

一株耐热石油烃降解菌的细胞疏水性及乳化、润湿作用研究

张明露¹ 马挺¹ 李国强¹ 汪卫东² 李希明² 梁凤来^{1*} 蔡宝立¹ 刘如林¹

(1. 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津市微生物功能基因组学重点实验室

南开大学生命科学学院 天津 300071)

(2. 中国石化胜利油田分公司采油工艺研究院 东营 257000)

摘要: 从胜利油田油水样中分离到一株能够在 60℃ 高温条件下利用烃类产生生物表面活性剂的菌株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)A1。结果表明: A1 的细胞表面具有很强的疏水性, 这有助于菌体细胞对烃类的摄取。该菌株对石油烃具有良好的乳化作用, 并可在 20% 的高盐环境和 100℃ 高温条件下仍显示很高的乳化活性。同时, A1 可明显改变油藏岩石表面的润湿性, 使其亲水性显著增强。对油藏中的岩石模拟试片石英、灰岩和玻璃作用后的接触角均减小 60% 以上。油藏中岩石的润湿性能增强, 水驱油时更易于剥落滞留在岩石表面上的油滴或油膜, 从而提高石油采收率。

关键词: 烃降解菌 A1, 疏水性, 乳化活性, 岩石表面润湿性

Cell-surface Hydrophobicity, Emulsification and Wetting Property of a High Temperature Hydrocarbon-degrading Strain

ZHANG Ming-Lu¹ MA Ting¹ LI Guo-Qiang¹ WANG Wei-Dong² LI Xi-Ming²
LIANG Feng-Lai^{1*} CAI Bao-Li¹ LIU Ru-Lin¹

(1. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

(2. Oil Production Technology Research Institute, Shengli Oil Field Co. Ltd., Dongying 257000)

Abstract: A high temperature hydrocarbon-degrading strain, *Bacillus* sp. A1, was isolated from oil-water samples of Shengli oil field in Shandong Province. The cell-surface hydrophobicity of A1, emulsification to hydrocarbons and change of the wetting property of rocks treated by A1 were investigated in this paper. Three methods were used to determine the cell-surface hydrophobicity, CAM (Contact Angle Measurement), SAT (Salt Aggregation Test) and BATH (Bacterial adherence to hydrocarbon). The results showed that the cell-surface of A1 was strongly hydrophobic. The diesel oil can be well emulsified by A1, and the emulsion showed good tolerance to salinity, pH and temperature. The hydrophobicity of rocks surface decreased dramatically treated by A1 and the contact angles of quartz, limestone and glass fell more than 60%. If the hy-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 50674058); 中国石化集团重点基础科研项目(No. P06071-3)

* 通讯作者: Tel: 022-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn

收稿日期: 2008-01-21; 接受日期: 2008-04-07

drophilicity of the rocks is higher, the oil in the rocks could be recovered more easily.

Keywords: Hydrocarbon-degrading strain A1, Hydrophobicity, Emulsification, Wetting property of rocks

在烃类化合物的微生物降解过程中, 烃基质必须通过外层细胞壁才能进入细胞内被烃降解酶降解^[1,2]。因此, 烃基质的疏水性是微生物代谢、降解烃类的主要障碍。生物表面活性物质能使液相中烃乳化分散, 增大水相和油相界面的面积, 从而使微生物细胞更容易摄取烃。同时, 细胞表面的疏水性也影响细菌对石油烃类的粘附^[3,4], 如果细菌细胞表面疏水性强, 则非常利于细菌吸附于烃类表面。因此, 研究解烃菌的细胞表面疏水性对于探索其烃摄取机制及在石油开采和烃类污染的生物修复中的应用具有重要的理论指导意义。

作者从胜利油田高温油藏油水样中分离到 1 株能够在高温条件下利用烃产生生物表面活性剂的菌株。本文研究了该菌株的细胞表面疏水性和对石油烃的乳化性, 同时对该菌株改变油藏岩石表面的润湿性也进行了模拟研究, 本项研究可为菌株的实际应用提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 菌种

从胜利油田高温油藏油水样中筛选到一株能够在 60 °C 高温、以石油烃为碳源代谢产生表面活性剂的菌株。应用多相分类技术, 通过细菌的表型、生理生化指标、16S rDNA 和 G+C mol% 等实验, 确定该菌株的分类地位为芽孢杆菌属, 命名为 *Bacillus* sp. A1, 本研究室保存。 *E. coli* K12: 该菌株为亲水性细胞, 作为细胞疏水性能研究的对照菌株, 本院实验教学部提供。

1.2 培养基及缓冲液

基础无机盐培养基 (g/L): $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.50, KH_2PO_4 0.20, NaNO_3 2.0, CaCl_2 0.01, FeSO_4 0.01, MgSO_4 0.3, 酵母粉 0.5, 蔗糖 1.0, 液蜡 25 mL, 加蒸馏水至 1000 mL, pH 7.2。PUM 缓冲液 (g/L): K_2HPO_4 22.2; KH_2PO_4 7.26; Urea 1.8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 加蒸馏水至 1000 mL, pH 7.2。琼脂培养基(g/L): 琼脂粉 10, 甘油 100 mL, 加蒸馏水至 1000 mL。

1.3 接触角测量(CAM)

将菌株 A1 接种至基础无机盐培养基置 60 °C 恒温油浴振荡培养至对数期, 8000 r/min 离心 20 min,

收集菌体, 用无菌水洗涤 2 次, 用硝酸纤维素膜 (0.45 μm) 过滤, 使膜上菌体浓度大于 10^8 cells/mm²。将滤膜平铺在无菌琼脂培养基上, 室温放置 2 h 润湿均匀, 然后放在普通滤纸上干燥, 干燥后把滤膜放到接触角测量仪上测量其与蒸馏水的接触角^[5]。每张滤膜取不同位置的 6 个点来测量, 其平均值为接触角 θ 。

1.4 盐析聚集检测(SAT)

用 0.002 mol/L 的 NaH_2PO_4 (pH 6.8) 将 4.0 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 6.8) 以 0.2 mol/L 的梯度从 4.0 mol/L 稀释到 0.2 mol/L。将 A1 菌株培养至对数期, 离心收集菌体, 用 0.002 mol/L 的 NaH_2PO_4 溶液洗涤细胞 2 次后重悬, 使菌浓约为 10^{10} CFU/mL。取 10 μL 菌悬液置载玻片上, 与等体积 3.2 mol/L、1.8 mol/L 及 0.2 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液相混合^[6], 25 °C 下将载玻片轻轻摇动 2 min, 置显微镜下观察细菌发生聚集所需的最低 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度。

1.5 细菌对烃的粘附性(BATH)测试

该方法基于 Rosenberg 所提出的方法^[7]略有改进。将 A1 菌株培养至对数期后, 离心收集菌体, 用 PUM 缓冲液洗涤细胞 2 次后再悬于该缓冲液中。以 PUM 缓冲液为空白, 将菌悬液 OD_{400} 调至 0.200 ± 0.010 。取 1.0 mL 菌悬液置 1.5 mL 离心管中, 分别加入 0.20 mL 的各种烃(环己烷、十二烷、十六烷、二甲苯)于 25 °C 下温育 5 min, 剧烈振荡 60 s, 室温静置 15 min; 从离心管下层水相中快速吸取 0.8 mL 水溶液到另一新离心管中, 以 PUM 缓冲液为空白, 测其 OD_{400} , 重复 3 次取其平均值。细菌的疏水性用 CSH % 表示, $\text{CSH} \% = (\text{AB}_i - \text{AB}_t) / \text{AB}_i \times 100\%$, AB_i 为初始菌液的 OD_{400} 值, AB_t 为终末菌液的 OD_{400} 值。

1.6 乳化活性的测定

在带刻度的磨口试管中, 加入 6 mL 测试烃 (0#柴油) 和 4 mL 乳化活性物质溶液, 涡旋振荡器充分振荡 2 min, 室温静置 24 h 后测量乳化层高度, 以乳化指数 (Emulsification index, EI₂₄) 表示乳化物质的乳化活性, 如 $\text{EI}_{24} > 50\%$, 则表示该乳状液稳定^[8]。

$$\text{乳化指数 EI}_{24} = \frac{\text{乳化层高度}}{\text{有机相总高度}} \times 100\%$$

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

1.7 油藏岩石表面润湿性模拟实验

油藏多为砂岩和碳酸盐岩地层, 石英是砂岩的主要成分, 可用作模拟砂岩油藏, 其润湿性为偏亲水; 灰岩的主要成分为碳酸盐, 可模拟碳酸盐岩地层, 它的润湿性近中性; 玻璃本身表面光滑, 润湿性为强亲水性。分别取预处理后的石英、灰岩和玻璃试片放入蒸馏水和 A1 菌株的培养液中, 置 60 恒温作用 24 h, 取出试片用蒸馏水清洗、干燥后, 使用接触角测量仪测定试片的表面接触角。将试片放回原培养液中, 继续置 60 作用, 于 2 d、3 d、4 d、5 d 和 6 d 后再分别测定试片的接触角。润湿性大小用接触角表示, $\theta < 90^\circ$ 时, 岩石润湿性为亲水, θ 越小, 润湿性越强; $\theta > 90^\circ$ 时, 岩石润湿性为疏水, θ 越大, 润湿性愈弱; $\theta = 90^\circ$ 时, 岩石为中等润湿性^[9,10]。

2 结果与讨论

2.1 A1 菌细胞表面的疏水性

2.1.1 接触角的测量: 依据接触角的测量标准^[5], 若细菌与水的接触角 $\theta > 90^\circ$, 表示菌体细胞疏水; 若 $\theta < 90^\circ$, 则说明该菌株亲水。测试结果显示(图 1), A1 菌与水的接触角为 96° , 表明该菌细胞呈疏水性; 对照株 *E. coli* 的接触角为 22° , 表示其细胞具强亲水性。

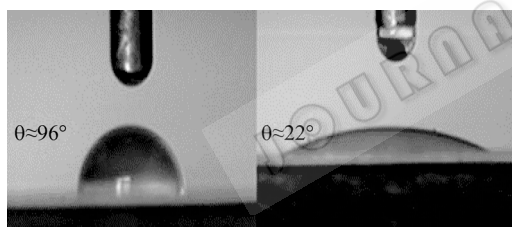


图 1 接触角的测试结果

Fig.1 Result of the contact angle test

Left: A1; Right: *E. coli*

2.1.2 盐析聚集检测: 细菌细胞与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液混合时可产生菌体细胞的聚集现象^[6], 细胞聚集时所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 摩尔浓度越低表示细胞疏水性越强。

图 2 结果表明, A1 菌株发生聚集现象所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 摩尔浓度仅为 0.2 mol/L, 作为亲水性对照菌株的 *E. coli* 发生聚集作用需高达 4.0 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 说明 A1 菌体细胞表面具有很强的疏水性。

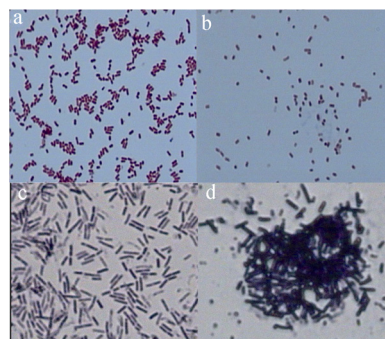


图 2 *E. coli* 与菌株 A1 的盐聚集光学显微照片

Fig. 2 Photomicrographs of *E. coli* (a, b) and bacteria A1 (c, d) in SAT (1000 \times)

a, c: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处理前; b, d: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 处理后

a, c: Normal conditions; b, d: Treated with ammonium sulfate

2.1.3 细菌对烃的粘附性: 一般情况, 如果细菌的 CSH% > 70 , 说明细菌细胞表面呈高疏水性; 如果 CSH% < 30 , 则显示细菌细胞表面高度亲水^[7]。细菌对烃的粘附性越强, 表明其细胞表面疏水性越强。由表 1 结果可见, A1 菌对 4 种测试烃类的粘附 CSH% 均高于 70, 表明其细胞表面的疏水性很强; 而作为对照组的 *E. coli* 对 4 种烃类的粘附 CSH% 都小于 30。据赵晴等报道^[11], 他们分离到的一株降解菌对二甲苯的 CSH% 为 68.8%, 而菌株 A1 对二甲苯的 CSH% 达到了 83%, 比其高出近 20%。

2.2 A1 菌对烃的乳化作用

大多细胞具有疏水性的解烃菌可产生表面活性剂, 该表面活性剂可对烃类化合物产生乳化作用^[12]。A1 解烃菌在以烃为碳源的生长代谢过程中, 可产生对烃具有良好乳化作用的表面活性剂, 并可将培养基质的表面张力由接种前的 72.6 mN/m 降至 40.5 mN/m。将 A1 菌发酵液和 0# 柴油混合, 涡旋振

表 1 通过不同方法测量的细菌细胞表面疏水性
Table 1 Different assays to measure bacterial cell surface hydrophobicity

Strain	CAM	SAI	CSH%			
			<i>c</i> -hexar	<i>n</i> -dodecar	<i>n</i> -hexadec	<i>p</i> -xylen
A1	$92.3^\circ \pm 2.5^\circ$	0.2	72	74	84	83
<i>E. coli</i>	$22.35^\circ \pm 1.5^\circ$	> 4.0	16	17	14	22

荡 2 min 静置 24 h 后, 可观察到明显稳定的乳化层(图 3 左), EI 24 达 80% 以上。该结果表明, A1 菌产生的表面活性物质具有良好的乳化性能; 可将石油烃完全乳化到基质中, 并形成稳定的乳状液。在相同的实验条件下, 水与 0[#]柴油形成的乳化层, 仅静置 2 min 便恢复到最初的油水分离状态(图 3 右)。

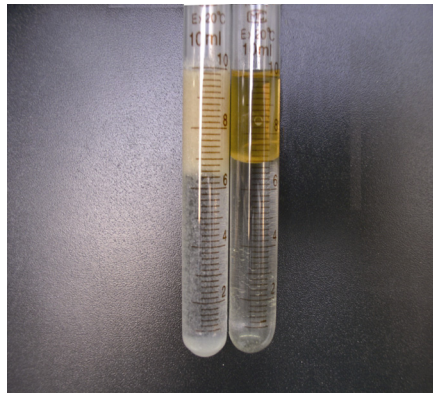


图 3 A1 菌株发酵液对柴油的乳化作用

Fig. 3 Emulsification of diesel oil by A1 fermentation liquor

左图: A1 发酵液; 右图: 水

Left: Fermentation liquor; Right: Water

在 NaCl 浓度为 0%~20% (W/V) 时, 菌株 A1 对柴油均表现出良好的乳化性能。如图 4 所示, 在 NaCl 浓度为 0%~2% 时乳化活性最高, 随着 NaCl 浓度升高, 乳化活性逐渐下降, 当 NaCl 浓度高达 20% 时, A1 菌对石油烃的乳化活性仍能保留接近 70%。

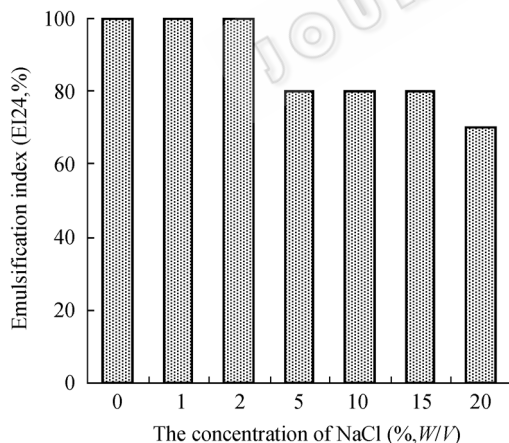


图 4 NaCl 浓度对乳化活性的影响

Fig. 4 Effect of NaCl on emulsification activity

菌株 A1 在 pH 5~9 环境下亦能表现出良好的乳化性能, 随着 pH 的升高, 乳化活性稍有一定增高。实验结果如图 5 所示。

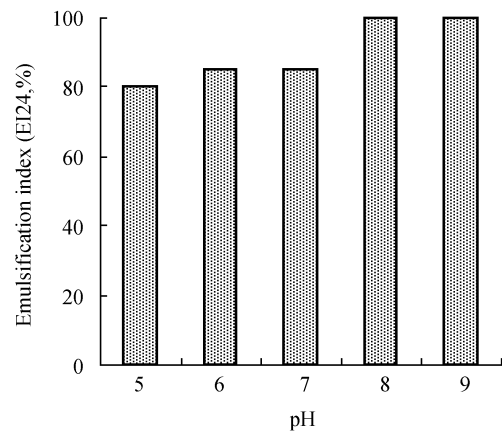


图 5 pH 对乳化活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on emulsification activity

将 A1 菌株发酵液与柴油混合, 分别置于 25 、 37 、 45 、 60 和 100 恒温油浴处理 24 h, 取出将混合液涡旋振荡 2 min 后再分别置于各自恒温温度, 静置 24 h 后测定不同温度下乳化液的乳化活性(图 6)。图 6 结果表明, 在 25 、 37 、 45 和 60 温度下, 菌株 A1 均显示出良好的乳化性能, 乳化活性均能达到 100%; 在处理温度为 100 时, 其乳化活性也能保持在 95% 以上。

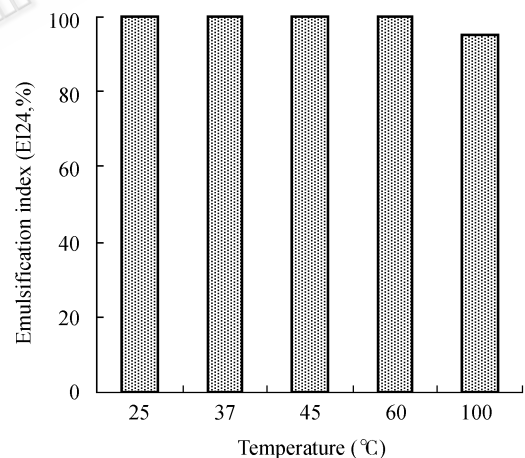


图 6 温度对乳化性能的影响

Fig. 6 Effect of temperature on emulsification activity

2.3 A1 菌株对岩石表面的润湿作用

具有疏水性细胞的解烃菌易结合于亲油性的岩石表面, 由解烃菌产生的表面活性剂除对石油烃进行乳化作用外, 另一个重要的功能是增强油藏岩石表面的润湿性^[10]。由表 2 可以看出, 石英、灰岩和玻璃 3 种表面性质不同的试片经过 A1 菌液作用以

后,接触角均有明显的降低,其中对玻璃试片作用后的接触角改变最为明显,未作用前玻璃的接触角是 95.53° ,菌液作用 6 d 以后降低为 26.45° ,接触角降低了 72%;而对照组玻璃经蒸馏水作用后,玻璃的接触角仅降低了 15.71%。另外,灰岩和石英试片经微生物作用后,接触角也分别降低了 68%和 61%,表明试片润湿性能增强,且作用时间越长,接触角越小。说明菌株 A1 具有显著改变岩石表面润湿性质的能力。

随着微生物对岩石表面作用时间的增长,油藏岩石的润湿亲水性逐渐增强,驱油动力越大,注入水越易剥落滞留在岩石表面上的油滴或油膜,越有利于提高油藏采收率。油藏中由于原油长期与岩石接触,原油中的胶质、沥青质、石蜡等有机组分吸附在岩石表面,使岩石逐渐转变为亲油,使剩余油滞留在岩石表面、孔隙角隅处和毛细管道中。通过改变岩石润湿性,使岩石亲水性增强,对采出这部分剩余油有重要意义。

表 2 玻璃、石英和灰岩经菌液作用后接触角变化情况
Table 2 Change of contact angle of glass, quartz and limestone

时间 Time 试片 Rocks	0	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	Contact angle decrease (%)
Glass	95.3	84.49	64.12	41.36	40.7	31.3	26.45	72
Quartz	94.7	91.20	46.41	36.51	36.3	32.7	30.50	68
Limestone	110.32	96.33	78.42	72.21	55.7	54.4	43.02	61

3 小结

分离到的耐热解烃菌 *Bacillus* sp. A1 能够在 60 °C 高温条件下利用烃类进行生长代谢,其细胞表面具有很强的疏水性,增强了细菌对烃类物质的吸附利用,同时菌株 A1 产生的表面活性剂对石油烃具有很好的乳化作用,能够将石油烃乳化成微小的颗粒,因此,初步推测菌株 A1 通过两种模式协同摄取烃类,目前尚没有关于协同摄取烃类的报道。对于菌株 A1 所产生的表面活性剂的成分尚未最后确定,还需进一步研究。另外,该菌株能够显著增强模拟岩石表面的润湿性,在油藏中,岩石亲水性增强,注入水更易于剥落滞留在岩石表面上的油滴,从而提高石油采收率。由于该菌株适用于高温油藏的微生物采油,并具有提高石油采收率的潜力,因此具有重要的实际应用价值。

参 考 文 献

- [1] Hua ZZ, Chen Y, Du GC, *et al.* Effects of biosurfactants produced by candida antarctica on the biodegradation of petroleum compounds. *World J Microbiol Biotechnol*, 2004, **20**(1): 25-29.
- [2] 张天胜. 生物表面活性剂及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2005, pp.111-115.
- [3] Shreve GS, Inguva S, Gunnam S. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, **4**(4): 331-337.
- [4] Pruthi V, Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techniques*, 1997, **11**(9): 671-674.
- [5] Van der Mei HC, Bos R, Busscher HJ. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Coll Surf B Bioint*, 1998, **11**(4): 213-221.
- [6] Jonsson P, Wadström T. Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT). *Curr Microbiol*, 1984, **10**(4): 203-209.
- [7] Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **42**(2): 375-377.
- [8] Plaza GA, Zjawiony I, Banat IM. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J Petro Sci Eng*, 2006, **50**(1): 71-77.
- [9] Tweheyo MT, Holt T, Torsæter O. An experimental study of the relationship between wettability and oil production characteristics. *J Petro Sci Eng*, 1999, **24**(2-4): 179-188.
- [10] Liu Y, Buckley JS. Evolution of wetting alteration by adsorption from crude oil. *SPEFE*, 1997, **12**(1): 5-11.
- [11] 赵 晴, 张甲耀, 陈兰洲. 疏水性石油烃降解菌细胞表面疏水性及降解特性. *环境科学*, 2005, **26**(5): 132-136.
- [12] Bury SJ, Miller CA. Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbon. *Environ Sci Technol*, 1993, **27**(1): 104-110.