

冀中地热区深部热水微生物群落组成及其功能预测

赵佳怡, 甄世军, 张翠云*, 殷密英, 张 胜

中国地质科学院水文地质环境地质研究所, 河北石家庄 050061;
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, 河北石家庄 050061

摘 要: 了解深部微生物群落组成和功能对探索早期生命起源和利用其独特功能均有重要意义。地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热储环境中微生物群落组成和功能特性仍然不清。为了探测冀中地热区深部热水微生物群落组成与功能特性, 以浅层水和土壤为参照, 利用冀中地热区地热科学钻探孔抽水试验, 采集深部热水样, 同时采集每个钻孔上方附近的大田农灌井浅层水和土壤样品, 用于 16S rRNA 基因高通量测序, 并使用 PICRUST 软件进行功能预测。结果显示冀中地热区深部热水含有 38 个菌门, 541 个菌属, 以细菌为主 (97.5%), 古菌很少 (2.5%), 特征性菌群主要是厚壁菌门 Firmicutes、硝化螺旋菌门 Nitrospirae、热袍菌门 Thermotogae 和广古菌门 Euryarchaeota, 优势菌属包括硫酸盐还原菌, 固碳作用、发酵作用和硫酸盐还原作用可能较强, 而产甲烷作用和反硝化作用可能很弱。深部热水出现好氧嗜温菌, 说明在大流量抽水条件下, 深部热水受到富含变形菌门 Proteobacteria 浅层水的补给。本次研究揭示了冀中地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热储层含有种类丰富、功能多样的微生物群落, 微生物群落特征可作为深部热水与浅层水水力联系的指示剂。

关键词: 微生物群落特征; 功能特性; 深部热水; 地热科学钻探; 冀中地热区

中图分类号: P314; P342.3 **文献标志码:** A **doi:** 10.3975/cagsb.2021.042601

Composition and Functional Prediction of Microbial Communities in Deep Geothermal Water from Jizhong (Central Hebei) Geothermal Area

ZHAO Jia-yi, ZHEN Shi-jun, ZHANG Cui-yun*, YIN Mi-ying, ZHANG Sheng

*Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050061;
Key Laboratory of Groundwater Remediation of Hebei Province and China Geological Survey, Shijiazhuang, Hebei 050061*

Abstract: The understanding of the composition and functions of deep microbial communities is of great significance for exploring the origin of early lives and utilizing their unique functions. The composition and functions of microbial communities in deep carbonate karst-fissure geothermal storage environment remain unclear. In order to explore the composition and prediction of the functions of microbial communities in the deep geothermal water from the deep carbonate rock karst-fissure geothermal storage environment, the authors, taking shallow water and soil as the references, collected deep geothermal water samples by the pumping tests using the geothermal scientific drilling holes located in Jizhong geothermal area and also collected shallow water samples from farm irrigation wells and soil samples near the top of each drill hole, respectively for 16S rRNA gene high-throughput sequencing and functional predictions using PICRUST. The results show that there exist 38 phyla and 541 genera in the deep geothermal water of Jizhong geothermal area, of which bacteria are dominant (97.5%), whereas archaea are rare (2.5%), and characteristic microbial communities comprise mainly Firmicutes, Nitrospirae, Thermotogae and Euryarchaeota. The dominant bacterial genera include sulfate-reducing bacteria. Carbon fixation, fermentation and sulfate reduction might be relatively strong, whereas methanogenesis and

本文由中国地质调查局地质调查项目(编号: 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(编号: SK202010)联合资助。

收稿日期: 2020-11-24; 改回日期: 2021-04-06; 网络首发日期: 2021-04-26。责任编辑: 张改侠。

第一作者简介: 赵佳怡, 女, 1992 年生。博士。主要研究方向为地热地质微生物研究。E-mail: zhaojiayi9208@126.com。

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

denitrification might be weak in the deep geothermal water. Aerobic, mesophilic bacteria occurring in the deep geothermal water indicate that the deep geothermal water is recharged by the shallow water rich in proteobacteria under the condition of large flow pumping. This study has revealed that the deep carbonate rock karst-fracture geothermal reservoirs contain abundant microbial communities with various functions in Jizhong geothermal area, and that the characteristics of microbial communities can be used as indicators of the hydraulic connection between deep geothermal water and shallow water.

Key words: microbial community characteristics; functional characteristics; deep geothermal water; geothermal scientific drilling; Jizhong geothermal area

越来越多的研究揭示地下深部存在各种微生物, 构成一个深部生物圈(Colman et al., 2017; Escudero et al., 2018), 深部微生物在全球生物地球化学循环中发挥着重要作用。地下深部是一个阳光照射不到、没有光合作用的黑暗环境, 在地表 1 km 以下常常是高温、高压、高盐、寡营养的极端环境, 能够适应这种极端环境的微生物具有独特的组成和功能, 这种极端环境与地球早期和其他星球环境相类似。深入了解深部微生物群落组成和功能特性, 对探索早期生命的起源、生理极限、适应机制和利用其独特功能均有重要意义(董海良等, 2009)。

早期采用培养法检测深部微生物(Hallbeck and Pedersen, 2008), 但是自然界大部分微生物是不可培养的, 培养法只能检出部分微生物。现代分子生物学技术, 特别是 16S rRNA 高通量测序技术不但可检测可培养菌, 而且还可检测不可培养菌, 近年来已应用于地下深部微生物检测(Nyyssönen et al., 2014; Lau et al., 2014; Dutta et al., 2018)。宏基因组测序技术可检出微生物的所有功能基因, 推测碳、氮、硫循环过程中的微生物代谢途径, 但是该技术所需样品量大, 深部样品微生物含量低, 一些样品不能满足样品量要求。新一代生物信息技术, 可利用 PICRUSt 软件(Langille et al., 2013), 通过 16S rRNA 高通量测序结果与已知基因组数据库比对, 进行微生物群落功能预测(Bomberg et al., 2016; Chiriac et al., 2018)。地下深部地质环境复杂多样, 深部微生物群落特征受地质水文地质条件的控制, 已有的研究只涉及其中很少一部分, 地热区深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热储环境中微生物群落组成和功能特性仍然不清。

冀中地热区地热能开发历史悠久, 目前主要开采 1800 m 以上蓟县系雾迷山组上段碳酸盐岩岩溶-裂隙热储热水, 而对 1800 m 以下蓟县系雾迷山组下段和高于庄组碳酸盐岩岩溶-裂隙热储地热资源状况不清。中国地质调查局自 2018 年以来在冀中地热区实施了一批地热科学钻探, 用于获取深部热储的地质、水文地质和地热基础数据, 评价深部新储层地热资源(王贵玲等, 2018)。地热科学钻探为深部热水微

生物研究提供了获取深部样品的机会, 我们选取了部分钻孔用于深部热水微生物群落研究。前期工作建立了深部热水硫酸盐还原菌微滴数字 PCR 检测技术, 并利用该技术对深部热水、浅层水和土壤进行了检测, 发现深部热水富含硫酸盐还原菌(赵佳怡等, 2020)。在此基础上, 本次研究继续以冀中地热区深部热水为研究对象, 采用新一代高通量测序技术和功能预测技术, 以浅层水和土壤为参照, 研究深部热水微生物群落组成和功能特性, 为提高深部生物圈认识和深部热水合理开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集和预处理

冀中地热区(115°55'46"E, 38°58'45"N)位于河北平原冀中凹陷中部, 区内构造断裂发育, 基底凹凸相间, 其中牛头镇凸起、容城凸起和高阳低凸起地热资源丰富, 埋藏浅, 水温高, 水量大, 地热科学钻探孔均位于这些基岩凸起区。本次研究 6 组深部热水样(E1-1, E3-1-E7-1)分别采自冀中地热区地热科学钻探孔抽水试验时最后阶段的抽出水, 井台泵口取样, 同时采集每个钻孔附近大田农灌井浅层水(E1-2, E3-2-E7-2)和土壤(E1-3, E3-3-E7-3)样品各 6 组作为参照, 共计 18 组样品用于微生物分析。地热科学钻探孔深变化于 2506—3853 m 之间, 抽水试验出水层段为蓟县系雾迷山组或高于庄组碳酸盐岩基岩热储层, 采样深度 1500—3853 m。浅层水井深变化于 70—120 m 之间, 土样采集深度均为 0.5 m。采样点分布如图 1 所示。水样采集容器为 18 L 耐高温的无菌塑料桶, 采集时利用哈希便携式测试仪进行现场测试, 测试项目为 pH、温度 T 和总溶解固体 TDS。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℃ 冰箱保存。土样采集使用洛阳铲取芯, 采用无菌小刀从岩芯中部挖取土样, 装入无菌塑料袋, 现场冰块保温箱保存, 运回实验室后 -70℃ 冰箱保存备用。土样现场测试指标, 采用土水体积比 1:2.5 水溶液测试。

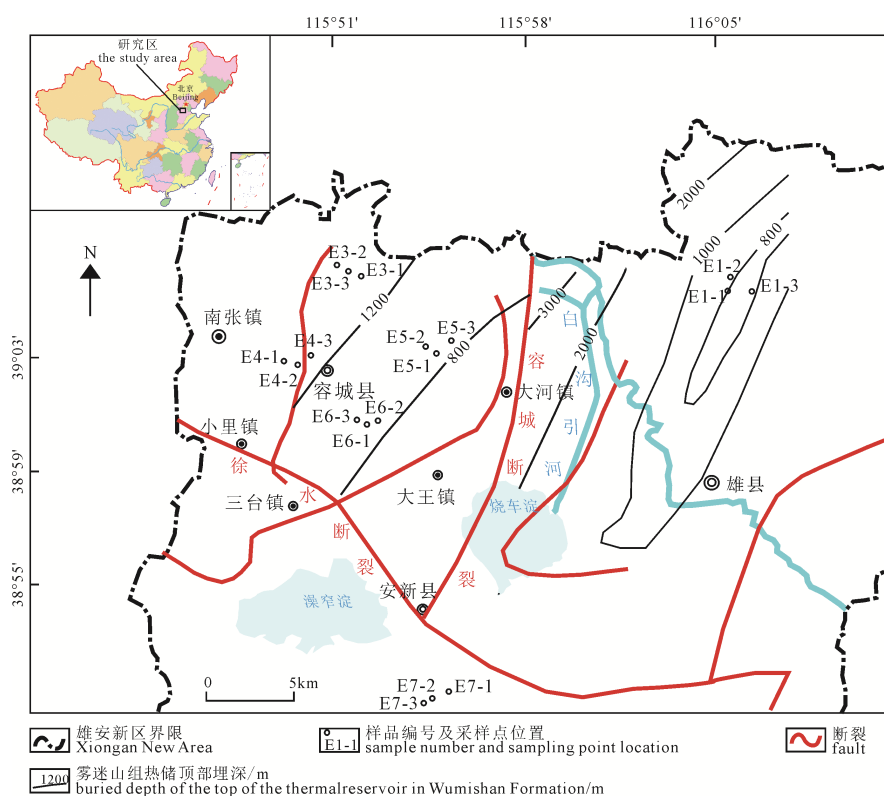


图1 研究区采样点图

Fig. 1 Sampling sites of the study area

1.2 高通量测序

深部热水和浅层水的过滤膜及土壤样品,送往上海美吉生物医药科技有限公司进行16S rRNA基因高通量测序。采用E.Z.N.A.® Soil DNA Kit试剂盒(Omega Bio-Tek, USA),按说明书提取水土样品微生物总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浓度变化于9.00~71.70 ng/μL。通过Illumina Miseq PE250测序平台,使用细菌古菌通用引物:515FmodF(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Parada et al., 2016)和806RmodR(5'-GGACTAC-AGGGTATCTAAT-3') (Apprill et al., 2015)对16S rRNA基因V4区进行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; 2.5 mM dNTPs 2 μL;前后引物(5 μM)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℃ 3 min; 95℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 29个循环; 72℃ 10 min, 10℃ 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。PCR产物目的条带大小正确,浓度合适者,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。利用Illumina公司的Miseq PE250平台进行高通量测序。

1.3 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,根据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Silva 132/16S,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本的群落物种组成。

利用Mothur软件计算抽平后样品OTU水平的Alpha多样性指数sobs、chao、ace、shannon、simpson和Coverage,并使用Student's-t方法检验组间显著性差异。依据分类学分析结果,采用Excel分别进行深部热水、浅层水和土壤门和属水平平均相对丰度大小排序,利用R语言分别绘制各样品门(≥1%)和属(≥5%)水平类群相对丰度柱状图。采用克氏秩和检验Kruskal-Wallis H test方法,fdr多重检验校正,

对多组样品的物种进行显著性差异分析。使用 PICRUSt2 软件对样品中微生物群落的功能组成进行预测,从 KEGG 功能模块 Module 挑选出与 C、N、S 循环相关的关键功能基因模块,利用 Excel 绘制功能模块相对丰度条形图,并进行组间显著性差异单因素方差统计检验。除了 Excel 分析外,上述所有分析均在美吉生物云平台上操作。

2 结果与分析

2.1 现场测试和高通量测序结果评估

冀中地热区深部热水、浅层水和土壤的 pH、温度 T 和总溶解固体 TDS 现场测试结果如表 1 所示。现场测试和组间显著性差异单因素方差统计检验结果是,深部热水 pH 值变化于 6.77~8.75 之间,属中性及弱碱性水,其 pH 值与浅层水(7.50~7.87)相近 ($P>0.05$),而较土壤浸提液(8.55~8.94)显著低 ($P<0.01$)。深部热水 T 变化于 56~105℃之间,属中低温热水,极显著高于浅层水(13~17℃)和土壤(8~13℃) ($P<0.001$)。深部热水 TDS 变化于 1990~2677 mg/L 之间,属微咸水,其 TDS 也极显著高于浅层水(202~503 mg/L)和土壤浸提液(72~178 mg/L) ($P<0.001$)。由此可见,本区深部热水以温

度和盐度高而显著区别于浅层水和土壤。

18 个样品高通量测序,获得原始序列 2 560 782 条,经质控过滤后,获优化序列 1 146 829 条,又去单序列和嵌合体,获有效序列 362 386 条,以最小样本序列数 46 740 抽平,以 97% 相似水平下聚类划分分类单元 OTU,产生 1131 个 OTU。各样品有效序列和 OTU 见表 1。样品的群落覆盖度 Coverage 很高,均大于 98%(表 2),说明本次测序量代表了样品微生物的真实情况。

2.2 深部热水微生物多样性分析

微生物群落丰富性采用 Sobs、Chao1 和 Ace 指数表示,数值越大,丰富性越高;微生物群落多样性用 Shannon 和 Simpson 指数表示,前者数值越大,多样性越高,而后者则相反。多样性指数计算结果如表 2 所示。显著性差异检验结果是,深部热水的丰富性指数 Sobs、Ace 和 Chao 均低于浅层水 ($P<0.05$) 和土壤 ($P<0.001$),说明深部热水的微生物丰富性低于浅层水,极显著低于土壤。深部热水的多样性指数 Shannon 低于浅层水 ($P<0.05$) 和土壤 ($P<0.001$),而 Simpson 高于浅层水 ($P<0.05$) 和土壤 ($P<0.001$),均说明深部热水的微生物多样性低于浅层水 ($P<0.05$),极显著低于土壤 ($P<0.001$)。

表 1 深部热水、浅层水和土壤样品现场测试和高通量测序结果
Table 1 Results of field measurement and high-through sequencing from deep geothermal water, shallow water and soil

样品编号	钻孔深度/m	pH	T/℃	TDS/(mg·L ⁻¹)	有效序列条数	OTU 数量
深部热水						
E1-1	2511	7.33	64.0	2197	46 753	292
E3-1	2520.8	7.20	70.5	2677	61 244	383
E4-1	2608.5	7.49	59.5	1990	68 522	284
E5-1	2506	6.90	61.6	2063	46 740	292
E6-1	2518.2	6.77	56.0	2620	69 863	286
E7-1	3853	8.75	105.0	1998	69 264	564
浅层水						
E1-2	100	7.78	17.0	303	53 932	1 955
E3-2	70	7.60	16.0	470	48 811	112
E4-2	100	7.74	15.0	304	51 600	2 119
E5-2	100	7.87	14.0	202	67 725	1 124
E6-2	70	7.50	14.0	548	68 666	351
E7-2	120	7.42	13.0	503	62 421	3 148
土壤						
E1-3	0.5	8.94	12.5	85	69 835	2 923
E3-3	0.5	8.73	8.0	64	66 503	3 004
E4-3	0.5	8.56	9.0	73	65 940	2 133
E5-3	0.5	8.57	9.0	85	66 432	2 437
E6-3	0.5	8.55	13.0	178	65 887	2 352
E7-3	0.5	8.61	9.0	114	51 533	2 151

表 2 冀中地热区深部热水、浅层水和土壤样品 α 多样性指数

Table 2 Alpha-diversity indices of deep geothermal water, shallow water and soil samples from Jizhong geothermal area

Sample ID	Sobs	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Coverage
深部热水						
E1-1	292	3.16	0.07	441.62	421.89	1.00
E3-1	345	2.48	0.27	632.23	494.73	1.00
E4-1	243	1.86	0.31	312.13	299.00	1.00
E5-1	292	2.76	0.16	509.16	454.30	1.00
E6-1	271	2.19	0.23	308.25	306.00	1.00
E7-1	509	1.90	0.35	610.26	590.28	1.00
浅层水						
E1-2	1 907	5.26	0.02	2 155.68	2 095.57	0.99
E3-2	111	2.52	0.16	156.38	141.00	1.00
E4-2	2 076	4.60	0.08	2 509.13	2 478.44	0.99
E5-2	941	3.31	0.08	2 406.14	1 732.69	0.99
E6-2	299	2.38	0.16	910.54	593.53	1.00
E7-2	2 920	6.28	0.01	3 687.49	3 623.55	0.98
土壤						
E1-3	2 625	6.13	0.01	3 310.38	3 310.54	0.98
E3-3	2 756	6.27	0.01	3 457.61	3 365.44	0.98
E4-3	1 900	5.30	0.02	2 726.64	2 707.83	0.99
E5-3	2 146	4.93	0.05	3 040.82	2 995.44	0.98
E6-3	2 123	5.77	0.01	2 817.28	2 741.83	0.99
E7-3	2 094	5.95	0.01	2 660.65	2 699.36	0.99

2.3 深部热水的微生物群落组成特征

本次高通量测序引物为细菌古菌通用引物, 测序结果为细菌古菌有关序列。18个样品的高通量测序结果共检出生物域3个, 门62个, 属1280个, 种2494个, 其中深部热水细菌(6个样品均值百分数, 97.5%), 古菌(2.5%); 浅层水细菌(96.4%), 古菌(3.6%); 土壤细菌(90.9%), 古菌(9.1%)。

2.3.1 门水平和属水平组成特征

深部热水6个样品平均相对丰度 $\geq 1\%$ 的门水平优势群落是厚壁菌门Firmicutes (38%), 变形菌门Proteobacteria (37%), 硝化螺旋菌门Nitrospirae (13%), 广古菌门Euryarchaeota (2%), 产水菌门Aquificae (2%), 热袍菌门Thermotogae (2%)、拟杆菌门Bacteroidetes (1%)、绿弯菌门Chloroflexi (1%)和异常球菌-栖热菌门Deinococcus-Thermus (1%), 其中厚壁菌门Firmicutes和变形菌门Proteobacteria的相对丰度大, 前者主要分布于样品E1-1、E3-1、E4-1、E5-1, 而后者主要分布于样品E3-1、E6-1、E7-1(图2A)。浅层水最丰富的类群是变形菌门Proteobacteria (61%), 其次是拟杆菌门Bacteroidetes (13%), 而厚壁菌门Firmicutes很少(1%), 古菌主要是奇古菌门Thaumarchaeots(1%)。土壤最丰富的类群主要是放线菌门Actinobacteria (28%), 其次是变形菌门

Proteobacteria (18%), 厚壁菌门Firmicutes较丰富(10%), 古菌主要也是奇古菌门Thaumarchaeots(9%)。由此可见, 本区深部热水门水平优势类群与浅层水和土壤不尽相同。经分组样品ANOSIM统计分析检验, 深部热水与浅层水微生物群落结构存在统计学差异($P<0.05$), 与土壤微生物群落结构的差异更显著($P<0.01$)。

深部热水平均相对丰度 $\geq 5\%$ 的属水平优势群落是硝化螺旋菌门Nitrospirae 成员热脱硫弧菌属Thermodesulfonbri (13%), γ -变形菌纲成员假单胞菌属Pseudomonas (10%)、硝豆菌属Thiofab (5%)和嗜氢菌属Hydrogenophilus (6%), δ -变形菌纲成员热脱硫杆菌属Thermodesulfobacterium (9%), 厚壁菌门成员嗜热厌氧菌科Thermoanaerobacteraceae (8%)和钙双螺杆菌属Caldicoprobacters (6%), 古菌最丰富的菌属是嗜热弯曲甲烷热杆菌属Methanothermobacter(2%)。这些菌属在各样品的分布不均(图2B), 其中热脱硫弧菌属Thermodesulfonbri主要分布于E4-1和E5-1, 假单胞菌属Pseudomonas主要分布于E7-1、热脱硫杆菌属Thermodesulfobacterium主要分布于E7-1, 属未定名的嗜热厌氧菌科Thermoanaerobacteraceae主要分布于E4-1, 硝豆菌属Thiofab主要分布于E6-1, 嗜热弯

曲甲烷热杆菌属 *Methanothermobacter* 主要分布于 E5-1 和 E6-1。

另外, 深部热水的优势菌属包括硫酸盐还原菌, 如热脱硫弧菌属 *Thermodesulfobacterium*、热脱硫杆菌属 *Thermodesulfobacterium*、嗜热厌氧菌科 *Thermoanaerobacteraceae*、脱硫化小幡菌属 *Desulfotomaculum* 和脱硫肠状菌属 *Desulfotomaculum* 等, 这些菌的存在有利于发生较强的硫酸盐还原作用。

2.3.2 组间差异分析

通过克氏秩和方法 (Kruskal-Wallis H test) 进一步检验组间菌群结构差异显著性。深部热水、浅层水和土壤间菌门和菌属相对丰度差异显著性检验结果 (图 3) 显示, 在门水平, 厚壁菌门 *Firmicutes*、硝化螺旋菌门 *Nitrospirae*、广古菌门 *Euryarchaeota*、产水菌门

Aquificae 和热袍菌门 *Thermotogae* 在深部热水中相对丰度高, 但是只有厚壁菌门 *Firmicutes*、广古菌门 *Euryarchaeota* 和热袍菌门 *Thermotogae* 组间相对丰度差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 3A), 说明这些菌门是深部热水的特征性菌门; 在属水平上, 硝化螺旋菌门 *Nitrospirae* 的热脱硫弧菌属 *Thermodesulfobacterium*、 γ -变形菌纲的假单胞菌属 *Pseudomonas*、嗜氢菌属 *Hydrogenophilus* 和碲豆菌属 *Thiofaba*、 δ -变形菌纲的热脱硫杆菌属 *Thermodesulfobacterium*、厚壁菌门的嗜热厌氧菌科 *Thermoanaerobacteraceae*、钙双螺杆菌目 *Caldicoprobacteres* 和碲豆菌属 *Thiofaba* 在深部热水中相对丰度高, 但是只有热脱硫弧菌属 *Thermodesulfobacterium*、属未定名的嗜热厌氧菌科 *Thermoanaerobacteraceae*、嗜氢菌属 *Hydrogenophilus*

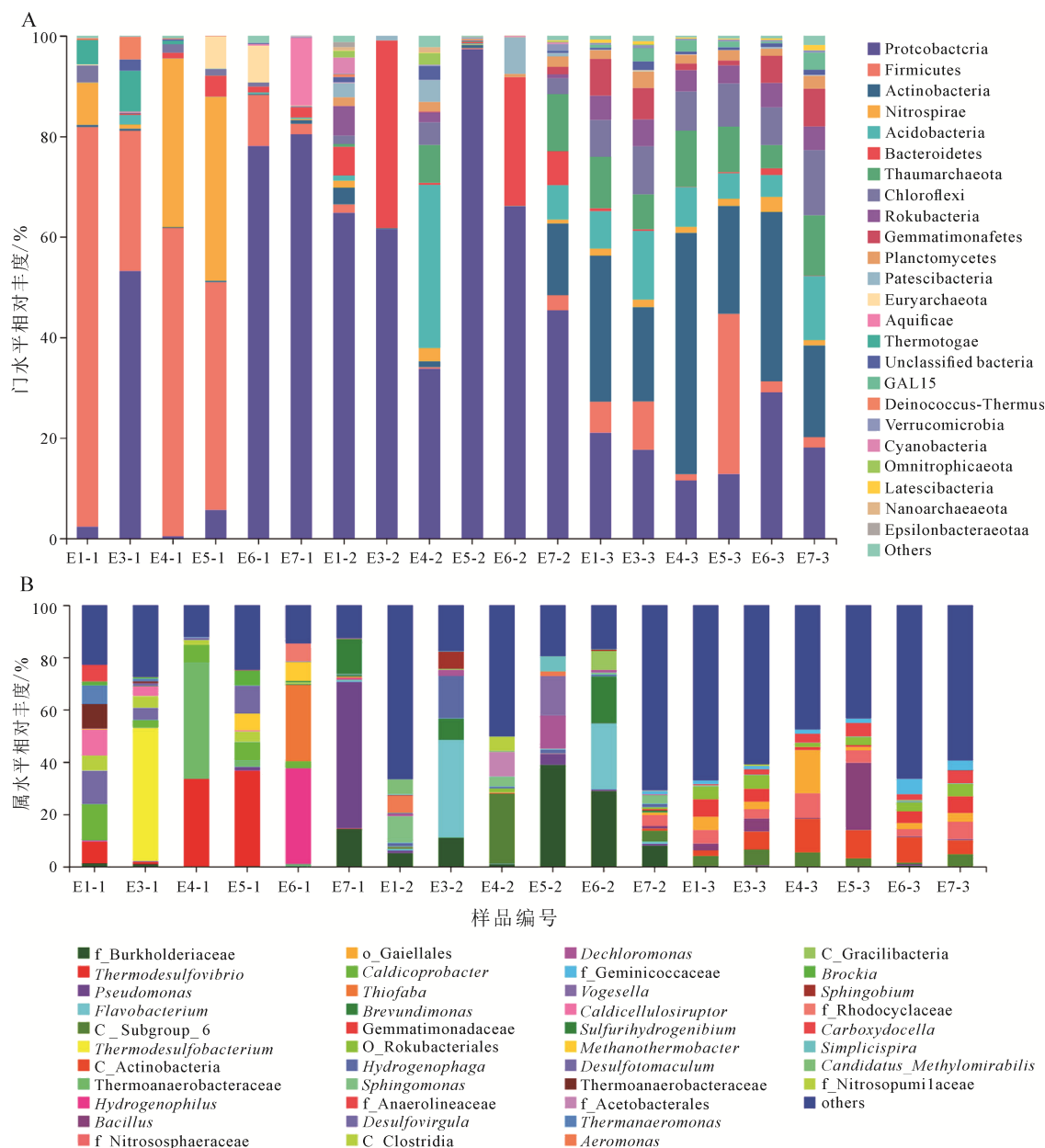


图 2 冀中地热区深部热水、浅层水和土壤各样品门(A)和属(B)水平微生物群落组成柱状图
Fig. 2 Compositional columnar section of microbial communities at phylum (A) and genus (B) level in deep geothermal water, shallow water and soil samples from Jizhong geothermal area

和属未定名的钙双螺杆菌目 *Caldicoprobacters* 组间相对丰度差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 3B), 说明深部热水特征性菌属是热脱硫弧菌属 *Thermodesulfobacterium*、属未定名的嗜热厌氧菌科 *Thermoanaerobacteraceae*、嗜氢菌属 *Hydrogenophilus*

和属未定名的钙双螺杆菌目 *Caldicoprobacters*。

2.4 深部热水微生物群落功能预测

PICRUSt2 软件可将样品 OTU 置于软件已有的系统发育树中, 并与参考基因组数据库比对, 获得 KEGG 功能信息, 包括功能基因模块 Module、功能

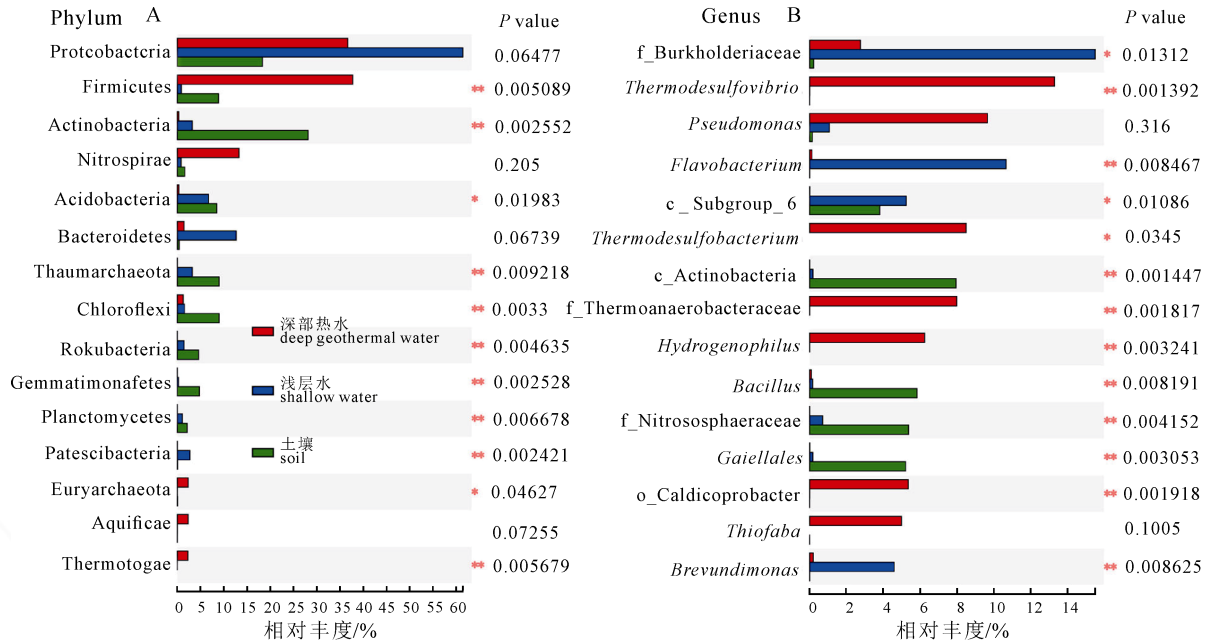


图 3 冀中地热区深部热水、浅层水和土壤样品门水平(A)和属水平(B)微生物群落结构差异分析
Fig. 3 Kruskal-Wallis H test columnar section of microbial community structural difference at phylum level (A) and at genus level (B) among deep geothermal water, shallow water and soil samples from Jizhong geothermal area

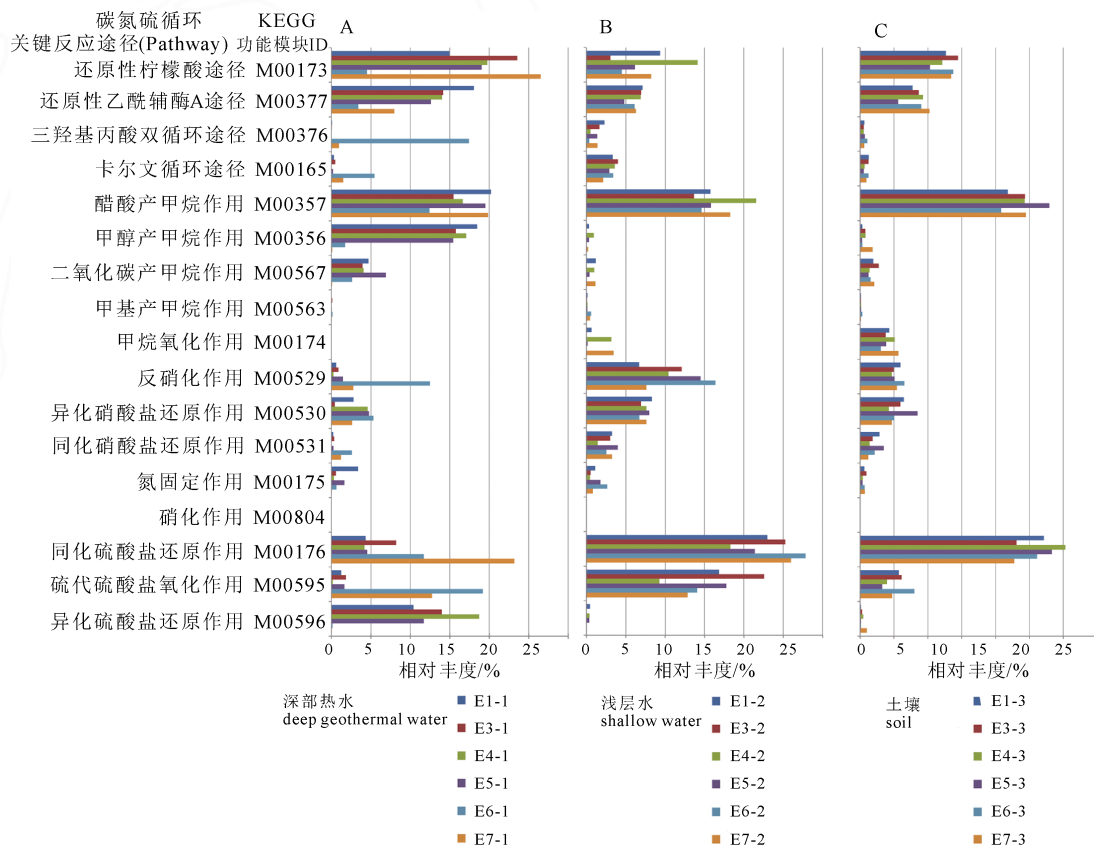


图 4 冀中地热区深部热水(A)、浅层水(B)和土壤(C)碳氮硫循环关键功能基因模块相对丰度
Fig. 4 Relative abundance of key functional gene modules of carbon (A), nitrogen (B) and sulfur (C) cycles in deep geothermal water, shallow water and soil from Jizhong geothermal area

基因 KO 信息及其在样品中的相对丰度,但是这种预测受到已知菌种、已知功能、参考数据库是否充足、基因转移等因素的影响,预测的功能仅仅是一种潜在的、分子功能,实际是否存在这些功能还需要通过宏基因组测序和功能表达进一步验证。碳氮硫循环相关的功能基因模块组成和相对丰度结果(图 4)及组间显著性差异单因素方差检验结果显示,深部热水中除个别样品外,还原性柠檬酸途径 Reductive citrate cycle(M00175)、还原性乙酰辅酶 A 途径 Reductive acetyl-CoA pathway(M00377)和异化硫酸盐还原作用 Dissimilatory sulfate reduction(M00596)功能基因模块相对丰度较高,可能指示这些途径和作用在深部热水中较强。醋酸产甲烷作用基因模块(M00357)和甲醇产甲烷作用基因模块(M00356)相对丰度也较高,但是产甲烷作用是由发酵细菌和产甲烷古菌共同完成的,而产甲烷古菌的关键功能基因 *mcrA*(K00399)在各样品中相对丰度很低($<1\%$),可能指示深部热水的产甲烷作用很弱。醋酸产甲烷作用基因模块 M00357 和甲醇产甲烷作用基因模块 M00356 等相对丰度较高,是发酵作用功能基因(如编码 ACSS 酶的基因 K01895、*IdhA* 基因 K00016、*poxB* 基因 K00156、*ackA* 基因 K00925 和 *pflD* 基因 K00656)相对丰度较高(18%~40%)之故。因此,深部热水的发酵作用可能较强,而产甲烷作用可能很弱。与浅层水和土壤相比,深部热水的还原性柠檬酸途径 Reductive citrate cycle (M00175)和还原性乙酰辅酶 A 途径 Reductive acetyl-CoA pathway(M00377)的基因模块相对丰度较浅层水更高($P<0.05$),而与土壤无显著性差异($P>0.05$);深部热水的异化硫酸盐还原 Dissimilatory sulfate reduction(M00596)功能基因模块相对丰度(最高达 18%)(除样品 E6-1 和 E7-1 外)显著高于浅层水和土壤($P<0.05$),可能指示深部热水的异化硫酸盐还原作用较强。

综上所述,碳氮硫循环有关的关键功能基因模块预测结果是,冀中地热区深部热水中除个别样品外,固碳作用、发酵作用和异化硫酸盐还原作用可能较强,而反硝化作用和产甲烷作用可能很弱。

3 讨论

本次研究的目的是采用高通量测序技术和功能预测技术,以浅层水和土壤为参照,探索深部热水的微生物群落结构组成和功能特性。为了达到此目的,首要任务是判别采集的深部热水样有无受到钻井液的污染。本次地热科学钻探设计要求,钻至深部基岩热储层时要改用清水钻探,以避免钻井泥

污染热储层;另外,抽水试验之前要洗井,保证井净水清,流体中悬浮物含量小于 1/2000 质量比。据研究,当抽出的水量超过 50 个钻孔体积水量时,来自钻井液的微生物污染可降至最低(Davidson et al., 2011)。本次采样是抽水试验进行了 2~3 天最后阶段采样,此时抽出的水量已大大超过 50 个钻孔体积水量。因此,本次深部热水微生物分析可不考虑来自钻井液的污染。

深部热水和土壤各自 6 个样品的 OTU 数量均在同一数量级,而浅层水则不然,其中 E3-2 和 E6-2 的 OTU 数量分别为 112 个和 351 个,仅为其它样品的 1/10(表 1),其原因可能是浅层水污染程度不同所致, E3-2 和 E6-2 样品井深 60~70 m,而其它样品井深 100~120 m,由于含水层越浅,越易受到污染,污染越严重多样性越低,因此前者 OTU 数量低。

本区深部热水域水平微生物组成主要是细菌(97.5%),古菌很少(2.5%),与本区 70—120 m 深的浅层水(细菌 96.4%,古菌 3.6%)和 0.5 m 深的土壤(细菌 90.9%,古菌 9.1%)域水平微生物组成相似;也与印度西部科学深钻获得的玄武岩和花岗岩岩芯中的域水平微生物组成相近(细菌 92.36%~99.36%,古菌 0.12%~6.33%)(Dutta et al., 2018),但是与南非金矿 2.8 km 深的裂隙水和美国爱达荷州深部裂隙热水域水平微生物组成差异大,前者几乎全是细菌($>99\%$)(Chivian et al., 2008),后者大部分是古菌($>90\%$)(Chapelle et al., 2002)。微生物组成差异与当地环境条件密切相关。另外,本区古菌检出种类较少,可能与引物有关,本研究使用的引物对获得的古菌通常较少。

本区深部热水各样品微生物组成分布不均,尤其是采自 3853 m 深的 E7-1 样品微生物组成与浅层水更相似(图 2A),其原因可能是该样品位于断层附近,在大流量抽水条件下,深部含水层通过断裂得到浅层水补给所致,而其温度仍然很高(105℃),可能是补给水通过深循环获得热能加热的结果。

本区深部热水最丰富的微生物群落是厚壁菌门 Firmicutes,主要分布于样品 E1-1、E3-1、E4-1 和 5-1,而在浅层水和土壤,尤其是浅层水中很少(图 2),这个特点在其他一些研究场地也观测到,如在芬兰深部基岩裂隙水中,随着深度的增加,隶属厚壁菌门 Firmicutes 的梭菌纲 Clostridia 的相对丰度增加,在 1400~1500 m 深处该菌占 76.5%(Itävaara et al., 2011)。尽管本区浅层水、土壤和深部热水都存在厚壁菌门 Firmicutes,但是它们属水平的优势菌不同。浅层水 Firmicutes 中最丰富的菌属是八叠球菌属 *Sporosarcina*,是嗜温厌氧菌;土壤 Firmicutes 的最

丰富菌属是杆菌 *Bacillus*, 是严格需氧或兼性厌氧嗜温菌。而深部热水 *Firmicutes* 的优势菌属种类多, 主要是属未定名的 *Thermoanaerobacteraceae* 菌科、*Caldicoprobacter* 和 *Desulfoviregula*, 其中菌科 *Thermoanaerobacteraceae* 和菌属 *Caldicoprobacter* 均是一类嗜热、化能异养厌氧菌, 能够通过发酵作用将有机物分解为乙醇、醋酸等, 产生氢气和二氧化碳, 这类菌最早分离于火山活动和热泉环境 (Zeikus et al., 1979; Wiegel and Ljungdahl, 1981)。 *Desulfoviregula* 菌属是一类嗜热的硫酸盐还原菌, 能够以氢气或有机物为电子供体, 硫及其化合物为电子受体, 产生硫化氢气体, 其菌株已分离自矿井深部水热活动的黑色沉积物 (Kaksonen et al., 2007)。由上可见, 浅层水和土壤 *Firmicutes* 的优势菌属均是嗜温菌, 而深部热水中 *Firmicutes* 的优势菌属均是嗜热、厌氧菌。

本区深部热水次丰富的微生物群落是变形菌门 *Proteobacteria*, 主要分布于 E3-1、E6-1 和 E7-1 样品中 (图 2A), 而该类群在浅层水和土壤, 尤其是浅层水中很丰富 (61%)。但是它们的属水平种类不尽相同。浅层水隶属于 *Proteobacteria* 的优势菌属种类较多, 最丰富的优势菌属是 γ -*Proteobacteria* 成员中的属未定名的 *Burkholderiaceae* 菌科, 其次是 γ -*Proteobacteria* 的 *Hydrogenphaga*、*Dechloromonas*、*Vogesella* 和 *Aeromonas*, α -*Proteobacteria* 的 *Brevundimonas*、*Sphingomonas* 和属未定名的 *Acetobacterales-incerfae-sedis*, 这些菌均是嗜温菌 (<45℃)。土壤中隶属于 *Proteobacteria* 的优势菌属种类少、含量低, 主要是 α -*Proteobacteria* 属未定名的 *Geminicoccaceae* 菌科和 δ -*Proteobacteria* 的属未定名的 *Bacteriap25* 菌科, 前者是专性好氧嗜温菌, 后者是未培养菌。而深部热水 *Proteobacteria* 的优势菌属种类较多, 最丰富的是隶属于 γ -*Proteobacteria* 的假单胞菌属 *Pseudomonas*, 主要分布于 E7-1 样品中, 该菌属是革兰氏阴性、好氧、嗜温菌, 温度范围 18~37℃, pH 6~10; 其次是隶属于 δ -*Proteobacteria* 的硫酸盐还原的热脱硫杆菌属 *Thermodesulfobacterium*, 主要分布在 E3-1 样品中, 该菌属菌株最早分离自火山活动热环境, 生长温度范围是 45~85℃, 最佳 70℃, 为嗜热硫酸盐还原菌 (Zeikus and Dawson, 1983)。第三丰富的是隶属于 γ -*Proteobacteria* 的 *Hydrogenophilus*、*Thiofaba* 和 *Burkholderiaceae*, 主要分布于 E6-1 和 E7-1, 其中 *Hydrogenophilus* 是严格好氧的嗜热菌; 硫氧化菌属 *Thiofaba* 是一类专性化能自养、硫氧化菌, 其菌株分离于日本温泉, 最佳生长温度是 45℃, 以硫代硫酸盐、硫和硫化氢为电子供体, CO₂ 为碳源, 将低价

硫氧化为高价硫 (Mori and Suzuki, 2008); 伯克霍尔德菌属 *Burkholderiaceae* 也是专性需氧嗜温菌, 广泛分布于土壤和水环境中, 生长温度 30~37℃。由此可见, 深部热水隶属于 *Proteobacteria* 菌门的各菌属种类与浅层水和土壤的不同, 但是大部分菌属是好氧嗜温菌, 相似于土壤和浅层水。采自 E6-1 和 E7-1 钻孔的深部热水, 出现好氧嗜温菌可能是大流量抽水条件下, 深部热水得到浅层水的补给所致。相似地, Hubalek 等人研究结果是, 深至 455 m 含水层微生物多样性取决于深层水与浅层水的连通程度 (Hubalek et al., 2016)。Chiriac et al. (2018) 认为, 深部热水嗜温菌丰度和微生物群落多样性增加可能是由浅层水补给引起的。

本区深部热水第三丰富的微生物群落是硝化螺旋菌门 *Nitrospirae*, 主要分布在 E1-1、E4-1 和 E5-1 样品中, 而在本区浅层水和土壤均很少。该门成员中的热脱硫弧菌 *Thermodesulfobacterium* 是本区深部热水最丰富的菌属, 是厌氧、嗜热的硫酸盐还原菌, 该菌最早分离自美国黄石公园热喷口水体中的该菌属菌株, 最佳生长温度是 65℃, 以硫酸盐、硫代硫酸盐和亚硫酸盐为电子受体, 以乳酸、戊糖、氢气和醋酸等为电子供体, 将硫氧化物还原为硫化氢气体 (Henry et al., 1994)。其余的优势菌门 (>2%) 情况是, 产水菌门 *Aquificae* 在浅层水和土壤也很少, 但是在深部热水是优势菌门, 主要分布于 E7-1 样品, 优势菌属为 *Sulfurihydrogenibium*。该菌属菌株最早在日本矿坑深部热液含水层中发现, 是嗜热、化能自养、兼性厌氧菌, 可将氢气氧化为水, 将硫和硫代硫酸盐氧化为硫酸盐, 最佳生长温度 60~65℃, 不能利用复杂的有机物, 以碳水化合物、氨基酸和有机酸为唯一能源和碳源 (Takai et al., 2003)。热袍菌门 *Thermotogae* 在本区浅层水和土壤也很少, 但是在深部热水是优势菌门, 是一类超嗜热厌氧菌。该菌属菌株最早在海底水热区分离得到, 可将乳酸和醋酸发酵降解为 CO₂ 和 H₂O, 将硫还原为 H₂S, 生长温度可达 90℃, 最佳温度 80℃ (Huber et al., 1986)。广古菌门 *Euryarchaeota* 是深部热水最丰富的古菌, 优势古菌属是甲烷嗜热杆菌属 *Methanothermobacter*, 主要分布在 E5-1、E6-1 样品中, 该菌属是嗜热、厌氧、氢营养的产甲烷菌, 已发现于高温油藏地层和天然气田地层水等环境中 (Cheng et al., 2011; Nakamura et al., 2013)。而浅层水和土壤优势古菌均是奇古菌门 *Thaumarchaeota*, 优势菌属分别是属未定名的菌科 *Nitrosopumilaceae* 和菌科 *Nitrososphaeraceae*, 这些菌均是嗜温、好氧氨氧化菌 (Qin et al., 2017)。由上可见, 上述深部热水优势菌门主要出现在深部热环境中, 且大部分是嗜热厌

氧菌。

综合上述分析结果,除去来自浅层水补给的好氧、嗜温菌,本区深部热水特征性菌群主要是厚壁菌门Firmicutes、硝化螺旋菌门Nitrospirae、热袍菌门Thermotogae和广古菌门Euryarchaeota,与组间显著性差异分析结果基本一致。

基于16S rRNA基因的功能预测结果是,还原性柠檬酸循环Reductive citrate cycle模块基因相对丰度最高,该循环广泛分布在厌氧和微好氧细菌中,如产水菌门Aquificae、 δ -Proteobacteria和 ϵ -Proteobacteria及硝化螺旋菌门Nitrospirae中各种厌氧和微好氧细菌中(Berg et al., 2011)。该循环也是罗马西部平原深部热水微生物群落CO₂固定的主要途径(Chiriac et al., 2018)。还原性乙酰辅酶A途径Reductive acetyl-CoA pathway是可利用氢的化能自养厌氧菌(产乙酸菌、硫酸盐还原菌和产甲烷菌等)的CO₂固定途径,该途径功能基因相对丰度在深部热水较浅层水更高,说明深部热水具有更强的氢营养化能自养厌氧固碳作用。三羟基丙酸双循环3-Hydroxypropionate bi-cycle和卡尔文循环途径Calvin cycle均是光合细菌固碳途径,两循环模块功能基因少量存在于本区深部热水中,主要分布在E6-1样品中,说明深部热水存在少量光合作用固碳途径,其原因可能是大流量抽水条件下,深部热水得到与地表水有联系的浅部水的补给,导致光合细菌进入了深部热水中。

本区深部热水生物产甲烷作用很弱,其原因可能是深部热水环境还原性强度尚未达到产甲烷作用发生所需的强还原条件。本区深部热水氮循环有关模块基因丰度较低,可能是深部热水环境还原性过强以及该作用发生所需的电子受体NO₃⁻含量较低之故。本区深部热水异化硫酸盐还原作用较强,原因是硫酸盐还原作用所需的还原强度不及产甲烷所需的还原强度,深部热水处于较封闭的环境,有利于硫酸盐还原作用的发生。硫代硫酸盐氧化作用是需氧反应,该作用基因也出现在深部热水中,主要分布在E6-1和E7-1样品中,这里从功能基因角度说明深部热水得到浅部含氧水的补给。

本区深部热水微生物群落组成和预测的功能具有显著的地热意义。本区深部热水栖息着大量微生物,而微生物的代谢活动会改变深部热水的化学成分。深部热水中优势菌属包括硫酸盐还原菌,该菌的代谢活动会使深部热水SO₄²⁻含量减少,产生的H₂S与金属离子如Fe化合产生FeS沉淀,会加速地下井管腐蚀结垢,缩短地热设施使用年限,本次研究结果为硫酸盐还原菌的防治提供了基础数据。通常地下水CH₄含量较高,本次研究结果是本区深部

热水生物产甲烷作用很弱,意味着深部热水中的CH₄大部分是非生物成因甲烷,研究结果有助于深部热水成因分析。采自E6-1和E7-1钻孔的深部热水出现好氧嗜温菌,意味着在大流量抽水条件下,这些钻孔的深部热水得到浅层水的补给。由于深部热水中变形菌门的优势菌属(假单胞菌Pseudomonas)不同于浅层水变形菌门的优势菌属(伯克氏菌科Burkholderiaceae),说明这种补给不是来自钻孔上方浅层水的垂直补给,可能是来自浅层水的侧向补给,通过深循环获得热能,或通过断裂带连通得到其他部位浅层水的补给,这些钻孔的深部热水具有资源的可更新性。

4 结论

本研究采用高通量测序技术和功能预测技术,以浅层水和土壤为参照,探索了冀中地热区深部热水的微生物群落组成和预测的功能,研究发现,冀中地热区深部热水含有38个菌门,541个菌属,以细菌为主(97.5%),古菌很少(2.5%),特征性菌群主要是厚壁菌门Firmicutes、硝化螺旋菌门Nitrospirae、热袍菌门Thermotogae和广古菌门Euryarchaeota,优势菌属包括硫酸盐还原菌,固碳作用、发酵作用和硫酸盐还原作用可能较强,而产甲烷作用和反硝化作用可能很弱。深部热水个别钻孔出现嗜温、好氧菌,说明在大流量抽水条件下,这些钻孔的深部热水得到浅层水的补给。本次研究揭示了深部碳酸盐岩岩溶-裂隙热储层含有种类丰富、功能多样的微生物群落,微生物群落特征可作为深部热水与浅层水水力联系的指示剂。

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、张薇高级工程师等的大力支持和帮助,特此致谢。

Acknowledgements:

This study was supported by China Geological Survey (No. DD20189112), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (No. SK202010).

参考文献:

- 董海良,于炳松,吕国. 2009. 地质微生物学中几项最新研究进展[J]. 地质论评, 55(4): 98-126.
- 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.
- 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.

References:

- APPRILL A, MCNALLY S, PARSONS R, WEBER L. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2): 129-137.
- BERG I A. 2011. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 1925-1936.
- BOMBERG M, LAMMINMÄKI T, ITÄVAARA M. 2016. Microbial communities and their predicted metabolic characteristics in deep fracture groundwaters of the crystalline bedrock at Olkiluoto, Finland[J]. *Biogeosciences*, 13(21): 6031-6047.
- CHAPELLE F H, O'NEILL K, BRADLEY P M, METHE 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, DAI Li-rong, LI Xia, ZHANG Hui, LU Ya-hai. 2011. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli oil field[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 5212-5219.
- CHIRIAC C M, BARICZ A, SZEKERES E, RUDI K, DRAGO N, COMAN C. 2018. Microbial Composition and Diversity Patterns in Deep Hyperthermal Aquifers from the Western Plain of Romania[J]. *Microbial Ecology*, 75: 38-51.
- CHIVIAN D, BRODIE E L, ALM E J, CULLEY D, DEHAL P S, DESANTIS T Z, GIHRING T M, LAPIDUS A, LIN Li-hung, LOWRY S R, MOSER D P, RICHARDSON P M, SOUTHAM G, WANGER G, PRATT L M, ANDERSEN G L, HAZEN T C, BROCKMAN F J, ARKIN A P, ONSTOTT T C. 2008. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth[J]. *Science*, 322: 275-278.
- COLMAN D R, POUDEL S, STAMPS B W, BOYD E S, SPEAR J R. 2017. The deep hot biosphere: Twenty-five years of retrospection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 6895-6903.
- DAVIDSON M M, SILVER B J, ONSTOTT T C, MOSER D P, GIHRING T M, PRATT L M, BOICE E A, LOLLAR B S, PIPKE J L, PFIFFNER S M, KIEFT T L, SEYMORE W, RALSTON C. 2011. Capture of Planktonic Microbial Diversity in Fractures by Long-Term Monitoring of Flowing Boreholes, Evander Basin, South Africa[J]. *Geomicrobiology Journal*, 28(4): 275-300.
- DONG Hai-liang, YU Bing-song, LÜ Guo. 2009. Recent Developments in Geomicrobiology[J]. *Geological Review*, 55(4): 98-126(in Chinese with English abstract).
- DUTTA A, DUTTA GUPTA S, GUPTA A, SARKAR J, ROY S, MUKHERJEE A, SAR P. 2018. Exploration of deep terrestrial subsurface microbiome in Late Cretaceous Deccan traps and underlying Archean basement, India[J]. *Scientific Reports*, 8(1): 17459.
- ESCUERO C, OGGERIN M, AMILS R. 2018. The deep continental subsurface: the dark biosphere[J]. *International Microbiology*, 21: 3-14.
- HALLBECK L, PEDERSEN K. 2008. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield[J]. *Applied Geochemistry*, 23(7): 1796-1819.
- HENRY E A, DEVEREUX R, MAKI J S, GILMOUR C C, WOESE C R, MANDELCO L, SCHAUDER R, REMSEN C C, MITCHELL R. 1994. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain[J]. *Archives of Microbiology*, 161(1): 62-69.
- HUBALEK V, WU Xiao-feng, EILER A, BUCK M, HEIM C, DOPSON M, BERTILSSON S, IONESCU D. 2016. Connectivity to the surface determines diversity patterns in subsurface aquifers of the Fennoscandian shield[J]. *The ISME Journal*, 10: 2447-2458.
- HUBER R, LANGWORTHY T A, KÖNIG H, THOMM M, WOESE C R, SLEYTR U B, STETTER K O. 1986. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C[J]. *Archives of Microbiology*, 144: 324-333.
- ITÄVAARA M, NYSSÖNEN M, KAPANEN A, NOUSIAINEN A, AHONEN L, KUKKONEN I. 2011. Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu deep borehole, Fennoscandian Shield[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(2): 295-309.
- KAKSONEN A H, SPRING S, SCHUMANN P, KROPPENSTEDT R M, PUHAKKA J A. 2007. *Desulfovibrio thermocuniculi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 98-102.
- LANGILLE M G I, ZANEVELD J, CAPORASO J G, MCDONALD D, KNIGHTS D, REYES J A, CLEMENTE J C, BURKEPILE D E, THURBE R L V, KNIGH R, BEIKO, R G, HUTTENHOWER C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 31(9): 814-821.
- LAU M C, CAMERON C, MAGNABOSCO C, BROWN C T, SCHILKEY F, GRIM S, HENDRICKSON S, PULLIN M, LOLLAR B S, HEERDEN E V, KIEFT T L, ONSTOTT T C. 2014. Phylogeny and phylogeography of functional genes

- shared among seven terrestrial subsurface metagenomes reveal N-cycling and microbial evolutionary relationships[J]. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1-16.
- MORI K, SUZUKI K. 2008. *Thiofabia tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from a hot spring[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1885-1891.
- NAKAMURA K, TAKAHASHI A, MORI C, TAMAKI H, MOCHIMARU H, NAKAMURA K, TAKAMIZAWA K, KAMAGATA Y. 2013. *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic, thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 715-722.
- NYSSÖNEN M, HULTMAN J, AHONEN L, KUKKONEN I, PAULIN L, LAINE P, ITÄVAARA M, AUVINEN P. 2014. Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield[J]. *The ISME Journal*, 8(1): 126-138.
- PARADA A E, NEEDHAM D M, FUHRMAN J A. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples[J]. *Environmental Microbiology*, 18(5): 1403-1414.
- QIN W, HEAL K R, RAMDASI R, KOBELT J N, MARTENS-HABBENA W, BERTAGNOLLI A D, AMIN S A, WALKER C B, URAKAWA H, KONNEKE M, DEVOL A H, MOFFETT J W, ARMBRUST E V, JENSEN G J, INGALLS A E, STAHL D A. 2017. *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalaminigenes* sp. nov., *Nitrosopumilus oxyclinae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine ammonia-oxidizing archaea of the phylum Thaumarchaeota[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 5067-5079.
- TAKAI K, KOBAYASHI H, NEALSON KH, HORIKOSHI K. 2003. *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 823-827.
- WANG Gui-ling, LI Jun, WU Ai-min, ZHANG Wei, HU Qiu-yun. 2018. 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*, 39(5): 24-32(in Chinese with English abstract).
- WIEGEL J, LJUNGDAHL L G. 1981. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov. spec. nov. a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium[J]. *Archives of Microbiology*, 128(4): 343-348.
- ZHAO Jia-yi, ZHEN Shi-jun, ZHANG Cui-yun, YIN Mi-ying, 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).
- ZEIKUS J G, HEGGE P W, ANDERSON M A. 1979. *Thermoanaerobium brockii* gen. nov. and sp. nov., a new chemoorganotrophic, caldophilic, anaerobic bacterium[J]. *Archives of Microbiology*, 122: 41-48.
- ZEIKUS J G, DAWSON M A, THOMPSON T E, INGORSSEN K, HATCHIKIAN E C. 1983. Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov.[J]. *Journal of General Microbiology*, 129: 1159-1169.