

## 胜利油田单 12 高温油藏非培养和富集培养样品的 细菌组成特性

袁三青<sup>1</sup>, 薛燕芬<sup>1\*</sup>, 汪卫东<sup>2</sup>, 李希明<sup>2</sup>, 马延和<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(<sup>2</sup> 胜利油田采油工艺研究院, 东营 257000)

**摘要:**【目的】通过比较分析油藏样品的微生物群落结构特点,认识油藏微生物的生态功能。【方法】利用 3 种油藏微生物研究中常用的富集培养方法,对胜利油田单 12 区块 S12-4 油井产出水样品进行了选择性富集培养,运用构建 16S rRNA 基因文库的方法分析了富集样品和非培养样品的细菌多样性。【结果】通过 16S rRNA 基因序列比对发现,非培养样品、异养菌富集样品、烃降解菌富集样品和硫酸盐还原菌富集样品中的优势菌分别为 *Pseudomonas* 属, *Thermotoga* 属, *Thermaerobacter* 属和 *Thermotoga* 属的成员。多样性分析结果表明,非培养样品的微生物多样性最丰富,同时非培养样品和富集样品的微生物群落结构存在很大的差异,富集样品中的微生物包括优势菌在油藏原位环境中含量很低。【结论】细菌组成差异的比较结果,对油藏微生物的生态功能研究和微生物驱油潜力评估具有重要意义。

**关键词:** 油藏; 非培养; 富集培养; 16S rRNA 基因文库

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1082-06

油藏是一种独特的极端生态环境,这种环境孕育了丰富的微生物类群,是极端微生物的重要组成部分,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<sup>[1~3]</sup>。异养菌、烃降解菌和硫酸盐还原菌是油藏中最常见的微生物<sup>[1]</sup>,由于它们在油藏微生物生态中的重要地位以及对微生物采油的重要意义而受到重视。从事微生物采油的科学工作者通过选择性富集培养的方法,或统计油藏中这 3 种代谢类型微生物的含量,或用于分离纯培养物,来认识油藏微生物的生态特征,迄今为止,已经分离到许多的异养菌<sup>[1,4,5]</sup>、烃降解菌<sup>[1,6,7]</sup>和硫酸盐还原菌<sup>[1,8,9]</sup>。

本文通过这 3 种常用的富集培养方法,对胜利油田单 12 区块 S12-4 油井产出水样品进行选择性的富集

培养,构建了 3 个样品的 16S rRNA 基因文库,使我们更加精确的认识这些富集培养物的菌群组成。同时,结合非培养分析,进一步比较了这些富集培养样品与非培养样品的微生物多样性差异,从而为油藏微生物的研究和微生物采油的应用提供有益的参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:** 样品取自山东省东营市胜利油田单 12 区块 S12-4 油井的产出水,油层埋深 1370 m~1500 m,地层温度为 66 °C, pH 范围为 7.4~7.8,矿化度范围为 20000 mg/L 左右。

**1.1.2 培养基:** 异养菌培养基和硫酸盐还原菌培养基使用海豚牌 TGB-HX 型和 SRB-HX 型总数测试

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: +86-10-64807618; Fax: +86-10-64807616; 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

收稿日期: 2008-01-25; 修回日期: 2008-04-05

瓶(北京华兴化学试剂厂); 烃降解菌培养基见文献[10]。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 基因组提取试剂盒 UltraClean™ Soil DNA Kit 购自美国 MO BIO Laboratories 公司; 微孔滤膜购自北京华恒高科工程技术有限公司; PCR 反应体系和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; pGEM-T Easy Vector Systems 和连接试剂购自 Promega 公司; DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司; PCR 扩增引物由上海博亚生物技术公司合成; 测序工作由北京诺赛基因公司和上海生工公司完成; PCR 仪 (BIO-RAD MyCycler™); 电转仪 (BIO-RAD MicroPulser™); 电泳仪 (BIO-RAD)。

## 1.2 富集培养

油藏样品从现场取回后立即接种于培养基中培养, 异养菌培养和硫酸盐还原菌的培养按照产品说明书进行, 置于 60 °C 培养。异养菌培养 5 d 转接 1 次, 而硫酸盐还原菌 2 周转接 1 次, 共转接 3 次。

烃降解菌接种是在 2 倍浓度的烃降解菌培养基中加入等量的水样, 然后置于 60 °C 温箱静止培养, 2 周转接 1 次, 共转接 3 次。

## 1.3 总 DNA 的提取

**1.3.1 非培养样品:** 取水样 1~2 L 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 0.22 μm 滤膜。用 STE 缓冲液将滤膜上的菌体洗下, 离心后得到细胞沉淀物, 用 UltraClean™ Soil DNA Kit (MO BIO) 提取总 DNA, 提取方法见产品说明, 提取的总 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后于 -20 °C 保存。

**1.3.2 富集培养样品:** 培养完成后取培养液离心后得到微生物菌体, 将获得的菌体用 UltraClean™ Soil DNA Kit 提取总 DNA, 提取的总 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后于 -20 °C 保存。

## 1.4 16S rRNA 基因文库的构建

**1.4.1 16S rRNA 基因扩增:** 各取 1 μL 总 DNA 作为模板进行 PCR, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACG-3' [10]); PCR 采用 50 μL 反应体系, 扩增条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。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。

**1.4.2 连接转化:** 纯化之后的 PCR 扩增产物使用

pGEM-T Easy vector System 试剂盒 (Promega) 连接, 连接产物转入感受态细胞大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α。

**1.4.3 ARDRA 分析:** 通过蓝白斑方法挑取白斑于 5 mL 含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 液体培养基中培养。以阳性克隆子菌液为模板, 使用载体引物 2956F (5'-GTTTTCCAAGTCACGA-3') 和 326R (5'-TGGCACGACAGGTTT-3') PCR 扩增插入片断, 避免宿主的共扩增。取 2 μL 菌液为模板, PCR 采用 50 μL 体系, 扩增条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选择正确的 PCR 产物 (约 1900 bp) 稀释 100 倍, 取 1 μL 作为第二次 PCR 的模板, 所用引物和反应体系同 1.5。扩增条件同上。

PCR 产物即可用于 ARDRA 分析, 采用 *Hinf* 和 *Hae* 两种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切图谱分析。先使用 *Hae* 对所有的 PCR 产物进行酶切, 挑选出具有相同带谱的序列, 再用 *Hinf* 进行第 2 次酶切, 将具有相同的 *Hinf* 和 *Hae* 酶切带谱的克隆子归为相同的克隆子称为一个 OTU (operational taxonomic unit)。

## 1.5 测序和系统发育分析

经 ARDRA 分析不同的 OTU 送北京诺赛公司测序, 测序引物为 530R (515-530, *E. coli* 顺序), T7 和 SP6。测序得到的 16S rRNA 基因序列, 保留可靠的约 500 bp 序列进行系统发育分析。通过 GenBank 的 BLAST 比对, 获得同源性较高的已知分类单元, 然后用这些序列构建系统发育树。建树所用软件为 MEGA 3.1, 系统发育树算法为 Neighbor-Joining, 采用 Kimura 双参数计算模型。

16S rRNA 基因序列在 GenBank 核苷酸数据库中的存取号为 DQ533509-DQ533521, DQ533531-DQ533548。

## 2 结果

### 2.1 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因的扩增结果

非培养和富集样品总基因组片段大小均约为 20 kb, 浓度均大于 25 ng/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 1500 bp, 表明扩增产物特异性较好 (图 1)。

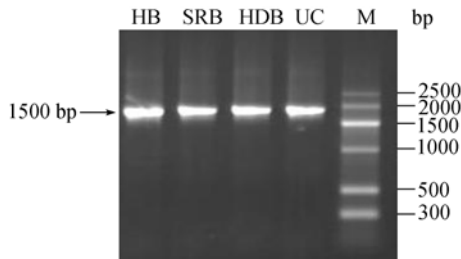


图 1 扩增的 16S rRNA 基因的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR product of 16S rRNA gene. Lanes: M, DNA 500-bp ladder marker; UC, the uncultured sample used as a template for PCR amplification; HDB, hydrocarbon-degrading bacteria enrichment; SRB, sulfate-reducing bacteria enrichment; HB, heterotrophic bacteria enrichment.

## 2.2 16S rRNA 基因文库分析结果

根据测序结果，将同源性大于等于 98% 16S rRNA 基因序列归为一个分类单元，共有 32 个，其中非培养样品 13 个，异养菌富集样品，烃降解菌富集样品和硫酸盐还原菌富集样品各有 2 个，7 个和 9 个

(表 1)。从 4 个样品的 OTU 数目来看，非培养样品的细菌多样性最丰富，其次是硫酸盐还原菌富集样品，而异养菌富集样品的细菌多样性最低。在非培养样品文库中，与已知可培养微生物同源性大于 98% 的克隆序列有 8 条，对应的细菌属于 *Pseudomonas* 属、*Ochrobactrum* 属、*Brevundimonas* 属和 *Flavobacterium* 属。异养富集样品文库中仅有 2 条序列，分别与 *Thermotoga* 属和 *Marinobacter* 属的物种的 16S rRNA 基因序列有 98% 的同源性。烃降解菌富集样品文库的克隆序列与 *Thermaerobacter* 属、*Azospirillum* 属和 *Marinobacter* 属物种的同源性高于 98%。硫酸盐还原菌富集样品文库克隆序列除了与 *Thermotoga* 属菌种的同源性较高外，其余序列与已知可培养微生物 16S rRNA 基因序列的同源性均低于 94%，而克隆子 R25 和 R83 与已知可培养微生物 16S rRNA 基因序列的同源性甚至只有 81%~82%。从克隆文库中克隆子数目

表 1 S12-4 油井产出水非培养和富集培养样品的 16S rRNA 基因克隆序列分析结果

Table 1 Phylogenetic affiliations of 16S rRNA gene clone sequences of culture-independent and enrichment samples obtained from S12-4 oil well product water

Accession number	Representative clone	Number of clone	Closest cultured phylotype	Similarity/%	Origina
Culture-independent sample					
DQ533503	CI-41	51	<i>Pseudomonas</i> sp. E1-4	99	deep sea
DQ533511	CI-5	17	<i>Pseudomonas</i> sp. WT OTU2	99	soil
DQ533512	CI-24	4	<i>Acinetobacter</i> sp. NJ-41	97	Subsurface
DQ533509	CI-2	2	<i>Pseudomonas</i> sp. Hugh 2814	98	/
DQ533521	CI-88	1	<i>Pseudomonas corrugata</i>	91	rhizosphere soil
DQ533517	CI-54	1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	98	wetland rhizosphere
DQ533520	CI-87	1	<i>Dokdonella koreensis</i> DS-140	96	soil
DQ533514	CI-45	1	<i>Ochrobactrum tritici</i> strain P61	99	Activated-Sludge
DQ533518	CI-67	1	<i>Brevundimonas</i> sp. Tibet-Iba1	99	permafrost
DQ533519	CI-81	1	<i>Brevundimonas</i> sp. Tibet- IX23	98	permafrost
DQ533513	CI-44	1	<i>Flavobacterium</i> sp. R2_13	97	wastewater
DQ533515	CI-46	1	<i>Flavobacterium columnare</i>	98	/
DQ533516	CI-47	1	Uncultured bacterium	95	/
Heterotrophic bacteria enrichment					
DQ533538	T5	161	<i>Thermotoga</i> sp. G2	98	deep biosphere
DQ533539	T59	8	<i>Marinobacter lutaensis</i>	98	coastal hot spring
Hydrocarbon-degrading bacteria enrichment					
DQ533532	A7	58	<i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	98	hydrothermal vent
DQ533539	A2	28	<i>Marinobacter lutaensis</i>	98	coastal hot spring
DQ533534	A1	16	<i>Azospirillum</i> sp. 5C	98	fuel-contaminated soils
DQ533537	A20	11	<i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	97	hydrothermal vent
DQ533533	A112	3	<i>Aquaspirillum itersonii</i>	92	putrid freshwater
DQ533531	A46	1	<i>Marinobacter lutaensis</i>	96	coastal hot spring
DQ533535	A53	1	<i>Marinobacter</i> sp. AN-B11B	98	coastal seawater
DQ533536	A13	1	<i>Marinobacter lutaensis</i>	95	coastal hot spring
Sulfate-reducing bacteria enrichment					
DQ533540	R2	29	<i>Moorella glycerini</i>	94	Yellowstone park
DQ533542	R13	26	<i>Thermotoga maritima</i>	99	/
DQ533544	R21	17	<i>Thermotoga</i> sp. G2	99	deep biosphere
DQ533541	R10	4	<i>Thermotoga maritima</i>	98	/
DQ533545	R83	4	<i>Thermobispora bispora</i>	81	Yellowstone park
DQ533546	R85	1	<i>Thermotoga</i> sp. G2	97	deep biosphere
DQ533548	R25	1	<i>Thermobispora bispora</i>	82	Yellowstone park
DQ533543	R19	1	<i>Moorella glycerini</i>	92	Yellowstone park
DQ533547	R65	1	<i>Moorella glycerini</i>	94	Yellowstone park

分布情况来看, 4 个样品中的优势菌分别为 *Pseudomonas* 属 (85.5%), *Thermotoga* 属 (95.2%), *Thermaerobacter* 属 (49.2%) 和 *Thermotoga* 属 (36.9%)。

将非培养样品和富集样品共 4 个文库的 16S

rRNA 基因序列和 GeneBank 中的相关序列一起构建了系统发育树 (图 2), 根据系统发育树可以把这 4 个样品的微生物群落划分为几个类群。非培养样品微生物群落由  $\gamma$ -proteobacteria ( $\gamma$ -变形细菌纲),

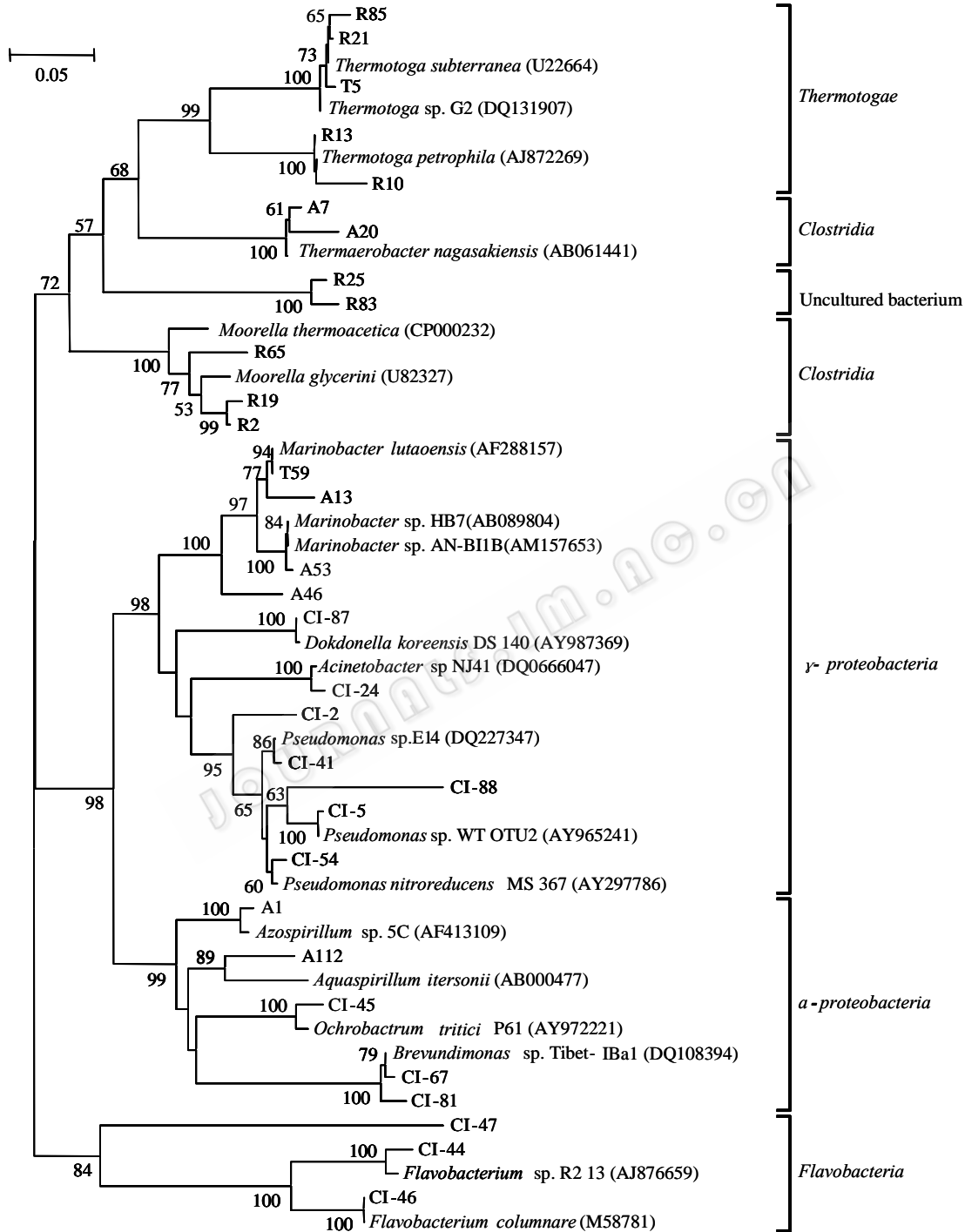


图 2 基于 16S rRNA 基因的 S12-4 油井产出水非培养和富集培养样品微生物群落系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by using the neighbour-joining method based on the 16S rRNA gene sequences of culture-independent and enrichment samples obtained from S12-4 oil well product water. Numbers at nodes represent percentage levels of bootstrap support, based on a neighbour-joining analysis of 1000 resampled data sets. Accession numbers of nucleotide sequences are given in parentheses. Bar, indicates 5% sequence divergence.

$\alpha$ -proteobacteria( $\alpha$ -变形细菌纲)和 *Flavobacteria*(黄杆菌纲) 3 部分组成。硫酸盐还原菌富集样品的微生物群落包括 *Thermotogae* (热袍菌纲), *Clostridia* (梭菌纲) 以及一些未培养微生物。烃降解菌富集样品的微生物群落包括  $\gamma$ -proteobacteria,  $\alpha$ -proteobacteria 和 *Clostridia* 菌纲。而异养菌富集样品的微生物群落结构相对简单, 由 *Thermotoga* 属和 *Marinobacter* 属微生物组成。

### 3 讨论

研究证明自然界中绝大部分微生物是不可培养的<sup>[11]</sup>, 同培养方法相比, 基于 16S rRNA 基因的非培养技术可以更全面的展示特定生态系统的微生物多样性<sup>[12]</sup>。本文分析结果表明非培养样品和富集样品之间的微生物群落结构存在很大差异, 非培养样品含有最丰富的微生物多样性。但是在 3 个富集样品的克隆文库中均没有检测到非培养样品克隆文库中的 16S rRNA 基因序列或者与其同源性较高的序列。分析其原因, 一方面是富集到的微生物包括优势微生物, 在油藏原位环境中的含量很低, 同时非培养技术又存在着一定的缺陷, 因此没有检测到油藏中含量很低的微生物种群。另一方面, 富集培养条件与油藏环境存在很大差异, 单 12 区块为水驱油藏, 经过长期的水驱采油, 产出液含水已达到 80%, 注入水带入外源微生物的同时也带入了氧气, 所以非培养样品中检测到大量好氧和兼性厌氧的微生物(表 1), 如 *Pseudomonas* 属为油藏中的优势微生物, 这与大港油田的一个水驱油藏的非培养分析结果是一致的<sup>[13]</sup>。硫酸盐还原菌富集样品和异养菌富集样品是在密闭环境中静置培养, 氧气含量低, 而烃降解菌富集样品富集时处于有氧环境, 同时它们的营养条件与油藏都有很大区别, 所以在富集样品中检测到了许多非培养样品中没有检测到的微生物, 如 *Thermotoga* 属和 *Thermaerobacter* 属, 前者是异养菌富集样品和硫酸盐还原菌富集样品中的优势菌, 已经从多个油藏中分离到, 是一种严格厌氧的嗜热微生物, 具有还原硫酸盐的功能<sup>[14~16]</sup>, 后者是烃降解菌富集样品中的优势菌, 是一种好氧的嗜热微生物, 已报道具有降解烃的功能<sup>[17]</sup>。

通过异养菌和硫酸盐还原菌总数测试瓶检测油藏样品中相应微生物的数量, 以及用烃降解菌培养基筛选采油微生物, 是从事微生物采油的科学工作者常用的方法。本文研究显示, 这些富集方法确实对油层

样品的微生物菌群结构进行了功能性选择, 形成了相应的富集菌群, 这些菌群的微生物也具有相应的代谢功能<sup>[1,14~17]</sup>。虽然这些富集到的微生物在油藏原位环境中含量很低, 但不能排除它们在油藏生态系统 C、N 和 S 代谢中的参与作用。并且, 只要将它们置于一定的环境中, 就会生长繁殖, 成为优势菌而发挥其作用。

利用非培养分析方法, 往往能发现一些代表新种甚至新属的 16S rRNA 基因序列, 本论文工作也不例外, 所分析的 16S rRNA 基因序列中, 与最相近的 GeneBank 数据库中已知菌的序列同源性低于 97% 的有 15 条(表 1), 说明 S12 油层微生物群落中存在还不被人们所知晓的新的微生物。

本文通过构建 16S rRNA 基因文库的方法对胜利油田单 12 区块一产油井的非培养样品和富集样品的微生物多样性进行了初步分析, 了解了富集培养样品的微生物多样性以及与非培养分析结果的差异, 为油藏微生物的研究和微生物采油的应用提供了有益的参考。

### 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 (Journal of Microbiology)*, 2004, 24(4): 31–34.
- [3] Belyaev SS. Activation of the geochemical activity of strata microflora as basis of a biotechnology for enhancement. *Mikrobiologiya*, 1998, 67(6): 708–714.
- [4] 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.
- [5] Jeanthon C, Reysenbach AL, Haridon SL, et al. *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Arch Microbiol*, 1995, 164(2): 91–97.
- [6] Brakstad OG, Lodeng AG. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb Ecol*, 2005, 49(1): 94–103.
- [7] Hao R, Lu A, Wang G. Crude-oil-degrading thermophilic bacterium isolated from an oil field. *Can J Microbiol*, 2004, 50(3): 175–182.
- [8] Jyh-Yih L, Caroline PM, Andrew JR, et al. Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing. *Anaerobe*, 1998, 4(3): 165–174.

- [9] Feio MJ, Zinkevich V, Beech IB, *et al.* *Desulfovibrio alaskensis* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium from a soured oil reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1747–1752.
- [10] Brosius J, Palmer JL, Kennedy JP, *et al.* Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 4801–4805
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 余跃惠, 张学礼, 张凡, 等. 大港孔店油田水驱油藏微生物群落的分子分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(3): 329–334.
- [14] Takahata Y, Nishijima M, Hoaki T, *et al.* *Thermotoga petrophila* sp. nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001(5), 51: 1901–1909.
- [15] Fardeau ML, Ollivier B, Patel BK, *et al.* *Thermotoga hypogea* sp. nov., a xylanolytic, thermophilic bacterium from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(4): 1013–1019.
- [16] Ravot G, Magot M, Fardeau ML, *et al.* *Thermotoga elfii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(2): 308–314.
- [17] Nunoura T, Akihara S, Takai K, *et al.* *Thermaerobacter nagasakiensis* sp. nov., a novel aerobic and extremely thermophilic marine bacterium. *Arch Microbiol*, 2002, 177(5): 339–344.

## Characterization of bacterial diversity in the Shengli-S12 oil reservoir by culture-dependent and culture-independent methods

Sangqing Yuan<sup>1</sup>, Yanfen Xue<sup>1\*</sup>, Weidong Wang<sup>2</sup>, Ximing Li<sup>2</sup>, Yanhe Ma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>Academy of Oil Extraction Engineering, ShengLi Oil Field Company, Dongying 257000, China

**Abstract: [Objective]** Examining bacterial diversity in an oil reservoir of Shengli oil field by both culture-independent molecular technique and enrichment method. **[Methods]** The heterotrophic bacteria, hydrocarbon-degrading bacteria and sulfate-reducing bacteria were enriched from S12-4 oil-well samples by the corresponding media. Then the genomic DNAs of the enrichments were extracted and the 16S rRNA gene clone libraries were constructed. **[Results]** The phylogenetic analysis revealed that the bacterial 16S rRNA gene clone libraries of the 3 enrichments were dominated by clones of *Thermotoga*, *Thermaerobacter* and *Thermotoga*, respectively. Sequences of the other co-dominant clones observed only in the enrichments of hydrocarbon-degrading bacteria and sulfate-reducing bacteria were, respectively, associated with *Marinobacter* and *Moorella*. The uncultured 16S rRNA gene library was also generated directly from total DNA of S12-4 oil-well samples by bacterial primer set. Sequence analysis of this bacterial library indicated that a large percentage of clones were highly related to the genus *Pseudomonas* and the dominant species emerging in the enrichment samples had a very low content in the tested oil reservoir. The significant difference of the bacterial composition between the samples obtained from independent-culture method and enrichment method implies that the specialized nutrient may lead to a distinctive selection of dominant organisms. **[Conclusion]** Through culture-dependent and culture-independent methods, we acquired important information on the bacterial diversity of ShengLi oil reservoir. These results may expand our understanding of the microbial diversity of oil reservoir and provide useful information for MEOR(microbial enhancement of oil recovery).

**Keywords:** 16S rRNA gene analyses; petroleum reservoirs; bacterial diversity

Supported by the 10<sup>th</sup> 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: +86-10-64807618; Fax: +86-10-64807616; E-mail: xueyf@sun.im.ac.cn

Received: 25 January 2008/ Revised: 5 April 2008