

研究报告

油藏注入水靶向脱硫潜力的高温脱硫菌群富集驯化

曹功泽^{#1}, 林军章^{#1}, 徐闯¹, 谢珍², 刘璟璇², 袁长忠¹, 江怡然¹, 徐鹏¹, 徐博文¹, 张晓君^{*2}

1 中国石油化工股份有限公司胜利油田分公司石油工程技术研究院, 山东 东营 257000

2 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

曹功泽, 林军章, 徐闯, 谢珍, 刘璟璇, 袁长忠, 江怡然, 徐鹏, 徐博文, 张晓君. 油藏注入水靶向脱硫潜力的高温脱硫菌群富集驯化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3550-3561.

CAO Gongze, LIN Junzhang, XU Chuang, XIE Zhen, LIU Jingxuan, YUAN Changzhong, JIANG Yiran, XU Peng, XU Bowen, ZHANG Xiaojun. Enrichment and acclimation of thermophilic desulfurizing bacterial consortium with sulfide removal potential for injection water of the oil reservoir[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3550-3561.

摘要:【背景】海上油田见聚后产出水硫化物超标, 影响到注聚水的配聚黏度, 采用生物脱硫时, 由于常规除硫菌难以适应除油后产出液的高温, 使得脱硫效果不佳。【目的】分析海上采出液水处理过程的菌群结构, 明确生物处理各节点的菌群构成变化; 开展耐高温脱硫菌驯化筛选, 获得耐高温的高效脱硫菌。【方法】采集来自胜利油田海三站的水样, 以 16S rRNA 基因高通量测序技术分析样本菌群结构, 并分别在不同温度(55、60 和 65 °C)下的无机富集培养基中进行多轮转接驯化, 结合常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术筛选获得耐高温的脱硫菌群, 采用宏基因组测序技术分析富集菌群的组成, 并测定其脱硫能力。【结果】处理前的采出液水样含有较多的嗜热菌和硫酸盐还原菌, 如 *Thermodesulfovibrio*、*Pseudothermotoga*、*Thermolithobacter*、*Fervidobacterium*、*Thermovenabulales* 和 *Pseudomonas*; 以厌氧气浮除油工艺处理的出水中, 嗜氢菌属(*Hydrogenophilus*)成为最主要的优势菌, 该菌在中心三平台外输水中相对丰度占比为 76%, 在注聚平台水中相对丰度占比为 84%。然而经过不断提高温度的驯化富集后, 菌群中栖热菌属(*Thermus*)微生物占主要优势, 相对丰度占比可达 89.4%, 此外也有少量嗜氢菌等; 等离子体诱变后进一步提高了脱硫的效率, 筛选获得的诱变后菌群在 65 °C 可将培养液中 8.88 mg/L 的硫化物快速去除, 去除率最高达 100%, 去除速率高达 0.49 mg/(L·h)。【结论】通过对水样中菌群

资助项目: 中石化胜利油田分公司科技攻关项目(YKD2203)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Technology Research Project of Shengli Oilfield, Sinopec (YKD2203).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xjzhang68@sjtu.edu.cn

Received: 2023-04-19; Accepted: 2023-05-25; Published online: 2023-06-14

进行高温驯化和等离子体诱变, 获得了耐 65 °C 高温的高效脱硫菌群, 提升了配聚水硫化物脱除效果, 对高温油田的开发意义重大。

关键词: 高温脱硫菌; 菌群; 硫化物氧化; 注聚水; 等离子体诱变

Enrichment and acclimation of thermophilic desulfurizing bacterial consortium with sulfide removal potential for injection water of the oil reservoir

CAO Gongze^{#1}, LIN Junzhang^{#1}, XU Chuang¹, XIE Zhen², LIU Jingxuan²,
YUAN Changzhong¹, JIANG Yiran¹, XU Peng¹, XU Bowen¹, ZHANG Xiaojun^{*2}

1 Research Institute of Oil Engineering Technology, Shengli Oilfield, Sinopec, Dongying 257000, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] The sulfide in the produced water of offshore oilfield often exceeds the limit, which affects the viscosity of the polymer-containing injection water. The efficiency of biodesulfurization is poor due to the poor adaptability of conventional mesophilic sulfide-removing bacteria to the high temperature of the produced water after oil removal. **[Objective]** To analyze the changes of microbial consortium structure in the process of offshore produced water treatment and acclimate a thermophilic bacterial consortium for desulfurization. **[Methods]** Water samples were collected from Haisan Station of Shengli Oilfield, and 16S rRNA gene sequencing was performed to reveal the structure of the bacterial consortium. The acclimation was conducted in the inorganic medium at different temperatures (55, 60, and 65 °C) for multiple rounds, and atmospheric and room temperature plasma (ARTP) was employed to obtain the efficient thermophilic desulfurizing bacteria. Metagenome sequencing was employed to study the composition of the enriched bacterial consortium and then the desulfurizing ability of the consortium was determined. **[Results]** The produced water samples contained abundant thermophilic bacteria and sulfate-reducing bacteria, such as *Thermodesulfovibrio*, *Pseudothermotoga*, *Thermolithobacter*, *Fervidobacterium*, *Thermovenabulales*, and *Pseudomonas*. *Hydrogenophilus* became the most dominant bacteria in the effluent from the nitrogen gas-floated oil removal. The relative abundance of *Hydrogenophilus* in the effluent water of the central platform and the polymer injection platform was 76% and 84%, respectively. After the enrichment and acclimation with increasing temperature, *Thermus* became predominant, with the relative abundance of 89.4%, in addition to a few members of *Hydrogenophilus*. The efficiency of desulfurization was further improved by ARTP. The acclimated bacterial consortium could rapidly desulfurize the liquid containing 8.88 mg/L sulfide at 65 °C, with a removal rate of 100% and a removal speed up to 0.49 mg/(L·h). **[Conclusion]** An efficient desulfurizing bacterial consortium adapted to 65 °C was obtained, which improved the desulfurization of polymer-containing injection water. This study would be

helpful for the development of high-temperature oil fields.

Keywords: thermophilic desulfurizing bacteria; microbial consortium; sulfide oxidation; polymer-containing injection water; atmospheric and room temperature plasma (ARTP)

油田聚合物驱是在注入水中加入高分子聚合物,通过增加注入水的黏度达到提高原油采收率的增产措施,在油田采油中应用广泛。将油田采出水处理后回用于配制驱油聚合物溶液,不仅可以解决采出水污染问题,还可节约水资源。然而采油过程的采出液物性复杂,外输污水含油量和悬浮物均超标,使硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)大量滋生,造成输水管路沿程硫化物浓度显著升高^[1];而硫化物超标往往会降低配聚黏度,影响聚合物驱的效果。硫化物浓度高于 1.5 mg/L 时,聚合物黏度随硫化物浓度提高急剧下降^[2]。然而胜利油田聚合物驱的产出液中硫化物浓度一般为 2–10 mg/L^[3–4]。近年来,业界对污水中硫化物的脱除有所关注^[5–9]。传统的硫化物脱除方法为物化方法,包括混凝法^[5]、湿空气氧化法^[6]、超临界水氧化法^[7]和催化氧化法^[8]等,但此类方法对设备要求较高,且需高温、高压或催化剂,能耗较大^[9]。微生物脱硫是在一定条件下,依靠好氧或厌氧菌去除污水中硫化物的新兴脱硫方法。由于微生物脱硫具有操作条件简单、设备要求和能耗低、无二次污染等优点^[10],在硫化物废水治理以及海上化学驱保粘的应用中发挥了巨大作用。

废水中硫化物的主要存在形式为低价硫离子,包括 S^{2-} 、 HS^- 和 H_2S 等^[11]。微生物脱硫技术通常使用硫氧化菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB)对低价硫离子进行氧化,形成硫单质或高价硫离子从而脱除废水中的硫化物。硫氧化菌在自然界分布广泛、功能繁多,在煤炭工艺脱硫^[12–14]、污水污泥处理^[15–17]、堆肥除臭^[18]和控制硫化氢排放^[19–20]等方面均有较为广泛的应

用。根据其特性可主要分为三类:丝状硫细菌(filamentous sulfur bacteria, FSB)、硫氧化光合细菌(photosynthetic sulfur bacteria, PSB)和无色硫细菌(colorless sulfur bacteria, CSB)^[21]。丝状硫细菌将生成的单质硫贮存在细胞体内,无法排出体外,而硫氧化光合细菌需在光照条件下氧化硫化物,二者在实际应用中有较大的局限性,因此用于生物脱硫的例子较少^[22–24]。左剑恶等^[22]采用人工合成含硫酸盐有机废水作为硫酸盐还原相的进水,研究了无色硫细菌去除水中硫化物的可行性,在进水硫化物浓度为 200 mg/L 左右、硫化物容积负荷为 12 kg/($m^3 \cdot d$)条件下硫化物的去除率可达 90%。Krishnakumar 等^[23]使用一种新型反向回流环状反应器,发现化学营养型硫化物氧化细菌在其表面能够形成生物膜,将硫化物氧化成硫并与水相分离,在 pH 值为 8.0、硫化物负荷为 30 kg/($m^3 \cdot d$)时,硫化物氧化率达到 90%,单质硫回收率为 65%。目前已报道的硫氧化菌多为硫杆菌属(*Halothiobacillus*)^[25–26]和假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[27–28]等常温菌株。

胜利油田工程院前期针对生物脱硫开展了相关攻关研究,形成了生物防治硫酸盐还原菌体系,不仅能抑制 SRB 产生新的硫化物,而且能够去除污水中原有的硫化物,成为去除和抑制注水系统硫化物的新途径;目前应用该技术在孤岛、孤东和海洋开展了规模化的现场应用,处理后采出水中硫化物由 2–4 mg/L 降低到 0.2 mg/L,聚合物溶液黏度由 17 mPa·s 上升至 35 mPa·s,同时替代了甲醛的使用,维持聚合物溶液黏度稳定性的同时,也保障了一线员工的健康;然而油田的油井采出液往往温度较高,且出口产液需升温到 65 °C 以上才能高效

脱水^[3,29], 因此注聚水常有温度超过 60 °C 的情况。然而目前已报道的脱硫菌最适生长温度普遍为中温或常温^[23-28], 在高温下无法生长和有效除硫, 因此, 获得耐高温的脱硫菌尤为重要。

本研究采用室内试验的方法, 采集胜利油田海三站至海上注聚平台各节点的水样, 采用 16S rRNA 基因和宏基因组高通量测序技术, 分析采出液油水分离后的回用水及传输各节点的菌群结构; 并针对含低浓度硫化物的采出液回用水开展耐高温脱硫菌的富集筛选, 通过多轮高温富集结合常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术, 筛选驯化得到耐高温高效脱硫菌群, 以期为项目现场应用提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

样品取自胜利油田注聚水处理和传输管线中, 从海三站、中心三平台至 CB22F 注聚平台现场 6 个节点的水样, 分别是油井采出液油水分离后的来水(LS)、外输缓冲罐(WS)、海三站(HSZ)、中心三平台自分水(ZXF)、中心三平台外输水(ZXW)以及海上注聚平台(22F)这 6 个位点, 如图 1 所示, 将各位点样品过 0.2 μm 滤膜

收集菌体, 用以研究各节点采出水菌群构成的变化。其中 LS 和 ZXF 为未经过 N₂ 气浮除油工艺处理的入水样本。LS 和 ZXF 的硫化物浓度分别为 2.5 mg/L 和 0.5 mg/L, 至 22F 注聚平台的硫化物浓度为 1.5 mg/L 左右, 注聚水硫化物浓度仍略有超标。

1.1.2 培 养 基

无机富集培养基(g/L)^[30]: KH₂PO₄ 2.0, NH₄Cl 0.5, Na₂CO₃ 0.5, MgCl₂·6H₂O 0.2, Na₂S·9H₂O 0.2, 微量元素溶液 20.0 μL, pH 7.0。微量元素溶液(mg/L): EDTA 5.0, FeSO₄·7H₂O 2.0, ZnSO₄·7H₂O 100.0, MnCl₂·4H₂O 30.0, CoCl₂·6H₂O 200.0, NiCl₂·6H₂O 20.0, Na₂MoO₄·2H₂O 30.0, CaCl₂·2H₂O 10.0, H₃BO₃ 300.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

Na₂S·9H₂O 和 NaHCO₃, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; N,N-二甲基对苯二胺二盐酸盐, 上海易恩化学技术有限公司; FastDNA™ SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals 公司; MiSeq Reagent Kit V3, Illumina 公司; Qubit® dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher 公司; DNB Kit, 中国华大智造公司。Qubit 4.0 核酸荧光定量分析仪, Thermo Fisher 公司; ARTP 诱变育种仪, 无锡源清天木生物科技有限公司; 安捷伦 2100 生物分析仪, Agilent 公司。

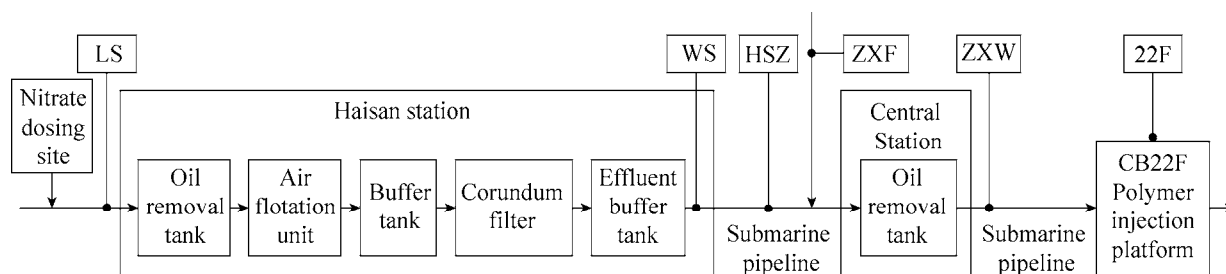


图 1 油田见聚采出水样品采集位点 图中黑色圆点代表水样采集位点

Figure 1 Sampling sites of oil field produced water. The black dots represent the collection sites of water sample.

1.2 耐高温脱硫菌群的驯化富集

取过滤后的来水样品 1 mL 注入含 50 mL 无机富集培养基的 100 mL 血清瓶中,用丁基橡胶垫和铝盖密封瓶口,抽去空气并注入氮气以形成厌氧环境。在 70 °C 培养 3 h,然后转移到 55 °C 培养 3 d,连续 5 次转接至新的培养基驯化培养后得到耐高温生长的菌群。再转接入新的培养基后在 60 °C 培养,选择脱硫效率高的富集培养物,再在 60 °C 进行连续几次转接富集培养。在富集培养过程中,每 12 h 取样测定菌群对培养基中硫化物的去除能力。选取硫氧化性能较优的菌液,在 65 °C 进行后续的富集和筛选试验。驯化过程中每 24 小时转接一次,通过缩短转接的时间间隔,筛选能够在高温条件下快速生长的脱硫菌。富集培养持续进行约 2 个月。

1.3 菌液脱硫能力分析

菌液经过 0.22 μm 的水系滤膜过滤后,采用亚甲基蓝分光光度法测定硫化物浓度,测定方法参考《水和废水监测分析方法》(第 4 版)^[31]。以标准曲线作参照计算不同样本中硫化物的浓度和脱硫率。

1.4 高温除硫菌的诱变与筛选

由于在 65 °C 的高温下使用常规富集方法难以达到高效去除硫化物的效果,因此采用 ARTP 方法对脱硫菌进行诱变处理^[32-37]。打开气瓶阀门,保证仪器内部压力为 0.15–0.20 MPa,紫外灭菌 15–20 min 后,取脱硫能力较强的菌群培养液 5 mL,4 000 $\times g$ 离心 5 min,弃去上清液后加入等体积 10% 甘油制备菌悬液,涂布 10 μL 在金属载片表面。设置气量范围为 8–12 SLM,功率为 100–120 W,分别进行 0、15、和 30 s 时长的诱变处理,诱变后将样品转入无菌培养基,在 65 °C 进行多轮转接富集培养。设置不同硫化物浓度(8.88、26.66 和 53.32 mg/L)的培养

液,转接菌液接种量为 1 mL,定时测定硫化物浓度,计算硫化物去除率。

1.5 样品菌群的测序分析

用无菌滤膜过滤原位取得的水样以收集菌体,滤膜连同菌体采用 FastDNA™ SPIN Kit for Soil 进行基因组 DNA 的提取。利用通用引物 341F (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')和 806R (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')对细菌基因组 16S rRNA 基因的 V3–V4 区域进行扩增,具体过程参照文献[38]。以扩增产物为模板进行 Illumina MiSeq 测序文库制备,并进行 Illumina MiSeq 系统测序,测序服务委托上海慕柏生物科技有限公司完成。Principal co-ordinates analysis (PCoA)和 amplicon sequence variants (ASV)划分具体步骤参照文献[39]。根据测序分析结果,分别作属水平和种水平的菌群组成丰度图,明确筛选获得的耐高温高效脱硫菌的菌群组成,并对注聚水处理系统采集的 6 个位点样品的微生物群落组成进行 PCoA 分析,比较菌群的差异。

将富集后的样品基因组 DNA 构建测序文库后进行宏基因组测序分析。首先采用酶切法将基因组 DNA 片段化为 150–200 bp 左右的片段,然后将片段化 DNA 末端修复添加 A 并连接特定样本识别标签序列,构建好的 DNA 文库采用 Qubit 4.0 核酸荧光定量分析仪和 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 测定文库浓度,采用安捷伦 2100 生物分析仪评估待测序文库中的 DNA 浓度和片段大小。利用 DNB Kit 一步法制备 DNA (DNA 纳米球)。质量合格的文库通过 MGISEQ-200 平台进行测序,测序服务委托南京实践医学科技有限公司完成。下机数据首先采用 FASTP V0.21.0 和 DustMasker V1.0.0 软件去除含测序接头、低质量、过短(长度<40 bp)及低复杂度的序列,然后使用 kraken2 V2.1.1 软件和 Bracken V2.5 软件进行物种分类。

2 结果与分析

2.1 不同来源样本的富集培养菌群比较

分别对海三站的来水滤膜、反应器滤后滤膜、来水水样 3 种类型样本进行富集培养, 其中来水滤膜样本为来水(LS)经过 0.22 μm 滤膜过滤后的样品, 滤后滤膜样本为金刚砂过滤器出水经过滤膜后的样品, 来水水样样本为未经过滤的原始水样。如表 1 所示, 来水滤膜、滤后滤膜 2 个样本类型的富集培养菌群对硫化物去除效果无显著差异, 硫化物去除率均为 99.4%, 55 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下培养 7 d 后可以达到完全去除; 而水样标本的硫化物去除率为 83.9%, 明显低于前两者。

2.2 富集与诱变筛选获得菌群的脱硫能力

不同的等离子体诱变处理时间对于菌液的脱硫能力有显著影响。如表 2 所示, 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 诱变后的样本硫化物去除率有较大提升, 硫化物去除能力显著增强。在相同时间内, 与

未处理的对照菌群相比, 经 15 s 等离子体诱变处理后的菌群, 其硫化物去除率从 35.0% 升高到 93.5%; 而经 30 s 等离子体诱变处理的菌群硫化物去除率升高到 66.4%, 相较诱变 15 s 的样本较低, 说明诱变时间过长可能对菌群产生毒害作用, 影响菌群的生长活力与脱硫性能。

对诱变筛选后的菌群进一步转接和筛选后检测其脱硫能力, 如表 3 所示, 诱变筛选驯化的菌可将 8.88 mg/L 的硫化物在 18 h 内完全去除, 去除速率达 0.49 mg/(L·h), 硫化物浓度提高到 26.66 mg/L 时去除速率为 0.36 mg/(L·h), 而硫化物浓度进一步提高到 53.32 mg/L 时去除速率降低为 0.15 mg/(L·h)。这提示随着硫化物浓度的提高, 需要更长培养时间以达到较高的硫化物去除率, 且底物硫化物浓度过高对菌群脱硫效果有一定影响。

2.3 注聚水处理系统样品的菌群组成和多样性

如图 2 所示, 16S rRNA 基因高通量测序结

表 1 不同来源样本富集后硫化物浓度及去除率对比

Table 1 Comparison of sulfide concentration and sulfide removal rate after enrichment of samples from different sources

待测样本 Samples	培养瓶中硫化物浓度 Measured sulfide concentration (mg/L)	空白对照硫化物浓度 Sulfide concentration in CK (mg/L)	55 $^{\circ}\text{C}$ 培养时长 Incubation time under 55 $^{\circ}\text{C}$ (d)	去除率 Sulfide removal rate (%)
来水滤膜 Filter sample of influent water	0.147	26	7	99.4
滤后滤膜 Filter sample of emery filtration	0.169	26	7	99.4
来水水样 Influent water sample	4.216	26	7	83.9

表 2 不同等离子体诱变时间下的硫化物去除效果

Table 2 Sulfide removal under different mutation time

项目 Item	样本诱变时间 Mutagenesis time (s)		
	0 (对照组 Control)	15	30
培养瓶中残余硫化物 Residual sulfide concentration (mg/L)	1.40	1.40	7.23
空白对照硫化物浓度 Sulfide concentration in control (mg/L)	21.50	21.50	21.50
65 $^{\circ}\text{C}$ 培养时间 Incubation time under 65 $^{\circ}\text{C}$ (d)	4	4	4
去除率 Sulfide removal rate (%)	35.0	93.5	66.4

表3 不同硫化物浓度时的去除效果

Table 3 Sulfide removal under different substrate concentration

项目 Item	硫化物浓度 Sulfide concentration (mg/L)		
	8.88	26.66	53.32
培养时长 Incubation time (h)	18	36	312
残余硫化物浓度 Residual sulfide concentration (mg/L)	0.0	13.73	6.67
去除率 Sulfide removal rate (%)	100.0	48.5	87.5
去除速率 Sulfide removal rate (mg/(L·h))	0.49	0.36	0.15

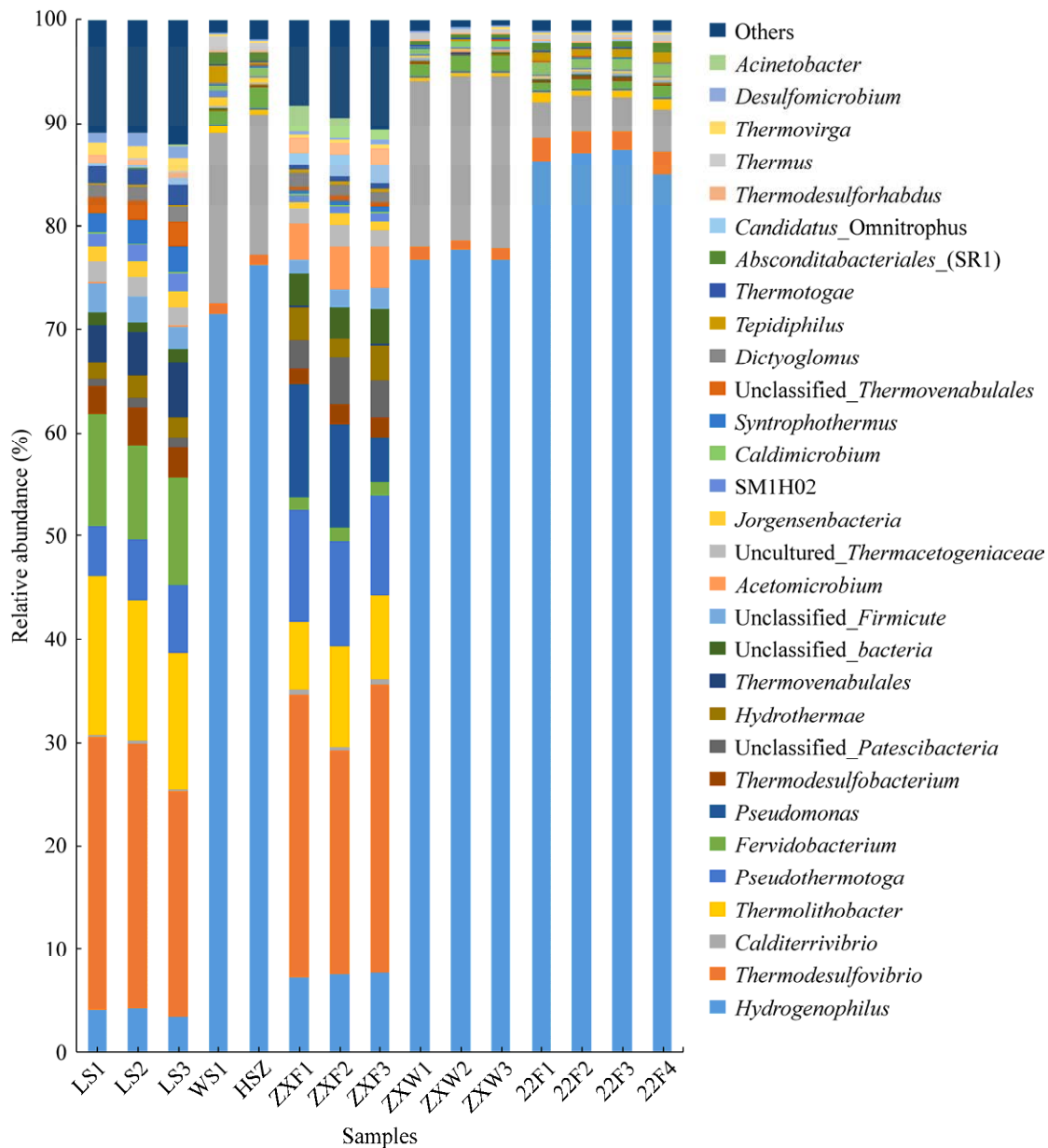


图2 注聚水处理与传输系统样品的菌群组成(属水平)

Figure 2 Microbial community composition of samples from polymer injection water (genus level).

果表明, LS 与 ZXF 的菌群组成各异, 它们与其他样品的菌群组成差异巨大, 且其他样品的菌群组成相似度高。此外, LS 和 ZXF 两个来水水样含有较多的高温脱硫弧菌属(*Thermodesulfovibrio*)、假热袍菌属(*Pseudothermotoga*)、热石杆菌属(*Thermolithobacter*)、闪烁杆菌属(*Fervidobacterium*, 仅 LS 中)、*Thermovenabulales* (仅 LS 中)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 仅 ZXF 中); 除 LS 和 ZXF 外, 其他水样中含有较多的 *Hydrogenophilus* (>70%) 和 *Calditerrivibrio* 的细菌。

对注聚水处理系统采集的 6 个位点样品的微生物群落的组成进行 PCoA 分析。如图 3 所示, LS 与 ZXF 的菌群组成各异, 且它们与其他样品的菌群组成差异巨大, 而其他样品的菌群组成相似度高。说明未进行除油工艺的来水菌群与经各站点气浮除油处理后的出水菌群差异显著。

2.4 富集与诱变筛选获得的菌群组成分析

对驯化富集后的菌液进行宏基因组测序分析, 结果表明, 在属水平富集后的样本中绝大部分为栖热菌属(*Thermus*)细菌, 占 89.4%, 其他优势菌属包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、*Pseudothermotoga*、嗜嗜热菌(*Rhodothermus*)、亚栖热菌属(*Meiothermus*)和嗜氢菌属(*Hydrogenophilus*); 在种水平上

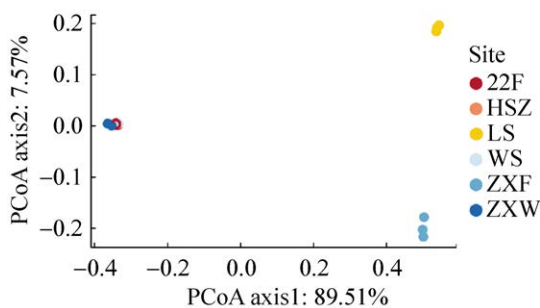


图 3 注聚水处理系统样品菌群的 PCoA 分析图
Figure 3 PCoA analysis of microbial community of samples from polymer injection water.

(图 4), 富集诱变筛选后样本中主要为栖热菌属的 *Thermus scotoductus*, 在菌群中丰度占 82.9%, 此外, 栖热菌属还有嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)、帕瓦蒂河栖热菌(*Thermus parvatiensis*)、水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)、*Thermus* sp. CCB_US3_UF1、*Thermus oshimai* 和布氏栖热菌(*Thermus brockianus*)等细菌, 丰度合计占 6.5%。以上结果说明本研究的高温筛选条件下, 驯化筛选得到的脱硫菌群具有耐高温性, 其中 *Thermus scotoductus* 可能是潜在的硫化物氧化功能菌。

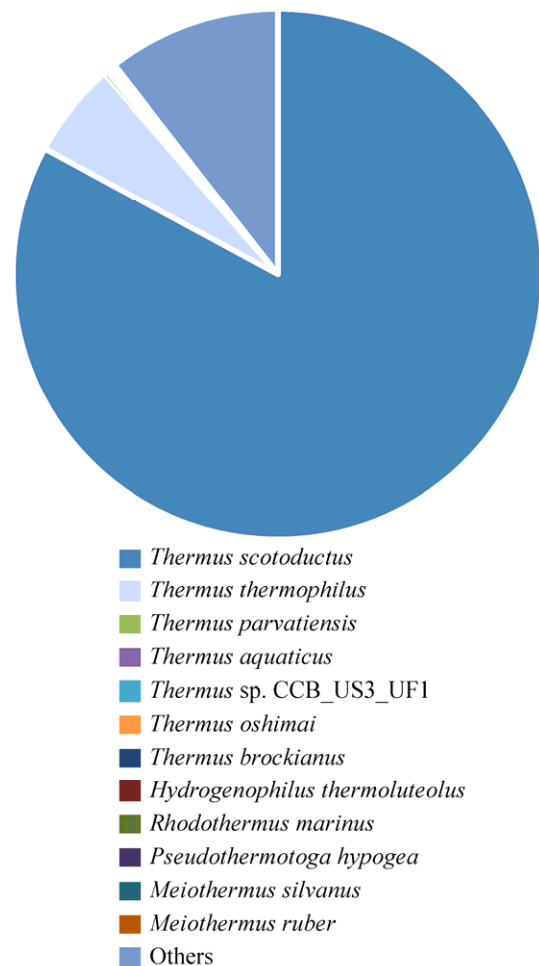


图 4 诱变后富集菌群在种水平上的相对丰度图
Figure 4 Relative abundance map of enriched microbial communities after mutagenesis at species level.

3 讨论与结论

由于微生物脱硫技术具有成本低、脱硫完全等优点,目前受到广泛关注。近年来已有研究发现了自然环境中存在的多种中温或常温脱硫菌^[40-42]。贡俊等^[40]发现了一种脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*),在25–35 °C的条件下,对进气浓度为2.5 mg/L的硫化氢脱除率达到91%以上。董晓莹等^[41]在污水处理厂的活性污泥中分离了一株假单胞菌属的细菌,当反应温度为30 °C、pH值为6.0、H₂S进口浓度为0.5–3.0 mg/L时,菌株对H₂S的去除率可保持在92%以上。张建斌等^[42]从土壤中分离出一株硫杆菌(*Thiobacillus*),在培养温度为45 °C、pH值为9.0时,可在72 h内将溶液中硫化钠转化为单质硫,硫化钠浓度从 1.93×10^3 mg/L降低至200 mg/L,脱除率高达89.2%。与上述报道的菌株相比,本研究富集诱变筛选获得的菌群同样能够高效地将溶液中的硫化物氧化,尤其是其耐高温特性能够使它在65 °C条件下有效脱除硫化物,具有解决高温油井回用水中硫化物去除难题的潜能。

本文研究结果表明,油田注聚水处理系统的样品菌群中主要包括一些嗜热硫酸盐还原或铁还原菌,包括*Thermodesulfovibrio*、*Pseudothermotoga*、*Thermolithobacter*。此外,对注聚水处理系统样品菌群的ASVs的PCoA分析表明,LS与ZXF样本的菌群组成与其他样品的差异较大,而经过气浮除油处理的样品之间菌群组成相似度更高,说明所采用的处理工艺改变了菌群生长环境,尤其是海三站现场硝酸盐药剂的添加和氮气气浮操作,有效抑制了硫酸盐还原菌的生长,导致优势菌群的结构改变。

ARTP诱变技术使用射频辉光放电产生的等离子体进行微生物诱变,由于其具有富含高

浓度的活性粒子、射流温度低、放电均匀、不需要真空系统等优点,已经成为新兴的有效育种手段^[43]。在本研究中,经过一定时长的等离子体诱变处理后,样本对硫化物的去除率显著提高,而且经过多轮富集驯化筛选后硫化物去除能力得到进一步提升。已有研究表明,等离子体诱变选育微生物能够大幅提升微生物的代谢速率,提高微生物的相关性能。例如,Liu等^[34]使用ARTP诱变技术获得了一株大肠杆菌突变体LL016,能够在缺少营养物质的培养基中厌氧利用葡萄糖产生琥珀酸,且葡萄糖消耗速率与琥珀酸产生速率均高于其他菌株。目前应用等离子体诱变技术选育高效耐高温脱硫菌的研究未见报道,本研究通过等离子体诱变的方法构建了突变后高效脱硫菌群,说明了该方法对菌群进行诱变的有效性。

该菌群经富集驯化后的优势菌主要为栖热菌属(*Thermus*)的*Thermus scotoductus*。Kristjánsson等^[44]在冰岛南部一个小镇的热水管道中首次分离出*Thermus scotoductus*,而Skirnisdottir等^[45]的研究发现*Thermus scotoductus*具有硫氧化特性,其能够以硫代硫酸盐和元素硫作为电子供体,以氧和硝酸盐作为电子受体,将低价硫氧化为更高价态。因此,在后续试验中从菌群中分离培养高效的栖热菌属功能菌株,分析其脱硫性能及功能基因信息,更好地了解脱硫菌厌氧条件下氧化硫化物的调控机理,可为高温条件下注聚水中硫化物(S²⁻/HS⁻)的生物氧化提供研究思路,而且耐高温硫化物氧化菌株具有重要的实际应用价值。

REFERENCES

- [1] 杨德敏,袁建梅,谢崇文,王兵. 气田高浓度含硫废水的化学氧化处理[J]. 环境工程学报, 2014, 8(11): 4757-4761.
YANG DM, YUAN JM, XIE CW, WANG B. Treatment

- of high concentration sulfide wastewater from gas fields by chemical oxidation process[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(11): 4757-4761 (in Chinese).
- [2] 王振. 污水配制聚合物溶液黏度的影响因素及其机理探讨[D]. 青岛: 中国石油大学硕士学位论文, 2009.
WANG Z. Influencing factors and mechanism discussed on the viscosity of polymer solution prepared by oilfield produced water[D]. Qingdao: Master's Thesis of China University of Petroleum (East China), 2009 (in Chinese).
- [3] 郭省学, 徐闯, 徐鹏, 王淋, 袁长忠, 张守献, 汤晓东, 汪卫东. 孤岛油田污水生物脱硫保黏技术应用[J]. 现代化工, 2018, 38(1): 180-182.
GUO SX, XU C, XU P, WANG L, YUAN CZ, ZHANG SX, TANG XD, WANG WD. Application of biological desulfurization and viscosity retention technology for wastewater in Gudao Oilfield[J]. Modern Chemical Industry, 2018, 38(1): 180-182 (in Chinese).
- [4] 潘永强. 微生物水处理技术在胜利油田污水资源化利用中的应用[J]. 化工管理, 2015(32): 108-110.
Pan YQ. Application of microbial water treatment technology in the resource utilization of sewage in Shengli Oil Field[J]. Chemical Engineering Management, 2015(32): 108-110 (in Chinese).
- [5] 王兵, 陈丹丹, 任宏洋, 李永涛, 王丹, 林奇. 高含硫废水受控氧化的混凝强化研究[J]. 工业水处理, 2016, 36(7): 29-33, 34.
WANG B, CHEN DD, REN HY, LI YT, WANG D, LIN Q. Study on the controlled oxidation of coagulation enhancement used on highly concentrated sulfur-bearing wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2016, 36(7): 29-33, 34 (in Chinese).
- [6] KWANG-DEOG J. Catalytic wet oxidation of H₂S to sulfur on Fe/MgO catalyst[J]. Applied Catalysis A: General, 2003, 240(1-2): 235-241.
- [7] 向波涛, 王涛, 刘军, 沈忠耀. 超临界水氧化法处理含硫废水研究[J]. 化工环保, 1999, 19(2): 75-79.
XIANG BT, WANG T, LIU J, SHEN ZY. Treatment of sulphur-containing wastewater by supercritical water oxidation process[J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 1999, 19(2): 75-79 (in Chinese).
- [8] 宫磊. 生物催化氧化法处理 H₂S 废气的工艺及理论研究[D]. 昆明: 昆明理工大学博士学位论文, 2005.
GONG L. The Process and theoretical study on the treatment of H₂S waste gas by biocatalysis oxidation[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Kunming University of Science and Technology, 2005 (in Chinese).
- [9] ZHANG LH, de SCHRYVER P, de GUSSEME B, de MUYNCK W, BOON N, VERSTRAETE W. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review[J]. Water Research, 2008, 42(1/2): 1-12.
- [10] 金小达, 刘广兵. 烟气生物脱硫技术的特点[J]. 环境科技, 2010, 23(2): 31-34.
JIN XD, LIU GB. Characteristic of flue gas biodesulfurization technology[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 23(2): 31-34 (in Chinese).
- [11] 杨旭, 吴晓玲. 含硫污水处理方法综述[J]. 油气田环境保护, 1994, 4(3): 59-61.
YANG X, WU X. A summary of the literature on sour water treatment[J]. Environmental Protection of Oil & Gas Fields, 1994, 4(3): 59-61 (in Chinese).
- [12] YE J, ZHANG P, ZHANG G, WANG S, NABI M, ZHANG Q, ZHANG H. Biodesulfurization of high sulfur fat coal with indigenous and exotic microorganisms[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 197: 562-570.
- [13] HU TT, YANG Y, ZHANG MJ, GAO Y, CHENG Q, JI HJ. Biodesulfurization of coal using *Rhodococcus erythropolis* SX-12 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* GF: a two-step approach[J]. Energy Science and Engineering, 2019, 7(1): 162-169.
- [14] ETEMADIFAR Z, ETEMADZADEH SS, EMTIAZI G. A novel approach for bioleaching of sulfur, iron, and silica impurities from coal by growing and resting cells of *Rhodococcus* spp.[J]. Geomicrobiology Journal, 2019, 36(2): 123-129.
- [15] 李敏, 王琦, 魏菁, 刘继军, 高云航. 粪产碱杆菌的分离鉴定及其生物转化作用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3612-3620.
LI M, WANG Q, WEI J, LIU JJ, GAO YH. Isolation, identification and biotransforming of *Alcaligenes faecalis*[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3612-3620 (in Chinese).
- [16] FENG SS, LIN X, TONG YJ, HUANG X, YANG HL. Biodesulfurization of sulfide wastewater for elemental sulfur recovery by isolated *Halothiobacillus neapolitanus* in an internal airlift loop reactor[J]. Bioresource Technology, 2018, 264: 244-252.
- [17] 韩佳桐, 罗剑飞, 林炜铁. 酿酒废水硫氧化细菌的分离鉴定及其硫氧化特性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 155-160.
HAN JM, LUO JF, LIN WT. Isolation and identification of sulfur-oxidizing bacterium from brewery wastewater and its sulfur-oxidizing characteristics[J]. Modern Food

- Science and Technology, 2020, 36(6): 155-160 (in Chinese).
- [18] MORI YM, TADA CK, FUKUDA Y, NAKAI Y. Diversity of sulfur-oxidizing bacteria at the surface of cattle manure composting assessed by an analysis of the sulfur oxidation gene *soxB*[J]. *Microbes and Environments*, 2020, 35(3): ME18066.
- [19] HOU NK, XIA YZ, WANG X, LIU HW, LIU HL, XUN LY. H₂S biotreatment with sulfide-oxidizing heterotrophic bacteria[J]. *Biodegradation*, 2018, 29(6): 511-524.
- [20] KHANONGNUCH R, di CAPUA F, LAKANIEMI A. H₂S removal and microbial community composition in an anoxic biotrickling filter under autotrophic and mixotrophic conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 367: 397-406.
- [21] 李亚新, 储江林, 池勇志. 无色硫菌氧化 SRB 还原硫酸盐产物硫化氢生成单质硫[J]. *城市环境与城市生态*, 2002, 15(5): 4-7.
- LI YX, CHU JL, CHI Y. Removal of sulfide produced by sulfate-reducing bacteria from wastewater and conversion to elementary sulfur by colorless sulfur bacteria[J]. *Urban Environment & Urban Ecology*, 2002, 15(5):4-7 (in Chinese).
- [22] 左剑恶, 袁琳, 胡纪萃, 顾夏声. 利用无色硫细菌氧化废水中硫化物的研究[J]. *环境科学*, 1995, 16(6): 7-10.
- ZUO JE, YUAN L, HU JC, GU XS. Biotechnological removal of sulfides in the effluent from sulfate reducing reactors[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 1995, 16(6): 7-10 (in Chinese).
- [23] KRISHNAKUMAR B, MAJUMDAR S, MANILAL VB, HARIDAS A. Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR)[J]. *Water Research*, 2005, 39(4): 639-647.
- [24] WANG R, LIN JQ, LIU XM, PANG X, ZHANG CJ, YANG CL, GAO XY, LIN CM, LI YQ, LI Y, LIN JQ, CHEN LX. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3290.
- [25] CANO PI, COLÓN J, RAMÍREZ M. Life cycle assessment of different physical-chemical and biological technologies for biogas desulfurization in sewage treatment plants[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 181: 663-674.
- [26] CHEN Y, WEN Y, ZHOU Q. Sulfate removal and sulfur transformation in constructed wetlands: the roles of filling material and plant biomass[J]. *Water Research*, 2016, 102: 572-581.
- [27] YOUSEF N, MAWAD A, ALDABY E, HASSANEIN M. Isolation of sulfur oxidizing bacteria from polluted water and screening for their efficiency of sulfide oxidase production[J]. *Global Nest Journal*, 2019, 21(3): 259-264.
- [28] SUN Z, PANG B, XI J. Screening and characterization of mixotrophic sulfide oxidizing bacteria for odorous surface water bioremediation[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 290: 121721.
- [29] 徐鹏. 孤岛污水深度处理配聚试验研究[J]. *环境工程*, 2015, 33(S1): 1008-1010, 1017.
- XU P. Experimental study on further treatment of wastewater to prepare polymer in Gudao Oilfield[J]. *Environmental Engineering*, 2015, 33(S1): 1008-1010, 1017 (in Chinese).
- [30] 陈莉, 赵艺, 周雨洁, 李伟光. 一株耐高温硫氧化菌爱媛类芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 25-38.
- CHEN L, ZHAO Y, ZHOU YJ, LI WG. Isolation, identification and fermentation optimization of a thermophilic sulfide-oxidizing strain *Paenibacillus ehimensis*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 25-38 (in Chinese).
- [31] 国家环保局本书编委会. 水和废水监测分析方法(第四版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- Editorial Committee of the National Environmental Protection Agency. *Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods (Fourth Edition)*[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).
- [32] WANG LY, HUANG ZL, LI G, ZHAO HX, XING XH, SUN WT, LI HP, GOU ZX, BAO CY. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 851-858.
- [33] 赵苗苗, 李茹, 李翰林, 李飞洋. 低温等离子体诱变选育高效脱硫菌的研究[J]. *应用化工*, 2016, 45(2): 240-244, 248.
- ZHAO MM, LI R, LI HL, LI FY. Study on breeding of efficient desulfurization bacteria muted by low temperature plasma[J]. *Applied Chemical Industry*, 2016, 45(2): 240-244, 248 (in Chinese).
- [34] LIU RM, LIANG LY, MA JF, REN XY, JIANG M, CHEN KQ, WEI P, OUYANG PK. An engineering *Escherichia coli* mutant with high succinic acid production in the defined medium obtained by the atmospheric and room temperature plasma[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(11): 1603-1609.

- [35] YUAN L, WANG L, MA K. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55(1): 17-22.
- [36] HUA XF, WANG J, WU ZJ, ZHANG HX, LI HP, XING XH, LIU Z. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(2): 201-206.
- [37] GUO T, TANG Y, XI YL, HE AY, SUN BJ, WU H, LIANG DF, JIANG M, OUYANG PK. *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by atmospheric pressure glow discharge producing high proportions of butanol and solvent yields[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(12): 2379-2383.
- [38] 纪梦梦, 吴晓刚, 吴欣欣, 吴巧玉, 李冀, 秦先超, 张晓君. 过量施肥对设施菜田土壤菌群结构及 N_2O 产生的影响[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(6): 1323-1332.
- JI MM, WU XG, WU XX, WU QY, LI J, QIN XC, ZHANG XJ. Effect of overuse nitrogen fertilizer on bacterial community and N_2O emission from greenhouse soil[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(6): 1323-1332 (in Chinese).
- [39] ZHANG QP, WU YQ, WANG J, WU GJ, LONG WM, XUE ZS, WANG LH, ZHANG XJ, PANG XY, ZHAO YF, ZHAO LP, ZHANG CH. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27572.
- [40] 贡俊, 张肇铭, 王玉芬, 杨官娥, 郑军, 程红兵, 李保珍. 一株高效脱硫菌的分离鉴定和脱硫特性研究[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(11): 2031-2036.
- GONG J, ZHANG ZM, WANG YF, YANG GE, ZHENG J, CHENG HB, LI BZ. Isolation, identification and desulfurization characteristics of an efficient desulfurization strain[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(11): 2031-2036 (in Chinese).
- [41] 董晓莹, 赵勇, 寇巍, 李世密, 曲静霞, 张大雷. 一株脱硫菌的鉴定及其对 H_2S 的降解能力[J]. *生态与农村环境学报*, 2012, 28(2): 213-216.
- DONG XY, ZHAO Y, KOU W, LI SM, QU JX, ZHANG DL. Identification of a desulfurizing strain and its H_2S degrading capacity[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2012, 28(2): 213-216 (in Chinese).
- [42] 张建斌, 梅清科, 张通, 刘占英, 刘丽华, 张冬艳. 一株耐高温碱性脱硫菌的分离及脱除 Na_2S 的性能研究[J]. *内蒙古工业大学学报(自然科学版)*, 2011(2): 123-128.
- ZHANG JB, MEI QK, ZHANG T, LIU ZY, LIU LH, ZHANG D. Isolation of a thermophilic alkaline desulfuricant strain and its biological decomposition of Na_2S [J]. *Journal of Inner Mongolia University of Technology (Natural Science Edition)*, 2011(2): 123-128 (in Chinese).
- [43] LI HP, LI J, ZHAO XT, WANG LY, FANG C, SU N, ZHANG C, XU Y, LV M, LI MJ, XING XH. Applications of cold atmospheric plasmas (CAPs) in agriculture: a brief review and the novel development of a radio-frequency CAP jet generator for plant mutation[J]. *Plasma Science and Technology*, 2022, 24(9): 093001.
- [44] KRISTJÁNSSON JK, HJÖRLEIFSDÓTTIR S, MARTEINSSON VT. *Thermus scotoductus*, sp. nov., a pigment-producing thermophilic bacterium from hot tap water in Iceland and including *Thermus* sp. X-1[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1994, 17(1): 44-50.
- [45] SKIRNISDÓTTIR S, HREGGVIDSSON GO, HOLST O, KRISTJÁNSSON JK. Isolation and characterization of a mixotrophic sulfur-oxidizing *Thermus scotoductus*[J]. *Extremophiles*, 2001, 5(1): 45-51.