

石油生物脱硫菌 *Pseudomonas stutzeri* UP-1 的筛选*

孔 瑛** 赵金生 史德青 侯影飞 杨金荣

(石油大学化学化工学院 东营 257061)

摘要: 以二苯并噻吩 (DBT) 为模型化合物, 筛选到一株能有效降解 DBT 的菌株, 根据其菌落的形态特征、生理生化特征和分子生物学鉴定方法, 确定其为 *Pseudomonas stutzeri* UP-1。该菌株对 DBT 具有较强的降解能力, 降解终产物为水溶性物质。通过对降解产物的分析, 初步推断 DBT 的降解符合 Kodama 机理。

关键词: 假单胞菌, 鉴定, 生物脱硫, 二苯并噻吩

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0036-06

Isolation of Biotransformation Bacteria *Pseudomonas stutzeri* UP-1 for Petroleum

KONG Ying ZHAO Jin-Sheng SHI De-Qing HOU Ying-Fei YANG Jin-Rong

(College of Chemistry and Chemical Engineering, University of Petroleum, Dongying 257061)

Abstract: Dibenzothiophene (DBT) was used as a model compound. A bacteria strain, which can degrade dibenzothiophene efficiently, was obtained. This strain was identified as *Pseudomonas stutzeri* UP-1 according to its morphological, physiological and biochemical characters, and 16S rDNA sequence. The strain exhibits strong degradation capacity of DBT, and the end product of degradation is a kind of soluble compound. After the analysis of product of DBT degradation, it was deduced that the degradation of DBT by *Pseudomonas stutzeri* UP-1 is in accordance with the Kodama mechanism.

Key words: *Pseudomonas*, Identification, Biotransformation, Dibenzothiophene

世界各国因环保的需求而制定了越来越严格的燃料油含硫标准, 因而, 对石油高效脱硫新技术的研究受到各国科学工作者的关注。石油生物脱硫技术是近 50 年来发展起来的一种新型石油脱硫技术。它利用微生物产生的各种酶类作用于含硫底物, 使之反应生成容易与石油分离的化合物, 以达到脱硫的目的^[1]。它能够有效脱除加氢脱硫技术难以除去的噻吩类化合物, 且具有生产工艺清洁无害、投资少、生产成本低等优点。若能和现有的脱硫技术有机结合, 可以相对较低的成本生产出高质量的低硫汽油和柴油。

在以往石油生物脱硫的研究中, 大多数微生物能较为有效地脱除无机硫和非杂环硫, 而对杂环硫的脱除效果较差。近年来, 科学工作者以 DBT 为模型化合物, 筛选培育出一些能够有效降解杂环硫的菌株, 主要分为两类, 一类菌株不破坏 DBT 中的芳环, 只将 DBT 中的 C-S 键断裂, 最终使 DBT 降解生成 2-羟基联苯和亚硫酸盐, 其降解历程称为 4S 路线, 如 *Rhodococcus erythropolis* H-2^[2]、*Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1^[3]、*Mycobacterium phlei* GT1S10^[4] 等菌株; 另一类菌株将 DBT 中的一个苯环破坏, 而 C-S 键依然保

* 中国石油天然气集团公司石油科技中青年创新基金资助项目 (No. w000424)

** 联系人 Tel: 0546-8391029, E-mail: kongy@hpu.edu.cn

收稿日期: 2003-06-24, 修回日期: 2003-09-12

存,含硫的部分变为水溶性有机物,其降解历程称为 Kodama 路线,如 *Rhizobium meliloti* Orange 1^[5]。目前国内对 DBT 生物降解的研究还相对较少。

本文以 DBT 为模型化合物,筛选到一株能够降解杂环硫的菌株,对其进行了鉴定,并对其脱硫性能进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌源:采自被含硫较多的原油污染的泥土。

1.1.2 培养基:无机盐溶液:每升蒸馏水中含 Na_2HPO_4 4 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCl_2 0.001 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, pH7.0。富集培养基:无机盐溶液中加入 0.8% 的牛肉浸膏、0.5% 的酵母浸膏和 0.1% 的 DBT。筛选培养基:富集培养基中加入 2% 琼脂粉,制成固体平板。脱硫培养基:在 50 mL 富集培养基中加入 20 mg 的 DBT。

1.2 实验方法

1.2.1 脱硫微生物的富集、筛选和纯化:从每个土样取 5g 土放入 50 mL 已加入 0.1% DBT 的基本盐溶液中摇匀成悬浊液,在 28℃ 和 200 r/min 条件下摇瓶培养 4 d。然后转入 50 mL 富集培养基中在上述条件下培养 3 d,最后取 5 mL 培养物转入 50 mL 新鲜的富集培养基中,如此往复 4 次,取最后的培养物 1 mL 稀释 10^6 倍,涂布到放有筛选培养基的平板中。30℃ 生化恒温培养箱中培养 3 d,选择能把 DBT 降解为橙色或黄色的水溶性物质的菌落做进一步研究。

1.2.2 菌株生长曲线的测定:在 50 mL 桑塔斯培养基中,接种 10 瓶,接种量 1 mL,每隔一定时间取出一瓶培养物,用离心机分离出菌体,放入烘箱中干燥至恒重,以时间为横坐标,以菌体重量为纵坐标作图,得到细胞生长曲线。

1.2.3 菌种鉴定方法:将筛选到的降解菌进行传统的形态及生理生化性状鉴定,并参考文献[6]测定其 16S rDNA 基因序列,首先将待测菌种新鲜培养物用无菌水和 TE 洗涤后,用溶菌酶法破壁提取总 DNA 模板,以通用引物 PCR 扩增 16S rDNA,PCR 产物经纯化后直接用测序仪进行测序,所得序列经校对后用 BLASTN 软件在非重复的 GenBank + EMBL + PDB 基因库中进行同源性比较并将其鉴定到种。

1.2.4 脱硫实验:将菌种接种在脱硫培养基中,控制适当的反应条件,经一定的反应时间取样测定 DBT 的残余浓度。

1.2.5 脱硫产物分析^[7]:在反应后的培养基中滴加 0.2 mol/L 的 HCl 溶液,调节 pH 值到 2.0,用 0.8 倍体积的正己烷萃取剩余的 DBT 及其代谢物,在 4℃ 下 10,000 r/min 离心 15 min,取出水相及正己烷相后分别通过孔径为 0.22 μm 滤膜滤掉残留的细菌,取 1 μL 进气相色谱分析。色谱条件为:FID 检测器,柱箱温度从 150℃ 开始,升温速度为 10℃/min,在 300℃ 保留 10 min,进样器温度 250℃,检测器温度 300℃。

2 结果与讨论

2.1 脱硫菌株的形态特征

在筛选培养基平板上可看到 DBT 被降解为黄色水溶性物质,挑选黄色物质周围的菌落用平板划线的方法在筛选培养基上反复纯化,最后得到能把 DBT 降解为黄色水溶性物质的菌株,该菌的细胞呈现直或弯曲杆状,但不是螺旋状,极生鞭毛,不成链;

没有芽孢；革兰氏染色阴性，抗酸染色阴性，不产生荧光色素。

2.2 脱硫菌的菌落形态特征和生理生化特征

微生物的菌落形态特征和生理生化特征，是微生物分类的主要依据之一。筛选出的脱硫菌种在葡萄糖酵母膏琼脂培养基和桑塔斯琼脂培养基上菌落均为乳黄色，粘稠状，表面光滑；在营养琼脂培养基和牛肉浸汁琼脂培养基上菌落均为黄褐色，黏液状，表面光滑；该菌种接触酶和氧化酶测定阳性，硝酸盐还原阴性，不能使明胶液化，可水解淀粉，葡萄糖产酸实验阳性，不产生类胡萝卜素，可利用某些无机盐。

2.3 脱硫菌种的 16S rDNA 序列分析

在微生物菌种的鉴定工作中，除了使用经典的鉴定方法外，基于分子生物学的现代鉴定方法能够更加准确的确定待测菌的归属。本文对待测菌种做了 16S rDNA 寡核苷酸分析，其序列长度为 1,455 bp，在 GenBank 中的登录号为 AY364327。该菌的 16S rDNA 序列与 GenBank 中存有的其它 16S rDNA 序列的同源性比较结果如下：与之序列同源性极高的菌种包括 *Pseudomonas stutzeri* CCUG 11256、*Pseudomonas stutzeri* strain DNSP21、*Pseudomonas stutzeri* strain phen8 和 *Pseudomonas stutzeri* strain DSM 50238 等菌株。菌株与施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) CCUG 11256 的序列同源性为 100%，根据 16S rDNA 的序列分析结果，菌株属于假单胞菌进化分枝。

根据多项分类原则，综合考虑所选育菌种的细胞壁革兰氏染色、菌落形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析，该菌种和施氏假单胞菌非常相似，故该菌种定名为 *Pseudomonas stutzeri* UP-1。

2.4 脱硫菌的碳源利用实验

分别配制十二烷、十六烷、液体石蜡和萘的 2% 的无机盐溶液，以它们为培养基，考察脱硫菌对石油烃类的利用情况。结果表明，该菌株不能以上述烃类作为唯一的碳源，这说明该菌不会降解油品中的饱和直链烷烃、饱和支链烷烃以及一些芳香烃类化合物，这符合生物催化脱硫的基本条件：即脱硫不能以损失燃料的燃烧值为代价。因此，该菌具有工业应用的潜力。

2.5 脱硫效果分析

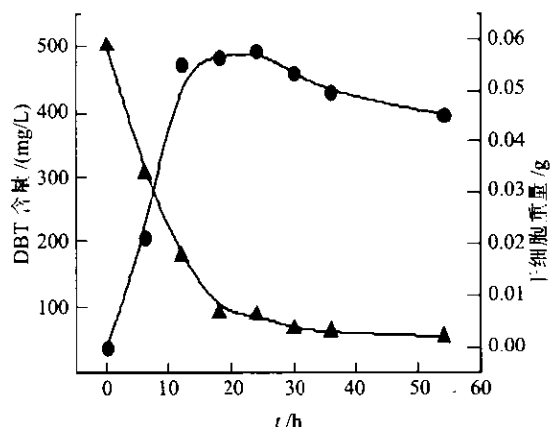


图 1 残余 DBT 量与培养时间的关系

● 细胞生长曲线，▲ DBT 含量

在各摇瓶脱硫培养基中接种，不同培养时间下萃取培养基中剩余的 DBT 并测定其含量。培养基中残余 DBT 量与培养时间的关系及菌株的生长曲线如图 1 所示。

由图中可以看到，在 18 h 内残余 DBT 的量随时间延长而快速下降，18 h 后 DBT 含量下降速度明显放慢。这与该菌株的生长状况密切相关，18 h 以内为该菌株生长曲线的指数期和部分稳定期，此时微生物的各种代谢旺盛，对 DBT 的降解速度较快。35 h 后，DBT 浓度从开始时的 500 mg/L 下降到 100 mg/L 以下，

此时已到微生物生长曲线的衰亡期。这时由于细胞内与代谢 DBT 有关酶类的合成代谢大大降低, DBT 的分解产物也抑制各种相关酶的活性 (这一点可由重复静息细胞实验得出), 从而使 DBT 降解速度下降。

从图中还可以看到, 此菌株在 18 h 内对 DBT 的降解速度较快, 可达到 19.7 mg/ (g dry cell·h), 以下是已有报道的部分菌株对 DBT 的降解速度: *Rhodococcus* sp. KT462 的降解速度为 0.287 mg/ (g dry cell·h)^[8], *Mycobacterium phlei* GTIS10 的速度为 12.1 mg/ (g dry cell·h), *Rhodococcus erythropolis* IGTS8:13.3 mg/ (g dry cell·h)^[4], *Rhodococcus erythropolis* sp. I2208 为 3.9 mg/ (g dry cell·h)^[9]。

2.6 各因素对 DBT 降解效果的影响

2.6.1 温度的影响: 将菌种接种在脱硫培养基中, 在不同温度下培养, 测定不同时间下菌株对 DBT 的降解率, 结果如图 2 所示。从图中可以看到, 微生物对 DBT 的降解效果受温度的影响较大, 较低温度下对 DBT 的降解效率也较低, 50 h 后对 DBT 的降解率只达到 50% 左右。在菌株生长的最适温度下 (31℃), 反应 18h 后 DBT 的降解率已达到 80%, 此后的降解率趋向某一稳定值。在更高的反应温度下, 菌株对 DBT 的初始降解速度较快, 其速度与 31℃ 下基本相当, 但 10 h 后其降解速度已明显低于 31℃ 下, 且最终降解率也较 31℃ 下为低。以上结果说明, 在菌株生长的最适温度下, 其代谢产生的与 DBT 降解相关的酶类具有较高的浓度与活性, 对 DBT 的降解速度也相对较快。反应一段时间后由于微生物的生长进入稳定期, 底物浓度降低, 产物抑制加剧, 从而使降解速度降低。在较低温度下菌株的生长较慢, 产酶速度和酶的活性均受到一定程度的影响, 反应速度较低, 但在相对较长的时间内表现出较为稳定的降解活性。高温下初始降解速度较快, 较高温度使酶失活速度也较快, 因此 10 h 后其降解 DBT 的速度已低于 31℃ 下的降解速度。

2.6.2 底物浓度的影响: 菌株对 DBT 的降解速度也受到底物浓度的影响, 图 3 是反应 48 h 后不同底物浓度与 DBT 降解率的关系。从图中可以看到, 随底物浓度的增加, DBT 的降解率有大幅度的下降, 说明底物对此反应有较强的抑制作用。

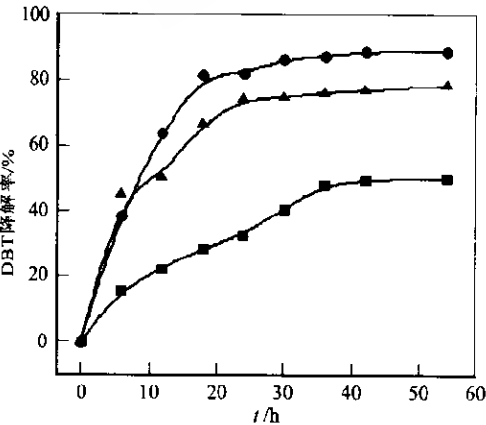


图 2 反应温度对 BDT 降解率的影响

■ 25℃, ● 31℃, ▲ 40℃

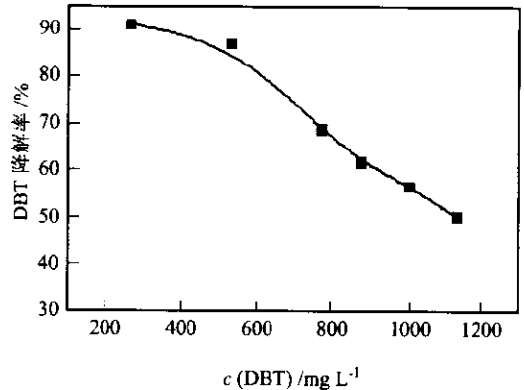


图 3 底物浓度对 DBT 降解率的影响

2.6.3 pH 值的影响: 从脱硫效果分析中可以看到, 菌株对 DBT 的降解效果与菌株的生长密切相关, 此菌株的最适 pH 范围为 7.3~7.5, 且菌株生长对 pH 的变化较为敏感,

在 pH 值小于 7.0 或大于 8.0 时菌株基本停止生长, 因此, 在其他 pH 条件下对 DBT 的降解效果也较差。

2.7 脱硫产物分析

将菌种培养 54 h 后的水相经过离心、微滤膜过滤除菌后, 用紫外-可见分光光度计在 600 nm ~ 200 nm 之间扫描, 在 386 nm 和 475 nm 处有吸收峰, 这分别和文献报道的假单胞菌以 Kodama 路线降解 DBT 的产物 3-羟基-2-甲醛基苯并噻吩以及中间产物反式-4-[2-(3-羟基)-噻吩]-2-氧代-3-丁烯酸相符^[1]。

用乙酸乙酯萃取培养基中的 DBT 及其氧化代谢产物进行 GC-MS 分析, 色谱图如图 4 所示。色谱图中除了溶剂峰和微量的杂质峰外, 主要的吸收峰有两个其保留时间分别为 18.36 min 和 20.55 min, 经质谱分析, 前者为未降解的 DBT, 后者为 DBT 的降解产物, 经计算机系统检索与人工谱图剖析, 并与纯化合物的谱图核对, 确定其为 3-羟基-2-甲醛基-苯并噻吩, 其质谱图如图 5 所示。DBT 降解过程中的其他中间代谢产物, 可能是由于含量太低而未能检测到。由此, 推测此菌株可能是按假单胞菌作用于 DBT 的 Kodama 路线进行脱硫的。

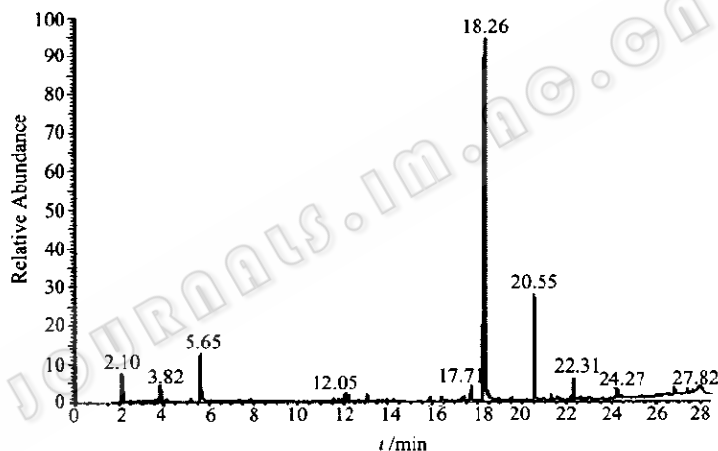


图 4 DBT 降解产物的色谱图

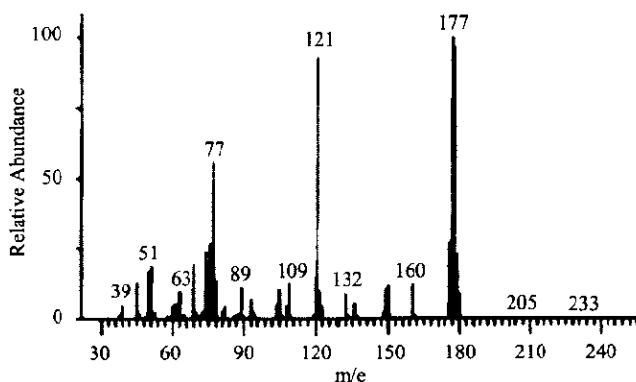


图 5 DBT 降解产物的质谱图

3 结论

通过样品的富集培养、筛选和纯化,得到一株能把模型化合物 DBT 降解为水溶性物质的菌株,该菌的形态、生理生化特征、革兰氏染色和 16S rDNA 序列比较等表明该菌为施氏假单胞菌属。研究表明,该菌能够在较短时间内将 DBT 降解为可溶于水的化合物。

致谢:中国科学院微生物研究所放线菌实验室刘志恒研究员和李 炜博士给予了许多帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Monticellg D J. Applied and Environmental Microbiology, 1985, **51** (4):756~760.
- [2] Ohshiro T, Hirata T, Izumi Y. FEMS Microbiology Letter, 1996, **142**:65~70.
- [3] Kobayashi M, Onaka T, Ishii Y, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2000, **187**:123~126.
- [4] Kayser K J, Cleveland H S, Park J H, *et al.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, **59**:737~745.
- [5] Frassinetti S, Setti L, Corti A, *et al.* Canada Journal of Microbiology, 1998, **44**:289~297.
- [6] Paabo S, Wilson A C. Nature, 1988, **334**:387~388.
- [7] Grossman M J. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**:181~189.
- [8] Tanaka Y, Matsui T, Konishi J, *et al.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, **59**:325~328.
- [9] Andaloussi S A, Lagnel C, Warzywoda M, *et al.* Enzyme and Microbial Technology, 2003, **32**: 446~454.