

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第2期

Vol.33 No.2

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

基于人体健康风险的水污染事件污染物安全阈值研究	郑丙辉, 罗锦洪, 付青, 秦延文, 胡林林 (337)
基于人体健康风险的水污染事件遗传性致癌物安全浓度研究	罗锦洪, 郑丙辉, 付青, 黄民生 (342)
湿地水环境健康评价方法及案例分析	李玉凤, 刘红玉, 郝敬锋, 郑因, 曹晓 (346)
北运河下游典型河网区水体中氮磷分布与富营养化评价	单保庆, 菅宇翔, 唐文忠, 张洪 (352)
漳卫南运河流域水质时空变化特征及其污染源识别	徐华山, 徐宗学, 唐芳芳, 于伟东, 程燕平 (359)
黄河三角洲浅层地下水化学特征及形成作用	安乐生, 赵全升, 叶思源, 刘贯群, 丁喜桂 (370)
沉积物扰动持续时间对悬浮物中磷形态数量分布的影响	李大鹏, 黄勇, 李勇, 潘杨 (379)
沉水植物生长期对沉积物和上覆水之间磷迁移的影响	王立志, 王国祥, 俞振飞, 周贝贝, 陈秋敏, 李振国 (385)
长寿湖表层沉积物氮磷和有机质污染特征及评价	卢少勇, 许梦爽, 金相灿, 黄国忠, 胡文 (393)
洪泽湖沉积物中营养盐和重金属的垂向分布特征研究	张文斌, 余辉 (399)
降雨对农家堆肥氮磷流失的影响及其面源污染风险分析	彭莉, 王莉玮, 杨志敏, 陈玉成, 乔俊婧, 赵中金 (407)
浅水湖泊水动力过程对藻型湖区水体生物光学特性的影响	刘笑菡, 冯龙庆, 张运林, 赵林林, 朱梦圆, 时志强, 殷燕, 丁艳青 (412)
基于半分析模型的太湖春季水体漫衰减系数 K_d (490) 估算及其遥感反演	刘忠华, 李云梅, 李瑞云, 吕恒, 檀静, 郭宇龙 (421)
基于 QAA 算法的巢湖悬浮物浓度反演研究	张红, 黄家柱, 李云梅, 徐伟凡, 刘忠华, 徐昕 (429)
好氧/厌氧潜流湿地结构工艺优化	李锋民, 单时, 李媛媛, 李扬, 王震宇 (436)
邻苯二甲酸二丁酯对短裸甲藻活性氧自由基的影响	别聪聪, 李锋民, 李媛媛, 王震宇 (442)
Rac-及 S-异丙甲草胺对 2 种微藻毒性特征影响研究	蔡卫丹, 刘惠君, 方治国 (448)
羟基自由基致死船舶压载水海洋有害生物研究	白敏冬, 张拿慧, 张芝涛, 陈操, 孟祥盈 (454)
天然菱铁矿改性及强化除砷研究	赵凯, 郭华明, 李媛, 任燕 (459)
零价铁降解 4-氯硝基苯动力学研究	廖娣劫, 杨琦, 李俊鎔 (469)
水体中氧氟沙星的光化学降解研究	邵萌, 杨桂朋, 张洪海 (476)
阿替洛尔在硝酸根溶液中的光降解研究	季跃飞, 曾超, 孟翠, 杨曦, 高士祥 (481)
吡啶在紫外光辐射下的生物降解	方苗苗, 阎宁, 张永明 (488)
蜜环菌漆酶对蒽醌类染料的脱色条件优化	朱显峰, 秦仁炳, 余晨晨, 范书军 (495)
ϵ -聚赖氨酸生产废菌体对六价铬吸附影响的研究	曹玉娟, 张杨, 夏军, 徐虹, 冯小海 (499)
丝状菌污泥致密过程的强化条件研究	李志华, 孙玮, 姬晓琴, 王晓昌 (505)
亚硝化颗粒污泥对温度变化的响应特性研究	罗远玲, 杨朝晖, 徐峥勇, 周玲君, 黄兢, 肖勇, 曾光明, 汪理科 (511)
我国典型工程机械燃油消耗量及排放清单研究	李东玲, 吴烨, 周昱, 杜让, 傅立新 (518)
北京市 PM_{10} 自动监测网络优化研究	齐玲, 赵越, 谢绍东 (525)
道路绿化带对街道峡谷内污染物扩散的影响研究	徐伟嘉, 幸鸿, 余志 (532)
Fe^{II} (EDTA) 络合协同 RDB 去除 NO 废气效能及过程分析	陈浚, 杨宣, 於建明, 蒋轶锋, 陈建孟 (539)
UV-B 辐射对亚热带森林凋落叶氮、磷元素释放的影响	宋新章, 张慧玲, 江洪, 余树全 (545)
干热河谷林地燥红土固碳特征及“新固定”碳表观稳定性	唐国勇, 李昆, 孙永玉, 张春华 (551)
九龙江河口表层水体及沉积物中甲烷的分布和环境控制因素研究	郭莹莹, 陈坚, 尹希杰, 孙治雷, 邵长伟 (558)
秋季黄河口滨岸潮滩湿地系统 CH_4 通量特征及影响因素研究	姜欢欢, 孙志高, 王玲玲, 牟晓杰, 孙万龙, 宋红丽, 孙文广 (565)
我国典型非木浆造纸二噁英排放研究	王志芳, 丁琼, 王开祥, 吴昌敏, 曲云欢, 赵晓冬 (574)
典型电器工业区河涌沉积物中的多溴联苯醚空间和垂直分布	邱孟德, 邓代永, 余乐洵, 孙国萍, 麦碧娴, 许玫英 (580)
电子废物拆解区农业土壤中多氯联苯的污染特征	王学彤, 李元成, 张媛, 缪绎, 孙阳昭, 吴明红, 盛国英, 傅家谟 (587)
北京科教园区绿地土壤中多环芳烃的残留特征与潜在风险	彭驰, 王美娥, 欧阳志云, 焦文涛, 陈卫平 (592)
上海城市样带土壤重金属空间变异特征及污染评价	柳云龙, 章立佳, 韩晓非, 庄腾飞, 施振香, 卢小遮 (599)
海河流域北部地区河流沉积物重金属的生态风险评价	尚林源, 孙然好, 王赵明, 汲玉河, 陈利顶 (606)
三峡库区消落带不同水位高程土壤重金属含量及污染评价	王业春, 雷波, 杨三明, 张晟 (612)
超声波促进好氧/缺氧污泥消化过程中细菌群落结构分析	叶运弟, 孙水裕, 郑莉, 刘宝健, 蔡明山, 许燕滨, 占星星 (618)
大庆聚驱后油藏内源微生物群落结构解析与分布特征研究	赵玲侠, 高配科, 曹美娜, 高梦黎, 李国强, 朱旭东, 马挺 (625)
不同碳源刺激对老化污染土壤中 PAHs 降解研究	尹春芹, 蒋新, 王芳, 王聪颖 (633)
应用电致化学发光分子探针技术对微小原甲藻的检测	朱霞, 甄毓, 米铁柱, 于志刚, 池振明, 路兴岚 (640)
软骨藻酸直接竞争 ELISA 方法的建立及优化	王茜, 程金平, 高利利, 董宇, 席磊 (647)
固相萃取-高效液相色谱法同时测定水体中的 10 种磺胺类抗生素	洪蕾洁, 石璐, 张亚雷, 周雪飞, 朱洪光, 林双双 (652)
五氯酚对 HeLa 细胞毒性及 DNA 损伤的研究	金帮明, 王辅明, 熊力, 张晓峰, 刘堰 (658)
建筑陶瓷碳计量与优化模型研究	彭军霞, 赵宇波, 焦丽华, 曾路, 郑为民 (665)
《环境科学》征订启事 (447)	《环境科学》征稿简则 (475)
信息 (524, 586, 605, 624)	

大庆聚驱后油藏内源微生物群落结构解析与分布特征研究

赵玲侠,高配科,曹美娜,高梦黎,李国强,朱旭东,马挺*

(南开大学生命科学学院,分子微生物与技术教育部重点实验室,天津 300071)

摘要: 利用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术和主成分分析法(principal component analysis, PCA)解析了大庆油田聚驱后油藏的细菌和古菌群落结构组成及分布特征。结果表明,注水井中的细菌主要以好氧的假单胞菌属和不动杆菌属为主,注水井近井地带以兼性厌氧的肠杆菌属为主,各采油井中的细菌则包括陶厄氏菌属、梭菌属、假单胞菌属、油杆菌属及大量的未培养细菌;各注水井及注水井近井地带检测到的古菌主要是乙酸型产甲烷的甲烷鬃菌,各采油井中古菌则以甲烷微菌属、甲烷螺菌属及甲烷杆菌属等为主。总体上,该聚驱区块从注水井到采油井,细菌优势菌群依次呈好氧细菌-兼性厌氧细菌-严格厌氧细菌分布;古菌的分布受环境因素及微生物代谢产物影响,注水井和采油井中的优势菌群差异显著。

关键词: 聚驱后油藏; 变性梯度凝胶电泳; 细菌; 古菌; 主成分分析

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)02-0625-08

Research on Population Structure and Distribution Characteristic of Indigenous Microorganism in Post-polymer-Flooding Oil Reservoir

ZHAO Ling-xia, GAO Pei-ke, CAO Mei-na, GAO Meng-li, LI Guo-qiang, ZHU Xu-dong, MA Ting

(Key Laboratory of Molecular Microbiology Technology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method and principal component analysis (PCA) method were used to analyze the structures of microorganism population in injection wells and production wells of a post-polymer-flooding oil reservoir in Daqing oil field. The results showed that the dominant species in injection wellhead were aerobic bacteria *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Facultative anaerobic bacteria *Enterobacter* was the dominant bacteria in near area of injection wells. Bacteria detected in production wells included *Thauera*, *Clostridia*, *Pseudomonas*, *Petrobacter* and some uncultured bacteria. *Methanosaeta* turned out to be the only archaea detected in injection wells, which was an aceticlastic methane-producing archaeon. Archaea detected in production wells consisted of *Methanomicrobium*, *Methanospirillum* and *Methanobacterium*. In general, aerobic bacteria, facultative anaerobe, and strictly anaerobic bacteria distributed successively from injection wells to production wells in this block. The dominant populations of archaea were different between injection wells and production wells, while were influenced by different environments and microbial metabolism products.

Key words: post-polymer flooding oil reservoir; denaturing gradient gel electrophoresis; bacteria; archaea; principal component analysis

聚合物驱油技术是指通过向高含水油藏中注入高分子聚合物来改变油藏内部流动相的黏度、改善流度比、增加波及体积进而提高原油采收率。大庆油田自20世纪末开始实施聚合物驱采油并取得了显著的经济效果^[1],但在聚驱后期,效率逐渐下降,因而必须结合其它方法来提高残余油采出程度,而微生物采油技术由于其无污染、效益好及工艺简单等特点,成为最有前景的聚驱后接替技术之一^[2,3]。目前,在实施微生物采油技术之前通常需要对油藏内源微生物群落结构进行深入调查分析,以评价其实施微生物采油的潜力。

由于纯培养技术的限制,近年来基于16S rDNA

的微生物分子生态学方法被广泛应用于油藏微生物研究中^[4~8]。Yamane等^[9]通过构建16S rDNA克隆文库的方法分析了高温油藏中微生物的多样性;王君等^[10]用PCR-DGGE技术分析了高温油藏内源微生物的多样性并指导了内源微生物的分离;郭盟华等^[11]则结合T-RFLP和构建16S rDNA克隆文库2种方法对聚驱后油藏的微生物多样性进行了分析。

收稿日期: 2011-04-01; 修订日期: 2011-05-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)重点项目(2009AA063502); 国家自然科学基金项目(50804024)

作者简介: 赵玲侠(1983~),女,博士研究生,主要研究方向为石油微生物, E-mail: mulanmeor@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: tingma@nankai.edu.cn

这些研究表明,长期注入聚合物后,油藏内部已经形成稳定的、且较为丰富的微生物种群.但总体来看,目前对聚驱后油藏微生物的研究仍主要集中在群落结构分析上,对于微生物在整个油藏体系中的功能尚不明确,导致在实施微生物采油时缺乏针对性,限制了残余油采出效率的提高.如何能通过分析内源微生物群落结构组成指导其功能研究,是提高微生物采油技术有效性的关键.本研究在应用分子生态学技术的基础上,从油藏微生物的分布特征入手来针对该问题进行进一步探讨.

变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 方法是通过对样品中微生物的 16S rDNA 高可变区分析来研究环境样品中微生物群落的多样性及物种丰度的分子指纹技术,已被广泛应用于微生物群落结构研究中^[12~15].由于可迅速对多个样品同时分析,因此适用于油藏体系中多个样本微生物群落结构研究.本研究通过 PCR-DGGE 方法对聚驱后油藏注入水和采出液中的微生物群落结构及分布特征进行研究,以期分析油藏微生物功能,以期为评价聚驱后油藏实施微生物驱油技术的可行性,定向调控油藏微生物群落以提高微生物驱油效率提供生态学依据.

1 材料与方法

1.1 实验区块

大庆油田采油一厂某区块,该区块在聚驱后期一直进行注水作业,以产出液作为回注水进行循环操作.

1.2 水样的采集

本实验主要对其中的 5 口注水井和 8 口采油井

的微生物群落结构进行分析,5 口注水井分别为注 1、注 2、注 3、注 4 和注 5,8 口采油井分别为采 1、采 2、采 3、采 4、采 5、采 6、采 7 以及采 8.其中注 2 为反排取样,用于反映注水井近井地带微生物菌群情况,其余各井均为井口取样.用灭菌的塑料桶采集水样后,密封,4℃ 保存,在 48h 内处理.

1.3 水样 DNA 的提取

将水样于 4℃ 8 000 r·min⁻¹ 离心 15min 得菌体,采用玻璃珠研磨-酶法-化学法相结合的方法提取基因组,具体操作步骤是:离心所得菌体重悬于 1 mL Lysis buffer (0.05 mol·L⁻¹ Tris, 0.04 mol·L⁻¹ EDTA, 0.1 mol·L⁻¹ NaCl, pH 8.0) 中,加入 0.3 g 直径 0.1 mm 玻璃珠,4 800 r·min⁻¹ 涡旋 1 min,冰浴 1 min,反复 3 次.加入溶菌酶 (终浓度 10 mg·mL⁻¹),轻轻混匀,于 37℃ 保温 1 h,然后加入 100 μL 20% SDS,混匀后 65℃ 保温 30 min 后,加入与上清液等量的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 溶液抽提蛋白,反复抽提直至中间没有明显的蛋白层为止,将上清液转移到新离心管中,加入 0.6 倍体积的异丙醇溶液,室温静置 30 min,于 4℃,10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃上清,加入 1 mL 70% 乙醇洗涤,离心,沉淀风干后,溶于适量 TE 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 中,用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的基因组.

1.4 水样微生物中细菌和古菌 16S rDNA 高可变区的扩增

细菌和古菌的 16S rDNA 高可变区片段分别使用引物 1055f/1406r-GC 和引物 46f/1017r、344f-GC/522r 扩增,引物序列如表 1 所示.具体的 PCR 步骤如下所述.

表 1 细菌和古菌 16S rDNA 通用引物¹⁾

Table 1 Universal primer for 16S rDNA amplification in bacteria and archaea respectively

类型	引物名称	引物序列	目的片段
细菌 ^[16]	1055f	5'-ATG GCT GTC GTC AGC T-3'	细菌 16S rDNA V6 ~ V8 高变区,约 390 bp
	1406r-GC *	5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3'	
古菌 ^[17]	46f	5-YTA AGC CAT GCR AGT-3'	古菌 16S rDNA 片段,约 1 000 bp
	1017r	5'-GGC CAT GCA CCW CCT CTC-3'	
	Arc344f-GC	5'-HGC AGC AGG CGC G-3'	古菌 16S rDNA V3 高变区,约 210 bp
	Univ522r	5-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3	

1) GC* 为一段约 40 bp 的富含 GC 的序列,序列组成为: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC-3'

1.4.1 细菌 16S rDNA V6 ~ V8 高变区扩增

使用引物 1055f/1406r-GC 进行扩增,反应体系为 50 μL [5 μL 10 × Buffer、2 μL dNTP Mixture (各 10 mmol·L⁻¹)、0.5 μL 正向引物 (20 μmol·L⁻¹)、0.5 μL 反向引物 (20 μmol·L⁻¹)、20 ng DNA 模板和

0.5 U *Taq* DNA 聚合酶],采用 TouchDown PCR,反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,退火 45 s,72℃ 延伸 90 s (退火温度从 60℃ 降至 52℃,共 20 个循环),之后再进行 15 个循环 (94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 3 min),72℃ 后延伸 10

min,4℃终止.

1.4.2 古菌 16S rDNA V3 高变区扩增

采用巢式 PCR 扩增目的片段,分两步进行. 第一步,扩增出古菌 16S rDNA,使用古菌 16S rDNA 通用引物 46f 和 1017r,扩增反应体系为 50 μL[5 μL 10 × Buffer,2 μL dNTP Mixture(各 10 mmol·L⁻¹)、0.5 μL 正向引物(20 μmol·L⁻¹)、0.5 μL 反向引物(20 μmol·L⁻¹)、20 ng DNA 模板和 0.5U Taq DNA 聚合酶],PCR 条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,50℃退火 45 s,72℃延伸 90 s,30 个循环,72℃后延伸 10 min,4℃终止;第二步:以第一步 PCR 产物为模板,使用引物 Arc344f-GC 和 Univ522r 扩增 16S rDNA V3 区片段,扩增反应体系同第一步,采用 TouchDown PCR,反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,退火 45 s,72℃延伸 90 s(退火温度从 65℃开始下降,每个循环降 0.5℃,共 20 个循环),之后再 15 个循环(94℃变性 1min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min),72℃后延伸 10 min,4℃终止. PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

利用 Dcode™ Universal Mutation Detection System(Bio-Rad)进行 DGGE 分析. 细菌 16S rDNA V6 ~ V8 高变区的 DGGE 条件为:6% 聚丙烯酰胺凝胶,40% ~ 60% 的变性剂浓度范围(100% 的变性剂为 7 mol·L⁻¹的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物),DNA 上样量为 200 ng,缓冲液为 1 × TAE,60℃恒温,160 V 恒压条件下电泳 3.5 h; 古菌 16S rDNA V3 高变区的 DGGE 条件为:10% 的聚丙烯酰胺凝胶,35% ~ 55% 的变性剂梯度,60℃恒温,200V 恒压条件下电泳 4.5 h. 电泳结束后,用 10 mg·mL⁻¹ EB

染色 15 min,脱色,通过 Bio-Rad 凝胶成像系统来成像,使用 Quantity One 软件对图像进行分析.

1.6 目的条带的回收及测序

将目的片段所在的凝胶切下,使用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒(日本 Bioflux 公司)回收,再次用对应的不带“GC”的 16S rDNA 高可变区引物扩增,然后按适当的比例连接到 pMD19-T 载体(日本 TaKaRa 公司)上,转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,筛选插入片段正确的克隆,送至北京三博远志生物公司测序.

1.7 聚类分析

所测的序列在 GenBank 中通过 Blast 进行比对,得到其最相似种属信息. 将所测序列与其最相似序列用软件 Clustal X1.81 排序,生成的序列文件经格式转化后,使用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 算法和 Kimura two-parameter 模型构建系统发育树,进行序列间同源性分析.

1.8 PCA 分析

根据各个样品的 DGGE 图谱,用 SPSS 16.0 软件对各井微生物群落结构进行主成分分析.

2 结果与分析

2.1 地层概况

该区块油层属于碎屑岩类储油层,岩性以细砂岩,细粉砂岩和泥质粉砂岩为主,油层平均温度为 42.4℃. 原油属石蜡基型,含蜡量在 26% ~ 29%,含胶量 13% ~ 16%,原油密度为 0.856 g·(cm³)⁻¹,黏度 8.75 mPa·s,凝固点 23.9℃. 根据滴定法、离子色谱法及电感耦合等方法分析得到地层采出液的化学组成(表 2).

表 2 油水采出液的化学组成/mg·L⁻¹

Table 2 Chemical composition of the production water/mg·L⁻¹

离子种类	Na ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ac ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
浓度	508.7	2 030	4.85	42.5	0.048	39	1.1	1.6	9.9	380

2.2 样品采集

通过不同的取样方法进行样品采集. 注水井中注 2 为反排取样,用来进行近井地带微生物群落结构分析,其余注水井通过井口采样反映注入水注前微生物的群落结构,采出液通过井口采样,反映采油井内部菌群结构. 所取样品最终将会反映出该区块从注水井口到注水井内部近井地带再到采油井内部近井地带微生物的分布情况.

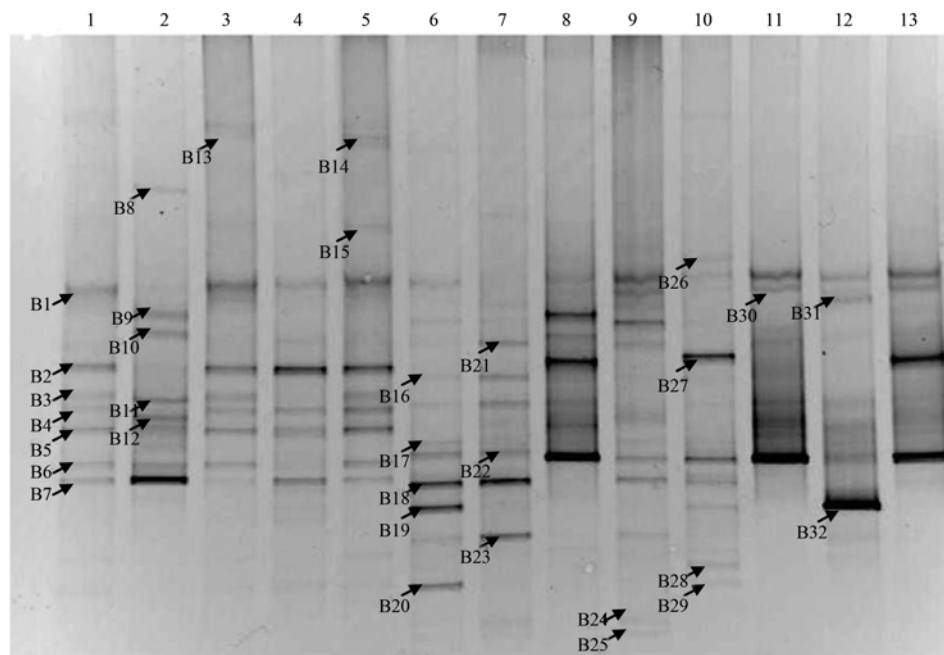
2.3 DGGE 分析

提取的基因组经电泳检测后,分别使用相应的引物扩增细菌和古菌的 16S rDNA 高可变区序列,琼脂糖凝胶电泳验证大小及浓度,进行 DGGE 分析.

2.3.1 细菌群落结构分析

扩增得到的细菌 16S rDNA V6 ~ V8 高可变区片段长约 350 bp,DGGE 图谱如图 1 所示.

从图中可以看出:除注 2 之外,其余 4 口注水井的 DGGE 图谱在条带数量以及优势条带的种类上



各泳道的样品依次为:1. 注1, 2. 注2, 3. 注3, 4. 注4, 5. 注5, 6. 采1, 7. 采2, 8. 采3, 9. 采4, 10. 采5, 11. 采6, 12. 采7, 采8;
标注的 B1 ~ B32 为进行序列分析的条带,下同

图1 细菌 16S rDNA V6 ~ V8 高可变区 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of the V6-V8 high various region of 16S rDNA in bacteria

非常相似,系统进化分析表明(图2),检出的细菌分别属于 β -变形菌纲(β -Proteobacteria)和 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria),以假单胞菌属(*Pseudomonas*, band B1, 相似性 98%)和不动杆菌属(*Acinetobacter*, band B2, 相似性 98%)为优势种群. 而反排取样井注2与其它四口注水井的种群差异较大,优势种属主要为肠杆菌属(*Enterbacter*, band B7, 相似性 99%),肠杆菌为异养兼性厌氧菌,有报道称其能降解聚丙烯酰胺^[18]以及在厌氧条件下发酵产氢^[19].

与注水井相比,采油井的细菌种类更具多样性,不同的采油井之间的菌群结构差异也比较大,优势菌群也不尽相同. 中心采油井采1和采2的细菌群落结构较为相似,以陶厄氏菌属(*Thauera*, band B19, 相似性 99%)、梭菌纲(*Clostridia*, band B18, 相似性 98%)、假单胞菌属(band B22, 相似性 99%)和油杆菌属(*Petrobacter*, band B23, 相似性 99%)为主,其他各采油井的优势细菌有假单胞菌属、不动杆菌属和未培养细菌(Uncultured bacteria),不动杆菌属是中温油藏中常见的细菌,具有产乳化剂^[20]及降解长链烷烃^[21]的功能,而假单胞菌属的许多种也都具有烃降解或者产生表面活性剂和小分子物质的功能,某些菌株还具有聚丙烯酰胺降解功能^[22],在聚驱油藏中广泛存在. 梭菌纲细菌为专性厌氧发酵菌,研究表

明梭菌纲细菌在无氧条件下可利用复杂的碳水化合物产氢、产乙酸及其它小分子有机物,为产甲烷菌的生长提供底物,促进其生长代谢. 这些功能微生物的存在表明该油藏具有很好的微生物驱油潜力.

DGGE 分析结果表明,从注水井口到注水井近井地带再到采油井,优势细菌菌群依次为好氧型细菌、兼性厌氧型细菌以及严格厌氧型细菌,与溶解氧浓度的变化趋势一致. 而 DGGE 分析表明好氧细菌不动杆菌属和假单胞菌属也存在于采油井中,这些菌虽然在无氧条件下生长受抑制,但是细胞可能尚未裂解,因而在后续检测中被发现.

2.3.2 古菌 16S rDNA V3 高可变区的 DGGE 分析

从 DGGE 图谱(图3)可以看出,相对于细菌来说,注水井之间和采油井之间的古菌无论是种类还是分布都非常稳定. 根据系统发育信息得知(图4),与检测到的各序列最相似的古菌主要有甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)、甲烷螺菌属(*Methanospirillum*)、甲烷微菌属(*Methanomicrobium*)、泉古菌门(*Crenarchaeota*)以及未培养古菌(Uncultured archaea). 注水井中的菌群比较单一,为甲烷鬃菌属(band A1、A6、A8 和 A9, 相似性 100%),但在采油井样品中未检测出;而注入水中含量较少或未检出的甲烷杆菌属(band A5, 相

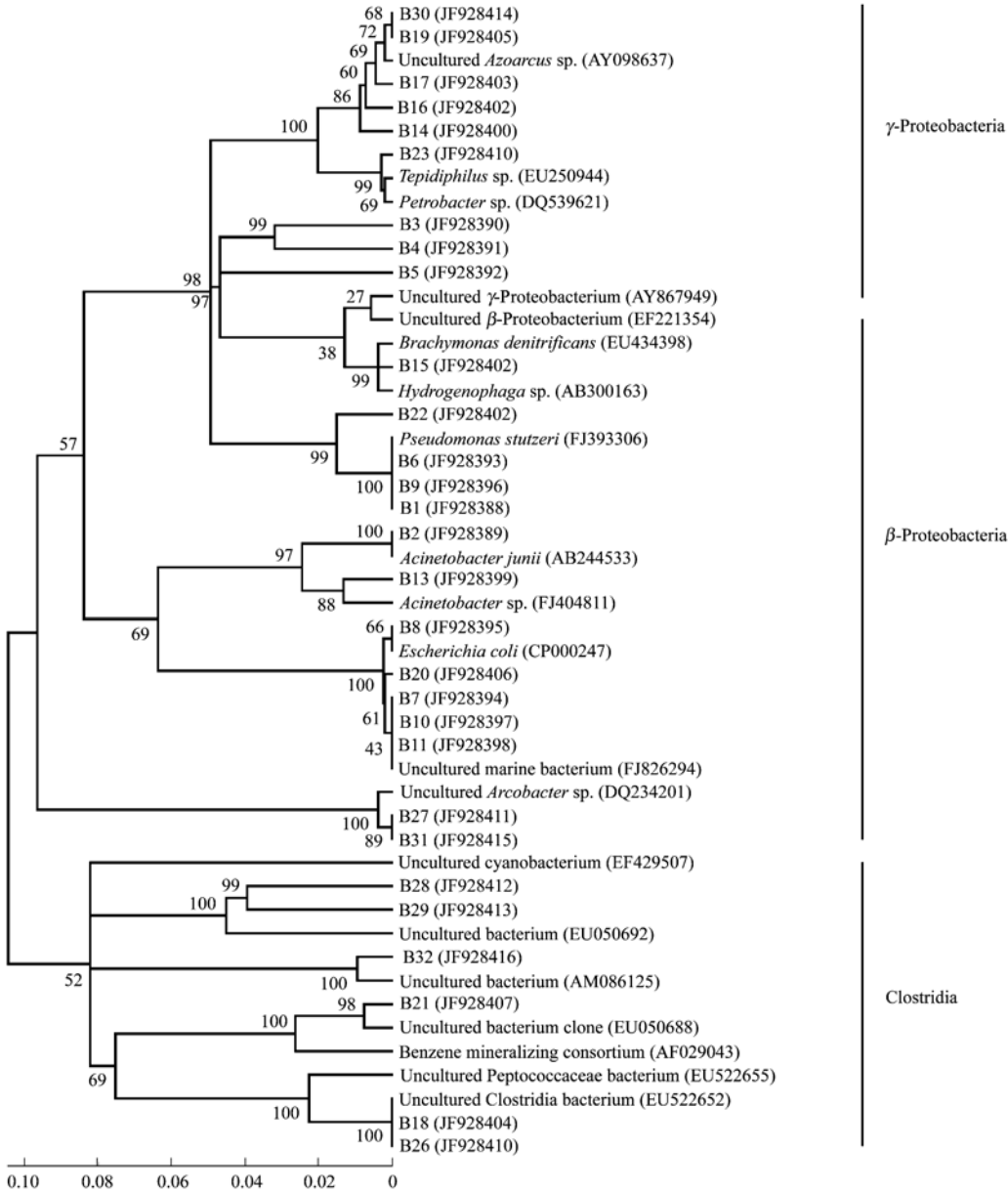


图2 16S rDNA V6 ~ V8 高可变区序列 DGGE 所代表的细菌的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the DGGE bands on 16S rDNA V6-V8 region

似性 100%)、甲烷微菌属 (band A7, 相似性 98%) 及甲烷螺菌属 (band A16 和 A11, 相似性 99%) 则在采油井中成为优势菌群, 采出液中同时还检测到一些未培养古菌 (band A18、A19 和 A20)。

注水井中的优势菌甲烷鬃菌属只能利用乙酸盐为底物产甲烷, 而采油井的优势菌群甲烷微菌属、甲烷螺菌属和甲烷杆菌属均可以氨作为唯一氮源, 以硫化物作为硫源, 利用 H_2/CO_2 代谢产甲烷, 不能利用乙酸盐生长。注水井和采油井中古菌结果的稳定状态表明该区块的各井中的古菌已适应了所处的地质环境, 注水井之间和采油井之间并无大的差别, 仅

仅是注水井和采油井存在差异。

油藏深处的厌氧环境利于严格厌氧的产甲烷菌生长, 同时在采油井内部存在的梭菌等厌氧发酵细菌代谢产生的小分子物质或者 H_2 也会促进产甲烷菌的生长增殖。而注水井及注水井近井地带为有氧环境, 并不具备严格厌氧的产甲烷菌生长所需要的条件, 却检测到了这类微生物, 这是由于 DGGE 方法是直接提取环境样品基因组进行分析, 既可以检测到环境样品中的活菌 (可培养的和不可培养的), 也可以检测到一些未降解的死菌^[23]。采出液经处理后回注, 来自于油藏深处的产甲烷菌细胞如未裂解,

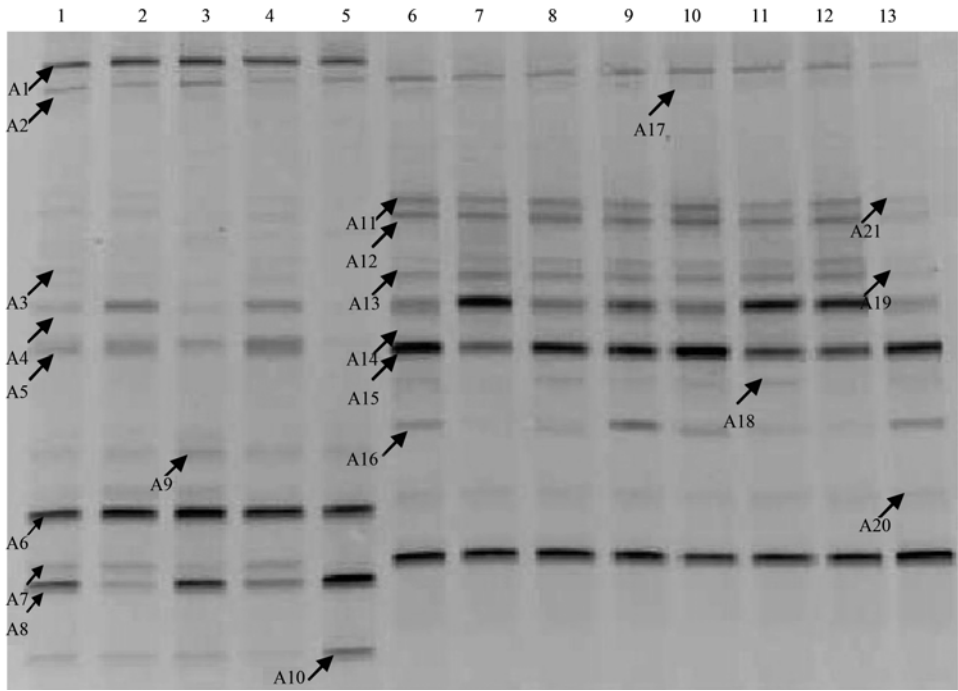


图 3 古菌 16S rDNA V3 高可变区 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profiles of the V3 high various region of 16S rDNA in archaea

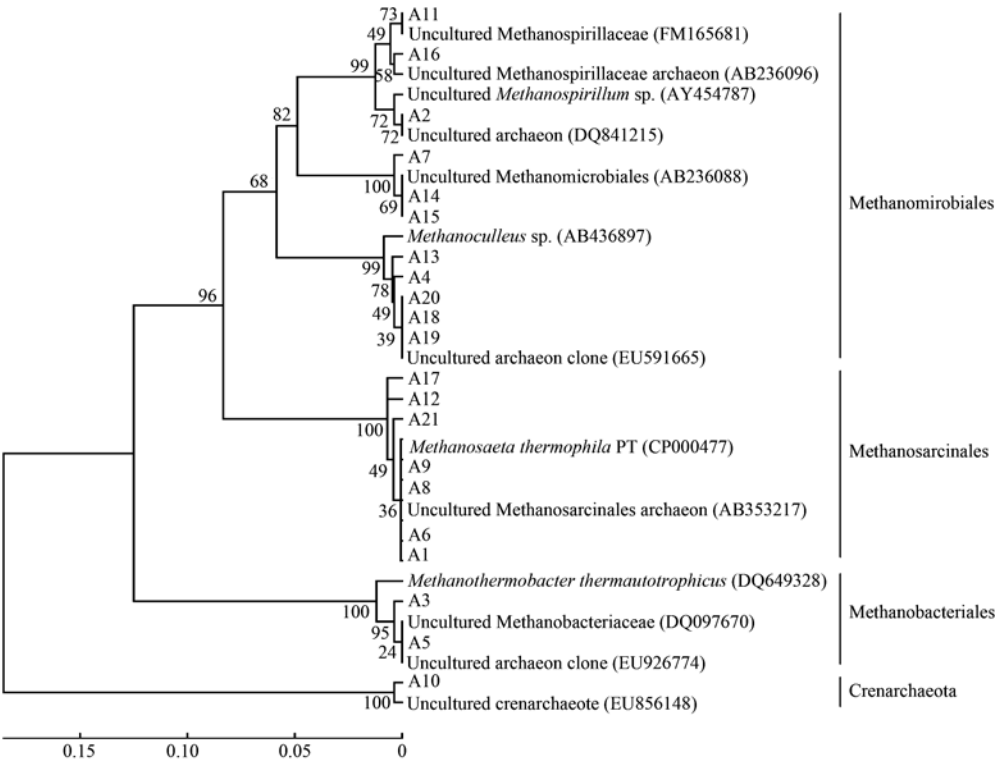


图 4 16S rDNA V3 高可变区序列 DGGE 所代表的古菌的系统发育进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the DGGE bands on 16S rDNA V3 region

注入水中便会被检测到。

2.4 细菌和古菌群落结构的主成分分析

本研究借助 SPSS 16.0 软件,对各样品的古菌和细菌群落结构进行主成分分析,以便更直观地反

映两类微生物的分布特征,结果见图 5 和图 6。从中可以看出,无论是细菌还是古菌,注水井和采油井之间的微生物群落组成差异显著,而各注水井之间和采油井之间的差异较小,表明影响油藏微生物种类及分布的关键因素来自于注水井和采油井之间的差异,包括地层水理化性质的影响以及地层条件的差异,例如溶解氧浓度和氧还电位大小等因素的影响^[9,24]。

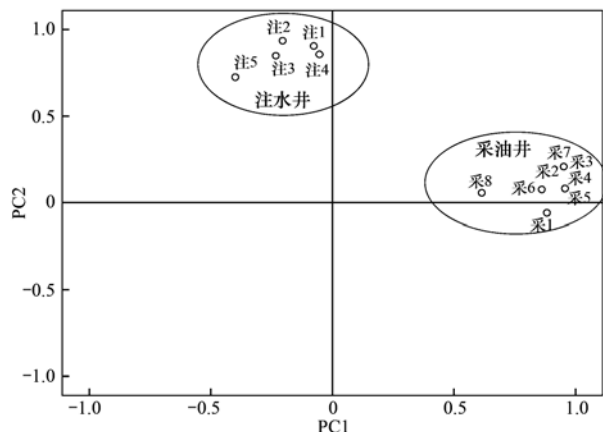


图 5 古菌群落结构的 PCA 分析

Fig. 5 PCA analysis about the archaea population structure based on DGGE analysis

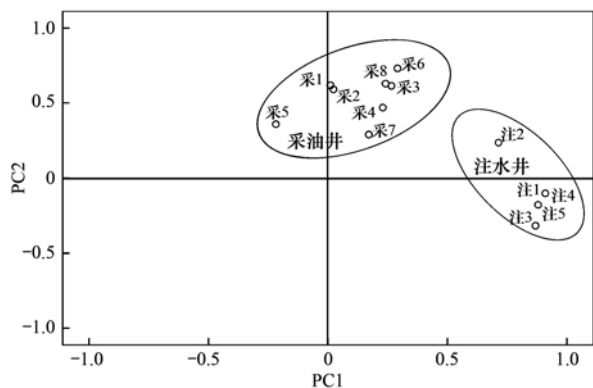


图 6 细菌群落结构的 PCA 分析

Fig. 6 PCA analysis about the bacteria population structure based on DGGE analysis

3 结论

(1) 来自于同一水站注水井样品的细菌群落结构基本相同,优势菌群为好氧的假单胞菌属和不动杆菌属细菌;注水井内部近井地带细菌群落结构的优势菌群发生变化,以兼性厌氧的肠杆菌为主;而采油井中的细菌群落差异很大,各井优势菌群不尽相同,以兼性厌氧菌和严格厌氧菌的发酵菌为主。

(2) 古菌在注水井和采油井中的分布均相对稳定。注入水中菌群为乙酸营养型产甲烷的甲烷鬃菌属;采出液中以油藏中常见的 H_2/CO_2 营养型和甲基营养型的甲烷微菌属、甲烷螺菌属及甲烷杆菌属等为主。

(3) 从注水井到采油井,细菌优势菌群呈好氧-兼性厌氧-厌氧分布,而古菌则主要分布在富含厌氧细菌的采油井。注水井和采油井之间的微生物群落组成差异显著,但各注水井之间和各采油井之间则差异较小,表明影响油藏微生物种类及分布的关键因素来自于注水井和采油井之间的环境条件差异。

(4) 具有应用潜力的采油功能微生物分布呈现一定的特征。注水井及其近井地带主要以解烃和产乳化剂等代谢产物的细菌为主,采油井则以可利用碳水化合物产氢、产酸的厌氧发酵菌及 H_2/CO_2 营养型的产甲烷菌为主。

致谢:本研究在样品采集过程中,得到大庆油田有限责任公司勘探开发研究院乐建君和郭盟华等人的帮助,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 王启民,冀宝发,隋军,等. 大庆油田三次采油技术的实践与认识 [J]. 大庆石油地质与开发, 2001, 20(2): 1-6.
- [2] 蒋焱,曹功泽,赵凤敏,等. 聚合物驱后微生物提高采收率的可行性分析 [J]. 油气地质与采收率, 2008, 15(5): 63-65.
- [3] 石梅. 聚合物驱后利用微生物进一步提高采收率的可行性 [J]. 大庆石油地质与开发, 2004, 23(2): 56-58.
- [4] Li H, Yang S Z, Mu B Z, *et al.* Molecular analysis of the bacterial community in a continental high-temperature and water-flooded petroleum reservoir [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 257(1): 92-98.
- [5] Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 700-711.
- [6] 万春黎,杨雪,杜茂安,等. 石油污染土壤中细菌群落结构特征 [J]. 石油学报(石油加工), 2010, 26(6): 928-933.
- [7] Nazina T N, Grigoryan A A, Xue Y F, *et al.* Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the Daqing oil field [J]. Microbiology, 2002, 71(1): 91-97.
- [8] 贾建丽,李光贺. 油田区土壤微生物种群构成及系统分类初步研究 [J]. 环境科学, 2009, 30(4): 1185-1192.
- [9] Yamane K, Hattori Y, Ohtagaki H, *et al.* Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98°C subsurface crude oil deposits in Japan [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(2): 220-235.
- [10] 王君,马挺,刘静,等. 利用 PCR-DGGE 技术指导高温油藏中功能微生物的分离 [J]. 环境科学, 2008, 29(2): 462-

- 468.
- [11] 郭盟华, 陆原鹏, 窦绪谋, 等. 大庆聚驱后油藏微生物群落结构分析 [J]. 生物技术, 2010, **20**(6): 69-72.
- [12] 程海鹰, 肖生科, 汪卫东, 等. 变性梯度凝胶电泳方法在内源微生物驱油研究中的应用 [J]. 石油学报, 2005, **26**(6): 82-85, 89.
- [13] Dahlel H, Garsho F, Madsen M, *et al.* Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008, **94**(1-2): 37-49.
- [14] 余跃惠, 张凡, 向廷生, 等. PCR-DGGE 方法分析原油储层微生物群落结构及种群多样性 [J]. 生态学报, 2005, **25**(2): 237-242.
- [15] 任红燕, 宋志勇, 李霏霏, 等. 胜利油藏不同时间细菌群落结构的比较 [J]. 微生物学通报, 2011, **38**(4): 561-568.
- [16] Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, *et al.* Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(11): 6801-6807.
- [17] Akarsubasi A T, Ince O, Oz N A, *et al.* Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters [J]. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(1): 28-35.
- [18] Buranasilp K, Charoenpanich J. Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, **23**(3): 396-403.
- [19] 赵丹, 余瑞彰, 李秀艳, 等. 厌氧暗发酵产氢细菌研究进展 [J]. 环境污染与防治, 2009, **31**(1): 78-82.
- [20] Choi J W, Choi H G, Lee W H, *et al.* Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, **45**(3): 217-225.
- [21] Abboud M M, Khleifat K M, Batarseh M, *et al.* Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **41**(4): 432-439.
- [22] 李蔚, 刘如林, 梁凤来, 等. 一株聚丙烯酰胺降解菌降解聚丙烯酰胺及原油性能研究 [J]. 环境科学学报, 2004, **24**(6): 1116-1121.
- [23] Meroth C B, Hammes W P, Hertel C. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(12): 7453-7461.
- [24] Nunoura T, Oida H, Masui N, *et al.* Culture-dependent and independent analyses of subsurface microbial communities in oil-bearing strata of the Sagara oil reservoir [J]. *Island Arc*, 2006, **15**(3): 328-337.

CONTENTS

Safety Value of Contaminant in Water Pollution Accident Based on Human Health Risk	ZHENG Bing-hui, LUO Jin-hong, FU Qing, <i>et al.</i> (337)
Safety Concentration of Genotoxic Carcinogens in Water Pollution Accident Based on Human Health Risk	LUO Jin-hong, ZHENG Bing-hui, FU Qing, <i>et al.</i> (342)
A Quantitative Method and Case Analysis for Assessing Water Health	LI Yu-feng, LIU Hong-yu, HAO Jing-feng, <i>et al.</i> (346)
Temporal and Spatial Variation of Nitrogen and Phosphorus and Eutrophication Assessment in Downstream River Network Areas of North Canal River Watershed ...	SHAN Bao-qing, JIAN Yu-xiang, TANG Wen-zhong, <i>et al.</i> (352)
Spatiotemporal Variation Analysis and Identification of Water Pollution Sources in the Zhangweinan River Basin	XU Hua-shan, XU Zong-xue, TANG Fang-fang, <i>et al.</i> (359)
Hydrochemical Characteristics and Formation Mechanism of Shallow Groundwater in the Yellow River Delta	AN Le-sheng, ZHAO Quan-sheng, YE Si-yuan, <i>et al.</i> (370)
Impacts of Sediment Disturbance Time on the Distribution of Phosphorus Forms in Suspended Solids	LI Da-peng, HUANG Yong, LI Yong, <i>et al.</i> (379)
Influence of Submerged Macrophytes on Phosphorus Transference Between Sediment and Overlying Water in the Growth Period	WANG Li-zhi, WANG Guo-xiang, YU Zhen-fei, <i>et al.</i> (385)
Pollution Characteristics and Evaluation of Nitrogen, Phosphorus and Organic Matter in Surface Sediments of Lake Changshouhu in Chongqing, China	LU Shao-yong, XU Meng-shuang, JIN Xiang-can, <i>et al.</i> (393)
Vertical Distribution Characteristics of Nutrients and Heavy Metals in Sediments of Lake Hongze	ZHANG Wen-bin, YU Hui (399)
Effects of Rainfall on Nitrogen and Phosphorus Loss from Courtyard Compost and Its Risk of Nonpoint Source Pollution	PENG Li, WANG Li-wei, YANG Zhi-min, <i>et al.</i> (407)
Effects of Hydrodynamic Process on Bio-optical Properties in Algal-Dominated Lake Region of Shallow Lake	LIU Xiao-han, FENG Long-qing, ZHANG Yun-lin, <i>et al.</i> (412)
Estimation and Remote Sensing Inversion of Diffuse Attenuation Coefficient $K_d(490)$ in Lake Taihu in Spring Based on Semi-analytical Model	LIU Zhong-hua, LI Yun-mei, LI Rui-yun, <i>et al.</i> (421)
Monitoring the Total Suspended Matter of Lake Chaohu Based on Quasi-Analytical Algorithm	ZHANG Hong, HUANG Jia-zhu, LI Yun-mei, <i>et al.</i> (429)
Optimization of Aerobic/Anaerobic Subsurface Flow Constructed Wetlands	LI Feng-min, SHAN Shi, LI Yuan-yuan, <i>et al.</i> (436)
Effects of Allelochemical Dibutyl Phthalate on <i>Gymnodinium breve</i> Reactive Oxygen Species	BIE Cong-cong, LI Feng-min, LI Yuan-yuan, <i>et al.</i> (442)
Toxicity Effects of <i>Rac</i> - and <i>S</i> -Metolachlor on Two Algae	CAI Wei-dan, LIU Hui-jun, FANG Zhi-guo (448)
Studies for Killing the Oceanic Harmful Organisms in Ship's Ballast Water Using Hydroxyl Radicals	BAI Min-dong, ZHANG Na-hui, ZHANG Zhi-tao, <i>et al.</i> (454)
Modification of Natural Siderite and Enhanced Adsorption of Arsenic	ZHAO Kai, GUO Hua-ming, LI Yuan, <i>et al.</i> (459)
Kinetic Study of 4-Chloronitrobenzene Degradation by Zero-Valent Iron	LIAO Di-jie, YANG Qi, LEE Chun-chi (469)
Photochemical Degradation of Ofloxacin in Aqueous Solution	SHAO Meng, YANG Gui-peng, ZHANG Hong-hai (476)
Photodegradation of Atenolol in Aqueous Nitrate Solution	JI Yue-fei, ZENG Chao, MENG Cui, <i>et al.</i> (481)
Biodegradation of Pyridine Under UV Irradiation	FANG Miao-miao, YAN Ning, ZHANG Yong-ming (488)
Optimization on Decoloration Conditions of Anthraquinone Dyes by Laccase from <i>Amillariella mellea</i>	ZHU Xian-feng, QIN Ren-bing, YU Chen-chen, <i>et al.</i> (495)
Biosorption of Chromium(VI) by Waste Biomass of ϵ -Poly-L-lysine Fermentation	CAO Yu-juan, ZHANG Yang, XIA Jun, <i>et al.</i> (499)
Investigation on Enhanced Conditions for the Densification of Filamentous Sludge	LI Zhi-hua, SUN Wei, JI Xiao-qin, <i>et al.</i> (505)
Effect of Temperature on the Response Characteristics of Shortcut Nitrification Granular Sludge	LUO Yuan-ling, YANG Zhao-hui, XU Zheng-yong, <i>et al.</i> (511)
Fuel Consumption and Emission Inventory of Typical Construction Equipments in China	LI Dong-ling, WU Ye, ZHOU Yu, <i>et al.</i> (518)
Optimization of PM ₁₀ Monitoring Network in Beijing	QI Ling, ZHAO Yue, XIE Shao-dong (525)
Effect of Greenbelt on Pollutant Dispersion in Street Canyon	XU Wei-jia, XING Hong, YU Zhi (532)
Investigation of Effect and Process of Nitric Oxide Removal in Rotating Drum Biofilter Coupled with Absorption by Fe ^{II} (EDTA)	CHEN Jun, YANG Xuan, YU Jian-ming, <i>et al.</i> (539)
Effect of UV-B Radiation on Release of Nitrogen and Phosphorus from Leaf Litter in Subtropical Region in China	SONG Xin-zhang, ZHANG Hui-ling, JIANG Hong, <i>et al.</i> (545)
Characteristics of Carbon Sequestration and Apparent Stability of New Sequestered Carbon in Forested Torrid Red Soil at Dry-Hot Valley	TANG Guo-yong, LI Kun, SUN Yong-yu, <i>et al.</i> (551)
Spatial Distribution of Methane in Surface Water and Sediment of Jiulongjiang Estuary and the Effect Environment factors of It	GUO Ying-ying, CHEN Jian, YIN Xi-jie, <i>et al.</i> (558)
Methane Fluxes and Controlling Factors in the Intertidal Zone of the Yellow River Estuary in Autumn	JIANG Huan-huan, SUN Zhi-gao, WANG Ling-ling, <i>et al.</i> (565)
Study on Dioxin Emission for Typical Non-Wood Pulp Making in China	WANG Zhi-fang, DING Qiong, WANG Kai-xiang, <i>et al.</i> (574)
Horizontal and Vertical Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in River Sediment from a Typical Electrical Equipment Industrial Area	QIU Meng-de, DENG Dai-yong, YU Le-huan, <i>et al.</i> (580)
Characteristics of Polychlorinated Biphenyls in Soils from an Electronic Waste Recycling Area	WANG Xue-tong, LI Yuan-cheng, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (587)
Characterization and Potential Risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Green Space Soils of Educational Areas in Beijing	PENG Chi, WANG Mei-e, OUYANG Zhi-yun, <i>et al.</i> (592)
Spatial Variability and Evaluation of Soil Heavy Metal Contamination in the Urban-transect of Shanghai	LIU Yun-long, ZHANG Li-jia, HAN Xiao-fei, <i>et al.</i> (599)
Assessment of Heavy Metal Pollution in Surface Sediments of Rivers in Northern Area of Haihe River Basin, China	SHANG Lin-yuan, SUN Ran-hao, WANG Zhao-ming, <i>et al.</i> (606)
Concentrations and Pollution Assessment of Soil Heavy Metals at Different Water-level Altitudes in the Draw-down Areas of the Three Gorges Reservoir	WANG Ye-chun, LEI Bo, YANG San-ming, <i>et al.</i> (612)
Analysis of Community Structure on Sludge Aerobic/anoxic Digestion After Ultrasonic Pretreatment	YE Yun-di, SUN Shui-yu, ZHENG Li, <i>et al.</i> (618)
Research on Population Structure and Distribution Characteristic of Indigenous Microorganism in Post-polymer-Flooding Oil Reservoir	ZHAO Ling-xia, GAO Pei-ke, CAO Mei-na, <i>et al.</i> (625)
Study on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) with Different Additional Carbon Sources in Aged Contaminated Soil	YIN Chun-qin, JIANG Xin, WANG Fang, <i>et al.</i> (633)
Detection of <i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller with the Electrochemiluminescence-Molecular Probe	ZHU Xia, ZHEN Yu, MI Tie-zhu, <i>et al.</i> (640)
Development of Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Domoic Acid	WANG Qian, CHENG Jin-ping, GAO Li-li, <i>et al.</i> (647)
Simultaneous Determination of 10 Sulfonamide Antibiotics in Water by Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography	HONG Lei-jie, SHI Lu, ZHANG Ya-lei, <i>et al.</i> (652)
Effects of Pentachlorophenol on DNA Damage and Cytotoxicity of HeLa Cells	JIN Bang-ming, WANG Fu-ming, XIONG Li, <i>et al.</i> (658)
Modeling of Carbon Dioxide Measurement and Optimization on Building Ceramic Industry	PENG Jun-xia, ZHAO Yu-bo, JIAO Li-hua, <i>et al.</i> (665)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年2月15日 33卷 第2期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 2 Feb. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧 阳 自 远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行