

一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离、鉴定及代谢产物特征

黎霞¹, 承磊¹, 汪卫东², 邓宇¹, 尹小波¹, 张辉^{1*}

(¹农业部沼气科学研究所, 成都 610041)

(²中国石化胜利油田采油工艺研究院, 东营 257000)

摘要:【目的】了解油藏环境中细菌的生理生化特性及代谢产物。【方法】采用 Hungate 厌氧操作技术从胜利油田罗 801 区块油层采出水分离到一株厌氧杆菌 SC-2。采用生理生化鉴定结合 16S rDNA 序列的系统发育学分析确定该菌株的系统发育地位, 用气相色谱分析其代谢产物。【结果】菌株 SC-2 为严格厌氧的革兰氏阴性杆菌, 菌体大小为 0.38 μm \times 1.7 μm ~3.9 μm , 单生、成对或成串生长, 产端生芽孢。温度生长范围 40 ~75 (最适温度 70); pH 范围 5.5~9.5 (最适 pH 6.5); NaCl 浓度范围 0%~5% (最适 NaCl 浓度 0%)。能够利用葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、木糖等多种碳水化合物, 发酵葡萄糖的产物是乙醇、乙酸、丙酸、 H_2 、 CO_2 及少量的乳酸。菌株 SC-2 的 (G+C) mol% 含量为 30.8%, 与 *Thermoanaerobacter mathranii* subsp. *mathranii* 的 16S rDNA 序列相似性为 99.85%。菌株利用葡萄糖产乙酸、乙醇的最佳初始 pH 为 8.0; 酵母粉能刺激生长并显著提高发酵葡萄糖的产酸、产醇率; 培养基中添加 4% (V/V) 的乙醇能明显抑制菌体生长。【结论】菌株 SC-2 是从特殊生境(油层采出水)中分离到的一株嗜热、耐盐的厌氧菌, 其发酵葡萄糖产生的代谢产物有利于改善油藏中的微环境。菌株 SC-2 与 *T. mathranii* subsp. *mathranii* 11426^T 的最适 pH 和最大耐受 NaCl 浓度有所不同, 且二者的 (G+C) mol% 含量差异较大。

关键词: 热厌氧细菌; 鉴定; 产酸、产醇特性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-0995-06

油藏是个特殊的缺氧生境, 具有独特的理化特征(温度、盐度、pH)^[1]。根据生理特性可将油藏中的厌氧微生物分为发酵细菌 (Fermentative bacteria)、硝酸盐还原菌 (Nitrate-reducing bacteria)、铁还原菌 (Iron-reducing bacteria)、硫酸盐还原菌 (Sulphate-reducing bacteria) 和产甲烷古菌 (Methanogenic archaea)^[2]。嗜热发酵细菌广泛分布于不同条件的油藏环境中^[3], 大多数的嗜热发酵细菌属于嗜热厌氧杆菌科 (Thermoanaerobiaceae) 和热袍菌目 (Thermotogales), 其中嗜热厌氧杆菌科包括了热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 和嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoan-*

aerobacterium)。热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 是一类能利用碳水化合物的异养嗜热菌^[4], 目前分离到的热厌氧杆菌共有 17 个种和 5 个亚种。其中分离自油藏环境的共有 3 个种, 即 1995 年 L'Haridon 等分离到的 *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*^[5], Cayol 等分离的 *Thermoanaerobacter Brockii* subsp. *lactiethylicus* SEBR 5268^T^[6]。Fardeau 等分别于 2000 年和 2004 年分离到 *Thermoanaerobacter subterraneus* SEBR 7858^T、SL9 和 OCA1^[4,7]。菌株 SC-2 是首株分离自国内油藏的热厌氧杆菌, 能利用葡萄糖产生乙醇、乙酸、丙酸、 H_2 、 CO_2 及少量的乳酸。

基金项目: 国家自然科学基金资源平台项目(2005DKA21201); 中国石化集团重点基础研究项目(P06071-3)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

作者简介: 黎霞(1979-), 女, 四川德阳人, 硕士研究生, 主要从事能源微生物研究。E-mail: xiaxiali@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-01-06; 修回日期: 2008-04-21

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:样品取自胜利油田罗801区块的油层采出水,油藏埋深1680 m~1800 m,地层温度75~80℃,压力系数约为1.0,饱和压力9.24 MPa,总矿化度9794 mg/L,采集的样品立即放入密封瓶中送至实验室富集培养。

1.1.2 主要试剂和仪器:酵母粉购于OXOID试剂公司,蛋白胨购于北京奥博星生物技术有限公司,16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit试剂盒和Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0试剂盒均购于TaKaRa公司。BH-2荧光相差显微镜购于OLYMPUS公司,721型分光光度计购于上海第三分析仪器厂,气相色谱GC-7AG购于日本岛津(Shimadzu)公司,DU800 spectrophotometer 购于Beckman公司。

1.2 菌种的培养方法

用于分离及培养的基础培养基均采用改良的144^[8]培养基(DSMZ)(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)(1 L蒸馏水):不加入FeSO₄·7H₂O和胰蛋白胨,并将酵母粉和微量元素-141^[9]含量分别修订为0.2 g和9 mL,加入0.5 g L-半胱氨酸盐酸盐-水,除温度实验外均于65℃培养。按照Hungate厌氧操作法进行滚管分离获得单菌落^[10]。

1.3 形态观察

采用相差显微镜和扫描电子显微镜观察菌体形态,电镜照片的制作参见文献[11]。

1.4 生理生化特性鉴定

采用葡萄糖(1%)作为碳源,其中pH实验分别采用1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH和2 mol/L NaOH溶液调至pH4~10;对于生长NaCl浓度范围,灭菌前调整NaCl浓度为0%~6%。最适生长条件下菌株的倍增时间测定采用监测菌体密度,取对数生长期菌体密度作非线性回归,计算得到倍增时间。底物实验采用不含酵母粉的培养基,用各种不同碳源代替葡萄糖(终浓度均为5 g/L)^[12]。培养基灭菌后加入不同抗生素(终浓度为100 μg/mL),测定菌体密度以确定菌株对不同抗生素的抗性。

1.5 16S rDNA序列扩增、测序及系统发育树构建

1.5.1 PCR扩增:挑取单菌落细胞至50 μL灭菌双蒸水,沸水水浴10 min,离心。取上清液进行PCR扩增,反应采用50 μL体系,反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 50~55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30个

循环;72℃ 5 min。回收PCR产物,由大连宝公司测序。1.5.2 构建系统发育树:提交菌株SC-2的16S rDNA序列在EMBL数据库中进行比对,选取与之相似性最高的16株热厌氧杆菌和1株热袍菌的16S rDNA序列进行Clustalx比对,MEGA3.1分析,采用Neighbor-Joining构建系统发育树,Bootstrap 1000次进行稳定性验证。

1.6 (G+C)mol%含量的测定

根据热变性温度法^[13](T_m值法)测定基因组(G+C)mol%。测定菌株DNA的热变性温度(T_m值),同时测定*E.coli* K12的T_m值。根据公式(G+C)mol%=51.2+2.08×[T_m(X)-T_m(K12)]计算出(G+C)mol%。

1.7 不同培养条件对代谢产物的影响

研究不同培养条件下菌株SC-2的代谢产物情况,实验如下:配制不同初始pH的培养基(葡萄糖1%);分别配制含有0.5%麦芽糖、纤维二糖、木糖、葡萄糖和淀粉的培养基;分别配制含有和不含0.02%酵母粉及蛋白胨的培养基。

1.8 代谢产物对菌株生长的影响

分别配制含有0%~4%(V/V)乙醇的培养基(1%葡萄糖,pH7.0),接种(接种量5%)于65℃培养3 d后测定OD₆₀₀以确定不同浓度的乙醇对菌株SC-2生长的影响。

2 结果和分析

2.1 菌株形态学

菌株SC-2是严格厌氧菌,呈直杆状,革兰氏染色呈阴性,无鞭毛,不运动,直径0.38 μm,长1.7 μm~3.9 μm,单生、成对或成串生长,产端生芽孢(图1)。菌株在葡萄糖固体培养基中滚管、培养7 d后形成白色菌落,圆形、湿润,直径大约1 mm,边缘整齐。



图1 菌株SC-2扫描电镜照片(8500×)
Fig. 1 Electron micrograph of strain SC-2(8500×).

2.2 生理生化特征

2.2.1 生理特征 菌株 SC-2 的温度范围为 40 ~ 75 °C，最适生长温度为 70 °C。pH 范围为 5.5 ~ 9.5，最适 pH 为 6.5 (图 2)。菌株 SC-2 在 pH 7.0、温度 65 °C 时，最适 NaCl 浓度为 0%，能耐受 5% 的 NaCl (图 3)。菌株的比生长速率 (μ_m) 为 0.92/h，倍增时间为 65 min (pH 6.5, 70 °C)。

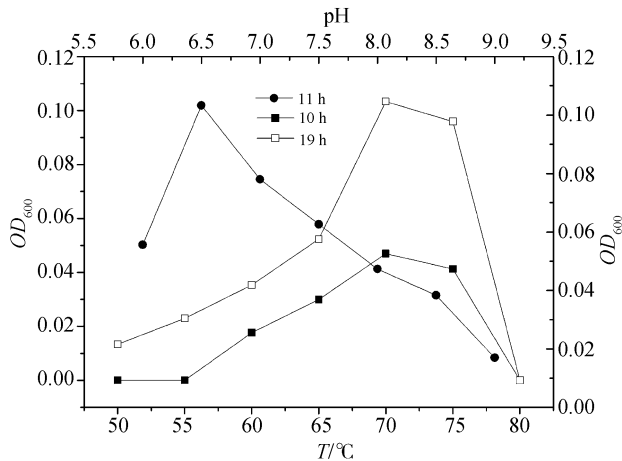


图 2 不同温度和 pH 对菌株 SC-2 生长的影响

Fig. 2 The effect of temperature and pH on the growth of strain SC-2.

2.2.2 生化特征：底物实验结果表明，菌株 SC-2 能利用的底物包括苦杏仁苷、树胶醛糖、纤维二糖、果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、松三

糖、棉子糖、核糖、蔗糖、木糖、淀粉、酵母粉、酪蛋白胨。不能利用半乳糖、甘油、鼠李糖、水杨苷、山梨糖醇、阿拉伯糖、蛋白胨、羧甲基纤维素钠、木聚糖。菌株 SC-2 在 65 °C 144 培养基中利用葡萄糖发酵的产物为乙醇、乙酸、 H_2 、 CO_2 及少量的乳酸。抗生素实验结果表明，菌株对氨苄青霉素、硫酸链霉素和卡那霉素有抗性；对红霉素、利福平、氯霉素、新霉素、四环素敏感。

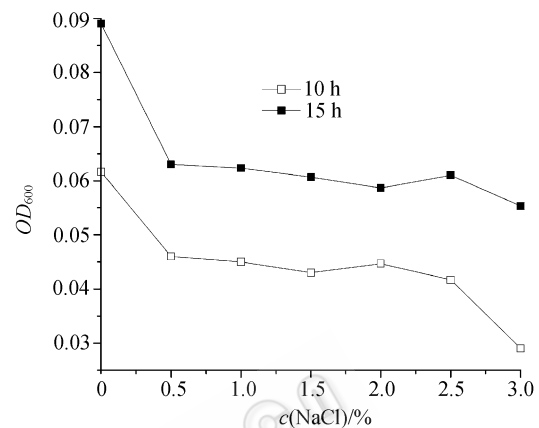


图 3 不同盐浓度对菌株 SC-2 生长的影响

Fig. 3 The effect of salinities on the growth of strain SC-2.

2.3 16S rDNA 序列的测定及系统发育树构建

菌株 SC-2 的 16S rDNA 部分序列长 1456 bp，在 GenBank 核酸登录号为 EF026571。根据菌株

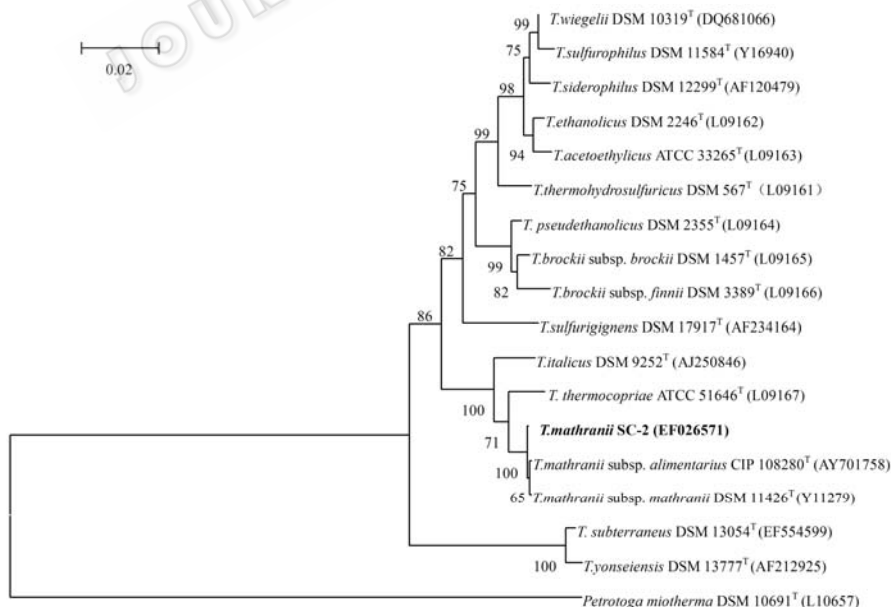


图 4 基于 16S rDNA 序列相似性构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 1456 bp-fragment of 16S rDNA sequences. The tree rooted with *Petrotoga miotherma* was constructed by the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1000 trees. The numbers at each clustering node indicate the percentage of bootstrap supporting, and in the brackets after each bacterial name are 16S rDNA accession numbers in GenBank. (Bar, 2% sequence divergence; T, type strain).

SC-216S rDNA 测序结果进行 BLASTn 分析, 菌株 SC-2 与 *T. mathranii* subsp. *mathranii* 11426^T 相似性为 99.85%, 与 *T. mathranii* subsp. *alimentarius* AIP 505.99^{T[14]} 相似性为 99.78%。菌株 SC-2 与热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 其他菌株的系统发育分析结果见图 4。

2.4 菌株 SC-2 的产乙酸、产乙醇特性

2.4.1 不同初始 pH 对代谢产物的影响: 接种不同初始 pH (5.5~8.5) 的 144 培养基 (葡萄糖 1%, 接种量 1.5%), 65 培养 3 d 后测定发酵液中最终的乙酸和乙醇量。实验结果表明 (图 5、6), 初始 pH 为 8.0 时产酸、产醇量最大。

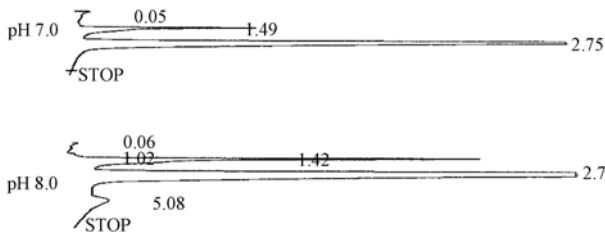


图 5 初始 pH7.0、8.0 的代谢产物色谱图
Fig. 5 Gas chromatograms of end products from glucose at pH 7.0 and 8.0. Retention time of ethanol is 1.42–1.49 min, and retention time of acetate is 2.7–2.8 min.

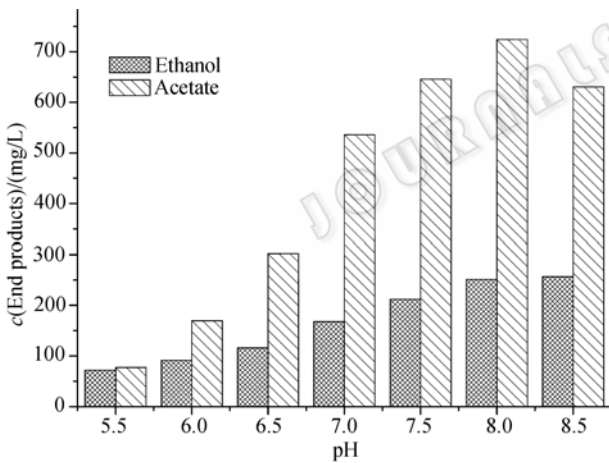


图 6 不同初始 pH 对代谢产物的影响
Fig. 6 The effect of different initial pH on end products.

2.4.2 不同碳源对代谢产物的影响: 将菌株 SC-2 的菌液接种到无机盐的 144 (不含碳源) 培养基中, 以连续转培养 2 代的菌液作为菌种接种到含有不同碳源 (碳源终浓度为 0.5%, 接种量 1%) 的无机盐培养基中, 于 65 培养 3 d 后测定发酵液中的产物量。结果表明 (表 1), 菌株 SC-2 发酵碳水化合物主要产生乙酸, 其中利用淀粉的乙酸产量最大。

表 1 不同碳源为底物的产醇、产酸量

Table 1 Fermentation and products from different carbon sources

Fermentation end products / (mg/L)	Different carbon sources				
	Maltose	Cellobiose	Xylose	Glucose	Starch
Ethanol	6.8	29.4	18.2	11.3	20.5
Acetate	79.5	111.5	144.6	108.9	181.7
Propionate	9.7	9.0	12.6	32.4	17.1

2.4.3 不同氮源对代谢产物的影响: 分别接种菌株 SC-2 于含有和不含酵母粉及蛋白胨 (0.02%) 的 144 培养基中 (接种量 1%), 65 培养 3 d 后测定发酵液中的产物量。分析结果显示, 加入 0.02% 的酵母粉能显著刺激菌株的产醇量和产酸量 (图 7), 使产乙醇量和产乙酸量由 0.2 mmol/L、0.35 mmol/L 分别增加到 5.48 mmol/L 和 2.45 mmol/L, 并且加入酵母粉可以改变菌株利用葡萄糖的代谢产物, 使乙醇成为主要的代谢产物。培养基中加入蛋白胨对菌株的生长及代谢几乎没有影响。

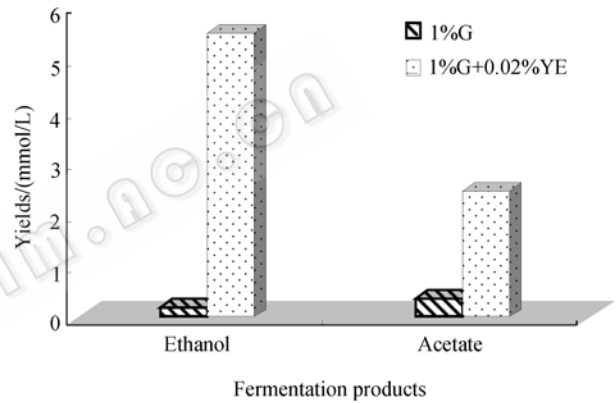


图 7 酵母粉对菌株的刺激作用
Fig. 7 The effect of Yeast extract on strain SC-2.

2.5 代谢产物对菌株生长的影响

乙醇是菌株 SC-2 发酵葡萄糖的主要代谢产物之

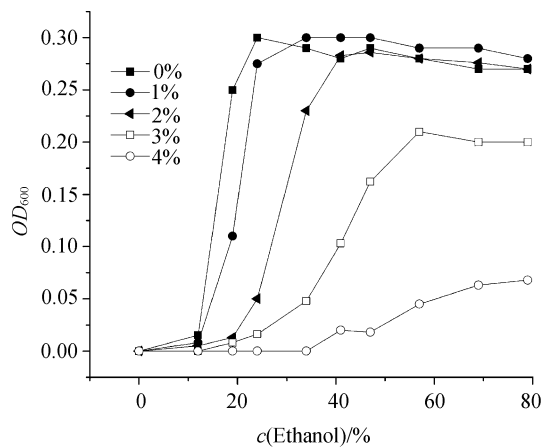


图 8 不同乙醇浓度对菌株 SC-2 生长的影响
Fig. 8 The effect of exogenously added ethanol(V/V) on the growth of strain SC-2.

一,由于产物的反馈抑制作用,乙醇能够影响菌株的生长。从图 8 可知,培养基中添加 2%的乙醇仅能延迟菌株的生长对数期,达到稳定期时菌体密度几乎不受影响;加入 3%的乙醇只能部分抑制菌株生长,但当乙醇浓度达到 4%时,菌体生长明显受到抑制。

3 讨论

(1) *T. mathranii* 目前包括两个亚种 *T. mathranii* subsp. *mathranii* 和 *T. mathranii* subsp. *alimentarius*, 菌株

SC-2 16S rDNA 序列的相似性与 *T. mathranii* subsp. *mathranii* 11426^T 最高 (99.85%), 从系统发育学上分析该菌株属于 *T. mathranii* subsp. *mathranii*。但菌株 SC-2 的最适 pH、最大耐受 NaCl 浓度及分离生境与 11426^T 有所不同,特别是二者 (G+C) mol%差异较大。同时,菌株 SC-2 与 AIP505.99^T 在最适温度、底物的利用、(G+C) mol%及分离生境上也存在着一定的差异(表 2)。因此推测,菌株 SC-2 可能属于新的亚种,进一步分类地位的确定需通过 DNA 杂交实验完成。

表 2 菌株 SC-2 与亲缘关系密切的细菌的特征比较
Table 2 Characteristics differentiating strain SC-2 from most closely strains

Characteristics	SC-2	<i>T. mathranii</i> subsp. <i>mathranii</i> 11426 ^T [12]	<i>T. mathranii</i> subsp. <i>alimentarius</i> [14]		
			AIP 505.99 ^T	AIP 504.99	AIP 431.03
Gram staining	-	V	-	-	-
Spores	Terminal	Terminal	No spores	No spores	No spores
Optimal growth temperature/	70	70~75	55~60	ND	ND
Optimal pH	6.5	7.0	ND	ND	ND
Generation time/min	65	74	ND	ND	ND
Growth in presence of ethanol:					
1%	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	+
4%	w	+	w	w	-
(G+C) mol%	30.8	37	31.5	ND	32.3
Isolated from	oil-production water	Hot spring in Iceland	Canned meat	Canned meat	Fermented milk

+ , positive; -, negative; V, variable; w, weak reaction; ND, not determined.

(2) 菌株 SC-2 能利用葡萄糖产生 H₂、CO₂ 及小分子的有机酸(醇),同时,加入微量的酵母粉即能显著地提高菌株的产酸(醇)量。在油藏环境中这些有机酸(醇)可有效地溶解储油岩层空隙中沉积的碳酸盐、硅酸盐等,增大油层的空隙度和渗透率,改善原油的流动环境^[15]。H₂ 和 CO₂ 有助于克服储层对原油的束缚力,降低原油粘度,改善其流动性^[16]。

(3) 嗜热发酵细菌广泛分布于高温油藏中,并在大量非注水油藏中也发现了嗜热发酵细菌的存在^[3],表明这些微生物可能是油藏中主要的微生物类群,但对于发酵细菌在油藏中的生态功能及其在油藏中的代谢作用还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Magot M, Ollivier B, Patel BKC. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 77: 103-116.
- [2] 承磊, 仇天雷, 张辉等. 油藏厌氧微生物研究进展. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 2006, 12: 740-744.
- [3] Grassia GS, McLean KM, Glenat P, *et al.* A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiol Ecol*, 1996, 21: 47-58.
- [4] Fardeau ML, Magot M, Patel BKC, *et al.* *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oilfield water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 2141-2149.
- [5] L'Haridon S, Reysenbach AL, Glenat P, *et al.* Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. *Nature*, 1995, 377: 223-224.
- [6] Cayol JL, Ollivier B, Patel BK, *et al.* Description of *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *lactiethylicus* subsp. nov., isolated from a deep subsurface French oil well, a proposal to reclassify *Thermoanaerobacter finnii* as *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finnii* comb. nov., and an emended description of *Thermoanaerobacter brockii*. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45: 783-789.
- [7] Fardeau ML, Salinas MB, L'Haridon S, *et al.* Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter sub-*

- terraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 467–474.
- [8] Slobodkin AI, Tourova TP, Kuznetsov BB, et al. *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49: 1471–1478.
- [9] Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1979, 43: 260–296.
- [10] Balch WE, Wolfe RS. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 32: 781–791.
- [11] 仇天雷, 承磊, 邓宇等. 一株近海沉积物中产甲烷菌的分离及鉴定. *中国沼气 (China Biogas)*, 2007, 25: 3–6.
- [12] Larsen L, Nielsen P, Ahring BK. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch Microbiol*, 1997, 168: 114–119.
- [13] Mandel M, Marmur J. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol*, 1968, 12: 195–206.
- [14] Carlier JP, Bonne I, Bedora-Faure M. Isolation from canned foods of a novel *Thermoanaerobacter* species phylogenetically related to *Thermoanaerobacter mathranii* (Larsen 1997): emendation of the species description and proposal of *Thermoanaerobacter mathranii* subsp. *alimentarius* subsp. nov. *Anaerobe*, 2006, 12: 153–159.
- [15] 伍晓林, 侯兆伟, 陈坚等. 采油微生物发酵液中有有机酸(醇)的 GC-MS 分析. *大庆石油地质与开发 (Petroleum Geology & Oilfield Development in Daqing)*, 2005, 24: 93–95.
- [16] 洪新, 杨翔华, 唐克. 利用微生物提高采油率. *辽宁石油化学大学学报 (Journal of Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology)*, 2004, 24: 43–46.

Isolation and characterization of *Thermoanaerobacter mathranii* SC-2 from oil-field water

Xia Li¹, Lei Cheng¹, Weidong Wang², Yu Deng¹, Xiaobo Yin¹, Hui Zhang^{1*}

⁽¹⁾Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China)

⁽²⁾Oil Production Technology Research Institute, Shengli Oilfield Co., Ltd, Dongying 257000, China)

Abstract: [Objective] We studied physiological, biochemical properties and metabolites of *Thermoanaerobacter mathranii* SC-2 from oil-field water in Shengli oilfield. **[Methods]** Strain SC-2 was isolated by Hungate anaerobic technique. Through physiological, biochemical and phylogenetic analysis, the strain was identified. Metabolites were analyzed by gas chromatogram. **[Results]** The cells were Gram-negative, rod-shaped, spore-forming. Growth was observed in the temperature range from 40 to 75 (optimum 70 °C) and pH range from 5.5 to 9.5 (optimum 6.5). The isolate grew in the presence of 0%~5% NaCl with an optimum without NaCl at pH 7.0 and 65 °C. Strain SC-2 used many carbohydrates as carbon sources, including glucose and xylose. Metabolites of glucose were ethanol, acetate, propionate, lactate, CO₂ and H₂. Based on 16S rDNA studies, strain SC-2 was most close to *T. mathranii* subsp. *mathranii*11246^T with 99.85% similarity. More ethanol and acetate were produced at initial pH 8.0 than yields at other pH. Yeast extract could significantly increase ethanol and acetate yields. In addition, ethanol (4%) added in the medium obviously inhibited its growth. **[Conclusion]** Strain SC-2 was extremely thermophilic, halotolerant anaerobe.

Keywords: thermophilic anaerobic bacterium; identification; ethanol producing and acetate producing characteristics

Supported by the National Infrastructure of Natural Resources for Sci-tech of China(2005DKA21201) and the Program for Petrochemical Corporation of China (P06071-3)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-85258573; E-mail: zhanghuits@yahoo.com.cn

Received: 6 January 2008/ Revised: 21 April 2008