

• 综 述 •

## 好氧甲烷氧化菌及其工程应用进展

严程<sup>1</sup>, 梅娟<sup>1,2</sup>, 赵由才<sup>3</sup>

1 苏州科技大学 环境科学与工程学院, 江苏 苏州 215009

2 江苏省环境科学与工程重点实验室, 江苏 苏州 215009

3 同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

严程, 梅娟, 赵由才. 好氧甲烷氧化菌及其工程应用进展. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1322-1338.

YAN C, MEI J, ZHAO YC. Engineering application of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs): a review. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1322-1338.

**摘 要:** 好氧甲烷氧化菌能以甲烷作为碳源和能源, 对全球甲烷消除的贡献率高达 10%–20%, 还能有效地合成有价值的甲烷来源生物产品。文中介绍了好氧甲烷氧化菌的甲烷氧化代谢机理, 总结了好氧甲烷氧化菌在填埋场甲烷减排、煤矿通风气治理、合成生物产品、油气藏勘探等领域的应用功效和研究热点, 即污染物去除和产品合成效率的影响因素。基于对甲烷氧化菌规模化培养方法的研究, 本文认为加强培养过程中代谢产物对甲烷氧化菌活性和种群结构影响的研究, 以及开发经济高效的替代培养基和培养技术的研究将有利于好氧甲烷氧化菌生物技术的应用推广。

**关键词:** 好氧甲烷氧化菌; 培养技术; 甲烷减排; 微生物合成; 油气勘探

## Engineering application of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs): a review

YAN Cheng<sup>1</sup>, MEI Juan<sup>1,2</sup>, ZHAO Youcai<sup>3</sup>

1 Department of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

2 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Environmental Science and Engineering, Suzhou 215009, Jiangsu, China

3 State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China

**Abstract:** Aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs) can use methane as carbon source and energy source, eliminating 10%–20% of global methane. Methanotrophs can also effectively synthesize

Received: June 3, 2021; Accepted: August 19, 2021; Published online: September 14, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (51508367)

Corresponding author: MEI Juan. Tel/Fax: +86-512-68247000; E-mail: juanmei@usts.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (51508367)

valuable methane-derived products. This article introduced the methane oxidizing mechanism of methanotrophs, and summarized the practical application and research hotspots of methanotrophs in the field of methane emission reduction in the landfill, ventilation air methane mitigation in coal mines, valuable chemicals biosynthesis, as well as oil and gas reservoir exploration. Main factors influencing the pollutant removal and the biosynthesis efficiency in various applications were also discussed. Based on the study of large-scale cultivation of methanotrophs, some measures to benefit the application and promotion of aerobic methane oxidizing biotechnology were proposed. This includes investigating the effect of intermediate metabolites on methanotrophs activity and population structure, and exploiting economical and efficient alternative culture media and culture techniques.

**Keywords:** aerobic methane oxidizing bacteria; cultivation technology; methane reduction; microbial synthesis; oil and gas exploration

好氧甲烷氧化菌 (aerobic methane-oxidizing bacteria, MOB) 是能以甲烷为唯一碳源和能源的微生物。它在环境中广泛存在, 能将厌氧环境产生的甲烷氧化, 避免其逃逸到大气, 对全球甲烷消除的贡献率高达 10%–20%<sup>[1]</sup>。由于对全球变暖问题的重视, 好氧甲烷氧化菌也越来越受到关注。同时, 由于好氧甲烷氧化菌特有的甲烷代谢途径和功能酶, 可以利用它将甲烷合成高价值生物产品, 从而使其具有商业价值, 相关甲烷合成化合物的工程应用也成为热点, 在聚羟基链烷酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 和单细胞蛋白(single cell protein, SCP) 生产中生产规模以吨计, 可提高勘探钻井成功率达 83%<sup>[2]</sup>。

随着人们对好氧甲烷氧化菌种群特征和代谢过程研究的深入, 对好氧甲烷氧化菌的实际应用也越来越广泛。本文针对已经实现工程应用的几个领域, 介绍了好氧甲烷氧化菌应用技术的发展现状。文中还分析了好氧甲烷氧化菌规模化培养中存在的问题, 以及在代谢机制和种群关系研究等方面存在的不足, 以促进好氧甲烷氧化菌生物技术的应用推广。

## 1 好氧甲烷氧化菌的培养

### 1.1 好氧甲烷氧化菌培养条件优化

甲烷氧化菌的驯化培养是对其进行生物学特性研究和微生物应用的前提。甲烷氧化菌的首次被分离成功可追溯到 1906 年, 并提出了简单的甲烷氧化菌培养方法。Meruvu 等<sup>[1]</sup>总结了现有的甲烷营养生长培养基的组成, 及其相应的甲烷氧化菌来源和目标甲烷营养菌, 不同研究中采用的实验室好氧甲烷氧化菌培养方法和条件见表 1<sup>[3-12]</sup>。

不同甲烷氧化菌的生长速度不同, 许多甲烷氧化菌生长缓慢, 包括一些在极端环境分离出的种类, 如从温热泉环境中分离出来的甲基暖菌 (*Methylocaldum marinum*)、甲基细胞菌 (*Methylocella silvestris*), 在琼脂平板上出现菌落可能需要 2–4 周<sup>[13]</sup>。另外有些生长速率高的菌种较适于生物合成等工程应用而被广泛关注, 如甲基球菌 (*Methylococcus capsulatus*) Bath 和甲基弯曲菌 (*Methylosinus trichosporium*) OB3b, 生长速率可以达到  $0.2 \text{ h}^{-1}$ , 细胞密度为 1–5 g 干重/L。而甲基单胞菌 (*Methylomonas methanica*) 和甲基微菌 (*Methylomicrobium alcaliphilum*) 的表观生长率约为  $0.4 \text{ h}^{-1}$ <sup>[14]</sup>。

表 1 好氧甲烷氧化菌培养条件

Table 1 Cultural conditions for aerobic methanotrophs

Cultural object	Microbial origin	Medium	Cultural parameters	Result	References
MOB strain	Activated sludge of a brewery plant	NMS	30% CH <sub>4</sub> , 30 °C, 230 r/min	Isolated <i>Methylomonas</i> sp. DH-1	[3]
	Paddy field soil	2-fold-diluted NMS medium	20% CH <sub>4</sub> , 24 °C, 100 r/min	Isolated <i>Methylothermus</i> C50C1	[4]
	Hot spring	AMS: modified medium=8:2	CH <sub>4</sub> :O <sub>2</sub> =1:1, 53 °C, pH 6.8, 2 weeks/incubated	Isolated <i>Methylothermus</i> MYHT <sup>T</sup>	[5]
	Wet rice field soil, methane seep and warm spring sediments	LMM	80% CH <sub>4</sub> , 22 °C, pH 6.8, 14 d/incubated, repeated twice	Isolated BRS-K6, GFS-K6, AK-K6	[6]
	Coal mine soil	NMS	20% CH <sub>4</sub> , 25 °C, 150 r/min, 7 d/incubated, repeated fourth	Isolated <i>Methylomarinum</i> ZL-07	[7]
	Coal mine soil	NMS	20% CH <sub>4</sub> , 28 °C, 180 r/min, 3 d/incubated, repeated fourth	After 48 h, OD <sub>600</sub> =0.246	[8]
	Aerobic sludge	NMS	20% CH <sub>4</sub> , 30 °C, 180 r/min, 5–7 d/incubated, repeated seventh	After 48 h, CH <sub>4</sub> conversion rate= 90.54%	[9]
MOB consortium	Landfill soil	NMS	20% CH <sub>4</sub> , 25 °C, 140 r/min, pH 6.8, 3 d/subcultured,	Max MOR= 5.814 g/(m <sup>3</sup> ·h)	[10]
	Aged refuse	NMS	CH <sub>4</sub> :O <sub>2</sub> =1, 30 °C, 130 r/min, 14 d/subcultured	MOR=2.8 mL/h	[11]
	Rice field soil and landfill soil	Optimum medium	10% CH <sub>4</sub> , 30 °C, pH 6.0, 2 d/incubated, repeated fifteenth	After 48 h, CH <sub>4</sub> conversion rate=100%	[12]

由于受到甲烷代谢效率和气液相传质限制的影响, 直接以甲烷作为碳源进行甲烷氧化菌的培养时, 甲烷氧化菌的生长速率有时达不到工程应用的要求。有些菌种耐受甲醇等有机物, 或者筛选、训练出耐甲醇的菌种, 可以利用有机碳源高效培养目标甲烷氧化菌, 满足生物合成的需要。

我们在对矿化垃圾中甲烷氧化菌的研究中发现有机碳源对甲烷氧化菌生长和甲烷利用的影响是复杂的。对从矿化垃圾中分离出来的菌株甲基孢囊菌 (*Methylocystis rosea*) JTA1 进行

纯培养时, 培养基中加入有机碳源可以促进其生长, 增加细胞密度<sup>[15]</sup>。研究还通过向矿化垃圾中喷洒渗滤液, 研究了有机质对甲烷氧化的影响。结果表明, 渗滤液中的化学需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 增加对促进矿化垃圾的甲烷氧化有利, 能提高矿化垃圾的最大甲烷氧化率。但如果 COD 过高会出现有机质氧化耗氧抑制甲烷氧化的现象, 导致矿化垃圾甲烷氧化启动延迟。表现为体系的氧气消耗和二氧化碳产生量高, 但甲烷氧化率低<sup>[16]</sup>。

很多研究针对甲烷氧化混合菌群培养条件



## 1.2 甲烷氧化菌培养强化技术和方法

现有甲烷氧化菌培养过程的强化主要通过添加辅助因子实现,添加物可分为2类:甲烷氧化菌代谢营养需要的代谢型添加物和增强甲烷气液传质效率的传质型添加物。

代谢型添加物都属于简单化合物,本身就存在于菌种生境中或培养体系中。二氧化碳(CO<sub>2</sub>)浓度对部分甲烷氧化菌有影响,严陈等<sup>[27]</sup>发现CO<sub>2</sub>浓度升高能促进水稻根际甲烷氧化细菌的丰度,包括疣微菌和变形菌门的部分甲烷氧化菌(Type I型的*M. capsulatus*、*M. marinum*, Type II型的*Methyloferula stellata*、*Methylocella silvestris*、*Methylocapsa acidiphila*)。这些甲烷氧化菌可以通过卡尔文(Calvin-Benson-Bassham, CBB)循环固定CO<sub>2</sub>作碳源。除了CO<sub>2</sub>外,氧气、氮气和氢气等补充气体也可以刺激部分甲烷营养生物的代谢<sup>[28-29]</sup>。某些金属离子也对菌体的生长有促进作用。由于铜离子能控制颗粒性甲烷单加氧酶(particulate methane monooxygenase, pMMO)与可溶性甲烷单加氧酶(soluble methane monooxygenase, sMMO)的差异化表达,培养时需添加铜离子以确保菌体良好地生长。Semrau等<sup>[30]</sup>发现,能进行甲烷(methane, CH<sub>4</sub>)彻底氧化的*M. album* BG8(I型,只能表达pMMO)和*M. trichosporium* OB3b(II型,能够同时表达sMMO和pMMO),Cu的加入会促进其生长。有研究发现,二价铁存在于sMMO中关键位置,以乙二胺四乙酸铁钠(ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium salt, NaFeEDTA)和钼酸盐形式存在的二价铁也经常被添加,用于富集固氮甲烷氧化菌。添加氮源增强代谢的选择有硝氮和铵氮,AlSayed等<sup>[31]</sup>发现向矿物盐培养基(mineral salts medium, MSM)中加入硝酸盐浓度到40 mmol时,菌体生长速率和甲烷吸收速率分别增加了14%和

25%。氨盐可以代替硝酸盐补充无机氮源,但通常以较低的浓度添加,因为氨是甲烷单加氧酶(methane monooxygenase, MMO)的竞争性抑制剂。

传质型添加物包括石蜡油和非离子表面活性剂等。Han等<sup>[32]</sup>在硝酸盐矿物盐(nitrate mineral salt, NMS)培养基中添加5%(V/V)的石蜡油后,增强了甲烷的传质并提高了细胞密度,*M. trichosporium* OB3b的细胞密度达到14 g/L(干重),在培养240 h后约是对照的7倍。Avalos等<sup>[33]</sup>在生物滴滤池中添加非离子表面活性剂Brij 35后,甲烷转化率比不添加表面活性剂的生物滴滤池提高了1倍。

此外,Veraart等<sup>[34]</sup>的研究结果首次揭示了非甲烷氧化异养菌-甲烷氧化菌相互作用中产生的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)的促生长作用,这表明混菌产生的VOCs可作为新型培养强化添加物。

## 2 好氧甲烷氧化菌及其代谢机制

好氧甲烷氧化菌为革兰氏阴性菌,在自然界中分布广泛,仍有许多菌种未被培养。在已分离的好氧甲烷氧化菌中,按系统发育可分为I、II、III 3种类型,分别属于生物分类意义上的变形菌门(Proteobacteria)  $\gamma$  亚型、 $\alpha$  亚型和疣状菌门(Verrucomicrobia)。甲烷氧化菌通过MMO将底物氧化为甲醇,MMO分为颗粒性(particulate)和可溶性(soluble)两类甲烷单加氧酶。I型好氧甲烷氧化菌主要通过pMMO酶氧化有机物,pMMO为含多基因簇的单一酶,故I型菌作用底物多为低碳烃,生长较快,在低甲烷浓度环境中的适应性强,更适合甲烷减排和油气勘探领域,但环境不利于其生长时死亡率高。II型好氧甲烷氧化菌通过sMMO完成底物氧化,sMMO途径需要多酶配合,故II型菌

底物范围广,多酶配合带来的复杂氧化系统同时使其生物物质应用潜力大,环境变化抵抗力更强,适用于有机物污染去除和微生物合成领域。III型好氧甲烷氧化菌多在极端环境下被分离,目前其代谢途径对工业应用的影响仍缺乏系统理解。

MOB 对甲烷氧化过程如图 1 所示,首先通过 MMO 将甲烷氧化为甲醇,再通过依赖周质吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 的甲醇脱氢酶 (methanol dehydrogenase, MDH) 将甲醇转化为甲醛,部分甲醛通过甲醛脱氢酶 (formaldehyde dehydrogenase, FADH) 氧化成甲酸,再通过依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 的甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH) 转化为  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  中部分被释放排出胞体,另一部分被 CBB 循环固定以提供必要的碳。甲醛的另一部分中, I 型 MOB 通过磷酸核酮糖 (ribulose monophosphate, RuMP) 途径固定碳, II 型菌通过四氢甲蝶呤-四氢叶酸 (tetrahydromethanopterin-tetrahydrofolate,

$\text{H}_4\text{MPT-H}_4\text{F}$ ) 进入丝氨酸途径产生生物物质。

不同的 MOB 种类在甲烷氧化过程中会有不同的代谢过程和代谢产物,利用这种特性可以生产各种不同的目标化合物。MOB 制甲醇的研究发现,甲烷氧化成甲醇需要甲酸氧化成  $\text{CO}_2$  过程中产生的  $\text{NAD}^+\text{H}^+$  作还原当量,故 I 型 MOB 在生物制甲醇应用中效率更高,而为提供 I 型 MOB 生长所需,部分甲醛经 RuMP 途径后被转化为丙酮酸 (PYR),然后通过不完全的柠檬酸循环 (citric acid cycle, TCA) 转化为生物物质。相反, II 型 MOB 在生产生物聚合物 (PHB/PHA, 其中 PHB 为聚羟基丁酸酯, polyhydroxybutyrate) 方面有优势。在将甲烷代谢为甲醛后, II 型 MOB 会将部分甲醛通过  $\text{H}_4\text{MPT}$  途径转化为甲酸,其中部分甲酸通过 FDH 氧化为  $\text{CO}_2$ ,另一部分经  $\text{H}_4\text{F}$  途径进入丝氨酸循环,随后, II 型甲烷氧化菌分别在营养充足或营养不足的条件下进行 TCA 或 PHA/PHB 循环,并产生  $\text{CO}_2$ 。因此,不同种群的 MOB 可用于不同化合物的生产流程。

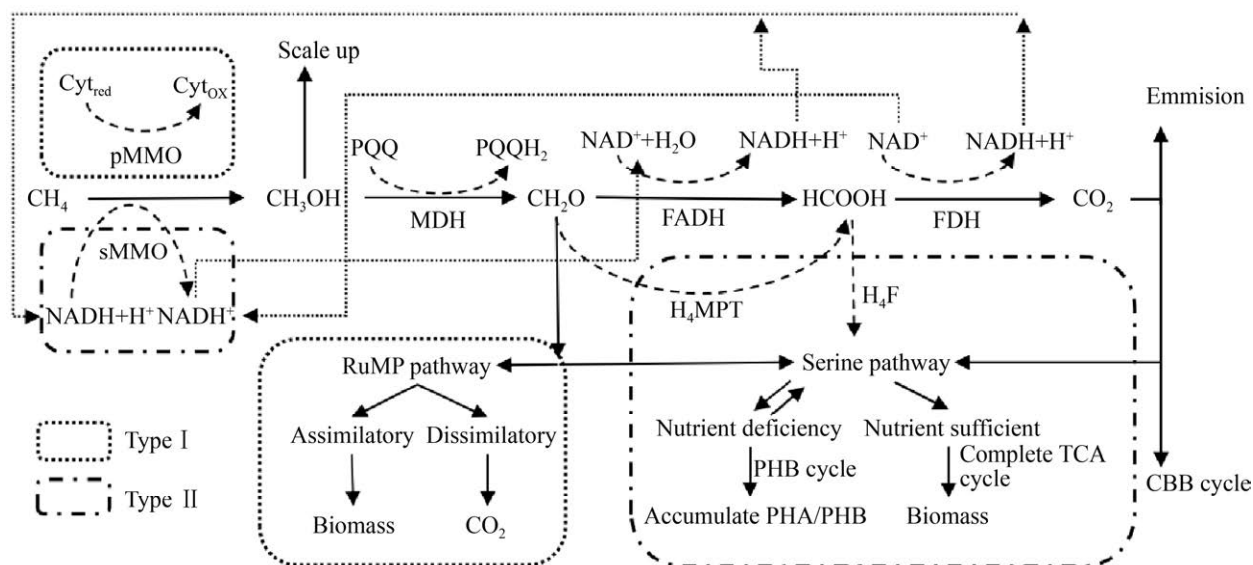


图 1 好氧甲烷氧化菌代谢甲烷的主要反应

Figure 1 Main methane metabolism reactions in MOB.

### 3 好氧甲烷氧化工程应用领域

#### 3.1 填埋场甲烷减排

生活垃圾填埋场甲烷排放量占全球甲烷排放总量的 6%–12%<sup>[35]</sup>, 控制和减少填埋场的甲烷排放量, 对减少全球温室气体排放有重要意义。填埋场覆土中的好氧甲烷氧化对甲烷排放具有调控作用, 特别是在处理填埋场封场前和产气高峰后的低浓度甲烷有优势。很多研究基于填埋场覆土层的甲烷氧化速率 (methane oxidation rate, MOR) 和影响因素, 发展出多种强化甲烷生物氧化处理技术, 包括生物覆盖层、生物窗口和生物过滤器等。

##### (1) 填埋场生物覆盖层

在没有填埋气收集系统的情况下, 填埋场的甲烷减排完全依靠填埋场覆盖土壤的甲烷氧化过程。但由于填埋场覆盖土层不能保证甲烷氧化的最优条件, 甲烷氧化率较低且变化范围也较大。Liptay 等<sup>[36]</sup>使用稳定同位素测定方法, 得到填埋场覆盖土的甲烷氧化率年均值最高约为 10%。Bartalaz 等<sup>[37]</sup>测得用粘土做覆盖层时甲烷氧化率约为 21%。Chanton 等<sup>[38]</sup>通过对不同覆盖土壤类型及各种规模填埋场的调查发现, 甲烷穿越覆盖土层时氧化率为 22%–55%, 平均为 36%。

生物覆盖层是通过改进垃圾覆盖层设计, 以优化甲烷氧化菌生长条件、增强填埋场甲烷氧化的技术。它包括一个促进甲烷氧化的顶层和下部的分布层 (gas distribution layer, GDL)。GDL 使用有一定强度和空隙率的沙砾建成, 以利于在整个区域内均匀分布填埋气以实现有效地氧化。生物覆盖层的顶部甲烷氧化层主要由富含有机物的材料组成, 例如堆肥<sup>[39-40]</sup>、污水厂污泥<sup>[40]</sup>、改性矿化垃圾<sup>[16]</sup>、泥炭<sup>[41]</sup>等, 这些材料可以单独使用, 也可以作为土壤的改良剂, 能有效促进甲烷营养细菌的生长。

Pawlowska 等<sup>[42]</sup>将污水污泥添加到用沸石改良的复合材料中, 检测到甲烷营养菌的活性增加了接近一倍。Tanthachoon 等<sup>[43]</sup>通过对堆肥覆盖层施用渗滤液促进甲烷营养活性并增加了甲烷氧化率。通过填埋场现场实验, Yang 等<sup>[44]</sup>发现使用矿化垃圾或生物炭改良土壤的生物覆盖层中甲烷氧化率平均值分别为 61.5%、56.1%。

与传统覆盖层相比, 生物覆盖层的甲烷氧化率有不同程度的提升, 甚至在现场环境甲烷氧化率也能接近 100%。Lee 等<sup>[45]</sup>对 12.5 m<sup>3</sup> (2.5 mW×5.0 mL×1.0 mH) 的生物覆盖层进行 240 d 的监测后发现, 冬季的甲烷去除率为 35%–43%, 而夏末的甲烷去除率最高, 达到了 96%。Pecorini 等<sup>[25]</sup>使用 25 m<sup>2</sup> 生物覆盖层, 得到的最大甲烷去除率达到了 98%, 平均氧化率约为 75%。Scheutz 等<sup>[46]</sup>测得的生物覆盖层的甲烷氧化潜力为 300 g CH<sub>4</sub>/(m<sup>2</sup>·d), 甲烷氧化效率达到 81%–100%。Olivier 等<sup>[47]</sup>对覆盖面积分别为 400、256、256 m<sup>2</sup> 的 3 个垃圾填埋场甲烷进行 4 年监测, 在此期间甲烷量减少了 50%–100%。

##### (2) 生物过滤器

传统的填埋场土壤覆盖以及改进的生物覆盖均是对填埋场表面进行无差别全覆盖以实现甲烷减排。而生物过滤器 (biofilters) 将工程化的生物系统安置在填埋场局部的小范围区域中, 填埋气 (landfill gas, LFG) 通过主动或被动气体导排系统导入后端的甲烷氧化层被氧化。与覆盖层相比, 生物过滤器通过气体收集系统或抽气泵等引导 LFG 流向, 能够在保证甲烷氧化率的前提下减少安装面积, 降低实施和监控成本。当填埋场没有气体收集系统时, 或者在填埋场中观察到的点源排放处可以采用生物窗口 (biowindows) 的运行方式。即在填埋场覆盖层的密封层中开口并嵌入甲烷氧化层, 甲烷氧化层与低渗透性覆盖物 (如合成覆盖物、压实

粘土) 整合在一起, LFG 通过渗透扩散自行进入生物窗口中的氧化层。

生物过滤器比生物覆盖层有更高的甲烷氧化效率, 生物过滤器的甲烷氧化效果见表 3。氧气浓度的降低和甲烷负荷的增高都会造成生物过滤器的甲烷氧化率下降, 因此过滤器表面氧化率高于底部<sup>[48-49]</sup>。根据 Scheutz 等<sup>[50]</sup>的研究, 为保持生物过滤器的甲烷氧化率, 氧气浓度不得低于 1%。Gebert 等<sup>[51]</sup>认为氧气浓度在 3%–20% 时甲烷氧化速率将达到最大。生物过

滤器的甲烷氧化效果会随甲烷负荷的增高而下降<sup>[49]</sup>。在 Pecorini 等<sup>[48]</sup>的研究中, 当  $\text{CH}_4$  负荷为  $6.5 \text{ g CH}_4/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  时, 氧化率为 80%; 当负荷为  $9.3 \text{ g CH}_4/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , 氧化率为 70%。不过, 当 LFG 中甲烷的浓度降低时, 生物过滤器可以承受的甲烷负荷也会相应提高。Turgeon 等在甲烷浓度 3%–18%, 填埋气负荷  $240 \text{ m}^3/\text{h}$  的条件下, 进行了中试规模的生物过滤器 ( $0.95 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ ) 研究, 通过 83 d 的运行数据得知最大氧化速率为  $66 \text{ g CH}_4/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ <sup>[52]</sup>。

表 3 生物过滤器的运行参数和效果

Table 3 Operating parameters and effects of biofilters and the running effects

Packing material	Volume	Methane concentration (%)	Inlet load	$\text{CH}_4$ removal (%)	MOR	References
Fly ash ceramicsite	0.500 L	1.0	0.009 L/h	36	Avg $4.628 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	[10]
Leaf compost	$30 \text{ m}^3$	5.9	$794 \text{ g CH}_4/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	58	$460 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$	[53]
Tobermolute	5 L	6.0	$2\,320 \text{ g CH}_4/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$	54	$766\text{--}974 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$	[54]
Mixture of peat moss and wood chips	$0.950 \text{ m}^3$ <i>in situ</i>	3.0–18.0	Avg $10.56 \text{ m}^3/\text{h}$	80	Max $66 \text{ g CH}_4/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	[52]
Composts:sand=1:5	$405 \text{ m}^3$ <i>in situ</i>	20.0	$10.9 \text{ g CH}_4/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$	58	Avg $5.7 \text{ g CH}_4/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$	[48]
Compost	$4 \text{ m}^3$	65.0–70.0	$1\,547.5\text{--}1\,666.7 \text{ g CH}_4/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$	10	Max $50 \text{ g CH}_4/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	[55]

考虑到  $\text{CH}_4$  在水中的溶解度较低, 为获得较高的甲烷氧化率, 生物过滤器的体积要满足一定要求, 空床停留时间 (empty-bed residence time, EBRT) 一般要大于甲烷等气体在气-液介质中转移所需要的时间, 使用无机填料时 EBRT 至少 4 min, 而有机填料则需更高 (相关研究中, EBRT 为  $6.5 \text{ min}$ <sup>[56]</sup>、 $50 \text{ min}$ <sup>[57]</sup>、 $82.8 \text{ min}$ <sup>[58]</sup>, 差异很大)。Nikiema 等<sup>[22]</sup>在对生物滤池研究的基础上, 提出的容积负荷限值对生物过滤器设计有参考价值, 在甲烷浓度从 0.13%–1.20% 时, 甲烷的最大容积负荷约为  $0.075 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ 。为减小生物过滤器的体积, Eldon 等<sup>[59]</sup>提出通过废气再循环的方式提高氧化效果。已有研究中,

生物过滤器的体积一般不超过  $30 \text{ m}^3$ ,  $58 \text{ m}^3$  生物过滤器去除封场填埋场甲烷是最大规模的实验。对大规模的现场实验, Streese 等将通过小试、中试生物过滤器装置算出的动力学参数代入虚构的  $370 \text{ m}^3$  生物过滤器时, 对 2.5% 的填埋气甲烷氧化率达 90%<sup>[55]</sup>。

### 3.2 煤矿通风气甲烷治理

甲烷生物氧化用于煤矿甲烷治理时主要针对低浓度甲烷。煤矿 64% 的温室气体排放<sup>[60]</sup>是由通风气甲烷排放引起的, 从作业面排出的煤矿通风气甲烷浓度低于 1%。

采用生物技术处理低浓度甲烷通常是将高密度甲烷氧化菌菌液喷涂或灌注于煤层表面,

或者将煤矿通风气 (ventilation air methane, VAM) 通入生物过滤器处理。由于反应器规模、微生物菌液种类、填料类型、气体停留时间等的差异, 已有研究得到甲烷去除率差别较大, 对 0.25%–1.00% VAM 去除率在 19.7%–90.0% 范围内 (0.25%–1.00% 的 VAM, 甲烷氧化率最高 90%<sup>[61]</sup>; 0.70%–0.75% 的 VAM, 甲烷氧化率为 41%<sup>[62]</sup>; 1% 的 VAM, 甲烷氧化率为 19.7%<sup>[63]</sup>)。

在利用菌剂法治理煤矿甲烷的研究中, 纯菌、混菌都具有甲烷减排效果, 钻孔注入法和表面停留法能分别针对煤层和巷道中的甲烷进行处理。生物过滤器治理 VAM 中由甲烷氧化菌和其他细菌组成的混菌起关键作用, 在混菌中已发现被用于 VAM 减排的 MOB 种类包括甲基单胞菌 (*Methylomonas fodinarum*) ACM 3268<sup>[61]</sup>、甲基孢囊菌 (*Methylocystis parvus*)<sup>[62]</sup>、甲基弯曲菌 (*Methylosinus sporium*)<sup>[63]</sup>, 均属于变形菌门 (Proteobacteria)。此外, 实际应用中多为甲烷氧化菌及其与其他微生物的混合菌群, 如甲烷氧化菌混合菌群 (mixed methanotrophic consortia, MMC)<sup>[64-65]</sup>、MMC 与微藻混合菌群<sup>[66]</sup>、MOB-真菌混合菌群<sup>[67]</sup>, 对应的甲烷氧化效果为 110  $\mu\text{g CH}_4/(\text{g soil}\cdot\text{h})$ 、589  $\text{mg CH}_4/(\text{g biomass}\cdot\text{d})$ 、甲烷氧化率为 90%。

在生物过滤器的运行中, 填料的特性对 VAM 甲烷氧化率影响显著, 其粗糙度、孔隙率、亲水性、电荷和化学组成会影响菌的附着。Limbrì 等以煤为填料构建连续式生物过滤器, 在甲烷负荷 139  $\text{g}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$  时, 对 1% 甲烷浓度的 VAM, MOR 达 27.2  $\text{g CH}_4/(\text{m}^3\cdot\text{h})$ , 去除率为 19.7%<sup>[63]</sup>。Sun 等<sup>[10]</sup>用粉煤灰陶粒作填料连续消除 1%  $\text{CH}_4$ , 反应器 (高 400 mm, 直径 40 mm), 使用填埋场富集培养后的菌液, 气体流量为 0.9 L/h, 平均氧化速度为 4.628  $\text{g}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$ 。

空床停留时间是生物过滤器运行的重要参

数, EBRT 延长会增加甲烷氧化率。Sly 用单一菌株处理甲烷浓度为 0.25%–1.00% 的空气时, 停留时间为 15 min 时, 甲烷氧化率超过 70%, 在 20 min 时去除了 90%<sup>[61]</sup>。但是 EBRT 增大会导致 VAM 气体处理量小, 增大反应器体积可以同时增加停留时间和气体处理量却会降低甲烷氧化速率。Nikiema 等在 18 L 甲烷生物过滤实验研究中, 用无机填料时, EBTR 约为 260 s, 氧化率仅为 41%, MOR 为 29.2  $\text{g}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$ <sup>[62]</sup>。Plessis 等在体积为 33 L 的生物过滤器中处理 0.5% 甲烷浓度 VAM ( $V/V$ ), 当生物滤池的 EBRT 超过 30 min 时, 甲烷去除效率超过 70%<sup>[57]</sup>。

虽然热氧化、催化氧化和低浓度甲烷富集技术是煤矿瓦斯气研究的主要方向, 但生物法在废弃煤矿超低浓度甲烷 (0.1%) 氧化方面投资成本低、灵活性好的优势不可忽略。现有研究初步表明了 EBRT 对甲烷氧化率的影响, 同时证明了生物法治理 VAM 的可行性。实际应用还需进一步研究, 如生物过滤法的生物稳定性、大气流量下氧化效率的维持、填料的筛选、营养物供应调节等。

### 3.3 生物合成甲烷来源产品

填埋场、煤矿井中释放的低浓度甲烷不适合进行能源回收, 可以利用甲烷氧化菌将其氧化生成二氧化碳而消除, 但是这种处理方式不产生收益。现有的好氧甲烷氧化菌生物合成研究有助于将填埋气、煤矿瓦斯及沼气中的甲烷转化为高附加值的生物产品, 如生物聚合物、胞外多糖, 从而将减少  $\text{CH}_4$  排放变为可持续而且有收益的过程。

好氧甲烷氧化菌可将甲烷转化为有价值的生物产品, 其中研究最深入的甲烷来源产品包括甲醇、PHA 和 SCP。尽管 MOB 有巨大的产甲醇潜力, 但目前要实现生物法甲烷制甲醇的工业应用, 还存在一些问题<sup>[68]</sup>。利用 MOB 生

产 PHA 相关研究已经进入了中小规模阶段,而生物法制 SCP 则已经实现大规模生产。

甲醇是一种重要的化学前体,可以用作化学原料、燃料或废水处理中的脱氮过程。与目前工业甲醇生产的化学催化过程相比,在 MMO 的催化下甲烷转化为甲醇一步就可以完成,反应条件温和,对环境友好。但是甲醇是甲烷氧化菌的中间代谢产物,正常情况下甲烷氧化菌会通过 MDH 将甲醇转化为甲醛,再进一步催化氧化至生成最终产物二氧化碳。若要实现甲醇的生物合成,需要抑制 MDH,防止甲醇转化为甲醛<sup>[69]</sup>。

由于不同的甲烷氧化菌的甲醇脱氢酶存在差异,抑制的方法也不同。大部分生物合成甲醇的研究涉及的甲烷氧化菌属于  $\alpha$  和  $\gamma$  Proteobacteria,含有 MxaFI 型的 MDH<sup>[70-72]</sup>,为钙依赖型,常用的抑制剂有  $MgCl_2$  和乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)。这类抑制剂同时会减少 ATP 的产生量从而降低产品产量。有研究通过添加甲酸盐作为额外的电子供体的方法减小 MDH 抑制剂的不利影响<sup>[73]</sup>,但还没有实现连续的甲醇生产。

Hogendoorn 等<sup>[69]</sup>利用从火山地区分离出来的富马酸甲酯菌 (*Methylocidiphilum fumariolicum*) SolV,实现了甲醇生物合成的实验室连续运行,并认为甲烷氧化菌可用于连续的甲醇生产。该菌属于疣状菌门 (Verrucomicrobia),只含有 XoxF 型 MDH,需要镧系元素作为辅助因子。研究通过使用几乎不含镧系元素的培养基来降低甲醇脱氢酶的活性,获得了连续产甲醇的微生物培养物。在 *M. fumariolicum* SolV 菌生长率较高水平下,测定的最大甲醇转化率为 63%,甲醇产生速率为 0.88 mmol/(g DW·h)。该研究得到的稳定连续的甲醇产量为 4.1 mmol/L,低于由 MxaFI 型 MDH 微生物得到的甲醇产量

4–30 mmol/L<sup>[72-74]</sup>。

PHA 这种微生物生成的胞内聚合物,因其优异的力学性能、生物降解性和生物相容性,有潜力成为油基塑料的替代品,其中 PHB 的相关研究较多。甲烷生物合成 PHB 成本较低,比以化石原料为基础的 PHB 生产传统工艺降低了 30%–35%<sup>[75]</sup>。在 PHB 规模化生产中, MangoMaterials 公司已实现以甲烷为原料、II 型 MOB 为主要菌株生产 3-羟基丁酸酯 (P3HB),年产量约 250 kg<sup>[76]</sup>。Newlight 公司的产品 Aircarbon 是以甲烷为原料,在生物催化剂的作用下制成的长链热塑性材料,已实现 22.7 万 t/年的规模化生产<sup>[77]</sup>。

在相关研究中,为了提高 PHA 的生产效率,常选取 II 型甲烷氧化菌中的 *Methylocystis* 作菌源。多数 PHA 是在碳源过量而氮源饥饿时实现累积的,II 型甲烷氧化菌氧化甲烷后产生的二氧化碳中约 50%被吸收到生物质中,I 型甲烷营养生物仅可吸收 5%–15%。II 型甲烷氧化菌中最受关注的菌属为甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*),在摇瓶、鼓泡塔生物反应器和垂直管式循环生物反应器中目标产品的累积率分别达到 60%<sup>[78]</sup>、73.4%<sup>[79]</sup>和 51.6%<sup>[80]</sup>。

添加铜离子、温度适宜和高传质反应器均有利于 PHA 的积累。铜离子浓度在 5–15  $\mu\text{mol/L}$  时,甲烷氧化菌生长速度随铜离子浓度增加而升高,但当浓度超过 30  $\mu\text{mol/L}$  时 MOB 生长会受到抑制。张婷婷<sup>[81]</sup>用甲烷营养菌群合成 PHB 的研究中,发现 5  $\mu\text{mol/L}$  铜离子条件下 PHB 合成能力从 11.9%增至 48.7%。Pérez 等<sup>[82]</sup>发现对以 *Methylocystis* (30%) 为主的甲烷氧化菌混合菌群,高温条件 (30 °C 和 37 °C) 比 25 °C 的常温更有利于 PHA 的积累,高温条件的 PHA 可占细胞干重的 30%。Zúñiga 等<sup>[83]</sup>通过创新反应器构型提高甲烷和氧气的传质效率,在两相

生物反应器中实现了 57% 的 PHB 积累。

SCP 按干重计一般含有 50%–80% 的蛋白质<sup>[84]</sup>，对于大多数必需氨基酸，尽管甲烷源细菌蛋白含量与鱼粉和豆粕的平均数据有微小差异，但必需氨基酸含量可与粮农组织的建议值相当或更高<sup>[85]</sup>，故单细胞蛋白生产技术仍持续推进。在国外，UniBio A/S 和 Calysta Inc 都开发了发酵技术，通过使用甲烷营养细菌将天然气转化为动物饲料蛋白。UniBio A/S 使用 U 形发酵罐，实现了 4 kg/(m<sup>3</sup>·h) 的生产率，生产具有约 70% 蛋白质的 UniProtein<sup>®</sup>，该蛋白已被批准用于动物饲料。Calysta Inc. 于 2016 年在英国开设了其产品 FeedKind<sup>®</sup> 的生产设施，并于 2020 年与 Adisseo 合资在重庆建设第一家单一菌株的单细胞蛋白商业规模生产设施。近年来，国内储卫华团队优化了甲烷氧化菌生产单细胞蛋白的发酵条件，为放大发酵提供基础<sup>[86]</sup>。辛嘉英团队<sup>[87]</sup>用甲烷氧化菌与光合菌协同生产单细胞蛋白用于饲料，为 SCP 生产提供了新的思路。

### 3.4 勘测油气藏

微生物油气勘探技术基于轻烃垂直微渗漏后表面环境微生物的变化，当检测到指示微生物（如甲烷氧化菌、丁烷氧化菌）的密度不断增加，可以表明存在油气渗漏，存在地下碳氢化合物储集层。该技术能帮助确定钻探位置的优先次序，评估某个地区的油气勘探前景，提高勘探钻井的成功率。MOB 勘探气藏的高频指示菌为甲基球菌、甲基杆菌和甲基孢囊菌<sup>[88]</sup>。

气藏地渗漏出的轻烃（C<sub>1</sub>–C<sub>4</sub>）以甲烷为主，MOB 以渗漏出的甲烷为唯一碳源和能源，专一性强，对判断页岩气、煤层气、常规油气和海洋天然气的分布情况有参考意义。汤玉平等<sup>[89]</sup>通过 30 个月的观测发现，烃类诱导下 MOB 数量随培养时间延长而增加，理论上利用微生物指示菌判识油气是有效的。袁志华等<sup>[2]</sup>

对蠡县斜坡西柳构造已钻的探井结果统计发现，天然气微生物勘探结果的符合率约为 83%。

传统的微生物勘探是基于微生物的培养，可分为土壤菌测法、细菌繁殖测量法、微生物勘探油气（microbial prospection for oil and gas, MPOG）、微生物石油勘探技术（microbial oil survey technique, MOST）。随着生物技术的发展，分子生物学检测方法与传统微生物勘探方法结合使用成为天然气勘探新的发展方向。培养法勘探的准确性受环境因素和难培养微生物的限制，免培养的分子生物学技术如稳定性同位素核酸探针技术能通过定量解析甲烷单加氧酶基因后验证油气藏位置和生产井位置，两者共同应用将提高勘探结果的准确率。

近几年，国内外利用甲烷氧化菌进行油气勘探有较多的应用实例。国内对多个油气田区块进行了甲烷氧化菌油气勘探，为缩小勘探范围提供了技术性支撑<sup>[2,90-92]</sup>。印度研究者将指示烃氧化细菌数量与土壤轻烃吸附量结合，对坎贝盆地北<sup>[93]</sup>、Jamnagar 次盆地<sup>[94]</sup>、Bikaner-Nagaur 盆地<sup>[95]</sup>、Krishna-Godavari 盆地<sup>[96]</sup>等进行探测，发现了异常烃类的微渗漏；德国 Micropro 实验室在非洲中部等沙漠地区应用 MPOG 方法勘探油气藏。

利用甲烷氧化菌勘探油气藏离不开其他指标的帮助。由于甲烷可在没有石油矿藏的情况下出现，故还需结合其他长链烃氧化细菌的检测。此外，确定油气藏位置和布井位置需综合微生物勘探结果与结合各类化探指标。未来，在建立甲烷氧化菌分子生物学库、完善各种气藏甲烷氧化菌拉曼数据库等方面仍有大量工作要做。

## 4 问题与展望

出于对甲烷温室效应控制与资源化利用的需要，甲烷氧化菌成为一个有吸引力的高效微

生物平台,可用于生成可再生燃料和化学品。在环境治理、化学品生产和油气藏勘测等领域也已经有规模化培养和实际应用。由于对好氧甲烷氧化菌代谢机制和种群关系认识的不足,好氧甲烷氧化菌的工程应用仍存在很多限制因素,需要在以下方面开展进一步研究。

### (1) 基于代谢模型的生物转化调控

甲烷生物转化的实际工程应用需以提高甲烷转化率和产品产率为前提。Snehal 等<sup>[97]</sup>基于 *M. alcaliphilum* 20ZR 已有的完整注释的基因组序列、大型酶制剂和转录组数据库,进行计算机模拟预测,并结合非靶向代谢组学和酶学的证据,提出了 *M. alcaliphilum* 20ZR 中甲烷和甲醇利用的综合代谢框架,并进行了数学建模。所建立的代谢模型框架为甲烷代谢工程或生态系统建模提供了有效的工具,有利于提高甲烷氧化细菌的产量和甲烷转化速率,以及探索甲烷生物转化调控的新方向。

该甲烷氧化细菌  $C_1$  代谢框架模型可以预测多种甲烷及中间产物的代谢途径、不同的生物酶,基于此可以研究甲烷代谢过程的限制因素和条件,还可以人为有效控制不同酶的表达,实现对代谢产物的调控。如该模型的研究表明,用 La 取代 Ca 能引起甲烷氧化细菌核心代谢途径的显著改变,获得有价值的生物产品甲醇。还可以基于代谢模型探索甲烷生物转化调控的新方向,如发现钨元素存在下细胞中甲酸盐产生量显著减少,表明钨限制是导致甲酸盐积累的主要因素,通过控制钨而改变代谢产物组成。

### (2) 混合培养的代谢过程和种群关系研究

对甲烷生物合成的研究大多基于对纯菌的分离和培养,约 90% 的研究用纯培养物来证明 PHA/PHB 积累的能力,这在大规模工业应用上的意义不大<sup>[98]</sup>。在工业生产中,单一培养系统会发生污染,对产率和产量的预测都会打折扣。

混合的甲烷氧化菌是有益的:共生菌能去除有毒和过量产生的代谢物(如甲醇)来改善甲烷氧化细菌的生长条件,还能提供必需维生素和生长因子,无需严格的无菌条件菌群也能保持长期稳定。

混合菌群的培养方法大多与纯菌类似,先对接种物进行富集,再经过多次传代培养得到稳定的甲烷代谢菌群。我们的研究中采用了不同的培养方式,即先通过类原位富集的方式获取接种物,接种物和培养基在甲烷条件下一次培养即可得到有效的甲烷氧化混合菌群,不需经过传代培养<sup>[15]</sup>。这种混合菌群的培养方法省时有效,尤其适用于含甲烷的生物废气的净化处理,该方式的应用和运行效果应进一步加以研究。

如何保证混合菌群稳定的甲烷氧化性能还需进一步研究。目前,甲烷氧化混合菌群的种群关系,代谢产物对种群结构的影响还不清楚,相关研究较少。甲烷氧化菌混合菌群的获得多基于种源直接培养,因缺乏对甲烷氧化菌种群间作用的生物化学机制及其调控方法的研究,难以实现高效稳定菌群的人工构建,对稳定菌群特征描述得更少。今后应加强对混合培养的代谢过程和种群关系方面的研究。

### (3) 甲烷氧化菌新菌种的分离培养

从自然环境中分离甲烷氧化菌仍然具有挑战性。NMS 培养基被广泛地用于各种环境中甲烷氧化菌的选择性富集。在富集过程中,当快速生长的菌株被选择性富集时,缓慢生长的甲烷氧化菌可能被稀释掉。Rhee 等<sup>[99]</sup>的分子生态学研究也表明,用 NMS 富集出来的甲烷氧化菌在原环境中并不是主要的甲烷氧化菌。模型的研究也显示出了甲烷代谢的多样性,因此分离出更多特定环境中的新菌种,可以发现更多的可利用菌株和代谢酶类型。新的甲烷氧

化菌的分离需要新的培养基和培养策略才能实现。如在分离特定甲烷氧化菌的过程中, Dedysch 等使用稀矿物盐培养基成功地从泥炭沼泽中分离出中等嗜酸的甲烷氧化菌 *Methylocapsa* 和 *Methylocella*<sup>[100]</sup>。

#### (4) 填埋气等生物废气的甲烷生物转化

目前欧洲很多国家都在积极推进温室气体减排的新战略, 将 CH<sub>4</sub> 生物转化为高附加值产品已成为最有前景的方法之一<sup>[19]</sup>。垃圾填埋场、煤矿和厌氧消化装置都会产生沼气, 可以替代天然气作为生物合成的甲烷来源, 而不是被收集后简单氧化或燃烧。国外很多研究都已针对碳基废物资源的甲烷转化进行研究<sup>[101]</sup>, 包括富含有机物的生活/工业废水和固体废物发酵产气和工业气体, 我国目前类似的研究还较少。我国垃圾分类出来的厨余垃圾多进行厌氧发酵, 对其产生的沼气进行生物合成的研究, 可以增加厨余垃圾资源化处理的收益, 有利于垃圾分类收集处理体系的实现。

对于以上环境沼气中甲烷转化的工程应用, 实验室的培养方法会限制甲烷氧化菌使用的规模和范围, 高成本的培养基, 尤其是甲烷氧化菌高密度生长的培养基所需试剂多且贵, 培养成本高。以矿化垃圾、煤等天然材料与具有优良表面性质的填料结合将是甲烷生物过滤器的填料发展方向, 能在降低填料成本的同时兼顾传质效果, 还能为微生物提供各种营养物质。其他经济高效的替代培养基和培养技术的研究将有利于甲烷氧化菌生物技术的推广。

## REFERENCES

- [1] Meruvu H, Wu H, Jiao Z, et al. From nature to nurture: essence and methods to isolate robust methanotrophic bacteria. *Synth Syst Biotechnol*, 2020, 5(3): 173-178.
- [2] 袁志华, 梅博文, 余跃惠, 等. 天然气微生物勘探研究——以蠡县斜坡西柳构造为例. *天然气工业*, 2003, 23(2): 27-30, 10.
- [3] Yuan ZH, Mei BW, She YH, et al. Application of gas microbial prospecting—take xiliu structure of Duxian slope as a case study. *Nat Gas Ind*, 2003, 23(2): 27-30, 10 (in Chinese).
- [4] Nguyen AD, Kim D, Lee EY. A comparative transcriptome analysis of the novel obligate methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 reveals key differences in transcriptional responses in C1 and secondary metabolite pathways during growth on methane and methanol. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 130.
- [5] Ghashghavi M, Belova SE, Bodelier PLE, et al. *Methylotetracoccus oryzae* strain C50C1 is a novel type Ib gamma-proteobacterial methanotroph adapted to freshwater environments. *mSphere*, 2019, 4(3): 1-15.
- [6] Tsubota J, Eshinimaev BT, Khmelenina VN, et al. *Methylothermus thermalis* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(Pt 5): 1877-1884.
- [7] Islam T, Larsen Ø, Torsvik V, et al. Novel methanotrophs of the family Methylococcaceae from different geographical regions and habitats. *Microorganisms*, 2015, 3(3): 484-499.
- [8] 于红, 崔学锋, 张瑞林. 颗粒煤吸附甲烷微生物降解效能试验探究. *河南理工大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(6): 30-36.
- [9] Yu H, Cui XF, Zhang RL. Experimental study on microbial degradation efficiency of adsorption methane of granular coal. *J Henan Polytech Univ (Nat Sci Ed)*, 2018, 37(6): 30-36 (in Chinese).
- [10] 龙於洋, 方圆, 廖燕, 等. 甲烷氧化菌在填埋场覆盖层的工程应用(I): 分离与筛选. *环境科学学报*, 2015, 35(7): 2210-2216.
- [11] Long YY, Fang Y, Liao Y, et al. Engineering application of methanotrophs in landfill coverlayer (I): isolation and characterization. *Acta Sci Circumstantiae*, 2015, 35(7): 2210-2216 (in Chinese).
- [12] 时士洋. 煤炭瓦斯生物治理菌种的选育、分子鉴定及优化试验研究[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2014.
- [13] Shi SY. Studies on the selection and molecular identification of bio-oxidizing methane and the optimization test[D]. Huainan, China: Anhui University of Science & Technology, 2014 (in Chinese).
- [14] Sun MT, Zhao YZ, Yang ZM, et al. Methane elimination using biofiltration packed with fly ash ceramicsite as support material. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 351.

- [11] 梅娟, 赵由才, 王莉, 等. 利用矿化垃圾富集和培养甲烷氧化菌的研究. 有色冶金设计与研究, 2009, 30(6): 101-103.  
Mei J, Zhao YC, Wang L, et al. Studies on enrichment and cultivation of methanotrophs from aged refuse. Nonferrous Met Eng Res, 2009, 30(6): 101-103 (in Chinese).
- [12] 余海霞. 利用微生物技术治理煤矿瓦斯的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.  
Yu HX. Studies on bio-oxidizing methane in coal mines with microbial technology[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007 (in Chinese).
- [13] Terry JM. Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon degrading microbes. 1st ed. Cham: Springer International Publishing, 2019: 246-269.
- [14] Eckert CA, Trinh CT. Biotechnology for biofuel production and optimization: Methane Biocatalysis: Selecting the Right Microbe. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2016: 353-383.
- [15] Zhao YC, Lou ZY. Pollution control and resource recovery: municipal solid wastes at landfill. 1st ed. Shanghai: Butterworth-Heinemann, 2016: 147-226.
- [16] Mei J, Zhen GY, Zhao YC. Bio-oxidation of escape methane from landfill using leachate-modified aged refuse. Arab J Sci Eng, 2016, 41(7): 2493-2500.
- [17] Syed R, Saggat S, Tate K, et al. Does acidification of a soil biofilter compromise its methane-oxidising capacity? Biol Fertil Soils, 2016, 52(4): 573-583.
- [18] Melse RW, Van Der Werf AW. Biofiltration for mitigation of methane emission from animal husbandry. Environ Sci Technol, 2005, 39(14): 5460-5468.
- [19] Cantera S, Sánchez-Andrea I, Lebrero R, et al. Multi-production of high added market value metabolites from diluted methane emissions via methanotrophic extremophiles. Bioresour Technol, 2018, 267: 401-407.
- [20] Ganendra G, Mercado-Garcia D, Hernandez-Sanabria E, et al. Biofiltration of methane from ruminants gas effluent using autoclaved aerated concrete as the carrier material. Chem Eng J, 2015, 277: 318-323.
- [21] Park S, Lee CH, Ryu CR, et al. Biofiltration for reducing methane emissions from modern sanitary landfills at the low methane generation stage. Water Air Soil Pollut, 2009, 196(1/2/3/4): 19-27.
- [22] Josiane N, Michèle H. The influence of the gas flow rate during methane biofiltration on an inorganic packing material. Can J Chem Eng, 2009, 87(1): 136-142.
- [23] Veillette M, Avalos Ramirez A, Heitz M. Biofiltration of air polluted with methane at concentration levels similar to swine slurry emissions: influence of ammonium concentration. J Environ Sci Heal Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng, 2012, 47(7): 1053-1064.
- [24] Jiang H, Duan CH, Jiang PX, et al. Characteristics of scale-up fermentation of mixed methane-oxidizing bacteria. Biochem Eng J, 2016, 109: 112-117.
- [25] Pecorini I, Iannelli R. Landfill GHG reduction through different microbial methane oxidation biocovers. Processes, 2020, 8(5): 591.
- [26] 毛飞. 微生物技术治理煤层瓦斯理论及应用研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2013.  
Mao F. Research on the theory and application of gas control by microorganism in the coal seam[D]. Chongqing: Chongqing University, 2013 (in Chinese).
- [27] 严陈, 许静, 钟文辉, 等. 大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高对稻田根际土壤甲烷氧化细菌丰度的影响. 生态学报, 2013, 33(6): 1881-1888.  
Yan C, Xu J, Zhong WH, et al. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on methanotrophs in the rhizosphere of rice plant. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(6): 1881-1888.
- [28] Mohammadi S, Pol A, Van Alen TA, et al. *Methylococcus* *fumarolicum* SolV, a thermoacidophilic 'Knallgas' methanotroph with both an oxygen-sensitive and-insensitive hydrogenase. ISME J, 2017, 11(4): 945-958.
- [29] Carere CR, McDonald B, Peach HA, et al. Hydrogen oxidation influences glycogen accumulation in a verrucomicrobial methanotroph. Front Microbiol, 2019, 10: 1873.
- [30] Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S. Methanotrophs and copper. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34(4): 496-531.
- [31] AlSayed A, Fergala A, Eldyasti A. Enhancement of the cultivation process conditions of mixed culture methanotrophic Proteobacteria phylum enriched from waste activated sludge as the first step for value added recovery process. J Biosci Bioeng, 2019, 127(5): 602-608.
- [32] Han B, Su T, Wu H, et al. Paraffin oil as a "methane vector" for rapid and high cell density cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83(4): 669-677.
- [33] Avalos RA, Jones JP, Heitz M. Methane treatment in biotrickling filters packed with inert materials in presence of a non-ionic surfactant. J Chem Technol Biotechnol, 2012, 87(6): 848-853.
- [34] Veraart AJ, Garbeva P, Van Beersum F, et al. Living apart together-bacterial volatiles influence

- methanotrophic growth and activity. *ISME J*, 2018, 12(4): 1163-1166.
- [35] 负娟莉, 王艳芬, 张洪勋. 好氧甲烷氧化菌生态学研究进展. *生态学报*, 2013, 33(21): 6774-6785.  
Yun JL, Wang YF, Zhang HX. Ecology of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs). *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(21): 6774-6785 (in Chinese).
- [36] Liptay K, Chanton J, Czepiel P, et al. Use of stable isotopes to determine methane oxidation in landfill cover soils. *J Geophys Res*, 1998, 103(D7): 8243-8250.
- [37] Chanton J P, Powelson D K, Green R B. Methane oxidation in landfill cover soils, is a 10% default value reasonable? *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(2): 654-663.
- [38] Barlaz MA, Green RB, Chanton JP, et al. Evaluation of a biologically active cover for mitigation of landfill gas emissions. *Environ Sci Technol*, 2004, 38(18): 4891-4899.
- [39] Rose JL, Mahler CF, Izzo RLDS. Comparison of the methane oxidation rate in four media. *Rev Bras Ciênc Solo*, 2012, 36(3): 803-812.
- [40] Zhang HH, Yan XF, Cai BC, et al. The effects of aged refuse and sewage sludge on landfill CH<sub>4</sub> oxidation and N<sub>2</sub>O emissions: roles of moisture content and temperature. *Ecol Eng*, 2015, 74: 345-350.
- [41] Einola J, Sormunen K, Lensu A, et al. Methane oxidation at a surface-sealed boreal landfill. *Waste Manag*, 2009, 29(7): 2105-2120.
- [42] Pawłowska M, Rozej A, Stepniewski W. The effect of bed properties on methane removal in an aerated biofilter—model studies. *Waste Manag*, 2011, 31(5): 903-913.
- [43] Tanthachoon N, Chiemchaisri C, Chiemchaisri W, et al. Methane oxidation in compost-based landfill cover with vegetation during wet and dry conditions in the tropics. *J Air Waste Manag Assoc*, 2008, 58(5): 603-612.
- [44] Yang T, Sun WJ, Yue DB. Characterizing the effects of biologically active covers on landfill methane emission flux and bio-oxidation. *J Environ Eng*, 2017, 143(9): 04017059.
- [45] Lee YY, Jung H, Ryu HW, et al. Seasonal characteristics of odor and methane mitigation and the bacterial community dynamics in an on-site biocover at a sanitary landfill. *Waste Manag*, 2018, 71: 277-286.
- [46] Scheutz C, Cassini F, De Schoenmaecker J, et al. Mitigation of methane emissions in a pilot-scale biocover system at the AV Miljø Landfill, Denmark: 2. Methane oxidation. *Waste Management*, 2017, 63: 203-212.
- [47] Olivier B, Isabelle Z, A. Huyard, et al. Passive biomitigation of diffuse landfill gas emissions on 12 french landfills: return of experience on design criteria used. 15th International Waste Management and Landfill Symposium, October, 2015, Cagliari, Italy. *ineris-01862561*
- [48] Pecorini I, Rossi E, Iannelli R. Mitigation of methane, NMVOCs and odor emissions in active and passive biofiltration systems at municipal solid waste landfills. *Sustainability*, 2020, 12(8): 3203.
- [49] Dever S, Swarbrick GE, Stuetz RM. Handbook for the design, construction, operation, monitoring and maintenance of a passive landfill gas drainage and biofiltration system. 1st ed. Sydney: Department of Environment, Climate Change and Water NSW, 2010, 32-44.
- [50] Scheutz C, Kjeldsen P, Bogner JE, et al. Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. *Waste Manag Res*, 2009, 27(5): 409-455.
- [51] Gebert J, Röwer IU, Scharff H, et al. Can soil gas profiles be used to assess microbial CH<sub>4</sub> oxidation in landfill covers? *Waste Manag*, 2011, 31(5): 987-994.
- [52] Turgeon N, Le Bihan Y, Buelna G, et al. Application of methanotrophic biofilters to reduce GHG generated by landfill in Quebec City (Canada) Air Pollution XIX. September 19-21, 2011. Malta. Southampton, UK: WIT Press, 2011: 387-397.
- [53] Fjølsted L, Scheutz C, Christensen AG, et al. Biofiltration of diluted landfill gas in an active loaded open-bed compost filter. *Waste Manag*, 2020, 103: 1-11.
- [54] Kim TG, Jeong SY, Cho KS. Characterization of tobermorite as a bed material for selective growth of methanotrophs in biofiltration. *J Biotechnol*, 2014, 173: 90-97.
- [55] Streesse J, Stegmann R. Potentials and limitations of biofilters for methane oxidation. 10th International Waste Management and Landfill Symposium, October 5-9, 2005, Santa Margherita di Pula, Sardinia. CISA.
- [56] Gómez-Cuervo S, Hernández J, Omil F. Identifying the limitations of conventional biofiltration of diffuse methane emissions at long-term operation. *Environ Technol*, 2016, 37(15): 1947-1958.
- [57] Plessis CAD, Strauss JM, Sebapalo EMT, et al. Empirical model for methane oxidation using a composted pine bark biofilter. *Fuel*, 2003, 82(11): 1359-1365.
- [58] La H, Hettiaratchi JPA, Achari G, et al. Biofiltration of

- methane using hybrid mixtures of biochar, lava rock and compost. *Environ Pollut*, 2018, 241: 45-54.
- [59] Rene ER, Veiga MC, Kennes C. *Air Pollution Prevention and Control: Biofilters*. 1st ed. Hoboken: Wiley Online Library, 2013: 57-119.
- [60] Su S, Beath A, Guo H, et al. An assessment of mine methane mitigation and utilisation technologies. *Prog Energy Combust Sci*, 2005, 31(2): 123-170.
- [61] Sly LI, Bryant LJ, Cox JM, et al. Development of a biofilter for the removal of methane from coal mine ventilation atmospheres. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 39(3): 400-404.
- [62] Nikiema J, Bibeau L, Lavoie J, et al. Biofiltration of methane: an experimental study. *Chem Eng J*, 2005, 113(2/3): 111-117.
- [63] Limbri H, Gunawan C, Thomas T, et al. Coal-packed methane biofilter for mitigation of green house gas emissions from coal mine ventilation air. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94641.
- [64] 江皓. 甲烷氧化混合菌群的富集培养及其治理瓦斯工艺研究[D]. 北京: 清华大学, 2010.  
Jiang H. Enrichment culture of mixed methanotrophic community and its application in coal mine gas control[D]. Beijing: Tsinghua University, 2010 (in Chinese).
- [65] Karthikeyan OP, Chidambarampadmavathy K, Nadarajan S, et al. Influence of nutrients on oxidation of low level methane by mixed methanotrophic consortia. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(5): 4346-4357.
- [66] Ruiz-Ruiz P, Gómez-Borraz TL, Revah S, et al. Methanotroph-microalgae co-culture for greenhouse gas mitigation: effect of initial biomass ratio and methane concentration. *Chemosphere*, 2020, 259: 127418.
- [67] Lebrero R, López JC, Lehtinen I, et al. Exploring the potential of fungi for methane abatement: performance evaluation of a fungal-bacterial biofilter. *Chemosphere*, 2016, 144: 97-106.
- [68] Bjorck CE, Dobson PD, Pandhal J, et al. Biotechnological conversion of methane to methanol: evaluation of progress and potential. *AIMS Bioeng*, 2018, 5(1): 1-38.
- [69] Hogendoorn C, Pol A, Nuijten GHL, et al. Methanol production by "*Methylococcus* *fumarolicum*" SolV under different growth conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(18): e01188-20.
- [70] Ge X, Yang L, Sheets JP, et al. Biological conversion of methane to liquid fuels: status and opportunities. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(8): 1460-1475.
- [71] Sheets JP, Ge X, Li YF, et al. Biological conversion of biogas to methanol using methanotrophs isolated from solid-state anaerobic digestate. *Bioresour Technol*, 2016, 201: 50-57.
- [72] Hur DH, Na JG, Lee EY. Highly efficient bioconversion of methane to methanol using a novel type I *Methylomonas* sp. DH-1 newly isolated from brewery waste sludge. *J Chem Technol Biotechnol*, 2017, 92(2): 311-318.
- [73] Duan C, Luo M, Xing X. High-rate conversion of methane to methanol by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Bioresour Technol*, 2011, 102(15): 7349-7353.
- [74] Patel SKS, Mardina P, Kim D, et al. Improvement in methanol production by regulating the composition of synthetic gas mixture and raw biogas. *Bioresour Technol*, 2016, 218: 202-208.
- [75] Listewnik HF, Wendlandt KD, Jechorek M, et al. Process design for the microbial synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from natural gas. *Eng Life Sci*, 2007, 7(3): 278-282.
- [76] PHA: A biopolymer whose time has finally come [EB/OL]. [2019-09-08], <https://cen.acs.org/business/biobased-chemicals/PHA-biopolymer-whose-time-finally/97/i35>
- [77] Company | Newlight[EB/OL]. [2020-11-21]. <https://www.newlight.com/company>.
- [78] Rostkowski KH, Pfluger AR, Criddle CS. Stoichiometry and kinetics of the PHB-producing type II methanotrophs *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis parvus* OBBP. *Bioresour Technol*, 2013, 132: 71-77.
- [79] Ghoddosi F, Golzar H, Yazdian F, et al. Effect of carbon sources for PHB production in bubble column bioreactor: emphasis on improvement of methane uptake. *J Environ Chem Eng*, 2019, 7(2): 102978.
- [80] Rahnama F, Vasheghani-Farahani E, Yazdian F, et al. PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor. *Biochem Eng J*, 2012, 65: 51-56.
- [81] 张婷婷. 甲烷氧化菌及混合菌群利用甲烷合成聚羟基烷酸酯的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2017.  
Zhang TT. Polyhydroxyalkanoates production from methane by methanotrophs and mixed communities[D]. Dalian, China: Dalian University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [82] Pérez R, Cantera S, Bordel S, et al. The effect of temperature during culture enrichment on methanotrophic polyhydroxyalkanoate production. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2019, 140: 144-151.

- [83] Zúñiga C, Morales M, Le Borgne S, et al. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. J Hazard Mater, 2011, 190(1/2/3): 876-882.
- [84] Anupama, Ravindra P. Value-added food: single cell protein. Biotechnol Adv, 2000, 18(6): 459-479.
- [85] Erdman MD, Bergen WG, Reddy CA. Amino acid profiles and presumptive nutritional assessment of single-cell protein from certain lactobacilli. Appl Environ Microbiol, 1977, 33(4): 901-905.
- [86] 顾华兵, 沈阳, 周淑鑫, 等. 甲烷氧化菌的分离鉴定及其发酵条件优化. 贵州大学学报(自然科学版), 2019, 36(6): 22-25.  
Gu HB, Shen Y, Zhou SX, et al. Isolation, identification of methanotrophic bacteria and optimization of its fermentation conditions. J Guizhou Univ (Nat Sci Ed), 2019, 36(6): 22-25 (in Chinese).
- [87] 孙立瑞, 辛嘉英, 邓晓萍. 甲烷氧化菌与光合菌协同培养高产单细胞蛋白. 饲料研究, 2019, 42(11): 64-69.  
Sun LR, Xin JY, Deng XP. The production of single cell protein by methanotrophs and photosynthetic bacteria co-culture. Feed Res, 2019, 42(11): 64-69 (in Chinese).
- [88] 汤玉平, 许科伟, 顾磊, 等. 油气微生物勘探理论与技术研究进展. 石油实验地质, 2021, 43(2): 325-334.  
Tang YP, Xu KW, Gu L, et al. Recent progress in the theory and technology of microbial prospecting for oil and gas. Petroleum Geol Exp, 2021, 43(2): 325-334 (in Chinese).
- [89] 汤玉平, 顾磊, 许科伟, 等. 油气微生物勘探机理及应用. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2386-2395.  
Tang YP, Gu L, Xu KW, et al. Research and application of microbial exploration for oil and gas. Microbiol China, 2016, 43(11): 2386-2395 (in Chinese).
- [90] 袁志华, 梅博文, 余跃惠, 等. 二连盆地马尼特坳陷天然气微生物勘探. 天然气地球科学, 2004, 15(2): 162-165.  
Yuan ZH, Mei BW, She YH, et al. Microbial prospecting for gas in manite depression of erlian basin. Nat Gas Geosci, 2004, 15(2): 162-165 (in Chinese).
- [91] 袁志华, 张杨, 王石头, 等. 湖北松滋油气田天然气微生物勘探. 天然气工业, 2008, 28(8): 28-31, 136.  
Yuan ZH, Zhang Y, Wang ST, et al. Microbiological gas exploration in the Songzi field, Hubei in China. Nat Gas Ind, 2008, 28(8): 28-31, 136 (in Chinese).
- [92] 张春林, 庞雄奇, 梅海, 等. 微生物油气勘探技术在岩性气藏勘探中的应用——以柴达木盆地三湖坳陷为例. 石油勘探与开发, 2010, 37(3): 310-315.  
Zhang CL, Pang XQ, Mei H, et al. Application of microbial oil surveying to exploration of lithologic gas reservoirs: a case from the Sanhu Depression, Qaidam Basin, NW China. Petroleum Explor Dev, 2010, 37(3): 310-315 (in Chinese).
- [93] Rasheed MA, Patil DJ, Dayal AM. Microbial techniques for hydrocarbon exploration. Hydrocarbon. Chaper 9: InTech, 2013.
- [94] Rasheed MA, Lakshmi M, Kalpana MS, et al. Geo-microbial and geochemical evidences in the near surface soils of Jamnagar sub-basin, Saurashtra, Gujarat, India: implications to hydrocarbon resource potential. Geosci J, 2012, 16(4): 455-467.
- [95] Rasheed MA, Lakshmi M, Srinu D, et al. Bacteria as indicators for finding oil and gas reservoirs: a case study of the Bikaner-Nagaur basin, Rajasthan, India. Petroleum Sci, 2011, 8(3): 264-268.
- [96] Lakshmi M, Rasheed MA, Madhavi T, et al. Geochemical exploration for hydrocarbons in the soils of southeast of Krishna-Godavari basin, Andhra Pradesh. J Geol Soc India, 2012, 80(5): 641-652.
- [97] Snehal N, Marina GK. Methanotrophs: Diversity, Physiology, and Biotechnological Potential of Halo(alkali)philic Methane-Consuming Bacteria. Cham: Springer International Publishing, 2019: 139-162.
- [98] Karthikeyan OP, Chidambarampadmavathy K, Cirés S, et al. Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production. Crit Rev Environ Sci Technol, 2015, 45(15): 1579-1610.
- [99] Rhee SK, Awala SI, Nguyen NL. Methanotrophs: Enrichment and Isolation of Aerobic and Anaerobic Methanotrophs 1st ed. Cham; Springer International Publishing, 2019: 39-69.
- [100] Dedysh SN, Khmelenina VN, Suzina NE, et al. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from *Sphagnum* bog. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(Pt 1): 251-261.
- [101] Chidambarampadmavathy K, Karthikeyan OP, Heimann K. Biopolymers made from methane in bioreactors. Eng Life Sci, 2015, 15(7): 689-699.

(本文责编 郝丽芳)