

一株代谢煤油兼性厌氧菌的筛选鉴定和特性*

李庆忠 张忠智** 王洪君 罗一菁 唐玉萍

(石油大学化工学院环境中心 北京 102249)

摘要: 从大港油田的油层水样中分离得到一株能以煤油为碳源代谢生成表面活性剂、产酸和产气的菌株 DG7, 该菌为革兰氏阴性杆菌, 兼性厌氧, 运动, 能在 NaCl 浓度为 18.5% 的培养基中生长, 经鉴定, 可能为气单胞杆菌属 (*Aeromonas* sp.) 中的一个新种, 但还需进一步确定。

关键词: 菌种筛选, 菌种鉴定, 兼性厌氧菌

中图分类号: Q93-939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0028-05

SCREENING, IDENTIFICATION AND CHARACTERISTIC OF A STRAIN OF FACULTATIVE ANAEROBE METABOLIZING DIESEL

LI Qing-Zhong ZHANG Zhong-Zhi WANG Hong-Jun LUO Yi-Jing TANG Yu-Ping

(Center of Environmental Engineering, College of Chemical Engineering, University of Petroleum, Beijing 102249)

Abstract: The strain of DG7 isolated from the oilwater sample in DAGANG oilfield could produce surfactant, acids and gas in the culture medium in which the diesel was sole carbon source. The strain was Gram-negative, motive, rod and grew facultatively in the 0 to 18.5% NaCl. Based on its characters, the strain was identified as a member of the genus *Aeromonas*, but there were some differences between this strain and the described species of this genus in some biochemical features, suggesting that it could be a new species of the genus.

Key words: Strain screening, Strain identification, Facultative anaerobe

微生物提高原油采收率 MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) 是一项利用微生物自身的有益活动及其代谢产物来提高原油采收率的综合性技术。与其它 3 次采油技术相比, 微生物采油增进法具有适用范围广、工艺简单、投资少、见效快、多功能性、

* 重质油加工国家重点实验室开放基金资助项目 (No. 200018)

** 联系人

收稿日期: 2001-03-09, 修回日期: 2001-10-26

成本低、无污染等优点^[1],是目前最具发展前景的一项3次采油技术。微生物采油技术的关键是菌种的筛选,菌种要能在油藏条件下生存并代谢对驱油有利的代谢产物。由于油藏处于缺氧状态,而在使用处理过程中无法做到绝对无氧状态,故微生物采油所用菌种最好为兼性厌氧菌。兼性厌氧菌的优势还在于它可以在好氧条件下培养,注入地层后在厌氧环境中繁殖生长,大大缩短了在地面上的培养时间。我们在筛选微生物采油菌种时从大港油田的水样中筛选到一株兼性厌氧菌,并对其进行了性能评价和鉴定研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

采自大港油田的油层水样。

1.2 培养条件

富集培养采用煤油培养基,在摇床上培养,转速120r/min,30℃培养3~4d。煤油培养基^[2]:NH₄NO₃ 2.5g, Na₂HPO₄ 1.0g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g; MgCl₂·6H₂O 0.24g, NaCl 2.0g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, CaCl₂ 0.01g, ZnCl₂ 0.01g, 煤油 20.0g, 蒸馏水 1000mL, pH 6.9。

分离和纯化培养基为营养琼脂培养基,划线分离接种,在30℃培养箱中培养2d。穿刺缩进培养在30℃培养箱中培养2d。穿刺培养采用的培养基的组分^[3]:酪朊 17.0g, 大豆朊 3.0g, 葡萄糖 6.0g, 氯化钠 2.5g, 硫乙醇酸钠 0.5g, L-胱氨酸 0.1g, 酵母膏 5.0g, 琼脂 1.3g, 蒸馏水 1000mL, pH7.2。

微好氧培养是将接种后的医用小瓶用氮气置换5min,用万能胶密封,然后在摇床上培养,转速120r/min,30℃培养7d。微好氧培养基是在煤油培养基中加入硫乙醇酸钠0.5g。

1.3 性能评价

1.3.1 最大菌体浓度:事先活化菌株备用,取已活化的菌液10mL接种于盛有150mL煤油培养基的医用瓶中,用氮气置换10min,30℃振荡培养。于接种后的第0h、5h、8h、12h、18h、24h、1.5d、2d、2.5d、3d、4d、4.5d用UV-9100分光光度计测定菌液OD₆₀₀值。以OD₆₀₀值对时间作图,从生长曲线判断该菌株达到最大菌体浓度的时间。在菌体达到最大浓度时,用无菌注射器取样,按稀释倾倒法制平板,30℃培养2d后计数。

1.3.2 界面张力:用SD-9112旋转滴界面张力仪测定培养3d后的发酵液与煤油之间的界面张力。

1.3.3 发酵液的酸碱度:用Inolab pH Level I酸度计测定培养3d后的发酵液的酸度变化。

1.3.4 气体的产生:事先在液体培养基中放入一个改进杜氏小管,从管中无气泡来判断。

1.4 鉴定方法

主要按文献[4,5]的方法进行。

1.4.1 形态特征观察:个体形态:将已充分活化的待鉴定菌株接种到CM液体培养基^[5]中,30℃培养18h。进行革兰氏染色^[6](用已知革兰氏阳性菌或阴性菌混合涂片做对照),然后在光学显微镜下观察细菌细胞的形态、菌体大小及颜色。

鞭毛染色采用银染色法^[7]进行。将待鉴定菌株在新制备的 CM 斜面培养基上连续接种 4~5 次，每次培养 18~24h，然后用接种针将其点种于 CM 半固体平皿上，30℃ 培养 12~18h，取其菌落边缘菌体进行鞭毛染色，镜检。在鞭毛染色前，采用半固体穿刺培养测定其运动性。

芽孢染色采用孔雀绿染色法^[5]。芽孢染色前，进行芽孢试验以确定是否有芽孢。对有芽孢的菌株，进行芽孢染色，以观察芽孢的形态、大小、位置等情况。

菌落特征：将活化菌种在 CM 平皿上划线接种，30℃ 培养箱中倒置培养 2d，观察菌落形态，并测量菌落大小。

液体培养特征：将待鉴定菌株接种于 CM 液体培养基中，30℃ 培养 2d，观察生长状态。

斜面培养特征：将待鉴定菌株接种于 CM 斜面培养基上，30℃ 培养 2d，观察斜面特征。

1.4.2 生理生化特性测定：生长温度：将已经活化的待测菌株接种于 CM 液体培养基中，用氮气置换后分别置于 4℃、10℃、20℃、30℃、37℃、40℃、45℃、65℃ 恒温箱中培养，5d 后，测量 OD 值，绘制曲线，以确定其最适、最高、最低生长温度。测定 OD 值之前从 4℃、40℃、45℃、65℃ 的发酵液中取样，接种于营养琼脂平板上，30℃ 培养 2d，观察平板上是否有菌落长出。

耐盐性试验：将活化的待测菌株分别接种于含 0、0.5%、1%、2%、6.5%、10%、15%、16.5%、18.5%、20%、25%、30% 的 NaCl 的 CM 液体培养基中，用氮气置换后在 30℃ 培养 5d，测量 OD 值，以确定其最适、最高、最低盐浓度。测定 OD 值之前，分别将 0、0.5%、15%、16.5%、18.5%、20%、25%、30% 的发酵液接种于营养琼脂平板上，30℃ 培养 2d，观察菌落长出情况。

耐酸碱度试验：将活化的待测菌株分别接种于 pH 值为 3.5、4.5、5.0、5.5、6.2、6.8、7.2、7.6、8.0、9.0、9.6 的 CM 液体培养基中，用氮气置换后在 30℃ 培养 5d，测量 OD 值，以确定其最适、最高、最低 pH 值。测定 OD 值之前，从 3.5、4.5、5.0、8.0、9.0、9.6 瓶中分别取样，接种于营养琼脂平板上，培养 2d，观察菌落长出情况。

葡萄糖发酵试验：将糖发酵培养基制成穿刺培养基，然后将待测菌株穿刺接种，30℃ 培养 1d，2d，4d，7d，14d 观察结果。

其他生理生化试验：油脂水解、淀粉水解、酪蛋白水解、明胶液化试验、吲哚试验、接触酶试验、氧化酶试验、石蕊牛乳试验、硝酸盐还原试验、尿酶试验、甲基红试验、V. P. 试验、柠檬酸盐试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、H₂S 产生试验参照文献 [5, 8] 的方法进行。

1.4.3 运动性试验：参照文献 [7, 9] 的方法，用悬滴法、半固体穿刺法和半固体培养基表面菌落扩散法进行测定。

2 结果

2.1 筛选结果

通过好氧培养和分离从水中共分离 38 株菌，通过穿刺培养确定了 18 株兼性厌氧菌，考虑到最大菌

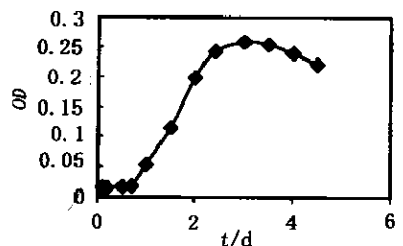


图 1 DG7 菌株生长曲线

体浓度、界面张力、产酸、产气、产孢和运动性等因素选出3株,最后筛选出一株能以煤油为唯一碳源的耐盐性能较好的兼性厌氧菌,记作DG7。

2.2 性能评价

生长曲线见图1。培养2.5~3d可达到对数增长期,菌体浓度可达 1.2×10^8 个/mL。界面张力可降低16%,pH值可从6.9降低至6.2,有气体产生,具体情况见表1。

表1 菌株DG7的性能

| 菌株 | 最大菌体浓度 | 界面张力 (mN/m) | | | pH值 | | | 气体 |
|-----|-------------------|-------------|-------|---------|-----|-----|---------|-----|
| | | 培养液 | 发酵液 | 降低率 (%) | 培养液 | 发酵液 | 降低率 (%) | |
| DG7 | 1.2×10^8 | 18.10 | 15.27 | 16 | 6.9 | 6.2 | 10.2 | 有气泡 |

2.3 形态特征

个体形态: DG7菌株为革兰氏阴性杆菌,大小 $0.3 \mu\text{m} \times 0.3 \sim 0.4 \mu\text{m}$,极生鞭毛,不产芽孢。菌落特征: 表面平整、乳白、润湿,菌落直径 $0.2 \text{mm} \sim 0.4 \text{mm}$ 。液体培养特征: 菌膜,底部有沉淀,从上到下混浊。斜面培养特征: 无色,毛状,有小刺。

2.4 生理生化特征

生长温度: 该菌株生长温度范围为 $4^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$,最适生长温度 30°C 左右。耐盐能力: 该菌株在氯化钠浓度为 $0 \sim 18.5\%$ 的范围内可生长,最适浓度为 6.5% 。耐酸碱度试验: 该菌株的最适pH值为 $5.5 \sim 6.5$,在pH5和pH9.6的条件下均能良好的生长,但在pH4.5以下不生长。

葡萄糖发酵试验: 培养基由紫变黄,表示发酵产酸,而琼脂柱中有气泡,表示产气。

其他生理生化试验: 如表2所示,该菌株能水解淀粉和油脂,而不能水解酪蛋白;产接触酶,不产尿素和苯丙氨酸脱氨酶,氧化酶可变;吲哚试验、石蕊牛乳试验、硝酸盐还原试验、M. R试验和V. P.试验均为阳性,明胶液化、 H_2S 试验和柠檬酸盐试验均为阴性。

表2 DG7菌株的生理生化反应

| 生理生化反应 | 结果 | 生理生化反应 | 结果 | 生理生化反应 | 结果 |
|--------|----|----------------------|-----|---------|----|
| 油脂水解 | + | 氧化酶 | + - | 接触酶 | + |
| M. R | + | 柠檬酸盐 | - | 酪蛋白水解 | - |
| 尿酶试验 | - | V. P. | + | 石蕊牛乳试验 | + |
| 明胶液化 | - | H_2S | - | 硝酸盐还原试验 | + |
| 吲哚试验 | + | 苯丙氨酸脱氨酶 | - | 淀粉水解 | + |

2.5 运动性试验

悬滴法观察可见菌体运动;半固体穿刺形成绒毛状生长线,半固体平皿可见菌落扩展,从而证明其具有运动性。

3 讨论

微生物驱油所用菌种的筛选标准: 能以原油为唯一碳源,适应地层油藏条件(如缺氧、温度较高、矿化度较高等),能产生对驱油有利的代谢产物如气体、酸、聚合物和表面活性剂等。由于煤油是原油的一个组成部分,在使用处理时比原油方便,故以

煤油进行实验。其菌体大小为 $0.3\mu\text{m} \times 0.3\mu\text{m} \sim 0.4\mu\text{m}$, 较小, 具有运动性, 能在油藏的孔隙中运移, 从而能在油藏孔隙中发挥作用。该菌株的生长温度范围是 $4^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$, 生芽孢, 兼性厌氧, 能在 18.5% NaCl 水溶液中生长, 可适应在地层油藏中生存。根据表 3 可知, 与已知能代谢煤油的菌株^[2]相比, 其最大优势在于能在 18.5% NaCl 水溶液中生长, 而大多油田经过化学驱之后油藏中的含盐量已经达到很高的浓度, 需要使用具有耐盐能力的菌种。同时由于其能代谢生成表面活性剂、酸性物质和气体, 这些物质都具有相应的驱油作用, 故有望用于微生物采油以提高原油采收率, 但具体的驱油效果还要根据模拟驱油试验的结果而定。

表 3 菌株 DG7 与其它菌株的性能比较

| 菌株 | 界面张力 (mN/m) | pH | 产气情况 | 最大耐盐度 |
|-----|-------------|-----|------|-------|
| DG7 | 15.27 | 6.2 | + | 18.5% |
| 1-C | 17.0 | 6.2 | - | 2% |
| 2-C | 17.8 | 5.7 | + | 5% |

在《常见细菌系统鉴定手册》^[4]中, 将革兰氏阴性且发酵型产酸的杆菌归为第四章, DG7 菌株符合这一章的特征, 故其分类地位应属于第四章的研究范畴。这一章有 3 个科, 即弧菌科、巴斯德氏菌科和肠杆菌科; 该菌株氧化酶可变, 以极生鞭毛运动, 应为弧菌科; 最适生长温度在 30°C 以下, 生长可不需要 Na^+ , 具酯酶, 应为气单胞杆菌属 (*Aeromonas* sp.), 但其与已知的气单胞杆菌属的种存在一定的差别, 如表 4 所示, DG7 菌株发酵葡萄糖产酸产气、不产生 H_2S 、M. R 和 V. P. 反应为阳性、吲哚试验和苯丙氨酸脱氨酶试验为阴性、有运动性, 与其它气单胞杆菌属种没有完全相同的地方, 故判断其可能为气单胞杆菌属的新种, 当然, 是否为新种还需要进一步确定。

表 4 菌株 DG7 与已知气单胞杆菌的比较

| 特征 | D-葡萄糖产酸 | D-葡萄糖产气 | H_2S 产生 | M. R | V. P. | 运动性 | 产吲哚 | 苯丙氨酸脱氨酶 |
|---------|---------|---------|-------------------------|------|-------|-----|-----|---------|
| 豚鼠气单胞菌 | + | - | - | + | - | + | + | - |
| 嗜泉气单胞菌 | + | + | - | + | - | + | + | + |
| 嗜水气单胞菌 | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 中间气单胞菌 | + | - | - | + | - | - | + | + |
| 杀蛙气单胞菌 | + | + | — | — | — | - | - | - |
| 舒氏气单胞菌 | + | - | - | + | - | + | - | + |
| 温和气单胞菌 | + | - | - | - | + | + | + | + |
| 维里纳气单胞菌 | + | + | - | + | + | + | + | + |
| DG7 | + | + | - | + | + | + | - | - |

注: + 为阳性反应, - 为阴性反应, — 为不定

参 考 文 献

- [1] 李希明, 冯时林, 曾庆坤, 等. 油气采收率技术, 1997, 3: 1~10.
- [2] Atsushi K, Heiji E, Akira K, et al.. Sekiyu Gakkaishi. 1992, 57 (2): 125~131.
- [3] 姚玉红, 王晓燕, 王宝玲, 等. 微生物学通报, 1999, 26 (4): 274~277.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝玲, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 2: 66~127.
- [5] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, 4.
- [6] 陈菊港, 陈文娟, 赵桂芳. 微生物学通报, 1999, 26 (2): 128~129.
- [7] 平文祥, 周东坡, 孙剑秋, 等. 微生物学报, 1998, 38 (2): 146~151.

2002年29(3)

微生物学通报

· 33 ·

[8] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物学实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1997, 2.

[9] 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2000. 8.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>