

胜利油田外排水中铁细菌主要类群的检测及群落结构分析^{*}

赵桂芳 吴晓磊^{**} 曾景海 李佳 钱易

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点实验室 环境生物技术中心 北京 100084)

摘要 根据油田外排水中常见铁细菌的 16S rRNA 特异性保守序列,设计和合成了 4 种荧光探针,利用荧光原位杂交方法,分别利用它们对胜利油田孤岛采油厂、胜利采油厂 1 号和 2 号综合处理站外排水中存在的铁细菌的种类和数量进行检测,分析了各外排水中铁细菌的群落结构.结果表明,利用基因探针能快速对胜利油田外排水中的铁细菌进行检测:在孤岛采油厂、胜利采油厂 1 号和 2 号综合处理站的外排水中,利用 4 种探针的组合探针检测到的铁细菌细胞数量分别占样品中微生物总细胞数量的 11.0%、12.8% 和 9.0%,其中 *Leptothrix* 和 *Sphaerotilus*,以及 *Leptospirillum ferriphilum* 为胜利油田外排水中的 3 种优势铁细菌,分别占水样中总微生物细胞数的 $2.94\% \pm 0.52\% \sim 3.39\% \pm 0.52\%$ 和 $2.24\% \pm 0.16\% \sim 2.63\% \pm 0.49\%$;而 *Leptospirillum ferrooxidans* 和 *Acidithiobacillus* spp. 的种群则较小. 3 个污水处理站中铁细菌群落结构差异较大,而多样性相差不大.利用 4 种探针的各种组合对外排水中铁细菌的检测表明,单探针能够很好地分析外排水中铁细菌的群落结构,而组合探针能快速、较准确地检测外排水中铁细菌的数量,比传统的绝迹稀释法具有快速、准确、直观等优点.图 1 表 5 参 14

关键词 荧光原位杂交 (FISH); 铁细菌; 基因探针; 群落结构; 绝迹稀释法

CLC Q939.141.081 ◇ X741

Community Structure of Iron Bacteria in Wastewater from the Shengli Oil Field^{*}

ZHAO Guifang, WU Xiaolei^{**}, ZENG Jinghai, LI Jia & QIAN Yi

(Center for Environmental Biotechnology, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Fluorescence in situ hybridization (FISH) with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes was applied for analyzing the community of iron bacteria in wastewater from the Shengli Oil Field. Four 16S rRNA probes were designed, which were highly specific to iron bacteria *Leptothrix*, *Sphaerotilus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus* spp. In the water samples from Gudao, and No. 1 and 2 wastewater stations of the Shengli Oil Field, the ratios of amount of iron bacterial cells to total microbial cells, detected by the combination of the 4 probes and DAPI staining, were 11.0%, 12.8% and 9.0%, respectively. In the iron bacterial community, *Leptothrix*, *Sphaerotilus* and *L. ferriphilum* were dominant in the 3 stations, and *Leptothrix* and *Sphaerotilus*, and *L. ferriphilum* cells to accounted for $2.94\% \pm 0.52\% \sim 3.39\% \pm 0.52\%$ and $2.24\% \pm 0.16\% \sim 2.63\% \pm 0.49\%$ of the total microbial cells, respectively, while *L. ferrooxidans* and *Acidithiobacillus* spp. were smaller populations. In addition, the structure of the iron bacterial community was different among the three wastewater stations although the biodiversity of the iron bacteria was similar. Fig. 1, Tab. 5, Ref. 14

Keywords FISH; iron bacteria; gene probe; microbial community; dilution-to-extinction method

CLC Q939.141.081 : X741

铁氧化细菌 (iron-oxidizing bacteria), 又称铁细菌 (iron bacteria), 是一种好气微生物, 存在于含有氧和铁的环境, 能利用将亚铁催化氧化成高价化合物的反应释放的能量来满足其生命活动需要, 并把铁和 (或) 锰氧化物沉积在菌体荚膜内、鞘

内或细胞外分泌物上^[1]. 铁细菌在油田工业中存在许多危害, 如加速管道的腐蚀, 造成输水设备和管线以及回注时地层的堵塞等, 所以在油田对回注水和外排水进行处理时, 铁细菌数量是一项严格控制的指标, 通常需要加入杀菌剂来控制铁细菌的繁殖和数量. 要对铁细菌进行严格控制, 就要 1) 准确了解铁细菌的群落结构, 并且根据铁细菌群落组成来针对性地选择杀菌剂和优化杀菌工艺; 2) 对铁细菌进行快速检测, 以便及时了解水体中铁细菌的数量, 调查铁细菌的控制效果, 通过调整处理工艺, 从而有效地控制铁细菌的生长和繁殖, 避免或减少铁细菌的危害.

收稿日期: 2005-06-13 接收日期: 2005-07-27

^{*} 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, No. 2005CB221308) 和国家自然科学基金项目 (No. 30300008) 资助. Supported by the State Key Basic R & D Program of China (No. 2005CB221308) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30300008)

^{**} 通讯作者 Corresponding author (E-mail: xiaolei_wu@tsinghua.edu.cn)

目前,石油天然气行业广泛采用的铁细菌检测标准方法——绝迹稀释法是最大可能数法的一种,其原理是将水样逐级稀释,注入到测试瓶中进行接种,在恒温下培养 7~14 d,根据阳性反应和稀释倍数,计算水样中铁细菌的数目^[2]。铁细菌是能够将亚铁氧化为高铁的好氧、自养菌的通称,种类很多,目前已知的就有 40 多种。在分类学上,油田中通常出现的铁细菌有纤发菌属 (*Leptothrix*)、球衣菌属 (*Sphaerotilus*)、盖氏铁柄杆菌属 (*Gallionella*)、铁细菌属 (*Crenothrix*)及鞘铁细菌 (*Siderocapsa*)等。绝迹稀释法利用培养的手段,根据对亚铁氧化反应来检测铁细菌是否存在及其可能的数量,这种方法具有以下缺点:1) 该方法实际是检测亚铁氧化反应发生次数和程度,从而间接检测水样中铁细菌的存在和数量,而无法对水样中铁细菌的种类进行分别,所以也就无法解析油田水中铁细菌的群落结构;2) 该方法耗时长,需要 1~2 wk 时间,所检测的结果无法及时反映生产实际发生的情况,也就无法指导对水处理工艺进行的调整;3) 由于自然界中只有少数微生物能够在标准实验室条件下被培养^[3],利用绝迹稀释法无法培养外排水中所有的能够将亚铁进行氧化的铁细菌。与绝迹稀释法相比,荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 不依赖于对微生物进行培养,而直接以微生物 rRNA 中高度保守、具有物种特异性的片断序列作为鉴别微生物的标志;设计和选择特异性探针以及荧光标记物质,通过探针与目标微生物 rRNA 特异性片断进行杂交反应使目标微生物特异性地带带有荧光标记,利用显微观察和计数技术,快速、直观、准确地检测目标微生物在水样中的存在、数量和分布。利用多种特异性探针来解析环境样品中微生物的群落结构和生物多样性,了解环境中优势微生物的种类、数量和分布^[4],从而可以根据对优势微生物

种群的作用来促进、抑制和调控环境中微生物群落,达到指导生产的目的。FISH 方法的这些优势使其成为了微生物生态学和环境微生物学中的重要技术手段,在海水沉积物、海水、河水、高山湖雪水、土壤和根系表面^[5~10]等自然环境,以及反应体系^[11, 12]中的微生物群落方面得到了广泛的运用。

前人利用 FISH 法检测铁细菌的工作都是利用单一探针针对水样中某些单个或者少数种群的铁细菌来进行的,而很少进行油田外排水铁细菌群落结构分析。为了快速、准确、简便地检测外排水中的铁细菌,分析其群落结构,本研究运用 FISH 技术对胜利油田外排水中的铁细菌进行全面检测,分析其群落结构和多样性,了解其中的优势菌群;定量分析其中铁细菌的数量,并与绝迹稀释法对铁细菌的检测结果进行比较,探索利用 FISH 方法检测油田外排水中铁细菌的可行性。

1 试验材料和方法

1.1 探针设计

油田中常见的铁细菌种类有纤发菌属 (*Leptothrix*)、球衣菌属 (*Sphaerotilus*)、盖氏铁柄杆菌属 (*Gallionella*)、铁细菌属 (*Crenothrix*)及鞘铁细菌 (*Siderocapsa*),其中以纤毛菌属 (*Leptothrix*)和球衣菌属 (*Sphaerotilus*)分布最为广泛,数量最多,生态意义最大^[13]。

对胜利油田外排水前期初步试验结果表明, *Leptospirillum* 在胜利油田外排水中是比较普遍的种群,同时根据 Siering 等^[13]和 Straub 等^[14]的工作共选用和设计了 4 条分别针对 *Leptothrix*、*Sphaerotilus*、*Acidithiobacillus* 和钩端螺菌 (*Leptospirillum*)进行检测的特异性探针,如表 1 所示。

表 1 检测铁细菌的特异性探针

Table 1 Specific 16S rRNA probes for iron bacteria

Probe	Specificity	Sequence	References
Probe 1	<i>Leptothrix</i> and <i>Sphaerotilus</i>	5'-ACGGUAGAGGAGCAAU-3'	[13]
Probe 2	<i>L. ferrooxidans</i>	5'-CCAGCCTGCCAGTCTCT-3'	[14]
Probe 3	<i>L. ferrophilum</i>	5'-TTGCCCCCTTTCGAG-3'	[14]
Probe 4	<i>Acidithiobacillus</i>	5'-GTCAA (C, T) AGCA (G, A) T (C, T) GTAT-3'	[13]

其中探针 4 根据文献^[13]进行综合设计而成。根据上述设计的探针序列选用 TET 荧光素,委托上海基康公司合成铁细菌的 16S rRNA 探针。

1.2 试验方法

1.2.1 荧光原位杂交 (FISH) 法 2003 年 10 月 24 日,采集胜利油田胜利采油厂 1 号和 2 号综合处理站外排水,以及孤岛采油厂外排水为实验水样,对水样进行分级离心和 0.22 μm 滤膜过滤处理,来收集水样中的微生物细胞。据文献^[11, 12]的方法,利用多聚甲醛对浓缩的微生物细胞进行固定,然后利用 100%乙醇对固定的微生物细胞进行脱水,处理后的微生物细胞置于 -20℃ 保存 (不超过 3 wk);移取处理后的样品 1 μL,均匀涂布在 FISH 检测标准载玻片的圆形储样孔中,室温过夜风干;通过多级乙醇脱水,利用选定的探针在最适温度和盐浓度下,与微生物细胞中 16S rRNA 进行一定时间的杂交反应;利用清洗液在清洗温度下,对样品清洗 20 min,洗去没有杂交的、以及非特异性杂交的探针;利用 DAPI 对所有微生物

DNA 进行染色;用荧光显微镜对样品进行观察,在 521 nm 光激发下,荧光素 TET 发出橙色的荧光,而在紫外激发下,DAPI 发出蓝色的荧光,所以荧光显微镜视野中带橙色荧光的细胞是目标铁细菌细胞,而带蓝色荧光的细胞为总体微生物细胞,对这些微生物细胞进行计数,可以分析目标铁细菌的种群大小及其在样品微生物细胞总量中所占的比例。

1.2.2 绝迹稀释法 参考中华人民共和国石油天然气行业标准 (SY/T 0532-93)^[12],对水样进行逐级稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-6}$),将梯度稀释的水样 1 mL 加入到装有 5 mL 灭菌的铁细菌液体培养基的试管中,每个稀释度做 3 个平行管,塞上胶塞,放入 37℃ 恒温培养箱中培养 7~14 d,凡生成浑浊或红棕色胶状物,即表示有铁细菌生长,如空白样有菌生长应重做。根据生长试管数查最大可能数表即得铁细菌的数量。

1.3 实验步骤

1.3.1 组合探针最优杂交条件的确定 本研究首先对组合探针的杂交条件进行了预备试验。由于四条探针的 T_m 值都是

46℃,所以本实验杂交温度选为 46℃ 改变甲酰胺浓度和杂交时间,观察样品中铁细菌的荧光强度以及数量,确定各种情况下组合探针的最优杂交条件为:杂交温度 46℃,清洗温度 48℃,甲酰胺浓度 30%,杂交时间 2.5 h

1.3.2 外排水中铁细菌群落结构以及生物多样性分析 分别利用 4 条探针单独进行试验,分析各种探针的检测结果,确定外排水中这些探针相对应的铁细菌种类;通过对样品中铁细菌细胞(带有 TET 橙色荧光的细胞)和总体微生物细胞(带 DAP 蓝色荧光细胞)计数,计算样品目标铁细菌对微生物总量的相对数量,以及目标铁细菌的种群大小,分析外排水中铁细菌的群落结构.根据铁细菌的数量计算群落生物多样性指数,分析铁细菌群落的生物多样性.

物种丰度 (richness): $S = \text{铁细菌的种类数};$

Shannon 指数: $H = -\sum p_i \log p_i;$

Simpson 指数: $D = 1 - \sum p_i^2$

其中: p_i 表示各种铁细菌的相对数量.

物种均度 (evenness): $E = \frac{H}{H_{\max}}$

其中: $H_{\max} = \log_2 S$

1.3.3 组合探针对外排水中铁细菌的检测 对 4 种探针进行 2 种、3 种和 4 种组合,在优化的实验条件下进行杂交.计算各种探针组合所能检测的铁细菌的数量,分析组合探针对于铁细菌的覆盖程度,研究利用组合探针检测样品中所有铁细菌的可能性,探索以 FISH 方法检测油田外排水中铁细菌的可行性.

2 实验结果与分析

2.1 胜利油田外排水中铁细菌群落结构和生物多样性

利用 4 种探针分别对胜利采油厂 1 号综合处理站、2 号综合处理站和胜利油田孤岛外排水中铁细菌进行检测,根据各种情况下检测的结果,以样品中铁细菌细胞对微生物总细胞数的相对数量为纵坐标,以探针种类为横坐标作柱状图,如图 1 所示.

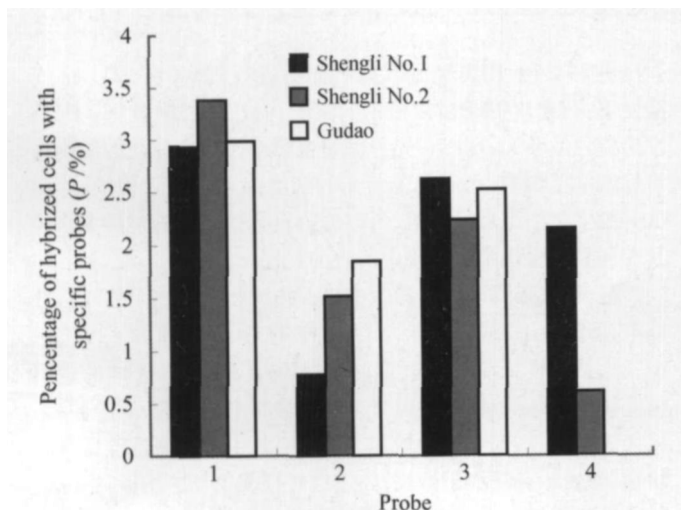


图 1 水样中各种铁细菌的相对含量

Fig 1 Relative amount of iron bacterial cells in samples from 3 water stations of the Shengli Oil Field

图 1 表明,在胜利油田各采油厂的外排水中铁细菌群落结

构基本类似. 1 号站的外排水中,各种铁细菌含量多少顺序为: *Leptothrix* 和 *Sphaerotilus* (探针 1, 铁细菌细胞数占样品中微生物总细胞数的 $2.94\% \pm 0.52\%$,下同) > *L. ferriphilum* (探针 3, $2.63\% \pm 0.49\%$) > *Acidithiobacillus* (探针 4, $2.16\% \pm 0.33\%$) > *L. ferrooxidans* (探针 2, $0.78\% \pm 0.21\%$); 2 号站以及孤岛采油厂的外排水中,各种铁细菌含量变化规律相同, *Leptothrix* 和 *Sphaerotilus* (探针 1) > *L. ferriphilum* (探针 3) > *L. ferrooxidans* (探针 2) > *Acidithiobacillus* (探针 4). 在 3 个站中, *Leptothrix* 和 *Sphaerotilus* (探针 1),以及 *L. ferriphilum* (探针 3) 的数量相近,大体为 $(2.94 \pm 0.52)\% \sim (3.39 \pm 0.52)\%$ 和 $(2.24 \pm 0.16)\% \sim (2.63 \pm 0.49)\%$, 在所有的外排水中这 3 种铁细菌是铁细菌群落中占优势的微生物;而其余的两种铁细菌的含量则差别较大,其中 *L. ferrooxidans* (探针 2) 顺序为: 孤岛外排水 ($1.85\% \pm 0.28\%$) > 胜利 2 号站 ($1.52\% \pm 0.18\%$) > 胜利 1 号站 ($0.78\% \pm 0.21\%$), 而 *Acidithiobacillus* (探针 4) 的顺序则相反, 孤岛外排水 (不可检测) < 胜利 2 号站 ($0.61\% \pm 0.08\%$) < 胜利 1 号站 ($2.16\% \pm 0.33\%$).

根据胜利油田各外排水站中铁细菌的种类和种群大小,计算油田外排水铁细菌群落的生物多样性指数,如表 2 所示,从中可以看出,胜利油田胜利采油厂 1 号综合处理站中铁细菌群落生物多样性 > 胜利采油厂 2 号站 > 孤岛采油厂外排水,而孤岛采油厂中铁细菌群落中物种均度最高.

表 2 各外排水中铁细菌群落生物多样性

Table 2 Biodiversity of iron bacteria in wastewater from the three stations of the Shengli Oil Field

多样性指数 Biodiversity index	1 号站 Na. 1	2 号站 Na. 2	孤岛 Gudao
类群丰度指数 Richness index (S)	4	4	3
香依指数 Shannon index (H)	1.30	1.24	1.08
辛普森指数 Simpson's index (D)	0.56	0.60	0.61
物种均度指数 Evenness index (E)	0.94	0.89	0.98

2.2 各种探针组合检测铁细菌的情况

利用双探针和三探针组合对外排水中铁细菌进行检测的结果,及其与单探针检测结果比较情况如表 3 和表 4 所示.

对胜利采油厂 1 号处理站外排水水样来说, 1-3-4 探针组合能检测出最多的铁细菌,明显好于其他探针组合;对胜利采油厂 2 号处理站外排水水样来说, 1-3 和 1-2-3 的铁细菌检测结果相差不多,都在标准偏差范围之内,说明在胜利采油厂 2 号处理站外排水中, *Leptothrix* 和 *Sphaerotilus* (探针 1) 和 *L. ferriphilum* (探针 3) 是优势的铁细菌. 对快速检测铁细菌来说,在孤岛外排水中 1-2-3 探针组合能检测最多的铁细菌.

2.3 外排水中铁细菌总数检测

2.3.1 绝迹稀释法检测结果 利用绝迹稀释法,对胜利采油厂 1 号和 2 号综合处理站的外排水中铁细菌进行了检测. 绝迹稀释法培养 14 d 后,检测到的铁细菌情况如下表 5 根据 3 个平行管最大可能的菌数表,可得 1 号站水样中铁细菌浓度为 2.5×10^3 个/mL; 2 号站水样中铁细菌浓度为 4.5×10^3 个/mL.

表 3 双探针组合检测结果 ($\bar{x} \pm s, P/\%$)
Table 3 Detection of iron bacteria by various combinations of 2 probes ($\bar{x} \pm s, P/\%$)

组合探针 Combined probe	1号处理站外排水 No. 1 wastewater		2号处理站外排水 No. 2 wastewater		孤岛采油厂外排水 Wastewater from Gudao	
	组合探针检测值 Combined probe value	单探针检测值之和 Sum of single probe value	组合探针检测值 Combined probe value	单探针检测值之和 Sum of single probe value	组合探针检测值 Combined probe value	单探针检测值之和 Sum of single probe value
1-2	2.60 $\pm$ 0.60	3.72 $\pm$ 0.73	5.35 $\pm$ 0.58	4.91 $\pm$ 0.43	3.45 $\pm$ 0.62	4.84 $\pm$ 0.63
1-3	4.762 $\pm$ 0.45	5.57 $\pm$ 0.01	8.88 $\pm$ 0.67	5.63 $\pm$ 0.41	6.76 $\pm$ 0.47	5.52 $\pm$ 0.96
1-4	4.38 $\pm$ 0.33	5.10 $\pm$ 0.85	2.89 $\pm$ 0.46	4.00 $\pm$ 0.33	3.18 $\pm$ 0.16	2.99 $\pm$ 0.35
2-3	1.97 $\pm$ 0.51	3.41 $\pm$ 0.70	3.13 $\pm$ 0.24	3.76 $\pm$ 0.34	2.78 $\pm$ 0.56	4.38 $\pm$ 0.89
2-4	3.03 $\pm$ 0.41	2.94 $\pm$ 0.54	1.65 $\pm$ 0.15	2.13 $\pm$ 0.26	1.45 $\pm$ 0.78	1.85 $\pm$ 0.28
3-4	3.57 $\pm$ 0.70	4.79 $\pm$ 0.82	3.26 $\pm$ 0.45	2.85 $\pm$ 0.24	4.69 $\pm$ 0.79	2.53 $\pm$ 0.61

表中数值为样品中铁细菌细胞占微生物总细胞数的百分比。下同 The data in the table are percentages of iron bacteria of samples in total cells. The same below

表 4 三探针组合检测结果 ($\bar{x} \pm s, P/\%$)
Table 4 Detection of iron bacteria by various combinations of 3 probes ($\bar{x} \pm s, P/\%$)

组合探针 Combined probe	1号处理站外排水 Wastewater from No. 1 station		2号处理站外排水 Wastewater from No. 2 station		孤岛采油厂外排水 Wastewater from Gudao	
	组合探针检测值 Combined probe value	单探针检测值之和 Sum of single probe value	组合探针检测值 Combined probe value	单探针检测值之和 Sum of single probe value	组合探针检测值 Combined probe value	单探针检测值之和 Sum of single probe value
1-2-3	4.90 $\pm$ 0.10	6.35 $\pm$ 0.22	8.00 $\pm$ 0.20	7.15 $\pm$ 0.59	10.35 $\pm$ 0.60	7.37 $\pm$ 0.24
1-2-4	4.70 $\pm$ 0.96	5.88 $\pm$ 0.06	4.84 $\pm$ 0.02	5.52 $\pm$ 0.51	5.48 $\pm$ 0.76	4.84 $\pm$ 0.63
1-3-4	9.45 $\pm$ 0.85	7.73 $\pm$ 0.34	6.19 $\pm$ 0.95	6.24 $\pm$ 0.49	6.67 $\pm$ 0.20	5.52 $\pm$ 0.96
2-3-4	6.78 $\pm$ 0.74	5.57 $\pm$ 0.03	5.20 $\pm$ 0.34	4.37 $\pm$ 0.42	6.06 $\pm$ 0.84	4.38 $\pm$ 0.89

表 5 绝迹稀释法铁细菌检测情况
Table 5 Detection of iron bacteria by maximum probable number approach

水样 Water Sample	平行管 Parallel pipe	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	空白 Blank
1号站 No. 1 station	1	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-
2号站 No. 2 station	1	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-

+: 生成浑浊或有红棕色胶状物 With red-brown jelly or solution turbid; -: 无菌生长 Without bacteria

2.3.2 FISH法4种探针组合检测的结果 利用4种探针的组合探针检测出孤岛采油厂、胜利采油厂1号和2号站的外排水中铁细菌的含量分别为11.0%、12.8%和9.0%。本研究利用胜利采油厂1号站外排水样品进行了铁细菌总量的检测和对FISH方法的验证。对胜利采油厂1号站的外排水,利用对DAP染色的微生物总细胞数进行计数,根据视野面积与样品分布总面积的比例,计算样品中微生物总细胞数;根据样品的体积,计算单位体积样品中微生物总量;根据铁细菌占样品中微生物总量的比例,计算铁细菌的数量。

在对DAP染色的细胞进行计数(微生物总数)的过程中,将50个视野(数字照像后的照片图像,方形,反映150 μm×150 μm面积)中微生物细胞总数进行平均,得出每个视野细胞总数为82个。计算:

菌量(10 μL原水) = $\frac{\pi(2.5 \times 10^{-3})^2}{(150 \times 10^{-6})^2} \times 82 = 7.16 \times 10^4$ 个

即1号站外排水中微生物含量为7.16×10⁴×100/50=1.432×10⁵个/mL;通过组合探针的FISH方法得到的水样中铁细菌含量为1.432×10⁵×12.8%=1.83×10⁴个/mL。

这个结果比绝迹稀释法测定结果高出1个数量级,证明了

绝迹稀释法无法培养所有的铁细菌,而FISH技术则不受微生物可培养性的限制,能够更加快速准确地对细菌进行检测,反应更加真实的情况,从而可以更加准确地指导生产。

3 结论与讨论

3.1 从检测结果可以看出,FISH方法不仅能够对水样中的铁细菌进行快速检测,定量计算水样中铁细菌的数量,而且可以解析铁细菌的群落结构。与绝迹稀释相比,FISH方法能检测更多的铁细菌,证明了FISH不受微生物可培养性的影响,能够更准确地检测外排水中铁细菌的数量。将单探针检测得到的铁细菌数量进行相加,同以组合探针检测的铁细菌数量相比较,发现以两种方式检测得到的铁细菌数量相当,都在标准偏差范围之内。另一方面,4种探针的DNA序列表明这些探针的DNA很少存在错误配对(Mismatch),所以这些探针组合在一起不会存在探针之间的互相干扰,这是4种探针的各种组合方式对铁细菌进行检测,结果的标准偏差都比较小的原因。总之,单探针能很好地解析外排水中铁细菌群落组成,而组合探针则能更快地、较准确地检测外排水中铁细菌的数量。设计新型FISH法载玻片和荧光扫描程序,自动控制荧光显微镜,使显微

镜对样品进行全面、自动扫描,快速采集样品中所有铁细菌(橙色荧光)和总细菌(兰色荧光)的荧光强度,通过对荧光信号进行数据处理,可以在8~20 h内完成对外排水中铁细菌的快速检测。FISH方法由于对所有铁细菌细胞直接计数,比迹稀释法利用的最大可能数要准确;所以通过特异性铁细菌探针的设计和组合,通过优化FISH的操作条件,FISH法可以更好地适合外排水中铁细菌检测,并指导生产实践。

3.2 单探针微生物群落结构分析结果表明,3种外排水中铁细菌群落结构相类似,但是各种铁细菌的种群大小不尽相同。在胜利油田试验的3个外排水站中,*Leptothrix*和*Sphaerotilus*,以及*L. ferrophilum*是占优势的铁细菌,分别大约占外排水中微生物总量的2%以上,而*Acidithiobacillus* spp. 和*L. ferrooxidans*则是相对较小的种群(其中孤岛采油厂外排水中没有检测到*Acidithiobacillus*),但是这些铁细菌种群大小的差别在5倍,并不很大。3个外排水站中铁细菌群落生物多样性不很高,Shannon指数为1.08~1.30之间,相差不大。理论上,群落结构的差异将使回注水和外排水中铁细菌群落对相同的杀菌剂具有不同的敏感性,从而也就影响各种药剂的杀菌效果,和水处理工艺的效率。同时,不同铁细菌新陈代谢所需要的底物也不完全相同,对这些底物的控制也就可以精细地指导铁细菌控制工艺的开发和应用。因此,对外排水中铁细菌群落结构的准确分析,有助于指导对杀菌剂的精确选用、以及铁细菌控制工艺精细的调控。

3.3 总之,通过对探针进行精确设计和优化组合、根据具体情况对杂交条件进行精细控制,FISH法能够快速、准确、直观地检测油田外排水中的铁细菌的存在、数量和群落结构。

References

- Emerson D, Moyer C. Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4784~4792
- 中国石油天然气总公司行业标准 SY/T 0532 - 93 碎屑岩油藏注水水质推荐指标及分析方法 SY 5329
- Emerson D, Revsbech NP. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: field studies. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 4022~4031
- Stöffels M, Ludwig W, Schleifer KH. rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environ Microbiol*, 1999, **1** (3): 259~271
- Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 3721~3726
- Möter A, Göbel UB. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Method*, 2000, **41**: 85~112
- Antoaen J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, Amann R. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol*, 1999, **1** (6): 517~523
- Friedrich U, van Langenhove H, Altendorf K, Lipski A. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ Microbiol*, 2003, **5** (3): 183~206
- Brossa EL, Mora RR, Amann R. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2691~2696
- Snaird J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 2884~2896
- Wu XL, Conrad R. Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stresses at two different temperatures. *Environ Microbiol*, 2001, **3** (6): 355~362
- Wu XL, Chin KJ, Stubner S, Conrad R. Functional patterns and temperature response of cellulose-fermenting microbial cultures containing different methanogenic communities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56** (2): 212~219
- Siering PL, Ghiorse WC. Development and application of 16S rRNA-targeted probes for detection of iron- and manganese-oxidizing sheathed bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 644~651
- Straub KL, Buchholz-Cleven BEE. Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4846~4856