

## 不同成熟度煤样产甲烷潜力

何乔<sup>1</sup>, 丁晨<sup>1</sup>, 李贵中<sup>3</sup>, 陈浩<sup>3</sup>, 承磊<sup>1,2</sup>, 张辉<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>农业部沼气科学研究所, 成都 610041

<sup>2</sup>农业部农村可再生能源开发利用重点实验室, 成都 610041

<sup>3</sup>中国石油勘探开发研究院廊坊分院, 廊坊 065007

**摘要:**【目的】评估不同类型煤炭生物降解转化为甲烷的潜力, 研究原位煤层的微生物群落结构特征。【方法】分别在原位模拟、补加烃降解产甲烷菌系和补加碳源下厌氧培养煤样, 利用气相色谱监测甲烷产生趋势, 及高通量测序技术研究原位煤层的细菌和古菌群落。【结果】10 个样品中有 3 个高成熟度煤样可以被厌氧降解转化为甲烷。通过生物强化和添加外源底物可以促进 HF 煤样的产甲烷潜力。其中 SL 煤样中的古菌类群主要是氢营养型产甲烷菌 *Methanoculleus* 和乙酸营养型产甲烷菌 *Methanosaeta* 为主, 细菌类群主要属于 *Firmicutes* (54.4%)、*Proteobacteria* (30.9%)、未培养微生物 (10.8%)、*Caldiserica* (1.5%) 及 *Thermotogae* (1.3%)。【结论】不同成熟度煤样降解产气潜力不同, 在部分原位煤层中可能存在参与烃降解与甲烷产生的功能菌。

**关键词:**煤层气, 厌氧降解, 底物刺激, 生物强化, 高通量测序

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 12-1307-11

煤层气 (coal-bed methane, CBM) 是一种蕴藏量非常大的新型清洁能源, 在过去 20 年, 煤层气资源评价表明在各国多处盆地都有较大的气藏资源。煤层气从形成过程上可分为热力学成因气和生物成因煤层气。热力学成因是地层中有机质在高温 (> 50℃) 和高压下形成的具有挥发性物质, 以甲烷、CO<sub>2</sub> 和水蒸气的形式释放出来, 是物理化学反应过程<sup>[1-2]</sup>。生物成因煤层气形成是煤储层自然发生并持续进行的微生物过程, 这种微生物作用主要是在缺氧条件下, 由各类不同代谢类型的厌氧微生物

(细菌和古菌) 协同作用而完成的, 但目前我国煤层生物气尚未得到有效开发利用<sup>[3-5]</sup>。

如何有效加快煤的生物转化, 促进“煤增溶” (coal solubilization)<sup>[6]</sup>, 改善煤层渗透性, 延长煤井开采寿命, 采用人工方法进行地下煤层厌氧降解产气问题, 已成为国内外研究的热点<sup>[7-8]</sup>。

近年来, 加拿大、德国及美国的科学家也进行了相应生物模拟实验, 主要以泥碳、褐煤等作为材料, 样品的镜质体反射率 (R<sub>0</sub>) 在 0.2% - 0.7% 之间, 属于低成熟度煤样。低成熟度煤样中含有大量的易被

**基金项目:** 国家科技重大专项 33 项目 005 课题 (2011ZX05033-005); 中石油股份公司煤层气科技项目 01 课题《煤层气富集规律研究及有利区块预测评价》

\* 通信作者。Tel: +86-28-85258573; Fax: +86-28-85215106; E-mail: zhanghuits@aliyun.com

**作者简介:** 何乔 (1987-), 陕西汉中, 硕士研究生, 主要研究方向为烃类厌氧微生物降解。E-mail: heqiao@gmail.com

**收稿日期:** 2013-04-16; **修回日期:** 2013-05-23

微生物降解的有机化学组分,在相对低温和浅埋藏的地层条件下易被厌氧细菌分解而产生生物气<sup>[9-12]</sup>。而这就给我们提出了一些新的问题,即高熟煤中是否也存在能够降解原煤产甲烷的微生物群落?高熟煤的生化甲烷潜力有多大?其产气机理与低成熟度的煤有何异同<sup>[13-14]</sup>?

本研究通过厌氧模拟培养,分析不同成熟度煤的厌氧降解生气潜力,研究添加外源菌种和碳源情况下,微生物对原煤降解产甲烷的影响,并采用高通量 454 测序的方法研究了原位煤藏中的微生物多态性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集和预处理:**选取我国次生生物气主要集中的富煤区进行采样(见表1),采样过程中将煤样装入已灭菌的密封袋中,低温运输(4℃)至实验室,4℃低温保藏,用于后续实验室富集培养。用灭菌的研钵处理各煤样,充分研磨过80目筛,取10g充分研磨样品于120 mL 无菌厌氧瓶中,抽真空、充N<sub>2</sub>,反复3次,便于煤炭吸附气脱出,用于厌氧富集培养。在超净工作台下,用灭菌的工具剥去煤样外层,将煤心样品保藏在-80℃冰箱,用于DNA提取等分子生物学分析。

表 1. 煤层样品采集信息

Table 1. The summary of collected coal samples

Sample names	The depth of coal/m	Coal-bed temperature/℃
HF	~200	15
SL	~300	20
ZC	~380	13
YJG	~80	20
XL	~200	20
ZJM	~150	20
NLM	~190	15
SM	~140	20
WJT	~189	17
AEB	~1278	5

**1.1.2 主要试剂和仪器:**甲醇、乙酸钠试剂购自Sigma公司。带阀门的气密性采样针购自美国VICI公司。TaKaRa Taq 试剂盒购自 TaKaRa 公司。胶回收纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。气相色谱 GC-2010

是 Shimadzu 公司产品。气相色谱-稳定同位素质谱联用仪(IRMS),是 Thermo 公司产品,其中同位素比率分析仪型号为 MAT 253 型。核磁共振分析仪(Rec Core-3010)是中国石油勘探开发研究院廊坊分院自主研发设备。454 GSFLX Titanium 测序仪是 Roche 公司产品。其它常规试剂主要购买自上海生物工程有限公司和中国国药集团。

### 1.2 无机盐培养基制备

采用 Hungate 厌氧操作技术,配制无机盐富集培养基。无机盐厌氧富集培养基成分如下:NaCl 0.5 g、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g、NH<sub>4</sub>Cl 0.3 g、KCl 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g<sup>[15]</sup>,称量化合物并依次溶解,加水至1L。煮沸后稍冷却,加入0.5g半胱氨酸盐酸盐,并调节pH于7.5左右,加入氧化还原性指示剂刃天青(0.1%,W/V)1 mL,通N<sub>2</sub>(2.0 m<sup>3</sup>/h)保护下,保持微沸约20 min,冷却后在N<sub>2</sub>保护下分装,121℃灭菌30 min。接种前补加无菌无氧试剂 NaHCO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O,及微生物生长所必须的 VB<sub>12</sub>(2 mL/L)及微量元素溶液(2 mL/L)<sup>[16]</sup>。

### 1.3 厌氧富集培养

将充分研磨的不同地区煤样(共10组,见表1)各约10g,装入的无菌厌氧瓶中,通入混合气N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(80:20,V/V),并加入无机盐培养基50 mL,塞入异丁基瓶塞,且用铝盖封口,用于煤样无机盐富集培养。

选取 HF、XL 及 NLM 3 组供试煤样进行生物强化和底物刺激试验。各称取约 10g 充分研磨的煤样,在厌氧条件下加入 40mL 无机盐培养基,分别添加 35℃ 培养条件下正十六烷烃降解产甲烷菌系(AHB)<sup>[15]</sup>,接种量 10% (V/V)。对照组设置为与实验组相同条件但不含煤样,为生物强化试验组。

各称取约 10 g 充分研磨的 3 组供试煤样,在无机盐培养基基础上,分别添加 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, V/V)、乙酸钠(终浓度 10 mmol/L)及甲醇(终浓度 10 mmol/L),用于底物刺激试验。

以上 3 组厌氧富集培养温度设置 15℃、35℃ 2 个温阶,每组煤样 3 个重复,避光静置培养。厌氧富集培养试验的试验方案类型及处理条件详见表 2。

表 2. 实验处理方案和样品种类

Table 2. Identification of source materials and experimental conditions

Sample or treatment	Description
Mineral salt enrichments	50mL mineral salt medium + 10g coal (10 sample groups)
Bioaugmentation; microcosm with coals, and AHB enrichments	Experimental group: 10g coal (3 sample groups), 50mL mineral salt medium with 10mL AHB enrichment inoculum Control group: 50mL mineral salt medium, 10mL AHB enrichment inoculum
Biostimulation; microcosm with coals, nutrients	50mL mineral salt medium, 10g coal (3 sample groups) with addition of H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20, V/V) 50mL mineral salt medium, 10g coal (3 sample groups) with methanol (final concentration 10mmol/L) 50mL mineral salt medium, 10g coal (3 sample groups) with sodium acetate (final concentration 10mmol/L)

AHB enrichment inoculum indicates inoculation with mesophilic anaerobic hydrocarbons degradation enrichments.

#### 1.4 气体组分分析及甲烷碳同位素测定

采用气相色谱 GC-2010 测定气体组分中甲烷和二氧化碳含量。配备有 TCD 检测器和 Porapak Q 不锈钢填充柱, 进样口、柱箱和检测器的温度分别是 50 °C、50 °C 和 70 °C, 高纯氢 (99.999%) 作载气, 流速为 50 mL/min。用带阀门的气密性采样针采集 0.2 mL 上空气体分析, 采用面积归一化测定气体组分中氮气、甲烷和二氧化碳的相对百分含量, 并换算成气体物质的量。

甲烷的碳同位素测定采用气相色谱-稳定同位素质谱联用仪, 采用程序性升温进样方法。初始温度 35 °C, 保持 6 min, 15 °C/min 升温速率上升至

80 °C, 以 5 °C/min 升温速率上升至 200 °C, 保持 5 min, 分流比为 10:1。由中国石油大学油气资源与探测国家重点实验室完成甲烷的碳同位素测定。

#### 1.5 煤样理化性质测定

利用显微镜光度计测试供试煤炭显微组分分析和镜质组反射率, 分别采用国家标准 GB/T 8899-1998 和 GB/T 6948-2008; 孔隙度、渗透率分析通过核磁共振分析仪测试完成。

#### 1.6 煤炭中微生物 DNA 提取、高通量测序

**1.6.1 引物:** 煤样中本源细菌和古菌 16S rRNA 本研究使用的引物序列详见表 3。

表 3. 本研究所涉及到的引物序列

Table 3. Primers in this study

Primers	Sequence of up-stream primer (5'→3')	Sequence of downstream primer (5'→3')
Bac27F/Bac907R	<u>ACACAGAGTACGGRAGGCAGCAG</u>	<u>ACACAGAGCCGTC AATTCMTTTRAGTTT</u>
Arc8F/Arc 958R	<u>ACACATATTCGGGTTGATCCTGCC</u>	<u>ACACATATYCCGGCGTTGAMTCCAATT</u>
Arc109F/Arc915R	ACKGCTCAGTAACACGT	GTGCTCCCCGCCAATTCCT

**1.6.2 煤炭中微生物 DNA 提取:** 称取 0.5 g 煤样 (充分研磨后), 对煤样中微生物 DNA 具体提取步骤参照文献 [17]。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用于后续分子生物学分析。

**1.6.3 高通量测序:** 细菌 16S rRNA PCR 扩增引物对 Bac27F/Bac907R<sup>[17]</sup>, 煤样古菌 16S rRNA 采用引物对 Arc 8F/Arc 958R<sup>[18-19]</sup>, 其中划线的 ACACATAT 为 8 个随机组合的核苷酸标签序列 (表 3)。PCR 扩增体系采用 TaKaRa Taq 试剂盒。细菌 16S rRNA PCR 扩增程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 53 °C 1.5 min, 72 °C 1.5 min, 28 个循环; 72 °C 10 min。古菌 16S rRNA PCR 程序: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 10 min<sup>[19]</sup>。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 对目的片

段割胶纯化。胶回收纯化步骤参照试剂盒的说明进行。对纯化后的 PCR 产物进行后续高通量 454 测序。高通量 454 测序在 Roche 454GSFLX Titanium 平台上进行。通过分类地位鉴定的 RDP 在线分类工具对数据进行分析, 使用 Online Classifier 工具确定分类地位, 并计算在不同分类水平上, 获得样本所拥有的分类种类及所占比例。

## 2 结果和讨论

### 2.1 煤样的物理和化学性质分析

选取的不同煤样的物理化学性质分析结果见表 4。从表上可以看出, 所选的 10 处煤样, 从成熟度上可以分为低变质煤 ( $R_0 < 0.6\%$ ), 包括有 YJG、SM、

ZJM 和 NLM, 中等变质煤 ( $0.6\% < R_0 < 2.0\%$ ), 有 WJT、AEB、ZC、XL、SL 及 HF。煤层微生物多样性和种类与煤层煤样的湿度、孔隙度及渗透率等有密切

关系<sup>[20]</sup>。煤炭的化学组成和结构非常复杂, 又极不均一, 成熟度越高, 可供本源微生物直接利用的可溶性有机质、挥发性组分就越低<sup>[20]</sup>。

表 4. 煤炭理化性质分析结果

Table 4. The physical and chemical properties of coal samples obtained from different sites

Sample name	Vitrinite	Inertinite	Exinite	Mineral	Organic matters type	Porosity / %	Permeability / mD	Hydrocarbon generation potential	Vitrinite reflectance / %
HF	77	19	-	4	Ⅲ	2.52	-	gas-formation	1.91
SL	80.2	16.3	-	3.5	Ⅲ	0.35	-	gas-formation	1.32
ZC	82.6	16.3	-	1.1	Ⅲ	2.17	0.05	gas-formation	1.3
YJG	6.3	85.5	6.9	1.3	Ⅲ	27.59	0.07	poor	0.5
XL	91.7	8.3	-	-	Ⅲ	11.08	204.12	oil-formation	1.31
ZJM	70.7	20	9	0.3	Ⅲ	14.76	0.07	oil-formation	0.56
NLM	75.8	18.6	5.3	0.3	Ⅲ	25.32	0.37	oil-formation	0.56
SM	7.4	78.9	12.5	1.2	Ⅲ	26.17	0.01	oil-formation	0.55
WJT	-	-	-	-	Ⅲ	24.17	-	oil-formation	0.8
AEB	71	7.6	18.9	2.5	Ⅲ	1.88	-	poor oil-formation	1.11

“-” indicates the data was not detected.

## 2.2 无机盐厌氧富集培养结果

选择表 4 中所示的 10 处不同成熟度的煤样, 在 15℃、35℃ 2 个温阶条件下, 经过 200 d 左右无机盐厌氧富集, 仅 SL、ZC 和 HF 这 3 个样品可以检测到生化甲烷的积累 (图 1, 表 5)。这反映出供试样品自身的特殊性 (如所含生物量) 及富集培养方案 (如培养基盐浓度设置、培养温度) 或许存在一定差异, 在没有添加外源接种物、有机营养物前提下, 仅利用本源微生物降解原煤基质产气这一过程较难。

Scott 等认为以煤样  $R_0 < 0.3\%$  为原生生物气的界限值, 而热成因气开始生成的  $R_0$  值为 0.5%, 次生生物气成因煤阶主要为褐煤 ( $R_0 = 0.2\%$ ) - 焦煤 ( $R_0 = 1.5\%$ )<sup>[6]</sup>。国内外关于煤炭降解富集培养, 主要是选取低成熟度煤炭, 并添加外源底物刺激或者添加悬浮接种物的办法<sup>[13, 20-21]</sup>。本次试验在不添加接种物和有机营养的前提下, 煤样中内源微生物也能在简单的无机盐培养基中生长代谢产生生物气 (图 1, 表 5)。HF ( $R_0 = 1.91\%$ )、SL ( $R_0 = 1.32\%$ ) 和 ZC ( $R_0 = 1.3\%$ ) 3 处煤样都属于中等变质煤 (表 4), 煤化程度高, 易被本源微生物利用的有机质 (如挥发酸类及长链脂肪酸类) 含量少。

## 2.3 生物强化对不同煤样厌氧降解产气的影响

选取不同地域、煤炭物理和化学性质皆有较大差异的 HF ( $R_0 = 1.91\%$ )、XL ( $R_0 = 1.31\%$ ) 及 NLM ( $R_0 = 0.56\%$ ) 这 3 处煤样, 添加本课题组富集驯化

的正十六烷烃厌氧降解产甲烷富集物作为外加菌种, 经过 186 d 生物强化富集培养, 降解产气趋势见图 2。在 15℃ 培养条件下, 添加外源接种物的 HF、XL 和 NLM 3 组分别较无机盐条件下培养, 产气趋势显著上升。XL、NLM 2 处煤样在无机盐富集条件下不产生甲烷 (图 1), 而在 186 d 添加外源接种物组分别有 0.12 mmol、0.10 mmol  $CH_4$  产生, 与不含煤样的 CK 组产气趋势和产气量相比, 添加 XL、NLM 煤样对富集产气有一定抑制作用。HF-AHB 组比 CK 组产气的启动时间缩短, 产气趋势加快, 但 186 d 两组间产气积累量相差不大。

35℃ 培养条件下, HF-AHB 组在 186 d 时产气量较对照组高 0.025 mmol, 同比增长 12.9%, 产气速率比对照组及同温阶无机盐培养 HF 组的显著增大。与 15℃ 生物强化组产气趋势类似, XL-AHB、NLM-AHB 2 组产气量低于对照组, 在 45 d 厌氧培养后, HF、XL、NLM 各组产甲烷过程进入稳定期。可能是因为在在中温阶段外源接种物与煤样中本源微生物在封闭环境中, 随着可利用的有机质减少, 降解过程不能持续进行, 微生物代谢进入停滞期。

选取地理位置、物化性质不同的 3 处样品, 经过不同温阶培养, 在投加外源菌的情况下产气潜力上有差异, 这或许与煤样组分、内源菌、外源菌及其适应性等多种因素有关。因此想要通过外源菌强化开采气藏, 就必须合理优化菌群结构, 以更好适应地层

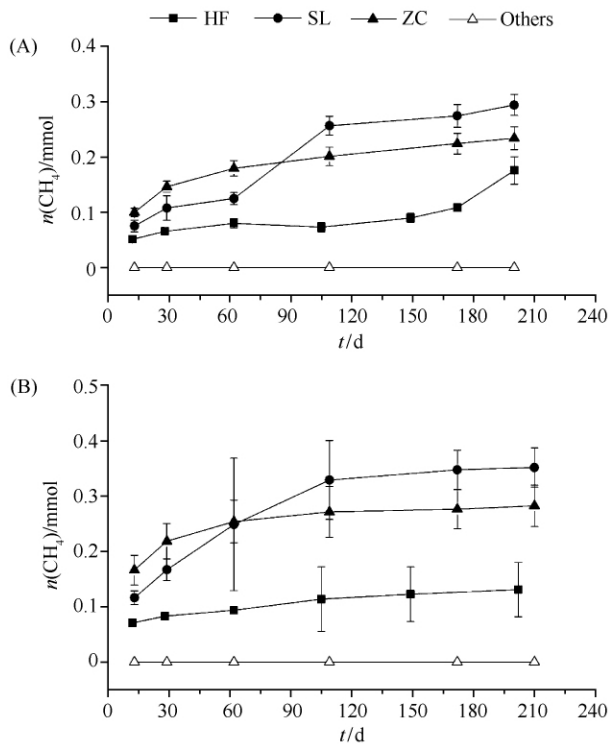


图 1. 无机盐富集培养产甲烷试验产气趋势图

Figure 1. Time course of methane production from mineral salt medium enrichments. Methane production from coal samples, with HF sample (■), SL sample (●), ZC sample (▲) and others (△). Others indicates the samples except from HF, SL and ZC three samples. The enrichments were incubated at 15°C (A) and 35°C (B). Values are the mean of three replicates indicating the amount of methane accumulated in the head spaces of the culture bottles, error bars (where visible) represent the standard deviation, the same below.

复杂环境。通过加入外源接种物能够提高产气量, 这为外源菌强化煤层气开采提供一定的理论依据。同时表明, 添加外源接种物以后能够刺激微生物含量低、原本不产气的煤样在不同程度上产生生物气。

#### 2.4 底物刺激对不同煤样厌氧降解产气的影响

选择 HF、XL 及 NLM 3 处煤样, 分别添加产甲烷古菌生长所必需底物 ( $H_2$ 、乙酸钠和甲醇)。通过 210 d 厌氧富集培养, 在 2 个温阶培养下, 添加  $H_2$ 、乙酸钠的 HF 煤样各组产气增加趋势明显, 说明 HF 煤样本源微生物可能以氢营养型和乙酸营养型产甲烷古菌为主。在 15°C、35°C 温度条件下, XL 和 NLM 煤样在添加相应底物后, 210 d 培养过程中均未产气 (未列出), 在无机盐条件下富集培养, XL、NLM 两组也均未有甲烷的积累产生 (图 3), 这可能是由于该 2 处煤样所在煤层本源微生物含量低, 不

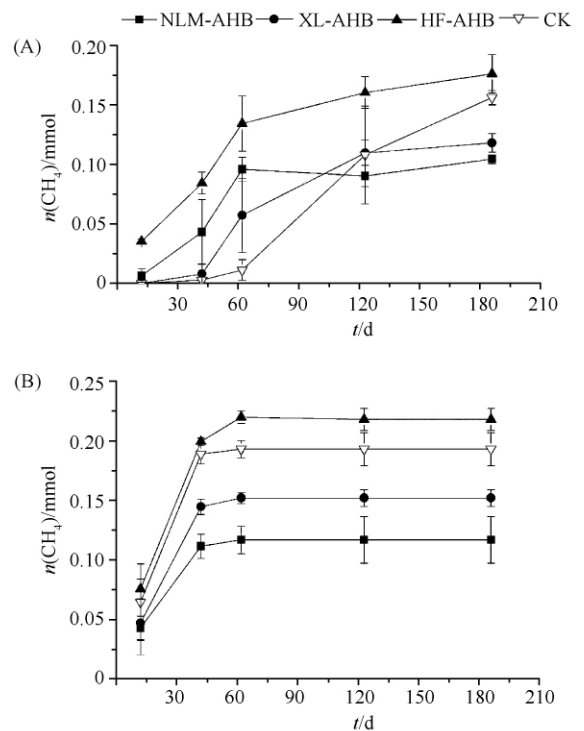


图 2. 添加外源接种物生物强化试验产气趋势图

Figure 2. Methane production of bioaugmentation experiment with addition of a microbial consortium during incubation time. Culture temperature at 15°C (A), at 35°C (B) respectively, NLM-AHB (■), XL-AHB (●) and HF-AHB (▲) with anaerobic hydrocarbons degradation enrichments respectively, CK group (▽) indicates the anaerobic cultures with only addition of anaerobic hydrocarbons enrichments and without any coal samples.

是生物成因气富集成藏区有关。

从图 4 可以看出, 无机盐培养条件下, HF 煤样 15°C 培养较 35°C 条件下产气量高 4.45  $\mu\text{mmol/g}$ , 结合 HF 煤样取样所在煤层温度 (15°C), 可能与该地层原位微生物最适生长温度有关。采用生物强化法, 即添加外源厌氧降解接种物, 在 35°C 培养条件下产气量高于 15°C, 这主要可能是因为添加的外源接种物最适生长温度为 35°C 中温条件, 外源微生物更加适于参与煤样的降解, 与不添加外源接种物的无机盐组相比, 甲烷产量显著增加约 8.72 mmol/g。15°C 培养条件下采用生物强化手段甲烷产量较无机盐培养差异不明显。

HF 煤样在添加外源碳源刺激情况下, 其产气量较无机盐组均有不同程度增加。35°C 培养条件下, 添加  $H_2$  刺激组最为明显, 较无机盐组产气量高出 30.87  $\mu\text{mmol/g}$ , 增加约 2.3 倍。添加  $H_2$ /甲醇/乙

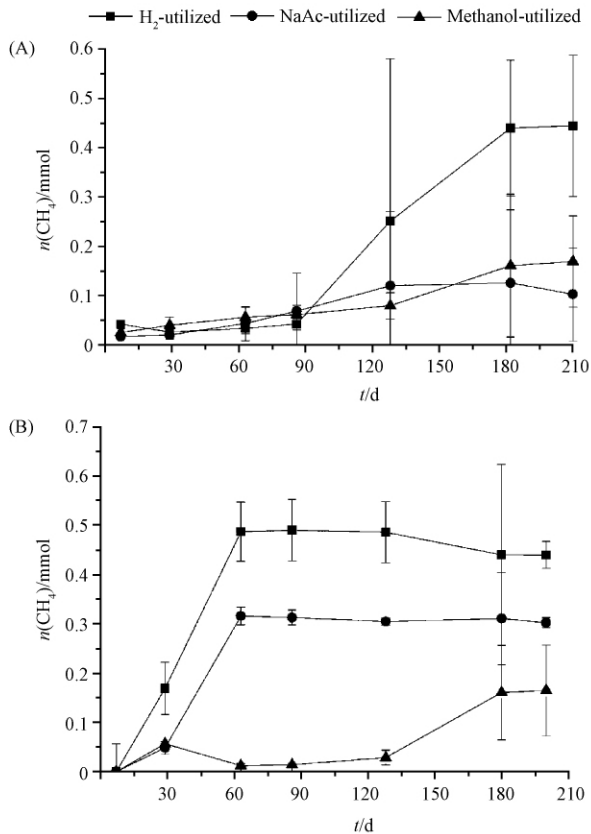


图 3. 添加不同底物微生物厌氧降解产气趋势图

Figure 3. Methane production of biostimulation experiments by adding different nutrients during cultivation over time. The incubation temperature at 15°C (A) and 35°C (B), H<sub>2</sub>-utilized (■), NaAc-utilized (●) and methanol-utilized (▲) indicates the medium with the H<sub>2</sub>, NaAc and methanol addition respectively.

酸钠 3 组产气量均高于无机盐富集培养(图 4)。乙酸钠刺激组, 35°C 培养条件产气量高于 15°C 条件下, 可能该地层以中温乙酸营养型产甲烷古菌为主, 但这一观点提出还需要相关分子生物学实验结果予以支撑。

## 2.5 气体组分及甲烷碳同位素分析

对生成的气体进行分析, 其所产气体成分主要为 CH<sub>4</sub> 和 CO<sub>2</sub>, 没有检测到重烃气体。文献报道模拟实验产生的甲烷碳同位素比值的变化范围在 (-40‰) - (-111‰),  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  值受生母质、形成机制、生气环境等因素影响<sup>[22]</sup>。从所产生的气体组成和  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  值, 可看出各处理组产生的甲烷属厌氧生物降解气。从实验结果上看, 无机盐富集组在没有外源菌介入情况下, 煤炭内源菌可以启动煤炭的生物降解产生生物气。所产生的生物气也呈现一定

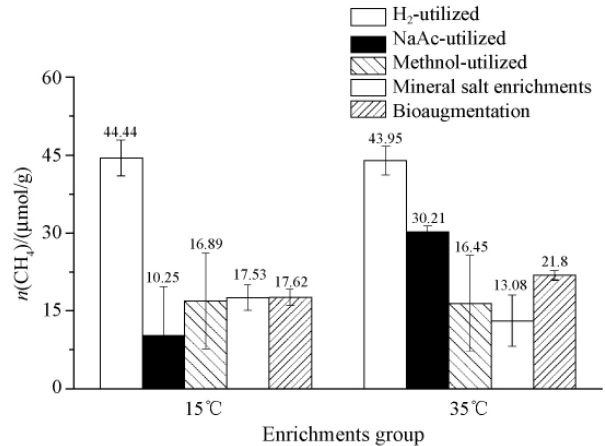


图 4. HF 煤样不同组处理生气潜力比较

Figure 4. Comparison of methane generated in different groups (HF sample).

规律, 如 HF、ZC 两处煤样, 所在煤层温度为 15°C, 无机盐 15°C 富集培养较 35°C 富集培养, 所产生的生物气更“轻”, 产生这种原因可能与微生物最适生长温度、降解基质有关; SL 煤样所在煤层温度为 20°C, 无机盐 15°C 和 35°C 富集培养产生的生物气碳同位素比值差异不大。生物强化组中, 所产生  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  较重, 为 (-44.07‰) - (-48.47‰), 产生这种差异的原因可能与石油烃所生成的生化甲烷较煤层偏重<sup>[22]</sup>, 人工驯化菌种结构单一, 只能利用煤炭某一种基质, 而原位甲烷菌更能适应煤层环境, 对同位素偏轻基质更易利用。测定各处理组  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  见表 5。

表 5. 煤炭富集实验甲烷碳同位素测试结果

Table 5. Final results of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  coals enrichments

Treatments	Sample name	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} / (\text{‰ PDB})$	
		15°C	35°C
Mineral salt enrichments	HF	-54.85	-49.73
	SL	-48.71	-49.80
	ZC	-78.07	-66.94
Bioaugmentation	CK	-44.07	-44.19
	NLM-AHB	-47.72	-48.47
	XL-AHB	-47.29	-47.41
	HF-AHB	-48.37	-47.95
Biostimulation	H <sub>2</sub> -utilized	-60.28	-59.83
	NaAc-utilized	-52.27	-54.39
	methanol-utilized	-62.48	-61.16

The values are the mean of three replicates respectively.

## 2.6 高通量测序结果分析

选取 HF、SL 和 ZC 3 个样品, 由于 HF、ZC 提取样品所含生物量低等原因, 仅 SL 样品通过 454 测序质量检测, 这与无机盐培养条件下, SL 在 15°C、35°C

表 6. SL 煤样微生物多样性指数覆盖率表

Table 6. Comparison of diversity estimators and coverage for SL coal sample

Domain	No. of sequences	No. of OTUs	Average read length	Converge	Chao1
Archaea	1866	158	491	0.971	236.79
Bacteria	8500	448	523	0.912	769.08

富集产气趋势及产气量均高于 HF、ZC 2 组, 也间接反映了 SL 煤样所含生物量较高。将 454 高通量测序得到的原始序列通过 RDP 数据库剔除低质量序列, 去除引物序列和标签序列, 分别获得 1866 条古菌序列、8500 条细菌序列。以序列相似性  $\geq 97\%$  作为 OTU 分类标准, 细菌和古菌分别可分为 448、158 个 OTUs。其测序结果信息见表 6。通过 RDP 10 数

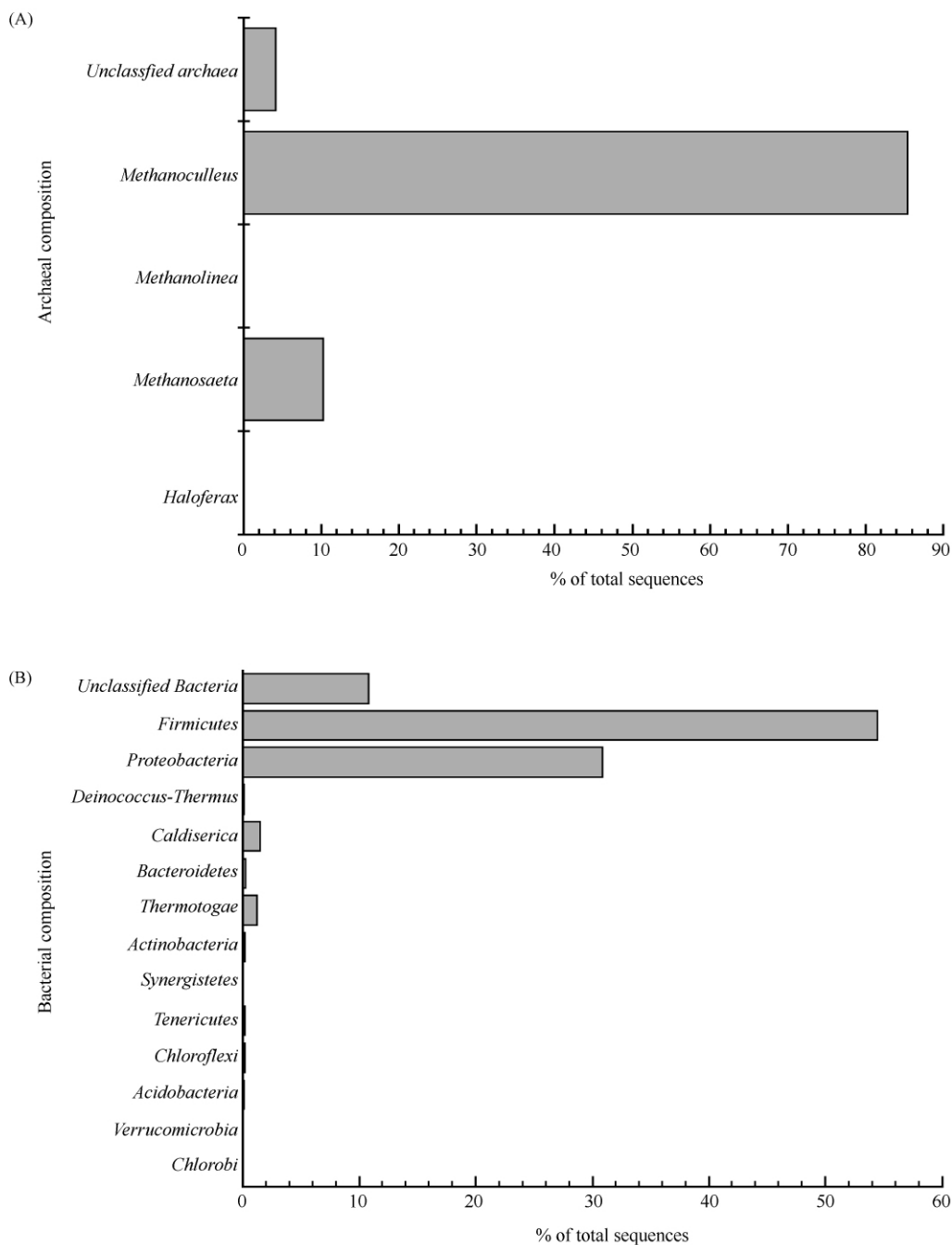


图 5. 高通量 454 测序古菌群落 (A) 细菌群落 (B) 系统分类学分析

Figure 5. Phylogenetic classification for the pyrosequencing analysis with archaeal composition (A) and bacterial composition (B).

数据库 Classifier, 以置信度 95% 计算各优势菌群相对数目<sup>[23]</sup>。SL 煤样中古菌类群都属于广古菌门, 其中 85.4% 的序列属于 *Methanoculleus*, 这个属的产甲烷古菌是氢营养型的, 能还原二氧化碳产生甲烷<sup>[24-25]</sup> (见图 5-A), 其次乙酸营养型产甲烷古菌 *Methanosaeta*, 占总序列数目 10.2%, 该 2 种类型的产甲烷古菌在我国鄂尔多斯盆地煤层、煤层水微生物学研究中都有所报道<sup>[19, 26]</sup>。未培养古菌类群占 4.1%, 甲烷绳菌属 *Methanolinea* 占 0.1%<sup>[27-28]</sup>, 极端嗜盐微生物类群 *Haloferax* 属占 0.1% (图 5-A)。

SL 样品检测到的细菌主要类群依次为厚壁菌门 *Firmicutes* (54.4%)、变形菌门 *Proteobacteria* (30.9%)、未培养微生物 (10.8%)、新发现的细菌门 *Caldiserica* (1.5%) 及热袍菌门 *Thermotogae* (1.3%)。其中, 厚壁菌门主要是以氨基酸杆菌属 *Acidaminobacter* 为主, 占厚壁菌门序列总数的 88.3% (图 5-B)。检测到的变形菌门微生物类群主要包括互营菌科 *Syntrophaceae* 下 *Smithella* 属和 *Desulfovibrio* 属, 分别占变形菌门细菌序列总数的 44.9% 和 31%。在多处煤层气盆地中都有报道变形菌门微生物是主要细菌类群<sup>[19, 26, 29]</sup>。微生物对难降解化合物的互营代谢已成为近几年国际上研究的热点, 目前认识到的具有互营代谢能力的厌氧细菌划分在 3 个门 (厚壁菌门、变形菌门及热袍菌门), 3 个纲 ( $\delta$  变形菌纲、梭菌纲及热袍菌纲), 8 个目, 10 个科, 16 个属中<sup>[30]</sup>。

关于难降解化合物 (如原油、芳香族化合物等) 的微生物厌氧降解研究中, Jones 等发现在中温原油降解产甲烷富集物中的细菌克隆文库中, *Syntrophus* spp. 是主要的微生物类群, 占总文库的 18%<sup>[31]</sup>。Gray 等通过 qPCR 技术研究证实 *Syntrophus* spp. 的倍增时间 (36 d) 与甲烷的产生趋势吻合, 推测这类微生物在原油降解产甲烷过程中起着重要的作用<sup>[32]</sup>。早先研究报道在煤藏<sup>[19, 33]</sup>、油藏<sup>[15, 34]</sup> 和煤焦油废水<sup>[35]</sup> 中都有互营菌报道。具有互营代谢功能的细菌在 SL 煤样中占有较高丰度, 这或许说明在煤藏厌氧环境下, 该类微生物有可能是参与原煤降解产气的关键微生物类群。

### 3 讨论

从内源菌无机盐富集、底物刺激及生物强化 3

个角度来研究原位煤样次生生物气产气速率及产量, 为研究在人为干预下不同成熟度原煤的产气规律及潜力提供理论支持。在研究初期, 国内外研究者一致认为埋藏浅、空隙大的低煤阶原煤是生物成因气的主要来源<sup>[20, 36]</sup>, 中、高煤化度的烟煤和无烟煤中的有机质因已失去生物活性, 可能不存在次生生物气生成的物质条件, 但本次试验得出高成熟度的原煤 (如 HF 样品  $R_0 = 1.91\%$ ) 依然能够在厌氧条件下, 不添加外源接种物和有机营养情况下, 通过无机盐培养基富集煤内源菌生长, 并利用煤中有机质降解产生生化甲烷, 这就提出不同成熟度的煤是否都能被微生物作用降解产生生物气的疑问。国外实验室通过添加外源营养刺激 (底物刺激) 及添加外源接种物 (生物强化, 降解氯代物富集培养物 WBC-2), 提出厌氧降解煤产甲烷过程是一个生化与微生物群落相互间作用的过程, 添加外源接种物能够刺激原本不产生物气的样品产生生物气<sup>[21]</sup>, 同样地通过人工干预手段提高微生物对难降解化合物作用产气研究也应用于原油降解<sup>[37]</sup>。添加实验室驯化的产甲烷条件下原油厌氧降解富集物 (AHB), 接种物大部分细菌克隆属于 5 个系统进化类群: 未培养的 WWE1 (4.8% - 36.7%)、*Clostridiales* (8.9% - 22.8%)、*Spirochaetales* (7.2% - 10.1%)、*Thermotogaceae* (4.8% - 6.3%) 和 *Proteobacteria* (5.1% - 6.3%), 古菌以乙酸营养型产甲烷古菌 (*Methanosaeta*、*Methanomicrobia*) 和氢营养型产甲烷古菌 *Methanomicrobiaceae* 为主<sup>[15]</sup>, 我们发现稳定的烃降解富集物的介入能够不同程度上刺激本源微生物对煤样厌氧降解产气能力 (如 HF 煤样)。通过添加底物刺激, 发现 HF 煤样在添加  $H_2$  或乙酸钠后, 产气趋势明显, 该地区样品可能主要以这 2 类产甲烷古菌为主, 但这一观点还需要分子生物学手段进一步提供支撑。基于传统微生物 DNA 提取手段或者试剂盒来说, 很难成功从煤炭中提取到高质量的 DNA, 并用于后续分子生物学分析。这主要是因为其所含的生物量低, 以及煤炭中含有较高浓度的腐植酸、富里酸、金属离子及抑制因子。在本试验起初, 通过古菌常用引物对 (Arc 109F/Arc 915R) (表 3) 未能获得 16S rRNA PCR 产物, 这与生物量、PCR 扩增效率和引物的偏好性有直接关系<sup>[19, 38]</sup>。



## 4 结论

本文首次结合地域及矿藏特点, 选定 10 处不同生气潜力及成熟度 ( $R_0$ ) 煤样进行厌氧富集培养试验。虽然早在 20 世纪末, 国外学者提出过利用本源菌强化煤层气开采的想法<sup>[6]</sup>, 但迄今为止国内外鲜见该方面研究成果报道。生物强化法, 驯化适应性强、能够降解大分子物质的功能菌系, 对于增强原位低产气量及难勘探开发利用的煤藏或许是条有效途径。

454 测序分析结果得出 SL 样品细菌类群主要以厚壁菌门 *Firmicutes* 和变形菌门 *Proteobacteria* 为主, 可能原位地质微生物与氢营养型为主的产甲烷古菌通过互营代谢作用产生甲烷, 互营菌可能在煤藏厌氧环境下降解产甲烷过程中起着重要。目前报道的煤层产甲烷古菌以  $CO_2$  还原型为主, 并且还存在着乙酸营养型产甲烷古菌, 但也有学者认为甲基营养型代谢方式是低成熟度煤岩转化生成甲烷的重要代谢途径<sup>[39]</sup>。随着高通量 454 测序技术的普及, 可以更加全面认知煤层微生物群落结构、功能菌群特征等, 这将为更加深入地研究微生物煤层甲烷降解代谢提供指导。

## 参考文献

- [1] Moore TA. Coalbed methane: A review. *International Journal of Coal Geology*, 2012, 101 (1): 36-81.
- [2] 王爱宽. 褐煤本源菌生气特征及其作用机理. 中国矿业大学博士论文, 2010.
- [3] Jones EJP, Voytek MA, Warwick PD, Corum MD, Cohn A, Bunnell JE, Clark AC, Orem WH. Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal Geology*, 2008, 76 (1-2): 138-150.
- [4] Lin C, Li Y, Qi B. Research status and exploration potential of biogenic gas. *Journal of Palaeogeography*, 2006, (3): 317-330. (in Chinese)  
林春明, 李艳丽, 漆滨汶. 生物气研究现状与勘探前景. 古地理学报, 2006, (3): 317-330.
- [5] Zhou C, Tao Z, Yang Z, Yuan X, Zhu R, Hou L, Jia J, Wang L, Wu S, Bai B, Gao X, Yang C. New advance in unconventional petroleum exploration and research in China. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2012, 31 (4): 312-322. (in Chinese)
- [6] Scott CD, Strandberg GW, Lewis SN. Microbial solubilization of coal. *Biotechnology Progress*, 1986, 2 (3): 131-139.
- [7] Faiz M, Hendry P. Significance of microbial activity in Australian coal bed methane reservoirs—A review. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology*, 2006, 54 (3): 261-272.
- [8] 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.
- [9] Beckmann S, Krüger M, Engelen B, Gorbushina AA, Cypionka H. Role of bacteria, archaea and fungi involved in methane release in abandoned coal mines. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28 (4): 347-358.
- [10] Beckmann S, Lueders T, Krüger M, von Netzer F, Engelen B, Cypionka H. Acetogens and acetoclastic *Methanosarcinales* govern methane formation in abandoned coal mines. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (11): 3749-3756.
- [11] Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, USA. *International Journal of Coal Geology*, 2008, 76 (1-2): 34-45.
- [12] Krüger M, Beckmann S, Engelen B, Thielemann T, Cramer B, Schippers A, Cypionka H. Microbial methane formation from hard coal and timber in an abandoned coal mine. *Geomicrobiology Journal*, 2008, 25 (6): 315-321.
- [13] Li M, Zhang H, Liu H, Zhang H, Deng Y, Lian L, Yin X. Advances in simulated test of biogas. *Oil & Gas Geology*, 1996, 17 (2): 117-122. (in Chinese)  
李明宅, 张洪年, 刘华, 张辉, 邓宇, 连莉文, 尹小波. 生物气模拟试验的进展. 石油与天然气地质, 1996, 17 (2): 117-122.
- [14] Li M, Zhang H. Coal gas generation by anaerobic degradation. *Natural Gas Industry*, 1998, 18 (2): 20-22-23. (in Chinese)  
李明宅, 张辉. 煤的厌氧降解产气作用. 天然气工业, 1998, 18 (2): 20-22-23.
- [15] Cheng L, Rui J, Li Q, Zhang H, Lu Y. Enrichment and

- dynamics of novel syntrophs in a methanogenic hexadecane-degrading culture from a Chinese oilfield. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83 (3) : 757-766.
- [16] Widdel F, Boetius A, Rabus R. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. *The Prokaryotes: Ecophysiology and Biochemistry*, 2006 (2) : 1028-1049.
- [17] Peng J, Lü Z, Rui J, Lu Y. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (9) : 2894-2901.
- [18] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (12) : 5685-5689.
- [19] Guo HG, Liu RY, Yu ZS, Zhang HX, Yun JL, 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 (1) : 56-61.
- [20] Strupar D, Mastalerz M, Dawson K, Macalady J, Callaghan AV, Wawrik B, Turich C, Ashby M. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2011, 39 (1) : 617-656.
- [21] Jones EJP, Voytek MA, Corum MD, Orem WH. Stimulation of methane generation from nonproductive coal by addition of nutrients or a microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (21) : 7013-7022.
- [22] Dai J. The characteristic carbon and hydrogen isotope and identification of different kinds of natural gas. *Natural Gas Geoscience*, 1993, 4 (Z1) : 1-40. (in Chinese)  
戴金星. 天然气碳氢同位素特征和各类天然气鉴别. *天然气地球科学*, 1993, 4 (Z1) : 1-40.
- [23] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (16) : 5261-5267.
- [24] Cheng L, Qiu TL, Li X, Wang WD, Deng Y, Yin XB, Zhang H. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 285 (1) : 65-71.
- [25] Surakasi VP, Wani AA, Shouche YS, Ranade DR. Phylogenetic analysis of methanogenic enrichment cultures obtained from Lonar Lake in India: isolation of *Methanocalculus* sp. and *Methanoculleus* sp. *Microbial Ecology*, 2007, 54 (4) : 697-704.
- [26] Tang YQ, Ji P, Lai GL, Chi CQ, Liu ZS, Wu XL. Diverse microbial community from the coalbeds of the Ordos Basin, China. *International Journal of Coal Geology*, 2012, 90-91 (1) : 21-33.
- [27] Imachi H, Sakai S, Sekiguchi Y, Hanada S, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H. *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58 (1) : 294-301.
- [28] Singh D, Kumar A, Sarbhai M, Tripathi A. Cultivation-independent analysis of archaeal and bacterial communities of the formation water in an Indian coal bed to enhance biotransformation of coal into methane. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93 (5) : 1337-1350.
- [29] Li D, Hendry P, Faiz M. A survey of the microbial populations in some Australian coalbed methane reservoirs. *International Journal of Coal Geology*, 2008, 76 (1-2) : 14-24.
- [30] McInerney MJ, Struchtemeyer CG, Sieber J, Mouttaki H, Stams AJM, Schink B, Rohlin L, Gunsalus RP. Physiology, ecology, phylogeny and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125 (1) : 58-72.
- [31] Jones DM, Head IM, Gray ND, Adams JJ, Rowan AK, Aitken CM, Bennett B, Huang H, Brown A, Bowler BFJ, Oldenburg T, Erdmann M, Larter SR. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 2008, 451 (7175) : 176-180.
- [32] Gray ND, Sherry A, Grant RJ, Rowan AK, Hubert CRJ, Callbeck CM, Aitken CM, Jones DM, Adams JJ, Larter SR, Head IM. The quantitative significance of *Syntrophaceae* and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes. *Environmental Microbiology*, 2011, 13 (11) : 2957-2975.
- [33] Shimizu S, Akiyama M, Naganuma T, Fujioka M, Nako M, Ishijima Y. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology*, 2007, 5 (4) : 423-433.
- [34] Gieg LM, Duncan KE, Sufliata JM. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (10) : 3022-3029.
- [35] Bakermans C, Madsen EL. Diversity of 16S rDNA and

naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microbial Ecology*, 2002, 44 (2) : 95-106.

- [36] Zhang X, Tao X, Wang W, Duan Y, Shi B. Generation of biogenic coalbed gases and its significance to resources. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2004, 23 (2) : 166-171. (in Chinese)

张小军, 陶明信, 王万春, 段毅, 史宝光. 生物成因煤层气的生成及其资源意义. *矿物岩石地球化学通报*, 2004, 23 (2) : 166-171.

- [37] Stallwood B, Shears J, Williams PA, Hughes KA. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas*

sp. from maritime Antarctica. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99 (4) : 794-802.

- [38] Penner TJ, Foght JM, Budwill K. Microbial diversity of western Canadian subsurface coal beds and methanogenic coal enrichment cultures. *International Journal of Coal Geology*, 2010, 82 (1-2) : 81-93.

- [39] Straupč D, Ashby M, Wood L, Levinson R, Huizinga B. How specific microbial communities benefit the oil industry: Significant contribution of methyl/methanol-utilising methanogenic pathway in a subsurface biogas environment//Whitby C, Skovhus TL. *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems*. New York:Springer, 2011: 211-216.

## Methane-generating potential of coal samples with different maturity

Qiao He<sup>1</sup>, Chen Ding<sup>1</sup>, Guizhong Li<sup>3</sup>, Hao Cheng<sup>3</sup>, Lei Cheng<sup>1,2</sup>, Hui Zhang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China

<sup>3</sup> Langfang Branch, PetroChina Exploration and Development Research Institute, Langfang 065007, China

**Abstract:** [Objective] To evaluate coal bed methane production potential and characterize the *in situ* microbial communities of coal bed. [Methods] Coal samples were incubated under anaerobic conditions: mimicking coal bed condition, supplementing with methanogenic hydrocarbon degrading consortium, or adding with exogenetic substrate. Methane production was observed over time using gas chromatograph, and the *in situ* bacterial and archaeal communities were revealed using pyrosequencing. [Results] Enrichment incubation revealed that 3 of total 10 coal samples microcosms produced methane; bioaugmentation and substrate addition could enhance methane production of coal sample HF. Hydrogenotrophic *Methanoculleus* and acetoclastic *Methanosaeta* dominated the archaeal community of coal sample SL, while the bacterial domain was mainly composed of *Firmicutes* (54.4%), *Proteobacteria* (30.9%), uncultured bacteria (10.8%), *Caldiserica* (1.5%) and *Thermotogae* (1.3%). [Conclusion] The methane production potential of coal bed samples with different maturity is different; the *in situ* coal bed microcosms are likely involved in hydrocarbons degradation and methane production.

**Keywords:** coal-bed methane, biostimulation, bioaugmentation, high-throughput sequencing

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science and Technology Major Project (2011ZX05033-005) and by the CNPC CBM No. 1 Project about "Enrichment Rule Research and Favorable Zone Prediction Evaluation of Coalbed Methane"

\* Corresponding author. Tel: +86-28-85258573; Fax: +86-28-85215106; E-mail: zhanghuits@aliyun.com

Received: 16 April 2013/Revised: 23 May 2013