微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
48(2)：152~156; 4 February 2008
ISSN 0001-6209; CN11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn

一株高温产粘菌株的筛选及其产胞外聚合物分析

刘静[1], 王君[1], 白新宇[2], 马挺[1], 梁凤来[1], 刘如林[1*]

([1] 南开大学生命科学学院，天津市微生物功能基因组学重点实验室，分子微生物学与技术教育部重点实验室，天津 300071)
([2] 辽河油田分公司兴隆台采油厂，盘锦 124010)

摘要：从油井采出水中分离到一株高温产胞外聚合物的细菌 MS-1，经 16S rDNA 基因序列分析属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。该菌能在 60℃生长并产生胞外聚合物，其中胞外多糖含量为 48.3%～54.5%，主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成，摩尔比分别是 2.04：1.00：0.89。胞外聚合物中蛋白含量为 37. 2%~42.4%，主要由甲硫氨酸、亮氨酸、天门冬氨酸、丙氨酸、组氨酸和丝氨酸组成。利用透射电镜和环境扫描电镜对胞外聚合物的形成进行了观察。该菌的分离和研究为高温油藏的微生物调剖和驱油奠定了生物学基础。

关键词：高温；芽孢杆菌；胞外聚合物；微生物调剖
中图分类号：Q93, TE357.9　　文献标识码：A　　文章编号：0001-6209 (2008) 02-0152-05

微生物调剖(Microbial Profile Modification)是通过微生物的生长代谢作用在岩石孔隙表面积累起生物膜，其主要成分为胞外聚合物及生物体，能有效地封堵喉孔，导致高渗透带渗透率降低，扩大注水波及面积，达到调剖和提高水驱采收率的目的[1~3]。胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)是微生物在一定环境条件下，在其代谢过程中分泌的包围在微生物细胞壁外的多聚化合物，包括荚膜、粘液层及其他表面物质，其有机部分主要由多聚糖、蛋白质、脂和腐质酸组成[4]。

伴随着石油开采力度的加强，高温油藏的极端环境成为制约调剖细菌使用的重要因素。因此筛选在高温条件下能够产聚合物的细菌是微生物调剖作业的重点。目前已报道的调剖细菌多为常温菌，在高温环境下产胞外聚合物的微生物尚未见报道。本研究室由油井采出水中分离到一株可在 60℃生长并产胞外聚合物的兼性厌氧菌，并对其胞外产物进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: DNA 纯化试剂盒, Ex-*Taq* 酶, dNTP, T4 连接酶, DNA maker 购于 TaKaRa 公司；其它试剂均为国产分析纯。日本岛津傅立叶变换红外光谱仪，美国 Angilent 6820 气相色谱，Philips EM400-ST 电子显微镜，捷克 FEI Quanta200 扫描电子显微镜。

1.1.2 菌株来源：从胜利油田井下采出水中分离的耐高温细菌。

1.1.3 培养基: ①平板培养基：每升含葡萄糖 10g，蛋白胨 3g，牛肉粉 2g，酵母粉 1g, NaCl 2g，琼脂粉 15g, pH 7.2。②种子培养基：每升含葡萄糖 10g，蛋白胨 1g，酵母粉 1g, KH_2PO_4 2g, Na_2HPO_4 1g, $MgSO_4$ 0.4g, pH 7.0~7.2。③发酵培养基：每升含蔗糖 20g，蛋白胨 1g，酵母粉 1g, KH_2PO_4 4g, Na_2HPO_4 1g, $NaNO_3$ 1g, $MgSO_4$ 0.4g, $CaCO_3$ 1.5g, pH 7.0~7.2。

基金项目：国家自然科学基金(50674058)；天津市应用基础研究重点项目(07JCZDJC03200)
*通讯作者。Tel: +86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn
作者简介：刘静(1982–)，女，山东东营人，硕士研究生，主要从事石油微生物研究。E-mail: liujing8660@mail.nankai.edu.cn
收稿日期：2007-10-09；修回日期：2007-11-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2 产胞外聚合物菌株的筛选

取胜利油田采出水，适当稀释后涂布筛选平板，60℃培养 20h。选取产粘液的菌株为初筛菌种，转接至种子培养基，60℃培养 12h，转接发酵培养基，60℃培养 3d。发酵液离心，上清液用乙醇提取胞外聚合物，产物烘干后称重。选取产量较高的菌株 MS-1 作为实验菌株。

1.3 菌株 16S rDNA 序列进化分析

提取细菌 MS-1 的基因组 DNA。用 16S rDNA 基因的通用引物，以细菌的基因组 DNA 为模板，PCR 反应扩增出 16S rDNA。PCR 产物检测，回收，连接 pGEM-T 载体，转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 感受态，筛选插入片段正确的阳性克隆测序[5]。测序的结果在 NCBI 上应用 BLAST 程序与数据库中已有细菌 16S rDNA 序列进行同源性比较分析。利用 Mega3.1 软件构建系统进化树。

1.4 EPS 的分离纯化和分析

1.4.1 EPS 的分离纯化[6]：细菌 MS-1 在含葡萄糖平板上 60℃培养 12h 后，刮取黏性菌体，溶到去离子水中，旋涡混合仪振荡 5min，15000×g 离心 30min，上清液过 0.45μm 滤膜完全去除菌体，加入 2 倍体积的冷乙醇，4℃过夜。捞取漂浮在液面上的白色产物，用乙醇洗两次后 60℃干燥。产物重溶于双蒸水中，Sevage 液(氯仿：异戊醇=5：1，V/V)多次抽提去蛋白。4℃透析 48h，冷冻干燥后得较纯的胞外产物 EPS。

1.4.2 EPS 红外光谱分析：取适量纯化产物，KBr 压片法测红外吸收光谱。

1.4.3 EPS 中多糖含量测定：采用苯酚-硫酸法[7]定量测定。

1.4.4 EPS 中蛋白质含量测定：采用考马斯亮蓝法[8]定量测定。

1.4.5 单糖组分的纸层析分析[9]：取 20mgEPS，加入 2mol/L $H_2SO_4$1mL，置安瓿管内密封。在沸水中水解 10h，$BaCO_3$ 中和，离心取上清液，浓缩点样。新华 1 号滤纸展开，检验单糖组分的展开剂为：正丁醇：乙酸：水= 4：1：5 (V/V)，显色剂为苯胺-磷酸盐溶液。

1.4.6 水解单糖气相色谱分析：参照文献[9]制备糖腈乙酸酯衍生物。色谱条件：HP-5(30m×0.32mm×0.25μm)弹性石英毛细管色谱柱；载气：氮气；检测器：氢火焰离子化检测器(FID)；柱温：柱室起始温度 120℃，保留 5min，程序升温 10℃/min，终止温度 250℃，维持 15min；检测器 280℃。

1.4.7 氨基酸组分的纸层析分析[8]：将胞外聚合物样品与 6~10 倍体积 6mol/LHCl 混合，置安瓿管内密封，105℃水解 18h，水解液加热蒸去 HCl，残渣溶于一定量双蒸水中即层析样品。新华 1 号滤纸展开，展层剂为：正丁醇：丙酮：水：冰乙酸=10：3：6：2 (V/V)，显色剂为 0.2%茚三酮丙酮溶液，65℃显色 20min，与标准氨基酸进行比较，确定 EPS 中的氨基酸组成。

1.5 菌株产胞外聚合物现象的透射电镜和扫描电镜观察

将培养到对数生长中期的菌体，3000r/min 离心 10min，用去离子水洗去残余营养成分，进行透射电镜和扫描电镜的样品前期处理后[10]，观察菌体表面形态及形成的胞外聚合物。

2 结果和分析

2.1 高温产胞外聚合物细菌的筛选和鉴定

从油井采出水样中筛选出一株能够在 60℃高温生长，并且菌落呈黏液状的菌株，命名为 MS-1。经发酵培养，提取胞外聚合物，产量可达 1.1 g/L。该菌为革兰氏阳性菌，杆状，大小为 0.5μm~1.0μm×3.5μm~6.0μm，芽孢端生或次端生，周生鞭毛，能运动。生长温度 37℃~65℃，pH 耐受范围为 4.0~8.0，NaCl 生长浓度范围为 0~2%。培养 12h 的菌落形态及菌体显微镜照片见图 1。

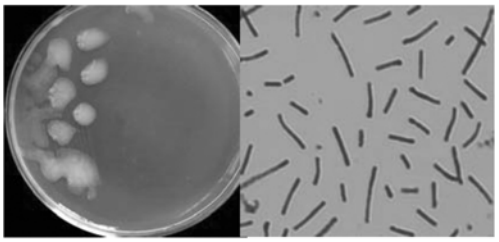

图 1 MS-1 菌落和菌体(1000×)的形态特征
Fig. 1 Clones of MS-1 and microscopic photograph(1000×).

菌株 MS-1 的 16S rDNA 长 1520bp，在 NCBI 数据库中注册序列号为 EF592490，将此序列与 GenBank 数据库中序列进行比对(图 2)，得到了 13 种细菌的匹配序列，用 Mega3.1 软件分析，得到系统进化树和进化距离。该菌株与史密氏芽孢杆菌(*Bacillus smithii* AY373319)的相似性高达 99.7%，结合培养及生理生化特征，将 MS-1 鉴定芽胞杆菌属，命名为 *Bacillus* sp. MS-1。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

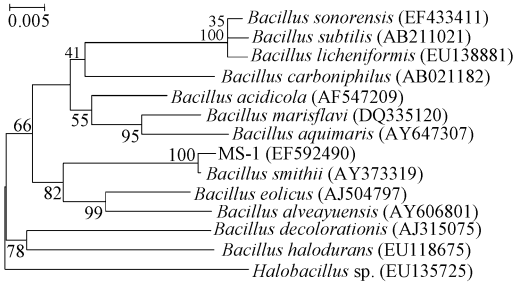

图 2 菌株 MS-1 与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain MS-1 and its relatives. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch point is the bootstrap support value (%) .

2.2 胞外聚合物的红外光谱分析

图 3 为 MS-1 胞外聚合物(EPS)的红外光谱图，3440cm^{-1}~3300cm^{-1} 的强吸收峰为 O-H 的伸缩振动吸收峰；2980cm^{-1}~2850cm^{-1} 和 1400cm^{-1}~1200cm^{-1} 是 C-H 的伸缩振动峰；1900cm^{-1}~1600cm^{-1} 之间的吸收峰是 C=O 的伸缩振动引起的；1390cm^{-1}~1350cm^{-1} 处的吸收是 CH_3 的变角振动；这几组是糖类的特征吸收峰。1626cm^{-1} 处为肽键上酰胺基的吸收峰，表明样品中含有蛋白；1154cm^{-1}~1030cm^{-1} 范围内存在低波数 1078.07cm^{-1}、1037.81 cm^{-1} 的强吸收，为葡萄糖的特征吸收。871cm^{-1} 附近的吸收峰是甘露糖的特征吸收峰。899cm^{-1} 附近的吸收峰是β-D 型吡喃糖的“2 型”谱带，800cm^{-1} 处的吸收峰是α-D-呋喃多糖的谱带，说明样品中同时存在β-D-吡喃多糖和α-D-呋喃多糖。

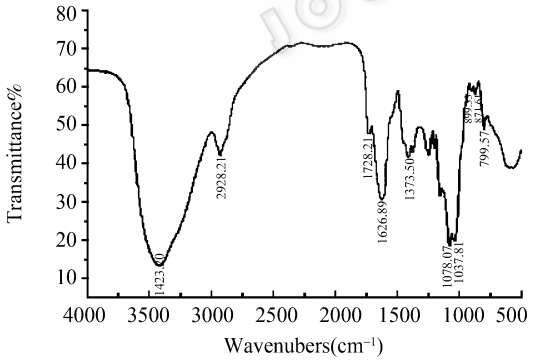

图 3 MS-1 菌株 EPS 的红外光谱图

Fig. 3 IR spectrum analysis of the EPS.

2.4 胞外聚合物的组分分析

2.4.1 EPS 中多糖含量的测定：用葡萄糖作为标准品制备标准曲线，以葡萄糖的质量浓度(mg/mL)为横坐标，以 490nm 处的吸收值(A)为纵坐标，绘制标准曲线，经回归处理得线性回归方程 $y=0.7417x+0.013$($R^2=0.9969$)。样品经多次测定多糖含量为 54.5%~48.3%，平均为 51.3%。

2.4.2 EPS 中蛋白含量的测定：用结晶牛血清蛋白作为标准品制备标准曲线，以其质量浓度(mg/mL)为横坐标，595nm 处的吸收值(A)为纵坐标，绘制标准曲线，经回归处理得线性回归方程 $y=2.937x+0.2181$ ($R^2=0.9924$)。经多次测定蛋白质含量在 37.2%~42.4%之间，平均含量 40.5%。

用乙醇提取的胞外聚合物存在多糖和蛋白质两种高分子，蛋白质成分包括了游离蛋白和结合在多糖上的蛋白。Sevage 法是从多糖溶液中脱除游离蛋白的一种较温和的方法，这种方法一次只能脱除少量的蛋白，所以需要多次脱蛋白，并且可能损失一部分多糖。对 MS-1 胞外聚合物的测定证明，多次抽提后仍存在大量蛋白质，所以该聚合物可能是一种糖蛋白。

2.4.3 多糖组分分析：EPS 样品经酸水解在层析图谱中呈现 R_f 值很接近的单糖斑点，如图 4。表明样品由 R_f 值相近的几种单糖组成。与样品斑点相近的单糖标准品有葡萄糖、半乳糖、甘露糖、山梨糖以及阿拉伯糖。

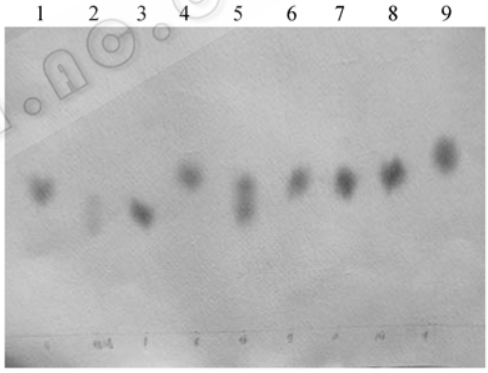

图 4 MS-1 产 EPS 酸水解成单糖后纸层析

Fig. 4 Paper chromatography of monosaccharide. 1. Glucose; 2. Glucuronic acid; 3. Galactose; 4. Fructose; 5. Sample; 6. Mannose; 7. Sorbose; 8. Arabinose; 9. Xylose.

为进一步确定单糖组分进行了气相色谱分析，图 5-A 是几种混合单糖标准品衍生物的色谱图，山梨糖在单独进行气相色谱时发现出现了 4 个明显的峰而不是单一的峰，推测山梨糖在衍生过程中生成了其他物质，所以在混合单糖标准品的气相色谱分析时只包括了鼠李糖(Rha)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)和阿拉伯糖(Ara)。图 5-B 是样品衍生物的气相色谱图，表明样品是由 3 种单糖组成，与标准品的出峰时间对照可以看出这 3 个峰分别对应的是甘露糖、葡萄糖和半乳糖(表 1)。用积分的方法(即面积归一法)计算样品气相色谱图中各峰的面积比例分别 51.8%、25.4%和 22.8%，可以得出甘露糖、葡萄糖和

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

半乳糖的摩尔比分别是 2.04∶1.00∶0.89。这个结果与红外光谱的分析也是一致的。

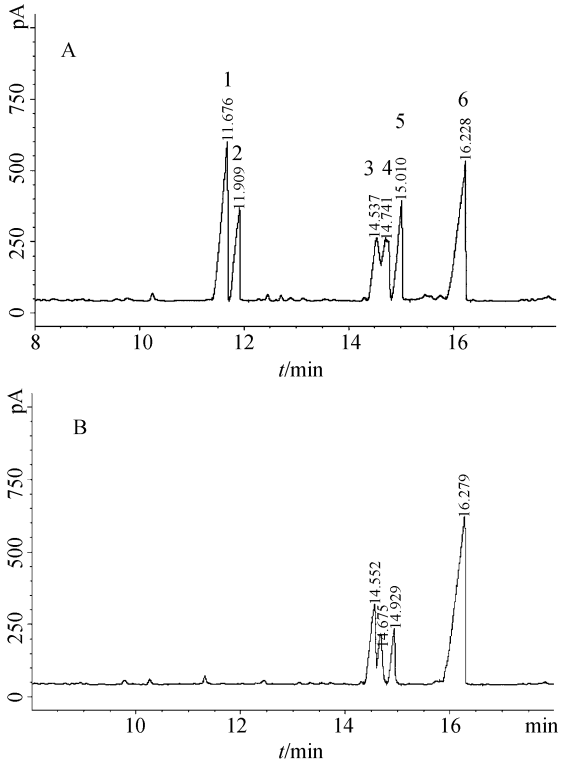

图 5 标准单糖混合物和 **MS-1** 的 **EPS** 中单糖衍生物的气相色谱图

Fig. 5 Gas Chromatography of monosaccharide standard and EPS hydrolyzed from MS-1. A: Gas Chromatography of monosaccharide standard; B: Gas Chromatography of EPS hydrolyzed from MS-1. 1. Rhamnose; 2. Arabinose; 3. Mannose; 4. Glucose; 5. Galactose; 6. Internal standard of inositol.

2.4.4 EPS 中蛋白的氨基酸分析：精制的 EPS 样品水解后进行蛋白组分的纸层析分析，结果显示(图 6)胞外聚合物的蛋白部分主要由甲硫氨酸、亮氨酸、天门冬氨酸、丙氨酸、组氨酸和丝氨酸组成。

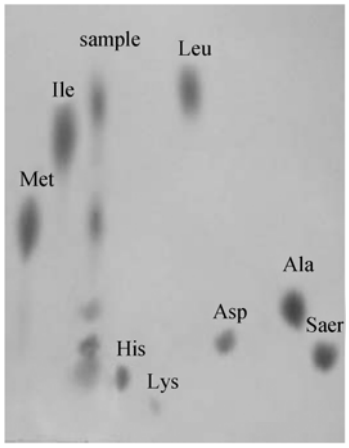

图 6 **MS-1** 蛋白水解后氨基酸样品纸层析

Fig. 6 Paper chromatography of amino acid.

2.5 菌株 MS-1 产胞外聚合物的电镜观察

通过透射电镜可以观察到，在菌体生长初期胞外多糖分泌较少(图 7-A)，当细菌生长到后期(鞭毛逐渐脱落)，向胞外分泌出大量细丝状的多糖产物(图 7-B)。

采用环境扫描电镜技术观察(图 8)，发现细菌向周围分泌大量胞外聚合物，聚合物和菌体一起可形成生物膜。实验从微观上表明了菌株 MS-1 能在高温环境下产聚合物并形成菌膜，从而对岩孔起到封堵作用。

表 1 单糖衍生物和 **MS-1** 的 **EPS** 中单糖衍生物的出峰时间

Table 1 GC peak time of monosaccharide standard and EPS hydrolyzed from MS-1

Monosaccharide	Rha	Ara	Man	Glu	Gal	inositol
Peak time of monosaccharide standard(min)	11.676	11.909	14.537	14.741	15.01	16.228
Peak time of EPS hydrolyzed (min)	–	–	14.554	14.675	14.931	16.278

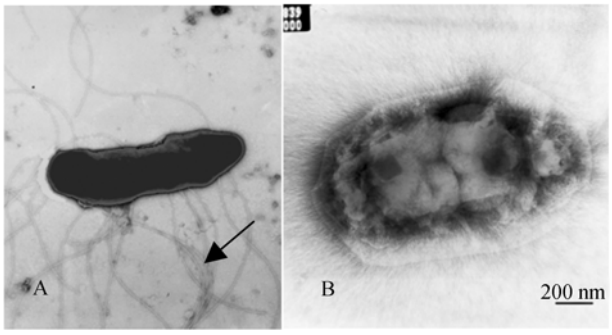

图 7 透射电镜观察 **MS-1** 分泌胞外多糖

Fig. 7 TEM photo of MS-1 excreting exopolysaccharides. A: Cell without EPS production. Arrow: flagella (14500×); B: Exopolysaccharides excreted radially (34000×).

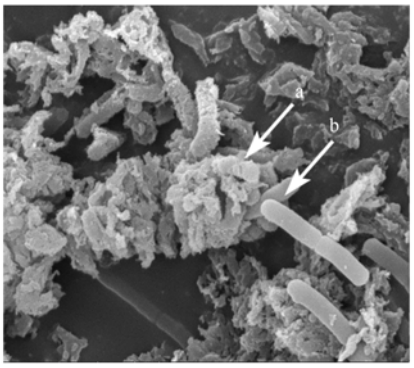

图 8 环境扫描电镜观察 **MS-1** 产生的胞外聚合物 (20000×)

Fig. 8 ESEM Photo of MS-1in the core (20000×). a: Biofilm formed by MS-1; b: Strains.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

3 结论

从筛选产胞外聚合物菌株的过程来看，有时需要在固体平板和发酵培养基中加入糖，来诱导聚合物的生成。菌落形态呈粘液状的菌株具有产胞外多糖的能力。特别是培养在含葡萄糖的平板上，粘性的菌落形态表现的更加明显。

Bacillus sp.MS-1 能在 60℃高温下产胞外聚合物。产物分析表明，该聚合物含有多糖和蛋白，应是一种糖蛋白。其中多糖部分主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖组成，摩尔比分别是 2.04∶1.00∶0.89。蛋白部分主要由甲硫氨酸、亮氨酸、天门冬氨酸、丙氨酸、组氨酸和丝氨酸组成。胞外聚合物在细菌的粘附，生物膜的形成，以及抵抗极端生存环境中都起到了很重要的作用[11]。

高温菌株 *Bacillus* sp.MS-1 的分离和研究扩展了微生物调剖的应用范围，能够适用于油藏温度较高的油田进行微生物调剖，对高渗透层带进行选择性封堵，扩大注水波及范围，从而提高原油采收率[12]。

参 考 文 献

[1] Lee HO, Bae JH. Effects of variables on microbial profile modification with spores. *SPE*39671, 1998.

[2] McCool CS, Shaw AJ, Singh A, *et al*. Permeability reduction by treatment with KUSPI biopolymer systems. *SPE* 40065, 1998.

[3] 罗强，蒲万芬，罗敏，等. 微生物调剖机理及应用.地质科技情报(*Geological Science and Technology Information*), 2005, 24(2): 101–104.

[4] Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 1981, 35: 299–305.

[5] Sambluke J, Flichi EF, Manniartis T.分子克隆实验指南. 金冬雁等译. 第三版，北京：科学技术出版社, 2002.

[6] Ortega-Morales BO, Santiago-García JL, Chan-Bacab MJ, *et al.* Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102 (1): 254–264.

[7] 王忠民，王跃进，周鹏. 苯酚—硫酸法测定葡萄多糖含量.新疆农业大学学报(*Journal of Xinjiang Agricultural University*), 2004, 27(2): 87–90.

[8] 李建武. 生物化学实验原理和方法.第二版. 北京:北京大学出版社,1994,174-176.

[9] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 第一版. 上海：上海科学技术出版社, 1989, 41–43.

[10] 张丰德，吕宪禹. 现代生物学技术.第三版. 天津：南开大学出版社, 2005.

[11] Schiano V, Moriello L, Lama A, *et al*. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30: 95–101.

[12] 冯庆贤，陈智宇. 耐高温采油微生物的研究与应用. 石油勘探与开发(*Petroleum Exploration and Development*), 2000, 27(3): 50–52.

Isolation of a thermophilic bacterium and analysis of its extracellular polymeric substance

Jing Liu[1], Jun Wang[1], Xinyu Bai[2], Ting Ma[1], Fenglai Liang[1], Rulin Liu[1*]

([1] *College of Life Sciences , Nankai University, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin* 300071, *China*)

([2] *The Xinglongtai Exploit Factory of Liaohe Oilfield Company, Panjin* 124010, *China*)

Abstract: A thermophilic bacterial strain MS-1 was isolated from the water let from an oil well, and identified as *Bacillus* sp. by its 16S rDNA sequence and morphological characteristics. The bacterium was able to grow at 60℃ and produce extracellular polymeric substance (EPS). Analysis of the EPS showed that there was 48.3%~54.5% polysaccharide, which was composed of mannose:glucose:galactose at a ratio of 2.04∶1.00∶0.89. The protein fraction was 37.2%~42.4% in EPS, containing methionine, leucine, aspartic acid, alanine, histidine and serine.Transmission Electron Microscopy and Environmental Scanning Electron Microscopy were used to observe the extracellular polymeric substances. The strain is useful in microbial profile modification in high temperature oil fields.

Keywords: high temperature; *Bacillus* sp.; extracellular polymeric substances; microbial profile modification

Supported by the National Natural Science Foundation (50674058) and the Tianjin Natural Science Foundation Key Project (07JCZDJC03200)

[*]Corresponding Author: Tel∶+ 86-22-23505967; E-mail : meor@nankai.edu.cn

Received: 9 October 2007/Revised: 26 November 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn