



褐煤强化产甲烷菌群的群落分析及条件优化

占迪¹, 何环^{1*}, 廖远松¹, 赵尚明¹, 姚菁华¹, 肖栋², 唐俊³, 陶秀祥¹

¹中国矿业大学化工学院, 煤炭加工与高效洁净利用教育部重点实验室, 江苏 徐州 221116

²中国矿业大学煤炭资源与安全开采国家重点实验室, 江苏 徐州 221116

³中国矿业大学安全学院, 江苏 徐州 221116

摘要:【目的】以白音华褐煤为底物, 利用从我国多地煤矿及污水处理厌氧罐中富集-混合-驯化得到的高效混合菌群进行产气, 分析其群落组成并优化产气条件。【方法】采用 Miseq 高通量测序分析混合菌群结构, 通过 Plackett-Burman (P-B)和 Box-Behnken (B-B)试验对褐煤产气影响因素和条件进行筛选和优化。【结果】本源和外源微生物样本混合样品(HN+MD+WT)经驯化后菌群产气效率最高。该样品菌群中细菌群落多样性丰富, 以变形菌门的脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* (15.07%)、拟杆菌门的屠场杆状菌属 *Macellibacteroides* (14.6%)、厚壁菌门的梭菌属 *Clostridiaceae* (9.77%)、互营菌门的脱硫代硫酸盐弧菌属 *Dethiosulfovibrio* (8.76%)以及热袍菌门 *Oceanotoga* 属(8.66%)为主。古菌全部为广古菌门, 其群落多样性则较为单一, 其中甲烷卵圆形菌属 *Methanocalculus* (80.28%)占据绝对优势。Plackett-Burman (P-B)试验结果表明温度、CoCl₂添加量和 NiCl₂添加量是影响褐煤产气的关键因素; Box-Behnken (B-B)试验结果表明最优产气条件为: 温度 36 °C, CoCl₂添加量 0.17 g/L, NiCl₂添加量 0.02 g/L, 最优条件下褐煤累计产甲烷量(周期 20 d)达到 159.33 μmol/g。【结论】经过驯化可以得到高效的产气菌群, 优化培养条件可使产气效率明显提高。

关键词: 褐煤, 生物强化产气, 微生物群落分析, 产气条件优化

煤层气是一种优质的清洁能源, 在世界能源结构中占有重要地位, 也是当前国家大力提倡开发的新能源。大量研究表明, 已开发的煤层气资源中有近 20%的甲烷气由微生物产生, 这在世界范围内得到广泛关注, 微生物促产煤层气(microbially

enhanced CBM, MECBM)也成为煤炭洁净利用领域研究热点^[1]。研究表明, 煤化程度较低的煤如褐煤, 由于其水分、灰分和挥发分含量高、热值低, 且腐植酸含量较多, 故直接燃烧效益不高。但是这些煤中氧含量及侧链官能团较多, 适合微生物利

基金项目: 国家自然科学基金(51404259); 江苏省自然科学基金(BK20150181)

*通信作者。Tel: +86-516-83591059; E-mail: hehuan6819@126.com

收稿日期: 2017-09-15; 修回日期: 2017-12-10; 网络出版日期: 2018-01-24

用, 为生物产气提供了物质基础^[2]。褐煤的厌氧降解产气过程是由发酵水解细菌、产氢产乙酸菌、产甲烷菌等多种功能微生物协同完成。按其来源, 其中功能微生物分为煤层环境中的本源厌氧微生物和来自沼气池、农田土壤等非煤层环境中的外源厌氧微生物^[3]。目前研究表明, 本源和外源厌氧降解微生物都可以利用褐煤进行生物产气^[4]。Green 等^[5]从粉河盆地煤层水富集的产甲烷菌群中进行模拟产气试验, 显著提高了甲烷产气量。王宝玉等^[6]用煤对沼液中菌群进行驯化, 发现驯化后的菌群也能利用煤产气。林海等^[7]从含氧低的污泥中富集厌氧产气菌群, 发现这些厌氧微生物也可利用褐煤产气, 并且当菌种经褐煤驯化后, 产气量提高近 30%, 产气周期也大幅缩短。然而, 煤的微生物产气效率低, 通常需要数月才能得到少量甲烷。故有学者通过调节产气环境, 利用化学试剂来提高产气效率。Ünal 等发现适当添加微量元素(Fe、Ni、Co、Mo、Zn、Mn、B 和 Cu)能够增强产甲烷菌活性和提高甲烷生成量, 而微量或是过量都会使甲烷产量减少^[8]。苏现波等^[9-11]研究了盐度、pH、温度、氧化还原电位、微量元素和关键营养物质添加量对产甲烷的影响, 发现菌群的生长状况、关键酶的活性和煤的性质均会随这些因素的改变而发生变化。王艳婷等^[12]通过单因素和正交试验对几个可能影响褐煤生物产气的理化因素进行筛选, 结果表明温度、pH、NaCl 浓度、煤浆浓度 4 个因素对褐煤产气影响较为显著, 而煤粉粒度影响相对较弱。有报道表明煤的熟化程度也会对生物产气具有影响, 这可能

与煤可被微生物利用的有机物质多少有关, 煤熟化程度越低, 有机质含量越高, 其产气量也越多^[13-14]。目前已有相当数量的关于外源和本源菌产气报道, 然而由于两者所处环境不同, 其菌群结构也存在差异, 所以作者考虑将两者混合, 这可能发挥其优势互补作用, 而至今仍鲜有关于外源和本源混合菌群产气的报道。另外, 虽然有关煤生物产气影响因素的报道较多, 但没有学者广泛考虑众多因素的整体影响。本研究从煤矿原位煤层水样和外源污水处理中厌氧罐水样中分别富集产甲烷菌群并混合, 利用褐煤对混合菌群进行连续驯化产气, 得到驯化后菌群, 利用 Miseq 高通量测序方法分析群落组成并通过 P-B 和 B-B 响应面试验综合筛选关键影响因素并优化产气条件, 以期通过本文为今后混合菌群产气的研究提供初步依据。

1 材料和方法

1.1 煤样

煤样取自我国内蒙古白音华煤田中西部, 属白音华盆地水文地质单元的西南部分。褐煤元素分析和工业分析结果见表 1, 其中可溶小分子有机质组分主要是 C₆₋₂₅ 的烷烃和芳烃, 且含有较多的羟基、羰基、醚键等极性基团^[15]。依据本实验室对产气过程中褐煤粒度的单因素实验研究^[11], 将褐煤样本经破碎后筛分至 80 目(180 μm)和 120 目(120 μm) 2 个不同粒度, 筛分后煤样经 80 °C 真空干燥 24 h 后, 放入干燥器保存以备用。

表 1. 褐煤元素分析和工业分析

Table 1. Elemental and industrial analysis of lignite (%)

Analytic method	Ultimate analysis					Proximate analysis			
	W _(C)	W _(H)	W _(O)	W _(N)	W _(S_t)	Mad	Aad	Vdaf	FCdaf
Content/%	78.02	7.21	11.98	1.82	0.97	11.88	27.47	52.32	47.68

W_(C), W_(H), W_(O), W_(N) and W_(S_t) represents the weight of C, H, O, N and total S respectively; M, A, V, FC, ad and daf represents moisture, ash, volatiles, fixed carbon, air dried base and dried ash free base respectively.

1.2 产甲烷菌群富集和驯化

产甲烷菌群富集原始样品采集自安徽淮南张集一矿的煤和煤层水(该煤矿瓦斯浓度较高, 编号HN)、内蒙古蒙东(褐煤主要产区, 编号MD)煤层水及徐州万通酱油厂污水处理厌氧罐水样(编号WT)。产甲烷菌群富集中所用基本培养基、还原基质、微量元素和维生素如下, 所有接种操作均在厌氧培养箱(上海跃进, YQX-II型)中完成。

基本培养基(g/L): MgCl₂ 0.1, KCl 0.2, NaCl 2.0, NH₄Cl 1.0, KH₂PO₄ 0.4, CH₃COONa 5.0, HCOONa 5.0, 酵母膏 1.0; 补充溶液为: 刃天青(0.1%) 1 mL/L, 微量元素 10 mL/L, 维生素溶液 10 mL/L。

褐煤产气培养基: 从基本培养基中去除碳源CH₃COONa 和 HCOONa。用于驯化培养和优化试验。

还原基质(g/L): L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, NaHCO₃ 1.0, Na₂S·9H₂O 0.5。

微量元素(g/L): N(CH₂COOH)₃ 1.5, NaCl 1.00, MgSO₄·7H₂O 3.00, CoCl₂ 0.18, MnSO₄·H₂O 0.50, CaCl₂·2H₂O 0.10, ZnSO₄·7H₂O 0.18, FeSO₄·7H₂O 0.10, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01, KAl(SO₄)₂·12H₂O 0.02, NiCl₂·6H₂O 0.03, CuSO₄·5H₂O 0.01, H₃BO₃ 0.01。

维生素(mg/L): 生物素 2, 泛酸钙 5, 盐酸吡哆醇 10, 硫胺素 5, 核黄素 5, 叶酸 2, 对氨基苯甲酸 5, 烟酸 5, 硫辛酸 5, 钴胺素 0.1。

产甲烷菌群富集培养过程: 在 500 mL 厌氧培养瓶中加入 300 mL 上述培养基, 按等体积比将原始样液进行混合(两两混合为 15:15 mL; 三者混合为 10:10:10 mL), 接种 30 mL 样品后置于 35 °C 恒温摇床培养 30 d, 利用气相色谱仪(安捷伦, 6890N)

分析产甲烷量。

产甲烷菌群的驯化: 在 500 mL 厌氧培养瓶中加入 300 mL 褐煤产气培养基, 并加入 10 g 煤样作为碳源, 煮沸驱氧, 灭菌, 并用还原基质保持其还原态, 将富集培养物 30 mL 接种到培养瓶中, 置于 35 °C 恒温摇床(120 r/min)培养 30 d, 并设置 3 组平行试验。每隔 5 d, 用气相色谱仪(安捷伦, 6890N)测量甲烷产量。经 3 次连续传代驯化后, 发现 30 d 内甲烷总产量同第 2 次驯化相比不再增加, 于是认为所得培养物为充分驯化的产甲烷混合菌群。

1.3 产甲烷混合菌群群落组成分析

通过比较混合菌群产气效率, 对其中产气效率最高的菌群群落多样性进行分析。取经驯化后产气最高的培养液 20 mL, 并在 10000 r/min、4 °C 离心 20 min, 去上清液, 沉淀用于 DNA 提取。按照 DNA 提取和纯化试剂盒(E.Z.N.A. Soil DNA Kit 和 Gel Extraction Kit, Omega Corporation, USA)程序得到约 3 mg DNA 样本, 然后用干冰冻存后寄往上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序, 细菌和古菌的 16S rDNA-V4PCR 扩增和测序引物序列如表 2 所示。原始下机序列利用 Mothur (version 1.3, <http://www.mothur.org/>, USA)软件去除非特异性序列片段、重复序列及包含模糊碱基和单碱基高重复区的序列, 最终获得高质量的序列集。上述获取的优化序列通过 Mothur 软件进行操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)聚类并构建 OTU 数据集。按照文献[16]中方法得到 OTU 的物种和丰度组成。为了确定驯化后产甲烷菌群中最佳物种分类水平, 根据测序结果我们从不同分类水平上对样本中的细菌和古菌的分布情况做了统计, 其中细

表 2. 细菌和古菌的 16S rDNA-V4 区 PCR 扩增引物及序列
Table 2. PCR amplified primers and sequences of bacteria and archaea

Type	Primer	Sequencing end	Primer order of sequencing end	Non-sequencing end	Primer order of non-sequencing end
Bacteria	16S 338F_806R	338F	ACTCCTACGG GAGGCAGCAG	806R	GGACTACHVG GGTWTCTAAT
Archaea	16S 5248F_958R	524F_10_ext	TGYCAGCCG CCGCGGTAA	Arch958R_mod	YCCGGCGTTG AVTCCAATT

菌和古菌均从门和属 2 个水平分析。利用 Mothur 计算了样本 Alpha 多样性(Alpha diversity), 包括 Chao1 值、ACE 值、Shannon 以及 Simpson 指数。

1.4 Plackett-Burman 试验(P-B, 筛选试验设计) 和 Box-Behnken 试验(B-B, 响应面试验设计)

利用 P-B 试验从温度、pH、煤粒度、煤添加量、盐度、镍离子浓度、钴离子浓度、转速、接种量 8 个因素中筛选出影响甲烷产气的关键因素。每个试验组做 3 个平行样, 响应值为培养 20 d 的产甲烷量($\mu\text{mol/g}$), 结果取平均值。其中因素 P 值小于 0.05 的认为是显著, 即关键因素。对 P-B 试验筛选得到甲烷产气的关键影响因素进行 B-B 试验并通过响应面分析得到最优的甲烷产气条件和最优条件下产甲烷量的预测值。

1.5 产甲烷量分析

利用气相色谱仪(安捷伦, 6890N)分析气体中甲烷峰面积, 通过标准曲线将所测峰面积换算成为甲烷量, 即为实测甲烷量 n_1 , 单位质量褐煤产甲烷量 M_z 由公式(1)计算得到。

$$M_z = (n_1 \times V_0) / (m \times V_1) \quad (1)$$

式中 M_z 为单位质量褐煤产甲烷量($\mu\text{mol/g}$), n_1 为实测的甲烷量(μmol), m 为反应体系中褐煤的质量(g), V_0 为厌氧培养瓶上部体积(mL), V_1 为微量进样器的体积(mL)。

2 结果和讨论

2.1 产甲烷混合菌群的富集和驯化

图 1 为产甲烷混合菌群产气量随时间变化曲线, 可以看出 3 种混合菌(HN+MD+WT)产气量最大(101.35 $\mu\text{mol/g}$, 30 d), 且驯化使产甲烷量明显提高(28.4%)。外源和本源富集菌群两两混合后褐煤的最终产气量也均高于单一样本产气量。一般认为, 本源菌具有较好的对煤的适应能力, 所以其产气效率会高于外源菌群, 但实际上外源菌群加入可以促进本源菌甚至优于单一本源菌进行产气^[17-18], 本研究中厌氧罐中样本(WT)的产气量也高于其他 2 个原位富集样本。然而, 根据 WT 产气率高于 2 个 HN 和 MD 的现象, 且文献表明产甲烷功能微生物初期只能利用煤中可溶性小分子进行厌氧产气^[19-20], 可以推测厌氧罐中富集菌群可能含有较多产甲烷菌群, 所以在初期能够快速利用溶解的小分子有机物进行产甲烷, 因此使得其对本源菌群有较好的促进作用。整体上而言, 富集菌群利用褐煤产气大致也存在类似的 3 个阶段^[7,20], 前 10 d 为产气潜伏期, 产气量缓慢增长; 10-25 d 为产气增长期, 产气量大量累积; 25 d 以后为产气减缓期, 除 HN 外, 其他样本产气量仍维持增长, 但增长速度明显减缓。综合考虑, 在后续的优化试验中选取淮南、蒙东和万通厌氧污水处理反应器样本中富集出来微生物混合驯化培养物(HN+MD+WT) 20 d 产甲烷量作为响应值来筛选因素并优化其最佳培养条件, 并利用高通量测序技术对该菌群组成进行了分析。

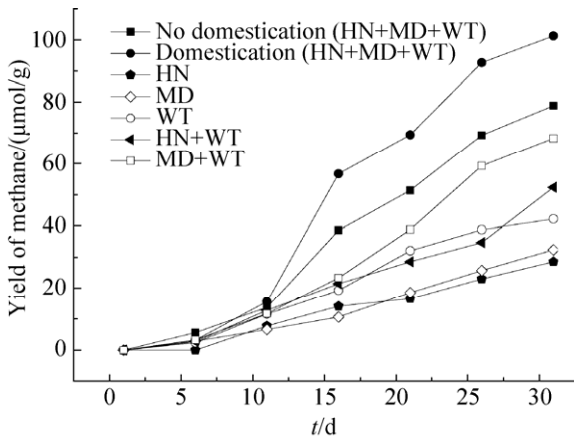


图 1. 富集和驯化的不同菌群培养物利用褐煤产甲烷量

Figure 1. Methane production with different enriched and domestication culture.

2.2 产甲烷混合菌群群落组成分析

迄今国内外关于煤层气田原位微生物多样性报道较多,主要用到技术有 16S rDNA 克隆文库^[21]和高通量测序^[16,22]方法,由于近年来高通量测序技术迅速发展,其能够全面、准确和深入了解微生物群落信息,已成为时下研究煤层气田原位微生物最热门的手段。从表 3 可以看出得到混合菌群(HN+MD+WT)中细菌和古菌的覆盖率都达到了 99.9%以上,表明测序结果能够覆盖样品中绝大多数的微生物群落组成信息。OTU 个数细菌群落统计为 105,古菌群落统计为 8; Shannon 指数和 Simpson 指数是用来估算样品中微生物的多样性指标,Shannon 指数越大表明群落多样性越丰富, Simpson 指数越小表明群落多样性越丰富^[23],

因此,此混合菌群中细菌群落多样性丰富而古菌中群落多样性较为单一。

由图 2-A 可知原始混合菌群中主要优势细菌菌门包括拟杆菌门(Bacteroidetes, 26.19%)、厚壁菌门(Firmicutes, 24.75%)、变形菌门(Proteobacteria, 15.07%)、互养菌门(Synergistetes, 13.36%)、热袍菌门(Thermotogae, 8.66%)以及螺旋菌门(Spirochaetae, 6%),其中还检测到低丰度的脱铁杆菌门 Deferribacteres (2.77%)和 Cloacimonetes (2.71%)等。从图 2-B 细菌属水平上群落丰度分析可以发现变形菌门的脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* (15.07%)是该富集样本中丰度最高的微生物,它们主要参与芳香烃的降解、体系的反硝化反应等^[6,24]。

厚壁菌门中的微生物主要参与一些混合酸、醇和中性物质的生成,其中的梭菌科 Clostridiaceae (9.77%)在一些淀粉、纤维素、几丁质等的解聚中扮演重要角色^[24]。拟杆菌门在沉积物中较常见,是一大类化能自养型微生物,混合样本中属于该门的微生物主要有屠场杆状菌属 *Macellibacteroides* (14.6%), *Mariniphaga* 属(3.65%), *Proteiniphilum* 属(3.49%)和东方龙细菌属 *Draconibacterium* (2.21%),它们主要参与大分子如蛋白质、糖、纤维素等的降解,发酵成为甲酸、氢气和二氧化碳^[25-26]。螺旋体门 *Sphaerochaeta* 属(6%)相对丰度并不高,但是有报道表明该属可降解碳水化合物产生乙醇、乙酸、乳酸、氢气和二氧化碳,是煤

表 3. 群落多样性及丰富性指数统计

Table 3. The community diversity and abundance index

Type	Total sequence number	OUT number	Ace index	Chao index	Coverage rate/%	Shannon index	Simpson index
Bacteria	17611	105	114	116	99.93	2.96	0.1087
Archaea	25300	8	0	8	100.00	0.81	0.6539

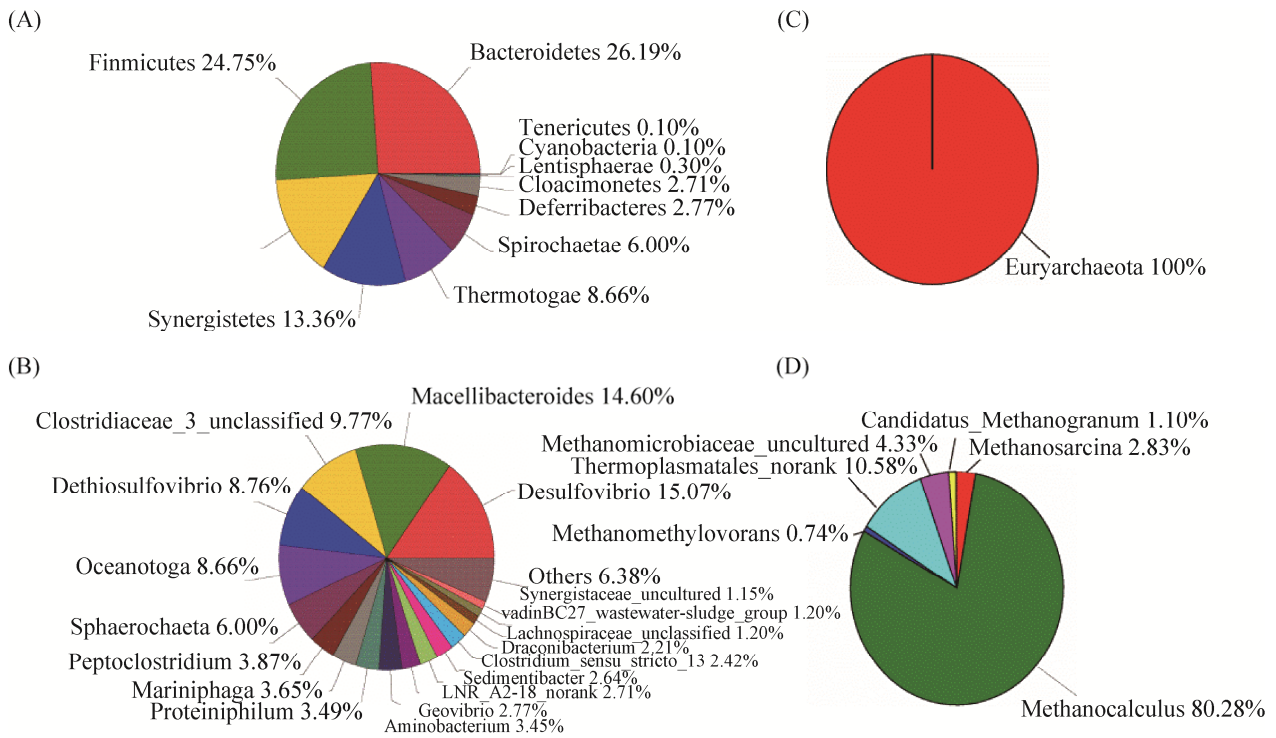


图 2. 细菌和古菌在门和属水平上的群落组成分析

Figure 2. Community composition analysis of mixed flora at phylum and genus level. Chart A, B: bacteria; chart C, D: archaea.

大分子降解中的主要功能菌属^[27]。混合样品中属于互养菌门中的微生物分别有胺小杆菌属 *Aminobacterium* (3.45%)、产氢产乙酸菌属 *Sedimentibacter* (2.64%)、脱硫代硫酸盐弧菌属 *Dethiosulfovibrio* (8.76%) 和 *Synergistaceae* (1.15%)，它们是厌氧系统中重要的氨基酸降解和产氢产乙酸的功能细菌，该类微生物在连接发酵型细菌和产甲烷菌中起重要作用^[28-29]。脱铁杆菌门是一类通过专性或兼性厌氧代谢获得能量的细菌，可利用多种电子受体，该门中的地弧菌属 *Geovibrio* (2.77%) 据报道是降解丙酮生成甲烷的混合培养微生物中的主要种属^[30]。

热孢菌门在微生物促采煤层中的应用有过报道，其功能可能主要是参与大分子的发酵降解^[31]，混合样品属于该门微生物 *Oceanotoga* 属

(8.66%)，在用生物乙醇废料作为底物的高温生物反应器中也有发现报道^[32]，但是在生物产煤层气中具体功能不太清楚。

产甲烷菌代谢类型主要有氢营养型、乙酸营养型、甲基营养型和混合营养型，以及最新报道可用甲氧基的芳香族化合物来直接产甲烷^[33-34]。从分类学上产甲烷菌又可以被分为甲烷杆菌纲 (*Methanobacteria*)、甲烷球菌纲 (*Methanococci*)、甲烷微菌纲 (*Methanomicrobia*) 和甲烷火菌纲 (*Methanopyri*) 4 个纲 7 个目，这些类型产甲烷菌在生物煤层气体系中均有报道^[2,24,33]。由图 2-C 可知原始混合菌群中古菌主要为广古菌门 (*Euryarchaeota*)，从属水平分析(图 2-D)可以发现群落中甲烷微球目的甲烷卵圆形菌属 (*Methanocalculus*, 80.28%) 占据绝对优势，热原体

目某属(*Thermoplasmatales_norank*, 10.58%)其次, 还有丰度很低的甲烷微生物目某属 *Methanomicrobiaceae_uncultured* (4.33%)。另外, 甲烷八叠球菌目的甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)和嗜甲基产甲烷菌属(*Methanomethylovorans*)分别占 2.83%和 0.74%。其中 *Methanocalculus* 属在中性偏碱条件下生长最快, 大部分已报到的该属产甲烷古菌主要分布在盐湖、油水井和海洋沉积物中, 利用 H_2/CO_2 , 大部分也可以利用甲酸盐作为电子供体来还原 CO_2 , 部分利用二级醇/ CO_2 生长^[35]。*Thermoplasmatales* 是产甲烷古菌中新分类的目, 它们可以利用 H_2 /甲醇和甲胺类化合物生长产甲烷^[35]。*Methanomicrobiaceae* 属于甲烷微生物球纲, 该纲是目前产甲烷古菌研究报道最多的微生物, 有 4 目、9 科、25 属, 都可以利用 H_2/CO_2 , 大部分也可以利用甲酸盐作为电子供体来还原 CO_2 , 部分利用二级醇/ CO_2 生长^[33,35]。甲烷八叠球菌目是形态最丰富的一个目, 在自然界分布广泛, 能够利用乙酸、 CO_2 、甲醇、甲胺、甲基硫化物等多种有机或无机化合物为底物产生甲烷^[35-36]。通过与文献比较分析发现, 本研究中富集到的菌群中产甲烷古菌的代谢类型多样, 均能够利用有机小分子来产甲烷, 所以推测这有可能与外源菌群(WT)中富含该类型产甲烷菌有关, 所以该富集样本能够对本源菌产气有促进作用, 具体原因还有待进一步分析。

2.3 P-B 试验筛选混合菌群产甲烷气关键影响因素

大量研究表明, 各种物化和生物因素都会从不同方面影响煤的生物产气效果^[8-13]。如从产气底物分析, 煤粒度和煤添加量的不同导致菌群和煤接触面积差异, 从而影响产气速率; 从外部培养条件分析, 温度不仅会影响菌群代谢生长而且会

对酶活性产生影响, 转速的不同则会通过影响煤样和菌群之间的传质速率来影响产气速率, 微量元素如钴和镍等主要和产甲烷菌群的酶活性有关等^[2,7,37]。在 P-B 试验之前, 按参考文献[7-11]选择了部分对产气有显著影响的因素, 并对这些因素先进行单因素试验筛选, 得出温度、pH、煤粒度、煤添加量、盐度、 $CoCl_2$ 添加量、 $NiCl_2$ 添加量、转速、接种量 8 个因素是可能具有显著影响的因素。故将上述 8 个条件选为研究因素, 并选取 3 个虚拟因素, 采用 Design expert 8.05 软件进行 N=12 的 P-B 试验设计, 每个因素选用高(+)和低(-)2 个水平, 响应值为产甲烷量($\mu mol/g$), 因素水平表见表 4, P-B 试验设计及结果见表 5。

P-B 试验方差分析模型的 P 值为 0.0276, 在 $\alpha=5\%$ 水平上达到显著; 各因素显著性检验结果见表 6, 从表中可以得出温度、 $CoCl_2$ 添加量对产甲烷量有显著影响, $NiCl_2$ 添加量对产甲烷量有极显著影响, 其他因素影响不显著。因此选取温度、 $CoCl_2$ 添加量、 $NiCl_2$ 添加量进一步采取 B-B 设计以确定最优的产甲烷量及培养条件。其他相关因素则合理取值。

表 4. P-B 试验设计因素及水平

Table 4. Factors and level in P-B experiment design			
Variable	Factor	Low level (-)	High level (+)
X_1	$T/^\circ C$	30	40
X_2	pH	6.5	7.5
X_3	Coal size/ μm	124	176
X_4	Coal amount/(g/L)	20	30
X_5	$CoCl_2$ /(g/L)	0.05	0.25
X_6	$NiCl_2$ /(g/L)	0.01	0.05
X_7	Rotation rate/(r/min)	100	150
X_8	Inoculum concentration/%	8	12
X_9, X_{10}, X_{11}	Visual factors	-	-

表 5. P-B 试验设计及结果

Table 5. P-B experimental design and results

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y/(μmol/g)
1	+	-	+	+	-	+	+	+	78.05
2	+	-	+	+	+	-	-	-	73.59
3	+	+	+	-	-	-	+	+	143.84
4	+	+	-	+	+	+	-	-	25.27
5	+	+	-	-	-	+	-	-	108.78
6	-	+	+	+	-	-	-	-	84.74
7	-	-	-	-	-	-	-	-	93.66
8	-	+	-	+	+	-	+	+	84.60
9	-	+	+	-	+	+	+	+	33.45
10	+	-	-	-	+	-	+	+	118.18
11	-	-	+	-	+	+	-	-	29.01
12	-	-	-	+	-	+	+	+	57.98

2.4 B-B 试验设计及分析

依据 B-B 试验对温度、CoCl₂ 添加量、NiCl₂ 添加量进行 3 因素 3 水平的设计, 因素水平如表 7 所示。试验设计及结果如表 8 所示, 以产甲烷量为响应值(Y), 对试验结果进行二次多元回归拟合,

获得 Y(产甲烷量)、A (温度)、B (CoCl₂ 添加量)和 C(NiCl₂ 添加量)的三元二次回归方程如公式(2)所示, 其中 Y 为响应值, A、B、C 为实际因素水平。

$$Y=148.90+11.95A+10.68B-18.00C+9.78AB+12.37AC-7.06BC-24.12A^2-43.64B^2-25.09C^2 \quad (2)$$

对上述回归模型进行方差分析(表 9), 模型 P 值<0.0001 达到极显著水平, 并且失拟项 P 值为 0.5026, 对响应值没有显著性影响, 表明数据中没有异常点, 不需要引入更高此项。R²=0.9815, 说明模型的相关性较好; AdjR²=0.9578, 说明该模型可以解释 95.78%的产甲烷量随 A、B、C 3 个因素变化的情况。变异系数 CV 为 7.02%, 表明响应值的变化只有 7.02% 来自变量之外, R² 预测值为 0.8614, 与 AdjR² 接近并且模型精密度 Adeq Precision 达到 16.147 (大于 4.0 为合理)。综上所述, 用软件建立的回归模型的拟合效果较好, 能够较好表征响应值和因素之间的实际关系, 因此可以用该模型对响应值(产甲烷量)进行分析和预测。由方差因素显著性分析(表 8)可以得出, 一次项 C 极显著, A、B 显著; 交互项 AB、AC 显著, BC 不显著; 二次项 A²、B²、C² 极显著。

表 6. 因素的显著性检验
Table 6. Verification of significant factors

Variable	Factor	Regression coefficient	Contribution level	P value	Significant level
X ₁	T/°C	27.83	15.18	0.0263	*
X ₂	pH	5.04	0.51	0.5059	N
X ₃	Coal size/μm	-7.63	1.18	0.3362	N
X ₄	Coal/(g/L)	-20.45	8.47	0.0550	N
X ₅	CoCl ₂ /(g/L)	-33.83	23.17	0.0149	*
X ₆	NiCl ₂ /(g/L)	-44.35	39.82	0.0070	**
X ₇	Rotation rate/(r/min)	16.84	5.74	0.0861	N
X ₈	Inoculum concentration/%	12.60	3.21	0.1560	N

** and * represents significant level of 1% and 5% respectively; N represents no significant level.

表 7. B-B 试验设计因素及水平

Table 7. Level of factors in B-B experimental design

Sample number	Factor	Level		
		-1	0	1
A	$T/^{\circ}\text{C}$	30	35	40
B	CoCl_2 amount/(g/L)	0.05	0.15	0.25
C	NiCl_2 amount/(g/L)	0.01	0.03	0.05

2.5 响应面分析

由图 3-5 的响应面分析结果可以看出, 等高线图椭圆程度越来越弱, 由椭圆趋向于圆。等高线的形状反映了交互作用的强弱大小^[38], 椭圆表明因素交互作用大, 圆形则表明交互作用不明显。因此, 温度和 NiCl_2 添加量、温度和 CoCl_2 添加量对产甲烷量影响存在较强的交互作用, CoCl_2 添加量和 NiCl_2 添加量对产甲烷量影响交互作用不显著。响应面立体图呈凸状, 表明产甲烷最优值在试验取值范围内达到。

表 8. B-B 试验设计及结果

Table 8. B-B experimental design and results

Run	A	B	C	Y/($\mu\text{mol/g}$)
1	0	-1	-1	81.38
2	0	0	0	143.17
3	1	1	0	119.38
4	0	0	0	158.39
5	0	0	0	142.74
6	1	-1	0	73.46
7	-1	0	-1	122.99
8	0	0	0	155.64
9	1	0	1	101.13
10	-1	-1	0	62.48
11	1	0	-1	115.50
12	-1	0	1	59.16
13	0	1	-1	111.87
14	0	-1	1	62.59
15	0	0	0	144.58
16	0	1	1	64.86
17	-1	1	0	69.27

表 9. 回归模型方差分析

Table 9. Variance analysis of regression model

Source	Sum of mean square	Free degree	Mean square	F value	P value	Prod>F	Significant level
Model	20330.0500	9	2258.89500	41.361580	< 0.0001		***
A-A	1141.4640	1	1141.46400	20.900820	0.0026		**
B-B	913.1935	1	913.19350	16.721070	0.0046		**
C-C	2591.5500	1	2591.55000	47.452680	0.0002		***
AB	382.6914	1	382.69140	7.007286	0.0331		*
AC	611.6966	1	611.69660	11.200490	0.0123		*
BC	199.1274	1	199.12740	3.646129	0.0978		N
A ²	2449.1580	1	2449.15800	44.845390	0.0003		***
B ²	8018.2070	1	8018.20700	146.817700	< 0.0001		***
C ²	2650.5210	1	2650.52100	48.532460	0.0002		***
Residual	382.2935	7	54.61336				
Unintended term	157.4295	3	52.47649	0.933480	0.5026		N
Net error	224.8640	4	56.21601				
Sum of correction	20712.3500	16					

*** represents extremely significant level of 0.1%; ** and * represent significant level of 1% and 5% respectively; N represents no significant level.

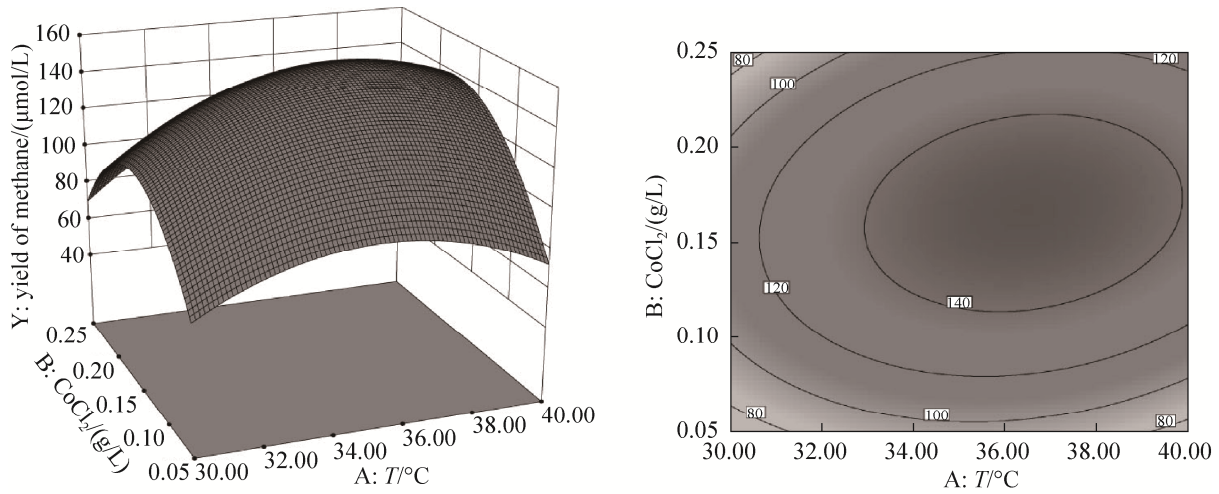


图 3. 温度和 CoCl_2 添加量对产甲烷量影响的响应面和等高线图

Figure 3. Response surface and contour map of the effect of temperature and CoCl_2 content on the yield of methane.

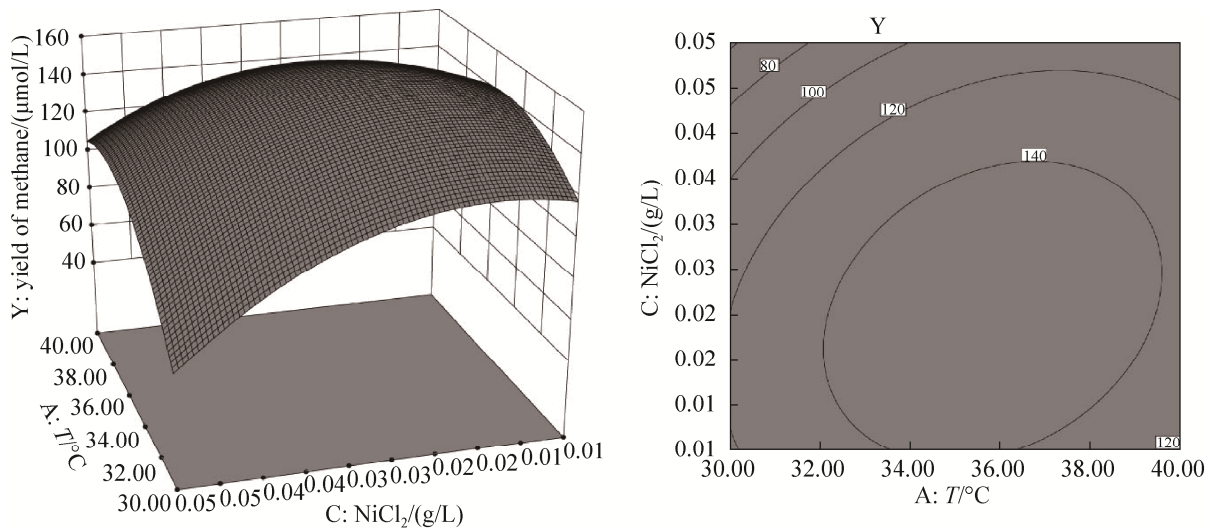


图 4. 温度和 NiCl_2 添加量对产甲烷量影响的响应面和等高线图

Figure 4. Response surface and contour map of the effect of temperature and NiCl_2 content on the yield of methane.

2.6 最优条件及验证试验

通过软件求解回归方程, 得到最优解: 温度为 $35.98\text{ }^\circ\text{C}$, CoCl_2 添加量为 0.17 g/L , NiCl_2 添加量为 0.02 g/L , 最优解下产甲烷量预测值为 $154.01\text{ }\mu\text{mol/g}$ 。为验证上述条件是否为最优条件, 在温度为 $36\text{ }^\circ\text{C}$ 、

CoCl_2 添加量为 0.17 g/L 、 NiCl_2 添加量为 0.02 g/L 条件下进行 3 次平行重复试验, 结果取平均值, 得到该条件下实际产甲烷量为 $159.33\text{ }\mu\text{mol/g}$ 。预测精度达到 96.65% , 因此基于 B-B 设计试验的回归模型所得混合菌群产甲烷最优参数条件可靠。

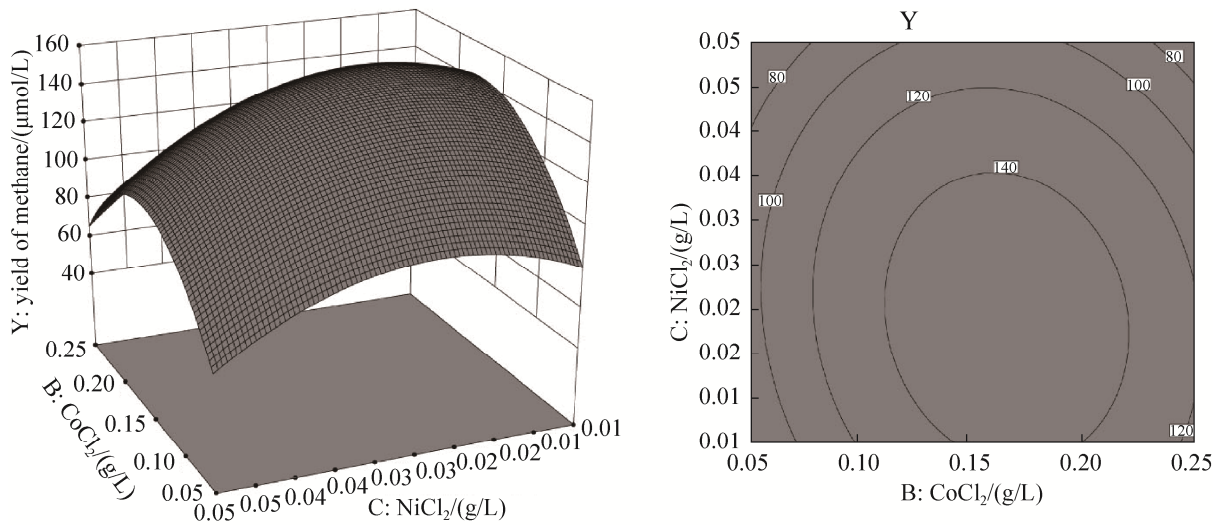


图 5. CoCl_2 添加量和 NiCl_2 添加量对产甲烷量影响的响应面和等高线图

Figure 5. Response surface and contour map of the effect of NiCl_2 and CoCl_2 content on the yield of methane.

本文利用驯化的混合产甲烷菌群进行产气条件优化试验,在产气进行到 20 d 时,得到 $159.33 \mu\text{mol/g}$ 的产率,而此时仍有少量甲烷继续生成。其他研究者在实验室条件下所得的甲烷产率大多在 $50\text{--}200 \mu\text{mol/g}$,也有少数达到 $250 \mu\text{mol/g}$ 以上,

如表 10,这些研究者所用的煤多为烟煤和亚烟煤,少数为褐煤和无烟煤^[2]。与之相比,本试验在没有对煤进行化学或其他方式进行预处理的情况下,且产气优化试验仅进行到 20 d 时已获得了较高的甲烷产率,具有一定的应用意义。

表 10. 用煤进行的非原位生物产甲烷

Table 10. *Ex situ* bio-methane production from coal

Sources of microbial community	Coal source	Coal rank	Coal size/mm	Test duration/d	Methane yield /($\mu\text{mol/g}$)	Reference
Formation water	Illinois basin, USA	High volatile B bituminous	< 0.42	20	140	[39]
Formation water	Wallon, Australia	Subbituminous	0.30–0.60	7	265	[40]
Wetland sediment	Texas, USA	Subbituminous	NA	105	69–101	[41]
Formation water	San Juan Basin, USA	NA	Ground	243	100	[42]
Well water	Powder River Basin, USA	Subbituminous	0.25–0.60	26	59	[5]
NA	Powder River Basin, USA	Lignite and subbituminous	Crushed	365	6–15	[43]
Mine water	Jitpur, India	Hard coal	0.025–0.060	63	214	[44]
Formation water	Pittsburgh No.8, USA	High volatile bituminous	NA	60	91	[45]
Formation water	Pocahontas No.3, USA	Low volatile bituminous	NA	60	159	[45]

3 结论

(1) 通过对 2 个矿区中的煤层水样和煤样以及污水厌氧罐水样进行产甲烷菌群富集培养, 并对混合富集菌群经褐煤驯化培养, 得到了高效产气的产甲烷混合菌群(HN+MD+WT)。利用 Miseq 高通量测序分析其群落组成, 发现初始混合菌群中细菌群落多样性丰富, 其中厚壁菌门(Firmicutes)的梭菌科 Clostridiaceae (9.77%), 变形菌门(Proteobacteria)的脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* (15.07%), 拟杆菌门(Bacteroidetes)的屠场杆状菌属 *Macellibacteroides* (14.6%)、*Mariniphaga* (3.65%) 和 *Proteiniphilum* (3.49%), 互养菌门(Synergistetes)的脱硫代硫酸盐弧菌属 *Dethiosulfovibrio* (8.76%) 和胺小杆菌属 *Aminobacterium* (3.45%), 螺旋菌门(Spirochaetae)的 *Sphaerochaeta* 属(6%), 以及热袍菌门(Thermotogae)为主。古菌群落多样性则较为单一, 全部为广古菌门(Euryarchaeota), 其中以该门中甲烷卵圆形菌属(*Methanocalculus*, 80.28%) 占据绝对优势, 热原体目某属(*Thermoplasmatales_norank*, 10.58%)其次, 还有丰度很低的甲烷微菌科某属(*Methanomicrobiaceae_uncultured*, 4.33%)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*, 2.83%)和嗜甲基产甲烷菌属(*Methanomethylovorans*, 0.74%)。

(2) 通过 P-B 试验得出温度、CoCl₂ 添加量和 NiCl₂ 添加量为影响产甲烷量的重要因素, 对重要因素进行 B-B 试验并进行回归分析和响应面分析, 得出显著程度为 NiCl₂ 添加量>温度>CoCl₂ 添加量, 并且温度和 NiCl₂ 添加量、温度和 CoCl₂ 添加量对产甲烷量影响存在较强的交互作用, 而 CoCl₂ 添加量和 NiCl₂ 添加量对产甲烷量交互作用不显著。

(3) 通过求解回归方程得出最优的产气条件:

温度为 36 °C, CoCl₂ 添加量为 0.17 g/L, NiCl₂ 添加量为 0.02 g/L。最优条件下产气量预测值为 154.01 μmol/g, 经验证试验得到该条件的实际产甲烷量为 159.33 μmol/g, 预测精度达到 96.65%, 达到条件优化的目的。

参考文献

- [1] Bao Y, Huang HP, He D, Ju YW, Qi Y. Microbial enhancing coal-bed methane generation potential, constraints and mechanism - A mini-review. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, 2016, 35: 68–78.
- [2] Park SY, Liang YN. Biogenic methane production from coal: A review on recent research and development on microbially enhanced coalbed methane (MECBM). *Fuel*, 2016, 166: 258–267.
- [3] Guo HG, Wang F, Li ZG. Research progress of microbially enhanced coalbed methane. *Microbiology China*, 2015, 42(3): 584–590. (in Chinese)
郭红光, 王飞, 李治刚. 微生物增产煤层气技术研究进展. *微生物学通报*, 2015, 42(3): 584–590.
- [4] Wang H, Lin H, Dong YB, Sui MQ, Li YZ. Experiments on the gas production of brown coal degraded by exogenous methanogens. *Petroleum Exploration and Development*, 2012, 39(6): 764–768. (in Chinese)
汪涵, 林海, 董颖博, 隋梦琪, 李洋子. 外源产甲烷菌降解褐煤产气实验. *石油勘探与开发*, 2012, 39(6): 764–768.
- [5] Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. Characterization of a methanogenic consortium enriched from coal-bed methane well in the Powder River Basin, U.S.A. *International Journal of Coal Geology*, 2008, 76(1/2): 34–45.
- [6] Wang BY, Chen LY, Tai C, Han ZY, Guan JD, Zhao H. A preliminary study of biological coal gasification by exogenous bacteria: microbiome composition, coal type, pore and seam fracture. *Journal of China Coal Society*, 2014, 39(9): 1797–1801. (in Chinese)
王保玉, 陈林勇, 邵超, 韩作颖, 关嘉栋, 赵晗. 外源菌群煤生物气化初步研究: 菌群结构、煤种及煤孔(裂)隙. *煤炭学报*, 2014, 39(9): 1797–1801.
- [7] Ünal B, Perry VR, Sheth M, Gomez-Alvarez V, Chin KJ, Nüsslein K. Trace elements affect methanogenic activity and diversity in enrichments from subsurface coal bed produced water. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 175.
- [8] Su XB, Wu Y, Xia DP, Chen X. Effect of temperature on biological methane generation of low rank coal. *Coal Geology*

- and Exploration*, 2012, 40(5): 24–26. (in Chinese)
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. *煤田地质与勘探*, 2012, 40(5): 24–26.
- [9] Su XB, Xu Y, Wu Y, Xia DP, Chen X. Effect of salinity and pH on biogenic methane production of low-rank coal. *Journal of China Coal Society*, 2011, 36(8): 1302–1306. (in Chinese)
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. *煤炭学报*, 2011, 36(8): 1302–1306.
- [10] Xia DP, Chen X, Su XB, Wu Y. Impact of oxidation-reduction potential on the generation of biogenic methane in low-rank coals. *Natural Gas Industry*, 2012, 32(11): 107–110. (in Chinese)
夏大平, 陈鑫, 苏现波, 吴昱. 氧化还原电位对低煤阶煤生物甲烷生成的影响. *天然气工业*, 2012, 32(11): 107–110.
- [11] Wang YT, Han YX, He H, Wang SS, Leng YW. Study on influencing factors for biogenic gas production in lignite. *Coal Science and Technology*, 2013, 41(11): 120–123. (in Chinese)
王艳婷, 韩娅新, 何环, 王珊珊, 冷云伟. 褐煤生物产气影响因素研究. *煤炭科学技术*, 2013, 41(11): 120–123.
- [12] He Q, Ding C, Li GZ, Chen H, Cheng L, Zhang H. Methane-generating potential of coal samples with different maturity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(12): 1307–1317. (in Chinese)
何乔, 丁晨, 李贵中, 陈浩, 承磊, 张辉. 不同成熟度煤样产甲烷潜力. *微生物学报*, 2013, 53(12): 1307–1317.
- [13] Robbins SJ, Evans PN, Esterle JS, Golding SD, Tyson GW. The effect of coal rank on biogenic methane potential and microbial composition. *International Journal of Coal Geology*, 2016, 154–155: 205–212.
- [14] Wang SS, Han YX, He H, Leng YW, Tao XX. Isolation and phylogenetic analysis of a methanogen from coal bed water. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(1): 123–127. (in Chinese)
王珊珊, 韩娅新, 何环, 冷云伟, 陶秀祥. 煤层水中一株产甲烷菌的分离与系统发育分析. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(1): 123–127.
- [15] Du JJ, Zhao YP, Tian YJ, Zhang D. Composition and structural characteristics of soluble organic species in Baiyinhua lignite. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 2017, 45(1): 9–14. (in Chinese)
杜姣姣, 赵云鹏, 田由甲, 张迪. 白音华褐煤可溶有机质的组成和结构特征. *燃料化学学报*, 2017, 45(1): 9–14.
- [16] Opara A, Adams DJ, Free ML, McLennan J, Hamilton J. Microbial production of methane and carbon dioxide from lignite, bituminous coal, and coal waste materials. *International Journal of Coal Geology*, 2012, 96–97: 1–8.
- [17] Wang H, Lin H, Rosewarne CP, Li DM, Gong S, Hendry P, Greenfield P, Sherwood N, Midgley DJ. Enhancing biogenic methane generation from a brown coal by combining different microbial communities. *International Journal of Coal Geology*, 2016, 154–155: 107–110.
- [18] Glombitza C, Mangelsdorf K, Horsfield B. A novel procedure to detect low molecular weight compounds released by alkaline ester cleavage from low maturity coals to assess its feedstock potential for deep microbial life. *Organic Geochemistry*, 2009, 40(2): 175–183.
- [19] Furmann A, Schimmelmann A, Brassell SC, Mastalerz M, Picardal F. Chemical compound classes supporting microbial methanogenesis in coal. *Chemical Geology*, 2013, 339: 226–241.
- [20] 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. *Geological Journal of China Universities*, 2010, 16(1): 80–85. (in Chinese)
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. *高校地质学报*, 2010, 16(1): 80–85.
- [21] He H, Han YX, Jin DC, Leng YW, Sun Q, Shen LY, Tao XX. Microbial consortium in a non-production biogas coal mine of eastern China and its methane generation from lignite. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 2016, 38(10): 1377–1384.
- [22] Guo HG, Liu RY, Yu ZS, Zhang HX, Li YM, Liu X, Pan JG. Pyrosequencing reveals the dominance of methylophilic methanogenesis in a coal bed methane reservoir associated with Eastern Ordos Basin in China. *International Journal of Coal Geology*, 2012, 93: 56–61.
- [23] Hong C, Si YX, Xing Y, Li Y. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(14): 10788–10799.
- [24] Colosimo F, Thomas R, Lloyd JR, Taylor KG, Boothman C, Smith AD, Lord R, Kalin RM. Biogenic methane in shale gas and coal bed methane: a review of current knowledge and gaps. *International Journal of Coal Geology*, 2016, 165: 106–120.
- [25] Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, Blanchet D, Jeanthon C. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(3): 427–443.
- [26] Haack SK, Breznak JA. *Cytophaga xylanolytica* sp. nov., a

- xylan-degrading, anaerobic gliding bacterium. *Archives of Microbiology*, 1993, 159(1): 6–15.
- [27] Strapoć D, Picardal FW, Turich C, Schaperdorth I, Macalady JL, Lipp JS, Lin YS, Ertefai TF, Schubotz F, Hinrichs KU, Mastalerz M, Schimmelmann A. Methane-producing microbial community in a coal bed of the Illinois Basin. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2424–2432.
- [28] Li JZ, Sun Q, Liu F, Gao CC. Selection and community structure analysis of two new syntrophic acetogen cocultures. *Science and Technology Review*, 2009, 27(16): 78–82. (in Chinese)
李建政, 孙倩, 刘枫, 高晨晨. 一种产氢产乙酸菌互营共培养体的筛选及其群落结构解析. *科技导报*, 2009, 27(16): 78–82.
- [29] Jia X, Ren LH, Li MX, Xi BD, Zhu CW, Zhao YC. Bacterial community structure succession in fermentative biohydrogen with methanogenesis integration from reed straw. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(4): 199–204. (in Chinese)
贾璇, 任连海, 李鸣晓, 席北斗, 祝超伟, 赵由才. 芦苇秸秆厌氧联产氢气甲烷过程中细菌群落演替规律. *农业工程学报*, 2016, 32(4): 199–204.
- [30] Budwill K, Koziel S, Vidmar J. Advancements in understanding and enhancing biogenic methane production from coals//Canadian Unconventional Resources Conference. Calgary, Alberta, Canada: Society of Petroleum Engineers, 2011.
- [31] Janssen PH, Liesack W, Schink B. *Geovibrio thiophilus* sp. nov., a novel sulfur-reducing bacterium belonging to the phylum Deferribacteres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(4): 1341–1347.
- [32] Röske I, Sabra W, Nacke H, Daniel R, Zeng AP, Antranikian G, Sahn K. Microbial community composition and dynamics in high-temperature biogas reactors using industrial bioethanol waste as substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(21): 9095–9106.
- [33] Wang BY, Liu JM, Han ZY, Liu J, Hu B. Recent progress and classification of methanogens. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(2): 418–425. (in Chinese)
王保玉, 刘建民, 韩作颖, 刘健, 胡斌. 产甲烷菌的分类及研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(2): 418–425.
- [34] Mayumi D, Mochimaru H, Tamaki H, Yamamoto K, Yoshioka H, Suzuki Y, Kamagata Y, Sakata S. Methane production from coal by a single methanogen. *Science*, 2016, 354(6309): 222–225.
- [35] Cheng L, Zheng ZZ, Wang C, Zhang H. Recent advances in methanogens. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1143–1164. (in Chinese)
承磊, 郑珍珍, 王聪, 张辉. 产甲烷古菌研究进展. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1143–1164.
- [36] Yang B, Lu XY, Tian Y. Research progress of methanosarcinae. *Chemistry and Bioengineering*, 2012, 29(12): 7–11. (in Chinese)
杨冰, 卢向阳, 田云. 甲烷八叠球菌研究进展. *化学与生物工程*, 2012, 29(12): 7–11.
- [37] Nomura T, Kawase M, Murata N. Method for treating organic waste by methane fermentation. US Patent: 5100553. 1992-3-31.
- [38] Zhu HX, Sun JX. Response surface optimization study for Nisin liquid fermentation conditions. *Chinese Dairy Industry*, 2009, 37(8): 31–34. (in Chinese)
朱会霞, 孙金旭. Nisin 液体发酵工艺条件的响应面分析优化. *中国乳品工业*, 2009, 37(8): 31–34.
- [39] Zhang J, Liang YN, Pandey R, Harpalani S. Characterizing microbial communities dedicated for conversion of coal to methane *in situ* and *ex situ*. *International Journal of Coal Geology*, 2015, 146: 145–154.
- [40] Papendick SL, Downs KR, Vo KD, Hamilton SK, Dawson GKW, Golding SD, Gilcrease PC. Biogenic methane potential for Surat Basin, Queensland coal seams. *International Journal of Coal Geology*, 2011, 88(2/3): 123–134.
- [41] Orem WH, Voytek MA, Jones EJ, Lerch HE, Bates AL, Corum MD, Warwick PD, Clark AC. Organic intermediates in the anaerobic biodegradation of coal to methane under laboratory conditions. *Organic Geochemistry*, 2010, 41(9): 997–1000.
- [42] Wawrik B, Mendivelso M, Parisi VA, Suflita JM, Davidova IA, Marks CR, van Nostrand JD, Liang YT, Zhou JZ, Huizinga BJ, Strapoć D, Callaghan AV. Field and laboratory studies on the bioconversion of coal to methane in the San Juan Basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 81(1): 26–42.
- [43] Harris SH, Smith RL, Barker CE. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *International Journal of Coal Geology*, 2008, 76(1/2): 46–51.
- [44] Gupta P, Gupta A. Biogas production from coal via anaerobic fermentation. *Fuel*, 2014, 118: 238–242.
- [45] Fallgren PH, Zeng CP, Ren ZY, Lu AH, Ren SJ, Jin S. Feasibility of microbial production of new natural gas from non-gas-producing lignite. *International Journal of Coal Geology*, 2013, 115: 79–84.

Community structure analysis of methanogenic flora and optimization for bioaugmentation methane generation from lignite

Di Zhan¹, Huan He^{1*}, Yuansong Liao¹, Shangming Zhao¹, Jinghua Yao¹, Dong Xiao², Jun Tang³, Xiuxiang Tao¹

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

² State Key Laboratory of Coal Resources and Safety Mining, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China

³ School of Safety Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The mixed methanogenic flora with high methane production from Baiyinhua lignite was obtained from several coalmines and an anaerobic polluted water processing tank by enrichment, mixture and domestication. The community structure was analyzed and its methane production condition from lignite was optimized. [Methods] The community structure was analyzed by Miseq high-throughput sequencing. Plackett-Burman and Box-Behnken tests were conducted to screen and optimize the main factors influencing the efficiency of methane production. [Results] The mixed flora (HN+MD+WT) combined with indigenous and exogenous microbial culture produced the highest methane after domestication. The diversity of bacterial community was abundant, in which the dominant portion was *Desulfovibrio* (belong to proteobacteria, 15.07%), *Macellibacteroides* (belong to bacteroidetes, 14.6%), *Clostridiaceae* (belong to Firmicutes, 9.77%), *Dethiosulfovibrio* (belong to *Synergistetes*, 8.76%) and *Oceanotoga* (belong to thermotogae, 8.66%). All the archaea were assigned to *Euryarchaeota*, and its diversity was single comparatively. *Methanocalculus* (80.28%) was the most dominant genus. Plackett-Burman test results indicated temperature, concentrations of CoCl₂ and NiCl₂ were the most important influencing factors. Box-Behnken test results showed that the optimal conditions were as follows: temperature 36 °C, CoCl₂ concentration 0.17 g/L, NiCl₂ concentration 0.02 g/L, under which the methane accumulation is up to 159.3 μmol/g (20 d). [Conclusion] A mixed flora with high methane production could be obtained by domestication. The productivity of methane could be enhanced significantly by optimizing the culture condition.

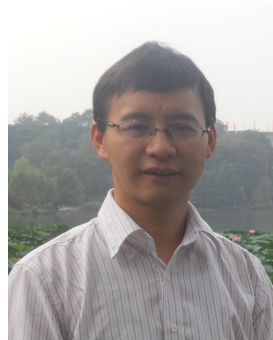
Keywords: lignite, bioaugmentation methane production, microbial community analysis, condition optimization of biomethane generation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (51404259) and by the Natural Science Fund of Jiangsu Province (BK20150181)

*Corresponding author. Tel: +86-516-83591059; E-mail: hehuan6819@126.com

Received: 15 September 2017; Revised: 10 December 2017; Published online: 24 January 2018



何环, 博士, 中国矿业大学生物工程系副教授, 硕士生导师。2009年毕业于中南大学获微生物学博士学位。研究方向: 煤炭清洁利用、矿区生态修复, 在煤炭生物液化和气化、煤矿瓦斯的微生物降解、煤炭生物脱硫、煤矿区重金属污染治理方面取得系列研究成果。先后主持了国家自然科学基金, 江苏省自然科学基金等研究课题, 已在 *Fuel*、*Fuel Processing Technology*、*Energy & Fuel*、*Bioresource*、*Applied Energy* 等期刊上发表论文 40 余篇。