

利用 PCR-DGGE 技术指导高温油藏中功能微生物的分离

王君, 马挺, 刘静, 刘清坤, 赵玲侠, 梁凤来, 刘如林*

(南开大学生命科学学院天津市功能基因组学重点实验室, 天津 300071)

摘要: 采用 PCR-DGGE 技术对高温油藏的微生物群落进行了多样性分析, 并将得到的信息用于指导油藏微生物的分离. 本研究通过 PCR-DGGE 技术对油藏水样中 DNA 的 16S rDNA V3、V8、V9 3 个高可变区的扩增产物进行了比较, 确定采用可得到更多微生物多样性信息的 V9 区引物进行 PCR 扩增, 优势条带序列分析表明, 在高温油藏中存在的微生物与 GenBank 数据库中 α 、 β 、 γ -变形杆菌和芽孢杆菌的序列相似性最高. 利用多元细菌培养技术, 以序列信息为指导, 采用富集培养、直接培养和特殊培养的方法, 从水样中分离出 5 株高温菌(而传统分离方法只能获得 3 株), 其中 3 株高温解烃菌分别属于 *Bacillus* 属、*Geobacillus* 属和 *Petrobacter* 属, 它们能够在 55℃ 以上兼性厌氧条件良好生长, 对原油的降解率分别为 56.5%、70.01% 和 31.87%, 对原油的降粘率分别为 40%、54.55% 和 29.09%, 使原油的凝固点分别降低 3.7、5.2 和 3.1℃. 因此, 序列指导和改变培养条件是分离更多有效采油微生物的改进方法, 这 3 株高温菌的对原油的作用效果证明其具备提高石油采收率的潜力.

关键词: 油藏; 梯度凝胶变性电泳(DGGE); 16S rDNA; 高温解烃菌; 培养技术

中图分类号: X172; Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0462-07

Isolation of Functional Bacteria Guided by PCR-DGGE Technology from High Temperature Petroleum Reservoirs

WANG Jun, MA Ting, LIU Jing, LIU Qing-kun, ZHAO Ling-xia, LIANG Feng-lai, LIU Ru-lin

(Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: It is a brand-new method to isolate functional bacteria from high temperature petroleum reservoirs according to the sequence information obtained from PCR-DGGE patterns. Three-set primers of 16S rDNA high variable region, V3, V8, V9, were compared. The results showed that more microbial diversity information could be obtained from the PCR product of V9 region. Sequence analysis indicated that the dominant bacteria in the petroleum reservoir had high sequence similarity with bacteria from α , β , γ -*Proteobacterias* and *Bacilli* from the GenBank database. According to the sequences information, multi-cultivation technology including enrichment cultivation, special cultivation and direct cultivation methods were employed, and finally, five strains (three strains by traditional methods) were isolated from oil-water samples. Among them, three thermophilic hydrocarbon-degrading bacteria, which belonged to *Bacillus* sp., *Geobacillus* sp. and *Petrobacter* sp., respectively, could grow well under 55℃ in obligate anaerobic condition. The crude oil could be utilized by these strains with the degradation rate of 56.5%, 70.01% and 31.78% respectively along with the viscosity reduction rate of 40%, 54.55% and 29.09%, meanwhile the solidify points of crude oil were reduced by 3.7, 5.2 and 3.1℃. Therefore, the combination of sequence information from PCR-DGGE and altering cultivation conditions is an available novel method to isolate more functional microorganisms which could be utilized for microbial enhanced oil recovery.

Key words: petroleum reservoirs; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rDNA; thermophilic hydrocarbon-degrading bacteria; cultivation technology

由于石油成分的复杂性和微生物代谢途径的多样性, 石油污染的土壤环境及油藏为复杂的微生物群体的形成提供了有利条件, 长期以来分离和鉴定降解烷烃的微生物被认为是一项重要的工作. 近年来, 通过分子生物学的方法(rRNA/rDNA 测序、RFLP、DGGE、TGGE 等技术)研究油藏微生物的报道很多^[1~7], 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)方法被广泛应用于分子水平上分析油藏微生物群落结构和监测微生物群落动态变化. Orphan 等^[5]通过扩增水样中微生物群

落总 DNA 的 16S rDNA 片段并克隆建库分析了高温油田微生物群落结构的组成, 余跃惠等^[6]使用基于 16S rDNA V3 高可变区的 PCR-DGGE 图谱分析结合条带割胶回收 DNA 进行序列分析, 对新疆油田注水井和相应采油井微生物群落的多样性进行了比较并

收稿日期: 2007-03-08; 修订日期: 2007-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(50674058); 天津市应用基础研究计划重点项目(07JCZDJ03200)

作者简介: 王君(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为石油微生物学, E-mail: vvwangjun@mail.nankai.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: meor@nankai.edu.cn

鉴定了部分群落成员.程海鹰等^[7]采用 PCR-DGGE 分析了在高温、高压和厌氧条件下富集培养的油藏内源微生物.这些研究探讨了油藏微生物的种群多样性,为内源微生物采油提供了清晰的生态学背景,但是目前还没有利用该技术对油藏微生物进行指导分离,从而为内源微生物提高石油采收率的机理研究提供更多理论依据.因此,采用 PCR-DGGE 技术对油藏微生物多样性进行分析,并将得到的信息用于指导油藏微生物的分离是一套全新的思路.

大港油田官 69 区块在 1998 年后通过激活内源微生物提高石油采收率,并取得了不错的成效^[8].为了进一步验证其采油机理,获得高性能的采油菌株,本实验利用 PCR-DGGE 技术研究了该油藏微生物群落的种群多样性,进而在这些信息的指导下,结合目前发展起来的提高微生物可培养性的方法,从油藏水样中分离了 5 株内源高温菌,其中进一步鉴定了与降解烷烃相关的 3 株高温菌,而通过传统“盲筛”只能从该油藏水样中分离得到 3 株内源微生物.该方法提供了一种现代的“可视”筛菌系统,并为进一步在模拟油藏条件下研究内源菌的采油机理提供基础.

1 材料与方法

1.1 试剂与引物

聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒购于 Biospin,尿素、丙烯酰胺、过硫酸铵、去离子甲酰胺均购自 BBI,各种限制性内切酶、T4 连接酶、PCR 所用的高保真 DNA 聚合酶、dNTPs、X-gal 及 IPTG 均购自 TaKaRa 公司.PCR 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,序列测序由北京三博远志生物有限责

任公司完成.

1.2 实验材料

油水样均采自大港油田官 69 区块采出井,油藏平均温度为 73℃,深度为 1 801.3 ~ 1 960 m.水样为无色透明液体,化学组成为 Na⁺ 7 615 mg/L, Ca²⁺ 369 mg/L, Mg²⁺ 107 mg/L, Cl⁻ 12 787 mg/L, NH₄⁺ 104 mg/L,总 P < 0.04 mg/L,总 Fe < 0.1 mg/L, Mn 0.023 mg/L, Si 5.47 mg/L,其它重金属未检出(< 0.01 mg/L),在无菌条件下用普通滤纸过滤除去悬浮物质,4℃低温保存.油样含胶质沥青 24.8%,含蜡 24.5%,50℃下粘度为 110 mPa·s,凝固点为 42.4℃.

1.3 水样基因组总 DNA 的提取

将 1 L 水样用滤纸过滤后,于 5 000 r/min 离心得菌体,参照文献[9]提取基因组 DNA,在破碎细胞时略加修改:一是直接用酶法和化学法相结合的方法;二是将菌体用液氮研磨后再加入酶和 SDS 进一步破壁.提取的基因组 DNA 置于 -20℃ 保存备用.

1.4 基因组总 DNA 16S rDNA 高可变区的 PCR 扩增

从水样基因组中扩增细菌 16S rDNA 的 V3、V8 和 V9 可变区片段(见表 1).扩增反应体系 50 μL[包括 5 μL 10 × Buffer、4 μL dNTP Mixture(各 10 mmol/L)、1 μL 正向引物(20 μmol/L)、1 μL 反向引物(20 μmol/L)、1 μL DNA 模板和 1U Taq DNA 聚合酶];PCR 扩增采用 TouchDown PCR 方法^[10],修改后反应条件为:94℃ 预变性 5 min,循环过程为:94℃ 1 min;退火温度 1 min;72℃ 3 min(其中退火温度从 65 ~ 52℃,每个温度 3 个循环);之后再 15 个循环(94℃ 1 min;55℃ 退火 1 min;72℃ 3 min);72℃ 延伸 10 min.PCR 反应产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测.

表 1 所用引物的序列¹⁾

Table 1 Primers and protocols used for PCR experiments			
引物	目的序列	引物序列	PCR 产物
P1: 341F-GC*	341 ~ 357	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	V3 high variable region
534R	517 ~ 534	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	234 bp
P2: 341F-GC*	341 ~ 357	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	V8 high variable region
907R	907 ~ 926	5'-CCG TCA ATT CMT TTGAGT TT-3'	626 bp
P3: 1055F	1 055 ~ 1 070	5'-ATG GCT GTC GTC AGC T-3'	V9 high variable region
1406R-GC*	1 392 ~ 1 406	5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3'	392 bp

1) F: Forward primer; R: Reverse primer; GC* 是一段约 40bp 的富含 GC 的序列,其序列为:5'-CGC CCGCCGCGC CCC GCGCCC GTC CCGCCGCCC CCGCCC-3'

1.5 16S rDNA 序列高可变区的 DGGE 分析

16S rDNA 的 V3、V8 和 V9 高可变区 PCR 扩增片段利用 Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad)进行 DGGE 分离.胶板面积为 16 cm × 16

cm.DGGE 条件为:6%的聚丙烯凝胶,30% ~ 60%的变性剂梯度(100%的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40%的去离子甲酰胺的混合物),160 V 恒压,60℃,200 min.电泳完毕后用 EB 染色,通过 Bio-Rad 凝胶

成像系统来成像。

1.6 DNA 片段序列分析

切割凝胶上的优势条带用 Biospin 聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 所得 DNA 用不带 GC 夹的 V9 区引物扩增后连接到 pGEM-T 载体上, 采用 CaCl_2 法转化入 *E. coli* DH5 α 中, 待转化子长出后, 挑白色菌落, 通过酶切鉴定阳性转化子, 送至北京三博测序公司测序. 将测序结果在 GenBank 中比对, 并用 Clustal X 和 Mega3.1 软件进行各序列间的同源性和进化距离的分析与比较, 构建系统发育树。

1.7 高温解烃菌的分离

1.7.1 传统富集培养法分离

取水样振荡均匀后用无菌移液管取 10 mL, 接种至 100 mL 含有 2% 液蜡的无机盐培养基中(培养基组成: KH_2PO_4 0.3 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.25 g; NH_4Cl 2.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.36 g; 酵母提取物 0.5 g; 蔗糖 1.0 g; 蒸馏水 1 000 mL; pH = 7.2), 55℃ 振荡培养 5 d. 将富集培养液充分混匀, 涂布在营养肉汤琼脂平板或无机盐液蜡琼脂平板上, 50 ~ 70℃ 培养 2 d, 观察长出的菌落。

1.7.2 直接培养法分离

直接取水样涂布在地层水上清液琼脂平板上, 50 ~ 70℃ 兼性厌氧培养 2 ~ 14 d, 观察长出的菌落. 挑取单菌落划线培养并用显微镜检验其纯度。

1.7.3 特殊培养法分离

模拟油田实际水样组成加入氮源、磷源或生长因子, 50 ~ 70℃ 兼性厌氧培养 2 ~ 14 d, 然后将培养液分别涂布在营养肉汤琼脂平板、10 倍稀释的营养肉汤琼脂平板或无机盐液蜡琼脂平板上, 挑选长出的不同菌落。

1.7.4 高温解烃菌的选育

将高温下生长的各个菌落, 接种至普通 LB 液体培养基中, 培养至 D_{630} 为 0.8 左右, 作为种子液以 10% (体积分数) 比例接入 100 mL 无机盐液蜡培养基中, 50 ~ 70℃ 兼性厌氧培养 5 d. 以此为种子液, 接种至新鲜的无机盐液蜡培养基中, 反复驯化菌种 3 ~ 4 次, 选取对液蜡乳化良好的菌种, 接至以原油为碳源的无机盐培养基中, 测定菌株对原油的降粘、降凝效果, 并采用红外测油仪测定菌株对原油的降解率。

1.8 高温解烃菌的 16S rDNA 鉴定

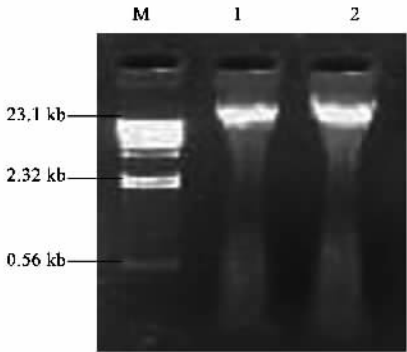
以菌株基因组 DNA 为模板, 用 16S rDNA 通用

引物扩增得到近全长的 16S rDNA, PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上, 序列测定和分析同 1.6, 将测序结果在 GenBank 中比对。

2 结果与讨论

2.1 水样基因组总 DNA 的提取

将从水样中提取的总 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 如图 1 所示. 提取前经液氮研磨法破碎细胞, 最终得到的 DNA 浓度为 21.5 $\mu\text{g/mL}$ (泳道 1); 不经液氮研磨直接用酶法和化学法相结合的方法进行提取, 得到的 DNA 浓度为 30.6 $\mu\text{g/mL}$ (泳道 2). 从水样中离心得到的微生物细胞数量较少, 液氮研磨法是一种较为激烈的破壁方式, 在操作时由于液氮飞溅势必会造成样品的损失, 而且不同的裂解方法对于细菌裂解的百分比是不一样的, 因此 2 种方法提取的总 DNA 存在差异. 从图 1 中还可以看出所有 DNA 分子量均集中在 23.1 kb 以上, 证明经以上方法破壁后提取的基因组较完整。



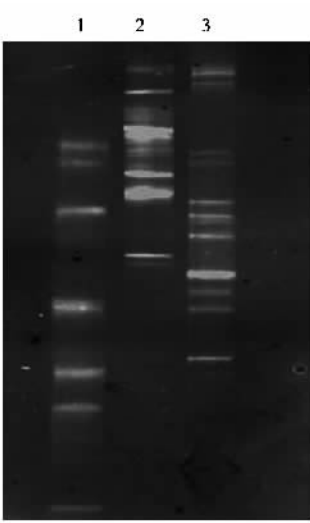
M. λ DNA/*Hind* III marker; 1. 经液氮研磨所得 DNA 样品;
2. 未经液氮研磨所得 DNA 样品

图 1 不同方法提取的样品总 DNA

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from the formation water samples

2.2 DGGE 分离 16S rDNA V3、V8、V9 区片段 PCR 产物

利用 PCR-DGGE 技术分析微生物群落时, 不同的 16S rDNA 靶序列对群落多样性分析有显著影响^[11]. 因此, 需要根据样品的实际情况, 优化选择 16S rDNA 通用引物. 将用酶法和化学法相结合的方法提取的 DNA, 用 16S rDNA 高可变区 V3、V8 和 V9 的不同的引物 P1、P2 和 P3 进行 PCR, 采用 40% ~ 60% 的变性剂浓度梯度进行 DGGE 分离, 结果如图 2 所示, P1、P2 和 P3 3 对引物分离的条带分别为 7、8 和 12 条, 根据 DGGE 的原理, 每一个条带可能代表



1. 用 P1 引物扩增所得到的 DGGE 图谱; 2. 用 P2 引物扩增所得到的 DGGE 图谱; 3. 用 P3 引物扩增所得到的 DGGE 图谱

图 2 不同引物扩增后得到的 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE patterns of the PCR products

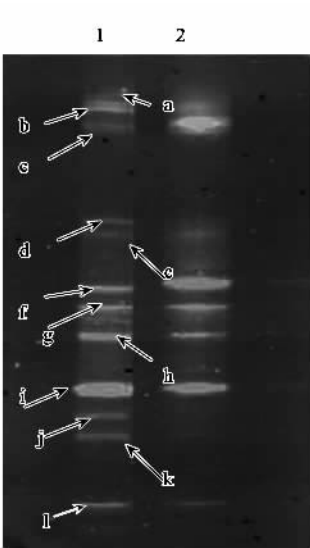
一种微生物,因此利用 P3 引物扩增 16S rDNA V9 区片断用 DGGE 分离可得到较多的条带,从而获得更多的微生物多样性信息.

2.3 DGGE 分离不同方法提取的水样 DNA 的 16S rDNA V9 区片断 PCR 产物

图 1 为 2 种不同的提取方法造成 DNA 产量的差异,但是从提取的 DNA 条带表明已获得较为完整的水样中微生物的总 DNA,进行 16S rDNA V9 区 PCR-DGGE 分析,结果如图 3 所示,第 1 泳道是直接利用酶法和化学法结合的方法提取 DNA 的 PCR-DGGE 图谱,第 2 泳道是经液氮处理后提取 DNA 的 PCR-DGGE 图谱,两者带型即所表现的细菌丰富度和优势菌基本一致,由于第 2 泳道样品在提取时采用的破壁方法较为剧烈,对某种微生物基因组的提取起到了一定的作用从而使得一些条带比较亮(条带 f),但是由于在操作时细胞的损失,致使所得到的条带不如 1 号样品多.因此选用第 1 种方法提取的 DNA 进行后续实验.

2.4 DGGE 条带比对和测序结果分析

将图 3 中第 1 泳道的样品分离的 12 个条带进行切胶回收,PCR 扩增后再进行一轮 DGGE,如该条带还能跑到原位置,则证明切下的条带不是杂合带或单链 DNA 干扰,将正确的条带进行测序,将测序结果通过 GenBank 数据库比对(表 2).分析的 12 条 DGGE 条带序列中,有 5 条序列与 GenBank 数据库中未培养的微生物相似;另外有 5 条序列属于变形杆



1. 扩增经液氮处理所得 DNA 样品的 DGGE 图谱;

2. 扩增未经液氮处理所得 DNA 样品的 DGGE 图谱

图 3 不同方法提取水样总 DNA 的 V9 区的 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE patterns of 16S rDNA V9 region

菌,2 条序列属于芽孢杆菌,其中,序列 e、j 与 *Pseudomonas* 属的菌株(*Pseudomonas* sp. EGU448 和 *Pseudomonas andersonii*)相似性都大于 99%,可初步判断这 2 条序列所代表的微生物属于 *Pseudomonas* 属;序列 h、g 分别与菌株 *Bacillus licheniformis* 和 *Geobacillus* sp. LB-1 的序列相似性均高于 99%,因此分别属于 *Bacillus* 属和 *Geobacillus* 属,序列 i 与 *Burkholderia* sp. N1US7 同源性最高,属于 *Burkholderia* 属;序列 a 和 k 与已知可培养的 Iodide-oxidizing bacterium 和 *Gamma proteobacterium* 相似性分别为 98% 和 99%,都属于变形杆菌.

将所得序列采用软件 Clustal X 和 Mega 3.1 构建系统发育进化树(图 4),结果发现这 12 个条带分别属于四大类群,与 α , β , γ 变形杆菌(*Proteobacterias*)和芽孢杆菌(*Bacilli*)的亲缘关系较近.其中序列 a、c、f、k、l 与数据库中未培养微生物和已鉴定的微生物相似性相同或比较接近,因此可确定这些序列对应的微生物在属水平上的发育地位,但是序列 b 与数据库中未培养微生物的相似性为 99%,而与已鉴定的同源性最高的微生物 *Methylococcus capsulatus* 相似性仅有 94%,序列 d 仅与数据库中未培养菌的相似性较高,没有同源性很高的已鉴定微生物,说明这 2 个序列代表的微生物比较新,可能会是一个新的微生物,因此仅能确定其所属纲的发育地位.

按照各条带所代表的微生物在属水平上的发育

表 2 16S rDNA V9 区 DGGE 条带序列与 GenBank 最相似序列的比对结果

Table 2 Alignment of 16S rDNA V9 region DGGE sequence to its most-similar GenBank sequence					
条带	序列大小/bp	GenBank 序列号	同源性最高的种属(序列号)	相似性/%	阈值
a	300	EF213064	Iodide-oxidizing bacterium (AB159201)	292/296, 98	555
			Roseobacter sp. TM1042 (AY332663)	289/296, 97	531
b	320	EF213065	Uncultured bacterium clone DQ337085	320/321, 99	628
			Methylococcus capsulatus AE017282	304/321, 94	502
c	322	EF213066	Uncultured bacterium clone DQ469207	315/322, 97	583
			Pseudomonas sp. C6-2 EF044363	311/318, 97	575
d	322	EF213067	Uncultured bacterium clone DQ337042	321/322, 99	630
e	322	EF213068	Pseudomonas sp. EGU448 DQ768241	321/322, 99	630
f	322	EF213069	Uncultured bacterium clone DQ833309	320/322, 99	622
			Pseudomonas sp. MY1412 EF079867	319/322, 99	615
g	320	EF213070	Geobacillus sp. LB-1 EF154233	319/320, 99	626
h	320	EF213071	Bacillus licheniformis DQ768245	319/320, 99	626
i	315	EF213072	Burkholderia sp. N1US7 AJ884850	314/315, 99	617
j	322	EF213073	Pseudomonas andersonii AF291818	320/322, 99	622
k	335	EF213074	Gamma proteobacterium (AB010860)	337/338, 99	662
			Rheinheimera chironomi (DQ298025)	332/333, 99	652
l	320	EF213075	Uncultured bacterium clone (DQ128243)	318/320, 99	618
			Petrobacter succinimandens (AY219713)	316/320, 98	603

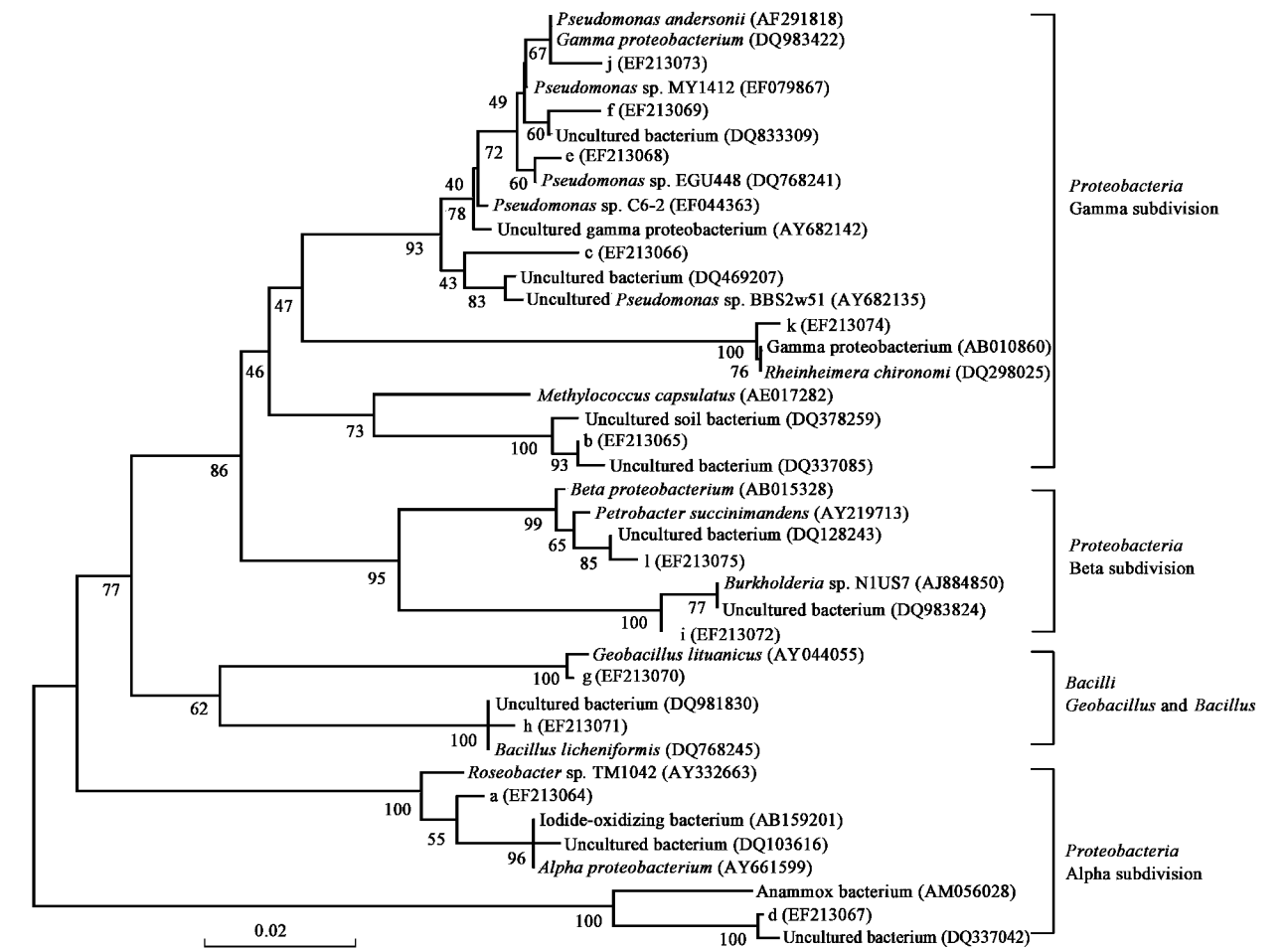


图 4 16S rDNA V9 区序列 DGGE 条带所代表的微生物的系统发育进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the DGGE bands based on 16S rDNA V9 region

地位,可对油藏中微生物的功能进行初步分析,结果发现其中条带 c、e、f、j 代表的 *Pseudomonas* 属、条带 h 代表的 *Bacillus* 属、条带 g 代表 *Geobacillus* 属,条带 i 代表的 *Burkholderia* 属中有大量的烃降解微生物被报道过^[12~17];条带 a 代表的玫瑰杆菌属 (*Roseobacter*),该属被发现在海洋中参与硫的循环^[18],条带 l 代表 *Petrobacter* 属^[19]是 2004 年从油藏中分离到的能够还原硝酸盐的新属;k 代表的 *Rheinheimera* 属也是重要的极端环境微生物^[20]。

2.5 高温解烃菌的分离鉴定及降解特性

DGGE 序列分析表明油藏中存在有 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Geobacillus* 和 *Burkholderia* 等烃降解微生物菌属。*Pseudomonas* 和 *Burkholderia* 属中多数是中温解烃菌,而 *Bacillus* 和 *Geobacillus* 2 个属中有大量能够在高温条件下利用烃的微生物,如已报道的 *Geobacillus stearothermophilus*^[12]能够利用 C₁₅ ~ C₁₇ 的烷烃, *Bacillus thermoleovorans*^[13]能够降解 C₂₃ 和

Geobacillus jurassicus^[15]能降解 C₁₆。可见,有些解烃菌可利用烃的范围很窄,根据这个信息,在无机盐培养基或油藏地层水中分别加入单烷烃(C₁₃ ~ C₂₅)作为碳源,适当添加氮源、磷源和生长因子,在不同的生长温度下(55 ~ 70℃),得到菌株 DM-1、DM-2 和 DM-3。

采用传统富集培养法从水样中分离到 2 株高温菌 DM-4 和 DM-5,直接培养法分离到高温菌 DM-6 和 DM-7。

经传统富集培养、直接培养和 DGGE 指导培养共分离到 7 株高温菌(DM-1 ~ DM-7),形态观察和初步生理生化实验鉴定其中 DM-3、DM-4 和 DM-7 为同一菌株,最后得到的 5 株菌分别对应 DGGE 图谱中的条带 h、g、l、f 和 k。降解实验表明其中有 3 株菌可在 55℃以上兼性厌氧条件下乳化液蜡并降解原油,其中 DM-2 对原油的降解率可达 70.01%,对原油降粘率为 54.55%,降凝效果显著(表 3)。

经 16S rDNA 序列分析鉴定,菌株 DM-1、DM-2

表 3 分离的 5 株高温解烃菌对烃的作用¹⁾

Table 3 Effect of five isolates on hydrocarbon

菌株	对应条带	最适温度/℃	液蜡乳化	原油降解率/%	粘度(50℃)/mPa·s	降粘率/%	凝固点/℃	凝固点降低/℃
DM-1	h	55	++++	56.5	66	40.00	38.7	3.7
DM-2	g	65	++++	70.01	50	54.55	37.2	5.2
DM-3	l	55	+++	31.87	78	29.09	39.3	3.1
DM-5	f	60	—	0.78	97	11.82	41.9	0.5
DM-6	k	60	—	0.26	105	4.55	42.2	0.2
对照			—	—	110	—	42.4	—

1) + : 乳化程度, - : 未乳化

和 DM-3 分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、地芽孢杆菌属(*Geobacillus* sp.)和油杆菌属(*Petrobacter* sp.),在 GenBank 中登记的序列号分别为 DQ539620、DQ309593 和 DQ539621,序列比对表明同源性最近的种分别是 *Bacillus licheniformis* (AY052767,同源性 100%)、*Geobacillus stearothermophilus* (AY608931,同源性 98.97%)和 *Petrobacter succinimandens* (AY219713,同源性 98.56%)。这 3 株菌在进化地位上与 DGGE 序列中的 h、g 和 l 相对应,扩增这 3 株菌的 16S rDNA V9 区片段,与水样同时进行 DGGE 分离,发现这 3 株菌确实在水样中存在(图 5)。如果降低筛选温度可能会得到更多的解烃菌,这需要进行进一步的实验探索。下一步的工作将围绕这些内源微生物在模拟油藏环境下的存在方式、协同作用,及其对提高石油采收率的贡献。

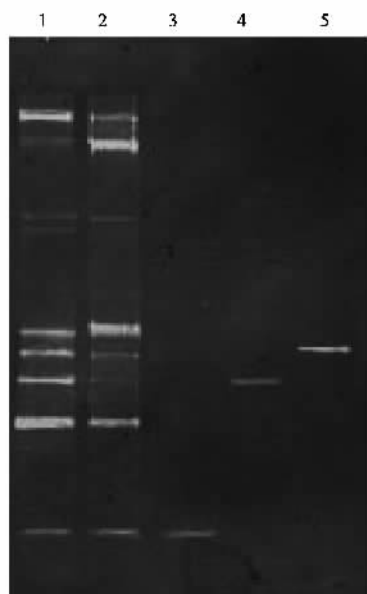
3 结论

(1)采用了 2 种方法提取油藏水样中的 DNA 并

对其 16S rDNA V3、V8、V9 3 个高可变区的扩增产物进行了比较。DGGE 图谱分析表明酶法和化学法相结合的方法可从油田水样中提取到较大量的 DNA, DGGE 图谱分析表明经 V9 高可变区引物扩增可得到较多的条带,能更好地反映油藏中内源微生物的多样性。

(2)DGGE 序列分析表明高温油藏中存在大量的 α、β、γ 变形杆菌以及芽孢杆菌,通过序列信息基本可确定这些条带所代表的微生物在属水平上的进化地位,但是序列 b、d 与 GenBank 数据库中的未培养微生物同源性较高(>99%),与被鉴定的微生物的同源性较低(<94%),因此无法确定这 2 个条带所代表的微生物的进化地位,它们可能是新菌。

(3)在 DGGE 的序列分析提供的信息指导下,采用传统富集培养、直接培养和特殊培养方法得到 3 株高温解烃菌 DM-1、DM-2 和 DM-3,其中 DM-1 和 DM-2 是传统分离方法所分离不到的,它们可在 55℃以上高温兼性厌氧条件下产生大量粘性多糖物



1. 扩增经液氮处理所得 DNA 样品的 DGGE 图谱; 2. 扩增未经液氮处理所得 DNA 样品的 DGGE 图谱; 3. DM-3; 4. DM-1; 5. DM-2

图 5 3 株高温解烃菌 16S rDNA V9 区与水样总 DNA 的 DGGE 图谱比对

Fig.5 16S rDNA V9 region DGGE patterns of the isolated bacteria and the total DNA

质和生物乳化剂,对原油的降解率为 31.78% ~ 70.01%,对原油乳化降粘效果显著,凝固点降低最高可达 5.2℃.

(4)经 16S rDNA 序列分析,3 株高温菌分别属于 *Bacillus* 属、*Geobacillus* 属和 *Petrobacter* 属,经 DGGE 验证这 3 株菌确实存在于该油藏水样中.

参考文献:

- [1] 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**: 427-443.
- [2] 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**: 92-98.
- [3] 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.
- [4] 赵凤敏. T-RFLP 微生物监测技术及矿场应用研究[J]. 油气地质与采收, 2005, **12**: 64-67.
- [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]. Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 700-711.

- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 陈智宇,冯庆贤,刘如林,等. 嗜热采油微生物菌种的开发与应用[J]. 石油学报, 2001, **22**(6): 59-62.
- [9] 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.
- [10] 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 encoding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, **59**: 695-700.
- [11] 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.
- [12] Hasanuzzaman M, Umadhay-Briones K M, Zsiros S M, *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of a Novel, Oil-Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1 [J]. Curr Microbiol, 2004, **49**: 108-114.
- [13] Sorkhoh N A, Ibrahim A S, Ghannoum M A, *et al.* High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, **39**: 123-126.
- [14] Kato T, Haruki M, Imanaka T. Isolation and characterization of long-chain n-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs [J]. J Biosci Bioeng, 2001, **91**: 64-70.
- [15] Feitkenhauer H, Muller R, Markl H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by *Thermus* and *Bacillus* spp. [J]. Biodegradation, 2003, **14**: 367-372.
- [16] Nazina T N, Sokolova D Sh, Grigoryan A A, *et al.* *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species [J]. Syst Appl Microbiol, 2005, **28**: 43-53.
- [17] Marin M M, Smits T H M, van Beilen J B, *et al.* The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control [J]. J Bacteriol, 2001, **183**: 4202-4209.
- [18] Gill Malin. OCEANS: New Pieces for the Marine Sulfur Cycle Jigsaw [J]. Science, 2006, **314**: 607-608.
- [19] Salinas M B, Fardeau M L, Cayol J L, *et al.* *Petrobacter succinimandens* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, **54**: 645-649.
- [20] Brettar I, Christen R, Höfle M G. *Rheinheimera perlucida* sp. nov., a marine bacterium of the *Gamma proteobacteria* isolated from surface water of the central Baltic Sea [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, **56**: 2177-2183.