

油田硫酸盐还原菌快速定量检测方法

魏利, 马放, 王继华, 赵立军

(哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 现有油田废水中硫酸盐还原菌检测周期长、检测费用较高, 本研究应用聚合酶链式反应(PCR)技术与倍比稀释法(MPN)相结合的 DSR-MPN-PCR 法, 对硫酸盐还原菌进行快速定量检测。从废水中制备了直接用于 PCR 扩增的菌液, 保证了定量准确性; 建立以硫酸盐还原菌亚硫酸盐还原酶基因(*Dsr*)为靶位点的通用探针 DSR1F 和 DSR5R 的反应体系和扩增条件。结果表明, 该方法检测灵敏度明显比液体稀释培养法高 2 个数量级, 真实地表征了废水中实际的 SRB 菌数量, 整个操作过程需要 3~4 h, 检测结果非常稳定, 降低了检测费用, 可以在生产中应用。

关键词: 硫酸盐还原菌; 菌液制备; 定量检测; 异化型亚硫酸盐还原酶; DSR-MPN-PCR 法

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)02-0441-04

Rapid Quantitative Detection of Sulfate Reducing Bacteria in Oilfield

WEI Li, MA Fang, WANG Ji-hua, ZHAO Li-jun

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: It take long time and high cost to measure sulfate reducing bacteria (SRB) in wastewater of oil field. A rapid quantitative method was developed by combining polymerase chain reaction(PCR) and most probable number(MPN) to measure sulfate reducing bacteria (SRB) in wastewater of oil field. The bacterium solution was directly prepared from wastewater for PCR amplification, which ensured quantitative accuracy. Reaction system and amplification condition were designed using universal primers DSR1F and DSR5R of dissimilatory sulfite reductase in SRB. The result show that the accuracy of this method is two magnitude higher than that of MPN. The whole measuring process take 3~4 hours and the reproducibility of this method is extremely stable, being fit to practical process.

Key words: sulfate reducing bacteria; bacterium solution preparation; quantitative detection; dissimilatory sulfite reductase; DSR-MPN-PCR assay

硫酸盐还原菌(sulfate reducing bacteria, SRB)是一类与硫酸盐还原反应相关细菌的总称^[1]。在油田生产的过程中, 硫酸盐还原菌的繁殖会造成很多危害, 如地面系统中腐蚀产物导致废水发黑、悬浮固体含量增加, 使处理后水中悬浮固体含量超标^[2]。硫酸盐还原菌的快速定量检测一直是油田生产中的一大难题, 其对于油田水质检测和地面系统中合理杀菌浓度的确定, 及时的指导油田生产具有重要的意义。

SRB 的检测方法主要集中在 3 个层面: 一是传统的检测方法, 培养法以及显微镜直接计数法; 二是基因层面, 基于 SRB 种属的 16S rDNA 序列的定性检测, 如基因芯片以及 FISH 技术^[3,4]对 SRB 的定量和定性检测, APS 还原酶基因和异化型亚硫酸盐还原酶基因进行定性检测^[5,6]; 三是蛋白层面, 主要是通过免疫吸附的原理得以实现, 如已经申请专利的基于 APS 还原酶的 SRB 的快速检测试剂盒^[7]。目前, 油田系统内 SRB 菌的计数主要执行中国石油天然气行业标准^[8], 该检测方法存在的问题是操作繁琐、培养周期过长, 需要 14 d, 检测结果偏低, 检测结果意义有限。

异化型亚硫酸盐还原酶(dissimilatory sulfite reductase, DSR)是其中的关键酶之一^[9], *Dsr* 基因在同一类群的 SRB 中相当保守, 由 3 个不同的亚基组成的六聚体($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), 在不同类群 SRB 中却有较大差别, 可以作为 SRB 的分类与进化的指标^[10,11], 是 16S rDNA 序列分子分类法的补充, 对于 SRB 菌的快速检测提供一个稳定的靶位点^[12]。

应用 PCR 技术结合倍比稀释法, 及其对样品的前处理时直接用于 PCR 扩增的“菌液制备”, 开发一种从取样到“DSR-MPN-PCR”计数全过程, 准确、快速、稳定的硫酸盐还原菌的定量检测方法, 整个过程可在 3~4 h 完成, 从而有效的缩短检测周期, 指导生产实践。

1 材料与方法

1.1 试验材料

rTaq DNA 聚合酶、dNTP 和 PCR Marker 等均为

收稿日期: 2006-03-30; 修订日期: 2006-05-20

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目(50521140075)

作者简介: 魏利(1978~), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物技术与工程, E-mail: weilihit@126.com

宝生物公司产品;通用引物是根据 Joulian 等人针对硫酸盐菌的异化型亚硫酸盐还原酶 α 亚基设计的, α 亚基中包含有典型的硫酸盐-亚硝酸盐还原酶的保守框架(C-X₅-C)-X_n-(C-X₃-C)和 CP-X_n-C-X₂-C-X₂-C 框架^[13],能与[Fe₄S₄]-嗜咯铁铁卟啉(siroheme)结合,引物分别为 DSR1F(5'-AC[C/G] CACTGGAAGCACG-3')和 DSR5R (5'-TGCCGAGGAGAACGATGTC-3')^[14,15],由上海生工合成;“菌液制备前处理缓冲液”贮存液(母液×10):17 g NaCl,2 g KCl,12 g Na₂HPO₄,2 g KH₂PO₄,调 pH 值为 7.5,在 121 °C 条件下灭菌 15~30 min;试验的水样分取自 5 个采油废水处理厂的出水和进水:一厂北 1-2、四厂新杏九联、一厂聚北一污水站、六厂喇 400 联合站、七厂甸二联合站;SRB 菌计数:硫酸盐还原菌检测试剂瓶(北京华兴化学试剂厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 直接用于 PCR 扩增的“菌液制备”

目前,基于环境样本中如生物反应器、土壤中的 DNA 的制备的方法多数采用溶菌酶、CTAB 或 SDS 法提取样本中微生物的 DNA, DNA 得率低,多为弥散的条带,或者无法进行 PCR 扩增.更深层的意义在于当环境样本 DNA 用于微生物分子生态学和特定菌种的定量检测研究,其 DNA 的损失率较大,对于数量少的微生物根本无法提取,这样的 DNA 用于微生物分子生态学的研究不能够全面的反映种群的结构和动态演替情况,用于环境样本中微生物的定量检测则更加不准确。

“菌液制备”是将环境样本中除微生物菌体以外的杂质尽量去除,在缓冲液中只含有微生物菌体,直接作为 PCR 扩增的模板 DNA.菌液制备方法如下(以下步骤在超净工作台完成,先紫外线灭菌 20~40 min):①含有高纯氮气的厌氧管中的油田污水水样,取 1 mL 注入到经灭菌的 1.5 mL 的离心管中;②在振荡器上充分振荡 5 min,13 000 r/min 离心 1 min;从管中轻轻的弃上清液 0.9 mL;③在剩余的 0.1 mL 中加入“菌液制备前处理缓冲液”0.9 mL,在振荡器上充分振荡 5 min;④13 000 r/min 离心 2 min,弃上清液 0.98 mL,充分振荡 2 min,制备完毕.短时间内使用 4 °C 保存即可,长时间使用需要 -20 °C 保存。“菌液制备”是定量检测的关键步骤,对于含油污水的细胞具有较高的回收率.同时适用于污泥和土壤等环境样本,细胞的回收率的主要影响因素是振荡的充分程度,能否有效地将污泥、土壤颗粒中细菌释放出来。

1.2.2 DSR-MPN-PCR 法

具体的操作步骤:①在冰上样品进行 10 倍梯度稀释(将上述的菌液吸取 2 μ L 然后加入用于倍比稀释的管中,加入 18 μ L 的去离子水,然后在从中吸取 2 μ L 进行下一步的稀释,最终水样被稀释 10 倍,依次操作,从上管中取样 2 μ L 加入下一个用于倍比稀释的管中,加入 18 μ L 的去离子水,直到选择稀释的倍数);②冰上的 PCR 操作,反应体系为 20 μ L:包括:Buffer(10×)2 μ L, dNTP 0.3 mmol·L⁻¹ 2 μ L, 引物 DSR1F 和 DSR5R 各 1 μ L 浓度为 0.1 μ mol·L⁻¹, *rTaq* DNA 聚合酶 0.3 U,其余的加去离子水 11.7 μ L,然后加 2 μ L 的样品;③设五管平行法,每个梯度做 5 个平行的 PCR 反应;④PCR 在扩增仪上的扩增,扩增程序为:94 °C 预热 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58.0 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 30 次,最后 72 °C 延伸 10 min;⑤扩增产物于 1.0% 的琼脂糖电泳检测;⑥查表计数(具体见结果与讨论)。

2 结果与讨论

2.1 PCR 体系和反应条件的优化以及目的片段的克隆

主要针对复性温度和 PCR 扩增体系进行优化,梯度 PCR 表明复性温度过低容易产生杂带,复性温度过高会造成扩增条带过弱或不能扩增出条带,58.0 °C 是比较合适的退火温度.同样,确定了适宜的反应体系为 20 μ L: Buffer(10×)2 μ L, dNTP (0.3 mmol·L⁻¹) 2 μ L, 引物 DSR1F 和 DSR5R (0.1 μ mol·L⁻¹), *rTaq* DNA 聚合酶 0.3 U, 去离子水 11.7 μ L, 2 μ L 的菌液,在此扩增条件下,扩增条带的特异性强,无杂带产生.将扩增的片段连接到载体 pGEM-T(Promega)后,随机挑取单菌落进行测序的结果表明,该扩增片段为 243 bp(图 1),序列在 GenBank 进行 BLAST,与 *Desulfovibrio desulfuricans* (AF273034)的 α 亚基相似性为 98%,属于硫酸盐还原菌(*Desulfovibrionaceae*)亚硫酸盐还原酶基因中的保守序列。

2.2 DSR-MPN-PCR 法对污水中 SRB 菌的定量结果分析

采用五管平行法进行冰上 PCR 操作,根据扩增产物的电泳结果来记录各样品的阳性条带数,具体查表计算方法是:选择后 3 个连续稀释梯度(10^x、10^{x+1}、10^{x+2}),根据阳性条带确定近似值(abc),然后查阅文献[16]得出对应数值,计算出 1 mL 检测水样中 SRB 菌的总数。

1 CCCACTGGAA GCACGGCGGC ATCGTGGGTG TGTTCGGTTA CGGCGGCGGC GTTATCGGCC 60
61 GTTACTGCGA CCAGCCCGAA ATGCTCCCCG GCGTGGCGCA CTTCACACACC ATGCGTGTTG 120
121 CCCAGCCTTC CGGCAAGTAC TACCACAGCA AGTTCCTGCG CGACCTGTGC GACATTIGGG 180
181 ATCTGCGTGG TTCTGGTCTG ACCAACATGC ACGGCTCCAC CGGCGACATC GTTCTCCTCG 240
241 GCA 243

图 1 引物 DSR1F 和 DSR5R 扩增的序列
Fig.1 Amplification sequence of primers DSR1F and DSR5R

计算公式如下:1 mL 检测样中 SRB 菌的总数(个/mL)= 条带近似值(abc)表中对应数值×3 个稀释梯度中第 1 个稀释梯度的稀释倍数(abc)×10⁴×10×1.02%;如图 2~3 所示,共稀释 7 个梯度,条带近似值(540),查表对应数值 13.0,代入公式,1 mL

检测样中硫酸盐细菌的总数为 1.326×10⁷个/mL. 采用三管平行法记录的结果数量级上与五管平行法无差别,五管平行法精确度更高,更加准确,置信度大于 99%.

2.3 DSR-MPN-PCR 法和液体稀释培养法的比较

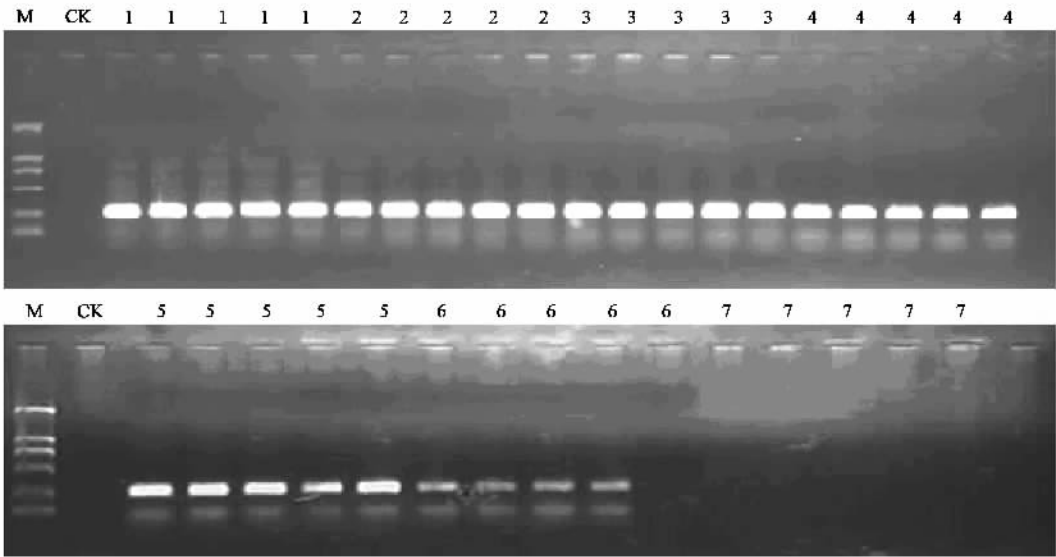


图 2 DSR-MPN-PCR 法 1~7 梯度 1.2%的琼脂糖电泳图谱
Fig.2 Agarose gel (1.2%) electrophoresis of DSR-MPN-PCR method from No.1 to No.7 diluting gradient

选择 5 个污水厂出水 and 进水进行硫酸盐还原菌的检测,从表 1 可见,DSR-MPN-PCR 法检测结果明显比液体稀释培养法高,且 2 个结果在数量上具有一定的相关性,前者检测结果大约平均是后者的 100 倍,而液体稀释培养法的结果一般认为与实际值相比偏低,难以真实地表征了水样中实际的 SRB 菌数量;SRB 菌检测试剂瓶需要 14 d,而 DSR-MPN-PCR 法整个操作过程需要 3~4 h,有效的缩短了检测的周期,准确的反映了当时生产实际情况、可以直接有效地指导生产.采用硫酸盐还原菌检测试剂瓶检测单个样品成本大约为 60 元,考虑到仪器损耗等 DSR-MPN-PCR 法检测成本大约为 30 元,大大地降低了检测费用.对以上 5 个废水厂出水和来水的检

测结果非常的稳定,同时检测结果具有可重复性.

3 结论

- (1)解决了环境样本中微生物 DNA 提取过程中得率低的问题,直接制备用于 PCR 扩增的菌液,是实现环境样本中微生物定量检测的前提和基础.
- (2)建立以硫酸盐还原菌的异化型亚硫酸盐还原酶 α 亚基设计的通用探针 DSR1F 和 DSR5R 的反应体系和扩增条件.
- (3)DSR-MPN-PCR 法检测灵明度明显比液体稀释法高约 2 个数量级,整个操作过程需要 3~4 h,检测的结果非常的稳定,降低检测费用 50%,可以在生产中应用.

表 1 DSR-MPN-PCR 法和液体稀释培养法(MPN)法的检测结果比较

Table 1 Detected results of DSR-MPN-PCR and MPN			
样品	DSR-MPN-PCR 检测结果/个·mL ⁻¹	液体稀释培养法(MPN) /个·mL ⁻¹	DSR-MPN-PCR/MPN
一厂聚北一废水站(进水)	3.57 × 10 ⁵	3.5 × 10 ³	1.02 × 10 ²
一厂聚北一废水站(出水)	3.06 × 10 ⁵	3.0 × 10 ³	1.02 × 10 ²
一厂北 1-2(进水)	3.06 × 10 ⁴	3.0 × 10 ²	1.02 × 10 ²
一厂北 1-2(出水)	2.55 × 10 ³	7.5 × 10 ¹	0.34 × 10 ²
四厂新杏九联(进水)	2.55 × 10 ⁴	3.0 × 10 ²	0.85 × 10 ²
四厂新杏九联(出水)	1.33 × 10 ⁵	1.3 × 10 ³	1.02 × 10 ²
六厂喇 400 联合站(进水)	5.1 × 10 ²	5.0 × 10 ⁰	1.02 × 10 ²
六厂喇 400 联合站(出水)	6.12 × 10 ²	6.0 × 10 ⁰	1.02 × 10 ²
七厂匍二联合废水处理站(进水)	2.55 × 10 ³	2.5 × 10 ¹	1.02 × 10 ²
七厂匍二联合废水处理站(出水)	3.06 × 10 ³	5.0 × 10 ¹	0.612 × 10 ²

参考文献:

[1] 冯颖,康勇,张忠国.硫酸盐还原体系的主要影响因素研究[J].水处理技术,2005,31(3):20~24.

[2] 何正国,王修垣.油藏中硫酸盐还原菌引起的腐蚀诊断及其生物学防治[J].油田化学,1999,16(4):390~392.

[3] Cole J R, Chai B, Marsh T L, *et al.* The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy[J]. Nucleic Acids Res., 2003,31(1):442~445.

[4] Amann R I, Binder B J, Olson R J, *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990,56:1919~1925.

[5] Loy A, Lehner A, Lee N, *et al.* Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002,68:5064~5081.

[6] Loy A, Kusel K, Lehner A, *et al.* Microarray and Functional Gene Analyses of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Low-Sulfate, Acidic Fens Reveal Cooccurrence of Recognized Genera and Novel Lineages [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004,70: 6998~7009.

[7] Strategic Diagnostic Inc. Rapid Chek®-SRB Detection System[P]. USA Patent: 4999286, 1992.

[8] SY-T0532-93,中国石油天然气行业“油田注入水细菌分析方法——绝迹稀释法”部颁标准[S].

[9] 李亚萍,钟江.一种硫酸盐还原菌的亚硫酸盐还原酶基因(*dsrA*)的克隆和序列分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 2002,41(6):674~678.

[10] Perez J R, Young L Y, Kerkhof L J. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsrAB*) genes [J]. FEMS Microbiol Ecol., 2001, 35: 145~150.

[11] Wagner M, Roger A J, Flax J L, *et al.* Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration[J]. J. Bacteriol., 1998,180:2975~2982.

[12] Karkhoff-Schweizer R R, Huber D P, Voordouw G. Conservation of genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995,61:290~296.

[13] Dahl C, Kredich N M, Deutzmann R, *et al.* Dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physicochemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase gene[J]. J. Gen. Microbiol., 1993,139:1817~1828.

[14] Joulain C, Ramsing N B, Ingvorsen K. Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from etuarine sediments[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001,67:3314~3318.

[15] Wagner M, Roger A J, Flax J L, *et al.* Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration [J], J. Bacteriol., 1998,181(11):2975~2982.

[16] 马放,任南琪,杨基先,等.污染控制微生物学实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002. 32~38.