151 9	109.428 6	0.999 476
	4	54	1.060 702	0.532 388	66.391 73	65.142 86	0.999 644
	5	50	0.444 724	0.825 69	98.305 05	88	0.999 427
	6	66	0.863 349	0.639 06	74.941 82	72.6	0.999 719
	7	51	0.891 979	0.611 669	98.689 77	81.6	0.999 634

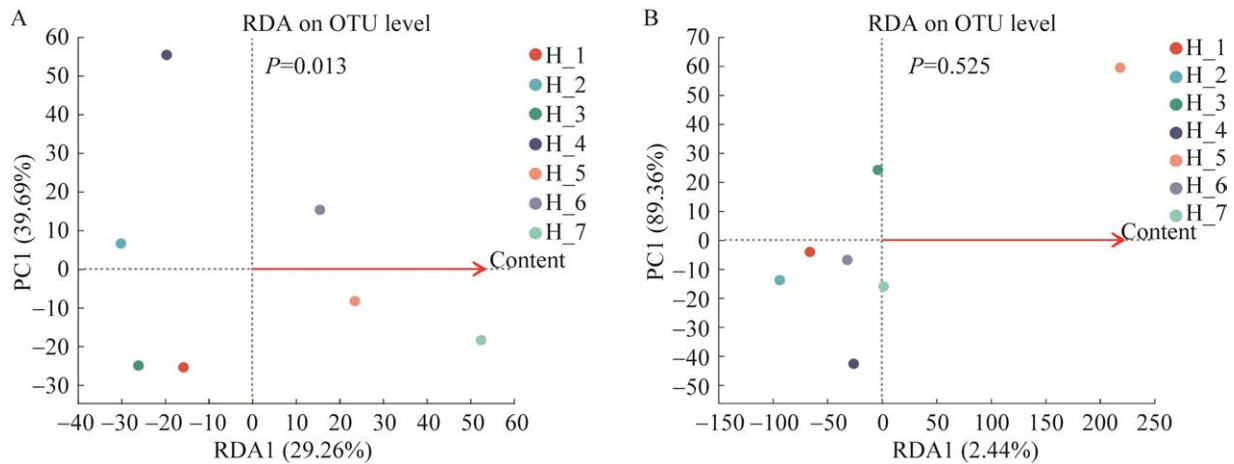


图 6 添加黄铁矿对细菌和古菌影响的显著性

Figure 6 Significance of adding pyrite on bacteria and archaea. A: The impact of pyrite as an environmental factor on bacteria. B: The impact of pyrite as an environmental factor on archaea.

这种影响根据图 6A 主要体现在细菌上,从图 6A 中可以看出  $P=0.013$ , 黄铁矿的存在对细菌多样性的影响具有显著作用。而在图 6B 中,  $P=0.525$ , 古菌受到的影响较小, 在黄铁矿的添加量作为环境因素时, 它并未对古菌的多样性体现出有显著影响。钟成等<sup>[19]</sup>研究发现添加针铁矿会对厌氧产气体系中细菌和古菌的群落组成产生影响。张勋<sup>[37]</sup>也发现针铁矿和赤铁矿会影响乙酸钠产甲烷体系中的细菌和古菌组成, 因而影响甲烷的生成。

根据测序结果, 黄铁矿实验组细菌共有 228 个 OTU, 可以分为 17 个门 124 个属, 图 7 为添加黄铁矿实验组细菌在门水平和属水平上的群落结构图, 图中横轴代表 7 组样本(H-1: 0%、H-2: 0.5%、H-3: 1%、H-4: 2%、H-5: 4%、H-6: 6%、H-7: 8%), 纵轴代表相应的物种在所有物种中所占的比例。从图 7A 中可以看出, 在门水平上, 芽孢杆菌门 (*Bacillota*) 最为丰富 (37.49%–53.08%), 其次依次是拟杆菌门 (*Bacteroidota*) (12.39%–25.55%)、弯曲菌门 (*Campilobacterota*) (8.31%–15.96%)、*Synergistota* (6.18%–15.33%)、脱硫细菌门 (*Desulfobacterota*) (6.25%–9.79%)、螺旋菌门 (*Spirochaetota*)

(2.76%–7.20%)、*Caldisericota* (0.28%–1.31%)等。根据研究显示, 在微生物煤产气的过程中, 细菌在门水平上主要以 *Bacillota*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes* 为主<sup>[9]</sup>。实验组中的 H-5 (4%), H-6 (6%), H-7 (8%)的 *Bacillota* 丰度明显高于对照组 H-1 (0%), 可见当添加较多黄铁矿时, *Bacillota* 的细菌的生长繁殖旺盛, 这有助于芳烃、长链烷烃的降解<sup>[38-39]</sup>。而添加较少黄铁矿量(H-2: 0.5%、H-3: 1%、H-4: 2%)时, *Bacteroidota* 的群落丰度高于对照组。从图 7B 中可以看出, 在属水平上, 嗜蛋白菌属 (*Proteiniphilum*) (8.51%–22.12%)占比最高, 属于拟杆菌门。其次是属于 *Bacillota* 的副梭菌属 (*Paraclostridium*) (8.66%–17.68%)以及属于假单胞菌门的硫还原菌属 (*Desulfurella*) (8.31%–15.96%)。此外菌群丰度较高的还有 JGI-0000079-D21 (6.18%–15.33%)、*Clostridium\_sensu\_stricto\_13* (属于梭菌属) (6.94%–12.66%)、*norank\_f\_Spirochaetaceae* (属于螺旋体门) (2.51%–6.83%)、杆状脱硫菌属 (*Desulforhabdus*) (3.95%–5.59%)、脱硫杆菌属 (*Desulfitobacterium*) (2.09%–4.34%)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)

(1.65%–5.33%)等。其中嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)可以和 *Proteiniborus* 水解蛋白质和脂类物质<sup>[40-41]</sup>, 主要作用于煤的微生物产气的第一阶段。副梭菌属(*Paraclostridium*)属于芽孢杆菌门(*Bacillota*), 具有降解淀粉、纤维质、几丁质等物质的作用<sup>[38,42]</sup>。结合图 5 红外拟合分析结果, H-4 (2%)中的 *Proteiniphilum* 的占比比其他两个实验组高, 而

*Proteiniphilum* 可以水解蛋白质和脂肪等物质, 推测是由于该菌属丰度较高使得对应的物质被利用的更多, 所以 H-4 (2%)在 1 175  $\text{cm}^{-1}$  和 1 290  $\text{cm}^{-1}$  处出峰强度小。*Desulfitobacterium* 具有发酵有机物的能力, 可以分解丙酸、苯甲酸、乙醇和芳香族化合物, 且可以利用溶液中的乙酸和  $\text{SO}_4^{2-}$  发生还原反应, 主要产物是  $\text{HS}^-$ <sup>[43]</sup>。

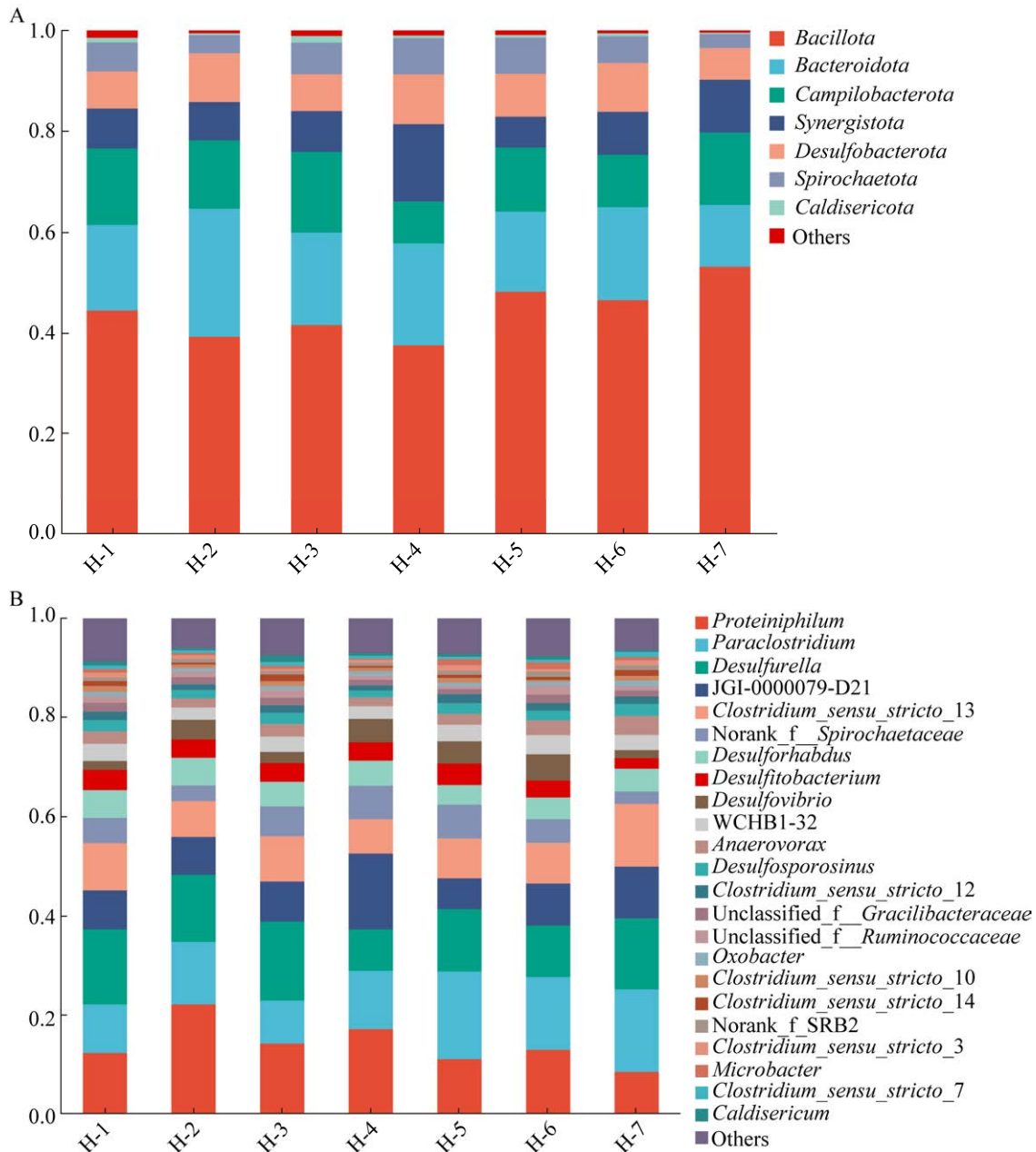


图 7 添加黄铁矿试验组细菌在门水平(A)和属水平(B)的群落结构图

Figure 7 Community structure of bacteria at phylum level (A) and genus level (B) of pyrite added test group.

为了进一步分析不同黄铁矿添加对细菌群落结构的影响, 选择样本间差异较大的 H-2 (0.5%)和 H-4 (2%)在细菌门和属水平上进行了群落差异显著性检验, 其结果如图 8 所示。从图

8A 细菌门水平的分析结果可知, 添加不同黄铁矿的两组样本之间的微生物群落结构差异显著, 其中 *Synergistota* 变化最为显著, *Bacillota* 和 *Campilobacterota* 次之。从图 8B 中细菌属水平

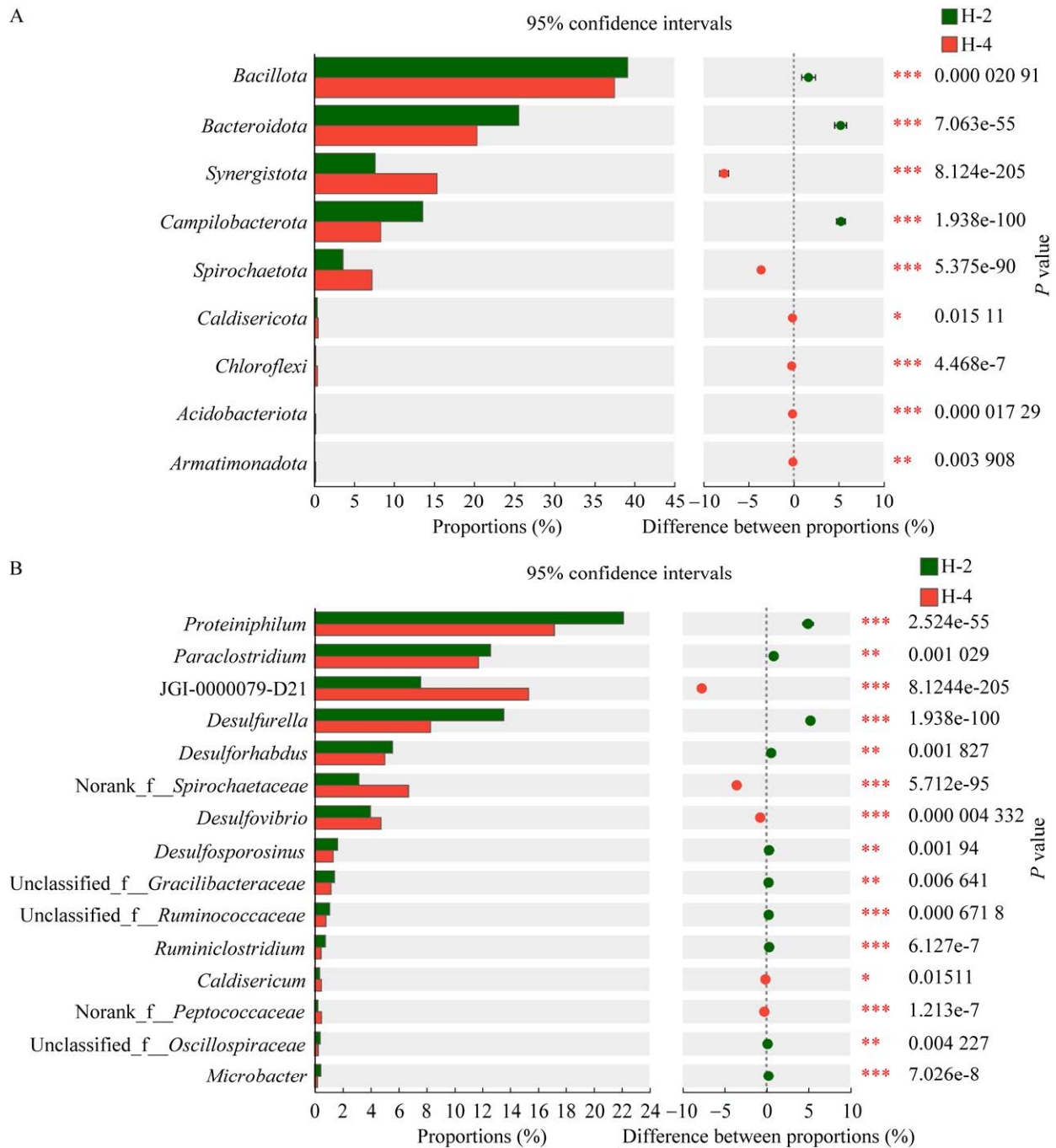


图 8 添加不同黄铁矿组(H-2: 0.5%和 H-4: 2%)在细菌门(A)和属(B)分类水平上群落差异分析(95%置信区间, Fisher 精确检验)

Figure 8 Difference analysis of pyrite added test group community at phylum (A) and genus (B) of bacterial classification level between H-2 (0.5%) and H-4 (2%) (95% confidence interval, Fisher exact test).



的分析结果可知, *Proteiniphilum* 和 *Desulfurella* 和 JGI-0000079-D21 差异最为显著。钟成等<sup>[19]</sup> 研究针铁矿使丙酸钠厌氧发酵产甲烷体系中的进行糖代谢的 *Petrimonas* 的相对丰度降低, 但对整体细菌的多样性影响却不明显。而本研究 2 个样本中参与脂类等有机物代谢的微生物属差异显著。由于煤是大分子物质, 其中可直接被利用的小分子物质较少, 并且本研究中所得到的微

生物群落组成源于培养后阶段(50 d), 参与大分子有机物降解的微生物种群也趋于平稳, 所以其他属的微生物种群丰度差异也不明显, 但是几种差异度较显著的微生物都在脂类和有机物降解中扮演重要作用, 可见, 黄铁矿的添加对参与有机物降解的微生物影响效果明显。

古菌的 7 组实验样品中共测得 102 个 OTU, 可以分为 5 个门, 11 个属, 图 9 为黄铁矿实验

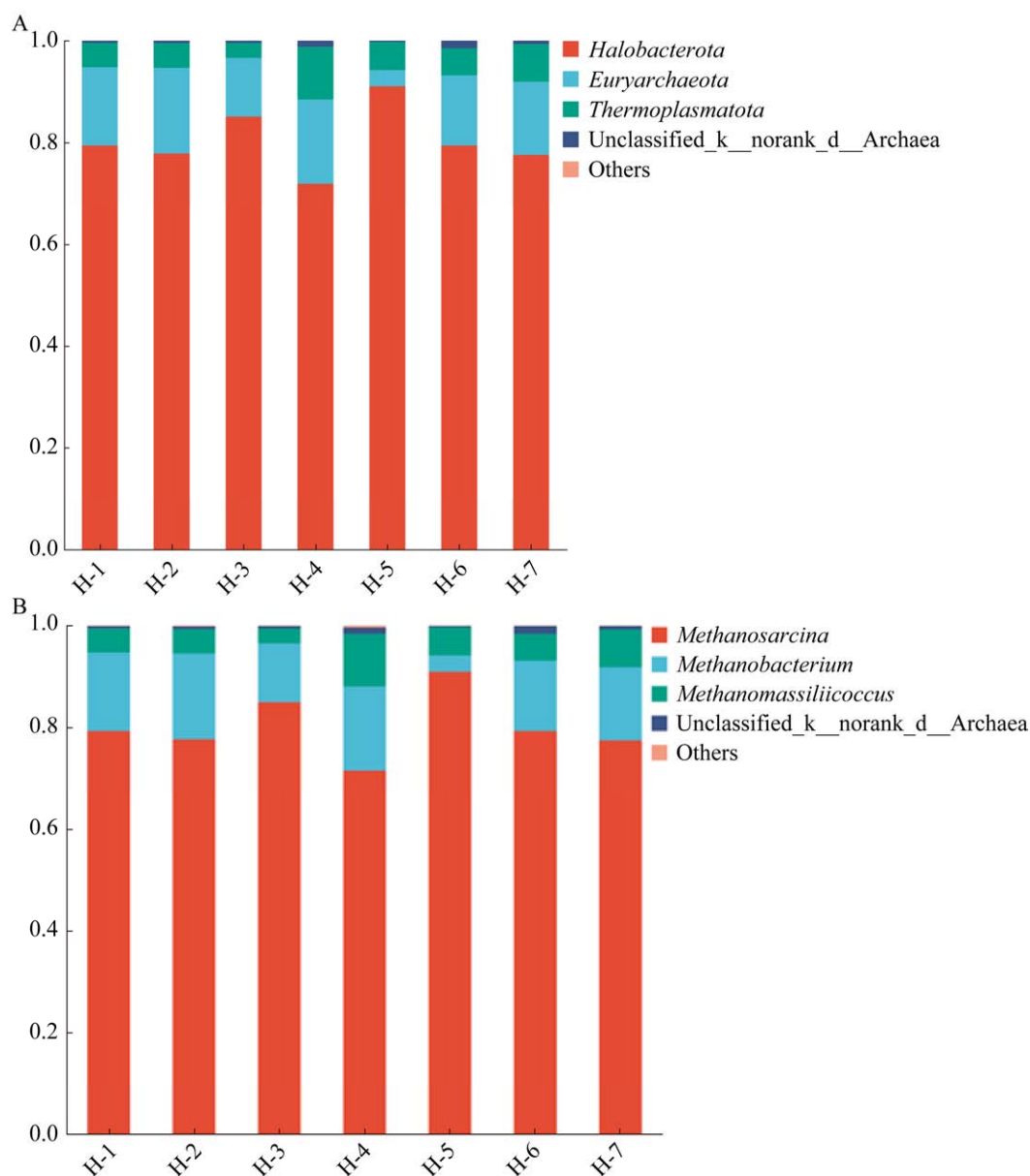


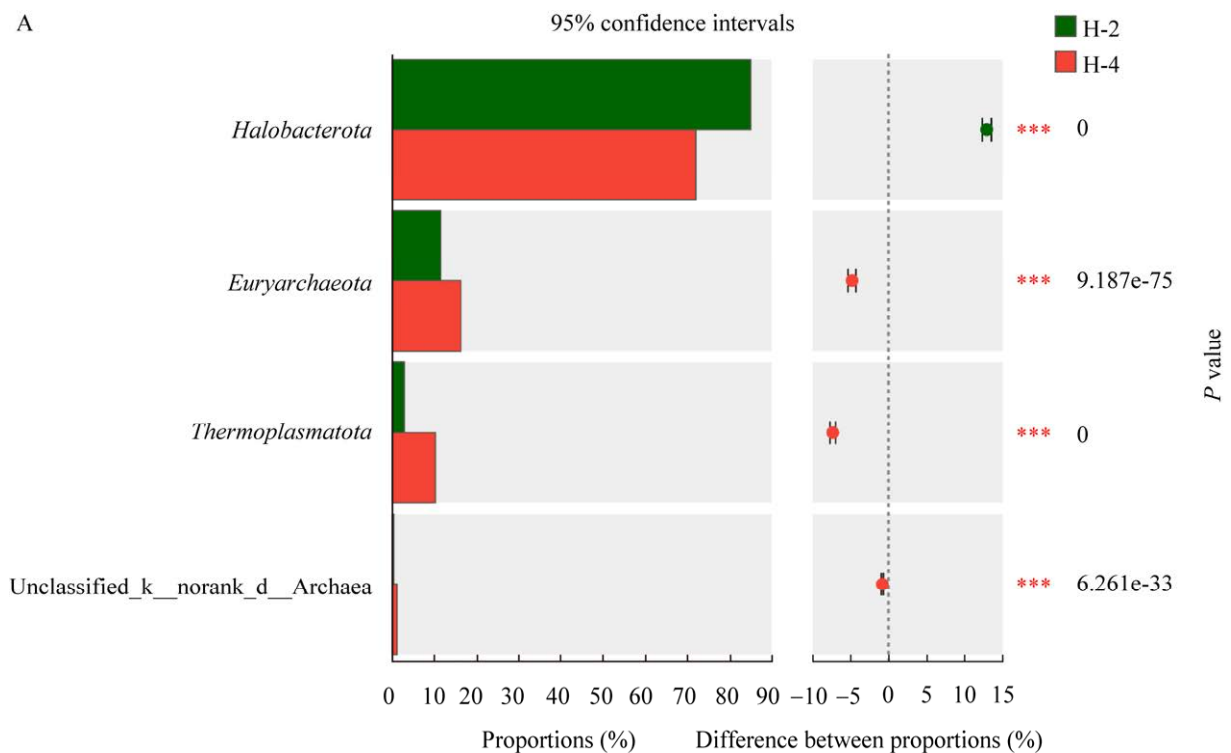
图 9 添加黄铁矿试验组古菌门水平(A)和属水平(B)的群落结构图

Figure 9 Community structure of archaea level (A) and genus level (B) in pyrite added test group.

组古菌在门水平(A)和属水平(B)的群落柱状图。从图 9A 中可以看出, 7 个实验组中海拉古菌门 (*Halobacterota*) (72.08%–91.07%) 的丰度最高, 其次是广古菌门 (*Euryarchaeota*)。在黄铁矿添加量为 5% 时, *Halobacterota* 的丰度是所有组中最高的, 它属于阿斯加德超门, 研究认为, *Halobacterota* 具有活化并厌氧氧化水热生成的短链烃的能力<sup>[44]</sup>。而 *Euryarchaeota* 是最主要的古菌门类之一, 包含多种产甲烷菌属<sup>[45]</sup>。从图 9B 中可以得知在古菌的属水平的丰度上, 甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) (71.71%–91.03%) 的丰度最高, 然后是甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) (3.16%–16.73%) 和 *Methanomassiliicoccus* (属于第七产甲烷古菌目) (2.94%–10.28%) 以及 unclassified\_k\_norank\_d\_Archaea (未分类古菌) (0.27%–1.51%), 这证明了煤在进行微生物产气的后期, 产甲烷菌群承担将前 3 个阶段分解得到的前体物质合成甲烷, 而其

中的 *Methanosarcina* 是混合营养型的产甲烷菌, 可以利用乙酸或者氢气和二氧化碳进行产甲烷, 而 *Methanobacterium* 则是利用氢气和二氧化碳生成甲烷, 这说明在反应体系中, 存在两种可以产甲烷的途径<sup>[9]</sup>。

从各实验组产甲烷菌组成丰度变化来看, 样本之间的差异度变化不大, 为了进一步对不同黄铁矿添加组之间的试验组之间的群落差异进行分析, 选择两个相对差异较大的添加黄铁矿样本 H3 (1%) 和 H4 (2%) 进行了群落差异显著性检验, 其结果如图 10 所示。从门水平来看 (图 10A) *Halobacterota* 的样本间差异性最明显, 而从属水平来看 (图 10B) *Methanosarcina*、*Methanomassiliicoccus* 和 *Methanobacterium* 差异性最为显著。从 2 个样本的累积产甲烷量 (图 1B) 和  $F_{420}$  (图 3) 的比较情况来看, 两者之间差异明显, 结合这两类微生物的代谢特点, 可见黄铁矿的添加主要影响利用小分子有机酸产甲烷的古菌。



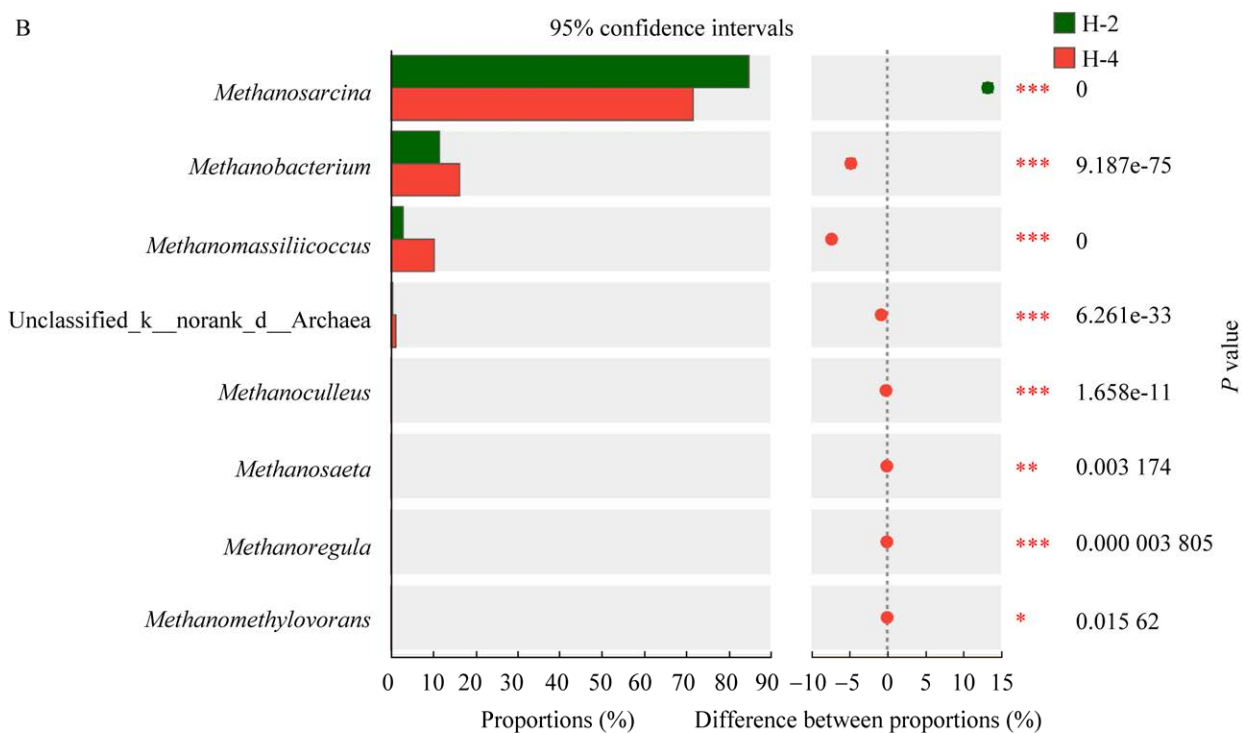


图 10 添加不同黄铁矿组(H-3: 1%和 H-4: 2%) 在古门(A)和属(B)分类水平上群落差异分析(95%置信区间, Fisher 精确检验)

Figure 10 Difference analysis of pyrite added test group community at phylum (A) and (B) genus of archaea classification level between H-3 (1%) and H-4 (2%) (95% confidence interval, Fisher exact test).

### 3 结论

(1) 黄铁矿的添加对甲烷生产在前期有一定促进作用, 而产气后期则会抑制产气速率, 在前中期(15–29 d)时, 添加 0.5%黄铁矿实验组累积产甲烷量最高达 193.67  $\mu\text{mol/g-coal}$ 。

(2) 黄铁矿的添加能提高发酵液中和 VFAs 的浓度和辅酶  $F_{420}$  浓度, 黄铁矿添加量为 0.5% 的实验组的 VFAs 浓度达到了 17.60 mg/L, 较对照组高 112.92%, 辅酶  $F_{420}$  在添加黄铁矿质量分数为 1%时最高, 达到了 46.44 ng/L。FT-IR 结果说明黄铁矿能够促进煤中醇、酚-OH、-NH-和 -NH<sub>2</sub> 被微生物利用。

(3) 添加黄铁矿对煤生物产气体系中的细菌和古菌种群结构有一定影响。通过比较细菌和古菌的样本差异性发现, 黄铁矿添加可提高

*Bacillota* 的丰度, 而添加少量的黄铁矿则有助于提高 *Bacteroidota* 的群落丰度, 黄铁矿对体系中的 *Proteiniphilum* 和 *Desulfurella* 和 JGI-0000079-D21 影响最为显著。添加黄铁矿后, *Halobacterota* 和 *Methanosarcina* 丰度变化较大, 黄铁矿对体系中的 *Methanosarcina*、*Methanomassiliicoccus* 和 *Methanobacterium* 影响最为显著。

### 参考文献

- [1] MAYUMI D, MOCHIMARU H, TAMAKI H, YAMAMOTO K, YOSHIOKA H, SUZUKI Y, KAMAGATA Y, SAKATA S. Methane production from coal by a single methanogen[J]. Science, 2016, 354(6309): 222-225.
- [2] MORRE TA. Coalbed methane: a review[J]. International Journal of Coal Geology, 2012, 101: 36-81.



- [3] RIGHTMIRE CT, EDDY GE, KIRR JN. Coalbed Methane Resources of the United States[M]. American Association of Petroleum Geologists, 1984.
- [4] 吴保祥, 段毅, 孙涛, 何金先. 热成因煤层气组成与演化模拟[J]. 天然气工业, 2010, 30(5): 129-132, 152. WU BX, DUAN Y, SUN T, HE JX. A simulation study on the composition and evolution of thermogenic coalbed gas[J]. Natural Gas Industry, 2010, 30(5): 129-132, 152 (in Chinese).
- [5] 琚宜文, 李清光, 颜志丰, 孙盈, 鲍园. 煤层气成因类型及其地球化学研究进展[J]. 煤炭学报, 2014, 39(5): 806-815. JU YW, LI QG, YAN ZF, SUN Y, BAO Y. Origin types of CBM and their geochemical research progress[J]. Journal of China Coal Society, 2014, 39(5): 806-815 (in Chinese).
- [6] SCHWEITZER H, RITTER D, MCINTOSH J, BARNHART E, CUNNINGHAM AB, VINSON D, OREM W, FIELDS MW. Changes in microbial communities and associated water and gas geochemistry across a sulfate gradient in coal beds: Powder River Basin, USA[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2019, 245: 495-513.
- [7] BAO Y, WANG WB, MA DM, SHI QM, ALI A, LV DK, ZHANG CK. Gas origin and constraint of  $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$  distribution in the dafoxi mine field in the southern margin of the Ordos Basin, China[J]. Energy & Fuels, 2020, 34(11): 14065-14073.
- [8] FU HJ, YAN DT, YANG SG, WANG XM, WANG G, ZHUANG XG, ZHANG LY, LI GQ, CHEN X, PAN ZJ. A study of the gas-water characteristics and their implications for the coalbed methane accumulation modes in the southern Junggar Basin, China[J]. AAPG Bulletin, 2021, 105(1): 189-221.
- [9] 苏现波, 夏大平, 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).
- [10] ZHANG D, HE H, REN Y, HAIDER R, URYNOWICZ M, FALLGREN PH, JIN S, ISHTIAQ ALI M, JAMAL A, ADNAN SABAR M, GUO HG, LIU FJ, HUANG ZX. A mini review on biotransformation of coal to methane by enhancement of chemical pretreatment[J]. Fuel, 2022, 308: 121961.
- [11] GUPTA P, GUPTA A. Biogas production from coal via anaerobic fermentation[J]. Fuel, 2014, 118: 238-242.
- [12] 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 biogenic methane generation in low-rank coal[J]. Coal Geology & Exploration, 2012, 40(5): 24-26 (in Chinese).
- [13] GREEN MS, FLANEGAN KC, GILCREASE PC. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, U.S.A[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76(1/2): 34-45.
- [14] 吴艳艳, 秦勇. 煤中矿物/金属元素在生气过程中的催化作用[J]. 地球科学进展, 2009, 24(8): 882-890. WU YY, QIN Y. Catalysis of mineral/metal elements during coal bed gas generation[J]. Advances in Earth Science, 2009, 24(8): 882-890 (in Chinese).
- [15] 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).
- [16] 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).
- [17] LI HJ, CHANG JL, LIU PF, FU L, DING DW, LU YH. Direct interspecies electron transfer accelerates syntrophic oxidation of butyrate in paddy soil enrichments[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(5): 1533-1547.
- [18] JIMÉNEZ J, THEUERL S, BERGMANN I, KLOCKE M, GUERRA G, ROMERO-ROMERO O. Prokaryote community dynamics in anaerobic co-digestion of swine manure, rice straw and industrial clay residuals[J]. Water Science and Technology, 2016, 74(4): 824-835.
- [19] 钟成, 王进, 徐诚, 黄纷, 陈琪, 陈天虎, 岳正波. 针铁矿添加量对丙酸钠厌氧产甲烷的影响[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2019(5): 961-965.

- ZHONG C, WANG J, XU C, HUANG F, CHEN Q, CHEN TH, YUE ZB. The effect of goethite dosage on the anaerobic methanogenesis by sodium propionate[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2019(5): 961-965 (in Chinese).
- [20] LU XF, WANG HD, MA F, ZHAO G, WANG SW. Enhanced anaerobic digestion of cow manure and rice straw by the supplementation of an iron oxide-zeolite system[J]. *Energy & Fuels*, 2017, 31(1): 599-606.
- [21] XIA DP, HUANG S, GAO Z, SU XB. Effect of different inorganic iron compounds on the biological methanation of CO<sub>2</sub> sequestered in coal seams[J]. *Renewable Energy*, 2021, 164: 948-955.
- [22] 王爱宽, 秦勇, 林玉成, 兰凤娟, 杨松. 褐煤中天然产甲烷菌富集培养与生物气产出模拟[J]. *高校地质学报*, 2010, 16(1): 80-85.
- WANG AK, QIN Y, LIN YC, LAN FJ, YANG S. Enrichment and cultivation of natural methanogen and simulation of biogenetic gas generation from brown coal samples[J]. *Geological Journal of China Universities*, 2010, 16(1): 80-85 (in Chinese).
- [23] MOESTEDT J, NORDELL E, SHAKERI YEKTA S, LUNDGREN J, MARTÍ M, SUNDBERG C, EJLERTSSON J, SVENSSON BH, BJÖRN A. Effects of trace element addition on process stability during anaerobic co-digestion of OFMSW and slaughterhouse waste[J]. *Waste Management*, 2016, 47: 11-20.
- [24] 张文军, 何坤, 李贤庆, 米敬奎, 胡国艺. 含铁矿物对高成熟有机质有水体系热解生气的影晌[J]. *天然气地球科学*, 2020, 31(9): 1316-1325.
- ZHANG WJ, HE K, LI XQ, MI JK, HU GY. Effect of iron-bearing minerals on gas generation from pyrolysis of high-mature organic matter in hydrothermal conditions[J]. *Natural Gas Geoscience*, 2020, 31(9): 1316-1325 (in Chinese).
- [25] XIAN HY, ZHU JX, TAN W, TANG HM, LIU P, ZHU RL, LIANG XL, WEI JM, HE HP, TENG HH. The mechanism of defect induced hydroxylation on pyrite surfaces and implications for hydroxyl radical generation in prebiotic chemistry[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2019, 244: 163-172.
- [26] LIU FJ, GUO HG, WANG QR, HAIDER R, URYNOWICZ MA, FALLGREN PH, JIN S, TANG MC, CHEN B, HUANG ZX. Characterization of organic compounds from hydrogen peroxide-treated subbituminous coal and their composition changes during microbial methanogenesis[J]. *Fuel*, 2019, 237: 1209-1216.
- [27] HAQ RS, TAMAMURA S, LGARASHI T, KANEKO K. Characterization of organic substances in lignite before and after hydrogen peroxide treatment: implications for microbially enhanced coalbed methane[J]. *International Journal of Coal Geology*, 2018, 185: 1-11.
- [28] 张金龙, 郭红光, 韩青, 李亚平, 王凯. 生物成因煤层气产生原理及其影响因素的研究进展[J]. *矿产综合利用*, 2018(6): 1-6.
- ZHANG JL, GUO HG, HAN Q, LI YP, WANG K. Discussion about the mechanism and main influencing factors of the production of biogenic coalbed methane[J]. *Multipurpose Utilization of Mineral Resources*, 2018(6): 1-6 (in Chinese).
- [29] 林海, 隋梦琪, 汪涵. 微生物增产煤层气菌种的驯化[J]. *煤炭学报*, 2012, 37(8): 1359-1363.
- LIN H, SUI MQ, WANG H. Domestication of microbially enhanced coalbed methane microorganism[J]. *Journal of China Coal Society*, 2012, 37(8): 1359-1363 (in Chinese).
- [30] 杨秀清, 梁祺, 韩作颖. 乙醇对生物成气过程中煤地质微生物菌群结构及产气途径的影响[J]. *山西大学学报(自然科学版)*, 2019, 42(4): 941-950.
- YANG XQ, LIANG Q, HAN ZY. Effect of ethanol on the structure and gas production pathways of coal geological microorganisms in biogas production process[J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2019, 42(4): 941-950 (in Chinese).
- [31] 陈林勇, 王保玉, 邵超, 关嘉栋, 赵晗, 王美林, 韩作颖. 无烟煤微生物成气中间代谢产物组成及其转化[J]. *煤炭学报*, 2016, 41(9): 2305-2311.
- CHEN LY, WANG BY, TAI C, GUAN JD, ZHAO H, WANG ML, HAN ZY. Composition and conversion of intermediate products in the process of anthracite gasification by microorganism[J]. *Journal of China Coal Society*, 2016, 41(9): 2305-2311 (in Chinese).
- [32] 刘娟, 李晓旭, 刘枫, 张逸潇. 铁氧化物-微生物界面电子传递的分子机制研究进展[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2018, 37(1): 39-47, 159.
- LIU J, LI XX, LIU F, ZHANG YX. Research advantages on molecular mechanisms of interfacial electron transfer between iron oxide and microbe[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2018, 37(1): 39-47, 159 (in Chinese).
- [33] MUELLER B. Experimental interactions between clay minerals and bacteria: a review[J]. *Pedosphere*, 2015, 25(6): 799-810.

- [34] 陈凡. 硫酸盐还原菌的分离及其对褐煤的作用研究[D]. 徐州: 中国矿业大学硕士学位论文, 2020.  
CHEN F. Isolation of sulfate-reducing bacteria and its effect on lignite[D]. Xuzhou: Master's Thesis of China University of Mining and Technology, 2020 (in Chinese).
- [35] 刘薇, 李啸宇, 何环, 陈子豪, 陈凡, 王江泽, 刘健, 陈林勇, 黄再兴. 硫酸盐还原菌 *Desulfotomaculum reducens* ZTS1 厌氧降解昭通褐煤[J]. 微生物学报, 2021, 61(6): 1610-1620.  
LIU W, LI XY, HE H, CHEN ZH, CHEN F, WANG JZ, LIU J, CHEN LY, HUANG ZX. Anaerobic degradation of Zhaotong lignite by sulfate reducing bacterium *Desulfotomaculum reducens* ZTS1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(6): 1610-1620 (in Chinese).
- [36] 贾廷贵, 李瑛, 曲国娜, 李伟, 姚海飞, 刘廷方. 不同变质程度煤样化学结构特征 FTIR 表征[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(11): 3363-3369.  
JIA TG, LI X, QU GN, LI W, YAO HF, LIU TF. FTIR characterization of chemical structures characteristics of coal samples with different metamorphic degrees[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(11): 3363-3369 (in Chinese).
- [37] 张勋. 铁氧化物-微生物交互作用对乙酸钠产甲烷的影响和机制[D]. 合肥: 合肥工业大学博士学位论文.  
ZHANG X. Effect and mechanism of iron oxide-microorganism interaction on methane production by sodium acetate[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of Hefei University of Technology, (in Chinese).
- [38] STRAPOĆ D, MASTALERZ M, DAWSON K, MACALADY J, CALLAGHAN AV, WAWRIK B, TURICH C, ASHBY M. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2011, 39: 617-656.
- [39] ZHANG J, LIANG YN, PANDEY R, HARPALANI S. Characterizing microbial communities dedicated for conversion of coal to methane *in situ* and *ex situ*[J]. International Journal of Coal Geology, 2015, 146: 145-154.
- [40] HAHNKE S, LANGER T, KLOCKE M. *Proteiniborus indolifex* sp. nov., isolated from a thermophilic industrial-scale biogas plant[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(3): 824-828.
- [41] CHEN SY, DONG XZ. *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2257-2261.
- [42] SHIMIZU S, AKIYAMA M, NAGANUMA T, FUJIOKA M, NAKO M, ISHIJIMA Y. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan[J]. Geobiology, 2007, 5(4): 423-433.
- [43] ROBERTSON WJ, BOWMAN JP, FRANZMANN PD, MEE BJ. *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(1): 133-140.
- [44] SEITZ KW, DOMBROWSKI N, EME L, SPANG A, LOMBARD J, SIEBER JR, TESKE AP, ETTEMA TJG, BAKER BJ. Asgard archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1822.
- [45] 林喜铮, 谢伟. 深部生物圈古菌的研究进展与展望[J]. 微生物学报, 2021, 61(6): 1441-1462.  
LIN XZ, XIE W. Research progresses and prospects of archaea in deep biosphere[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(6): 1441-1462 (in Chinese).

**何环**, 博士, 中国矿业大学副教授、硕士生导师, 中国微生物学会地质微生物学会委员, 中国生物工程学会会员, 中国微生物学会会员, 《煤田地质与勘探》青年编委。主要从事微生物在煤炭安全生产和清洁利用及矿区生态修复领域的研究。近几年作为项目负责人, 主持国家自然科学基金、江苏省自然科学基金、徐州市重点研发计划、中央高校基金、企业横向项目 10 项, 作为科研骨干参与国家自然科学基金、国家重点研发计划、江苏省自然科学基金多项。近几年共发表学术论文 65 篇, 其中 SCI 和 EI 收录 42 篇, 申请专利 8 项, 出版专著 2 部。

