

# 不同压力条件下油藏内源细菌群落激活过程中变性梯度凝胶电泳分析

包木太<sup>1</sup>, 王兵<sup>1</sup>, 陈庆国<sup>1</sup>, 高光军<sup>2</sup>, 李希明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100)

(<sup>2</sup> 中国石化胜利油田分公司采油工艺研究院, 东营 257000)

**摘要**【目的】了解常压(1 MPa)和高压(10 MPa)条件下内源细菌激活中的细菌群落和结构的变化。【方法】利用胜利油田沾3×24井产出液水样,在常压和高压下进行富集培养后,定时取样,样品用变性梯度凝胶电泳(denature gradient gel electrophoresis, DGGE)技术分析。【结果】通过对内源微生物激活前后DGGE条带的数量和亮度变化分析表明,油藏环境中的细菌在种类和数量上并不丰富,激活剂的加入改变了菌群原有的贫营养环境,从而使一些因营养缺乏生长受抑制细菌得以大量繁殖,菌群结构发生变化。【结论】高压条件下,条带数量变化趋势与常压下大体一致,但在条带数量和出现的位置上有所差异,高压条件下,DGGE条带数量要少一些,说明高压激活过程中能适应环境的细菌种类较少,且条带数量的增加相比常压具有明显的滞后性,激活后期,条带数量和亮度的变化逐渐趋缓,表明细菌群落生态结构重新调整,达到了新的动态平衡。论文的研究结果为解释微生物驱油室内研究与现场效果评价之间的关系奠定基础。

**关键词**: 内源细菌群落, 选择性激活, 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: X172, TE357.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0536-04

由于油藏是具有高温、高压等特点的极端环境,用传统培养方法所获得的微生物生态信息远不能反映油藏环境中的实际情况。影响内源微生物驱油技术深入发展的主要难点是缺乏有效的油藏微生物群落结构分析及动态变化的监测方法<sup>[1-2]</sup>。近10年来,以分析16S rDNA为主的分子指纹技术发展为极端环境中不可培养微生物的研究提供了一种新手段。变性梯度凝胶电泳(denature gradient gel electrophoresis, DGGE)就是一种通过分离微生物基因组DNA来研究环境样品中微生物群落的多样性及物种丰度的一种分子指纹技术<sup>[3]</sup>。近年来,运用分子指纹技术对油藏微生物群落的研究已有不少<sup>[4-10]</sup>,但少有文献报道不同压力条件下内源微生

物激活的影响。本文利用胜利油田的沾3×24井产出液水样,在模拟油藏条件下,利用DGGE技术探讨了低压和高压条件下内源微生物激活中的微生物群落和结构的变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DNA纯化试剂盒,购自北京天为时代生物技术有限公司;溶菌酶(Fluka 62970),蛋白酶K(Roche 109126原装),RNase A(Merck),聚乙烯吡咯烷酮(PVPP, Sigma P-6755分装),购自北京欣经科生物技术有限公司;三(羟甲基)胺基甲烷(Tris),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;十六烷基三甲基溴化胺

基金项目: 国家自然科学基金“油藏环境中采油功能微生物群落选择性激活条件研究”(50604013)

作者简介: 包木太(1971-),男,山东临沂人,教授,主要从事微生物驱油理论研究、环境生物修复应用基础研究以及油品指纹信息提取与鉴别研究。Tel: +86-532-66782509; Fax: +86-532-66782540; E-mail: mtbao@mail.ouc.edu.cn

收稿日期: 2008-09-17; 修回日期: 2008-12-16

(CTAB) 十二烷基硫酸钠(SDS),天津科密欧化学试剂开发中心;2500DNA 分子量标准、上样缓冲液, TaKaRa(ABI, USA)。纯化柱 PCR Clean-up Kit, MoBio Laboratories Inc(USA);TGL-16G 台式高速离心机,上海医用分析仪器厂;GS-15R Centrifuge 离心机, Beckman(USA);Model 311D Incubator 恒温培养箱, National Labnet Company;Eppendorf 微量移液器, Germany;MyCycler PCR 扩增仪, BIORAD, USA;SX-300 成像系统, Shanghai Sixing Biological Technology Co., Ltd;DYY-8C 型电泳仪,北京六一仪器厂;Mini-Transilluminator 紫外透射仪, BIORAD(USA)。

## 1.2 水样的富集培养

向沾  $3 \times 24$  产出液水样中添加激活剂(玉米浆 1%、 $\text{KNO}_3$  0.1%)后,分装于经无菌处理的 60 mL 小岩心管中,不加压或加压至 10 MPa 后,置于  $53^\circ\text{C}$  恒温箱内培养一定时间后<sup>[11]</sup>进行 DNA 的提取与纯化。

## 1.3 基因组 DNA 的提取与纯化

原始水样中菌体用孔径为  $0.22 \mu\text{m}$  的混合纤维素酯滤膜抽滤 1 L 水样来收集,经培养后的菌体直接取 10 mL 培养液高速离心获得。具体操作步骤与文献<sup>[12]</sup>相同。基因组 DNA 提取与纯化使用北京天为时代生物技术公司的 DNA 纯化试剂盒,按照操作说明进行。

## 1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增

将纯化的基因组 DNA 试样作为 PCR 反应的模板,用 PCR 反应扩增仪对培养前后油藏微生物 16S rDNA 的 V3 区进行扩增,扩增片段长度约为 200 bp,

引物对<sup>[13-15]</sup>为:P2:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'; P3:5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGG GCACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3'。PCR 条件为: $94^\circ\text{C}$  4 min; $94^\circ\text{C}$  1 min; $65 \sim 56^\circ\text{C}$  1 min; $72^\circ\text{C}$  1 min 2 个循环降  $1^\circ\text{C}$ ,退火 20 个循环; $94^\circ\text{C}$  1 min, $55^\circ\text{C}$  1 min, $72^\circ\text{C}$  1 min,延伸 10 个循环; $72^\circ\text{C}$  6 min。聚合酶链反应结果用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测<sup>[9]</sup>。

## 1.5 16S rDNA 序列的 DGGE 分析

将纯化好的 PCR 样品加入制备好的变性胶中,进行电泳分离并用 YLN-2000 凝胶影像分析系统进行分析,观察每个样品的电泳图谱并拍照<sup>[12]</sup>。

# 2 结果和讨论

## 2.1 样品的 DGGE 条带

常压 1 MPa(N)和高压 10 MPa(P)下进行水样富集培养后,分别于第 0、4、8、12、19、26、33、43、53 天取样,所得 DGGE 电泳图如图 1 所示,N0、P0 为激活前产出水样,N1-N8 分别为常压下第 1~8 次取样,P1-P8 分别为高压下第 1~8 次取样。每个泳道中相同位置的条带可视为具有相同的 DNA 片段序列,条带亮度越大表示相应种群数量上的优势越明显,从而反映出油藏内源微生物的种类和数量。DGGE 仅能检测到环境样品中一定数量的微生物,一般是优势菌群。根据 Mulyzer 的研究<sup>[16]</sup>整个微生物群落中仅有约 1% 的菌群能通过 DGGE 检测到。由激活前的 DGGE 泳道 N0、P0 中 DNA 条带数量可以看出,油藏这种贫营养环境中微生物的多样性并不丰富。

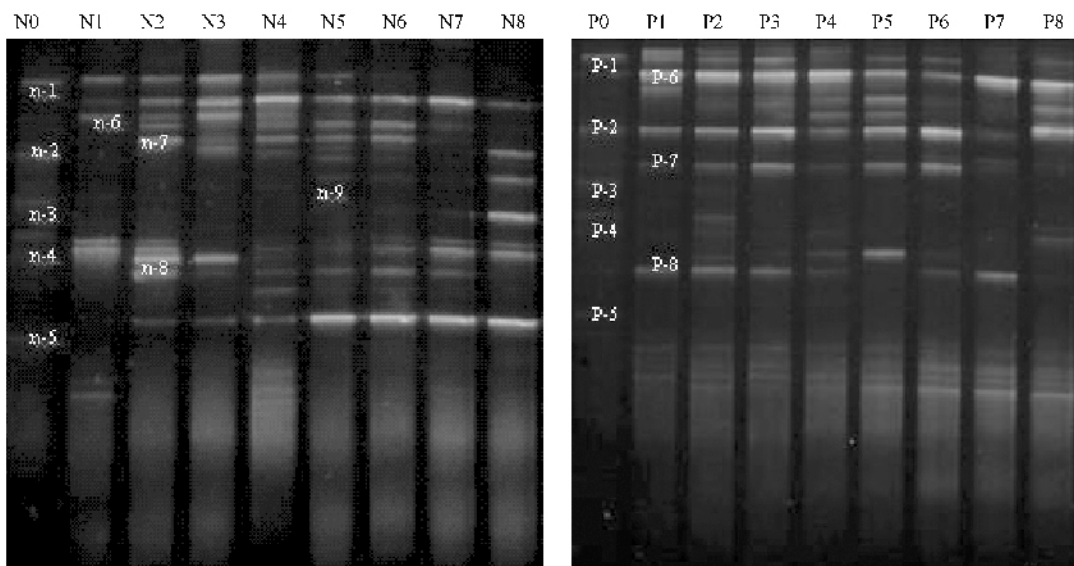


图 1 16S rDNA 扩增产物的 DGGE 电泳图

Fig.1 DGGE profile of 16S rDNA amplified products.

## 2.2 不同压力下的 DGGE 条带变化

如图 1 和图 2,常压条件下,条带数量变化表现为先增多后减少的趋势。第 2 次取样时,在 N-7、N-8 位置明显出现了很多新的条带,条带数量由 5 条增加到 8 条,第 5 次取样时条带数量达到 10 条,在激活剂的作用下内源菌的丰富性得到有效增强,此后条带数量逐渐减少,第 7 次取样检测时减少到 6 条,就条带亮度而言,n-1、n-5 和 n-6 位置的变化更有规律性,n-1 和 n-6 亮度先增强后逐渐减弱,n-5 的亮度则一直增强。激活前,硝酸盐还原菌和硫酸盐还原菌的数量为  $1 \times 10^2$  个/mL 和  $2 \times 10^2$  个/mL;常压激活后硝酸盐还原菌和硫酸盐还原菌的数量为  $4 \times 10^2$  个/mL 和 6 个/mL。可以推测激活后条带亮度的变化可能是由于好氧转厌氧过程使得好氧菌和厌氧菌的相对数量发生变化,厌氧环境中,由于硝酸盐的存在,电子受体由氧转移到硝酸根,所以硝酸盐的存在对硫酸盐还原菌的生长产生了抑制作用。同时,就条带变化的延续性而言,激活前期 N0 ~ N4 变化延续性较差,说明激活剂的加入改变了菌群原有的贫营养环境,从而使一些因营养缺乏生长受抑制细菌得以大量繁殖,菌群结构迅速发生变化,激活后期 N5 ~ N8 条带变化更具有延续性,菌群结构逐步趋于稳定,达到了选择性激活的目的。

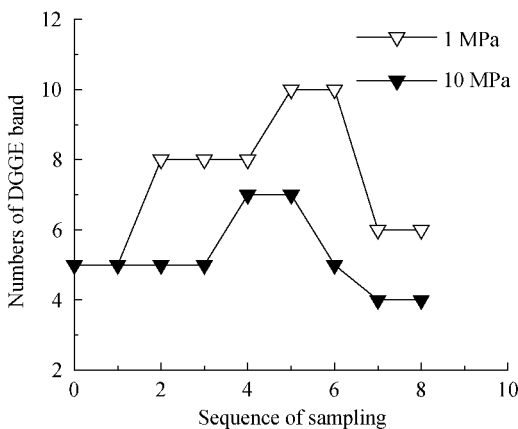


图 2 DGGE 条带数量变化曲线图

Fig.2 The change of the numbers of DGGE bands.

高压条件下,条带数量变化趋势与常压下大体一致,但在条带数量和出现的位置上差异比较明显,在高压下,条带数量要少一些,说明高压激活过程中能适应环境的细菌种类较少,且条带数量的增加相比常压具有明显的滞后性,第 4 次取样时,条带数量才从 5 条增加到 7 条,从第 5 次取样开始,条带数量逐渐减少,并趋于稳定,微生物生态结构重新调整,

达到了新的动态平衡。

## 3 小结

(1)由激活前后 DGGE 条带的数量和亮度变化分析可知,油藏环境中的微生物在种类和数量上并不丰富,激活剂的加入改变了菌群原有的贫营养环境,从而使一些因营养缺乏生长受抑制细菌得以大量繁殖,菌群结构发生变化。

(2)高压条件下,条带数量变化趋势与常压下大体一致,但在条带数量和出现的位置上有所差异,高压条件下,DGGE 条带数量要少一些,说明高压激活过程中能适应环境的细菌种类较少,且条带数量的增加相比常压具有明显的滞后性,激活后期,条带数量和亮度的变化逐渐趋缓,表明微生物群落生态结构重新调整,达到了新的动态平衡。

## 参考文献

- [1] 汪卫东,魏斌,谭云贤,等. 微生物采油需要进一步解决的问题. 石油勘探与开发(*Petroleum Exploration and Development*), 2004, 31(6): 88-91.
- [2] 蒋焱,徐登霖,陈健斌,等. 微生物单井处理技术及其现场应用效果分析. 石油勘探与开发(*Petroleum Exploration and Development*), 2005, 32(2): 104-106.
- [3] 包木太,肖生科,孔祥平,等. 16S rRNA 基因技术在油藏微生物生态研究中的应用. 应用基础与工程科学学报(*Journal of Basic Science and Engineering*), 2007, 15(3): 369-379.
- [4] 王君,马挺,刘静,等. 利用 PCR-DGGE 技术指导高温油藏中功能微生物的分离. 环境科学(*Environmental Science*), 2008, 29(2): 462-468.
- [5] Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(3): 427-443.
- [6] Li H, Yang SZ, Mu BZ, et al. Molecular analysis of the bacterial community in a continental high-temperature and water-flooded petroleum reservoir. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 257(1): 92-98.
- [7] 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.
- [8] Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, et al. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 700-711.

- [ 9 ] 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 (*Acta Ecologica Sinica*), 2005, 25(2): 238 - 242.
- [ 10 ] 程海鹰,肖生科,马光东,等. 营养注入后油藏微生物群落 16S rRNA 基因的 T-RFLP 对比分析. 石油勘探与开发 (*Petroleum Exploration and Development*), 2006, 33(3): 356 - 359.
- [ 11 ] 包木太,王兵,袁长忠,等. 胜利油田沾 3 区内源微生物室内模拟激活实验研究. 化工学报 (*Journal of Chemical Industry and Engineering*), 2008, 59(9): 2334 - 2338.
- [ 12 ] 程海鹰,肖生科,汪卫东,等. 变性梯度凝胶电泳方法在内源微生物驱油研究中的应用. 石油学报 (*Acta Petrolei Sinica*), 2005, 26(6): 82 - 85.
- [ 13 ] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695 - 700.
- [ 14 ] 邢德峰,任南琪,宋佳秀,等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响. 环境科学 (*Environmental Science*), 2006, 27(7): 1424 - 1428.
- [ 15 ] Yu ZT, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4800 - 4806.
- [ 16 ] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(10): 317 - 322.

## Denature gradient gel electrophoresis of stratal bacteria activation in oilfield under different pressure conditions

Mutai Bao<sup>1\*</sup>, Bing Wang<sup>1</sup>, Qingguo Chen<sup>1</sup>, Guangjun Gao<sup>2</sup>, Ximing Li<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

(<sup>2</sup>Research Institute of Oil Production Technology, Shengli Oilfield Company, Sinopec, Dongying 257000, China)

**Abstract** : [ **Objective** ] To study the structure change of dominant microbial population during activation of stratal microflora under atmospheric pressure ( 1 MPa ) and higher pressure ( 10 MPa ) conditions. [ **Method** ] The water sample was from Zhan 3 × 24 well produced water in Shengli Oilfield. We activated the bacteria in the water sample under atmospheric pressure and higher pressure, and collected samples at different time intervals. These samples were analyzed by denature gradient gel electrophoresis ( DGGE ). [ **Results** ] Based on the analysis of the number and lightness of DGGE bands, we studied the change of the microbial community diversity activation of stratal bacteria. The species number and total quantity of dominant microbial population were not abundant under oil reservoir conditions. After injecting activation agent, some bacteria grew and reproduced quickly along with the enhancement of nutrition condition, and the structure of dominant microbial population changed. [ **Conclusion** ] Compared to atmospheric pressure condition, the number of DGGE bands was fewer under higher pressure condition, which indicated that only a few microbial species adapted high pressure conditions. The delayed increase of DGGE bands occurred apparently under higher pressure conditions. In late activation period, the change of DGGE bands was slight, which indicated that, the structure of dominant microbial population readjusted successfully and reached a new dynamic balance. This paper lays the foundation for explaining the relationship between laboratory study and field effect evaluation of microbial flooding.

**Keywords** : stratal bacteria ; selective activation ; denaturing gradient gel electrophoresis

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 50604013 )

\* Corresponding author. Tel : + 86-532-66782509 ; Fax : + 86-532-66782540 ; E-mail : mtbao@mail.ouc.edu.cn

Received : 17 September 2008 / Revised : 16 December 2008