

腐蚀生物膜垢中硫酸盐还原菌的系统进化分析

陈 悟^{1,2} 汪文俊² 向 福² 余龙江^{2*} 曾庆福¹

(1. 武汉科技学院环科所 武汉 430073)

(2. 华中科技大学生命与科学技术学院 武汉 430074)

摘 要: 从油田回注水系统加压泵后的管道管壁生物膜垢里分离得到的一株嗜热、嗜酸、异养型硫酸盐还原菌, 编号为 CW-04。该菌株兼性厌氧、革兰氏阳性、有极生鞭毛、直或弯曲的短杆状, 能产孢子, 最佳生长温度 47℃, 在 20℃~63℃ 下培养基中均能使测试瓶有黑色沉淀产生。从腐蚀防治的角度研究该菌株的生长曲线。主要生理生化特性包括: 生长 pH 范围为 3.7~10, 最佳生长 pH 为 6~6.5, 最佳生长盐度为 0.7%。能够在 H₂+醋酸盐、甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、乳酸盐、丙酮酸盐和乙醇等电子供体中生长, 也能够利用葡萄糖、果糖和简单的氨基酸作为唯一碳源生长; 能够在硫酸钠、硫代硫酸钠、亚硫酸钠等电子受体中生长, 但是不能利用硝酸盐和硫磺。通过 16S rDNA 测序以及系列比对分析: 该菌属于细菌界(Bacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭菌纲(Clostridia)、梭菌目(Clostridiales)、蛋白脲链球菌科(Peptococcaceae)、脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum*), 与该属中的种 *Desulfotomaculum aeronauticum* 相似性达到 99%。

关键词: 硫酸盐还原菌, 脱硫肠状菌属, 系统进化, 16S rDNA, PCR

Lineages Evolution Analysis of Sulfate-reducing Bacteria in the Corrosion Biofilm

CHEN Wu^{1,2} WANG Wen-Jun² XIANG Fu² YU Long-Jiang^{2*} ZENG Qing-Fu¹

(1. The Research Centre of Environmental Science, Wuhan University of Science & Engineering, Wuhan 430073)

(2. School of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074)

Abstract: A new thermophilic, acidityphilic, sulfate-reducing heterotrophic bacteria, strain CW-04, was isolated from biofilm dirtiness in pipeline wall after press pump of affusion system in oilfield. The bacterium is an concurrently anaerobic, non-motile, Gram-positive, pole flagellum, spore-forming curved rod growing within a pH range of 3.7~10(optimal growth at pH 6~6.5) and temperature range of 20℃~63℃ (optimal growth at 47℃), then, growth curve was studied to efficiently prevent corrosion. The optimum NaCl concentration for growth is 0.7%. A limited number of compounds are utilized as electron donors, including H₂+acetate, formate, acetate, lactate, propionate, pyruvate and ethanol. Sulfate, sulfite and thiosulfate, but not sulfur or nitrate, can be used as electron acceptors. Strain CW-04 is able to utilize glucose, fructose and simple aminophenol as sources of carbon. Analysis of the 16S rDNA sequence allowed strain CW-04(accession numbers: AY703033) to be classified as a representative of a new strain of the genus

* 通讯作者: Tel: 027-87792265; ✉: yulongjiang@hust.edu.cn

收稿日期: 2007-06-25; 接受日期: 2007-08-06

Desulfotomaculum, *Desulfotomaculum aeronauticum* (Bacteria, Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Peptococcaceae) whose similarity is 99%.

Keywords: Sulfate-reducing bacteria, *Desulfotomaculum*, Lineages evolution, 16S rDNA, PCR

原油在长时间的开采过程中,地层需要注水来维持油气输出压力,而输水所用的长金属管道管壁在水的生境中,极易形成由水体沉积物和微生物组成的生物膜垢^[1,2]。人们通过对生物膜垢的形成^[3]、结构^[4]和微生物群落分析^[5,6]得出:生物膜的形成是微生物腐蚀(Microbiologically Influenced Corrosion MIC)发生的必要条件,也是微生物的金属腐蚀难以防治的主要原因。本论文首次采用纯培养的方法直接从回注水系统的管壁膜垢中分离纯化得到一株耐温、嗜酸产孢子的脱硫肠状菌。从腐蚀防治的角度来研究它的生长代谢规律、生理生化特性,并通过对基因 16S rDNA 序列的测定进一步确定了该菌株的分类学和系统发育地位。

1 材料和方法

1.1 分离源和分离纯化方法

菌株来自中石化中原油气高新股份有限公司文南油田联合污水处理站,菌株 CW-04 取自回注水系统加压泵后的碳钢管道管壁生物膜垢经富集、分离、纯化后得到。

1.2 菌株的形态学观察和芽孢观察

菌体形态观察先用 Nikon Alphaphot-2 YS2 光学显微镜,后用 JEM-100cxII 透射电镜观察菌体形态、芽孢以及鞭毛情况,用扫描电子显微镜(SEM 型号: HITACHI, X-650)观察菌体表面情况。并用革兰氏染色方法确定菌株是阳性还是阴性,培养芽孢用生孢培养基,鞭毛用磷钨酸负染的方法观察。

1.3 细菌生长量测定

采用测定培养基中硫酸盐的消耗量来间接得到硫酸盐还原菌的生物量的变化的方法: 420 nm 下进行比色测定,以硫酸盐为横坐标,OD 值为纵坐标作出硫酸盐标准曲线,在曲线上得出培养液中的 SO_4^{2-} 浓度值。

1.4 生理生化实验

实验利用已经使用过的北京华兴化学试剂厂生产的 SRB-HX 型硫酸盐还原菌测试瓶,将原菌体培养基抽空,加酸、洗净后,注入相应的不同碳源、硫的氧化酸盐、硝酸盐等硫酸盐还原菌培养基 18 mL,经湿法灭菌,接种 2 mL。在 47 °C 培养箱中培养 4 d

左右观察测试瓶溶液是否有黑色沉淀产生而最终确定菌株能否在这种特异培养基中生长。

1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增和系列分析

总 DNA 的提取按照文献[7]进行,PCR 反应的引物参考文献[8],5'-端引物 GM3: AGAGTTTGATC (A/C)TGGCTCAG(对应于大肠杆菌的 8~24),3'-端引物 U1492r: GGTACCTTGTTACGACTT(对应大肠杆菌的 1492~1510)。

将所测系列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行系列比对分析,并利用 T-COFFE 进行多重序列比对、比对结果用 MEGA3 进行系统发育分析,构建系统进化树。

2 结果和分析

2.1 分离菌株形态学

用接种针从油田新鲜废弃的腐蚀穿孔的金属碳钢管内壁刮去一层生物膜垢,直接接种到已灭菌的硫酸盐还原菌液态培养基中富集培养。用滚管法分离,得到一株兼性厌氧、直或弯的短杆状菌,用透射电镜和扫描电镜观察:直径为 0.8 μm 左右,长度 3 μm ~6 μm ,有 1~3 根较长的端生鞭毛(图 1-B 是菌体喷金后的扫描电镜照片),可以观察到有明显的孢子生成(见图 1-C),革兰氏染色阳性。在厌氧条件下如果接种到硫酸盐还原菌的琼脂培养皿中,可以观察到该菌落为气泡形,周围是黑色的硫化亚铁颗粒,顶端是鼓起的气泡,直径 0.5 mm~2 mm(见图 1-A)。

2.2 菌株的生长曲线的确定

硫酸盐还原菌培养基中含有大量的硫酸根离子,SRB 也是从硫酸根离子还原成负二价硫离子的过程中获得能量的;硫酸根离子消耗量的变化一定程度上反映了 SRB 数量的变化、代谢的快慢。采用在乙醇介质中,以钼试剂作指示剂,亚甲基蓝溶液作衬色剂,用铬酸钡标准溶液作滴定剂,可以合理测定硫酸根离子变化。而生长曲线的测定一方面可以提供不同菌株具有不同生长规律的信息,更重要的是可以指导我们合理的加药时间间隔、合理的加药方式以及合理的加药量(图 2)。为我们最终解决油田回注水的微生物腐蚀问题提供了强而有力的理论依据。

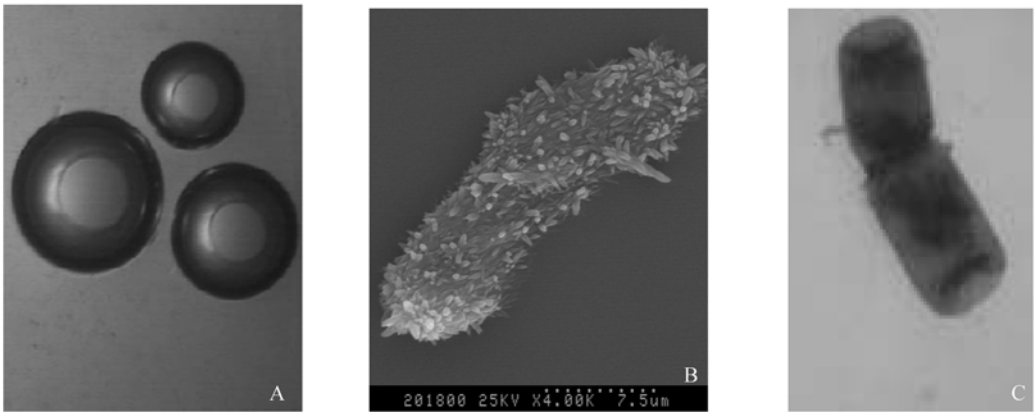


图 1 菌株 CW-04 的形态学(A: 菌落形态照片; B: 扫描电镜照片; C: 孢子的透射电镜照片)

Fig. 1 Morphology of strain CW-04 (A: Photo of cells colony; B: SEM of strain; C: JEM of spore-form)

表 1 菌株 CW-04 在不同电子供体下的生理特性(以硫酸盐作为电子受体)

Table 1 Physiological characteristics of CW-04 species with different electron donors (with sulfate as electron acceptor)

不同碳源 Different carbon sources	<i>Desulfohalobium</i> strain CW-0	不同碳源 Different carbon sources	<i>Desulfohalobium</i> strain CW-0
H ₂ + CO ₂	—	Isopropanol	—
H ₂ + acetate	+	Isoamyl alcohol	—
Sodium Formate	+	Mannitol	+
Sodium Acetate	+	Propionyl alcohol	—
Sodium Lactate	+	propyl three alcohol	—
Sodium Propionate	+	Aether	—
Sodium Butyrate	—	Acetone	—
Sodium Pyruvate	+	Glucose	+
Sodium Citrate	—	Fructose	—
Sodium Succinate	—	Saccharose	—
Sodium Fumarate	—	Maltose	—
Sodium Malate	—	L- cystine	+
Sodium Oxalate	—	L-lysine	—
Methanol	—	D,L- α -aminopropionic acid	+
Ethanol	+	D,L- methionin	—
Propanol	—	Sodium Glycolate	—
Butanol	—		

Electron acceptors (with lactate as energy and carbon source):

Sulfate	+	Nitrate	—
Sulfite	+	Sulfur	—
Thiosulfate	+		

2.3 菌株的生理、生化特性研究

2.3.1 不同电子受体和电子供体对硫酸盐还原菌生长的影响：根据油田回注水系统中可能存在的有机碳源，结合实验室里的条件，我们研究了 33 种电子受体对硫酸盐还原菌生长的影响。同时，还研究了硫磺、硫酸钠、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠以及硝酸盐 5 种电子供体对 SRB 生长的影响，具体见表 1。从表中我们可以看出：该菌株能利用一些初级醇类、短链脂肪酸、葡萄糖、一些氨基酸以及乙醚、丙酮等为碳源，较难利用分子量较大的脂肪酸和醇类。这些性质与文献[15]报道脱硫弧菌属的生理生化特性相似。

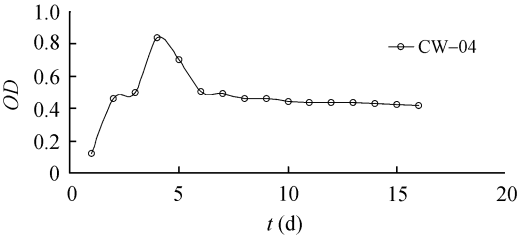


图 2 菌株 CW-04 的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of strain CW-04

2.3.2 不同 pH 条件、温度条件对硫酸盐还原菌菌株生长的影响：从图 3 中我们可以看出：不同 pH 条件对菌株的生长速度有较大的影响，pH 在低于 3 和高于 10 的培养基中不能生长，最佳生长 pH 值为 6.7 左右。最佳生长温度 47℃，在 63℃ 下特殊培养基中能使测试瓶产生黑色沉淀，78℃ 不能生长，但是在该温度下培养 3d 后，再放置 47℃ 下，能够观察到菌体的继续生长。

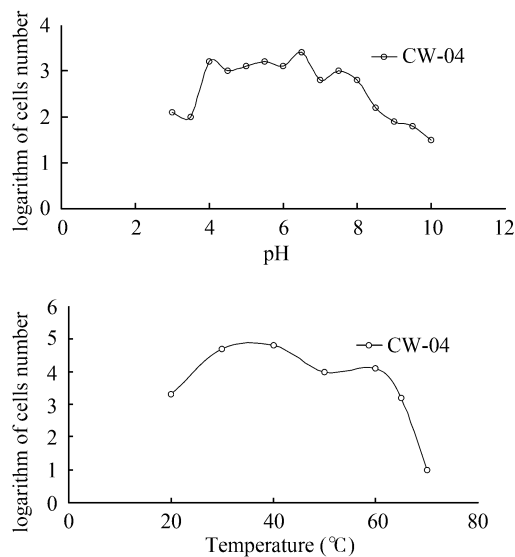


图3 菌株 CW-04 在不同 pH 和不同温度下的生长状态

Fig. 3 The number of strain CW-04 in different pH, different temperature

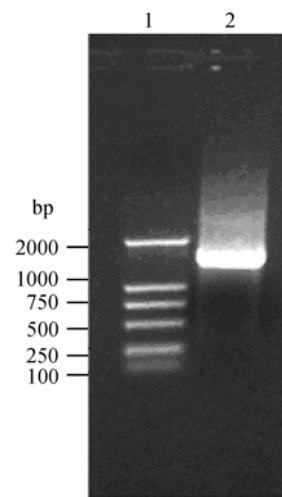


图4 菌株的 16S rDNA 凝胶电泳照片

Fig. 4 Analysis of the 16S rDNA gene by gel electrophoresis
1: DL2000 DNA marker; 2: PCR product of strain CW-04

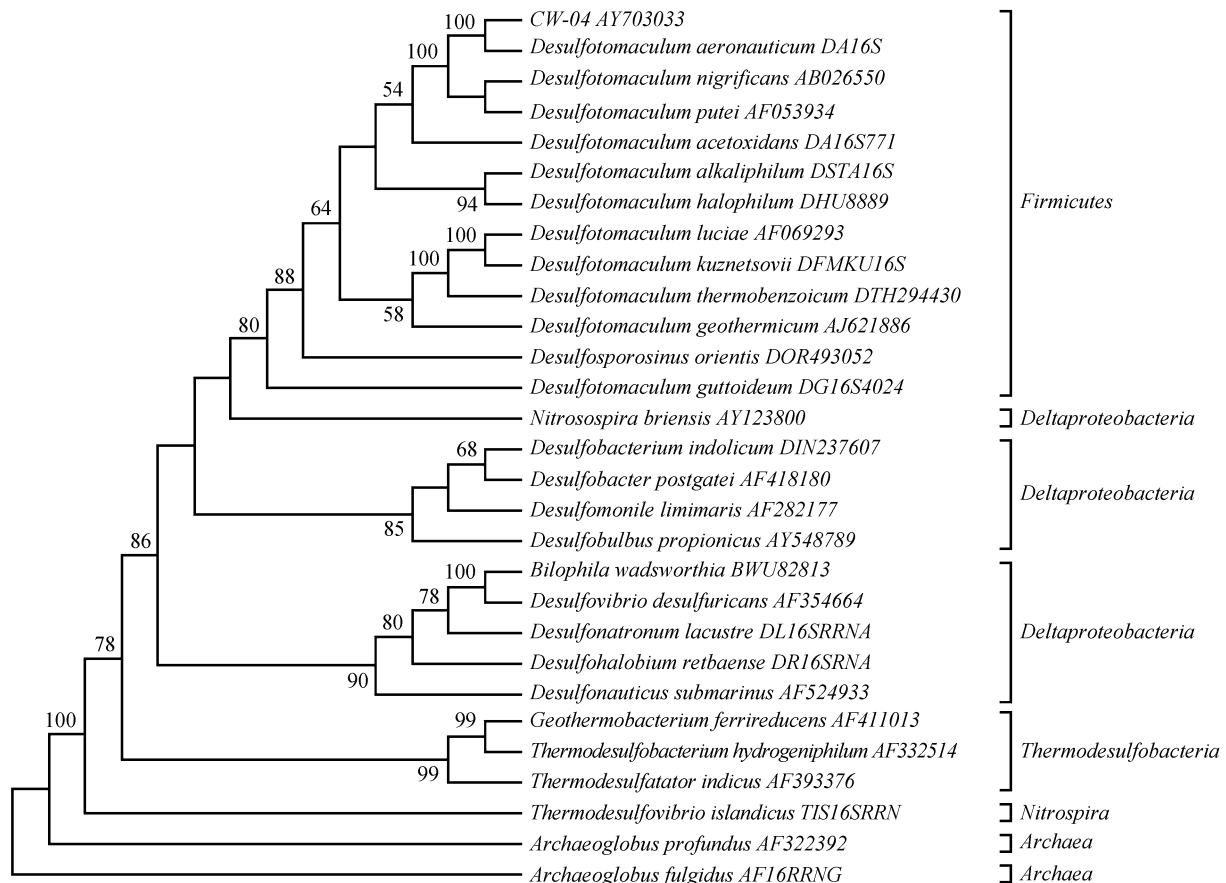


图5 菌株 CW-04(AY703033)与 44 种典型脱硫肠状菌 16S rDNA 构建的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic relationship among typical 44 genus in all *Desulfotomaculum* 16S rDNA gene and CW-04(AY703033)

2.4 菌株 CW-04 的系列数据处理和系统发育树构建

将菌株的序列测序结果输入 GenBank 以 Blast 软件进行序列同源性比较, 结果显示菌株 CW-04 的 16S rDNA 全系列与脱硫肠状菌属的菌株 *Desulfotomaculum aeronauticum* 具有较高同源性(接近 99%), 菌株 CW-04 在 GenBank 中的序列登录号为: AY703033。用文献[9]报道的软件和方法远程获取 GenBank 上所有的硫酸盐还原菌 16S rDNA 系列, 选取其中比较有代表性的菌株 28 株, 与本实验所测的菌株进行多重系列比对, 比对结果用 MEGA3 软件构建最大节约一致树如图 5, 其中图 4 是该菌株通过 PCR 扩增的 16S rDNA 的琼脂糖凝胶电泳照片, 最亮的条带对应的长度正是标记物 1500 bp 左右的地方。

3 结论

油田回注水体系的水源复杂, 一般包括原油分离水、矿井作业废水、炼油废水、地面污水、生活污水以及一些补充水(如: 浅层井水、海水、河流水等等), 这些水源矿化度高, 富含各种有机物, 有利于各种微生物的过度生长。如果不加以处理, 很快造成输水管线腐蚀穿孔、底下油井堵塞等等, 给原油的开采和输送带来严重的影响。

为了更好治理硫酸盐还原菌对金属管道的腐蚀, 从油田回注水系统金属管道管壁生物膜垢中分离得到的一株脱硫肠状菌, 兼性厌氧, 产孢子, 能够利用较多的短链碳源生长, 所能利用硫的氧化酸盐也较多, 所能适应生长温度、pH 范围也较宽, 通过测定该菌株 16S rDNA 基因序列在 GenBank 上 Blast 比较和系统发育分析, 该菌株属于脱硫肠状菌属中

的 *Desulfotomaculum aeronauticum* 种的一株。由于该菌株隐藏在生物膜垢中, 又能通过孢子的方式繁殖, 所能适应的生长环境也较宽, 如果单纯采用化学药剂来抑制或杀死 SRB 很难达到目的。这对于我们开发生物的、物理的包括化学的金属微生物腐蚀综合防治方法提供一定的理论支持。

参 考 文 献

- [1] Cecilia MS, Timothy GF. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**: 3731–3739.
- [2] Philip SS. Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**: 1485–1491.
- [3] Almeida MAN, Franc FP. A biofilm formation on brass coupons exposed to a cooling system of an oil refinery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, **20**: 39–44.
- [4] Daniel RN, Gonzalo P. Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions. *Wat Sci Tech*, 1999, **39**: 123–130.
- [5] Zhang T, Fang HHP. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 437–440.
- [6] Stoodley P, Sauer LK. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 2002, **57**: 187–209.
- [7] Frederick MA(F 奥斯伯)等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 2001, pp. 39–41
- [8] Rosnes JT, Torsvik T. Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacterium from North Sea oil field waters. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2302–2307.
- [9] Dang PN, Dang TCH. *Desulfovibrio vietnamensis* sp.nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium from vietnamese oil fields. *Anaerobe*, 1996, **2**: 385–392.