

PCR-DGGE 方法分析原油储层微生物群落结构及种群多样性

余跃惠¹, 张 凡^{1,2}, 向廷生¹, 刘彬彬², 赵立平^{2*}, 周玲革¹, 舒肤昌¹

(1. 长江大学化学与环境工程学院, 湖北 434023; 2. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要:使用基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)图谱分析结合条带割胶回收 DNA 进行序列分析,对新疆克拉玛依油田一中区注水井(12#9-11)和与该注水井相应的两个采油井(12#9-9S、13#11-8)井口样品微生物群落的多样性进行了比较并鉴定了部分群落成员。DGGE 图谱聚类分析表明注水井与两油井微生物群落的相似性分别为 30%和 20%,而两油井间微生物群落结构的相似性为 54%。DGGE 图谱中优势条带序列分析表明注水井样品和油井样品中的优势菌群为未培养的环境微生物,它们与数据库中 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 变形杆菌(*Proteobacteria*)和拟杆菌(*Bacteroidetes*)有很近的亲缘关系。DGGE 与分子克隆结合的分子生物学方法在研究微生物提高原油采收率(MEOR)机理,以及指导 MEOR 在油田生产中的应用有着重要的意义。
关键词:注水井;油井;变性梯度凝胶电泳(DGGE);多样性;微生物提高原油采收率(MEOR)

Microbial diversity in petroleum reservoirs analyzed by PCR-DGGE

SHE Yue-Hui¹, ZHANG Fan^{1,2}, XIANG Ting-Sheng¹, LIU Bin-Bin², ZHAO Li-Ping^{2*}, ZHOU Ling-Ge¹, SHU Fu-Chang¹ (1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Hubei 434023, China; 2. College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2): 237~242.

Abstract:Recent investigation of the microbial communities in an oil reservoir using culture-independent molecular techniques has indicated that this environment contains many uncultured assemblages, and that the cultured bacteria may represent very minor components of the true microbial diversity. In this study, 16S rDNA based PCR amplification and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used to monitor the microbial diversity in an injection well (12#9-11) and two related production wells (12#9-9S, 13#11-8) in the KELAMAYI oilfield (Xin Jiang Autonomous Region). The DGGE gel profiles showed significant difference between the microbial community structure of injection and production wells. The bacterial species richness in the injection well was higher than those of the production ones. Unweighted Pair Group Method Clustering (UPGMC) showed the similarity between the injection well and two production wells was 30% and 20% respectively, whereas the similarity between the two production wells was 54%. In addition, the dominant bands in the DGGE gel were excised and analyzed by nucleotide sequence analysis. This analysis of 10 excised bands showed that the dominant microorganisms in all samples had high sequence identity with rRNA genes from uncultured bacteria in the GenBank database (NCBI). Nine sequences of excised band were affiliated with α , γ , δ , ϵ -*Proteobacteria*, and one was related to *Bacteroides*. Two bands exhibited 100% identity to sequences of *Pseudomonas stutzeri* and *Aminobacter* sp. cox, respectively. Three bands showed relatively low identity (92% to 93%) to cultured bacteria in the GenBank database, indicating possible new taxa. This work analyzed the composition of the microbial community in KELAMAYI oilfield, which provides important data which may facilitate the isolation of new bacteria from this special underground environment. It also provides useful information for understanding the mechanism of MEOR and applying MEOR in practical oil production in KELAMAYI oilfield.

基金项目:湖北省科技厅国际合作重点资助项目(2004CA014)

收稿日期:2004-11-23;修订日期:2005-01-15

作者简介:余跃惠(1965~),男,湖南邵东,副研究员,主要从事微生物采油技术研究。E-mail:sheyuehui@263.net

* 通信作者 Author for correspondence. E-mail:lpzhao@sjtu.edu.cn

Foundation item: Hubei Provincial Science and Technology Department International Cooperation Foundation of China(No. 2004CA014)

Received date: 2004-11-23; Accepted date: 2005-01-15

Biography: SHE Yue-Hui, Associate professor, mainly engaged in microbial enhancement of oil recovery. E-mail:sheyuehui@263.net

Key words: injection well; production well; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); diversity; microbial enhancement of oil recovery (MEOR)

文章编号:1000-0933(2005)02-0237-06 中图分类号:Q938 文献标识码:A

一直以来许多科学工作者都在从事微生物提高原油采收率的研究,但这些研究都是集中在特殊生理学种群如硫酸盐还原菌^[1]、产甲烷菌^[2,3]等可培养微生物上,研究表明可培养微生物仅占自然界微生物的 0.1%~15%左右^[4],石油储层中势必也存在很多还没有被检测到的微生物。由于石油储层中可培养微生物与本源微生物多样性之间的偏差,评估人工培养菌种在地层本源微生物群落中的地位是困难的。微生物采油就是通过向地层中注入营养型激活剂和对石油开采有益的微生物发酵液等工艺过程从而达到石油增产的目的,因此从事微生物采油的研究首先必须弄清楚石油储层中微生物群落的组成、各微生物种群的地位、整个采油过程中各微生物群落的变化以及它们之间的相互关系,从而发现与原油采收率相关微生物种群并将其应用于微生物采油,因此在微生物纯培养的基础上来研究微生物提高原油采收率的机理,并以此指导微生物采油的现场运用还远远不够。

随着分子生物学和系统发育分析方法的发展,人们运用基于 16S rRNA(rDNA)基因的分子生物学方法来分析复杂的生态系统,近年来一些科学工作者对原油储层微生物生态系统进行了研究,其中 Orphan V J 等人通过对样品总 DNA16S rDNA 的 PCR 扩增片段克隆建库分析了高温油田微生物群落结构的组成^[5];Watanabe. K 等通过荧光原位杂交(FISH)、克隆建库、对原油储坑地层水中微生物群落进行了研究,并通过竞争 PCR(cPCR)对其中优势菌群进行定量分析^[6,7]。所有研究结果表明原油储层存在很高的微生物多样性,这些结果使人们进一步了解了原油储层微生物生态系统。

目前 16S rDNA 的 PCR 扩增片段通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)的方法常被用来分析微生物群落结构的变化^[8]。将 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增片段割胶克隆测序可进一步分析群落微生物在系统进化中的地位^[9]。采集从地层返排出来的油井样和注入地层的水样,通过直接提取样品中的总 DNA,并对总 DNA 进行 16S rDNA V3 区 PCR 扩增,利用变性梯度凝胶电泳来分析油田注水井注入水经过地层从油井返排回来后微生物群落结构的变化,并通过对 DGGE 优势条带序列的研究来分析各群落中的优势成员。通过研究了解了运用微生物采油前克拉玛依油田一中区原油储层中主要微生物群落组成,这一结果为该油田下一步微生物提高原油采收率的现场应用提供很多有价值的信息。

1 实验方法

1.1 样品

样品采自新疆克拉玛依油田一中区注水井 12#9-11 井井口和与其相应的两口油井 12#9-9S 井、13#11-8 井井口,注水井的部分注入水为油井产出液处理后的回注水,注水井和油井关系示意图见图 1。注水井样品为透明无色液体,其中含有少量的黑色悬浮颗粒;油井样为油水混合物,含水小于 50%。

1.2 基因组总 DNA 的提取

1.2.1 样品浓缩 在无菌条件下取 250ml 注水井样品用定性滤纸过滤除去样品中的悬浮颗粒,收集滤液,滤液通过聚碳酸酯膜(0.22μm,47mm)真空抽滤,滤膜用无菌缓冲液冲洗两次^[10]。将滤膜取出剪成碎片装入 10ml 的离心管中-20℃保存。

取 250ml 油井油水混合样品将样品加热到 70℃使油水充分分离,用定性滤纸过滤收集滤液,将滤纸上的原油装入 3 个无菌的 100ml 的离心管中,在其中加入等体积的 PBS 缓冲液,涡旋 10min 用定性滤纸过滤收集滤液,合并两次收集的滤液通过聚碳酸酯膜(0.22μm,47mm)真空抽滤,滤膜用无菌缓冲液冲洗两次,将滤膜取出剪成碎片装入 10ml 的离心管中-20℃保存。

1.2.2 样品总 DNA 的提取 将离心管在室温下解冻在其中加入 360μl 新鲜的溶菌酶溶液 37℃温育 1h(150r/min)后,加入 115μl SDS(10%)溶液和 25μl 蛋白酶 K(20mg/ml)接着温育 2h。随后加入 400μl 的 5mol/L NaCl 上下颠倒混匀后在其中加入预热到 65℃的 280μl CTAB 溶液,并在 65℃下培养 20min。

初提的 DNA 中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)上下颠倒混匀离心(12000g,30min),取上清加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)上下颠倒混匀离心(12000g,30min),取上清加入 0.6 倍体积的异丙醇-20℃沉淀 3h,离心(14000g,20min)后去上清液,将 DNA 溶于 30μl 无菌水,加入 1.5μl RNaseA (20mg/ml) 37℃消化 20min。用 DyNA Quant 200 (Pharmacia Biotech)DNA 浓度测定仪来测定 DNA 浓度。

1.3 基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增

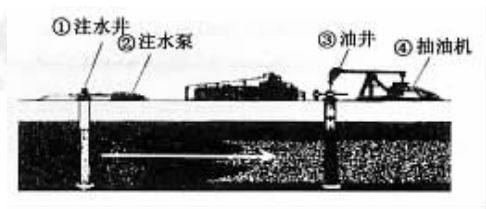


图 1 注水井与油井关系示意图

Fig.1 The relationship between injection well and production well

① 注水井 Injection well; ② 注水泵 Injection pump; ③ 油井 Production well; ④ 抽油机 Oil extraction machine

使用 16S rDNA V3 区通用引物 P2(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')和 P3(5'-CGCCC GCCGCGCGCGGCGGGCGGGG CGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAG CAg-3')^[8]从油田样品基因组总 DNA 中扩增 16S rDNA V3 区基因片段,PCR 扩增体系和程序参考文献^[8]。扩增产物再经过一次“reconditioning PCR”以及聚丙烯酰胺凝胶电泳来消除普通 PCR 过程中的单链 DNA 和杂合双链 DNA 污染^[11]。

1.4 基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增片段变性梯度凝胶电泳(DGGE)

基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增片段通过 DGGE (Bio-Rad)分离来研究微生物群落。聚丙烯酰胺的变性梯度范围为 35%~60%, DNA 扩增产物上样量为 200ng。200V,1×TAE 缓冲液中电泳 240min。

电泳完毕后用 SYB green I (1×TAE,1:10000)染色 30min,通过 UVI 成像系统来成像。

1.5 割胶回收主要条带克隆

将 DGGE 图谱上的主要条带割胶回收,回收的条带浸泡在 50μl 的无菌水中 4℃过夜,取 1μl 为模板按基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增体系和程序再次扩增。扩增产物通过 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。用 Promega 公司的 pGEM-T easy vector system 将纯化产物与载体连接,连接产物通过 CaCl₂ 法转化到大肠杆菌 DH5α 中,每个条带挑取 5 个阳性克隆转化子。

1.6 DGGE 条带比对

提取含有割胶条带 DNA 片段克隆转化子质粒,使用 16S rDNA V3 区通用引物 P2 和 P3^[8]扩增质粒载体中的 16S rDNA V3 区插入片段,PCR 扩增体系和程序步骤同 1.3,DGGE 操作同 1.4 所示,但质粒载体中的 16S rDNA V3 区扩增产物的上样量为 20ng。

1.7 割胶回收条带测序结果分析

每条割胶条带挑一个比对正确的阳性单克隆送上海博亚公司测序分析。应用 Gene Tool 软件将测序公司返回原序列进行编辑,非嵌合体序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 数据库中进行比对分析,寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。

2 结果

2.1 样品基因组 DNA 提取和 16S rDNA V3 区扩增结果

3 个样品总基因组片段均大于 20Kb,其中注水井(12#9-11)样品 DNA 浓度为 49ng/μl,采油井 12#9-9S、13#11-8 样品 DNA 浓度分别为 32ng/μl 和 29ng/μl,该结果可进行进一步的分子生物学分析,16S rDNA V3 区扩增片段长度约为 200bp,可用于 DGGE 分析(图 2)。

2.2 通过 DGGE 图谱对油田微生物群落结构的分析

从 DGGE 图谱可知注水井样品图谱中有 16 条主要条带,除 a 条带外其它条带强度都比较均一。两油井样品中分别有 4 条主要条带,其中两者间有 3 条共有主带图。通过聚类分析(图 3)注水井中微生物群落与两油井微生物群落的相似性分别为 30%和 20%,两油井微生物群落相似性为 54%。注水井样品很多主要条带如 a、b、d 等在油井样品的 DGGE 图谱中没有与其相应的条带,且油井所返排回来的油水混合样中有些条带如 e、f、g、h 在注水井样品中也找不到与其相关的条带。

2.3 DGGE 割胶条带比对和测序结果分析

所有割胶条带都能找到与其相对应的阳性克隆转化子,DGGE 割胶条带比对结果如图 4。分析的 10 条 DGGE 优势条带序列中有 7 条序列与 GenBank 数据库中未培养微生物相似(表 1);另外 3 条序列属于变形杆菌,它们分别与 *Pseudomonas stutzeri* 和 *Aminobacter* sp. cox 的同源性都大于 98%,有的同源性甚至达到了 100%;Bb 与 Bg 在 GenBank 数据库中比对结果完全相同,但 Bb 与 Bg 序列仍有 2 个碱基的差异,由于 DGGE 能分辨序列间 1 个碱基间的差异,所以它们在 DGGE 图谱中迁移位置不同。

用 GenBank 数据库中每条序列亲缘关系最近的菌以及与之亲缘关系最近的已鉴定出来的微生物构建系统发育树(图 5),结果表明这 10 个克隆属于细菌界,它们与数据库中 α、γ、δ、ε 变形杆菌(*Proteobacteria*)和拟杆菌(*Bacteroidetes*)有很近的

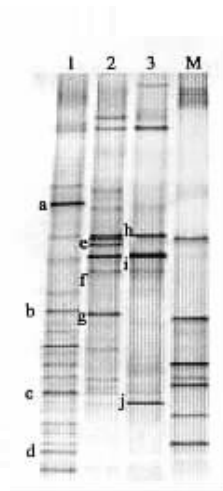


图 2 样品 16SrDNA V3 区 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE analysis of 16Sr DNA V3 region

1 Sample of the injection well(12#9-11); 2 Sample of the production well(12#9-9S);3 Sample of the production well(13#11-8); M The DGGE marker

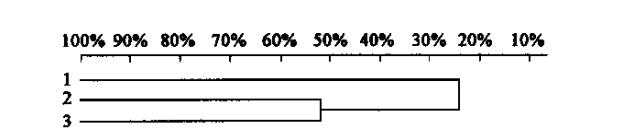


图3 注水井与其相应油井微生物多样性聚类分析

Fig. 3 The analysis of Unweighted Pair Group Method Clustering (UPGMC) of the DGGE banding pattern of the three wells shows the similarity of injection well and two production well is 30% and 20% respectively, the similarity of the two production wells is 54%

亲缘关系。其中 Bc 与数据库中之同源性最高的未培养微生物的相似性仅为 94%,而与之亲缘关系最近的已鉴定的微生物的同源性也仅为 93%,因此这一序列所代表的微生物有可能为一新的未培养物种;条带 Ba、Bf、Bb、Bg 对应的序列与数据库中未培养微生物和已鉴定的微生物的相似性相同或比较接近,因此可确定这些条带所对应的微生物在属水平上的发育地位;Bd、Bh 条带所对应的序列与数据库中未培养微生物的相似性均为 98%,而它们与已鉴定的微生物的相似性分别仅为 93%和 92%,该结果表明这 2 条带所代表的微生物比较新,仅能确定其所属纲上的发育地位。

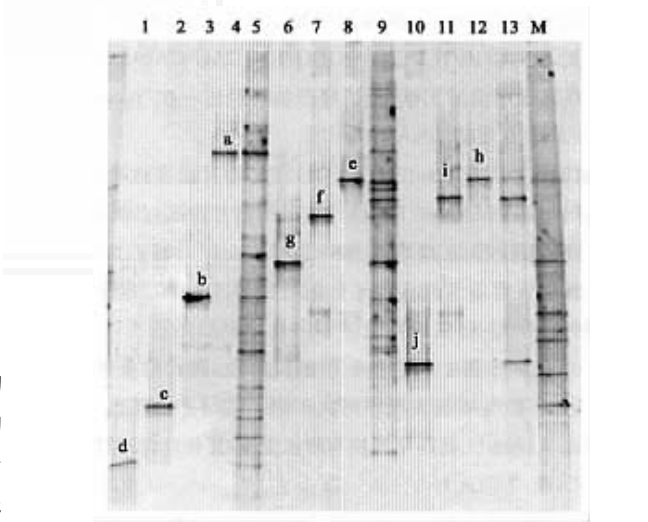


图4 DGGE 割胶条带比对图谱

Fig. 4 16SrDNA V3 region DGGE profile of the clones of the DNA cutting from the DGGE gel bands

Lane 5: sample of the injection well (12 # 9-11); Lane 9: sample of the production well (12 # 9-9S); Lane 13: sample of the production well (13 # 11-8)

表1 DGGE 优势条带序列比对结果					
Table 1 Tentative identification of dominant DGGE bands by sequencing the excised and BLAST analysis					
割胶条带编号 Band name	序列长度(bp) Sequence size	登陆号 Accession	Genbank 数据库中最相似菌种名称 (登陆号)Closest relative	相似性(%) Alignment, % similarity	阈值 Score
Ba	169	AY851700	Uncultured epsilon proteobacterium (AY225613)	165/169,97	303
			Sulfurospirillum sp. 18.1 (AY357199)	165/169,97	303
Bb	169	AY851699	Uncultured bacterium (AY340831)	167/169,98	319
			Campylobacter sp. No3A (AY135396)	164/169,97	295
Bc	195	AY851701	Uncultured bacterium (AF482435)	185/195,94	299
			Syntrophobacter pfennigii (X82875)	183/195,93	293
Bd	195	AY851702	Uncultured bacterium (AY327189)	192/194,98	369
			Olavius algarvensis sulfate-reducing endosymbiont (AF328857)	180/194,92	274
Be	194	AY851697	Pseudomonas stutzeri (AJ006105)	193/194,98	379
Bf	194	AY851694	Uncultured bacterium (AY770964)	193/194,99	377
			Pseudomonas sp. NUST03 (AY293865)	193/194,99	377
Bg	169	AY851698	Uncultured bacterium (AY340831)	167/169,98	319
			Campylobacter sp. No3A (AY135396)	164/169,97	295
Bh	189	AY851693	Uncultured bacteroidetes bacterium Bacteroides sp. 22c (AY554420)	186/189,98	351
				177/189,93	280
Bi	194	AY851695	Pseudomonas stutzeri (AY364327)	194/194,100	385
Bj	169	AY851696	Aminobacter sp. cox (AY307924)	169/169,100	335

3 结论

原油储层环境复杂,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使地层环境发生了改变,同时也使地层微生物生态系统发生了改变。外源微生物随着钻井与采油过程被带入到地层,从 DGGE 图谱可知注水井中微生物多样性较油井丰富,聚类分析表明注水井样品和油井样品微生物群落的相似性随两者空间上距离的增加而减少。注水井样品 DGGE 图谱中的优势条带和油井样品的优势条带存在很大的差异,注水井样品图谱中很多优势条带在油井样品图谱中消失,油井中也出现了一些新的优势条带,该结果表明很多注入水中的外源微生物在地层环境下失去其优势地位,油井样品中主要的菌群可能为地

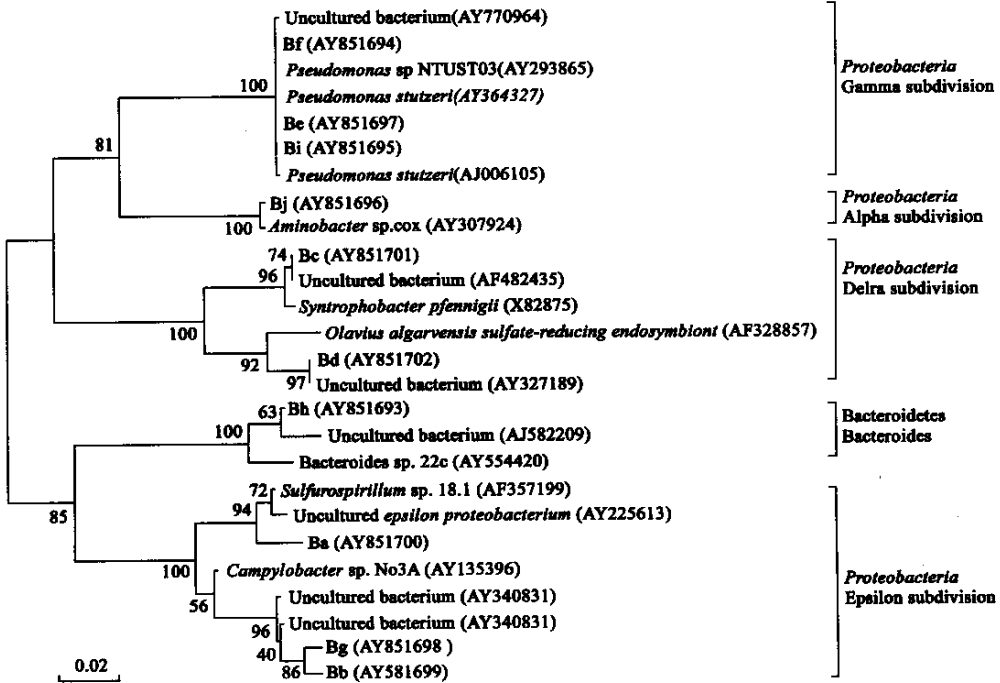


图 5 DGGE 割胶条带 16S rDNA V3 序列所代表的微生物的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree constructed by the sequences of the excised DGGE bands and their nearest neighbours in GenBank

层本源微生物菌群。

DGGE 条带割胶测序具体分析了注水井样品与油井样品的微生物种群多样性,注水井和油井样品中主要为未培养的微生物,通过系统发育分析可知这些未培养微生物属 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 变形杆菌 (*Proteobacteria*) 的假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、硫酸盐还原菌属 (*Sulfate-reducing*)、氨基杆菌属 (*Aminobacter*) 等和拟杆菌纲 (*Bacteroidetes*) 的拟杆菌属 (*Bacteroides*),这一结果与近年来人们通过分子生物学方法来研究油田微生物群落组成基本相同,但由于各研究工作者所研究的地层情况的不同,因此在微生物群落组成的优势种群上存在一定的差异,例如 Orphan V J 等研究高温以及富含硫的石油储层,因此在它们研究结果中盐杆菌属、热厌氧杆菌和硫氧化菌等为优势群^[6];Watanabe K 等通过研究证明原油储坑中甲烷菌、硫酸盐还原菌等占有一定的优势地位^[7,8];Stetter K O 等研究高温海上油田中古生菌为优势种群。

本文研究为中温石油储层,因此结果中占优势地位的菌群的大部分为嗜中温微生物如假单胞菌、氨基杆菌等。一直以来人们通过传统培养从原油储层中主要分离出了硫酸盐还原菌、发酵菌、硫氧化细菌以及产甲烷菌^[6~8],其中部分结果与本文研究所得的结果吻合,但 DGGE 优势条带中没有产甲烷菌,这主要是因为产甲烷菌为古生菌,目前研究所用的引物为细菌特异性引物,接下来将会寻找古生菌特异性引物,对古生菌群落进行研究。基于目前 16S rDNA 的分子生物学方法对原油储层微生物群落结构的报道还比较少,因此对原油储层中微生物优势种群还需要做进一步的研究。

本文通过 PCR-DGGE 分子技术对新疆克拉玛依油田一中区块的注水井 (12# 9-11) 和与该注水井相应的两个采油井 (12# 9-9S、13# 11-8) 井口样品进行了分析,揭示了这些油井原油储层中微生物的群落结构。从分析的样品中得到了很多新的基因序列,且这些序列所代表的微生物在原油储层中占有优势地位,但因为它们未被培养而一直不为人所知,因此也很少有报道来研究它们对原油储层的影响,人们有必要寻找新的方法对这些微生物进行分离和进一步研究,从而了解这些微生物在原油储层相互作用,为研究微生物提高原油采收率的机理研究以及该机理在实际生产中的应用提供更多的可靠依据。

References:

[1] Nilsen R K, Beeder J, Thorstenson T, et al. Distribution of thermophilic marine sulfatereducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 1793~1798.

[2] Ng R, 万方数据 J, Gawel L J. Possible nonanthropogenic origin of two methanogenicisolates from oil-producing wells in the San Miguelito fiele, Venture County, California. *Geomicrobiol. J.*, 1988, **7**: 185~192.

- [3] Rozanova E P, Nazina T N, Galushko A S. Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsheronum* gen. nov., sp. Nov. *Microbiology*, 1988, **57**: 514~520.
- [4] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**: 143~169.
- [5] Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 700~711.
- [6] Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K, *et al.* Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 4803~4809.
- [7] Watanabe K, Kodama Y, Kaku N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiol.*, 2002, **2**: 23.
- [8] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 695~700.
- [9] Sun H Y, Deng S P, *et al.* Bacterial Community Structure and Diversity in a Century-Old Mure-Treated Agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(10): 5868~5874.
- [10] Irma N G, Rivera, Erin K Lipp, *et al.* Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(7): 599~606.
- [11] Zhang X L, Yan X, Gao P P, *et al.* Optimized sequence retrieval from single bands of TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J. Microbiol. Method*, 2005, **60**(1): 1~11.
- [12] Voordouw G, Armstrong S M, Reimer M F, *et al.* Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**: 1623~1629.
- [13] Stetter K O, Huber R, Bloechl E, *et al.* Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*, 1993, **365**: 743~745.

