

生物复合型破乳剂破乳特性研究

徐 暘^{1,2}, 马 放^{1,2}, 代 阳^{1,2}, 李 旭^{1,2}, 刘 畅^{1,2}

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨, mafang@hit.edu.cn;

2. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨)

摘 要:为解决现有生物破乳剂破乳效率低、稳定性差、易受环境影响、难以大规模生产的问题,将具有破乳效果的莫海威芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在改进的无机盐液体培养基中混合培养,得到了一种高效生物复合型破乳剂.生物复合型破乳剂全培养液在室温下,接触时间48 h可使O/W型模型乳状液完全破乳.与单一菌株的全培养液相比,缩短了发酵时间(提高6 h以上),降低了破乳剂投加量,提升了破乳活性和稳定性.乳状液pH值为3~7的条件下,生物复合型破乳剂可维持较高破乳活性.具有良好耐温性,乳状液温度在20~120℃,破乳剂排油率变化在15%以内.复合后,生物破乳剂仍主要依靠发酵过程中产生代谢产物破乳,上清液排油效果为全培养液的87%,菌体悬液几乎不具有破乳活性.与目前广泛使用的化学破乳剂相比,对大庆油田含油废水的处理效果基本接近.微生物破乳剂的复合是提高破乳活性的有效手段.

关键词:生物复合型破乳剂;全培养液;乳状液;排油率

中图分类号: X703.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2011)08-0061-04

De-emulsification ability of a microbial compound de-emulsifier

XU Yang^{1,2}, MA Fang^{1,2}, DAI Yang^{1,2}, LI Xu^{1,2}, LIU Chang^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, mafang@hit.edu.cn; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China)

Abstract: The use of microbial de-emulsifier is limited for its low de-emulsification activity, instability and sensitivity to environmental factors. To solve this problem, two superior strains (*Bacillus mojavensis*, *Bacillus subtilis*) were cultured in a mineral salt medium to obtain a microbial compound de-emulsifier with high capability of de-emulsification. The cell culture could demulsify the O/W model emulsion completely in 48 h at room temperature. Comparing with that of the single strain culture, the fermentation process of the mixed culture was shortened more than 6 h. With less addition volume, the mixed culture showed higher de-emulsification activity and stability. The microbial compound de-emulsifier kept high de-emulsification activity in the emulsion with different pH value ranged from 3-7. Thermostability was detected. When the emulsion temperature varied from 20-120℃, changing rate of the oil drain rate was under 15%. After the strains were mixed cultured, the metabolites produced during the fermentation process still took the main function of de-emulsification. The supernatant remained 87% de-emulsification ability of the cell culture while the bacterial cells could hardly break the emulsion. Comparing with the widely used chemical ones, the microbial compound de-emulsifier has almost the same effectiveness in dealing with the oil-bearing waste water from Daqing oilfield. Compounding microbial de-emulsifiers is an effective way to enhance their demulsification abilities.

Key words: microbial compound de-emulsifier; cell culture; emulsion; oil drain rate

收稿日期: 2010-04-22.

基金项目: 黑龙江省重大攻关项目(GA06C202).

作者简介: 徐 暘(1977—),女,博士研究生;

马 放(1963—),男,教授,博士生导师.

破乳剂在原油生产、运输以及油污分离、去除等领域具有重要的作用.长期以来工业中主要使

用化学破乳剂进行油水分离^[1-2]. 然而, 化学破乳剂表现出较强的专一性, 且会将大量无机盐或有机残留物带进原油废水中. 排放含有化学残留物的废水会对环境造成严重危害, 对这样的废水进行处理又会大大提高生产成本. 生物破乳技术利用微生物细胞本身或者其代谢过程、代谢产物实现乳液破乳, 具有生产工艺简单, 能耗小的优点^[3-7]. 更重要的是, 生物破乳剂无毒、易被降解, 其环保性是化学破乳剂无法比拟的.

但是, 生物破乳剂的破乳效率低, 稳定性较差, 而且生产成本偏高, 制约了其大规模生产和应用^[8]. 对生物破乳剂进行复配, 提高生物破乳剂的破乳能力和稳定性, 将成为生物破乳剂研发的重要方向之一. 有研究者将生物破乳剂与化学破乳剂进行复配^[9-11], 利用二者间的协同作用提高破乳效果. 但仍然无法从根本上解决化学破乳剂对环境的污染问题. 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是目前研究较多、破乳效果较好的生物破乳菌^[12-13]. 莫海威芽孢杆菌 (*Bacillus mojavensis*) 是本实验室从大庆油田含油土壤中分离出的破乳优势菌^[14]. 研究表明这两株破乳菌均为利用代谢产物破乳. 将这两株破乳机制相似的菌株进行有效的复合, 可以克服使用单一菌体培养液破乳效果不佳, 与化学破乳剂复配仍有污染物残留的不足, 具有广阔的应用前景.

1 实 验

1.1 菌种来源

莫海威芽孢杆菌 (*Bacillus mojavensis*) 从大庆油田长期被污染的土壤中筛选获得, 见文献 [15]. 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 来自本实验室.

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 培养基

文中的培养基均为改进的无机盐液体培养基 (MMSM). 培养基组成 (g/L): NH_4NO_3 3.0, K_2HPO_4 3.0, KH_2PO_4 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, 酵母膏 0.5, 葡萄糖 10.0, 微量元素溶液 5 mL, 液体石蜡 4%. 微量元素溶液组成 (g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, EDTA 1.4.

1.2.2 培养条件

将莫海威芽孢杆菌接种于 MMSM 液体培养基中, 在 28 ~ 32 °C、摇床转数 140 r/min 的条件下培养 24 h, 得莫海威芽孢杆菌种子液 (种子液 1).

将枯草芽胞杆菌接种于 MMSM 液体培养基中, 在 28 ~ 32 °C、摇床转数 140 r/min 的条件下培

养 20 h, 得枯草芽胞杆菌种子液 (种子液 2).

将 3 ~ 5 mL 的种子液 1 与 1.5 ~ 3.0 mL 的种子液 2 分别接种于 100 mL 的 MMSM 液体培养基中, 在 32 ~ 35 °C、摇床转数为 80 ~ 160 r/min、pH 值为 7 ~ 8 的条件下培养 10 ~ 16 h, 即得生物复合型破乳剂.

1.3 破乳能力测定方法

1.3.1 O/W 乳状液的制备

0.028% (体积分数) Span 60 - 煤油与 0.072% (体积分数) TWEEN 60 - 水的原液以体积比 3.5 : 6.5 混合. 采用乳化剪切机以 5 000 r/min 转速搅拌 3 min 得到乳状液. 经油红染色法鉴定, 该乳状液为 O/W 型乳状液, 稳定时间超过 200 h.

1.3.2 破乳能力测定

除特殊说明, 破乳能力的测试方法为: 取 2.5 mL 的细菌全培养液加入到 5 mL 乳状液中, 震荡混匀后置于室温下破乳. 48 h 后, 使用针管吸出排出的油. 依据破乳后排出油的体积与乳状液中油体积的比值计算排油率, 即排油率 (%) = 排出油的体积 / 乳状液中油体积.

2 结果与讨论

2.1 培养时间对破乳特性的影响

采用分光光度法在 620 nm 波长条件下测定不同培养时间生物复合型破乳剂全培养液的 OD 值, 同时测定不同培养时间时全培养液对模型乳状液的破乳效果. 结果如图 1 所示.

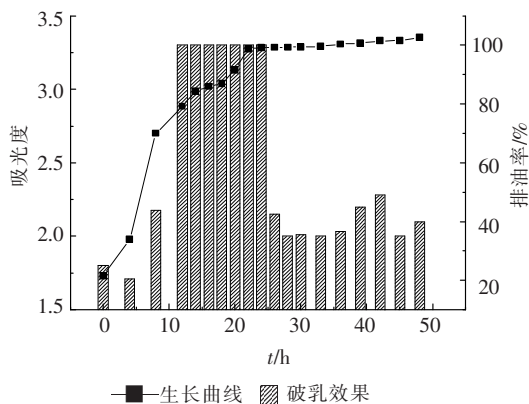


图 1 生物复合破乳剂生长曲线及破乳效果

复合破乳菌混合培养 4 h 后开始进入对数生长期, 在此时期细菌数量按几何级数增长, 菌量迅速上升, 22 h 以后进入生长稳定期. 单独培养莫海威芽孢杆菌和枯草芽胞杆菌均需 10 h 以上发酵时间进入对数生长期, 24 h 后进入生长稳定期^[12,15]. 复合破乳菌所需的发酵时间更短, 进入对数生长期的时间比培养单菌株的时间提前 6 h

以上,降低了生产成本.

培养时间在 12~24 h 时,该生物复合型破乳剂均具有最高的破乳活性.室温下,接触时间 48 h 时,复合生物破乳剂的排油率为 100%.组成复合破乳剂的两株破乳菌主要利用代谢产物破乳,推断复合后仍为代谢产物的作用,其浓度及性质决定破乳效果的高低.对数生长期及稳定期初期,细菌的生长速度快,处于代谢最高峰,培养液中代谢产物的浓度最高,因而生物复合破乳剂破乳活性最高.

莫海威芽孢杆菌全培养液在发酵时间为 20~28 h 时排油率为 70%~80%;枯草芽胞杆菌全培养液在发酵时间为 20~26 h 时达到最大破乳活性,排油率最高为 65%.上述两种菌株单独培养的全培养液,具有破乳高活性的时间范围较窄,破乳效果也有较大的波动,在生产过程中难以控制最佳生产条件.生物复合型破乳剂在 12 h 的时间范围均可维持较高的破乳活性.因此,将生物破乳菌复配,可以缩短生产时间,提高产量及破乳效率.

2.2 破乳剂投加量对破乳效果的影响

将不同体积的破乳剂投加至 5 mL 模型乳状液中,测试破乳剂的排油率.生物复合型生物破乳剂在用量为 2.5 mL 时达到破乳最佳效果,排油率 100% (如图 2).莫海威芽孢杆菌培养液的加入量为 4 mL 可以达到最佳排油效果,48 h 排油率 63%.枯草芽胞杆菌培养液的最佳加入量则更高,加入 6 mL 全培养液时,排油率 65%.破乳剂投加量在一定范围内,破乳效率随投加量的增加而增大.达到一定值后,破乳效率基本不变,甚至降低.表明破乳剂用量存在最佳值.破乳剂吸附于乳状液界面膜上或排替部分表面活性剂,从而破坏界面膜,使其稳定性降低,发生絮凝、聚结破乳.复合破乳剂中活性物质为两株菌代谢产物总量,较少的加入量便可达到吸附饱和状态,达到最佳破乳效果.

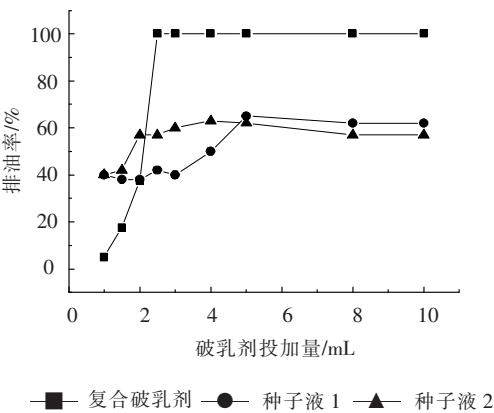


图 2 破乳剂投加量对破乳效果的影响

2.3 乳状液 pH 对破乳效果的影响

考察了 O/W 型模型乳状液 pH 值为 2~10 范围内破乳剂的破乳效果 (如图 3).乳状液 pH 在 3~7 范围内,3 种生物破乳剂均可达到较高破乳活性.其中,生物复合型破乳剂的破乳效果最好.乳状液 pH 为 6 时,该破乳剂排油率为 100%.pH 为 4 时,莫海威芽孢杆菌、枯草芽胞杆菌破乳活性最高.乳状液 pH 在碱性范围内时,破乳剂破乳效果明显降低.与利用菌体细胞进行破乳的情况不同^[16],复合型生物破乳剂更适于在中性及酸性环境内破乳.

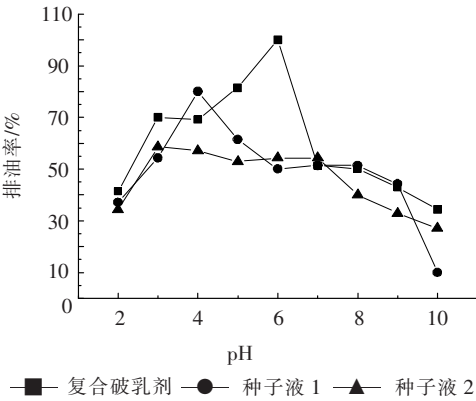


图 3 乳状液 pH 对破乳效果的影响

2.4 乳状液温度对破乳效果的影响

复合型生物破乳剂与莫海威芽孢杆菌种子液的破乳能力随乳状液温度的变化并不明显.乳状液温度在 20~120 ℃,破乳剂的排油率变化在 15% 范围内波动.枯草芽胞杆菌种子液受温度影响较大 (如图 4).将两种具有破乳效果的菌种复合,可以提高生物破乳剂的稳定性,并提高破乳活性.复合型生物破乳剂对乳状液温度适用范围较宽,更适用于对高寒地区油田原油采出液进行破乳,可以节省加热所需的能源消耗从而进一步降低生产成本.

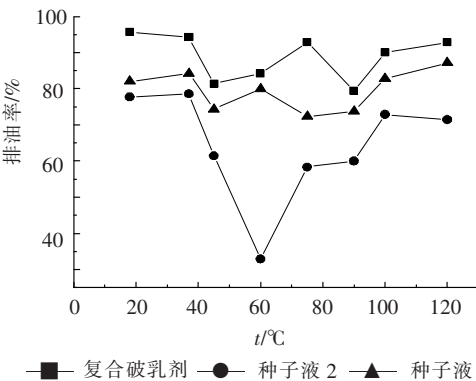


图 4 乳状液温度对破乳效果的影响

2.5 生物复合型破乳剂破乳活性分布

全培养液 5 000 r/min 离心 30 min 得到上清液.剩余沉淀用蒸馏水清洗两次再用蒸馏水稀释

至初始体积得到菌悬液. 以全培养液的排油率(设为 100%)为对照, 考察上清液、菌悬液、培养基 48 h 排油率. 上清液的破乳活性最高, 排油率为全培养液的 87%. 菌悬液 48 h 排油率为 5%, 培养基不具破乳活性. 由此可知, 生物复合型破乳剂破乳有效成分主要存在于去菌细胞上清液中, 利用发酵过程中产生的代谢产物破乳, 与推断的结果一致. 菌悬液的破乳活性可能是菌体细胞表面残留的细胞代谢产物的作用.

2.6 生物复合型破乳剂对大庆含油废水的破乳

将 3 种生物破乳剂用于大庆油田含油废水(含油废水含油量为 153.217 mg/L)的处理. 使用生物复合型破乳剂排油效果最好, 排油量为 98.909 mg/L, 比单菌株培养液的破乳效果提高 13% 以上. 与目前广泛使用的化学破乳剂(化学-1 成分为聚氧丙烯聚氧乙烯丙二醇醚, 化学-2 成分为聚乙撑基聚季铵盐)相比, 破乳效果基本接近破乳效果最好的化学-2(排油量 102.715 g/L), 又不会有沉淀生成. 破乳后出现清晰油层, 更有利于将油水分离.

3 结 论

1) 将两种破乳优势菌混合培养后, 发酵时间缩短为 12~24 h, 生物复合破乳菌持续保持最高破乳效果, 实现乳状液完全破乳.

2) 复合后, 破乳剂最小投加量低于使用莫海威芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌全培养液, 破乳活性最高.

3) 乳状液 pH 在中性及酸性范围内, 破乳剂具有最好破乳效果并具有良好耐温性.

4) 破乳活性物质存在于去菌上清液中, 菌体本身不具有破乳能力, 破乳剂主要利用发酵过程产生的代谢产物破乳.

5) 使用生物复合破乳剂处理大庆含油废水, 排油能力接近使用效果最好的化学破乳剂.

参考文献:

- [1] 吴利春, 刘松涛, 刘雪娟. 原油破乳剂的发展现状[J]. 日用化学品科学, 2008, 31(11): 8-10.
- [2] 吴结丰, 郭海军, 吕仁亮, 等. 原油破乳剂的研究进展[J]. 化学推进剂与高分子材料, 2009, 7(1): 28-30.
- [3] HUANG Xiangfeng, LIU Jia, LU Lijun, *et al.* Evalua-

tion of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *alcaligenes* sp[J]. *Bio-resource Technology*, 2009, 100(3): 1358-1365.

- [4] KOSARIC N, GRAY N C C, CAIRNS W L. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers[J]. *Biotechnology*, 1983, 3: 575-592.
- [5] MADHUSWETA D. Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species[J]. *Bio-resource Technology*, 2001, 179: 15-22.
- [6] PARK S H, LEE J H, KO S H, *et al.* Demulsification of oil-in-water emulsions by an aerial spores of a *streptomyces* sp[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 122: 1389-1395.
- [7] FUKUMI N, NOBUHIRO T, TOMOHIKO T. Microorganisms, demulsifiers and processes for breaking an emulsion: US, 662944[P]. 1999-11-23.
- [8] 肖稳发, 刘锡见, 饶品华, 等. 生物破乳剂的应用研究进展[J]. 2008, 16(10): 17-19.
- [9] 张天胜. 生物表面活性剂及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [10] 娄世松, 范洪波, 赵德智. 高效微生物复合破乳剂及其制备方法: 中国, 200610107039. 9[P]. 2007-02-28.
- [11] 侯宁, 马放, 李旭, 等. 一种复合型生物破乳剂: 中国, 200910071562. 4[P]. 2009-09-16.
- [12] 曾里. 生物破乳剂的分离、筛选及破乳特性研究[D]. 四川: 四川大学, 2003.
- [13] JANIYANI K L, PUROHIT H J, SHANKER R, *et al.* De-emulsification of oil-in-water emulsions by *bacillus subtilis*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1994, 10: 452-456.
- [14] HOU Ning, YANG Jixian, MA Fang, *et al.* Properties study and phylogenetic analysis of a bacterial strain with high de-emulsification efficiency[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2009, 16(3): 99-104.
- [15] 李旭, 杨基先, 马放, 等. 一株芽胞杆菌破乳特性实验[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2009, 41(8): 74-78.
- [16] HUANG Xiangfeng, GUAN Wei, LIU Jia, *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of biode-mulsifier-producing bacteria[J]. *Bio-resource Technology*, 2010, 101(1): 317-323.

(编辑 刘 彤)