

一株嗜热脱硫菌株的筛选及其生物脱硫性能研究

徐 闯^{1,2*}, 冯逸茹^{1,2}, 于丹丹^{1,2}, 徐 鹏^{1,2}, 张守猷^{1,2}

(1. 中石化胜利油田石油工程技术研究院, 山东 东营 257000;
2. 中石化微生物采油重点实验室, 山东 东营 257000)

摘要:从油田污水中分离出一株嗜热脱硫菌株 T1, 并对其进行了鉴定和生物脱硫特性研究。该菌为革兰氏阳性菌, 兼性厌氧。生理生化特性和 16S rRNA 基因鉴定其为地芽孢杆菌属 (*Geobacillus* sp.)。菌株 T1 最适生长条件为: 温度为 70℃、pH 为 7、盐度为 4%。对该菌的生物脱硫特性研究表明, 在初始 S²⁻ 质量浓度为 67 mg/L 条件下, 菌株 T1 在 30 h 内可将硫化物完全去除, 平均去除速率约为 2.22 mg/(L·h)。该菌具有高效的生物脱硫特性, 为高温污水生物脱硫工艺提供了一种微生物资源。

关键词: 油田污水; 生物脱硫; 地芽孢杆菌; 生理生化特性

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)09-0111-03

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2019.09.024

Isolation of a thermophilic desulfurization strain and study on its desulfurization property

XU Chuang^{1,2*}, FENG Yi-ru^{1,2}, YU Dan-dan^{1,2}, XU Peng^{1,2}, ZHANG Shou-xian^{1,2}

(1. The Petroleum Engineering Technology Research Institute, Sinopec Shengli Oilfield Branch Company, Dongying 257000, China; 2. Sinopec Key Laboratory of Microbial Oil Recovery, Dongying 257000, China)

Abstract: A thermophilic desulfurization strain T1 is isolated from oilfield wastewater, and its characterization and biological desulfurization characteristics are studied. The strain is proved to be a Gram-positive and facultative anaerobic. According to its physiological and biochemical characteristics as well as 16S rRNA gene analysis, the strain is identified as *Geobacillus* sp. The most suitable growth conditions for strain T1 include temperature at 70℃, pH = 7 and salinity at 4%. Study on the biological desulfurization characteristics of the strain shows that the sulfides can be completely removed by strain T1 within 30 hours with an average removal rate of about 2.22 mg/(L·h) when the initial S²⁻ concentration is 67 mg·L⁻¹. The strain exhibits a high efficiency of biological desulfurization and is a microbial resource for biological desulfurization process of high temperature sewage.

Key words: oilfield wastewater; biological desulfurization; geobacillus; biochemical and physiological characteristics

油田污水中的硫化物的存在会造成设备、管线和其他金属材料的严重腐蚀和损坏, 其腐蚀产物硫化亚铁黑色沉淀会造成污水悬浮物升高并形成污垢, 导致水质恶化^[1-3]; 同时, 污水中硫化物的存在会导致聚合物驱溶液黏度大幅度降低, 既浪费了大量聚合物干粉, 也严重制约了聚合物驱现场试验的开展。

当前去除污水中硫化物的方法主要是物理化学方法, 包括曝气氧化、化学氧化、化学沉淀及吸附等方法, 这些方法在油田采出水的处理回用过程中处理费用高, 而且不容易保持效果。生物脱硫具有投资少、成本低、能耗少、不产生二次污染等优点^[4], 从生物治理的角度通过筛选脱硫功能菌进行硫化物的去除, 可以有效降低硫化物对污水的不良影响, 减轻腐蚀、改善水质, 同时提升聚合物驱的开发效果。

油田污水环境条件复杂, 对菌种的要求很高。目前筛选得到的脱硫菌种性能各异, 很难同时具有优良的脱硫性能和很好的污水环境适应性, 矿场应

用范围因此受到很大的限制, 尤其对于高温污水, 菌种的耐热性就显得十分重要。筛选出耐受高温、可适应污水环境及能够有效去除硫化物的微生物菌种, 是目前微生物技术应用于油田高温污水、去除硫化物和改善水质的关键。

笔者筛选得到了一株高效的嗜热脱硫细菌, 其典型特征为能够将硫化物氧化为硫单质。生理生化和分子生物学鉴定其为地芽孢杆菌, 该功能微生物有望成为高温污水生物脱硫工艺的潜在微生物资源, 为油田污水硫化物治理提供一种新的途径。

1 材料与方法

1.1 菌种的分离与筛选

1.1.1 培养基组成

培养基配方: Na₂S · 9H₂O 0.5 g、柠檬酸钠 0.5 g、KNO₃ 2 g、K₂HPO₄ 1 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄ 0.2 g, 用蒸馏水定容至 1 L。用 4 mol/L NaOH 将

收稿日期: 2018-11-30; 修回日期: 2019-07-05

作者简介: 徐闯 (1979-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为油田污水生化处理, 通讯联系人, xuchuang.slyt@sinopec.com。

pH 调至 7.2,在配制培养基过程中全程通入无菌氮气,同时加热排除培养基中的氧气,121℃ 灭菌 30 min。制作固体培养基时,在液体培养基中加入 2% 的琼脂。

1.1.2 菌种的富集与分离

取胜利油田海洋采油厂污水,用一次性注射器取 1 mL 接种至 1 L 液体培养基中,70℃ 静置培养 7 d。用一次性注射器取 7 d 后的培养液 1 mL,无菌接种至新的液体培养基中,70℃ 培养 7 d。按此步骤进行 5 轮共 35 d 的驯化培养。最后取第 5 轮的培养液进行 Hungate 滚管分离,70℃ 恒温培养箱中培养 3 d,挑取单菌落,用显微镜检验其纯度。将纯化菌种 T1 斜面划线,培养并保存备用。

1.2 菌株的鉴定

1.2.1 菌株的形态特征

利用透射电镜观察菌株 T1 的大小和形态,之后进行革兰氏染色。

1.2.2 菌种的生理生化特性

参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》中所述的实验方法,检测菌种 T1 的生理生化特性,进行甲基红、接触酶、V-P、葡萄糖产酸、淀粉水解、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原实验,以及利用阿拉伯糖、木糖和乳糖进行实验。

1.2.3 菌种 16S rRNA 基因的测序和鉴定

将菌株 T1 进行基因组 DNA 提取,之后利用细菌 16SrRNA 基因通用引物:P11:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'和 P12:5'-TACGGTTACCTGT-TACGACTT-3'进行细菌的 16SrRNA PCR 扩增。引物由大连宝生物工程公司合成。反应体系 50 μ L,反应条件:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1 min,70℃ 延伸 1 min,35 个循环;70℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。将扩增产物送华大基因测序。序列在 GenBank 中用 BLASTN 比较,并用 DNASTAR 软件进行同源性和系统进化分析。

1.3 菌株的生长温度和生长 pH

1.3.1 温度对菌株生长的影响

将菌株 T1 对数生长期的菌液 20 mL 接种在 500 mL 液体培养基中,温度依次设定为 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90℃,静置培养 24 h,通过测定培养液的光密度($\lambda = 600$ nm)来观察菌体的生长情况。

1.3.2 pH 对菌株生长的影响

实验设计方法同 1.3.1,初始 pH 依次设定为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,培养温度为 70℃。

1.4 菌株的耐盐性

配制盐度分别为 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11% 和 12% 的人工海水代替蒸馏水配制 500 mL 液体培养基。分别接入对数期的 T1 菌液 20 mL,70℃ 静置培养 24 h,测定培养液的光密度,确定菌株的耐盐性。

1.5 菌株的脱硫特性

在 500 mL 液体培养基中接入 20 mL 对数期的 T1 菌液,立即用分光光度计检测 S^{2-} 浓度,同时用气相色谱测定柠檬酸钠的浓度并记录,再置于 70℃ 恒温箱中静置培养。每隔 6 h 对这 2 个指标进行检测,直至其不再发生变化。

2 结果与讨论

经过定向富集得到 1 株可在 70℃ 条件下降解硫化物的菌株,将其命名为 T1。该菌可兼性厌氧生长,在厌氧固体培养基上培养 1~2 d,出现的菌落直径为 0.4~2.0 mm,菌落形态呈圆形,边缘整齐,表面湿润呈半透明或白色。

2.1 菌株的鉴定结果

2.1.1 菌株的电镜观察

菌株 T1 的电镜图如图 1 所示。由图 1 可以看出,细胞形态为杆状,大小 2.0~4.5 μ m \times 0.4~1.8 μ m,芽孢中生,不能运动。

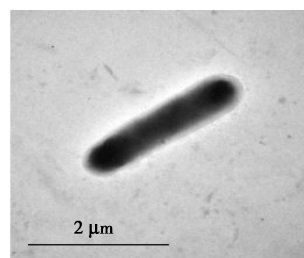


图 1 菌株 T1 的菌株形态图

2.1.2 菌株的生理生化特性

菌株 T1 的生理生化特性检测结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,菌株 T1 为革兰氏阳性菌,接触酶、

表 1 菌种的生理生化特性

实验项目	结果	实验项目	结果
革兰氏	+	硝酸盐(还原)	+
接触酶	+	亚硝酸盐(还原)	+
V-P	-	阿拉伯糖	+
甲基红	-	木糖	+
葡萄糖产酸	+	乳糖	-
淀粉水解	+		

葡萄糖产酸、淀粉水解实验为阳性,V-P、甲基红实验为阴性。能够还原硝酸盐和亚硝酸盐,能利用阿拉伯糖、木糖,不能利用乳糖。

2.1.3 菌种 16S rRNA 分析结果

将菌株 T1 的 16S rRNA 基因的测序结果与 GenBank 数据库进行比对,结果显示,菌株 T1 的 16S rRNA 基因序列和地芽孢杆菌属 (*Geobacillus* sp.) 最为接近,相似性达 99%。地芽孢杆菌属目前共有 10 余种已确切描述的菌种^[5-7],该菌属细胞为杆状,单个或数个形成短链状,细菌的细胞壁为格兰氏阳性结构,化能异养,专性嗜热,生长的温度范围为 37~75℃。能利用碳氢化合物是该菌属成员的普遍特性。近年来,关于地芽孢杆菌用于石油降解的研究比较多^[8-9],但在污水生物脱硫中的应用未见相关报道。

2.2 温度和 pH 对菌株生长的影响

2.2.1 菌株的生长温度

温度对菌株 T1 生长的影响如图 2 所示。从图 2 中可以看出,温度对菌株 T1 的生长有明显影响。当温度从 55℃ 升高到 70℃ 时,菌体的生长速率逐渐增大;温度继续升高,菌体生长速率迅速下降。菌株最适宜的生长温度为 70℃。

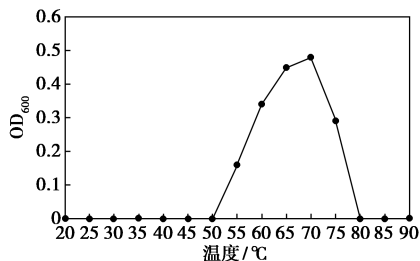


图 2 温度对菌株 T1 生长的影响

2.2.2 菌株的生长 pH

pH 对菌株 T1 的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出,pH 从 5 升至 7 时,该菌的生长速率逐渐提高;pH 继续升至 9 时,其生长速率不断减慢。菌株生长的 pH 范围为 5~9,最适生长 pH 为 7。

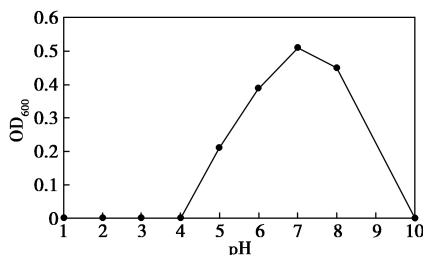


图 3 pH 对菌株 T1 生长的影响

2.3 盐度对菌株生长的影响

菌株耐盐性实验结果如表 2 所示。由表 2 可以看出,菌株 T1 生长的盐度范围为 0~10%,盐度低于 4%,菌体生长速率随盐度增加逐渐增大;盐度高于 4%,菌体生长速率随盐度增大明显降低。因此,菌株最适宜的生长盐度为 4%。

表 2 盐度对菌株 T1 生长的影响

盐度/%	0	1	2	3	4	5	6
OD ₆₀₀	0.44	0.45	0.50	0.53	0.57	0.44	0.32
盐度/%	7	8	9	10	11	12	
OD ₆₀₀	0.20	0.15	0.08	0.04	0	0	

2.4 菌株的脱硫特性

菌株 T1 在培养液中生长时,溶液中 S²⁻ 质量浓度的变化曲线如图 4 所示,初始 S²⁻ 质量浓度为 67 mg/L,在 T1 菌体的整个生长过程中,菌株均具有利用硫化钠的能力,前 18 h 硫化物去除速率逐渐增加,18 h 后硫化物去除速率逐渐降低,30 h 后硫化物被完全去除,平均去除速率约为 2.22 mg/(L·h)。

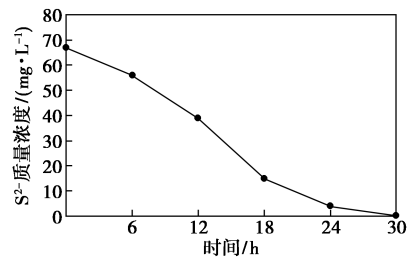


图 4 S²⁻ 浓度的变化

菌株 T1 利用柠檬酸钠的情况如图 5 所示。由图 5 可以看出,初始柠檬酸钠质量浓度为 500 mg/L,18 h 内菌株 T1 对柠檬酸钠的利用速率较快,18 h 后利用速率逐渐缓慢,30 h 柠檬酸钠利用率达到 98%,几乎全部被去除。结果表明,菌株 T1 去除硫化物和利用柠檬酸钠的过程同步进行。

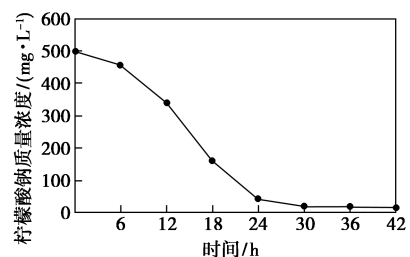


图 5 柠檬酸盐质量浓度的变化

3 结论

(1) 从胜利油田海洋采油厂污水中分离筛选出 1 株高效的嗜热脱硫细菌 T1,该菌为兼性厌氧菌,

(下转第 118 页)

(4) 燃料电池系统的造价成本中, 质子交换膜的成本占绝大部分。如果能够降低质子交换膜的成本, 则燃料电池系统的成本还可能更大幅度地降低。

参考文献

- [1] 李季, 孙佳伟, 郭利, 等. 生物质气化新技术研究进展[J]. 热力发电, 2016, 45(4): 1-6.
- [2] 童家麟, 吕洪坤, 齐晓娟, 等. 国内生物质发电现状及应用前景[J]. 浙江电力, 2017, 36(3): 62-66.
- [3] 赵展, 齐秀龙, 刘晓东, 等. 生物质气化—燃料电池发电系统性能分析[J]. 可再生能源, 2011, 29(6): 115-120.
- [4] 李雄威, 刘聪敏, 徐冬, 等. 生物质液体催化燃料电池的电化学模型[J]. 可再生能源, 2018, 36(8): 1113-1118.
- [5] 李雄威, 刘聪敏, 徐冬, 等. 液体催化燃料电池的污泥发电性能分析[C]. 《环境工程》2018 年全国学术年会, 北京, 2018.
- [6] 何凡, 胡蕴仪, 黄秀静, 等. 碳纸和碳布电极微生物燃料电池产电特性的对比研究[J]. 现代化工, 2019, 39(1): 184-187.
- [7] 卓露, 汪兴兴, 吕帅帅, 等. 微生物燃料电池技术的研究进展[J]. 现代化工, 2017, 37(8): 41-44.
- [8] Wei L, Wei M, Yulin D. High-performance liquid-catalyst fuel cell for direct biomass-into-electricity conversion [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(49): 13558-13562.
- [9] Liu W, Mu W, Liu M, et al. Solar-induced direct biomass-to-electricity hybrid fuel cell using polyoxometalates as photocatalyst and charge carrier[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(2): 1-8.
- [10] Wu W, Liu W, Mu W, et al. Polyoxymetalate liquid-catalyzed polyol fuel cell and the related photoelectrochemical reaction mechanism study[J]. *Journal of Power Sources*, 2016, 318: 86-92.

(上接第 113 页)

其典型特征为能够将硫化物氧化为硫单质; 生理生化和分子生物学鉴定菌株 T1 为地芽孢杆菌。

(2) 菌株 T1 最适宜生长条件为: 温度为 70℃, pH 为 7, 盐度为 4%。

(3) 菌株 T1 具有高效的生物脱硫特性, 在初始 S²⁻ 质量浓度为 67 mg/L 条件下, 在 30 h 内可将硫化物完全去除, 平均去除速率约为 2.22 mg/(L·h)。

(4) 筛选得到的嗜热脱硫细菌 T1 为高温污水生物脱硫工艺的实施提供了一种微生物资源, 在污水硫化物治理领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 黄廷林, 赵建伟, 吴宗福, 等. 陇东油田采出水系统的腐蚀及防护[J]. 西安建筑科技大学学报: 自然科学版, 2002, 34(4): 320-321.
- [2] Starkey R L. The general physiology of the sulfate-reducing bacteria in relation to corrosion[J]. *Producers Monthly*, 1958, 22: 12-16.

- [11] 刘跃岭, 景琦, 徐帆, 等. 直接利用生物质的化学燃料电池研究进展[J]. 化工进展, 2018, 37(9): 3346-3354.
- [12] Zhang Z, Liu C, Liu W, et al. Direct conversion of sewage sludge to electricity using polyoxometalate catalyzed flow fuel cell [J]. *Energy*, 2017, 141: 1019-1026.
- [13] Gong J, Liu W, Du X, et al. Direct conversion of wheat straw into electricity with a biomass flow fuel cell mediated by two redox ion pairs [J]. *Chemosuschem*, 2017, 10(3): 506-513.
- [14] Zhang Z, Liu C, Liu W, et al. Innovative design of coal utilization-A green pathway for direct conversion of coal to electricity through flow fuel cell technology [J]. *Applied Energy*, 2017, 200: 226-236.
- [15] 吴伟兵, 李建, 刘聪敏, 等. 基于水溶性多金属氧酸盐的光催化燃料电池[J]. 高等学校化学学报, 2017, 38(6): 1082-1089.
- [16] Liu C, Zhe Z, Wei L, et al. Synergistic effect of polyoxometalate solution and TiO₂ under UV irradiation to catalyze formic acid degradation and their application in the fuel cell and hydrogen evolution [J]. *Green Energy & Environment*, 2017, 2(4): 436-441.
- [17] 夏子华, 赵璐洋, 吴伟兵, 等. 基于杂多酸的光催化生物质燃料电池性能[J]. 林业工程学报, 2017, 2(6): 86-91.
- [18] 杨琦, 苏伟, 姚兰, 等. 生物质制氢技术研究进展[J]. 化工新型材料, 2018, 46(10): 247-250.
- [19] Xiong B, Zhao J, Tseng K J, et al. Thermal hydraulic behavior and efficiency analysis of an all-vanadium redox flow battery [J]. *Journal of Power Sources*, 2013, 242: 314-324.
- [20] You D, Zhang H, Chen J. A simple model for the vanadium redox battery [J]. *Electrochimica Acta*, 2009, 54(27): 6827-6836.
- [21] 李雄威, 孙振新, 陈毅伟, 等. 液体催化燃料电池泵损耗及运行策略分析[C]. 中国电机工程学会 2017 年年会, 广西南宁, 2017. ■

[3] 杨怀玉, 陈家坚, 曹楚南. H₂S 水溶液中的腐蚀与缓蚀作用机理的研究[J]. 中国腐蚀与防护学报, 2000, 20(2): 97-100.

[4] 马晓丹, 高灵芳, 谭文博, 等. 一株异养脱硫反硝化菌株的筛选及其生物脱硫脱氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 853-857.

[5] Nazina T N, Tourova T P, Poltarau A B, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 433-446.

[6] Fortina M G, Mora D, Schumann P, et al. Reclassification of *Saccharococcus caldxylosilyticus* as *Geobacillus caldxylosilyticus* comb [J]. *nov Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(6): 2063-2071.

[7] Zeigler D R. The Genus *geobacillus* introduction and strain catalog. The bacillus genetic stock center catalog of strains [DB]. 7edition, volume 3, Ohio State University, Ohio, 2001.

[8] Marchant R, Banat I M, Rahman T J, et al. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments [J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(10): 595-602.

[9] Maugeri, Teresa L, Gugliandolo, et al. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25(3): 450-455. ■