

生物破乳菌的筛选及发酵条件的优化

李 旭 杨基先 马 放* 侯 宁 徐 畅

(城市水资源与水环境国家重点试验室 哈尔滨工业大学市政环境工程学院 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要: 生物破乳剂的开发可以降低油田乳状液对石油工业和生态环境的负面影响并减少化学破乳剂的使用量。本研究建立了一套高效、便捷的破乳菌筛选方法,并对破乳菌的发酵条件进行研究。利用大庆油田受石油污染土壤作为菌种来源,将 Tween 60-water(0.072%, *V/V*)和 Span 60-oil(0.028%, *V/V*)以 6.5:3.5 体积比配置出可以稳定 200 h 以上的 O/W 型乳状液,用于破乳菌破乳效能的评价。经过分离纯化、血平板试验、排油试验和破乳试验最终筛选出 2 株 24 h 平均排油率在 80% 以上的优势破乳菌,初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。通过该破乳菌发酵条件的优化得到,当温度为 25°C,摇床转速为 160 r/min, pH 值为 9, 接菌量为 20% 时该破乳菌生长速率最快,积累发酵产物的量最多;当温度为 35°C,摇床转速为 120 r/min, pH 值为 9, 接菌量为 2% 时该破乳菌代谢产物的破乳活性最高。

关键词: 生物破乳剂, 破乳菌, 乳状液, 培养条件

Selection of De-emulsification Strains and Optimization of Fermentation Conditions

LI Xu YANG Ji-Xian MA Fang* HOU Ning XU Yang

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

Abstract: Petroleum-field emulsions, which are produced in the process of exploration, production and recovery, represent a major environmental and processing problem for the petroleum industry. Biological demulsifier as a biological agent, will become a novel method of petroleum-field emulsions demulsifier instead of chemical demulsifier for its high efficiency, low cost, high adoptability, environment-friendly, repeated use. A set of high efficiency and convenient method was established to isolate de-emulsification strain and studied on the fermentation conditions of the de-emulsification strains. A de-emulsification strains, isolated from a petroleum-contaminated site, was evaluated for its de-emulsification capabilities using a kerosene/water model emulsion system keeping stable for more than 200 hours which was mixed by stirring Tween 60-water (0.072%, *V/V*) and Span 60-oil (0.028%, *V/V*) at the ratio (oil:water) of 6.5:3.5. We have isolated two strains with high and steady de-emulsification activity by separation and purification, blood-plate test, excluding-oil test and de-emulsifying test. The average de-emulsification rates were more than 80.0% at 24 h. The two strains are both belonging to *bacillus* by traditional and molecular genetic iden-

tification. By optimizing the demulsification bacteria fermentation conditions, the fermentation conditions, which is the most suitable for accumulating the fermentation products, were determined as follows: temperature 25°C, stirring speed 160 r/min, pH 9, inoculated quantities 20%. When the fermentation conditions were temperature 35°C, stirring speed 120 r/min, pH 9, inoculated quantities 2%, the fermentation products appeared the highest activities of demulsification.

Keywords: Biological de-emulsifier, De-emulsifying strain, Emulsion, Culturing conditions

在石油工业中,原油的开采、生产及油精炼等过程中会形成大量成分复杂的乳状液^[1]。特别是目前世界各国为了延长油田开采寿命普遍采用二次采油和三次采油技术,由于注入大量的水和表面活性剂,进一步加重了原油采出液的含水率和乳化程度。以中国石油天然气股份公司为例,截止到2002年底,其所属油田的采出液的含水率已高达83%。根据连续相和分散相的不同,油田乳状液主要分为W/O型、O/W型和O/W/O型乳状液。油田乳状液的存在会降低原油的品质,增加了精油提炼时的困难;原油含水量过高会引起运输管道和后续处理装置生锈、腐蚀,增加原油外输能耗(原油的运输标准要求原油中含有的沉淀物和水的含量不应高于0.5%^[2]);更为严重的是如果乳状液废水处理不当会对生态系统和生态环境(水体、土壤)造成严重的负面影响。目前我国以投加化学破乳剂作为油田乳状液的主要破乳方法,但该方法不但适应性差、投加大、脱水效率低、研发和运行费用高,而且化学破乳剂成分复杂,含有有机溶剂助剂,对工作人员和生态环境具有不良影响。生物破乳剂作为生物制剂的一种,具有破乳效率高、成本低、适应性高、环境友好、可重复使用等优点^[3],已经逐渐受到研究机构和石油工业的关注。

在20世纪70年代末,加拿大西安大略大学最早开始研究利用微生物对乳状液破乳。微生物破乳是指利用微生物细胞本身或其代谢过程、代谢产物实现乳状液破乳^[4]。生物破乳剂经历30多年的研究,

国内外研究人员通过筛选和试验,已经发现若干具有高破乳效能的生物破乳剂产生菌。目前已知嗜石油棒状杆菌(*Corynebacterium petrophilum*)和污泥诺卡氏菌(*Nocardia amara* LLSe6 27808)对各种复杂的油田乳状液和模型乳状液破乳效果较好^[5,6],酵母菌细胞可以利用乳状液生长并且具有破乳能力^[7],微球菌(*Micrococcus* sp.)对W/O型和O/W型2种类型乳状液均具有破乳效果^[8]。除此以外,橙色红球菌(*Rhodococcus aurantiacus*)和暗红球菌(*Rhodococcus rubropertinctas*)也具有不同程度的破乳效能^[9]。但目前可应用于实际原油乳状液破乳的高效工程破乳菌的种类尚少。本试验将针对生物破乳菌的筛选过程进行研究,摸索出一套行之有效的筛选方法,为工程生物破乳菌的开发应用奠定基础,同时对该破乳菌的发酵条件进行优化,为该生物破乳剂的实际的生产和应用做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源:本试验以大庆油田采油井井口长期受石油污染的土壤为菌源。分别从5座不同的井口取土样,去除表层受阳光长期照射的部分,将内层土壤置于4°C的冰箱内保存备用。

1.1.2 培养基:试验所用的培养基见表1。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物破乳菌的筛选与鉴定:1)微生物破乳菌的初筛流程见图1。

表 1 试验所用培养基 Table 1 Medium used in the tests				
编号 No.	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]
培养基名称 Medium	普通的无机盐培养基(MSM)	改进的牛肉膏蛋白胨培养基	改进的无机盐培养基(MMSM)	血平板培养基
用途 Use	富集培养	分离纯化	破乳菌筛选	血平板试验

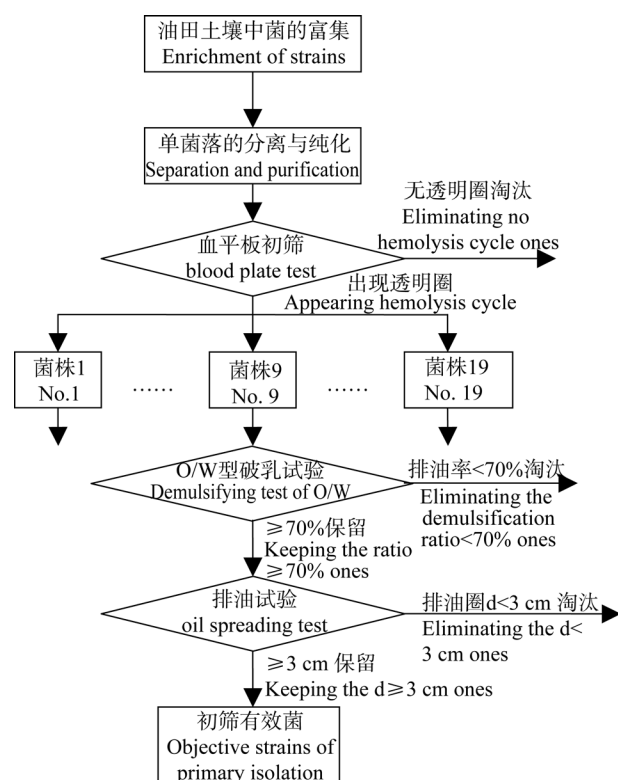


图1 破乳菌初筛流程图

Fig. 1 Technical route of primal selection of demulsifying bacterial strains

2) 生物破乳菌的筛选方法：a. 富集培养，在 5 个装有 150 mL 液体富集培养基 1[#]的 250 mL 三角瓶中各接种 10 g 新鲜土样(5 个三角瓶均为随机取样)，于 28℃、140 r/min 的摇床培养 72 h，之后依次将 25% 全发酵菌液转接到液体富集培养基 1[#]中，并将三角瓶标号为 1、2、3、4、5，以后的每次转接均按此号码对应进行。共转接 5 个周期(每个周期为 72 h)。

b. 采用平板划线法进行单菌落的分离与纯化。将获得的纯菌株斜面置于 4℃ 的冰箱内保藏。

c. 将分离纯化后的菌株进行血平板试验^[10]，于 30℃ 的生化培养箱内培养 24 h~48 h。选出现溶血现象的菌株保存于斜面上。

d. 将出现溶血现象的菌株，转接于装有 100 mL 3[#]培养基的三角瓶中，于 30℃、140 r/min 的摇床中培养 72 h。然后对全培养液进行破乳试验，选取排油率大于 70% 的菌株。

e. 利用排油试验对破乳能力较高的菌株进行进一步筛选^[11]，将排油率大于 75% 的菌株接种到装有 100 mL 3[#]培养基中，30℃、140 r/min 振荡培养 4 个周期后(每个周期 2 d~3 d)，进行排油试验。具体

做法：在培养皿中加 1/4 体积的蒸馏水，向水面上滴加 0.1 mL 煤油(煤油中含有少量的油红 O)，待形成油膜后，在油膜中心加入一滴菌液，测定菌液所能排开油圈的直径。选取排油圈直径大于 3 cm 的菌株。

3) 通过细菌形态观察、革兰氏染色、生理生化试验对所筛菌株进行鉴定^[12]。

1.2.2 破乳能力的测定方法：1) O/W 型乳状液的制备。用 Tween 60-water (0.072%, V/V) 和 Span 60-oil (0.028%, V/V) 两种原液以 6.5 : 3.5 (V/V) 混和，用转速 5000 r/min 乳化剪切机搅拌 3 min，可形成稳定时间在 200 h 以上的模型乳状液。利用稀释法和染色法鉴定所制备的模型乳状液为 O/W 型。

2) 破乳能力评价。参考石油天然气行业标准规定的瓶试法(SY/T5291-2000)中对破乳剂破乳能力的评价方法。向装有 5 mL 的模型乳状液的磨口具塞比色管中加入 2 mL 的全培养液，振荡混匀，静置于室温进行破乳。用 1 mL 的注射器定时量取排出油的体积，并进行排油率的计算。设配置乳状液加入的油体积为 V_0 ，破乳后产生的油体积为 V ，排油率按公式(1)计算：

$$\text{排油率}(\%) = \frac{VmL}{V_0mL} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 破乳菌发酵条件的优化：本试验设计一组正交试验，研究破乳剂产生菌的发酵条件对破乳菌发酵产物产量以及破乳效能两方面的影响，从中优化出破乳菌最佳的发酵条件。以测定 620 nm 处不同发酵条件下的吸光度值，作为衡量破乳菌生物量的标准。并通过破乳试验，测定排油率作为破乳效能的评价标准。

2 结果与分析

2.1 破乳菌株的筛选与鉴定

2.1.1 筛选结果：按图 1 的筛选方法在较短时间内初筛出具有较高破乳活性的菌株，分别得到以下结果：血平板培养初筛得到 19 株具有明显血溶性的生物表面活性菌。在初筛破乳试验中，从加入全培养液开始计算，3 h 左右部分菌株开始破乳，可以明显看到分散相液滴变大、凝聚，最终可以明显看到排出的油层。12 h 时有 16 株菌出现了不同程度的破乳现象；20 h 时有 5 株菌的排油率达到 85.0% 以上；72 h 时 19 株菌的排油率均达到 100%。比较破乳时

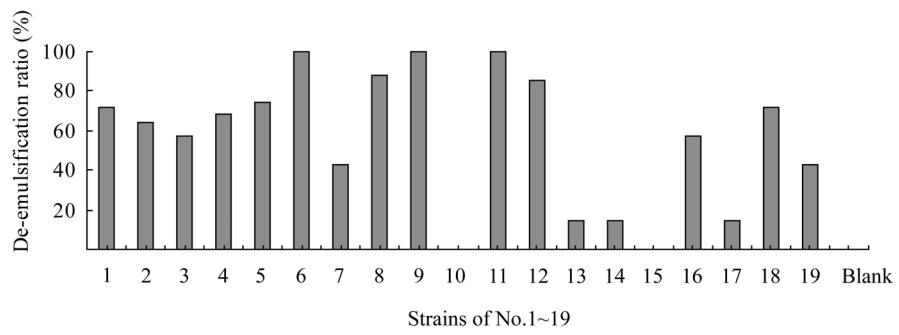


图 2 排油率比较图
Fig. 2 The demulsifying ratios chart

表 2 初筛结果 Table 2 The results of the primal selection								
编号 No.	1	5	6	8	9	11	12	18
24 h 破乳率(%) 24 h Demulsifying ratio (%)	71.4	74	100	88	100	100	85.7	85.7
排油圈直径(cm) Diameters (cm)	0	0	2.5	6.5	2.5	3	3	6.5
初筛菌株结果 Results				Yes		Yes	Yes	Yes

间为 24 h, 19 株菌的破乳情况, 见图 2。根据破乳试验和排油试验结果, 初筛得到 4 株优势破乳菌, 初筛结果见表 2。再经复筛得到 11 号、18 号菌 72 h 排油率为 100%, 排油圈直径 $d = 3.0$ cm; 而其余两株菌破乳效能不稳定, 因此最终得到破乳能力稳定的优势破乳菌株 2 株。

2.1.2 菌株的鉴定: 观察所筛菌株菌落形态, 其直径约为 3 cm, 菌体隆起, 表面粗糙, 边缘为不规则波浪型, 菌体成同心环状, 中心位置颜色较浅。对筛选得到 2 株破乳有效菌, 进行革兰氏染色和生理生化试验鉴定, 结果为革兰氏阳性菌, 直杆状有芽孢。经查阅《常见细菌系统鉴定手册》(2001 年版)确定该菌株属于芽孢杆菌属(*Bascillus*)。

2.2 破乳菌发酵条件的优化

通过前期对影响破乳菌特性的单因素培养条件的研究, 得知培养温度、摇床转数、pH 值、接菌量 4 个因素对于破乳菌的生长和破乳特性具有重大的影响。因此本试验选择以上 4 个因素作为研究对象, 设计四因子三水平的正交试验 $L_9(3^4)$, 优化该破乳菌的发酵条件。其中破乳菌发酵条件的因子与水平数, 见表 3。

表 3 破乳菌发酵条件正交因子与水平表 Table 3 The orthogonal factors and levels of the de-emulsification bacteria fermentation conditions			
因子 Factors	水平 1 Level 1	水平 2 Level 2	水平 3 Level 3
A: 培养温度(°C) A: Temperature (°C)	15	25	35
B: 摇床转数(r/min) B: Revolution of cradle (r/min)	80	120	160
C: 培养 pH 值 C: pH	5	7	9
D: 接菌量(%) D: Inoculated-pathogen quantities (%)	2	10	20

2.2.1 培养条件对发酵产物积累的影响: 按正交表 $L_9(3^4)$ 进行破乳试验, 结果列于表 4。

根据表 4 的结果, 进行极差比较和水平选优与组合选优, 得到以下结果: 极差比较得到 4 个因素的极差比较从小到大依次为 $|R|_C < |R|_A < |R|_D < |R|_B$ 。由此可知摇床转数, 即溶氧量对于破乳剂产生菌的发酵产量影响最大; 其次是种子液的接入量; 再次是培养温度; 对破乳剂产生菌发酵产量影响最小的是 pH 值。

表 4 破乳菌发酵条件正交试验的直观分析表(1)
Table 4 Orthogonal test intuitive analysis chart of the de-emulsification bacteria fermentation conditions (1)

列号 No.		A	B	C	D	24 h 的吸光度值 Absorbance values of 24 h
		1	2	3	4	
试 验 号 Test No.	1	1	1	1	1	0.455
	2	1	2	2	2	0.385(×10)
	3	1	3	3	3	0.900(×10)
	4	2	1	3	2	0.469(×10)
	5	2	2	1	3	0.544(×10)
	6	2	3	2	1	0.560(×10)
	7	3	1	2	3	0.229(×10)
	8	3	2	3	1	0.657(×10)
	9	3	3	1	2	0.465(×10)
	T_1	13.305	7.705	10.545	6.712	
	T_2	16	9.947	11.74	13.46	
	T_3	7.597	19.25	14.617	16.73	
	\bar{x}_1	2.96	1.71	2.34	1.49	$T=36.902$
	\bar{x}_2	3.56	2.21	2.61	2.99	
	\bar{x}_3	1.69	4.28	3.25	3.72	
	$ R $	1.87	2.57	0.91	2.23	

水平选优与组合选优得到最优组合是 $A_2B_3C_3D_3$, 即培养温度为 25℃, 摇床转数为 160 r/min, pH 值为 9, 接菌量为 20%。在此发酵条件下生物破乳菌的生长速度最快, 最有利于发酵产物的积累。

2.2.2 培养条件对该破乳菌破乳效能的影响: 按正交表 $L_9(3^4)$ 进行破乳试验, 结果列于表 5。
根据表 5 的结果, 进行极差比较和水平选优与组合选优。

表 5 破乳菌发酵条件正交试验的直观分析表(2)
Table 5 Orthogonal test intuitive analysis chart of the de-emulsification bacteria fermentation conditions (2)

列号 No.		A	B	C	D	24 h 排油率 Demulsifying ratios of 24 h(%)
		1	2	3	4	
试 验 号 Test No.	1	1	1	1	1	22.85
	2	1	2	2	2	5.71
	3	1	3	3	3	22.85
	4	2	1	3	2	68.57
	5	2	2	1	3	42.86
	6	2	3	2	1	17.14
	7	3	1	2	3	28.86
	8	3	2	3	1	88.57
	9	3	3	1	2	22.85
	T_1	51.41	120.28	88.65	128.56	
	T_2	128.57	137.14	51.71	97.13	
	T_3	140.28	62.84	179.99	94.57	
	\bar{x}_1	11.42	26.73	19.68	28.57	$T=320.26$
	\bar{x}_2	28.57	30.48	11.49	21.58	
	\bar{x}_3	31.17	13.96	40.00	21.02	
	$ R $	19.57	16.52	28.51	7.55	

极差比较得到 4 个因素的极差比较从小到大依次为 $|R|_D < |R|_B < |R|_A < |R|_C$ 。由此可知 pH 值对于破乳剂产生菌的发酵产物的破乳效能影响最大, 其次是培养温度, 再次是摇床转数, 对破乳剂产生菌发酵产物破乳效能影响最小的是种子液的接入量。

水平选优与组合选优得到最优组合是 $A_3B_2C_3D_1$, 故破乳剂产生菌的发酵产物破乳效能最高的发酵条件优化结果为, 培养温度 35°C 、摇床转数 120 r/min 、pH 值 9、接菌量 2%。

3 结论

1) 将表面活性剂产生菌的筛选方法与破乳菌自身特点相结合, 设计建立一套高效、便捷的生物破乳菌的筛选方法。筛选出 2 株高效破乳菌, 24 h 平均排油率大于 80%, 经鉴定均为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

2) 通过正交试验得到摇床转数对破乳菌的生长影响最大。当发酵条件为温度 25°C 、摇床转数 160 r/min 、pH 值 9、接菌量 20%时, 最有利于发酵产物的积累。

3) 得到影响发酵产物破乳活性的最主要因素是 pH 值。当发酵条件为温度 35°C 、摇床转数 120 r/min 、pH 值 9、接菌量 2%时, 该破乳菌发酵产物的破乳效能最高。

参 考 文 献

[1] Nadarajah N, Singh A, Ward OP. De-emulsification of pe-

troleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochemistry*, 2002a, **37**(10): 1135–1141.

[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.294–317.

[3] Park SH, Lee JH, Ko SH, *et al.* Demulsification of oil-in-water emulsions by aerial spores of a *Streptomyces* sp.. *Biotechnology letter*, 2000, **22**(17): 1389–1395.

[4] 黄翔峰, 闻 岳, 杨葆华, 等. 破乳菌种 TR-1 的筛选与破乳性能的试验研究. *油田化学*, 2006, **23**(2): 136–140.

[5] Gray NCC, Stewart AL, Cairns WL, *et al.* Bacteria-induced deemulsification of oil-in-water petroleum emulsions. *Biotechnology Letters*, 1984, **6**: 419–424.

[6] Stewart AL, Gray NCC, Carins WL, *et al.* Bacteria-induced de-emulsification of water-in-oil petroleum emulsions. *Biotechnology letters*, 1983, **5**(11): 725–730.

[7] Duvnjak Z, Kosaric N. De-emulsification of petroleum water in oil emulsions by selected bacterial and yeast cells. *Biotechnology letters*, 1987, **9**(1): 39–42.

[8] Das M. Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species. *Bioresource Technology*, 2001, **79**(1): 15–22.

[9] 方 云, 夏咏梅. 生物表面活性剂. 北京: 中国轻工业出版社, 1992, pp.210–265.

[10] Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, *et al.* Biosurfactants: potential applications in medicine. *Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, **57**(4): 609–618.

[11] Huang XF, Liu J, Lu LJ, *et al.* Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp.. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(3): 1358–1365.

[12] 马 放, 任南琪, 杨基先. 污染控制微生物学试验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002, pp.162–166.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。