

生物破乳剂产生菌的筛选及其方法研究

刘佳 黄翔峰* 陆丽君 闻岳 杨殿海 周琪

(同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

摘要: 针对生物破乳剂产生菌筛选难的问题, 采用显色法、溶血细胞测试法、表面张力测定法和排油圈法从6种不同菌源对生物破乳菌产生菌进行了筛选。通过试验筛选得到了17株生物破乳剂产生菌, 其中24h内破乳率高于70%的破乳菌有5株; 油田含油污泥、采油废水生物处理污泥和污水处理厂剩余污泥是筛选破乳菌的较好的菌源; 显色法、溶血圈法存在检测范围的局限性; 表面张力测定法和排油圈法是最为简易和准确的生物表面活性剂产生菌的筛选方法, 采用模型乳状液对生物破乳剂产生菌进行筛选最为直接和准确, 但工作量大、所需时间长, 因此在筛选高效破乳菌时, 建议采用表面张力、排油圈法进行初筛, 而后通过模型乳状液破乳进行验证。

关键词: 生物破乳剂, 表面张力, 排油圈法, 溶血圈, 煤油模型乳状液

Isolation of Strains Producing Bio-demulsifiers and Comparison of Screening Methods

LIU Jia HUANG Xiang-Feng* LU Li-Jun WEN Yue YANG Dian-Hai ZHOU Qi

(College of Environmental Science & Engineering, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092)

Abstract: Four screening methods, colorimetric assay, blood-plate hemolysis method, surface tension activity and oil spreading technique were introduced to isolate strains producing bio-demulsifiers from 6 different bacteria source samples. The results of various screening methods were evaluated in this paper. Seventeen demulsifying strains were obtained, which are qualified in demulsification test of kerosene model emulsions. Among them, 5 strains showed high demulsifying ability, achieving 70% plus demulsifying ratio within 24 hours. Petroleum-contaminated soil, excess sludge from biological process treating oilfield produced water and sludge from municipal wastewater treatment plant were the best among all tested sources. Due to the determination limit, the colorimetric assay and blood-plate hemolysis method are not competent to screen bio-demulsifiers strains. The measurement of surface tension and oil spreading method were easy but accurate methods to isolate bio-demulsifiers strains. Although demulsification test of model emulsion is an effective technique to target strains with the capability of breaking emulsions, it is sophisticated and time-consuming. Thus it is recommended to use surface tension and oil spreading methods in pre-screening and validate the results in demulsification test with kerosene model emulsions.

Keywords: Bio-demulsifiers, Surface tension, Oil spreading technique, Blood-plate hemolysis, Kerosene

model emulsions

生物表面活性剂是一类由微生物代谢作用产生具有亲水、亲油基团的表面活性物质, 在环境保护领域和石油开采炼制领域应用最为广泛, 如对受碳氢化合物或重金属污染的土壤和水体的修复、微生物采油、清洗油罐、治理油泄漏污染等^[1-3]。目前研究中发现生物表面活性剂产生菌大部分为细菌, 也有研究者筛选到了酵母菌、真菌等^[4]。生物破乳剂是生物表面活性剂的一种, 具有一些化学破乳剂难以合成的基团, 能够高效、高质地完成破乳过程, 此外生物破乳剂为可生物降解的有机物, 不会引入化学破乳剂难降解的大分子物质^[5-7]。因此, 对生物破乳剂的开发已经成为破乳剂发展的重要研究热点之一, 而生物破乳剂产生菌的快速而准确的筛选是开发高效生物破乳剂的关键^[8]。

目前筛选生物表面活性剂的方法众多, 根据不同筛选方法的出发点可以分为两大类, 一类是通过

考察表面活性剂的性质来确定是否产生了表面活性剂, 如乳化能力测试法、溶血细胞测试法、碳氢化合物吸附能力测试法、显色测试法等; 第二类以考察生物表面活性剂表面活性的角度来确定的, 如表面张力测定法、界面张力测定法、对称液滴形状分析法、液滴坍塌法、排油圈法。不同筛选方法的优缺点见表 1^[8-11]。

由于生物破乳剂具有众多生物表面活性剂具备的性质, 因此根据生物表面活性剂的筛选方法, 本文针对生物破乳剂产生菌筛选难的问题, 采用表面张力测定法、排油圈法、溶血细胞测试法和显色测试法等不同方法从不同菌源筛选生物破乳菌产生菌, 获得了 17 株生物破乳剂产生菌, 分析确定了生物破乳剂产生菌筛选菌源和筛选方法的选择, 并对 5 株高效生物破乳菌分离菌株进行了研究。

表 1 生物表面活性剂筛选方法比较
Table 1 Comparison of screening methods for biosurfactants

筛选依据 (Screening basis)	筛选方法 (Screening methods)	方法准确性 (Accuracy)	单次分析数量 (Quantity)	单次分析速度 (Analysis speed)	操作简易性 (Easy operation)
表面活性剂性质 (Biosurfactant properties)	乳化能力法	+++	+	+	++
	碳氢化合物吸附能力	++	++	++	+
	溶血细胞测试法	+	++	+	+
	显色测试法	+	++	+	+
表面活性 (Surface activity)	表面张力法	++++	+	+	+
	界面张力法	+++	+	+	+
	对称液滴形状分析法	+	+	+	+
	液滴坍塌法	++	++	++	++
	微盘法	+++	++++	++	+++
	排油圈法	+++	++	+++	++++

注: + + + + : 达到筛选目标的效果最佳

Note: + + + + : Best performance

1 材料与方法

1.1 菌源的选择及菌种富集筛选

1.1.1 菌源的选择: 本研究采集的菌源包括 6 类:

油田含油废水 油田含油土壤 采油废水
生物处理污泥 污水处理厂剩余污泥 炼油厂
污水处理污泥 垃圾渗滤液处理污泥。

1.1.2 菌种富集筛选及分离: 具体筛选方法为: 将采集的样品约 5 g 加入到 10 mL 灭菌的去离子水中, 在摇床中以 140 r/min 振荡 2 h, 充分摇匀后静置 2 h, 待较大土壤颗粒沉淀后取上层液体 5 mL 加入到装

有 100 mL 富集培养基的 250 mL 摇瓶中, 在摇床中以 140 r/min 富集 7 d; 将富集培养液摇匀, 取 10 mL 转接到新鲜的 100 mL 富集培养基中, 相同条件下进行第 2 次富集, 重复操作, 得到富集 3 次的富集培养基; 采用稀释涂平板法对第 3 代富集培养基进行单菌株分离, 得到的单菌株转接到普通肉汤平板培养基进行划线分离, 直到分离得到单菌落, 将单菌落接入到肉汤培养基富集后接入到筛选培养基, 培养 7 d 得到细菌的全培养液。

1.2 筛选方法

1.2.1 表面活性剂性质筛选方法: 显色法。根据

阴离子型表面活性剂在阳离子(Ca^{2+} 、 Fe^{3+})存在条件下与染料分子(番红、沙黄、亚甲基蓝)形成的胶束包含络合物具有退色功能的特性,考察菌落周围是否有透明圈来判断是否存在生物表面活性剂。溶血圈法。根据生物表面活性剂可以溶血的性质,在绵羊血培养基平板上接种单菌落,观察是否有溶血圈来判断是否存在生物表面活性剂,通过溶血圈的大小可以判断表面活性剂的活性高低。本研究认定溶血圈大于1 cm为生物表面活性剂产生菌。

1.2.2 表面活性剂筛选方法: 表面张力法。全培养液的表面张力采用淄博华坤电子仪器有限公司生产的表面张力仪(DT-102)检测,每个样品测定3次。

排油圈法。取一直径25 cm培养皿,加入200 mL蒸馏水,水面上加250 μL 液体石蜡形成油膜,在油膜中心加250 μL 发酵液,中心油膜被挤向四周形成一圆圈,圆圈的直径与表面活性剂的含量和活性成正比,记录排油圈的直径,每个样品测定3次。本研究认定排油圈直径大于3 cm为生物表面活性剂产生菌^[12]。

1.3 培养基

1.3.1 筛选、富集培养基: 筛选培养基(每升): NH_4NO_3 4.0 g, K_2HPO_4 4.0 g, KH_2PO_4 6.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 微量元素溶液1 mL, 液体石蜡4%(V/V), pH7.0, 微量元素溶液(每升)含: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1000 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1000 mg, EDTA 1400 mg, 该培养基也是后续研究中用的发酵用培养基; 富集培养基(每升): 牛肉膏5.0 g, 蛋白胨10.0 g, NaCl 5.0 g, pH7.0。

1.3.2 筛选用培养基: 蓝色凝胶筛选培养基(每升): 十六烷基三甲基溴化铵5 g, 次甲基蓝0.02 g, 营养琼脂20 g, pH7.0; 番红凝胶筛选培养基(每升): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, 番红0.04 g, 营养琼脂20 g, pH7.0; 绵羊血平板培养基: 将灭菌的肉汤琼脂培养基冷却到50℃左右,加入8%的无菌绵羊血,轻轻摇匀并防止产生气泡,倒平板凝固后保存在4℃冰箱中。

1.4 菌株活性验证试验方法

1.4.1 生物表面活性剂产生菌的验证: 表面张力是筛选生物表面活性剂产生菌的最为准确和直接的方法,据文献报道^[13],一般认为表面张力低于40 mN/m的样品即具有较强的表面活性,因此将能产生小于40 mN/m的培养液的菌株确定为表面活性剂产生菌。

1.4.2 生物破乳剂产生菌的验证方法: 依据石油行

业标准《原油破乳剂使用性能检测方法(瓶试法)》(SY/T 5281-2000)的方法,采用W/O型乳状液进行破乳效果验证试验,全培养液在24 h内能够使乳状液脱水率达到50%以上,即为破乳剂产生菌。原油乳状液的配制,制备原油乳状液的水样、油样采用克拉玛依油田某站采出液静置分层后的油、水两相,将两者按体积比1:1混和,用S312型数显恒速搅拌器以900 r/min搅拌15 min,制得稳定的试验用乳状液,该乳状液采用油红显色法检验,观察到乳状液变为红色,确认为W/O(油包水)型原油乳状液;

模型乳状液的配制,制备模型乳状液采用特种煤油、蒸馏水与乳化剂在高速搅拌条件下配制。W/O型乳状液:1.67%的Span80溶于煤油,加入等体积的蒸馏水,采用上海威宇牌乳化机以10000 r/min、搅拌3 min配制,采用油红显色法确认为W/O型模型乳状液^[14,15]。

破乳率 =

$$\left(1 - \frac{\text{剩余乳状液体积}}{\text{乳状液体积} + \text{破乳剂投加体积}}\right) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 不同菌源筛选结果的比较

从6种菌源筛选得到38株菌株,其中具有较强表面活性作用的菌株6株,可以使新疆原油乳状液破乳的菌株有5株,可以使煤油模型乳状液破乳的菌株17株。

从表2可见,油田含油污泥、采油废水生物处理污泥和污水处理厂剩余污泥是筛选破乳菌的较好菌源,筛选得到的破乳菌株占总破乳菌株的比例为76%。采用原油乳状液和模型乳状液对菌株的破乳性能进行验证,结果上存在差异:采用模型乳状液验证得到的破乳菌株数多于原油乳状液。分析原因可能是:原油乳状液为新疆油田的油水配制而成,而我国不同油田油品性质差异较大,破乳剂对原油油品具有一定的选择性,因此采用模型乳状液对于筛选通用的生物破乳剂产生菌具有一定的优势,可以避免有效菌株漏筛。

2.2 生物表面活性剂性质筛选法筛选结果

将筛选得到的38株菌株,从平板划线接种于显色培养基和绵羊血培养基上,培养24 h~72 h观察菌落生长情况,记录筛选结果,如表3所示。

表 2 不同菌源筛选结果的比较
Table 2 Evaluation of isolation results obtained from different bacteria sources

菌源 (Bacteria source)	菌株数 (Number of strains)	原油乳液破乳菌株 (Demulsifying strains breaking petroleum emulsion)	模型乳液破乳菌株 (Demulsifying strains breaking model emulsion)
油田含油废水 (Oil-contaminated water)	5	0	2(SL-S-1、SL-S-2)*
油田含油土壤 (Oil-contaminated soil)	16	2(XJ-T-1、JS-T-1)	3(XJ-T-1、JS-T-1、JS-T-8)
采油废水生物处理污泥 (Sludge from biological process treating oilfield produced water)	8	2(SLR-N-1、SL-N-1)	4(SLR-N-1、SL-N-1、SL-N-2、SL-N-3)
污水处理厂剩余污泥 (Excess sludge from wastewater treatment plant)	6	0	5(QY-N-1、QY-N-2、SDK-N-1、SDK-N-2、SDK-N-3)
炼油厂污水处理污泥 (Excess sludge from refinery wastewater treatment plant)	1	1(LYC-N-1)	1(LYC-N-1)
垃圾渗滤液处理污泥 (Excess sludge from leachate treatment plant)	2	0	2(JQ-N-1、JQ-N-2)
合计(Total)	38	5	17

注：*：菌株数和对应的菌株代码，菌株代码的涵义分别是：菌源的来源地-菌源性状-序号(S表示水，T表示土壤，N表示污泥)

Note: *: Number of strains and its corresponding code. Meaning of the code: The first letter in the code stands for the source of bacteria and the second for the source state (S: water; T: soil; N: sludge) and the third is the number

表 3 根据生物表面活性剂性质筛选结果
Table 3 Isolation results based on biosurfactant properties

显色法(Colorimetric assay)			溶血法(Blood-plate hemolysis method)	
响应水平 (Response level)	亚甲蓝响应个数及比例 (Number of strains and its ratio responding to methylene blue) (%)	番红响应个数及比例 (Number of strains and its ratio responding to safranin) (%)	响应水平 (Response level) (cm)	响应个数及比例 (Number of strains and its ratio) (%)
透明圈(Clearing zones)	0(0)	0(0)	≥1.0	1(2.6%)
生长(Growth)	1(2.6%)	8(21.1%)	0~1	18(47.4%)
不生长(Un-growth)	37(97.4%)	30(78.9%)	不生长	19(50.0%)

表 3 显示，用显色法不能筛选得到有效菌株，几乎全部细菌不能在显色平板上生长，没有细菌显示出透明圈，分析原因可能是由于亚甲蓝和番红对细菌具有毒性作用，对其生长存在一定的抑制，因此不能作为破乳菌筛选的方法；而溶血圈法筛选得到的细菌有一半左右不能在绵羊血平板上生长，因此这 2 种方法都存在一定的局限性。

2.3 生物表面活性剂活性筛选法筛选结果

筛选得到 38 株菌株，经过富集培养后，均接种于石蜡液体发酵培养基中，采用表面张力测定法、排油圈法对全培养液的表面活性进行了检测。试验结果见表 4。

从表 4 可知，采用表面张力法和排油圈法可以从响应水平的差异上区分出不同生物表面活性剂产生菌的活性差异，筛选得到的菌株中大部分表面活性不佳。

2.4 生物破乳剂产生菌筛选法比较

对上述 4 种筛选方法筛选得到的菌株数及准确

性进行比较，如表 5 所示。

针对上述 4 种方法的筛选结果，通过比较生物破乳剂产生菌菌株数发现：显色法不能用于筛选生物破乳剂产生菌；溶血圈法筛选得到的 1 株菌为破乳剂产生菌，但是未能筛选到其它菌株；表面张力法和排油圈法筛选的结果具有较好的相似性，筛选得到的 5 株菌有 4 株是相同的，且这 5 株菌中大部分为破乳率较高的高效菌。结果表明依据表面活性的筛选方法比依据表面活性剂的筛选方法更为准确。通过破乳试验的验证，筛选得到破乳率大于 50% 的 17 株菌，这 17 株菌的破乳性能存在一定的差异。

2.5 高效破乳菌株性质的比较

配制 W/O 型模型乳液，对 17 株破乳菌株的破乳效果进行考察，根据 24 h 内破乳率大于 70% 的标准，筛选得到 5 株高效破乳菌株，这 5 株菌株的性质和在 W/O 模型乳液的破乳效果见表 6 和图 1 所示。

表 4 根据表面活性剂活性筛选结果
Table 4 Isolation results based on biosurfactant surface activity

表面张力法(Measurement of surface tension)			排油圈法(Oil spreading technique)		
响应水平(mN/m) (Response level)	对应菌株数(株) (Number of strains)	百分比(%) (Percentage)	响应水平(cm) (Response level)	对应菌株数(株) (Number of strains)	百分比(%) (Percentage)
≤40	6	15.8	≥3	6	15.8
40-50	8	21.0	1~3	4	10.5
≥50	24	63.2	≤1	28	73.7

表 5 生物破乳剂产生菌筛选方法比较
Table 5 Comparison of screening methods for bio-demulsifier producers

方法 (Methods)	响应水平 (Response level)	筛选菌株数 (Number of strains)	破乳菌株及比例 (Demulsifying strains and ratio)	破乳菌株编号 (Demulsifying strains' code)
显色法 (Colorimetric assay)	透明圈	0	0(0)	—*
溶血圈法 (Blood-plate hemolysis)	≥1.0	1	1(100%)	SLR-N-1
表面张力 (Surface tension)	≤40	6	5(83.3%)	XJ-T-1、JS-T-1、JS-T-8、LYC-N-1、SL-N-1
排油圈法 (Oil spreading)	≥3.0	6	5(83.3%)	XJ-T-1、JS-T-1、JS-T-8、LYC-N-1、SLR-N-1
破乳试验 (Demulsification)	≥50%	17	17(100%)	SL-S-1、SL-S-2、XJ-T-1、JS-T-1、JS-T-8、SLR-N-1、SL-N-1、SL-N-2、SL-N-3、QY-N-1、QY-N-2、SDK-N-1、SDK-N-2、SDK-N-3、LYC-N-1、JQ-N-1、JQ-N-2

注：*：无

Note：*：None

表 6 5 株高效破乳菌株性质比较
Table 6 Comparison of properties of five high-efficiency demulsifying strains

菌株 (Strain)		菌株生理生化性质 (Biochemical characteristics)			菌株培养液性质 (Properties of culture medium)		
菌株编号 (No.)	菌源 (Source)	革兰氏染色 (Gram stain)	接触酶 (Catalase test)	氧化酶 (Oxidase test)	表面张力 (Surface tension) (mN/m)	排油圈 (Oil spreading) (cm)	离子类型 (Ionic type)
XJ-T-1	②	—	+	—	30.8±0.5*	13.0±1.0	阴性
JS-T-1	②	—	+	—	39.8±1.0	11.7±0.6	阴性
LYC-N-1	⑤	—	+	—	34.6±1.6	14.3±0.6	阴性
SLR-N-1	③	+	+	+	50.8±0.5	2.2±0.3	阴性
SL-N-1	③	—	+	+	33.9±1.1	14.0±1.7	阴性

注：*：平均值±均方差

Note：*：Mean value ± mean variance

将这 5 株生物破乳剂产生菌在液体石蜡培养基中培养 7 d 后, 在 W/O 的模型乳状液进行破乳试验, 观察 24 h 的破乳效果, 如图 1 所示。筛选得到的 5 株菌株有 4 株为革兰氏阴性菌, 离子类型均为阴离子型表面活性剂。分析这 5 株菌的破乳效果发现, 24 h 破乳性能从高到低的顺序为: SL-N-1> SLR-N-1> XJ-T-1> LYC-N-1> JS-T-1; 在破乳时间

为 6 h 时, 5 株菌的破乳效果均达到比较稳定的状态, 破乳效率较高。根据表 6 和图 1 结果, 破乳效率的高低与该细菌全培养液的表面张力和排油圈大小之间不存在线性关系, 可见表面张力值和排油圈直径仅能反映菌株的表面活性, 不能代表菌株破乳能力的高低。因此, 对于高效破乳剂产生菌的筛选, 建议先通过表面张力和排油圈的初步筛选, 之后采用模

型乳状液试验对其破乳效果进行验证。

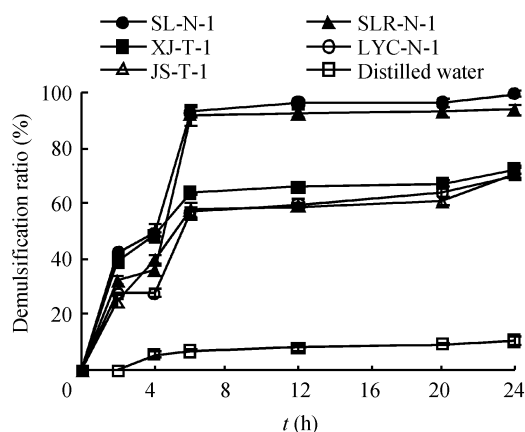


图 1 高效破乳菌株在模型乳状液中的破乳率比较

Fig. 1 Comparison of demulsification ratio in model emulsion by high efficiency demulsifying strains

3 结论

(1) 油田含油污泥、采油废水生物处理污泥和污水处理厂剩余污泥是筛选破乳菌的较好的菌源。

(2) 采用模型乳状液对于筛选通用的生物破乳剂产生菌具有一定的优势, 避免某些破乳菌株的漏筛。

(3) 依据表面活性的筛选方法比依据表面活性剂性质的筛选方法更为准确和可靠, 但是表面张力和排油圈直径仅能反映菌株的表面活性, 不能代表菌株破乳能力的高低。

(4) 对于高效破乳剂产生菌的筛选, 建议先通过表面张力、排油圈进行初筛, 然后采用模型乳状液进行验证, 确认高效破乳剂产生菌。

参 考 文 献

[1] Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, **67**(4): 503–549.
 [2] Kosaric N. Biosurfactants in industry. *Pure & Appl Chem*, 1992, **64**(11): 1731–1737.
 [3] Soumen Mukherjee, Palashpriya Das, Ramkrishna Sen.

Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biothenology*, 2006, **24**(11): 509–515.

- [4] Tugba Tugrul, Emir Cansunar. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **21**(6-7): 851–853.
 [5] Madhusweta D. Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species. *Bioresource Technology*, 2001, **79**(1): 15–22.
 [6] Nadarajah N, Singh A, Ward OP. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, **18**(5): 435–440.
 [7] Park SH, Lee JH, Ko SH, *et al.* Demulsification of oil-in-water emulsions by aerial spores of a *Streptomyces* sp.. *Biotechnology Letters*, 2000, **22**(17): 1389–1395.
 [8] Chen CY, Baker SC, Richard CD. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **70**(3): 503–510.
 [9] Adria AB, Raina M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **32**(3): 273–280.
 [10] Noha HY, Kathleen ED, David P Nagle, *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **56**(3): 339–347.
 [11] Pia AW, Ulrich K. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 1997, **7**(5): 415–423.
 [12] 宁长发, 沈 薇, 孟广荣. 产生物表面活性剂菌种的一种快速筛选模型. *微生物学通报*, 2004, **31**(3): 55–58.
 [13] Carrillo PG, Mardaraz C, Pitta-Alvarez SI, *et al.* Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1996, **12**(1): 82–84.
 [14] Nadarajah N, Singh A, Ward OP. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochemistry*, 2002, **37**(10): 1135–1141.
 [15] Lee JC, Lee KY. Emulsification using environmental compatible emulsifiers and de-emulsification using D.C. field and immobilized *Nocardia amarae*. *Biotechnology letters*, 2000, **22**(14): 1157–1163.