

产表面活性剂菌的筛选和验证实验研究

张凤凤 (陕西师范大学生命科学院, 陕西西安 710062)

摘要 [目的]探究废弃钻井液中产表面活性剂菌株的性能。[方法]以废弃的钻井液为原材料,利用生物表面活性剂的性质进行产表面活性剂菌株的培养和筛选,并且将筛选出来的产表面活性剂菌进行排油活性和乳化性能的测定。[结果]筛选出的产表面活性剂菌排油圈的直径约为4 cm,乳化层初始较厚,1 d后变薄。[结论]筛选出的产表面活性剂菌排油活性较好,但乳化性能不稳定。

关键词 产表面活性剂菌;培养;筛选;验证

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)16-04967-02

Experimental Study on Surfactant Bacteria Screening and Validation

ZHANG Su-su (Life Science School, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062)

Abstract [Objective] The research aimed to explore the performance of surfactant producing bacteria of waste drilling fluid. [Method] Taking waste mud as raw material, surfactant producing strain was trained and selected using properties of bio-surfactants, and oil discharge activity and emulsifying properties of surfactant producing bacteria produced and screened out were determined. [Result] Oil ring of surface active agent screened was about 4 cm, the initial emulsion layer was thick, and it was becoming thinning a day later. [Conclusion] Oil extraction activity of surface active agent was good, but the emulsification performance was instable.

Key words Surfactant bacteria; Culture; Selection; Validation

随着我国经济建设的发展,石油开采规模日益扩展,但是由于技术的落后与环保意识的缺乏,土壤石油污染越演越烈,并且严重威胁到人们的生存环境和身体健康。油田中钻井、洗井、采油、运输、炼制等过程中会有数量不等的原油被排放到环境中,使得土壤受到不同程度的污染^[1]。石油在土壤中的积累将导致土壤结构的破坏,影响土壤孔隙率,并且对农作物的生长和发育造成很大的负面影响^[2]。同时,石油经通过“土壤—植物—人”这一食物链进入人体内,危害人体健康^[3]。所以,探究土壤石油污染的治理方法显得极为迫切。

各种修复技术各有所长也各有所短,其中微生物修复技术因其具有速度快、消耗少、效率高、成本低、反应条件温和以及无二次污染等优越性而被人们所提倡。微生物修复的一个关键技术就是生物表面活性剂的应用。生物表面活性剂能显著降低表面张力,提高不溶性石油组分的生物可利用性。与化学表面活性剂相比,生物表面活性剂具有特异性强、高效、低毒、不污染环境以及生产成本低等优点。因此,生物表面活性剂已被广泛地应用于石油污染土壤的修复实践中,显示出良好的应用前景。笔者以废弃的钻井液为原材料,利用生物表面活性剂的性质进行产表面活性剂菌株的培养和筛选,并且将筛选出来的产表面活性剂菌进行排油活性和乳化性能的测定。

1 材料与方**1.1 试验材料**

1.1.1 生物菌剂。以废弃的钻井液为菌源,以原油为唯一碳源进行菌株培养。

1.1.2 培养基。

1.1.2.1 细菌富集培养基。将 KH_2PO_4 1.0 g、 K_2HPO_4 1.0 g、 NH_4NO_3 1.0 g、 CaCl_2 0.02 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 NaCl 10 g

溶于1 L去离子水中,用NaOH调pH至7.0。

1.1.2.2 血平板培养基。将牛肉膏0.3 g、蛋白胨1.0 g、酵母粉0.01 g、 NaCl 0.5 g、琼脂粉2.0 g溶于100 ml去离子水中。灭菌后将培养基冷却到50℃,然后按8% (V/V)用量把绵羊血无菌操作加到冷却的培养基中,轻轻摇匀后倒平板即可。注意不要产生气泡。

1.1.2.3 蓝色平板培养基。将牛肉膏0.3 g、蛋白胨1.0 g、酵母粉0.01 g、 NaCl 0.5 g、琼脂粉2.0 g、十六烷基三甲基溴化铵0.5 g、亚甲基蓝0.002 g溶于100 ml去离子水中,用NaOH调pH至7.0,高压下蒸气灭菌20 min。待冷却后,轻轻摇匀后倒平板即可。

1.1.2.4 LB培养基。胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L,用NaOH调节pH达7.4,高压下蒸气灭菌20 min。

1.1.2.5 复筛摇瓶培养基。将牛肉膏7 g、葡萄糖5 g、 NaNO_3 2.5 g、 KH_2PO_4 4 g、 K_2HPO_4 4 g、 CaCl_2 0.1 g、 MgSO_4 0.2 g、 NaCl 1 g、 KCl 1 g溶于1 L去离子水中,用NaOH调pH至7.5,高压下蒸气灭菌20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 采样。采集废弃的钻井液作为试验样品。

1.2.2 富集培养。称取10 g原油样品,用无菌水稀释100 ml,静置15 min。滤去沉淀,取滤液5 ml,加入装有95 ml富集培养基的250 ml锥形瓶中,加塞,32℃摇床培养2 d。

1.2.3 初步筛选。将富集培养的菌液梯度稀释至10~5,采用涂布法分别接种到血平板培养基和蓝色平板培养基上,放置在30℃培养箱中,培养2 d,观察菌落。在血平板培养基上,菌落周围会形成溶血圈;在蓝色平板培养基上,菌落周围会有蓝色的晕圈。

1.2.4 挑取再培养。用接种环挑取能够产生溶血圈的菌和周围有蓝色晕圈的菌,采用划线法分别接种到血平板培养基和蓝色平板培养基上进行培养。

1.2.5 LB培养基培养。挑选能产生溶血圈的和能产生蓝色晕圈的单菌落,接种到LB培养基,37℃条件下摇床培养

24 h, 做好标记, 编号。

1.2.6 复筛摇瓶培养。用移液枪从 LB 培养基中抽取 5 ml 菌液至一灭菌的盛 100 ml 发酵培养基的 250 ml 三角锥形瓶中, 32 °C 摇床培养 3 d。

1.2.7 生物表面活性剂排油活性的测定。取一定量的发酵培养液, 1 000 r/min 离心 10 min, 得上清液, 取直径为 20 cm 的培养皿, 加入 90 ml 蒸馏水, 并且加入 0.5 g 苏丹 III 染色, 然后加入 1 滴柴油, 待柴油均匀分布于水面上后, 在柴油膜的中央慢慢加入 80 μ l 上清液, 观察排油圈大小。

1.2.8 生物表面活性剂乳化性能的测定。取一定量的发酵培养液, 1 000 r/min 离心 10 min, 得上清液, 取 3 ml 上清液与等体积的柴油, 加到乳化管中, 搅拌, 混合均匀, 制备悬浊液, 观察乳化相和油相的体积变化以及乳化性能的稳定性。

2 结果与分析

2.1 产表面活性剂排油性检测 试验结果见图 1。经测量, 玻璃平皿的直径为 20 cm, 排油圈的直径约为 4 cm。

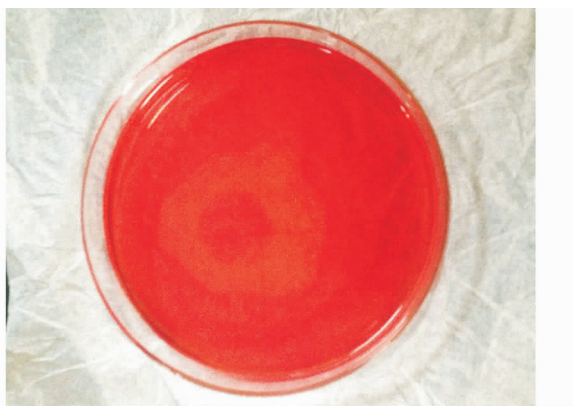


图 1 产表面活性剂排油性检测

2.2 产表面活性剂乳化性能的检验

2.2.1 初始相。由图 2 可知, 乳化层较厚。

2.2.2 变化相。由图 3 可知, 形成乳化层 1 d 后, 乳化层变薄, 说明该产表面活性剂菌的乳化性能不稳定。

3 讨论

以废弃的钻井液为原材料, 利用生物表面活性剂的性质

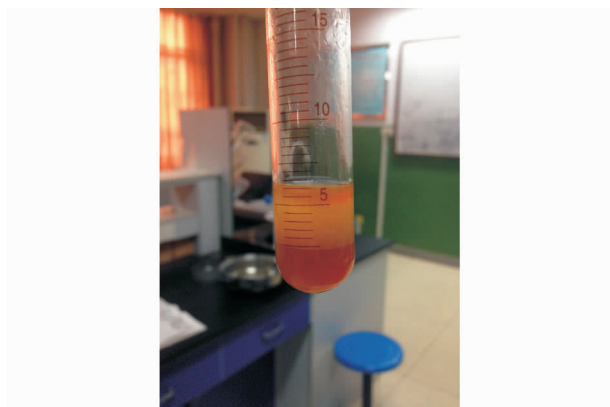


图 2 产表面活性剂乳化性能的检测(初始相)

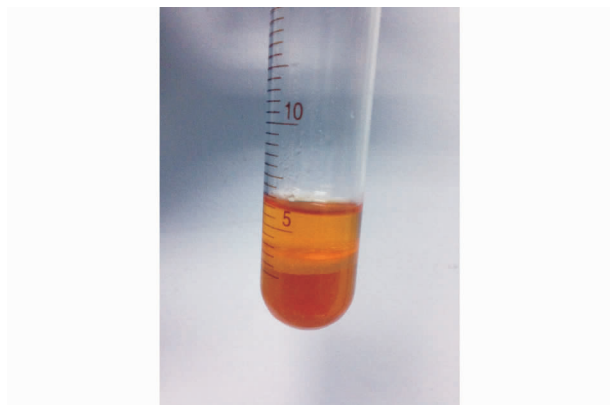


图 3 产表面活性剂乳化性能的检验(变化相)

进行产表面活性剂菌株的培养和筛选, 并且将筛选出来的产表面活性剂菌进行排油活性和乳化性能的测定。经测定, 该试验筛选出来的产表面活性剂菌排油活性较好, 但乳化性能不稳定。

参考文献

- [1] 叶建阳, 叶向德, 郭军权. 石油工程环境保护[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2010.
- [2] 吕志萍, 程龙飞. 石油污染土壤中石油含量对玉米的影响[J]. 油气田环境保护, 2001, 11(1): 36-37.
- [3] 马志华. 石油对海洋环境造成的污染究竟有多大[J]. 森林与人类, 2002(12): 8-9.

(上接第 4963 页)

- [3] 闵天禄. 世界山茶属的研究[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2000.
- [4] 黄建安, 黄意欢, 罗军武, 等. 茶树基因组 DNA 的高效提取方法[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(5): 402-407.

- [5] 闵天禄. 山茶属山茶组植物的分类、分化和分布[J]. 云南植物研究, 1998, 20(2): 127-148.
- [6] 邓白罗, 谭晓风, 漆龙霖, 等. 山茶属红茶组植物的 RAPD 分析及分类研究[J]. 林业科学, 2006, 42(5): 36-40.