

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第10期

Vol.39 No.10

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

我国典型城市环境大气挥发性有机物特征比值	王鸣, 陈文泰, 陆思华, 邵敏 (4393)
2015年北京大气 VOCs 时空分布及反应活性特征	张博韬, 安欣欣, 王琴, 闫贺, 刘保献, 张大伟 (4400)
北京市建筑类涂料 VOCs 排放清单编制技术方法及应用	邓子钰, 高美平, 王庆玮, 聂磊 (4408)
基于实测的建筑类涂料挥发性有机物 (VOCs) 含量水平及组分特征	高美平, 邓子钰, 聂磊, 邵霞, 安小栓 (4414)
2014~2016年京津冀沿山城市空气质量首要污染物特征分析	王晓彦, 王帅, 朱莉莉, 许荣, 李健军 (4422)
北京市大气环境 PM _{2.5} 和 PM ₁ 及其碳质组分季节变化特征及来源分析	樊啸辰, 郎建奎, 程水源, 王晓琦, 吕喆 (4430)
南京春季北郊地区大气 PM _{2.5} 中主要化学组分及碳同位素特征	周一鸣, 韩珣, 王瑾瑾, 陈善莉, 沈潇雨, 章炎麟, 朱彬, 郭照冰 (4439)
热脱附法快速分析大气细颗粒物中非极性有机物	马英歌, 吴霞, 彭梦梦, 冯加良, 郁建珍, 乔利平, 周敏, 朱书慧, 李莉 (4446)
杭州市空气细颗粒物浓度与哮喘就诊人次的关系	王安旭, 陈曦, 宋从波, 应颂敏, 李倩, 吴琳, 毛洪钧 (4457)
基于远程通讯技术的混动公交车 SCR 系统运行及 NO _x 排放特征	杨强, 胡馨遥, 黄成, 陈昀, 刘佳栋, 李莉, 熊忠亮, 唐伟 (4463)
基于环境风险排序的流域优先污染物筛选	李奇峰, 吕永龙, 王佩, 张悦清 (4472)
重庆远郊丰都雪玉洞流域大气无机氮湿沉降变化特征与来源分析	段世辉, 蒋勇军, 张远瞩, 胡刘婵, 曾泽, 吕现福 (4479)
黑龙江凉水国家级自然保护区大气氮沉降特征	宋蕾, 田鹏, 张金波, 金光泽 (4490)
脱甲河水系 N ₂ O 关键产生过程及氮素来源探讨	赵强, 吕成文, 秦晓波, 吴红宝, 万运帆, 廖育林, 鲁艳红, 李健陵 (4497)
生物炭添加对曝气人工湿地脱氮及氧化亚氮释放的影响	王宁, 黄磊, 罗星, 梁岩, 王燕, 陈玉成 (4505)
黑麦草对水体中镉-壬基酚复合污染的生理响应及修复	史广宇, 李中义, 张路, 程媛媛, 陈宏伟, 施维林 (4512)
城市黑臭水体的吸收特性分析	丁潇蕾, 李云梅, 吕恒, 朱利, 温爽, 雷少华 (4519)
岷江上游水体中 DOM 光谱特征的季节变化	范诗雨, 秦纪洪, 刘堰杨, 孙辉 (4530)
防渗型生物滞留中试系统降雨径流水质与三维荧光特征	林修咏, 王书敏, 李强, 谢云成 (4539)
基于 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的农业区地下河硝酸盐污染来源	盛婷, 杨平恒, 谢国文, 洪爱花, 曹聪, 谢世友, 时伟宇 (4547)
垃圾填埋场地下水溶解性有机物光谱特征	彭莉, 虞敏达, 何小松, 刘思佳, 张鹏 (4556)
铅负载颗粒沸石改良底泥对水中磷酸盐的吸附行为	梁舒静, 林建伟, 詹艳慧, 汪振华, 李雅灵, 何思琪, 陈海洋, 唐凤霞, 李志强 (4565)
基于紫外光谱分析的腐殖质混凝控制	张北辰, 张晓蕾, 秦兰兰, 黄海鸥 (4576)
AAO 工艺联合臭氧削减污水中微量有机污染物及遗传毒性	李默, 汪震哲, 陈志强, 温沁雪 (4584)
抗生素抗性基因在两级废水处理系统中的分布和去除	李奥林, 陈吕军, 张衍, 代天娇, 田金平, 刘锐, 温东辉 (4593)
磁性壳聚糖凝胶球固定厌氧铁氨氧化菌对废水氨氮去除的影响	刘志文, 陈琛, 彭晓春, 谢武明, 黄镇扬, 韩庆吉 (4601)
海藻糖强化厌氧氨氧化耦合反硝化工艺处理高盐废水的脱氮除碳效能	杨振琳, 于德爽, 李津, 王晓霞, 冯莉 (4612)
低温下 A ² /O-BAF 反硝化除磷脱氮特性	黄剑明, 赵智超, 郑隆举, 邵兆伟, 安芳娇, 陈永志 (4621)
O ₃ -BAC 深度处理石化废水厂尾水的特性及菌群结构分析	张超, 单明皓, 许丹宁, 古明哲, 代蓓蓓, 纪轩, 孙井梅 (4628)
基于 MBR 不同种泥短程硝化启动的微生物群落结构分析	吴鹏, 陈亚, 张婷, 沈耀良, 徐乐中 (4636)
3 种不同工艺切换下活性污泥菌群结构及代谢产物对污泥沉降性能的影响	温丹丹, 袁林江, 陈希, 王洋, 申童童, 刘小博 (4644)
硫酸盐还原菌活性污泥胞外聚合物对环丙沙星的吸附机制	张会群, 贾妍艳, 方荷婷, 阴琳婉, 吕慧 (4653)
包埋活性污泥反硝化性能的快速提高及群落分析	杨宏, 徐富, 孟琛, 苏姗, 袁星 (4661)
中国粮食主产区耕地土壤重金属时空变化与污染源分析	尚二萍, 许尔琪, 张红旗, 黄彩红 (4670)
典型区土壤重金属空间插值方法与污染评价	马宏宏, 余涛, 杨忠芳, 侯青叶, 曾庆良, 王锐 (4684)
秸秆与化肥减量配施对菜地土壤温室气体排放的影响	黄容, 高明, 黎嘉成, 徐国鑫, 吕盛, 罗梅 (4694)
不同肥料施用对设施蔬菜地 NH ₃ 挥发和 N ₂ O 排放的影响	山楠, 韩圣慧, 刘继培, 陈清, 袁玉玲, 王立刚, 李虎 (4705)
施肥类型和水热变化对农田土壤氮素矿化及可溶性有机氮动态变化的影响	田飞飞, 纪鸿飞, 王乐云, 郑西来, 辛佳, 能惠 (4717)
长期不同施肥量对全程氨氧化细菌丰度的影响	王梅, 王智慧, 石孝均, 蒋先军 (4727)
典型绿洲不同土壤类型有机碳含量及其稳定碳同位素分布特征	陈新, 贡璐, 李杨梅, 安申群, 赵晶晶 (4735)
凹凸棒石及其改性材料对土壤镉生物有效性的影响与机制	陈展祥, 陈传胜, 陈卫平, 焦文涛 (4744)
天然有机物活化过硫酸盐降解土壤有机污染物效果	刘琼枝, 廖晓勇, 李尤, 龚雪刚, 曹红英, 罗俊鹏 (4752)
水分管理和外源硒对水稻吸收累积铅的影响	万亚男, 刘哲, Aboubacar Younoussa Camara, 余垚, 王琪, 李花粉 (4759)
窖水中微生物降解污染物的关键细菌	杨浩, 杨晓妮, 张国珍, 王宝山, 张翔, 李健 (4766)
砷氧化菌对胡敏酸络合 As(III) 的氧化作用	李泽姣, 崔岩山, 尹乃毅, 蔡晓琳, 都慧丽, 王鹏飞 (4778)
海域高温油田 1 株耐高温耐盐硫酸盐还原菌的筛选与生理特性及活性抑制	杨春璐, 苑美玉, 史荣久, 闫鹏举, 赵峰, 韩斯琴, 张颖 (4783)
1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 <i>Zobellella</i> sp. B307 的分离及脱氮特性	白洁, 陈琳, 黄潇, 胡春辉, 赵阳国, 李岍然 (4793)
1 株镰刀菌属 KY123915 的分离及其对 17 β -雌二醇的降解特性	吴蔓莉, 祝长成, 祁燕云, 时艺馨, 徐会宁, 杨瑾如 (4802)
氟喹诺酮对垂直流人工湿地性能及微生物群落的影响	李新慧, 郑权, 李静, 王晓慧, 海热提 (4809)
林可霉素菌渣堆肥微生物群落多样性分析	任省涛, 郭夏丽, 芦阿度, 张倩倩, 郭笑盈, 王岩, 王连忠, 张宝宝 (4817)
DEP 对蚯蚓抗氧化酶系的影响及 DNA 损伤	平令文, 李现旭, 张翠, 宋佩佩, 王金花, 朱鲁生, 王军 (4825)
生活垃圾焚烧灰灰矿物学特性及重金属分布	李建陶, 曾鸣 (4834)
《环境科学》征订启事 (4429) 《环境科学》征稿简则 (4471) 信息 (4529, 4777, 4816)	

海域高温油田 1 株耐高温耐盐硫酸盐还原菌的筛选与生理特性及活性抑制

杨春璐¹, 苑美玉^{1,2}, 史荣久^{2*}, 闫鹏举^{1,2}, 赵峰², 韩斯琴², 张颖²

(1. 辽宁大学环境学院, 沈阳 110036; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 中国科学院污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳 110016)

摘要: 油田中硫酸盐还原菌(SRP)的生长代谢能产生大量 H₂S, 会引起油藏酸化和微生物腐蚀等严重的生产和环境问题, 而关于油田环境中 SRP 微生物多样性与生理活性的研究仍十分缺乏。为了深入了解我国渤海湾海域高温酸化油藏中 SRP 代谢特点并探究其潜在危害控制方法, 本研究采用厌氧纯培养技术从渤海湾某高温油田采出水分离筛选到 1 株耐高温、耐盐的 SRP 菌株 BQ₁, 研究了其生理特性, 并评价了不同杀菌剂和代谢抑制剂对其产 H₂S 活性的影响。结果表明, 菌株 BQ₁ 的细胞呈短杆状, 大小为 (1.2 ~ 2.5) μm × (0.5 ~ 0.8) μm, 有运动性。尽管 BQ₁ 与普通脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough) 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99%, 但两者生理特性具有明显差异。BQ₁ 可在温度为 14 ~ 70℃ (最适 30℃)、pH 6.0 ~ 9.0 (最适 7.0)、盐度为 0% ~ 10% 条件下生长代谢。BQ₁ 可利用甲酸钠、乳酸钠、乙酸盐等多种碳源, 能以硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐或单质硫为唯一电子受体产生 H₂S。次氯酸钠 (600 mg·L⁻¹)、苄基三甲基氯化铵 (300 mg·L⁻¹) 或 NaNO₃ (800 mg·L⁻¹) 对 BQ₁ 产 H₂S 活性无明显抑制效果。戊二醛 (50 mg·L⁻¹)、溴硝醇 (30 mg·L⁻¹)、二氧化氯 (50 mg·L⁻¹) 或 NaNO₂ (70 mg·L⁻¹) 可抑制 BQ₁ 产 H₂S 活性达 30 d 以上, 是控制渤海湾高温油田微生物酸化的潜在有效抑制剂。

关键词: 海上油田; 硫酸盐还原菌; 普通脱硫弧菌; 杀菌剂; 硫化氢; 酸化

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)10-4783-10 DOI: 10.13227/j.hj.kx.201802103

A Thermotolerant and Halotolerant Sulfate-reducing Bacterium in Produced Water from an Offshore High-temperature Oilfield in Bohai Bay, China: Isolation, Phenotypic Characterization, and Inhibition

YANG Chun-lu¹, YUAN Mei-yu^{1,2}, SHI Rong-jiu^{2*}, YAN Peng-ju^{1,2}, ZHAO Feng², HAN Si-qin², ZHANG Ying²

(1. College of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: The growth and activity of sulfate-reducing prokaryotes (SRP) in oilfield environments could produce large amounts of H₂S, leading to multifaceted problems, including oilfield souring and microbially-influenced corrosion, yet knowledge about the diversity and physiology of SRP therein was quite limited. To further understand the phenotypic characteristics of SRP residing in an offshore high-temperature oilfield at Bohai Bay, China, and to explore the potential methods for control of SRP-mediated problems, we isolated, using Hungate techniques, a thermotolerant, halotolerant SRP strain, designated BQ₁, from the produced water of a high-temperature. We also presented the phenotypic features of BQ₁, and investigated the efficacy of five biocides, or metabolic inhibitors, in suppressing the sulfidogenic activity of BQ₁. Cells of BQ₁ were motile, short rod-shaped, 1.2-2.5 μm in length and 0.5-0.8 μm in width. Although BQ₁ shared 99% 16S rRNA gene sequence similarity with *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, distinct phenotypic traits between them were observed. Isolated BQ₁ could grow at 14-70℃ (optimum at 30℃) and pH 6.0-9.0 (optimum pH 7.0), and in the presence of 0%-10% NaCl. Isolated BQ₁ utilized a wide range of carbon substrates, including sodium formate, sodium lactate, and acetate. Sulfate, sulfite, thiosulfate, and sulfur were utilized as electron acceptors, but not nitrate or nitrite. Sodium hypochlorite (600 mg·L⁻¹), Benzyltrimethylammonium chloride (300 mg·L⁻¹), or nitrate (800 mg·L⁻¹) failed to inhibit H₂S production by BQ₁. By contrast, glutaraldehyde (50 mg·L⁻¹), bronopol (30 mg·L⁻¹), chlorine dioxide (50 mg·L⁻¹), and nitrite (70 mg·L⁻¹) inhibited H₂S production by BQ₁ for at least 30 d, indicating that these compounds may be suitable for the mitigation of microbial souring in this specific, high-temperature, offshore oilfield at Bohai Bay, China.

Key words: offshore oilfield; sulfate-reducing prokaryotes; *Desulfovibrio vulgaris*; biocide; sulfide hydrogen; souring

收稿日期: 2018-02-12; 修订日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570121); 中国科学院污染生态与环境工程重点实验室开放课题项目(2016CB)

作者简介: 杨春璐(1978 ~), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境科学与工程, E-mail: 38960662@qq.com

* 通信作者, E-mail: shirongjiu@iae.ac.cn

硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing prokaryotes, SRP) 是一大类能够利用硫酸盐为电子受体进行厌氧呼吸产生硫化氢 (H_2S) 的微生物生理类群. SRP 广泛分布于诸如油田的地下油藏^[1, 2]、海洋沉积物^[3, 4]等厌氧环境中, 并在这些生境中对碳、硫等元素的循环周转发挥着重要作用^[5, 6]. 早在 1926 年, Bastin 等^[7]首次报道了油田采出水中栖息着 SRP; 近几十年来, 越来越多的 SRP 种类在油田环境中被发现^[8~11]. 这些微生物可利用随注入水进入油藏的 SO_4^{2-} 或其他含硫化合物进行生长代谢, 并产生大量的 H_2S , 该过程也称油田的微生物酸化 (microbial souring)^[1, 12]. 由 SRP 引发的油藏酸化给油田开发带来一系列重大的生产和环境问题^[13]: ①SRP 的生长代谢过程及其产物 H_2S 可引发并促进金属管线等设施发生腐蚀, 从而造成潜在的巨大经济损失和生产事故^[14]; ②SRP 产生的 H_2S 会降低原油和天然气质量和经济价值, 增加后续处理成本; ③采出水和天然气中的 H_2S 会对油田工人身体健康甚至生命产生危害; ④SRP 生长代谢过程中产生的 S^{2-} 可与其他离子形成硫化物沉淀 (如 FeS 等), 进而降低油藏渗透率, 甚至堵塞油藏地层, 从而增加原油开采难度和开发成本. 因此, 如何有效地控制油藏环境中 SRP 的生长及代谢活性, 降低或消除微生物酸化危害是石油工业面临的一项重要挑战^[1, 12~14].

向注入水中投加化学杀菌剂是油田企业目前最为常用的用于控制 SRP 生长繁殖的方法^[15]. 常用的杀菌剂包括戊二醛、四羟甲基硫酸磷 (THPS)、季铵盐类化合物等^[16, 17]. 化学杀菌剂化学结构多样, 可供选择的种类较多, 且在控制油田采出水及管线中 SRP 的生长繁殖的效果起效快^[12]. 尽管如此, 化学杀菌剂也有其局限性: 一方面, 长期使用一种化学杀菌剂, SRP 会产生耐药性^[18], 致使杀菌效果变差, 而提高杀菌剂的使用剂量又会进一步增加油田企业的成本; 另一方面, 绝大多数化学杀菌剂均具有较大的环境毒性, 这些杀菌剂在运输、存储和使用过程中对于人身健康和生态环境均存在潜在危害^[1, 12]. 随着世界各国对于环境保护意识的逐渐增强, 日趋严苛的环境质量保护标准会进一步限制化学杀菌剂的应用. 进一步优选低成本、有效、低毒性的化学杀菌剂或研发抑制 SRP 活性的其他方法对于油田微生物酸化控制具有重要意义.

渤海湾海域油田是我国第二大产油区, 年产原油 3 000 万 t 以上^[19]. 向油藏中注入海水是海域油

田开采石油的常规技术手段. 与陆地油田相比, 海水中含有的高浓度的 SO_4^{2-} (约 $28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 会引发更为严重的油田酸化问题^[20], 部分采出井的采出水中 SRP 的数量可高达 $10^6 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ 数量级水平, 采出井端天然气中次生 H_2S 浓度超过 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 遗憾的是, 尽管目前已有一些研究者采用了不依赖于纯培养技术的方法揭示了油田环境中存在多种 SRP, 但是对于我国海域高温油田环境中 SRP 的分离筛选、鉴定及生理活性的研究工作严重滞后, 这不但极大地限制了人们对海域油藏 SRP 微生物多样性、生理活性和油田酸化机理的科学认识, 同时也为油田企业有针对性地研发油田酸化控制技术带来了挑战. 本研究从我国渤海湾海域某高温油田酸化严重的采出井的采出水样品中分离筛选到 1 株优势硫酸盐还原菌, 进一步研究了该菌株的生理特性, 并重点评价了几种化学杀菌剂和硫酸盐还原活性抑制剂对该优势 SRP 菌株产 H_2S 活性的抑制效果. 本研究结果有助于拓展我国海域高温油田环境中硫酸盐还原菌微生物多样性的认识, 并可为我国渤海湾海域高温油田微生物酸化机制及控制研究提供借鉴.

1 材料与方法

1.1 油井采出水的采集

用于 SRP 筛选的油藏采出水取自我国渤海湾海域某高温油田的一个已发生微生物酸化的采出井. 采用预先除菌的 2.5 L 聚乙烯材质塑料桶从采油井端采集采出液 (原油与采出水的混合物), 然后迅速加盖密封. 该采出液样品在 7 d 内运抵实验室. 该采出井及其采出水的基本理化性质如表 1 所示.

表 1 渤海湾海域某高温油藏酸化采出井及采出水的基本理化性质

Table 1 Basic physicochemical characteristics of a producing well and the production water from an offshore high-temperature oilfield at Bohai Bay, China

油井及其采出水性质	数值
硫酸盐还原菌数量/ $\text{MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.5×10^6
温度/ $^{\circ}\text{C}$	60
采出井深度/m	1 550
开采历史/a	10
pH	7.7
SO_4^{2-} 质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	148
盐度 (NaCl)/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	11714

1.2 培养基

硫酸盐还原菌富集与筛选培养基 M^[21]

($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 乳酸钠(50%) 1.25, Na_2SO_4 1.0, NH_4Cl 1.0, $\text{C}_2\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.655, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2, NaCl 7.0, 巯基乙酸钠 0.1, 酵母膏 0.5, 柠檬酸铁铵 0.2; 固体培养基按 1.8% 加入琼脂粉. 培养基的终 pH 为 7.0 ~ 7.5.

简化培养基 N($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 乳酸钠(50%) 2.5, 酵母膏 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaCl 7.0, KH_2PO_4 0.5, 维生素 C 0.1. 培养基的终 pH 为 7.0 ~ 7.5. 该简化培养基用于硫酸盐还原菌纯菌株的生理活性评价与抑制性实验. 在使用简化培养基评价硫酸盐还原菌菌株在不同盐度或 pH 条件下的生长特性时, 适当调整培养基中的 NaCl 浓度和 pH 梯度(见 1.3.3 节). 培养基的配制、分装等过程均按照厌氧微生物培养基制备方法完成^[22]. 厌氧管或厌氧瓶顶空气体为高纯 N_2 (99.99%).

1.3 SRP 分离筛选、优势菌株的生理特性及初步鉴定

1.3.1 SRP 富集与菌株分离筛选

用无菌注射器取采出水 10 mL 转接至含 90 mL 液体培养基 M 的厌氧瓶中, 然后将培养瓶置于 60℃ 生化培养箱中恒温静置培养. 待瓶内培养基变黑(4 d; 产生的 H_2S 与 Fe^{2+} 形成 FeS 黑色沉淀)后, 取瓶内富集培养液用液体培养基 M 进行 10 倍梯度稀释(最低稀释度为 10^{-9}), 然后采用 Hungate 滚管法^[23]分离硫酸盐还原菌. 挑取硫酸盐还原菌菌落后, 再重复液体培养、梯度稀释、滚管分离等步骤至少 3 次, 直至获得纯菌株(通过显微镜镜检与 16S rRNA 基因测序判定).

1.3.2 SRP 菌株 16S rRNA 基因序列分析

使用天跟生化科技有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)提取 SRP 菌株的基因组 DNA. 采用 NanoDrop 2000(Thermo, USA)测定提取到的 DNA 浓度与纯度. 采用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')扩增近全长的 16S rRNA 基因片段. PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环后再在 72℃ 延伸 10 min. 使用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化获得的 PCR 扩增产物, 然后采用限制性内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I(宝生物工程(大连)有限公司, 大连)对 PCR 扩增产物进行酶切. 使用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切产物, 根据 16S rRNA 基因酶切产物的电泳谱带类型区分不同

SRP 菌株, 即不同的电泳谱带类型视为不同的“种”(可分类操作单元, OTU)选取不同 OTU 对应菌株的 PCR 扩增产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司经 TA 克隆后测序. 获得的序列经拼接、去除载体序列等处理, 然后通过 BLASTn 程序在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/)进行序列相似性比对分析. 选取近缘序列后, 采用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树, Bootstrap 值设为 1000.

1.3.3 优势 SRP 菌细胞形态与生理生化特性评价

选取 1.3.2 节中出现频率最高的 OTU 所对应的菌株, 进行形态学观察和生理生化测定. 取适量体积的对数期菌液, 在 $10\,000 \times g$ 离心 15 min, 用生理盐水重悬润洗菌体, 重复离心、洗涤步骤 3 次; 然后使用 2.5% 戊二醛磷酸钠缓冲液固定 4 h, 使用 0.5% 戊二醛磷酸钠缓冲液重悬清洗菌体, 并依次用 40%、70%、90%、100% 乙醇溶液进行脱水处理, 最后使用冷冻保护剂叔丁醇处理, 于 $12\,000 \times g$ 条件下离心 15 min 后, 将菌体沉淀在 -80℃ 条件下冷冻干燥, 并经镀膜处理后通过扫描电镜(Quanta 250, Holland, 荷兰飞利浦公司)拍照. 扫描电镜拍照在中国科学院沈阳应用生态所分析检测中心完成.

参照文献[24, 25]中的相关方法完成优势 SRP 菌株生理生化特性的测定. 待评测的碳源(唯一电子供体)包括甲酸钠、果糖、葡萄糖、甘油、乳糖、蔗糖、乳酸钠、乙酸钠、丙酸钠、乙醇、丙酮酸钠; 待评测的唯一电子受体包括 Na_2SO_4 、 Na_2SO_3 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、巯基乙酸钠、单质硫、 NaNO_3 、 NaNO_2 . 此外, 使用培养基 N 考察温度、pH、盐度对优势 SRP 菌株生长及产 H_2S 的代谢活性的影响. 共设 7 个温度梯度, 分别为 4、14、25、37、45、60、70℃; 使用 HCl 或 NaOH 调节培养基初始 pH, 梯度为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0; 调整培养基中 NaCl 浓度为 0%、0.7%、1%、3%、5%、10%、12% 和 15%, 考察菌株的耐盐性. 上述实验中, 所有接菌处理的接种量为 5%, 同时设“不接菌”和“接菌但不添加待评测碳源或硫源”的对照处理, 所有处理均设 3 个重复. 除了温度影响评价实验外, 所有处理均置于 60℃ 恒温静置培养. 在 30 d 的观测期内定期取样测定菌株产生的 H_2S 浓度.

1.4 不同杀菌剂及硝酸盐、亚硝酸盐添加对优势 SRP 菌株产 H_2S 活性及数量的影响

选取 5 种化学杀菌剂, 即分别为戊二醛、次氯酸钠、苄基三甲基氯化铵(benzyl trimethyl

ammoniumchloride, BTAC)、溴硝醇和二氧化氯,评价不同使用剂量对筛选到的优势 SRP 菌株产 H_2S 活性的影响;此外,考察硝酸盐和亚硝酸盐添加对优势 SRP 产 H_2S 活性的影响. 厌氧瓶内杀菌剂、硝酸盐、亚硝酸盐的初始浓度梯度如表 2 所示. 取对数生长期优势 SRP 菌液,按照 5% 的比例接种(接种后瓶内 SRP 初始数量为 $10^6 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ 数量级水平). 所有厌氧瓶置于 60°C 恒温静置培养 30 d,定期取水样测定 H_2S 浓度变化,选取代表性实验组,测定特定时间节点水样中 SRP 数量及 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 NO_2^- 浓度变化. 所有实验处理均设置 3 个平行.

表 2 可能抑制优势 SRP 菌株产 H_2S 活性的不同
杀菌剂及硝酸盐、亚硝酸盐的添加剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 2 Various concentration of biocides, nitrate, or nitrite used for evaluating the potential inhibition on H_2S -producing activity of the predominant SRP isolate/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
杀菌剂或抑制剂名称	初始浓度梯度
戊二醛	0、50、100、150
次氯酸钠	0、200、400、600
BTAC	0、100、200、300
溴硝醇	0、10、30、50
二氧化氯	0、10、30、50
NaNO_3^-	0、80、250、450、800
NaNO_2^-	0、70、210、350、700

1.5 分析测定

H_2S 浓度的测定采用亚甲基蓝分光光度法(GB 13801-1992)完成; SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 NO_2^- 含量的测定采用离子色谱仪(ICS-900,戴安中国有限公司)完成. 所用的色谱柱为 AS22 分析柱,淋洗液为 $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 和 $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$,流速为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,温度为 30°C . 使用培养基 M,采用最大可能计数法(MPN)测定采出水或培养实验样品中硫酸盐还原菌的数量. 采用重复测量单因素方差分析的方法评估杀菌剂或抑制剂添加实验中各处理组间差异的显著性.

2 结果与分析

2.1 渤海湾海域高温酸化油田采出水中的优势 SRP 菌筛选

采用 Hungate 纯培养技术,成功从采出水样品中分离筛选得到了 55 株 SRP. 这些菌株的 16S rRNA 基因的双酶切产物的电泳图谱仅展现了 2 种 OTU 类型(电泳结果未展示),分别包含 50 个和 5 个菌株. 该结果提示筛选获得的菌株可能属于两种不同的 SRP. 本实验从包含菌株数量最多 OTU 组别

中挑取菌株作为优势菌进行后续研究,优势菌株编号为 BQ_1 .

2.2 菌株 BQ_1 的细胞形态、系统发育关系及生理生化特性

BQ_1 在固体 M 培养基上生长时形成圆形黑色菌落,菌落表面略凸起;扫描电镜结果显示, BQ_1 细胞呈短杆状且稍有弯曲,两端钝圆,菌体长度约在 $1.2 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 之间,宽度约在 $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$ 之间(图 1).

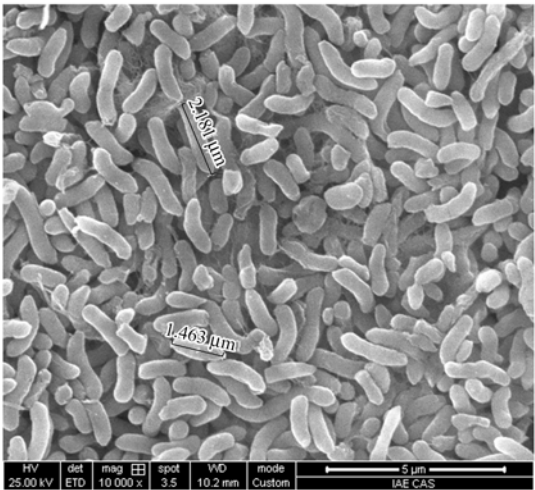


图 1 扫描电镜下硫酸盐还原菌菌株 BQ_1 细胞形态
Fig. 1 Scanning electron micrograph of cells of
sulfate reducer isolate BQ_1

基于 16S rRNA 基因构建的系统发育树如图 2 所示. BQ_1 与普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough)的 16S rRNA 基因序列相似性最高,达 99%,提示两者的亲缘关系最近.

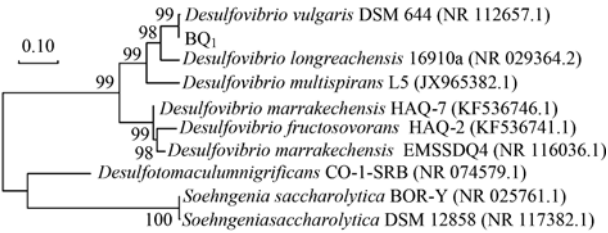


图 2 菌株 BQ_1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of isolate BQ_1 based on the
16S rRNA gene sequence alignment

菌株 BQ_1 能利用本试验中评价的 11 种碳源进行生长(表 3),最适碳源为甲酸钠. BQ_1 能利用 Na_2SO_4 、 Na_2SO_3 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、单质硫产 H_2S ,而不能利用巯基乙酸钠、硝酸盐和亚硝酸盐为唯一电子受体进行生长代谢. 菌株 BQ_1 具有运动性,胞内氧化酶阴性,过氧化氢酶阳性.

表 3 硫酸盐还原菌株 BQ₁ 的基本生理生化特性¹⁾

生理生化反应	BQ ₁	碳源利用	BQ ₁	电子受体利用	BQ ₁
VP 试验	—	葡萄糖	+	硫酸钠	+
甲基红试验	—	甘油	+	亚硫酸钠	+
吲哚试验	+	乳糖	+	硫代硫酸钠	+
柠檬酸盐利用	+	蔗糖	+	单质硫	+
尿素酶	—	乳酸钠	+	巯基乙酸钠	—
运动性	+	乙酸	+	硝酸钠	—
氧化酶	—	丙酸	+	亚硝酸钠	—
过氧化氢酶	+	乙醇	+		
产气	+	丙酮酸钠	+		
糖发酵试验	+	甲酸钠	++		
淀粉水解	+	果糖	+		
明胶液化	—				

1) + 表示阳性或能利用; ++ 表示生长更好; — 表示阴性或不利用

2.3 温度、pH 及盐度对 BQ₁ 生长及产 H₂S 活性的影响

如图 3 所示, 菌株 BQ₁ 在 14 ~ 70℃ 条件下均能生长, 显示该菌具有适应较宽泛环境温度条件的能力, 是一种耐高温菌. 第 10 d 时, BQ₁ 在 30℃ 培养的厌氧瓶内 H₂S 的累积浓度最大, 提示该菌的最适生长温度为 30℃. 在 4℃ 条件时, BQ₁

生长十分缓慢, 第 10 d 时在瓶内几乎检测不到 H₂S 产生, 第 60 d 时, 瓶内的 H₂S 依然小于 1.0 mg·L⁻¹. 在 70℃ 条件下, 菌株可以生长, 且产生 H₂S. 在 pH 为 6.0 ~ 9.0 时, 菌株可生长且能产 H₂S, 最适 pH 为 7.0; BQ₁ 在 NaCl 浓度为 0% ~ 10% 条件下均可生长且产 H₂S, 但在 NaCl 浓度为 15% 条件下不生长.

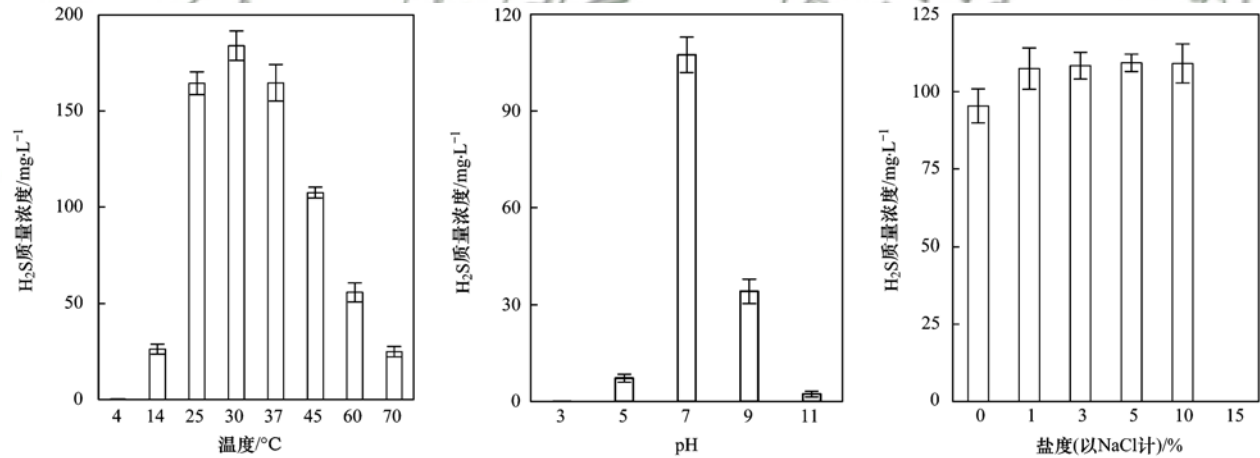


图 3 温度、pH 及盐度对菌株 BQ₁ 产 H₂S 活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature, pH, and salinity on the sulfidogenic activity of isolate BQ₁

2.4 硝酸盐、亚硝酸盐添加对 BQ₁ 产 H₂S 活性的抑制效果

添加不同浓度硝酸盐的各处理的厌氧瓶内不同时间节点的 H₂S 累积浓度无显著差异 ($P > 0.05$). 为简便起见, 仅以添加 800 mg·L⁻¹ 硝酸盐的处理组和不添加硝酸盐的对照组数据为例进行作图展示. 如图 4(a) 所示, 添加浓度高达 800 mg·L⁻¹ 的 NO₃⁻ 仍无法抑制 BQ₁ 的硫酸盐还原活性, 处理组瓶内 H₂S 累积浓度与不添加硝酸盐的对照无显著差异 ($P > 0.05$). 本研究测定了

添加 80 mg·L⁻¹ 硝酸盐处理组瓶内各阴离子的浓度 [图 4(b)], 结果显示瓶内硫酸盐在第 2 d 时已被 BQ₁ 完全还原生成了 H₂S, 而所加入的硝酸盐未被利用, 未检测到亚硝酸盐的产生. 该结果再次说明, 菌株 BQ₁ 无利用硝酸盐的能力, 而单独加入硝酸盐无法有效抑制菌株 BQ₁ 产 H₂S 的代谢活性.

添加 NO₂⁻ 能够显著抑制 BQ₁ 产 H₂S 的代谢活性. 初始浓度为 70 mg·L⁻¹ 即可抑制菌株 BQ₁ 产 H₂S 的活性超过 30 d [图 5(a)]. 相似地, 在 30 d

实验周期内, 浓度高于 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_2^-$ 的处理组均未产生 H_2S (数据未展示). 该结果显示, NO_2^- 具有较好的抑制 BQ_1 产 H_2S 代谢活性的效果. 有关离子

的测定结果显示, 添加亚硝酸盐后, 培养瓶内的 SO_4^{2-} 和 NO_2^- 均未发生显著变化, 提示 BQ_1 的生长被亚硝酸盐强烈抑制[图 5(b)].

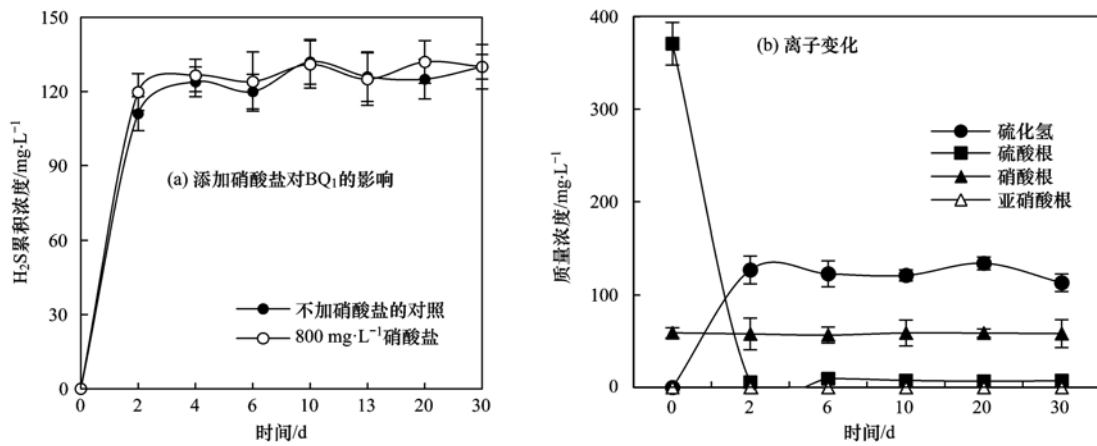


图 4 添加硝酸盐对 BQ_1 产 H_2S 活性的影响及瓶内各离子浓度变化

Fig. 4 Effects of nitrate addition on sulfide production by BQ_1 and the dynamics of anion concentration

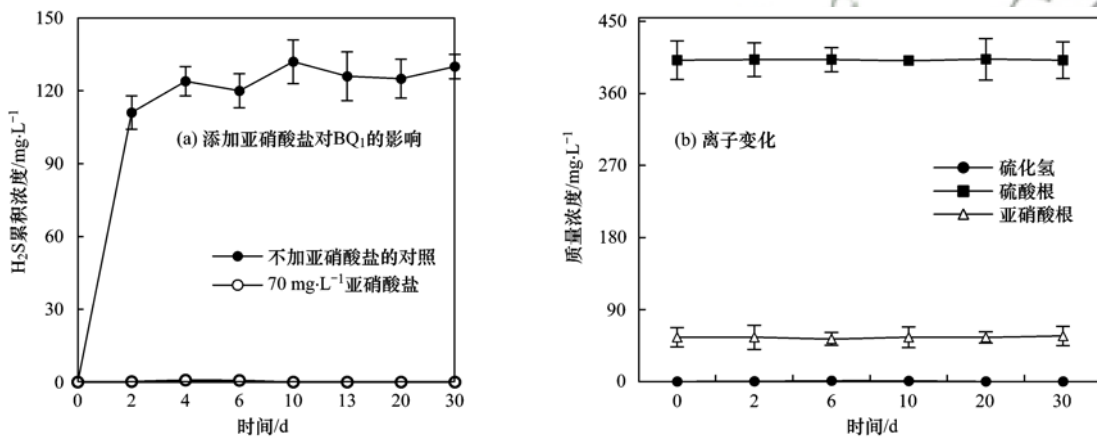


图 5 添加亚硝酸盐对 BQ_1 产 H_2S 活性的影响及瓶内各离子浓度变化

Fig. 5 Inhibition of BQ_1 by nitrite and the concentrations of various anions within the treatments

2.5 不同杀菌剂对 BQ_1 产 H_2S 活性和菌体数量的影响

不同浓度的戊二醛对 BQ_1 产 H_2S 活性的抑制效果如图 6(a) 所示. 初始浓度高于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛能够抑制菌株 BQ_1 产 H_2S 的活性超过 30 d. 当 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛与 BQ_1 作用 24 h 后, 菌体数量由初始的 $10^6 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ 数量级水平降低至 $10^1 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 4). 该结果提示, 菌株 BQ_1 对戊二醛比较敏感, 戊二醛具有高效抑制渤海湾高温油田微生物酸化的潜力.

与戊二醛不同的是, 使用初始浓度高达 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的次氯酸钠仍无法有效抑制 BQ_1 的产 H_2S 活性[图 6(b)], 尽管加入次氯酸钠后不同时间节点培养瓶内 H_2S 浓度值与对照处理组具有显著性差异 ($P < 0.05$). 第 30 d 时, 添加 200 ~ 600

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 次氯酸钠的各处理组培养瓶内 H_2S 浓度均在 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右. 加入 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 次氯酸钠 24 h 后, BQ_1 微生物数量由初始的 $10^6 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ 数量级水平降低至 $10^3 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 4). 该结果表明, 菌株 BQ_1 对次氯酸钠呈现出一定的耐受能力.

与次氯酸钠的结果类似, 杀菌剂 BTAC 在浓度高达 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时仍无法有效抑制 BQ_1 产 H_2S 的代谢活性[图 6(c)]. 尽管添加 BTAC 的各处理组瓶内 H_2S 浓度略低于对照组, 但第 30 d 时瓶内 H_2S 浓度值也超过了 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 加入 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 次氯酸钠 24 h 后, BQ_1 微生物数量由初始的 $10^6 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ 数量级水平降低至 $10^2 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 4).

初始浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溴硝醇在前 10 d 内能

抑制 BQ₁ 产生 H₂S[图 6(d)], 但该处理组瓶内 H₂S 浓度在第 20 d 时已经超过 60 mg·L⁻¹, 提示低浓度的溴硝醇不能长期抑制 BQ₁ 的活性; 当溴硝醇的初始质量浓度 > 30 mg·L⁻¹ 时, 菌株 BQ₁ 在 30 d 的实验周期内无法产生 H₂S. 30 mg·L⁻¹ 溴硝醇在 24 h 内能将 BQ₁ 完全杀死(表 4). 该结果表明, 溴硝醇也具有高效抑制渤海湾高温油田微生物酸化的

潜力.

添加 10 ~ 30 mg·L⁻¹ 二氧化氯的各处理组 H₂S 浓度与对照几乎相同, 约为 120 mg·L⁻¹. 但浓度为 50 mg·L⁻¹ 的二氧化氯抑制菌株 BQ₁ 产 H₂S 的活性超过 30 d[图 6(e)]. 50 mg·L⁻¹ 的二氧化氯在 24 h 内将 BQ₁ 数量从 10⁶ MPN·mL⁻¹ 数量级水平降低至 10¹ MPN·mL⁻¹(表 4) 数量级水平.

表 4 杀菌剂对菌株 BQ₁ 数量的杀菌效力

Table 4 Biocidal efficacy of selected biocides against SRP isolate BQ ₁			
项目	接触时长/h	BQ ₁ 初始数量/MPN·mL ⁻¹	BQ ₁ 数量/MPN·mL ⁻¹
戊二醛(50 mg·L ⁻¹)	24	4.5 × 10 ⁶	9.0 × 10 ¹
次氯酸钠(600 mg·L ⁻¹)	24	4.5 × 10 ⁶	2.0 × 10 ³
BTAC(300 mg·L ⁻¹)	24	4.5 × 10 ⁶	7.5 × 10 ²
溴硝醇(30 mg·L ⁻¹)	24	4.5 × 10 ⁶	0
二氧化氯(50 mg·L ⁻¹)	24	4.5 × 10 ⁶	1.5 × 10 ¹

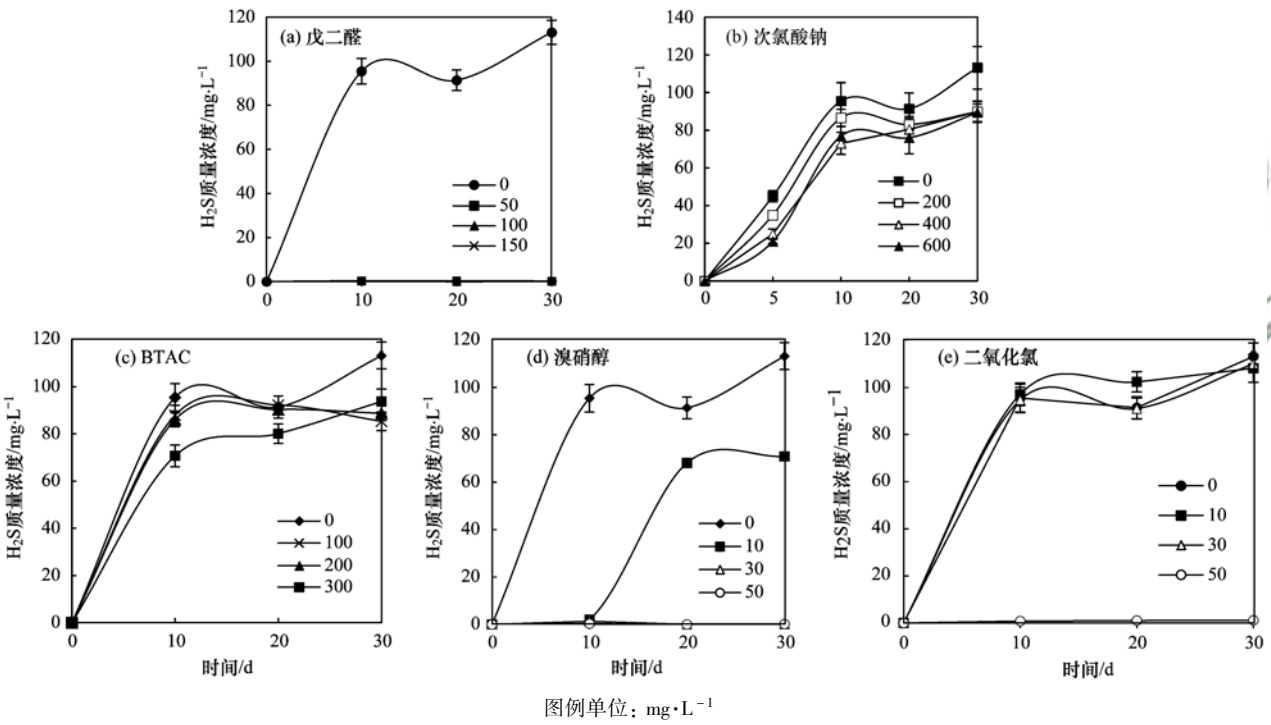


图 6 不同杀菌剂对 BQ₁ 产 H₂S 活性的抑制

Fig. 6 Inhibitory effects of various biocides on sulfide production by isolate BQ₁

3 讨论

3.1 菌株 BQ₁ 与近缘种 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 生理活性的差异

本文从我国渤海湾海域高温油田酸化采出井的采出水中成功分离了 1 株优势 SRP 菌株 BQ₁. BQ₁ 的 16S rDNA 序列与 *D. Hildenborough* 的相似性最高(99%), 提示两者亲缘关系可能最近. 包括 *D. vulgaris* 在内的许多脱硫弧菌属微生物种群常见于油田环境中^[26, 27], 提示这些微生物类群在油田注

水开发过程中很好地适应了油藏环境, 并可能在油田微生物酸化和腐蚀过程中扮演着重要角色. 尽管如此, BQ₁ 表现出了耐高温、耐盐等生理特性, 这与脱硫弧菌属内的微生物, 特别是与 *D. vulgaris* Hildenborough 的差异明显: ①BQ₁ 的最适温度为 30℃ 左右(图 3), 能够耐受的最高温度为 70℃, 而 *D. vulgaris* Hildenborough 的最适温度为 30 ~ 36℃, 最高耐受温度 44℃; ②1.5% 的 NaCl 能够抑制 *D. Hildenborough* 的生长(细胞浓度降低 50%)^[28], 但 BQ₁ 在 10% 的 NaCl 浓度下的生长及代谢活性未受

明显影响(图3);③BQ₁能够以单质硫为唯一电子受体产生H₂S,但是*D. vulgaris* Hildenborough不能利用单质硫;BQ₁能够利用乙酸、丙酸为唯一碳源进行生长,但是*D. vulgaris* Hildenborough不能利用小分子的脂肪酸和乙酸盐.这些研究结果提示,虽然BQ₁在形态和系统发育上与*D. vulgaris* Hildenborough具有较高相似性,但由于环境的差异(高温高盐)可能造成菌株对不同环境的适应性不同,造成了菌株在生理生化特征上的一些改变.另有研究表明,从大庆油田采出水筛选出的1株硫化氢产生菌,其16S rRNA基因序列与脱硫弧菌属相似性最高(99%),但该菌株也能耐受10%的NaCl浓度,且在pH为6.0~11.0范围内生长^[29].这些结果提示,脱硫弧菌属的微生物种群对油藏环境条件具有较强的适应性.另一方面,在未来的研究工作中,非常有必要通过基因组学等多种方法的综合应用进一步揭示硫酸盐还原菌的环境适应性进化机制.本研究结果显示,BQ₁的耐高温、耐高盐的生理特性可能对于确保其适应渤海湾油藏内的高温、高盐环境具有重要作用(表1).

BQ₁不能利用硝酸盐为唯一电子受体进行生长代谢,提示BQ₁不具有异化硝酸盐还原成铵的代谢活性^[30,31],这与*D. vulgaris* Hildenborough的特性相似^[32].添加800 mg·L⁻¹硝酸盐时,菌株产H₂S的代谢活性未受任何影响,该结果显示BQ₁对硝酸盐具有耐受能力,硝酸盐的添加无法有效抑制由该菌株引发的油藏酸化.另有研究也表明,单纯补加硝酸盐无法抑制北海高温油田中硫酸盐还原菌(*Thermodesulforhabdus norvegicus*和*Archaeoglobus fulgidus*)的代谢活性^[33].Korte等^[34]的研究则显示,尽管高浓度的硝酸盐(6 000 mg·L⁻¹)能够短期抑制*D. vulgaris* Hildenborough菌株生长,但是胁迫后的子代菌株几乎完全不受该浓度水平硝酸盐的抑制.He等^[35]的研究结果也显示,*D. vulgaris* Hildenborough能够耐受高达12 000 mg·L⁻¹的硝酸盐.在本研究中由于重点是考察低剂量的硝酸盐抑制油田酸化的有效性,因此实验处理中未包含浓度大于800 mg·L⁻¹的处理.未来研究中,有必要明确菌株BQ₁耐受硝酸盐的最高浓度,这将进一步深化对我国高温油田硫酸盐还原菌生理特性的认识.

亚硝酸盐是硫酸盐还原过程中的亚硫酸盐还原酶的竞争性抑制剂^[36],在细胞内缺乏亚硝酸盐还原酶的硫酸盐还原菌类群中,低浓度的亚硝酸盐即可有效抑制硫酸盐还原的代谢活性.本研究中,

BQ₁不能利用亚硝酸盐为唯一电子受体进行生长,且浓度低至70 mg·L⁻¹的亚硝酸盐能抑制BQ₁产生H₂S的代谢活性达30 d以上,这表明BQ₁对亚硝酸盐的“毒性”更为敏感.尽管如此,人们仍需要有关BQ₁基因组中是否存在亚硝酸盐还原酶基因的直接证据.据报道,与BQ₁亲缘关系较近的*D. vulgaris* Hildenborough基因组中有编码亚硝酸盐还原酶NirHA的基因^[37];最新的研究进一步显示,*D. vulgaris* Hildenborough能够利用亚硝酸盐为唯一电子受体进行生长代谢^[38].在利用亚硝酸盐方面,菌株BQ₁与*D. vulgaris* Hildenborough间的差异值得进一步研究.另一方面,BQ₁对亚硝酸盐的敏感性对于使用亚硝酸盐控制渤海湾海域高温油田微生物酸化是有利的,源自北海高温油田的有关研究也证明亚硝酸盐抑制硫酸盐还原菌产H₂S活性方面比硝酸盐更有效^[33].

3.2 杀菌剂剂量对于抑制硫酸盐还原菌代谢活性的差异

同一种杀菌剂在杀死或抑制不同油田硫酸盐还原菌中的使用剂量和效果存在显著差异.有研究显示^[39],戊二醛、溴硝醇在抑制加拿大Coleville油田中SRP的最低抑制浓度分别为500 mg·L⁻¹和800 mg·L⁻¹.本实验中,戊二醛、溴硝醇能够有效抑制BQ₁的浓度远低于Coleville油田的使用剂量,仅分别为50 mg·L⁻¹和30 mg·L⁻¹;对于印度Kathloni油田杀菌剂的研究结果显示^[40],单独使用25 mg·L⁻¹的次氯酸钠、苄基三甲基氯化铵(BTAC)、溴硝醇在2 h内即可全部杀死从该油田采出水中分离到的SRP(初始数量达10⁸ MPN·mL⁻¹).但在本研究中,能够有效抑制BQ₁活性所需的次氯酸钠、BTAC的浓度远高于Kathloni油田杀菌剂使用量.本实验投加50 mg·L⁻¹二氧化氯才能使BQ₁得到有效抑制.造成这些差异的原因可能与特定油田中待评测的硫酸盐还原菌种类、杀菌剂应用历史、油藏环境条件有关^[15].这些差异再次提示,控制油田酸化的技术研发需要针对特定油藏的实际环境及SRP物种组成及代谢特点开展深入的分析研究^[1,12].除抑制效果外,选取的几种杀菌剂相较于其他杀菌剂,具有相对安全、低毒等特性,虽部分杀菌剂成品价格高,但相对于同类型杀菌剂其维护成本、设施造价及管理成本低.本实验结果显示,溴硝醇和戊二醛可以高效抑制或杀灭渤海湾海域油藏中的SRP优势菌株,这两种杀菌剂在该区域油藏酸化控制中可能具有较大的应用潜力.尽管如此,在未来的工作

中仍有必要进一步评价这几种杀菌剂在渤海湾海域高温油田中应用的经济可行性及其他油田开发过程的潜在影响(如结垢效应等)。

4 结论

(1) 通过厌氧 Hungate 技术获得的渤海湾海域高温油田采出水中可培养的优势硫酸盐还原菌菌株 BQ₁ 的 16S rRNA 基因序列与 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 相似性达 99%。该菌株具有耐高温(70℃)、耐盐(10% 的 NaCl)的生理特性; 菌株能够利用多种碳源进行生长代谢, 能利用硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐和单质硫为唯一电子受体产生 H₂S, 但不能利用硝酸盐和亚硝酸盐;

(2) 50 mg·L⁻¹ 的戊二醛、30 mg·L⁻¹ 的溴硝醇或 50 mg·L⁻¹ 的二氧化氯可单独抑制 BQ₁ 产 H₂S 的代谢活性达 30 d 以上, 是潜在的高效杀菌剂; 而初始浓度分别为 600 mg·L⁻¹ 和 300 mg·L⁻¹ 的次氯酸钠和 BTAC 对于 BQ₁ 的抑制效果不明显;

(3) 浓度为 800 mg·L⁻¹ 的 NO₃⁻ 无法抑制 BQ₁ 的生长和产 H₂S 活性, 而 70 mg·L⁻¹ 的 NO₃⁻ 对 BQ₁ 的抑制时间长达 30 d 以上, 是潜在的有效抑制剂。

致谢: 感谢中国科学院沈阳应用生态研究所、中国科学院污染生态与环境工程重点实验室庄杰研究员、严俊研究员、李秀颖博士对本研究中硫酸盐还原菌筛选等方面的帮助和支持!

参考文献:

- [1] Gieg L M, Jack T R, Foght J M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, **92**(2): 263-282.
- [2] Li X X, Liu J F, Yao F, et al. Dominance of *Desulfotignum* in sulfate-reducing community in high sulfate production-water of high temperature and corrosive petroleum reservoirs [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, **114**: 45-56.
- [3] Wasmund K, Mußmann M, Loy A. The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments [J]. Environmental Microbiology Reports, 2017, **9**(4): 323-344.
- [4] Colin Y, Goñi-Urriza M, Gassie C, et al. Distribution of sulfate-reducing communities from estuarine to marine bay waters [J]. Microbial Ecology, 2017, **73**(1): 39-49.
- [5] Muyzer G, Stams A J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria [J]. Nature Reviews. Microbiology, 2008, **6**(6): 441-454.
- [6] Bowles M W, Mogollón J M, Kasten S, et al. Global rates of marine sulfate reduction and implications for sub-sea-floor metabolic activities [J]. Science, 2014, **344**(6186): 889-891.
- [7] Bastin E S, Greer F E, Merritt C A, et al. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters [J]. Science, 1926, **63**(1618): 21-24.
- [8] Guan J, Xia L P, Wang L Y, et al. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and *dsrAB* genes [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, **76**(76): 58-66.
- [9] Priha O, Nyssönen M, Bomberg M, et al. Application of denaturing high-performance liquid chromatography for monitoring sulfate-reducing bacteria in oil fields [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, **79**(17): 5186-5196.
- [10] Rosnes J T, Torsvik T, Lien T. Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, **57**(8): 2302-2307.
- [11] Beeder J, Nilsen R K, Rosnes J T, et al. *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(4): 1227-1231.
- [12] Johnson R J, Folwell B D, Wirekoh A, et al. Reservoir souring—latest developments for application and mitigation [J]. Journal of Biotechnology, 2017, **256**: 57-67.
- [13] Cord-Ruwisch R, Kleinitz W, Widdel F. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production [J]. Journal of Petroleum Technology, 1987, **39**(1): 97-106.
- [14] Skovhus T L, Eckert R B, Rodrigues E. Management and control of microbiologically influenced corrosion (MIC) in the oil and gas industry—overview and a North Sea case study [J]. Journal of Biotechnology, 2017, **256**: 31-45.
- [15] Yin B, Williams T, Koehler T, et al. Targeted microbial control for hydrocarbon reservoir: identify new biocide offerings for souring control using thermophile testing capabilities [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, **126**: 204-207.
- [16] Okoro C C. The Biocidal efficacy of tetrakis-hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS) based biocides on oil pipeline PigRuns liquid biofilms [J]. Petroleum Science and Technology, 2015, **33**(13-14): 1366-1372.
- [17] Kahrilas G A, Blotvogel J, Stewart P S, et al. Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity [J]. Environmental Science & Technology, 2015, **49**(1): 16-32.
- [18] Chapman J S. Biocide resistance mechanisms [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, **51**(2): 133-138.
- [19] 邓运华, 薛永安, 于水, 等. 浅层油气团聚理论与渤海大油田群的发现 [J]. 石油学报, 2017, **38**(1): 1-8.
- [19] Deng Y H, Xue Y A, Yu S, et al. Shallow hydrocarbon migration and accumulation theory and discovery of giant oilfield group in Bohai Sea [J]. Acta Petroli Sinica, 2017, **38**(1): 1-8.
- [20] 唐磊. 辽东湾绥中 36-1 油田硫化氢成因研究 [J]. 石化技术, 2016, **23**(6): 142-143.
- [20] Tang L. Origin of hydrogen sulfide in Suizhong 36-1 oilfield [J]. Petrochemical Industry Technology, 2016, **23**(6): 142-143.
- [21] Stilić B, Hrenović J. Rapid detection of sulfide-producing bacteria from sulfate and thiosulfate [J]. Folia Microbiologica, 2004, **49**(5): 513-518.
- [22] Miller T L, Wolin M J. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes [J]. Applied Microbiology, 1974, **27**(5): 985-987.
- [23] Hungate R E. Chapter IV a roll tube method for cultivation of

- strict anaerobes[J]. *Methods in Microbiology*, 1969, **3**: 117-132.
- [24] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 221-223.
- [25] 马放. 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. 68-81.
- [26] 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*, 2010, **16**(1): 12-18.
- [27] Jan-Roblero J, Posadas A, de la Serna J Z D, *et al.* Phylogenetic characterization of bacterial consortia obtained of corroding gas pipelines in Mexico[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, **24**(9): 1775-1784.
- [28] Zhou A, Lau R, Baran R, *et al.* Key metabolites and mechanistic changes for salt tolerance in an experimentally evolved sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio vulgaris* [J]. *mBio*, 2017, **8**(6): e01780-17.
- [29] 郝钦钦. 三元复合驱油藏微生物酸化与控制研究[D]. 沈阳: 中国科学院大学, 2017. 39-42.
- [30] 杨德玉, 张颖, 史荣久, 等. 硝酸盐抑制油田采出水中硫酸盐还原菌活性研究[J]. *环境科学*, 2014, **35**(1): 319-326.
- Yang D Y, Zhang Y, Shi R J, *et al.* Inhibition of the activity of sulfate-reducing bacteria in produced water from oil reservoir by nitrate[J]. *Environmental Science*, 2014, **35**(1): 319-326.
- [31] 谢柄柯, 张玉, 王晓伟, 等. 菌株 *Desulfovibrio* sp. CMX 的 DNRA 性能和影响因素[J]. *环境科学*, 2016, **37**(10): 3955-3962.
- Xie B K, Zhang Y, Wang X W, *et al.* Performance and influencing factors of dissimilatory nitrate reduction to ammonium process by the strain *Desulfovibrio* sp. CMX[J]. *Environmental Science*, 2016, **37**(10): 3955-3962.
- [32] Jan K, Rainey F A, Friedrich W. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*[M]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.
- [33] Kaster K M, Grigoriyan A, Jenneman G, *et al.* Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field in the North Sea[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75**(1): 195-203.
- [34] Korte H L, Fels S R, Christensen G A, *et al.* Genetic basis for nitrate resistance in *Desulfovibrio* strains [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, **5**: 153.
- [35] He Q, He Z L, Joyner D C, *et al.* Impact of elevated nitrate on sulfate-reducing bacteria: a comparative study of *Desulfovibrio vulgaris*[J]. *ISME Journal*, 2010, **4**(11): 1386-1397.
- [36] Greene E A, Hubert C, Nemati M, *et al.* Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**(7): 607-617.
- [37] Heidelberg J F, Seshadri R, Haveman S A, *et al.* The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(5): 554-559.
- [38] Korte H L, Saini A, Trotter V V, *et al.* Independence of nitrate and nitrite inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and use of nitrite as a substrate for growth[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(2): 924-931.
- [39] Greene E A, Brunelle V, Jenneman G E, *et al.* Synergistic inhibition of microbial sulfide production by combinations of the metabolic inhibitor nitrite and biocides [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(12): 7897-7901.
- [40] Kaur G, Mandal A K, Nihlani M C, *et al.* Control of sulfidogenic bacteria in produced water from the Kathloni oilfield in northeast India [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, **63**(2): 151-155.

CONTENTS

Ratios of Volatile Organic Compounds in Ambient Air of Various Cities of China	WANG Ming, CHEN Wen-tai, LU Si-hua, <i>et al.</i> (4393)
Temporal Variation, Spatial Distribution, and Reactivity Characteristics of Air VOCs in Beijing 2015	ZHANG Bo-tao, AN Xin-xin, WANG Qin, <i>et al.</i> (4400)
Research and Application of the Technical Method for the Compilation of VOCs Emission Inventories from Architectural Coatings in Beijing	DENG Zi-yu, GAO Mei-ping, WANG Qing-wei, <i>et al.</i> (4408)
Content Levels and Compositions Characteristics of Volatile Organic Compounds(VOCs) Emission from Architectural Coatings Based on Actual Measurement	GAO Mei-ping, DENG Zi-yu, NIE Lei, <i>et al.</i> (4414)
Characteristics of Primary Pollutants of Air Quality in Cities Along the Taihang Mountains in Beijing-Tianjin-Hebei Region During 2014-2016	WANG Xiao-yan, WANG Shuai, ZHU Li-li, <i>et al.</i> (4422)
Seasonal Variation and Source Analysis for PM _{2.5} , PM ₁ and Their Carbonaceous Components in Beijing	FAN Xiao-chen, LANG Jian-lei, CHENG Shui-yuan, <i>et al.</i> (4430)
Chemical Constitution and Carbon Isotopic Compositions of PM _{2.5} in the Northern Suburb of Nanjing in Spring	ZHOU Yi-ming, HAN Xun, WANG Jin-jin, <i>et al.</i> (4439)
Analysis of Non-polar Organic Compounds in PM _{2.5} by Rapid Thermo-desorption Method Coupled with GC/MS	MA Ying-ge, WU Xia, PENG Meng-meng, <i>et al.</i> (4446)
Association Between Fine Particulate Matter and Asthma Hospital Outpatient Visits in Hangzhou	WANG An-xu, CHEN Xi, SONG Cong-bo, <i>et al.</i> (4457)
Hybrid Electric Bus SCR System Operation and NO _x Emission Characteristics Based on Remote Communication Technology	YANG Qiang, HU Qing-yao, HUANG Cheng, <i>et al.</i> (4463)
Selection of Priority Contaminants in a Watershed Using Risk Ranking Methodology	LI Qi-feng, LÜ Yong-long, WANG Pei, <i>et al.</i> (4472)
Characteristics and Sources of Atmospheric Inorganic Nitrogen Wet Deposition in Xueyu Cave Watershed, Outer Suburbs of Chongqing City	DUAN Shi-hui, JIANG Yong-jun, ZHANG Yuan-zhu, <i>et al.</i> (4479)
Characteristics of Nitrogen Deposition in Heilongjiang Liangshui National Nature Reserve	SONG Lei, TIAN Peng, ZHANG Jin-bo, <i>et al.</i> (4490)
Key Production Process of Nitrous Oxide and Nitrogen Sources in Tuojia River	ZHAO Qiang, LÜ Cheng-wen, QIN Xiao-bo, <i>et al.</i> (4497)
Impact of Biochar on Nitrogen Removal and Nitrous Oxide Emission in Aerated Vertical Flow Constructed Wetland	WANG Ning, HUANG Lei, LUO Xing, <i>et al.</i> (4505)
Physiological Responses of Ryegrass in Cadmium-Nonylphenol Co-contaminated Water and the Phytoremediation Effects	SHI Guang-yu, LI Zhong-yi, ZHANG Lu, <i>et al.</i> (4512)
Analysis of Absorption Characteristics of Urban Black-odor Water	DING Xiao-lei, LI Yun-mei, LÜ Heng, <i>et al.</i> (4519)
Seasonal Variations of DOM Spectral Characteristics in the Surface Water of the Upstream Minjiang River	FAN Shi-yu, QIN Ji-hong, LIU Yan-yang, <i>et al.</i> (4530)
Water Quality and Three-Dimensional Fluorescence of Stormwater Runoff from Lined Bioretention Field Cells	LIN Xiu-yong, WANG Shu-min, LI Qiang, <i>et al.</i> (4539)
Nitrate-Nitrogen Pollution Sources of an Underground River in Karst Agricultural Area Using ¹⁵ N and ¹⁸ O Isotope Technique	SHENG Ting, YANG Ping-heng, XIE Guo-wen, <i>et al.</i> (4547)
Spectral Characteristics of Dissolved Organic Matter in Landfill Groundwater	PENG Li, YU Min-da, HE Xiao-song, <i>et al.</i> (4556)
Adsorption Behavior of Phosphate from Water on Zirconium-loaded Granular Zeolite-amended Sediment	LIANG Shu-jing, LIN Jian-wei, ZHAN Yan-hui, <i>et al.</i> (4565)
Control of Coagulant Dosing for Humic Substances Based on Ultraviolet Spectrum Analysis	ZHANG Bei-chen, ZHANG Xiao-lei, QIN Lan-lan, <i>et al.</i> (4576)
Reduction of Wastewater Organic Micro-pollutants and Genotoxicity in a Hybrid Process Involving Anaerobic-anoxic-oxic and Ozonation Treatments	LI Mo, WANG Zhen-zhe, CHEN Zhi-qiang, <i>et al.</i> (4584)
Distribution and Removal of Antibiotic Resistance Genes in Two Sequential Wastewater Treatment Plants	LI Ao-lin, CHEN Li-jun, ZHANG Yan, <i>et al.</i> (4593)
Effect of Magnetic Chitosan Hydrogel Beads with Immobilized Feamnox Bacteria on the Removal of Ammonium from Wastewater	LIU Zhi-wen, CHEN Chen, PENG Xiao-chun, <i>et al.</i> (4601)
Enhanced Nitrogen and Carbon Removal Performance of Simultaneous ANAMMOX and Denitrification (SAD) with Trehalose Addition Treating Saline Wastewater	YANG Zhen-lin, YU De-shuang, LI Jin, <i>et al.</i> (4612)
Characteristics of Denitrifying Phosphorus Removal by A ² /O-BAF at Low Temperatures	HUANG Jian-ming, ZHAO Zhi-chao, ZHENG Long-ju, <i>et al.</i> (4621)
Characteristics of Advanced Treatment of Treated Petrochemical Water by O ₃ -BAC and Analysis of Consortium Structure	ZHANG Chao, SHAN Ming-hao, XU Dan-ning, <i>et al.</i> (4628)
Microbial Community Characteristics of Shortcut Nitrification Start-up in Different MBR-Inoculated Sludges	WU Peng, CHEN Ya, ZHANG Ting, <i>et al.</i> (4636)
Effect of Microbial Community Structure and Metabolites on Sludge Settling Ability Under Three Different Switching Condition Processes	WEN Dan-dan, YUAN Lin-jiang, CHEN Xi, <i>et al.</i> (4644)
Adsorption Mechanisms of Ciprofloxacin by Extracellular Polymeric Substances of Sulfate-reducing Bacteria Sludge	ZHANG Hui-qun, JIA Yan-yan, FANG He-ting, <i>et al.</i> (4653)
Rapid Improvement of Denitrification Performance of Embedded Activated Sludge and Community Analysis	YANG Hong, XU Fu, MENG Chen, <i>et al.</i> (4661)
Spatial-Temporal Trends and Pollution Source Analysis for Heavy Metal Contamination of Cultivated Soils in Five Major Grain Producing Regions of China	SHANG Er-ping, XU Er-qi, ZHANG Hong-qi, <i>et al.</i> (4670)
Spatial Interpolation Methods and Pollution Assessment of Heavy Metals of Soil in Typical Areas	MA Hong-hong, YU Tao, YANG Zhong-fang, <i>et al.</i> (4684)
Effect of Straw Residues in Combination with Reduced Fertilization Rate on Greenhouse Gas Emissions from a Vegetable Field	HUANG Rong, GAO Ming, LI Jia-cheng, <i>et al.</i> (4694)
Emission of NH ₃ and N ₂ O from Spinach Field Treated with Different Fertilizers	SHAN Nan, HAN Sheng-hui, LIU Ji-pei, <i>et al.</i> (4705)
Effects of Various Combinations of Fertilizer, Soil Moisture, and Temperature on Nitrogen Mineralization and Soluble Organic Nitrogen in Agricultural Soil	TIAN Fei-fei, JI Hong-fei, WANG Le-yun, <i>et al.</i> (4717)
Long-term Fertilization Effects on the Abundance of Complete Ammonia Oxidizing Bacteria(Comammox <i>Nitrospira</i>) in a Neutral Paddy Soil	WANG Mei, WANG Zhi-hui, SHI Xiao-jun, <i>et al.</i> (4727)
Spatial Variation of Soil Organic Carbon and Stable Isotopes in Different Soil Types of a Typical Oasis	CHEN Xin, GONG Lu, LI Yang-mei, <i>et al.</i> (4735)
Effect and Mechanism of Attapulgite and Its Modified Materials on Bioavailability of Cadmium in Soil	CHEN Zhan-xiang, CHEN Chuan-sheng, CHEN Wei-ping, <i>et al.</i> (4744)
Persulfate Oxidation Effect of Soil Organic Pollutants by Natural Organic Matters	LIU Qiong-zhi, LIAO Xiao-yong, LI You, <i>et al.</i> (4752)
Lead Uptake and Accumulation in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) with Water Management and Selenite Fertilization	WAN Ya-nan, LIU Zhe, Aboubacar Younoussa Camara, <i>et al.</i> (4759)
Key Bacteria for the Microbial Degradation of Pollutants in Cellar Water	YANG Hao, YANG Xiao-ni, ZHANG Guo-zhen, <i>et al.</i> (4766)
Oxidation of Humic Acid Complexing As(III) by As(III)-Oxidizing Bacteria	LI Ze-jiao, CUI Yan-shan, YIN Nai-yi, <i>et al.</i> (4778)
A Thermotolerant and Halotolerant Sulfate-reducing Bacterium in Produced Water from an Offshore High-temperature Oilfield in Bohai Bay, China: Isolation, Phenotypic Characterization, and Inhibition	YANG Chun-lu, YUAN Mei-yu, SHI Rong-jiu, <i>et al.</i> (4783)
Isolation and Nitrogen Removal Characteristics of Salt-tolerant Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification Bacteria <i>Zobellella</i> sp. B307	BAI Jie, CHEN Lin, HUANG Xiao, <i>et al.</i> (4793)
Isolation, Identification and Degradation Characteristics of a 17 β -estradiol Degrading Strain <i>Fusarium</i> sp. KY123915	WU Man-li, ZHU Chang-cheng, QI Yan-yun, <i>et al.</i> (4802)
Effect of Fluoroquinolones on Performance and Microbial Community of a Vertical Flow Constructed Wetland	LI Xin-hui, ZHENG Quan, LI Jing, <i>et al.</i> (4809)
Microbial Community Diversity Analysis During Lincomycin Mycelia Dreg with Manure	REN Sheng-tao, GUO Xia-li, LU A-qian, <i>et al.</i> (4817)
Oxidative Stress and DNA Damage Induced by DEP Exposure in Earthworms	PING Ling-wen, LI Xian-xu, ZHANG Cui, <i>et al.</i> (4825)
Mineralogy Characteristics and Heavy Metal Distribution of MSWI Fly Ash	LI Jian-tao, ZENG Ming (4834)