

T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性

袁三青^{1,2}, 薛燕芬^{1*}, 高 鹏³, 汪卫东⁴, 马延和¹

(¹中国科学院微生物研究所 北京 100080) (²中国科学院研究生院 北京 100049)

(³中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023) (⁴胜利油田采油工艺研究院 东营 257000)

摘 要 应用 T-RFLP (末端限制性片段长度多态性) 技术分析和比较了胜利油田单 12 区块的一口注水井 (S12-zhu) 和三口采油井 (S12-4、S12-5 和 S12-19) 的油藏微生物多样性。基于 T-RFLP 图谱的多样性指数表明注入水样品具有更丰富的细菌和古菌多样性。相似性指数表明, 样品间细菌群落结构的相似性介于 22.4% ~ 30.8% 之间, 古菌群落结构的相似性介于 20.8% ~ 34.5% 之间。查询 RDP 数据库推测这 4 个油藏样品所共有的优势微生物可能为 *Pseudomonas* 属, *Marinobacter* 属和产甲烷微生物。T-RFLP 技术能方便快捷的分析微生物多样性, 其在油藏微生物多样性研究上的应用可以为 MEOR 提供有用的信息。

关键词 : T-RFLP ; 油藏 ; 微生物多样性

中图分类号 : Q938 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-6209 (2007) 02-0290-05

油藏是一种独特的生态环境, 其中存在着丰富的微生物类群, 它们具有多种代谢类型, 不仅可提供新的微生物物种和生物活性物质, 同时, 这些微生物类群在石油开采过程中可发挥重要作用^[1~3]。以往油层微生物多样性研究多是以培养技术为基础, 并且已从中分离出了大量的好氧和厌氧微生物^[1]。但已有研究表明自然界中多数微生物利用现有方法还未能培养^[4], 因此以往的纯培养分析不能真实的反映油藏的微生物种群结构, 其结果会导致对油藏微生物多样性认识的偏差, 从而影响其应用, 特别是在微生物增加石油采收率 (MEOR) 方面的应用。

近年来, 随着分子生物学的发展, 基于 16S rRNA 基因的非培养技术为揭示自然环境中微生物种类和遗传多样性开辟了一条全新的途径, 能使我们更准确全面的认识特定生态系统中微生物的多样性, 摆脱了传统的分离培养方法不能完整反映生态系统全部信息的束缚^[5]。一些分子生态方法已经应用于油藏微生物多样性的研究上^[6~8], 拓展了人们对油藏微生物多样性的认识。T-RFLP 技术是将 RFLP 技术和荧光标记技术相结合后发展的一种较先进的分子生态学方法, 由 Liu 等于 1997 年首次应用于微生物群落多样性的研究^[9], 为人们分析和比较环境样品微生物群落结构的组成提供了新的手段。近年来, 许多科学家对 T-RFLP 技术应用于微生

物群落结构及其动态变化研究的稳定性和可靠性进行了评估, 证明了该方法适于微生物群落多样性中等或更低的环境样品的微生物多样性分析^[10, 11], 同时具有分辨率高^[12], 重复性好^[13], 并且可以给出定量分析结果^[14]等优点。目前 T-RFLP 技术已成功的应用于多种微生物群落多样性研究中^[9, 15, 16], 但在油藏微生物多样性研究方面还未见报道, 并且国内极少有该方法应用的报道。

本文将 T-RFLP 技术应用于油藏微生物多样性的研究中, 基于 T-RFLP 图谱, 运用多样性指数和群落相似性分析比较了一口注水井和三口采油井之间的油藏微生物群落的多样性及其相似度, 同时参考 RDP 数据库, 推测了样品中可能存在的优势微生物, 为全面认识油藏微生物多样性提供了有用的信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 采样 样品取自于山东省东营市胜利油田单 12 区块注入水, S12-4 油井, S12-5 油井和 S12-19 油井的产出水, 油层埋深 1370 ~ 1500m, 地层温度为 66℃, pH 范围为 7.4 ~ 7.8, 矿化度范围为 20g/L 左右。

1.1.2 主要试剂和仪器 环境样品 DNA 提取试剂盒 (UltraClean™ Soil DNA Kit) 购于美国 MO BIO 公司, DNA 纯化试剂盒购于北京天根生化科技有限公

基金项目: 国家十五攻关课题 (2003BA613A-08-1); 中科院知识创新项目 (KSCX2-YW-G-011)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-82615965; E-mail: xueyf@sun.im.ac.cn

作者简介: 袁三青 (1981 -), 男, 湖北荆门人, 硕士研究生, 主要从事油藏微生物生态的研究。E-mail: yuansanq@126.com

其他作者: 李希明⁴, 许国旺³

收稿日期: 2006-08-05; 接受日期: 2006-09-27; 修回日期: 2006-12-29

司,毛细管电泳仪器为 ABI 310 Genetic Analyzer.

1.2 环境总 DNA 的提取

取水样 1~2L 用于总 DNA 的提取.根据水样的混浊程度,使用孔径从大到小的滤膜逐级抽滤,最后一次抽滤用 0.22μm 滤膜.抽滤后得到的滤膜置于 50mL 离心管中,加入 STE 缓冲液和二氯甲烷各 10mL,再加入少许玻璃珠,涡旋 30min.取出洗过的滤膜,剩余的液相 8000r/min 离心 5min,弃下层有机相和水相上部分,剩余水相 10000r/min 离心 10min 后弃上清,得到细胞沉淀物,用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,提取的总 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后于 -20℃ 保存.

1.3 16S rRNA 基因扩增

各取 1μL 环境总 DNA 作为模板进行 PCR,引物为:细菌(27F :5'-FAM-AGAGTTTGATC2CTGGCTCAG-3', 1495R :5'-CTACGGCTACCTTGTACG-3');古菌(21F :5'-FAM-TCCGCTTGATCCTGCCGGA-3', 1495R :5'-CTACGGCTACCTTGTACG-3').扩增条件:94℃ 4min,94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 60s,30 个循环,72℃ 7min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产量和特异性,并用 DNA 纯化试剂盒纯化.

1.4 带 FAM 标记 16S rRNA 基因的限制性酶切

采用 *Hae* III 和 *Hha* I 两种限制性内切酶分别对 PCR 产物进行酶切.限制性内切酶酶切反应体系(20μL):2.0μL 10 × Buffer,10U 限制性内切酶,10μL PCR 产物,7.0μL ddH₂O,混匀后 37℃ 酶切 5h,然后 65℃ 15min 使酶失活.酶切后采用乙醇沉淀法脱盐,脱盐后体积为 10μL.

1.5 限制性片断的基因扫描

基因扫描由上海基康生物技术有限公司和大连化物所完成.取 2μL 样品、10μL 甲酰胺、1μL 内标

(liz500)混匀后 95℃ 变性 4min,马上置于冰浴中,然后上样进行毛细管电泳,胶型为 POP₄,电泳时间 30min.基因扫描结果分析软件为 ABI PRISM[®] GeneScan Analysis Software Version 3.7.

1.6 基于 T-RFLP 图谱的微生物多样性分析

以 T-RFLP 图谱中每一个限制性片段(T-RF)为一个 OTU(operational taxonomic unit),OTU 丰度按照 Saikaly 的方法计算^[17],即以相对峰高值(每个 T-RF 的峰高除以累计峰高值)作为 OTU 丰度,峰高值低于 100 荧光单位的峰不予考虑.根据图谱中 OTU 的数目及其丰度用 BIO-DAP 程序(<http://nhsbig.inhs.uiuc.edu/wes/populations.html>)进行多样性指数计算,包括多样性指数(Shannon Diversity H')和均匀度指数(Shannon Diversity E'),同时通过 Jaccard measure 公式分析了 4 个样品微生物群落的相似性.

登陆网站 <http://rdp.cme.msu.edu/>,选择在线分析中的 TAP T-RFLP 程序^[18]对 4 个样品中都出现的优势 T-RFs 进行定性分析.

2 结果

2.1 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因的扩增结果

注入水和采油井样品总基因组片段大小均约为 20kb,其中注入水样品浓度大于 30ng/μL,采油井样品浓度均大于 20ng/μL,该结果可进行进一步的分子生物学分析,扩增的 16S rRNA 基因序列为单一条带,长度约为 1500bp,表明扩增产物特异性较好.

2.2 基于 T-RFLP 图谱的微生物多样性分析

2.2.1 多样性指数分析:根据 *Hae* III 和 *Hha* I 酶切 T-RFLP 图谱(图 1)中末端限制性片断的数目及其相对峰高值,分别计算了 4 个样品细菌和古菌多样性指数(表 1).

表 1 基于 T-RFLP 图谱的微生物多样性分析

Diversity index	S12-zhu		S12-4		S12-5		S12-19	
	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea
OTU	43	19	42	9	17	8	17	20
Diversity H'	3.08	2.36	3.07	1.69	1.88	1.49	2.07	2.26
Eveness E'	0.82	0.80	0.82	0.77	0.66	0.72	0.73	0.75

从不同样品的细菌和古菌多样性指数(Shannon Diversity H')来看,注入水样品高于采油井样品,说明注入水中有更丰富的微生物多样性.从均匀度指数(Shannon Eveness E')来看,在注入水中,相比油层水样品,各物种的丰度相差不明显,较少存在占据绝对优势地位的微生物物种,而在油层产出水中,存在一定数量的占有相对优势的物种.

对同一个样品的细菌和古菌多样性进行比较,发现注入水、S12-4 和 S12-5 油井细菌多样性更丰富,而 S12-19 油井古菌多样性较细菌多样性略高.

2.2.2 样品间相似性分析:基于 T-RFLP 图谱的相似性系数反映了 4 个样品之间微生物群落的相似性.表 2 的数据说明,样品之间细菌群落的相似性没有明显的规律.相比之下,S12-5 油井样品和 S12-19

油井样品的细菌群落相似性最高,达到 30.8% ,其余样品之间的相似性系数是 22.4% ~ 25.5%。古菌

群落的相似性分析结果表明,注入水样品和 S12-19 样品之间古菌群落的相似性最高(34.5%)。

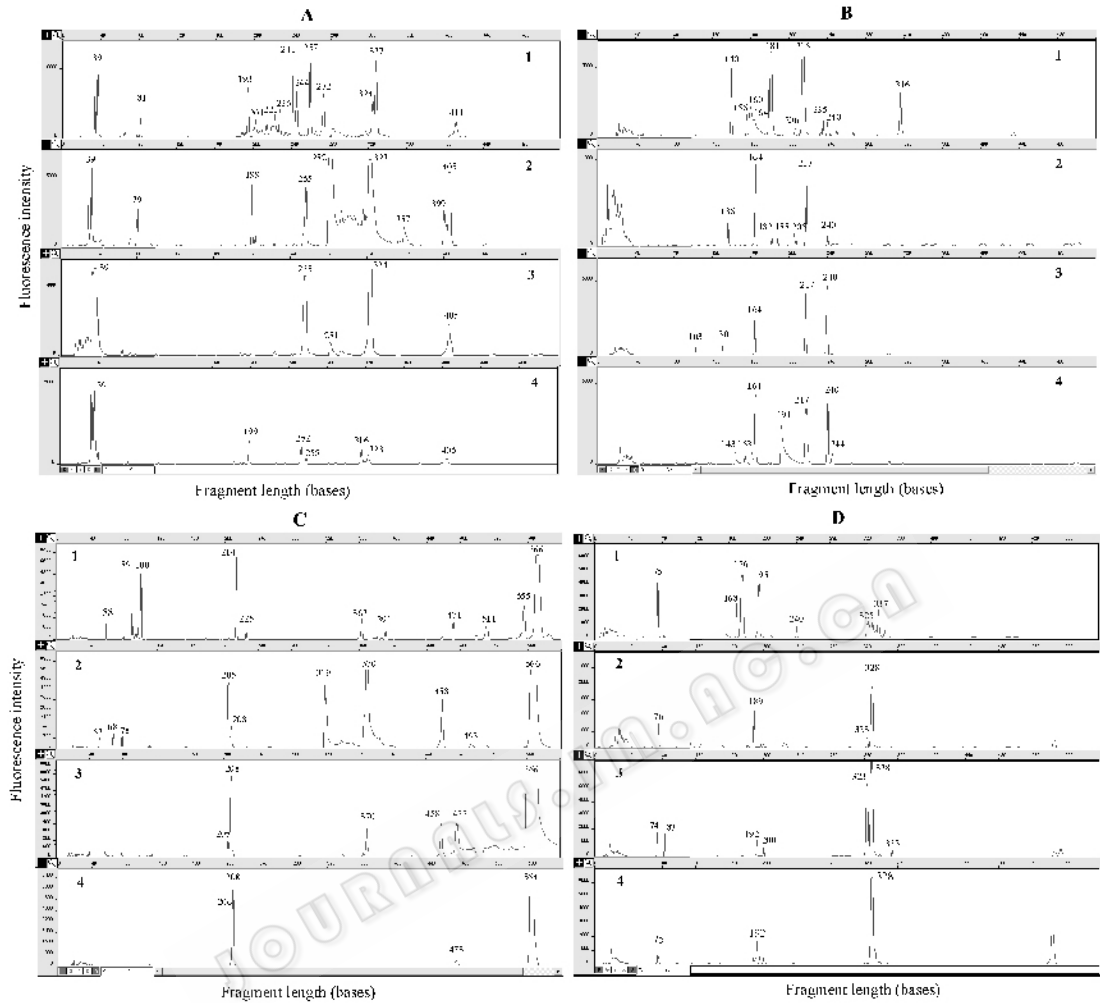


图 1 S12 区块 4 个取样样品 T-RFLP 分析图谱

Fig.1 T-RFLP profiles of four samples from S12 plot. A : *Hae* III -digesting T-RFLP profiles for Bacteria ; B : *Hae* III -digesting T-RFLP profiles for Archaea ; C : *Hha* I -digesting T-RFLP profiles for Bacteria ; D : *Hha* I -digesting T-RFLP profiles for Archaea ; 1 : sample of the injection well (S12-zhu) ; 2 : sample of the production well (S12-4) ; 3 : sample of the production well (S12-5) ; 4 : sample of the production well (S12-19).

表 2 基于 T-RFLP 图谱的样品间相似性系数

Samples	Bacteria				Archaea			
	S12-zhu	S12-4	S12-5	S12-19	S12-zhu	S12-4	S12-5	S12-19
S12-zhu	1.000				1.000			
S12-4	0.250	1.000			0.273	1.000		
S12-5	0.250	0.255	1.000		0.227	0.214	1.000	
S12-19	0.224	0.229	0.308	1.000	0.345	0.208	0.333	1.000

2.2.3 对 T-RFLP 图谱中主要限制性片断的定性分析 :从图 1 中找出在 4 个样品中都出现的 *Hae* III 酶切的末端限制性片断(T-RF),图 1-A 中有 39bp、255/257bp 和 323/324bp,图 1-B 中则是 164bp、215/217bp 和 240bp,这些 T-RFs 代表着单 12 区块注入水和油藏中的优势微生物。结合 *Hha* I 酶切 T-RFLP 图谱中的优势峰,对 TAPT-RFLP 程序进行分析(表 3)。

经过查询 RDP 数据库,推测注入水和油藏中可能存在 *Pseudomonas* 属, *Marinobacter* 属,产甲烷古菌以及一些未培养微生物,而细菌 T-RFLP 图谱中的优势峰 T-RF-323/324bp 和古菌 T-RFLP 图谱中的优势峰 T-RF-164bp 在 TAP T-RFLP 程序中没有找到对应的数据。

表 3 TAP T-RFLP 程序分析 T-RFLP 图谱

Table 3 Analysis of T-RFLP profiles by TAP T-RFLP program

Strains	Hae III	Hha I	Accession No.	Taxonomy
Bacteria	39	207	AF063219	
	39	209	AF105379	<i>Pseudomonas</i>
	39	565	AF039489	
	256	210	AB026946	<i>Marinobacter</i>
Archaea	216	328	AF028691	<i>Methanosarcina</i>
	240	325	AF121998	uncultured marine archaeon
	240	325	D87349	unculturable Mariana archaeon

3 讨论

胜利油田单 12 区块油层是一种高压、中温和含盐的极端环境是适合用 T-RFLP 技术分析的一种生态环境。表 1 中各个样品的 OTU 数目证明了油藏微生物的多样性,4 个样品的细菌和古菌的平均 OTU 值分别是 30 和 12 ,而注入水样品和 S12-4 样品的细菌 OTU 值高达 43 和 42 ,相比用其它的方法研究油藏微生物多样性 ,如构建 16S rRNA 基因文库^[4]和 DGGE^[6] ,T-RFLP 技术展示了更高的灵敏度。

在原油开采过程中 ,外源物质特别是注入水进入油藏较大的改变了油藏内源微生物群落的结构 ,基于 T-RFLP 图谱的多样性指数分析说明 ,注入水相比油井样品具有更丰富的微生物多样性 ,结合 T-RFLP 图谱(图 1) ,发现一些注入水样品 T-RFLP 图谱中的优势峰在油井样品的图谱中消失 ,说明一些在注入水中的优势微生物由于不适应油藏的极端环境而消失 ,这与余跃惠等的研究结果是一致的^[8]。而油井样品 T-RFLP 图谱中的优势峰大部分在注入水样品 T-RFLP 图谱中都能找到 ,推测由于长期的注水开发和注入水的重复利用 ,地层水中已经形成了稳定的微生物群落 ,这些微生物在地上地下都能生存并且是群落中的优势菌。

通过 TAP T-RFLP 程序分析 ,推测了油藏微生物群落中可能存在着 *Pseudomonas* 属 ,*Marinobacter* 属 ,产甲烷古菌以及一些未培养微生物。同时发现 T-RFLP 图谱中的一些 T-RFs ,包括一些优势峰在 RDP 数据库中找不到相应的数据 ,而在油藏中常见的硫酸盐还原菌和铁细菌也没有检测到 ,分析其原因可能有以下几点 ,一是油藏中存在着一些未被人们发掘和鉴定的微生物 ,因此在 RDP 数据库中也没有它们的 16S rRNA 基因序列 ;二是因为 RDP 数据库中的许多 16S rRNA 基因序列并不完整 ,而本文中用于 TAP T-RFLP 程序分析的引物为非常靠近 16S rRNA 基因序列 5'端的 7-27K(大肠杆菌序列)通用引物 ,从而导致 RDP 数据库中缺少 5'端序列信息的 16S rRNA 基因序列无法被检测到。为了弥补 T-RFLP 技

术在定性方面依赖 RDP 数据库的缺陷 ,近年来 ,一些科学家将 T-RFLP 技术和构建 16S rRNA 基因文库这两种方法结合使用 ,获得了更好的结果^[19 20]。本文将 T-RFLP 技术引入到油藏微生物多样性的研究中 ,对胜利油田单 12 区块的注入水样品和 3 个油井样品的微生物多样性进行了分析和比较 ,同时推测了油藏中可能存在的微生物种类。分析结果可为微生物采油技术提供重要的信息。

参 考 文 献

[1] Magot M , Ollivier B , Patel BK . Microbiology of petroleum reservoirs . *Antonie Van Leeuwenhoek* , 2000 , 77(2) : 103 - 116 .

[2] 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 .

[3] Belyaev SS . Activation of the geochemical activity of strata microflora as basis of a biotechnology for enhancement . *Microbiology* , 1998 , 67 : 708 - 714 .

[4] Amann RI , Ludwig W , Schleifer KH . Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . *Microbiol Rev* , 1995 , 59(1) : 143 - 169 .

[5] Pace NR , Stahl DA , Lane DJ , et al . The analysis of natural microbial population by ribosomal RNA sequence . *Advances in Microbial Ecology* , 1986 , 9(1) : 1 - 55 .

[6] Voordouw G , Armstrong SM , Reimer MF , 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(5) : 1623 - 1629 .

[7] Orphan VJ , Taylor LT , Hafenbrald 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 .

[8] 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 . 生态学报 , 2005 , 25(2) : 237 - 242 .

[9] Liu WT , Marsh TL , Cheng H , et al . Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA . *Appl Environ Microbiol* , 1997 , 63(11) : 4516 - 4522 .

[10] Engebretson JJ , Moyer CL . Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism . *Appl Environ Microbiol* , 2003 , 69(8) : 4823 - 4829 .

[11] Denaro R , Auria G , Marco G . Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments . *Environ Microbiol* , 2005 , 7(1) : 78 - 87 .

[12] Moeseneder MM , Arrieta JM , Muyzer G , et al . Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis . *Appl Environ Microbiol* ,

- [13] Osborn AM , Moore E , Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* , 2000 , 2(1) : 39 – 50.
- [14] Lueders T , Friedrich MW. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , 69(1) : 320 – 326.
- [15] Tillmann L , Michael F. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , 66(7) : 2732 – 2742.
- [16] Kaplan CW , Astaire JC , Sanders ME , *et al.* 16S Ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , 67(4) : 1935 – 1939.
- [17] Saikaly PE , Stroot PG , Oerther DB. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl Environ Microbiol* , 2005 , 71(10) : 5814 – 5822.
- [18] Marsh TL , Saxman P , Cole J , *et al.* Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program , a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , 66(8) : 3616 – 3620.
- [19] González JM , SimóR , Massana R , *et al.* Bacterial community structure associated with a dimethylsulfonio-propionate-producing north atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , 66(10) : 4237 – 4246.
- [20] Derakshani M , Lukow T , Liesack W. Novel bacterial lineages at the (sub) division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , 67(2) : 623 – 631.

Microbial diversity in Shengli petroleum reservoirs analyzed by T-RFLP

YUAN San-qing^{1,2} , XUE Yan-fen^{1*} , GAO Peng³ , WANG Wei-dong⁴ , MA Yan-he¹

(¹ Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Graduate University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

(³ Dalian Institute of Chemical Physics , Chinese Academy of Sciences , Dalian 116023 , China)

(⁴ Academy of Oil Extraction Engineering , ShengLi Oil Field Company , Dongying 257000 , China)

Abstract Recent investigations on the microbial ecology of oil reservoirs in a variety of locales indicated that these habitats harbor various assemblages. In this study , a cultured-independent molecular technique , Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) , was used to analyze the microbial diversity of an injection well (S12-ZHU) and three related production wells (S12-4, S12-5 and S12-19) in the ShengLi oilfield (Shandong province , China). The 16S rRNA genes were amplified by PCR with the 5' carboxy-fluorescein (5'-FAM)-labelled universal forward primers (27F for bacteria and 21F for archaea) and a universal reverse primer (1495R). Then the 16S rRNA genes were digested with restriction enzymes (*Hae* III and *Hha* I) and analyzed by using an automated DNA sequencer. The Shannon-Wiener Diversity index , based on the T-RFLP profiles , indicated that the bacterial and archaeal species richness in the injection well was higher than those of the production ones. The similarity coefficient showed the microbial community similarity among the four samples was 22.4% ~ 30.8% (Bacteria) and 20.8% ~ 34.5% (Archaea) , respectively. According to the analysis by TAP T-RFLP program , species belonging to *Pseudomonas* , *Marinobacter* and *Methanosarcina* as well as some uncultured archaeon were supposed to be the dominant bacteria in all four samples. Thus , this study indicates that T-RFLP is useful for analysis of the microbial diversity in petroleum reservoirs.

Keywords : terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) ; petroleum reservoirs ; microbial diversity

Foundation item : The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2003BA613A-08-1) and the CAS Knowledge Innovation Program (KSCX2-YW-G-011)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-82615965 , E-mail : xueyf@sun.im.ac.cn

Other authors : LI Xi-ming⁴ , XU Guo-wang³

Received : 5 September 2006 / Accepted : 27 September 2006 / Revised : 29 December 2006 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>