

# 大港孔店油田水驱油藏微生物群落的分子分析

余跃惠<sup>1,2,\*</sup> 张学礼<sup>1,\*</sup> 张 凡<sup>1,2</sup> 王凌华<sup>1</sup> 赵立平<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)(<sup>2</sup>长江大学化学与环境工程学院 荆州 434023)

**摘 要** 通过多聚酶链式反应-温度梯度凝胶电泳(PCR-TGGE)和构建 16S rRNA 基因克隆文库两种方法对比研究了大港油田孔二北断块注水井和采油井的微生物群落结构。16S rDNA V3 区 PCR 扩增产物的 TGGE 图谱分析表明,这两个油井的微生物群落结构差异很大。注水井样品的 TGGE 图谱中有 6 条主要条带,而采油井样品中只有一个条带占绝对优势。同时,建立了两个样品的 16S rRNA 基因克隆文库,从中分别挑选了 108 和 50 个克隆进行限制性酶切片长度多样性分析(ARDRA)。注水井样品有 33 个操作分类单元(OTU),其中 6 个 OTU 是优势类型,而采油井样品只有 8 个 OTU,有 1 个 OTU 在文库中占绝对优势。克隆文库和 TGGE 的研究结果一致,均表明注水井样品的生物多样性比采油井丰富很多。每个 OTU 的代表克隆序列分析结果表明,注水井样品中的细菌主要属于  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  变形菌纲和放线菌纲,尤其是红细菌亚纲(47%)。采油井样品的细菌主要属于  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  变形菌纲,尤其是假单胞菌属(62%)。油藏微生物多样性的分子分析可为开展微生物采油技术研究奠定基础。

**关键词** 油藏,16S rRNA 基因,TGGE,克隆文库,微生物群落,多样性

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0329-06

微生物能通过自身的有益活动及其代谢产物提高原油采收率(Microbial enhanced oil recovery, MEOR)。该技术与其他采油技术(热驱,化学驱,气驱)相比,具有适用范围广、工艺简单、投资少、见效快、多功能、无污染等优点,是目前最具发展前景的一项采油技术<sup>[1]</sup>。油藏中微生物的研究越来越受到科学家们的重视。经过过去几十年对油藏微生物的研究,已从油藏中分离出硫酸盐还原菌、产硫化物菌、硫氧化细菌、发酵细菌、锰和铁还原菌、产甲烷菌和产乙酸盐菌,以及烃氧化菌、腐生菌、产多糖菌、产生生物表面活性剂菌等<sup>2-6]</sup>。

传统的分离培养方法只能反映特定生态系统中一小部分微生物多样性的信息<sup>[7]</sup>。分子生物学方法,尤其是基于 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和探针杂交技术,能使我们更准确全面地认识特定生态系统中的微生物种群多样性<sup>[7]</sup>。已有的基于分子研究的报道表明,油藏中的主要微生物是硫酸盐还原菌、发酵菌和硫氧化细菌<sup>[5,8]</sup>。但由于目前在分子水平上对油藏微生物系统的研究较少,我们对该系统中微生物的群落结构及其代谢功能的了解还很少。

本文主要通过温度梯度凝胶电泳(TGGE)和构

建 16S rRNA 基因克隆文库两种分子方法,对比研究了大港油田孔二北断块注水井和采油井的微生物群落结构,为以后详细研究油藏生态系统中微生物种群组成及各自的代谢活性奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 油藏微生物样品** 用无菌瓶分别取自大港孔店油田孔二北断块的注水井(1098-8)和采油井(1017-7)。样品采集后 5h 内带回实验室处理。注水井样品为在注水井井口取样口取返排水的第 8 立方米和第 25 立方米的水样;采油井样品在井口采油树取样。该区块已注水二十多年,流体性质稳定,其中代表性采油井(1017-7)所在油藏的地质环境为,温度 60℃(深度 1300~1400m),矿化度 5500mg/L, pH 7.0、压力 7~9MPa、注水开发时间为 1979 年初、未使用杀菌剂、采样前未进行过增产措施处理。

**1.1.2 试剂和仪器** DNA 提取采用 Q·Bio gene 公司的 FastDNA SPIN Kit (BIO 101 Systems)试剂盒;PCR 试剂购自 Promega 公司;硝酸银购自 SIGMA 公司;其他化学试剂购自上海医药(集团)化学试剂公司。

\* 通讯作者。Tel 86-21-54743351;Fax 86-21-54744263;E-mail:lpzhao@sjtu.edu.cn

\*\* 两位作者对本文具有同等贡献

作者简介:余跃惠(1965-)男,副研究员,主要研究方向为微生物采油技术,Tel/Fax 86-10-62552493;E-mail:shyuehui@263.net;

张学礼(1981-)男,江苏靖江人,博士研究生,研究方向为环境微生物分子生态学,E-mail:xlzhang@sjtu.edu.cn

收稿日期 2004-10-13,修回日期 2005-02-23

PCR 扩增仪购自英国 Hybaid 公司(PCR Express);琼脂糖凝胶电泳仪、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪和电击转化仪均购自美国 BIO-RAD 公司;温度梯度凝胶电泳仪购自德国 BIOMETRA 公司(mini-system)。

## 1.2 样品预处理和 DNA 提取

样品在无菌条件下以 90mg/L 的聚合铝处理清除原油。高速离心(20000r/min, 30min)后收集沉淀。取 50mg 沉淀至一无菌 1.5mL 离心管中,加入 200 $\mu$ L 无菌 PBS 缓冲液(8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)和 20 $\mu$ L 氯仿,悬浮均匀。按照试剂盒说明提取 DNA。

## 1.3 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 扩增及温度梯度凝胶电泳(TGGE)分析

利用细菌通用引物 P2/P3<sup>[9]</sup>对两口井样品进行 16S rRNA 基因的 V3 区扩增。PCR 扩增体系及程序参见 Muyzer 等<sup>[9]</sup>的方法。扩增产物再经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Denatured polyacrylamide gel electrophoresis, d-PAGE)纯化以消除第一次 PCR 过程中的单链 DNA 和杂合双链 DNA 污染<sup>[10]</sup>。所得 PCR 产物先用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,再通过温度梯度为 35~50℃ 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶分析,其中尿素 8mol/L,甲酰胺 20%,电泳缓冲液为 Na-TAE(pH 8.4)。电泳结束后用硝酸银染色法染色。

用 Scion Image 程序(<http://www.scioncorp.com>)计算出 TGGE 图谱中各条带的强度,并计算出各个条带强度在图谱所有条带强度中的比例<sup>[10]</sup>。根据 TGGE 图谱中的条带数目和每个条带的相对强度,计算出 Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )<sup>[11]</sup>。计算公式为  $H' = -\sum p_i \ln p_i$  ( $p_i = n_i/N$ ),其中  $n_i$  为单个条带的强度, $N$  为所有条带的强度。

## 1.4 两口井样品 16S rRNA 基因克隆文库的构建

利用细菌通用引物 P0/P6<sup>[12]</sup>引物对两口井样品进行 16S rRNA 基因的全长扩增。PCR 扩增体系及程序参见文献<sup>[12]</sup>。PCR 扩增产物连接至 pGEM T-easy 克隆载体(Promega),通过电击转化法(BIO-RAD)转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。从注水井和采油井样品的文库中分别挑选 108 和 50 个克隆,用煮菌法扩增每个克隆的 16S rRNA 基因。PCR 产物用 *Hinf* I 酶切后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析限制性片段。

克隆文库 Coverage 值的计算公式为  $[1 - (n/N)] \times 100\%$ ,其中  $n$  为含单个克隆的 OTU 数, $N$  为总克隆数<sup>[13]</sup>。根据克隆文库中的 OTU 种类和每个 OTU 的克隆数目,计算出 Shannon-Wiener 多样性指数。计算公式同上,其中  $n_i$  为每个 OTU 的克隆数目, $N$  为

文库中的总克隆数目。

## 1.5 序列分析

每个 ARDRA 类型挑一个代表克隆进行测序,测序由上海博雅生物技术公司完成。序列在 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)数据库中进行 BLAST 比对分析<sup>[14]</sup>,寻找最相似的已知序列及最相似的已知分类地位的序列。用 Clustal X 软件<sup>[15]</sup>对测得的所有 16S rRNA 基因序列及它们在 GenBank 中的最相似的序列构建邻近树(Neighbor-joining tree)<sup>[16]</sup>,进行系统进化分析。Bootstrap 分析进化树枝点处的统计学可信度。

本研究中所获得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号为 AY770933-AY770973。

## 2 结果

### 2.1 两口井微生物群落样品的 PCR-TGGE 分析

分别两次提取两口井微生物群落的基因组总 DNA,用细菌通用引物扩增 16S rDNA V3 区,通过 TGGE 分析得到的图谱(图 1)。不同次数提取的基因组 DNA 做出来的 TGGE 图谱完全一致,说明整个过程操作比较稳定。对比两个不同的样品,它们的 TGGE 图谱差异比较明显。注水井样品的 TGGE 图谱中有 6 条主要条带,且条带强度比较均匀,说明该样品中的微生物丰富度较高,分布比较均匀;而采油井样品中只有一个条带占绝对优势,其他条带相对来说很弱,说明其中有一种微生物是占绝对优势的。根据 TGGE 图谱中条带数目和条带相对强度计算出的 Shannon-Wiener 多样性指数,注水井样品为 1.53,而采油井的只有 0.90。

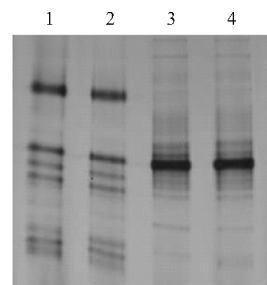


图1 两个油藏微生物群落的 16S rDNA V3 区的 PCR-TGGE 分析

Fig. 1 PCR-TGGE analysis of the 16S rDNA V3 region fragments of the microbial communities of the two wells

1 and 2. Samples from the water injection wells; 3 and 4. Samples from the oil wells.

### 2.2 16S rRNA 基因克隆文库分析

根据 *Hinf* I 酶切分型,注水井样品的 16S rRNA

基因克隆文库中选择的 108 个克隆子分为 33 个 OTU(表 1)。其中 6 个 OTU 是优势类型(含 5 个克隆以上),有 18 个 OTU 只有 1 个克隆。文库的 coverage 值为 83%, Shannon-Wiener 多样性指数为 2.82。

根据 *Hinf* I 酶切分型,将采油井样品的 16S rD-

NA 克隆文库中选择的 50 个克隆子分为 8 个 OTU(表 2)。其中 1 个 OTU 有 25 个克隆,占整个文库的 50%。有 2 个 OTU 只有 1 个克隆,文库的 coverage 值为 96%, Shannon-Wiener 多样性指数为 1.56。

表 1 注水井样品的 16S rRNA 基因克隆文库分析

Table 1 Clone library analysis of the 16S rRNA genes of the water injection well(WW)

Type	Clone number	GenBank Accession number	Phylogenetically closest related organism phylogenetically identified closest related organism	Similarity / %	Origina
W1	31	AY770941	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9 ( AF515782 )	94	Swine waste lagoon
W2	10	AY770942	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9 ( AF515782 )	94	Swine waste lagoon
W3	10	AY770943	clone R5p16 ( AF482444 ) <i>Streptomyces lividans</i> ( Y00484 )	95 66	Granular sludge /
W4	6	AY770944	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ( AJ491845 )	98	PAHs contaminated site
W5	6	AY770945	clone R5p16 ( AF482444 ) <i>Streptomyces nodosus</i> ( AF114036 )	83 67	Granular sludge /
W6	5	AY770946	Unidentified bacterium rM16 ( AB021351 ) <i>Alcaligenes</i> sp. ( X92415 )	97 96	Activated sludge Freshwater sediment
W7	3	AY770947	<i>Agrobacterium</i> sp. PB ( AF482682 )	92	Aquatic sediment
W8	3	AY770948	<i>Rhodobacter veldkampii</i> ( D16421 )	79	Seawater
W9	3	AY770949	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9 ( AF515782 )	84	Swine waste lagoon
W10	2	AY770950	<i>Pseudomonas</i> sp. BRW1 ( AF025349 )	96	/
W11	2	AY770951	<i>Shewanella baltica</i> ( AJ000216 )	99	Baltic Sea
W12	2	AY770952	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9 ( AF515782 )	88	Swine waste lagoon
W13	2	AY770953	<i>Paracoccus</i> sp. MBIC3024 ( AB008115 )	84	Marine
W14	2	AY770954	<i>Thauera mechernichii</i> ( Y17590 )	89	Leachate treatment plant
W15	2	AY770955	clone ZZ15C9 ( AY214206 ) <i>Leptothrix</i> sp. oral clone AV011a ( AF385528 )	99 98	Groundwater Noma lesion
W16	2	AY770956	Uncultured bacterium DSSD55 ( AY328753 ) <i>Pseudomonas saccharophila</i> ( AF368755 )	94 93	Drinking water Ultrapure water
W17	1	AY770957	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> ( AJ306683 )	94	Upflow sludge bed
W18	1	AY770958	<i>Xanthomonas axonopodis</i> ( AE012039 )	96	/
W19	1	AY770959	<i>Cytophaga</i> sp. strain JTB250 ( AB015264 )	82	Japan Trench land
W20	1	AY770960	<i>Paracoccus</i> sp. MBIC3024 ( AB008115 )	86	Marine
W21	1	AY770961	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9 ( AF515782 )	93	Swine waste lagoon
W22	1	AY770962	Clone R5p16 ( AF482444 ) <i>Streptomyces lividans</i> ( Y00484 )	95 60	Granular sludge /
W23	1	AY770963	<i>Pseudomonas</i> sp. MBIC2027 ( AB030085 )	90	Coastal sediment water
W24	1	AY770964	<i>Pseudomonas</i> sp. BU ( AF482684 )	97	Aquatic sediment
W25	1	AY770965	<i>Rhodobacter</i> sp. PS9 ( AF515782 )	93	Swine waste lagoon
W26	1	AY770966	<i>Pseudomonas</i> sp. MBIC2027 ( AB030085 )	99	Coastal sediment water
W27	1	AY770967	Clone R5p16 ( AF482444 ) <i>Pseudomonas</i> sp. BU ( AF482684 )	88 77	Granular sludge Aquatic sediment
W28	1	AY770968	Unidentified Thermotogales OPB7 ( AF027071 )	95	Yellowstone park
W29	1	AY770969	<i>Flavobacterium</i> sp. 3A5 ( AF368756 )	99	Ultrapure water
W30	1	AY770970	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ( AJ312172 )	99	Soil
W31	1	AY770971	Clone SR-FBR-E44 ( AY340827 ) <i>Geobacter</i> sp. strain CdA-3 ( Y19191 )	97 94	Fluidized-bed reactor Lake sediments
W32	1	AY770972	Clone AHU23 ( AB092908 ) <i>Capnocytophaga haemolytica</i> ( U41349 )	78 74	/ /
W33	1	AY770973	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ( U26417 )	85	Soil

“ / ” labeled as unknowable original microbe.

### 2.3 克隆文库中 16S rRNA 基因序列分析

将注水井样品和采油井样品克隆文库中所有

OTU 的代表克隆进行测序,所得序列在 GenBank 数据库中对分析(表 1 2),并对它们及其在 GenBank

中的最相似的序列构建邻近树(图3)。结果表明,注水井样品的绝大部分克隆的序列和数据库中 $\alpha$ 变形菌纲(53%) $\beta$ 变形菌纲(15%) $\gamma$ 变形菌纲(11%)以及放线菌纲(17%)亲缘关系最近(表1,图2,图3)。其中有7个 OTU 的 51 个克隆属于红细菌属(*Rhodobacter*),占整个文库的 47%。所得到的 33 个序列中只有 9 个和 GenBank 中已有的 16S rDNA 序列同源性大于 97%(表1),说明该系统中微生物

资源比较新颖,属于新种的可能性相当大。

采油井样品的克隆序列和数据库中 $\alpha$ 变形菌纲(20%) $\beta$ 变形菌纲(16%)和 $\gamma$ 变形菌纲(64%)亲缘关系最近(表2,图2,图3),尤其是假单胞菌属(*Pseudomonas*),占有克隆的 62%。8 个 OTU 的序列中有 7 个和 GenBank 中已有的 16S rDNA 序列同源性大于 97%(表2)。

表 2 采油井样品的 16S rRNA 基因克隆文库分析

Table 2 Clone library analysis of the 16S rRNA genes of the oil well (OW)

Type	Clone number	GenBank accession number	Phylogenetically closest related organism phylogenetically identified closest related organism	Similarity /%	Original
O1	25	AY770933	<i>Pseudomonas</i> sp. BRW1 (AF025349)	99	/
O2	7	AY770934	Unidentified bacterium HTB015 (AB010864) <i>Moraxella</i> sp. (AJ000645)	99	Deep-sea sites
O3	6	AY770935	<i>Thauera</i> sp. B4P (AJ315678)	97	Marine algal cultures
O4	5	AY770936	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (AY189751)	98	/
O5	3	AY770937	<i>Agrobacterium</i> sp. PB (AF482682)	98	Bohai gulf
O6	2	AY770938	<i>Azotobrio restrictus</i> (AF011346)	94	Aquatic sediment
O7	1	AY770939	<i>Pseudomonas</i> sp. BRW1 (AF025349)	97	Surface-sterilized roots of Kallar grass
O8	1	AY770940	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (AJ293463)	99	Oilseed rape rhizosphere

"/ labeled as unknowable original microbe.

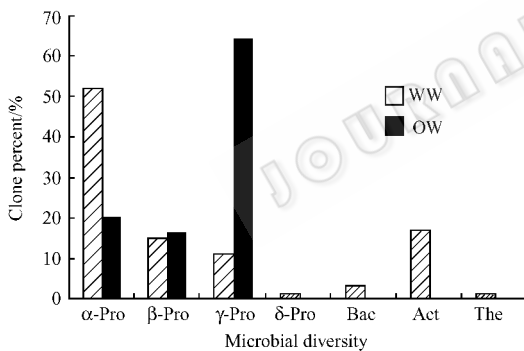


图 2 注水井和采油井中的微生物多样性对比分析

Fig. 2 Comparative analysis of the microbial diversity between the water injection well and the oil well

$\alpha$ -Pro: Alphaproteobacteria;  $\beta$ -Pro: Betaproteobacteria;  $\gamma$ -Pro: Gammaproteobacteria;  $\delta$ -Pro: Deltaproteobacteria; Bac: Bacteroidetes; Act: Actinobacteria; The: Thermotogae.

### 3 讨论

本文结合 16S rRNA 基因的 PCR-TGGE 和克隆建库两种方法对大港油田孔二北断块注水井和采油井的微生物群落结构进行了初步研究。两种方法的结果一致,均表明两个井中微生物群落结构差异显著,注水井样品中的微生物多样性比采油井样品大很多。这是因为原始采油井未经处理前特殊的营养和高压、厌氧及高温条件,使得适应该环境的微生物

种类必定比较单一。而往注水井中注水提高石油采收率的同时,带入了很多外源微生物,导致了种群多样性的提高。

到目前为止,通过分子生物学的方法对油藏微生物的研究报道还比较少<sup>[5,8,17,18]</sup>。已有的基于 16S rRNA 基因克隆测序的研究表明,油藏中的主要微生物是硫酸盐还原菌、发酵菌和硫氧化细菌以及产甲烷菌<sup>[5,8]</sup>。然而对大港油田微生物群落的 16S rRNA 基因克隆文库的研究表明,大部分克隆的 16S rRNA 基因序列和 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 变形菌纲以及放线菌纲的亲缘关系最近,而且绝大部分最相似的微生物或克隆都不是来源于油藏系统(表1,2)。只有少数几个克隆可能属于硫酸盐还原菌(W31)或是产甲烷菌(W32)。另一方面,不同油藏由于其所属地层的化学和物理条件不同,其中所含的本源微生物可能差异较大。对于经过处理的注水井来说,由于所注入的水的来源不同,其所携带的外源微生物自然也有很大差异。

Watanabe 等人使用不同的 16S rRNA 基因的通用引物对同一地下储油洞内微生物的研究表明,不同引物得到的关于微生物群落结构的结果差异很大<sup>[17,18]</sup>。由于 PCR 扩增技术本身的偏爱,单单使用这一种方法并不能使我们完全准确地了解到油藏微生物群落的真实信息,还需要结合荧光原位杂交、DNA 芯片等其他分子方法对其进行深入研究。

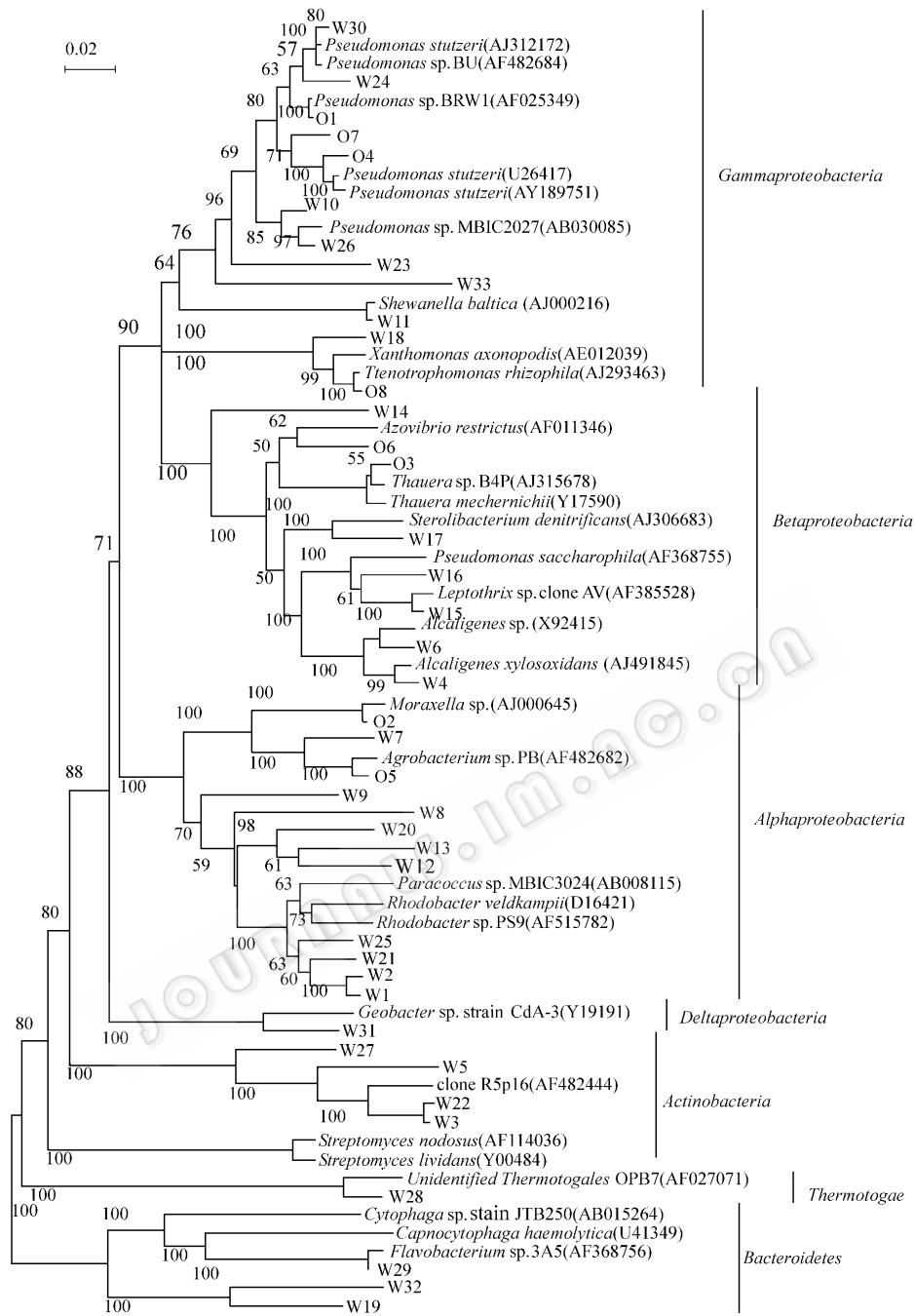


图 3 注水井和采油井克隆文库中的 16S rRNA 基因序列与它们在 GenBank 中最相似的序列的系统进化树

Fig.3 Unrooted neighbor-joining tree based on the 16S rRNA genes from the clonlibraries of the WW and OW samples and their nearest neighbors retrieved from GenBank

“W” refers to the water injection well clones representing different OTUs; “O” refers to the oil well clones representing different OTUs.

Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The numbers at the branch nodes are bootstrap values (per 100 trials) with only values greater than 50 indicated. The bar represents 0.02 substitution per nucleotide site.

参 考 文 献

[ 1 ] 雷光伦. 微生物采油技术的研究与应用. 石油学报, 2001, 22: 56 - 61.

[ 2 ] Blanchet D. Microbiology of oil degradation in reservoirs. 2001, SPE, 71449.

[ 3 ] Grassia G S. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiol Ecol*, 1996, 21: 47 - 58.

[ 4 ] Magot M, Ollivier B, Patel B K. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 77: 103 - 116.

- [ 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. *Appl Environ Microbiol* 2000 **66** :700 – 711 .
- [ 6 ] Van Hamme J D , Singh A , Ward O P . Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003 **67** :503 – 549 .
- [ 7 ] Amann R I , Ludwig W , Schleifer K H . Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995 **59** :143 – 169 .
- [ 8 ] Voordouw G , Armstrong S M , Reimer M F , *et al.* Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing , fermentative , and sulfide-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1996 **62** :1623 – 1629 .
- [ 9 ] 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. *Appl Environ Microbiol* 1993 **59** :695 – 700 .
- [ 10 ] Zhang X L , Yan X , Gao P P , *et al.* Optimized sequence retrieval from single bands of TGGE ( temperature gradient gel electrophoresis ) profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J Microbiol Methods* 2005 **60** ( 1 ) :1 – 11 .
- [ 11 ] Krebs C J . Ecological Methodology . New York : Harper Collins Inc . , 1989 .
- [ 12 ] Di Cello F , Bevivino A , Chiarini L , *et al.* Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol* 1997 **63** :4485 – 4493 .
- [ 13 ] Good I J . The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 1953 **40** :237 – 264 .
- [ 14 ] Altschul S F , Gish W , Miller W , *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990 **215** :403 – 410 .
- [ 15 ] Saitou N , Nei M . The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987 **4** :406 – 425 .
- [ 16 ] Thompson J D , Gibson T J , Plewniak F , *et al.* The CLUSTAL-X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997 **25** :4876 – 4882 .
- [ 17 ] Watanabe K , Kodama Y , Kaku N . Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiol* 2002 **2** ( 1 ) :23 .
- [ 18 ] Watanabe K , Kodama Y , Syutsubo K , *et al.* Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl Environ Microbiol* 2000 **66** :4803 – 4809 .

## Molecular analysis of the microbial communities of the Dagang Kongdian flooding bed oilfield

SHE Yue-hui<sup>1,2</sup> ZHANG Xue-li<sup>1</sup> ZHANG fan<sup>1,2</sup> WANG Ling-hua<sup>1</sup> ZHAO Li-ping<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science and Biotechnology , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200240 , China )

(<sup>2</sup> College of Chemistry and Environmental Engineering , Yangtze University , Jingzhou 434023 , China )

**Abstract** : Both PCR-TGGE ( temperature gradient gel electrophoresis , TGGE ) and 16S rRNA gene clone library construction were used to comparatively analyze the microbial communities of a water injection well ( WW ) and an oil well ( OW ) in Dagang oilfield . TGGE analysis of the PCR amplified 16S rDNA V3 region products showed great difference between these two microbial communities . Six major bands were detected in the TGGE profile of the WW sample , while only one predominant band in the OW sample was found . Two 16S rRNA gene clone libraries were also constructed , and 108 and 50 clones were selected from the WW and OW library respectively for amplified ribosomal DNA restriction analysis ( ARDRA ) . 33 taxonomic operational units ( OTUs ) were found in the WW library with 6 major OTUs , while only 8 OTUs were found in the OW library with one OTU predominant . The results of TGGE and clone library profiling analysis both indicated that microbial community of the WW had higher diversity than the OW . Sequence analysis of the representative clone of each OTU showed that most bacteria of the WW were affiliated with  $\alpha$  ,  $\beta$  , and  $\gamma$  *Proteobacteria* and *Actinobacteria* , especially *Rhodobacter* ( 47% ) . Most bacteria of the OW were affiliated with  $\alpha$  ,  $\beta$  , and  $\gamma$  *Proteobacteria* , especially *Pseudomonas* ( 62% ) . Molecular analysis of the microbial diversity in oilfield provides foundation for better application of MEOR ( Microbial Enhanced Oil Recovery ) .

**Key words** : Oilfield , 16S rRNA gene , Temperature gradient gel electrophoresis ( TGGE ) , Clone library , Microbial community , Diversity

\* Corresponding author . Tel 86-21-54743351 , Fax 86-54744263 , E-mail : lpzhao@sjtu.edu.cn

First author . E-mail : sheyuehui@263.net ; xlzhang@sjtu.edu.cn

Received date : 10-23-2004