

一株高效表面活性剂产生菌的筛选及其活性产物的结构与性质*

肖 兵^{1,2} 杨德玉^{1,2} 史荣久^{2**} 张 颖² 张 阳¹ 郝金生³ 李国桥³ 赵劲毅³

(¹沈阳师范大学化学与生命科学学院, 沈阳 110034; ²中国科学院沈阳应用生态研究所, 中国科学院污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳 110016; ³大庆油田有限责任公司第二采油厂中心化验室, 黑龙江省大庆 163414)

摘 要 采用血平板法结合表面张力法从大庆油田高台子低渗透油藏采出水中筛选出一株高效表面活性剂产生菌, 编号为 DY-9。16S rDNA 序列同源性比对结果显示, DY-9 与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的序列相似性达 99%。在 45 °C、180 r · min⁻¹ 振荡培养条件下, DY-9 在 20 g · L⁻¹ 糖蜜为碳源的培养基中生长良好, 24 h 内将发酵液的表面张力从初始的 69.3 mN · m⁻¹ 降低至 26.5 mN · m⁻¹。48 h 发酵液中表面活性剂粗品的产量达 0.48 g · L⁻¹, 其临界胶束浓度为 28 mg · L⁻¹。菌株产生的表面活性剂在高温 (120 °C, 1 h)、高盐 (12% NaCl) 及较宽的 pH (2 ~ 12) 条件下保持稳定, 溶液的 surface 张力低于 30 mN · m⁻¹。经傅里叶变换红外光谱 (IF-TR) 和高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 分析, 菌株 DY-9 的表面活性产物为环状脂肽类表面活性剂。

关键词 低渗透油藏; 生物表面活性剂; 地衣芽孢杆菌; 脂肽

中图分类号 Q939.99 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2013)3-0779-08

Screening of an efficient biosurfactant-producing bacterial strain and the structure and property of its surface-active metabolic product. XIAO Bing^{1,2}, YANG De-yu^{1,2}, SHI Rong-jiu^{2**}, ZHANG Ying², ZHANG Yang¹, HAO Jin-sheng³, LI Guo-qiao³, ZHAO Jin-yi³ (¹College of Chemistry and Life Sciences, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; ²Key Laboratory of Terrestrial Ecological Processes, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ³Center Laboratory of No. 2 Oil Production Plant, Daqing Oilfield Company Ltd., Daqing 163414, Heilongjiang, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(3): 779–786.

Abstract: By adopting blood-agar procedure combined with surface tension screening strategy, an efficient surfactant-producing bacterial strain DY-9 was successfully isolated from the produced water from low-permeability Gaotaizi oil reservoir, Daqing Oilfield of Northeast China. The comparison with the homoeologous 16S rDNA sequences deposited in the GenBank showed that the DY-9 had a 99% sequence similarity with *Bacillus licheniformis*. When cultured on a medium with 20 g · L⁻¹ of molasses as the sole carbon source at 180 r · min⁻¹ and 45 °C, the DY-9 could grow well, and decrease the surface tension of culture broth from initial 69.3 mN · m⁻¹ to 26.5 mN · m⁻¹ within 24 h. After cultured for 48 h, the maximum raw biosurfactant yield of the strain reached 0.48 g · L⁻¹, and the critical micelle concentration was 28 mg · L⁻¹. The biosurfactant produced by the DY-9 could keep stable under the conditions of high temperature (120 °C) for 1 h, high salinity (12% NaCl), and wide pH (2–12), and the surface tension of the zymotic fluid within 48-h was lower than 30 mN · m⁻¹. The analysis with infrared spectroscopy (IF-TR) and high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) revealed that the surface-active product of the DY-9 was a cyclic structure lipopeptide biosurfactant.

Key words: low-permeability oil reservoir; biosurfactant; *Bacillus licheniformis*; lipopeptide.

* 中国科学院污染生态与环境工程重点实验室资助项目和大庆油田有限责任公司微生物驱油技术攻关项目 (DQYT-0502002-2011-JS-369) 资助。

** 通讯作者 E-mail: shirongjiu@iae.ac.cn

收稿日期: 2012-08-17 接受日期: 2012-11-16

生物表面活性剂是一类由微生物代谢产生的具有表/界面活性,兼具亲水基团和疏水基团的两亲化合物。与化学合成的表面活性剂相比,生物表面活性剂具有高表面活性与环境稳定性、可降解、低毒等优点(Desai & Banat,1997)。有研究表明,能够产生表面活性剂的微生物种类(特别是细菌)丰富,所产生的表面活性物质结构和性质多样(曹娟等,2009; Khire,2010)。近年来,生物表面活性剂在石油开采、环境污染修复、食品、医药、化妆品等诸多行业中的应用研究受到广泛重视(Herman *et al.*,1995; Desai & Banat,1997; Banat *et al.*,2000)。

利用生物表面活性剂提高原油采收率是微生物采油(MEOR)研究的重要内容之一,也是生物表面活性剂在石油工业应用研究较多的领域(Khire,2010)。生物表面活性剂在MEOR领域的应用主要基于其具有良好的油-水界面活性。生物表面活性剂可有效降低原油-水界面张力,并使原油粘度下降,改善原油的流动性,更有利于岩芯中残余油的剥离与释放,进而提高原油采收率。Li等(2002)利用自行筛选的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)菌株P-1的代谢产物(生物表面活性剂)实施了实验室规模的岩芯驱油实验。结果表明,向岩芯中注入10%的菌株代谢产物可提高原油采收率11.2%,并降低注水压力40.1%,降低原油粘度达38.5%;他们在大庆油田实施的单井吞吐实验研究进一步显示,在选择超过60口实验井中,80%的采出井原油产量显著增加。Youssef等(2007)采用注入营养盐等措施首次证实了芽孢杆菌RS-1和枯草芽孢杆菌菌株NRRLB-23049在油藏原位环境中产生表面活性剂的能力和可行性。其他许多研究也表明,基于生物表面活性剂的微生物采油技术具有较大潜力(Banat,1995; Sen,2008; Brown,2010; Zheng *et al.*,2012)。

表面活性剂产生菌的筛选、优化及表面活性产物结构与性质等相关研究是生物表面活性剂成功应用的基础和关键(Lee *et al.*,2007)。产生菌种类、碳源等成分及比例、微量金属(如 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等)等因素均对表面活性剂的产量、结构及活性有重要影响。目前,微生物产生表面活性剂的研究与应用评价仍大多局限于实验室规模。生物表面活性剂的大规模生产成本还高于化学合成的产品(Mulligan & Gibbs,1993)。因此,选育表面活性剂高产菌株,并加强菌株生理及微生物学方面研究,对于优化表面

活性剂生产工艺和进一步研究、开发与应用表面活性剂具有重要理论与实践意义(Banat *et al.*,2000; Xia *et al.*,2012)。

油藏中栖息着多种具有独特生理功能的微生物类群(L'Haridon *et al.*,1995; Grassia *et al.*,1996; 艾明强等,2010),如表面活性剂产生菌(李娜娜等,2010; Xia *et al.*,2012)。深入认识油藏本源的表面活性剂产生菌的微生物学、生理学特征,并开展其表面活性产物的结构与性质等方面研究,对于有效调控表面活性剂产生菌活性,以发挥其在MEOR方面的潜力无疑具有重要作用(Lee *et al.*,2007)。不同油藏的地质、地理及生物、化学环境存在巨大的异质性(Magot,2005),这些差异可能对油藏内微生物的生理、生态学特性产生很大影响。因而,针对特定油藏物理、化学和生物学特点开展油藏本源的表面活性剂产生菌的研究具有重要意义。已有少数研究报道了油藏本源的表面活性剂产生菌(李娜娜等,2010; Xia *et al.*,2012),但对于低渗透油藏(如平均渗透率为 $0.1 \sim 20 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ 的油藏)的相关研究则鲜有报道。本文采用血平板法初筛,以表面张力法进行复筛,从大庆油田的高台子低渗透油藏采出液中筛选出一株表面活性剂高效产生菌DY-9,研究了该菌株的生理和微生物学特征,并对其产生的脂肽类表面活性剂的结构与性能进行了表征,旨在拓展对油藏中本源的表面活性剂产生菌的科学认识,同时可为利用生物表面活性剂产生菌进行微生物驱油提供相关的理论依据与技术指导。

1 材料和方法

1.1 油藏采出水

用于表面活性剂产生菌筛选的油藏采出液取自大庆油田高台子低渗透油藏的水驱采出井。3口采出井井号分别为2G181-S158、2G166-58和2G191-164。采用预先灭菌的下口玻璃瓶在每口采出井井口采集2.0 L左右的采出液(原油与采出水的混合物),3口井样品混合后于室温条件下静置15 min,待油-水有效分层后,通过采样瓶的下口收集采出水,分装至无菌塑料瓶中。在最短时间内(约15 h)运抵实验室,并立即开展菌种筛选等实验。

1.2 培养基

血平板培养基:血琼脂基础41.0 g(天和微生物试剂有限公司,杭州),溶于1.0 L蒸馏水中,经121℃高温蒸汽灭菌15 min后放凉至50℃,加入无菌

脱纤维羊血 50 mL(羊血的终浓度约为 5%),调节 pH 至 7.5。

发酵培养基:NaNO₃ 5 g,NaCl 0.6 g,KCl 0.6 g,微量元素液 5 mL,葡萄糖 20 g,KH₂PO₄ 3.4 g,K₂HPO₄ 4.4 g,MgSO₄ 0.5 g,酵母膏 0.5 g。加蒸馏水定容至 1.0 L,调节 pH 至 7.0~7.5。微量元素液成分(g·L⁻¹):ZnSO₄·7H₂O 0.29 g,CaCl₂·4H₂O 0.24 g,CuSO₄·5H₂O 0.25 g,MnSO₄·H₂O 0.17 g。

斜面培养基:NaCl 5 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,琼脂 1.5%~2.0%,加蒸馏水定容至 1.0 L,调节 pH 至 7.0~7.5。

LB 培养基:NaCl 5 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,加蒸馏水定容至 1.0 L,调节 pH 至 7.0~7.5。

除血平板培养基外,发酵培养基、斜面培养基、LB 培养基配制好后,立即灭菌(121℃、15 min),备用。

1.3 研究方法

1.3.1 表面活性剂产生菌的筛选及其生理生化特性 表面活性剂产生菌的筛选方法主要参考李娜娜等(2010),并做小幅修改:将油田采出水进行梯度稀释后涂布于血平板培养基上,45℃培养 48 h 后,挑取出现溶血圈的单菌落接种到新的血平板培养基上进行划线分纯。挑取纯菌株接种到含 50 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,在 180 r·min⁻¹、45℃条件下振荡培养 16 h。取 2 mL 发酵液接种到含有 100 mL 发酵培养基的 300 mL 三角瓶中,180 r·min⁻¹、45℃条件下振荡培养 48 h。取发酵液,10000×g 离心 10 min 去除菌体沉淀,取上清液,用表面张力仪(BZY-1 型,上海横平仪器仪表厂)测定上清液的表面张力。如果表面张力值低于 35 mN·m⁻¹,则认为菌株为表面活性剂产生菌。

目的菌株的生理生化实验参考《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英,2005)完成。通过测定发酵液(经适度稀释)的 OD₆₀₀ 评价菌株不同生长时期的生物量变化;采用排油圈法(Morikawa *et al.*, 2000; 毕思宁等,2009)测定不同时期发酵液的表面活性。

1.3.2 菌株基因组 DNA 提取、纯化及 16S rDNA 序列扩增与比对 取在 45℃、180 r·min⁻¹ 条件下培养 16 h 发酵液 2 mL,10000×g 离心 2 min,取沉淀并加入 350 μL TE 缓冲液(pH 8.0)洗涤 2 次,10000×g 离心 2 min;取沉淀并加入 563 μL TE 缓冲液,涡旋后使之重悬,加入 2 μL 溶菌酶(20 mg·L⁻¹)涡旋

混匀,37℃水浴 10 min;加入 30 μL 10% 的 SDS 和 5 μL 蛋白酶 K(20 mg·L⁻¹),涡旋混匀,50℃水浴 1 h;加入 100 μL,5 mol·L⁻¹ 的 NaCl,充分混匀,再加入 80 μL 10% 的 CTAB/NaCl 溶液,涡旋混匀,65℃水浴 10 min;加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1,V:V:V),混匀,8000×g 离心 10 min。将上清液转移到新 2 mL 离心管中,加入 0.6 倍体积氯仿/异戊醇(24:1,V:V),轻轻混匀。8000×g 离心 10 min,将上清液转到新 2 mL 离心管中,用 30% 乙醇混匀静止 10 min,室温干燥,然后将 DNA 沉淀溶于 50 μL TE 缓冲液中,-20℃保存备用。

采用细菌通用引物 27f-1492r 引物(27f:5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'; 1492r:5'-TACCTTGTTACGACTT-3')扩增其 16S rDNA。PCR 扩增反应条件为:95℃ 5 min;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒(爱思进,杭州)纯化后,连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa,大连),并转化感受态 *E. coli* DH5α。取 120 μL 转化液涂布含 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素的 LB 平板,37℃,培养 18 h。随机挑取平板上 10 个白斑至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃,180 r·min⁻¹,过夜培养;抽提质粒,以抽提的质粒为模板,采用 M13-47/RV-M 引物,进行 PCR 验证。然后将阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。测序完成后,采用 RDP(ribosomal database project)中的 Chimera Detection 程序对所获得的 16S rDNA 序列进行嵌合体检验。然后通过 GenBank 数据库中的 BLASTn 软件进行基因同源性比对分析。

1.3.3 表面活性剂的分离纯化与定性分析 将 48 h 发酵液在 5000×g 离心 10 min,弃菌体,收集上清液;用 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液调节上清液 pH 至 2.0,静置于 4℃冰箱中过夜;10000×g 离心 20 min,取沉淀,并用 HCl 溶液(pH 2.0)洗涤沉淀 3 次,用氯仿-甲醇(2:1,V:V)萃取,萃取液在旋转蒸发仪(RE-2000,上海亚荣生化仪器厂)中于 65℃蒸干溶剂,得表面活性剂粗品,并计算表面活性剂产量。

采用傅里叶变换红外光谱仪(NICOLET 380)在 100~4000 cm⁻¹ 区域对表面活性剂的粗品进行红外吸收光谱的扫描分析。

表面活性剂粗品用 DOS C₁₈ 色谱柱(0.5 μm, 10×3.0 cm)进一步纯化(Wang *et al.*, 2010)。先用 200 mL 70% 的甲醇溶液洗脱,再用 200 mL 100% 的

甲醇洗脱,收集流分。然后将纯化得到的表面活性剂溶解于甲醇中(浓度低于 $0.1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),进行 LC-MS 检测。HPLC 的色谱条件如下:采用 APS-2 HYPERSIL 分析柱($2.1\text{ mm} \times 150\text{ mm}$);梯度洗脱;流动相 A 是乙腈,流动相 B 为 0.5% TFA 水溶液;检测波长是 $\text{UV } 220\text{ nm}$;流速: $0.2\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。质谱分析中毛细管电压和喷雾电压分别为 32 V 和 5 kV ,毛细管的温度是 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.4 pH、温度及矿化度(NaCl)对发酵液表面张力的影响 取培养 48 h 的发酵液, $10000 \times g$ 离心 5 min 除菌体,上清液分别在 20 、 30 、 45 、 60 、 80 、 100 、 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 1 h ,放凉至室温;另取上清液,用 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ HCl}$ 或 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaOH}$ 溶液调节 pH 至 2 、 4 、 6 、 8 、 10 和 12 ;再取上清液,用 NaCl 调整上清液中盐浓度为 2% 、 4% 、 6% 、 8% 、 10% 和 12% 。分别测定上述各处理的表面张力,每个处理 3 个重复。

1.3.5 表面活性剂临界胶束浓度的确定 测定不同质量浓度下表面活性剂溶液的表面张力情况,作出 CMC 曲线(Xia *et al.*, 2012)并确定表面活性剂的临界胶束浓度。

2 结果与分析

2.1 大庆油田水驱油藏采出水中表面活性剂产生菌菌株

经血平板法初筛结合表面张力法复筛,从大庆油田采出水样品中筛选出 11 株表面活性剂产生菌菌株。这些菌株在发酵培养中生长 48 h 后均将发酵液的表面张力从 69.3 降低到 $30\text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 以下。其中,菌株 DY-9 的 24 h 发酵液的表面张力已低至 $26.5\text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$,为各菌株之首。因此,本文选取菌株 DY-9 开展后续研究。

2.2 菌株 DY-9 的初步分类及生长特性

菌株 DY-9 涂布于平板发酵培养基在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 后,菌落成乳白色,不规则,有皱褶,边缘不整齐。部分生理生化实验结果如表 1 所示。DY-9 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中相关序列的比对结果显示,DY-9 与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的同源性达到 99% 。结合菌株形态、生理生化特性及 16S rDNA 序列比对结果,初步鉴定 DY-9 为地衣芽孢杆菌。

由图 1 可见,DY-9 可在 24 h 内进入稳定生长期,此时发酵液已经具有较高的排油活性,排油圈直径达 4.5 cm 。此后的 24 h ,菌株发酵液的排油圈

表 1 菌株 DY-9 生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical properties of strain DY-9

特征	菌株 DY-9	<i>Bacillus licheniformis</i>
革兰氏染色	+	+
M. R. 测定	-	-
V-P 测定	+	+
接触酶	+	+
葡萄糖	+	+
阿拉伯糖	+	+
甘露醇	+	+
纤维二糖	-	-
麦芽糖	+	+
蔗糖	+	+
木糖	+	+
明胶水解	+	+
淀粉水解	+	+
柠檬酸钠	+	+
丙酸盐	+	+

+表示生长良好或呈阳性;-表示不生长或呈阴性。

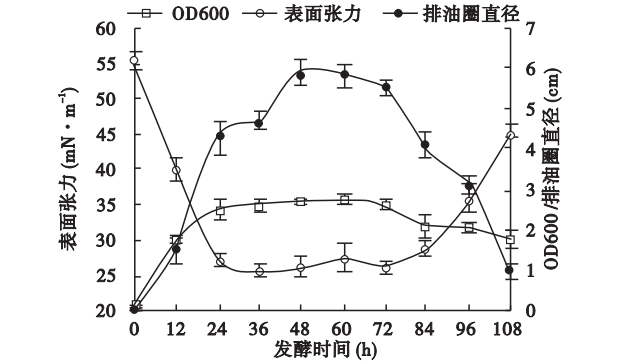


图 1 不同生长时期菌株 DY-9 生物量与发酵液表面活性变化

Fig.1 FT-IR spectrum of the biosurfactant produced by DY-9

直径最大,达到 5.8 cm ,此时表面活性剂产量为 $0.48\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随后,表面活性剂的产量逐渐降低。至第 108 h ,排油圈直径减小为 1.2 cm ,此时发酵液的表面张力为 $45\text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

2.3 表面活性剂的定性分析

如图 2 所示, 3303.06 cm^{-1} 是分子链中氢键引起的 N-H 收缩振动谱带, 1650.32 cm^{-1} 、 1539.58 cm^{-1} 为酰胺谱带。这些特征吸收表明该表面活性剂分子含有肽键,说明 DY-9 产生的表面活性剂分子的亲水基为肽链。谱图上 $2923.96 \sim 2853.23\text{ cm}^{-1}$ 和 $1465.67 \sim 1367.01\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰为脂肪族碳链的 C-H 伸缩振动峰, 1739.22 cm^{-1} 和 1199.99 cm^{-1} 是内酯的特征吸收峰,表明表面活性剂分子的疏水基是

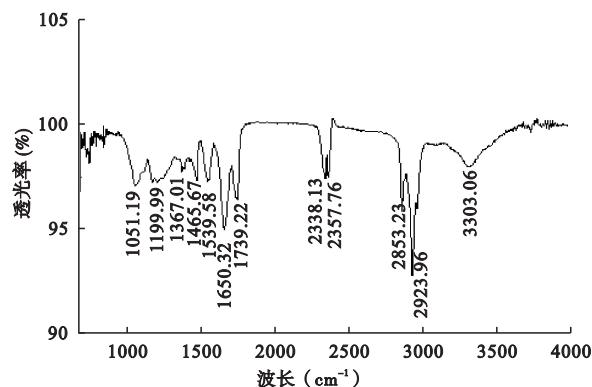


图2 菌株 DY-9 表面活性产物的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectrum of the biosurfactant produced by strain DY-9

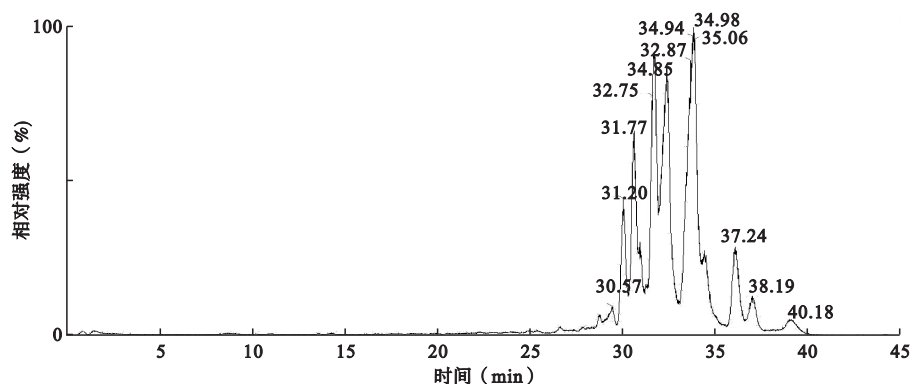


图3 菌株 DY-9 表面活性产物的 HPLC-MS 谱图

Fig.3 HPLC-MS spectrum of the biosurfactant produced by DY-9

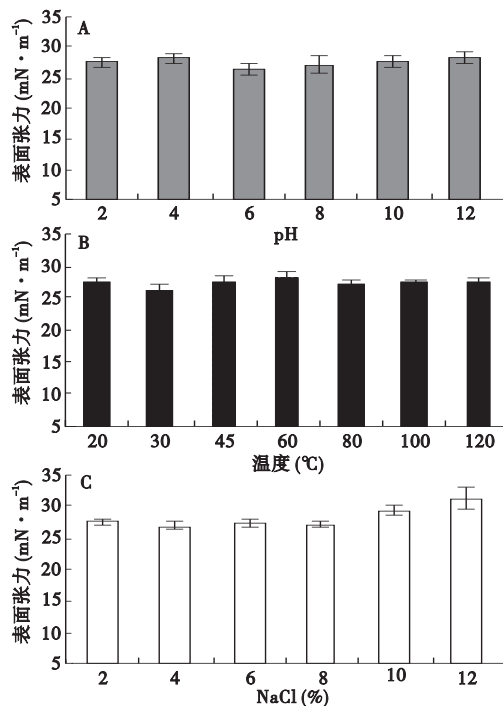


图4 菌株 DY-9 表面活性产物在不同 pH、温度和盐浓度下的稳定性

Fig.4 Stability of the biosurfactant produced by DY-9 under different pH, temperature, and salt conditions

脂肪酸半分子。因此,可初步确定该物质为环状脂肽类表面活性剂。

根据液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)谱图(图3)分析,液相色谱检出时间 30 min 以后出现的峰多为 surfactin 类环状脂肽。进一步确定 DY-9 菌株的代谢产物为环状脂肽类生物表面活性剂。由质谱谱图中检出时间所对应的分子量推断该脂肽表面活性剂含有分子量为 1009.1、1023.2、1037.3、1051.2, surfactin C13 $[M+H]^+$ 、C14 $[M+H]^+$ 、C15 $[M+H]^+$ 、C14 $[M+H]$ 结构 (Sivapathasekaran *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010)。

2.4 pH、温度及盐度 (NaCl) 对发酵液表面张力的影响

如图4所示,不同 pH 值条件下 DY-9 菌株发酵液的表面张力变化不大,由此说明 DY-9 菌株所产生的表面活性剂 pH 适应范围广泛,在 pH 2 ~ 12 范围内其活性稳定(图4A)。将 DY-9 菌发酵液在不同温度下处理 1 h 后,测定其表面张力。结果表明,在 20 ~ 120 °C 内发酵液表面张力并没有明显的变化,其表面张力均低于 30 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。说明 DY-9 菌株所产生的表面活性物质对温度具有良好的稳定性(图4B)。在 NaCl 浓度 0 ~ 8% 条件下,DY-9 菌株发酵液的表面张力并没有明显变化,但随着 NaCl 浓度的进一步增加,表面张力呈明显的上升趋势,因此可判定 DY-9 菌株在盐度低于 8% 的条件下具有一定的耐受性(图4C)。

2.5 临界胶束浓度(CMC)

将 DY-9 菌株产生的表面活性剂提纯后,用蒸馏水稀释成终浓度为 5 ~ 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,分别测定其表面张力。如图5所示,浓度在 5 ~ 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时,溶液的表面张力随着产物浓度的增大而迅

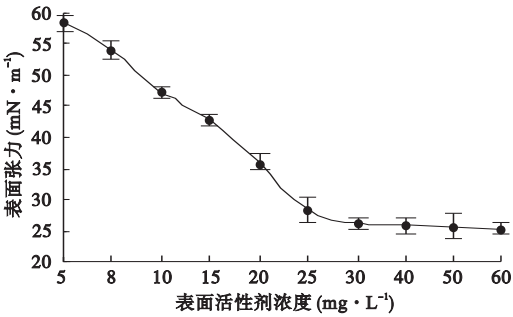


图 5 表面张力随菌株 DY-9 的表面活性产物浓度的变化
Fig. 5 Variation of surface tension against concentration of the biosurfactant produced by DY-9

速减小,由初始的 58.6 下降到 25.6 mN · m⁻¹。而后,表面活性产物浓度增加,但表面张力基本保持不变。因此,DY-9 产生的表面活性剂的 CMC 值约为 28 mg · L⁻¹。

3 讨 论

3.1 表面活性剂产生菌的筛选方法

由于生物表面活性剂的优良特性,表面活性剂的产生菌筛选、结构鉴定以及表面活性剂在微生物采油 (Brown,2010; Xia *et al.*,2012)、污染物修复等领域的应用研究逐渐成为研究热点 (Banat,1995; Desai & Banat,1997; Sen,2008)。有研究显示,表面活性剂产生菌的多样性高,且在各种生境中分布广泛。菌种筛选是上述研究的基础,因而,找到合适的筛选方法较为关键。目前常用的筛选方法有血/油平板法、液体坍塌法、杜诺伊环法 (Du-Nouy-Ring method) 等。这些方法均是基于直接或间接测定发酵液表/界面活性,并依据其降低幅度对菌株进行判定的方法。这些方法各有优缺点,如有的需要特别的装置和设备,有的方法筛选通量不高等。另一方面,由于表面活性剂产生菌的高度多样性以及其栖息生境的巨大异质性,因而很难找到一种方法适合所有的表面活性剂产生菌的筛选 (Hsieh *et al.*,2008)。本研究采用了血平板法初筛结合表面张力复筛的方法,最终得到 11 株表面活性剂产生菌菌株 (数据未给出)。经 16S rDNA 序列比对,这 11 株细菌分属 *Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Bacillus*、*Micrococcus* 4 个属,其中 *Bacillus* 属的比例较大,占 40%。该结果表明,大庆低渗透油藏中存在多种表面活性剂产生菌;此外,尽管血平板法可能出现假阳性的问题,但是后续的表面张力法能够弥补这一不足,两者结合能够成功用于油藏采出水中表面活性剂产生菌

的筛选 (李娜娜等,2010)。

3.2 DY-9 在提高原油采收率方面的应用潜力

菌株 DY-9 发酵液的表面活性在高温 (120 ℃)、高盐 (12%) 以及宽泛的 pH (2 ~ 12) 条件下保持稳定,这些特性可能使其在微生物提高原油采收率 (MEOR) 方面具有重要意义。以糖蜜为唯一碳源,DY-9 在 24 h 内可将发酵液的表面张力从 69.3 降低到 26 mN · m⁻¹ 以下,且其产生的表面活性剂具有较低临界胶束浓度 (28 mg · L⁻¹),产量达到 0.48 g · L⁻¹。相比较已报道的脂肽类表面活性剂产生菌而言 (Gogotov & Miroshnikov,2009),DY-9 是一株高产的生物表面活性剂产生菌。

利用表面活性剂产生菌提高原油采收率主要有“地上发酵”和“地下发酵”两种方法。所谓“地上发酵”主要是指通过地面发酵设施将表面活性剂生产出来后再注入地下油藏;而“地下发酵”指通过注入一定的营养成分选择性地调控油藏本源的表面活性剂产生菌活性,让其在油藏原位条件下产生表面活性剂,以利于采油 (Youssef *et al.*,2007)。一方面,对于 DY-9 而言,如果利用“地上发酵”法,则如何优化菌种的培养基成分及发酵条件以提高表面活性剂的产量显得尤为重要。已有研究表明,微生物产表面活性剂的产量 (甚至表面活性剂组成成分) 受培养基中碳源、碳氮比、二价阳离子浓度、接种龄、溶解氧浓度等等因素的影响 (Robert *et al.*,1989; Gogotov & Miroshnikov,2009),显然,DY-9 的培养基成分及发酵条件优化研究尚待深入研究和探讨。此外,通过诱变育种以及基因工程技术对菌种进行改良以提高表面活性剂的产量研究也有报道。DY-9 在本研究中的发酵培养基及生长条件下表面活性剂的产量已经达到约 0.48 g · L⁻¹,如果再行培养基成分与发酵条件优化,其产量仍有望提升。

另一方面,若采用“地下发酵”法,则 DY-9 需要在油藏厌氧环境下产生表面活性剂。目前,绝大多数表面活性剂产生菌是好氧微生物,仅有少数研究报道 *B. licheniformis* 菌株在厌氧条件下产生脂肽类表面活性剂 (Javahery *et al.*,1985; Gogotov & Miroshnikov,2009)。Gogotov 和 Miroshnikov (2009) 的研究显示,*B. licheniformis* VKM B-511 菌株在好氧和厌氧条件下均能产表面活性剂,但是厌氧条件下的产量远远大于好氧条件下的产量。DY-9 也能够 在厌氧条件下以硝酸盐为电子受体产生表面活性剂,72 h 内发酵液的表面张力由 68.5 降低到 40 mN ·

m^{-1} 以下。进一步的驱油物模实验结果显示,厌氧条件下利用 DY-9 可以在水驱的基础上提高 4 ~ 6.5 个百分点(数据待发表)。这些结果意味着大庆低渗透油藏内的本源表面活性剂产生菌 DY-9 可能在油藏原位厌氧产表面活性剂及提高原油采收率方面具有较大潜力。尽管如此,DY-9 厌氧条件下产表面活性剂的途径、机制及相关影响因素尚不清楚,相关研究亟待加强。

虽然相关研究尚待深入,但油藏中栖息着的多种表面活性剂产生菌为利用该类特定功能的“土著”微生物提高原油采收率的研究与实践提供了菌种基础。当然,这类微生物在油藏这一特殊生境中的微生物生理、生态学作用仍亟待深入研究。

4 结 论

大庆油田低渗透油藏(采出水)环境中存在多种表面活性剂产生菌,如 *Bacillus* 等。血平板法结合表面张力法适用于油藏采出液中表面活性剂产生菌的筛选。高效表面活性剂产生菌菌株 DY-9 与地衣芽孢杆菌的 16S rDNA 序列相似性最高。DY-9 产生的表面活性物质在高温、高盐和宽泛的 pH 条件下保持稳定的表面活性,其结构为环状脂肽类表面活性剂,在低渗透油藏微生物驱油方面具有一定应用潜力。

致 谢 本研究得到大庆油田有限责任公司第二采油厂技术发展部主任尹中民博士、刘卫东副主任的大力支持;在采出液样品采集过程中还得到了第二采油厂中心化验室纪海龙、郭明、閔洁、贾小兵等的热心帮助;中国科学院沈阳应用生态研究所的韩斯琴老师、胡江春研究员和王楠副研究员在表面活性剂纯化与结构表征方面给予了无私帮助与指导。在此,一并表示感谢!

参考文献

- 艾明强,李 慧,刘晓波,等. 2010. 大庆油田油藏采出水的细菌群落结构. 应用生态学报, **21**(4): 1014–1020.
- 毕思宁,王彦杰,左豫虎. 2009. 生物表面活性剂排油圈检测方法的改进和应用. 黑龙江八一农垦大学学报, **21**(6): 58–60.
- 曹 娟,刘怡辰,张振华,等. 2009. 脂肽类生物表面活性剂产生菌的分离及特性研究. 环境科学学报, **29**(10): 2056–2062.
- 东秀珠,蔡妙英. 2005. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社.
- 李娜娜,史荣久,郝金生,等. 2010. 表面活性剂产生菌 SQ6: 筛选及其发酵液表面活性. 生态学杂志, **29**(8):

- 1618–1623.
- Banat IM. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, **51**: 1–12.
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**: 495–508.
- Brown LR. 2010. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Current Opinion in Microbiology*, **13**: 316–320.
- Desai JD, Banat IM. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**: 47–64.
- Gogotov IN, Miroshnikov AI. 2009. The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **45**: 654–658.
- Grassia GS, McLean KM, Glénat P, *et al.* 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology*, **21**: 47–58.
- Herman DC, Artiola JF, Miller RM. 1995. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science & Technology*, **29**: 2280–2285.
- Hsieh FC, Lin TC, Meng M, *et al.* 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Current Microbiology*, **56**: 1–5.
- Javahery M, Jenneman GE, McInerney MJ, *et al.* 1985. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**: 698–700.
- Khire JM. 2010. Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR)// Sen R, ed. Biosurfactants. New York: Landes Bioscience/Springer Science+Business Media: 146–153.
- Lee SC, Kim SH, Park IH, *et al.* 2007. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, **188**: 307–312.
- L'Haridon S, Reysenbach AL, Glenat P, *et al.* 1995. Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. *Nature*, **377**: 223–224.
- Li QX, Kang CB, Wang H, *et al.* 2002. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering Journal*, **11**: 197–199.
- Liu X, Ren B, Chen M, *et al.* 2010. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**: 1881–1893.
- Magot M. 2005. Indigenous microbial communities in oil fields// Ollivier B, Magot M, eds. Petroleum Microbiolo-

- gy. Washington DC: ASM Press: 21–33.
- Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1488**: 211–218.
- Mulligan CN, Gibbs BF. 1993. Factors influencing the economics of biosurfactants// Kosaric N, ed. *Biosurfactants, Production, Properties and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc. : 329–372.
- Robert M, Mercadé ME, Bosch MP, *et al.* 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, **11**: 871–874.
- Sen R. 2008. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**: 714–724.
- Sivapathasekaran C, Mukherjee S, Samanta R, *et al.* 2009. High-performance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**: 845–854.
- Wang J, Haddad NIA, Yang SZ, *et al.* 2010. Structural characterization of lipopeptides from *Brevibacillus brevis* HOB1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**: 812–821.
- Xia WJ, Luo ZB, Dong HP, *et al.* 2012. Synthesis, characterization, and oil recovery application of biosurfactant produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 using waste vegetable oils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**: 1148–1166.
- Youssef N, Simpson DR, Duncan KE, *et al.* 2007. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 1239–1247.
- Zheng CG, Yu L, Huang LX, *et al.* 2012. Investigation of a hydrocarbon-degrading strain, *Rhodococcus ruber* Z25, for the potential of microbial enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **81**: 49–56.
-
- 作者简介** 肖 兵,女,1985年生,硕士研究生。主要从事环境微生物学、环境化学方面的研究。E-mail: xiaobing1022@126.com
- 责任编辑** 魏中青
-