

研究报告

## 基于 *mcrA* 基因的沁水盆地煤层气田产甲烷菌群与途径分析

杨秀清<sup>1\*</sup> 吴瑞薇<sup>1</sup> 韩作颖<sup>2,3</sup> 王保玉<sup>2,3</sup>

(1. 山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西 太原 030006)

(2. 煤与煤层气共采国家重点实验室 山西 晋城 048000)

(3. 易安蓝焰煤与煤层气共采技术有限责任公司 山西 晋城 048000)

**摘要:**【目的】分析沁水盆地煤层气田不同煤层气井产出水样中产甲烷菌群和生物成因气的生成途径。【方法】以甲基辅酶 M 还原酶基因(*mcrA*)作为目标基因, 采用 454 焦磷酸高通量测序方法, 同时比对 NCBI 功能基因文库中的 *mcrA* 序列, 分析不同煤层气井产出水中的产甲烷菌群。【结果】高通量测序表明, 5 个出水样产甲烷菌群 OTUs (Operational taxonomic units) 数为 64–157 个, 共有的为 22 个, 各占样品总数 14%–34%; 样品共检测到 4 种已知菌属, 即甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)、甲烷微菌属(*Methanomicrobium*)、甲烷叶菌属(*Methanolobus*)和甲烷螺菌属(*Methanospirillum*), 优势菌属均为 *Methanobacterium*。系统发育分析表明, 未明确地位的菌属主要与 *Methanobacterium*、*Methanomicrobium*、产甲烷球菌属(*Methanococcus*)和甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)有较近的亲缘关系。5 个样品中菌属所占比例不同, 检测到的菌属类别大致相同。所有检测样品生物成因煤层气(Coalbed methane, CBM)的生成途径主要为氢营养型产甲烷途径。

【结论】沁水盆地不同煤层气田产甲烷菌群菌种差异比较大, 但生物成因气生成途径基本相似, 与地理位置和煤藏条件没有相关性。

**关键词:** 沁水盆地, 煤层气(CBM), *mcrA* 基因, 高通量测序, 氢营养型

**Foundation item:** Natural Science and CBM Joint Foundation of Shanxi Province (No. 2015012002); Key Scientific and Technological Project of Shanxi Province (No. MQ2014-03)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-351-7010215; E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

**Received:** December 27, 2016; **Accepted:** January 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 20, 2017

基金项目: 山西自然科学基金与煤层气联合基金会项目(No. 2015012002); 山西省重点科技攻关项目(No. MQ2014-03)

**\*通讯作者:** Tel: 86-351-7010215; E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-27; 接受日期: 2017-01-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-20

## Analysis of methanogenic community and pathway of coalbed methane fields in the Qinshui Basin based on *mcrA* gene

YANG Xiu-Qing<sup>1\*</sup> WU Rui-Wei<sup>1</sup> HAN Zuo-Ying<sup>2,3</sup> WANG Bao-Yu<sup>2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

(2. State Key Laboratory of Coal and CBM Co-mining, Jincheng, Shanxi 048000, China)

(3. Yi'an Lanyan Coal and Coal-bed Methane Simultaneous Extraction Technology Co., Ltd, Jincheng, Shanxi 048000, China)

**Abstract:** [Objective] To analyse methanogenic community and the pathway of biogenic methane in the formation water from coalbed methane (CBM) wells in the Qinshui Basin. [Methods] Based on the methyl coenzyme-M reductase (*mcrA*) gene, the diversity of methanogens from different CBM wells formation water were investigated by 454 pyrosequencing and aligning *mcrA* sequences from NCBI functional genes library. [Results] The high-throughput sequencing indicated that the numbers of OTUs (Operational taxonomic units) were 64 to 157 in five detected methanogens communities, only 22 OTUs were identical in all samples, which accounted for 14% to 34% in each sample. According to the alignment results of high-throughput sequencing data and *mcrA* library, four genera were detected in five formation water, including *Methanobacterium*, *Methanomicrobium*, *Methanobolus* and *Methanospirillum*, the dominant genus was *Methanobacterium*. Phylogenetic analysis indicated that the majority of unidentified genera were closely related to *Methanobacterium*, *Methanomicrobium*, *Methanococcus* and *Methanoculleus*. Although the percentage of methanogens was different in five sample, the detected genera were about the same. The hydrogenotrophic methanogenesis was main pathway of methane formation in the Qinshui Basin. [Conclusion] The methanogens species were obvious different in different CBM blocks of the Qinshui Basin. However, methanogenesis pathways were similar and had no correlation with the geographical location and reservoir conditions.

**Keywords:** Qinshui Basin, Coalbed methane (CBM), *mcrA* gene, High-throughput sequencing, Hydrogenotrophic

自工业革命以来,煤作为一种广泛的资源应用于许多方面,世界总的化石燃料约有 71.4%以煤的形式储藏<sup>[1]</sup>。煤层气(CBM)是在煤层中以自生自储形式存在的一种非常规天然气<sup>[2]</sup>,其主要成分为甲烷。CBM 在煤化作用下的形成机制有两种,即热成因和生物成因,热成因主要受煤阶和煤层深度控制;生物成因则由多种因素调控,如盐度、微生物的可利用性、煤的渗透性、物化特性等,而微生物被认为是生物成因煤层气形成的关键因素<sup>[3-6]</sup>。CBM 作为一种非常规的新型清洁能源,近年来受到国内外许多研究学者的关注,尤其是生物成因煤层气的开采和利用,为已有煤层气田的可持续利用提供了有力的事实依据。已有研究报道,在实验室模拟及煤层气田,通过微生物分子

生态学分析微生物群落,同时利用生物添加和生物刺激促进煤的生物转化,从而产生生物气<sup>[7-8]</sup>,这些研究将有助于解析生物成因气的形成机理。研究上述问题的首要任务是明确微生物群落中由哪些微生物参与煤的生物降解。

2007 年始,Shimizu 等首次报道了煤层气田的微生物多样性,其选择日本北海道煤层气田产出水为研究对象,通过 16S rRNA 基因文库的构建解析了产出水中细菌和古菌群落多样性<sup>[9]</sup>。随着微生物分子生态学的发展,煤层气田产出水和煤中微生物多样性的表征有了很大的突破,有通过系统发育研究煤层气田相关微生物多样性的,如构建 16S rRNA 基因文库,例如以烟煤为主的美国伊利诺斯州盆地<sup>[10]</sup>、含褐煤煤层的加拿大西部<sup>[11]</sup>和亚

烟煤为主的美国粉河盆地<sup>[12]</sup>;也有通过克隆文库的构建同时结合实时荧光定量 PCR 对古细菌总细胞数定量来分析微生物群落多样性的<sup>[13]</sup>;还有采用 PCR-DGGE 指纹技术对微生物群落直观快速检测的<sup>[14]</sup>,这些方法均有不同程度的局限性。高通量测序技术由于具有数据容量大,从而弥补了上述手段的不足,该技术有助于更加全面地解析微生物群落组成,成为研究者的首选。

甲基辅酶 M 还原酶(MCR)是甲烷生产所必需的酶,它催化甲烷生成的最后一步,还原一个甲基基团连接到辅酶 M 形成甲烷,这种酶在所有已知的产甲烷菌中被发现<sup>[15]</sup>。MCR 操作子有两种形式:MCR I 编码 *mcrA* 基因, MCR II 编码 *mcrB* 基因, MCR I 出现在所有的产甲烷菌中, MCR II 仅在甲烷杆菌目(Methanobacteriales)和甲烷球菌目(Methanococcales)中发现<sup>[16]</sup>。因此 *mcrA* 基因常被用作一个特异的功能基因用于定量产甲烷菌。根据甲烷生成过程中产甲烷菌所利用的代谢底物类型,可将产甲烷菌分成 3 个营养型,即氢营养型、甲基营养型和乙酸营养型<sup>[17]</sup>。从 2008 年开始, *mcrA* 基因开始被用作靶标研究环境微生物的多样性,如沉积水、淤泥、沼气池和少量的煤气田中。如 Guo 等在研究高阶煤层甲烷古菌多样性时,采用 *mcrA* 基因克隆文库法<sup>[18]</sup>,分析两口煤层气井出水样的微生物。在 Guo 等的报道中,所有的克隆子均属于 *Methanobacterium*,菌群结构单一,没有挖掘出其他已命名的甲烷古菌或是未鉴定的菌属。该研究没有从 *mcrA* 基因的角度全面揭示高阶煤地质环境的甲烷古菌,使理解煤层甲烷的生物成气机理受到一定的限制。所以基于 *mcrA* 基因,全面地认识煤地质甲烷菌群及其组成就显得尤为必要。

在本研究中,我们以山西沁水盆地煤层气田为研究对象,该地区为典型的高煤阶区域,也是我国煤层气田开采最为活跃的地方。实验从寺河(SH)和亚行(YH)两个矿区取样,基于 *mcrA* 功能基因,采用 454 焦磷酸高通量测序检测不同煤层气井

产出水中的产甲烷菌。在煤层气田产气微生物研究中,很少利用 *mcrA* 基因进行高通量测序分析来表征产甲烷菌群结构特征,本文为生物成因气相关微生物多样性的研究在方法和全面深入理解生物成气机理方面提供了可参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

产出水样品的采集在产气井的排水口完成。实验采集了 5 口煤层气井中的出水样,分别是 SHX-181、SHJM-30、SHX-203、YH13-24 和 ZXCC-09,井位示意图如图 1 所示。为方便标记,依次编号为 A、B、C、D 和 E,其中,A、B、C 和 E 来自于同一矿区,即寺河;样品 D 取自亚行。产出水首先由煤层气生产设备通过钢管从井下采抽到地面,由排水口排出,同时为防止空气及钢管的污染,在采集水样前,不断抽取产出水 3 d 以上,然后将水样收集在 5 L 的无菌样品桶中,水样灌满排除桶内空气,用橡胶塞封紧瓶口,最后将收集好的水样放置在冰上,快速运回实验室。将收集的产出水样品用 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤器(Millipore, USA)无菌过滤,在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存用于基因组 DNA 的提取。

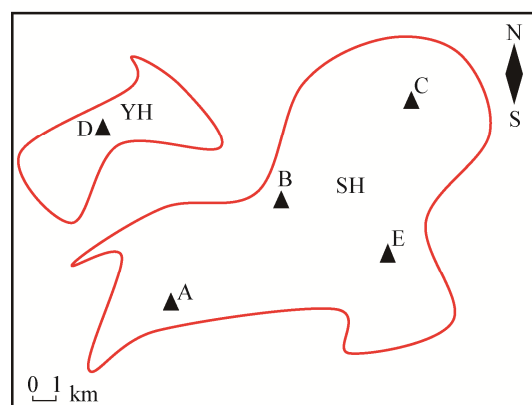


图 1 取样井位示意图

Figure 1 Location of wells providing samples for study of the formation water

注:A、B、C 和 E 样品属于寺河矿区,D 样品属于亚行矿区。

Note: The A, B, C and E water samples from the SH block, sample D was collected from YH block.

## 1.2 主要试剂和仪器

胶回收试剂盒, 中科瑞泰(北京)生物科技有限公司; 蛋白酶 K, 生工生物工程股份有限公司; SDS, 北京索莱宝科技有限公司; DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司。0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤器, 美国 Millipore; 机械振荡器 Mini-Bead Beater, BioSpec Products, USA; PCR 仪, 美国伯乐公司 PTC-200 型(PTC-200, Bio-Rad, USA); 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司(BioTek, USA)。

## 1.3 煤层出水样基因组 DNA 的提取

为了分析不同位点井产出水的产甲烷菌群结构变化, 5 口井的产出水样 DNA 被提取。由于煤层水样中成分复杂, 腐殖酸、吸附性颗粒物等有影响, 为得到高质量的基因组 DNA, 对提取方法进行优化。在基因组的提取过程中, 细胞破碎为关键步骤, 实验采用机械破碎、化学破碎与酶解法相结合的破碎方法得到了较高质量的基因组。首先将附有出水菌体的滤膜剪碎, 置于 10 mL STE 缓冲液中(1 L STE 缓冲液的配制: NaCl 60 g, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L EDTA); 然后将含有菌体的缓冲液移入装有 0.6 g 玻璃珠的预冷螺旋帽管中, 用 Mini-Bead Beater (MBB)对菌体进行破碎, 重复 2–3 次, 每次 2 500 r/min 离心 30 s。重复过程中每次将上清液移至新的 EP 管后, 再向螺旋帽管中加满 STE 缓冲液, 破碎后将上清与之前的上清液合并; 再次加入蛋白酶 K 和 SDS 继续对菌体进行消化; 之后按常规步骤进行基因组 DNA 的抽提、纯化及沉淀; 最后加入超纯水溶解沉淀即可得到微生物总 DNA。为验证提取的 DNA 大小及完整性, 在 0.7%的琼脂糖凝胶中检测提取的基因组 DNA, 并通过酶标仪测定其浓度以验证提取质量和纯度。

## 1.4 基于 *mcrA* 基因片段的扩增

用提取的基因组 DNA 作为模板, 采用通用引物 *mcrA*-f/*mcrA*-r<sup>[19]</sup> 进行片段扩增, 大约 464–491 bp。PCR 扩增体系: 10×Easy Taq buffer

5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物各 2  $\mu\text{L}$ , Easy Taq polymerase 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 最后用水补至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 循环 35 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物在 1% (质量体积比) 的琼脂糖凝胶中检测目标片段长度, 以验证 PCR 的正确性, 随后用胶回收试剂盒对目的产物进行纯化, 具体步骤则参照说明书。最后将纯化后的产物进行 Roche 454 FLX 高通量测序。

## 1.5 高通量测序的数据处理

**1.5.1 *mcrA* 的 454 高通量测序数据处理:** 样品测序完成后, 首先运用 Qiime (version 1.7.0, <http://qiime.org/>)进行序列过滤, 然后运用 Mothur 软件(version 1.31.2, <http://www.mothur.org/>)对有效序列进行进一步过滤和去除嵌合体处理, 从而得到优质序列进行进一步分析, 在 Qiime 中调用 Uclust 的方法对优质序列按序列相似度 0.97 进行聚类, 选取每个类中最长的序列为代表序列, 为了保证分析结果的准确性, 进一步对 OTUs (Operational taxonomic units)进行精简处理, 精简标准为去掉丰度值小于总的序列条数 0.001%的 OTUs, 也可将序列通过 Mothur 软件计算微生物  $\alpha$  多样性及稀释分析等。

**1.5.2 丰度分析:** 基于高通量测序获得的读长数 (Reads), 同一菌属的 Reads 数总和与样品总的 Reads 数之比, 即该菌属在样品中的丰度百分比。

## 1.6 系统发育分析

结合高通量测序结果, 选取 OTU 的代表序列构建系统发育树。每一类菌属中, 取每个样品中已知菌属序列和未知菌属序列中读长数较多的作为代表序列; 同时为了对未知菌属的分类地位进行分析, 从 GenBank 中选取具有代表性的 12 种产甲烷菌的 *mcrA* 基因序列作为参考序列进行系统发育分析。然后通过 Clustal 软件进行多序列比对, 最后运用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建 *mcrA* 功能基因的系统发育树, 1 000 次重复的自展值(Bootstrap)分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 含量的测定

应用分子生物学的方法对环境微生物群落多样性进行全面解析的最关键一步是样品基因组总 DNA 的提取。样品基因组 DNA 的琼脂糖凝胶检测结果如图 2 所示, 基因组主带完整, 均在 23 kb 附近处。同时对提取的 5 个不同井产出水样的 DNA 用酶标仪进行了浓度和质量测定 结果如表 1 所示, 可以看出所用样品的  $OD_{260}/OD_{280}$  均在 1.6–2.0 之间, 浓度均在 20 mg/L 以上, 能用于后续的相关 PCR 及高通量测序分析。

2.2 高通量测序的序列分析

将所有样品测序完成后, 经过质量监控处理后总共得到 69 891 条优质序列用于后续分析(表 2), 5 个样品的优质序列读长数在 9 389–22 480, 包含

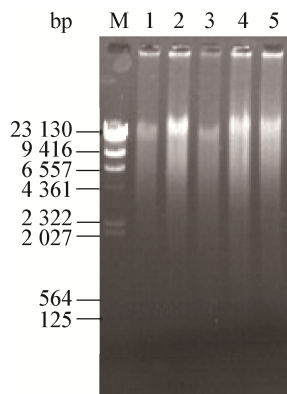


图 2 5 个产出水样基因组 DNA 提取结果  
Figure 2 Genomic DNA in five formation water samples of the Qinshui Basin  
Note: M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 1: Sample D; 2: Sample A; 3: Sample E; 4: Sample C; 5: Sample B.

表 1 样品 DNA 含量测定		
Table 1 The measurement of samples DNA content		
样品编号	OD 值	浓度
Samples ID	$OD_{260}/OD_{280}$	Concentration (mg/L)
A	1.88	172.8
B	1.99	47.4
C	1.93	112.1
D	1.60	38.2
E	1.65	24.8

的 OTU 数目在 64–157 (表 2)。同时对每个样品的优质序列按序列相似度 97%进行 OTU 聚类 and 后续分析。用 Chao 1 指数和 ACE 指数来评估微生物群落的丰富度, Shannon 指数用来表征微生物的多样性, 由表 2 可以看出产甲烷菌群的 Chao 1 指数均高于每个样品检测到的 OTU 数; 样品 D 的 Chao 1、ACE 和 Shannon 指数最大, 即该样品环境中检测到的菌群多样性最大。

2.3 序列号

研究得到的高通量测序结果提交至 NCBI SRA (Sequence read archive) 数据库, 获取的登录号为 SRA495307。

2.4 高通量测序分析产甲烷菌群的结构变化

2.4.1 产甲烷菌群组成分析: 为了分析不同井位产出水样的产甲烷菌群结构变化, 对产甲烷菌群属水平进行了分类分析(图 3)。由图 3A 可以看出, 在样品 A 中检测到的菌属为 *Methanobacterium* (2.63%)、*Methanomicrobium* (0.01%)和 *Methanolobus* (0.06%), 在图 3B 中, 样品 B 的主要优势菌属为 *Methanobacterium* (48.25%),

表 2 高通量测序优质读长数、OTUs 及多样性指数汇总					
Table 2 Summary of reads, operational taxonomic units (OTUs) and diversity estimates					
样品编号	读长数	操作分类单元	Chao 指数	ACE 指数	香农指数
Samples ID	Reads	OTUs	Chao index	ACE index	Shannon index
A	22 480	98	109.333	109.303	2.340
B	9 743	129	177.750	168.192	3.157
C	9 389	64	90.250	87.122	2.415
D	12 629	157	193.250	176.189	4.139
E	15 620	83	93.929	97.481	1.495

注: 序列相似度在 97%以上为一个 OTU。  
Note: The operational taxonomic unit (OTU) was defined with 97% similarity.

其次为 *Methanomicrobium* (0.49%)、*Methanolobus* (0.09%)和 *Methanospirillum* (0.05%) ;样品 D 的产甲烷菌群结构分布如图 3D 所示,相比其他样品而言,该水样被检测到的产甲烷菌属丰度最低,包括 *Methanobacterium* (0.21%) 和 *Methanomicrobium* (0.02%);样品 C 和 E 被检测到的菌属和样品 A 相同(图 3C 和图 3E),主要菌属均为 *Methanobacterium*,所占比例分别为 25.52%和 80.73%。综上所述,可以看出 *mcrA* 功能基因在本研究能检测到的产甲烷菌属主要有 3 种,即 *Methanobacterium*、*Methanomicrobium* 和 *Methanolobus*,它们分别属于 *Methanobacteriales*、甲烷微菌目(*Methanomicrobiales*)和甲烷八叠球菌目(*Methanosarcinales*),且均属于广古菌门(*Euryarchaeota*)。

**2.4.2 基于高通量测序的产甲烷菌群系统发育分析:** 由于 *mcrA* 功能基因文库容量的制约,检测样品中包含很多未知序列,为了更加准确地鉴定群落的产甲烷途径,对所有菌群进行了系统发育分析,如图 4 所示。在已知菌属和未明确分类地位菌属中,选取读长较多的为代表序列,在 A、B、C、D 和 E 5 个样品中分别选取 14、16、12、13 和 14 个 OTUs 的序列,运用 Clustal 软件进行多序列比对后,用 MEGA 5 软件进行系统发育分析。在图 4A 中,未明确地位菌属 A1、A2、A4 和 A7 与 A15 (*Methanobacteriales*)有较近的亲缘关系,A6 与 *Methanococcus aeolicus* (AY354034)有较近的亲缘关系,A3 和 A5 与 *Methanoculleus thermophiles* (AB300783)有较近的亲缘关系。在图 4B 中,未明确地位菌属 B1 和 B5 与 B9 (*Methanobacterium*)有较近的亲缘关系,B2 和 B3 与 B14 (*Methanospirillum*)有较近的亲缘关系;B4 与 *Methanococcus aeolicus* (AY354034)有较近的亲缘关系。其中序列 B6 和 B7 支持率(Bootstrap values)为 38%,序列 B16 与 *Methanospirillum hungatei* (AF414038)支持率为 48%,其可靠性较低。在样品 C 中(图 4C),未明确地位菌属 C1、C2、C3、C5、C6 和 C7 与 C10 (*Methanomicrobium*)有较近的亲缘关系,C4 与

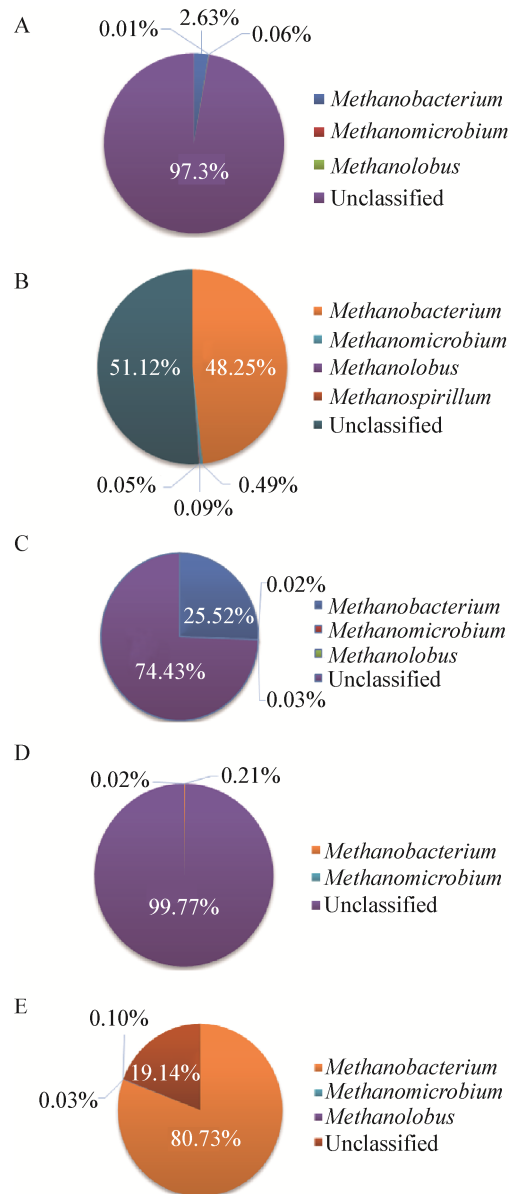


图 3 5 个样品中产甲烷菌群属类水平的微生物组成分布  
Figure 3 Relative abundances of genus level methanogens based on sequencing of *mcrA* gene in five samples  
Note: A: Sample A; B: Sample B; C: Sample C; D: Sample D; E: Sample E.

*Methanococcus aeolicus* (AY354034)有更近的亲缘关系,其中序列 C9 与 *Methanobacterium movens* (HM802934)和 C8 的支持率为 43% 其可靠性较低;在样品 D 中,未明确地位菌属最多,由图 4D 可以看出 D2、D3、D6、D7、D8 和 D9 与 D10 (*Methanomicrobium*)有较近的亲缘关系,D1、D4 和

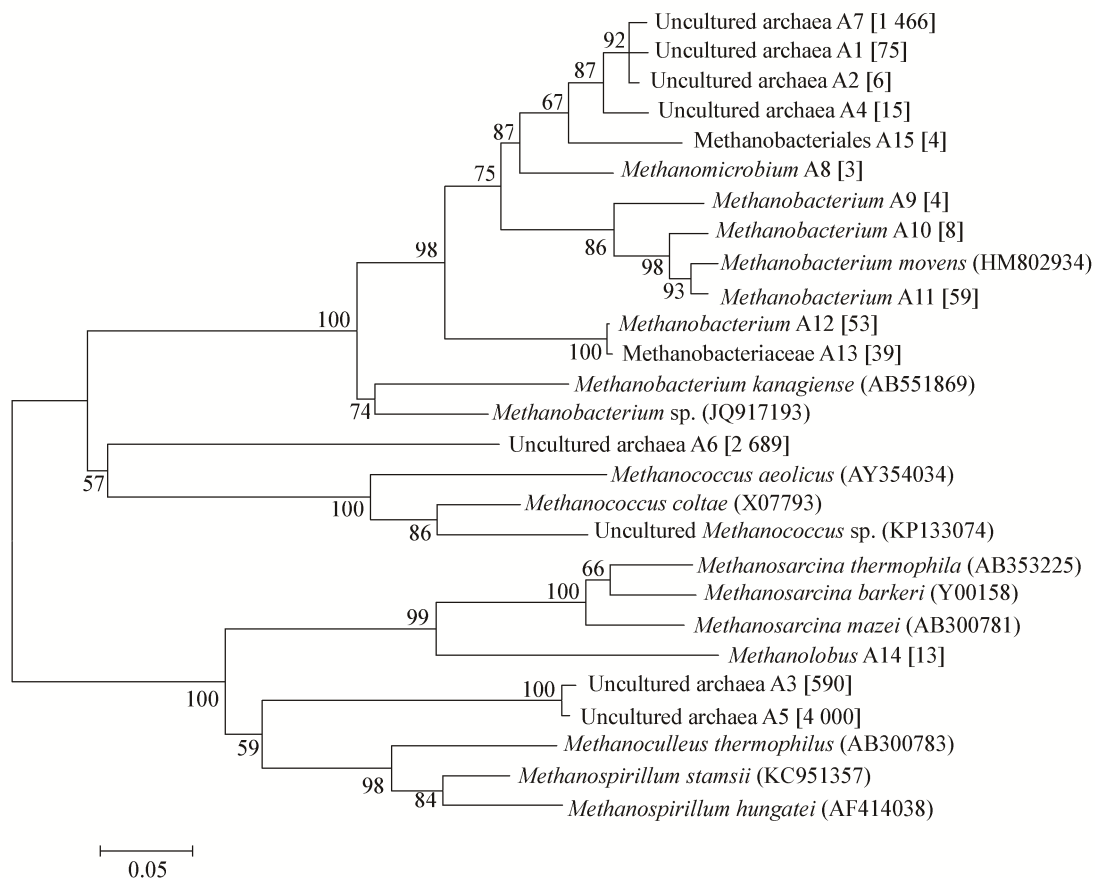


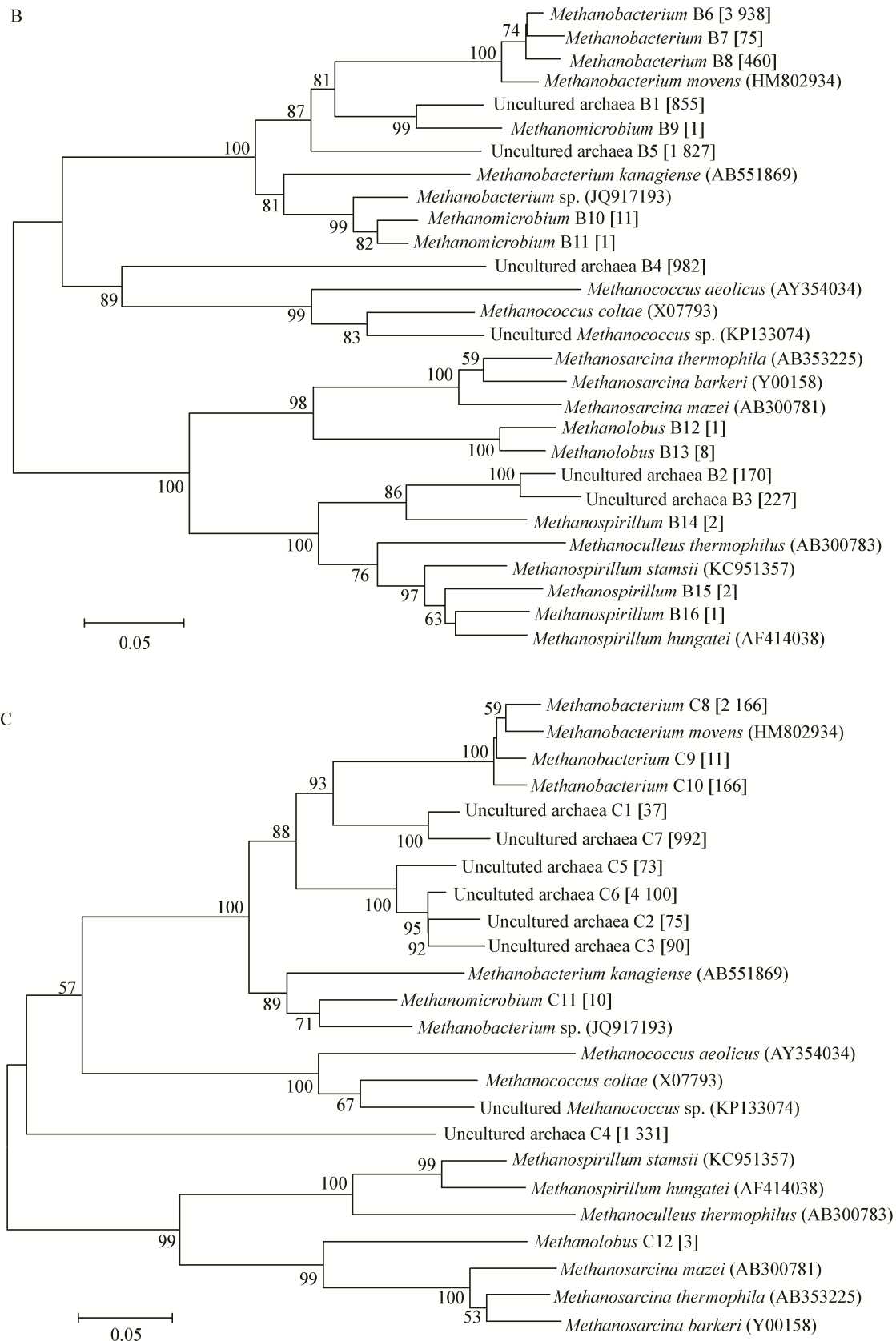
D5 与 *Methanoculleus thermophiles* (AB300783) 有亲缘关系。在样品 E 中, 未明确地位菌属 E1 和 E5 与 E13 (*Methanomicrobium*) 有较近的亲缘关系, E2、E3 和 E4 与 *Methanoculleus thermophiles* (AB300783) 有较近的亲缘关系(图 4E)。从上述数据中可以看出, 不考虑样品来源, 未明确地位菌属主要与 *Methanomicrobium*、*Methanobacterium*、*Methanococcus* 和 *Methanoculleus* 有较近的亲缘关系。

**2.4.3 不同井位产出水产甲烷菌群落差异性分析:** 由于 5 个水样取自不同地点的煤层气井, 为了深入分析不同地点可能引起的产甲烷菌群结构差异, 对 A、B、C、D 和 E 样品进行了 OTUs 韦恩图分析(图 5A)和主成分分析(PCA, 图 5B)。由图 5A 可知, 所

有样品微生物群落总的 OTUs 数为 531 个, 其中共有的为 22 个, 仅占总数的 4.1%, 且共有产甲烷菌属主要为 *Methanobacterium*。同时由图 5B 可以直观地看出, 该图总共解析了 98.49% 的变量, 第一和第二主成分分别代表了 85.41% 和 13.08% 的变量, 两点之间距离越短, 则说明两样品之间的微生物群落差异越小。因此, 样品 B 和 C 群落差异最小, 样品 A、D 和 E 差异较大。由于受 *mcrA* 功能基因数据库的制约, 可鉴定的菌属种类有限, 通过差异性分析很难判定菌属的差异性, 结合获得的已知产甲烷菌属和未鉴定菌属的亲缘分析, 说明 5 个水样中的功能产甲烷菌除菌属所占比例不同外, 检测到的菌属类别大致相同。

A







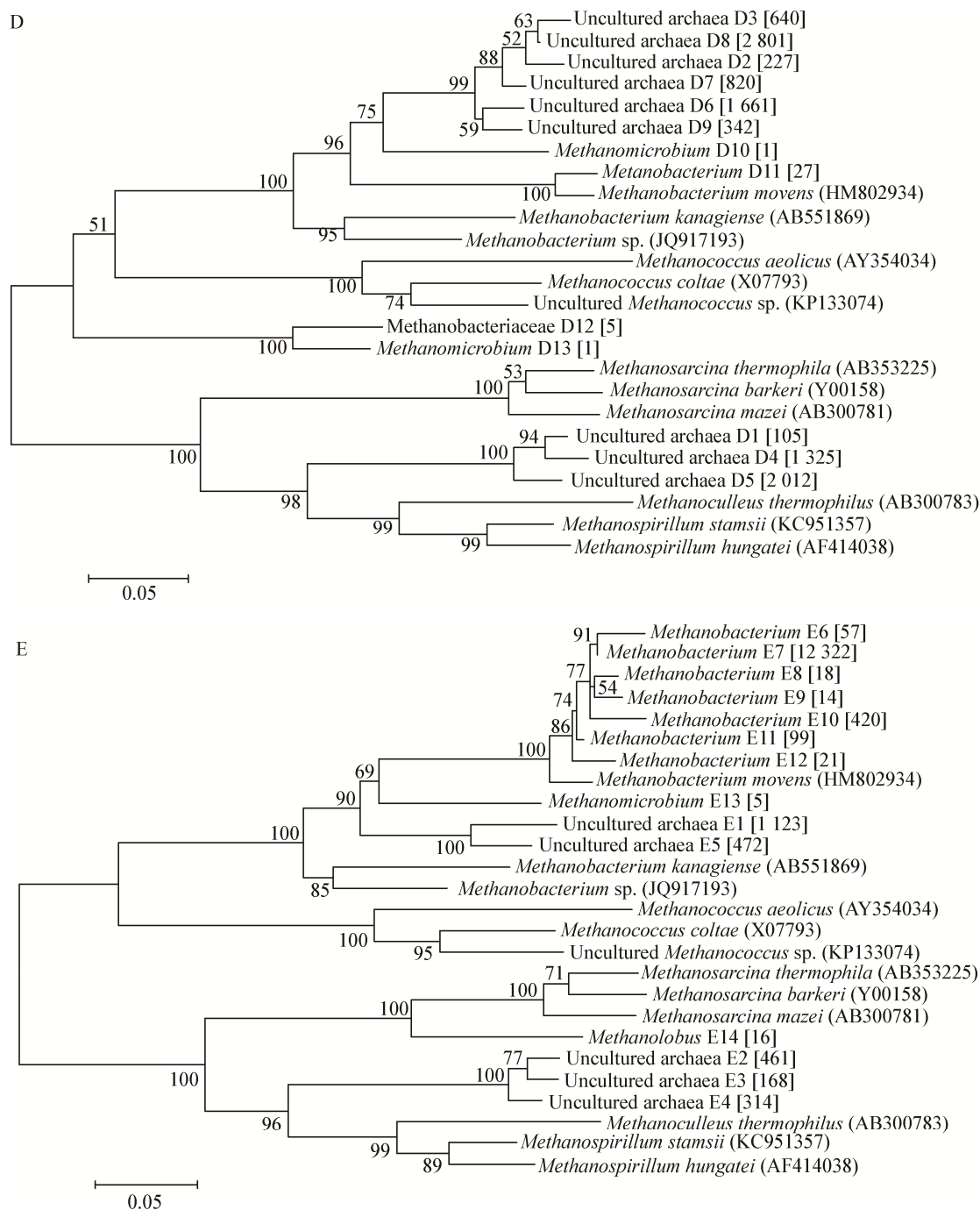


图 4 基于高通量测序的 5 个样品中 *mcrA* 基因序列的系统发育分析

Figure 4 Phylogenetic tree showing relationships of *mcrA* gene sequences obtained from five formation water samples by 454 high-throughput sequencing

注: 通过 454 高通量测序的 *mcrA* 基因序列全部提交至 NCBI SRA, 登录号为 SRA495307; 节点上的数值为自展值(Bootstrap); 低于 50% 的数值(1 000 次重复)没有显示; 比例尺代表有 5% 的序列误差; 圆括号内是在 GenBank 中该菌种部分 *mcrA* 基因序列的登录号; 方括号内是每个样品中该菌属的读长数。

Note: The *mcrA* gene sequences derived from 454 pyrosequencing are deposited in the NCBI SRA (Sequence Read Archive) under accession No. SRA495307; Numbers at the node are the bootstrap values (%); Bootstrap values (1 000 replicates) less than 50% are not shown; The scale bar represents 5% sequence difference; Accession numbers of partial sequences of *mcrA* gene from these genera are shown in parentheses in GenBank; The digital in bracket represents the number of the genus's sequence reads in each sample.

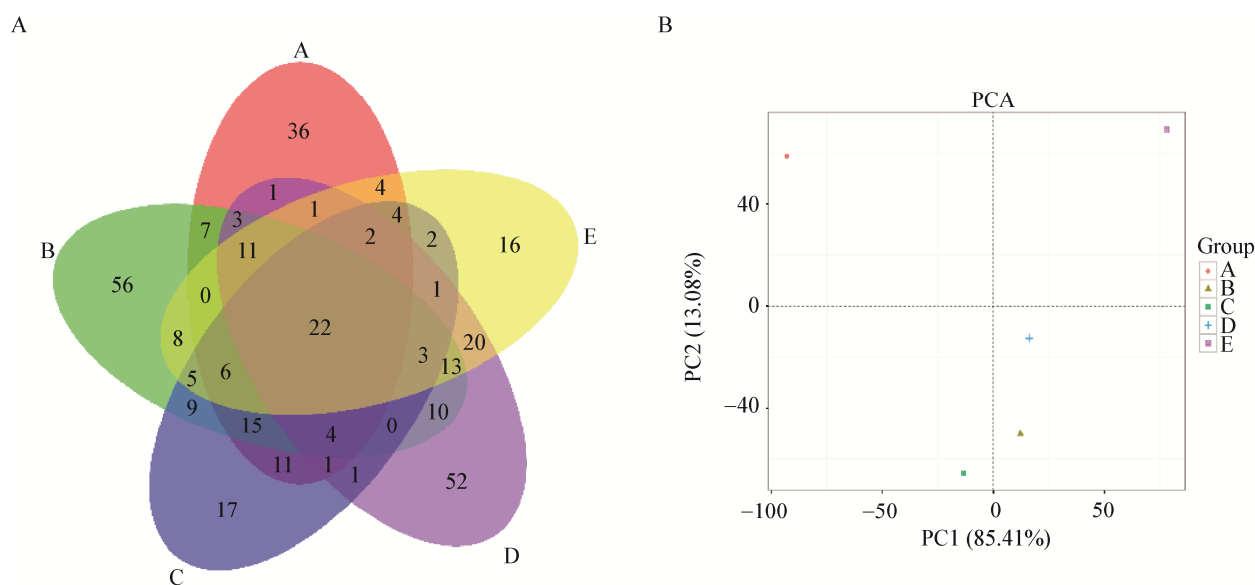


图 5 基于 OTUs 的产出水样产甲烷菌韦恩图和主成分分析

Figure 5 Venn diagram and PCA (principal component analysis) methanogens communities from the formation water based on OTUs

2.4.4 不同井位产出水产甲烷菌丰度相似性聚类分析：为解析不同井位产出水样中检测到的产甲烷菌群丰度相似性，基于 OTUs 的分类，利用 R 软件(Pheatmap)对样品间丰度相似性聚类，将聚类后的数据用 Heatmap 图体现，如图 6 所示，可将高丰度和低丰度的物种分块聚集，通过颜色梯度及相似程度来反映 5 个样品在属类水平上的组成相

似性和差异性。图 6 显示了 *Methanobacterium*、*Methanospirillum*、*Methanolobus* 及未鉴定环境菌属在样品中的丰度分布，样品 A 和 D 未鉴定的产甲烷菌属所占比例较大，检测到的产甲烷菌比例甚少；且所有样品产甲烷菌群结构单一，有相近的同源关系。

### 3 讨论

基因组 DNA 的提取是进行环境分子生物学分析的关键步骤，也是评估微生物多样性的可靠保障。总 DNA 提取得不完整及腐殖酸和蛋白质等对 PCR 的抑制，都会对环境微生物多样性造成偏低的估量<sup>[20]</sup>。煤具有复杂和难降解结构，有机质主要是由缩聚的芳香环、脂环、杂环和各种官能团支链所组成，同时含有腐殖酸等物质，而产出水样中本身又含有煤渣，微生物同时也会吸附在煤颗粒表面。因此该种环境样品微生物的提取和 DNA 的品质保障具有一定的难度。在本研究中，我们通过优化基因组提取过程中细胞破碎这一重要环节，得到了高质量的环境样品总 DNA (图 2)，从而为下一步的实验提供了前提条件。引物对物种的选择性也会对群落多样性的评估有一定的误

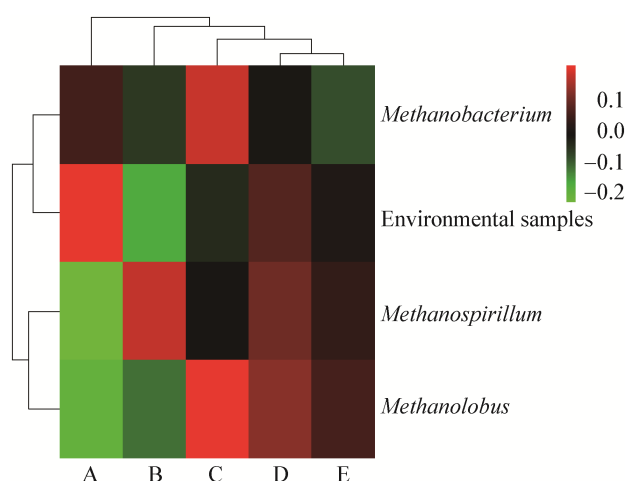


图 6 不同煤层气井产出水样的 Heatmap 图分析

Figure 6 Heatmap of five formation water samples from different CBM wells of the Qinshui Basin

差<sup>[21]</sup>。在本研究中,我们选用了含有简并碱基的 *mcrA* 基因通用引物,该引物能够检测到 5 种主要的产甲烷菌目<sup>[19]</sup>,即 Methanobacteriales、Methanomicrobiales、Methanosarcinales、Methanococcales 和甲烷火菌目(Methanopyrales)。在所有煤层气田相关微生物的研究中,甲烷形成中的功能产甲烷菌也大部分来自 Methanobacteriales、Methanococcales、Methanomicrobiales 和 Methanosarcinales<sup>[22-25]</sup>。此外,*mcrA* 基因作为检测产甲烷菌靶标基因,也多用于一些厌氧颗粒污泥、鸡粪沼气池、芦苇床污泥等厌氧环境中。例如基于 *mcrA* 基因对阿维菌素废水处理工业化 UASB 厌氧颗粒污泥中的产甲烷菌群进行分析时,通过 *mcrA* 基因的 PCR-DGGE 分析得到了 Methanobacteriales 和 Methanosarcinales 两种优势产甲烷种群<sup>[26]</sup>;又如在分析污泥干化芦苇床中的产甲烷菌时,利用 *mcrA* 基因的 PCR-DGGE 和系统发育树分析,表明该污泥样品中主要的产甲烷优势菌属是 *Methanobacterium* 和 *Methanomicrobium*<sup>[27]</sup>。

*mcrA* 基因的高通量测序结果显示,样品 A、C 和 E 均检测到 3 种菌属,即 *Methanobacterium*、*Methanomicrobium* 和 *Methanobrevibacter*, 而且 *Methanobacterium* 在所有样品中所占比例最大。其中 *Methanobacterium* 与 *Methanomicrobium* 为氢营养型<sup>[28-29]</sup>,而 *Methanobrevibacter* 则是典型的甲基营养型产甲烷菌属<sup>[30]</sup>;在样品 B 中,除上述 3 种菌属外,还检测到一种产甲烷菌,即 *Methanospirillum*,该菌属同样是氢营养型的产甲烷菌<sup>[31]</sup>;而样品 D 仅检测到 2 种菌属,*Methanobacterium* 与 *Methanomicrobium*。从产甲烷菌群的系统发育分析(图 4)可以看出,未明确地位菌属主要与 *Methanomicrobium*、*Methanobacterium*、*Methanococcus* 和 *Methanoculleus* 有较近的亲缘关系,*Methanococcus* 通常利用  $H_2+CO_2$ 、甲酸盐生成  $CH_4$ ,而不利用乙酸和甲基胺;*Methanoculleus* 同样不利用乙酸和甲基胺作为生成  $CH_4$  的底物。5 个样品中都检测到了 *Methanobacterium*,这个结果与部分厌氧环境中的甲烷菌较为相似,如在俄罗斯北极永冻土中同样

检测到了 *Methanobacterium*<sup>[26]</sup>;Shlimon 等在海洋沉积物中发现也有 *Methanobacterium* 的存在,并分离得到 *Methanobacterium aarhusense* sp. nov. 菌株<sup>[32]</sup>,同时也有报道在一些煤层气田中,如日本北海道的煤层地下水<sup>[9]</sup>和加拿大西部亚伯达煤层中的煤样<sup>[11]</sup>也发现了 *Methanobacterium*。高通量测序所得的已知菌属和未知菌属的分析结果表明,5 种产出水样的生物成因气生成途径相同,均为氢营养型产甲烷菌占主导地位。与本研究结果较为相似的是,Zhang 等在研究分析美国伊利诺斯州盆地烟煤产出水中的微生物群落组成中,有 89.8% 的产甲烷菌来自于氢营养型的 Methanobacteriales<sup>[10]</sup>;Shimizu 等在日本北海道煤层地下水的研究中,通过构建 16S rRNA 基因克隆文库发现产甲烷菌克隆子主要来自氢营养型的 *Methanoculleus* 和 *Methanobacterium*<sup>[9]</sup>。

同为高煤阶煤出水样微生物分析,Guo 等的研究中<sup>[18]</sup>以 *mcrA* 功能基因建立的文库,在两个样品中仅获得了 30 个阳性克隆子,并且都是同样的种属,即 *Methanobacterium*,而且没有检测出其他已知的和未鉴定的菌属,这与本文的结果有着明显的不同。这可能是由于克隆文库容量制约了其他菌属的发现。本研究除了检测到 *Methanobacterium*,还包括氢营养型的 *Methanomicrobium*、*Methanospirillum*、*Methanococcus* 和 *Methanoculleus*,甲基营养型的 *Methanobrevibacter*,表明无烟煤产甲烷菌成气过程是一个多菌群联合作用,而不是单一菌属来完成的。当然,就产气类型而言,它们都是以氢营养型产甲烷为主。由此可见,以 *mcrA* 功能基因为靶标,有助于更全面地理解生物成气机理。

## 参 考 文 献

- [1] Faison BD. Biological coal conversions[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1991, 11(4): 347-366
- [2] Rightmire CT, Eddy GE, Kirr JN. Coalbed methane resources of the United States[J]. AAPG Studies in Geology, 1984, 17: 1-14
- [3] Formolo M, Martini A, Petsch S. Biodegradation of sedimentary organic matter associated with coalbed methane in the Powder River and San Juan Basins, USA[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76(1/2): 86-97
- [4] Scott AR. Thermogenic and secondary biogenic gases, San Juan Basin, Colorado and New Mexico-implications for coalbed gas producibility[J]. AAPG Bulletin, 1994, 78(8): 1186-1209

- [5] Schimmelmann A, Sessions AL, Mastalerz M. Hydrogen isotopic (D/H) composition of organic matter during diagenesis and thermal maturation[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2006, 34(1): 501-533
- [6] Strapoć D, Mastalerz M, Schimmelmann A, et al. Variability of geochemical properties in a microbially dominated coalbed gas system from the eastern margin of the Illinois Basin, USA[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76(1/2): 98-110
- [7] Jones EJP, Voytek MA, Corum MD, et al. Stimulation of methane generation from nonproductive coal by addition of nutrients or a microbial consortium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7013-7022
- [8] Gupta P, Gupta A. Biogas production from coal via anaerobic fermentation[J]. Fuel, 2014, 118: 238-242
- [9] Shimizu S, Akiyama M, Naganuma T, et al. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan[J]. Geobiology, 2007, 5(4): 423-433
- [10] Zhang J, Liang YN, Pandey R, et al. 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
- [11] Penner TJ, Foght JM, Budwill K. Microbial diversity of western Canadian subsurface coal beds and methanogenic coal enrichment cultures[J]. International Journal of Coal Geology, 2010, 82(1/2): 81-93
- [12] Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, USA[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76(1/2): 34-45
- [13] Meslé M, Périot C, Dromart G, et al. Methanogenic microbial community of the Eastern Paris Basin: potential for energy production from organic-rich shales[J]. International Journal of Coal Geology, 2015, 149: 67-76
- [14] Diaz M, Ladero V, Redruello B, et al. A PCR-DGGE method for the identification of histamine-producing bacteria in cheese[J]. Food Control, 2016, 63: 216-223
- [15] Thauer RK. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson: 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture[J]. Microbiology, 1998, 144(9): 2377-2406
- [16] Springer E, Sachs MS, Woese CR, et al. Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(3): 554-559
- [17] Papendick SL, Downs KR, Vo KD, et al. Biogenic methane potential for Surat Basin, Queensland coal seams[J]. International Journal of Coal Geology, 2011, 88(2/3): 123-134
- [18] Guo HG, Yu ZS, Thompson IP, et al. A contribution of hydrogenotrophic methanogenesis to the biogenic coal bed methane reserves of Southern Qinshui Basin, China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(21): 9083-9093
- [19] Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, et al. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill[J]. Microbiology, 2002, 148(11): 3521-3530
- [20] Han P. Progress in soil DNA extraction[J]. Science and Fortune, 2014(4): 50-51 (in Chinese)  
韩朋. 土壤 DNA 提取研究进展[J]. 科学与财富, 2014(4): 50-51
- [21] Guo HG, Liu RY, Yu ZS, et al. Pyrosequencing reveals the dominance of methylotrophic methanogenesis in a coal bed methane reservoir associated with Eastern Ordos Basin in China[J]. International Journal of Coal Geology, 2012, 93: 56-61
- [22] Susilawati R, Evans PN, Esterle JS, et al. Temporal changes in microbial community composition during culture enrichment experiments with Indonesian coals[J]. International Journal of Coal Geology, 2015, 137: 66-76
- [23] Wei M, Yu ZS, Jiang Z, et al. Microbial diversity and biogenic methane potential of a thermogenic-gas coal mine[J]. International Journal of Coal Geology, 2014, 134-135: 96-107
- [24] Gründler F, Jiménez N, Thielemann T, et al. Microbial methane formation in deep aquifers of a coal-bearing sedimentary basin, Germany[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 200
- [25] Strapoć D, Mastalerz M, Dawson K, et al. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2011, 39(1): 617-656
- [26] Liu C, Li L, Ma JK, et al. Analysis of methanogenic community of anaerobic granular sludge based on *mcrA* gene[J]. Environmental Science, 2011, 32(4): 1114-1119 (in Chinese)  
刘春, 李亮, 马俊科, 等. 基于 *mcrA* 基因的厌氧颗粒污泥产甲烷菌群分析[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1114-1119
- [27] Wang SQ, Cui YB, Piao YZ, et al. Characterization of methanogens diversity in sludge drying reed bed based on *mcrA* gene analysis[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(6): 3312-3316 (in Chinese)  
王世全, 崔玉波, 朴永哲, 等. 基于 *mcrA* 基因分析污泥干化芦苇床中产甲烷菌的多样性[J]. 环境工程学报, 2016, 10(6): 3312-3316
- [28] Shcherbakova V, Rivkina E, Pecheritsyna S, et al. *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(1): 144-147
- [29] Rivard CJ, Henson JM, Thomas MV, et al. Isolation and characterization of *Methanomicrobium paynteri* sp. nov., a mesophilic methanogen isolated from marine sediments[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1983, 46(2): 484-490
- [30] König H, Stetter KO. Isolation and characterization of *Methanobolus tindarius*, sp. nov., a coccoid methanogen growing only on methanol and methylamines[J]. Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, 1982, 3(4): 478-490
- [31] Ferry JG, Smith PH, Wolfe RS. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1974, 24(4): 465-469
- [32] Shlimon AG, Friedrich MW, Niemann H, et al. *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 759-763