



研究报告

一株源自渤海海域高温酸败油井采出水的硫酸盐还原菌
筛选与活性抑制杨春璐¹ 闫鹏举^{1,2} 魏宠^{1,2} 史荣久^{*2,3} 韩斯琴^{2,3} 张颖^{2,3} 万传明¹

1 辽宁大学环境学院 辽宁 沈阳 110036

2 中国科学院沈阳应用生态研究所 辽宁 沈阳 110016

3 中国科学院污染生态与环境工程重点实验室 辽宁 沈阳 110016

摘要:【背景】海域油藏环境中硫酸盐还原菌(sulfate-reducing prokaryotes, SRP)的生长和代谢能够产生大量 H₂S, 引发酸败(souring)及微生物腐蚀等多方面的问题。但有关油藏生境中 SRP 的微生物多样性与生理活性及其危害控制的认识仍十分有限。【目的】深入了解我国渤海海域某高温酸败油藏中 SRP 的生理特点, 探究 SRP 危害的控制策略。【方法】采用 Hungate 厌氧纯培养技术从渤海海域某高温酸败油井采出水中分离筛选 SRP, 并考察优势菌株的生理特点, 综合 16S rRNA 基因序列比对分析菌株系统发育地位, 着重评价不同杀菌剂及使用剂量对优势菌株产 H₂S 活性的抑制效力。【结果】酸败采出井的采出水中优势 SRP 菌株 WJ₁ 的细胞呈长杆状, 菌体长度为 2.0–5.5 μm, 有运动性。WJ₁ 与解糖泽恩根氏菌(*Soehngenia saccharolytica*)模式菌株 BOR-Y^T 的 16S rRNA 基因序列一致性达 99%。WJ₁ 最适生长温度约为 37 °C, 能够耐受 60 °C 高温; 最适 pH 值约为 8.0 (范围 5.0–10.0), 最适盐度约为 0%–3%, 盐度高于 5% 不能生长。WJ₁ 可利用丙酸钠、乳酸钠、乙酸盐等多种碳源, 能以硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐为唯一电子受体产生 H₂S, 不能利用单质硫。次氯酸钠(600 mg/L)、苜基三甲基氯化铵(600 mg/L)对 WJ₁ 产 H₂S 活性无明显抑制效果。戊二醛(30 mg/L)、溴硝醇(10 mg/L)或四羟甲基硫酸磷(120 mg/L)可抑制 WJ₁ 产 H₂S 活性达 30 d 以上。【结论】渤海海域某高温酸败油井采出水中优势 SRP 菌株 WJ₁ 与 *S. saccharolytica* BOR-Y^T 的 16S rRNA 基因序列一致性最高, 但两者生理特性差异明显; 溴硝醇、戊二醛、四羟甲基硫酸磷是控制该酸败油井的潜在有效杀菌剂。

关键词: 硫酸盐还原菌, 海域油田, 杀菌剂, 硫化氢

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31570121); 2018 Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Liaoning University (x201810140178)

***Corresponding author:** Tel: 86-24-83970370; E-mail: shirongjiu@iae.ac.cn

Received: 16-03-2019; **Accepted:** 05-05-2019; **Published online:** 03-01-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31570121); 2018 辽宁大学“大学生创新创业训练计划”(x201810140178)

***通信作者:** Tel: 024-83970370; E-mail: shirongjiu@iae.ac.cn

收稿日期: 2019-03-16; **接受日期:** 2019-05-05; **网络首发日期:** 2020-01-03

Isolation and activity inhibition of a sulfate-reducing bacterium in produced water from an offshore high-temperature soured oilfield in the Bohai Sea area, China

YANG Chun-Lu¹ YAN Peng-Ju^{1,2} WEI Chong^{1,2} SHI Rong-Jiu^{*2,3} HAN Si-Qin^{2,3}
ZHANG Ying^{2,3} WAN Chuan-Ming¹

1 School of Environmental, Liaoning University, Shenyang, Liaoning 110036, China

2 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China

3 Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China

Abstract: [Background] The growth and activity of sulfate-reducing prokaryotes (SRP) that reside in petroleum reservoirs could generate large amount of H₂S, resulting in various problems such as microbial souring and microbially-influenced corrosion. Unfortunately, knowledge on the diversity, physiology, and activity control of SRP therein is quite limited. **[Objective]** In order to further understand the phenotypic characteristics of SRP residing in the offshore high-temperature oilfield in the Bohai Sea area, China, and to explore the potential methods for addressing the SRP-mediated problems. **[Methods]** We first isolated, using Hungate techniques, SRP strains from the production water, and then evaluated the phenotypic features of the dominant strain. We also investigated the efficacy of each of five biocides in suppressing the sulfidogenic activity of the selected SRP strain. **[Results]** Cells of the isolated dominant SRP strain WJ₁ are motile, rod-shaped, and approximately 2.0–5.5 μm in length. WJ₁ exhibits a sequence identity of 99% for 16S rRNA gene with *Soehngenia saccharolytica* BOR-Y^T. Isolate WJ₁ could survive at 60 °C (optimum at 37 °C), pH 5.0–10.0 (optimum pH 8.0), and in the presence of 0%–3% NaCl. Isolate WJ₁ utilized a wide range of carbon substrates, including propionate, lactate, and acetate. Sulfate, sulfite, and thiosulfate could be utilized as electron acceptors, but not sulfur. Neither sodium hypochlorite (600 mg/L) or benzyltrimethylammonium chloride (600 mg/L) could inhibit H₂S production by WJ₁. By contrast, glutaraldehyde (30 mg/L), bronopol (10 mg/L), or THPS ((bis[tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium] sulfate solution, 120 mg/L) could inhibited H₂S production by WJ₁ for at least 30 days. **[Conclusion]** The dominant SRP strain WJ₁, isolated from the soured production water from this specific high-temperature offshore oilfield in the Bohai Sea area, shares the highest sequence identity of 16S rRNA gene with *S. saccharolytica* BOR-Y^T but presents distinct phenotypic traits from this phylogenetically close relative; bronopol, glutaraldehyde, or THPS could serve as potent agents for the mitigation of microbial souring by WJ₁.

Keywords: Sulfate-reducing prokaryotes, Offshore oilfield, Biocide, Sulfide hydrogen

硫酸盐还原菌(sulfate-reducing prokaryotes, SRP)是能够以硫酸根为唯一电子受体进行厌氧代谢产生 H₂S 的多种微生物类群的统称^[1]。基于 16S rRNA 基因比对分析结果, SRP 分属于 *Deltaproteobacteria*、*Clostridia*、*Thermodesulfobacteria* 等 7 个进化分支, 其中 5 个进化支为细菌域, 2 个进化支为古菌(*Euryarchaeota* 和 *Crenarchaeota*)。SRP 种类多样, 广泛栖息于油藏、沉积物等缺/厌氧环境中, 且在碳、硫等元素的生物地球化学循环过

程中发挥着至关重要的作用^[1]。

在原油开采过程中, 向地下油藏中注水来提高原油的采收率(简称“水驱”)是非常重要的且常用的一种技术。对于海域油田而言, 因地表水等水源供给限制, 使用海水作为注入水开采石油是油田企业的必然选择。但是, 海水中含有的大量硫酸盐(浓度约 28 mmol/L)及其他营养物质, 会随注入水进入地下油藏。在油藏环境中, 由于可供 SRP 利用的有机碳源(电子供体)比较丰富(例如短

链脂肪酸、烷烃、芳香烃等),一旦持续引入硫酸盐则会大幅促进 SRP 的生长繁殖和代谢,从而产生高浓度的 H_2S ^[2-5],导致油藏发生酸败(souring)。在油田开发过程中,由 SRP 引发的油藏酸败会产生许多生产、安全和环境问题^[6-7]。例如,SRP 的大量繁殖及代谢活动会导致油田金属设施(如采、输油管线)的微生物腐蚀加剧,由此增加原油泄漏及经济损失等问题发生的潜在风险,而产生的 H_2S 不但降低原油及天然气的品质,还会严重危害工作人员的生命安全与身体健康。因此,几乎所有的油田企业均非常重视 SRP 的危害控制,但如何有效管控 SRP 在油田环境中的生长繁殖,降低甚至消除其危害一直是困扰油田开发工业的重要挑战之一^[8-11]。

绝大多数油田企业主要通过向注入水中投加化学杀菌剂以杀灭 SRP。较常用的化学杀菌剂包括戊二醛、四羟甲基硫酸磷{bis[tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium] sulfate solution, THPS}等^[7,12-13]。尽管化学杀菌剂在杀灭注入水中 SRP 的效果好、起效快,但 SRP 会对该杀菌剂产生耐药性,从而降低杀菌的效果^[11,14]。可是如果继续提高杀菌剂用量,则会增加成本。此外,绝大多数化学杀菌剂为高环境毒性的化合物,其生产、运输及使用等环节均存在较高的安全、生态与环境损害风险^[15]。另一方面,越来越多的研究显示,受油藏地质与环境条件异质性及开发方式的影响,不同油田环境中 SRP 的生物多样性和生理特性存在巨大差异,这些差异将对杀菌剂的选取及其工作浓度产生重要影响。因此,在深入了解特定油田 SRP 生理生态学具体实际的基础上,有针对性地开展杀菌剂筛选与效力评价等相关研究非常必要,也是有效提高油藏酸败控制技术效果的关键^[7]。

我国渤海海域油气资源储量丰富。据不完全统计,目前已有超过 1 000 口采油井正在运营^[16]。随着开采时间的延长,许多油井的采出液和天然气中均可检测到高浓度的 H_2S (其浓度可

达 10^3 mg/L 数量级水平)及细胞数量达 10^2 – 10^6 MPN/mL 水平的 SRP,表现出明显的微生物酸败特征。虽然一些学者已针对渤海海域油田 H_2S 的成因、杀菌剂的筛选等开展了研究,但关于渤海海域油田油藏中 SRP 生理特点及危害控制的研究仍十分缺乏,现有认知仍非常有限^[17]。本研究采用 Hungate 厌氧纯培养技术从渤海海域某高温油田酸败严重的生产平台采出水样品中筛选到一株数量占优势的硫酸盐还原菌,考察了该菌株的生理特性,并着重评价了几种化学杀菌剂(戊二醛、次氯酸钠、苄基三甲基氯化铵、溴硝醇和四羟甲基硫酸磷)对该菌株生长繁殖及产 H_2S 活性的控制效力。本研究结果将有益于深化我国渤海海域高温油田环境中 SRP 及代谢特性的认识,同时为该区域油藏杀菌剂优选及酸败控制研究提供菌种资源支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 油田采出水样品采集

采出水样品取自渤海海域已发生酸败的某高温油田生产平台的一口采出井。截止到采样时,该采出井已经注海水(或海水采出水混注)开发 6 年,油井的其他基本情况及采出水的基本理化性质如表 1 所示。采用预先除菌并充满高纯氮气(N_2 纯度 $\geq 99.99\%$)的高密度聚乙烯塑料桶(5.0 L)从井口端采集采出液,取样完成后迅速加盖密封并

表 1 用于 SRP 筛选的酸败采出井及采出水的基本理化性质

Table 1 Sourded producing well and physicochemical characteristics of the production water used for SRB isolation

指标参数 Parameters	数值 Quantitative value
SRP 数量 SRP estimates (MPN/mL)	9.5×10^5
温度 Temperature (°C)	60
采出井深度 Depth of well (m)	1 568
pH	7.9
SO_4^{2-} 质量浓度 Sulfate concentration (mg/L)	340
盐度(NaCl) Salinity (NaCl, mg/L)	10 728

于 4 日内运抵实验室。样品运抵实验室后, 立即在高纯氮气保护条件下完成油水分离, 收集采出水用于 SRP 菌株分离和水质理化性质测定。

1.1.2 培养基

采用含有乳酸钠为碳源的培养基(简称 M 培养基)完成 SRP 的富集与筛选, 采用简化培养基(简称 N 培养基)开展 SRP 纯菌株生理生化实验评价和杀菌剂效力评价, 培养基的成分参见文献[17]。利用 N 培养基评价菌株碳源、电子受体利用能力时, 用等量的待评测碳源和电子受体分别取代乳酸钠和硫酸镁; 评价纯菌株在不同环境条件下的生长能力时, 根据需要调整培养基中 NaCl 的用量和 pH 梯度(使用 HCl 或 NaOH 调节)。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^[17-18]完成。实验过程中使用的厌氧管或厌氧瓶均采用丁基橡胶塞密封, 再用铝盖压紧, 瓶/管的顶空气体为高纯 N₂。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶纯化试剂盒、限制性内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I, 宝生物工程(大连)有限公司。pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 分光光度计, PerkinElmer 公司; PCR 仪, 耶拿公司; 凝胶电泳系统, 北京六一生物科技有限公司; 微量蛋白质核酸分析仪, Thermo Fisher Scientific 公司, 环境扫描电子显微镜, 飞利浦公司; 离子色谱仪(ICS-900), 戴安(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SRP 分离、优势菌株的生理特性及种属关系初步鉴定

取无菌注射器吸取采出水 5 mL 接种至已预装 95 mL 液体 M 培养基的厌氧瓶中, 再将培养瓶置于培养箱中于 60 °C 条件下避光、静置培养。待培养瓶内液体变黑(SRP 生长代谢所产生的 H₂S 与培养基中含有的 Fe²⁺形成了 FeS 黑色沉淀)后, 取培养液转接至液体 M 培养基中连续进行 10 倍比梯度稀释(最低稀释度为 10⁻⁸), 然后参照文献[18]报道的方法完成 SRP 纯菌株的分离筛选。在厌氧手

套箱内小心挑取 Hungate 管内成功生长的 SRP 菌落, 接种至含有 9.5 mL 液体 M 培养基的厌氧管中进行培养; 此后, 重复滚管分离及液体转接培养等步骤 3-5 次, 期间通过显微镜观察结合 16S rRNA 基因测序结果确定菌株纯化效果。

纯菌株的基因组 DNA 提取参照试剂盒说明书完成。使用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因, PCR 扩增体系和条件参见文献[17]。获得 PCR 扩增产物后, 使用琼脂糖凝胶纯化试剂盒进行纯化, 再采用双酶切法(*Hae* III 和 *Msp* I)对扩增产物进行酶切分型。使用 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切产物, 不同的电泳谱带类型视为不同的 SRP “种”操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 取特定 OTU 所对应纯菌株的 PCR 产物进行测序, 测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。经去除载体序列等处理后, 采用 BLASTn 程序在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/)进行 16S rRNA 基因序列相似性比对分析, 同时将序列上传至 GenBank 数据库。根据比对结果, 选取 SRP 菌株的近缘序列并采用 MEGA X 软件的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树, Bootstrap 值设为 1 000。

1.2.2 特定 SRP 菌体细胞形态与代谢特性

通过扫描电镜观察优势 SRP 菌株细胞形态, 样品制备及电镜扫描方法参见文献[17]。SRP 菌株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。

参考《常见细菌鉴定手册》^[19]完成优势 SRP 菌株生理生化特性的评测。共评测 11 种碳源(唯一电子供体)的利用能力, 分别为乳酸钠、丙酸钠、乳糖、蔗糖、甘油、乙二醇、乙酸钠、果糖、丙酮酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖; 待评测的唯一电子受体分别为 Na₂SO₃、Na₂S₂O₃、单质硫。

考察优势 SRP 菌株在不同环境条件下的生长活性时, 共设 4 个温度梯度, 分别为 25、37、

45、60 °C；设 8 个 pH 梯度，分别为 3.0、5.0、6.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0；设 4 个盐度梯度，培养基中 NaCl 终浓度分别为 0.4%、1.0%、3.0%、5.0%，以考察菌株在不同盐度下产 H₂S 能力。所有接菌处理中，SRP 的接种量为 5%，另设不接菌的处理组作为阴性对照，每个试验组均设 3 个重复。除了温度影响试验外，培养瓶均置于 60 °C 条件下恒温、倒置、避光培养 30 d，每 10 d 用无菌注射器取样测定培养液中的 H₂S 浓度。

1.2.3 杀菌剂添加对优势 SRP 菌株产 H₂S 活性及数量的影响

为了评价杀菌剂对优势 SRP 菌株数量及产 H₂S 活性的影响，共选取 5 种化学杀菌剂进行试验，分别为戊二醛、次氯酸钠、苜基三甲基氯化铵(benzyl trimethyl ammoniumchloride, BTAC)、溴硝醇和四羟甲基硫酸磷(THPS)，其添加剂量见表 2。取优势 SRP 菌株对数生长期菌液 5.0 mL，转接至预装有 95.0 mL 液体 M 培养基的厌氧瓶中，然后使用无菌注射器向厌氧瓶内补加 1.0 mL 待评测杀菌剂溶液，使瓶内杀菌剂的终浓度达到表 2 所示的各浓度梯度。厌氧瓶培养及 H₂S 浓度测定同 1.2.2；另选取代表性试验组，测定特定时间节点水样中 SRP 数量。除杀菌剂添加试验组外，还设有不添加杀菌剂的阴性对照组，所有处理组均设置 3 个重复。

1.2.4 常规理化分析及统计学分析

采用亚甲基蓝分光光度法(GB 13801-1992)^[17]测定 H₂S 浓度；使用离子色谱法测定硫酸根含

表 2 抑制优势 SRP 菌株产 H₂S 活性的杀菌剂及添加剂量

Table 2 Biocides and the respective dosages used for inhibiting the H₂S-producing activity of the isolated predominant SRP strain

杀菌剂 Biocide	初始浓度 Initial concentration (mg/L)
戊二醛 Glutaraldehyde	0, 30, 50, 100
次氯酸钠 Sodium hypochlorite	0, 200, 400, 600
苜基三甲基氯化铵 BTAC	0, 200, 400, 600
溴硝醇 Bronopol	0, 10, 30, 50
四羟甲基硫酸磷 THPS	0, 30, 60, 120

量，色谱条件参见文献[17]。采用最大可能计数(most probable number, MPN)法测定采出水及各个实验组有关样品中 SRP 数量，每个稀释梯度设 5 个平行管。杀菌剂添加后，试验组与对照组间的差异通过重复测量单因素方差分析的方法进行检验，采用 SPSS 20.0 软件完成有关统计检验。

2 结果与分析

2.1 酸败油井采出水中的优势 SRP 菌

经过多轮次 Hungate 滚管法从采出水中分离得到了 42 株 SRP。基于 16S rRNA 基因的双酶切分型方法，共发现 2 种 OTU 类型(电泳结果未展示)，其中一种 OTU 类型包含 38 个菌株，为优势类群，另一种 OTU 仅包含 4 个菌株。此结果提示，从酸败油井采出水中筛选获得的 42 株硫酸盐还原菌可能仅分属两个不同的分类单元。从优势 OTU 类型对应菌株中挑取一株进行后续研究，其编号为 WJ₁。

2.2 菌株 WJ₁ 形态、系统发育地位及生理生化特点

优势 SRP 菌株 WJ₁ 细胞的扫描电镜照片如图 1 所示，该菌株细胞呈长杆状，菌体长度在 2.0–5.5 μm 之间。

菌株 WJ₁ 及其近缘菌种/株的系统发育树如图 2 所示。菌株 WJ₁ 的 16S rRNA 基因序列(登录号为 MK644261)与解糖泽恩根氏菌(*Soehngenia*

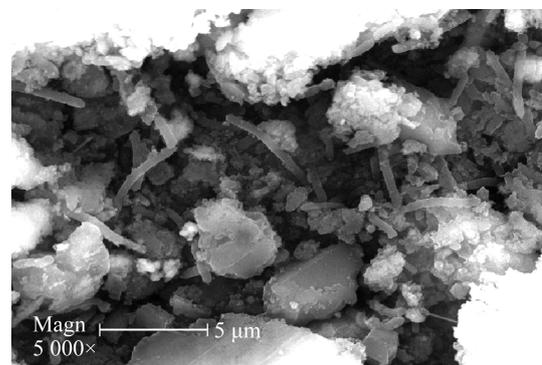


图 1 硫酸盐还原菌菌株 WJ₁ 形态的扫描电镜图

Figure 1 Scanning electron micrograph showing the morphology of strain WJ₁

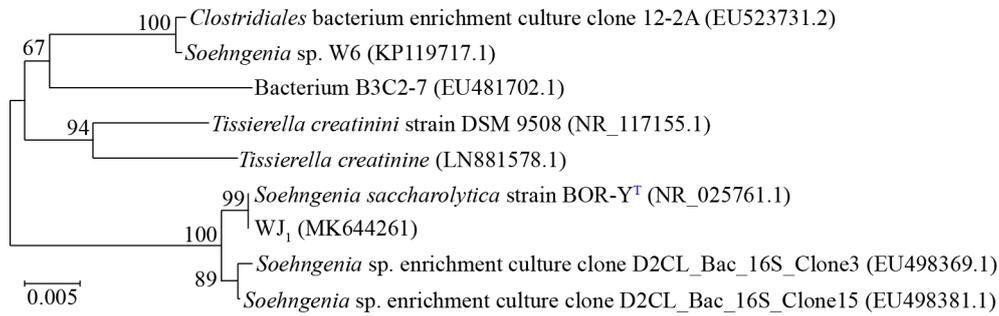


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 WJ₁ 及其近缘菌株的 Neighbor-Joining 系统发育树

Figure 2 Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic positions of strain WJ₁ and representatives of some other related taxa, based on 16S rRNA gene sequences

注: 分支节点数值为 Bootstrap 值(1 000 次重复的百分比); 标尺表示碱基替换率。

Note: The bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch nodes. Bar (0.005) shows the nucleotide substitution rate units.

saccharolytica)模式菌株 BOR-Y^{T[20]}的 16S rRNA 基因序列一致性最高, 达 99%, 提示两者系统发育的亲缘关系较近。

菌株 WJ₁ 生长代谢利用碳源、电子受体及部分生理生化特性如表 3 所示。该菌株能够利用除果糖外的所有碳源进行生长代谢并产生 H₂S, 最适碳源为丙酸钠; 除了硫酸盐之外, WJ₁ 还能分别利用 Na₂SO₃、Na₂S₂O₃ 为唯一电子受体产 H₂S, 但不能利用单质硫。菌株 WJ₁ 具有运动性, 不能够产生吲哚, 明胶液化阳性。此外, 菌株 WJ₁ 对氧气敏感, 为严格厌氧菌。

尽管 WJ₁ 与 *Soehngenia saccharolytica* BOR-Y^T 在 16S rRNA 基因序列上最相似, 但两者在碳源利用、电子受体利用及其他生理生化特性上的差异明显(表 3)。

2.3 温度、pH 及盐度对 WJ₁ 产 H₂S 活性的影响

菌株 WJ₁ 在不同环境条件下产 H₂S 的活性如图 3 所示。本文仅选取第 30 天的数据进行作图展示。菌株 WJ₁ 在 25–60 °C 范围内均能产生 H₂S (图 3A), 表明该菌可在较宽环境温度条件下生长。菌株在 37 °C 培养时产生 H₂S 的量最大, 提示 WJ₁ 的最适生长温度约为 37 °C; 而在 60 °C 培养时, 尽管 WJ₁ 生长相对缓慢, 但瓶内培养液中 H₂S 浓度仍能达到 37.3 mg/L, 表明菌株可以耐受 60 °C 高温条件。

表 3 菌株 WJ₁ 及其近缘种 *S. saccharolytica* 模式菌株 BOR-Y^{T[20]} 的基本生理生化特性对比

Table 3 Comparison of the basic physio-biochemical features of isolate WJ₁ and its closest relative *S. saccharolytica* type strain BOR-Y^{T[20]}

实验项目 Testing item	WJ1	BOR-Y
吲哚试验 Indole production	-	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis	-	+
运动性 Mobility	+	+
H ₂ S 生成 H ₂ S production	+	+
硫酸盐利用 Utilization of sulfate	+	-
亚硫酸盐利用 Utilization of sulfite	+	+
硫代硫酸盐利用 Utilization of thiosulfate	+	+
单质硫利用 Utilization of sulfur	-	-
耐氧性 Aerotolerance	-	+
葡萄糖 Glucose	+	+
甘油 Glycerol	+	-
乳糖 Lactose	+	-
蔗糖 Sucrose	+	+
乳酸盐 Lactate	+	-
乙酸盐 Acetate	+	-
丙酸钠 Propionate	++	-
乙二醇 Glycol	+	-
丙酮酸盐 Pyruvate	+	+
果糖 Fructose	-	ND
柠檬酸钠 Citrate	+	+

注: +: 阳性或能利用; -: 阴性或不利用; ND: 未检测; BOR-Y^T: *S. saccharolytica* 模式株。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; ND: Not determined; BYR-R^T: The type strain of *S. saccharolytica*.

在 pH 为 5.0–10.0 时, 菌株 WJ₁ 可生长且能产 H₂S (图 3B), 其最适 pH 约为 8.0; 当 pH 小于 3.0 或高于 11.0 时, WJ₁ 几乎不能产生 H₂S。当 NaCl 浓度为 0.4%–3% 时, WJ₁ 可生长并产 H₂S; 而 NaCl 浓度为 5% 时, 未检测到 H₂S 生成(图 3C)。

2.4 杀菌剂添加对 WJ₁ 产 H₂S 活性及菌体数量的影响

如图 4A 所示, 当瓶内添加的戊二醛浓度高于 30 mg/L 时, WJ₁ 在 30 d 的实验评价周期内不产 H₂S ($P < 0.01$), 该结果表明 WJ₁ 对戊二醛较为敏

感。对杀菌剂作用前后 WJ₁ 菌体数量的监测结果同时显示, 当 30 mg/L 的戊二醛与 WJ₁ 作用 24 h 后, 菌体数量由初始的 10⁶ MPN/mL 数量级水平降低至 10¹ MPN/mL (表 4)。这些结果提示戊二醛具有高效抑制 WJ₁ 引起的高温油田酸败的潜力。

尽管加入次氯酸钠后不同时间节点培养瓶内 H₂S 浓度值显著低于不添加杀菌剂的对照组数值 ($P < 0.05$), 但第 30 天时, 添加 200–600 mg/L 次氯酸钠的各处理组培养瓶内 H₂S 浓度均已达 80 mg/L 左右(图 4B); 与 600 mg/L 次氯酸钠接触 24 h 后,

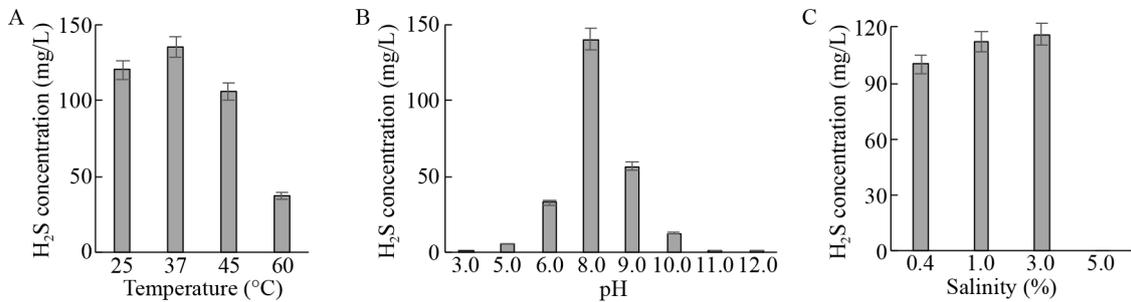


图 3 WJ₁ 在不同温度(A)、pH(B)及盐度(C)条件下产 H₂S 活性(第 30 天)

Figure 3 Sulfidogenic activity of strain WJ₁ under various conditions of temperature (A), pH (B), and salinity (C) (Day 30)

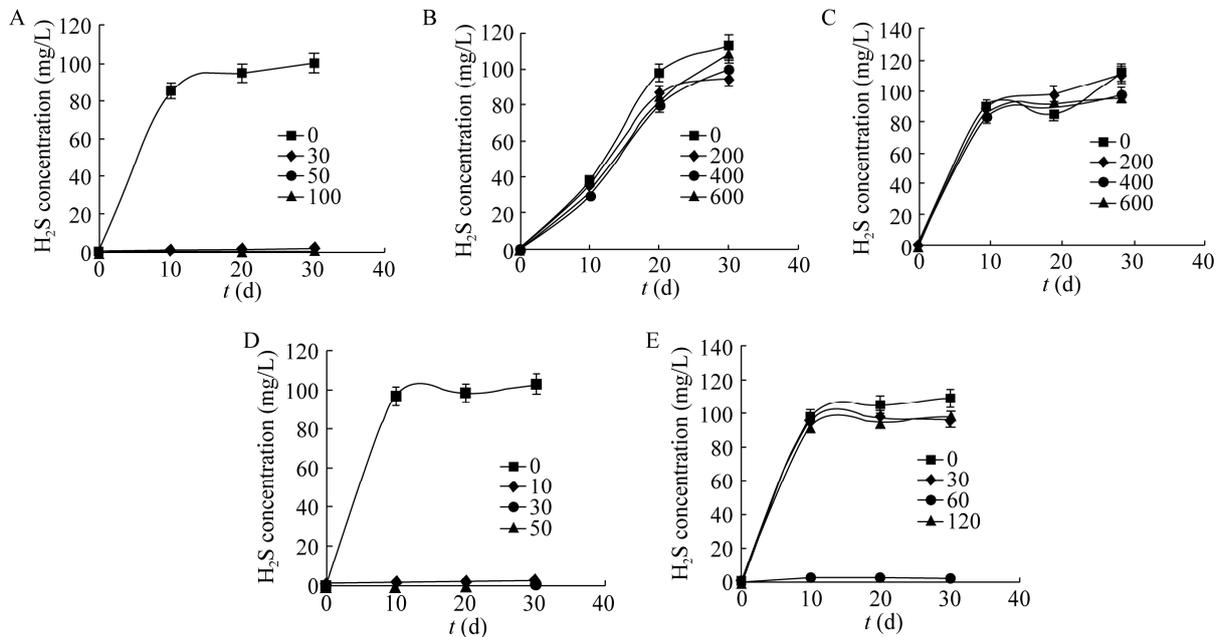


图 4 戊二醛(A)、次氯酸钠(B)、BTAC (C)、溴硝醇(D)及 THPS (E)对 WJ₁ 产 H₂S 活性的抑制效应

Figure 4 Inhibitory effects of glutaraldehyde (A), sodium hypochlorite (B), BTAC (C), bronopol (D), and THPS (E) on the sulfide production by strain WJ₁

表 4 杀菌剂对菌株 WJ₁ 数量的影响(时间点 24 h)
Table 4 Effects of selected concentration of biocides against the number of strain WJ₁ (time point 24 h)

杀菌剂 Biocides	使用前 Before (MPN/mL)	使用后 After (MPN/mL)
戊二醛 Glutaraldehyde (30 mg/L)	4.5×10 ⁶	8.0×10 ¹
次氯酸钠 Sodium hypochlorite (600 mg/L)	4.5×10 ⁶	3.0×10 ³
BTAC (600 mg/L)	4.5×10 ⁶	4.5×10 ²
溴硝醇 Bronopol (50 mg/L)	4.5×10 ⁶	0
THPS (120 mg/L)	4.5×10 ⁶	2.0×10 ¹

WJ₁ 微生物数量由初始的 10⁶ MPN/mL 数量级水平降低至 10³ MPN/mL (表 4)。该结果表明, 次氯酸钠无法有效抑制 WJ₁ 的产 H₂S 活性(图 4B)。

与次氯酸钠类似, 添加 BTAC 后, 培养瓶内杀菌剂初始浓度高达 600 mg/L 时 WJ₁ 仍能产生 70 mg/L 以上的 H₂S (图 4C)。第 30 天时, 尽管不同浓度的添加组瓶内 H₂S 浓度略低于对照组, 但差异不显著($P>0.1$)。与 600 mg/L BTAC 接触 24 h 后, WJ₁ 微生物数量由初始的 10⁶ MPN/mL 数量级水平降低至 10² MPN/mL (表 4)。

如图 4D 所示, 初始浓度为 10 mg/L 的溴硝醇在 30 d 内能显著抑制 WJ₁ 产生 H₂S ($P<0.01$); 50 mg/L 溴硝醇在 24 h 内的杀菌率达到 100% (表 4), 表明溴硝醇抑制 WJ₁ 产 H₂S 的效果较好。

添加 30–60 mg/L THPS 的处理组其 H₂S 浓度与对照无显著差异($P>0.1$), 第 30 天瓶内 H₂S 浓度高达 100 mg/L。当 THPS 初始浓度达到 120 mg/L 时, 菌株 WJ₁ 在 30 d 内不产 H₂S (图 4E)。使用 120 mg/L 的 THPS 在 24 h 内将 WJ₁ 数量从 10⁶ MPN/mL 数量级水平降低至 10¹ MPN/mL (表 4)。

3 讨论

SRP 生长繁殖和代谢产生 H₂S 被认为是导致油藏微生物酸败的根本原因^[3,7,9]。因此, 深入认识油藏环境中 SRP 的微生物学、生理学、生态学特点对于明确油藏酸败发生与发展的机制及研发有效的控制技术均具有重要意义。随着纯培养技

术的改进及 DNA 测序技术的飞速发展, 有关油藏环境中 SRP 的物种多样性、生理特性及活性抑制方面的研究逐渐增多^[2-3]。海域油藏环境中栖息着多种 SRP, 可能受油藏地质及环境异质性等因素(如油藏温度、原油组分、油田注水开发历史等)的影响, 不同油藏 SRP 的微生物多样性与生理活性等存在明显差异^[7,17]。本研究采用 Hungate 厌氧纯培养技术, 从渤海海域已经发生微生物酸败的高温油田某采出井的采出水样品中分离到了一株 SRP 菌株 WJ₁。该菌株可以作为进一步认识渤海海域高温油田微生物酸败发生机制、杀菌剂优选评价的菌种资源。尽管如此, 因受纯培养技术自身局限性的影响, 本研究获得的菌株 WJ₁ 及有关认知极有可能仅是对渤海海域高温油田 SRP 总体的“管中窥豹”。在后续的研究中, 仍有必要综合运用宏基因组学、宏转录组学等技术和方法获得该区域油田中 SRP 更全面和立体的科学认识。

3.1 WJ₁ 近缘种——解糖泽恩根氏菌 (*S. saccharolytica*) 生理活性的差异

菌株 WJ₁ 可耐受 60 °C 高温条件, 且在 pH 8.0、盐度(NaCl)小于 3% 的条件下生长良好并产生 H₂S。上述环境条件与油藏及采出水环境条件相似(表 1), 提示菌株对于海域高温油藏环境条件的良好适应性。另一方面, 菌株 WJ₁ 在 25–37 °C 生长良好(图 3A), 但不能在 65 °C 以上温度下生长(数据未展示), 提示该菌株可能并非油藏的原生菌群, 可能来自于海水环境而随注水过程进入油藏并定殖于此。

16S rRNA 基因序列比对结果显示, WJ₁ 与 *S. saccharolytica* BOR-Y^T 的序列一致性最高(99%), 但与油田环境中常见 SRP 种属(如 *Desulfovibrio vulgaris*) 的序列一致性较低(<90%)。该结果提示, 菌株 WJ₁ 与 *S. saccharolytica* 的亲缘关系可能更近。尽管如此, WJ₁ 表现出了耐高温、耐酸碱等生理特性, 这与 *S. saccharolytica* 模式菌株 BOR-Y^T 的差异明显: (1) WJ₁ 能够耐受 60 °C 的高温(图 2A), 而 BOR-Y^T 的最高耐受温度 40 °C;

(2) BOR-Y^T 适应的 pH 范围是 6.0–7.5, 最适 pH 为 7.0, 但 WJ₁ 能在 pH 为 5.0–10.0 的范围内生长及代谢(图 2B), 最适生长的 pH 值为 8.0; (3) WJ₁ 能够以硫酸盐为唯一电子受体进行厌氧呼吸产生 H₂S, 但是 BOR-Y^T 不能利用硫酸盐; WJ₁ 能够利用乙酸、丙酸为唯一碳源进行生长, 但是 BOR-Y^T 不能利用小分子的脂肪酸和乙酸盐^[20]。这些生理特性上的差异可能由于 WJ₁ 长期适应渤海海域油藏内高温厌氧高盐环境条件而导致。另一方面, 在未来的研究工作中, 非常有必要通过全基因组测序或者 DNA-DNA 杂交的方法进一步确定菌株 WJ₁ 的系统发育地位。

3.2 杀菌剂的剂量对于抑制硫酸盐还原菌代谢活性的差异

有研究显示, 当戊二醛浓度达到 500 mg/L 或者溴硝醇浓度达到 800 mg/L 时才能抑制加拿大 Coleville 油田中 SRP 的代谢活性^[21]。然而在本实验中, 添加低剂量的戊二醛(30 mg/L)、溴硝醇(10 mg/L)就能够高效抑制 SRP 产 H₂S 的活性。另有报道显示, 在印度 Kathloni 油田单独使用 25 mg/L 的次氯酸钠或苜基三甲基氯化铵(BTAC)在 2 h 内 SRP (初始数量达 10⁸ MPN/mL)的杀菌率可达 100%^[22]。但在本研究中, 即使次氯酸钠、BTAC 浓度高达 600 mg/L 仍无法有效抑制 WJ₁ 活性(虽然菌株 WJ₁ 的初始浓度为 10⁶ MPN/mL, 低 2 个数量级)。这些研究结果表明同一杀菌剂杀灭不同油田的 SRP 或抑制 SRP 产 H₂S 活性的效果存在明显差异。其原因可能与不同油田中 SRP 的多样性及组成、杀菌剂选择及应用历史、油藏水环境条件及开发方式等因素有关^[23]。这些结果从另一个角度说明, 控制油田 SRP 的危害, 有必要针对特定油藏的实际环境及 SRP 特点进行针对性的研发。本研究结果显示, 较低浓度的溴硝醇、戊二醛和 THPS 能够高效地抑制渤海海域高温油藏中优势 SRP 菌株产 H₂S 的活性(图 4), 大幅降低细菌数量(表 4), 这些杀菌剂在此区域油藏酸败控制中具有较好的应用潜力。需要注意的是, 有必要

通过小规模工业试验进一步评价杀菌剂的实际应用效力、经济性及对其他采油过程的影响。

4 结论

本研究采用纯培养技术从渤海湾某高温酸败采出井的采出水中筛选 SRP, 对优势菌株的形态特征、生理特征和系统发育地位进行了初步探讨, 并着重考察了不同杀菌剂对其产 H₂S 活性的抑制效果, 获得主要结论为:

(1) 渤海海域高温酸败油井采出水中优势 SRP 菌株 WJ₁ 的 16S rRNA 基因与解糖泽恩根氏菌 (*S. saccharolytica*) BOR-Y^T 序列一致性最高, 达 99%。

(2) WJ₁ 可在 25–45 °C、pH 8.0、盐度(NaCl) 小于 3% 的条件下生长良好, 产生 H₂S, 可耐受 60 °C 高温, 但在温度大于 65 °C、pH 小于 5.0 或大于 11.0、盐度大于 5% 条件下几乎不能生长; 除硫酸盐之外, 菌株 WJ₁ 可以利用亚硫酸盐、硫代硫酸盐分别作为唯一电子受体产生 H₂S。

(3) 单独添加浓度为 30 mg/L 的戊二醛、10 mg/L 的溴硝醇或 120 mg/L 的 THPS 可抑制初始细胞浓度为 10⁶ MPN/mL 的 WJ₁ 产 H₂S 活性达 30 d 以上。溴硝醇、戊二醛、THPS 是控制该酸败油井的潜在有效杀菌剂。

REFERENCES

- [1] Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(6): 441-454
- [2] Kamarisima, Miyanaga K, Tanji Y. The utilization of aromatic hydrocarbon by nitrate- and sulfate-reducing bacteria in single and multiple nitrate injection for souring control[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 143: 75-80
- [3] Hubert C, Voordouw G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(8): 2644-2652
- [4] Prajapat G, Rellegadla S, Jain S, et al. Reservoir souring control using benzalkonium chloride and nitrate in bioreactors simulating oil fields of western India[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 132:

- 30-39
- [5] Shen Y, Agrawal A, Suri NK, et al. Control of microbial sulfide production by limiting sulfate dispersal in a water-injected oil field[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 266: 14-19
- [6] Enning D, Venzlaff H, Garrelfs J, et al. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(7): 1772-1787
- [7] Gieg LM, Jack TR, Foght JM. Biological souring and mitigation in oil reservoirs[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(2): 263-282
- [8] Tsesmetzis N, Alsop EB, Vigneron A, et al. Microbial community analysis of three hydrocarbon reservoir cores provides valuable insights for the assessment of reservoir souring potential[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 126: 177-188
- [9] Tang K, Baskaran V, Nemati M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(1): 73-94
- [10] Kaster KM, 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): 235
- [11] Youssef N, Elshahed MS, Mcinerney MJ. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities[A]//Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM. *Advances in Applied Microbiology*[M]. Burlington: Academic Press, 2009: 141
- [12] Schwermer CU, Lavik G, Abed RMM, et al. Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for injection of seawater into oil fields[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(9): 2841-2851
- [13] Yang BC, Yang MT, Qi YF, et al. Development of new low-cost oil field fungicide. *China Petrochemistry*, 2016(24): 73-74 (in Chinese)
杨冰川, 杨美田, 齐元峰, 等. 新型低成本油田杀菌剂的研制[J]. *中国石油石化*, 2016(24): 73-74
- [14] Thauer RK, Stackebrandt E, Hamilton WA. Energy metabolism phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria[A]//Barton LL, Hamilton WA. *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 1
- [15] Xu J, Jia R, Yang DQ, et al. Effects of D-phenylalanine as a biocide enhancer of THPS against the microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel[J]. *Journal of Materials Science & Technology*, 2019, 35(1): 109-117
- [16] Deng YH, Xue YA, Yu S, et al. Shallow hydrocarbon migration and accumulation theory and discovery of giant oilfield group in Bohai Sea[J]. *Acta Petrolei Sinica*, 2017, 38(1): 1-8 (in Chinese)
邓运华, 薛永安, 于水, 等. 浅层油气运聚理论与渤海大油田群的发现[J]. *石油学报*, 2017, 38(1): 1-8
- [17] Yang CL, Yuan MY, Shi RJ, et al. 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[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4783-4792 (in Chinese)
杨春璐, 苑美玉, 史荣久, 等. 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[J]. *环境科学*, 2018, 39(10): 4783-4792
- [18] Miller TL, Wolin MJA. Serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes[J]. *Applied Microbiology*, 1974, 27(5): 985-987
- [19] Dong XZ, Cai MY. *Manual for Systematic Identification of Common Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2005 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*[M]. 北京: 科学出版社, 2005
- [20] Parshina SN, Kleerebezem R, Sanz JL, et al. *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(6): 1791-1799
- [21] Greene EA, Brunelle V, Jenneman GE, 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
- [22] Kaur G, Mandal AK, Nihlani MC, 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
- [23] 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