

## 新疆低阶煤本源生物甲烷转化中微生物群落组成及变化

尤陆花<sup>1,3</sup> 史应武<sup>1,2\*</sup> 高雁<sup>1,2</sup> 杨红梅<sup>1,2</sup> 张涛<sup>1,2</sup> 娄恺<sup>1,2</sup>

(1. 新疆特殊环境微生物实验室 新疆 乌鲁木齐 830091)

(2. 新疆农业科学院 农产品质量安全重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830091)

(3. 新疆大学 生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**【目的】探究新疆低阶煤生物甲烷转化过程微生物群落组成及多样性。【方法】采用厌氧培养方法和末端限制性片段长度多态性技术(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析新疆低阶煤本源微生物对甲烷转化及有机酸含量的影响,分析新疆哈密大南湖长焰煤生物甲烷转化过程中微生物群落动态变化。【结果】研究表明长焰煤和褐煤对本源微生物产甲烷影响较小,随着低阶煤生物甲烷转化时间的延长,甲烷产量呈上升趋势,转化 60 d 后长焰煤甲烷产量高达 10.28 mL/g,挥发性有机酸(VFA)浓度则最低;微生物多样性指数变化不明显,不同转化时间微生物主要类群为放线菌门(Actinobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes),变形菌门(Proteobacteria);甲烷菌的群落结构相对于细菌较简单,在整个低阶煤生物转化产甲烷过程中共有古菌类群为甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷盐菌属(*Methanohalobium*)、甲烷叶菌属(*Methanolobus*)、甲烷食甲基菌属(*Methanomethylovorans*),它们是构成群落结构的基本菌群。【结论】低阶煤生物甲烷转化过程微生物群落具有丰富的多样性,且不同时期多样性有较大差异。甲烷菌群落结构相对于细菌较简单,共有类群明显。

**关键词:** 厌氧培养, 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP), 细菌群落, 产甲烷菌群落

## Microorganism community composition and changes during low rank coal authigenous microorganism methane conversion in Xinjiang

YOU Lu-Hua<sup>1,3</sup> SHI Ying-Wu<sup>1,2\*</sup> GAO Yan<sup>1,2</sup> YANG Hong-Mei<sup>1,2</sup>  
ZHANG Tao<sup>1,2</sup> LOU Kai<sup>1,2</sup>

(1. Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

(2. Key Laboratory for Agro-products Quality and Safety, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

(3. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China)

**Abstract:** [Objective] The composition and diversity of microorganism during low rank coal authigenous microorganism methane conversion were explored in Xinjiang. [Methods] We evaluated

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目(No. 201232121)

\*通讯作者: Tel: 86-991-4533304; ✉: syw1973@126.com

收稿日期: 2014-03-06; 接受日期: 2014-06-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-30

the effect of low rank coal authigenous microorganism on methane conversion and organic acid content by anaerobic culture. The dynamic changes of microbial community were analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in Hami's long flame coal. **[Results]** The results suggested that lang flame coal and brown coal had little influence on methane production of indigenous microorganism. As low rank coal biological methane conversion time went on, methane production showed an increasing tendency. The yield of long flame coal biological methane was 10.28 mL/g and the concentration of volatile fatty acid (VFA) were the lowest at 60 days. The diversity indexes of microbes did not change significantly. The major microbial groups were Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria in different low rank coal conversion period. The bacterial community structure was more complex, while the methanogens community structure was relatively simple. All samples harbored these phyla such as *Methanosarcina*, *Methanohalobium*, *Methanlobus*, *Methanomethylovorans*, which constituted a basic flora of community structure. **[Conclusion]** There was abundant microbial diversity in different low rank coal conversion period and the diversity was different in different period. The methanogens community structure was relatively simple, and the number of common groups was higher in methanogens community.

**Keywords:** Anaerobic culture, Terminal restriction fragment length polymorphism, Bacterial community, Methanogens community

低阶煤是指镜煤反射率小于 0.65% ( $R_0$ ,  $\max < 0.65\%$ ) 的煤层<sup>[1]</sup>, 埋藏较浅, 空隙空间较大, 适合微生物的生存和繁殖<sup>[2]</sup>。新疆作为我国重要的煤炭基地, 煤炭主要分布在准噶尔盆地、吐哈盆地、塔里木盆地及天山部分地区, 可作为国内煤生物甲烷转化的研究重要领域。

在世界范围内, 随着常规油气资源日益枯竭和环境意识不断增强, 清洁型能源甲烷的勘探开发和利用已成为当前的热点。利用微生物转化煤炭具有能耗低、转化条件温和、转化效率高、设备要求简单、绿色无污染和可以充分利用煤炭等优点。另外, 生物转化技术对低阶煤尤其有效, 可将化学过程难以转化的低阶煤转化为甲烷从而实现“变废为宝”, 不但提高了资源利用效率而且减少了对环境的污染和破坏。因此, 微生物转化煤炭产甲烷对于改善我国能源结构、保证国家能源安全有着重要的意义, 为新疆低阶煤生物甲烷转化奠定基础。

一些学者对本源微生物进行相关研究, 认为不需要向煤层中注入异源菌, 煤层中本源菌可以利用煤炭产生一定数量的甲烷<sup>[3]</sup>。同时对煤炭进行生物转化实验研究, 通过 MPN 计数方法证实存在厌氧发酵性细菌, 认为这是生物甲烷转化的前提保

证<sup>[4]</sup>。煤炭生物转化是一系列复杂的微生物代谢过程<sup>[5]</sup>, 微生物群落特征和多样性的研究可以更好地了解煤炭甲烷产生的过程<sup>[6-8]</sup>。此外, 目前学者们对产甲烷菌的研究主要集中在沼气池, 而对于低阶煤生物甲烷转化过程研究未见报道。

本文选择新疆哈密大南湖长焰煤和吐鲁番沙尔湖褐煤为研究对象, 从煤炭生物甲烷转化过程不同反应时间采集发酵煤样沉积物, 采用双荧光 T-RFLP 指纹图谱法, 结合气相色谱法, 分析新疆低阶煤本源微生物对低阶煤甲烷转化及有机酸生成的影响, 明确新疆哈密大南湖长焰煤生物甲烷转化过程微生物群落动态变化, 为新疆低阶煤高效转化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:** 采样时间 2013 年 5 月, 两件样品为长焰煤和褐煤, 编号分别为 D-C 和 S-H。D-C 样品采自新疆哈密大南湖一号井, S-H 采自吐鲁番沙尔湖露天煤矿。随机采集煤样, 将样品装入无菌食品保鲜袋, 带回实验室 4 °C 保藏。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** PCR 操作试剂和酶均购

自上海生工生物工程有限公司, PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg; 凝胶成像系统 GK-330C 购自美国联合生物科技有限公司; 纯甲烷气体, 购于上海仁和分析器材有限公司, 纯度 99.9%; 气相色谱仪, GC-6850, 美国安捷伦科技有限公司生产。

**1.1.3 产甲烷菌的富集培养基:** 每 1 000 mL 无菌无氧水中加入  $K_2HPO_4$  0.4 g、 $MgCl_2$  2.0 g、 $KH_2PO_4$  0.4 g、酵母浸出液 1.0 g、 $NH_4Cl$  1.0 g、刃天青 0.01 g、乙酸钠 2.0 g、KCl 0.2 g、NaCl 2.0 g、微量元素溶液 10 mL, pH 7.0。其中微量元素溶液配方为:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.0 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g、 $CoCl_2$  0.1 g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.01 g、 $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0.5 g、 $KAl(SO_4)_2$  0.01 g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g、 $H_3BO_3$  0.01 g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0.01 g、NaCl 1.0 g。每个 100 mL 血清瓶装入 70 mL 培养基, 培养基配制好之后煮沸 5–10 min 以去除溶液中的溶解氧, 于  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。培养基灭菌后立即放入厌氧手套箱。接种前用灭菌除氧注射器注入 1%  $Na_2S$  和 5%  $NaHCO_3$  混合溶液 20 mL, 半胱氨酸 0.5 g, 利用其还原作用来彻底去除液体中的溶解氧。刃天青作为还原剂和指示剂加入培养基中, 以去除培养基中残留的溶解氧。如果培养基中还有剩余氧存在, 则呈现紫色或粉红色, 无氧时则呈现培养基的颜色。

## 1.2 低阶煤生物甲烷转化

**1.2.1 富集菌液制备:** 采集 S-H、D-C 两个样品, 分别研磨称取 2.0 g 煤炭加入到装有 70 mL 产甲烷菌富集培养基的血清瓶中, 置于 35 °C 厌氧培养箱中静置培养 60 d, 即可得到两件样品的产甲烷菌富集本源菌液。

**1.2.2 甲烷转化实验:** 选用 100 mL 血清瓶作为培养瓶, 使用异丁基瓶塞且用铝盖封口以保证其密封性良好。所用样品为“富集菌液制备”同一套煤样, 分别研磨称取 2.0 g 加入到装有 70 mL 培养基的血清瓶中, 并且加入 4 mL 富集菌液, 置于 35 °C 厌氧培养箱中。转化 15、30、40、50、60 d 检测甲

烷气体和 VFA 产量, 两种煤样品编号分别为 S-H1、S-H2、S-H3、S-H4、S-H5 (S-H 代表沙尔湖褐煤), D-C1、D-C2、D-C3、D-C4、D-C5 (D-C 代表大南湖长焰煤), 同时收集、离心富集培养沉积物, 于 -20 °C 保藏用于后续实验, 每件样品设置 3 个平行实验。

**1.2.3 空白对照:** 为考察培养基对产气量的影响和煤的转化, 空白组只加入培养基和富集菌液, 不加入煤样。

## 1.3 甲烷气体的测定

甲烷检测采用气相色谱法, 仪器为 GC-6850 型气相色谱仪; 色谱参数为: HP-PLOT U 色谱柱, 柱温箱采用程序升温, 初始温度为 120 °C, 以 10 °C/min 升温至 170 °C, 检测器温度 250 °C, 进样口温度为 150 °C, 载气为高纯  $N_2$ , 流速为 25 mL/min。进样量为 1 mL。

根据不同浓度的甲烷标准气体: 0 mL 空气+1 mL 甲烷, 0.2 mL 空气+0.8 mL 甲烷, 0.2 mL 空气+0.6 mL 甲烷, 0.2 mL 空气+0.4 mL 甲烷, 0.2 mL 空气+0.2 mL 甲烷, 0.2 mL 空气+0.1 mL 甲烷, 对应的甲烷质量浓度分别为: 358.40、286.70、215.00、143.60、71.68、35.84 g/L。对应的峰面积得到甲烷的标准气体方程: 甲烷(%) =  $7.85 \times 10^{-4} A + 1.709 764$ , 即可计算甲烷生成量, 其中 A 为峰面积。

## 1.4 挥发性有机酸(VFA)测定

取 10 mL 反应液置于离心机中离心 20 min, 转速 6 000 r/min, 温度控制 4 °C。离心后取上清液, 用 6 mol/L HCl 溶液调节 pH 为 2.0, 用气相色谱仪测定 VFA 含量。检测器: 氢火焰离子化检测器(FID)。色谱柱: FFAP。色谱条件: 进样口温度 200 °C, 柱温箱采用程序升温模式: 初始值 70 °C, 平衡时间 1 min, 后以 15 °C/min 升温至 230 °C, 保持时间 1 min。检测器 250 °C。自动进样, 进样量为 10  $\mu$ L。

取乙酸 956  $\mu$ L、丙酸 604  $\mu$ L, 正丁酸 625  $\mu$ L 置于 100 mL 容量瓶中, 即各标准酸的初始浓度为: 10、6、6 g/L; 在 5 个 1.5 mL 离心管中分别加入混合标准溶液 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 mL, 以及蒸

馏水 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mL, 即配成 5 个不同浓度梯度的 VFA 标准溶液。乙酸梯度浓度为: 10、8、6、4、2 g/L, 丙酸和正丁酸的浓度为: 6.0、4.8、3.6、2.4、1.2 g/L。根据酸的不同浓度(X)对应的峰面积(Y)得出标准方程式分别为: 乙酸:  $Y=57.34X+20.60$ ; 丙酸:  $Y=27.62X+14.94$ ; 丁酸:  $Y=54.91X+37.85$ 。乙酸、丙酸、正丁酸含量总和即为总有机酸含量。

### 1.5 样品总 DNA 的提取

比较选取产甲烷量相对较高的样品 D-C 反应沉积物作为微生物多样性分析样品, 15、30、40、50、60 d 样品编号分别为 D-C1、D-C2、D-C3、D-C4、D-C5, 利用上海生工生物工程有限公司提取试剂盒提取样品总 DNA。并通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 储存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.6 细菌和甲烷菌 16S rDNA 的 PCR 扩增

使用细菌通用引物 46F 和 519R<sup>[5]</sup>对样品 16S rRNA 基因序列进行扩增, 正向引物 46F 序列为 5'-GCYTAACACATGCAAGTCGA-3' (5'为 FAM 标记), 反向引物 519R 序列为 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (5'为 HEX 标记)。PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): Premix Taq (含 Taq 酶 2.5 U) 12.5  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.1  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (浓度为 2–3 mg/L) 1  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  45 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  7 min。甲烷菌通用引物 341F 序列<sup>[9]</sup>为 5'-CCTACGGGSRG CAGCAG-3' (5'为 FAM 标记), 反向引物 860R 序列<sup>[10]</sup>为 5'-GGCTCGCTTCACGGCTTCCCT-3' (5'为 HEX 标记), PCR 反应体系 (30  $\mu\text{L}$ ): Premix Taq (含 Taq 酶 2.5 U) 15  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.1  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 30  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。以无菌水为模板做空白对照, 做 3 个 PCR 扩增平行试验。

### 1.7 T-RFLP 分析

采用限制性内切酶 *Ava* II 和 *Bst*U I 对细菌

16S rDNA PCR 产物酶切。酶切反应体系 (30  $\mu\text{L}$ ): 1  $\mu\text{L}$  *Ava* II/*Bst*U I, 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Buffer R, 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物, ddH<sub>2</sub>O 补至 30  $\mu\text{L}$ , 混匀后  $37^{\circ}\text{C}$  酶切过夜, 然后  $65^{\circ}\text{C}$  放置 20 min 使酶失活。采用限制性内切酶 *Scr*F I 和 *Bst*U I 对甲烷菌 PCR 产物酶切。酶切反应体系 (30  $\mu\text{L}$ ): 1  $\mu\text{L}$  *Scr*F I/*Bst*U I, 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Buffer R, 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物, ddH<sub>2</sub>O 补至 30  $\mu\text{L}$ , 混匀后  $37^{\circ}\text{C}$  酶切过夜, 然后  $65^{\circ}\text{C}$  放置 20 min 使酶失活。酶切产物由上海生工生物技术有限公司完成。使用 Excel 对各样品的限制性内切片段 (T-RFs) 进行筛选, 将片段小于 50 bp, 荧光强度小于 50 单位的峰进行剔除。将筛选后的 T-RFs 数据录入 MiCA 数据库 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) 进行在线比对以获得具体生物信息。

### 1.8 群落多样性分析

选择 T-RFs 在 50–400 bp 范围内、荧光强度高于 50 U 且 T-RFs 的峰面积大于总峰面积 0.5% (小于 0.5% 被视为噪音值) 的片段计算香依指数 (Shannon index,  $H'$ )、辛普森指数 (Simpson index,  $D$ ) 和均匀度指数 (Evenness index,  $E$ ), 分析微生物群落结构多样性。其中  $H'=-\sum P_i \ln P_i$ ,  $D=1-\sum P_i^2$ ,  $E=H'/\ln S$ ,  $P_i$  代表片段所占的相对面积<sup>[11]</sup>,  $S$  代表 T-RFLP 图谱中的有效片段数。

### 1.9 数据统计

所有数据均采用 Excel 和 SPSS 17.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 本源微生物转化低阶煤产甲烷过程比较

由图 1 可见, 不加入煤基质的空白组 15 d 产甲烷量 0.24 mL/g, 累积 60 d 产甲烷量达到 1.30 mL/g, 由此可见空白组甲烷量相对于实验组较少。本源微生物转化低阶煤 15 d 后, 长焰煤产甲烷量低于褐煤产甲烷量, 分别为 4.12 mL/g 和 5.14 mL/g, 但是在整个微生物转化低阶煤产甲烷过程中, 两种煤样的产气量随时间的增加呈上升趋势, 转化 30 d 出现产气高峰, 分别为 8.54 mL/g 和 7.12 mL/g,

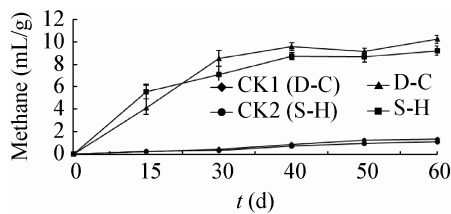


图 1 新疆低阶煤本源微生物产甲烷变化趋势

**Figure 1 Variation of CH<sub>4</sub> concentration from low rank coal of authigenous microorganism in Xinjiang**

Note: D-C: Sample of the long flame coal; S-H: The sample of the brown coal.

转化 40、50、60 d 产气量缓慢增长并且趋于平衡, 转化 60 d 有升高趋势。经统计分析, 长焰煤和褐煤本源微生物产甲烷总量无显著性差异( $P>0.05$ ), 空白组产甲烷量和实验组产甲烷量差异较显著( $P<0.05$ ), 表明本源微生物转化低阶煤产甲烷过程中长焰煤和褐煤对甲烷量影响较小。

## 2.2 产甲烷过程中 VFA 浓度变化

从图 2 中可以明显看出, 转化 15 d 长焰煤和褐煤反应液中 VFA 产量分别为 20.47  $\mu\text{mol}$  和 68.87  $\mu\text{mol}$ , 转化 30 d, 两种煤样反应液中 VFA 产量随时间的增加呈下降趋势( $P<0.05$ ), 转化 60 d, 产甲烷高的煤样 VFA 产量达到最低(图 1、2)。

## 2.3 甲烷生成过程微生物多样性分析

不同酶切所获得 T-RFs 数量不同, 研究结果(图 3、4)显示细菌 *Ava* II 酶切总体效果优于 *Bst*U I, 采用 *Ava* II 的酶切结果分析各个样品的细菌多样性; 甲烷菌 *Scr*F I 酶切总体效果优于 *Bst*U I, 故采用 *Scr*F I 的酶切结果分析各个样品的甲烷菌

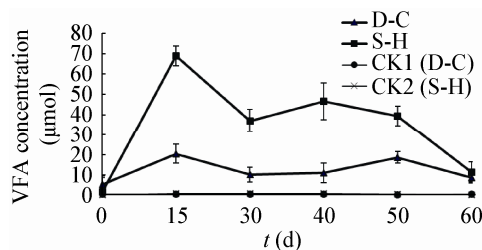
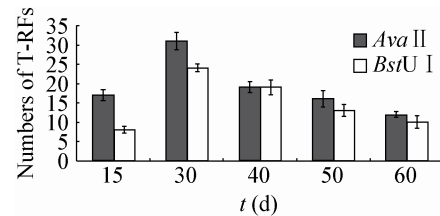
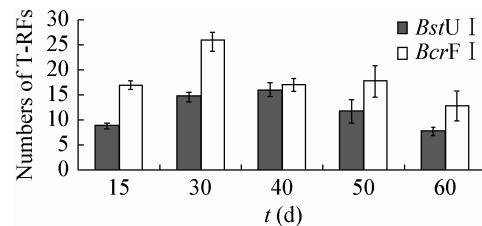


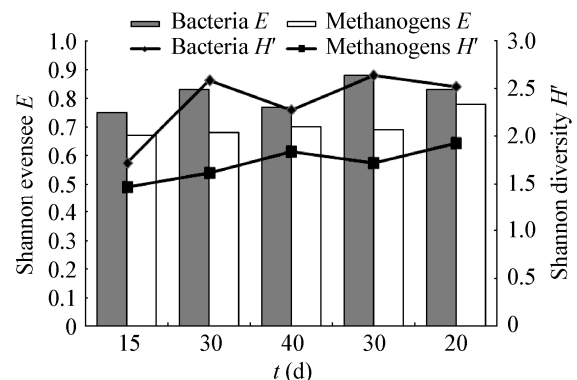
图 2 新疆低阶煤本源微生物产 VFA

**Figure 2 Variation of VFA concentration from low rank coal of authigenous microorganism in Xinjiang**

Note: D-C: Sample of the long flame coal; S-H: The sample of the brown coal.


**图 3 低阶煤生物甲烷转化过程中细菌 16S rDNA PCR 产物经两种内切酶消化产生的 T-RFs 数**
**Figure 3 Numbers of T-RFs of PCR products from bacteria digestions by two enzymes in biological methane conversion process**

**图 4 低阶煤生物甲烷转化过程中甲烷菌 PCR 产物经两种内切酶消化产生的 T-RFs 数量**
**Figure 4 Numbers of T-RFs of PCR products from methanogens digestions by two enzymes in biological methane conversion process**

多样性。根据 T-RFLP 图谱计算各样品的丰度指数和均匀度指数, 结果如图 5 所示。从不同时间阶段生物甲烷转化中细菌和甲烷菌多样性指数 (Shannon diversity,  $H'$ ) 来看, 生物甲烷转化 50 d 细菌多样性最丰富, 从均匀度指数 (Shannon evenness,  $E$ ) 来看, 生物甲烷转化过程中各微生物物种的丰度相差不明显。


**图 5 基于 T-RFLP 图谱的细菌和甲烷菌多样性分析**
**Figure 5 Species diversity of bacteria and methanogens based on T-RFLP profiles**

## 2.4 甲烷生成过程微生物群落动态变化

低阶煤本源微生物甲烷生物转化过程中微生物类群丰富,很多是未培养微生物,转化 15 d,细菌类群主要为放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*);转化 30 d,群落经过演替微生物多样性增强,细菌的数量明显增加,随之产甲烷量大幅度提高;转化 60 d 有新的种群出现,产甲烷量有增加趋势,样品中出现热厌氧菌属(*Thermoanaerobacterium*)。5 个样品主要种群为放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)(表 1)。

甲烷菌的群落结构相对于细菌较简单,在不同检测时间点共有古菌类群为甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷盐菌属(*Methanohalobium*)、甲烷叶菌属(*Methanobolus*)、甲烷食甲基菌属(*Methanomethylovorans*),它们是构成群落结构的基本菌群(表 2)。

## 3 讨论

煤炭生物甲烷转化影响因素主要有煤炭结构特性、微生物数量、微生物活性等。煤炭在形成过程中的水分主要来自地层水,因此水的矿化度和 pH 值对煤炭生物甲烷转化产生直接的影响<sup>[12]</sup>,同时盐度也会影响生物甲烷转化中微生物的多样性<sup>[13]</sup>。生物甲烷转化主要有乙酸发酵和 CO<sub>2</sub> 还原两种途径,早期研究者<sup>[14]</sup>认为,生物甲烷形成途径因季节变化有明显差异。本文中煤炭是通过哪种途径完成甲烷转化,有待于进一步研究。目前,褐煤生物甲烷转化研究较多,可能是由于褐煤储量较大,开发成本低。但是,从工艺性和经济性角度考虑,褐煤的含水量大,甲烷转化过程前期处理较复杂。本实验选取长焰煤和褐煤作为研究对象,在实验室模拟褐煤甲烷生成,实验结果表明长焰煤和褐煤对产甲烷影响较小。可见,长焰煤和褐煤都可以作为新疆甲烷转化的煤炭资源。

挥发性有机酸(VFA)是厌氧消化过程的中间产物,厌氧菌主要利用 VFA 形成甲烷,只有少数

产甲烷由 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 生成。本研究中由于甲酸量较小,易挥发,主要测定乙酸、丙酸、丁酸的量,并且乙酸占总 VFA 含量较高,也是甲烷转化重要途径。本实验发现,不加入煤基质的空白实验组仍可以产出一部分甲烷,其原因可能在于培养基中添加微量的 L-半胱氨酸和 Na<sub>2</sub>S 为富集菌液中的产甲烷菌提供营养物质。实验组所产生的气体中既包括产甲烷菌利用培养基中营养物质产生的甲烷,也包括煤样作为基质被降解产生的甲烷,两件煤样品的产甲烷量一直高于空白组(CK)。然而两件煤样的产甲烷量均为扣除 CK 值(图 2),可见煤在产甲烷过程中作为基质被微生物降解,最终产生甲烷气体。此外对照组 VFA 量很少,几乎忽略不计。从反应开始甲烷量最小 VFA 量最大,到最终甲烷量最大而 VFA 量最小,导致浓度迅速衰减<sup>[15]</sup>。

煤炭生物甲烷转化微生物存在丰富的多样性,本文采用 T-RFLP 技术研究表明,随着甲烷的生成和 VFA 浓度的变化,微生物群落结构发生变化,在甲烷产量较高时,微生物多样性较为丰富。基于 T-RFLP 技术的非培养方法在研究微生物群落结构方面具有极其明显的优势,但同时又存在着一些不足,本研究采用双荧光 T-RFLP 技术,利于全面精确分析低阶煤转化中的微生物区系<sup>[16]</sup>。然而,由于 T-RFLP 技术分析微生物群落的局限性,要得到更为准确深刻的结果,可以结合 MPN 计数、克隆文库分析,对整个甲烷转化过程微生物多样性进行深入研究。

目前对煤炭生物甲烷转化过程微生物群落动态变化的研究未见报道。虽然厌氧发酵中有多种生物存在,但是占主导地位的还是细菌<sup>[17]</sup>。本研究对生物甲烷转化过程不同时期细菌的类群对比发现,微生物类群丰富,很多是未培养细菌,在整个产甲烷过程中还发现一些起水解作用的细菌、严格厌氧的拟杆菌(*Bacteroides*)、梭菌(*Clostridium*)及兼性厌氧的真杆菌(*Eubacterium*)、硫酸盐还原菌脱硫弧菌(*Desulfobrio*)、脱硫单胞菌(*Desulfomonas*),王刘阳等<sup>[18]</sup>在沼气发酵产甲烷古菌多样性的研究中也同样发现了拟杆菌(*Bacteroides*)、梭菌(*Clostridium*)及兼性

表 1 甲烷产生过程中细菌 MiCA 种属比对					
Table 1 The bacteria identified by MiCA during generation of methane					
样品 Sample	Ava II 实际片段 Ava II observed	BstU I 实际片段 BstU I observed	登录号 Accession No.	属名 Genera name	类群 Phylum
D-C1	182.37	199.27	DQ767879	<i>Acetobacterium</i>	Firmicutes
	273.12	194.52	DQ168656	<i>Clostridium</i>	
	300.54	185.33	AB245515	<i>Ferrimonas</i>	
	285.52	165.53	AF359941	<i>Acidithiobacillus</i>	Proteobacteria
	161.65	350.50	HQ284952	<i>Acinetobacter</i>	
	203.54	132.26	FJ015030	<i>Pseudomonas</i>	
	154.84	350.50	AB332414	<i>Cellvibrio</i>	Actinobacteria
	280.37	185.33	AF131315	<i>Actinomadura</i>	
	284.76	194.52	GU168006	<i>Actinobacterium</i>	Bacteroidetes
	280.17	185.33	AM423085	<i>Chryseobacterium</i>	
D-C2	281.28	280.17	GQ167610	<i>Capnocytophaga</i>	Firmicutes
	185.63	195.20	GU370092	<i>Clostridium</i>	
	192.50	179.39	FN397995	<i>Acetobacterium</i>	
	282.99	195.20	AB426563	<i>Actinobacterium</i>	Actinobacteria
	281.38	63.48	AY781191	<i>Psychroserpens</i>	Bacteroidetes
D-C3	282.99	195.20	FJ425220	<i>Algibacter</i>	Firmicutes
	192.49	87.59	AB546245	<i>Acetobacterium</i>	
	162.62	350.61	HQ841028	<i>Acinetobacter</i>	
	285.90	353.83	AF359941	<i>Acidithiobacillus</i>	Proteobacteria
	290.47	357.22	AM084114	<i>Arcobacter</i>	
	147.56	353.83	FJ015030	<i>Pseudoalteromonas</i>	
	285.90	360.69	HQ588838	<i>Pseudoxanthomonas</i>	Actinobacteria
	282.66	353.83	AJ609273	<i>Psychrobacter</i>	
	280.25	194.43	GU168006	<i>Actinobacterium</i>	
	282.66	353.83	HM134893	<i>Caldilinea</i>	Chloroflexi
D-C4	288.65	355.85	M75074	<i>Actinobacillus</i>	Proteobacteria
	158.9	166.56	AY437843	<i>Acidithiobacillus</i>	Proteobacteria
	288.65	54.01	M63248	<i>Buchnera</i>	
	158.90	350.44	AB461811	<i>Acinetobacter</i>	
	158.90	355.85	DQ517286	<i>Citrobacter</i>	Actinobacteria
	158.90	350.44	EF556273	<i>Pseudomonas</i>	
	279.94	185.26	AJ293702	<i>Actinomadura</i>	
	285.15	74.51	Z29968	<i>Clostridium</i>	Firmicutes
	285.15	66.39	AM110988	<i>Flavobacterium</i>	Bacteroidetes
	359.64	288.51	AF268946	<i>Acidithiobacillus</i>	Proteobacteria
D-C5	350.53	161.02	FJ816055	<i>Acinetobacter</i>	Actinobacteria
	350.53	279.92	EF621896	<i>Campylobacter</i>	
	186.47	279.92	DQ351730	<i>Actinobacterium</i>	
	185.26	279.92	AF131315	<i>Actinomadura</i>	Firmicutes
	68.18	285.34	CP002171	<i>Thermoanaerobacterium</i>	

表 2 生物甲烷转化过程产甲烷菌 MiCA 种属对比				
Table 2 The methanogens identified by MiCA during generation of methane				
样品 Sample	ScrF I 理论片段 ScrF I predicted	ScrF I 实际片段 ScrF I observed	登录号 Accession No.	属名 Genera name
D-C1	120	119.57	GQ872118	<i>Methanosarcina</i>
	220	220.56	M59133	<i>Methanohalophilus</i>
D-C2	121	120.58	AY487181	<i>Methanimicrococcus</i>
	121	120.58	AM268271	<i>Methanosarcina</i>
	121	120.58	AY177812	<i>Methanolobus</i>
	121	120.58	AY780565	<i>Methanomethylovorans</i>
D-C3	121	120.58	FR733675	<i>Methanohalobium</i>
	121	120.52	EU731574	<i>Methanohalophilus</i>
	120	119.59	GQ872118	<i>Methanosarcina</i>
	121	120.52	AY196680	<i>Methanimicrococcus</i>
	121	120.52	DQ631888	<i>Methanolobus</i>
	121	120.52	DQ631884	<i>Methanomethylovorans</i>
D-C4	121	120.59	AY487181	<i>Methanimicrococcus</i>
	121	120.59	EU731574	<i>Methanohalophilus</i>
D-C5	121	120.59	EU721850	<i>Methanolobus</i>
	121	120.59	DQ631884	<i>Methanomethylovorans</i>
	88	87.39	AB529874	<i>Methanosarcina</i>
	121	120.59	FR733675	<i>Methanohalobium</i>
	121	120.65	GQ872118	<i>Methanosarcina</i>
	121	120.65	AY196680	<i>Methanimicrococcus</i>
	121	120.65	EU731574	<i>Methanohalophilus</i>
	121	120.65	AY177812	<i>Methanolobus</i>
	121	120.65	AY780565	<i>Methanomethylovorans</i>

厌氧的真杆菌(*Eubacterium*)等。本文中在产甲烷后期还出现热厌氧菌属(*Thermoanaerobacterium*)，有研究报道，热厌氧菌属(*Thermoanaerobacterium*)在热力学上更易于利用乙酸来产生甲烷<sup>[19]</sup>。

从对细菌和甲烷菌群落结构的分析可以看出，甲烷菌的群落结构相对于细菌较简单，在转化 60 d 细菌的多样性逐渐降低，甲烷菌的多样性逐渐增加。在低阶煤生物转化中共有古菌类群为甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷盐菌属(*Methanohalobium*)、甲烷叶菌属(*Methanolobus*)、甲烷食甲基菌属(*Methanomethylovorans*)，它们是构成群落结构的基本菌群，决定产甲烷效能，可能这些混合菌群之间存在着共代谢作用。以往的研究也表明甲烷菌发现于各类厌氧环境中，Whitby C.在海底沉积物中

发现了甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)。甲烷菌最常见发现于沼气发酵中，不同发酵原料沼气池中甲烷古菌不同<sup>[20]</sup>，也常常发现未培养的产甲烷菌存在<sup>[21]</sup>。最近研究发现，新疆乌鲁木齐 10 号泉也存在 *Methanobacteriales* 的新类群，并且泉水水体的理化指标中也检测到了甲烷气体<sup>[22]</sup>。那么细菌与产甲烷古菌究竟是怎样相互作用的，有待进一步研究。

本研究用细菌的特异性引物从煤炭甲烷转化沉积物中扩增出了细菌和甲烷菌的 16S rDNA，以非培养方法研究煤炭生物甲烷转化过程微生物多样性的报道并不多。目前的研究主要集中在以培养的方法研究煤炭生物甲烷转化过程微生物数量的变化<sup>[23]</sup>，可能由于模板浓度低或引物的选择等原因检测到的细菌和甲烷菌丰富度较低，要全面、客



观、真实地了解微生物多样性还需做进一步的研究。值得注意的是,表2中显示相同片段可代表不同类群,如121 bp可能为甲烷球菌属(*Methanimicrococcus*)、甲烷嗜盐菌属(*Methanohalophilus*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷盐菌属(*Methanohalobium*)、甲烷叶菌属(*Methanolobus*)、甲烷食甲基菌属(*Methanomethylovorans*)。这可能是由于T-RFLP数据库所造成,因此只有将T-RFLP技术与克隆文库构建结合才会更加准确反映微生物群落信息。

综上所述,生物甲烷转化过程微生物群落具有丰富的多样性,且不同时期多样性有较大差异。只有通过培养和非培养方法的结合才能对生物甲烷转化过程微生物多样性有客观全面的认识,为新疆煤炭资源的利用和开发提供理论依据和基础资料。

## 参 考 文 献

- [1] Michael DZ. Production characteristics and reservoir analysis of coalbed methane reservoirs[J]. International Journal of Coal Geology, 1998, 38: 27-45.
- [2] 王勃, 李景明, 张义, 等. 中国低煤阶煤层气地质特征[J]. 石油勘探与开发, 2009, 36(1): 1-5.
- [3] Steve HH, Richard LS, Charles EB. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76: 46-51.
- [4] 丁安娜, 连莉文, 张辉, 等. 1854m-2608m 气源岩中产甲烷菌的富集培养和发酵产气实验研究[J]. 沉积学报, 1995, 13(3): 117-125.
- [5] Elizabeth JP, Mary A, Margo D, et al. Stimulation of methane generation from nonproductive coal by addition of nutrients or a microbial consortium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 52(3): 7013-7022.
- [6] Dahllof I. Molecular community analysis of microbial diversity[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 213-217.
- [7] Li DM, Hendry P, Faiz M. A survey of microbial populations in some Australian coalbed methane reservoirs[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76: 14-24.
- [8] Donald AK, Romeo MF, Christophe V, et al. Molecular sequences derived from paleocene fort union formation coals vs. associated produced waters: implications for CBM regeneration[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76: 3-13.
- [9] Hansen MC, Tolker-Neilson T, Givskov M, et al. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking template region[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 26: 141-149.
- [10] Van der M, Sprenger W. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 17: 189-194.
- [11] Blackwood BC, Hudleston D, Zak DR, et al. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(16): 5276-5283.
- [12] 林春明, 李从先, 蒋维三. 钱塘江口地区全新世沉积环境与生物气分布[J]. 天然气工业, 1997, 17(1): 11-15.
- [13] 李本亮, 王明明, 冉启贵, 等. 地层水含盐度对生物气运聚成藏的作用[J]. 天然气工业, 2003, 23(5): 16-20.
- [14] Martens CS. Seasonal variations in the stable carbon isotopic signature of biogenic methane in a coastal sediment[J]. Science, 1986, 233: 1300-1303.
- [15] Ulrich G, Bower S. Active methanogenesis and acetate utilization in Powder River Basin coals, United States[J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76: 25-33.
- [16] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [17] 刘君寒, 胡光荣, 李福利, 等. 厌氧消化系统微生物菌群的研究进展[J]. 工业水处理, 2011, 31(10): 10-14.
- [18] 王刘阳, 尹小波, 胡国全. 分子生物学技术在产甲烷古菌研究中的应用[J]. 中国沼气, 2008, 26(1): 14-19.
- [19] 黎霞, 承磊, 汪卫东, 等. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离、鉴定及代谢产物特征[J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 995-1000.
- [20] Whitby C, Earl J, Lanyon C, et al. The molecular diversity of the methanogenic community in hypereutrophic freshwater lake determined by PCR-RFLP[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97: 973-984.
- [21] Karakashev D, Batstone DJ, Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 331-338.
- [22] 李萍, 曾军, 祖丽皮亚·玉努斯, 等. 新疆乌鲁木齐10号冷泉古菌群落结构多样性[J]. 微生物学报, 2013, 53(3): 230-240.
- [23] 王爱宽, 秦勇. 褐煤本源菌在煤层生物气生成中的微生物学特征[J]. 中国矿业大学学报, 2011, 40(6): 1-6.