

## 研究报告

# 一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)石油脱有机氮分析

李力<sup>2</sup>, 许平<sup>1</sup>, 史权<sup>3</sup>

1 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 山东大学环境科学与工程学院, 济南 250100

3 中国石油大学(北京)重质油国家重点实验室, 北京 102200

**摘要:** 为了探讨咔唑降解菌在石油中的脱氮性能, 从研究咔唑降解菌 *Pseudomonas* sp. XLDN4-9 在双液相系统中降解咔唑的性能出发, 分别考察了 XLDN4-9 休止细胞体系对原油、润滑油及柴油的脱氮效果, 并借助于 GC-MS 分析了柴油中咔唑及其衍生物的降解状况。结果表明, 正十四烷-水系统有利于咔唑的降解; 以低氮柴油代替正十四烷, 2 g/L 咔唑可在 15 h 内降解 95.2%; XLDN4-9 休止细胞体系对原油、润滑油、柴油均有显著脱氮效果。在柴油脱氮过程中, 发现 3 天后, 99% 的咔唑被降解, 四种单甲基咔唑的降解率为 63.4%~87.6%, 二甲基咔唑共降解了 15%。

**关键词:** 咔唑, 生物降解, 石油, 生物脱氮

## Denitrogenation of Petroleum by a *Pseudomonas* sp.

Li Li<sup>2</sup>, Ping Xu<sup>1</sup>, and Quan Shi<sup>3</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 School of Environmental Science and Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China

3 State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, University of Petroleum, Beijing 102200, China

**Abstract:** Bionitrogenation of petroleum oil was investigated by a previously isolated carbazole-degrader *Pseudomonas* sp. XLDN4-9. In a tetradecane-aqueous phase system, biodegradation of carbazole was enhanced by the presence of n-tetradecane. And strain XLDN4-9 was capable of absorbing 95.2% of 2 g/L carbazole dissolved in diesel within 15 hours. Significant denitrogenation of crude oil, diesel and lubricating oil was detected by strain XLDN4-9. Removal of carbazole, methylcarbazole, and dimethylcarbazole in diesel was confirmed by using GC-MS. After 3 days, 99% of carbazole and 15% of dimethyl carbazole was degraded. And the removal rate of 1-, 2-, 3-, and 4-methyl carbazole was determined to be 63.4%, 87.6%, 78.4%, and 66.5% respectively.

**Keywords:** carbazole, biodegradation, petroleum, bionitrogenation

石油中含氮量通常为 0.02%~0.8%, 我国原油的含氮量偏高, 最高可达 2%<sup>[1]</sup>。石油中含氮化合物分为碱性氮化物和非碱性氮化物, 碱性氮化物主要有吡啶、喹啉及其同系物等, 非碱性氮化物主要有吡

咯、吲哚、咔唑及其同系物等, 在原油中非碱性化合物约占含氮化合物总量的 70%~75%<sup>[2]</sup>。石油中的含氮化合物在油品加工过程中可引起贵重的催化剂中毒, 在油品储藏时则降低油品的抗氧化稳定性。

**Received:** March 14, 2008; **Accepted:** April 7, 2008

**Supported by:** the grant from National Natural Science Foundation of China (No. 20377026, 20590368), and 863 Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2004AA649160).

**Corresponding author:** Ping Xu. Tel: +86-531-88564003; Fax: +86-531-88567250; E-mail: pingxu@sdu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20377026, 20590368), 国家高技术研究发展计划 (863) (No. 2004AA649160)资助。

石油燃烧后含氮化合物以  $\text{NO}_x$  的形式排入大气,是酸雨的成因之一。含氮化合物释放到环境中对人体危害较大,毒理学实验表明呋唑对鼠生殖细胞具致突变性<sup>[3]</sup>。

石油脱氮技术是石油化工行业的一个活跃的研究方向,石油微生物脱氮技术是一项有潜力的技术。国际上对微生物的脱氮研究集中于石油中非碱性含氮化合物的降解,呋唑成为研究的模式化合物,主要原因一是由于呋唑及其衍生物在石油氮化物中所占比例较高,二是由于石油中的碱性含氮化合物较非碱性含氮化合物更易通过有机溶剂提取等方法去除。虽然与其他含氮有机化合物相比,呋唑较难被微生物降解<sup>[2]</sup>,国际上有多组研究小组从土壤、水样、活性污泥中筛选获得呋唑降解菌<sup>[4-6]</sup>。其中对 *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 开展的研究最为深入,其呋唑代谢途径<sup>[7]</sup>、呋唑降解质粒与呋唑降解基因簇 *carAaBCAcAd*<sup>[8,9]</sup>、呋唑降解关键酶的晶体结构<sup>[10-12]</sup>被相继报道。

国际上针对模式化合物呋唑的生物降解的研究趋于深入,但关于石油生物脱氮的进展则报道较少。Fedorak 等曾以混合菌群处理原油<sup>[13]</sup>。Riddle 等构建了耐有机溶剂的重组菌株 MB1332,在含 10%(V/V)二甲苯的双液相系统及柴油-水双液相系统中降解高浓度(0.8%)的呋唑<sup>[14]</sup>。Kilbane II 等曾分别利用喹啉降解菌 *Pseudomonas ayucida* IGTN9m 与呋唑降解菌 *Sphingomonas* sp 处理页岩油,研究其中喹啉、呋唑的降解状况<sup>[15,16]</sup>。

假单胞菌菌株 XLDN4-9(*Pseudomonas* sp. XLDN4-9)为课题组从土壤中分离的一株呋唑降解菌,其呋唑降解基因簇 *carAaBCAcAd* 与 *P. resinovorans* strain CA10 具 99% 的同源性<sup>[17]</sup>。本文旨在探讨呋唑降解菌在石油中的脱氮性能,从研究 XLDN4-9 在双液相系统中降解呋唑的性能出发,分别考察了 XLDN4-9 休止细胞体系对原油、润滑油及柴油的脱氮效果,并借助于 GC-MS 分析了柴油中呋唑及其衍生物的降解状况。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与培养条件

菌株 XLDN4-9(16S rRNA 基因序列 GenBank

Accession No. AY278245)以添加葡萄糖的呋唑无机盐培养基在 30°C, 120 r/min 往复振荡培养。1 L 无机盐培养基中含 12 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、11 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.0 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、2.0 g  $\text{KCl}$ 、0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 微量金属盐溶液 1 mL, pH 7.0。1 L 无机盐培养基中添加葡萄糖 10 g, 呋唑 500 mg, 含微量金属盐  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.038 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{ZnCl}_2$  0.014 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.0124 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.04 g,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0034 g。

### 1.2 休止细胞制备

将菌株 XLDN4-9 培养至指数中后期,4°C 离心培养液(5000 r/min, 15 min),收集菌体细胞以 0.15 mol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 7.0)冲洗 2 遍,重悬于缓冲液,调节细胞浓度备用。

### 1.3 双液相系统反应

反应在 250 mL 磨口瓶进行。以休止细胞磷酸盐悬浮液作水相,油相与水相体积之比为 1:1,总体积固定为 20 mL,反应系统置于往复式摇床,30°C,转速为 120 r/min。

呋唑浓度根据水相体积计算,正十四烷-水系统中加入呋唑使之达到 5.0 g/L,休止细胞浓度约合 4.75 g 干菌体/L;水-柴油系统呋唑浓度为 2.0 g/L(用作溶剂的柴油本身总氮含量 1.71 mg/L),休止细胞浓度约合 4.95 g 干菌体/L。

反应中设置 3 个平行,并设两种对照,即(1)其他反应条件相同,但不加菌体(2)其他反应条件相同,但以 20 mL 磷酸盐缓冲液代替油水两相。在每个取样点反应结束后向瓶中加入一定体积的乙酸乙酯,溶解并稀释反应体系中残留的呋唑,充分振荡后使静置分层,取有机相待分析。

### 1.4 油品脱氮实验

实验中所用原油、润滑油、柴油样品由克拉玛依石化公司提供。

油品脱氮实验采用双液相反应系统,在 500 mL 磨口瓶中进行。反应条件同 1.3。原油、润滑油脱氮实验,称取油样 3 g,加正十四烷 6 mL,与休止细胞悬浮液等体积混匀;柴油脱氮实验,取柴油 5 mL 以正十四烷稀释 1 倍,与休止细胞悬浮液 10 mL 混匀。处理时间为 6 d,设至少 2 个平行,并设不接菌体对照。实验结束后将整个反应瓶中的液体离心,12000 r/min 离心 30 min,取上层油相用于样品分析。

## 1.5 检测方法

正十四烷中的咔唑定量分析使用气相色谱仪(安捷伦 1790, HP-5 毛细管柱)。分析条件: FID 检测器, 进样器、检测器温度 280°C、柱温 170°C。

柴油中加入的咔唑与原油、润滑油、柴油中的氮含量分析, 均采用微库仑法分析总氮(WK-2D 微库仑分析仪, 江苏电分析仪器厂产)。分析条件: 偏压 120 mV, 放大倍数 140 倍, 积分电阻 0.4 K。

柴油脱氮实验中咔唑与烷基咔唑定量分析, 采用气相色谱质谱联用仪(Finnigan Model SSQ-710 GC-MS), 配置 HP-5MS 毛细管柱, 采用 Xcallibur 数据分析系统<sup>[18]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 正十四烷对咔唑降解的影响

在柴油中直链烷烃 C14-C16 可占到 40% 以上<sup>[19]</sup>, 为了认识石油中烷烃类有机溶剂对咔唑降解性能的影响, 设计了相比为 1:1 的正十四烷-水双液相系统, 比较了 5 g/L 咔唑在该系统与纯水相的降解的差别(图 1)。实验结果表明, 咔唑的降解速率在双液相系统中比在纯水相中高, 正十四烷的存在有利于咔唑的降解。

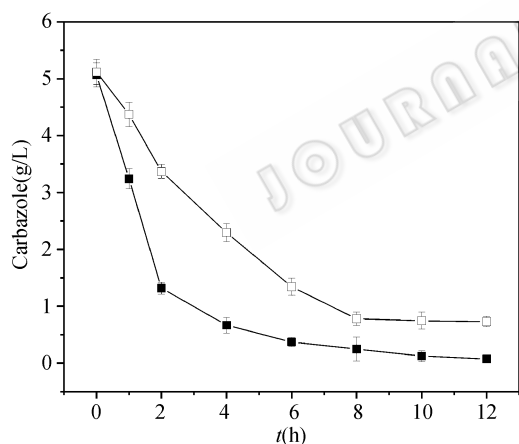


图 1 咔唑在正十四烷-水双液相系统及纯水相中的降解  
Fig. 1 Degradation of carbazole in aqueous phase (□) and in the presence of n-tetradecane (■)

In tetradecane-aqueous phase, 10 mL tetradecane was mixed with equal volume of resting cell suspension in a 250 mL screw-cap Erlenmeyer flasks, shaking at 30°C, 120 r/min. Cell density corresponding to 4.75 g dry cell /L was used. Data is the mean and standard deviation of independent triplicates

### 2.2 以柴油作溶剂咔唑的降解

石油是多种有机溶剂的复杂混合物, 以低氮柴油直接作为有机溶剂更能反映出石油中的复杂成分

对咔唑降解的影响。在柴油-水双液相系统中, 经过 15 h 的处理, 溶于低氮柴油(总氮 1.71 mg/L)中的 2.0 g/L 的咔唑可被菌株 XLDN4-9 休止细胞体系降解 95.2%(图 2), 根据降解曲线计算<sup>[16]</sup>咔唑的比降解速率为 0.481 mg/min/g dry cell。

### 2.3 石油脱氮

在双液相系统反应的基础上, 将 XLDN4-9 的休止细胞体系分别用于处理原油、润滑油、柴油, 在 6 天的处理过程中, 图 3 记录了原油的总氮变化。经过 6 d 处理, 三种油品总氮均明显下降, 以原油脱氮效果最显著, 见表 1。

为了确定油品中被脱除的总氮来源, 借助于 GC-MS 考察了柴油中咔唑及其衍生物的降解状况。结果表明, 在处理 3 d 后, 柴油中的咔唑(100 μg/g 油)可被降解 99% 以上, 四种甲基咔唑被不同程度地显著降解(见表 2)。GC-MS 可分辨出 13 种二甲基咔唑(总量 880 μg/g 油), 降解程度不一, 总降解率为 15%。三甲基咔唑的量变化不显著, 总降解率小于 5%, 在测定误差范围内, 因此其可生物降解性尚有待验证。

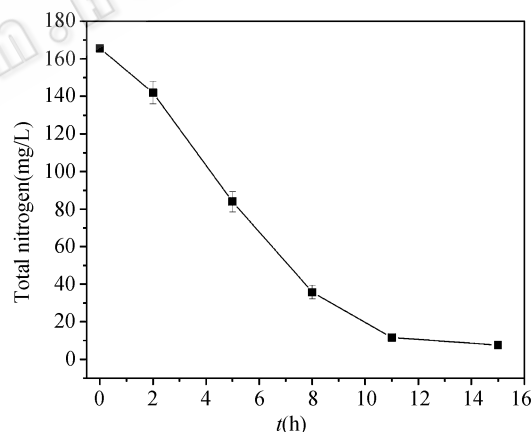


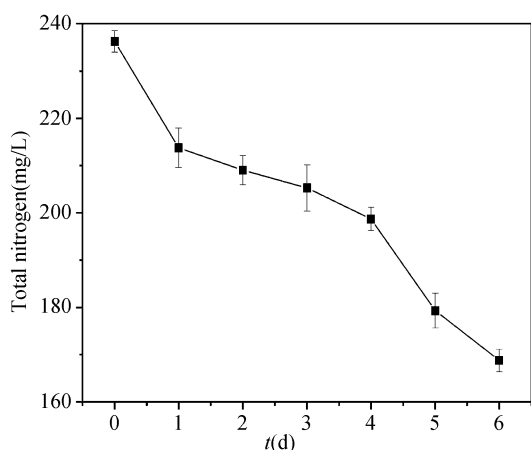
图 2 *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 对溶于柴油中的咔唑的降解

Fig. 2 Degradation of 2 g/L carbazole dissolved in diesel by resting cells of *Pseudomonas sp.* XLDN4-9

Ten-milliliter diesel with total nitrogen 1.71 mg/L was mixed with equal volume of resting cell suspension in a 250 mL screw-cap Erlenmeyer flasks, shaking at 30°C, 120 r/min. Cell density corresponding to 4.95 g dry cell /L was used. Data is the mean and standard deviation of independent triplicates

## 3 讨论

在双液相生物处理系统中, 有机相可作为非极性化合物的良好溶剂, 形成疏水化合物的贮藏库, 化合物在水相中的浓度取决于其在非水相-水相的

图3 *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 对原油的脱氮曲线Fig. 3 Denitrogenation in crude oil by *Pseudomonas sp.* XLDN4-9

Five-gram oil diluted with 5 mL tetradecane was mixed with equal volume of resting-cell suspension in a 500 mL screw-cap Erlenmeyer flask, shaking at 30°C, 120 r/min. Cell density corresponding to 3.4 g dry cell /L was used. Data is the mean and standard deviation of independent triplicates

表1 *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 对三种油品处理 6 d 的脱氮效果Table 1 Denitrogenation in petroleum oil by *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 within 6d-treatment

Petroleum types	Total nitrogen of controls (mg/L)	Nitrogen removal (%)	Cell density (g dry cell /L)
Crude oil	236.3±2.6	28.6	3.4
Lubricating oil	693.4±5.4	17.0	7.0
Diesel	570.0±4.0	12.5	4.6

表2 *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 处理 3d 柴油中甲基咪唑的降解状况Table 2 Removal of methylcarbazoles in diesel by *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 within 3d treatment

	Controls (µg/g diesel)	Removal (%)
1-Methyl carbazole	149.3 ± 2.3	63.4
3-Methyl carbazole	73.9 ± 1.5	78.4
2-Methyl carbazole	81.4 ± 2.0	87.6
4-Methyl carbazole	106.0 ± 3.0	66.5

分配以及由降解微生物参与的平衡的结果<sup>[21]</sup>。基于这个原理,由正十四烷-水构成的双液相系统可以促进咪唑的生物降解过程。进一步的研究表明这种促进作用与有机溶剂的辛醇-水分配系数(log $K_{ow}$ )有关<sup>[20]</sup>。

Riddle 等认为溶剂成分对脱氮酶系有毒害作用。为了解除石油中的溶剂毒害作用,他们将咪唑降解基因簇 *carAaBCAcAd* 导入耐有机溶剂的宿主中,构建了耐有机溶剂的咪唑降解重组菌株 MB1332,

使之分别在含 10%(V/V)二甲苯的双液相系统及柴油-水双液相系统中降解高浓度(0.8%)的咪唑<sup>[14]</sup>。在本研究中 XLDN4-9 对溶于柴油中的咪唑的有效降解证明了咪唑降解菌能够克服柴油中溶剂的毒性降解咪唑。值得注意的是,与在正十四烷-水系统中降解性能不同,在柴油存在时咪唑的比降解速率为 0.481 mg/min/g 干菌体,比在纯水相中 1.74 mg/min/g 干菌体明显降低,表明虽然油品中的复杂成分并未完全抑制咪唑降解酶系的活性,但对酶的活性有干扰作用,这一点在石油油品脱氮实验结果中再次得到验证。

国际上虽然针对某类含氮化合物的降解研究较多,尤其是对模式化合物咪唑的生物降解研究日趋深入,但关于石油生物脱氮的结果却很少有报道,原油<sup>[13]</sup>和页岩油<sup>[15,16]</sup>是被报道过的脱氮对象。由于氮化物在石油各馏份中分布不均匀,原油及页岩油中非碱性含氮化合物相对含量较高,比较适用于咪唑降解菌脱氮,在本研究中原油脱氮实验测得了最高的脱氮率。Kilbane II 等曾用咪唑降解菌 *Pseudomonas ayucida* IGTN9m 的休止细胞体系处理页岩油,能够降解 68% 的咪唑,但仅得到 5% 的总氮脱除率<sup>[15]</sup>,分析可能跟油品的氮化物的种类分布有关。Kilbane II 等又利用咪唑降解菌 *Sphingomonas sp.* 对页岩油脱氮,去除了其中 95% 的咪唑,50% 的 C1 咪唑,发现对含更多烷基取代基的咪唑无效<sup>[16]</sup>,但该文对总氮脱除率未作报道。本研究通过 GC-MS 分析,发现咪唑降解菌不仅可以降解油品中的咪唑、甲基咪唑,并且对二甲基咪唑也有降解能力;XLDN4-9 对咪唑、甲基咪唑也表现出更强的降解力。Fedorak 等曾报道一组种类未知的混合菌可以降解含 5 个取代基的咪唑,表现出以下特征:咪唑环上的烷基取代基数目越少,越易被微生物降解,即 C1>C2>C3>C4>C5<sup>[13]</sup>,但目前关于纯菌,即咪唑降解酶系对烷基咪唑的降解能力仅有少量报道<sup>[16,17]</sup>。受检测手段的限制,三甲基咪唑的可降解性仍有待验证。

虽然本文用于脱氮的油品中烷基咪唑的总含量尚不清楚,但据报道烷基咪唑的含量在油品含氮化合物中通常占决定优势<sup>[22]</sup>,咪唑降解菌对烷基咪唑的降解性能应是未来生物脱氮领域的拓展方向;另外针对不同油品中氮化物种类分布的差异,拓宽降解菌的底物范围或者使用不同降解菌的组合是提高总氮脱除率的研究方向。

## REFERENCES

- [1] Qi J, Zhang J, Dai YY. Progress in solvent denitrogenation technology of petroleum product. *Modern Chemical Industry*, 1999, **19**(1): 9–11.  
齐江, 张瑾, 戴猷元. 石油产品溶剂脱氮研究进展. *现代化工*, 1999, **19**(1): 9–11.
- [2] Benedik MJ, Gibbs PR, Riddle RR, *et al.* Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(9): 390–395.
- [3] Jha AM, Bharti MK. Mutagenic profiles carbazole in the male germ cells of Swiss albino mice. *Mutation Res*, 2002, **500**(1-2): 97–101.
- [4] Nojiri H, Nam JW, Kosaka M, *et al.* Diverse oxygenations catalyzed by carbazole 1, 9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain CA10. *J Bacteriol*, 1999, **181**(10): 3105–3113.
- [5] Santos SC, Alviano DS, Alviano CS, *et al.* Characterization of *Gordonia* sp. strain F.5.25.8 capable of dibenzothiophene desulfurization and carbazole utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(3): 355–362.
- [6] Castorena G, Mugica V, Le Borgne S, *et al.* Carbazole biodegradation in gas oil/water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. strain IMP5GC. *J Appl Microbiol*, 2006, **100**(4): 739–745.
- [7] Nojiri H, Sekiguchi H, Maeda HK, *et al.* Genetic characterization and evolutionary implications of a car gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. *J Bacteriol*, 2001, **183**(12): 3663–3679.
- [8] Maeda K, Nojiri H, Shintani M, *et al.* Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin- degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J Mol Biol*, 2003, **326**(1): 21–33.
- [9] Miyakoshi M, Urata M, Habe H, *et al.* Differentiation of carbazole catabolic operons by replacement of the regulated promoter via transposition of an insertion sequence. *J Biol Chem*, 2006, **281**(13): 8450–8457.
- [10] Nojiri H, Ashikawa Y, Noguchi H, *et al.* Structure of the terminal oxygenase component of angular dioxygenase, carbazole 1, 9a-dioxygenase. *J Mol Biol*, 2005, **351**(2): 355–370.
- [11] Ashikawa Y, Fujimoto Z, Noguchi H, *et al.* Electron transfer complex formation between oxygenase and ferredoxin components in Rieske nonheme iron oxygenase system. *Structure*, 2006, **14** (12): 1779–1789.
- [12] Ashikawa Y, Uchimura H, Fujimoto Z, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the ferredoxin reductase component in the Rieske nonhaem iron oxygenase system carbazole 1,9a-dioxygenase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2007, **63**(6): 499–502.
- [13] Fedorak PM, Westlake DWS. Microbial degradation of alkyl carbazoles in Norman wells crude oil. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **47**(4): 858–862.
- [14] Riddle RR, Gibbs PR, Willson RC, *et al.* Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, **30**(1): 6–12.
- [15] Kilbane II JJ, Ranganathan R, Cleveland L, *et al.* Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2): 688–693.
- [16] Kilbane II JJ, Daram A, Abbasian J, *et al.* Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**(2): 242–248.
- [17] Li L, Li QG, Li FL, *et al.* Degradation of carbazole and its derivatives by a *Pseudomonas* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73**(4): 941–948.
- [18] Shi Q, Zhu L, Zhu D, *et al.* Determination and quantification of carbazoles in crude oil and rock extracts by ammonia chemical ionization GC-MS. *Geochimica*, 2004, **33**(4): 395–399.  
史权, 朱雷, 朱丹, 等. 氨化学电离色谱-质谱法分析原油及岩石抽提物中的咪唑类含氮化合物. *地球化学*, 2004, **33**(4): 395–399.
- [19] Setti L, Lanzarini G, Pifferi PG. Dibenzothiophene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. in model solutions. *Proc Biochem*, 1995, **30**(3): 721–728.
- [20] Li L, Xu P, Blankespoor HD. Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(7): 581–584.
- [21] Déziel E, Comeau Y, Villemur R. Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation*, 1999, **10**(3): 219–233.
- [22] Mao J, Pacheco CR, Traficante DD, *et al.* Analysis of neutral nitrogen compounds in diesel oil by direct injection high-performance liquid chromatography-mass spectrometry-ultraviolet spectrometry methods. *J Chromatogr A*, 1994, **684**(1): 103–111.