

文章编号: 1673- 9620 (2008) 02- 0009- 04

两株杂环硫脱硫菌脱硫特性的初步研究^{*}

田志国¹, 田 静¹, 李尔炆²

(1 江苏工业学院 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164; 2 江苏工业学院)

摘要: 从油污染的土壤样品中筛选出两株能将二苯并噻吩 (DBT) 代谢为 2- 羟基联苯 (2- HBP) 的菌株 LT₁ 和 LT₂, 初步鉴定其均属于节杆菌属 (*Arthrobacter*. sp)。在 0.5 mmol · L⁻¹ DBT 浓度下两菌株都有较高的脱硫活性。硫酸钠和 2- HBP 的存在对菌株的脱硫活性有强烈的抑制作用: 在硫酸钠初始浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 的 DBT 基础培养液中, 两菌株均只有少量的 2- HBP 产生; 在 2- HBP 初始浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 下, LT₁ 和 LT₂ 细胞无明显生长。

关键词: 生物脱硫; 二苯并噻吩; 节杆菌; 2- 羟基联苯

中图分类号: TE 624.5

文献标识码: A

Biodesulfurization of Organic Sulfur by Two Isolated Strains

TIAN Zhi- guo¹, TIAN Jing¹, LI Er- yang²

(1. School of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213164, China; 2. Jiangsu Polytechnic University)

Abstract: Two bacterial strain LT₁ and LT₂ were isolated from contaminated soil, which could convert dibenzothiophene (DBT) into 2- hydroxybipheny (2- HBP), and were primarilly identified as *Arthrobacter*. sp LT₁ and LT₂. Both of them had high desulfurization activities in culture of 0.5 mmol · L⁻¹ DBT as sole sulfur source. The existence of sulphate and 2- HBP had strong inhibiting effect on desulfurization activity both of LT₁ and LT₂. There were only a few of 2- HBP generated by both two bacterial strain in culture of 0.5 mmol · L⁻¹ sulfate initial concentration; cell- growth of LT₁ and LT₂ stopped when 2- HBP concentration was 1 mmol · L⁻¹.

Key words: biodesulfurization; dibenzothiophene; *Arthrobacter*. sp; 2- hydroxybiopheny

硫以无机硫化物、硫醇、硫醚、芳烃环及杂环硫化物等形式存在于原油中, 含量从 0.05% ~ 5% 不等。硫的存在不但提高了石油炼制的成本, 且燃烧释放出的 SO₂ 是造成空气污染的主要污染物之一^[1]。炼油厂脱除油品中的有机硫主要采用加氢脱硫方法: 在高温高压下, 将有机硫转化为硫化氢而脱除。如果用加氢脱硫方法将石油中含硫量降到很低水平, 如 40 mg/L, 不但成本高而且副产品对环境极不友好。

生物脱硫因能在常温常压下进行, 并高效快速脱硫而被广泛关注。二苯并噻吩类杂环硫化物不易被加氢脱硫方法有效去除^[2], 所以二苯并噻吩 (DBT) 被人们作为生物脱硫研究的模型化合物。微生物脱除 DBT 中的硫, 主要有两种途径, 即: 彻底破坏整个分子或选择性断裂 C- S 键^[3,4]。后者因为不破坏碳骨架、不降低油品燃烧热值, 被研究者认为是具有积极意义的脱硫方法。从土壤筛选获得的多个菌株, 据报道能脱除 DBT 中的硫, 其

* 收稿日期: 2007- 12- 11

作者简介: 田志国 (1981-), 男, 河南鹤壁人, 硕士研究生。

中菌株 *Rhodococcus rhodochlorus* IGTS8 因为能选择性去除 DBT 中的硫, 而被进行了广泛的遗传信息和燃料脱硫研究^[5,6]。同时筛选其它高效脱硫菌的工作也一直在进行。陆续报道了许多专一性脱硫菌株, 如 *Corynebacterium*. sp, *Gordona*. sp 等, 这些菌种多受专利保护。所以分离具有我国自主知识产权的脱硫菌种显得十分必要。国内生物脱硫方面的研究起步较晚, 但菌种的筛选工作也取得了一定的进展, 如: 红球菌 LSSE 8-1^[7]、红球菌 SDUZA WQ^[8] 等。本文报道了两株能选择性脱除 DBT 中硫的菌株, 研究了其对 DBT 的脱硫效果和 Na_2SO_4 、2- HBP 对菌株脱除 DBT 中硫的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

二苯并噻吩, 分析纯 99%, 购自 Sigma 公司; 2- 羟基联苯, 分析纯, 99%, 购自 Acros Organics 公司; 2, 6- 二氯醌- 4- 氯亚胺, 化学纯, 购自国药集团。

1.2 培养基与溶液^[7]

无硫基础培养基 (BSM): 甘油 3 g, KH_2PO_4 2.44 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.04 g, NH_4Cl 2 g, MgCl_2 0.4 g, 盐溶液 1 mL; 加蒸馏水至 1 000 mL, pH=7.0~7.2。

盐溶液: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g, ZnCl_2 2 g, CaCl_2 40 g, H_3BO_3 0.5 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 g, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8 g, 加蒸馏水至 1 000 mL。

Gibbs 试剂: 0.05 g 2, 6- 二氯醌- 4- 氯亚胺加无水乙醇至 50 mL, 然后避光保存。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞浓度

采用分光光度法。在 $\lambda=600\text{ nm}$ 条件下, 测定细胞悬液的 OD 值。

1.3.2 荧光法检测 2- 羟基联苯^[9]

2- 羟基联苯在 254 nm 处有较强的蓝色荧光。用紫外灯 (254 nm) 照射选择培养基上长出的菌落, 根据荧光的强弱粗略判定菌株对 DBT 的降解能力。

1.3.3 2- 羟基联苯测定^[10]

Gibbs 试剂与 2- 羟基联苯反应生成蓝色醌酚

衍生物, 在 $\lambda=610\text{ nm}$ 处具有吸收峰。先建立标准曲线, 然后再根据标准曲线确定样品的浓度。

1.4 DBT 脱硫菌株的筛选分离

从原油田, 长庆油田, 常州等地采集被石油污染的土壤样品, 分别取 5 g, 浸于 100 mL 自来水中, 摇床震荡 1 h。取悬液 5 mL 接入 50 mL 含有 $0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DBT 的 BSM 培养基中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、140 r/min 摇床震荡培养 3 天, 并在相同培养基中连续转接 3 到 4 次。取经富集的培养液, 调 pH>9, 用 Gibbs 试剂检测, 如培养液呈阳性, 即表示其中可能含有脱硫细菌。将阳性培养液进行梯度稀释, 选 10^{-5} 到 10^{-8} 稀释菌液涂布以 DBT 为唯一硫源的 BSM 固体平板, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 72 h。取单菌落接入以 DBT 为唯一硫源的固体选择培养基平板, 培养 48 h。用紫外灯 (254 nm) 照射菌落, 挑取具有蓝色荧光的菌落接入 BSM 培养液 ($\text{DBT } 0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。培养 48 h, Gibbs 试剂检测, 显阳性的为目标菌株。

1.5 菌株脱硫实验

在 50 mL DBT 浓度为 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSM 培养液中, 接入 OD 为 1 的菌悬液 5 mL, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、140 r/min 摇床振荡培养, 隔一定时间取样测细胞浓度和 2- HBP 积累浓度。

1.6 Na_2SO_4 对 DBT 降解的影响

在 50 mL DBT 浓度为 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSM 培养液中, 分别加入不同浓度的 Na_2SO_4 : 0、0.05、0.2、0.5、1、2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 接种 OD 为 1 的菌悬液 5 mL, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、140 r/min 摇床振荡培养, 60 h 后取样测定各样品中 2- HBP 积累浓度。

1.7 2- HBP 对脱硫菌生长的影响

在 50 mL DBT 浓度为 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSM 培养液中, 分别加入不同浓度的 2- HBP: 0、0.05、0.2、0.5、1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种 OD 为 1 的菌悬液 5 mL, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、140 r/min 摇床振荡培养, 60 h 取样测细胞浓度。

2 结果与讨论

2.1 脱硫菌的筛选及鉴定

从 6 个土壤样品中共分离得 400 株能在 DBT

为唯一硫源的选择平板上生长的菌株，其中 26 株在 DBT 固体选择培养基平板上培养后，在 254 nm 紫外光照射下产生蓝色荧光，挑取 5 株荧光较强的菌株 LT₁、LT₂、LT₃、LT₄、LT₅，在 DBT 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 的 BSM 液体培养基中培养 60 h 后，测定培养液中 2- HBP 积累浓度，如图 1 所示，LT₁、LT₂ 高于其它菌株，所以 LT₁、LT₂ 菌株入选，并对其进行分类学鉴定，性状见表 1，表 2。

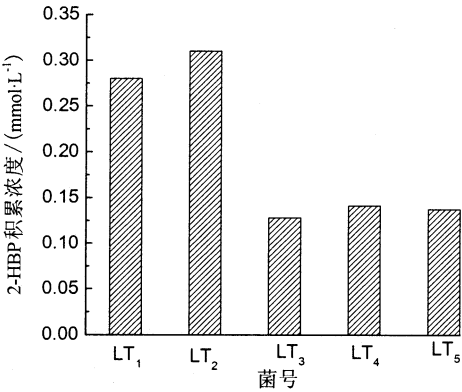


图 1 筛选菌株在 0.5 mmol · L⁻¹ DBT 选择培养基中 2- HBP 积累浓度

Fig 1 The ultimate concentrations of 2- HBP to different isolated strains in 0.5 mmol · L⁻¹ DBT selected media

表 1 牛肉膏蛋白胨培养基上菌落特征

Table 1 The bacteria colony characteristics on LB culture medium

菌号	形状	表面	隆起	边缘	颜色	光学特征
LT ₁	圆	光滑	凸	整齐	乳白色	半透明
LT ₂	圆	粗糙	凹	齿形	米黄色	不透明

表 2 细胞形态特征

Table 2 The cell morphological characteristics

菌号	形状	大小	革兰氏染色
LT ₁	微杆- 长杆- 微杆	0.5 × 0.7~ 0.5 × 4.0	G ⁺
LT ₂	微杆- 长杆- 微杆	0.5 × 0.7~ 0.5 × 4.5	G ⁺

由以上特征，根据《伯杰细菌鉴定手册》第八版，LT₁ 和 LT₂ 初定为节杆菌 LT₁ (*Arthrobacter*. sp) 和节杆菌 LT₂ (*Arthrobacter*. sp)。

2.2 LT₁ 和 LT₂ 菌株的生长及脱硫曲线

菌株 LT₁ 和 LT₂ 菌体生长及脱硫情况见图 2、图 3。LT₁ 在 40 h 菌体浓度达最大，菌体的生长与 DBT 的降解产生是同步的，对数期内 2- HBP 平均积累浓度达 0.01 mmol · L⁻¹ · h⁻¹；培养过程中 LT₂ 菌体增殖速度低于 LT₁，但 LT₂ 在对数期内的 2- HBP 的平均积累浓度为 0.011 mmol · L⁻¹ · h⁻¹，脱硫活性高于 LT₁；培养 68 h 后 LT₁、LT₂ 培养液中 2- HBP 的终积累浓度分别为：

0.29 mmol · L⁻¹、0.32 mmol · L⁻¹，LT₂ 的脱硫效果优于 LT₁。

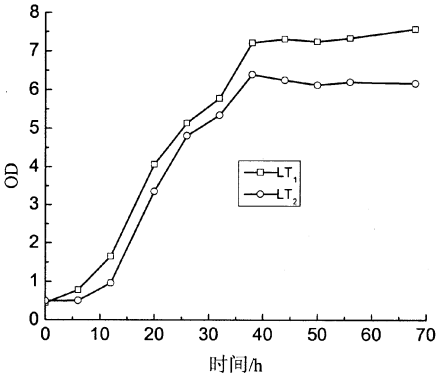


图 2 DBT 为唯一硫源 LT₁ 和 LT₂ 生长曲线

Fig 2 Growth curve of LT₁ and LT₂ with DBT as sole sulfur source

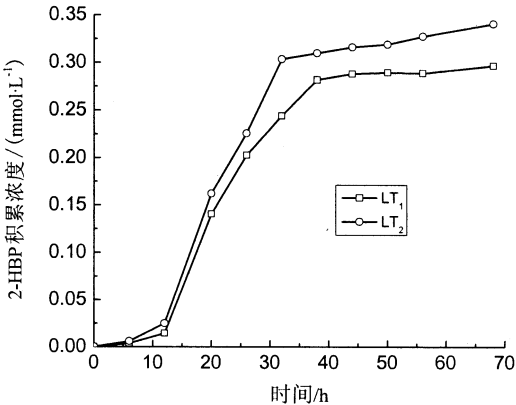
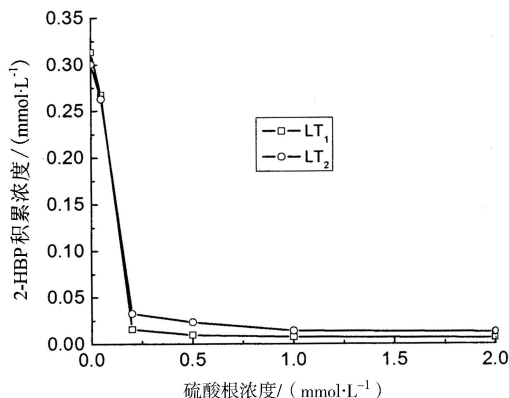


图 3 DBT 为唯一硫源 LT₁ 与 LT₂ 培养液中 2- HBP 积累曲线

Fig 3 Concentration curve of 2- HBP in culture of LT₁ and LT₂ with DBT as sole sulfur source

2.3 Na₂SO₄ 对 DBT 降解的影响

如图 4 所示，较低浓度的 Na₂SO₄ (0.05 mmol · L⁻¹) 对 LT₁ 和 LT₂ 降解 DBT 产生 2- HBP 几乎无影响；较高浓度的 Na₂SO₄ 对 LT₁ 和 LT₂ 降解 DBT 产生 2- HBP 有明显的抑制作用，Na₂SO₄ 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 时，LT₁ 培养液中检测不到 2- HBP，而 LT₂ 有 0.024 mmol · L⁻¹ 的 2- HBP 生成，Na₂SO₄ 浓度为 2.0 mmol · L⁻¹ 时，LT₂ 仍有 0.013 mmol · L⁻¹ 2- HBP 生成，所以 LT₂ 抗 Na₂SO₄ 的抑制性作用强于 LT₁。实验结果与 Ohshiro、Rhee^[11,12] 等在研究中发现的结果类似。出现这种情况的原因可能为 Na₂SO₄ 的存在阻遏了 DBT 部分降解酶系的产生，有待进一步深入研究。

图4 Na_2SO_4 对 DBT 脱硫的影响Fig 4 Effect on desulfurization of DBT by Na_2SO_4

2.4 2-HBP 对菌株 DBT 脱硫的影响

2-HBP 为 DBT 代谢的终产物, 对 LT₁ 和 LT₂ 细胞生长有一定影响: 如图 5 所示, 低浓度的 2-HBP ($0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 LT₁ 和 LT₂ 细胞生长无明显影响; 较高浓度的 2-HBP (高于 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 LT₁ 和 LT₂ 的生长有强烈的抑制作用, LT₂ 在 2-HBP 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌体不生长, 而 LT₁ 对 2-HBP 的耐受度略优于 LT₂。出现这种情况可能是 2-HBP 对 DBT 脱硫酶的反馈抑制作用。实验结论与 Ohshiro^[11] 等 1996 年报道的结果类似。

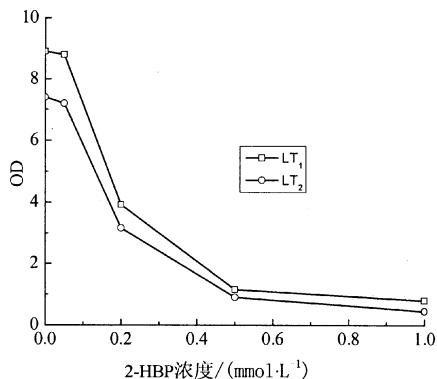


图5 2-HBP 对 DBT 降解的影响

Fig 5 Effect on degradation of DBT by 2-HBP

3 结论

以二苯并噻吩为模型化合物分离得到两株杂环硫脱硫菌, 能将二苯并噻吩中的硫脱除并转化为 2-羟基联苯; 根据《伯杰细菌鉴定手册》描述的性状, 将两株菌初定为节杆菌 LT₁ (*Arthrobacter*.

sp) 和节杆菌 LT₂ (*Arthrobacter*. sp)。④LT₁ 和 LT₂ 在 DBT 浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中生长良好, 且有较高的脱硫效率。④ Na_2SO_4 对 LT₁ 和 LT₂ 菌株降解 DBT 具有较强的抑制作用, Na_2SO_4 对 LT₁ 的抑制强于 LT₂。④ 2-羟基联苯对 LT₁ 和 LT₂ 生长有明显影响, LT₁ 对 2-HBP 的耐受度略优于 LT₂。

参考文献:

- [1] 姜安玺. 空气污染控制 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [2] Grossman M J, Lee M K, Prince P C, et al. Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 181-188
- [3] Van Afferden M, Schacht M S. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium*. sp [J]. DO Arch Microbiol, 1990, 153 (23): 324-328
- [4] Gallagher J R, Olson E S, Stanley D C. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway [J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 107 (11): 31-36
- [5] Kayser K J, Bielaga-Jones B B, Jackowski K, et al. Utilization of organic sulfur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 [J]. J Gen Microbiol, 1993, 39 (7): 3123-3129.
- [6] Kaufman E N, Harkins J B, Borole A P. Comparison of batch stirred and electro-spray reactors for biodesulfurization of dibenzothiophene in crude oil and hydrocarbon feedstocks [J]. Appl Biochem Biotech, 1998, 73 (2): 127-144.
- [7] 缙仲轩, 刘会洲, 罗名芳, 等. 专一性脱硫菌的分离与鉴定 [J]. 中国科学 B 辑, 2002, 5 (32): 398-405.
- [8] 马翠卿, 佟明友, 于波, 等. 一株红球菌脱硫菌株脱硫特性的研究 [J]. 化学学报, 2004, 62 (19): 1883-1888.
- [9] 姜成英. 微生物催化脱除柴油中含硫化合物的研究 [D]. 北京: 中国科学院化工冶金研究所, 2001.
- [10] 马翠卿, 许平. 分光光度法在微生物脱有机硫二苯并噻吩中的应用 [J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18 (2): 70-73.
- [11] Ohshiro T, Suzuki K, Izumi Y. Regulation of dibenzothiophene-degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1 [J]. Ferment Bioeng, 1996, 81 (5): 121-124.
- [12] Sung-keun Rhee, Je Hwan Chang. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a Newly Isolated Gordonia Strain CYKS1 [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (6): 2327-2331.