

文章编号:1000-4092(2020)02-311-07

石油降解菌的复配及降解效果评价*

李小康^{1,2}, 鱼涛¹, 李红¹, 杜明明¹, 屈撑囤^{1,2}

(1. 西安石油大学陕西省油气田环境污染控制技术与储层保护重点实验室, 陕西 西安 710065; 2. 石油石化污染物控制与处理国家重点实验室, 北京 102206)

摘要:为了高效修复陕北定边油田附近的原油污染土壤,从当地含油污染土壤中筛选了5株原油降解菌,通过生理生化实验及16S rDNA序列分析鉴定分离的降解菌种类,采用正交实验方法探究和建立高效的混合菌修复体系并分析菌株的降解产物,选用表面活性剂Tween80刺激微生物进一步提高对石油的降解效率。研究表明,从含油污染土壤中筛选的5株原油降解菌株分别为D-1纤维单胞菌、D-3黏质沙雷氏菌、C-2无色杆菌、D-5不动杆菌和A-3铜绿假单胞菌。通过测定菌株在LB培养基和石油培养基中生长状态、GC-MS分析菌株降解石油的残留组分,将筛选的D-5、C-2、A-3进行复配,各菌株对原油降解的影响效果D-5>A-3>C-2,菌株最佳复配比D-5:C-2:A-3=5:1:5。在温度35℃、pH 7.5、摇床转速180 r/min、菌液加量6%,Tween80含量为5 cmc的降解条件下,混合菌群对原油的降解效果可以达到87.12%,有效促进原油污染土壤的高效修复。图12表6参29

关键词:石油降解菌;鉴定;复配;表面活性剂;降解率

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **DOI:** 10.19346/j.cnki.1000-4092.2020.02.022

0 前言

石油烃化合物作为不同行业的主要能源和材料,由于用途较广、使用量大,导致石油类物质每年大量流入土壤和水体中,对生态环境产生负面影响^[1-2]。石油物质引起污染的途径很多,主要包括石油大规模生产、运输、炼制、航运活动、意外溢油等^[3]。若不及时治理,这些污染会不断向周围环境扩散,并在新的环境中积累而达到较高的污染水平,给环境中的生命构成直接或间接的健康危害^[4-5]。石油污染物被列为污染广泛的有毒化合物^[6]。近年来,对石油污染物的控制已成为环境保护的重要问题^[7]。因此,以环保和健康为宗旨清洁这些石油污染是非常必要的,广大学者已研究并总结出一系列治理污染的技术^[8]。相比于物理和化学的修复方法,生物处

理是一种费用低、操作简单、环境友好的处理方法^[9-10],不会对环境产生有害影响。但由于微生物修复的效率普遍较低,严重阻碍了微生物修复技术的实际应用,同时,降解石油污染的过程复杂多样,不同菌株对原油的降解效果也各有差异,不同的环境条件和菌株间的相互作用也会影响原油的降解效果^[11-12]。本文主要针对陕西定边油田附近石油污染土壤的修复构建高效的混合菌群,分析了它们的降解能力和降解过程中菌剂的组合配比,找寻提高它们降解能力的方法,为后续工程实践提供理论基础。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

含菌土壤:挖掘陕西定边与靖边油田附近的原油污染土壤表层10~20 cm的土壤,经自然风干,破

* 收稿日期:2019-05-29;修回日期:2019-11-20。

基金项目:国家自然科学基金“微观尺度上L360钢在H₂S-CO₂-Cl-体系中元素硫沉积下点蚀机理研究”(项目编号21808182),陕西省自然科学基金基础研究计划项目“含油污泥热解残渣负载纳米TiO₂催化剂的制备及催化性能研究”(项目编号2019JM-506)。

作者简介:李小康(1993-),男,西安石油大学化学工程专业在读硕士研究生(2017-),研究方向为微生物修复含油污染土壤,E-mail:1336093833@qq.com。屈撑囤(1964-),男,教授,本文通讯联系人,研究方向为油气田环境保护,通讯地址:710065 陕西省西安市雁塔区电子二路18号西安石油大学化工学院,E-mail:xianquct@163.com。

碎研磨、混匀、过 0.85 mm 筛后密封,用于降解菌的分离与富集。

营养原油培养基:将 4.8 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.5 g KH_2PO_4 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g 酵母粉和 0.002 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 逐一加入超纯水中进行溶解,定容到 1000 mL,用 2 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 为 7.0~7.2,制成营养培养基。取营养培养基 100 mL,定量加入 0.2 g 原油(含饱和烃 81.58%、芳香烃 7.86%、胶质 7.26%、沥青质 1.06%,回收率 97.76%),将培养基置于 121℃ 下高压灭菌 25 min。

LB 培养基:将 10 g 蛋白胨、10 g NaCl 和 5 g 酵母浸粉加入 1000 mL 的超纯水中进行溶解,制备 LB 培养基。

DNP-9272A 型恒温培养箱,常州恒隆仪器有限公司;LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;OIL-460 型红外分光测油仪,北京华夏科创仪器技术有限公司;JYW-200A 型表面张力测定仪,承德金和仪器制造有限公司;SPX-150 GH 型隔水培养箱,北京科伟永兴仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 石油降解菌株的筛选与分离

将 2.0 g 预处理后的含菌土样加入 100 mL 的含 2 g/L 原油的营养原油培养基中,在 150 r/min、30℃ 的恒温震荡培养箱培养 24 h,转移到另一个新鲜营养原油培养基中振荡富集培养 7 d,重复 4 次。使用稀释涂布平板法培养单个菌落,培养 2~4 d 左右,挑取菌落特征明显的单一菌落进行编号保存。

1.2.2 生理生化特性鉴定及分子生物学鉴定

根据文献[13-14]提供的方法对已保存菌株进行生理生化和形貌的分析鉴定。对纯化的细菌进行 16S rDNA 的聚合酶链反应扩增,建立和表征不同种属的细菌种类。利用通用引物为模板对菌株进行 16S rRNA 基因的扩增,通用引物为^[15]: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492 R: 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'。

具体反应体系为: Template(基因组 DNA 20~50 ng/ μL) 0.5 μL , 10× Buffer(with Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTP(各 2.5 mM) 1 μL , 酶 0.2 μL , F(10 uM) 0.5 μL , R(10 uM) 0.5 μL , 加双蒸 H_2O 至 25 μL , 总反应体系共 30.2 uL。PCR 扩增条件为:预变性 94℃ 4

min; 30 cycle 94℃ 45 sec, 55℃ 45 sec, 72℃ 1 min; 72℃ 延伸 10 min。将扩增产物进行测序并在 NCBI 进行比对分析,并构建系统发育树。

1.2.3 菌株的生长特性分析

向 12 支试管中分别加入 5 mL 的 LB 液体培养基,在 121℃ 下灭菌 30 min,使用接种环接种筛选的石油降解菌(600 nm 波长处的吸光度值 $OD_{600}=0.5$),并标注编号,放入恒温振荡培养箱在 35℃、180 r/min 条件下培养,每 6 h 取样 1 次,使用可见分光光度法测定吸光度值,并求出 OD_{600} 值^[16]。使用原油培养基探究菌株以石油为碳源情况下的生长状况,由于培养基中原油在 6 h 左右会被细菌乳化,故不能采用分光光度法测量细菌的 OD_{600} 值,选用平板涂布法^[17]测定不同时间下的菌数。

1.2.4 原油降解率的测定

在 100 mL 的原油培养基中加入 0.2 g 原油,灭菌后继续加入 3% 接种量的纯化菌液($OD_{600}=0.6$),并设置 2 个平行样和空白对照,在 37℃、180 r/min 的恒温震荡培养箱中振荡培养 7 d 后,使用四氯化碳萃取剩余的原油,使用红外测油仪测定剩余的总石油烃的量。利用所测数据按照式(1)计算原油降解率:

$$\nu=1-c_1/c_2 \times 100\% \quad (1)$$

其中, ν —原油降解率; c_1 —无菌对照样品中原油的总烃类含量,mg/L; c_2 —接菌样品中原油的总烃类含量,mg/L。

1.2.5 单菌降解残余烃类组成分析

用 CH_2Cl_2 萃取细菌降解 7 d 后的原油培养基,使用无水 Na_2SO_4 除去萃取液中残余水分后进行 GC-MS 分析。GC-MS 分析条件:色谱柱为 DB-5MS 毛细管柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm ;进样口温度 250℃,载气为高纯度 He 气,流速 1 mL/min;在 80℃ 下保持 5 min,然后以 6℃/min 升温速率升至 180℃,保持 2 min,再以 10℃/min 的升温速率升至 300℃,保持 10 min;分流比为 10:1。

1.2.6 复配菌株对原油降解效果分析

如表 1 所示,采用 A-3、D-5、C-2 这 3 株原油降解菌株进行正交试验,培养基中原油浓度为 2 g/L,在温度 35℃、摇床转速 180 r/min 下降解反应 7 d。通过正交试验和 SPSS 主体间效应分析,探究复合菌加量对原油降解率的影响,找到最佳复配比例。

表1 正交实验因素水平表

水平	因素 A	因素 B	因素 C
	D-5 加量/%	C-2 加量/%	A-3 加量/%
1	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0
3	2.5	2.5	2.5

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

菌株经过多次的转接、筛选、纯化后,分离出 5 株对原油降解作用明显且活性较高的石油降解菌 D-5、C-2、A-3、D-3、D-1,其生理生化特性如表 2 所

示。使用 MEGA7 软件对 A-3、D-5、C-2 的基因序列进行系统发育树构建,结果如图 1 所示。

2.2 菌株的生长状况

分离的不动杆菌 D-5、无色杆菌 C-2、铜绿假单胞菌 A-3、黏质沙雷氏菌属 D-3、纤维单胞菌 D-1 在 LB 培养基的生长曲线如图 2 所示。分离的 5 种菌株生长状况各有差异,其中 A-3、C-2 的生长状况最好,对数期菌株增长较快,A-3、C-2 和 D-5 分别在 25、30 和 30 h 左右达到稳定期。A-3、C-2、D-5 以 1:1:1 的投加量混合的混合菌群 E 在 LB 培养基的生长曲线也见图 2。混合菌 E 呈现 S 型增长趋势,细菌生长量也达到较高水平,在 LB 培养基中 45 h 时 OD_{600} 值达到 1.94,在原油培养基中菌数达到 4.3×10^{15} 个/mL。

表2 分离菌株形态与生理生化鉴定

菌株编号	菌株名称	菌落形态	单菌形状	菌落颜色	需氧性/兼性	革兰氏染色	荚膜实验	甲基红实验	葡萄糖产酸	葡萄糖产气	柠檬酸盐试验	产芽孢实验	吡啶实验	V.P 实验
D-5	不动杆菌	边缘整齐	短杆状	黄白色	好氧	-	无荚膜	-	+	-	+	-	-	-
C-2	无色杆菌	边缘整齐	短杆状	黄色	好氧	-	无荚膜	-	+	-	-	-	-	-
A-3	铜绿假单胞菌	边缘整齐	短杆状	黑灰色	好氧	-	无荚膜	-	+	-	+	-	+	+
D-3	黏质沙雷氏菌属	边缘不规则	短杆状	暗红色	好氧	-	无荚膜	-	+	+(少量)	+	-	-	+
D-1	纤维单胞菌	边缘不规则	直杆状	淡黄色	兼性	+	无荚膜	+	+	+	-	-	-	-

注:“+”阳性反应;“-”阴性反应。

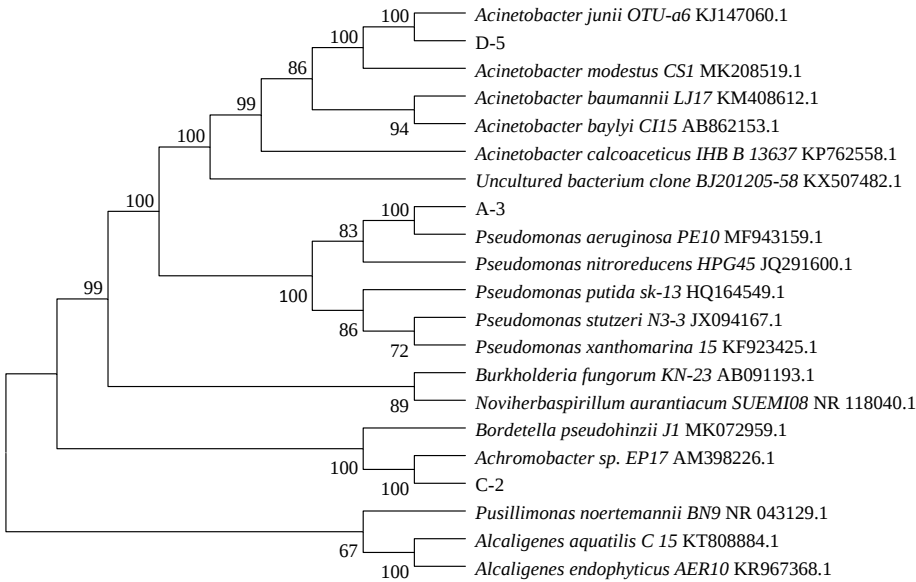


图1 菌株 16S rDNA 基因序列发育树

Cornforth D M等^[18]研究表明,当混合菌生长曲线为S型增长时,菌株之间将不存在拮抗作用。因此可以将A-3、C-2、D-5这3株细菌作为混合菌降解石油污染物。D-3、D-1的生长量较低,这可能是由于培养基本身不适合该细菌的生长繁殖。张东升等^[19]研究认为,细菌在不同培养基中的适应能力和生长状况各有不同,有些培养基还会抑制微生物自身生长代谢,降低微生物活性。分离的D-5、C-2、A-3、D-3、D-1等5种菌株和A-3、C-2、D-5以1:1:1的投加量混合的菌混合菌群E在原油培养基中的生长曲线如图3所示。混合菌群E在培养基中依然表现出较高的细菌生长量,D-5、A-3也呈现较好增长的趋势,C-2相比于D-3、A-1生长趋势也较好。综合可得,A-3、C-2、D-5这3株细菌无论是在独立条件还是混合条件下,在原油中均表现出很高的生物活性,可以用作治理石油污染的修复菌剂。

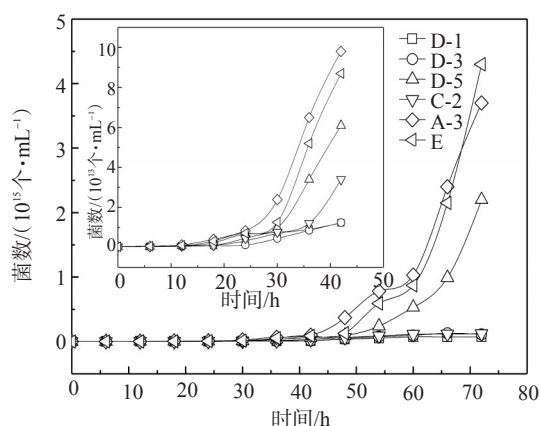


图2 菌株在LB培养基中的生长曲线

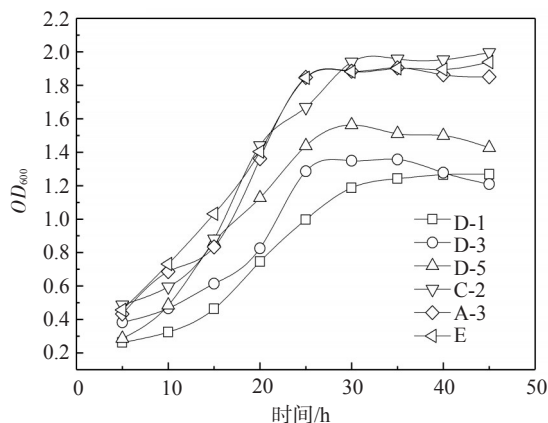


图3 菌株在原油培养基中的生长曲线

2.3 细菌对原油的降解效果

细菌D-5、C-2、A-3、D-1和混合菌群E对原油的

降解率如图4所示。由图4可见,D-5和A-3对原油的降解效率均达到60%以上,C-2对原油的降解率也达到39.36%。D-3由于降解过程中会将水中分散的原油聚集成为不溶于水和有机溶剂的团状物质,无法使用红外测油仪测定降解率,夹出水中团块物质后水中含油量几乎为0。分析可能是细菌自身分泌的一些胞外物质对原油产生了聚集包覆作用^[20]。混合菌群E对石油的降解率最高,可能是微生物之间的协同作用改善了原油的疏水性和乳化性,增强了微生物对原油的利用效率^[21],具体情况有待进一步研究。结合图3可知,混合菌在相同培养环境下的生长量比其它菌株的略高,也反映出微生物对石油的利用率增强。

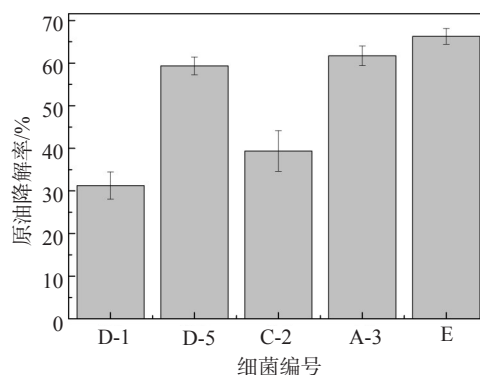


图4 各菌株7 d后对原油的降解率

2.4 残烃的GC-MS分析

单菌($OD_{600}=0.6$)和混合菌E在2 g/L石油含量的无机盐培养基中反应7 d后,萃取剩余油相进行GC-MS分析,结果如图5所示。由图5可知,A-3、D-5和混合菌E可以高效地降解原油组分中的C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、C₂₁、C₄₄等烃类,且都表现出较强的石油降解能力;而D-1、C-2降解石油组分的能力相对较低。

2.5 菌株的乳化能力和表面活性剂对菌株降解能力的影响

筛选产表面活性剂菌株的方法较多,不同菌株分泌的表面活性剂种类不同,单一方法不能准确测定菌株分泌表面活性剂的能力^[22-23]。表3为血平板乳化实验和菌株降解后培养液表面张力的测定结果。将5种菌株接种到血平板上,在20℃下经过2 d的恒温培养,只有A-3、D-5生成了大小不同的透明乳化圈,且发酵液的表面张力的差异不大。可能是由于血平板培养基不能很好地促进菌株生成表面活性剂。其他3种菌株均未产生透明的乳化圈,发

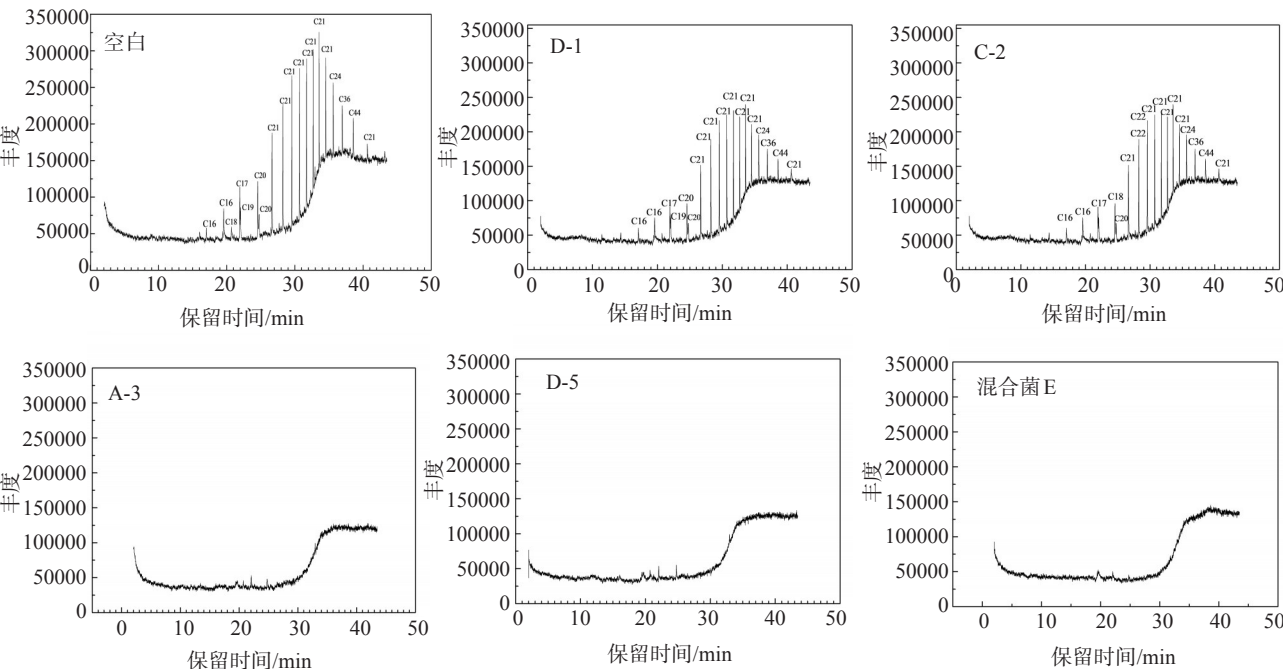


图5 各菌株降解原油后剩余组分的GC-MS分析

酵液表面张力基本接近空白培养基的表面张力,因此菌株对培养基中原油的降解率低^[24]。

向培养基中加入 4 mL 的质量浓度为 10 g/L 的表面活性剂 Tween 80,降解反应 7 d 后单菌对原油的降解率如表 4 所示。结果表明,向培养基中加入表面活性剂 Tween 80 后,5 株细菌对原油的降解率均有所提高,其中 C-2 对原油的降解率提升最高,达到 70.84%。

表 3 各菌株分泌表面活性剂的能力

菌株	血平板透明圈直径/cm	表面张力/(mN·m ⁻¹)
A-3	2.85	37.63
D-3	0	60.28
D-5	1.55	36.06
D-1	0	61.04
C-2	0	61.26

注:空白培养基的表面张力为 62.40 mN/m。

表 4 各菌株在有 Tween80 的情况下对原油的降解率

菌株	降解率/%
A-3	78.32
D-3	49.65
D-5	76.06
D-1	46.59
C-2	70.84

2.6 高效降解菌群的复配

不同菌株降解原油中各组份物质的效率和方式存在差异,菌株之间也会相互影响,当菌株之间相容性较高或存在协同关系时,混合菌群能发挥最大的降解作用。研究表明,混合菌株投加比例合适时,会进一步提高细菌的降解效率^[25-26]。D-5、C-2 和 A-3 按不同比例混合的混合菌对原油的降解率见表 5,SPSS 主体间效应的检验结果分析见表 6。由表 5

表 5 菌株复配正交试验与极差分析

试验编号	D-5 加量	C-2 加量	A-3 加量	降解率/%
1	1	1	1	60.68
2	1	2	2	61.83
3	1	3	3	63.49
4	2	1	2	65.43
5	2	2	3	64.37
6	2	1	1	62.60
7	3	1	3	72.63
8	3	2	1	67.64
9	3	3	2	65.18
k1	1.860	1.987	1.909	
k2	1.924	1.938	1.924	
k3	2.054	1.912	2.005	
R	0.043	0.024	0.032	

可知,混合菌群在D-5、C-2和A-3之间的最佳接种比例5:1:5时对石油的降解效果最好。结合表6主体间效应检验结果的Sig值($0.05 < D-5 < A-3 < C-2$, 即 $0.05 < 0.129 < 0.354 < 0.502$)来看,3株菌对原油降解率均不产生显著性影响,但混合菌群能有效地降解原油,说明各菌群对石油的降解均起到一定作用,其中D-5对石油污染物的降解效果影响最大,其次是A-3、C-2。通过实验发现,在最佳条件(温度 35°C 、pH 7.5、摇床转速180 r/min、菌液加量6 mL)下,最佳接种比例的混合菌群在原油培养基中对原油的降解率达到74.18%。

表6 SPSS主体间效应的检验结果分析

因变量:降解率

源	III型平方和	df	均方	F	Sig.	偏Eta方
校正模型	92.764 ^a	6	15.461	3.198	0.257	0.906
截距	37882.134	1	37882.134	7835.060	0.000	1.000
D-5	65.552	2	32.776	6.779	0.129	0.871
C-2	9.604	2	4.802	0.993	0.502	0.498
A-3	17.608	2	8.804	1.821	0.354	0.646
误差	9.670	2	4.835			
总计	37984.568	9				
校正的总计	102.434	8				

a. $R^2 = 0.906$ (调整 $R^2 = 0.622$)

2.7 Tween80加量对菌株降解能力的影响

通过以上探究发现,加入Tween80可以明显提升菌株对原油降解能力。表面活性剂对原油有较强的乳化作用,适量加入会提高微生物自身的活性,增强对原油的降解,但加入过量的表面活性剂会对微生物产生毒害作用^[27]。研究表明^[28-29],投加的表面活性剂未达到临界胶束浓度 cmc 前,疏水性有机化合物的溶解性不能得到显著提升。通过“拉环法”测定了加有不同量的Tween80原油培养基的表面张力,结果见图6。经测Tween80在原油培养基中的 cmc 值为30 mg/L,此时培养基的表面张力趋于稳定。为了进一步提高复配菌株对原油的降解效率,考察了不同Tween80加量下复配菌株对原油的降解速率,结果见图7。当培养基中Tween80加量为30 mg/L(1 cmc)时,降解7 d后混合菌群对原油的降解效果低于未添加Tween80的,当Tween80加

量为150 mg/L(5 cmc)时,降解7 d后混合菌群对原油的降解效果高于未添加Tween80的,降解率达到了87.12%,能很好地应用于石油污染的修复。

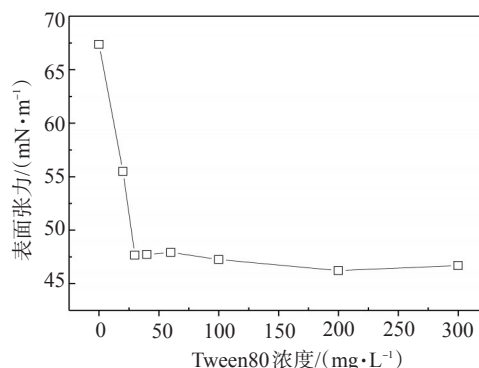


图6 Tween80在培养基中的 cmc 值测定

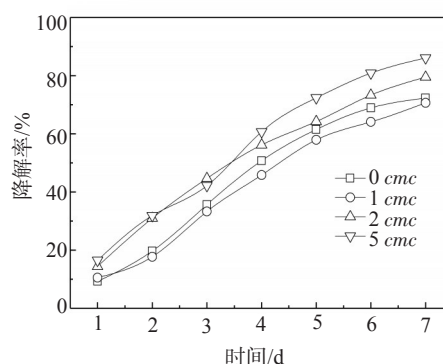


图7 Tween80加量对菌群降解效果影响

3 结论

从陕北定边、靖边油田原油污染土壤中筛选的原油降解菌中不动杆菌D-5、无色杆菌C-2、铜绿假单胞菌A-3对原油的降解率分别为61.46%、39.36%和62.42%,其中,D-5、A-3可降解原油中大分子烃类,降解作用明显,C-2的生物活性高,与菌株A-3、D-5有较好的相容性,在表面活性剂作用下降解效果显著。将这3种菌株进行复配,复配后的混合菌在LB培养基中45 h时 OD_{600} 值达到1.94,在原油培养基中菌数达到 4.3×10^{15} 个/mL,比单菌数量有所提升。在温度为 35°C 、pH为7.5、摇床转速为180 r/min、复配菌剂加量比D-5:C-2:A-3为5:1:5、加量为6%、表面活性剂Tween80浓度为150 mg/L时,混合菌的降解效果可达到87.12%,能很好地应用于石油污染的修复。

参考文献:

- [1] VARJANI S J, UPASANI V N. Carbon spectrum utilization by

- an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant[J]. *Bioresource Technol*, 2016, 221:510-516.
- [2] Li Y L, PEACOCK A D, WHITE D C, et al. Spatial patterns of bacterial signature biomarkers in marine sediments of the Gulf of Mexico[J]. *Chem Geol*, 2007, 238(3-4):168-179.
- [3] ARULAZHAGAN, VASUDEVAN, YEOM I T. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment[J]. *Inter J Env Res Pub Hea*, 2010, 7(4):639-652.
- [4] SAJNAK V, SUKUMARAN R K, GOTTUMUKKALAL D, et al. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth[J]. *Bioresource Technol*, 2015, 191:133-139.
- [5] FREEMAN D J, CATTELL F C R. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environ Sci Technol*, 1990, 24(10):1581-1585.
- [6] COSTA A S, ROMO, B.R. ARAÚJO, et al. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass[J]. *Bioresource Technol*, 2012, 105:31-39.
- [7] MARDAN S, GITIPOUR S, ALI ABDOLI M. Pollution control caused by high levels of petroleum hydrocarbons in contaminated soils[J]. *Petrol Sci Technol*, 2018, 36(11):1-7.
- [8] BHATTACHARYYA K G, GUPTA S S. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: A review[J]. *Adv Colloid Interf Sci*, 2008, 140(2): 114-131.
- [9] 惠云芳, 王鸿飞. 石油污染土壤的生物修复研究进展[J]. *西北农业学报*, 2018, 27(4): 451-458.
- [10] 李援, 王亭, 王崇, 等. 石油烃污染土壤微生物修复促进技术[J]. *化工环保*, 2018, 38(3): 349-352.
- [11] GULLIVER D M, LOWRY G V, GREGORY K B, et al. CO₂ concentration and pH alters subsurface microbial ecology at reservoir temperature and pressure[J]. *RSC Adv*, 2014, 34(4):17443-17453.
- [12] MENG L, LIU H, BAO M, ET AL. Microbial community structure shifts are associated with temperature, dispersants and nutrients in crude oil-contaminated seawaters[J]. *Mar Pollut Bull*, 2016, 111(1):203-212.
- [13] 周德庆, 徐德强. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 33-35.
- [14] GOODFELLOW M, O' DONNELLA G. Handbook of new bacterial systematics [M]. London: Academic Press, 1993: 115-194.
- [15] 刘春光, 杨峰山, 卢星忠, 等. 阿特拉津降解菌的分离鉴定及土壤修复[J]. *微生物学报*, 2010, 50(12):1642-1650.
- [16] 黄兴如, 张彩文, 张瑞杰, 等. 多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5):965-973.
- [17] 杨茜. 石油烃降解菌的筛选及石油污染土壤的生物修复机理研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2014.
- [18] 章慧, 郭楚玲, 卢桂宁, 等. 具有产表面活性剂功能石油降解菌的筛选及其发酵条件优化[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(11):2185-2191.
- [19] 赵姣, 屈撑囤, 鱼涛, 等. 高效原油降解菌的分离鉴定及降解特性分析[J]. *油田化学*, 2017, 34(3):532-537.
- [20] 花莉, 彭香玉, 范洋, 等. 石油降解单菌株及混合菌降解产物分析[J]. *陕西科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 32(5): 27-31.
- [21] CORNFORTH D M, SUMPTER D J T, BROWN S P, et al. Synergy and group size in microbial cooperation[J]. *Am Nat*, 2012, 180(3):296-305.
- [22] 张东升, 葛红生, 石泽阳, 等. 培养基变化和接种不同生长期细菌对印度芽孢杆菌生长的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(4): 487-491.
- [23] 李鹏鹏. 黏质沙雷氏菌 FS14 全基因组测序分析及其 VI 型分泌系统翻译后调控蛋白和免疫蛋白的晶体结构[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [24] 许学峰, 尤朝阳, 张淑娟, 等. 混合菌降解柴油效能及协同机制研究[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(10):47-55.
- [25] CAI T, WANG X, WEN W, et al. Promotion effect of biosurfactant on heavy-oil biodegradation [J]. *Petrol Sci Technol*, 2017, 35(16):1692-1698.
- [26] SANTISI S, CAPPELLO S, CATALFAMO M, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium[J]. *Braz J Microbiol*, 2015, 46(2):377-387.
- [27] 谢丹平, 尹华, 彭辉, 等. 混合菌对石油的降解[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(2):210-214.
- [28] ZHONG H, YANG X, TAN F, et al. Aggregate-based sub-CMC solubilization of *n*-alkanes by monorhamnolipid biosurfactant [J]. *New J Chem*, 2016, 40(3):2028-2035.
- [29] SINGLETON D R, ADRION A C, AITKEN M D. Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in contaminated soil[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2016, 100(23): 10165-10177.

Development and Performance Evaluation of Super Heavy Oil Viscosity Reducer with Heat Resistance and Salt Tolerance

REN Yaqing, WU Benfang

(School of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, P R of China)

Abstract: In view of the high viscosity and poor fluidity of super heavy oil and high salinity of formation water, emulsified viscosity reducer was prepared by surfactant, alkali and organic phosphoric acid and its formula was optimized. The effects of salinity and temperature on the viscosity-reducing properties of viscosity reducer were studied and the mechanism of viscosity reduction was analyzed. The results showed that the optimal formula of emulsifying viscosity reducer for super heavy oil was obtained as follows: 1.1:0.45:1.15 the mass ratio of compound surfactant consisting of sulfonate anionic surfactant YBH and alcohol ether carboxylate anionic-nonionic surfactant YFBH with a mass ratio of 1:1, alkali and salt resistant additive NYZJ-1. When the dosage of compound agent and additives was 0.81% in the emulsion, emulsification temperature was 80℃, the mass ratio of oil to water was 7:3 and the salinity was 95 g/L, the viscosity of super heavy oil reduced from 316.5 Pa·s to 0.0831 Pa·s at 50℃, the viscosity reduction rate was up to 99.97% and the water separating proportion was only 5.93% after standing in 4 hours at 50℃. Temperature had little effect on the viscosity-reducing property of viscosity reducer and the viscosity reduction rate of super heavy oil emulsion remained unchanged after 2 hours treatment at 200℃. The synergetic effect among the components of the compound emulsifier enhanced the viscosity-reducing property of the system and the stability of emulsion. The emulsified viscosity reducer had good viscosity-reducing effect and could withstand temperature and salt, which was suitable for the oil reservoir with high temperature and high salt.

Keywords: super heavy oil; viscosity reducer; emulsification; viscosity reduction; salt tolerance; heat resistance

(上接第 317 页。continued from p.317)

Analysis of Compounding and Degradation of Petroleum Degrading Bacteria

LI Xiaokang¹, YU Tao¹, LI Hong¹, DU Mingming¹, QU Chengtun^{1,2}

(1. Shaanxi Key Laboratory of Environmental Pollution Control Technology and Reservoir Protection in Oil and Gas Fields, Xi'an, Shaanxi 710065, P R of China; 2. State Key Laboratory of Petroleum and Petrochemical Pollutant Control and Treatment, PetroChina, Beijing 102206, P R of China)

Abstract: In order to efficiently repair the crude oil-contaminated soil near the Dingbian oil field in northern Shaanxi, five strains of crude oil-degrading bacteria were selected from the local oil-contaminated soil, the isolated degrading-bacteria were analyzed through physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence method. The orthogonal experiment method was used to explore and establish an efficient mixed bacteria repair system and analyze the degradation products of the strains. The surfactant Tween80 was used to stimulate the microorganisms to further improve the degradation efficiency of petroleum. The research showed that the strains were D-1 Cellulomonas, D-3 Serratia marcescens, C-2 Achromobacter, D-5 Acinetobacter, and A-3 Pseudomonas aeruginosa. By measuring the growth status of strains in LB medium and petroleum medium, analyzing the residual components of strains degrading petroleum, D-5, C-2, A-3 were screened out for compounding, and it was found that the effect of each strain on oil degradation was D-5> A-3> C-2 and the optimal dosage ratio of strain compounding of D-5 to C-2 to A-3 was 5:1:5. It was found that under the degradation conditions of temperature 35℃, pH 7.5, shaker speed 180 r/min, bacterial solution dosage 6%, and Tween80 content 5 cmc, the degradation effect of the mixed bacteria on crude oil could reach up to 87.12%, effectively promoting the efficient repair of the crude oil-contaminated soil.

Keywords: petroleum degrading bacteria; identification; compounding; surfactant; degradation rate