

PCR-DGGE 技术在内源细菌选择性激活过程中的应用

包木太¹, 王兵¹, 陈庆国¹, 高光军², 李希明²

(1. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100; 2. 中国石化胜利油田分公司采油工艺研究院, 东营 257000)

摘要:分子生态学技术的发展大大促进了人们对环境中微生物群落的认识, 也为研究油藏微生物群落提供了一个新的工具。在模拟油藏条件下, 应用 PCR-DGGE 技术研究激活剂的注入对油藏微生物群落结构的影响, 考察了激活过程中菌群结构的变化情况。分析了常压(1 MPa)和高压(10 MPa)下内源激活 DGGE 条带变化, 进行了激活过程中的 PCR 序列分析, 考察了激活不同阶段中的优势菌, 将优势条带序列构建系统发育树, 并对激活过程中主要内源菌所在类群分析。结果表明, 高压条件下, 优势菌群结构与常压下差异较大, 常压激活和高压激活细菌类群数量变化差异显著; 激活后, 优势菌的种类有所增加, 群落结构也发生了变化。激活前, 优势菌是芽孢杆菌, 而激活剂的加入使变形菌的在种类上得到增加。

关键词:内源细菌; 选择性激活; DGGE; PCR 测序

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2009)06-1802-08

Application of PCR-DGGE in Selective Activation of Stratal Bacteria

BAO Mu-tai¹, WANG Bing¹, CHEN Qing-guo¹, GAO Guang-jun², LI Xi-ming²

(1. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Research Institute of Oil Production Technology, Shengli Oilfield Company, Sinopec, Dongying 257000, China)

Abstract: With the development of molecular biology, the research on microflora in the environment is accelerated and a new research method for oil reservoir microflora is provided. Based on the methods of PCR-DGGE, the change of the structure of dominant microbial population in selective activation of stratal bacteria was studied. During activation, the change of samples' DGGE bandings under different pressure conditions (1 MPa and 10 MPa) was analyzed, the PCR alignment analysis of bacteria was studied, the dominant bacteria at different periods were explored, the phylogenetic tree of dominant DGGE banding sequence was build, and the groups of the main indigenous bacteria was also analyzed. The result showed that the structure and the quantity of stratal microorganism indicated obvious differences, under different pressure conditions. The species number of dominant microbial population increased, and the structure of dominant microbial population obviously changed after activation. Before activation, the main bacteria were belonged to Bacillales, and after injecting activation agent, the species of Proteobacteria increased.

Key words: stratal bacteria; selective activation; DGGE; PCR sequencing

由于油藏是具有高温、高压等特点的极端环境, 用传统培养方法所获得的微生物生态信息远不能反映油藏环境中的实际情况。影响内源微生物驱油技术深入发展的主要难点是缺乏有效的油藏微生物群落结构分析及动态变化的监测方法^[1,2]。近10年来, 以分析16S rDNA为主的分子指纹技术发展为极端环境中不可培养微生物的研究提供了一种新手段^[3-5]。其中PCR-DGGE技术(基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳技术)被广泛应用于分子水平上分析各种环境下微生物群落结构和监测微生物群落动态变化^[6-15]。近年来, 运用分子指纹技术对油藏微生物群落的研究已有不少^[16-22], 但少有文献报道不同压力条件对内源微生物激活的影响。本研究利用胜利油田的沾3×24产出液水样, 在模拟油藏条件下, 应用PCR-DGGE技术考察了在常压(1 MPa)

和高压(10 MPa)下激活剂的注入对油藏微生物群落结构的影响及微生物群落结构的变化。

1 材料与方法

1.1 水样的富集培养

向沾3×24产出液水样中添加激活剂(玉米浆1%、KNO₃ 0.1%)后, 分装于经无菌处理的60 mL小岩心管中, 不加压或加压至10 MPa后, 置于54℃恒温箱内培养一定时间后进行DNA的提取与纯化。

1.2 基因组DNA的提取与纯化

收稿日期: 2008-09-03; 修订日期: 2008-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(50604013)

作者简介: 包木太(1971~), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为微生物驱油理论、环境生物修复应用基础以及油品指纹信息提取与鉴别, E-mail: mtbao@mail.ouc.edu.cn

样富集培养后,第 0 d(激活前)、第 10 d(激活中)、第 20 d(激活后)取样,5 个水样分别离心后提取纯化基因组,扩增后进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析,所得 DGGE 电泳图如图 1 所示.

2.2 激活过程中的 PCR 序列分析

在以上 5 个样本的 DGGE 条带中选取具有代表

性的 36 条条带,割胶二次扩增后,插入 PCR 质粒载体,转化大肠杆菌感受态细胞,经室温培养,挑取 4~5 个具有代表性的菌落进行测序,再将序列信息提交到 GeneBank 获得序列号,采用 BLAST 程序与已知序列进行比对分析,然后对数据进行进一步处理,相似性分析结果如表 2 所示.

表 2 细菌相似性分析
Table 2 Similarity analysis of bacteria

条带编号	菌株编号及序列号	最相似菌	最大相似性/%	出现概率
1	1-a(FJ424873); 1-b (FJ424874); 1-c (FJ424875);	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	95	3/4
	1-d (FJ424876)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	1/4
2	2-a(FJ424877); 2-b (FJ424878); 2-c(FJ424879);	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	3/5
	2-d (FJ424880); 2-e (FJ424881)			
3	3-a (FJ424882); 3-b (FJ424883); 3-c (FJ424884);	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.	96	3/4
	3-d (FJ424885)			
4	4-a(FJ424886); 4-b (FJ424887); 4-c (FJ424888);	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	92	4/5
	4-d (FJ424889)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	1/5
5	5-a (FJ424890); 5-b (FJ424891); 5-c (FJ424892);	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	95	4/5
	5-d (FJ424893); 5-e (FJ424894)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	1/5
6	6-a(FJ424895); 6-b (FJ424896); 6-c (FJ424897);	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	3/5
	6-d (FJ424898); 6-e (FJ424899)			
7	7-a (FJ424900); 7-b (FJ424901); 7-c (FJ424902);	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	1/5
	7-d (FJ424903)			
8	8-a (FJ424904); 8-b (FJ424905); 8-c (FJ424906);	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	95	3/4
	8-d (FJ424907)			
9	9-a (FJ424908); 9-b (FJ424909); 9-c (FJ424910);	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	92	2/5
	9-d (FJ424911); 9-e (FJ424912); 9-f (FJ424913)			
10	10-a (FJ424914); 10-b (FJ424915); 10-c (FJ424916);	Uncultured microorganisms	—	2/4
	10-d (FJ424917)			
11	11-a (FJ424918); 11-b (FJ424919); 11-c (FJ424920);	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100	5/5
	11-d (FJ424921); 11-e (FJ424922)			
12	12-a (FJ424923); 12-b (FJ424924); 12-c (FJ424925);	Uncultured microorganisms	—	2/4
	12-d (FJ424926)			
13	13-a (FJ424927); 13-b (FJ424928); 13-c (FJ424929);	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.	97	3/5
	13-d (FJ424930); 13-e (FJ424931)			
14	14-a (FJ424932); 14-b (FJ424933); 14-c (FJ424934);	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	100	2/4
	14-d (FJ424935)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	99	2/4
15	15-a (FJ424936); 15-b (FJ424937); 15-c (FJ424938);	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	94	3/5
	15-d (FJ424939); 15-e (FJ424940)			
16	16-a (FJ424941); 16-b (FJ424942); 16-c (FJ424943);	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	97	2/4
	16-d (FJ424944)	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	100	1/4
17	17-a (FJ424945); 17-b (FJ424946); 17-c(FJ424947)	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	94	2/3
		<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100	1/3
18	18-a (FJ424948); 18-b (FJ424949); 18-c (FJ424950);	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	94	3/4
	18-d (FJ424951)			
19	19-a (FJ424952); 19-b (FJ424953); 19-c (FJ424954);	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	95	3/4
	19-d (FJ424955)			
20	20-a(FJ424956); 20-b (FJ424957); 20-c (FJ424958);	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	94	2/4
	20-d(FJ424959)			
21	21-a (FJ424960); 21-b (FJ424961); 21-c (FJ424962);	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	94	2/5
	21-d (FJ424963); 21-e (FJ424964)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	99	1/5
22	22-a (FJ424965); 22-b (FJ424966); 22-c (FJ424967);	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	99	1/5
		Uncultured microorganisms	—	2/4
	22-d (FJ424968)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	99	1/4

续表 1

条带编号	菌株编号及序列号	最相似菌	最大相似性/%	出现概率
23	23-a (FJ424969); 23-b (FJ424970); 23-c (FJ424971);	Uncultured microorganisms	—	5/5
	23-d (FJ424972); 23-e (FJ424973)			
24	24-a (FJ424974); 24-b (FJ424975); 24-c (FJ424976);	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	94	2/5
	24-d (FJ424977); 24-e (FJ424978)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	100	1/5
25	25-a (FJ424979); 25-b (FJ424980); 25-c (FJ424981);	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	94	3/4
	25-d (FJ424982)			
26	26-a (FJ424983); 26-b (FJ424984); 26-c (FJ424985);	<i>Bacillus cereus</i> subsp.	93	2/5
	26-d (FJ424986); 26-e (FJ424987)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100	1/5
27	27-a (FJ424988); 27-b (FJ424989); 27-c (FJ424990);	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100	3/5
	27-d (FJ424991); 27-e (FJ424992)			
28	28-a (FJ424993); 28-b (FJ424994); 28-c (FJ424995);	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	94	4/4
	28-d (FJ424996)			
29	29-a (FJ424997); 29-b (FJ424998); 29-c (FJ424999);	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	94	2/4
	29-d (FJ425000)	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	100	1/4
30	30-a (FJ425001); 30-b (FJ425002); 30-c (FJ425003);	<i>Bacillus cereus</i> subsp.	93	2/5
	30-d (FJ425004); 30-e (FJ425005)	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	94	2/5
31	31-a (FJ425006); 31-b (FJ425007); 31-c (FJ425008);	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	100	1/5
	31-d (FJ425009); 32-a (FJ425010)			
32	32-b (FJ425011); 32-c (FJ425012); 32-d (FJ425013);	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	99	2/5
	32-e (FJ425014)	chromosome linear		
33	33-a (FJ425015); 33-b (FJ425016); 33-c (FJ425017);	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	100	3/5
	33-d (FJ425018); 33-e (FJ425019)			
34	34-a (FJ425020); 34-b (FJ425021); 34-c (FJ425022);	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	98	2/4
	34-d (FJ425023);			
35	35-a (FJ425024); 35-b (FJ425025); 35-c (FJ425026);	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100	
	35-d (FJ425027)		1/4	
36	36-a (FJ425028); 36-b (FJ425029); 36-c (FJ425030);	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	94	2/4
	36-d (FJ425031)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	99	1/4

如表 2,测序结果中,比对结果出现次数较多的细菌有: *Bacillus pumilus* SAFR-032, *Alkaliphilus oremlandii* OhILAs, *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831, *Salmonella enterica* subsp., *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, *Azoarcus* sp. EbN1, *Bacillus cereus* subsp., *Klebsiella pneumoniae* subsp..其中,11 号条带,5 次测序比对结果相同,最相似菌为 *Pseudomonas stutzeri* A1501,相似性达到 100%; 27 号条带 5 次测序比对结果中 3 次相同,最相似菌为 *Pseudomonas stutzeri* A1501,相似性达到 100%。

2.3 激活不同阶段中的优势菌

由各泳道中条带亮度可以分析得知不同激活时期的优势菌种,由表 3 可以看出,激活后,优势菌的种类有所增加,群落结构也发生了变化.常压条件下,激活 10 d 时优势菌的种类由 2 种增加到 5 种, *Geobacillu thermodenitrificans* NG80-2, *Alkaliphilus oremlandii* OhILAs, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 的数量增加, *Bacillus subtilis* subsp., *Bacillus pumilus*

SAFR-032 依然是优势菌;第 20 d,优势菌种类达到 6 种,但结构却发生了变化, *Bacillus subtilis* subsp., *Bacillus pumilus* SAFR-032, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 不再占据优势,被 *Azoarcus* sp. EbN1, *Bacillus* sp. NRRL B-14911, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Petrotoga mobilis* SJ95 取代.高压条件下,优势菌群结构与常压下差异较大,激活 10 d 时优势菌的种类由 2 种增加到 7 种,第 20 d 时优势菌的种类依然为 7 种,但相对 10 d 时,除 *Salmonella enterica* subsp., *Klebsiella pneumoniae* subsp. 仍然保持优势外,其它原有优势菌均被新的优势菌所取代.反映出了好氧转厌氧过程中,菌群结构种类上的变化。

2.4 优势条带序列系统发育树

为了考察测得的优势序列间的相似程度,将 5 个样本中的优势条带序列分别构建系统发育树,如图 2 所示.在系统发育树中,相似数值越大,表明序列之间差异越小,序列间的距离越远,表明序列差异越大.总体来说,序列间的相似性并不大,相似性大多在 80% 以下,相似值最大的是 12-c 和 12-d,达到

表 3 激活不同阶段中的优势菌

Table 3 Dominant bacteria at different periods during activation

泳道	最亮条带	优势菌种
n0/p0	3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.; <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032
n1	7,3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.; <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032; <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2; <i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs; <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831
n2	19,20,21,22,23	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs; <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2; <i>Azoarcus</i> sp. EbN1; <i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911; <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580; <i>Petrotoga mobilis</i> SJ95
p1	3,11,12,13,14	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.; <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501; <i>Salmonella enterica</i> subsp.; <i>Pseudomonas mendocina</i> ymp; <i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043; <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.
p2	26,27,28,30,31,32	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501; <i>Bacillus cereus</i> subsp.; <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.; <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831; <i>Salmonella enterica</i> subsp.; <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58; <i>Bacillus halodurans</i> C-125

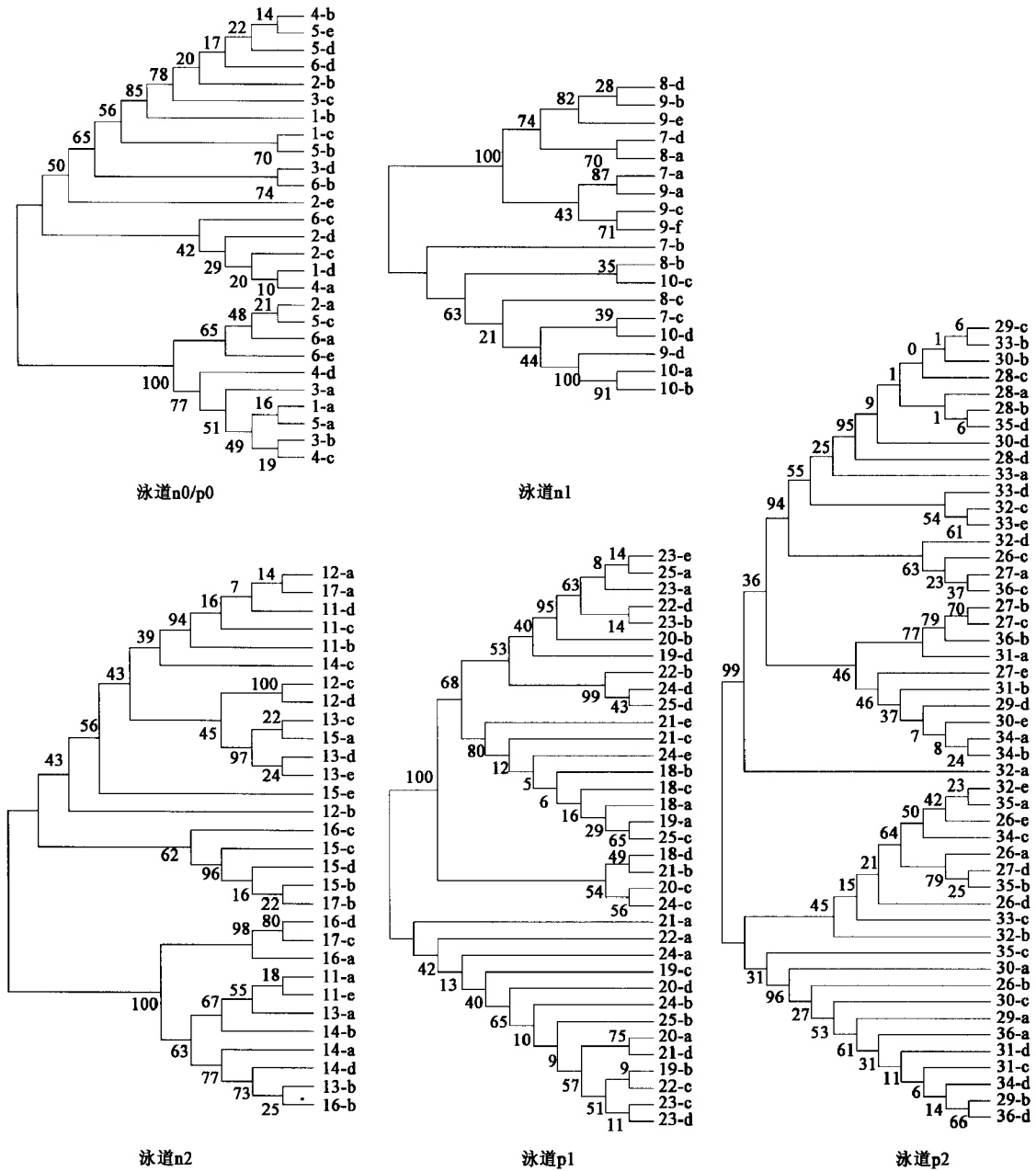


图 2 5 个样本中优势条带序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of dominant DGGE banding sequence in five samples

100. 由于 DGGE 的分离度受变性剂浓度梯度、胶浓度和切胶等多种因素影响, 相似度较高的序列并未完全分离, 所以实验中获得的条带均含有多个不同序列.

2.5 激活过程中主要内源菌所在类群分析

对优势菌所在类群分析, 结果如图 2、图 3 与表 4. 激活过程中主要存在的 16 种菌, 大体可分为 3 类: 其中 7 种菌属于芽孢杆菌目 (Bacillales), 7 种属于变形菌门 (Proteobacteria) (其中 α 变形菌 1 种, β 变形菌 1 种, γ 变形菌 5 种), 1 种属于梭菌门 (Clostridia), 而 *Petrotoga mobilis* SJ95 是比较特别的 1

种菌. 从分类上讲, Bacillales 和 Proteobacteria 是优势类型, 占整个文库的 93% 以上.

从内源菌的种类上分析, 激活前 (n0/p0), 优势菌为 2 种芽孢杆菌, 常压条件下, 激活中期 (n1) 的优势菌为 4 种芽孢杆菌和 1 种梭菌, 激活后期 (n2) 的优势菌为 3 种芽孢杆菌、1 种梭菌和 1 种变形菌; 高压条件下, 激活中期 (p1) 的优势菌为 2 种芽孢杆菌和 5 种变形菌, 激活后期 (p2) 的优势菌为 3 种芽孢杆菌和 4 种变形菌. 可以看出, 激活剂的加入使变形菌在种类上得到明显增加.

从内源微生物类群数量上对测序结果进行分

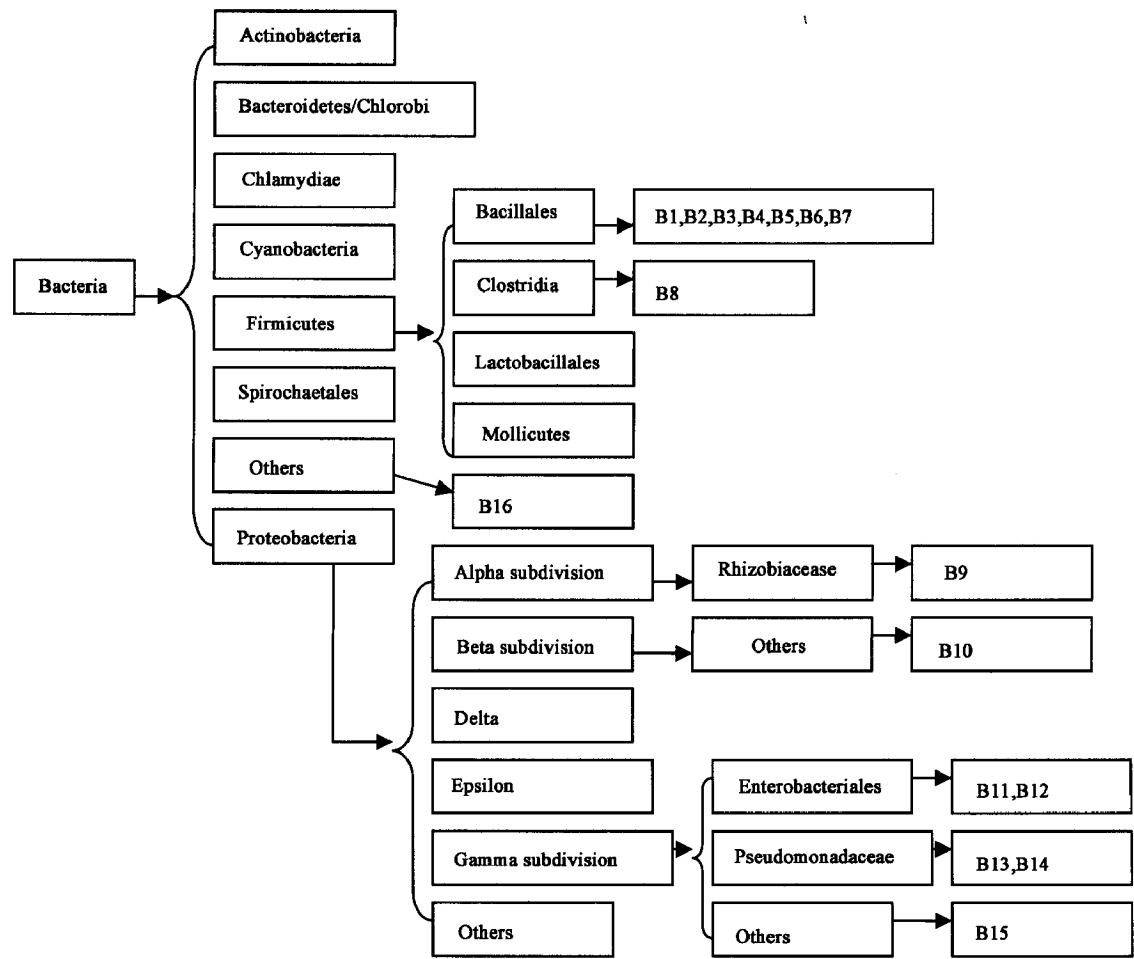


图 3 优势菌所在类群关系示意
Fig.3 Group-diagram of the dominant bacteria

析, 常压激活和高压激活细菌类群数量变化差异显著: 常压激活过程中 (如图 4), 芽孢杆菌的数量先增加后急剧减少, 梭菌的数量迅速增加, β 变形菌、 γ 变形菌也有所增加, 而 α 变形菌始终未出现; 高压激活过程中 (如图 5), 芽孢杆菌的数量先减少后大量增加, γ 变形菌的数量大幅增加, 梭菌和 α 变形菌数量

稍有增加, 而 β 变形菌始终未出现. 可以看出, 激活剂的加入使变形菌在数量上也得到明显增加.

3 结论

(1) 激活后, 优势菌的种类有所增加, 群落结构也发生了变化. 常压条件下, 激活 10 d 时优势菌的

表 4 激活过程中主要内源菌所在类群
Table 4 Groups of the main indigenous bacteria during activation

细菌编号	细菌名称	所在类群
B1	<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	Bacillales(芽孢杆菌目)
B2	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	Bacillales
B3	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Bacillales
B4	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	Bacillales
B5	<i>Bacillus cereus</i> subsp.	Bacillales
B6	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	Bacillales
B7	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	Bacillales
B8	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	Clostridia(梭菌门)
B9	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	Rhizobiaceae(根瘤菌科)/Alpha Proteobacteria(α 变形菌门)
B10	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	Others/Beta Proteobacteria(β 变形菌门)
B11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.	Enterobacteriales(肠杆菌目)/Gamma Proteobacteria(γ 变形菌门)
B12	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	Enterobacteriales
B13	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	Pseudomonadaceae(假单胞菌科)
B14	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	Pseudomonadaceae
B15	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	Others/Gamma Proteobacteria(γ 变形菌门)
B16	<i>Petrotoga mobilis</i> SJ95	Others

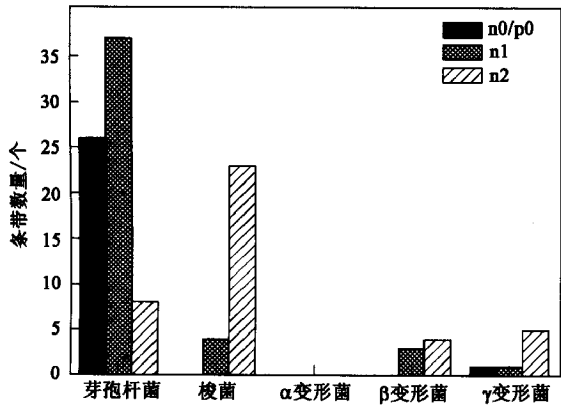


图 4 常压激活过程中各类菌的数量变化

Fig.4 Changes of the bacteria amount during ordinary pressure activation

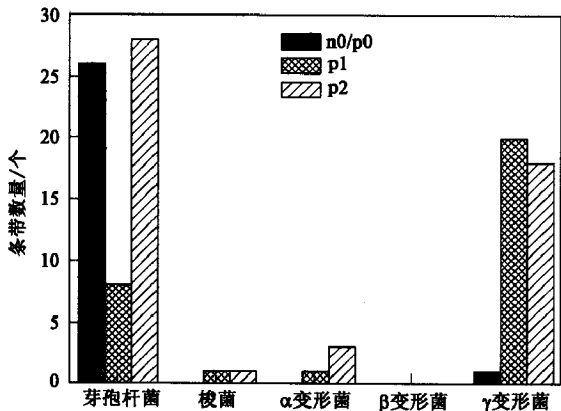


图 5 高压激活过程中各类菌的数量变化

Fig.5 Changes of the bacteria amount during high pressure activation

种类由 2 种增加到 5 种,第 20 d,优势菌种类达到 6 种,但菌群结构却发生了变化;高压条件下,优势菌群结构与常压下差异较大,激活 10 d 时优势菌的种类由 2 种增加到 7 种,第 20 d 时优势菌的种类依然为 7 种,但相对于 10 d 时,除 *Salmonella enterica* subsp., *Klebsiella pneumoniae* subsp. 仍然保持优势外,其它原有优势菌均被新的优势菌所取代.反映出了好氧转厌氧过程中,菌群结构种类上的变化.

(2)激活前,优势菌是芽孢杆菌,激活剂的加入使变形菌在种类上得到明显增加;常压激活和高压激活细菌类群数量变化差异显著.

参考文献:

[1] 汪卫东,魏斌,谭云贤,等.微生物采油需要进一步解决的问题[J].石油勘探与开发,2004,31(6):88-91.

[2] 蒋焱,徐登登,陈健斌,等.微生物单井处理技术及其现场应用效果分析[J].石油勘探与开发,2005,32(2):104-106.

[3] Leu J Y, McGovern-Traa C P, Porter A J, et al. Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing [J]. Anaerobe, 1998, 4(3): 165-174.

[4] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(4): 1721-1730.

[5] 包木太,肖生科,孔祥平,等.16S rRNA 基因技术在油藏微生物生态研究中的应用[J].应用基础与工程科学学报,2007,15(3):369-379.

[6] 邢德峰,任南琪,宫曼丽. PCR-DGGE 技术解析生物制氢反应器微生物多样性[J].环境科学,2005,26(2):173-176.

[7] Malin C, Illmer P. Ability of DNA content and DGGE analysis to reflect the performance condition of an anaerobic biowaste fermenter

- [J]. *Microbiol Res*, 2008, **163**(5): 503-511.
- [8] Vero L D, Giudici P. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, **125**(1): 96-101.
- [9] 肖勇, 杨朝晖, 曾光明, 等. PCR-DGGE 研究处理垃圾渗滤液序批式生物膜反应器(SBBR)中的细菌多样性[J]. *环境科学*, 2007, **28**(5): 1095-1101.
- [10] 李少英, 菊地政则, 安藤功一, 等. PCR-DGGE 技术检测双歧杆菌影响因素的探讨[J]. *食品科技*, 2008, **1**: 211-214.
- [11] 陈凌, 王智晔, 蒋铁锋, 等. 生物转鼓过滤器反硝化去除 NO 过程中微生物群落结构多样性解析[J]. *环境科学*, 2008, **29**(4): 1092-1098.
- [12] 王慧, 王远鹏, 林琦, 等. 应用 PCR-DGGE 研究铜冶炼厂附近根际土壤微生物生态变化[J]. *农业环境科学学报*, 2006, **25**(4): 903-907.
- [13] 张振冬, 王淑芬, 曹宇峰. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用[J]. *海洋环境科学*, 2008, **27**(3): 297-300.
- [14] 刘敏, 朱开玲, 李洪波, 等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成[J]. *环境科学*, 2008, **29**(4): 1082-1091.
- [15] 杨朝晖, 肖勇, 曾光明, 等. 用于分子生态学研究的堆肥 DNA 提取方法[J]. *环境科学*, 2006, **27**(8): 1613-1617.
- [16] 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.
- [17] Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, *et al.* Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **54**(3): 427-443.
- [18] 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 Microbiol Lett*, 2006, **257**(1): 92-98.
- [19] 余跃惠, 张学礼, 张凡, 等. 大港孔店油田水驱油藏微生物群落的分子分析[J]. *微生物学报*, 2005, **45**(3): 329-334.
- [20] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2): 700-711.
- [21] 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): 238-242.
- [22] 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.
- [23] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [24] 邢德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. *环境科学*, 2006, **27**(7): 1424-1428.
- [25] Yu Z T, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(8): 4800-4806.