

文章编号:2095-6134(2015)01-001-08

综 述

生物成因煤层气形成的微生物分子生态学研究进展^{*}

郭红光^{1,2}, 余志晟^{1†}, 魏 敏¹, 张洪勋¹

(1 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049; 2 太原理工大学矿业工程学院, 太原 030024)

(2014 年 3 月 31 日收稿; 2014 年 6 月 30 日收修改稿)

Guo H G, Yu Z S, Wei M, et al. Research progress on molecular microbial ecology associated with the formation of biogenic coal bed methane[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2015, 32(1): 1-8.

摘 要 生物成因煤层气广泛分布于全球煤层气田, 是煤层气研究的重点. 微生物是生物成因煤层气形成的关键因素. 生物成因煤层气相关微生物分子生态学研究, 将有助于解析生物成因气的形成机理, 促进煤层气的开采和开发, 具有潜在的研究和应用价值. 本文分析微生物在生物成因煤层气生成中的作用, 总结当前国内外关于煤层气田原位微生物多样性研究方面的最新进展, 旨在为生物成因气相关微生物多样性研究及煤层气产业的可持续发展提供参考.

关键词 煤层气; 生物成因气; 微生物多样性; 产甲烷菌

中图分类号: Q938.1 文献标志码: A doi: 10.7523/j.issn.2095-6134.2015.01.001

Research progress on molecular microbial ecology associated with the formation of biogenic coal bed methane

GUO Hongguang^{1,2}, YU Zhisheng¹, WEI Min¹, ZHANG Hongxun¹

(1 College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

2 College of Mining Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract Biogenic coal bed methane (CBM) has been detected in various CBM fields in the world, and microorganisms are the key factors for its formation. Studies on the molecular microbial ecology associated with biogenic CBM are highly valuable, and will improve the understanding of the formation mechanism of biogenic CBM and promote the exploitation of CBM. We summarize the role of microorganisms in the formation of biogenic CBM and the latest developments of *in situ* microbial diversity in CBM fields worldwide. The present work is valuable for further studies on biogenic CBM and the sustainable development of CBM industry.

Key words coal bed methane; biogenic methane; microbial diversity; methanogen

^{*} 国家自然科学基金(21177153)、太原理工大学引进人才科研启动经费(tyutrc-201250a)和太原理工大学 2013 校青年基金(2013Z015)资助

[†] 通信作者, E-mail: yuzs@ucas.ac.cn

煤层气 (coal bed methane, CBM) 俗称瓦斯, 是指以吸附态为主、游离态为辅, 赋存于煤层中以甲烷为主要成分的一种自生自储的非常规天然气。煤层气产业的发展, 不仅是新能源开发利用的必然趋势, 能够改善能源供给结构, 有效缓解化石能源供应不足的能源危机, 同时也是煤矿安全开采和环境保护的客观要求, 具有重大经济、社会和环境意义。近年来, 世界上各产煤大国相继加入到煤层气开发利用当中, 美国已实现煤层气的大规模商业化开发。中国煤层气的井下抽采和地面开采利用也非常活跃, 煤层气产量逐年增大。煤层气开发在山西柳林、山西晋城、河北大城、陕西韩城、鄂南等地都先后取得重大突破, 特别是煤层气勘探的热点地区鄂尔多斯盆地和沁水盆地。

煤层气不仅存在热成因, 同样存在生物成因。生物成因气通常被认为是在微生物的作用下, 通过降解煤来产生的。生物成因气的提出对煤层气开采起到了巨大的推动作用。通过激活煤层原位微生物可以促进煤层气的再生, 从而增加煤层气储量, 延长煤层气田的开采年限; 同时微生物降解煤能够增加煤层的渗透性, 提高煤层气的回采率; 而且煤层微生物能够将回注的二氧化碳转化为甲烷被再次利用, 使得能源循环利用成为可能。因而, 研究生物成因煤层气的生成过程具有积极的理论和实践指导意义。

生物成因气的生成是一个煤生物降解产甲烷的过程, 其中包含了多种代谢功能的微生物菌群。煤层气田原位微生物群落多样性的研究正是研究煤层原位微生物结构、功能, 解析微生物降解煤机理的重要方法。本文介绍生物成因气的生成机理, 总结国内外关于煤层气田生物成因气相关微生物分子生态学尤其是微生物多样性研究的历史、现状及进展情况, 展现了当前煤层气田微生物多样性研究的前沿、热点。

1 煤层气的生物成因

1.1 生物成因煤层气的提出

煤层气的生物成因最初由 Rightmire^[1] 在对美国含煤盆地的煤层气研究后提出。此后, Rice^[2] 根据煤层气的同位素组成和煤岩 Ro 值, 也提出煤层气中含有生物气^[2]。Scott 等^[3] 在前人基础上, 针对煤化作用早期阶段的生物成因气, 提出次生生物成因甲烷, 即次生生物成因煤层气。至此,

生物成因气的来源、分类基本确定。原生生物成因煤层气是在煤化作用早期阶段, 由相对低温和浅埋深的泥炭沼泽环境中的泥炭或低煤级煤, 通过微生物分解等一系列复杂过程所生成。由于泥炭或低变质煤中的孔隙很有限, 加之埋藏浅、压力低, 对气体的吸附作用也弱, 故一般认为原生生物成因气不能被大量地保留在煤层, 当今煤层中存留的生物成因气大部分属于次生生物成因气。次生生物成因气是煤系地层在成煤后因构造运动被抬升并剥蚀到近地表, 含菌地表水下渗进入煤层, 在相对低的温度下, 煤化过程中产生的湿气、正烷烃及其他有机物经微生物降解和代谢作用而生成的。

1.2 生物成因煤层气的生成机理

生物成因气是指在相对低的温度 (一般小于 50℃) 条件下, 在微生物的参与或作用下, 通过降解煤来产生的、以甲烷为主的气体。煤是杂环大分子化合物, 主要为芳香族及木质素衍生的包含氮、硫、氧的复杂碳水化合物, 可以作为碳源被微生物降解利用^[4]。目前, 普遍采用微生物降解复杂有机物产甲烷的代谢模型来解释煤的生物降解产甲烷。即, 复杂有机物 (煤) 中的聚合物或单体化合物首先被发酵、分解为脂肪酸、有机酸、醇类等化合物; 然后这些中间代谢产物被进一步降解, 形成产甲烷底物, 如 CO₂、H₂、乙酸等简单化合物; 最后在产甲烷菌的作用下产生甲烷 (图 1)。其中, 生物降解煤产甲烷的最后一步, 即甲烷的生成是比较清晰的。产甲烷菌在煤层中生成甲烷的机理与其在其他生境中一致。根据产甲烷菌的产甲烷机理, 将生物成因煤层气分为氢营养型 (二氧化碳还原型)、乙酸营养型和甲基营养型。

虽然, 煤的好氧生物降解的第一步很有可能是由生物溶解作用和胞外酶的解聚作用催化完成的^[6]。然而, 煤的厌氧降解过程中, 煤分子的断裂、大分子的煤降解为小分子化合物的机理等, 还没有形成统一认识。已有研究通过分析煤层气田产出水中的有机物, 煤中的可萃取有机物以及产甲烷培养实验中的有机物, 发现了部分潜在的煤生物降解中间产物, 推动了生物降解煤机理研究。Orem 等^[7] 在煤样富集培养过程中检测到高浓度的 C₂₂ - C₃₆ 烷烃类和十六烷酸被释放出来。该研究组在一些煤层气田产出水中检测到单甲基烷烃和烷基环己烷, 指出产出水中的脂肪酸可能是由

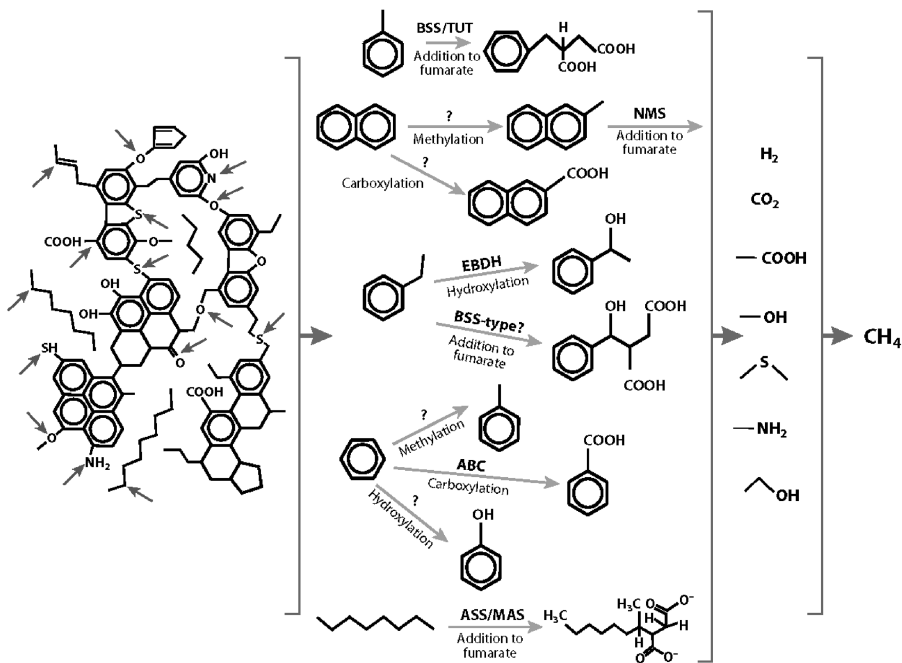


图 1 煤的生物降解过程及中间产物^[5]

Fig. 1 The process of coal biodegradation and the intermediates^[5]

脂肪族和环烃类化合物的生物降解而产生的^[8]。此外,芳香族化合物同样被报道存在于产出水、煤以及富集培养中,如 PAHs、苯二甲酸、酚类、联苯等^[7-9]。这些化合物可能是生物降解煤的中间代谢产物,能够被进一步代谢而产生甲烷底物,如乙酸、甲酸、甲醇、甲胺、CO₂、H₂ 等,进而由产甲烷菌生成甲烷。

煤的有机组分成分复杂,而且煤的疏水性和部分芳香族和木质素衍生的大分子限制了煤的生物降解。因此,煤的厌氧生物降解不可能由单一微生物实现,需要不同代谢功能的多种微生物菌群相互配合来完成。

2 煤层气田微生物多样性研究现状与进展

自上世纪 80 年代提出生物成因气的概念以来^[1],利用地球化学方法,如同位素检测、煤层气的气体组成分析等,世界各煤层气田不断检测到生物成因气的存在^[10-12]。甚至在某些煤层气田,生物成因气是该地区煤层气的一个主要来源^[13-15]。由此,现存煤层中是否存在与生物成因煤层气产生相关的微生物,它们的活性如何等问题成为研究者关注的焦点。特别是近年来,随着微生物分子生态技术的发展,煤层气田产出水和煤

样中微生物的分析,以及对地下煤层生物成因煤层气微生物学的机理认识都得到了极大促进和提高。

2.1 16S rRNA 基因文库技术

16S rRNA 基因克隆文库利用 DNA 序列的差异性,克服了微生物培养技术的限制,能够从分子水平层面揭示原位环境微生物种类和遗传多样性,已被广泛应用于分子生态学研究。该技术是煤层气田微生物多样性研究的主要技术手段,也是最为常见的分析方法,在揭示煤层气田产出水和煤中微生物多样性方面发挥了重要作用。

2007 年,Shimizu 等^[16]首次报道了煤层气田微生物多样性研究。他们选取日本北海道煤层气田煤层气及产出水为研究对象。通过地球化学方法测定了煤层气中的气体组成及稳定同位素,同时利用 16S rRNA 基因文库技术调查了产出水中的细菌和古菌的多样性。结果显示该地区的煤层气主要为热成因气,但产出水中存在氢营养型产甲烷菌 *Methanoculleus* 和甲基营养型产甲烷菌 *Methanobolus*,同时也检测出产甲烷菌的互养细菌,而且检测到产出水具有氢营养型和甲基营养型产甲烷能力。这一结果说明,该地区应该是存在生物成因气的,尽管主要为热成因气。

Li 等^[17]从澳大利亚东部 3 个煤层气田采集产出水及煤样, 16S rRNA 基因文库研究结果显示, 细菌以变形菌门 (*Proteobacteria*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*) 为主, 厚壁菌门中主要为梭菌目细菌 (*Clostridiales*)。古菌包含厌氧硫球菌属 (*Sulfophobococcus*)、古球菌属 (*Archaeoglobus*) 和热球菌属 (*Thermococcus*), 而没有检测到产甲烷菌; 而且, 产出水和煤中的微生物群落结构存在显著差异。Klein 等^[18]利用 16S rRNA 基因文库技术, 同样在 Power River 盆地发现, 目标煤层和产出水中的微生物群落结构存在显著差异。Midgley 等^[19]利用 16S rRNA 基因文库在澳大利亚的 Gippsland 盆地煤层气田的产出水中检测到细菌和古菌的存在; 细菌同样以变形菌门和厚壁菌门为主, 古菌只检测到甲烷杆菌属产甲烷菌 (*Methanobacterium*)。Strapčevic 等^[20]对美国伊利诺伊盆地东部煤层气田进行系统的地球化学研究后得出, 该地区的生物成因气主要是二氧化碳还原型; 同时, 16S rRNA 基因文库分析结果显示产出水和富集培养液中的产甲烷菌都以甲烷粒菌属 (*Methanocorpusculum*) 为主。该地区的细菌包括 α -*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Clostridia* 和 *Spirochaetes*。Fry 等^[21]利用 16S rRNA 基因文库技术在新西兰的 Waikato 煤田的煤样中检测到的产甲烷菌包括 *Methanosarcinales* 和 *Methanobacteriales*, 细菌包括 *Proteobacteria*、*Firmicutes* 和 *Bacteroidetes*。Penner 等^[22]在加拿大 Alberta 盆地采集煤芯样品, 利用 16S rRNA 基因文库技术检测原煤和产甲烷富集培养液中的微生物群落结构, 在原煤只检测到细菌 16S rRNA 基因序列, 而在培养液中检测到大量的细菌和古菌; 且原煤与富集培养液中的细菌群落存在较大差异, 培养液中的古菌以 *Methanosarcina* 属产甲烷菌为主。

在国内, 煤层气田微生物多样性相关报道还非常少。如, Tang 等^[23]从鄂尔多斯盆地 2 个煤矿中采集煤样, 利用 16S rRNA 基因克隆文库对其中的古菌、细菌群落多样性进行研究, 证实了产甲烷菌的存在。产甲烷菌以 *Methanosaeta* 属为主, 两个煤矿的细菌均以 *Proteobacteria* 和 *Actinobacteria* 为主。Guo 等^[24]研究鄂尔多斯盆地东缘的柳林煤层气田的微生物多样性, 16S rRNA 基因克隆文库结果显示, 产甲烷菌是产出水中的唯一古菌, 主要是甲基营养型产甲烷菌的甲烷叶菌属

(*Methanobolus*); 细菌中的发酵细菌、硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌在煤的生物降解中发挥作用, 以生成产甲烷菌的产甲烷底物。

2.2 高通量测序技术

常规克隆、测序技术存在克隆缺陷和有限的测序通量问题, 这会导致对微生物群落真实多样性的错误评价和低估^[25]。而高通量测序则较好地弥补了常规克隆、测序技术的不足, 在微生物生态研究方面应用广泛^[26-27]。部分学者利用高通量测序技术研究煤层气田微生物多样性。Guo 等^[28]采用 454 高通量测序技术研究柳林煤层气田产出水与储层煤岩中微生物群落结构的异同, 研究结果发现, 甲基营养型产甲烷菌的甲烷叶菌属 (*Methanobolus*) 是煤岩与产出水中的主要产甲烷菌, 而煤岩与水样的细菌群落之间存在较大差异。Wei 等^[29]研究湖北宜昌某煤矿煤样与矿井水样中的微生物多样性, 454 高通量测序研究结果显示, 煤与矿井水中的产甲烷菌以 *Methanosaeta* 和 *Methanosarcina* 为主, 同时检测到丰富的细菌, 以 *Rheinheimera* 和 *Hydrogenophaga* 为主。Barnhart 等^[30]设计了一种新型微生物采样器 (Diffusive Microbial Sampler, DMS), 利用这种新型采样器采集 Powder River 盆地煤层原位微生物, 高通量测序结果显示甲基营养型 *Methanobolus* 和氢营养型产甲烷菌 *Methanobacterium* 是煤层原位的主要产甲烷菌, 细菌以 β -*Proteobacteria* 为主, 其次为 *Firmicutes* 和 *Actinobacteria*; 而在富集培养实验中则检测到产甲烷菌 *Methanosarcina*、*Methanospirillum* 和 *Methanosaeta*。Dawson 等^[31]利用 16S rRNA 高通量测序技术研究阿拉斯加州 Cook Inlet 盆地煤层气田产出水中的微生物多样性, 发现产甲烷菌主要为 *Methanobolus* 和 *Methanosarcina*, 细菌主要为 *Firmicutes* 和 *Bacteroides*, 其中又以 *Acetobacterium* 和 *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidales* species (CFBs) 两类为主。

2.3 功能基因克隆文库

功能基因克隆文库技术利用某类微生物菌群基因组中的特殊生物标志物来研究环境中的特定微生物菌群多样性。这类特殊的生物标志物通常是该微生物菌群代谢过程中某些关键酶的编码基因。利用这些特殊生物标志物能够获取更加详实的微生物菌群结构和多样性。mcrA 功能基因即为产甲烷菌生成甲烷代谢过程中的关键酶——甲基

辅酶 M 还原酶的编码基因。该基因自 2002 年被发现能够用来对产甲烷菌进行系统发育研究以来^[32],在产甲烷菌的微生物生态学研究中的应用广泛,是研究产甲烷菌多样性的重要技术方法之一。但在煤层气田微生物多样性研究中的应用较少。仅 Fry 等利用 *mcrA* 功能基因文库技术在新西兰 Waikato 煤田煤样中检测到一些新的产甲烷菌群^[21]。

2.4 成像技术

利用成像技术能够直观显示微生物群落的原位状态、相互之间关系,同时能够根据发光、细胞形状和大小等特征对微生物进行鉴定。利用产甲烷菌在 420 nm 下自发蓝绿荧光的特性可以很方便地检测、鉴定产甲烷菌的存在。然而,已报道研究中却很少应用这一特性。Klein 等^[18]将产出水过滤到滤膜后,在 420 nm 紫外光下直接观察得到一簇自发荧光的细胞团,证实了产甲烷菌的存在。

此外,扫描电镜技术和荧光原位杂交技术也被应用于煤层气田微生物研究中。煤层气田产出水的扫描电镜(SEM)检测结果显示,产出水中含有大量煤粉,因而,产出水中的微生物群落分析能够反映出煤层原位的微生物群落结构^[5]。Strapoc 等在伊利诺伊盆地产出水的富集培养液中检测到,80%的细胞能够在 420 nm 紫外光下发出荧光;培养液的 SEM 图像显示这些细胞的形态相似,细胞直径在 0.4 μm 左右,说明富集获取的主要是一种产甲烷菌。Dawson 等^[31]利用 FISH 技术研究阿拉斯加州 Cook Inlet 盆地煤层气田产出水中的微生物多样性,研究结果与高通量测序结果一致,同时,FISH 图像直观显示出丝状的厚壁菌门细菌和棒状的醋酸杆菌属细菌缠绕在产甲烷菌周围,与产甲烷菌存在共生关系。

2.5 富集培养模拟及菌种分离研究

煤层气田微生物多样性研究中常利用富集培养技术结合气相色谱等检测手段以研究生物降解煤产甲烷潜能和影响因素。富集培养基的组分多基于产甲烷菌培养基改进而来。根据样品的不同,煤层气田微生物的富集培养可分为 2 种:其一,提供产甲烷底物以验证产出水中产甲烷菌的活性;其二,以煤为底物,实验室模拟生物降解煤代谢过程,检验微生物的煤降解能力及影响因素。

Shimizu 等^[16]即通过富集培养实验检测到产出水中的产甲烷菌具有氢营养型和甲基营养型产

甲烷能力,证实产出水中存在这 2 类产甲烷菌。Midgley 等^[19]研究发现,只有在添加产甲烷底物的情况下,Gippsland 盆地产出水中的产甲烷菌才能产生甲烷,而以煤为底物则没有检测甲烷的生成。Guo 等^[24]同样利用富集培养实验证实柳林煤层气田产出水中的产甲烷菌能够以甲醇为底物产生甲烷,属甲基型产甲烷类型,与基因文库技术的检测结果一致。Strapoc 等^[4]对伊利诺伊盆地煤层气田产出水进行厌氧培养,检测到显著的氢营养型产甲烷速率,同时测定了培养液中古菌细胞膜的 IPLs(Intact polar lipids)组成,与克隆文库结果一起证实了富集培养后的产甲烷菌主要为 *Methanocorpusculum*。

Harris 等^[33]发现,Powder River Basin 煤样的微生物在添加 H_2/CO_2 的情况下能够高速率产生甲烷,而在添加乙酸盐的情况下不生成甲烷。Green 等^[34]通过培养实验证实美国 Powder River 盆地煤层气田产出水中的微生物能够降解煤产甲烷,且升高温度、减小 pH、缩小煤颗粒以及添加 N,N-二甲基甲酰胺都会促进产出水中微生物降解煤产甲烷速率。同样是 Powder River 盆地,Ünal 等^[35]的研究发现,适中添加 8 种微量元素能够促进煤层气产出水中产甲烷菌活性、产甲烷能力,缺少或是过量添加微量元素都会抑制甲烷生成。Gupta P 和 Gupta A^[36]通过培养实验比较了牛粪便、水田土壤、白蚁和矿井水中微生物对煤的降解产气能力,发现矿井水中的微生物群落最适合用于煤的生物降解。而且,固液比、pH、煤粒度和培养温度的最佳值分别为 1:10、7.0~7.5、25~60 μm 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

从煤或产出水中分离纯种微生物将为我们提供这一特定生境下微生物的形态、生理以及代谢等方面的详细信息。由于煤层气田是厌氧环境,菌种分离难度较大。目前,这方面研究的报道还很少。Doerfert 等^[37]从美国 Louisiana 的一个煤层气田产出水中分离得到一株甲基营养型产甲烷古菌。经鉴定,该产甲烷菌属于 *Methanolobus zinderi* sp. nov.,该菌株能够利用甲醇、甲胺,而不能利用甲酸盐、乙酸盐、氢气和二氧化碳。Shimizu 等^[38]在日本北海道煤层气田地下水中分离得到一株新的产甲烷菌 *Methanosarcina horonobensis* sp. nov.,该产甲烷菌能够利用甲醇、二甲胺、三甲胺、乙酸而不能利用甲胺、 H_2/CO_2 、甲酸等。

通过上述分子生态学方法,目前已对煤层气田的产出水样和目标煤层的煤样可能存在的微生物群落有了一定了解.产出水样是煤层气田微生物研究最常见的样品,因为煤层气普遍使用“排水法”开采,产出水很容易就得到.这也导致大部分煤层气相关微生物研究均着眼于煤层气产出水的微生物.与产出水相比,煤层微生物的研究要少得多,这是由于煤样采集的难度要大,需要专门的钻井设备,新鲜煤样的采集机会较小.然而,同一煤层气田产出水和煤样中的微生物多样性研究显示,产出水和煤中的微生物群落结构存在较大差异^[18, 28].这一研究结果显示,更加准确的煤层气田微生物群落结构分析需要产出水与储层煤样的同步研究.

上述研究也显示,各煤层气田的微生物多样性较低,尤其是产甲烷菌群落结构单一,甚至在一些煤层气田仅检测到一个属的产甲烷菌.然而,经过多年的积累,综合多个煤层气田的研究,也发现了不少的产甲烷菌,表 1 列出了已报道的产甲烷菌类型及检出地区.这些产甲烷菌主要包括 *Methanosarcina*、*Methanolobus*、*Methanobacteria*、*Methanocorpusculum*、*Methanosaeta*、*Methanococci*、*Methanoculleus* 和 *Methanoregula*;已检测到的产甲烷菌包括了所有 3 种产甲烷类型:氢营养型(即二氧化碳还原型)、乙酸营养型和甲基营养型.其中,以氢营养型产甲烷途径在煤层气田最为常见,乙酸营养型次之,而甲基营养型产甲烷途径最少,只在日本北海道煤层气田、美国 Cook Inlet Basin 以及中国山西柳林地区监测到^[16, 24, 39].在各煤层气田中,细菌均以变形菌门(*Proteobacteria*)为主,*Firmicutes*、*Spirochetes* 和 *Bacteroidetes* 也在煤层气田检出频率较高.

3 存在问题及研究方向

国内外学者对煤层气田原位微生物的研究已取得一定成果,为研究煤层气的生物生成途径、机理奠定了基础.但是,煤层气田微生物研究的深度、微生物功能和相互关系、生物成因气的生成机理和生成过程等研究仍比较薄弱,需要进一步加强,主要表现在以下几个方面:

第一,煤层气田微生物多样性研究的深度和广度仍需要进一步加强.目前,对原位微生物的种属鉴定多采用常规测序方法,不能很好地反映出

真实的原位微生物结构,需要引入新的技术,如高通量测序、DNA 微阵列等,以获取全面、系统的微生物群落信息.同时,多种分析方法的结合使用将丰富煤层原位微生物群落结构信息,如 16S rRNA 基因文库技术和功能基因文库技术相结合,获得微生物

表 1 已报道的煤层气田产甲烷菌
Table 1 The reported methanogens in CBM fields

产甲烷类型	产甲烷菌	盆地/地区	参考文献
氢营养型	<i>Methanoculleus</i>	日本北海道	[16]
		Gippsland 盆地	[19]
		Powder River 盆地	[30]
	<i>Methaobacterium</i>	印度某煤矿	[40]
		Powder River 盆地	[18]
		日本北海道	[16]
	<i>Methanocorpusculu</i>	伊利诺伊盆地	[4]
	<i>Methanobacteriales</i>	Waikato 煤田	[21]
		Alberta 盆地	[22]
	<i>Methanothermococcus</i>	Powder River 盆地	[18]
乙酸营养型	<i>Methanothermobacter</i>	印度某煤矿	[40]
	<i>Methanococcus</i>	Powder River 盆地	[18]
	<i>Methanosaeta</i>	鄂尔多斯盆地	[23]
		湖北宜昌某煤矿	[29]
		Powder River 盆地	[18]
		Powder River 盆地	[18]
	<i>Methanolinea</i>	印度某煤矿	[40]
甲基营养型	<i>Methanolobus</i>	日本北海道	[16]
		鄂尔多斯盆地	[24]
		Cook Inlet Basin	[39]
		Powder River 盆地	[30]
多种营养类型	<i>Methanosarcinales</i>	Waikato 煤田	[21]
		Alberta 盆地	[22]
		日本北海道	[16]
	<i>Methanosarcina</i>	湖北宜昌某煤矿	[29]
		鄂尔多斯盆地	[24]
		Powder River 盆地	[34]

群落结构概况的同时,分析生物降解煤产甲烷过程中关键微生物的多样性,以更好地理解原位微生物群落结构.扫描电镜与 FISH 技术相结合可以直观、清晰地展示出微生物与煤的空间关系、各微生物菌群之间的相互作用、联系.此外,利用 mRNA 反转录技术与磷脂脂肪酸图谱法(PLFAs)等技术能够获取煤层气田原位活性微生物的群落特征和多样性信息.

第二,煤层气田微生物功能需要深入研究.煤层气田的微生物多为不可培养,其代谢特征以及在煤降解中的作用尚不清楚.目前,多数学者只是利用微生物序列比对来推测可能的代谢功能,具

有很大的不确定性.一方面,煤层原位微生物的确切功能可以通过培养实验加以验证;另一方面,需要加大降解煤功能微生物的分离培养,以丰富煤层微生物资源,研究煤层特殊生境下的微生物代谢特征.此外,引入代谢组学和酶学研究,将有利于理解微生物原位功能.同时,研究这些微生物的真实功能还有待于环境微生物可培养技术的发展、创新.

第三,生物成因气的生成机理、过程仍需要深入研究.目前,对生物成因气的微生物学机理的认识还不足,仍然借用其他生境下的大分子化合物降解机理,对于厌氧条件下的生物降解煤产甲烷过程缺乏足够的认识.尤其是大分子煤断裂为小分子化合物是如何实现的还没有获得确切答案.可以通过中间代谢产物检测,建立生物降解煤中间代谢产物库,以分析可能的代谢途径;同时需要加强对不同煤阶煤的分子结构模型的建立,结合酶学检测研究煤分子断裂的方式、方法.

参考文献

- [1] Rightmire C T. Coalbed methane resource [C] // Coalbed methane resources of the United States. Tulsa: American Association of Petroleum Geologists. Studies in Geology Series, 1984, 17: 1-13.
- [2] Rice D D. Composition and origins of coalbed gas [C] // Hydrocarbons from coal. Tulsa: American Association of Petroleum Geologists. Studies in Geology Series, 1993, 38: 159-184.
- [3] Scott C D, Woodward C A, Scott T C. Use of chemically modified enzymes in organic solvents for conversion of coal to nliquides [J]. Catalysis today, 1994, 19(3): 381-393.
- [4] Strapóć D, Picardal F W, Turich C, et al. Methane-producing microbial community in a coal bed of the Illinois Basin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2 424-2 432.
- [5] Strapóć D, Mastalerz M, Dawson K, et al. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane [J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2011, 39: 617-656.
- [6] Fakoussa R, Hofrichter M. Biotechnology and microbiology of coal degradation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(1): 25-40.
- [7] Orem W H, Voytek M A, Jones E J, et al. Organic intermediates in the anaerobic biodegradation of coal to methane under laboratory conditions [J]. Organic Geochemistry, 2010, 41(9): 997-1 000.
- [8] Orem W H, Tatu C A, Lerch H E, et al. Organic compounds in produced waters from coalbed natural gas wells in the Powder River Basin, Wyoming, USA [J]. Applied Geochemistry, 2007, 22(10): 2 240-2 256.
- [9] Ulrich G, Bower S. Active methanogenesis and acetate utilization in Powder River Basin coals, United States [J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76 (1/2): 25-33.
- [10] Aravena R, Harrison S, Barker J, et al. Origin of methane in the Elk Valley coalfield, southeastern British Columbia, Canada [J]. Chemical Geology, 2003, 195(1-4): 219-227.
- [11] Martini A M, Walter L M, Ku T C W, et al. Microbial production and modification of gases in sedimentary basins: A geochemical case study from a Devonian shale gas play, Michigan basin [J]. AAPG bulletin, 2003, 87 (8): 1 355-1 375.
- [12] Montgomery S L, Barker C E, Seamount D, et al. Coalbed methane, Cook Inlet, south-central Alaska: A potential giant gas resource [J]. AAPG bulletin, 2003, 87(1): 1-13.
- [13] Faiz M, Hendry P. Significance of microbial activity in Australian coal bed methane reservoirs: a review [J]. Bulletin of Canadian Petroleum Geology, 2006, 54(3): 261-272.
- [14] Kotarba M J. Composition and origin of coalbed gases in the Upper Silesian and Lublin basins, Poland [J]. Organic Geochemistry, 2001, 32(1): 163-180.
- [15] Thielemann T, Cramer B, Schippers A. Coalbed methane in the Ruhr Basin, Germany: a renewable energy resource? [J]. Organic Geochemistry, 2004, 35 (11/12): 1 537-1 549.
- [16] 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.
- [17] Li D M, Hendry P, Faiz M. A survey of the microbial populations in some Australian coalbed methane reservoirs [J]. International Journal of Coal Geology, 2008, 76(1/2): 14-24.
- [18] Klein DA, Flores RM, Venot C, 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(1/2): 3-13.
- [19] Midgley D J, Hendry P, Pinetown K L, et al. Characterisation of a microbial community associated with a deep, coal seam methane reservoir in the Gippsland Basin, Australia [J]. International Journal of Coal Geology, 2010, 82(3/4): 232-239.
- [20] Strapóć D, Mastalerz M, Eble C, et al. Characterization of the origin of coalbed gases in southeastern Illinois Basin by compound-specific carbon and hydrogen stable isotope ratios [J]. Organic Geochemistry, 2007, 38(2): 267-287.
- [21] Fry J C, Horsfield B, Sykes R, et al. Prokaryotic populations

- and activities in an interbedded coal deposit, including a previously deeply buried section (1.6 ~ 2.3 km) above 150 Ma basement rock [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(3): 163-178.
- [22] Penner T, Foght J, 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.
- [23] Tang Y Q, Ji P, Lai G L, et al. Diverse microbial community from the coalbeds of the Ordos Basin, China [J]. *International Journal of Coal Geology*, 2012, 90-91: 21-33.
- [24] Guo H, Yu Z, Liu R, et al. Methylophilic methanogenesis governs the biogenic coal bed methane formation in Eastern Ordos Basin, China [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(6): 1 587-1 597.
- [25] Cheung M K, Au C H, Chu K H, et al. Composition and genetic diversity of picoeukaryotes in subtropical coastal waters as revealed by 454 pyrosequencing [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(8): 1 053-1 059.
- [26] Edwards R A, Rodriguez-Brito B, Wegley L, et al. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7(1): 57.
- [27] Schlüter A, Bekel T, Diaz N N, et al. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology [J]. *Journal of biotechnology*, 2008, 136(1/2): 77-90.
- [28] Guo H, Liu R, Yu Z, et al. Pyrosequencing reveals the dominance of methylophilic methanogenesis in a coal bed methane reservoir associated with Eastern Ordos Basin in China [J]. *International journal of coal geology*, 2012, 93: 56-61.
- [29] Wei M, Yu Z, Zhang H. Microbial diversity and abundance in a representative small-production coal mine of central China [J]. *Energy & Fuels*, 2013, 27(7): 3821-3829.
- [30] Barnhart E P, De León K B, Ramsay B D, et al. Investigation of coal-associated bacterial and archaeal populations from a diffusive microbial sampler (DMS) [J]. *International Journal of Coal Geology*, 2013, 115: 64-70.
- [31] Dawson K S, Strapáč D, Huizinga B, et al. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization analysis of microbial consortia from a biogenic gas field in Alaska's Cook Inlet Basin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(10): 3 599-3 605.
- [32] Luton P, Wayne J, Sharp R, 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): 3 521-3 530.
- [33] Harris S H, Smith R L, Barker C E. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals [J]. *International Journal of Coal Geology*, 2008, 76(1/2): 46-51.
- [34] Green M S, Flanagan K C, Gilcrease P C. 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.
- [35] Ünal B, Perry V R, Sheth M, et al. Trace elements affect methanogenic activity and diversity in enrichments from subsurface coal bed produced water [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 175.
- [36] Gupta P, Gupta A. Biogas production from coal via anaerobic fermentation [J]. *Fuel*, 2014, 118: 238-242.
- [37] Doerfert S N, Reichlen M, Iyer P, et al. *Methanolobus zinderi* sp. nov., a methylophilic methanogen isolated from a deep subsurface coal seam [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(5): 1 064-1 069.
- [38] Shimizu S, Upadhye R, Ishijima Y, et al. *Methanosarcina horonobensis* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface Miocene formation [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(10): 2 503-2 507.
- [39] Strapáč D, Ashby M, Wood L, et al. Significant contribution of methyl/methanol-utilising methanogenic pathway in a subsurface biogas environment [C] // *Applied microbiology and molecular biology in oilfield systems*. Berlin: Springer, 2010: 211-216.
- [40] Singh D N, Kumar A, Sarbhai M P, et al. Cultivation-independent analysis of archaeal and bacterial communities of the formation water in an Indian coal bed to enhance biotransformation of coal into methane [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012, 93(3): 1 337-1 350.