

# 除硫菌剂的工业化生产条件研究与应用

杨帆<sup>1,2</sup>, 孟章进<sup>1,2</sup>, 姜桂英<sup>1</sup>, 钱志鸿<sup>1,2</sup>, 王志明<sup>1</sup>

(1. 中国石化江苏油田分公司工程技术研究院, 江苏扬州, 225009; 2. 江苏省油气微生物工程研究中心, 江苏扬州, 225009)

**摘要:** 除硫菌 N411 是一种可以高效除硫的高温反硝化细菌, 为提高该菌的培养效能, 提高发酵水平, 开展了工业发酵培养基优化研究和工业生产条件研究。通过调整培养基中碳和氮的比例, 对基础培养基进行优化, 从 4 组配方中优化出最优培养基, 考察不同温度、pH 值和装液量对除硫菌生长状况的影响, 从而确定工业发酵条件。根据确定的发酵条件生产的除硫菌剂, 经平板活菌计数法测定的菌数可达  $2.2 \times 10^8$  CFU/mL。

**关键词:** 除硫菌; 培养基; 工业发酵

**中图分类号:** Q939.97 **文献标志码:** A

## Study and application of industrialized production conditions of sulfur removal bacteria

YANG Fan<sup>1,2</sup>, MENG ZhangJin<sup>1,2</sup>, JIANG Guiying<sup>1</sup>, QIAN Zhihong<sup>1,2</sup>, WANG Zhiming<sup>1</sup>

(1. Petroleum Engineering Technology Research Institute of Jiangsu Oilfield Company, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Oil and Gas Microbial Engineering Research Center, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Desulfurization bacteria N411 is a kind of high-temperature denitrifying bacteria that can remove sulfur efficiently. In order to improve the culture efficiency and fermentation level of N411, it was carried out studies on the optimization of industrial fermentation medium and production conditions. The basic medium was optimized by adjusting the proportion of carbon and nitrogen in the medium, and the optimal medium was obtained from the four sets of formulas. The effects of temperature, pH value, and liquid volume on the growth of sulfur removal bacteria were investigated to determine industrial fermentation conditions. According to the sulfur removal bacteria produced under the determined fermentation conditions, the number of bacteria can reach  $2.2 \times 10^8$  CFU / mL by the plate viable bacteria counting method.

**Key words:** sulfur removal bacteria; culture medium; industrial fermentation

微生物人工培养和自然条件下的生理特性有很大的不同, 影响合成代谢产物能力的因素也有相当大的差异, 其中培养基对微生物的各种代谢活动的影响最为显著<sup>[1-2]</sup>, 培养基的成分对菌体生长繁殖、产物的生物合成、产品的分离及产品质量和产量都有重要影响, 除此之外, 温度、pH 值、装液量等操作条件也是影响微生物生长的因素<sup>[3-4]</sup>。因此, 微生物培养条件的优化非常重要。N411 是一株高温除硫菌, 为提高该菌的培养效能, 提高发酵水平, 从温度、pH 值、摇瓶装液量 3 个因素着手, 开展了工业发酵培养基和发酵条件研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 发酵培养基优化

按照表 1 的组成成分设计发酵培养基, 比较不

同配方条件下 N411 菌株的生长增殖情况, 以确定合适发酵生产的培养基。

### 1.2 检测方法

**比浊法:** 取一定量摇瓶液, 稀释不同倍数后, 用紫外分光光度计测定波长为 600 nm 的吸收值 ( $OD_{600}$ )。

**平板菌落计数法:** 取摇瓶液 1 mL, 分别稀释至 10~5、10~6、10~8 倍 (由预试验得出), 取 0.1 mL 的稀释菌液涂布于固体培养基平板上, 培养 1 d 后, 计算摇瓶液中的活菌数。

细菌数 (CFU/mL) = 平板上菌落数 × 稀释倍数 /

收稿日期: 2021-04-20; 改回日期: 2021-08-13。

第一作者简介: 杨帆 (1983—), 女, 副研究员, 从事油田微生物技术研究。E-mail: yangfan.jsyt@sinopec.com。

表 1 发酵配方设计

g

培养基	XSN	TDAX	NMSN	YSN	PTT	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	FeCl <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>	JMG	H <sub>2</sub> O
配方 1	1.25	0.5		1	1			0.5	0.5	0.025	0.05	0.25	500
配方 2	1.0	0.5		1	1			0.5	0.5	0.025	0.05	0.25	500
配方 3	1.0	0.5		1	0.5			0.5	0.5	0.025	0.05	0.25	500
配方 4	0.84	0.5		1	1			0.5	0.5	0.025	0.05	0.25	500
CK	0.84	0.5	4.25	1	1	0.22	0.205		0.5	0.025	0.05	0.25	500

平板上加菌液的量(mL)。

pH 检测:定期取样,以 4.0~9.0 精密 pH 试纸检测。

2 结果与分析

2.1 除硫菌的发酵培养基优化研究

2.1.1 发酵培养基碳源筛选

以 XSN 为基本氮源,保持质量浓度 10 g/L 和其他基础培养基成分配比不变,分别设置 2 g/L PTT、3 g/L YMF、1 g/L PTT +1.5 g/L YMF 作为不同碳源处理,调节培养基最终 pH 为 7.0,50℃ 培养并观察菌体生长情况,明确不同碳源条件下除硫菌 N411 的增殖影响。

以 YMF 作为多糖部分或全部替代 PTT 测定除硫菌 N411 对多糖的分解利用能力(图 1)。试验结果表明,2 g/L PTT 作为碳源培养条件下菌体生长较好,50℃ 培养 16 h 后菌体达最大浓度,1 g/L PTT+3 g/L YMF 的细菌繁殖量明显低于 20 g/L PTT 处理。以 5 g/L YMF 替代 PTT 的培养基中除硫菌 N411 繁殖速度慢,12 h 达最大高峰期,表明除硫菌 N411 能有效利用 PTT 等单糖作为碳源,而对 DF 为碳源的多糖降解利用能力较弱,在试验浓度范围内,菌体增殖能力与培养基 PTT 浓度成正相关。

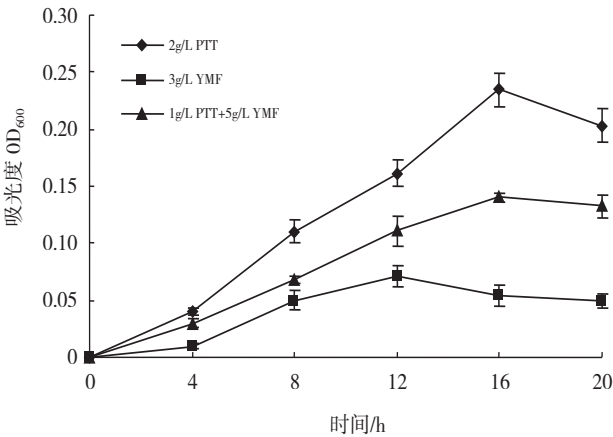


图 1 不同碳源培养基对除硫菌 N411 发酵培养的影响

2.1.2 发酵培养基氮源筛选

以 PTT 为基本碳源,保持质量浓度 2 g/L 和其他基础培养基成分配比不变,分别设置 4 g/L XSN、6 g/L 豆饼粉、2 g/L XSN+3 g/L 豆饼粉等不同氮源处理,调节培养基最终 pH 为 7.0,50℃ 培养并观察菌体生长情况,明确不同氮源条件下除硫菌 N411 的增殖影响(图 2)。

在以 2 g/L PTT 为碳源的基础培养基中,以豆饼粉作为氮源部分或全部替代无机氮 NaNO<sub>3</sub>,测定除硫菌 N411 对有机氮的利用能力。试验结果表明,4 g/L XSN 作为氮源培养条件下菌体生长较好,50℃ 培养 16 h 后菌体达最大浓度。2 g/L XSN+3 g/L 豆饼粉的处理中,细菌繁殖量明显低于 4 g/L XSN 的氮源处理,且培养 16 h 后菌体自溶,浊度下降。以 6 g/L 豆饼粉替代 XSN 作为氮源的培养基中,除硫菌 N411 几乎不能繁殖生长,表明除硫菌 N411 能有效利用 XSN 等无机氮作为氮源,而对蛋白质为主要成分的豆饼粉作为有机氮源几乎不能利用。在试验浓度范围内,菌体繁殖生长与 XSN 浓度成正相关。

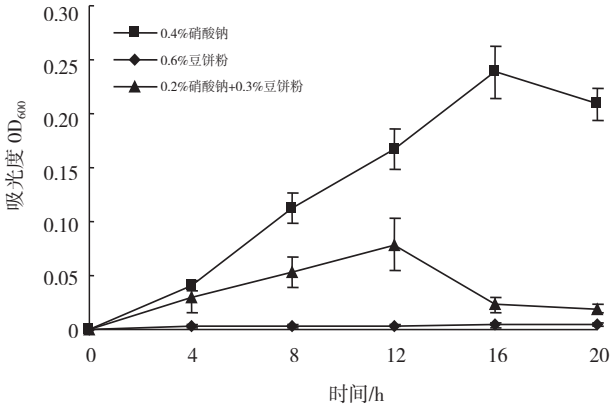


图 2 不同氮源培养基对除硫菌 N411 发酵培养的影响

2.1.3 发酵培养基优化

在明确除硫菌 N411 适宜碳源、氮源基础上,通过调整培养基中碳、氮比例对基础培养基进行优化(见表 1)。

培养基各组成成分的变化直接影响了除硫菌

N411的菌体生长。基础培养基以PTT、XSN为基本碳、氮源,能提供菌体发酵培养的一般需求,但发酵周期短,生长不整齐,16 h达最大 $OD_{600}$ 值,镜检呈现芽孢、孕孢及营养体多种菌体形态。通过对基础培养基配方调整试验表明,XSN和PTT是影响除硫菌发酵培养的关键营养因子,其含量和比例直接影响了菌体的发酵水平和发酵周期。在试验范围内,菌体生长量与XSN含量成显著正相关,同时PTT含量也显著影响除硫菌的生长。试验结果表明配方1、配方2都能获得较高菌数的发酵培养液,培养44 h平板测定单位活菌数分别达 $6.6 \times 10^7$  CFU/mL和 $2.1 \times 10^7$  CFU/mL,可以在此范围内优化发酵培养基以提高除硫菌N411的发酵水平。

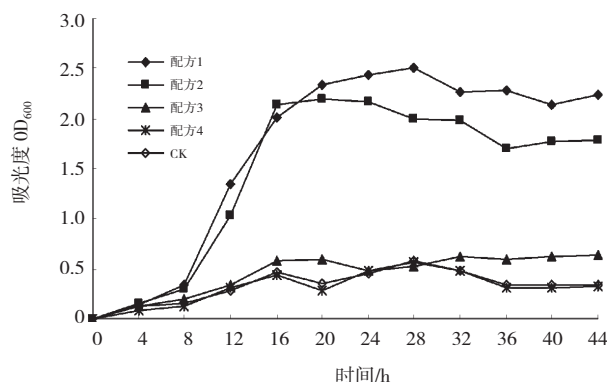


图3 除硫菌N411在不同组成培养基中的生长繁殖动态

## 2.2 除硫菌的发酵培养控制条件研究

### 2.2.1 不同温度条件对除硫菌生长发育的影响

不同温度条件试验结果表明,除硫菌N411的生长对温度具有较高的要求,以50~60℃为宜。试验在40℃条件下培养24 h,孢子几乎不萌发。在60℃条件下培养孢子萌发率最高,平均达236 CFU/皿,随温度的提高,孢子萌发率有所下降(图4)。从菌落生长速度来看,萌芽的菌体随温度的升高生长速度加快,以60℃温度培养单菌落最多,说明60℃更适合菌体生长(图5)。

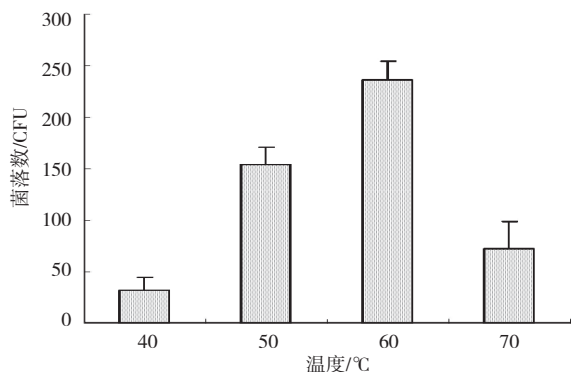


图4 不同温度对除硫菌的孢子萌发的影响

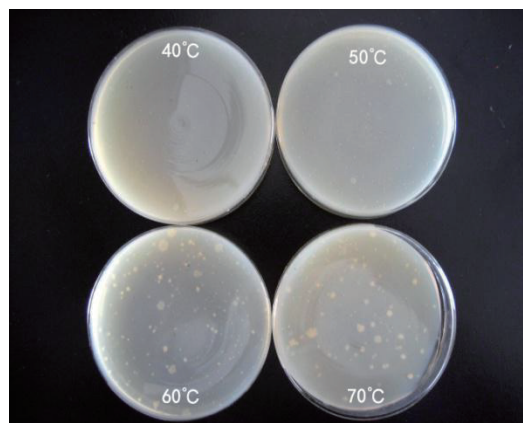


图5 不同温度对除硫的菌落生长影响

### 2.2.2 不同pH值对除硫菌孢子萌发的影响

将培养基以1 mol/L HCl或NaOH调节pH值分别为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5和8.0等不同酸碱度,按照方法接入1 mL稀释的孢子悬浮液,置于60℃生化培养箱中观察培养,24 h检查培养基平板表面形成的菌落数,明确不同pH条件对除硫菌N411孢子萌发的影响。

不同pH条件显著影响除硫菌N411的孢子萌发( $F=46.861$ ,  $P=0.000$ )。pH为4.0的酸性条件下,孢子萌发受到显著抑制,培养24 h几乎不萌发。在酸性条件下随着pH值的升高,孢子萌发率逐步提高,pH值中性(pH 7.0)条件下达最大值,单位菌落数达237个。碱性条件同样抑制芽孢的萌发,pH值大于8.0以上孢子60℃培养24 h几乎不萌发。说明除硫菌适合在中性条件下生长(图6)。

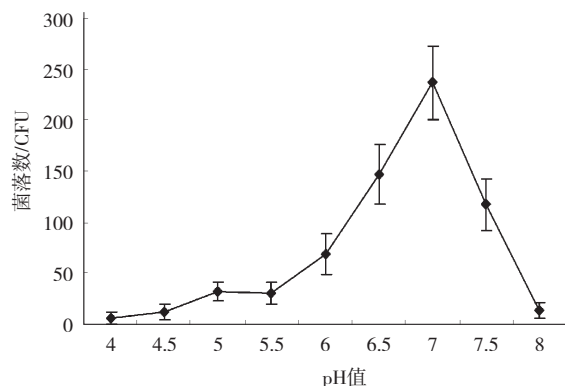


图6 培养基不同pH值对除硫菌芽孢萌发的影响

### 2.2.3 不同装液量对除硫菌生长状况的影响

在50 mL的灭菌的培养基中加入1 mL除硫菌孢子悬浮液并充分摇匀。分别取4 mL、8 mL、12 mL加入15 mL的指形管中,每处理重复6次。以硅胶塞封口后,置于60℃、230 r/min的摇床上震荡培养。间隔4 h分别取出不同装液量的试管1支,测定 $OD_{600}$ 值、pH值,并显微镜染色观察细菌生长状况。



不同装液量直接影响了培养基中的溶氧浓度,进而影响好氧微生物的生长。装液少,液体与空气接触面积大,溶氧量增加,反之则溶氧量减少。试验结果表明,除硫菌 N411 在不同溶氧条件下都能繁殖生长,但溶氧量的大小影响到菌体的生长速度,充足的溶氧量有利于芽孢的形成。4 mL/管装液

量生长发育速度快,整齐度高,12 h 达菌体最高浓度,OD<sub>600</sub> 值达 0.281,伴随着芽孢形成,pH 逐渐上升,24 h 大部分芽孢脱落完成生长周期。随装液量的增加,菌体生长速度减缓,发育进度加长,12 mL/管装液量 24 h 菌体形态仍处于营养体阶段,pH 值为 7.0,未见芽孢形成(表 2)。

表 2 不同装液量摇菌试验对除硫菌 N411 菌体生长发育的影响

时间/h	发育状况			OD <sub>600</sub> 值			pH 值		
	4 mL	8 mL	12 mL	4 mL	8 mL	12 mL	4 mL	8 mL	12 mL
0	芽孢	芽孢	芽孢	0	0	0	7.0	7.0	7.0
4	营养体	营养体	营养体	0.201	0.179	0.194	6.5	6.5	6.4
12	孢囊形成	营养体	营养体	0.281	0.258	0.266	6.7	6.7	6.8
16	芽孢脱落	孢囊形成	营养体	0.259	0.265	0.270	7.0	6.7	7.0
20	孢囊芽孢	芽孢脱落	营养体	0.255	0.273	0.272	7.2	7.0	7.0
24	芽孢	孢囊芽孢	营养体	0.249	0.279	0.270	7.3	7.1	7.0

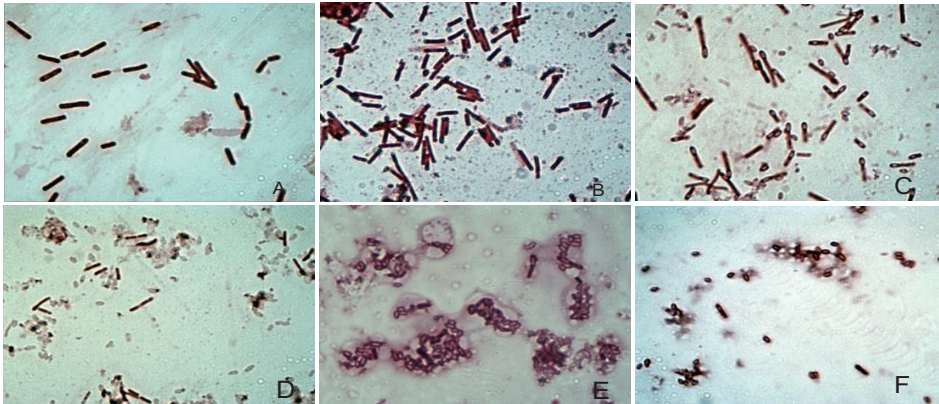
2.3 除硫菌工业发酵过程控制研究

2.3.1 除硫菌的发酵周期及菌体形态观察

除硫菌在配方 1 的培养基中,按照控制参数培养,24 h 完成发酵周期。接种后 4 h,孢子萌发产生营养体并进行对数生长;接种后 8 h 菌数显著增多,处于对数生长后期,以营养体形态存在;接种 12 h 后细菌在营养体一端开始形成孢囊;接种后 16 h,形

成孢囊的菌体自溶并释放出芽孢,20 h 后大部分芽孢脱落并聚集;24 h 后反应体系中主要以芽孢形式存在,脱落的芽孢二次萌芽生长(图 7)。

终止培养取样测定 OD<sub>600</sub> 值达 2.327,显著高于对照 0.396 的 OD<sub>600</sub> 值,平板活菌数测定结果表明工业发酵生产的除硫菌 N411 菌数达 2.2×10<sup>8</sup> CFU/mL (图 8)。



A: 4 h; B: 8 h; C: 12 h; D: 16 h; E: 20 h; F: 24 h

图 7 除硫菌 N411 在 8M<sup>3</sup> 发酵体系中菌体生长发育形态

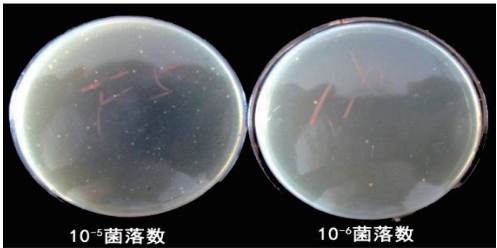


图 8 工业发酵除硫菌活菌数测定

2.3.2 除硫菌发酵过程 pH 值变化

伴随着发酵过程进行,N411 反应体系的 pH 值也随之变化。接种时培养基 pH 值为 7.0,孢子萌发进入营养生长阶段,培养 4 h 后取样检测 pH 值下降至 6.5。随着溶氧增加、蛋白质代谢增强,pH 逐步提高,接种后 12 h pH 值升高到 7.2。16 h 后 pH 上升至 7.5,营养体形态的菌体开始形成孢囊,伴随着细胞

自溶,芽孢释放,反应体系pH值上升为7.7(图11)。

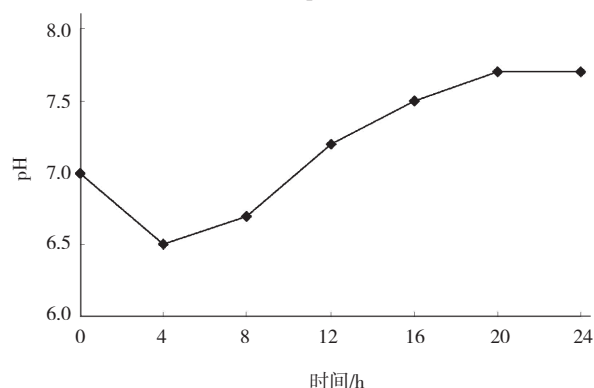


图11 除硫菌N411在发酵培养过程中pH的动态变化

### 3 结论

(1)培养基的优化研究结果表明,在碳源选择上,除硫菌N411能有效利用PTT等单糖作为碳源,而对DF为碳源的多糖降解利用能力较弱。在氮源选择上,除硫菌N411能有效利用XSN等无机氮作为氮源,而蛋白质为主要成分的豆饼粉作为有机氮源几乎不能利用。

(2)N411发酵控制条件以温度、pH、装液量(溶氧)为主要参数。通过实验确定温度为60℃,pH值为7.0,装液量为26.7%。

(3)采用制定的发酵工艺和控制条件完成了除硫菌N411的工业发酵生产。所得发酵产品平板活菌数达 $2.2 \times 10^8$  CFU/mL,且菌体整齐度高,无杂菌。

#### 参考文献:

- [1] 吴立新,吴祖芳.短小芽孢杆菌脂肪酸羟基化发酵特性与培养条件优化[J].食品与生物技术学报,2011,30(4):602-608.
- [2] 欧平,梁静娟,庞宗文.一株产大豆蛋白酶的芽孢杆菌发酵条件的优化[J].食品研究与开发,2011,32(2):133-139.
- [3] 范超,黎继烈,吴浩,等.重组巨大芽孢杆菌产青霉素G酰化酶发酵条件研究[J].中南林业科技大学学报,2011,31(7):124-129,135.
- [4] 纪明山,王毅婧.地衣芽孢杆菌生防菌株SDYT-79发酵条件优化[J].沈阳农业大学学报,2011,42(2):164-169.

(编辑 韩枫)

(上接第115页)

(2)热采井的快速腐蚀现象是由于在井筒中高温、氯离子和氧共同存在导致的,且氯离子和氧浓度越高,腐蚀速率越高。

(3)通过改善热采工艺方案,降低井筒中氯离子和氧的浓度,可有效防止井筒管柱腐蚀现象。

#### 参考文献:

- [1] 李萍,刘志龙,邹剑,等.渤海旅大27-2油田蒸汽吞吐先导试验注采工程[J].石油学报,2016,37(2):242-247.
- [2] 邹剑,韩晓冬,王秋霞,等.海上热采井耐高温井下安全控制技术[J].特种油气藏,2018,25(4):154-157,163.
- [3] 张博,林珊珊,李科研,等.海上深层稠油热采吞吐高效隔热措施研究[J].海洋石油,2019,39(2):35-39.
- [4] 罗珊,吴婷,袁伟杰,等.渤海油田蒸汽吞吐试验井注汽压力影响因素分析[J].海洋石油,2019,39(1):24-27.
- [5] 李军,李恩林,王曼依,等.海上稠油泡沫堵水技术研究与应用[J].海洋石油,2016,36(1):60-63.

- [6] 王威,陈国民,陈琦,等.海管立管腐蚀缺陷修复补强技术及矿场应用[J].海洋石油,2017,37(4):85-88.
- [7] 田红政.富含CO<sub>2</sub>凝析气井的腐蚀与防腐技术[J].海洋石油,2006,26(2):68-74.
- [8] 顾春元,狄勤丰,王掌洪.N80钢在地层水中的应力腐蚀行为研究[J].石油学报,2006,27(2):141-144.
- [9] 张智,刘志伟,谢玉洪,等.井筒载荷—腐蚀耦合作用对碳钢套管服役寿命的影响[J].石油学报,2017,38(3):342-347,362.
- [10] 姬辉,孙玉豹,张卫行,等.基于多弹簧—空间梁有限元模型的海上热采管柱力学分析[J].海洋石油,2017,37(4):89-93.
- [11] 田敬元.注水管柱失效分析及改进[J].海洋石油,2018,38(2):27-31.
- [12] 游明锐,金平,谭晓明,等.温度和氯离子浓度对30CrMnSiNiA腐蚀速率的影响研究[J].装备环境工程,2017,14(9):93-98.
- [13] 王世杰.CO<sub>2</sub>驱油田注采井油套管腐蚀速率控制值[J].腐蚀与防护,2015,36(3):218-220,280.

(编辑 韩枫)