

# 培养法和免培养法联合检测油藏环境 烃降解菌和产甲烷菌群多样性

李辉<sup>1</sup> 林匡飞<sup>1</sup> 牟伯中<sup>2\*</sup> 张卫<sup>1</sup> 顾继光<sup>3</sup> 李洋洋<sup>4</sup>

- (1. 华东理工大学资源与环境工程学院 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室 上海 200237)
- (2. 华东理工大学应用化学研究所 生物反应器国家重点实验室 上海 200237)
- (3. 暨南大学生命科学技术学院 广东 广州 510632)
- (4. 上海化工研究院 上海 200062)

**摘要:** 烃降解菌和产甲烷菌是油藏环境微生物生态系统中重要的功能菌群, 采用 DGGE 和 FISH 方法分析了不同油藏样品中两类菌群的多样性和产甲烷活性。DGGE 结果表明, 不同水样的 *alkB* 基因多样性相差较大, 而且注水井条带明显多于采油井。FISH 结果表明, 油藏水样中产甲烷菌含量明显高于烃降解菌, 且两者空间分布的位置较近; 说明油藏环境中烃降解菌和产甲烷菌结成一定的相互关系。富集培养表明, 胜利油田产出液接种物培养 130 d 后, 石油烃降解率达到 50% 以上, 产甲烷的最大速率达到  $1.57 \times 10^{-2}$  mmol/(L·d)。利用分子生物学方法分析油藏环境功能菌群的多样性, 可以为开展微生物采油技术的应用提供有用信息。

**关键词:** 油藏, 分子生态, 微生物多样性, DGGE 指纹图谱, FISH 杂交

## Culture-dependent and culture-independent characterization of alkane-degrading bacteria and methanogens consortium diversity associated with petroleum reservoir

LI Hui<sup>1</sup> LIN Kuang-Fei<sup>1</sup> MU Bo-Zhong<sup>2\*</sup> ZHANG Wei<sup>1</sup> GU Ji-Guang<sup>3</sup>  
LI Yang-Yang<sup>4</sup>

- (1. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)
- (2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Applied Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)
- (3. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)
- (4. Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 50744016, 40871223, 40901148, 41003031); 中国博士后科学基金特别资助项目(No. 200902223); 水体污染控制与治理科技重大专项项目(No. 2009ZX07101-009-03); 国家 863 计划项目(No. 2007AA06Z331); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(No. WB0911011, WB1014004)

\* 通讯作者: Tel: 86-21-64252063; ✉: bzmu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2010-06-18; 接受日期: 2010-11-09

**Abstract:** The alkane-degrading bacterium and methanogenic were the important functional populations in oil reservoirs and their diversities were investigated by FISH and DGGE, respectively. The DGGE profiles showed great difference between the *alkB* genes in samples. And the major bands detected in injection wells were obviously more than them in production wells. The FISH results indicated that the quantity of archaea was much more than bacteria in the samples and they had close spatial distribution *in situ*. The results indicated that alkane-degrading bacterium and methanogenic populations were diverse in oil reservoirs and formed compact aggregates *in situ*. The incubation of Shengli oilfield production water degraded more than 50% residual oil during 130 d culture, with the production rate of methane reaching up to  $1.57 \times 10^{-2}$  mmol/(L·d). Molecular analysis of the functional populations of microbial community in oilfield will provide the information for better application of microbial enhanced oil recovery.

**Keywords:** Petroleum reservoir, Molecular ecology, Microbial diversity, DGGE, FISH

油藏环境极端的理化因子对其中的微生物构成了独特的筛选条件。经过长期驯化,许多菌种不仅完全适应了油藏极端环境,而且相互作用构成了复杂的微生物群落,形成了特有的微生物资源和基因资源。人们已经运用分子生物学方法和纯培养方法分析了油藏微生物群落结构,初步了解了油藏微生物的多样性<sup>[1-3]</sup>。但当前油藏微生物群落研究面临的最大问题是群落功能分析,即如何识别功能菌群,如何分析功能菌群和协同菌群的相互关系,以及如何将微生物群落结构研究与其功能研究相结合。目前,国际上尚无系统的油藏微生物群落功能认识,只有一些零星报道,例如 Grabowski 等人<sup>[4]</sup>用 FISH 杂交方法研究了加拿大西部油藏水样中的产甲烷共生菌团,发现其中烃降解菌和产甲烷菌围绕固态烃底物形成一定的相互关系,推测可能是该油藏环境中两种功能菌群之间主要的生态关系。

烷烃是原油的主要成分,也是油藏生态系统碳素循环中的主要成分,烃降解菌是石油烃的最初分解者,它的代谢产物为其他菌的生长繁殖提供了丰富多样的营养底物,因此烃降解菌是油藏环境微生物生态系统中重要的功能菌群。目前,已经分离了很多烃降解菌<sup>[5-6]</sup>,并且研究了烷烃降解途径及其基因调控机制,发现烷烃羟化酶系(Alkane hydroxylase system),其中烷烃羟化酶是非铁红素的膜整合蛋白<sup>[7]</sup>,负责催化烷烃生物氧化途径的第一步

氧化反应,决定了烷烃降解的动力学性质<sup>[8]</sup>。研究发现,原油污染环境中许多微生物都携带了与 *alkB* 相似的基因类型<sup>[5,9-10]</sup>,说明这一基因可能在烃降解微生物中普遍存在,因此 *alkB* 可以用作分子标记研究油藏环境中烷烃降解菌的多样性。

产甲烷菌也是油藏环境中的一类重要功能菌群,它们能接受末端电子产生甲烷,解除生物链的末端抑制,对石油烃的降解意义重大,尤其在油藏深部厌氧环境中的碳元素循环中起重要作用,识别产甲烷菌群将会在油藏微生物群落功能研究中发挥重要作用。迄今为止发现的油藏环境产甲烷菌绝大部分都是利用氢产甲烷菌<sup>[11-14]</sup>,这些菌自身不能降解石油烃,必须依靠烃降解菌先将石油烃分解为小分子有机酸才能加以利用。因此,油藏环境中石油烃降解产生甲烷的过程需要烃降解菌和产甲烷菌等功能菌群协同配合,形成一定的互利共生关系,这种共生关系也是石油烃降解的关键因素。

本文运用 DGGE 指纹图谱法分析了不同油藏环境中的烷烃羟化酶基因片段(*alkB*)多样性,试图通过分析功能基因的表达情况说明烃降解功能菌群的生长情况,推测其环境适应性。同时,用 FISH 杂交法检测了油藏水样中的烃降解菌和产甲烷菌分布情况,并考察了富集培养条件下的降解原油产甲烷速率,从而对油藏环境烃降解菌和产甲烷菌群结构和功能进行了初步探索。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 油藏水样:** 用无菌瓶在井头管线采集产出液油水混合物, 装满样品后立即密封瓶口以防止污染, 立即送往实验室, 4 °C 保存。水样分别采自 4 个目标区块: (1) 华北油田 816 区块注水井返排水, 水样外观清澈透明, 命名为华北水样(Huabei); (2) 华北油田巴 19 断块油井产出液, 外观浑浊含有石油, 命名为巴水样(Ba); (3) 胜利油田孤 1-6 区块注水井返排水, 水样黄色浑浊, 命名为孤水样(Gu); (4) 胜利油田 7N11 区块油井产出液, 外观浑浊含油 10%, 命名为 N 水样(N), 采样日期分别为 2007 年 8 月和 9 月。

**1.1.2 试剂和仪器:** DNA 提取和纯化试剂盒购自 V-gene 公司; PCR 试剂购自 Promega 公司; 引物和探针由 Invitrogen 公司合成并标记荧光素; GelRed 染色剂购自 Biotium 公司; 其他化学试剂购自上海医药集团化学试剂公司。PCR 扩增仪购自 MJ 公司; DGGE 电泳系统购自 Bio-Rad 公司; 荧光显微镜 (BX51T-32P01-FLB3) 购自 Olympus 公司。

### 1.2 样品预处理和 DNA 提取

样品在无菌条件下 70 °C 温浴 30 min, 加 30% 的无水乙醇和石油醚/正己烷/吐温(10:10:1, V/V/V) 混合液充分摇匀, 静置使油相和水相分层, 抽取下层水样, 取 2 支无菌离心管, 各装 40 mL, 15 000×g 离心 10 min, 弃上清; 再加 40 mL 水样离心, 如此用同样 2 支离心管反复操作离心步骤; 获得足量的菌体沉淀后用 75%酒精清洗离心管底部; 将洗涤液转入无菌 EP 管中, 15 000×g 离心 10 min, 弃上清, 收集微生物细胞。按照试剂盒说明提取 DNA。

### 1.3 烷烃羟化酶基因(*alkB*)扩增引物设计

从核酸数据库下载 *Pseudomonas putida* (CAB51047)、*Pseudomonas oleovorans* GPol (P12691)、*Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (AAY92207)、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CAB08323)、*Acinetobacter* sp. ADP1 (AJ002316)、*Pseudomonas marginata* PA01 (AAG04914)、*Rhodococcus erythropolis* (CAB51053)和 *Nocardioides* sp. JS614 (NC008699)等 8 株菌的羟化酶序列, 采用 ClustalW

算法对这些序列进行比对寻找保守区域, 根据保守区氨基酸序列对应的碱基组成设计简并引物<sup>[15-16]</sup>, 并在反向引物 5'端添加 GC 夹子, 得到 *alkB* 基因 PCR-DGGE 分析的引物序列, 正向序列: D-*alkF* (5'-GCTCAYGARCTRGGTCACAAG-3'), 反向序列: D-*alkR* (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGGCGRTGRTGRTCYGARTG-3')。预期目标片段的 PCR 产物长度为 600 bp 左右。

### 1.4 *alkB* 基因扩增和产物纯化

用上述引物, 从水样基因组总 DNA 中扩增 *alkB* 基因, 扩增条件参见刘晔等<sup>[16]</sup>的方法。扩增产物用添加 7 mol/L 尿素的聚丙烯酰胺凝胶电泳去除 PCR 产物中的单链 DNA, 凝胶浓度为 8%, 160 V 电泳 1 h, 电泳结束后将凝胶染色并在紫外灯下观察, 用手术刀将跑在前面的双链 DNA 割下, 转移至新的 EP 管中, 将胶条捣碎, 加入 100 μL 洗脱液, 4 °C 浸泡 16 h, 10 000×g 离心 10 min, 取上清, 真空干燥至 20 μL 用于 DGGE 分析<sup>[17]</sup>。

### 1.5 *alkB* 基因的 DGGE 分析

用 DGGE 系统对 *alkB* 基因多样性进行分析, DGGE 胶浓度为 8%丙烯酰胺/双丙烯酰胺(37.5:1), 变性剂浓度梯度为 40%-70%, 电泳缓冲液用 TAE 系统, 温度恒定 60 °C, 电压 200 V, 时间 5 h。电泳结束后, 用 GelRed 进行染色, UV 成像获得 *alkB* 基因的 DGGE 电泳照片。用 Dice 相似性系数<sup>[18]</sup>比较 DGGE 指纹图谱之间的相似性。Cs=2j/(a+b)×100, 其中 a 是第 1 组指纹图谱条的条带数目, b 是第 2 组指纹图谱的条带数目, j 是两个图谱中共有的条带数目。

### 1.6 特征条带的克隆、测序和序列分析

用手术刀片将 DGGE 胶中的特征条带割下, 置于 1.5 mL 的 EP 管中, 将胶条捣碎, 加入 50 μL TE 缓冲液, 4 °C 保温 16 h, 1 000×g 离心 1 min, 取 2 μL 上清液作为模板进行 PCR 扩增, 引物用 G-*alkF* (5'-GCTCAYGARCTRGGTCACAAG-3'), 反向序列 G-*alkR* (5'-GCRTGRTGRTCYGARTG-3'), 反应条件同上。PCR 产物割胶回收后用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化(V-gene), 产物浓缩后检测 DNA 浓度,

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

按适当比例与克隆载体 pUCm-T 混匀, 在 T4 连接酶作用下于 6 °C 连接 18 h。吸取连接产物, 转化 *E. coli* 感受态细胞 DH 5 $\alpha$  菌株。挑取阳性克隆进行测序, 序列提交 GenBank 进行分析。

### 1.7 荧光原位杂交(FISH)

离心收集样品中的细胞, 立即用 4% 多聚甲醛溶液固定, 用 PBS 缓冲液洗涤再用 100% 乙醇脱水; 移取处理后的样品 1  $\mu$ L, 均匀涂布在带小圆孔的载玻片上, 室温风干。多级乙醇脱水后, 采用 CY3 (红色) 标记的 Met 探针和 FAM'5 (绿色) 标记的 Hyr 探针, 分别与产甲烷菌和烃降解菌进行原位杂交, 其序列见表 1, 杂交温度为 46 °C, 杂交甲酰胺浓度分别为 25% 和 35%。用清洗液对样品清洗 20 min, 洗去没有杂交的、以及非特异性杂交的探针; 在荧光显微镜上观察成像。

表 1 FISH 杂交探针序列  
Table 1 The probes of FISH

目标菌种 Objective species	FISH 探针 FISH probe	序列 Sequence (5'→3')
产甲烷菌 Methanogens	Met <sup>[19]</sup>	GGCCACGGTGCAC CGTTGTCG
烃降解菌 Hydrocarbon- degrading bacteria	Hyr <sup>[20]</sup>	AGTTAGCCGGTGCTT CCT

### 1.8 石油烃降解产甲烷

石油烃降解过程采用胜利油田产出液作为接种物, 以胜利油田原油作为唯一碳源, 培养基组成: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g; NaHPO<sub>4</sub> 14.34 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.44 g; NaCl 0.5 g; MgSO<sub>4</sub> 0.24 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 14.7 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.01 mg; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.15 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.2 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.4 mg; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.49 mg; 调节 pH 7.0, 加去离子水定容至 1 000 mL。培养基用亨盖特除氧装置除氧, 分装至 250 mL 血清瓶中, 每瓶 100 mL, 1 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min 后, 接种胜利油田产出液菌种。37 °C 培养 130 d, 取 30 mL 培养液, 等体积的正己烷萃取 3 次, 萃取液浓缩后经 GC/MS 检测烃的降解效果。GC/MS 分析采用岛津气相色谱-质谱联用仪 (Shimadzu, GCMS-QP2010), 色谱柱为 DB-5ms (30 m $\times$  0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m, J&W Scientific), 载气为高纯氮

气, 柱流速 1.0 mL/min, 气化温度 280 °C, 进样量 1  $\mu$ L, 无分流高压进样 (250 MPa, 1 min), 隔垫吹扫 3 mL/min; 升温程序: 柱温 50 °C 维持 0.5 min, 以 10 °C/min 升温至 100 °C, 维持 1 min, 以 5 °C/min 升至 200 °C, 维持 5 min, 以 2 °C/min 升至 300 °C, 维持 5 min; 接口温度 300 °C, 溶剂切割时间 2.5 min, 灯丝点燃时间 6 min, 离子轰击 (EI), 检测器电压 1.2 kV, 离子源温度 250 °C。在培养过程中, 通过顶空进样和气相色谱法联用检测产生的气体组成。每次测量时从培养瓶顶空抽取 200  $\mu$ L 气体进样。采用 GC112A 气相色谱仪, 色谱柱为 5 Å 分子筛, 内径 4 mm; 载气 N<sub>2</sub>, 体积流量 1.5 mL/min; 用氢火焰检测器 (FID) 检测甲烷含量, 用热导池检测器 (TCD) 检测氢气含量; 进样口温度 200 °C; 检测器温度 200 °C; 升温程序: 50 °C 保持 5 min, 15 °C/min 升至 200 °C, 稳定 15 min。

## 2 结果

### 2.1 *alkB* 基因的 DGGE 指纹图谱分析

对 4 个油藏水样进行了 DNA 提取, 经过 PCR 扩增、产物纯化和 DGGE 分析, 得到各样品中 *alkB* 基因多样性的 DGGE 指纹图谱图 1。如图 1 所示, 4 个泳道中清晰可见的 DNA 条带分别达到 9、8、6 和 7 条, 说明油藏环境中 *alkB* 基因多样性比较丰富, 而且 1、2 和 4 号水样中 *alkB* 基因多样性比 3 号的更为丰富, 其中 H1 条带是 4 个样本共有的, 特征片段克隆测序表明, 该序列与菌株 *Acidisphaera* sp. C197 携带的 *alkB* 基因片段 (AY817739) 亲缘关系最近, 相似性为 81%, 该菌株分离自黄石公园彩虹泉附近富含烃的酸性土壤中, 具有烃降解功能<sup>[21]</sup>。

根据图谱相似性分析, 可以将 4 个样品分为 2 组, 样品 1 和样品 2 分为第 1 组, 相似性为 59%, 其共有条带数目为 5; 样品 3 和样品 4 分为第 2 组, 相似性为 71%, 其共有条带数目也为 5。每组内 2 个样本的相似性较高, 但是两组之间的相似性较低。样品 1 中有 4 个条带亮度较高, 是主要条带。其中 H1 和 H4 是最亮的 (图 1), 是该环境中 *alkB* 基因的主要类型。H4 条带对应的特征片段克隆测序表明, 该序

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

列与菌株 *Marinobacter aquaeolei* VT8 携带的 *alkB* 基因片段(CP000514)亲缘关系最近, 相似性为 82%, 该菌株是很常见的水生菌, 是烃降解共生菌系中的一员<sup>[22-24]</sup>。样品 2 和样品 3 的条带亮度都比较均匀, 说明几种 *alkB* 基因在这两个样品中的丰度比较接近。样品 4 中 N6 和 N8 条带亮度最高(图 1), 而且 N8 条带在样品 3 中也有清晰的对应条带, 特征片段克隆测序表明, 两个序列都与菌株 *Marinobacter aquaeolei* VT8 携带的 *alkB* 基因片段(CP000514)亲缘关系最近, 相似性分别为 83.5%和 83.9%。

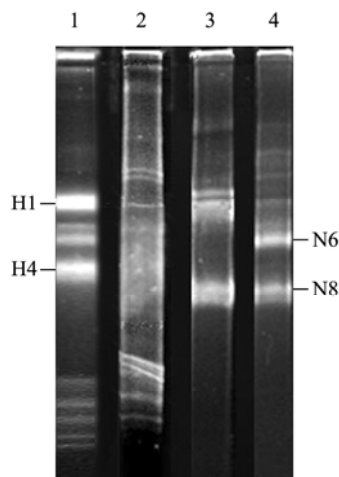


图 1 不同样品中 *alkB* 基因多样性的 DGGE 分析  
Fig. 1 DGGE analysis of *alkB* gene fragments amplified from different samples  
Note: 1: Huabei sample; 2: Gu sample; 3: Ba sample; 4: 7N sample.

## 2.2 产甲烷古菌和烃降解菌的 FISH 杂交分析

用 FISH 杂交方法分析了烃降解菌和产甲烷菌的种群数量和空间分布情况, 结果如图 2 所示, 箭头所指绿色球菌代表烃降解菌, 红色球菌代表产甲烷菌。从荧光强度分析, 产甲烷菌的数量高于烃降解菌; 从空间分布分析, 图 A 和图 B 显示这两类菌所处的位置较近, 形成关系紧密的菌团, 菌团内部没有明显的分层结构, 而图 C 显示产甲烷菌随机分布在烃降解菌周围。

## 2.3 石油烃降解产甲烷

本研究以胜利油田产出液为接种物, 其中携带有油藏储层中的混合微生物菌群, 培养结果表明培养 130 d 后石油烃降解效果明显(图 3), 各组分丰度

均大幅下降, 其中正构烷烃的生物降解量最大。但仍有个别组分残留, 其原因可能是大分子烃类生物降解后代谢产生的一些短链小分子有机物, 抵消了原有组分的降解部分。降解过程中, 谱图右侧的基线有缓慢抬升的趋势, 可能是降解过程中异构烷烃的量增加, 出峰时间也比较接近, 造成了混合出峰, 将基线抬高。比较降解前后石油烃组分的丰度变化表明, 培养体系中石油烃的总转化率达到 50%以上。

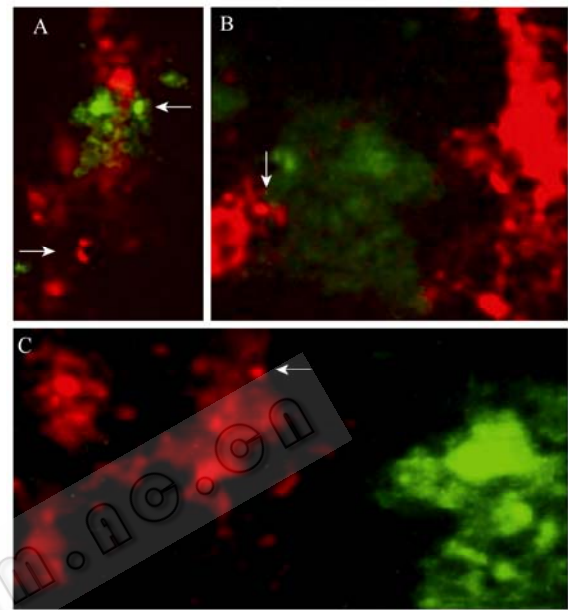


图 2 油藏水样中产甲烷菌与烃降解菌的空间分布  
Fig. 2 Spacial distribution of methanogen and hydrocarbon-degrading bacteria in the water sample from oil reservoir

Note: Arrows indicate Methanogen-like cells (red) and hydrocarbon degrading-like cells (green); Photographs are overlays of several confocal microscopic images; Magnification times ( $\times 1\ 000$ ).

胜利油田油藏水样 37 °C 下培养, 不同时间采用顶空进样法获得气体样品 0.2 mL, 用气相色谱法分析各组分的浓度。如图 4 所示, 在培养过程中, 前 30 d 是启动期, 在培养体系中有大量氢气产生, 此后氢气的不断消耗, 甲烷则迅速增加。在培养两周左右, 氢气产量达到最高值, 体系中氢气分压为  $2.78 \times 10^{-2}$  atm。培养 60 d 后氢气含量维持在较低水平, 体系中氢气分压为  $2.20 \times 10^{-4}$ – $2.11 \times 10^{-5}$  atm。而甲烷产量逐步升高, 培养前 60 d 甲烷产量缓慢增加, 培养 60–95 d 甲烷产量快速增加, 产甲烷的最大

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

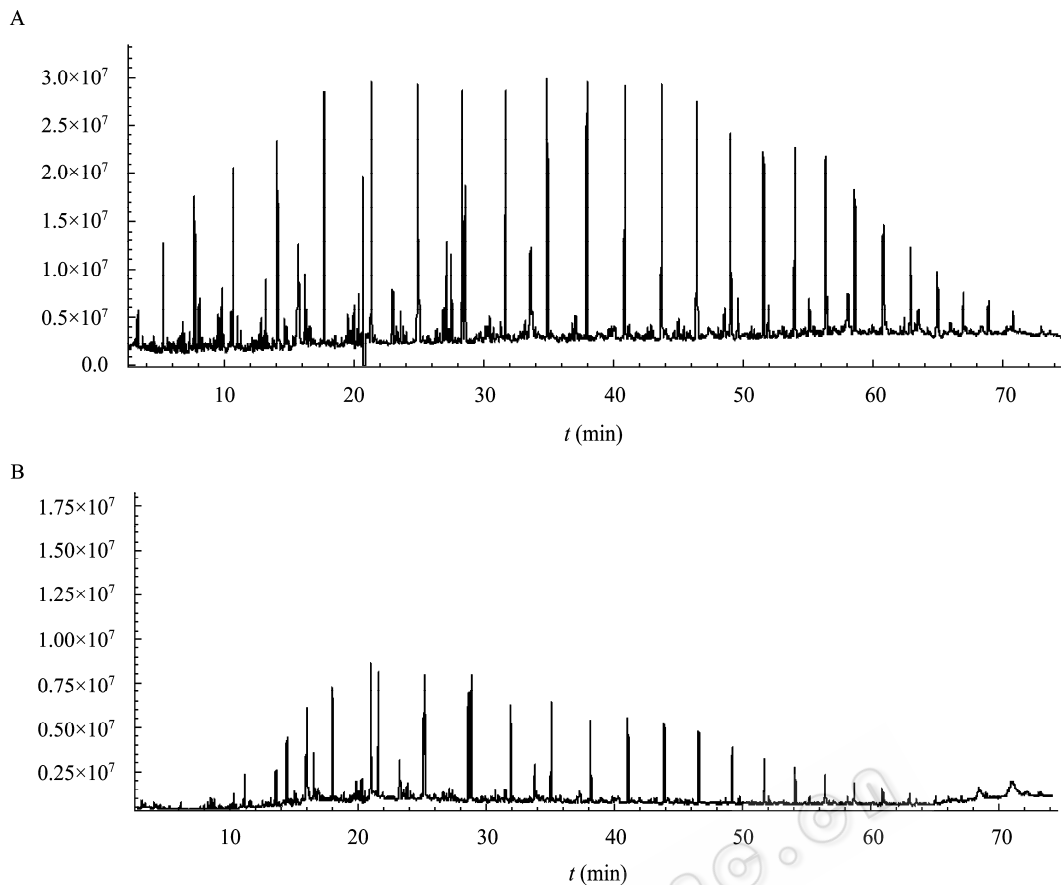


图3 石油烃各组分丰度变化的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion current chromatogram of the different component of petroleum hydrocarbon

Note: A: The oil composition in original medium; B: The residual oil composition in the culture broth after 130 d.

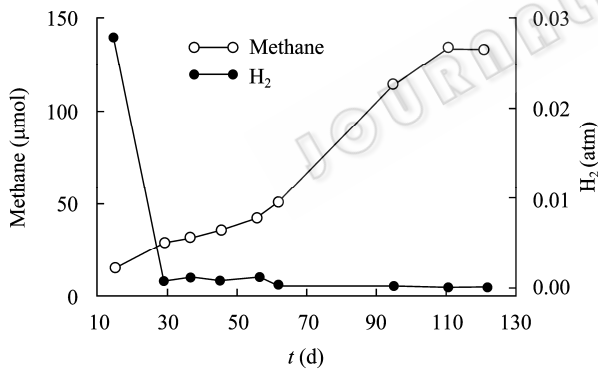


图4 胜利油田产出液培养物的甲烷和氢气产量

Fig. 4 The production of methane and hydrogen during the culture of the oil reservoir water sample from Shengli oilfield

Note: White dot: Production of methane; Black dot: Production of hydrogen.

速率达到  $1.57 \times 10^{-2}$  mmol/(L·d)。培养 95–110 d 甲烷产生速率有所下降, 培养 110 d 以后甲烷产生转入停滞期, 该现象符合有机物的共生降解规律。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

### 3 讨论

油藏环境富含石油烃, 为烃降解菌的生长提供了丰富的碳源, 研究表明烃降解菌是油藏微生物群落的重要组成部分, 其菌种多样性已经从纯培养和分子生物学分析的角度进行了很多研究, 但本文从其重要的功能基因 *alkB* 着手, 设计合适的引物, 用 PCR-DGGE 指纹图谱法分析了基因多态性, 从而说明烃降解功能菌群的多样性, 具有一定新意。从功能基因多样性的角度来说明功能菌群的多样性是比较有效的, 本文建立的 *alkB* 基因 PCR-DGGE 分析方法不仅可以分析环境样本中 *alkB* 基因的多样性, 还可以用来快速评价其中的烃降解菌多样性, 研究结果对直接从环境中克隆多样的 *alkB* 基因具有一定参考价值。DGGE 图谱显示只有少量的 *alkB* 基因是所

有样本共同的, 表明 *alkB* 基因具有丰富的多样性, 也说明油藏环境中具有丰富多样的烃降解功能菌。样品 1、2 的功能菌群结构整体比样品 3、4 的更为复杂, 可能是因为前者采自注水井, 而后者采自产出井, 说明一部分烃降解菌随着水驱过程, 在地层中从注水井向采油井运移中无法适应油藏环境条件而休眠或者消亡了。而恰恰相反的是还有一些菌种的丰度却得到了加强, 其中 N6 和 N8 条带的亮度就明显增强了, 说明这些菌株可能在油藏环境中生长繁殖状况良好。

油藏环境中烃的彻底降解至少需要两种功能菌群相互配合才能完成, 首先由烃降解菌将烃类分解成乙酸等小分子有机酸, 再由产甲烷菌等将小分子彻底降解产生甲烷, 而这两种过程必须紧密结合, 才能保证整个烃降解反应的顺利进行。因此产甲烷菌和烃降解菌在环境中往往形成紧密的共生关系。本文用 FISH 杂交方法检测了两种菌群的原位空间分布情况, 避免了纯培养的限制和基因操作等带来的误差, 比较客观的反映了菌群的空间分布情况。结果表明, 产甲烷菌和烃降解菌形成了一定的相互关系, 与 Grabowski、Sekiguchi 等人<sup>[4,25]</sup>观察的结果相一致, 推测其原因可能是这种空间位置上的相互接近有助于不同成员之间相互交换代谢产物。因为通常烃降解菌是附着在固态烃颗粒表面的, 它们利用烃代谢产生乙酸等小分子物质, 而产甲烷菌围绕在烃降解菌周围就可以方便地摄取到小分子有机酸, 有利于其自身的生长和繁殖, 同时也为烃降解菌解除了产物抑制, 从而使两种功能菌群形成了良好的共生关系。

#### 4 结论与展望

本文运用分子生物学分析和纯培养方法相结合研究了油藏水样中两种功能菌群的多样性和空间分布, 从一定程度上说明了油藏微生物群落功能, 首次运用 *alkB* 基因的 DGGE 指纹图谱法分析了油藏环境烃降解功能菌群的多样性, 探索了油藏极端环境微生物资源和基因资源, 对微生物采油和油藏微生物资源化利用方面具有一定的应用价值。另外, 通

过 FISH 杂交方法, 分析了烃降解菌和产甲烷菌的空间分布和位置关系, 可以为在细胞水平上识别油藏功能菌群的相互关系以及分离和纯化功能菌种提供支持。但本文也只是从一个侧面揭示了油藏微生物群落功能的复杂性, 有必要进一步结合多学科交叉的方法系统研究各菌群的分布、功能和生态意义。

#### 参考文献

- [1] 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[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 60(1): 74–84.
- [2] Li H, Yang SZ, Mu BZ, 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.
- [3] Magot M, Ollivier B, Patel BKC. Microbiology of petroleum reservoirs[J]. Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol, 2000, 77(2): 103–116.
- [4] Grabowski A, Blanchet D, Jeanthon C. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir[J]. Res Microbiol, 2005, 156(7): 814–821.
- [5] Smits THM, Balada SB, Witholt B, et al. Functional analysis of alkane hydroxylase from gram-negative and gram-positive bacteria[J]. J Bacteriol, 2002, 184(6): 1733–1742.
- [6] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* POA1, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(6799): 959–964.
- [7] Staijen IE, Van Beilen JB, Witholt B. Expression, stability and performance of the three component alkane monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans* in *Escherichia coli*[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(7): 1957–1965.
- [8] Ayala M, Torres E. Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective[J]. Appl Catalysis A: General, 2004, 272(1/2): 1–13.
- [9] Kok M, Oldenhuis R, van der Linden MP, et al. The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene, sequence and expression[J]. J Biol Chem, 1989, 264(10): 5435–5441.
- [10] Sotsky JB, Greer CW, Atlas RM. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments[J]. Can J Microbiol, 1994, 40(11): 981–985.
- [11] Bonch-Osmolovskaya EA, Miroshnichenko ML, Lebedinsky AV, et al. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic micro-

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- bial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 6143–6151.
- [12] Nilsen RK, Torsvik T. *Methanococcus thermolithotrophicus* isolated from North Sea oil field reservoir water[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 728–731.
- [13] Head IM, Jones DM, Larter SR. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil[J]. *Nature*, 2003, 426(6964): 344–352.
- [14] Aitken CM, Jones DM, Larter SR, et al. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs[J]. *Nature*, 2004(431): 291–294.
- [15] Smits THM, Röthlisberger M, Witholt B, et al. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in gram-negative and gram-positive strains[J]. *Environ Microbiol*, 1999, 1(4): 307–317.
- [16] 刘晔, 李辉, 牟伯中, 等. 长链烷烃降解菌 *alkB* 片段的分离和鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(4): 562–565.
- [17] Zhang XL, Yan X, Gao PP, et al. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 60(1): 1–11.
- [18] Dice LR. Measure of the amount of ecologic associations between species[J]. *J Ecology*, 1945, 26(3): 297–302.
- [19] Rocheleau S, Greer CW, Lawrence JR, et al. Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent in situ hybridization and confocal scanning laser microscopy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5): 2222–2229.
- [20] Loy A, Lehner A, Lee N, et al. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(10): 5064–5081.
- [21] Hamamura N, Olson SH, Ward DM, et al. Diversity and functional analysis of bacterial communities associated with natural hydrocarbon seeps in acidic soils at Rainbow Springs, Yellowstone National Park[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 5943–5950.
- [22] Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42(4): 568–576.
- [23] huu NB, Denner EBM, Ha DTC, et al. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(Pt 2): 367–375.
- [24] Márquez MC, Ventosa A. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(Pt 3): 1349–1351.
- [25] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, et al. *Syntrophothermus lipocalidus*, gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 2000, 50(Pt 2): 771–779.

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教學类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教學栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学领域的教师提供一个发表論文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的論文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教學理念贯穿到教學之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师名课”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教學名师、知名科学家就教學和学生培养发表观点,推荐在教學改革、教學研究、引进先进教學手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀論文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和學習的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>