

石油集输系统中硫酸盐还原菌的分布和多样性

罗丽, 刘永军*, 王晓昌

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055)

摘要: 分别用亚甲基比色法、MPN法和16S rRNA基因序列分析方法, 研究中国长庆油田(陕北)石油集输系统中原油和水样中 H_2S 的分布以及硫酸盐还原菌(SRB)的分布和多样性。结果表明, 从油井井口经石油计量站再到石油综合处理站的集输系统中, 原油中 H_2S 的含量依次为105.80、99.70、24.57 $mg \cdot L^{-1}$; SRB的数量依次为98、300、680 $CFU \cdot 100 mL^{-1}$ 。水样中 H_2S 的含量依次为1.13、2.80、3.49 $mg \cdot L^{-1}$; SRB的数量依次为9 500、40 000、76 000 $CFU \cdot 100 mL^{-1}$ 。集输系统中水样中SRB的数量平均为原油样品的100倍以上。原油井口中高浓度的 H_2S 抑制了SRB的生长, SRB数量较少; 随着 H_2S 浓度的降低, 抑制作用削弱并消失, 使集输系统中SRB的数量逐渐增加。水样中 H_2S 初始浓度较低, SRB数量较多, 系统中 H_2S 的含量随着SRB数量的增大而逐渐增多。由16S rRNA基因的序列分析表明, 能够同时在水样和原油样本中检测到与脱硫弧菌属(*Desulfovibrionaceae* sp.)以及脱硫球菌属(*Desulfococcus* sp.)相关的SRB基因序列。但是, 在水样中能够检测到与脱硫念珠菌属(*Desulfomonile* sp.)、脱硫弯杆菌属(*Desulfotomaculum* sp.)和脱硫八叠球菌属(*Desulfosarcina* sp.)相关的SRB基因序列, 而在原油样本中未检测到。在石油集输过程中由于环境条件的变化, 水样和原油样品中SRB的多样性都有一定的增加。

关键词: 石油集输系统; 硫酸盐还原菌(SRB); 分布; 16S rRNA; H_2S

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2160-06

Distribution and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in a Crude Oil Gathering and Transferring System

LUO Li, LIU Yong-jun, WANG Xiao-chang

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: The distribution of sulfured hydrogen (H_2S) as well as sulfate-reducing bacteria (SRB) distribution and diversity in crude oil and oilfield production water samples from a oil gathering and transferring system in Changqing Oilfield of China were investigated by methylene blue colorimetric method, the most probable number technique and sequence analysis of the 16S rRNA gene, respectively. At the oil gathering and transferring system which from oil well through oil flowstation and then to oil comprehensive treatment station, the results showed that in oil samples, the content of H_2S were 105.80, 99.70, and 24.57 $mg \cdot L^{-1}$, respectively; and the count of SRB were 98, 300, and 680 $CFU \cdot 100 mL^{-1}$, respectively. In water samples, the content of H_2S were 1.13, 2.80, and 3.49 $mg \cdot L^{-1}$, respectively; and the count of SRB were 9 500, 40 000, and 76 000 $CFU \cdot 100 mL^{-1}$, respectively. The abundance of SRB in the water samples is about 100 times than that in the crude-oil samples. High concentration of H_2S in oil well inhibited the growth of SRB, thereby the count of SRB in oil well were small. With the reduction of H_2S concentration, the actions of inhibition weakened and disappeared, then the number of SRB were gradual increase in the gathering and transferring system. For the initial concentration of H_2S in water samples was low, and the number of SRB were large, then the content of H_2S increased gradually with the number of SRB were increased. Sequence analysis of the 16S rRNA gene indicated that SRB related to *Desulfovibrionaceae* sp. and *Desulfococcus* sp. were detected in the water and crude oil samples, simultaneously. However, SRB related to *Desulfomonile* sp., *Desulfotomaculum* sp. and *Desulfosarcina* sp. were detected in the water samples but not in crude-oil samples. Abundance of SRB was increased due to the variation of environmental condition during the period of oil gathering and transferring process.

Key words: oil gathering and transferring system; sulphate-reducing bacteria (SRB); distribution; 16S rRNA; sulfured hydrogen

在石油工业中, 硫酸盐还原菌(SRB)是一类常见的且对石油经济造成影响的微生物^[1]。由SRB活动所引起的结果主要是石油酸化、气体积聚以及与微生物腐蚀(MIC)相关的问题。所产生的有毒 H_2S 不仅危害工人的身体健康, 而且可能导致石油和天然气的酸化而降低石油的质量^[2,3]。由于微生物腐蚀受环境条件的影响, 因此在石油工业中, 很难估计由于MIC(主要为SRB腐蚀)而造成的经济损失。据

中国石油天然气总公司1992年统计显示, 每年由于腐蚀给油田造成的损失约为2亿元, 其中SRB腐蚀占相当大的部分^[4]。因此, 对存在于油田环境中的 H_2S 和SRB进行研究是十分重要的。但是, 到目前

收稿日期: 2009-11-04; 修订日期: 2009-12-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50838005)

作者简介: 罗丽(1984~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为污水再生利用技术, E-mail: luoli_luck@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

为止,油田中的 H_2S 的分布以及 SRB 群落结构和定量数据非常有限。

用聚合酶链式反应(PCR)分析 16S rRNA 基因,并用 16S rRNA 基因来识别来自不同环境样本中某种特定菌株和菌属已广泛用于环境样本的微生物学分析^[5-7]。目前已有许多人尝试使用杂交探针从其他环境样品,如生物膜^[8]、土壤^[9]和盐沼沉积物^[10]中检测具体的 SRB。Tanaka 等^[11]首次报道了一种从原油中提取细菌 DNA,并用扩增的 16S rRNA 基因片段分析脱硫弧菌(*Desulfovibrionaceae*)的新方法。因此,为了全面了解原油污染的来源以及控制输油管线的生物腐蚀,本研究通过对石油集输系统中 H_2S 和 SRB 的监测与分析,来探讨在石油集输过程的原油和油田产出水中 H_2S 的分布、SRB 的数量和多样性。

1 材料与方法

1.1 取样点及样本

在中国长庆油田(陕北)的同一石油集输系统中,分别从油井井口、石油计量站和石油综合处理站同时采集原油样本和水样。在油井井口取油水混合样品,静置 30 min 后,取上层作为原油样本,下层作为水样。石油计量站的原油样本和水样分别取自计量站油水重力分离器中的原油和分离水。石油综合处理站的原油样本和水样分别取自储油罐和污水罐。取样后,将样本在 4℃ 下存储以供分析之用。

1.2 H_2S 和阴、阳离子的测定方法

水样中的 H_2S 气体测定采用亚甲蓝比色法(GB/T 16489-1996)。油样中 H_2S 通过吹脱装置,将大量的 H_2S 气体吹脱至气体吸收瓶中,然后按照水样的测定方法进行分析。

SO_4^{2-} 的测定采用铬酸钡分光光度法; $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 SO_3^{2-} 的测定采用碘量法; HCO_3^- 的测定采用电位滴定法; Cl^- 的测定采用硝酸银滴定法; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 采用 EDTA 滴定法^[12]。

1.3 硫酸盐还原菌(SRB)的计数

水样中 SRB 的数量使用三管组 MPN 法来估算^[13]。所使用的培养基是经过改进的 Baar 培养基,培养基的组成为:1.0 g K_2HPO_4 ;2.0 g NH_4Cl ;4.0 g Na_2SO_4 ;0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;3.0 mL 乳酸盐;3.0 g 酵母提取物;1 L 去离子水,调节 pH 值为 7.2。灭菌并将油田水样接种到培养基后,在室温下($28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$)经过 14 d 的厌氧培养,培养基显示出深黑色的,记录为阳性,表示存在 SRB。

原油样本中 SRB 的计数方法如下:将 200 μL 原油加入到同等体积 10% 的吐温 20(中国上海化学试剂厂)中,振荡混匀,并在 4℃ 下 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min。所获得的水相按照上面所述的方法来估算油样中 SRB 的数量。

1.4 细菌 DNA 的提取方法

原油样本的 DNA 提取方法^[14]:先用 2,2,4-三甲基戊烷(异辛烷)(中国上海化学试剂厂)预处理原油样本,然后用土壤 DNA 快速提取试剂盒(Bio101; Carlsbad, CA, USA)从预处理的样本中提取 DNA。具体步骤是:取 200 mL 原油样品加入到 200 mL 的异辛烷中,振荡混匀后在 4℃ 下以 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 20 min。取离心后的沉淀物,向其中加入等量的异辛烷,依照上述方法再进行混合,离心,最终使沉淀物悬浮在约 10 mL 的异辛烷中。适当稀释悬浮液,并取 200 μL 的稀释液,向其中加入同等体积的试剂盒中提供的 MT M 溶液。然后用玻璃珠搅拌器(Mini-BeadBeater; Biospec Products, Bartlesville, USA),在 $3\,800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度下搅拌 30 s,再按照试剂盒的说明提取 DNA。进行 6 次同样的 DNA 提取操作后,获得 50 μL 的 DNA 溶液。

水样中 DNA 的提取方法:先用 0.8 μm 的微孔过滤器(Advantec Toyo Kaisha, Tokyo)过滤 200 mL 的水样,再用 0.45 μm 的微孔过滤器(Advantec Toyo)将滤液浓缩至约 1 mL。取 450 μL 的浓缩菌液来提取细菌 DNA。

1.5 16S rRNA(16S rDNA)基因片段的 PCR 扩增

用特异性引物,通过 PCR 扩增 16S rDNA 基因片段来分析 SRB。特异性引物序列如下:5'-CTGTCRGRARGGAAGAAMC-3'(DSV435F; 脱硫弧菌 16S rRNA 基因 435 ~ 453 bp)和 5'-GGGTARAACCRRCTTTTCG-3'(DSV1430R; 脱硫弧菌 16S rRNA 基因 1 418 ~ 1 430 bp)^[11]。50 μL 反应体系包括:上、下游引物 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 2.5 U HotStar Taq DNA 聚合酶(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, 20 ng 的 DNA 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTP。反应在 iCycler PCR 仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)中进行,扩增条件如下:95℃ 15 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 35 个循环。最后在 72℃ 下链延伸 10 min。

PCR 产物通过凝胶电泳分析,琼脂糖凝胶的浓度为 2%,溶解液为 TAE(89 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.3; 89 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HB, 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA),其中

EB 染色剂浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 110 V 恒定电压下, 电泳 35 min . 然后使用 Gel Doc XR 凝胶成像系统 (Bio-Rad) 对 DNA 条带进行 UV 照射, 观察电泳条带并拍照. 在 1000 bp 处出现荧光条带为阳性, 无条带则为阴性.

1.6 克隆和测序

用 0.8% 的琼脂糖凝胶分离纯化 PCR 产物 (大约 1.0 kb), 并克隆到 pT7Blue T-vector (Novagen, Madison, WI, USA) 中. 从每个克隆库中随机选择 $8 \sim 15$ 个克隆, 并由上海生物工程公司进行 DNA 序列测定. 文中所报道的核苷酸序列的数据已登录 NCBI/GenBank, 序列接受号为: EU917046-EU917051.

1.7 系统演化分析

为找出试验中 16S rRNA 基因序列与相关 SRB 之间的联系, 原油样品和水样中细菌的 16S rDNA 片段的序列通过 NCBI 的 BLAST 检索系统和 GenBank 数据库进行序列同源性分析. 所有的 16S rDNA 片段的序列通过 BLAST 在 GenBank 数据库中搜寻相似序列, 将相关序列用 DNA-MAN (version 4.0) 进行比对并构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 石油集输系统中 H_2S 的分布规律

测得从油井到石油计量站的距离为 13.2 km ,

从石油计量站到石油综合处理站的距离为 25.6 km . 对石油集输系统中 3 个取样点的物理和化学特性进行分析测定, 结果见表 1. 数据显示: 集输系统中不同取样点的温度和 pH 值基本相同, 说明在石油集输过程中, 各点的物理特性基本一致. 但从氧化还原电位值 (ORP) 和阴、阳离子的含量, 可以看出系统中集输系统中不同取样点化学性质有所不同. 系统中 ORP 从油井到综合处理站逐渐升高, 但升高的幅度很小, 且各个取样点的氧化还原电位值都小于 -110 mV , 表明石油集输系统处于厌氧状态^[15]. 系统中 HCO_3^- 、 Cl^- 、 Na^+ 和 Mg^{2+} 的浓度差异较小, 但 SO_4^{2-} 、 SO_3^{2-} 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的浓度变化较大. 系统中 SO_4^{2-} 的浓度随集输过程逐渐降低, 而 SO_3^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的浓度随集输过程逐渐增加. 这表明, 由于石油集输系统处于厌氧状态且集输距离很长 (约 40 km), 因此在石油集输过程中发生硫酸盐还原为亚硫酸盐的反应.

对石油集输系统各个取样点的水样和油样中 H_2S 的含量进行了检测. 结果如图 1、2 所示.

由图 1 可以看出, 系统水样中 H_2S 含量较低, 含量在 $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 最高不超过 $3.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 水样中 H_2S 的含量随集输系统流程的延长呈现逐渐增加的趋势, 由油井井口的 $1.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至集中处理站沉降罐水相中的 $3.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 上升了 $2.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 从油井井口到石油计量站过程中, H_2S 的增加幅度较大, 增加了 60% .

表 1 石油集输系统各取样点的环境特征

Table 1 Environmental characteristics of sampling sites in the oil gathering and transferring system

取样地点	温度 / $^{\circ}\text{C}$	pH	ORP ¹⁾ / mV	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$						
				SO_4^{2-}	SO_3^{2-}	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	HCO_3^-	Cl^-	Na^+	Mg^{2+}
油井井口	27.3	7.5	-135.0	370.9	18.1	5.3	760.3	1 893.3	876.6	37.4
石油计量站	25.6	7.3	-128.0	232.6	25.6	10.6	680.6	1 792.6	922.5	35.6
综合处理站	28.7	7.6	-119.0	175.2	38.0	15.8	826.7	1 912.8	890.2	27.8

1) ORP 为氧化还原电位

石油集输系统油中的 H_2S 分布监测结果 (图 2) 可以看出, 系统油样中 H_2S 含量较高, 含量在 $20 \sim 110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 最低不小于 $24.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 从油井井口采出的原样经过计量站到综合处理站沉降罐后, 油中的 H_2S 含量随集输系统流程的延长呈现逐渐减少的趋势, 由井口中的 $105.80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降至集中处理站沉降罐中的 $24.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 为井口中的 23.2% , 下降了 $81.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 从石油计量站到综合处理站过程中, 油中 H_2S 的降低幅度很大, 下降了 75% . 油中 H_2S 的含量普遍比水中高, 且井口油中 H_2S 含量最高, 是水中的 90 多倍.

2.2 石油集输系统中 SRB 的分布

原油和油田水样中存在的 SRB 的细菌分析结果如图 3 所示. 所有的水样和原油样本都含有 SRB, 且水样中 SRB 的数量是原油样本中的 100 倍以上. 在石油从油井到综合处理站集输过程中, SRB 的数量逐渐增加, 其中原油中 SRB 数量依次为 98 、 300 和 $680 \text{ CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, 水样中 SRB 数量依次为 $9\,500$ 、 $40\,000$ 和 $76\,000 \text{ CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. 结合图 1 和图 2 可得, 在集输系统中, 水样由于温度、pH 值和水分等环境条件适宜, 且 H_2S 的初始浓度较低, 适合 SRB 的生长与繁殖, SRB 数量较多. SRB 的数

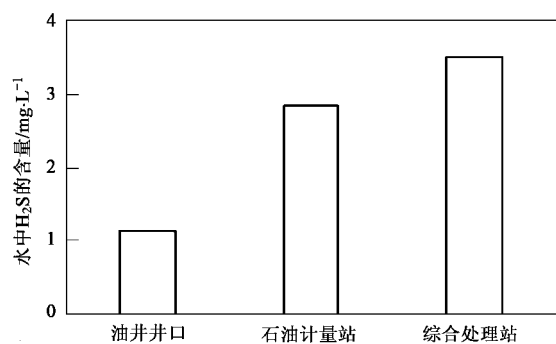
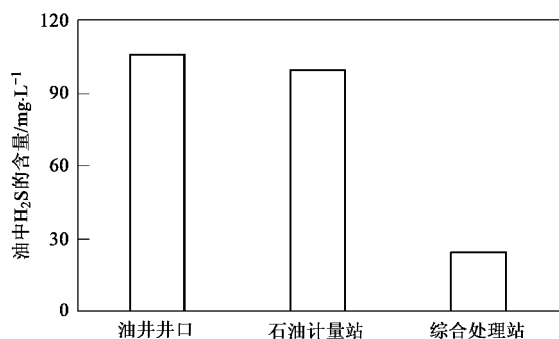
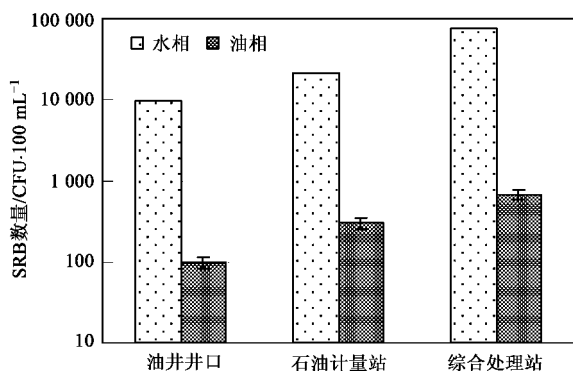
图1 石油集输系统水中 H₂S 分布特征Fig. 1 Concentration of H₂S in water sample at the system图2 石油集输系统油中 H₂S 分布特征Fig. 2 Concentration of H₂S in crude oil sample at the system

图3 取自石油集输系统不同地点的水样和原油样本中硫酸盐还原菌的分布

Fig. 3 Bacterial population of sulphate-reducing bacteria in water sample and crude oil sample from different site of the oil gathering and transferring system

量在集输过程中逐渐增加,从而导致水中 H₂S 的含量逐渐增加.油样中由于含水量较少,缺少 SRB 生长所需的一些离子环境,导致油中 SRB 的数量比水中的少.同时由于油井井口高浓度的 H₂S 抑制了 SRB 的生长,使得初始的 SRB 数量较少.随着 H₂S

浓度的降低,抑制作用削弱并消失,因此集输系统中 SRB 的数量逐渐增加.

在石油集输系统中存在如此大量的 SRB 表明,这些微生物可能是造成管线原油污染和生物腐蚀的一个重要原因.系统中水样 SRB 的数量逐渐增加,同时 H₂S 的含量也逐渐增加,说明系统中 H₂S 的产生和 SRB 有关.在 H₂S 初始浓度不高,且环境条件适宜的情况下(如水样),SRB 的增加会导致 H₂S 的增多.但是,在 H₂S 初始浓度很高,且含水量下降的情况下(如油样),由于高浓度 H₂S 对 SRB 生长有一定抑制作用,导致 SRB 的数量增加很少.同时,由于油水分离,在相应的环境条件下一些离子的化学环境在油相中不复存在,造成形成 H₂S 的链条断裂,从而降低了 H₂S 的产量.

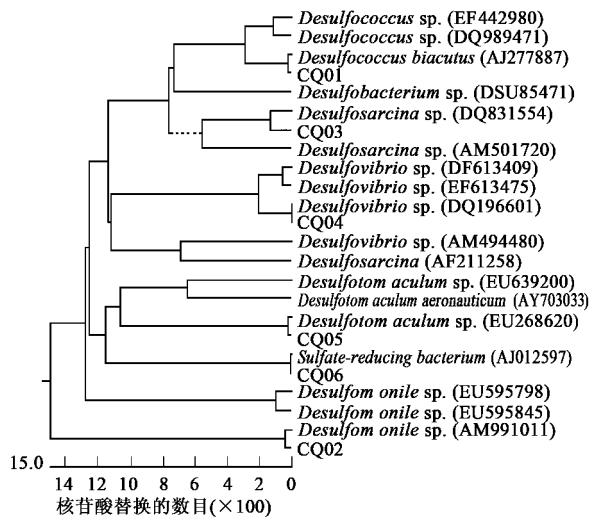
2.3 PCR 扩增及 16S rRNA 基因克隆

利用 SRB 特异性引物^[11],对石油集输系统不同取样点的水样和原油样品中的 SRB 的 16S rRNA 基因(约 1.0 kb)进行检测.凝胶电泳成像结果显示,从油井井口、石油计量站和综合处理站水样里提取的 DNA 中,都扩增到了 PCR 产物.但是,从油井井口和石油计量站原油样本里提取的 DNA 中没有扩增到 PCR 产物(16S rRNA 基因),而石油综合处理站原油样本的 PCR 产物是分别经过 20 和 35 个循环的 PCR 再扩增才检测到的.

2.4 16S rRNA 基因的系统演化分析

将得到的 PCR 产物(约 1.00 kb)分离纯化,并克隆到 pT7Blue T-vector 中.用所建立的 4 个 PCR 产物克隆库来研究石油集输过程中油田产水和原油中 SRB 的 16S rRNA 基因的多样性.

图 4 所示为不同克隆体 16S rRNA 基因片段序列与相关细菌群落之间的亲缘关系.结果表明,克隆体 CQ01 与脱硫球菌属(*Desulfococcus* sp.)相关^[16,17],它们的核苷酸序列相似性达 98%.克隆体 CQ03 与脱硫八叠球菌属(*Desulfosarcina* sp.)相关^[18],它们的核苷酸序列相似性达 92%.克隆体 CQ04 与脱硫弧菌属(*Desulfovibrionaceae* sp.)的核苷酸序列同源,其序列相似性达 97.8%.这类细菌能够不完全氧化乳酸,形成乙酸盐、二氧化碳和硫化氢^[19],乙醇和氢也是常见的电子供体^[20].在所有的水样和部分的原油样本中都能够检测到 CQ01 和 CQ04.克隆体 CQ05 与脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum* sp.)相关(相似性为 93%),有研究认为,*Desulfotomaculum* sp. 属于革兰氏阳性 SRB,是一类能够使用三价铁作为生长繁殖唯一最终电子



(CQ-后面的数字代表从水和原油样本中获得的片段编号,刻度表示核苷酸替换的数目,圆括号中的数码是数据库中序列接受号)

图4 石油集输系统水样和原油样本中硫酸盐还原菌的系统演化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of bacteria in the water sample and crude oil sample from the oil gathering and transferring system

受体的微生物群落^[21,22]. 克隆体 CQ06 与一种不知名的硫酸盐还原菌属密切相关,它们的核苷酸序列相似性达 98%. 克隆体 CQ02 与脱硫念珠菌属

(*Desulfomonile* sp.) 相关^[23], 它们的核苷酸序列相似性达 95%.

2.5 石油集输系统不同取样点中不同 16S rRNA 基因片段出现频率

表 2 所示为石油集输系统不同取样点中不同 16S rRNA 基因片段以及相关细菌(图 4)出现频率,总共分析了 48 个克隆体. 结果表明:在石油综合处理站所有的水样和原油样本中,都检测到与 *Desulfococcus* sp. 和 *Desulfovibrionaceae* sp. 相关的克隆体 CQ01 和 CQ04,且出现频率高,分别为 29% 和 44%. 但是,克隆体 CQ02、CQ03、CQ05 和 CQ06 仅在水样中检测到,而在原油样本中未检测到. 这表明 *Desulfococcus* sp. (CQ01) 和 *Desulfovibrionaceae* sp. (CQ04) 是油田环境条件下最常见,最普遍的硫酸盐还原菌. 与 *Desulfosarcina* sp. 相关的克隆体 CQ03 在油井井口处出现频率(23%)高于石油综合处理站(7%). 相反,与 *Desulfomonile* sp. 相关的克隆体 CQ02 在石油综合处理站出现频率(20%)高于油井井口(8%). 与 *Desulfotomaculum* sp. 相关的克隆体 CQ05,仅在石油综合处理站水样中检测到(7%),而克隆体 CQ06(未知硫酸盐还原菌)仅在油井井口水样中检测到(8%). 在水样中检测到克隆体 CQ02、CQ03、CQ05 和 CQ06,但是在原油样本中未检测到.

表 2 石油集输系统不同取样点水样和原油样本中不同 16S rRNA 基因片段出现频率

Table 2 Frequency of different 16S rRNA gene clones in the water sample and crude oil sample from different site of oil gathering and transferring system

相关种属	克隆体	水样			原油样本			+
		油井	计量站	综合处理站	油井	计量站	综合处理站	
<i>Desulfococcus</i> sp.	CQ01	3	4	4	0	0	3	14
<i>Desulfomonile</i> sp.	CQ02	1	1	3	0	0	0	5
<i>Desulfosarcina</i> sp.	CQ03	3	2	1	0	0	0	6
<i>Desulfovibrionaceae</i> sp.	CQ04	5	5	6	0	0	5	21
<i>Desulfotomaculum</i> sp.	CQ05	0	0	1	0	0	0	1
未知 SRB	CQ06	1	0	0	0	0	0	1
+		13	12	15	0	0	8	48

3 讨论

油井井口原油样本的 H_2S 起始浓度很高,但随着集输系统的流向, H_2S 浓度逐渐降低. 高的起始浓度应该是采油时从油气藏中自带的 H_2S 多,由于随着集输线路延长,油水分离彻底,在相应的环境条件下,一些离子的化学环境在油相中不复存在,微生物的活动受到限制,造成形成 H_2S 的链条断裂,从而降低了 H_2S 的产量. 系统原油样本的 H_2S 最低含量仍有 $24.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,表明在集输系统中降

低原油中 H_2S 的含量是十分必要的.

在石油集输系统所取的所有油田水样和原油样本中都检测到 SRB,表明在油田的环境条件下,SRB 是常见的且广泛存在的细菌. 这个结果与先前 Agrawal 等^[24] 和 Benka-Coker 等^[25] 报道的结果相同,他们分别报道了在印度东北部和尼日利亚的油田中存在的 SRB. 石油集输过程中 SRB 数量较多,可能是由于水和原油中含有高浓度的 SO_4^{2-} 和碳,且碳可以作为生物体繁殖的营养源所造成的. 而且在石油集输过程中,SRB 数量逐渐增加,这可能是为

什么从油井到石油综合处理站 SO_4^{2-} 的浓度逐渐降低,同时 SO_3^{2-} 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的浓度逐渐升高的原因(表 1)。

Tanaka 等^[11]报告了一种用氧化锆珠 DNA 提取试剂盒从原油中提取 DNA,随后用 PCR 技术检测 *Desulfovibrionaceae* 的方法。但是,从本研究结果来看,从油井井口和石油计量站原油样本(SRB 的数量分别为 98 和 300 CFU·100mL⁻¹)里提取的 DNA 中没有扩增到 PCR 产物(16S rRNA 基因),仅在石油综合处理站原油样本中获得了 PCR 产物。说明当原油中 SRB 的数量低于 300 CFU·100mL⁻¹ 时(图 3),很难直接从原油样品中获得 PCR 产物。

在石油集输系统中检测到了 *Desulfococcus* sp.、*Desulfomonile* sp.、*Desulfosarcina* sp. 等 6 种 SRB 相关种属,水样中这 6 种 SRB 相关种属都检测到了,而油样中仅检测到了 *Desulfococcus* sp. 和 *Desulfovibrionaceae* sp.,说明水样中的环境条件比油样适宜 SRB 的生长和繁殖。如果将油水分离彻底可在一定程度上降低 SRB 的数量。

4 结论

(1)SRB 的数量在集输过程中逐渐增加,且水样中 SRB 的数量平均为原油样品的 100 倍以上。水样中 H_2S 初始浓度较低,SRB 数量较多,系统中 H_2S 的含量随着 SRB 数量的增大而逐渐增多。原油井口中高浓度的 H_2S 抑制了 SRB 的生长,SRB 数量较少;随着 H_2S 浓度的降低,抑制作用削弱并消失,使集输系统中 SRB 的数量逐渐增加。

(2)由 16S rRNA 基因的序列分析表明:水样中 SRB 的多样性比原油中丰富;不同取样点的 SRB 相关种属及出现频率均不同,但水样和原油样品中 SRB 的多样性都随着集输过程而增加。

参考文献:

- [1] Luna A S, Da Costa A C A, Gonçalves M M M, *et al.* The effects of surfactants on the estimation of bacterial density in petroleum samples[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008, **147**: 77-84.
- [2] Rueter P, Rabus R, Wilkes H, *et al.* Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria[J]. Nature, 2002, **372**: 455-458.
- [3] McInerney M J, Sublette K L. Petroleum microbiology: biofouling, souring and improved oil recovery[M]. Washington D C: American Society for Microbiology, 1997.
- [4] 陈野,刘贵昌. 硫酸盐还原菌腐蚀的防治方法及研究进展[J]. 腐蚀与防腐, 2004, **25**(3): 102-104.
- [5] Guarneri T, Rossetti L, Giraffa G. Rapid identification of lactobacillus brevis using the polymerase chain reaction[J]. Lett Appl Microbiol, 2001, **33**: 377-381.
- [6] 吴学玲,金德才,赵维良,等. 4 株邻苯二甲酸二丁酯降解菌的分离鉴定及其相关降解基因的克隆[J]. 环境科学, 2009, **30**(9): 2722-2727.
- [7] 杨郁,金志华,李宁慧,等. 甲醛降解细菌的分离鉴定和降解效果测定[J]. 环境工程学报, 2009, **3**(8): 1529-1531.
- [8] Neria-González I, Wang E T, Ramírez F, *et al.* Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico[J]. Anaerobe, 2006, **12**: 614-623.
- [9] Sun H Y, Deng S P, Ruan W R. Bacterial communities structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**: 5868-5874.
- [10] Santana M. Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments[J]. Anaerobe, 2008, **14**: 145-156.
- [11] Tanaka Y, Sogabe M, Okumura K, *et al.* A highly selective direct method of detecting sulphate-reducing bacteria in crude oil[J]. Lett Appl Microbiol, 2002, **35**: 242-246.
- [12] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [13] 王爱杰,任南琪. 厌氧生物技术原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 300-301.
- [14] Nobuyuki Y, Kazuhiro Y, Daisuke S, *et al.* Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles[J]. J Biosci Bioeng, 2005, **99**(2): 143-149.
- [15] 周群英,高延耀. 环境工程微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 126-127.
- [16] Janssen P H, Schnik B. Catabolic and anabolic enzyme activities and energetics of acetone metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfococcus biacutus* [J]. J Bacteriol, 1995, **177**(2): 277-282.
- [17] Platen H, Temmes A, Schink B. Anaerobic degradation of acetone by *Desulfococcus biacutus* spec. nov [J]. Arch Microbiol, 1990, **154**(4): 355-361.
- [18] Wind T, Stubner S, Conrad R. Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots [J]. Syst Appl Microbiol, 1999, **22**(2): 269-279.
- [19] Liamleam W, Annachhatre A P. Electron donors for biological sulfate reduction[J]. Biotechnol Adv, 2007, **25**: 452-463.
- [20] Voordouw G. The genus *Desulfovibrio*: the centennial [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 2813-2819.
- [21] Friedrich M W. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5P-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms [J]. J Bacteriol, 2002, **184**: 278-289.
- [22] Tebo B M, Obraztsova A Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, **162**: 193-198.
- [23] Sun B, Cole J R, Tiedje J M. *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, **51**(2): 365-371.
- [24] Agrawal A, Vanbroekhoven K, Lal B. Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil-water separation tanks in the north-eastern oil fields of India [J]. Anaerobe, 2009, **14**: 1-7.
- [25] Benka-Coker M O, Metseagharun W, Ekundayo J A. Abundance of sulphate-reducing bacteria in Niger Delta oilfield waters [J]. Bioresour Technol, 1995, **54**: 151-154.