

嗜热解烃菌 DM-2 产生的生物乳化剂

李国强 纪凯华 李佳斌 刘云 梁凤来 马挺*

(南开大学 生命科学学院 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津市微生物功能基因组学重点实验室
天津 300071)

摘要:【目的】生物乳化剂是一类由微生物代谢产生的大分子生物表面活性物质, 从胜利油田中 1 区 N3 块地层环境中筛选到一株能产生一种生物乳化剂的嗜热解烃菌 DM-2, 经鉴定为嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*), 研究其产生的生物乳化剂的化学组成和理化性质。【方法】采用化学显色、红外光谱、高效液相色谱和氨基酸自动分析等方法确定乳化剂的化学组成; 根据乳化剂在不同条件下的乳化指数(EI-24)确定其理化性质。【结果】菌株 DM-2 产生的乳化剂主要由多糖(71.4%, 质量比)和蛋白(27.75%, 质量比)组成, 对柴油、苯、二甲苯和煤油等石油烃均有很好的乳化效果。理化性质分析显示它是一种耐高温、耐盐、耐酸碱的高效乳化剂。【结论】菌株 DM-2 产生的乳化剂是一种新型的生物乳化剂, 在石油开采、原油集输、油罐清洗和石油污染治理等领域具有潜在的应用价值。

关键词: 生物乳化剂, 嗜热脂肪地芽孢杆菌, 解烃菌, 嗜热菌, 理化性质

Bio-emulsifier produced by a thermophilic hydrocarbon-degrading strain DM-2

LI Guo-Qiang JI Kai-Hua LI Jia-Bin LIU Yun LIANG Feng-Lai MA Ting*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] A thermophilic hydrocarbon-degrading strain DM-2, isolated from Shengli oilfield and identified as *Geobacillus stearothermophilus*, produced an extracellular bio-emulsifier. [Methods] To characterize the bio-emulsifier, its chemical composition was determined by colorimetric method, infrared spectroscopy, HPLC and amino acid automatic analyzer. [Results] The bio-emulsifier is consisted of polysaccharides (71.4%, W/W) and polypeptide (27.75%, W/W). It could emulsify diesel, benzene, xylene and kerosene. It tolerated high temperature, salt and pH. [Conclusion] The bio-emulsifier produced by strain DM-2 is a novel bio-emulsifier and has potential applications in the oil exploitation, oil recovery and transportation, oil tank cleaning, and oil pollution regulation.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41373074); 国家 863 计划项目(No. 2009AA063502, 2013AA064401); 国家基础学科人才培养基金项目(No. J1103503)

*通讯作者: Tel: 86-22-23498185; ✉: tingma@nankai.edu.cn

收稿日期: 2013-04-30; 接受日期: 2013-06-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

Keywords: Bio-emulsifier, *Geobacillus stearothermophilus*, Thermophilic bacteria, Hydrocarbon-degrading bacteria, Physical and chemical performance

生物乳化剂是一类由微生物代谢产生的大分子生物表面活性物质,大多是由多糖、蛋白质、脂多糖、脂蛋白,或者这些物质的复合物组成^[1-2]。生物乳化剂具有稳定界面膜的作用,可与石油烃等疏水物质形成稳定的油水乳状液,并且无毒、可生物降解、与环境兼容性好,在石油开采、石油运输、油罐清洗、污染治理、化妆品、食品等领域具有潜在的应用前景^[3-6]。

早在 20 世纪六七十年代,就对生物乳化剂展开了广泛的研究。目前国外报道的生物乳化剂主要有 3 种: Emulsan、Alasan 和 Liposan。Emulsan 是由乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*) RAG-1 以乙醇为碳源发酵产生的胞外生物乳化剂^[7-8],能使石油明显分散,形成稳定的石油乳状液^[9]。Alasan 是由抗辐射不动杆菌(*Acinetobacter radioresistens*) KA53 以乙醇为碳源的发酵液中分离出来的阴离子生物乳化剂,由杂多糖和蛋白组成^[10]。Liposan 是一种由碳氢化合物和蛋白质组成的生物乳化活性物质,由嗜石油假丝酵母(*Candida petrophilum*)发酵烃类物质的发酵液中分离得到^[11]。国内对于生物乳化剂的研究起步较晚,但也分离到了多株能够产生乳化剂的菌株。李丹等^[12]对烃降解菌株 *Rhodococcus erythropolis* T7-2 产生的生物乳化剂进行了研究,发现它是一种由糖类、脂类和蛋白质组成的性能稳定、乳化效率高的生物乳化剂,对海洋石油污染的生物修复及石油开采都具有潜在的应用价值。李习武等^[13]从胜利油田原油污染土壤中分离到一株能降解多种石油芳烃和烷烃且能产生一种脂类生物乳化剂的菌株,并对其发酵产乳化剂的条件进行了研究。Huang 等^[14]对 *Brevibacillus* sp.、*Dietzia* sp.、*Ochrobactrum* sp.、*Pusillimonas* sp.、*Sphingopyxis* sp.和 *Achromobacter* sp.所产乳化剂进行了研究。Zheng 等^[15]对一株嗜热解烃菌 *Geobacillus pallidus* 的解烃特性和发酵生产的生物乳化剂进行了初步分析。由此可见,国

内外对嗜热解烃菌产生的生物乳化剂研究较少。

嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*) DM-2 是从胜利油田分离得到的一株嗜热解烃菌,本文对该菌产生的生物乳化剂进行了分离纯化,并对其化学组成、理化性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*) DM-2 是在胜利油田中 1 区 N3 块油井采出水中筛选得到的嗜热解烃菌,本室分离保存。该菌在 60–65 °C 高温条件下,能够以烃类物质为唯一碳源生长代谢,并对烃类物质具有良好的乳化和降解效果^[16]。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 培养基: 基础培养基(g/L): KH_2PO_4 0.30, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NH_4Cl 0.20, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.36, 酵母粉 0.50, 蔗糖 1.00, pH 7.2。以基础培养基添加 2.0% (体积比)液体石蜡作为种子培养基。

产乳化剂培养基(g/L): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4.8, KH_2PO_4 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, 柠檬酸三钠 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 葡萄糖 2.0, 酵母提取物 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.000 4, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.000 4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 4, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.000 2, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.000 2, pH 7.2。

1.2.2 培养条件: 种子液培养时间为 8 h, 产乳化剂发酵时间为 48 h, 均在 60 °C、130 r/min 振荡培养, 接种量为 5%。

1.3 乳化活性的测定

乳化指数(EI-24)法^[17]: 在刻度试管中, 加入 3 mL 单烷烃(或 0#柴油)和 7 mL 细菌发酵液(或相应浓度的生物乳化剂样品), 室温振荡 1 min 后静置 24 h。

乳化指数(Emulsification index, EI-24) = $\frac{\text{乳化高度}}{\text{对照石油烃高度}} \times 100\%$

如果 EI-24 $\geq 50\%$, 则说明乳状液是稳定的。

1.4 乳化剂的分离提取与纯化

菌株 DM-2 在产乳化剂培养基中 60 °C 培养 48 h, 培养液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 除去菌体后, 在上清液中加入 3 倍体积 4 °C 预冷的丙酮或者工业酒精, 用玻璃棒搅拌均匀, 置于 4 °C 过夜。8 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 ddH₂O 重悬透析后冷冻干燥, 得乳化剂粗提物, -20 °C 保存。据文献报道的生物乳化剂的分子量一般在 9×10^5 Da 左右^[7-10], 故选用分离范围为 2×10^5 – 8×10^6 Da 的 Sephacryl S-400HR 填充柱分离纯化生物乳化剂的有效成分。洗脱条件: 流动相为 0.15 mol/L 的 NaCl; 洗脱速度为 1 mL/min。连续分管收集洗脱液并测定其 EI-24, 将 EI-24 $\geq 100\%$ 的收集液合并, 冷冻干燥得乳化剂样品, -20 °C 储存备用。

1.5 乳化剂的定性分析

将提纯的乳化剂样品用 KBr 压片, 采用 Nicolet-560E.S.P 进行红外光谱扫描, 扫描波长为 400 – $4\,000\text{ cm}^{-1}$, 初步确定其可能含有的化学基团。根据李丹等报道的方法对乳化剂进行定性分析, 包括糖、蛋白质、脂的含量和组分分析^[12]。

1.6 乳化剂的理化性质分析

将提纯乳化剂样品溶于 Triple-buffer (10 mmol/L 琥珀酸钠, HEPES 和 CHAPS) 中配成 1 g/L 溶液, 然后在相应的条件下测定其 EI-24。在考察乳化剂的抗稀释性时, 用 Triple-buffer 将乳化剂溶液稀释成不同的浓度; 在考察乳化剂的耐盐性时, 向溶液中加入不同浓度的 NaCl; 在考察乳化剂的耐酸碱性时, 用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调整溶液的 pH; 在考察乳化剂的耐温性时, 将乳状液在不同温度下(4、15、30、45、60、70、80、100 °C) 放置 24 h。

1.7 乳化剂对不同底物的乳化作用

以二甲苯、甲苯、煤油、柴油和液蜡为乳化对

象, 测试发酵液和离心去菌体的上清液的 EI-24。

2 结果与讨论

2.1 菌株 DM-2 发酵液的乳化活性

菌株 DM-2 在以糖为碳源时可以产生一种生物乳化剂。在产乳化剂培养基发酵过程中表面张力略有下降, 发酵 11 h 乳化活性达到最高, 此时菌体量最大(图 1)。发酵液对 0#柴油的 EI-24 为 110%, 且其乳状液可稳定存在 7 d 以上(图 2A)。而在相同的实验条件下, 水与 0#柴油混合振荡后, 很快便恢复到初始的油水分层状态(图 2B)。

2.2 乳化剂的分离纯化

菌株 DM-2 在产乳化剂培养基中发酵 11 h, 发酵液经离心、有机溶剂沉淀上清液后得到乳化剂粗

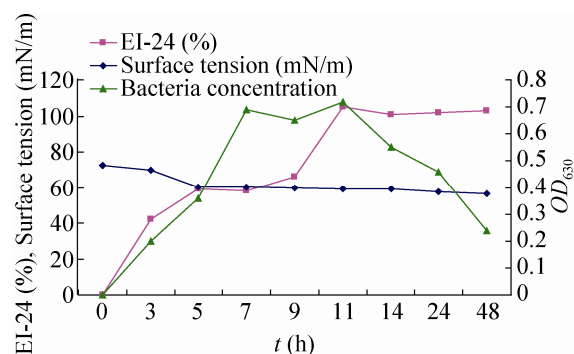


图 1 菌株 DM-2 生长曲线

Figure 1 The growth curve of strain DM-2



图 2 菌株 DM-2 发酵液对柴油的 EI-24

Figure 2 Emulsification index of diesel oil by strain DM-2 fermentation liquor

注: A: 乳化后的柴油; B: 未乳化的柴油。

Note: A: Emulsified diesel oil; B: Non-emulsified diesel oil.

提物, 其产量为 2.13 g/L。用 SephacrylS-400HR 层析柱将乳化剂粗提物纯化后合并 EI-24 \geq 100% 的收集液, 冷冻干燥, 获得 0.66 g/L 的生物乳化剂样品, 用于性质分析。

2.3 乳化剂的定性分析

2.3.1 乳化剂的红外光谱(IR)分析: 将菌株 DM-2 所产的乳化剂样品用溴化钾压片后在 400–4 000 cm^{-1} 波长下扫描, 结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出该乳化剂在 1 055、1 543、1 654、2 932、3 415 cm^{-1} 处有特征性吸收峰。其中, 吸收峰(1 055 cm^{-1})是由 C–O 伸缩振动产生, 吸收峰(1 543 cm^{-1})是由糖环上的 C–O–C 伸缩振动产生, 吸收峰(1 654 cm^{-1})

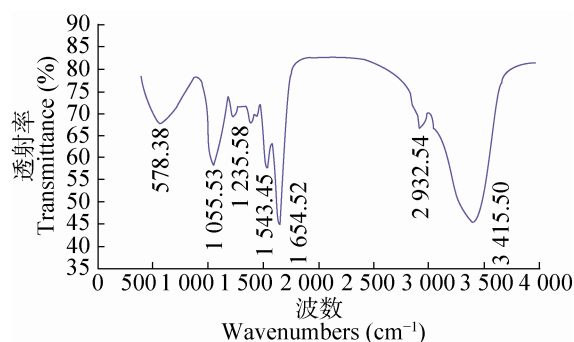


图 3 菌株 DM-2 产生的生物乳化剂的红外光谱分析
Figure 3 IR spectrum analysis of bio-emulsifier produced by strain DM-2

是酰胺键上羰基的特征吸收峰, 吸收峰(2 932 cm^{-1})是糖类 C–H 伸缩振动的特征吸收峰, 而吸收宽峰(3 415 cm^{-1})是由 O–H 伸缩振动产生。从菌株 DM-2 所产乳化剂的红外光谱可以看出该化合物中含有较多的–OH 和 RCO–NHR 基团, 而这些基团为糖蛋白的特征官能团。由此可以初步确定糖和蛋白质为该乳化剂的主要化学组分。

2.3.2 乳化剂的组分分析: 菌株 DM-2 所产生乳化剂的定性分析结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出: 乳化剂样品水解后和未水解时, 用硫酸-萘酮显色后都呈现出和阳性对照相似的蓝绿色(图 4A), 说明该乳化剂中含有糖组分; 用茚三酮显色后都呈现出和阳性对照相似的黄色(图 4B), 说明该乳化剂中含有蛋白质组分; 用钼酸铵-高氯酸显色后, 水解和未水解样品均未呈现出与阳性对照卵磷脂相似的蓝黑色(图 4C), 说明该乳化剂中不含脂类组分。结合红外光谱分析结果, 可以确定菌株 DM-2 所产生的乳化剂由多糖和蛋白质组成。

2.3.3 乳化剂的糖组分分析: 采用苯酚-硫酸法测定了乳化剂中多糖的含量, 定量用的标准曲线以不同浓度的葡萄糖为标准品绘制。经过 3 次测定, 发现 0.1 g/L 的乳化剂溶液中含有 0.07 g/L 葡萄糖当量的单糖, 约为乳化剂总质量的 71.4%。

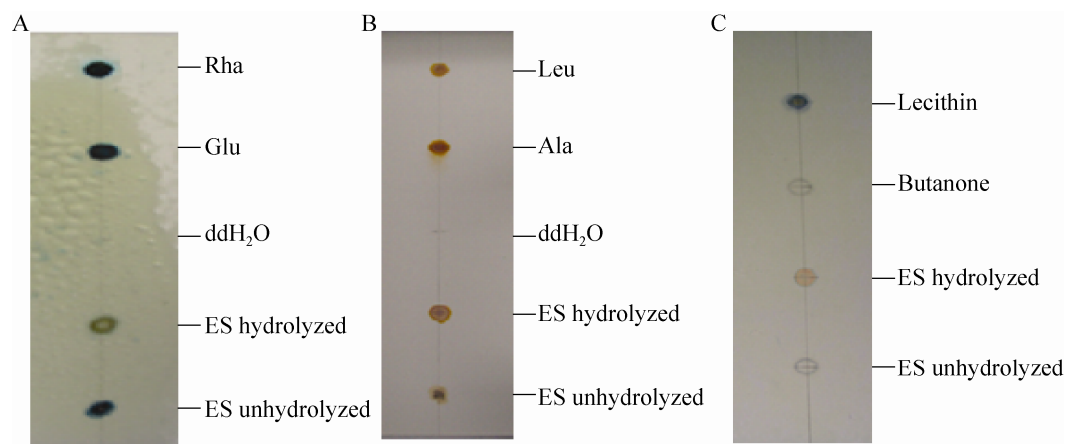


图 4 菌株 DM-2 产乳化剂的定性分析

Figure 4 Qualitative analysis of emulsifier produced by DM-2

注: A: 硫酸-萘酮显色; B: 茚三酮显色; C: 钼酸铵-高氯酸显色。

Note: A: Sulfuric acid-naphthalene coloration; B: Ninhydrin coloration; C: Ammonium molybdate-perchloric acid coloration.

将乳化剂样品进行酸水解, 经 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生后 HPLC 分析, 结果如图 5 所示。从图 5A 中可以看出乳化剂水解物中含有 4 种单糖, 出峰时间分别为 16.007、19.122、22.000 和 28.300 min。根据出峰时间推断, 这 4 种单糖分别为甘露糖、葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸。用面积归一化法计算得出乳化剂样品中甘露糖、葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸的比例约为 37.8:31.9:28.0:2.3。

2.3.4 乳化剂的氨基酸组分分析: 用考马斯亮蓝染色法测定了乳化剂样品中蛋白质的含量, 定量用的

标准曲线以不同浓度的小牛血清白蛋白(BSA)为标准品绘制。经过 3 次平行测定, 发现 1.0 g/L 的乳化剂溶液中含有 0.28 g/L 的蛋白质, 约为乳化剂总质量的 27.75%。

乳化剂样品经酸水解 24 h 后进行氨基酸组成分析, 结果见表 1, 其中极性氨基酸有 7 种, 分别为苏氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、丝氨酸、精氨酸和赖氨酸, 约为乳化剂总质量的 13.74%; 非极性氨基酸有 10 种, 分别为丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、亮氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸, 约为乳化剂总质量的 14.01%。

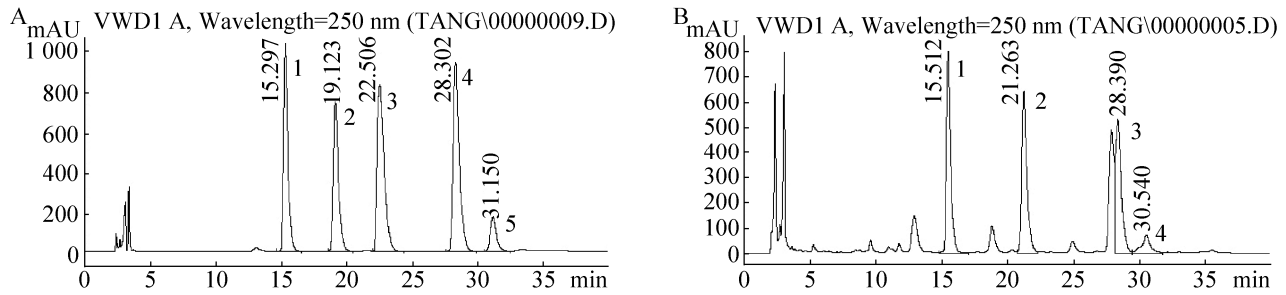


图 5 标准单糖及菌株 DM-2 所产乳化剂单糖组分的 HPLC 分析

Figure 5 HPLC analysis of the mixed standard monosaccharaides and PMP-derivatives acid-hydrolyzed bio-emulsifier
注: A: 单糖标准品; 1: 甘露糖; 2: 鼠李糖; 3: 葡萄糖; 4: 半乳糖; 5: 葡萄糖醛酸. B: 乳化剂样品; 1: 甘露糖; 2: 葡萄糖; 3: 半乳糖; 4: 葡萄糖醛酸.

Note: A: Standard monosaccharide mixture derivatives; 1: Mannose; 2: Rhamnose; 3: Glucose; 4: Galactose; 5: Glycuronic acid. B: Emulsifier sample derivatives; 1: Mannose; 2: Glucose; 3: Galactose; 4: Glycuronic acid.

表 1 菌株 DM-2 产生物乳化剂的蛋白组分氨基酸组成			
Table 1 Amino acid contents of the bio-emulsifier produced by strain DM-2			
氨基酸类型	含量	氨基酸类型	含量
Type of amino acid	Content (g/100 g)	Type of amino acid	Content (g/100 g)
Non-polar amino acid	14.01	Polar amino acid	13.74
Valine	1.98	Glutamic acid	4.80
Leucine	1.83	Asparaginic acid	2.69
Methionine	1.80	Lysine	1.64
Glycine	1.52	Threonine	1.48
Isoleucine	1.22	Arginine	1.32
Phenylalanine	1.12	Serine	0.98
Tyrosine	0.75	Histidine	0.83
Proline	0.75		
Cystine	0.32		

2.4 乳化剂的理化性质分析

2.4.1 乳化剂的抗稀释性:用 Triple-buffer 将乳化剂样品配制成 0.002 5、0.01、0.05、0.25、0.5、1.0、1.5 g/L 的系列稀释液,测定 EI-24,结果如图 6 所示。可以看出乳化剂溶液的乳化能力随着浓度的降低而降低。在乳化剂浓度为 1.0 g/L 时其 EI-24 为 100%;当乳化剂浓度为 0.05 g/L 时,其 EI-24 仍大于 70%;当溶液中乳化剂的浓度为 0.002 5 g/L 时,其 EI-24 依然大于 40%,优于已报道的解烃菌 T7-2 产生的乳化剂的乳化效果^[13]。说明菌株 DM-2 所产生的乳化剂在极微量的条件下就可以乳化石油烃,是一种高效的生物乳化剂。

2.4.2 乳化剂的耐盐性:用 Triple-buffer 将乳化剂样品配制成 1.0 g/L 的溶液,再分别加入终浓度为 5%、10%、20%、25%和 30%的 NaCl,测定含有不同浓度 NaCl 的乳化剂溶液的 EI-24,结果如图 7

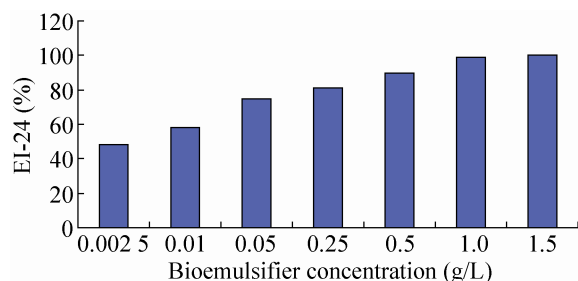


图 6 菌株 DM-2 产生的生物乳化剂不同浓度对柴油的乳化效果

Figure 6 Emulsification by different concentration of the bio-emulsifier produced by strain DM-2

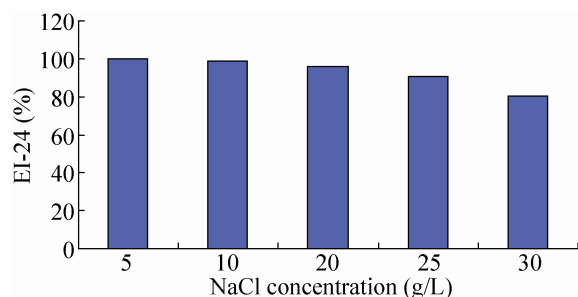


图 7 DM-2 菌产生的生物乳化剂对 NaCl 的耐受能力

Figure 7 Emulsification under different concentration of NaCl with bioemulsifier produced by strain DM-2

所示。从图 7 中可以看出菌株 DM-2 产生的乳化剂具有较高的耐盐性,在 NaCl 浓度小于 10%时其 EI-24 均为 100%,当 NaCl 浓度为 25%时其 EI-24 仍为 91.7%。

2.4.3 乳化剂的耐酸碱性:用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 将乳化剂溶液的 pH 调整为 1、3、5、7、9、11 和 14,然后测定它们的 EI-24。结果表明:当乳化剂溶液的 pH 在 1–14 之间时,其 EI-24 均为 100%。说明菌株 DM-2 产生的乳化剂具有很好的耐酸碱能力。

2.4.4 乳化剂的耐温性:将 7 mL 乳化剂 Triple-buffer 溶液(1 g/L)与 3mL 0[#]柴油在常温下形成的 EI-24 为 100%的乳状液在 4、15、30、45、60、70、80 和 100 °C 下放置 24 h 后再考察它们的 EI-24,结果如图 8 所示。从图 8 中可以看出,乳状液的破裂程度随着放置温度的增加而增加,但是放置温度低于 60 °C, EI-24 仍为 100%,当放置温度为 100 °C 时,其 EI-24 仍大于 60%,说明菌株 DM-2 产生的乳化剂具有较高的耐温性。

2.5 乳化剂对不同底物的乳化作用

分别以甲苯、二甲苯、柴油、煤油和液蜡等石油烃为乳化对象,分别测试发酵液和上清液的乳化能力,结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出,发酵液对甲苯、二甲苯、柴油和煤油的 EI-24 均为 100%,对液蜡的乳化效果仅为 76%;上清液对二甲苯和柴油的 EI-24 为 100%,但对甲苯、煤油和液蜡的

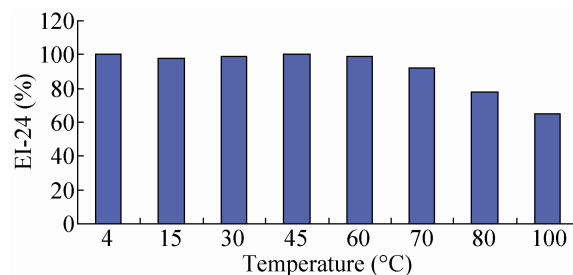


图 8 菌株 DM-2 产生物乳化剂在不同温度下对柴油乳状液的稳定性

Figure 8 Emulsification under different temperature with the bioemulsifier produced by strain DM-2

表 2 发酵液和上清液对几种石油烃的乳化能力						
Table 2 Emulsification to different hydrocarbons by the ferment broth and the supernate						
烷烃 Hydrocarbon	乳化指数 EI-24 (%)					
	对照 Control	甲苯 Toluene	二甲苯 Dimethyl benzene	柴油 Diesel	煤油 Kerosene	液体石蜡 Liquid wax
Ferment broth	0	100	100	100	100	76.47
Supernate	0	98.02	100	100	95.24	25.00

乳化能力有所降低,其中对液蜡的 EI-24 只有 25%。说明菌株 DM-2 产生的乳化剂对不同的石油烃具有不同的乳化效果,同时也说明 DM-2 菌株本身对石油烃也有一定的乳化效果。有学者研究了大分子生物乳化剂 Emulsan 对石油烃的乳化机制,指出 Emulsan 虽然不能降低油水界面张力,但是其依靠较高的分子量和亲(疏)水活性基团,以及一些蛋白质的相互作用起到稳定界面膜的作用^[18]。关于菌株 DM-2 产生的生物乳化剂的乳化机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 154-162.

[2] Haferburg D, Hommel R, Claus R, et al. Extracellular microbial lipids as biosurfactants[J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 1986, 33: 53-93.

[3] Toledo FL, Gonzalez-Lopez J, Calvo C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8470-8475.

[4] Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93: 915-929.

[5] Liu J, Huang XF, Lu LJ, et al. Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 6481-6487.

[6] Franzetti A, Gandolfi I, Raimondi C, et al. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5[J]. Bioresource Technology, 2012, 108: 245-251.

[7] Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, et al. Emulsifier of *Acinetobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties[J]. Applied and Environmental

Microbiology, 1979, 37(3): 402-408.

[8] Goldman S, Shabtai Y, Rubinovitz C, et al. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 44(1): 165-170.

[9] Abraham R, Eugene R, David G. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures[J]. Applied Microbiology, 1972, 24(3): 363-368.

[10] Navon VS, Zosim Z, Gottlieb A, et al. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3240-3244.

[11] Cirigliano MC, Carman GM. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(4): 747-750.

[12] 李丹, 黄磊, 李国强, 等. 烃降解菌株 T7-2产生的生物乳化剂及其理化性质研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 653-660.

[13] 李习武, 刘志培, 刘双江. 生物乳化剂产生菌及其产乳化剂条件初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 39-43.

[14] Huang XF, Guan W, Liu J, et al. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 317-323.

[15] Zheng CG, He JL, Wang YL, et al. Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 9155-9161.

[16] 刘清坤, 王君, 李国强, 等. 嗜热地芽孢杆菌 DM-2烃降解特性研究[J]. 环境科学, 2008, 29(12): 3554-3559.

[17] Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-active agents from two *Bacillus* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(2): 224-229.

[18] Horacio B, Yevgeny B, David G. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2608-2615.