

doi:10.12029/gc20220830002

冀中地热区深部热水产甲烷菌群落多样性

甄世军^{1,2}, 赵佳怡^{1,2}, 张翠云^{1,2}, 殷密英^{1,2}, 张胜^{1,2}

(1. 中国地质科学院水文地质环境地质研究所, 石家庄 050061; 2. 中国地质调查局/河北省地下水污染机理与修复重点实验室, 石家庄 050061)

摘要:【研究目的】了解深部环境中产甲烷菌群落多样性是探索早期生命起源、极端环境生命和调控甲烷产量的基础。然而, 地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中产甲烷菌群落多样性仍然不清。

【研究方法】利用地热科学钻探孔抽水试验, 采集深部热水样用于产甲烷菌标记基因 *mcrA* 高通量测序, 分析冀中地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中的产甲烷菌群落多样性。【研究结果】结果显示, 从冀中地热区深部热水中共检出 3 个纲、4 个目、8 个属的产甲烷菌, 其中隶属于广古菌门、甲烷杆菌纲和甲烷杆菌目的甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter* 是产甲烷菌的主要类型, 占比 99.85%; 优势菌种是 *Methanothermobacter wolfeii* (相似性达 99%, 占比 71%), 产甲烷菌的主要代谢途径是 CO₂ 还原; 不同样品产甲烷菌群落多样性不尽相同, 但均以甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter* 为优势菌属, 占比均大于 99.77%。【结论】本文研究揭示了冀中地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中含有种类较丰富而组成极不均匀的产甲烷菌群落, 拓展了甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter* 的生境类型, 为进一步研究产甲烷菌在地球生态系统的功能奠定了科学基础。

关键词: 产甲烷菌群落; 多样性; 深部热水; 地热科学钻探; 地热地质调查工程; 冀中地热区;

创新点: 利用地热科学钻探孔抽水试验, 采集深部热水样用于 *mcrA* 高通量测序分析, 揭示了冀中地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中含有种类较丰富而组成极不均匀的产甲烷菌群落, 拓展了甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter* 的生境类型。

Diversity of methanogenic communities in the deep geothermal water from the Jizhong geothermal area, China

ZHEN Shijun^{1,2}, ZHAO Jiayi^{1,2}, ZHANG Cuiyun^{1,2}, YIN Miying^{1,2}, ZHANG Sheng^{1,2}

(1. The Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Shijiazhuang 050061 China; 2. Key Laboratory of Groundwater Contamination and Remediation, China Geological Survey & Hebei Province, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: [Objective] Understanding the diversity of methanogenic communities in the deep environment is the basis for exploring the origin of early life, extreme environmental life and regulating methane production. However, the diversity of methanogenic communities in the deep carbonate karst-fracture geothermal water is still unclear. [Methods] The deep geothermal water samples were collected for methanogenic marker gene *mcrA*-based high-throughput sequencing by the pumping tests performed in the geothermal scientific drilling holes located in the Jizhong geothermal area, China to explore the diversity of methanogenic communities in the deep carbonate rock karst-fracture geothermal water. [Results] Results showed that 3 classes, 4 orders and 8 genera of methanogenic communities were detected in the deep geothermal water, of which *Methanothermobacter*, belonging to Euryarchaeota, Methanobacteria and Methanobacteriales, was dominant methanogens, accounting for 99.85% of the

基金项目: 本文由中国地质调查局地质调查项目(DD20189112)和中国地质科学院水文地质环境地质研究所基本科研业务费专项(SK202010)联合资助。

作者简介: 甄世军, 男, 1990 年生, 硕士, 主要研究方向为地热地质微生物研究; E-mail: zhsj_1990@163.com。

通讯作者: 张翠云, 女, 1962 年生, 博士, 研究员, 从事地质微生物研究; E-mail: zcygeology@163.com。

total sequences. The dominant species based on *mcrA* was closely affiliated with *Methanothermobacter wolfeii* (similarity 99%, accounting for 71%). The metabolic pathway of methanogens was mainly the pathway of CO₂ reduction. The compositions of methanogenic communities in different samples were different, but *Methanothermobacter* was a dominant genus in all of the samples, accounting for more than 99.77%. **[Conclusions]** This study reveals that the deep geothermal water from the carbonate rock karst-fracture geothermal reservoirs contains relatively abundant but extremely uneven compositions of methanogenic communities and expands the habitat type of *Methanothermobacter*, which provides scientific basis for further studying the function of methanogens in the earth ecosystem.

Key words: methanogenic communities, diversity, deep geothermal water, geothermal scientific drilling, geothermal geological survey engineering, Jizhong geothermal area

Highlights: The deep geothermal water samples were collected by the pumping tests performed in the geothermal scientific drilling holes for *mcrA*-based high-throughput sequencing. This study reveals that the deep geothermal water from the carbonate rock karst-fracture geothermal reservoirs contains relatively abundant but extremely uneven compositions of methanogenic communities and expands the habitat type of *Methanothermobacter*.

About the first author: ZHEN Shijun, male, born in 1990, M.S., engaged in study of geothermal geomicrobiology. E-mail: zhsj_1990@163.com.

About the corresponding author: ZHANG Cuiyun, female, born in 1962, Ph.D., Research Fellow, engaged in study of geomicrobiology. E-mail: zcygeology@163.com.

Fund support: supported by China Geological Survey (No. DD20189112) and Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences (No. SK202010).

1 引言

产甲烷菌是一类将 H₂/CO₂ 或简单有机物(如甲酸、甲醇、乙酸、仲醇、甲基化合物)转化为甲烷的极端厌氧菌,是生命进化史上最古老的生命形式之一,广泛分布在各种缺氧环境中,积极参与碳元素生物地球化学循环(Conrad, 2009)。产甲烷菌代谢活动产生的甲烷,既是一种低碳能源(Strapoc et al., 2011; Wainaina et al., 2022),又是主要的温室气体(Rodhe, 1990)。因此,产甲烷菌自 1776 年被发现以来一直备受关注。深入了解产甲烷菌群落种类和组成的多样性是探究地球早期生命起源、极端环境生命和调控甲烷产量的基础。迄今为止,在各种环境中培养分离的产甲烷菌共有 7 个目(Methanobacteriales、Methanococcales、Methanocellales、Methanomicrobiales、Methanopyrales、Methanosarcinales 和 Methanomassiliicoccales)、15 科、35 属,150 多个种(承磊等, 2016; 冷欢等, 2020)。然而,由于产甲烷菌生长条件苛刻,大部分产甲烷菌难于培养分离,通过分离获得环境中产甲烷菌的多样性是困难的。

20 世纪 90 年代发展起来的分子生物学技术是免培养的微生物检测技术,不但能检测可培养菌,而且能检测不可培养菌,为环境微生物群落的多样性研究提供了有力工具。该技术通过检测样品微生物 DNA 中的特定基因片段快速识别微生物群落,这种特定的基因片段通常是 16S rRNA 基因或是功能基因。在检测产甲烷菌群落多样性时,功能基因更适合产甲烷菌群落的检测,因为功能基因直接与产甲烷代谢相关。目前已知产甲烷菌的代谢途径主要有 CO₂ 还原途径、乙酸发酵途径和甲基裂解途径。这 3 条代谢途径中,甲基辅酶 M 还原酶(MCR)是所有代谢途径产甲烷所必需的酶,它催化甲烷生成的最后一步,还原甲基基团辅酶 M 形成甲烷(Thauer, 1998),编码这种酶的核心基因是甲基辅酶 M 还原酶 α 亚基 *mcrA* (methyl coenzyme reductase subunit A)基因,出现在所有的产甲烷菌中,因此 *mcrA* 基因常被作为产甲烷菌的标记基因用于研究特定环境产甲烷菌群落的多样性。早期 *mcrA* 基因检测技术主要是克隆文库测序技术,该技术广泛用于各种环境中产甲烷菌群落多样性研究,如沼泽泥炭(Hales et al., 1996; Nercessian et al., 1999; Juottonen et al., 2006; 曾志华等, 2014)、土壤(Grosskopf et al., 1998; Lueders et al., 2001)、微咸湖沉积物(Banning et al., 2005)、热液沉积物(Dhillon et al., 2005)、地下深部结晶岩裂隙水(Moser et al., 2005; Nyssönen et al., 2014)、

消化池(Steinberg and Regan, 2008; Zhu et al., 2010)和动物瘤胃(Denman et al., 2007; Mi et al., 2019), 而近年快速发展的高通量测序技术较克隆文库技术能获得更大数据量, 可以快速、详细并且准确地了解产甲烷菌群落的多样性, 并已应用于煤层气田(杨秀清等, 2017)和土壤(Wang et al., 2020)。然而, 地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中产甲烷菌群落多样性研究鲜见报道。

冀中地热区蕴藏着丰富的地下热水资源, 目前主要开采 500-800 m 深的新近系孔隙砂岩热储层和 1500-1800 m 以浅的蓟县系雾迷山组上段碳酸盐岩岩溶-裂隙热储层中的热水。为了探测 1800 m 以下蓟县系雾迷山组下段和高于庄组碳酸盐岩岩溶-裂隙热储资源状况, 中国地质调查局自 2018 年起在河北省容城县、雄县和高阳县地热区实施了一批地热科学钻探孔(王贵玲等, 2018; 吴爱民等, 2018; 马峰等, 2020), 并进行了抽水试验。这些抽水试验为获取深部热水微生物样品提供了机会, 我们选取了部分钻探孔用于深部热水微生物群落研究。前期工作建立了硫酸盐还原菌微滴数字 PCR 检测技术, 用于深部热水硫酸盐还原菌定量检测(赵佳怡等, 2020), 进行了 16S rRNA 基因为目的基因的微生物群落组成和功能预测研究(赵佳怡等, 2021)。本次研究采用新一代 Illumina 高通量测序技术, 以 *mcrA* 基因为靶标进一步研究冀中地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中产甲烷菌群落多样性, 为提高地下深部微生物生命的认识和深部热水合理开发利用提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 样品采集和预处理

本文研究的地热科学钻探孔位于河北省保定市东北部约 50 km 处的容城县地热区, 4 个深部热水样 F4-1(115°49'42", 39°02'42")、F5-1、F5-2(115°55'53", 39°03'00")和 F6-1(115°52'59", 39°00'55")(图 1), 分别产自 3 个地热科学钻探孔抽水试验时的抽出水, 其中 2 个样品(F5-1、F5-2)产自同一钻孔的不同层位(1501~2151 m, 1068~1346 m), 井台泵口采样。地热科学钻探孔深度变化在 2506~2608 m 之间, 抽水试验出水层段主要为 1000 m 以下的碳酸盐岩岩溶-裂隙热储层, 采样深度变化在 1068~2518 m 之间。采样容器为 18 L 耐高温的无菌塑料桶, 利用哈希便携式测试仪进行现场测试, pH 值 6.77~7.49, T 56.0~61.6°C, EC 3981~5240 μS/cm。水样运回实验室后进行抽滤预处理, 按 4 L 水样过滤到孔径为 0.22 μm 的多片聚四氟乙烯滤膜上, 将带有过滤物的滤膜置于无菌培养皿中-70°C 冰箱保存备用。

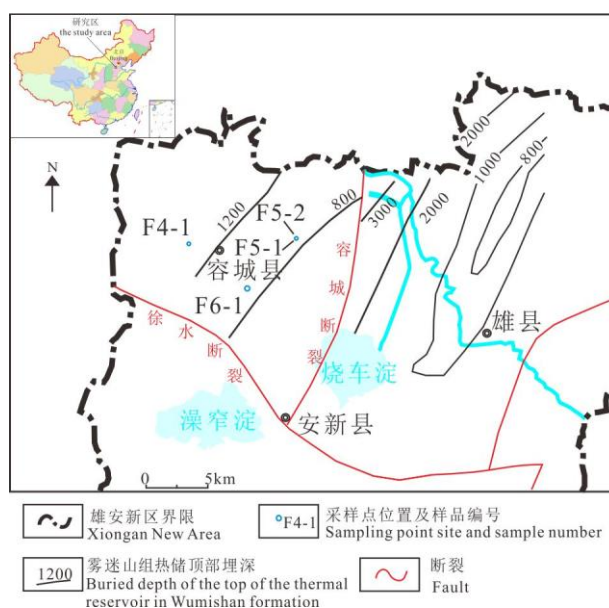


图 1 研究区采样点分布图

Fig. 1 Sampling point map of the study area

2.2 高通量测序

深部热水的膜过滤样品, 送往上海美吉生物医药科技有限公司进行产甲烷菌标记基因 *mcrA* 高通量测序。采用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 试剂盒(Omega Bio-Tek, USA), 按说明书提取水样微生物总基因组 DNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 使用 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度和纯度, 其中深部热水 DNA 浓度范围 7.00~23.60 ng/μl。使用引物对: MLf (5'-GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWACAGC-3') 和 MLr (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT -3') (Luton et al., 2002) 进行 *mcrA* PCR 扩增。扩增仪为 ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪, DNA 聚合酶为 TransStart® Fastpfu DNA Polymerase (TransGen, 北京), 20 μl PCR 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μl; 2.5mM dNTPs 2 μl; 前后引物 (5μM) 各 0.8 μl; FastPfu DNA Polymerase (2.5 U/μl) 0.4 μl; Template DNA 10 ng; ddH₂O 补足 20 μl。先预实验确定最小循环数, 最终 PCR 反应扩增程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 45 s, 37 个循环; 72 °C 10 min, 10 °C 保育无穷。每样设置三个重复。扩增产物取 3 μl 于 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。扩增结果均为 A, 指示 PCR 产物目的条带大小正确, 浓度合适, 可进行后续实验。将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 纯化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 试剂盒建立 MiSeq 文库。Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行高通量测序。

2.3 数据处理

将高通量测序获得的原始数据, 使用 Fastp 和 Flash 软件进行质控, 去掉低质量序列, 获得优化序列。使用 Usearch 软件, 按 97% 的相似度对序列进行分类最小单元 OTU (Operational Taxonomic Units) 聚类并剔除嵌合体。使用 RDP classifier 软件对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 比对数据库为 *fgr/mcrA*, 比对阈值为 70%, 并按照最小样品序列数进行抽平处理, 分别在各个分类学水平统计各样品的群落物种组成, 以及各个类群在总样品的平均数计算各个类群所占总样品的百分比。

利用 Mothur 软件计算抽平后样品 OTU 水平的 Alpha 多样性指数 Sobs、Ace、Chao1、Shannon 和 Coverage。依据分类学分析结果, 利用 R 语言分别绘制所有样品的 OTU、属、目、纲水平群落相对丰度饼图以及各样品的 OTU 和属水平柱状图、韦恩图和 PCoA 图。将样品 OTU 序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对, 获得 OTU 与已知菌种相似性、基因序列等有关信息, 并使用 MEGA 11.0 软件, 绘制所有样品的 OTU 系统发育进化树。除了进化树绘制和 BLAST 比对外, 上述所有分析均在美吉生物云平台上操作。

3 结果与分析

3.1 高通量测序结果评估

4 个深部热水样产甲烷菌群落标记基因 *mcrA* 高通量测序, 获得双向测序的原始序列 109153*2 条, 平均长度 411 bp, 经质控过滤后, 获优化序列 109153 条, 去单序列和嵌合体后, 获有效序列 106962 条, 以 97% 相似度聚类划分分类单元 OTU, 产生 25 个 OTU。样品的序列覆盖度 Coverage 很高, 均达到 100%(表 1), 说明本次测序量足够大, 能够反映样品产甲烷菌群落的真实情况。

3.2 深部热水产甲烷菌群落多样性指数分析

产甲烷菌群落丰富性采用 Sobs、Ace 和 Chao1 指数表示, 数值越大, 丰富性越高; 产甲烷菌群落多样性用 Shannon 指数表示, 数值越大, 多样性越高。以最小样本序列数 23376 抽平后计算, 4 个深部热水的产甲烷菌群落多样性指数计算结果如表 1 所示。样品的产甲烷菌群落丰富性指数 Sobs、Ace 和 Chao1, 分别变化在 2~19, 0.00~19.43, 2~19 之间, 多样性指数 Shannon 变化在 0.67~1.83

之间，其中样品 F5-2 的多样性指数数值最大，而样品 F5-1 的最小，指示前者的多样性最高，而后的多样性最低，其原因可能是不同层位深度和岩性差异导致的，样品 F5-1 采样层位深度 1501~2151 m，热储层岩性为长城系大红峪组玄武岩和白云岩，而样品 F5-2 采自其上的更浅层位 (1068~1346 m)，热储层岩性为蓟县系高于庄组白云岩，采样层位深度越深，岩石变质程度越大，微生物多样性越低，符合微生物多样性随深度变化的一般规律。

表 1 冀中地热区深部热水样 α 多样性指数

Table 1 Alpha-diversity indices of deep geothermal water samples from the Jizhong geothermal area

Sample ID	Sobs	Ace	Chao1	Shannon	Coverage
F4-1	8	8.00	8	1.41	1.00
F5-1	2	0.00	2	0.67	1.00
F5-2	19	19.43	19	1.83	1.00
F6-1	12	12.69	12	0.88	1.00

3.3 深部热水产甲烷菌群落组成分析

为了解本区深部热水的产甲烷菌群落组成，对4个样品共25个OTU进行了系统发育分类分析(图2)。由图2可见，在OTU水平上，优势OTU为OTU17和OTU13，其序列数分别占4个样品的总序列数的45.66%和30.61%。在属水平上，25个OTU归于8个菌属，其中优势属为甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter*，占4个样品总序列的99.85%；其它菌属均<0.1%，这些菌属是甲烷杆菌属 *Methanobacterium* (0.06%)、甲烷食甲基菌属 *Methanomethylovorans* (0.04%)、甲烷八叠球菌属 *Methanosarcina* (0.03%)、甲烷袋状菌属 *Methanoculleus* (0.01%)、甲烷短杆菌 *Methanobrevibacter* (0.003%)、未分类的甲烷八叠球菌科 unclassified-Methanosarcinaceae(0.01%)和未分类的热源体纲 unclassified-Thermoplasmata (0.01%)。在目水平上，这些OTU归属于4个目，分别为甲烷杆菌目 *Methanobacteriales* (99.91%)，甲烷八叠球菌目 *Methanosarcinales* (0.07%)、甲烷微菌目 *Methanomicrobiales* (0.01%) 和未分类的热源体纲 unclassified-Thermoplasmata (0.01%)。在纲水平上，这些OTU归属于3个纲，分别为甲烷杆菌纲 *Methanobacteria* (99.91%)，甲烷微菌纲 *Methanomicrobia* (0.08%) 和热源体纲 *Thermoplasmata* (0.01%)，这些纲均属广古菌门 *Euryarchaeota*，古菌域 *Archaea*。

综上所述，本区深部热水产甲烷菌类群较丰富，共检出3个纲、4个目、8个属的产甲烷菌，但其群落组成极不均匀，其中隶属于广古菌门、甲烷杆菌纲和甲烷杆菌目的甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter* 是产甲烷菌的主要类型，占比达99.85%。

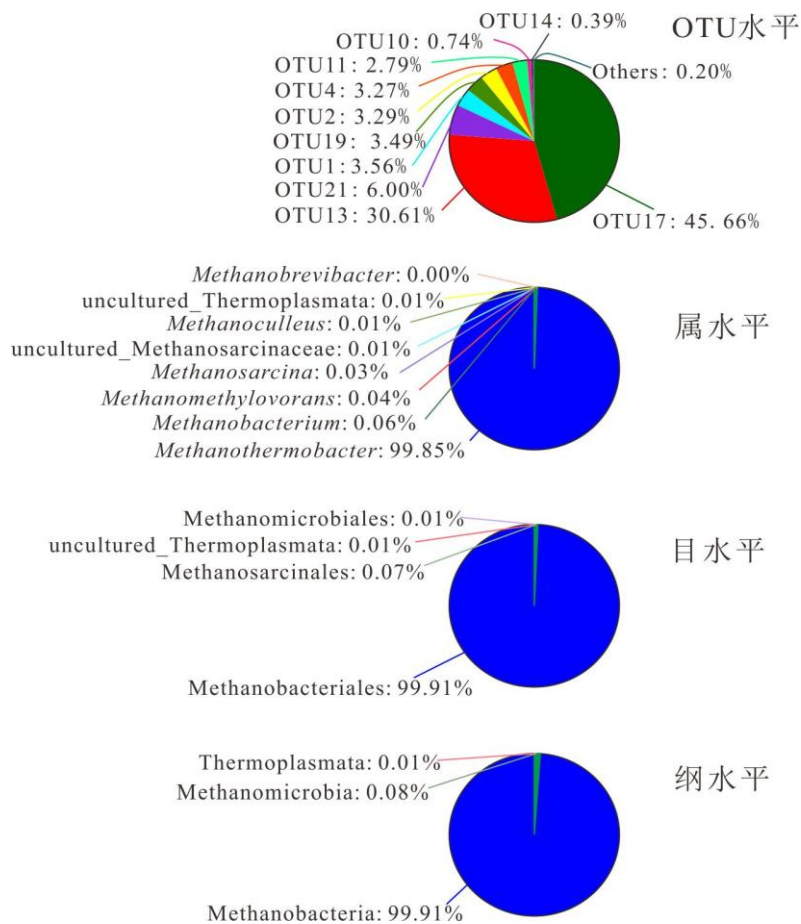


图2 冀中地热区4个深部热水样OTU、属、目和纲水平产甲烷菌群落组成

Fig.2 Compositions of the methanogen communities at OTU, genus, order and class level from 4 deep geothermal water samples of the Jizhong geothermal area.

3.4 深部热水产甲烷菌群落系统发育分析

为了进一步明确本区深部热水OTU与已知菌种的亲缘关系，绘制了本区深部热水OTU(未包括OTU16，因其序列太短(221 bp))与已知菌种亲缘关系的系统发育进化树(图3)，并将OTU序列与已知菌种相似性列于表2。由图3和表2可见，优势OTU17和OTU13均与产甲烷菌菌种 *Methanothermobacter wolfeii* 的亲缘关系最近，序列相似性分别达到99.03%和99.02%，占总序列的71%。据Steinberg and Regan (2008)研究，产甲烷菌属内不同菌种之间 *mcrA* 基因序列相似性变化在69.3%~100%之间，均值为89%。若以序列相似性>89%为同一菌种，而<89%为新菌种，则OTU17和OTU13均属于 *Methanothermobacter wolfeii* 菌种。与已知菌种相似性>89%的其它OTU还有OTU21、OTU1、OTU19、OTU2、OTU4、OTU11、OTU10、OTU14、OTU3、OTU22、OTU25、OTU23、OTU16、OTU12、OTU20、OTU7、OTU18、OTU15、OTU8和OTU9，共有20个OTU菌种类型被识别，其中OTU21和OTU1均属 *Methanothermobacter marburgensis* 菌种，占总序列的10%。另外，OTU5、OTU6和OTU24与未培养菌序列相似性较已知菌种的相似性更高，但是这些OTU与已知菌种的序列相似性也>89%，因此，这些OTU菌种类型也被识别，如OTU5与已知菌种 *Methanosarcina thermophila* (AB353225) 的序列相似性为95%，故OTU5与 *Methanosarcina thermophila* 为同一菌种。同理，OTU6与 *Methanomassiliicoccus luminyensis* (HQ896500) 为同一菌种(相似性90%)，OTU24与 *Methanoculleus thermophilus* (AB300783) 为同一菌种(相似性96%)。综上

所述，本区深部热水含有种类较丰富而组成极不均匀的产甲烷菌，其中优势产甲烷菌菌种为 *Methanothermobacter wolfeii* (占总序列的71%)，其次是 *Methanothermobacter marburgensis* (10%)。

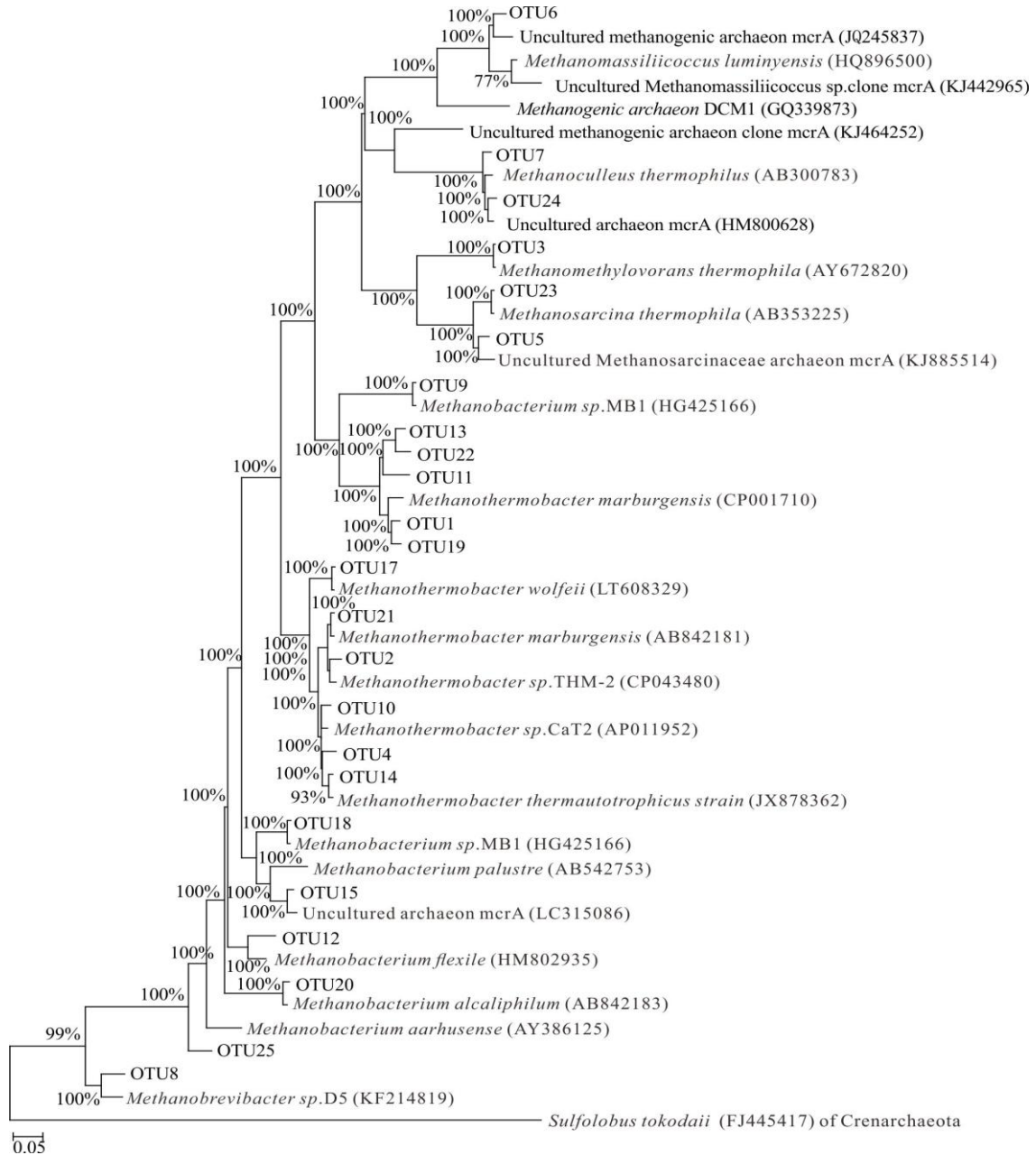


图3 冀中地热区深部热水 *mcrA* 基因的系统发育进化树。

OTU标记为 *mcrA* 基因代表序列，括号内编号为已知菌种的序列登录号，标尺0.05为5%的核苷酸替换频率，节点百分数为自展分析 (Bootstrap 1000次) 的支持率，以泉古菌成员 *Sulfolobus tokodaii* (FJ445417) 为外群。

Fig.3 Phylogenetic tree based on *mcrA* gene fragment from the deep geothermal water of Jizhong geothermal area

The scale bar represents 5% substitutions per nucleotide sequence position. Percentage at nodes represents the supporting percentage by bootstrap analysis with 1000 iterations. Member *Sulfolobus tokodaii* (FJ445417) of Crenarchaeota was used as the outgroup.

表2 冀中地热区深部热水*mcrA*的OTU与已知菌种的亲缘关系

Table 2 Phylogenetic affiliations of *mcrA*-based OTUs from the deep geothermal water of Jizhong geothermal area with known species

OTU	序列数 (条)	已知菌种	序列号	覆盖 长度 (bp)	相似性 (%)	E 值
OTU17	42687	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	LT608329	412	99.03	0.0
OTU13	28615	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	LT608329	410	99.02	0.0
OTU21	5610	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	AB842181	412	99.51	0.0
OTU1	3330	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	CP001710	412	96.13	0.0
OTU19	3265	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	CP001710	412	95.15	0.0
OTU2	3079	<i>Methanothermobacter sp. Thermobacter THM-2</i>	CP043480	411	97.81	0.0
OTU4	3053	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	JX878362	387	95.35	4e-176
OTU11	2611	<i>Methanothermobacter sp. CaT2</i>	AP011952	410	97.56	0.0
OTU10	689	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	JX878362	387	95.61	3e-172
OTU14	365	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	JX878362	387	97.93	0.0
OTU3	38	<i>Methanomethylovorans thermophila</i>	AY672820	433	100.00	0.0
OTU22	31	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	LT608329	410	96.34	0.0
OTU25	28	<i>Methanobacterium aarhusense</i>	AY386125	412	89.56	6e-152
OTU23	24	<i>Methanosarcina thermophila</i>	AB353225	433	100.00	0.0
OTU16	15	<i>Methanomassiliicoccus Luminyensis</i>	HQ896500	32	100.00	1e-04
OTU12	11	<i>Methanobacterium flexile</i>	HM802935	414	92.75	6e-175
OTU20	10	<i>Methanobacterium alcaliphilum</i>	AB842183	412	98.30	0.0
OTU5	7	Unclassified_Methanosarcinaceae	KJ885514	433	95.84	0.0
OTU6	6	Uncultured Methanomassiliicoccus sp.	KJ442965	319	92.48	5e-128
OTU7	4	<i>Methanoculleus thermophilus</i>	AB300783	436	97.02	0.0
OTU18	4	<i>Methanobacterium sp. MB1</i>	HG425166	412	100.00	0.0
OTU15	3	<i>Methanobacterium palustre</i>	AB542753	412	90.05	8e-148
OTU8	3	<i>Methanobrevibacter sp. D5</i>	KF214819	409	92.91	1e-165
OTU9	2	<i>Methanobacterium sp. MB1</i>	HG425166	409	100.00	0.0
OTU24	2	Uncultured archaeon	HM800628	436	97.71	0.0

3.5 深部热水不同样品产甲烷菌群落差异性分析

为了进一步揭示不同样品的产甲烷菌群落组成的差异性，进行了各样品的对比分析。4个样品产甲烷菌群落OTU水平组成分布图（图4）显示，样品F4-1共检出8种OTU，其中OTU17和OTU13为优势OTU，其序列分别占该样品总序列的42%和26%；其次是OTU1、OTU2和OTU21，分别占比14%、13%和4%；样品F5-1共检出2种OTU，占比分别为60%和40%；样品F5-2检出的OTU最多，共有19种OTU，其中>10%的OTU为OTU17(28%)、OTU21(20%)、OTU21(19%)、OTU19(14%)、OTU4(13%)和OTU13(12%)；样品F6-1共检出11种OTU，其中优势OTU为OTU17和OTU13，占比分别为52%和44%。本区不同样品OTU组成不尽相同，说明各样品环境条件有差异。但是除了样品F5-2外，优势OTU均为OTU17和OTU13。

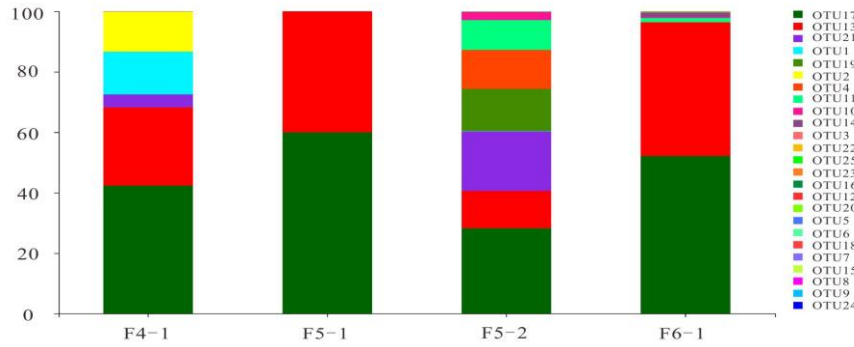


图4 冀中地热区深部热水不同样品mcrA基因的OTU组成

Fig.4 Compositions-based *mcrA* gene at OTU level from different samples collected from the deep geothermal water of the Jizhong geothermal area.

4个样品产甲烷菌群落属水平组成分布图(图5)显示, 样品F4-1共检出3种产甲烷菌属, 其中甲烷热杆菌属*Methanothermobacter*为优势产甲烷菌, 其序列占该样品总序列的99.82%, 其它菌属为甲烷食甲基菌属*Methanomethylovorans*和属未分类的热原体纲unclassified_Thermoplasmata, 占比分别为0.16%和0.02%; 样品F5-1的产甲烷菌全部为甲烷热杆菌属*Methanothermobacter* (100%); 样品F5-2检出产甲烷菌属类型最多, 共有6种, 分别为甲烷热杆菌属*Methanothermobacter* (99.81%)、甲烷杆菌属*Methanobacterium* (0.13%)、甲烷袋状菌属*Methanoculleus* (0.02%)、甲烷短杆菌属*Methanobrevibacter* (0.01%)、未分类的甲烷八叠球菌科unclassified_Methanosarcinaceae (0.02%) 和未分类的热源体纲unclassified_Thermoplasmata (0.004%), 其中甲烷热杆菌属*Methanothermobacter* 仍为优势菌属; 样品F6-1检出产甲烷菌属共有4种, 分别为甲烷热杆菌属*Methanothermobacter* (99.77%)、甲烷杆菌属*Methanobacterium* (0.13%)、甲烷八叠球菌属*Methanosarcina* (0.10%)和甲烷袋状菌属*Methanoculleus* (0.01%)。综上所述, 不同样品的产甲烷菌属水平组成不尽相同, 但是均以甲烷热杆菌属*Methanothermobacter* 为优势菌属, 占比均大于99.77%。

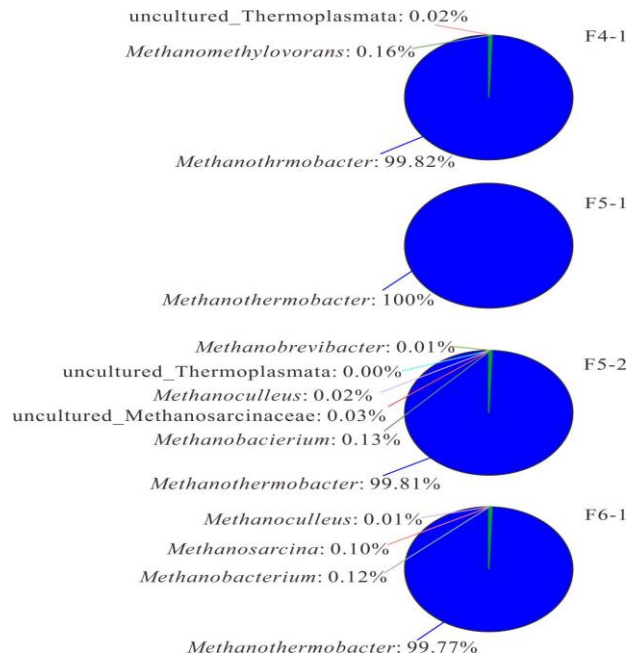


图5 冀中地热区深部热水不同样品mcrA基因的产甲烷菌群落属水平组成

Fig. 5 Composition of Methanogenic communities-based *mcrA* gene at genus level from different samples collected from the deep geothermal water of the Jizhong geothermal area

韦恩图(图6-A)显示,本区4个深部热水样25个OTU中,共有OTU仅有2个,为OTU17和OTU13,均为物种*Methanothermobacter wolfeii*;独有OTU样品F5-2最多,共有9个。PCoA图6-B显示,第一坐标轴对数据解释的贡献率为78.15%,第二坐标轴贡献率为20.85%,总计贡献率为99.00%,说明数据解释足够可靠。该图显示,样品点F5-1和F6-1分布距离短,这些点与样品点F4-1和F5-2距离大,说明样品F5-1和F6-1的产甲烷菌群落组成相似,而与样品F4-1和F5-2的差异较大,这一分析与不同样品OTU组成分析(图5)一致。

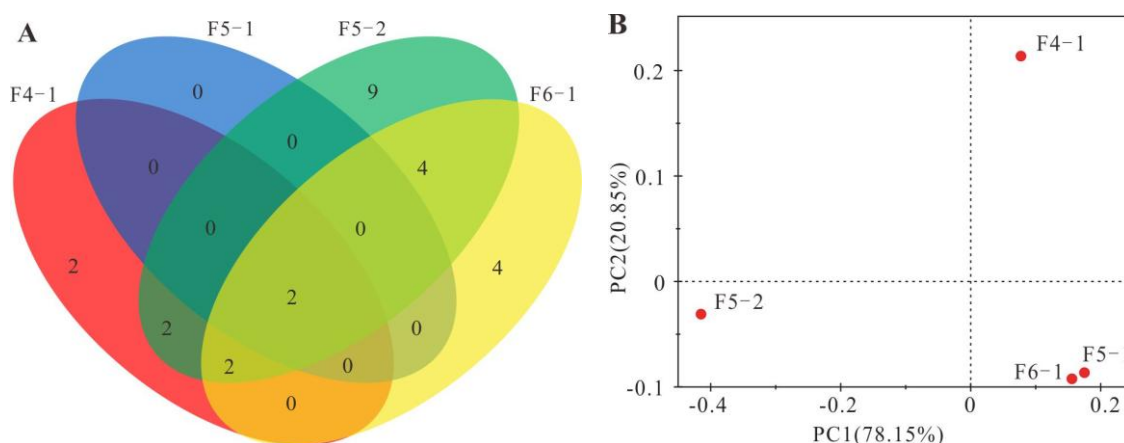


图6 冀中地热区深部热水不同样品 *mcrA* 基因的韦恩图 (A) 和 PCoA 图 (B) 产甲烷菌群落差异性分析

Fig.6 Methanogen community difference analysis using Venn plot (A) and PCoA plot (B) based on *mcrA* gene from different samples collected from the deep geothermal water of Jizhong geothermal area.

4 讨论

本次研究的目的是采用高通量测序技术,以*mcrA*基因为目的基因,探索深部热水的产甲烷菌群落多样性。高通量测序评估结果显示,4个样品的文库覆盖率均达100%,指示本次测序深度足以反映样品真实情况。4个样品共检出25个OTU,这些OTU归于8个属,优势菌属是甲烷嗜热杆菌属*Methanothermobacter*(占比99.85%)。优势OTU是OTU17和OTU13,均与*Methanothermobacter wolfeii*的相似性达99.00%,亲缘关系最近。甲烷嗜热杆菌属*Methanothermobacter*是一类专性厌氧菌,目前已发现8个种,即*M. crinale*, *M. defluvii*, *M. marburgensis*, *M. thermautotrophicus*, *M. thermoflexus*, *M. thermophilus*, *M. tenebrarum*和*M. wolfeii*(Hassa et al., 2019),分布在厌氧反应器、污水污泥、温泉和油气田中,其最佳生长温度55~70℃,能量代谢以H₂作为电子供体,将CO₂还原甲烷,一些菌种也能利用甲酸盐作为电子供体;模式菌株是*Methanothermobacter wolfeii*,其以H₂/CO₂或甲酸盐作为能源和碳源(Wasserfallen et al., 2000)。采样时4个样品的水温变化在56~62℃,优势产甲烷菌属的最佳生长温度符合其生长的环境温度。本次研究扩展了甲烷嗜热杆菌属*Methanothermobacter*的生境类型,该菌属可富集在地热区地下深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中。

本区深部热水非优势产甲烷菌群落菌属中,甲烷杆菌属*Methanobacterium*是嗜温氢营养产甲烷菌,某些菌株也能利用甲酸盐、仲醇和CO产甲烷,最佳生长温度37~45℃(Boone et al., 2001),OTU20与*Methanobacterium alcaliphilum*的序列相似性为98.30%,该菌种生长温度37℃,以H₂/CO₂为反应基质,该菌特点是能适应较高的pH值(8.1~9.1)(Worakit et al., 1986);OTU18与*Methanobacterium sp.* MB1序列相似性为100.00%,该菌特色是H₂营养,也能醋酸催化产生甲烷(Maus et al., 2013)。*Methanomethylovorans*菌属是以甲基化合物为碳源和能源的产甲烷菌,OTU3与*Methanomethylovorans thermophila*物种相似性达100.00%,该菌种是嗜热、厌氧、甲基化合物营

养的产甲烷菌, 生长温度42~58℃, 最佳温度50℃(Jiang et al., 2005)。*Methanosarcina* 菌属是能利用多种底物, 包括H₂/CO₂、醋酸、甲基化合物的产甲烷菌(Boone et al., 2001), OTU23与*Methanosarcina thermophila*物种相似性达100.00%, 该菌株分离自厌氧消化器, 最佳生长温度约50℃, 能利用醋酸、甲醇或甲基胺产生甲烷(Zinder et al., 1985; Jablonski et al., 1990)。*Methanoculleus* 菌属是以H₂/CO₂或甲酸盐为底物产生甲烷, 为嗜温或嗜热产甲烷菌, OTU7与*Methanoculleus thermophilus*的相似性为97.02%, 该菌最佳生长温度58℃(Rivard et al., 1982)。*Methanobrevibacter* 菌属是嗜温的、主要以H₂/CO₂为反应基质产生甲烷, 最佳生长温度37~40℃ (Lee et al., 2013), OTU8与*Methanobrevibacter sp. D5*的相似性仅92.91%。可见, 本区深部热水非优势产甲烷菌群落菌属大部分属于嗜热产甲烷菌, 营养类型除*Methanomethylivorans*菌属以甲基化合物为碳源和能源外, 其它菌属均能利用H₂/CO₂产甲烷。

本区深部热水优势产甲烷菌和大部分非优势产甲烷菌均是氢营养的产甲烷古菌, 因此, 产甲烷菌的主要代谢途径是CO₂还原。H₂的来源可能是有机质发酵产生的, 因为本区深部热水赋存于海相碳酸盐岩岩溶-裂隙热储中, 碳酸盐岩是沉积岩, 其中含有较丰富的有机质, 据报道, 中国海相碳酸盐有机质中的TOC含量变化在0.05%~0.20%之间(周新科等, 2009), 有机质在厌氧条件下发酵会产生H₂(Liu et al., 2008); H₂的来源也可能是地质成因(Worman et al., 2020), 如基性或超基性岩与水反应释放的H₂, 或者水的放射性裂解产生H₂, 还可能是地下深部地幔排放的还原性气体, 其中包括H₂, 具体是哪种来源还有待进一步研究。

本区深部热水检出产甲烷菌有多方面的意义。产甲烷菌的代谢活动会影响地下热水化学成分, 导致水中H₂/CO₂含量减少, CH₄含量增加, 促进地下热水化学成分演化, 在利用碳同位素和流体化学成分研究地热流体成因时应该考虑产甲烷作用对流体化学成分的影响; 产甲烷菌能够不依赖太阳光能, 而是利用H₂还原CO₂产生的化学能作为生长能源, 能够存活于地下深部黑暗环境, 产生的甲烷可为其它微生物提供能源和碳源, 促进早期异养菌的发展, 有利于地球生物圈从无光合作用生态系统向有光合作用生态系统演化(Stevens, 1997); 在地球地质历史发展过程中, 地球曾遭受过多次生物大灭绝(冯伟民, 2020), 当地球表面遭受毁灭性打击生物不能生存时, 地下深部可能是微生物生命的避难处, 氢营养的产甲烷菌能够生存于地下深部, 可成为食物链的初级生产者; 同样地, 地外行星表面条件不适合生物生存, 如果存在生命, 最有可能存在于星球深部, 氢营养产甲烷菌可利用地质成因H₂为微生物生长提供能源, 而地球深部氢营养产甲烷菌可作为地外行星生命的类似物进行研究(Chapelle et al., 2002)。深入了解地下深部产甲烷菌多样性对地球早期生物圈的演化研究、地外生命的探索、甲烷全球循环机制和地热流体和甲烷资源成因机制研究均有重要的科学价值。未来可对地下深部产甲烷菌群落与其它菌群及其环境的相互作用关系进一步研究, 从而更加深入地探讨产甲烷菌在地球生态系统所发挥的作用。

5 结论

本研究采用高通量测序技术, 以*mcrA*为目的基因, 探索了冀中地热区深部热水产甲烷菌群落的多样性。冀中地热区深部热水产甲烷菌类群较丰富, 共检出3个纲、4个目、8个属的产甲烷菌, 但是群落组成极不均匀, 其中隶属于广古菌门、甲烷杆菌纲和甲烷杆菌目的甲烷热杆菌属*Methanothermobacter*是产甲烷菌的主要类型, 占4个样品总序列的99.85%; 优势种是*Methanothermobacter wolfeii*(相似性99%), 产甲烷菌的主要代谢途径是CO₂还原; 不同样品产甲烷菌群落多样性不尽相同, 但是均以甲烷热杆菌属*Methanothermobacter*为优势菌属, 占比均大于99.77%。本文研究揭示了冀中地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热水中含有种类较丰富而组成极不均匀的产甲烷菌群落, 拓展了甲烷热杆菌属*Methanothermobacter*的生境类型, 为进一步研究产甲烷菌在地球生态系统的功能奠定了科学基础。

致谢 本文工作得到中国地质科学院水文地质环境地质研究所王贵玲研究员、张薇副研究员等大力支持和帮助，并得到中国地质调查局地质调查项目（No. DD20189112）和中国地质科学院水文地质环境地质研究所基本科研业务费专项（No. SK202010）资助。特此致谢。

References

- Banning N, Brock F, Fry J C, Parkes R J, Hornibrook E R, Weightman A J. 2005. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment [J]. *Environmental Microbiology*, 7(7): 947-60.
- Boone D R, Castenholz R W, Garrity G. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (vol.1)[M]. 2nd ed. New York: Springer Publication, 211-355.
- Chapelle F H, O'Neill K, Bradley P M, Methé B A, Ciufo S A, Knobel L L, Lovley D R. 2002. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens[J]. *Nature*, 415: 312-315.
- Cheng Lei, Zheng Zhenzhen, Wang Cong, Zhang Hui. 2016. Recent advances in methanogens[J]. *Microbiology China*. 2016, 43(5): 1143-1164(in Chinese with English abstract).
- Conrad R. 2009. The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1: 285-292[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5): 285-292.
- Denman S E, Tomkins N W, McSweeney C S. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane[J]. *FEMS microbiology ecology*, 62(3): 313-322.
- Dhillon A, Lever M, Lloyd K G, Albert D B, Sogin M L, Teske A. 2005. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4592-4601.
- Feng Weimin. 2020. The role of viruses and bacteria and other microorganisms in the history of the earth biological evolution[J]. *Geology in China*, 47(3): 655-663(in Chinese with English abstract).
- Grosskopf R, Janssen P H, Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3) : 960-969.
- Hales B A, Edwards C, Ritchie D A, Hall G, Pickup R W, Saunders J R. 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2): 668-675.
- Harirchi S, Wainaina S, Sar T, Nojourni S A, Parchami M, Parchami M, Varjani S, Khanal S K, Wong J, Awasthi M K, Taherzadeh M J. 2022. Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review[J]. *Bioengineered*, 13(3): 6521-6557.
- Hassa J, Wibberg D, Maus I, Pühler A, Schlüter A. 2019. Genome Analyses and Genome-Centered Metatranscriptomics of *Methanothermobacter wolfeii* Strain SIV6, Isolated from a Thermophilic Production-Scale Biogas Fermenter[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1) : 13-13.
- Jablonski P E, DiMarco A A, Bobik T A, Cabell M C, Ferry J G. 1990. Protein content and enzyme activities in methanol- and acetate-grown *Methanosarcina thermophila*[J]. *Journal of Bacteriology*, 172(3): 1271-1275.
- Jiang B, Parshina S N, van Doesburg W, Lomans B P, Stams A J M. 2005. *Methanomethylovorans thermophila* sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen from an anaerobic reactor fed with methanol[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 6) : 2465-2470.
- Juottonen H, Galand P E, Yrjölä K. 2006. Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene[J]. *Research in Microbiology*, 157(10): 914-921.
- Lee J H, Kumar S, Lee G H, Chang D H, Rhee M S, Yoon M H, Kim B C. 2013. *Methanobrevibacter boviskoreani*

- sp. nov.* isolated from the rumen of Korean native cattle[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt11): 4196-4201.
- Leng Huan, Yang Qing, Huang Gangfeng, Bai Liping. 2020. Recent advances in hydrogenotrophic methanogenesis[J]. Microbiology China. 60(10): 2136-2160(in Chinese with English abstract).
- Liu Yuchen, Whitman W B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125(1): 171-189.
- Lueders T, Chin K J, Conrad R. 2010. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage[J]. Environmental Microbiology, 3(3):194-204.
- Luton P E, Wayne J M, Sharp R J, Riley P W. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill[J]. Microbiology, 148(11): 3521-3530.
- Ma Feng, Wang Guiling, Zhang Wei, Zhu Xi, Zhang Hanxiong, Yue Gaofan. 2020. Structure of geothermal reservoirs and resource potential in the Rongcheng geothermal field in Xiong'an New Area[J]. Acta Geologica Sinica, 94(7): 1981-1990(in Chinese with English abstract).
- Maus I, Wibberg D, Stantscheff R. 2013. Complete genome sequence of the hydrogenotrophic Archaeon *Methanobacterium sp.* Mb1 isolated from a production-scale biogas plant[J]. Journal of Biotechnology, 168(4): 734-736.
- Mi Jiandui, Peng Haiyan, Wu Yinbao, Wang Yan, Liao Xindi. 2019. Diversity and community of methanogens in the large intestine of finishing pigs[J]. BMC microbiology, 19(1):1-9.
- Moser D P, Gihring T M, Brockman F J, Fredrickson J K, Balkwill D L, Dollhopf M E, Lollar B S, Pratt L M, Boice E, Southam G, Wanger G, Baker B J, Pfiffner S M, Lin L H, Onstott T C. 2005. *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium spp.* dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault[J]. Applied and Environmental Microbiology, 71(12): 8773-83.
- Nercessian D, Upton M, Lloyd D, Edwards C. 1999. Phylogenetic analysis of peat bog methanogen populations[J]. FEMS Microbiology Letters, 173(2): 425-429.
- Nyyssönen M, Hultman J, Ahonen L, Kukkonen I, Paulin L, Laine P, Itävaara M, Auvinen P. Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield[J]. The ISME Journal, 2014, 8(1): 126-138.
- Rivard C J, Smith P H. 1982. Isolation and Characterization of a Thermophilic Marine Methanogenic Bacterium, *Methanogenium thermophilicum sp. Nov.*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 32(4): 430-436.
- Rodhe H. 1990. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect[J]. Science, 248: 1217-1219.
- Steinberg L M, Regan J M. 2008. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology, 74(21): 6663-71.
- Stevens T. 1997. Lithoautotrophy in the subsurface[J]. FEMS Microbiology Reviews, 20(3-4): 327-337.
- StraPoc D, Mastalerz M, Dawson K, et al. D. Strc; Strapoć D, Mastalerz M, Dawson K, Macalady J, Callaghan A, Wawrik B, Turich C, Ashby M. 2011. Biogeochemistry of Microbial Coal-Bed Methane[J]. Annual Review of Earth & Planetary Sciences, 39(1): 617-656.
- Thauer R K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. Marjory Stephenson Prize Lecture [J]. Microbiology, 144 (Pt 9): 2377-406.
- Wang Guiling, Li Jun, Wu Aimin, Zhang Wei, Hu Qiuyun. A study of the thermal storage characteristics of Gaoyuzhuang Formation, a new layer system of thermal reservoir in Rongcheng uplift area, Hebei Province[J].

- Acta Geoscientica Sinica, 2018, 39(5): 533-541(in Chinese with English abstract).
- Wang Y , Cui H , Su X , Wang Yanfa, Cui Hongpeng, Su Xin, Wei Shiping, Zhu Youhai, Lu Zhenquan, Pang Shouji, Liu Hui, Zhang Shuai, Hou Weiguo. 2020. Diversity and Distribution of Methanogenic Community Between Two Typical Alpine Ecosystems on the Qinghai–Tibetan Plateau [J]. Current Microbiology, 77(6): 1061-1069.
- Wasserfallen A, Nöling J, Pfister P, Reeve J, Macario E C de. 2000. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic Methanobacterium isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter gen. nov.*, and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis sp. nov.*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(Pt 1): 43-53.
- Worakit S, Boone D R, Mah R A. 1986. *Methanobacterium alcaliphilum sp. nov.* an H₂-Utilizing Methanogen That Grows at High pH Values[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 36(3): 380-382.
- Worman S L , Pratson L F , Karson J A , Schlesinger W H. 2020. Abiotic hydrogen (H₂) sources and sinks near the Mid-Ocean Ridge (MOR) with implications for the seafloor biosphere[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(24): 13283-133293.
- Wu Aimin, Ma Feng, Wang Guiling, Liu Jinxia, Hu Qiuyun, Miao Qingzhuang. 2018. A Study of Deep-seated Karst Geothermal Reservoir Exploration and Huge Capacity Geothermal Well Parameters in Xiongan New Area[J]. Acta Geoscientica Sinica, 39(5): 523-532(in Chinese with English abstract).
- Yang Xiuqing, Wu Ruiwei, Han Zuoying, Wang Baoyu. 2017. Analysis of methanogenic community and pathway of coalbed methane fields in the Qinshui Basin based on *mcrA* gene[J]. Microbiology China, 44(4): 795–806(in Chinese with English abstract).
- Zeng Zhihua, Yang Minhe, She Chenxing, Tong Chuan. Diversity of methanogen communities in tidal freshwater and brackish marsh soil in the Min River estuary[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(10): 2674-2681 (in Chinese with English abstract).
- Zhao Jiayi, Zhen Shijun, Zhang Cuiyun, Yin Miying, Zhang Sheng, He Ze, Ning Zhuo. 2020. Development and application of a droplet digital PCR technique for detection of sulfate-reducing bacteria in deep geothermal water[J]. Microbiology China, 47(11): 3756-3767(in Chinese with English abstract).
- Zhao Jiayi, Zhen Shijun, Zhang Cuiyun, Yin Miying, Zhang Sheng. 2021. Composition and Functional Prediction of Microbial Communities in Deep Geothermal Water from Jizhong (Central Hebei) Geothermal Area[J]. Acta Geoscientica Sinica, 42(05): 605-616(in Chinese with English abstract).
- Zinder S H, Sowers K R, Ferry J G. 1985. *Methanosarcina thermophila sp. nov.*, a Thermophilic, Acetotrophic, Methane-Producing Bacterium[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 35(4): 522-523.
- Zhou Xinke, Xu Huazhen. 2009. Features of organic matter and formation environment of marine carbonate rocks[J]. Oil & Gas Geology, 30(3): 337-349(in Chinese with English abstract).
- Zhu, Chenguang, Zhang Junya, Tang Yuanping, Xu Zhengkai, Song Rentao. 2010. Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis[J]. Microbiological Research, 166(1): 27-35.

附中文参考文献

- 承磊, 郑珍珍, 王聪, 张辉. 2016. 产甲烷古菌研究进展[J]. 微生物学通报, 43(5): 1143–1164.
- 冯伟民. 2020. 病毒与细菌等微生物在地球生物演化史上的作用[J]. 中国地质, 47(3): 655-663.
- 冷欢, 杨清, 黄钢锋, 白丽萍. 2020. 氢营养型产甲烷代谢途径研究进展[J]. 微生物学报, 60(10): 2136-2160.
- 马峰, 王贵玲, 张薇, 朱喜, 张汉雄, 岳高凡. 2020. 雄安新区容城地热田热储空间结构及资源潜力[J]. 地质学报, 94(7): 1981-1990.
- 曾志华, 杨民和, 余晨兴, 仝川. 2014. 闽江河口区淡水和半咸水潮汐沼泽湿地土壤产甲烷菌多样性[J]. 生态

学报, 34(10): 2674-2681.

王贵玲, 李郡, 吴爱民, 张薇, 胡秋韵. 2018. 河北容城凸起区热储层新层系—高于庄组热储特征研究[J]. 地球学报, 39(5): 24-32.

吴爱民, 马峰, 王贵玲, 刘金侠, 胡秋韵, 苗青壮. 2018. 雄安新区深部岩溶热储探测与高产能地热井参数研究[J]. 地球学报, 39(5): 523-532.

杨秀清, 吴瑞薇, 韩作颖, 王保玉. 2017. 基于 *mcrA* 基因的沁水盆地煤层气田产甲烷菌群与途径分析[J]. 微生物学通报, 44(4): 795-806.

赵佳怡, 甄世军, 张翠云, 殷密英, 张胜, 何泽, 宁卓. 2020. 深部热水硫酸盐还原菌微滴数字 PCR 检测技术的建立与应用[J]. 微生物学通报, 47(11): 3756-3767.

赵佳怡, 甄世军, 张翠云, 殷密英, 张胜. 2021. 冀中地热区深部热水微生物群落组成及其功能预测[J]. 地球学报, 42(5): 605-616.

周新科, 许化政. 2009. 海相碳酸盐岩的形成环境与有机质特征[J]. 石油与天然气地质, 30(3): 337-349.