

典型油气藏上方甲烷氧化菌群的分子生物学解析

汤玉平, 高俊阳, 赵克斌, 任 春, 许科伟

(中国石化 石油勘探开发研究院 无锡石油地质研究所, 江苏 无锡 214151)

摘要:以胜利油田典型油气藏为研究对象, 原位提取土壤中的甲烷氧化微生物群落组成信息, 明确了油气指示微生物类群。通过对油田、气田和背景区土壤的 *pmoA* 基因克隆文库分析发现, 来自油气藏上方土壤与背景区土壤的甲烷氧化菌群结构的差异较大。背景区土壤的甲烷氧化 II 型菌——甲基孢囊菌和甲基弯曲菌的相对丰度明显高于油气藏上方土壤, 而甲烷氧化 I 型菌——甲基球菌和甲基暖菌则显著减少, 表明长期的油气微渗漏能使甲烷氧化微生物群落向 I 型菌演替。T-RFLP 多变量统计分析结果显示, 经过地质历史时期的微量轻烃连续驯化, 油气藏上方的甲烷氧化微生物群落发生了演替, 甲基球菌和甲基杆菌可能是推动这种演替变化的关键种群。甲烷氧化 *pmoA* 基因的丰度在油气藏上方的异常可以用于预测下伏油气藏的存在。

关键词: 克隆文库; T-RFLP; *pmoA* 基因; 甲烷氧化菌; 油气藏

中图分类号: TE135

文献标识码: A

Molecular biological analysis of methanotrophic bacterial community above typical oil and gas reservoirs

Tang Yuping, Gao Junyang, Zhao Kebin, Ren Chun, Xu Kewei

(Wuxi Research Institute of Petroleum Geology, SINOPEC, Wuxi, Jiangsu 214151, China)

Abstract: In this study, the community structure of aerobic methanotrophic communities were investigated at light hydrocarbon microseeps above a known oil and gas field in the Shengli Oilfield. Clone library analysis of the *pmoA* gene revealed major differences in the methanotrophic community composition between oil and gas fields and the surrounding soils. The relative abundance of methanotrophic Methylocystis and Methylosinus (type II) in surrounding soils is obviously lower in oil and gas field soils than surrounding soils, but the relative abundance of methanotrophic Methylococcus and Methylocaldum (type I) presents a reverse trend. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis confirmed that one distinct Methylococcus and Methylobacter-related group may dominate the community at hydrocarbon microseeps. The *pmoA* gene copy numbers determined by real time PCR also indicated that methane oxidizing microbial community anomalies above typical oil and gas reservoirs exist objectively.

Key words: clone library; T-RFLP; *pmoA* gene; methanotrophic bacteria; oil and gas reservoirs

传统的微生物勘探技术具有一定的局限性, 特别是样品采集后的后续实验室分析。传统方法主要采用特异培养基(如富含烃类组分的培养基分离油气指示微生物), 从环境样品中选择性地对油气微生物进行计数和分类, 推测其新陈代谢机理, 进而推测油气资源分布的有利区块^[1-3]。然而, 原核微生物通常对环境具有极强的适应能力, 即便在烃类浓度极低的情况下, 烃类氧化微生物也有可能存在。事实上, 20 世纪 30 年代即有科学家提出地球上微生物的分布规律遵循以下原则: “一切物种无处不在, 但却依赖环境选择”^[4]。因此非油气藏环境样品中也可能含有极少量的烃类氧化微生物。

此外, 目前常用的油气指示微生物培养检测方法多会注入较高浓度的烃类, 在富集土壤样品中的指示微生物的同时, 也可能会刺激其他微生物的生长, 这与油气藏上方原位实际状况相去甚远。因此, 原位采集环境样品, 规避实验室内高浓度烃类物质培养过程, 从微生物群落的角度直接分析特征微生物组成和数量的变化规律, 能够在最大程度上反映油气藏形成过程中的微生物群落演替规律, 提升微生物勘探技术的精度。

此外, 已知的 C₁-C₄ 烃类氧化微生物极可能仅占油气资源指示微生物很少的一部分, 大部分的油气资源指示微生物目前尚不为人所知。采用微生物

16S rRNA 序列为基础的分析表明,地球上可培养的微生物仅占有所有微生物的 1%~10%,绝大多数微生物无法在实验室获得纯菌株开展下游研究^[5-8]。传统的研究手段可能忽视了绝大多数油气资源指示微生物,无法为油气勘探提供有力而准确的支撑并准确鉴别油气资源指示微生物。此外,油气资源微生物,特别是难培养微生物的形成极可能伴随有漫长的油气藏地质历史形成过程,因而,自然条件下的油气藏指示微生物极可能长期处于贫营养状态,属于难培养微生物,实验室内采用平板法和最大概率法很难准确甄别难培养油气资源指示微生物的变化规律,为油气藏微生物勘探技术提供有力支撑^[9]。此外,平板法和最大概率法的操作过程极为繁琐、费时,尤其不适于大样本量的规模化工业勘探应用^[10]。

甲烷氧化菌是一种常用的油气指示菌,专性利用甲烷作为唯一的碳源和能源^[7,9-10]。在甲烷氧化菌的诸多功能基因中,*pmoA* 基因存在于几乎所有已知的甲烷氧化微生物细胞中,因此被普遍应用于土壤或沉积物样品中甲烷氧化菌的定性和定量研究^[9,11-12]。本文针对 *pmoA* 基因,采用限制性片段多样性分析(T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)、克隆文库、实时荧光定量 PCR(Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应)等分子生物学技术,对已知油气藏上方的指示微生物群落进行精确识别和解析。

1 样品与实验

1.1 研究区石油地质概况

陈 22 块位于济阳拗陷陈家庄凸起西段,邵家洼陷延伸的低凸起上,北部以东西向北掉虎 4 断层为界,由北向南残留陈 12、岭 1 和陈 22 共 3 个基岩高点,埋深为 1 100~1 270 m。古近系沿西、北、东 3 个方向向西段基岩高点逐层超,至东营组三段沉积末期披覆其上,新近系馆陶组与下伏东营组不整合接触。陈 22 块东营组储层为东三段灰绿色、灰色含砾砂岩和细砂岩夹少量紫红色泥岩,单砂层较薄,厚度为 1.5~8.0 m,累积厚度为 3.0~20.0 m,属于小型扇三角洲沉积^[13]。

1.2 采样部署

图 1 为本研究采样部署,设计一条过油田、气田剖面,采样深度为 60 cm,分别进行群落指纹分析和基因定量。

1.3 土壤 DNA 提取

采用 MP 公司的土壤 DNA 提取试剂盒(FastDNA

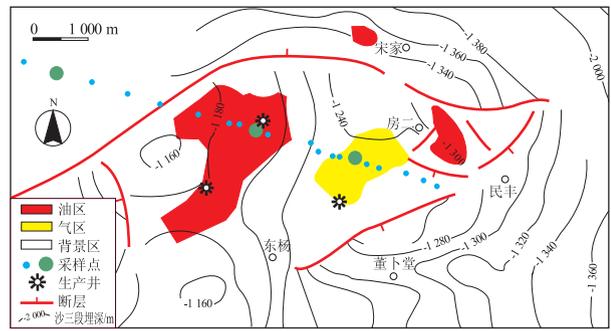


图 1 济阳拗陷陈 22 块微生物样品采集示意

绿色圆点为 3 个地表深度钻孔研究样点,剖面上其他蓝色小圆点做群落指纹分析(T-RFLP)和定量 PCR 分析

Fig.1 Sampling scheme for spatial analysis of methanotrophic community in Chen22 oil and gas field, Jiyang Depression

SPIN Kit for Soil) 进行提取。

1.4 甲烷氧化菌 *pmoA* 基因扩增

PCR 反应采用甲烷氧化菌特异性引物。PCR 反应体系参照文献^[6],其扩增产物采用专用的 PCR 纯化试剂盒(TaKaRa)进行纯化。

1.5 Real-time PCR 基因定量

实时荧光定量 PCR 是通过实时监测 PCR 扩增反应中扩增产物荧光信号的变化,来实现对样品中的特定基因进行定量及定性分析^[14-16]。*pmoA* 基因重组质粒构建完成后,将 *pmoA* 重组质粒进行十倍稀释以获得定量标准曲线,采用试剂盒(SYBR Premix Ex Taq Perfect Real Time)于扩增仪(CFX96 Real-Time PCR)上对标样和未知土壤样品进行 *pmoA* 基因定量分析。

1.6 克隆文库和系统发育学分析

采用 Kemp 等^[17]的渐进采样方法来检验克隆文库的有效性和代表性。即在所建文库中随机抽取不同大小的虚拟文库,随后采用多样性指数计算各个虚拟文库组成预测样品的种群丰富度。随着虚拟文库中克隆数目的增加,预测曲线平稳则说明文库克隆数量已经可以代表给定样品中主要的微生物类群。

1.7 末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)

T-RFLP 实验的反应体系和反应条件采用 Peng 等人的方法^[18]。在 T-RFLP 图谱中,单个末端限制性片段 T-RF(可代表一个物种)的相对丰度为峰高与所有片段总面积之比。克隆文库所得的克隆子序列经过软件模拟酶切后,可以对应 T-RFLP 图谱中各个不同末端限制性片段(T-RF)所代表的特定种属^[19](图 2)。

1.8 多元统计分析

对于本研究样品中出现的所有 8 种 T-RFs 进

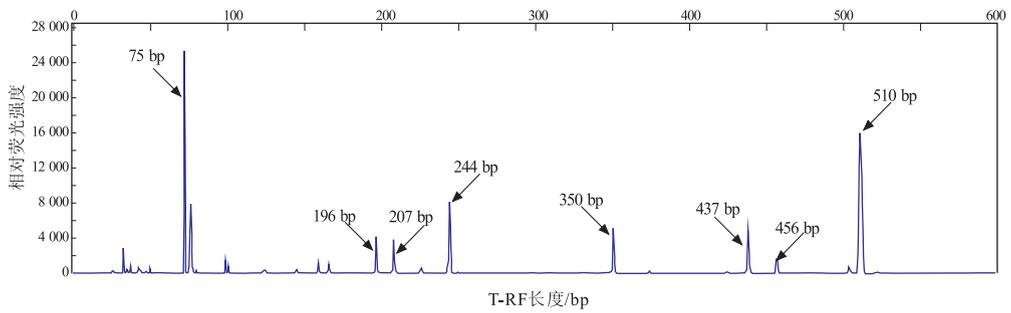


图2 甲烷氧化 *pmoA* 基因末端限制性片段长度多态性图谱(T-RFLP)

Fig.2 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of methanotrophic *pmoA* gene

行去趋势对应统计分析,将这8种不同的T-RFs进行分组和排序,以计算其第一排序轴的梯度范围(Lengths of Gradient)。结果显示,第一轴小于3.0,因此选用线性模型PCA(Principal Components Analysis,主成分分析)分析^[19]。排序分析采用CANOCO生态学软件进行运算和绘图。

2 结果与讨论

2.1 甲烷氧化微生物多样性分析

基于16S rRNA的分子生态学解析技术已被广泛用于研究不同环境中的微生物群落多样性,如热带雨林、水稻田、草甸和海底沉积物中的微生物群落。与石油相关微生物群落的研究主要集中于地下油藏和油田水等的微生物群落^[20-21],而对于典型油气藏上方土壤中的微生物群落特征却知之甚少。本研究针对油藏、气藏和背景区的土壤样品分别构建了甲烷氧化功能基因 *pmoA* 克隆文库,全面掌握油气藏上方甲烷敏感性微生物种属,为研究油气藏上方烃类微渗漏生态系统中微生物群落特征并开展微生物油气勘探提供实验数据。

为测试所建克隆文库是否具有代表性,本研究采用了Kemp等^[17]推荐的渐进采样法,计算了2个多样性估计指数 S_{Chao1} 和 S_{ACE} 。计算结果显示这2个

估算指数对样品中微生物类群数量的预测已趋于平稳。如图3所示, S_{Chao1} 和 S_{ACE} 指数表明 *pmoA* 基因克隆文库的覆盖度已达到理论值的93%,表明所建的文库已经可以代表实际样品中的微生物多样性。

通过与已有研究相比较,这些克隆子在海湖沉积物、海底冷泉、水稻根系、垃圾填埋场、活性污泥等好氧或兼氧环境中均有发现(图4)。对随机挑取的总共155个 *pmoA* 基因克隆子做的系统发育分析显示,沾化油区的甲烷氧化菌多样性比较高,基本覆盖了所有已知的中温菌,这些甲烷氧化菌包括甲基球菌(*Methylococcus*)、甲基暖菌(*Methylocaldum*)、甲基微菌(*Methylomicrobium*)、甲基杆菌(*Methyllobacter*)、甲基孢囊菌(*Methylocystis*)、甲基弯曲菌(*Methylsinus*)和甲基单胞菌(*Methylomonas*),除此之外还有大量的未培养微生物(图5)。对3个文库进行综合分析,其中甲基杆菌是丰度最大的菌群(26%),其次是甲基单胞菌(18%)和甲基孢囊菌(14%),以甲基微菌为最少12%)。

前已述及,根据甲烷氧化菌细胞结构、代谢途径和生理代谢途径的不同,可分类为属于 γ 变形杆菌门的I型菌,涵盖甲基杆菌和甲基球菌等10个属,它们细胞内利用甲醛的代谢途径为戊糖磷酸核

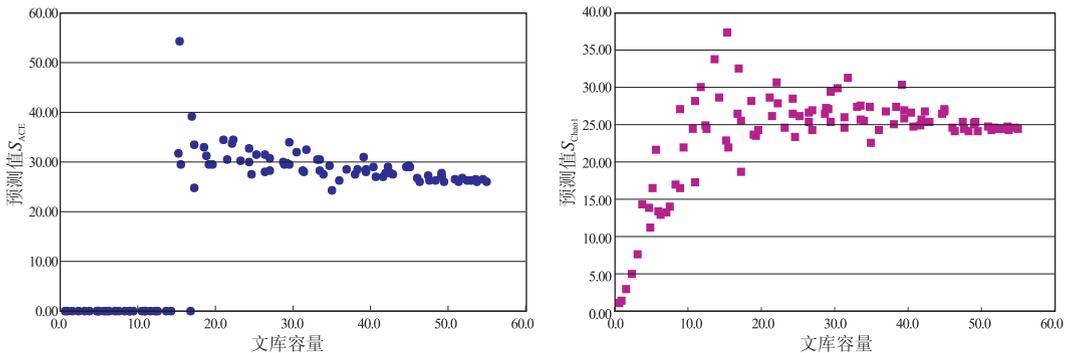


图3 克隆文库的 S_{ACE} 和 S_{Chao1} 值

当 S_{ACE} 和 S_{Chao1} 进入平台期时,即可认为文库容量已足够。

Fig.3 S_{ACE} and S_{Chao1} values of clone library

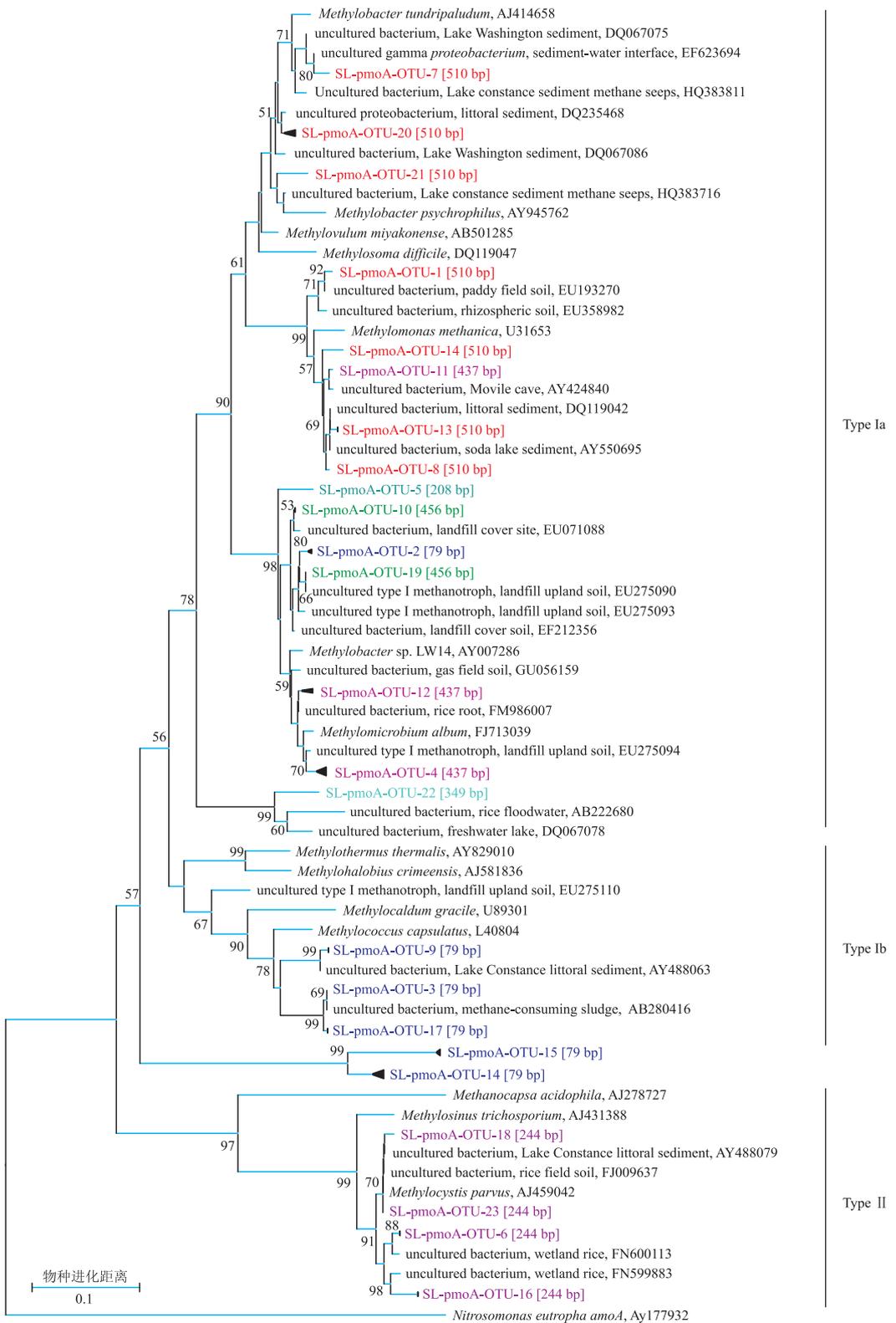


图 4 沾化油区甲烷氧化 *pmoA* 基因克隆文库系统发育树

括号为模拟酶切所得 T-RF 片段长度; Bootstrap 检验值低于 50% 未在图中显示

Fig.4 Phylogenetic relationship of deduced *pmoA* sequences generated from different soil samples in Zhanhua area

酮糖途径;以及属于 α 变形杆菌门的 II 型菌,包括甲基孢囊菌和甲基弯曲菌等 4 个属,它们通过丝氨酸途径同化甲醛。土壤微生物在竞争过程中,通常有 2 种生态策略^[22]。一种是在外界营养丰富条件

下,微生物迅速生长繁殖 ($V_{max} \uparrow$),同时底物利用阈值也随之上升 ($K_m \uparrow$);另一种情况是在底物浓度极低时,微生物胞内酶系自我调控,把能量消耗降到最低 ($V_{max} \downarrow$),同时底物利用阈值也随之降低

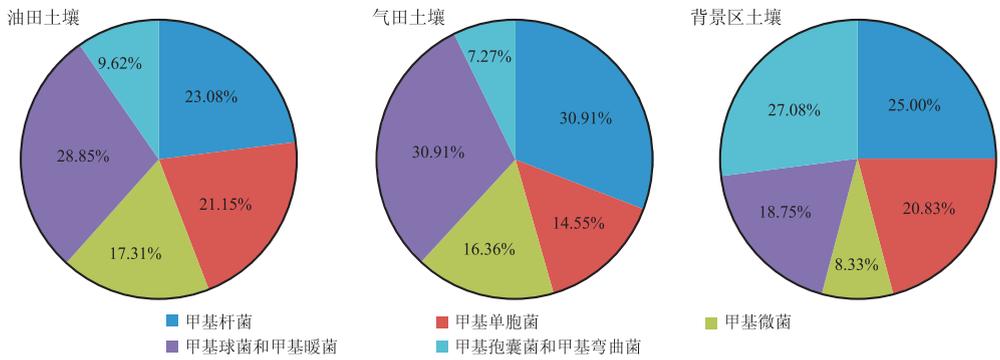


图 5 甲烷氧化菌克隆分布

Fig.5 Microbial community structure of methanotrophy from different soil samples

($K_m \downarrow$)。现在普遍认为,地表土壤中存在 2 类甲烷氧化菌^[23],一类是在高浓度甲烷的环境下生长的,具有较低的亲和力(k 策略);另一类是以微渗漏的甲烷为基质,具有较高的亲和力(r 策略)。与之对应,甲烷氧化 II 型菌通常在极端环境土壤中存在(如沙漠、极地等),而且以利用大气中的甲烷气体为主^[24-25]。甲烷氧化 I 型菌则在土壤甲烷浓度较高的生境中存在,如森林、沼泽和水稻田土壤中^[26-29]。那么在地质历史时期的持续轻烃供应下,油气藏上方的甲烷氧化微生物群落是否会从 II 型菌向 I 型菌演替呢?

针对这一假设,本研究对油田土壤、气田土壤和背景区土壤的 *pmoA* 基因克隆文库进行了分析。结果发现来自油藏和气藏上方土壤中的甲烷氧化微生物群落结构非常相似,与之对应,两点位土壤顶空气和游离气中的甲烷含量均占 90% 以上。背景区土壤与油气藏上方土壤相比,甲烷氧化菌群结构则呈现了较大的差异,甲烷氧化 II 型菌——甲基孢囊菌和甲基弯曲菌的相对丰度明显高于油气藏上方土壤,而甲烷氧化 I 型菌——甲基球菌和甲基暖菌则显著减少。因此,从克隆文库的角度来看,长期的油气微渗漏确实能使甲烷氧化微生物群落向 I 型菌演替,尽管甲烷的浓度很低 ($< 200 \times 10^{-6}$)。侯读杰课题组^[9]最近也对大港油田油气藏上方土壤中 *pmoA* 基因的多样性进行了研究,并提出甲烷氧化 II 型菌甲基孢囊菌和甲基弯曲菌是 2 种可能的气藏指示菌,这与我们的结论有较大差异。这表明在不同地理条件下,油气指示菌的类型很有可能发生变化,其内在机制值得进一步研究。

2.2 甲烷氧化微生物群落解析

与克隆文库相对应,T-RFLP 图谱中有 9 个主要片段(75, 98, 196, 207, 244, 350, 437, 456, 510 bp)。通过模拟酶切,与克隆文库的 OUT 对应关系如下:75 bp 的片段对应甲基球菌(*Methylococcus*)

和甲基暖菌(*Methylocaldum*),244 bp 的 T-RF 对应甲基孢囊菌(*Methylocystis*)和甲基弯曲菌(*Methylobacter*),350 bp 和 456 bp 的 T-RF 对应甲基微菌(*Methylomicrobium*),437 bp 的 T-RF 对应甲基单胞菌(*Methylomonas*),510 bp 的片段对应甲基杆菌(*Methylomonas*)。其余 98,196,207 bp 的片段未在文库中找到对应的克隆子,可能是 PCR 反应引入的非特异性片段造成的^[30]。为全面地了解甲烷氧化菌群在长期地质历史时期的演替特征,本研究对不同来源样品的 *pmoA* 基因 T-RFLP 数据进行了多元统计分析(图 6),相关符号及图解详见文献^[31]。具体种群变化讨论如下:

由图 6 可知,不同油气属性土壤样品的聚类特性表现得较为明显。经过地质历史时期的微量轻烃连续驯化,油气藏上方的甲烷氧化微生物群落发生了演替,75 bp 所代表的甲基球菌(*Methylococcus*)

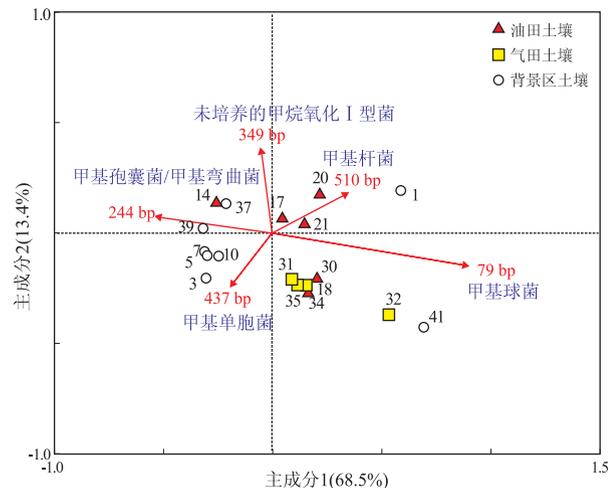


图 6 甲烷氧化微生物群落排序

箭头方向代表物种增加方向,箭头长度代表与排序图轴关系的强弱。数字代表微生物剖面采样点号

Fig.6 Ordination diagram from principal component analysis (PCA) of methanotrophic microorganism from different soil samples

和 508 bp 代表的甲基杆菌(*Methylobacter*)就是推动这种演替变化的关键种群。在对照簇中,244,350 和 437 bp 代表的甲基孢囊菌、甲基弯曲菌、甲基微菌、以及甲基单胞菌则表现出对微量甲烷的高度敏感性。据文献报道,荚膜甲基球菌(*Methylococcus capsulatus*)常常被作为研究“methane-fixing symbionts”的模式菌株,这些都得益于其独特的生态特性^[32]。荚膜甲基球菌经常出现于垃圾填埋场、瘤胃和油气藏等高甲烷浓度的生境中^[33]。

2.3 甲烷氧化微生物定量解析

为评估油气基因是否适合快速诊断和识别油气藏,本研究采集了图 1 中一条通过油气藏的剖面样品,采用定量 PCR 技术对气指示基因 *pmoA* 丰度基于油气藏的生物地理学分布进行了初步研究。如图 7a 所示,甲烷氧化基因 *pmoA* 在油气田上方显示出明显的高值区,非油气区为明显的低值。经移动平均化后,对地下油藏和气藏均有较好的指示效果,且边界清晰(图 7b)。传统微生物勘探理论认为甲烷氧化菌仅能指示天然气藏,而从我们的结果可以看出,甲烷氧化基因 *pmoA* 既可以指示气藏,同时可以很好地指示富含甲烷气的油藏。

3 结论

本研究采用分子生物学方法进行了微生物油气勘探的探索性研究,将油气藏形成视为一种长期的、动态的地质生态系统过程,基于油气藏上方烃类微渗漏原理,以特征性微生物群落的长期驯化规律为主线,选择胜利油田典型油气藏为实验区,探索油气藏上方甲烷氧化过程的微生物驱动者,取得

以下认识:

(1) 油藏和气藏上方土壤中的甲烷氧化微生物群落结构非常相似,而背景区土壤的甲烷氧化菌群结构的差异较大。背景区土壤的甲烷氧化 II 型菌——甲基孢囊菌和甲基弯曲菌的相对丰度明显高于油气藏上方土壤,而甲烷氧化 I 型菌——甲基球菌和甲基暖菌则显著减少,表明长期的油气微渗漏能使甲烷氧化微生物群落向 I 型菌演替。

(2) T-RFLP 多变量统计分析结果显示,经过地质历史时期的微量轻烃连续驯化,油气藏上方的甲烷氧化微生物群落发生了演替,甲基球菌(*Methylococcus*)和甲基杆菌(*Methylobacter*)可能是推动这种演替变化的关键种群。

(3) *pmoA* 基因丰度的分布规律得知,在油气藏上方土壤中会出现“微生物热点”,这种异常现象可以用作检测和预测下伏油气藏的存在。

参考文献:

- [1] Brisbane P G, Ladd J N. The role of microorganisms in petroleum exploration[J]. Annual Review of Microbiology, 1965, 19: 351-364.
- [2] Tedesco S A. Surface geochemistry in petroleum exploration[M]. New York: Chapman & Hall, 1995.
- [3] 袁志华, 许晨, 松辽盆地西部杜 75 块油气微生物勘探研究[J]. 特种油气藏, 2012, 19(1): 47-50.
Yuan Zhihua, Xu Chen. Research on microbial prospecting for oil and gas in Block Du75 of western Songliao Basin[J]. Special Oil & Gas Reservoirs, 2012, 19(1): 47-50.
- [4] O'Malley M A. The nineteenth century roots of 'everything is everywhere' [J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(8): 647-651.
- [5] Ehrlich H L. Geomicrobiology [M]. New York: Marcel Dekker, 2002.
- [6] Pérez-de-Mora A, Schulz S, Schlöter M. MPN- and real-time-based PCR methods for the quantification of alkane monooxygenase homologous genes (alkB) in environmental samples [M] // Cummings S. Methods in molecular biology. New York: Humana Press, 2010: 59-68.
- [7] Redmond M C, Valentine D L, Sessions A L. Identification of novel methane-, ethane-, and propane-oxidizing bacteria at marine hydrocarbon seeps by stable isotope probing [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6412-6422.
- [8] Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(10): 2477-2490.
- [9] Zhang F, She Y H, Zheng Y. Molecular biologic techniques applied to the microbial prospecting of oil and gas in the Ban 876 gas and oil field in China [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(4): 1183-1194.
- [10] 易绍金, 熊汉辉, 陈斌强. 细菌瓶法用于油气微生物勘探中气态烃氧化菌菌数测定 [J]. 油田化学, 2006, 23(1): 92-95.
Yi Shaojin, Xiong Hanhui, Chen Binqiang. Determination of bacteria cell population for gaseous hydrocarbon-oxidating bacteria by using

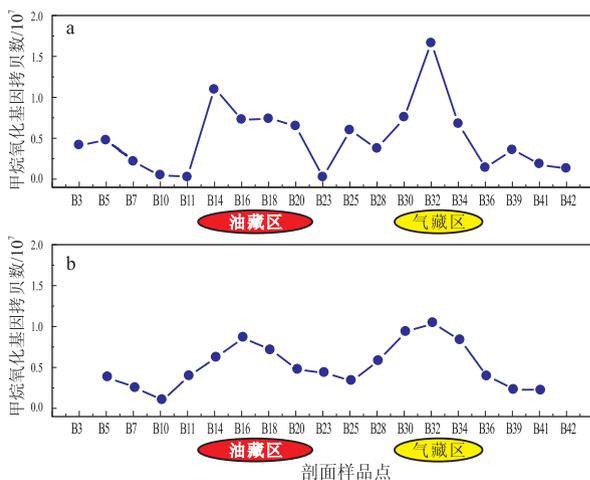


图7 过油气剖面甲烷氧化基因 *pmoA* 定量数据(a)和移动平均化曲线(b)

Fig.7 Original *pmoA* gene copy numbers (a) and moving average numbers (b) of different soils across Chen22 oil and gas field

- culture flask test in Microbiological Prospecting of Oil and Gas (MPOG)[J]. Oilfield Chemistry, 2006, 23(1): 92-95.
- [11] Han B, Chen Y, Abell G, et al. Diversity and activity of methanotrophs in alkaline soil from a Chinese coal mine[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(2): 40-51.
- [12] Han B, Su T, Li X, et al. Research progresses of methanotrophs and methane monooxygenases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(9): 1511-1519.
- [13] 田建华, 苏朝光, 张营革. 陈家庄凸起西段陈22块东营组地层超覆油藏地震描述技术[J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(3): 50-53.
Tian Jianhua, Su Chaoguang, Zhang Yingge, et al. Seismic description techniques for stratigraphic overlap oil reservoirs of Dongying Formation, Chen22 Block, western Chenjiazhuang Uplift[J]. Petroleum Geology and Recovery Efficiency, 2008, 15(3): 50-53.
- [14] Limpiyakorn T, Kurisu F, Yagi O. Development and application of real-time PCR for quantification of specific ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of sewage treatment systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 1004-1013.
- [15] López-Gutiérrez J C, Henry S, Hallet S, et al. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(3): 399-407.
- [16] Zhang T, Fang H. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 70(3): 281-289.
- [17] Kemp P, Aller J. Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? [J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2004, 2: 114-125.
- [18] Peng J, Lü Z, Rui J, et al. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(9): 2894-2901.
- [19] Xu K W, Liu H, Li X F, et al. Typical methanogenic inhibitors can considerably alter bacterial populations and affect the interaction between fatty acid degraders and homoacetogens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87: 2267-2279.
- [20] Krista K M, Bonaunet K, Berland H, et al. Characterization of culture independent and dependent microbial communities in a high-temperature off shore chalk petroleum reservoir [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, 96(4): 423-439.
- [21] Lysnes K, Bøtker G, Torsvik T, et al. Microbial response to reinjection of produced water in an oil reservoir [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 83(6): 1143-1157.
- [22] Andrews J H, Harris R F. R-selection and K-selection and microbial ecology[J]. Advances in Microbial Ecology, 1986, 9: 99-147.
- [23] Krause S, Lüke C, Frenzel P. Succession of methanotrophs in oxygen-methane counter-gradients of flooded rice paddies [J]. The ISME Journal, 2010, 4(12): 1603-1607.
- [24] Striegl R G, McConnaughey T A, Thorstenson D C, et al. Consumption of atmospheric methane by desert soils [J]. Nature, 1992, 357(6374): 145-147.
- [25] Valentine D L. Emerging topics in marine methane biogeochemistry[J]. Annual Review of Marine Science, 2011, 3: 147-171.
- [26] Boeckx P, Cleemput O V. Methane oxidation in a neutral landfill cover soil: Influence of moisture content, temperature, and nitrogen-turnover [J]. Journal of Environmental Quality, 1996, 25(1): 178-183.
- [27] Bowden R D, Newkirk K M, Rukko G M. Carbon dioxide and methane fluxes by a forest soil under laboratory-controlled moisture and temperature conditions [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(12): 1591-1597.
- [28] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria [J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(2): 439-471.
- [29] Hunger S, Schmidt O, Hilgarth M, et al. Competing formate- and carbon dioxide-utilizing prokaryotes in an anoxic methane-emitting fen soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3773-3785.
- [30] Deutzmann J S, Worner S, Schink B. Activity and diversity of methanotrophic bacteria at methane seeps in eastern lake confluence sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(8): 2573-2581.
- [31] ter Braak C J F, Šmilauer P. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5) [M]. Microcomputer Power, NY, USA, 2002.
- [32] Wendlandt K D, Stottmeister U, Helm J, et al. The potential of methane-oxidizing bacteria for applications in environmental biotechnology [J]. Engineering in Life Sciences, 2010, 10(2): 87-102.
- [33] Ward N, Larsen Ø, Sakwa J, et al. Genomic insights into methanotrophy: The complete genome sequence of Methylococcus capsulatus (bath) [J]. PLoS Biology, 2004, 2(10): 1616-1628.

(编辑 韩 彧)