

油藏微生物多样性的分子生态学研究进展

李辉¹ 牟伯中^{1,2*}

(1. 华东理工大学应用化学研究所 上海 200237)
(2. 华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)

摘要: 油藏微生物是一类宝贵的资源, 在油层生态系统的物质循环和能量流动中发挥着主导作用。传统上, 主要依赖纯培养技术, 使得大部分油藏微生物都没能得到充分认识。分子方法克服了纯培养方法中遇到的问题, 能更好地了解环境微生物群落多样性。近年来, 在油藏微生物群落多样性研究中的应用进展迅速, 对油藏微生物学和生态学的发展产生了重要影响。文中评述了近年来国内外在油藏微生物分子生态方面的研究进展, 并对进一步的研究提出了展望。

关键词: 油藏, 分子生态, 微生物群落

Recent Advances in Molecular Microbial Ecology of Petroleum Reservoirs

LI Hui¹ MU Bo-Zhong^{1,2*}

(1. Institute of Applied Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)
(2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: The microorganisms in the subterranean high-temperature petroleum reservoir is a kind of precious resource, which play an important role in matter circulation and energy flow in oil reservoir ecosystem. Traditionally, culturing techniques were used to analyze them, but it was hard to understand the microbial community diversity thoroughly. Molecular methods had overcome the pure culture bottleneck, which was very useful to analyze the environmental microbial community. In recent years, uncultured-based study of oil reservoir microbiology progressed rapidly, which produced important effect on the development of petroleum microbiology and ecology. In this paper, the current knowledge about molecular microbial ecology in petroleum reservoirs was reviewed and some suggestions towards further research were given.

Keywords: Petroleum reservoirs, Molecular ecology, Microbial community

深埋地下的油藏储层是典型的极端环境, 凭借其厌氧、高温、高压和高矿化度等极端的理化因子造就了独特的油藏微生物生态系统, 形成了丰富的油藏极端微生物资源和基因资源^[1,2]。通过纯培养方法人们已经发现了烃氧化菌、喜温硫还原菌、嗜热

硫还原、发酵菌、产乙酸菌、产甲烷菌和锰、铁还原菌等多种油藏微生物。这些微生物不仅具有重要的研究价值^[3,4], 而且在原油污染环境的生物修复、挥发性石油烃的降解、原油的脱硫、脱氮和微生物采油^[5,6]等领域都取得了一定的应用。

但是, 由于纯培养方法的局限性, 人们对油藏微生物群落多样性及其功能的认识还十分有限, 有必要引入新的原理和方法对它们进行研究。现代微生物分子生态分析方法突破了纯培养瓶颈, 能从分子水平上较为客观地揭示环境微生物的多样性, 近年来在油藏微生物群落研究中的应用发展迅速^[7-22], 促进了人们对油藏微生物多样性的认识, 并深刻地影响着微生物采油技术机理研究和应用研究的发展方向。

本文综述了近年来油藏微生物群落研究的分子方法、油藏微生物多样性与分布规律, 探讨了油藏微生物群落结构与功能的关系, 展望了油藏微生物分子分析方法在油田生产实际中的应用前景, 为进一步研究油藏微生物群落提供了借鉴。

1 分子方法在油藏微生物研究中的应用

油藏微生物多样性是指生态系统中微生物的种类、数量、分布以及微生物种群的功能和对油藏环境的影响。因此, 油藏微生物群落多样性研究方法应该包括微生物群落结构的整体分析和功能菌群的局部测定。目前测定微生物群落结构的方法主要包括: 16S rRNA 基因克隆文库、变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis/Temperature Gradient Gel Electrophoresis, DGGE/TGGE)、酶切分型 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 和末端限制性片段长度多态性 (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 等; 测定群落功能的方法主要包括: 免疫杂交 (Protein Banding)、反相基因组探针 (Reverse Sample Genome Probing, RSGP)、荧光原位杂交 (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH)、基因芯片 (Microchip) 和放射性同位素标记 (Radiography) 等。其中建立在 rRNA 基因序列比对基础上的分析方法是相对成熟的, 这些方法看似独立, 实则相互影响互为补充 (图 1), 只有综合运用取长补短, 才能深入说明油藏微生物群落的结构和功能。

反相基因组探针法是较早用于油藏微生物研究的分子分析方法^[7], 其反相的意思主要指固定相是标准参照物而不是待测样品, 这与基因芯片的设计思路是相同的, 只是没有芯片的密度大, 所以 RSGP 实际上也可以认为是一种全基因组芯片, 适用于检测特定菌种在油藏中的分布。最近, Bonch 等人制作

了一套包括主要嗜热细菌和古菌的寡核苷酸探针基

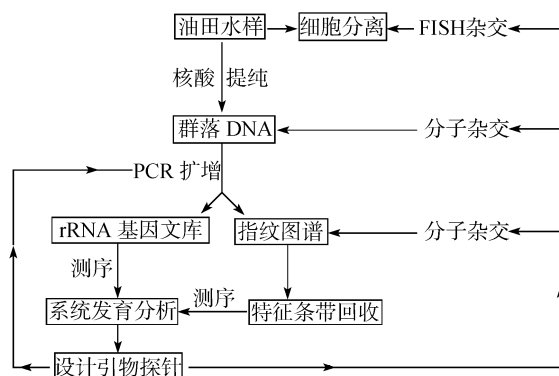


图 1 分子分析方法的相互关系

Fig. 1 Relationship of the molecular techniques

因芯片^[8], 克服了 RSGP 方法的缺陷, 但值得一提的是, RSGP 方法操作简便快速, 实验条件相对宽松, 适合油田现场应用, 可以针对油田生产实际建立相关菌种的主杂交膜, 从而简便快速地检测油藏水样中相关菌种的含量。类似的还有免疫杂交法, 也具有应用价值, 可惜相关研究没有深入进行。目前使用频率最高的方法就是构建 16S rRNA 基因文库^[8-20], 其优点是在通常的分子生物学实验室都可以开展相关工作, 而且得到的 16S rRNA 基因序列完整, 携带信息量大, 在此基础上进行的系统发育学分析结果可靠, 比较适合油藏微生物群落的整体结构分析, 得到较为完整的油藏微生物多样性认识。同时还可以为其他分子分析方法提供基础数据, 例如设计菌种特异性引物用来完成实时定量 PCR, 还可以设计合适的探针进行 FISH 杂交实验, 甚至在 16S rRNA 基因序列信息量充足的时候可以指导设计基因芯片, 对环境微生物进行快速检测。

但是构建文库的工作量比较大, 很难穷尽样品中微生物的多样性, 统计方法也难以得到完美的结果, 实践当中由于油藏水样微生物的丰度较低, 一般挑取 300 个左右细菌克隆, 或者 200 个左右古菌克隆, 计算文库的 Coverage 值就可以达到 0.9 左右, 而稀缺性曲线的斜率也已经很小, 可以认为库容是足够的了^[10]。另外, 16S rRNA 基因全序列测定成本比较高, 尤其对于序列类型比较丰富的样品直接进行测序分析代价往往会很大, 实践中可以结合 RFLP 方法来降低成本, 先将阳性克隆逐个进行酶切分型, 相同酶切类型的克隆子归为同一操作分类单元, 再从各个操作分类单元中挑取 1~3 个克隆测

序就可以了,这样就避免了同一 16S rRNA 基因的重复测序。通过对国内陆上和海上油藏微生物的 RFLP 分析,本实验室已经积累了三百多种油藏微生物的 RFLP 指纹图谱,每种图谱都经过测序确定了其代表的菌种,初步形成了一定规模的图谱数据库,将来对未知的 16S rRNA 基因类型只要作出其 RFLP 酶切分型图,再与数据库中的标准图谱进行比较,找到相同的就可以确定其代表的菌种了,这样既省去了测序带来的高额费用,也缩短了实验周期^[18,19]。

DGGE/TGGE 指纹图谱法近年来在油藏微生物群落研究中的应用发展十分迅速,是很好的监测油藏微生物群落演替的方法,既能分析水样中的微生物在注水井、地层以及采油井等不同空间位置的菌群分布差异,又能对同一油藏样本不同时间间隔的菌群变化进行分析^[20]。类似的 T-RFLP 技术也是一种快速分析微生物群落结构的方法^[21],能够同时对分析大量样品,既可以比较不同微生物群落之间的差异,也可以研究同一个微生物群落随时间和外部环境压力的变化过程,适合于连续监测环境中菌群结构的变化,从而识别功能菌群的演替及其生理活性状态的变化情况。但是这两种方法只能分析 500 bp 以下的 DNA 片段,携带的系统发育信息量较小,另外指纹图谱所能包含的条带有限,通常只有二三十条,只能得到一些优势菌群的信息,而弱势菌群往往检测不到,难以全面反映油藏环境微生物群落的多样性。最近, FISH 杂交方法也开始用于油藏微生物群落的研究当中^[9],并获得了一些新的成果,但是探针还很有限,需要设计符合油藏特点的更加有效的探针。

虽然分子分析方法非常先进,具有很多优点,但是仍然会产生误差,在从细胞水平、分子水平以及它们的过渡阶段都会产生一些偏差,例如细胞破碎、DNA 提取、PCR 扩增等几乎是所有分子方法都会遇到的通病。另外,油田样品中微生物的收集方法不妥当也会带来误差,由于油田样品大多是油水混合物,菌浓都比较低,再加上聚合物驱油后产生了很多悬浮物,致使样品很难进行过滤分离,而且很多菌种都是分布在水油界面上的,如果首先进行油水相分离就会使一部分菌种丢失,所以先用极性较弱的有机溶剂洗涤萃取油类物质,使细胞体尽量转入水相当中,再用冷冻超速离心方法收集大部分

细胞体,就可以最大限度地收集到样品中的微生物细胞了。

2 油藏微生物群落多样性

微生物群落结构和多样性是微生物生态学和环境科学研究的热点内容,对于开发微生物资源阐明微生物群落与其生境的关系、揭示群落结构与功能的联系、指导微生物群落功能的定向调控具有重要意义。首先,群落结构决定了生态功能的特性和强弱;其次,群落结构的稳定性是实现生态功能的重要因素;再次,群落结构变化是标记环境变化的重要方面。因此,通过对油藏环境微生物群落结构和多样性进行解析并研究其动态变化,可以为调节群落功能和发现新的功能菌群提供可靠依据。

2.1 菌群分布

油藏环境微生物的分布状况取决于生态系统理化因子的综合作用^[11],包括温度、矿化度、pH 值、压力、溶氧浓度和有机质含量等,其中温度和溶氧浓度是关键因子。Bonch 等人^[8]平行使用放射性同位素标记法、富集培养法和基因芯片法研究了西伯利亚高温油藏中的微生物多样性。富集培养发现有好氧和厌氧的嗜热、极端嗜热菌,大部分属于异养发酵菌,主要包括热孢菌属、嗜热厌氧杆菌属、地杆菌属、石油神孢菌属、高温套管菌属和热球菌属,其中石油神孢菌属是首次发现,其它菌属以前均在油藏环境中发现过,而后面 4 个属中发现的菌种都是新菌种,说明这些菌种的分布情况实际上大于以往界定的范围。Orphan 等人用克隆文库法和富集培养法研究了加州陆上和海上未注水高温油藏中的菌群分布^[12],检测到的菌种主要为嗜热发酵菌和异养硫呼吸细菌和古菌,这一结果与厌氧富含硫和有机物的油藏环境条件相吻合。Grabowski 等人^[13]采用文库法分析了加拿大低温、低矿化度和未注水开发的生物降解类油藏的微生物群落多样性,发现好氧菌和脱氮菌的浓度比较高,同型乙酸菌的浓度则达到 10^6 cells/mL,而硫酸盐还原菌和乙酸营养型产甲烷菌的浓度则达到 10^4 cells/mL,这是首次使用分子分析方法证实低温油藏中有乙酸营养型产甲烷古菌的存在,而以往认为油藏中只有氢营养型和甲基营养型产甲烷古菌。本实验室采用克隆文库法分析了我国陆上和海上高温水驱油藏的微生物多样性^[10,15,18,19],检测到细菌和古菌类型分别达到 60 种

和 20 种以上, 细菌类型包括变形杆菌、嗜热菌、脱硫菌和烃降解菌等, 其中嗜热菌的种类最为丰富, 而且一些菌种曾经在多个油藏水样中检出过, 说明它们可能广泛分布于各种油藏环境当中; 古菌全部归为产甲烷菌, 其中既有利用氢产甲烷菌, 也有利用乙酸产甲烷菌, 这与 Grabowski 等人的研究结果相似^[13]。

但是, 分子方法无法避免采样过程中管线中微生物的污染, 容易高估油藏微生物的多样性。由于油藏深埋地下, 通过钻探岩芯采样代价十分高昂, 通常不得不采用井头管线进行取样, 这样可以利用水流将油层深处的微生物携带上来, 非常方便但也引入了很大偏差。Basso 等人用指纹图谱法对比分析了井筒和管线灭菌前后所采水样中的微生物群落结构信息^[14], 发现管线除菌后水样中的细菌浓度比除菌前下降了 25 倍, 这是由于采油井筒和地面管线长期处于常温或中温状态, 其中滋生了大量常温菌和中温菌, 它们也会随着水流移动到地面上并最终被检测到, 这也解释了为什么会从高温油藏水样中检测到大量的常温菌^[12,15], 而且这些常温菌的生长速率要远高于地层深处的高温菌, 所以在数量上处于优势, 容易掩盖占少数的菌种信息, 而这些菌种可能是真正在油层深处生长繁殖的微生物^[14]。

2.2 群落演替

通常油藏微生物群落结构分布与溶氧浓度随地层深度增加而递减的规律相一致, Orphan 等人比较了 4 口不同井深的微生物多样性, 发现微生物数量和多样性随井深呈递减变化^[12], 在平均井深 1600 m~3300 m 范围内, 井内平均温度为 72 ~115 °C, 平均菌浓度为 10^6 cells/mL~ 10^3 cells/mL, 代表性的菌种也从 7 种到 3 种不等。优势菌种主要有低 G/C 含量的革兰氏阳性细菌, α 、 γ 、 δ 变形杆菌, 发酵菌和利用硫化物的超嗜热古菌、嗜热甲烷菌等, 其中细菌的多样性要远远高于古菌, 而且许多 16S rRNA 基因序列与以往在油藏体系中发现的序列类型相似性都达到 97% 以上。

在没有人为扰动的情况下油藏环境微生物群落结构比较稳定, 但在水驱和化学驱等原油开采过程中, 注入水和化学物质都会使群落分布发生变化。其中注入水对油藏微生物群落结构的改变最为深刻。赵立平等用 TGGE 方法研究了大港油田孔二断块注水井和采油井的微生物群落结构差异^[20], 发

现注水井样品中微生物的多样性远远高于采油井, 袁三青等人^[21]用 T-RFLP 比较分析胜利油田单 12 区块的注水井和采油井样品得出了同样的结论, 说明注入水中的微生物在从注水井经过地层到采油井的过程中很多都被淘汰了。注入的化学物质和营养成分对油藏微生物群落结构的影响也比较大, 往往是具有选择性地使某些菌种得到富集, 同时抑制另外一些菌种的生长。Telang 等人^[22]向厌氧油藏注入硝酸盐, 并用改进的 RSGP 方法监测其中微生物群落的变化, 结果发现硝酸盐注入后硫氧化菌和硝酸盐还原菌立即成为优势菌种, 这种富集效应能够持续 30 d, 而硫酸盐还原菌等其它菌种却没有得到明显加强, 这说明集中注入电子受体对厌氧油藏环境微生物群落影响显著, 而且营养物质注入后微生物的数量与丰度都有显著提高, 而且群落结构随时间推移发生变化。

综上所述, 油藏在开发之前是封闭系统, 属于高度还原性的环境; 而开发之后变为开放系统, 注入水将溶解氧不断带入地层, 使油藏环境不再是严格厌氧环境, 溶解氧浓度随地层深度增加逐步变小, 在注水井及近井地带形成一定范围的有氧环境, 而沿注水井向油藏深部至采油井的方向溶解氧含量迅速降低; 同时, 注入水中携带有数量巨大、种类繁多的微生物, 长期的水驱作业使许多菌种进入到油藏环境中, 经过长期驯化, 它们不仅适应了油藏极端环境, 而且与本原微生物相互作用构成了复杂的微生物群落, 彻底改变了油藏本原微生物群落以严格厌氧菌为主体的格局, 逐渐在注水井至采油井方向上, 形成了好氧菌、兼性厌氧菌和严格厌氧菌交替分布、互相补充的群落结构。油藏微生物群落演替规律的研究也是油藏微生物群落的基础认识, 最近人们提出, 研究演替规律有助于评价各种油藏微生物活动对提高原油采收率的贡献, 对于指导微生物采油现场应用具有借鉴意义。

3 油藏微生物群落功能

微生物群落研究面临的最大的挑战就是如何将微生物群落结构与其功能联系起来, 尽管各种分子分析方法从不同侧面提供了大量群落结构信息, 甚至试图详尽说明微生物的组成和数量, 但这些方法很难直接提供足够的群落功能信息, 有时反而不得不

借助纯培养方法或化学分析方法才能给出初步的群落功能信息。目前尚未见到系统的油藏微生物群落功能研究成果,只能从一些侧面进行了解。硫细菌群的代谢活动是造成油藏酸化、腐蚀井下设备和降低油品性质的主要原因,同时溢出的 H_2S 气体对采油工人的健康也带来威胁。厌氧油藏环境中硫酸盐还原菌能与厌氧菌、发酵菌及产乙酸菌结成共生关系,协同完成油藏环境中石油烃的厌氧降解,同时催化无机硫向硫酸根离子的转变,最终造成油品降低和油井酸化。其中硫酸盐还原菌的作用是利用烃、有机酸或者氢作为电子供体,将无机硫或硫化物还原为硫化氢,处于整个反应的起始阶段,设法抑制它们的生长繁殖,就能有效防止油井酸化现象。生产过程中应该防止向油井中添加硝酸盐,以免激活石油烃的厌氧降解降低油品性质同时产生硫化氢等有害物质。

产甲烷菌处于石油烃厌氧降解生物链的最末端,能够接受末端电子产生甲烷,可以解除生物链的末端抑制,在厌氧油藏环境碳元素循环中起着重要作用。Bonch 等人^[8]用同位素法检测了高温油层样品中产甲烷菌群的活性,发现利用氢产甲烷的速率超过 $80 \text{ nmol/L}\cdot\text{d}$ 。Nazina 等人^[16]用文库法结合纯培养研究了高温油藏中产甲烷菌群的活性,发现利用氢产甲烷的速率达到 $15.7 \mu\text{g CH}_4/\text{L}\cdot\text{d}$,而利用乙酸产甲烷的速率则高达 $1143 \mu\text{g CH}_4/\text{L}\cdot\text{d}$,但是没有分离到乙酸营养型产甲烷菌,说明油藏环境中乙酸不是由产甲烷菌降解的,而是由乙酸氧化共生菌系中的细菌消耗的,例如硫酸盐还原菌在硫酸盐不足的情况下就可以氧化乙酸和其它脂肪酸,并把电子传递给利用氢产甲烷菌,促进它们的生长,所以这种情况下利用氢产甲烷菌便成为优势菌。Grabowski 等人^[9]用 FISH 杂交法结合纯培养研究了甲烷生成条件下长链烃降解菌群的功能,发现主要是脂肪酸降解菌、利用氢或甲酸产甲烷菌和利用乙酸产甲烷菌这 3 类微生物组成了烃降解的共生菌系,用激光扫描共聚焦显微镜观察到它们围绕固相烃形成相互关系紧密的菌团,这种紧密关系使不同成员之间交换代谢产物变得非常方便。其中氢营养型和甲酸营养型产甲烷菌是主要的功能菌群,但也观察到乙酸营养型产甲烷菌的代谢活性,在混合培养菌群的指数生长初期有乙酸积累,然后很快就消耗了,说明乙酸营养型产甲烷菌生长较慢,但是激活之后就可以将

乙酸转化为甲烷,解除了乙酸的末端抑制,使石油烃厌氧降解反应能够持续不断地进行。

4 展望

目前,油藏微生物分子生态学研究工作较少,要全面评估油藏微生物的群落结构和功能,尚需探测更多不同地质和物性条件的油藏环境的微生物群落多样性,并注重多学科方法的交叉使用,包括地质学、地球化学、分析化学、油藏工程、微生物学的方法都应该充分运用,只有综合分析各项研究结果才能获得油藏原位微生物群落结构和功能的全貌。其中,分子分析方法克服了纯培养的缺陷,在微生物定性方面已经比较成熟,由此发现了很多新菌种,丰富了油藏微生物多样性的认识,但在菌种的定量研究方面仍然难以得到满意答案。可以尝试发挥 FISH 杂交和实时荧光定量 PCR 方法的定量研究功能来计算菌种数量,其中实时荧光定量 PCR 自动化程度高,特异性强能有效解决 PCR 污染问题,而且可以修正文库法等得到的菌种相对数量结果,例如,选择克隆数目多的序列类型设计菌种特异性引物,用实时荧光定量 PCR 进行准确定量,考察它们在原始样品中的含量。但目前尚未见到其应用于油藏微生物群落研究的报道,笔者认为这一方法是非常值得尝试的。

油藏微生物群落功能的研究主要是围绕油田生产实际展开的,硫细菌群的功能分析为防治油田开发中腐蚀问题提供了思路,而产甲烷混合菌群共代谢厌氧转化石油烃的研究也可能为残余油资源化利用等提供新途径。然而,独特的油藏微生物资源的应用潜力应该远远不只这些,目前亟待加强油藏微生物群落功能的研究。一方面,应该继续扩大分子分析方法在油藏微生物群落研究中的应用,比如尝试 RNA 方法,为推断原位的微生物代谢活性过程提供支持;可以构建常见的油藏微生物的基因芯片,快速检测它们的结构变化,测定其重要功能基因的表达,深入理解油藏微生物的活性状况。还可以通过群落基因组学分析微生物基因组序列与某些表达特征之间的关系,将特定功能与具有这种特定功能的微生物群落结构对应起来。另一方面,需要重新认识纯培养方法,将分子方法得到的研究成果应用到纯培养当中,缩短新种分离纯化的过程,获得更

多微生物生理生化性能参数,深入了解其形态、功能及生态作用等信息。随着分子分析方法的深入应用,以及纯培养与分子方法的逐步结合优化,相信人们对油藏微生物群落结构和功能的了解将更加透彻,使其创造的价值也越来越大。

参 考 文 献

- [1] 刘金峰, 牟伯中. 油藏极端环境中的微生物. 微生物学杂志, 2004, **24**(4): 31–34.
- [2] van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67**(4): 503–49.
- [3] Aitken CM, Jones DM, Larter SR. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature*, 2004, **431**(7006): 291–294.
- [4] Head IM, Jones DM, Larter SR. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, 2003, **426**(6964): 344–352.
- [5] Liu JF, Ma LJ, Mu BZ, *et al.* The field pilot of microbial enhanced oil recovery in a high temperature petroleum reservoir. *J Petrol Sci Eng*, 2005, **48**(8): 265–271.
- [6] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**(5): 495–508.
- [7] Greene EA, Voordouw G. Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *J Microbiol Methods*, 2003, **53**(2): 211–219.
- [8] Bonch-Osmolovskaya EA, Miroshnichenko ML, Lebedinsky AV, *et al.* Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(10): 6143–6151.
- [9] Grabowski A, Blanchet D, Jeanthon C. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Res Microbiol*, 2005, **156**(7): 814–821.
- [10] Li H, Yang SZ, Mu BZ, *et al.* Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oil field. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **60**(1): 74–84.
- [11] Orphan VJ, Goffredi SK, Delong EF, *et al.* Geochemical influence on diversity and microbial processes in high temperature oil reservoirs. *Geomicrobiol J*, 2003, **20**(4): 295–311.
- [12] Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2): 700–711.
- [13] Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, *et al.* Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **54**(3): 427–443.
- [14] Basso O, Lascourreges JF, Jarry M, *et al.* The effect of cleaning and disinfecting the sampling well on the microbial communities of deep subsurface water samples. *Environ Microbiol*, 2005, **7**(1): 13–21.
- [15] Li H, Yang SZ, Mu BZ, *et al.* Molecular analysis of the bacterial community in a continental high-temperature and water-flooded petroleum reservoir. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **257**(1): 92–98.
- [16] Nazina TN, Sokolova DSh, Shestakova NM, *et al.* The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the Dagang high-temperature oil field. *Microbiology*, 2005, **74**(3): 343–351.
- [17] Nazina TN, Shestakova NM, Grigoriyan AA, *et al.* Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P.R. China). *Microbiology*, 2006, **75**(1): 55–65.
- [18] Li H, Yang SZ, Mu BZ. Phylogenetic diversity and structure of the archaeal community in a continental high-temperature, water-flooded petroleum reservoir. *Current Microbiology*, 2007, **55**(5): 382–388.
- [19] 陈 平, 李 辉, 牟伯中. 油藏水样细菌群落 16S rRNA 基因的 RFLP 分析. 微生物学杂志, 2005, **25**(6): 1–5.
- [20] 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. 微生物学报, 2005, **45**(3): 329–334.
- [21] 袁三青, 薛燕芬, 高 鹏, 等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性. 微生物学报, 2007, **47**(2): 290–294.
- [22] Telang AJ, Ebert S, Foght JM, *et al.* Effect of nitrate on the microbial community in an oil field as monitored by reverse sample genome probing. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(5): 1785–1797.