

文章编号:1000-4092(2024)01-146-08

假单胞菌 YZ32 产生物乳化剂及原油降解作用*

苟燕¹, 余跃惠², 舒福昌¹, 董浩¹

(1. 长江大学化学与环境工程学院, 湖北 荆州 434100; 2. 长江大学石油工程学院, 湖北 武汉 430100)

摘要:为了分离出一株产生物乳化剂且能降解原油的菌株,以原油为唯一碳源,筛选出能乳化原油的细菌,再通过调整培养基成分来优化假单胞菌 YZ32 产生物乳化剂,以乳化指数和乳化剂产量为指标选出最佳的碳源和氮源;用乙醇提取生物乳化剂,再用透析袋纯化,测定乳化剂的糖含量和蛋白质含量,检测乳化剂的乳化活性物质。将乳化剂与7种不同的底物混合后测定乳化指数,考察乳化剂对不同底物的乳化效果。在不同条件下考察生物乳化剂的理化稳定性;通过原油降解实验,用GC-MS对原油组分进行分析,考察菌株对原油的去除率和降解效果。结果表明,分离出的能乳化原油的假单胞菌 YZ32,以蔗糖(20 g/L)和谷氨酸钠(7 g/L)为碳源和氮源时,可获得最大的生物乳化剂产量。代谢产物中蛋白含量为64.29%,糖含量为13.89%,乳化活性物质为蛋白类物质。该乳化剂对液体石蜡和甲苯具有较好的乳化效果,在温度为15~80 °C、pH值为4~11和矿化度为50~350 g/L的条件下,YZ32产生的生物乳化剂都能保持良好的稳定性。原油降解实验表明,YZ32在24 d内对原油的去除率达到60.3%,对原油饱和烃中的C₁₁—C₂₀组分和芳香烃中的菲类具有较好的降解效果。假单胞菌 YZ32能产生蛋白类的且稳定性良好的生物乳化剂,对原油具有良好的降解效果,在含油污泥土壤修复中具有巨大的应用潜力。

关键词:生物乳化剂;假单胞菌;乳化活性;原油降解;土壤修复

文献标识码: A DOI: 10.19346/j.cnki.1000-4092.2024.01.020

中图分类号: TE357:X74

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 前言

石油是一种重要的能源及生产原料,但在石油勘探、开采、储运、加工和使用过程中会对环境造成污染。石油中的许多成分具有难降解和高毒性的特点,被石油烃污染的土壤需要按照环境标准进行修复,特别是需要增强对难降解的石油烃的生物降解力度。石油烃污染土壤修复技术包括物理化学和生物方法等,其中生物修复是应用最广泛的方法之一,因为其成本低、效率高、更环保^[1]。生物修复主要是利用微生物及其代谢产物来降解石油。石

油烃降解微生物主要分离自被石油污染的土壤、深层地下储层和永久冻土下的沉积物,这些石油烃降解微生物能在极端环境下降解石油污染物^[2]。

生物乳化剂是同时具有疏水性和亲水性的两亲性分子,它们在不同极性的流体(油/水和水/油)之间起作用,能接触到疏水性基质,并提高水-烃接触面积、流动性、生物利用度和生物降解。生物乳化剂具有在较宽的pH值、温度和盐度下的稳定性^[3]、生物可降解性和低毒性,已被广泛用于石油开采^[4]、石油烃污染环境的生物修复、去除有毒金属^[5]等。据文献报道^[6-7],假单胞菌通常用于生产糖脂类生物

* 收稿日期:2023-06-25;修回日期:2023-08-19;录用日期:2023-10-17。

基金项目:国家自然科学基金青年项目“高温油藏嗜热铁还原微生物多样性及其提高采收率研究”(项目编号51804041),国家自然科学基金“循环激活本源微生物提高原油采收率的基础研究”(项目编号51574038)。

作者简介:苟燕(1999—),女,长江大学材料与化工专业在读硕士研究生(2021—),研究方向为微生物采油技术,E-mail:2393883167@qq.com。董浩(1987—),男,副教授,本文通讯联系人,研究方向为油气田开发及环境保护,通讯地址:434100 湖北省荆州市长江大学化学与环境工程学院,E-mail:dong_hao2005@163.com。

表面活性剂,而很少用于生产生物乳化剂。本文报道了一株分离自油田采出液的能够代谢产生生物乳化剂的假单胞菌,研究了不同碳源和氮源及其加量对乳化剂产量的影响,评价了分离所得乳化剂的理化性质,考察了不同的温度、pH、矿化度对乳化剂乳化活性的影响和假单胞菌对原油的降解特性。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

实验水样取自吐哈油田的油井生产水、注入水和三相分离器水。每个样品约取 500 mL 于无菌的血清瓶中 4 °C 下密封保存,用于降解菌的筛选;含油土壤取自吐哈油田现场的油泥;氯化钙(CaCl_2)、氯化钠(NaCl)、酵母粉、蛋白胨,分析纯,北京化学试剂公司;磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钾(KCl)、硫酸镁(MgSO_4)、硫酸亚铁(FeSO_4)、硫酸锰(FeSO_4)、硫酸锌(ZnSO_4)、硫酸铜(CuSO_4)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、正丁醇、氯仿、无水乙醇、葡萄糖、琼脂、蔗糖、乳糖、橄榄油、液体石蜡、甘油、硝酸钠(NaNO_3)、氯化铵(NH_4Cl)、硝酸铵(NH_4NO_3)、谷氨酸钠、蛋白胨、脲、玉米浆干粉、考马斯亮蓝 G250、硫酸、苯酚、煤油、花生油、橄榄油、液体石蜡、正庚烷、甲苯、甲醇、三氧化二铝,分析纯,国药集团化学试剂有限公司; Biosharp 型透析袋(27 mm, MW 3500),兰杰柯科技有限公司。

GI54DA 型高压灭菌锅,厦门致微仪器有限公司; SJ-CJC1F 型超净工作台,福州华科电子科技有限公司; MQT-60R 型恒温摇床,上海旻泉仪器有限公司; KLH-150FD 型恒温培养箱,上海齐欣科技仪器有限公司; JYW-200B 型全自动表面张力仪,承德市科承试验机有限公司; UV-2102C 型紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司; XH-C 型涡旋振荡器,常州越新仪器制造有限公司; SCIENTZ-12N 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司; H2050R 型高速离心机,湘潭湘仪集团; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,上海科尔仪器制造厂。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离

把 3 种水样加入富集培养基[2 g/L 玉米浆干粉、1 g/L K_2HPO_4 、1 g/L KH_2PO_4 、5 g/L NH_4NO_3 、0.2

g/L MgSO_4 、2% (体积含量)原油, pH 值为 7.0] 中,在 150 r/min、35 °C 的恒温摇床内培养 3 d; 选择原油乳化分散的实验组,在 LB 平板(5 g/L 酵母粉、10 g/L 蛋白胨、10 g/L NaCl 、2% 琼脂)上涂板划线,选取产乳化剂菌株 YZ32 用 LB 培养基(5 g/L 酵母粉、10 g/L 蛋白胨、10 g/L NaCl)中活化保存待用。通过 DNA 试剂盒提取单菌 YZ32 基因组,对 16S rRNA 进行测序,测序结果在 NCBI 中比对并构建系统发育树。

1.2.2 表面张力的测定

在室温下,采用全自动表面张力仪铂金板法^[8]测定培养基上清液的表面张力。

1.2.3 乳化活性的测定

乳化指数的测定采用 Cai 等^[9]的方法,将培养基上清液与煤油按体积比 1:1 混合,静置 24 h,由乳化层高度与液体总高度之比计算乳化指数 E_{24} 。

1.2.4 碳氮源优选实验

采用淀粉、乳糖、葡萄糖、橄榄油、无水乙醇、液体石蜡、甘油等碳源代替基础培养基(0.5 g/L MgSO_4 、6.8 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L KCl 、0.0005 g/L MnSO_4 、0.005 g/L FeSO_4 、0.07 g/L CuSO_4 、0.09 g/L ZnSO_4 、1.4 g/L NaOH 、5.56 g/L 谷氨酸钠、20 g/L 蔗糖, pH 值为 7.0)中的蔗糖分别加入基础培养基中,接种 5% 的 YZ32,在 35 °C、160 r/min 的恒温摇床内培养 3 d,先根据培养基上清液的乳化指数选出最佳碳源,再进行最佳碳源浓度(10~45 g/L)的优化。氮源优化方法同碳源优化一致,选择 NaNO_3 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、谷氨酸钠、蛋白胨、脲、玉米浆干粉作为氮源进行优化,再进行最佳氮源浓度(2~9 g/L)的优化。

1.2.5 乳化剂的纯化及化学性质分析

将 5% 的 YZ32 接种到灭菌的优化得到的培养基(0.5 g/L MgSO_4 、6.8 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L KCl 、0.0005 g/L MnSO_4 、0.005 g/L FeSO_4 、0.07 g/L CuSO_4 、0.09 g/L ZnSO_4 、1.4 g/L NaOH 、7 g/L 谷氨酸钠、20 g/L 蔗糖, pH 值为 7.0)中,在 35 °C、160 r/min 的恒温摇床培养 3 d,将发酵液在 10 000 r/min 下离心 5 min 并收集上清液,将上清液按 1:4 体积比与无水乙醇混合,在 4 °C 下静置 12 h,离心收集沉淀,用 75% 乙醇洗涤后冷冻干燥、称量,计算得到乳化剂粗品的产量;再用去离子水将收集到的沉淀溶解,用截留分子量的 14 000 Da 的透析袋透析,透析完成后将溶液

冷冻干燥,最后称重^[10]。将得到的纯生物乳化剂进行化学性质的分析,分别用硫酸苯酚法^[11]和考马斯亮蓝法^[12]测定乳化剂中糖含量和蛋白质含量,采用Sevag法去除乳化剂中的蛋白质后,测量样品的乳化活性。

1.2.6 乳化剂理化性质分析

将用蒸馏水配制的质量浓度为10 g/L的乳化剂溶液与等体积的煤油、花生油、橄榄油、液体石蜡、原油、正庚烷或甲苯漩涡振荡混匀,静置24 h,测定乳化活性。

将10 g/L的乳化剂溶液分别在不同温度(15、40、60、70、80、90、100 °C)下加热2 h后,取3 mL与等体积的煤油混合,室温静置,在不同时间点测定乳化活性。

将10 g/L的乳化剂溶液调节pH值至2、3、4、5、7、9、11、12,取3 mL与等体积的煤油混合,室温静置,在不同时间点测定乳化活性。

分别采用质量分数为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%的NaCl和CaCl₂溶液配制质量浓度为10 g/L的乳化剂溶液,取3 mL与等体积的煤油混合,在室温下分别测定不同时间点乳化剂的乳化活性。

1.2.7 含油土壤中原油降解分析

含油土壤中原油的生物降解实验在有机玻璃制反应器中进行。YZ32接种量为5%,同时设置一组不接菌的空白组。将取自吐哈油田的油泥与土壤配制成固体含量为25%的泥浆。反应器总体积为7 L,每个反应器内含5 L泥浆;机械搅拌器转速设定为600 r/min;在反应器底部钻孔,接入曝气装置,通过调节气流速度,保持泥浆溶解氧在2 mg/L以上;通过加热棒使泥浆温度控制在30~35 °C;在实验过程中,为了使氨氮含量和总磷含量分别保持在100和50 mg/L以上,每3 d分析一次泥浆中的氨氮和总磷浓度,再按需补充谷氨酸钠和K₂HPO₄;每天加入蒸馏水补充水分挥发损失;在不同时间点取样,测定含油土壤的总提取有机物含量(TEO)、微生物数量和原油四组分。

(1)含油率与TEO测定^[13]:将泥浆样品在45 °C烘箱中干燥24 h,取5 g干燥后的样品用质量为a的滤纸包裹,用二氯甲烷为溶剂,在索氏抽提器中抽提8 h;取出被抽提的滤纸包,在70 °C烘干

至恒重,采用重量法计算含油率和TEO(单位为mg/kg_{含油土壤})。

(2)微生物数量的测定:采用平板计数法,取1 g的含油土壤加入49 mL的无菌水中,在35 °C、150 r/min的恒温摇床下培养20 min,取1 mL进行梯度稀释后,在LB平板上涂布,每个稀释度做3个平行,在35 °C下培养7 d,按国标GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》计算微生物的数量。

(3)原油四组分分析:将抽提得到的提取液,参照中华人民共和国石油化工有限公司标准NB/SH/T0509—2010《石油沥青四组分测定法》,利用不同有机溶剂在层析柱中洗脱而将原油各组分分离,然后采用气相色谱质谱联用仪GC-MS对组分分离得到的饱和烃、芳香烃进行分析。

2 结果与讨论

2.1 微生物的鉴定

从油田采出液中分离得到一株单菌,能够将原油乳分散,将发酵液的表面张力由71.8 mN/m降至46.7 mN/m,因此,初步判断该菌株能够代谢产生生物乳化剂。将其16S rRNA基因序列在NCBI数据库中进行了比对,结果显示该菌株属于假单胞菌属,与之有99%的相似度,使用MEGA构建发育树,如图1所示。基于此结果,将分离株命名为YZ32。

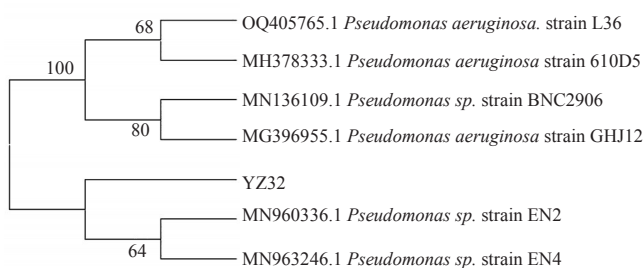


图1 菌株YZ32 16S rRNA系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree of strain YZ32 16S rRNA

2.2 乳化剂生产条件优化

文献报道的Pseudomonas属能利用水溶性和非水溶性的碳源来发酵合成生物乳化剂,例如葡萄糖^[14]、甘油^[15]、原油^[16]等。与碳源一样,氮源也是影响生物乳化剂合成的另一个重要参数。常用的用于合成乳化剂的氮源有NH₄Cl^[17]、NaNO₃^[18]等。不同生长条件对菌株YZ32产生物乳化剂的乳化活性

和产量的影响如图 2 所示。由图 2(a)可知,以蔗糖为碳源时,发酵液的乳化活性最高(E_{24} 为 70.7%),其次为葡萄糖(E_{24} 为 64.9%)。由图 2(b)可知,蔗糖质量浓度为 20 g/L 时,乳化剂乳化活性和产量整体达到最高。从图 2(c)可知,以谷氨酸钠为氮源时,发酵液的乳化活性最高(E_{24} 为 63%),其次为玉米浆干粉(E_{24} 为 59.3%)。由图 2(d)可知,谷氨酸钠质量浓度为 7 g/L 时,发酵液的乳化活性达最高(E_{24} 为 61.45%)。综合考虑,碳源选取蔗糖,质量浓度为 20 g/L;氮源选取谷氨酸钠,质量浓度为 7 g/L,乳化剂产量可达 11.48 g/L。

2.3 乳化剂的化学性质分析

通过纯化后得到的乳化剂是一种白色固体粉末,乳化剂产品中蛋白类物质含量为 64.29%,糖含量为 13.89%。用 Sevag 法去除乳化剂中蛋白质后,乳化层迅速分层,样品的乳化活性显著降低,表明

蛋白类物质为 YZ32 产乳化剂的主要活性物质,分析结果与 Fan 等^[19]报道的一致。

2.4 乳化剂的理化性质分析

菌株 YZ32 产生物乳化剂对 7 种不同底物的乳化活性如图 3 所示。由图 3 可知,菌株 YZ32 所产的生物乳化剂对 7 种底物都具有乳化效果,其中对液体石蜡、甲苯的乳化效果最好, E_{24} 分别达 66.67% 和 66.58%,表明菌株 YZ32 所产的生物乳化剂可对非水溶性有机物起到增溶作用。

温度和 pH 对乳化剂乳化活性的影响如图 4 所示。由图 4(a)可知,9 d 内温度为 15~80 °C 时对乳化剂乳化活性的影响不大,但当温度超过 80 °C 时,乳化活性明显下降,可能是由于生物乳化剂在高温环境下活性降低。由图 4(b)可知,乳化剂在 pH 值为 4~11 时具有较高乳化活性,且乳化指数在 30 d 内保持在 50% 左右。*Pseudomonas* 属中产生的不同

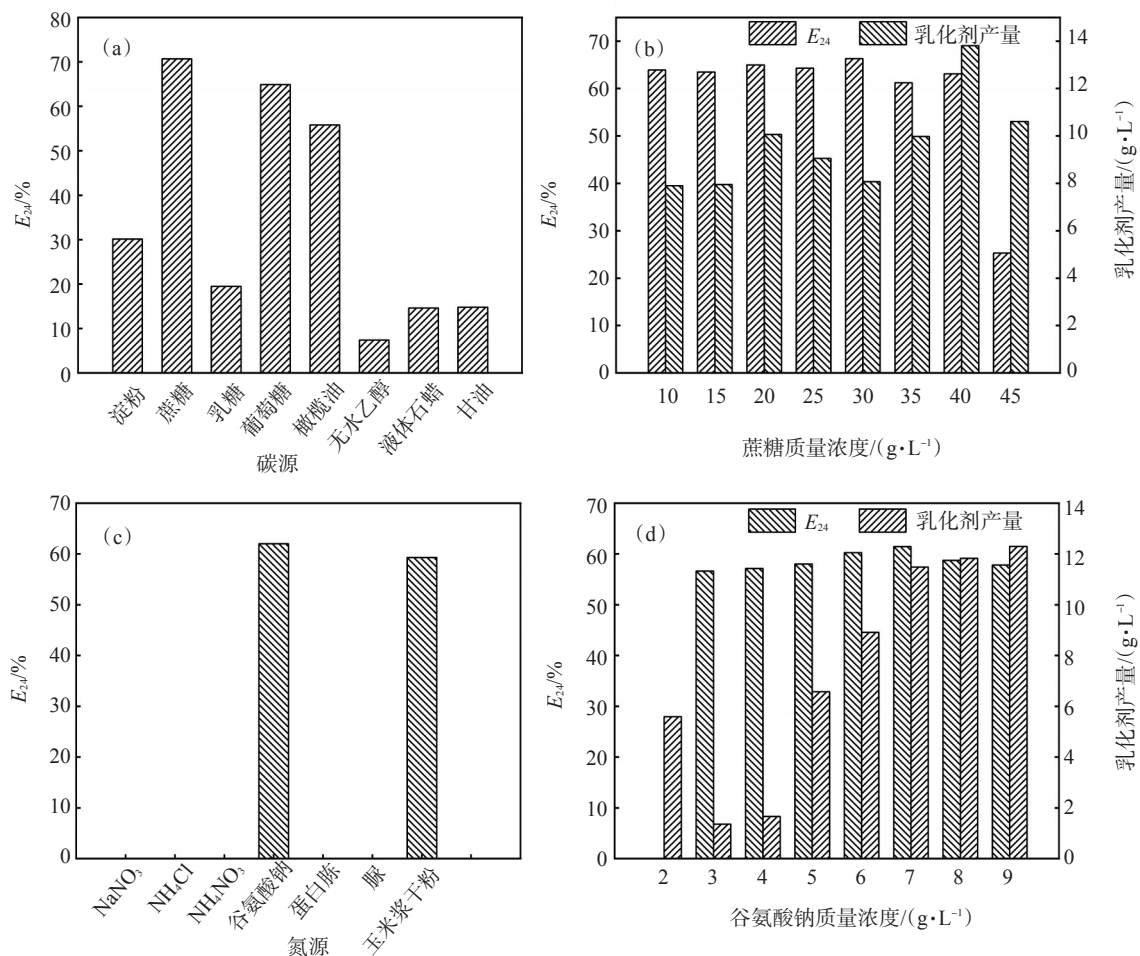


图 2 不同生长条件对生物乳化剂生产的影响

Fig.2 Effect of different growth conditions on bioemulsifier production

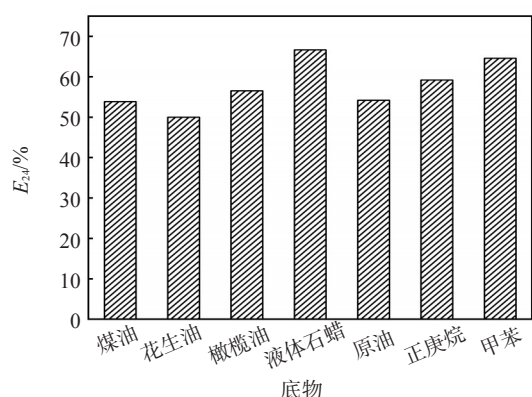


图3 乳化剂对不同底物的乳化活性

Fig.3 Emulsification activity of emulsifiers for different substrates

类型的乳化剂对温度和pH的耐受程度不同。*Pseudomonas oleovorans* 代谢产生的多糖类乳化剂能在温度为30~50 °C、pH值为2~12下保持乳化活性^[15]。由*Pseudomonas stutzeri* NJtech11-1产生的糖蛋白类乳化剂在温度为45~95 °C、pH值为3~10下表现出较好的稳定性。研究表明YZ32代谢产生物乳化剂在高温及碱性环境下具有良好的实际应用价值。

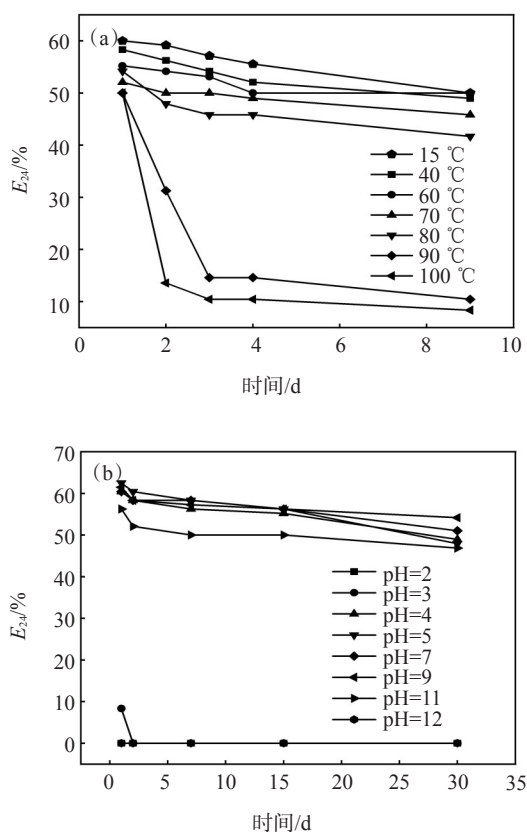
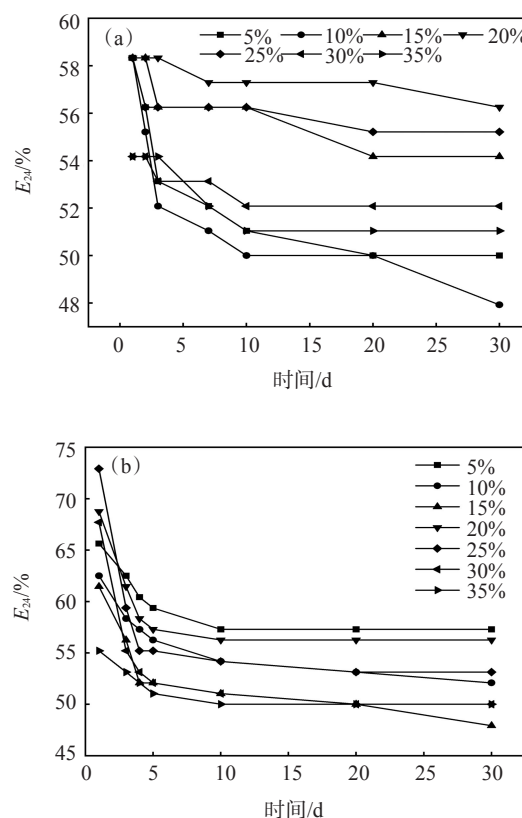


图4 温度(a)、pH值(b)对乳化稳定性的影响

Fig.4 Effect of temperature (a) and pH value (b) on emulsifying stability

不同NaCl、CaCl₂含量下乳化剂的乳化活性如图5所示。由图5可知,NaCl和CaCl₂质量分数为5%~35%时,乳化剂均表现出乳化活性,且E₂₄在30 d内保持在50%左右。CaCl₂对乳化剂乳化活性的影响要强于NaCl,在CaCl₂质量分数为30%~35%的环境下,乳化剂的E₂₄略低于NaCl环境。结果表明,的生物乳化剂在高矿化度下具有较好的乳化活性,并且具有长期稳定性,说明该乳化剂可用于海洋石油开采和海洋石油污染修复等领域。菌株YZ32产生的生物乳化剂的乳化能力在较宽的pH值(4~11)、温度(15~80 °C)和矿化度(NaCl质量分数为5%~35%)范围内几乎保持不变,这与Xia^[20]等报道的结果相似。

图5 NaCl浓度(a)、CaCl₂浓度(b)对乳化稳定性的影响Fig.5 Effect of NaCl concentration(a) and CaCl₂ concentration(b) on the emulsification stability

2.5 YZ32菌株对原油的生物降解性能

YZ32菌能够降解油泥中的原油,如图6所示,不添加菌的空白组也有一定降解效果,经过24 d的生物处理后含油率由3.18%降至2.28%;添加YZ32的实验组,第24 d时含油率由最初的3.18%降低至

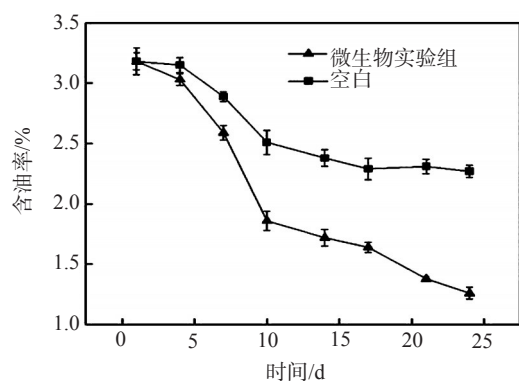


图 6 含油土壤的含油率随时间的变化

Fig.6 Change of oil content in oily soil with time

1.26%, 去除率达到了 60.3%, 是空白组的 2 倍; 从图中还可以看出, 含油率在第 10 d 后下降缓慢, 这可能是因为一些残余物如氧化态的多环芳烃在水中的溶解度较低, 且随修复时间的延长, 这些物质会逐渐进入油泥固相表面的缝隙中而被锁定以及与沉粒渣子发生化学键的结合, 导致生物降解速率越来越慢。

接种 5% 的 YZ32 后含油土壤中微生物的数量与 TEO 随时间的变化如图 7 所示。从图 7 可以看出, 随着含有土壤中的微生物数量逐渐增加, TEO 也逐渐增加, 第 7 d 时微生物数量和 TEO 达到最大值; 随后由于可利用基质的减少和生物毒性的增加, 微生物数量和 TEO 逐渐降低。由此可见, 含油污泥的降解效率与泥浆中的微生物数量息息相关。

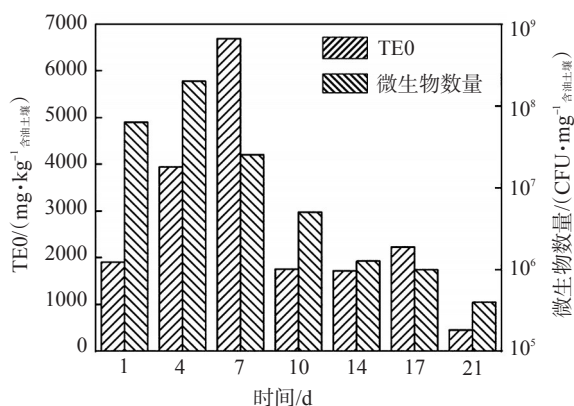
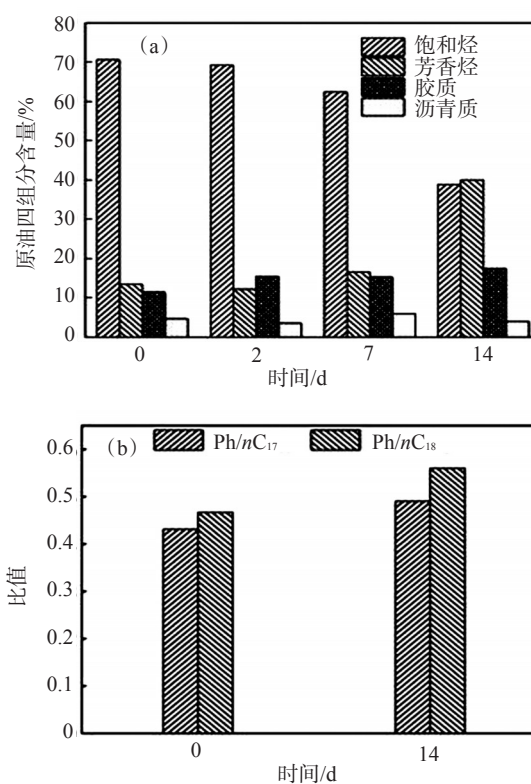


图 7 接种 YZ32 后含油土壤中微生物的数量与 TEO 随时间变化

Fig.7 Change of the number of microorganisms and TEO in oily soil with time after YZ32 inoculation

接种 YZ32 原油生物降解 14 d 后, 原油四组分 (a) Ph/nC_{17} 和 Pr/nC_{18} 值 (b) 随时间的变化如图 8 所

示。由图 8(a) 可知, 原始原油样品的组成以饱和烃为主, 相对含量为 70.6%, 芳香烃、胶质、沥青质的相对含量依次为 13.3%、11.5%、4.5%; 生物降解 14 d 后, 原油样品中饱和烃含量降低至 38.7%, 而芳香烃、胶质、沥青质分别为 40.0%、17.4%、3.8%。通常用 Ph/nC_{17} 和 Pr/nC_{18} 值作为检测原油被生物降解的指标。如图 8(b) 所示, 生物降解前原油的 Ph/nC_{17} 和 Pr/nC_{18} 值分别为 0.431 和 0.467, 生物降解 14 d 后原油 Ph/nC_{17} 和 Pr/nC_{18} 值增加至 0.490 和 0.560, 说明 YZ32 对原油组分中正构烷烃起到了降解作用。

图 8 接种 YZ32 后含油土壤中原油四组分 (a) 及 Ph/nC_{17} 和 Pr/nC_{18} 值 (b) 随时间的变化Fig.8 Changes of crude oil four components (a) and Ph/nC_{17} and Pr/nC_{18} values (b) with time after YZ32 inoculation

接种 YZ32 生物降解 14 d 后含油土壤中原油的饱和烃组分、芳香烃组分变化如图 9 所示。由图 9 (a) 所示, 微生物对 C_{11} — C_{20} 的饱和烃降解最为彻底, 说明该菌株偏好降解中短链烷烃; C_{21} 以上的饱和烃在降解过程中相对含量有所增加, 说明在生物降解过程中, C_{21} 以上的饱和烃降解低于其他烷烃。通常认为, 短链正构烷烃 (C_8 — C_{15}) 优先被微生物降解, 而中长链烷烃需要利用生物表面活性剂来帮助微

生物进行降解^[21]。由图9(b)可知, YZ32对芳香烃中的菲降解最为明显, 生物降解14 d后, 菲的相对含量由63.6%降至51.3%, 降低了12.3个百分点; 在降解过程中, 萘的相对含量有所增加, 表明原油降解过程中萘的降解低于其他芳烃。石油烃在生物降解过程中涉及各种酶的多个不同降解途径^[22]: 烷烃单加氧酶的微生物能对烷烃上的甲基进行氧化, 使烷烃转化为醇^[23]; 烷烃羟化酶(alkb)的微生物能降解C₁₃—C₃₀的正构烷烃^[24]。不同的微生物常含有一种或者多种酶系, 这决定了微生物对石油烃的降解能力。

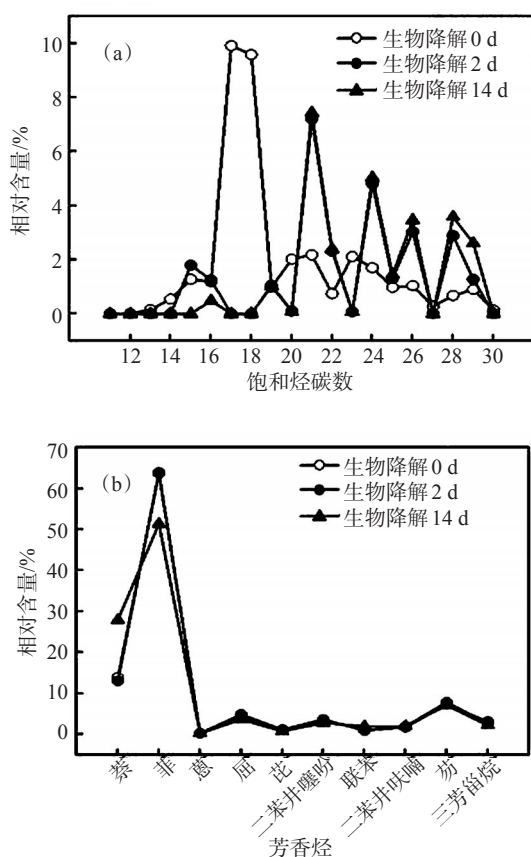


图9 接种YZ32后含油土壤中原油饱和烃(a)、芳香烃(b)组分的变化

Fig.9 Changes of the saturated hydrocarbon fraction (a) and the aromatic hydrocarbon fraction (b) after YZ32 inoculation

3 结论

从油田采出液中分离得到了单菌YZ32, 所产生生物乳化剂的蛋白含量为64.29%, 糖含量为13.89%。该菌产生的生物乳化剂对多种石油烃均有较好的乳化活性, 对温度(15~80℃)、pH(4~11)

和矿化度(5%~35%)有很好的耐受性。

菌株YZ32能够将含油污泥的含油率在24 d内由3.18%降至1.26%。菌株YZ32能降解原油的中短碳链的饱和烃和芳香烃中的菲类化合物。该菌株在石油污染土壤修复中有巨大的应用潜力。

参考文献:

- [1] SAHA R C, REZA A, HASAN M S, et al. A review: Bioremediation of oil sludge contaminated soil// 2018 6th International Conference on Environment Pollution and Prevention [C]. Brisbane, QLD, Australia, December 6–8, 2018.
- [2] SIDDIQUI S, BANO A. Hydrocarbon degradation [M]. Springer Singapore. 2019: 615–641.
- [3] RULLI M M, ALVAREZ A, FUENTES M S, et al. Production of a microbial emulsifier with biotechnological potential for environmental applications [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 174: 459–466.
- [4] ZHOU J F, LI G Q, XIE J J, et al. A novel bioemulsifier from *Geobacillus stearothermophilus* A-2 and its potential application in microbial enhanced oil recovery [J]. RSC Advances, 2016, 6 (98): 96347–96354.
- [5] COLIN V L, JUAREZ CORTES A A, APARICIO J D, et al. Potential application of a bioemulsifier-producing actinobacterium for treatment of vinasse [J]. Chemosphere, 2016, 144: 842–847.
- [6] ZHAO F, ZHENG M Y, XU X M. Microbial conversion of agro-processing waste (peanut meal) to rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: solid-state fermentation, water extraction, medium optimization and potential applications [J]. Bioresource Technology, 2023, 369: 128426.
- [7] PEREIRA D D T, SILVA A L S, LOPEZ A M Q. Production of emulsifier by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* (C1 LBPVMA-UFAL) using lubricant oil as main carbon source [J]. Acta Scientiarum Technology, 2010, 32(1): 33–36.
- [8] 李兴丽, 余跃惠, 张忠智. 两株高效原油降解混合菌的性能分析[J]. 中国石油大学学报(自然科学版), 2008(2): 132–134. LI X L, SHE Y H, ZHANG Z Z. Performance evaluation of two efficient mixed strains for crude oil degradation [J]. Journal of China University of Petroleum, 2008(2): 132–134.
- [9] CAI Q, ZHANG B, CHEN B, et al. A novel bioemulsifier produced by *Exiguobacterium* sp. strain N4-1P isolated from petroleum hydrocarbon contaminated coastal sediment [J]. RSC Advances, 2017, 7(68): 42699–42708.
- [10] LI M C, YU J Q, CAO L, et al. Facultative anaerobic conversion of lignocellulose biomass to new bioemulsifier by thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443: 130210.
- [11] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical chemistry, 1956, 28(3): 350–356.

- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [13] 包清华. 油气田含油污泥生物处理技术研究[D]. 北京: 中国科学院渗流流体力学研究所, 2021.
- BAO Q H. Research on the biological treatment of oily sludge in oil and gas fields [D]. Beijing: Research Institute of Seepage Fluid Mechanics, Chinese Academy of Sciences, 2021.
- [14] BONILLA M, OLIVARO C, CORONA M, et al. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 98 (2) : 456–63.
- [15] FREITAS F, ALVES V D, CARVALHEIRA M, et al. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78 (3) : 549–556.
- [16] VANDANA, DAS S. Structural and mechanical characterization of biofilm-associated bacterial polymer in the emulsification of petroleum hydrocarbon [J]. *3 Biotech*, 2021, 11(5) : 239.
- [17] DE SOUSA T, BHOSLE S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123(8) : 256–262.
- [18] WEI F D, XU R, RAO Q Y, et al. Biodegradation of asphaltenes by an indigenous bioemulsifier-producing *Pseudomonas stutzeri* YWX-1 from shale oil in the Ordos Basin: Biochemical characterization and complete genome analysis [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 251: 114551.
- [19] FAN Y Q, TAO W Y, HUANG H, et al. Characterization of a novel bioemulsifier from *Pseudomonas stutzeri* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33: 1–10.
- [20] XIA M Q, FU D F, CHAKRABORTY R, et al. Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 282: 456–463.
- [21] ROJO F. Degradation of alkanes by bacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(10): 2477–2490.
- [22] VARJANI S J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 223: 277–286.
- [23] ABBASIAN F, LOCKINGTON R, MALLAVARAPU M, et al. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176: 670–699.
- [24] LIU Y C, LI L Z, WU Y, et al. Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the alkB gene [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 310–316.

Bioemulsifier Production and Crude Oil Degradation by *Pseudomonas* YZ32

GOU Yan¹, SHE Yuehui², SHU Fuchang¹, DONG Hao¹

(1. School of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434100, P R of China; 2. School of Petroleum Engineering, Yangtze University, Wuhan, Hubei 430100, P R of China)

Abstract: In order to obtain a strain that could produce bioemulsifier and degrade crude oil, the bacteria that could emulsify crude oil was selected using crude oil as the sole carbon source, and the production of bioemulsifiers by *Pseudomonas* YZ32 was optimized by adjusting the composition of the culture medium. The optimal carbon and nitrogen sources were selected based on the emulsification index and emulsifier yield. bioemulsifiers was extracted with ethanol and purified with dialysis bags, the sugar and protein content of the emulsifiers was measured, the emulsifying active substances of the emulsifiers was tested. By Mixing bioemulsifiers with 7 kinds of different substrates and measuring the emulsification index, the bioemulsification effect of emulsifiers on different substrates was investigated. Under different conditions, the physicochemical stability of bioemulsifiers was investigated. The crude oil degradation experiments were carried out, the components of crude oil were analyzed using GC-MS to investigate the removal rate and degradation effect of strains on crude oil. The results showed that a strain of *Pseudomonas* YZ32 capable of emulsifying crude oil was isolated. The maximum bioemulsifier yield could be obtained using 20 g/L of sucrose and 7 g/L of sodium glutamate as carbon and nitrogen sources for YZ32. The protein content of its metabolites was 64.29% and the sugar content was 13.89%, and the emulsifying active substances were protein-like substances. The bioemulsifier had a good emulsifying effect on liquid paraffin and toluene. The bioemulsifier produced by YZ32 could maintain good stability under the temperatures of 15–80 °C, pH value of 4–11 and salinity of 50–350 g/L. The crude oil degradation experiment showed that YZ32 achieved 60.3% removal of crude oil within 24 d with better degradation effect for C₁₁–C₂₀ components in saturated hydrocarbons and phenanthrene in aromatic hydrocarbons of crude oil. *Pseudomonas* YZ32 could produce stable protein based bioemulsifiers. YZ32 had a good degradation effect on crude oil and had great potential for application in the remediation of oily sludge soil.

Keywords: bioemulsifier; *Pseudomonas*; emulsification activity; crude oil degradation; soil remediation