

⑧

397-402

硫酸盐还原菌生长规律的研究

张小里¹, 刘海洪¹, 陈开勋¹, 郭生武², 陈志昕²

(1. 西北大学 化学工程学系, 陕西 西安 710069; 2. 中国天然气总公司管材研究所, 陕西 西安 710065)

摘要: 通过对油田注水井中分离得到的 *D. desulfuricans* 的研究表明: 硫酸盐还原菌(SRB) 菌株不是严格的厌氧菌, 它能够耐受 4.5 mg/L 的环境溶解氧浓度, 但在 9.0 mg/L 的高溶解氧环境下不能生长; 当环境中 NaCl 浓度小于 0.818% 时, SRB 可正常生长, 浓度在 0.972%~2.228% 时, 只能在水下沉积物中生长, 大于 2.45% 时, 生长完全受到抑制; 当环境中 Fe²⁺ 浓度增大时, SRB 代谢活动更加旺盛, 生长高峰期延长, Fe²⁺ 限制 SRB 生长的浓度范围为小于 13~15 mg/L, 亚铁离子浓度高时, 对 SRB 生长无抑制作用; 厌氧环境下 SRB 生长的适宜 pH 为 6.5~7.5, 最佳 pH 为 7.5, pH 小于 5.5 或大于 8.0 时, SRB 不能生长, 有氧环境下 SRB 在 pH 8~8.5 时仍能生存乃至增殖。

关键词: 硫酸盐还原菌(SRB); 细胞培养; 细菌腐蚀; 油田注水

中图分类号: TE357.61 文献标识码: A 文章编号: 1000-274X(1999)05-0397-06

Q939.105
TQ172.7

生长规律

硫酸盐还原菌(简称 SRB) 对油田注水管的严重腐蚀是一个长期困扰世界各油田的难题, 至今尚无一个经济、高效、持久的方法。较常用的方法是投加各种杀菌剂, 但长期使用杀菌剂, SRB 普遍产生抗药性, 使得杀菌剂的投加量逐年增加, 成本上涨^[1]。为克服此弊, 寻找一条长期高效的抑菌途径实为必要, 我们由微生物与其周围环境中诸因素的密切关系出发, 针对 SRB 所在的注水中各种因素, 对其生长的影响进行了一系列的研究。从还原环境、碳源种类、不同电子受体以及 SO₄²⁻ 浓度对 SRB 的影响。本文通过 L₁₆(4⁴) 正交实验^[2] 及单因子实验探讨了环境中溶解氧量、Cl⁻、Fe²⁺ 浓度及 pH 与 SRB 生长的关系, 进一步增加人们对硫酸盐还原菌的认识, 通过注水水质指标控制以抑制 SRB 的生长, 为减缓井管腐蚀奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

SRB 脱硫弧菌属中的脱硫弧菌 (*D. desulfuricans*) 分离自油田注水水样。

1.2 培养基

KH₂PO₄ 0.5 g/L; NH₄Cl 1.0 g/L; Na₂SO₄ 4.5 g/L; CaCl₂ 0.06 g/L; MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g/L; 酵母膏 1.0 g/L; FeSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L; 乳酸钠 3 mL/L; 抗坏血酸 0.2 g/L (单独灭菌), pH 7.2, 121 C 蒸汽灭菌 20 min, 恒温 37 C 培养, 上部以液体石蜡密封隔氧。

1.3 计数方法

美国石油协会推荐的“三管平行绝迹稀释法”。

1.4 实验设计方法

1.4.1 单因子实验 在保持培养基其他成分不变的情况下, 改变所考察因子对应成分的含量, 进行静态试管培养计数。

1.4.2 正交实验 正交设计实验因素及水平见表 1。

以溶解氧相同的实验组号将 16 组实验分 4 批完成, 分别是第 1 批 1, 7, 12, 14, 第 2 批 2, 8, 11, 13; 第 3 批 3, 5, 10, 16; 第 4 批 4, 6, 9, 15。实验管为一 φ50 mm / 300 mm 玻璃管, 距瓶底 100 mm 处有一取样口, 底部放一磁转子用以混合菌液。进行每批实验时分别将灭菌后的 4 组培养基 299.5 mL 加入于

收稿日期: 1998-10-12

基金项目: 石油天然气总公司合作项目(96F.421)

作者简介: 张小里(1962-), 男, 陕西澄城人, 西北大学化工系副教授, 从事生物化工研究。

热灭菌后的实验管,接种 15.5 mL 菌液,接通气路,调节各管口放气阀,使每个管中气体流量相同,依插在其中一管的溶氧探头测定溶解氧浓度(DO),并调节气路总阀,使溶氧值在设定值附近基本保持稳定,每隔 2 d 取样测定管中 SRB 数量及 Fe^{2+} , Fe^{3+} , pH

变化情况。10 d 后结束实验,并测定挂片腐蚀速率,及做挂片菌量计数。正交实验结果依极差表进行分析,表中数据为对应的因子在该水平的 4 组实验 SRB 细胞数对数值的和,由数值大小判断各个因子水平影响的强弱趋势。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Factor and levels

因素代号	因素	水平 I	水平 II	水平 III	水平 IV
A	$Fe^{2+}/mg \cdot L^{-1}$	0.5	5	50	100
B	$Cl^{-}/mg \cdot L^{-1}$	50	500	2 000	5 000
C	pH	5	6.5	8	9.5
D	$O_2/mg \cdot L^{-1}$	0	3.0	9.0	4.5

表 2 4 因子对 SRB 生长影响的极差分析

Tab. 2 Polar difference analysis on growth of SRB

水平	因素			
	A	B	C	D
I	13.05	10.63	10.05	14.01
II	3.63	6.37	9.19	9.43
III	2.98	6.77	3.36	0
IV	7.35	3.05	3.96	3.40

2.1 溶解氧量对 SRB 生长的影响

生物学界一直将 SRB 归入严格的厌氧菌^[3],近期一些研究表明 SRB 能在有氧环境下存活,甚至利用分子氧。但是,SRB 耐氧限值还未见报道,实验结果显示,从油井管材中分离的 SRB 当溶解氧为 3.0 mg/L 时,菌数平稳地维持在 $10^1 \sim 10^4$ 个/mL 数量级;溶解氧 4.5 mg/L 时,也有一组 SRB 数量达到了 10^3 个/mL,但过高浓度的溶解氧(9.0 mg/L) SRB 不能生存。

据报道^[4]中原油田文-联污水处理站原油脱出

水水质溶解氧为 0.2~3 mg/L,SRB 数量大于 10^3 个/mL。其胡林水厂水质监测数据中溶解氧为 5.0 mg/L,SRB 达到 100 个/mL,与实验结果非常一致。究其原因有以下两点:

(1)SRB 胞内含有抗分子氧的保护酶。据文献报道^[5]脱硫弧菌属(*Desulfovibro*)中的很多种菌都具有超氧化物歧化酶(superoxide-dismutase)、NADH 氧化酶(NADH oxidase)、过氧化氢酶(catalase),这些酶都是细胞氧化还原过程中间步骤的参与者。过程末端的氧化还原酶近来也从该属中的巨大脱硫弧菌(*D. gigas*)中被分离提纯。*desulfuricans*中也含有红素还原酶,类似的氧利用途径可能同样存在于该种菌胞内。这一途径不同于好氧微生物氧代谢途径,只有在氧浓度较低时才可利用,SRB 获取能量的主要途径仍是硫酸盐异化还原过程。然而, SO_4^{2-} 还原反应必须在较低的环境还原电位下进行^[6],较高的氧浓度导致环境中还原电位过高,SRB 异化硫酸盐还原受阻,SRB 生长受到抑制。

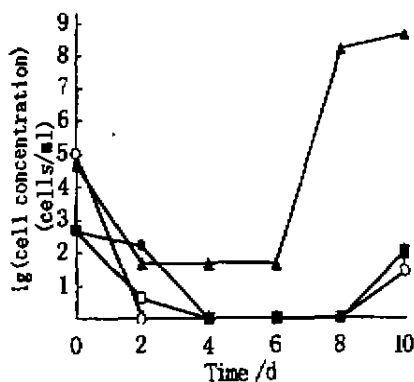


图 1 溶解氧 0 mg/L 培养条件 SRB 的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of SRB in media with 0 mg/L oxygen content

1 组(▲), 7 组(□), 12 组(○), 14 组(●)

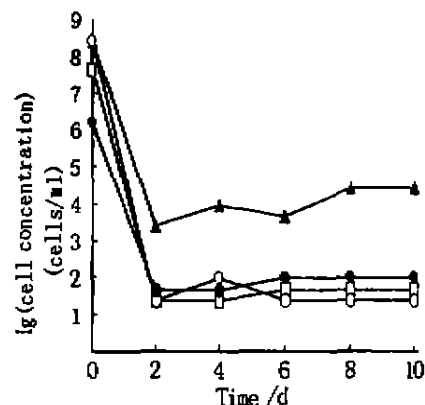


图 2 溶解氧 3.0 mg/L 培养条件 SRB 的生长曲线

Fig. 2 The growth curves of in media with 3.0 mg/L oxygen content

2 组(▲), 8 组(□), 11 组(○), 13 组(●)

(2)SRB 利用沉积物或钢铁表面营造局部厌氧小环境^[7]。自然环境下 SRB 可与需氧菌构成共生体系,在各种菌共同作用形成的生物膜的底层无氧区中,SRB 大量生存繁殖并扩散入液相,从而显示能够耐受一定的外界溶解氧。实验中由于注入气体的

不断搅动,培养管中培养基混合均匀,基本不存在死区,而且无共生菌,加之培养时间较短,从试片表面细菌计数结果看,可以排除 SRB 营造厌氧小环境而显示耐氧假象的可能性。

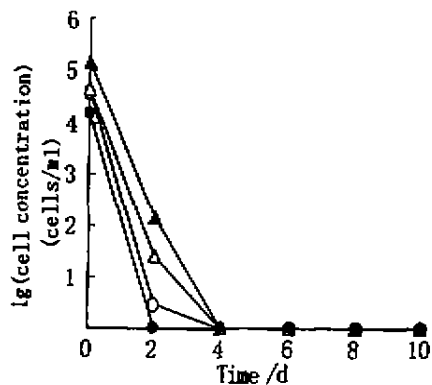


图 3 溶解氧 9.0 mg/L 培养条件 SRB 的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of SRB in media with 9.0 mg/L oxygen content
3组(▲),5组(□),10组(○),16组(●)

由此可以得出结论,*D. desulfuricans* 为兼性厌氧菌,可耐受 4.5 mg/L 的水中溶解氧含量。故可推断油田系统以往采用的短时暴氧法难以杀灭水中的 SRB。据油田现场报道^[8],注水中溶解氧为 3.08 mg/L 时,所引起的井下挂片平均腐蚀速率已经高达 0.688 mm/a,最大点腐蚀速率高达 4.745 mm/a,从而必须进行注水脱氧处理。由此,希望控制一定的注水溶解氧含量,既起到杀灭 SRB 又不致引起井下管壁严重的氧腐蚀难以施行,可考虑将注水先混合空气饱和溶解氧前处理,杀灭其中全部 SRB 后再脱氧注井。这样,杀菌和防腐的目的可望同时实现。

2.2 NaCl 浓度对 SRB 生长的影响

盐对细菌的影响是通过水中渗透压变化影响细菌物质运输过程。盐浓度过高会引起细胞质壁分离,造成细胞脱水死亡^[9]。由正交实验结果知,随着培养基中 NaCl 浓度增大,SRB 菌株的生长受到抑制。单因子实验结果见图 5。又当 NaCl 浓度为 9.72 g/L,13.0 g/L,16.26 g/L,22.8 g/L 时,SRB 生长实验,未做过程计数,初始接种浓度为 1.5×10^5 个/mL,观察试管中颜色变化,20 d 中各管中液相均未出现混黑现象,管底部沉积相中颜色浅黑,与液相接触处浅白,分别做管中液相及沉积相显微镜观察,液相中无 SRB,沉积相中则有少量 SRB,估计数量在 10^3 个/mL,这是由于沉积相对盐分子扩散具有屏障

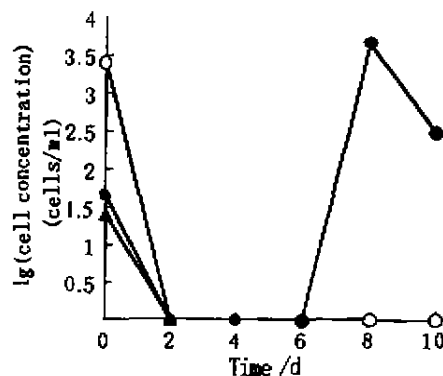


图 4 溶解氧 4.5 mg/L 培养条件 SRB 的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of in media with 4.5 mg/L oxygen content
4,6组(▲),11组(○),13组(●)

作用,微环境中的盐浓度适合 SRB 的生长。

由上述实验结果可见,环境中 NaCl 浓度小于 0.818% 时,SRB 可以正常生长;浓度在 0.972%~2.28% 时,只能在水下沉积相中生长;大于 2.45% 时,生长完全受到抑制。

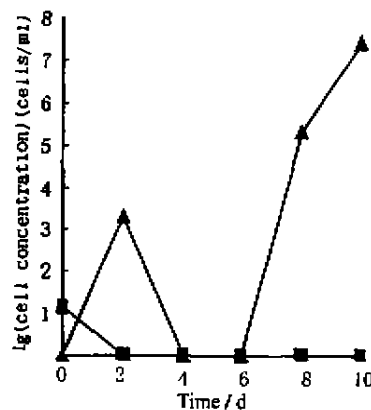


图 5 NaCl 浓度对 SRB 生长的影响

Fig. 5 Effect of NaCl concentration on *D. desulfuricans* growth

(▲)8.18 g/L,(■)24.54 g/L,(□)40.90 g/L,(○)57.25 g/L,80.7 g/L

2.3 Fe²⁺ 对 SRB 生长的影响

Fe²⁺ 是 SRB 细胞中各种酶如细胞色素 C₃(Cytochrome C₃)、铁还原酶(Ferredoxin)、红素还原酶(Rubredoxin)、过氧化氢酶等的活性基成分^[4],故 Fe²⁺ 浓度有可能成为影响 SRB 生长的因素。在正交

实验中,由于培养基中的 Fe^{2+} 浓度受挂片腐蚀溶铁及氧气氧化变价的影响,培养过程的实际 Fe^{2+} 浓度与初始设计值有较大差别,极差的分析结果不能用于推测 Fe^{2+} 对 SRB 的影响。单因子实验结果如图 6,表 3 所示。由此可得出以下结论:

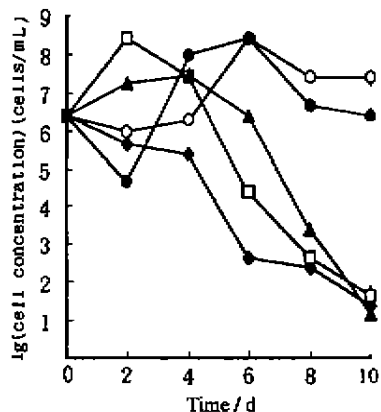


图 6 不同 Fe^{2+} 浓度下 SRB 的生长曲线

Fig. 6 Cell concentrations of SRB versus time in media with different Fe^{2+} concentration
(◆)1, (□)2, (▲)3, (○)4, (●)5

(1)环境中 Fe^{2+} 浓度增大,SRB 的代谢活动更为旺盛,生长高峰期延长。

(2) Fe^{3+} 在各组实验中均出现被还原为 Fe^{2+} 的现象。这一方面由于 SRB 菌株可以利用 Fe^{3+} 作为电子受体,替代 SO_4^{2-} 接受电子,本身被还原^[10]。另一方面,也有 SRB 代谢产生的 H_2S 与其发生氧化还原反应的可能性。 Fe^{3+} 虽可作为 SRB 的电子受体,但

实验中 SRB 的主要电子受体 SO_4^{2-} 含量充足,而 Fe^{3+} 含量很少,且 Fe^{3+} 接受电子的能力逊于 SO_4^{2-} ^[10],因而实验中 Fe^{3+} 作为电子受体对 SRB 生长的影响可忽略不计。外部 Fe^{3+} 可以转化为 Fe^{2+} ,同时细胞内部 Fe^{2+} 作为酶的活性基成分也是通过自身价态相互转化 $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$ 而实现所在酶传递电子的作用^[4], Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 作用相同,因而下文将 Fe^{3+} 作为 Fe^{2+} ,合并讨论。

(3)由 4,5 组 SRB 第 10 d 仍处于 10^6 个/mL,保持混黑与较高的 H_2S 浓度数天,判断 1,2,3 组 SRB 的衰老不是由于碳源耗尽或是 H_2S 的毒杀作用。比较可知,第 1,2 组后期应有足够的碳源剩余,而第 2 组后期的 Fe^{2+} , Fe^{3+} 含量与第 1 组初期十分接近但 SRB 依旧衰亡,由此推测第 1,2 组前期 SRB 的增殖可能是由于接入的 SRB 胞内储积有足够的 Fe^{2+} 的作用。由第 3 组 SRB 生长曲线及 Fe^{2+} 变化趋势估计 Fe^{2+} 限制 SRB 生长的浓度下限在 13~15 mg/L 左右。第 4 组实验第 8 d,10 d Fe^{2+} 浓度分别为 17.68 mg/L,16.32 mg/L,SRB 菌浓度平稳在 107 个/mL,它在一定程度上验证了这一结论。

(4)由溶解氧为 3.0 mg/L 时的正交实验 4 组 SRB 生长曲线,高浓度的铁离子含量对 SRB 无底物抑制现象。又如,第 13 组实验中的 Fe^{3+} 浓度高达 150 mg/L 以上,SRB 菌量仍数天保持在 10^2 个/mL。

表 3 Fe 离子浓度随时间的变化

Tab. 3 Fe ion concentration versus in media

培养时间/d 实验号	0		2		4		6		8		10	
	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}
1	1.36	1.90	2.17	0.82	2.17	0	1.08	0.55	1.08	1.08	1.08	1.08
2	2.72	4.90	2.17	0.55	3.26	0.54	3.80	0	1.08	1.91	1.63	1.36
3	6.8	9.52	6.53	8.70	8.43	4.00	7.6	4.46	3.80	8.16	8.69	1.63
4	16.32	12.51	7.88	12.79	7.06	18.32	11.96	13.61	6.5	11.12	14.69	1.63
5	34.0	10.4	23.12	19.04	17.68	23.58	25.03	25.29	20.07	17.5	32.6	18.6

2.4 pH 对 SRB 生长的影响

pH 影响微生物的活动是由于氢离子与细胞膜中的酶相互作用的结果,同时也影响细胞壁上的酶活性。合适的 pH 环境对微生物而言是必须的^[9]。正交实验过程中,各组实验的培养基均出现 pH 升高现象。其原因是由于挂片发生电化学腐蚀反应,产生的 OH^- 或消耗 H^+ 使得培养基 pH 升高,起始的 pH 设定值发生变化,不能用极差分析表进行判断。单因子实验结果如表 4。

表 4 pH 单因子实验中 pH 随时间的变化

Tab. 4 pH Versus time in pH single-factor experiment

培养时间/d	0	2	4	6	8	10
1	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
2	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
3	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
5	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

在实验过程中 pH 保持得非常稳定,满足单因子实验要求,结合正交实验记录得出如下结论。

(1)SRB 在 pH6.5~7.5 可以良好地生长,尤以 7.5 处 SRB 数量峰值达到了 10^5 个/mL,可以判断 SRB 最佳 pH 应在 7.5 左右。据报道^[1],*D. desulfuricans* 酸性(5.9)至中性(7.0)环境中可调节细胞内外 pH 差值,使胞内的 pH 稳定在 7.1~7.5,这也证实了上述结果。

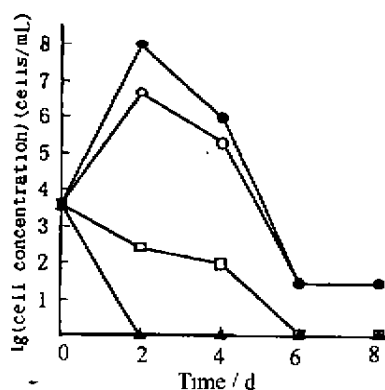


图 7 不同初始 pH 下的 SRB 生长曲线

Fig. 7 pH Versus time in pH single-factor experiment

1,5(▲),2(□),3(○),4(●)

(2)SRB 不能在 pH 小于 5.5 的环境下生存。1969 年 Tuttle 等也报道过分离自酸性矿区水中的 SRB 脱硫弧菌属 (*Desulfotomobacter*) 种在 pH 低于 5.5

的环境不能异化硫酸盐。

(3)缺氧状态时 SRB 不能在 pH 大于 8.0 的环境生存,而在有氧环境中。比如,在正交实验第 2 组、第 13 组、第 15 组中,SRB 在 pH 为 8,8.5 时仍能生存乃至增殖,其中原因尚不清楚,有待进一步研究。

3 结 论

(1)SRB 不是严格的厌氧菌,应归类于兼性厌氧菌。SRB 能耐受 4.5 mg/L 的环境溶解氧量,但在高的溶解氧条件下不能生存。油田系统以往采用的短时暴氧无法杀 SRB。

(2)当环境中 NaCl 含量小于 0.818% 时,SRB 菌株可正常生长,含量在 0.972%~2.28% 时,可在沉积相中生长,大于 2.45% 时,SRB 生长完全受到抑制。

(3)在环境中 Fe^{2+} 浓度增大,SRB 代谢活动旺盛,生长高峰期延长, Fe^{2+} 限制 SRB 生长的浓度下限在 13~15 mg/L。很高的铁离子含量对 SRB 生长无抑制作用。

(4)厌氧环境下 SRB 生长的 pH 区间为 6.5~7.5,pH 在 7.5 左右为其生长的最佳 pH 条件,小于 5.5 或大于 8.0 时,SRB 均不能生长;在有氧环境下,SRB 在 8~8.5 时,家仍能生存,乃至增殖。

参考文献:

- [1] 刘鹤霞,赵景茂. CT10-1 新型杀菌剂的研究与应用[J]. 腐蚀与防护, 1990(6):315-317.
- [2] 上海市科学技术交流站组编. 正交实验设计法[M]. 上海:上海人民出版社,1975. 218.
- [3] [日]微生物研究讨论会编. 微生物学实验方法[M]. 程光胜,李玲阁,张启先等译. 北京:科学出版社, 1983,273.
- [4] 方 浩. 中原油田污水处理中化学药剂的应用[J]. 油田化学, 1988,5(4):268-273.
- [5] Liang Chen, Liu Ming-Y, Jean Le Gall. Characterization of Electron Transfer Proteins[M]. New York; Larry L. Barton. Plenum Press, 1995.
- [6] Erko Stackebrandt, David A Stahl, Richard Devereux. Taxonomic Relationships[C]. In: Larry L Barton. Sulfate-Reducing Bacteria[M]. New York; Plenum Press, 1995.
- [7] 唐和清. 微生物腐蚀中游离氧的作用[J]. 材料保护, 1992,25(4):24-29.
- [8] 马永强. 油田注入水的化学除氧[J]. 油田化学, 1989,6(4):214.
- [9] 俞大铨. 微生物学[M]. 北京:科学出版社, 1985.
- [10] 樊毓斐. 硫酸盐还原菌生长规律及石油管材微生物腐蚀防护的研究[D]. 西安:西北大学化学工程学系, 1998, 6.
- [11] Gibson G R. Physiology and ecology of the sulfate-reducing bacteria[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1990, 69: 769-797.

(编辑 时亚丽)

The study of growing regulation of sulfate-reducing bacteria

ZHANG Xiao-li¹, LIU Hai-hong¹, CHEN Kai-xun¹,
GUO Sheng-wu², CHEN Zhi-xin²

(1. Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Tubler Goods Research Center, Xi'an 710065, China)

Abstract: *D. desulfuricans* screened from oil flooding water were studied, the results showed: (1) The SRB strain had the ability of oxygen-resisting about 4.5 mg/L dissolved oxygen concentration, but can't grow with 9.0 mg/L dissolved oxygen concentration, it was not obligate anaerobes but annex anaerobes; (2) It can grow both in liquid and deposit while NaCl content was below 0.818%, and can grow only in deposit from 0.972 to 2.28%, and can't grow when NaCl content was over 2.45%; (3) The increasing of Fe²⁺ concentration was better for the SRB growing, and it can't grow when Fe²⁺ concentration was below 13~15 mg/L; high iron ion content has no depressing effect on SRB; (4) In anoxic condition its appropriate growing pH range was between 6.5~7.5, and about 7.5 was its optimum pH value. In oxygenic condition the SRB can also grow between 8.0~8.5.

Key words: Sulfate-reducing bacteria (SRB); culture of SRB; microbial corrosion; oil well flooding water

(上接第 396 页)

[2] 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院. 酿造酒工艺学[M]. 北京: 轻工业出版社, 1992. 94.

[3] 管教仪. 啤酒工业手册[Z]. 北京: 轻工业出版社, 1986. 454.

(编辑 时亚丽)

The lab simulation of the industrial wort fermentation in beer-brewing

I. Heat effect monitoring and following of the wort fermentation process

DONG Sui-ming, ZHAO Hong-an, ZHONG Guang-xue, SHEN Jie-ru

(Institute of Analytical Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: A DDC- I type Digital compensation calorimetric system with the specially designed calorimetric vessel (see pt. I) was used in the simulation experiments of the industrial wort fermentation through heat compensation. Heat effects during the fermentation process were continually and automatically monitored and recorded, and the total heat effects were calculated from the thermograms at regular time intervals. Analogous fermentations were carried out with glucose solutions at the same sugar concentration as that of the wort; and a comparison of their thermograms gave, from the angle of heat monitoring, a verification of the reported mechanism of wort fermentation. conditional tests for wort fermentation were made with the same calorimetric procedures by changing temperatures, sources of yeast solutions, etc, that was known as the dominating factors. To test the agitation effect, experiments were also conducted by bubbling gas through the liquid media at the selected gas flow rates (see pt. I) and valuable results were obtained.

Key words: wort fermentation; beer-brewing compensation calorimeter; lab simulation of industrial fermentation process