

## 胜利油藏不同时间细菌群落结构的比较

任红燕<sup>1</sup> 宋志勇<sup>2</sup> 李霏霏<sup>1</sup> 汪卫东<sup>2</sup> 张晓君<sup>1\*</sup> 赵立平<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢教育部重点实验室 上海 200240)

(2. 胜利油田采油工艺研究院 山东 东营 257000)

**摘要:** 利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和构建 16S rRNA 基因克隆文库 2 种方法,对孤岛油田两口井(注水井 G 和采油井 L)在相距 9 个月的 2 个时间点(A 和 B)所采集样品的细菌群落结构进行了比较。DGGE 图谱聚类分析表明注水井在 2 个时间点的微生物群落结构相似性为 48.1%,而采油井的相似性只有 28.7%。16S rRNA 基因克隆文库结果表明,A 时间点样品 G 中的优势菌群为 Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria,还有 Deferribacteres、Firmicutes、Bacteroidetes 等;而样品 L 中, Gammaproteobacteria 中的 Moraxellaceae 含量达到 97%。B 时间点 G 中除了优势菌 Betaproteobacteria 之外, Deferribacteres 的数量显著增加,成为优势菌;而 L 在 B 时间点优势菌除 Gammaproteobacteria 外,还有 Betaproteobacteria 和 Firmicutes。采油井中的微生物群落结构随时间发生了显著改变,而注水井变化不显著。这一结果部分揭示了微生物采油过程中地层微生物群落的变化规律,有助于进一步阐明微生物驱油的机理。

**关键词:** 油藏, 16S rRNA 基因, 细菌多样性, DGGE, 克隆文库

## Comparison of bacterial community structures in Shengli oil reservoir of different time point

REN Hong-Yan<sup>1</sup> SONG Zhi-Yong<sup>2</sup> LI Fei-Ji<sup>1</sup> WANG Wei-Dong<sup>2</sup>  
ZHANG Xiao-Jun<sup>1\*</sup> ZHAO Li-Ping<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of MOE for Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Institute of Oil Recovery Research, Shengli Oil Field Ltd, Dongying, Shandong 257000, China)

**Abstract:** Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and 16S rRNA gene clone library methods were used to analyze the microbial communities of a water injection well (G) and an oil production well (L) at two sampling time points (A and B) in Gudao block of Shengli oilfield. DGGE profile showed that the microbial similarity of sample G at two sampling time was 48.1%, that of sample L was 28.7%, respectively. Sequence analysis of 16S rRNA gene clone libraries showed that bacteria in G library at time

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20677041); 中国石油化工总公司科技创新项目; 国家 863 计划重点项目(No. 2007AA021301); 上海市重点学科建设项目资助(No. B203)

\* 通讯作者: Tel: 86-21-34204878; 邮箱: xjzhangsjtu@gmail.com

收稿日期: 2010-12-29; 接受日期: 2011-02-16

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

point A were mainly Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria, and also with low percentage of Deferribacteres, Firmicutes and Bacteroidetes; But in L library, 97% bacteria belong to Moraxellaceae of Gammaproteobacteria. Whereas, the main type of bacteria in sample G at time point B were Betaproteobacteria and Deferribacteres. The bacterial composition of sample L was dominated by Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria and Firmicutes. Both DGGE and clone library indicated the distinct temporary shift of microbial communities of production well, but much less change happened in injection water sample. Our results will benefit to the better understanding of mechanisms of microbial enhanced oil recovery.

**Keywords:** Oilfield, 16S rRNA gene, Bacterial diversity, Denaturing gradient gel electrophoresis, Clone library

自 1926 年 Beckman 等人提出微生物采油 (MEOR) 的概念以来<sup>[1]</sup>, 便以其费用低廉、无环境污染、施工简单、应用范围广等优点得到众多学者以及开发者的认同。油藏中的微生物类型多样、功能各异, 如硫酸盐还原菌<sup>[2]</sup>、发酵细菌、铁还原菌<sup>[3]</sup>、产甲烷菌等<sup>[4-5]</sup>, 它们产生的多种代谢产物, 如表面活性剂<sup>[6-8]</sup>、酸和生物气等, 可促进原油的开采; 或利用产甲烷菌等将原油转化为甲烷, 使难开发原油以天然气的形式得以开采, 从而大幅度提高油气资源的利用率<sup>[9]</sup>; 还有多种微生物以石油中的正构烷作为碳源生长繁殖, 改变了原油的碳链组成, 从而使原油黏度降低, 易于流动, 等等。由此可见, 分析油藏中微生物的类型对于认识微生物采油过程是非常重要的。然而目前对油藏中微生物的认识仍不够深入。

对采油有益的微生物可以是油层中的本源微生物, 或注入的外源微生物。油藏中的本源微生物在长期的进化过程中已适应地下的极端环境, 并能降解原油产生有机酸、气体、表面活性剂等, 但是由于地层中缺乏足够的营养物质, 导致本源微生物的生长繁殖受到了很大的限制, 因此, 了解本源微生物的生长和生态规律显得极为重要。而外源微生物中被证实具有驱油效果的某些特定微生物受到主要关注。值得注意的是, 过去大家普遍认为注入水中的外源微生物会影响地层中本源微生物的菌群, 但是它们对油藏中的波及面到底有多大却一直难以确定。也曾有学者比较过注入水中的微生物和采油井中的微生物群落, 例如余跃惠等人利用 PCR-DGGE 检测了大港油田的微生物群落, 发现注水井和采油井之间的微生物结构差异显著<sup>[10]</sup>; 袁三青等人采用 T-RFLP 技术比较了胜利油田一口注水井和三口采

油井的微生物结构, 发现注入水中的微生物多样性高于产出液<sup>[11]</sup>。然而, 这些研究中并未详细解析样品中的微生物组成, 对于注入水中的外源微生物如何影响本源微生物我们还知之甚少。

在本研究中, 我们以胜利油田中孤岛采油队的注水井 G 和采油井 L 为研究对象, 分析了先后相隔 9 个月的两个时间点样品的微生物群落结构的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 油井与样品采集

样品采自山东胜利油田公司的孤岛油田, 油藏深度 1 173 m-1 230 m, 平均温度 69 °C, 压力 12 MPa, 此油田 1974 年开始注水, 目前产出液的含水量大于 96%, 属于典型的高温高含水油藏。4 个样品(水或油水混合物)分别采自 2006 年 12 月(A)和 2007 年 9 月(B)的注水井 G (实际井号 G1-6)和采油井 L (6-13)。其中注入水取自注水井口, 产出液为油水混合物采自采油井的井口, 每个样品采集 5 L 装入灭菌的塑料桶中, 置于 4 °C 并尽快完成预处理。

注水井 G 与采油井 L 之间的地面距离为 300 m。SCN<sup>-</sup>与注入水按 1:5 的比例混合后从注水井注入, 在产出液中连续检测 SCN<sup>-</sup>浓度的变化。结果表明注入水在 G 与 L 之间的流动速度为 12 m/d。

### 1.2 样品的预处理及 DNA 提取

注入水样品以 8 μm 和 0.2 μm (Millipore, USA) 的滤膜真空抽滤收集菌体。产出液样品抽滤前需要进行预处理, 具体方法是: 150 mL 产出液样品与饱和 NaCl 溶液以 4:1 比例混合后, 70 °C 加热 2 min。所有样品滤膜置于已灭菌的 10 mL 离心管中, -20 °C 保存备用。

DNA 的提取采用改进的击打法。将样品滤膜装入数个 2 mL 的螺纹管, 各加入 1 mL 异辛烷清洗滤膜。离心后弃上清, 加入 1 mL 无菌水清洗滤膜, 再次离心弃上清液; 加入 900  $\mu$ L Buffer Z (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 涡旋 3 min 悬浮滤膜, 再加入 20  $\mu$ L 的蛋白酶 K (20 g/L) 和 100  $\mu$ L 10% SDS, 于 55  $^{\circ}$ C 保温 1 h; 加入 0.3 g Zirconia/Sicica beads (0.1 mm) 和 100  $\mu$ L Tris 饱和苯酚 (pH 8.0), 以 Bead beater 击打 60 s。后续苯酚氯仿抽提参考余跃惠等人的方法<sup>[10]</sup>。得到的基因组 DNA 用 AxyPrep PCR Cleanup Kit 纯化, 并用 0.8% 的琼脂糖胶电泳检测后备用。

### 1.3 16S rRNA 基因 V3 区扩增及变性梯度凝胶电泳(DGGE)

利用通用引物 P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTG G-3') 和 P3 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGG GCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAG CAG-3')<sup>[12]</sup> 完成对细菌 16S rRNA 基因 V3 区的扩增。25  $\mu$ L 的扩增体系包括: 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 1 $\times$ buffer, 0.2 mmol/L dNTP (Promega), 1.6 mg/L BSA, 6.25 pmol 引物(P2/P3), 以及 10 ng 基因组 DNA。PCR 扩增程序如下: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 退火 1 min (前 20 个循环的退火温度每 2 个循环降低 1  $^{\circ}$ C, 从 65  $^{\circ}$ C 逐渐降到 56  $^{\circ}$ C, 剩下的 5 个循环保持 55  $^{\circ}$ C<sup>[13]</sup>), 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。按照 Thompson 介绍的方法进行“Reconditioning PCR”<sup>[14]</sup>, PCR 扩增产物利用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行检测。

V3 区 PCR 扩增产物以 8% (W/V) 的变性胶进行分离 (Bio-Rad, Dcode 系统), 各样品 DNA 的上样量均为 250 ng。变形剂梯度为 27%–55%, 200 V 电压, 60  $^{\circ}$ C 电泳 4 h, 电泳完毕用 SYBR green I (Amresco) 进行染色, 并用 UV 胶成像系统拍照 (UVItect, United Kingdom)。

### 1.4 16S rRNA 基因的扩增及克隆文库的构建

细菌 16S rRNA 基因的扩增使用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-G GTTACCTTGTACGACTT-3')<sup>[15]</sup>。25  $\mu$ L PCR 反应体系包括: 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 1 $\times$ buffer, 0.2 mmol dNTP (Promega), 1.6 mg/L BSA, 6.25 pmol

引物(27f/1492r)。PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s (60  $^{\circ}$ C 退火 5 个循环, 55  $^{\circ}$ C 退火 5 个循环, 50  $^{\circ}$ C 退火 15 个循环), 72  $^{\circ}$ C 3 min, 共 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 6 min。PCR 产物利用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行检测, 并利用 Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) 对 DNA 进行纯化, 纯化后的 DNA 连接到 pGEM-T Easy 载体 (Promega), 转化到 *E. coli* 感受态细胞中。转化的细胞涂布在带有氨苄青霉素 (50 mg/L)、X-Gal (0.25 mg/L) 和 IPTG (1 mmol) 的 LB 平板, 通过蓝白斑对阳性克隆进行筛选。

挑取的白斑利用引物 T7/SP6 进行 PCR 扩增, 带有插入片段的扩增产物利用内切酶 *Hinf* I 和 *Csp6* I 于 37  $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 酶切产物以 3% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 根据电泳图谱划分 OTU。每个 OTU 选取一个代表序列进行测序, 测序工作在人类基因组南方中心完成。文库的饱和度通过公式  $C = [1 - (n/N)] \times 100$  计算, 其中  $n$  为含单克隆的 ARDRA 类型的数目,  $N$  为用于分型的克隆总数<sup>[16]</sup>。

### 1.5 序列分析

序列以 Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) 检测是否为嵌合体, 并计算各序列间的距离矩阵。利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 找到各代表 OTU 的最近相似序列, 利用 MEGA 3.1<sup>[17]</sup> 构建系统发育树。以 UniFrac (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>) 的  $P$  值检测判断 2 个样品之间的差异。

测定的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号为 FJ828674–FJ828727。

## 2 结果

### 2.1 PCR-DGGE 图谱分析

G 和 L 分别在时间点 A 和 B 所采集的 4 个样品的 PCR-DGGE 图谱如图 1 所示。GA (注水井 G 在 A 时间点的样品, 下同) 中 4 条优势条带 (a–d) 在 GB 样品中减弱或者消失, 另外 4 条条带 (e–h) 亮度增强, 但是条带的数目相对稳定, 大部分优势条带没有显著变化; 与 G 不同的是, 两个时间点产出液 L 中的细菌结构变化显著。LB 的条带数量远高于 LA, 并且在 LB 时样品新出现的条带部分与 GB 相同。

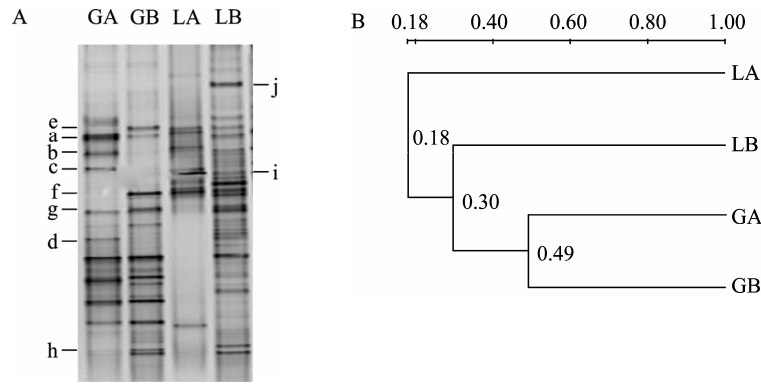


图 1 2 个时间点的样品的 16S rDNA DGGE 图谱及聚类分析

Fig. 1 DGGE gel profiles of samples at two sampling times and Unweighted Pair Group Method Clustering (UPGMC) of the DGGE banding patterns

Note: A: 1: Injection water GA; 2: Injection water GB; 3: Production water LA; 4: Production water LB. B: Dendrogram of cluster analysis of DGGE fingerprint.

除此之外, 部分条带, 例如条带 i、j 等只存在于采油井 L 中。利用 Quantity one 对 DGGE 图谱进行聚类分析表明, 注水井和采油井之间的细菌结构差异明显; 另外, 不同时间点注入水中的群落结构相对稳定, 而采油井内的群落结构变化较大。

## 2.2 克隆文库分析结果

4 个样品通过 16S rRNA 基因全长片段的扩增, 构建了克隆文库。

G 和 L 在时间点 A 的样品分别获得 115 和 69 个阳性克隆。按照 ARDRA 分型的结果, 文库 GA 中的序列划分为 18 个 OTU, 文库 LA 划分为 5 个 OTU, 2 个文库的库容分别为 93.0% 和 97.1% (表 1), 说明 2 个文库都具有较好的代表性。通过对每个 OTU 的代表序列的分析得知文库 GA 中的优势菌为 Proteobacteria 门 (图 2), 其中 51.3% 的细菌属于 Gammaproteobacteria, 34.8% 的细菌属于 Betaproteobacteria, 此外, Epsilonproteobacteria、Alphaproteobacteria、Clostridia、Deferribacteres 以及 Flavobacteria 也被检测到, 但数量上并非优势。优势属有 *Pseudomonas*、*Thauera* 和 *Marinobacterium*。文库 LA 的细菌多样性较单一, 97.1% 的细菌属于 Gammaproteobacteria 中的 *Psychrobacter*。两文库的 Shannon-Weiner 指数以及 Simpson 指数 (表 1) 均表明注水井中的细菌群落多样性明显高于采油井。利用 Unifrac 对文库 GA 和 LA 之间的差异分析结果表明, A 时间点注水井和采油井之间的细菌群落结构

差异显著 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

G 和 L 在时间点 B 的样品中分别获得 103 和 60 个单克隆, GB 划分为 15 个 OTU, LB 划分为 16 个 OTU (图 2)。2 个文库的库容分别为 92.2% 和 91.7%, 说明这 2 个文库也具有较好的代表性。GB 中 70.6% 的细菌属于 Betaproteobacteria, 而 LB 中的优势菌群有 Gammaproteobacteria (23.8%)、Alphaproteobacteria (14.3%) 以及 Bacilli (33.3%)。但是, 由两文库的 Shannon-Weiner 指数以及 Simpson 指数 (表 1) 可以看出, 在时间点 B, 采油井中的细菌多样性略高于注水井。Unifrac 分析结果表明此时间点注水井与采油井之间的细菌群落结构差异显著 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 1 基于克隆文库的微生物多样性分析  
Table 1 Analysis of microbial diversity based on 16S rRNA gene clone library

	GA	LA	GB	LB
克隆数 Clone number	115	69	103	60
OTU 数目 OTU number	18	5	15	16
文库饱和度 (C) Library coverage (%)	93.0	97.1	92.2	91.7
香农-威纳指数 (H) Shannon-Weiner index	2.048 0	0.776 4	1.849 0	2.341 0
辛普森指数 Simpson index (1-D)	0.789 1	0.399 5	0.772 2	0.860 6
均匀度指数 (E) Evenness index	0.430 8	0.434 7	0.423 5	0.649 2

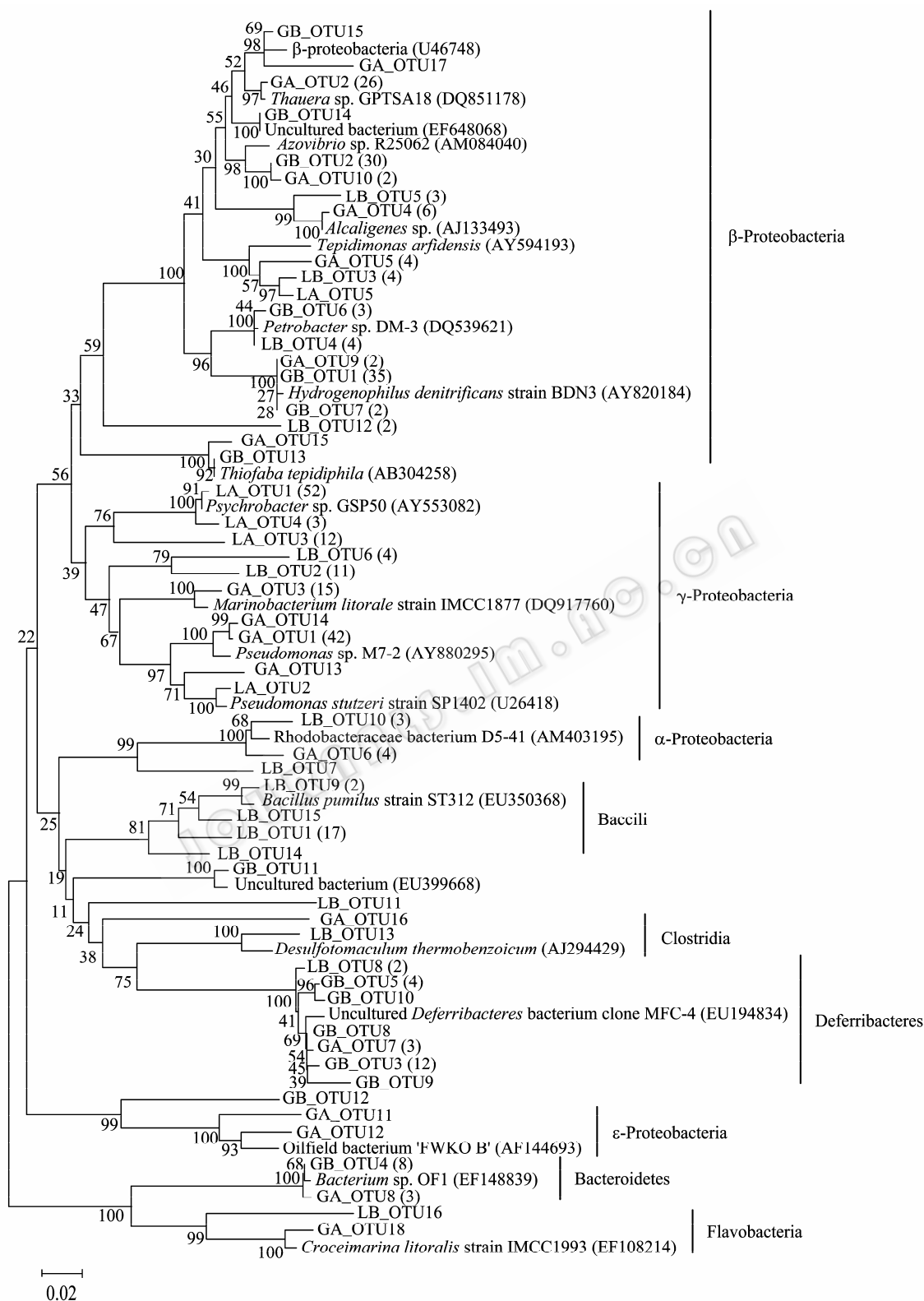


图2 代表性 OTU 的 16S rRNA 基因序列及其 GenBank 中最相似序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the represent OTU sequences of samples and their nearest neighbors retrieved from GenBank

Note: The numbers in parentheses indicate the clone numbers of each OTU.

表 2 克隆文库相似性的  $P$ -检验  
Table 2  $P$  value of pairwise comparison among libraries

Library name	GA	LA	GB	LB
GA	/	0.02	0.59	/
LA	0.02	/	/	0.06
GB	0.59	/	/	0.01
LB	/	0.06	0.01	/

两个时间点注水井中序列比对结果表明,在纲的水平上,文库 GA 与文库 GB 中的细菌类型相似,但各细菌的含量有一定变动。在属的水平上, *Azovibrio* 和 *Hydrogenophilus* 均从 A 时的 1.7% 分别增加到 B 时的 29.1% 和 35.9%, 另外, *Deferribacteres* 中某未知属的细菌也从 2.6% 增加到 18.4%。但是 Unifrac 的结果表明两个时间点注水井内的细菌结构并没有明显差异 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。与注水井细菌总体趋势相反,采油井在两个时间点的细菌结构发生了明显变化,细菌多样性显著增加。LA 中的优势属 *Psychrobacter* 在 LB 中未检测到, *Bacillus* 取而代之成为优势属,属水平的多样性明显增加,这一结果与 DGGE 图谱相一致。 $P$  值结果 ( $P = 0.06$ ) 证明两者之间有一定差异。

### 3 讨论

DGGE 和克隆文库均表明,注水井和采油井中的细菌群落结构均随时间变化而改变,但注入水中的变化明显小于产出液。虽然注入水中的某些属随时间变化有所浮动,但是细菌在纲的水平并没有随时间发生改变,而且文库相似性的  $P$  值检验也表明,注入水的群落结构在这 2 个时间点的变化不显著。然而采油井在 2 个时间点的优势菌在纲与属的水平均发生了显著改变,文库相似性的  $P$  值检验结果为显著差异。

微生物群落结构主要是由微生物对环境条件的适应所决定的,我们研究的油藏的采油系统在地上包括油水分离和水循环利用两部分,地上的油水分离及水循环利用系统属于半开放系统,空气、雨水、以及补给水中的微生物均可经由输水管道及储水池进入注入水,这些微生物来源会随时间、温度、气候等的变化而变化。然而,本研究所的油田中,地

上的储油罐、输水管道及储水池常年稳定运行,该系统内也形成了相对稳定的微生物群落。正常情况下,外部进入的微生物数量相对有限,它们虽可产生一定影响,但不会显著改变注入水的微生物群落结构。因而,注入水的群落结构可以长期保持相对稳定,这在我们对该油田多年的群落结构监测得到证实(结果未发表)。

本研究结果表明,尽管大量的微生物随注入水被注入到地下,但是,在距离注水井数百米的采油井中的微生物群落却没有受到这些注入微生物的显著影响。采油井中的微生物类型可能主要受到地下环境的影响。油藏地下环境复杂,原油开采后地层中由于泥浆、钻井液、注入水等外源物质的侵入导致地层环境可能发物理和化学的改变,在不同时间,水在地下两口井之间的流通途径可能不完全相同;同时地层中原油的成分及含量、离子种类以及浓度等可能在地层中呈现非均一性<sup>[18]</sup>;这些原因都可导致油藏中原位微生物的差异生长,因此,采油井中的微生物群落可能会因为油层中生态环境的变化,而随时间发生显著的改变。

对同一采样时间 G 和 L 之间的微生物结构比较结果显示,注水井和采油井中的微生物结构差异显著。这是由于采油系统在地上部分的温度、压力、溶氧量等条件相比地下高温、高压、缺氧、营养贫乏等条件差异显著,导致了注入水与产出液中的微生物类型的差异。另外,在本研究中,由离子示踪结果得知,微生物从注水井到达采油井需要经过 25 d,在这段流通过程中,注入水中的部分微生物由于不适应地下环境,或者地层的过滤作用而不能到达采油井,可能是造成了注水井和采油井之间微生物组成差异的原因。

本文样品中检测到的 *Pseudomonas*、*Thauera*、*Marinobacterium*、*Bacillus*、*Petrobacter* 等细菌在其它油藏环境中也有报道。例如,油藏中 *Pseudomonas* 属的细菌可以产生表面活性剂<sup>[19]</sup>; *Bacillus* 在油藏中不仅可以产表面活性剂,还可以产酸和产气<sup>[20]</sup>; *Marinobacterium* 在厌氧条件下可以将长链烷烃降解为短链小分子,而且在代谢过程中

还可以产酸产气<sup>[21]</sup>等等。另外我们还发现, A 时间点采油井中存在大量与 *Psychrobacter* 属的细菌相似性高于 96% 的细菌序列。*Psychrobacter* 最早发现于南极冰川中, 已知的种大多存在于海洋、南极土壤、海豹的粪便、发酵的海产品等, 且某些菌株可以产生低温脂肪酶<sup>[22-23]</sup>。Wentzel 等在分析细菌对长链烷烃的降解时提到一种新的可以降解 C<sub>32</sub> 或者更长链的烷烃的基因 *almA*, 而这种基因编码的黄素家族的单加氧酶在 *Psychrobacter* 中也存在<sup>[24]</sup>。而且, *Psychrobacter* 属的有些种已在原油污染的海洋中发现, 并证实具有降解原油碳氢化合物的功能<sup>[25]</sup>, 因此 *Psychrobacter* 可能在降解原油中的长链烷烃上有重要功能。但以前报道 *Psychrobacter* 属细菌的生存范围是 -10 °C-40 °C, *Psychrobacter* 菌株的分离主要采用 20 °C-30 °C 的分离条件<sup>[26]</sup>。本研究是第一次在高温油藏中发现此类细菌, 但它们在高温油藏中的功能有待进一步研究。

本论文揭示了相互连通的注水井和采油井在 2 个不同时间点样品的微生物群落结构。研究发现采油过程导致的油藏储层环境条件的变化, 对采油井样品中的微生物群落结构的影响较大。因此, 在微生物采油的现场实施过程中, 应该加强对微生物群落结构的监控, 并据此采取相应措施。这对于提高微生物采油的效率可能具有指导意义。

## 参 考 文 献

- [1] Beckman JW. The action of bacteria on mineral oil[J]. Industrial and Engineering Chemistry Research News, 1926, 10(3): 3-10.
- [2] Kaster KM, Bonaunet K, Berland H, et al. Characterisation of culture-independent and-dependent microbial communities in a high-temperature offshore chalk petroleum reservoir[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 96(4): 423-439.
- [3] Greene AC, Patel BKC, Yacob S. *Geoalkalibacter subterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe (III)- and Mn (IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family *Desulfuromonadaceae* and the genus *Geoalkalibacter*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 781-785.
- [4] Magot M, Ollivier B, Patel BKC. Microbiology of petroleum reservoirs[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 77(2): 103-116.
- [5] 刘金峰, 牟伯中. 油藏极端环境中的微生物[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 31-34.
- [6] Bordoloi NK, Konwar BK. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 63(1): 73-82.
- [7] Babu PS, Vaidya AN, Bal AS, et al. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes[J]. Biotechnology Letters, 1996, 18(3): 263-268.
- [8] Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 339-347.
- [9] 王立影, Maurice MS, 李辉, 等. 石油烃的厌氧生物降解对油藏残余油气化开采的启示[J]. 微生物学通报, 2010(1): 96-102.
- [10] 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[J]. 生态学报, 2005, 25(2): 237-242.
- [11] 袁三青, 薛燕芬, 高鹏, 等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 290-294.
- [12] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [13] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, et al. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(14): 4008.
- [14] Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(9): 2083-2088.
- [15] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [16] Ravenschlag K, Sahm K, Perntaler J, et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3982-3989.
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2):

- 150-163.
- [18] Hallmann C, Schwark L, Grice K. Community dynamics of anaerobic bacteria in deep petroleum reservoirs[J]. *Nature Geoscience*, 2008, 1(9): 588-591.
- [19] Arino S, Marchal R, Vandecasteele JP. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45(1/2): 162-168.
- [20] Jenneman GE, McInerney MJ, Knapp RM, et al. A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery[J]. *Dev Ind Microbiol*, 1983, 24: 485-492.
- [21] Fuse H, Takimura O, Murakami K, et al. Utilization of dimethyl sulfide as a sulfur source with the aid of light by *Marinobacterium* sp. strain DMS-S1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5527-5532.
- [22] Yoon JH, Lee CH, Yeo SH, et al. *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1007-1013.
- [23] Yumoto I, Hirota K, Kimoto H, et al. *Psychrobacter piscatorii* sp. nov., a psychrotolerant bacterium exhibiting high catalase activity isolated from an oxidative environment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 205-208.
- [24] Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, et al. Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(6): 1209-1221.
- [25] Brakstad OG, Nonstad I, Faksness LG, et al. Responses of microbial communities in arctic sea ice after contamination by crude petroleum oil[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 540-552.
- [26] Shivaji S, Reddy GSN, Raghavan PUM, et al. *Psychrobacter salsus* sp. nov. and *Psychrobacter adeliensis* sp. nov. isolated from fast ice from Adelie Land, Antarctica[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(6): 628-635.

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，原“高等院校教学”，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！