

红球菌 PR-1 菌株破乳性能研究

马挺¹, 梁凤来², 奚艳伟², 刘如林^{2*}

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 利用乳化剂 Span 80 配制出一种稳定的煤油-水乳浊液作为模型乳浊液, 进而从大港油田废水中筛选出 1 株破乳能力较强的红球菌 PR-1. 该菌株培养液在 55℃ 下 8h 可以使模型乳浊液完全破乳, 且在实验条件下比化学破乳剂 DGF-01 具有更强的破乳活性. 研究发现, 乳浊液的破乳为线性增长过程, 冻融和高压灭菌对其破乳能力没有影响, 菌体细胞是破乳的主要活性成分, 经超声波破碎及有机溶剂处理后其破乳活性显著降低. 菌体表面有很强的疏水性, 其对烃的粘附率为 84%, 碳链长度范围在 C₂₇~C₅₄ 的枝菌酸类物质是保持菌体细胞完整性和疏水性的关键, 其对细胞的破乳活性也至关重要. PR-1 菌株发酵液用于原油乳状液的破乳具有操作方便, 破乳率高, 应用面广, 无毒无害等优点, 且能完全脱出 J9-19 原油乳状液中的水, 因此可作原油乳状液或油田采出水的破乳剂.

关键词: 红球菌; 乳状液; 生物破乳; 枝菌酸; 原油

中图分类号: X172; Q93; TQ949 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1191-06

Performance of Demulsification by *Rhodococcus* sp. PR-1

MA Ting¹, LIANG Feng-lai², XI Yan-wei², LIU Ru-lin²

(1. College of Environment Sciences and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: *Rhodococcus* sp. PR-1 with high capability of demulsification on a surfactant-stabilized kerosene-water model emulsion was isolated from sewage of Dagang oil field. It could demulsify the model emulsion completely in 8 hours at 55℃ and had better demulsifying capability than chemical demulsifier DGF-01. The freezing-thawing and autoclaving had no effect on the process of demulsification, yet ultrasonic disposal and deal with organic solvent could inhibit its activity. A linear relationship, not the first order reaction that was used in some references, was observed between the percentage of demulsification and reaction time. The demulsifying capability of PR-1 was mainly resulted from the hydrophobic surfaces of microbial cells, which were characterized by the mycolic acids with the carbon chain length from 27 to 54. These results provide foundation for biological application on demulsifying crude oil emulsions in produced water of oil field.

Key words: *Rhodococcus* sp.; emulsion; bio-demulsification; mycolic acids; crude oil

乳状液是指一种或多种液体以液珠形式分散在与它不相溶的液体中构成的粗分散体系, 通常为油包水(W/O)或水包油(O/W)型, 乳化剂是乳状液赖以稳定的关键, 它可以吸附在油水界面上形成单分子膜, 有降低油水界面张力及阻止油珠并聚的作用而使乳状液稳定. 因此凡是能消除或削弱乳化剂保护能力的因素, 皆可达到破乳的目的^[1,2]. 常用的破乳方法有: ①用另外一种表面活性很强的物质或不能形成牢固膜的表面活性物质代替原来的乳化剂, 使界面膜发生改变; ②加入某些能与乳化剂发生化学反应的物质, 消除乳化剂的保护作用; ③加入机理不同的乳化剂, 如高价的电解质, 加强搅拌, 离心分离, 超声波, 微波, 电泳法等皆可加速分散相的聚结从而达到破乳的目的^[3].

世界开采出的原油经过地层的孔隙与水 and 气体混合在一起, 又经过泵送的搅动, 有近 80% 以原油乳状液形式存在^[4]. 原油乳状液是十分复杂的分散

体系, 在石油运输和精炼时, 必须要求原油含水量在 0.5% 以下^[5]. 工业上最常用的原油破乳方法是加入化学破乳剂^[6]. 由于原油乳状液的复杂性, 虽然化学破乳剂的破乳速度较快, 但用量大, 专一性太强, 不能普遍适用于各种性质的原油采出液, 而且还会造成对环境的污染. 生物破乳是通过加入微生物发酵全培养液而使乳状液破乳脱水的方法. 与传统破乳方法相比, 生物破乳具有生产工艺简单, 成本低, 能耗小, 易商品化等优点. 更重要的是, 生物破乳剂易被降解, 不污染环境, 对加工设施无腐蚀作用. 因此, 它在原油脱水, 含油污水的分离及污水处理等领域的开发和应用前景十分广阔. 本研究为红球菌 PR-1 生物破乳剂在原油乳状液破乳脱水的实际应

收稿日期: 2005-06-25; 修订日期: 2005-09-07

基金项目: 教育部南开大学-天津大学科技合作基金项目

作者简介: 马挺(1977~), 男, 博士后, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: tingma@nankai.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: meor@nankai.edu.cn

用提供了可行性.

1 材料与方法

1.1 实验菌种

红球菌(*Rhodococcus* sp.) PR-1 菌株, 分离自大港油田废水样, 由本室保藏.

1.2 培养基及培养条件

培养基(g/L): KH_2PO_4 2.44; Na_2HPO_4 5.57, NH_4Cl 2.0; MgCl_2 0.2; CaCl_2 0.02; FeCl_3 0.01; MnCl_2 0.004; 蔗糖 5.0; 酵母粉 0.8; PR-1 菌株种子液, 置 37℃摇床 120r/min 培养 60h, 菌体细胞浓度能达到约 1.5×10^8 cells/mL.

1.3 破乳能力测定方法

1.3.1 测定用乳浊液制备

用含 1.67% Span80 的煤油溶液与蒸馏水以 90:60 比例混和, 10 000r/min 高速搅拌 1min, 可形成乳状白色液体. 经油红染色法鉴定为 W/O 型乳浊液^[1], 经显微镜观察乳浊液液滴近 90% 小于 1.5 μm ; 该乳浊液可稳定 2 个月以上.

1.3.2 测定用原油乳化液制备

取大港油田 J9-19 井原油 90mL 和 60mL 蒸馏水, 10 000r/min 混和搅拌 2min, 使原油形成黑褐色乳状液; 经染色法鉴定为 W/O 型乳状液, 该乳状液可稳定 3 个月以上.

1.3.3 乳浊液破乳能力测定

将 PR-1 在 LB 培养基中 30℃, 200r/min 培养 36~72h, 取 1mL 的 PR-1 菌株培养液加入到装有 5mL 乳浊液的带刻度磨口试管, 在混匀器上振荡 30s, 使其混匀, 置于 55℃水浴中进行破乳. 依据放置零时乳浊液体积与破乳一定时间后的剩余乳浊液体积, 计算破乳率.

破乳率(%) = [零时刻乳浊液体积(mL) - 破乳一定时间后剩余乳浊液体积(mL)] / 零时刻乳浊液体积(mL).

1.4 菌体表面疏水性(CSH)分析

按照 Richard 等人所述方法进行^[7,8].

1.5 接触角测量方法

利用 Francois 等人的方法测定接触角^[9].

1.6 枝菌酸分析

1.6.1 枝菌酸甲基酯的制备

见参考文献[10, 11].

1.6.2 气相色谱-质谱分析

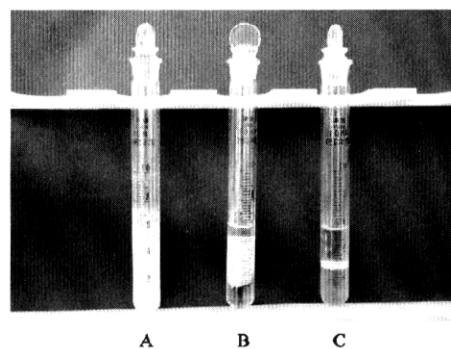
用制备好的枝菌酸甲酯二氯甲烷溶液 0.5 μL 与内标二十烷基甲酸酯, 一同注入带有裂解头装置

的气相色谱仪里. 注射温度 300℃, 检测器温度 320℃, 程序升温 4~6℃/min, 185~300℃停留 2min. 将每个峰做质谱分析可得出该峰所代表物质的分子量, 根据分子式估算其碳数.

2 结果与分析

2.1 破乳时间曲线

取 1mL PR-1 细菌全培养液加入到模型乳浊液中, 55℃水浴破乳 8h. 观测破乳效果随时间的变化, 结果如图 1 所示. 在 55℃条件下进行破乳试验, 是因为原油泵送、运输及脱水大都在此温度下进行. 常温下 PR-1 同样具备破乳能力.

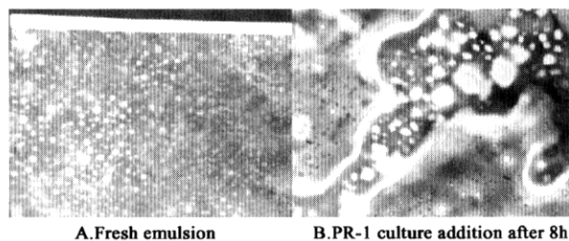


A. 0h, 100%; B. 3h, 40%; C. 8h, 100%

图 1 模型乳状液破乳效果图

Fig. 1 Photograph showing the process of deemulsification

从乳状液的显微镜照片(图 2)显示, 破乳过程就是一个小液滴聚合成大液滴, 最终导致煤油和水完全分离的过程, 由于煤油的密度比水小, 所以上层析出煤油, 下层析出水. 随着破乳时间的增加, 破乳率逐渐增大, 8h 破乳率达 90% 以上.



A. Fresh emulsion B. PR-1 culture addition after 8h

图 2 PR-1 对乳浊液的破乳过程

Fig. 2 Photomicrographs of W/O model emulsion, before and after the bacterial deemulsification

2.2 培养液中不同成分的破乳活性

取 1mL PR-1 菌株培养液, 4 000r/min 离心 30min, 取沉淀物加蒸馏水稀释到 1mL, 与 1mL 离心上清液、1mL 发酵液、1mL 培养基和终浓度 1.67% 乳化剂 Span80 分别加入到 5mL 模型乳浊液

中,混匀,55℃水浴破乳2h,分别测定破乳率,结果见图3.表明PR-1菌株培养液破乳的有效成分主要存在于菌体细胞沉淀中.由此说明PR-1菌株的菌体细胞具有良好的破乳效能.

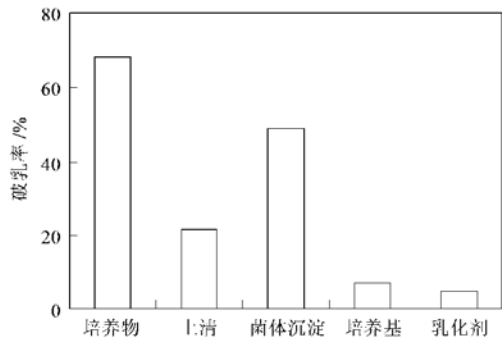


图3 培养液的离心上清液与菌体细胞破乳能力比较
Fig.3 Comparison between the deemulsification capabilities of supernate and pellet of R culture broth

2.3 菌体细胞浓度对破乳能力的影响

表1列出了PR-1细菌全培养液的不同投加量对乳浊液(5mL)破乳效果的影响.从表1可以看出,随着PR-1全培养液投加量的增加,乳浊液的破乳效果增强,在菌体细胞高浓度区域(菌剂投加量>0.6mL)破乳效果增强速率有所减慢.在培养液投加量为1mL时,置55℃8h,破乳率可达到100%.可以近似地认为PR-1细菌对乳浊液的破乳效能为一典型的线性增长的过程.

表1 菌液投量对破乳效果的影响

PR-1 fermentation culture		
培养液投加量/mL	剩余乳浊液体积/mL	破乳率/%
0.2	3.4	35
0.4	2.3	57
0.6	1.0	82
0.8	0.3	95
1.0	0	100

2.4 冻融和高压灭菌对全培养液破乳能力的影响

将PR-1全培养液分别经-20℃,24h冻融及121℃,30min高温处理后,取其各1mL加入到5mL乳浊液中,在55℃水浴破乳4h,测试破乳效果;以未经处理的培养液为对照,结果见表2.结果表明,PR-1全培养液经低温冷冻和高温处理后对乳浊液的破乳能力无明显影响,破乳性能稳定,说明菌株破乳能力与其生长代谢及产物无关.

表2 培养液的冻融和灭菌处理对破乳能力的影响

Table 2 Effects of freezing and autoclaving on the deemulsification of PR-1		
培养液处理	剩余乳浊液体积/mL	破乳率/%
冻融	1.5	75
灭菌	1.7	72
对照	1.4	77

2.5 红球菌PR-1细胞表面特征及结构分析

2.5.1 菌体接触角的测定

对于水来说,当 $\theta > 90^\circ$ 为疏水; $\theta < 90^\circ$ 为亲水.测量*Bacillus* sp. ATCC 21332和PR-1菌体细胞在煤油中相对于水的接触角,比较结果如图4所示.可以看出,ATCC21332具有很强的亲水性,在煤油中对水的接触角为55.5°;而PR-1具有很强的疏水性,在煤油中对水的接触角为122.5°.因此PR-1在对W/O模型乳状液的破乳过程中,其菌体细胞必然起着重要的作用.

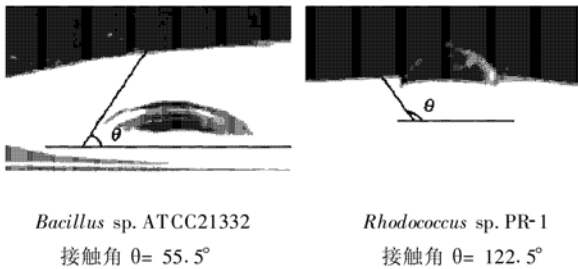
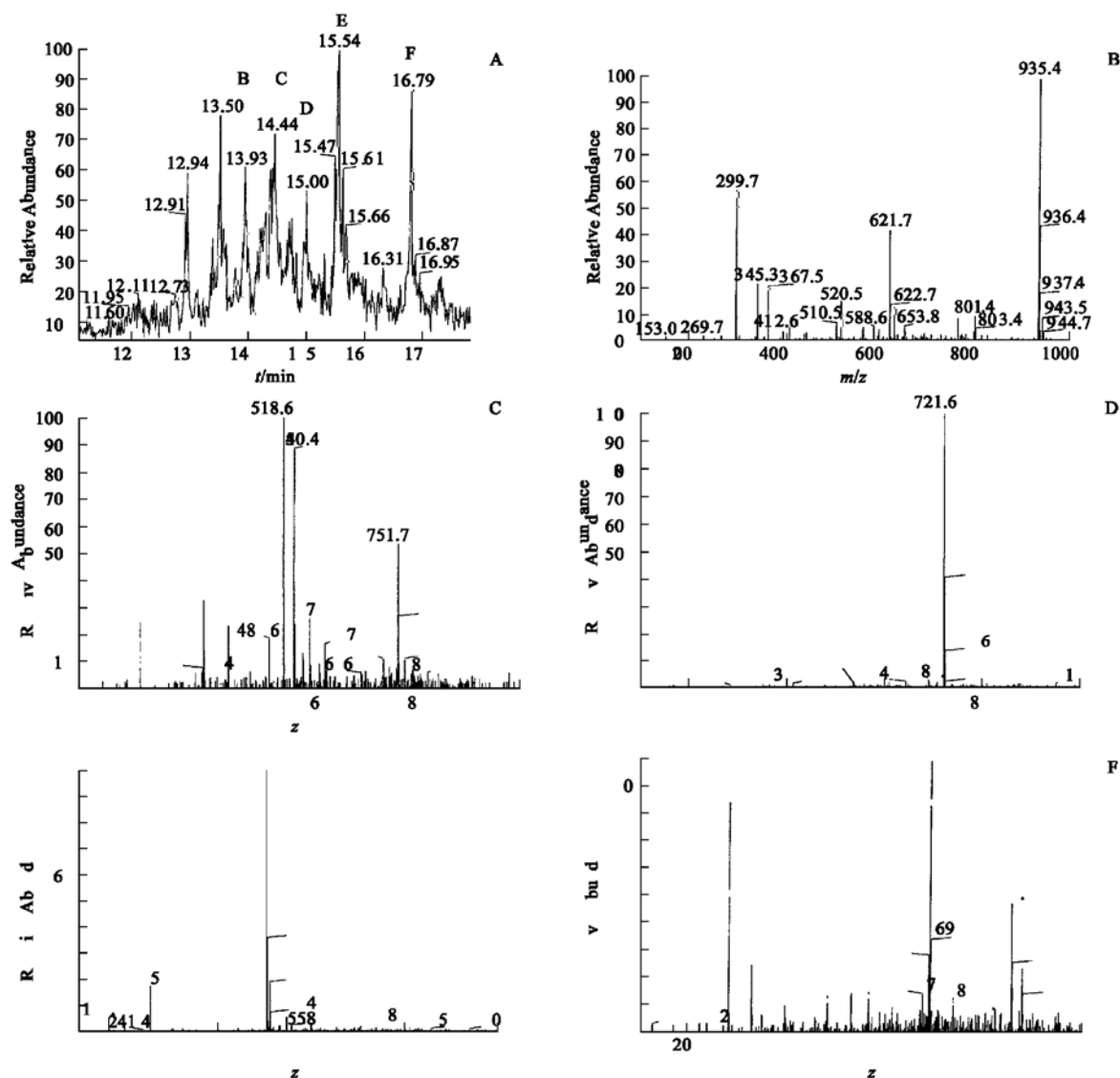


图4 芽孢杆菌ATCC21332与红球菌PR-1在煤油中对水的接触角比较

Fig.4 Contact angle comparison between stain ATCC21332 and PR-1

2.5.2 枝菌酸结构分析

枝菌酸是一种在分子二位碳原子(α)上有含2个不饱和双键的长烷基侧链,三位碳原子(β)上有1个羟基的高分子脂肪酸,写成结构式为 $(CH_2)_n(CH)_mCHOHCHCOOH$, m 代表双键数, n 代表脂肪酸长度;由于枝菌酸的长疏水性碳链,因而会使菌体细胞呈现为一定的疏水性.红球菌属于诺卡氏放线菌类,枝菌酸分析是用于鉴定诺卡氏放线菌各种属的重要指标之一,其枝菌酸碳原子数为 $C_{34} \sim C_{52}$ ^[12].PR-1的枝菌酸甲酯样品气相色谱-质谱图见图5,可以看出9个主峰的出峰时间分别为13.93min,14.44min,15.00min,15.54min和16.79min,相应的分子量为别为935.4,751.7,721.6,504.5和691.5,按照结构式可以得出枝菌酸的碳链长度范围是 $C_{27} \sim C_{54}$,其中 C_{46} 是最主要的部分,枝菌酸含3~4个双键.



A 为枝菌酸甲酯气相色谱图; B~ F 为 A 图中主峰 B~ F 的质谱图

图 5 PR-1 枝菌酸甲酯的气相色谱-质谱联用分析

Fig. 5 Gas chromatograph-mass spectrometer trace of mycolic acid methyl ester derivative from PR-1

2.5.3 PR-1 细胞的 BATH (bacterial adhesion to hydrocarbon) 测定

通过 BATH 测定得出 $CSH_R = [(3.5 \times 10^{-6} \sim 4.5 \times 10^{-7}) / 3.5 \times 10^{-6}] \times 100\% = 87\%$, 大于 80% 即为强疏水性, 说明 PR-1 的疏水性很强, 这种疏水性是由于其菌体细胞表面有枝菌酸这种疏水性物质所致。

2.6 超声波破碎菌体细胞后破乳能力变化

取 PR-1 新鲜培养液, 进行超声波破碎细胞处理(功率为 450W, 破碎 10s, 冰浴 15s 为一循环, 共进行 300 次循环), 直至几乎全部菌体细胞被破碎。取破碎的细胞液及未经超声波处理的菌液分别进行

乳浊液的破乳测试, 结果见图 6。结果表明, 未经超声波处理的 PR-1 完整菌体细胞对乳浊液破乳 8h, 破乳率为 92%; 而经过超声波破碎后的细胞其破乳率仅为 30%, 其破乳能力仅为完整菌体细胞的 33%。该结果说明 PR-1 菌株的破乳能力取决于菌体细胞的完整性, 而不取决于菌株所产的酶类或代谢产物。图 6 中对照是用 1mL 培养基代替菌液加入到乳浊液中, 8h 后有 12% 的乳浊液被破乳, 这是由于加热使乳浊液内液滴的布朗运动加剧, 小水滴碰撞几率增大, 故会产生一定的破乳作用。

2.7 有机溶剂处理 PR-1 菌体细胞后破乳能力变化

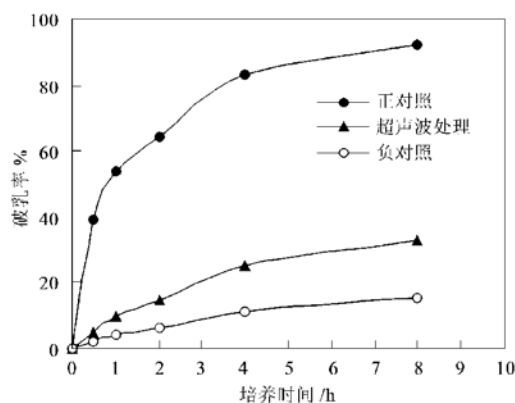


图 6 经超声波处理后 PR-1 菌体细胞破乳能力变化

Fig. 6 Variety of de-emulsification capability of PR-1 dealing with ultrasonic

取一定体积的 PR-1 菌株培养液, 加入 10 倍体积的正十六烷, 25 °C 振荡 4h 后 4 000 r/min 离心 15min, 去除上层正十六烷溶液, 取下层含有菌体细胞的溶液对模型乳浊液进行破乳测试, 并与未被正十六烷处理的培养液的破乳能力比较, 结果如图 7 所示. 由图 7 可以看出, 被正十六烷处理后的菌体细胞破乳活性显著降低, 仅保留原有菌体细菌破乳能力的 52%. 实验还发现在十六烷中检测到原存在于菌体表面的枝菌酸类物质, 由此推测, PR-1 细胞表面像枝菌酸这样的脂溶性疏水物质与破乳活性相关.

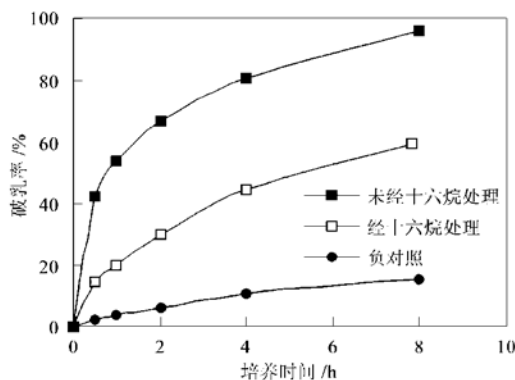


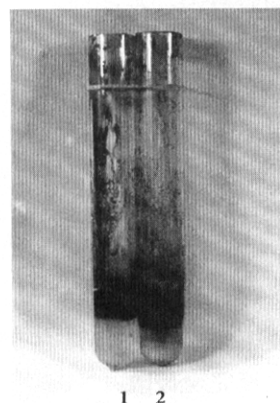
图 7 经正十六烷洗涤菌体后 PR-1 细胞破乳能力变化

Fig. 7 Variety of de-emulsification capability of PR-1 dealing with hexadecane

2.8 红球菌 PR-1 与化学破乳剂 DGF-01 对原油乳状液的破乳能力比较

将 5mL 的 PR-1 全培养液和 1 000mg/mL 化学破乳剂 DGF-01 分别加入到 25mL 的原油乳状液中, 搅拌均匀, 在 55 °C 的水浴上进行破乳能力比较.

比较结果如图 8 所示, 对于 J9-19 原油乳状液, 在相同条件下, PR-1 全培养液比化学破乳剂 DGF-01 具有更好的破乳能力. 水浴 4.5h 时, PR-1 全培养液已经几乎完全脱出原油乳状液中 20.5mL 水, 而化学破乳剂 DGF-01 只脱出 14.5mL 水. 该实验结果进一步证明微生物发酵液可作为油田原油乳状液的破乳剂.



1. 红球菌 PR-1 全培养液; 2. 化学破乳剂 DGF-01

图 8 红球菌 PR-1 培养物与化学破乳剂 DGF-01 对 J9-19 原油乳状液破乳效果比较

Fig. 8 De-emulsification comparison between *Rhodococcus* sp. PR-1 culture with chemical de-emulsifier DGF-01 on the J9-19 crude oil emulsion DGF-01

3 讨论

破乳是一个复杂的过程, 目前尚没有一个固定的规律可用, 因此也没有一种万能的破乳剂. 近年来国内外对原油破乳的研究较多, 均是根据乳状液特定的形成特点及离子强度进行破乳剂的复配, 或是利用细菌或其代谢产物, 如有机酸及表面活性剂等^[13, 14]. Nalina 等人从石油污染地点筛选出一组混合菌群, 发现它们具有很好的破乳活性, 经证实是菌体粒子和产生的表面活性剂起破乳作用^[15, 16].

本实验的乳状液是 W/O 型乳状液, 但由于在破乳试验中加入了微生物的发酵液, 部分地改变了乳状液的性质. 由于水的密度比油大, 因而会在局部形成 O/W 型乳状液, 红球菌 PR-1 的菌体细胞会在此处发挥其很强的破乳能力, 最终使模型乳状液完全破乳. 红球菌 PR-1 发酵液的破乳能力主要源于其疏水性的菌体细胞. 因为 PR-1 的菌体表面有枝菌酸这种疏水性物质, 使菌体本身具有一定的疏水性, 菌体的这种性质驱使菌体在乳状液中向油水界面扩散并占据一个位置, 通过架桥的作用, 使液滴在其表面润湿, 接触, 最后聚合导致了乳状液的破乳,

外力(如机械力或热能)的作用会加速这种破乳作用. 本文还首次提出 PR-1 细菌对乳浊液的破乳效能为一典型的线性增长的过程.

红球菌属于诺卡氏菌型放线菌, 是一株多功能的与生物降解有关的“超级菌株”, 菌株均无毒无害, 此前报道它能够在常、低温对烷烃进行降解^[17, 18]及芳香烃污染物的生物降解^[19], 生物絮凝^[20], 产表面活性剂^[17], 生物脱硫^[21], 石油勘探^[22], 但其破乳作用未见报道. 利用红球菌具有解烃、破乳、除污、絮凝等功能, 同时具有安全、高效、无毒、对环境无污染等特点, 据此可在不同时期设计不同的工艺流程, 最后降低水中 BOD 值, 这样就能对油田废水或工业废水进行有效的处理.

4 结论

(1) 红球菌 PR-1 菌株培养液在 55℃下 8h 左右可以使模型乳浊液完全破乳.

(2) 碳链长度范围在 C₂₇~C₅₄的枝菌酸类物质是保持菌体细胞完整性和疏水性的关键, 并对细胞的破乳活性至关重要.

(3) 该菌株用于原油乳状液的破乳具有操作方便, 破乳性好, 应用面广, 无毒无害等优点, 可作为原油乳状液或油田采出液的破乳剂.

参考文献:

- [1] 徐燕莉. 表面活性剂的功能[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000, 106~137.
- [2] 姚允武, 袁祖楠. 胶体与表面化学导论[M]. 天津: 南开大学出版社, 1988. 165~258.
- [3] 董元彦, 李宝华, 路福绥. 物理化学[M]. (第三版). 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] 杨小莉, 陆婉珍. 有关原油乳状液稳定性的研究[J]. 油田化学, 1998, **15**(1): 87~96.
- [5] 张瑞泉, 康威, 郭志东, 等. 原油分析评价[M]. 北京: 石油工业出版社, 2000. 89~94.
- [6] Chen C M, Lu C H, Chang C H, *et al.* Influence of pH on the stability of oil-in-water emulsions stabilized by a splittable surfactant [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2000, **170**: 173~179.
- [7] Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity [J]. FEMS Microbiology Letters, 1984, **22**: 289~295.
- [8] Richard S P, Kevin C M, *et al.* Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? [J] Applied Environment Microbiology, 1999, **65**: 2877~2894.
- [9] Francois A, Michel P, Philippe J, *et al.* Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, **45**: 119~126.
- [10] Stratton H M, Brook P R, Seviour R J. Analysis of the structural diversity of mycolic acids of *Rhodococcus* and *Gordonia* isolates from activated sludge foams by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry (SIM GC-MS) [J]. Journal of Microbiology Methods, 1999, **35**: 53~63.
- [11] Steven R H, Jennifer D T. Analysis of mycolic acids by high performance liquid chromatography and fluorimetric detection implications for the identification of mycobacteria in clinical samples [J]. Journal of Chromatography A, 1995, **692**: 167~172.
- [12] Sutcliffe I C. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, **74**: 49~58.
- [13] 夏立新, 曹国英, 陆世维, 等. 原油乳状液稳定性和破乳研究进展[J]. 化学研究与应用, 2002, **14**(6): 623~627.
- [14] Madhusweta D. Characterization of deemulsification capabilities of a *Micrococcus* species [J]. Bioresource Technology, 2001, **79**: 15~22.
- [15] Nalina N, Ajay S, Owen P W, *et al.* De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture [J]. Process Biochemistry, 2002, **37**: 1135~1141.
- [16] Nalina N, Ajay S, Owen P W, *et al.* Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2002, **18**: 435~440.
- [17] Margesin R, Labbé D, Schinner F C, *et al.* Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils [J]. Applied Environment Microbiology, 2003, **69**: 3085~3092.
- [18] Whyte L G, Hawari J, Zhou E, *et al.* Biodegradation of variable chain length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. [J]. Applied Environment Microbiology, 1998, **64**: 2578~2584.
- [19] Warhurst A W, Clarke K F, Hill R A, *et al.* Production of catechols and muconic acids from various aromatics by the styrene-degrader *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 [J]. Biotechnology Letters, 1994, **16**: 513~516.
- [20] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, *et al.* Chemical structure of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1995, **59**: 1652~1656.
- [21] Glagy C, Claudia S, Idania V, *et al.* Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus* sp. Strain [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, **215**: 157~161.
- [22] Ivshina I B, Oborin A A, Nesterenko O A, *et al.* Bacteria of the *Rhodococcus* genus from the ground water of oil-bearing deposits in the Perm region near the Ural [J]. Mikrobiologiya, 1981, **50**: 709~717.