

pH 对破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 破乳性能的影响

黄翔峰 尚家佳 陆丽君 刘佳*

(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: 从受石油污染的土壤中筛选出一株破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1, 该菌在初始 pH 6.0–11.0 均可生长, 其最适初始 pH 为 10.0。在初始 pH 10.0 条件下培养, 破乳菌产量最高可达 4.8 g/L, 菌悬液投加量为 1000 mg/L 时, 24 h 破乳率在 85% 以上。同时, 该培养条件下得到的生物破乳菌细胞表面疏水性最大, 对碳氢化合物的吸附能力达 72.7%, 接触角达 115°。采用稳定性分析仪分别对 pH 7.0 和 pH 10.0 条件下培养得到的菌体的破乳效果进行分析, 结果发现与初始 pH 7.0 相比, 初始 pH 10.0 培养得到的破乳菌可以加速分散相粒径的增大, 最终使乳状液破乳速率大幅提高。

关键词: 生物破乳菌, 细胞表面疏水性, 破乳

Influence of pH on Emulsion Breaking Performance of a Demulsifying Strain *Alcaligenes* sp. S-XJ-1

HUANG Xiang-Feng SHANG Jia-Jia LU Li-Jun LIU Jia*

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

Abstract: One demulsifying strain of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1, isolated from the oil-contaminated soil, could grow at initial cultivation pH ranging from 6.0 to 11.0 and the optimum pH was observed at 10.0. Cultivated at initial pH 10.0, the biomass yield reached highest at 4.8 g/L and the emulsion breaking ratio achieved over 85% within 24 h when the biodemulsifier was dosed at 1000 mg/L. Meanwhile, this demulsifying strain S-XJ-1 had a higher cell surface hydrophobicity with ratio of microbial adhesion to hydrocarbon at 72.7% and water contact angle at 115° when it was cultivated at initial pH 10.0. To compare the demulsification process of demulsifiers produced at pH 7.0 and pH 10.0, kerosene-water model emulsion (W/O) mixed with the demulsifier was analyzed using Turbiscan method. Compared with the biodemulsifier produced under initial pH 7.0, the biodemulsifier produced at initial pH 10.0 remarkably increased the particle size of the dispersed phase, and then greatly improved the emulsion breaking rate.

Keywords: Demulsifying strain, Cell surface hydrophobicity, Demulsification

生物表面活性剂是微生物在一定培养条件下代谢产生的具有一定表/界面活性,且同时具有亲水基和疏水基的两亲化合物^[1]。与化学合成的表面活性剂相比,生物表面活性剂具有选择性好、用量少、低毒、易生物降解、可引入化学方法难以产生的新化学基团等特点^[2]。生物破乳剂是生物表面活性剂的一种,在石油开采、制药、工业废水处理等行业均有广阔的应用前景,其中原油乳状液破乳对生物破乳剂的需求量最大^[3]。

从地层中开采出的原油乳状液成分复杂,具有高碱、高盐等特点,对于这一类型的原油乳状液,某些生物破乳剂可能会存在破乳效率降低或失活的问题。因此,研究与开发嗜碱菌来产生生物破乳剂具有重要的意义。嗜碱微生物是指那些在 pH 9.0 以上生长良好,在 pH 10.0–12.0 生长最佳,在 pH 6.5 左右不能或仅能缓慢生长的微生物^[4]。目前研究主要集中于嗜碱菌产生的胞外碱性酶及其在医药、化学、环保、造纸和麻纺等方面的应用^[5]。利用嗜碱菌进行乳状液破乳的研究罕见报道,而这一研究将有利于推广生物破乳剂在原油乳状液破乳中的应用。

前期研究表明^[6–7],本实验采用的破乳菌株 S-XJ-1 经鉴定为一株产碱杆菌,该菌全培养液起主要破乳作用的是菌体细胞。本文着重研究了培养基初始 pH 对破乳菌的影响,并对破乳菌产量、破乳性能与细胞表面疏水性进行了研究和分析。

1 材料与方 法

1.1 菌体培养

本研究所用菌株为一株从受石油污染的土壤中筛选得到的 *Alcaligenes* sp., 命名为 S-XJ-1。本研究所用的发酵培养基(1 L): 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, pH 7.0。碳源为液体石蜡 4% (V/V)。其中微量元素溶液(1 L)包含 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1000 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1000 mg, EDTA 1400 mg。用 6 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 调节培养基初始 pH 分别为 6.0–11.0。培养基使用前,使用高压蒸气灭菌, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。接入种子培养基后在摇床中培养 7 d, 培养条件为 35°C、130 r/min。

1.2 破乳菌产量

将全培养液用四氯化碳萃取除去石蜡层, 剩余液体在 12000 r/min、4°C 离心 10 min 得到菌体, 再

用去离子水清洗 2 次, 置于冷冻干燥机(Scientz-10N, 宁波新芝生物科技股份有限公司)经 -50°C 冷冻干燥 24 h。称重并计算得到的干粉量, 即为破乳菌产量。每次试验测试 3 次, 试验结果取计算后得到的平均值。

1.3 培养液 pH

将全培养液倒入分液漏斗中, 静置 30 min 后分液去除上层的剩余石蜡层, 取下层用 pH 计测定其 pH 值。每次试验测试 3 次, 试验结果取计算后得到的平均值。

1.4 破乳能力

1.4.1 模型乳状液配制: 用煤油和水配制油包水型(W/O)模型乳状液, 配制方法参考相关文献[8–9], 并加以调整。具体如下: 在 250 mL 高脚烧杯中, 加入 80 mL 溶有 1.526 g Span80 和 0.074 g Tween80 的煤油溶液, 然后加入 120 mL 蒸馏水, 用高速搅拌乳化机(WL-500CY, 上海威宇机电有限公司, 中国)搅拌 3.5 min, 转速 10000 r/min。采用油红显色法鉴定为 W/O 型模型乳状液。

1.4.2 破乳菌溶液配制: 将不同 pH 条件下培养得到的全培养液在 12000 r/min、4°C 离心 10 min 得到菌体, 根据 1.2 中测试得到的破乳菌产量浓度, 加入一定体积的蒸馏水, 配制成 10 g/L 和 5 g/L 的菌悬液, 用于乳状液破乳性能的测试。

1.4.3 破乳试验: 破乳试验按照石油行业标准《原油破乳剂使用性能检测方法(瓶试法)》(SY/T 5281-2000)进行。在 20 mL 具塞圆底试管内加入 18 mL 乳状液和 2 mL 破乳菌溶液, 加塞后用力振荡 120 次, 置于 35°C 恒温水浴中, 定时读取脱出油和脱出水的体积, 计算破乳菌的破乳率。破乳率的计算公式如下:

$$\text{破乳率} = (\text{脱出油体积} + \text{脱出水体积}) / (\text{乳状液体积} + \text{破乳菌溶液体积}) \times 100\% \quad (1)$$

为评价乳状液的稳定性, 在 20 mL 具塞圆底试管内加入 20 mL 乳状液, 其他条件同上, 作为空白参照 1; 在 20 mL 具塞圆底试管内加入 18 mL 乳状液和 2 mL 蒸馏水, 其他条件同上, 作为空白参照 2。评价破乳菌破乳效果的试验和空白试验每次测试 3 个平行样, 试验结果取计算后得到的平均值。

1.5 疏水性测试

1.5.1 碳氢化合物吸附能力(Microbial adhesion to hydrocarbon, MATH): 微生物对碳氢化合物吸附

能力的测试方法参照文献[10]。将全培养液离心,用 0.01 mol/L pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液清洗 2 次,再悬浮于该缓冲液中,配制成菌悬液。以磷酸盐缓冲液为空白,使用该缓冲液将菌悬液在 580 nm 下的 OD 值调至 0.9–1.0,以使菌悬液浓度达到 10^8 – 10^9 CFU/mL,记下此 OD 值 A_0 。用移液管移取 5 mL 上述菌悬液至具塞圆底试管中,再用移液枪加入 1 mL 煤油,在迷你振荡器上以 1800 r/min 的速率振荡 3 min。在室温下静置 20 min 后,用注射针头移取下层水相 3 mL 至玻璃比色皿中,用紫外-可见分光光度计(欣茂 752W)测定其在 580 nm 下的吸光度,记为 A_f 。每次试验测试 3 次,试验结果取计算后得到的平均值。MATH 的计算公式如下:

$$\text{MATH} = (1 - A_f / A_0) \times 100\% \quad (2)$$

1.5.2 接触角测量(Water contact angle, WCA)^[11–12]:离心收集菌体,用无菌水洗涤 2 次,用 0.45 μm 的硝酸纤维素膜过滤,使膜上菌体浓度大于 10^8 cells/mm²。将滤膜平铺在无菌琼脂培养基上,室温放置 2 h 润湿均匀,然后放在普通滤纸上干燥 60 min,干燥后将滤膜放到表面接触角测试分析仪(OCA15, 德国 Dataphysics)上测量其与蒸馏水的接触角。每个滤纸上选取 10 个点进行测量,取平均值得到接触角。琼脂培养基(1 L): 琼脂粉 10 g, 甘油 100 mL。

1.6 稳定性分析

Turbiscan 稳定性分析仪采用近红外脉冲光源对乳状液进行垂直扫描,能快速分析乳状液的絮凝、凝结、分相等综合现象,广泛应用于食品、化妆品、石油化工、造纸等领域^[13]。对添加破乳菌溶液的煤油-水乳状液体系进行稳定性分析,采用的仪器为 Turbiscan Lab[®] Expert (Formulation, France)。近红外扫描仪包含一个近红外脉冲光源($\lambda = 880$ nm)和 2 个同步探测器,其中一个为反射光探测器,一个为透射光探测器。探测器从样品底部起沿样品测试室向上扫描,每 40 μm 高度采集一次透射光和反射光数据。透射光和反射光强度以百分比表示,其含义是相对标准样品光通量为 10% 的硅油(10% Silicone oil)的光通量的百分比。采用多次扫描模式进行测量,设定每个样品的扫描时间为 24 h。煤油-水乳状液配制方法同 1.4.1,破乳菌投加浓度为 500 mg/L。设定样品室温度为 35°C,与破乳试验的条件一致。

2 结果与讨论

2.1 pH 对破乳菌产量的影响

将 S-XJ-1 在初始 pH 分别为 6.0–11.0 的培养基中培养 7 d,每 24 h 对培养基的 pH 和菌体产量进行测定,结果见图 1 和图 2。由图 1 可见,初始 pH 呈碱性的培养基培养 3 d 后,培养液的 pH 会逐渐趋向中性;而初始 pH 为 6.0 和 7.0 的培养基,培养后的 pH 变化不大。说明碱性环境下,破乳菌 S-XJ-1 可能通过微生物的自身调节机制调节生长环境的 pH,使其能够适应碱性环境。

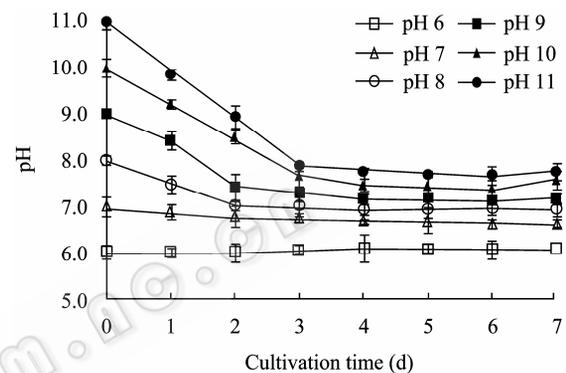


图 1 培养液 pH 随培养时间的变化

Fig. 1 Variation on the pH of fermented broth versus cultivation time

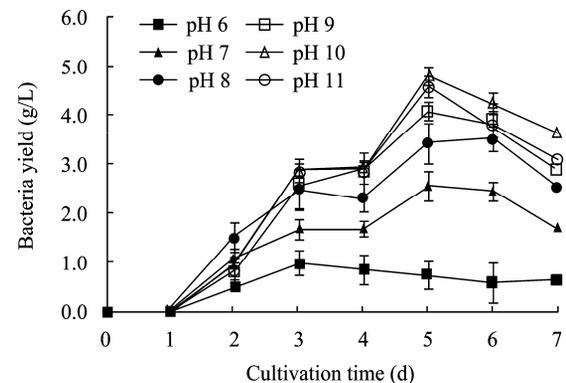


图 2 破乳菌菌体产量随培养时间的变化

Fig. 2 Variation on the bacteria yield versus cultivation time

pH 对破乳菌产量的影响见图 2,从图中可知,破乳菌 S-XJ-1 在培养至第 5 天时,产量达到最大;随着培养基初始 pH 的提高,破乳菌产量逐渐提高,其中初始 pH 为 10.0 条件下培养至第 5 天时,菌体产量可高达 4.8 g/L。由以上分析可知,破乳菌 S-XJ-1 在碱性条件下生长良好,在中性或酸性条件

下生长缓慢,且菌株具有调节胞外 pH 的能力,推测该菌是一株兼性嗜碱菌。其他研究中报道的生物破乳剂产生菌包括不动细菌(*Acinetobacter* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、红球菌(*Rhodococcus* sp.)、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)、产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)、诺卡式菌(*Nocardia amarae*)等^[2],有关嗜碱菌为生物破乳菌的研究尚未见报道。

2.2 pH 对破乳菌破乳性能的影响

不同初始 pH 条件下培养得到的破乳菌破乳性能结果如图3所示。破乳菌溶液投加量为1000 mg/L时,初始 pH 6.0、7.0条件下培养的菌体24 h破乳率低于40%;初始 pH 10.0、11.0条件下培养的菌体,

24 h 破乳率高达85%。破乳试验开始的前12 h 内,初始 pH 9.0–11.0条件下培养得到的菌体的破乳速率明显快于初始 pH 6.0–8.0,24 h 后破乳率趋于稳定。破乳菌溶液投加量为500 mg/L 时,虽然破乳率均略有降低,但是与较高投加量时呈现的规律基本相同,尤其是初始 pH 10.0和11.0时,S-XJ-1菌悬液24 h 破乳率仍在70%左右。以上结果说明,pH 10.0和 pH 11.0条件下培养得到的破乳菌的破乳性能优于其他条件。综合考虑破乳菌产量和破乳效果,确定该菌株的最佳初始 pH 为10.0。此外,经过多次试验,发现2个空白参照的破乳率均小于10%,说明本研究所用的乳状液较稳定,且蒸馏水对乳状液的破乳无影响。

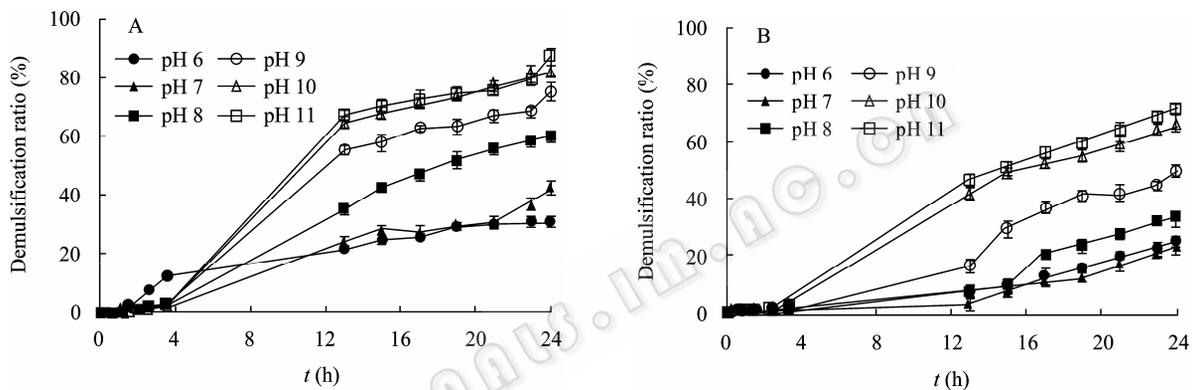


图3 不同初始 pH 培养下得到的破乳菌破乳性能的比较

Fig. 3 Comparison on the demulsification efficiency of biodemulsifiers cultivated at different initial pH

注: A: 破乳菌溶液投加量为 1000 mg/L; B: 破乳菌溶液投加量为 500 mg/L.

Note: A: The dosage of the biodemulsifier was 1000 mg/L; B: The dosage of the biodemulsifier was 500 mg/L.

大部分有关生物破乳剂产生菌的研究发现,中性偏碱性条件下培养得到的破乳菌破乳效果较好。缪永霞等^[14]发现 pH 为 7.0 条件下,嗜中温菌的破乳效果最佳。王晓梅等^[15]发现一株芽孢杆菌在 pH 为 7.0–7.5 培养下的破乳活性最佳。此外,从油田采出水中筛选得到一株具有破乳性能的沙雷氏菌,其最适生长 pH 为 7.0–9.0^[16]。本研究中的破乳菌在初始 pH 10 条件下培养时菌体产量最大、破乳性能最强,因而在碱性原油乳状液的破乳中具有较广泛的应用。

2.3 破乳菌的细胞表面疏水性

细菌的细胞表面疏水性(Cell surface hydrophobicity, CSH)是决定细菌非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要的因素之一^[17],也是影响细菌吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之

一^[18]。本研究采用碳氢化合物吸附能力法和接触角法对 S-XJ-1 细胞表面疏水性进行了测试,试验结果见图 4。由图 4 可见,pH 6.0–7.0 时培养得到的菌体的 MATH 值均小于 40%;而 pH 9.0–11.0 时,S-XJ-1 细胞 MATH 值均大于 50%。MATH 值越大,表明其细胞表面疏水性越强,说明碱性条件培养下,菌株的表面疏水性增强。对菌株的接触角进行测试发现,初始 pH 6.0–8.0 时培养得到的 S-XJ-1 菌体的接触角小于 90°;初始 pH 9.0–11.0 时培养得到的菌体的接触角大于 100°。接触角测试结果也表明随着培养基初始 pH 的提高,细胞表面疏水性逐渐增大,两种方法测试结果比较一致。此外,研究中发现最佳初始 pH 10.0 条件下,培养得到的 S-XJ-1 菌株的细胞表面疏水性最大。

以上分析表明,破乳菌疏水性随着培养基初始

pH 的提高而逐渐增强,这可能是 pH 对生物破乳菌产量和破乳菌破乳性能影响的原因。培养基初始 pH 对破乳菌产量的影响,可能是因为细胞表面疏水性越强,越有利于菌株对疏水性碳源的摄取,从而促进了菌体的生长,提高了生物破乳菌的产量。Prabhu 等^[19]的研究也表明,与细菌生长相关的细胞表面疏水性,对细菌摄取疏水性碳源起着重要作用。培养基初始 pH 对破乳性能的影响,可能是因为生物破乳菌的细胞表面疏水性越强,投加到乳状液中能够快速地在疏水性的煤油中分散,并能吸附在油水界面,从而提高了破乳速率和性能。马挺等研究发现破乳菌 *Rhodococcus* sp. PR-1 的破乳机理为其细胞表面所具有的较强疏水性造成的^[20],与本研究结果一致。

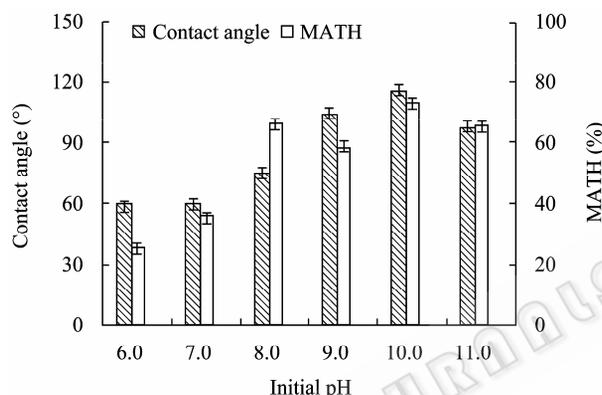


图4 不同初始 pH 培养下得到的破乳菌细胞表面疏水性的比较

Fig. 4 Comparison of cell surface hydrophobicity of the demulsifying strains cultivated at different initial pH

2.4 pH 7 与 pH 10 时产生的破乳菌破乳过程分析比较

为了比较 2 种初始 pH 培养得到的破乳菌的破乳过程的差异,采用稳定性分析仪分别对 pH 7.0 和 pH 10.0 条件下培养得到的菌体的破乳性能进行分析。通过测量背散射光 *BS* 和透射光 *T* 的强度, Turbiscan 仪可以得到分散相水滴平均粒径随时间的变化曲线,结果如图 5 所示。随着破乳过程的进行,水滴平均粒径总体上呈现逐渐增大的趋势。初始 pH 10.0 培养得到的菌体,水滴粒径在破乳过程前 8 h 增大速率快于 pH 7.0,在 8 h 时粒径达到最大;而初始 pH 7.0 培养得到的菌体,水滴粒径在破乳进行 11 h 才达到最大。由此可见,与初始 pH 7.0 相比,在初始 pH 10.0 时培养得到的破乳菌 S-XJ-1 可以更

快地提高液滴聚集和聚并的速率,显著增大粒径,根据 Stokes 公式,液滴的粒径越大,油和水的迁移速度越大^[21]。随着液滴的不断迁移,乳状液最终形成界线分明的油相、剩余乳液、水相 3 层,实现破乳目的。对于整个生物破乳过程,破乳初期的聚集和聚并速率要明显快于后期。

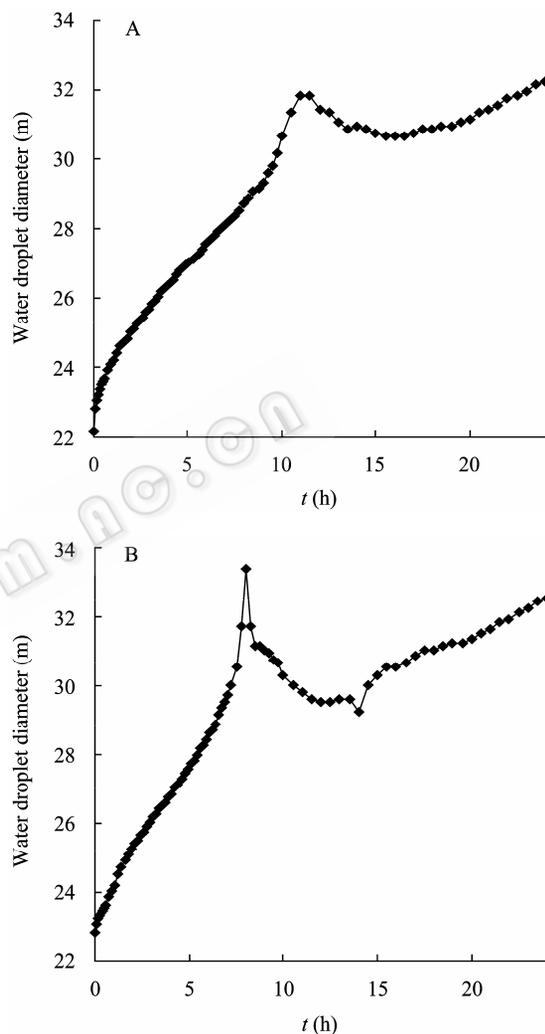


图5 中间段乳状液内部水滴平均粒径随破乳时间的变化曲线

Fig. 5 Variation of average diameter of water droplet in intermediate residual emulsion versus time

注: A: pH = 7.0 培养得到的破乳菌体; B: pH = 10.0 培养得到的破乳菌体。

Note: A: The demulsifying strain S-XJ-1 cultivated under initial pH 7.0; B: The demulsifying strain S-XJ-1 cultivated under initial pH 10.0.

3 结论

(1) 破乳菌 S-XJ-1 在初始 pH 6.0–11.0 范围内均可生长,在碱性条件下生长良好,在中性或酸性条

件下生长缓慢。随着培养基初始 pH 的提高, 该破乳菌的生物量及其破乳性能均有所提高, 最适初始 pH 为 10.0。

(2) 随着培养基初始 pH 的提高, 破乳菌 S-XJ-1 的细胞表面疏水性逐渐提高, 在最适初始 pH 10.0 时, 细胞表面疏水性最大。细胞表面疏水性对于 S-XJ-1 菌体利用疏水性碳源石蜡和生物破乳菌破乳均具有一定的促进作用。

参 考 文 献

- [1] Ron EZ, Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 2001, **3**(4): 229–236.
- [2] Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**(1): 99–121.
- [3] Nayak AS, Vijaykumar MH, Karegoudar TB. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, **63**(1): 73–79.
- [4] Horikoshi K. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63**(4): 735–750.
- [5] 华洋林, 赵继, 伦潘力. 嗜碱菌的特性及其应用前景. 生命的化学, 2004, **24**(4): 358–360.
- [6] 黄翔峰, 闻岳, 杨葆华, 等. 破乳菌种 TR-1 的筛选与破乳性能实验研究. 油田化学, 2006, **23**(2): 136–139.
- [7] 陆丽君, 黄翔峰, 刘佳, 等. 一株高效生物表面活性剂产生菌的筛选鉴定及其性能研究. 工业微生物, 2008, **38**(5): 34–39.
- [8] Nadarajah N, Singh A, Ward OP. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochem*, 2002, **37**(10): 1135–1141.
- [9] Lee JC, Lee KY. Emulsification using environmental compatible emulsifiers and de-emulsification using DC field and immobilized *Nocardia amarae*. *Biotechnology Letters*, 2000, **22**(14): 1157–1163.
- [10] Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett* 2, 2006, **262**(2): 129–134.
- [11] Busscher J, Weerkamp AH. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**(5): 980–983.
- [12] Heard J, Johnson BB, Wells JD, et al. Measuring 'hydrophobicity' of filamentous bacteria found in wastewater treatment plants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, **72**(2): 289–294.
- [13] 张强, 陈颖, 付文静, 等. TURBISCAN LAB 稳定性分析仪研究农药 WDG 悬浮液稳定性. 光谱学月光谱分析, 2008, **28**(4): 843–846.
- [14] 缪永霞, 易绍金, 蒋锐, 等. 生物破乳菌种对原油乳状液的破乳性能评价. 石油与天然气化工, 2009, **38**(2): 150–152.
- [15] 王晓梅, 李大平, 彭世群, 等. 一株芽孢杆菌及其破乳特性研究. 环境科学与技术, 2009, **32**(3): 22–26.
- [16] 刘娜, 郭继香, 王晓梅. 生物破乳菌的培养及代谢产物分析. 应用化工, 2007, **36**(6): 557–560.
- [17] Pan WH, Li PL, Liu ZY. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 2006, **12**(3): 148–152.
- [18] Obuekwe CO, Al-Jadi ZK, Al-Saleh ES. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, **63**(3): 273–279.
- [19] Prabhu Y, Phale PS. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003(61): 342–351.
- [20] 马挺, 梁凤来, 奚艳伟, 等. 红球菌 PR-1 菌株破乳性能研究. 环境科学, 2007, **27**(6): 1911–1911.
- [21] Eow JS, Ghadiri M, Sharif AO, et al. Electrostatic enhancement of coalescence of water droplets in oil: a review of the current understanding. *Chemical Engineering Journal*, 2001, **84**(3): 173–192.