

除油生物表面活性剂产生菌的分离及其特性

陈忠喜^{1,2}, 郭书海³, 刘广民⁴, 朱玉萍², 牛明芬³, 任南琪¹, 李永峰¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, E-mail: chenzhongxi@petrochina.com.cn; 2 大庆油田建设设计研究院, 黑龙江 大庆 163712; 3 中国科学院 沈阳应用生态研究所, 沈阳, 110016; 4 哈尔滨工程大学 材料科学与化学工程学院, 哈尔滨 150001)

摘要: 为了对石油污染的土壤进行生物修复, 从大庆油田油泥和油田污水中富集培养、分离得到 52 株菌, 通过对各菌株的排油活性及表面张力实验, 优选出菌株 B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄ 和 C₄₃, 它们产生的表面活性剂的表面张力较低, 并且表面活性稳定. 对纯化的表面活性剂分析表明, 表面活性剂的主要成分为脂肽类 (Lipopeptide)、鼠李糖脂 (Rhamnolipid)、槐糖脂 (Sphrolipids) 及甘油酯类 (Glyceride) 化合物. 用这 4 株菌的发酵液进行了油泥处理实验, 72 h 后石油去除率平均达 70% 以上. 与对照样品相比, 石油去除率提高到大约 7~9 倍.

关键词: 除油; 微生物分离; 排油活性; 生物表面活性剂; 油泥处理

中图分类号: X 172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0367-6234(2007)04-0586-03

Isolation and characteristics of the degreasing biosurfactant bacteria

CHEN Zhong-xi^{1,2}, GUO Shu-hai³, LIU Guang-min⁴, ZHU Yu-ping²,

NIU Ming-fen³, REN Nan-qi¹, LI Yong-feng¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, E-mail: chenzhongxi@petrochina.com.cn; 2 Daqing Oilfield Construction Design and Research Academy, Daqing 163712, China; 3 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 4 School of Material Science and Chemical Engineering, Harbin Engineering University, Harbin 150001, China)

Abstract: For the bioremediation of the oil polluted soil, the 52 isolates of bacteria were isolated from the oil - mud and sewage from Daqing Oilfield by the enrichment culture. 4 isolates, named as B381, B101, B64 and C43, were selected by the degreasing activity and the surface tensility experiments. Their surface activities of the biosurfactants were low and stable. It was shown that the main components of purified biosurfactants were lipopeptide, rhamnolipid, sphrolipids and glyceride compounds. The degreasing rate of oil and mud treatment could reached at 70% averagely or even more by the fermentative liquids of the 4 isolates. Comparing with the check, the degreasing rate was about 7 - 9 times.

Key words: degreasing; microorganism isolation; degreasing activity; biosurfactant; oil and mud treatment

生物表面活性剂是天然表面活性剂的一种, 主要是指微生物在一定培养条件下产生的一些代谢产物, 分子结构具有严格的亲水和疏水基团, 它

们除具有降低表面张力、稳定乳化液等特性外, 还具有无毒、自然生物降解、生态安全及高表面活性和生理活性等优点^[1].

生物表面活性剂在石油的生物降粘、提高原油采收率、重油污染土壤的生物修复等石油工业和环境工程领域得到广泛应用^[2,3], 并引起各国学者们越来越多的关注.

本研究在油泥和油田污水中筛选出产生生物

收稿日期: 2004-03-10

基金项目: 国家科技部资助项目 (2001BA605A10); 大庆油田有限责任公司科技发展项目 (030116).

作者简介: 陈忠喜 (1964—), 男, 博士研究生, 高级工程师;
任南琪 (1959—), 男, 博士生导师, 长江学者特聘教授.

表面活性剂的除油土著微生物,对除油微生物的生理生化特性进行了分析,制备出生物表面活性剂,并且利用富含表面活性剂的发酵液进行了油泥处理室内实验,研究结果可为大规模的油田污泥处理及石油回收提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 培养基

细菌富集培养基(1 L 溶液):硫酸铵 1 g,氯化钾 0.11 g,硫酸亚铁 2.8×10^{-3} g,磷酸二氢钾 0.34 g,磷酸氢二钾 0.44 g,硫酸镁 0.05 g,酵母膏 0.05 g,微量元素液 5 mL,正烷烃 2 mL, pH7~7.5; 酵母和霉菌富集培养基(1 L 溶液):硫酸铵 0.6 g,磷酸二氢钾 0.3 g,磷酸氢二钠 0.2 g,硫酸镁 0.08 g,硫酸亚铁 0.001 g,氯化钙 0.01 g,酵母膏 0.05 g,微量元素溶液 0.5 mL,正烷烃 4 mL, pH6

1.2 菌株富集和分离方法

菌源为大庆油田油水分离系统中三相分离器内的油泥及大庆油田污水处理厂石油废水。

称取油泥 10 g,加入 90 mL 无菌水,摇床上振荡 2 h 取上清液及石油废水 10 mL 接种到装有 90 mL 富集培养基的摇瓶中,于 28、220 r/min 的恒温摇床中振荡培养 3 d,以此摇瓶中的培养菌液作为菌种,在同样条件下进行二次转接培养。将二次培养的菌液做适当稀释,将不同浓度的稀释液分别涂布在普通培养基中,选择生长较好的菌株进一步在平板上划线纯化,挑取单菌落保存在斜面培养基上。将斜面保存的菌株接种在摇瓶培养液中,28、220 r/min 振荡培养 3~5 d,培养基同富集培养基。

1.3 菌株的筛选、鉴定及生物表面活性剂的制备分析方法

生物表面活性剂菌株的筛选依据排油活性实验结果,排油性试验时,取一培养皿,加水后再加 0.1 mL 橄榄油,在油膜中心加摇瓶发酵液,中心油膜被挤向四周形成一圈圈,圆圈直径与表面活性剂含量和活性成正比,测量圆圈直径大小,直径 >3 cm 的菌株保留做进一步研究^[4]。表面张力测定方法为圆环法,采用山东淄博科森公司的 Auto-tensiometer ZL-2 型表面张力测定仪。菌株鉴定根据文献^[5,6]进行。

制备生物表面活性剂时,取培养后菌株发酵液,8000 r/min 离心 20 min 除菌体^[7];上清液用浓 HCl 调 pH 至 2.0,出现絮状沉淀,4 静止过夜,10000 r/min 离心 30 min 收集沉淀;

用 pH2.0 的酸水洗涤一次,随后将该沉淀溶于 NaOH 溶液,使 pH 为 7.0,冷冻干燥,得浅褐色疏松状固体的表面活性剂粗品。将粗品置 NH_2C_2 中抽提,后减压蒸干,稀 NaOH 溶液溶解,形成多泡液体;再用 Whatman No. 4 滤纸过滤,滤液再次加 HCl 调 pH 至 2.0,将得到的沉淀离心,真空干燥去除残留水分,即得成品。生物表面活性剂主要成分通过凝胶电泳、纸层析、薄层色谱和气相色谱法进行分析。

1.4 生物表面活性剂处理油泥室内实验方法

称取油泥 10 g,测定含油量,然后加入离心(8000 r/min, 20 min)后的菌株 B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄、C₄₃ 发酵液 100 mL,在 25~28℃ 下振荡,分别在 24、48、72 h 时取样,离心,测定泥渣含油量,每菌株做 3 次重复;用培养基做空白对照(CK)。

2 结果与讨论

2.1 生物表面活性剂成份分析及产生菌的分离与筛选

从多达 100 份的大庆油田油泥、石油污水样品中,经过富集培养、平板分离,获得 52 株菌。摇瓶培养,发酵液离心(8000 r/min, 10 min),取上清液进行排油活性测定,圆圈直径 >3 cm 的菌株有 10 株。经过多次重复摇瓶培养,圆环法对发酵液的表面张力测定,表面活性保持稳定,表面张力较低的菌株有 4 株,即 B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄ 和 C₄₃,见表 1。

表 1 生物表面活性剂产生菌的筛选

菌株	排油圈直径 /cm	表面张力 /mN · m ⁻¹	菌株类型
B ₃₈₁	5.0	36.6	细菌
B ₁₀₁	7.9	34.7	细菌
B ₆₄	6.0	35.2	细菌
C ₄₃	6.8	34.9	酵母

2.2 生物表面活性剂成份分析及产生菌鉴定

对筛选到的 B₃₈₁、B₁₀₁ 和 B₆₄ 菌株进行了形态学和生理生化特征的研究,结果见表 2 参考相关文献^[6,7],确定三株菌分别为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。C₄₃ 从菌落形态和细胞形态上初步鉴定为酵母菌。

经聚丙烯酰胺凝胶电泳、气相色谱、薄层色谱和纸层析分析,菌株 B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄、C₄₃ 提纯产物分别为脂肽类(*Lipopeptide*)、鼠李糖脂(*Rhamnolipid*)、槐糖脂(*Sophrolipids*)及甘油酯类(*Glyceride*)化合物。

表 2 生物表面活性剂产生菌的形态学和生理生化特征

特征	B ₃₈₁	B ₁₀₁	B ₆₄
革兰氏染色	+	+	-
需氧性	好氧	好氧	好氧
氧化酶	+	+	+
明胶液化	+	+	-
淀粉水解	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
利用丙酸盐	+	-	-
葡萄糖分解	+	+	+
菌体形态	细胞呈直杆状, (0.6 - 0.8) × (1.2 - 1.5) μm, 单个或短链排列; 具圆端, 周生鞭毛运动; 芽孢椭圆形, 中生.	细胞呈直杆状, (0.6 - 0.8) × (1.2 - 2.0) μm, 单个或短链排列; 具圆端, 周生鞭毛运动; 芽孢柱形, 中生.	直或略弯曲的杆状 (0.6 - 0.8) × (1.4 - 2.0) μm, 不成链, 极生鞭毛, 能运动, 不产生芽孢.
类型	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

2.3 生物表面活性剂处理油泥效果

在油泥清洗实验中, 加入菌株 B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄、C₄₃ 发酵液 (其中富含生物表面活性剂), 振荡培养 24h 后, 摇瓶中的泥、油、液体界面分离明显, 大量的浸出油漂浮在液面上, 与对照样 (发酵培养基) 相比, 清洗后渣泥油量降低, 去除率均达到 20% 以上. 油泥清洗效果见表 3. 由表 3 可见, 使用富含生物表面活性剂的菌株发酵液处理油泥后, 与对照 (CK) 相比, 油泥中油的去除率显著提高, 菌株 B₁₀₁ 和 C₄₃ 在 48h 的去除率达到 49.33% 和 47.13%, 而 72h 后去除率更高达 81.69% 和 80.31%. 总体上看, 与对照相比, 油去除率提高到大约 7 至 9 倍. 油去除率结果与表面张力大小变化相关, 表面张力较低, 除油效果较好.

表 3 油泥清洗效果 %

发酵液	48 h 油去除率	72 h 油去除率
CK	5.04	8.36
B381	25.67	62.31
B101	49.33	81.69
B64	36.42	71.38
C43	47.14	80.31

3 结 论

1) 在油泥和石油污水中可以分离得到产生生物表面活性剂的微生物, 在本研究实验条件下, 获得 B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄ 和 C₄₃ 菌株 4 株, 其产生生物表面活性剂排油效果好、表面张力较低.

2) B₃₈₁、B₁₀₁、B₆₄ 为细菌, 分别属于地衣芽孢杆

菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 而 C₄₃ 为酵母菌.

3) 生物表面活性剂的成分复杂, 主要成分为鼠李糖脂、槐糖脂、甘油酯类和脂肽类化合物.

4) 本研究实验条件下, 使用菌株发酵液处理油泥样品, 72h 后油去除率达 62.3% ~ 81.7%, 与对照样相比, 油去除率提高到大约 7 ~ 9 倍, 除油效果显著.

参考文献:

[1] HEALY M G. Microbial production of biosurfactants [J]. Study Environment Science, 1997, 6 (6): 179 - 195.

[2] HARVEY S, ELASHV LL II I, VALDES J J, et al. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant [J]. Bio/Technology, 1990, 8: 228 - 230.

[3] 陈坚, 华兆哲, 伦世仪. 生物表面活性剂在环境生物工程中的应用 [J]. 环境科学, 1996, 17 (4): 84 - 87.

[4] 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选 [J]. 微生物学报, 1999, 39 (3): 264 - 267.

[5] 陈秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[6] 卢振祖编著. 细菌分类学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.

[7] COOPER D G, MACDONALD C R. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions [J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 42 (3): 408 - 412 (编辑 姚向红)