

石油生物脱硫菌 *Agrobacterium tumefaciens* UP-3 的固定化研究*

侯影飞 孔 瑛** 杨金荣 辛 伟 张建辉

(石油大学华东化学化工学院 东营 257061)

摘要: 对能降解二苯并噻吩 (DBT) 的根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* UP-3 菌株进行了固定化研究, 以聚乙烯醇 (PVA) 和海藻酸钠 (SA) 混合物为包埋法固定化载体, 固定化最佳操作条件为 4℃ 交联, PVA 和 SA 混合物总浓度 7%, 两者最佳浓度比为 6, 细胞浓度为 0.05 g/mL。当 DBT 加入量为 2.7 mmol/L 时, UP-3 的静息细胞最高脱硫率为 13%, 而固定化细胞的脱硫效率超过了 60%; 固定化细胞的最佳使用条件为降解 5d, 温度 28℃ ~ 32℃。

关键词: 石油生物脱硫, 二苯并噻吩, 固定化细胞, 根癌土壤杆菌 UP-3

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0052-05

Study on Immobilization of Petroleum Biodesulfurization Catalyst *Agrobacterium tumefaciens* UP-3

HOU Ying-Fei KONG Ying YANG Jin-Rong XIN Wei ZHANG Jian-Hui

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

Abstract: Immobilization of the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* UP-3 was studied in this paper. The results showed that the immobilized cells with the mixture of polyvinyl alcohol (PVA) and sodium alginate (SA) as the immobilizing carrier had good biodesulfurization characteristics; The optimum operation immobilization conditions were 4℃, the total concentration of PVA and SA being 7% (wt), and the concentration of cells being 0.05 g/mL. When DBT addition was 2.7 mmol/L, the DBT degradation of immobilized cells was above 60% while that of resting cells is 13%. The optimum degradation time and temperature of immobilized cells were 5d and 28℃ ~ 32℃, respectively.

Key words: Petroleum biodesulfurization, Dibenzothiophene, Immobilized cells, *Agrobacterium tumefaciens* UP-3

石油及其产品的大量使用给人类生存的环境带来了巨大的压力, 日益严厉的环保要求对燃料的含硫量进行了严格的限制, 而多年的持续开发使得原油的含硫量越来越高, 迫使人们开发新的清洁燃料生产技术。生物脱硫 (BDS) 是在常温常压下通过空气、水和生物催化剂的作用使硫化物选择性氧化, 进而脱除硫原子或硫化物^[1], 其具有成本低、操作条件温和、不需要氢、能有效脱除加氢脱硫技术难以脱除的杂环含硫化合物等优点。国外已分离出多种具有脱硫能力的菌种^[2-4]。国内对石油生物脱硫的研究较少, 进展缓慢, 迫切需要加强石油生物脱硫的基础技术储备。

得到高效稳定的生物脱硫催化剂是生物催化脱硫技术工业化的前提, 脱硫菌种的

* 中国石油天然气集团公司中青年创新基金资助项目 (No. 200109)

石油大学 (华东) 博士生创新基金资助项目 (No. B2004-06)

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

收稿日期: 2004-03-24, 修回日期: 2004-05-28

固定化是一种获得高效稳定的生物脱硫催化剂的有效途径之一, 有关石油脱硫菌种的固定化研究, 国内还未见报道, 国外已报道仅有 Chang J. H. [5] 和 Naito M. 等 [6] 人分别采用吸附法和交联法进行了相关研究。本文使用的 *Agrobacterium tumefaciens* UP-3 (CG-MCC No. 0973) 是笔者自己筛选的具有独立知识产权的石油生物脱硫菌。本文采用包埋法对该菌株进行了固定化研究, 探讨了生物催化剂各种固定化条件对其催化脱硫性能的影响, 考察了固定化细胞的使用条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 菌种来源于胜利油田孤岛油区被原油污染的土壤和污水中, 鉴定为根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) UP-3。

1.1.2 培养基: 所有培养基和磷酸盐缓冲液 pH 均调为 7.3 ~ 7.5。

CZ 培养基: 蔗糖 3 g, 硝酸钠 0.3 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.05 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $FeSO_4$ 0.001 g, 蒸馏水定容至 1 L。

PU 培养基: 葡萄糖 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, Na_2HPO_4 4 g, NH_4Cl 1 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 g, NaCl 0.01 g, 基本盐溶液 10 mL, 蒸馏水定容至 1 L。

NBYE 培养基: Na_2HPO_4 4 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.001 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g, 蛋白胨 8 g, 蒸馏水定容至 1 L。

1.1.3 其他主要材料: SA, PVA, $CaCl_2$, DBT, 硼酸, N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养与收集: 培养在转速为 200 r/min 摇床中进行, 温度 30℃, 培养基 50 mL, 培养 24 h 后离心分离, 冷冻离心机操作条件: 4℃, 10,000 r/min。

1.2.2 固定化方法: 将 PVA 和 SA 混合物加入 100℃ 的水中, 搅拌溶解得到 PVA 和 SA 的均匀水溶液, 冷却到室温时, 加入收集菌体, 充分混合, 用注射器在搅拌状态下滴入氯化钙和硼酸的混合沉淀液中, 控制成球直径在 3 mm ~ 5 mm, 交联固化 24 h, 而后用生理盐水洗涤 3 次备用。

1.2.3 脱硫试验: 选用 DBT 为模型化合物进行脱硫试验, 反应温度 30℃、常压于 250 mL 三角瓶中进行反应, 摇床转速为 180 r/min, DBT 起始浓度为 2.7 mmol/L。生长细胞脱硫实验在接种 UP-3 后的 50 mL 培养基中进行; 静息细胞脱硫实验使用新鲜静息细胞悬在 50 mL 磷酸盐缓冲液中进行, 细菌浓度为 0.0125 g/mL; 固定化细胞脱硫实验使用相当于细菌浓度为 0.0125 g/mL 的固定化细胞在 50 mL H_2O 中进行; 固定化细胞的使用寿命通过多批次反应测定, 每批次反应结束后, 用生理盐水多次清洗、活化固定化细胞。

1.2.4 DBT 测定: 用萃取液萃取反应液 (萃取液与反应液体积比为 4:5) 中剩余的 DBT, 使用气相色谱 (Varian 3800) 测定剩余 DBT 含量。

2 结果与讨论

2.1 脱硫菌 UP-3 的脱硫性能

在前期的研究中笔者已经确定了 UP-3 的最佳培养条件: 常压、30℃、pH 为 7.3 ~ 7.5、有氧。本文采用了不同的培养基和分散剂考察了 UP-3 在富营养状态下对模型化

合物的降解能力, 结果见表 1, 从表中数据可以看出, NBYE 培养基最为理想, 对应的高效分散剂为十二烷和 DMF, 降解了 2.52 mmol/L 和 2.39 mmol/L 的 DBT, 而 Kohtaro K. 等^[7] 人筛选的菌株 WU-S2B 生长细胞只降解 0.54 mmol/L 的 DBT。由于 UP-3 生长细胞可以部分利用十二烷为碳源和十二烷不溶于水, 再考虑到后续的模拟体系以水为主, 所以选择 DMF 为分散相。

表 1 不同培养基和分散相中 UP-3 的脱硫效果

培养基	降解率 (%)			
	十二烷	十六烷	石蜡	DMF
NBYE	93.3	52.9	42.9	88.4
CZ	65.2	57.4	26.0	77.25
PU	15.5	9.1	3.8	19.0

静息细胞是指细胞在培养基内虽基本停止生长, 细胞处于贫营养状态, 通过 UP-3 菌株静息细胞脱硫实验发现贫营养状态的 UP-3 细胞对 DBT 的降解能力十分有限, 当 DBT 浓度为 2.7 mmol/L 时, 最好效果仅为 13% 左右。

表 2 温度对固定化细胞脱硫效果的影响

固定化温度 (°C)	第一次降解率 (%)	第二次降解率 (%)
4	53.10	45.98
15	29.46	16.35
25	28.40	19.86

2.2 脱硫菌 UP-3 细胞的固定化

2.2.1 固定化细胞的制备温度选择: 表 2 是对不同温度下固定化细胞制备效果的考察, 从表中可以看出 4°C 是较为理想的固定化制备温度, 此时固定化细胞的活性最高, 降解能力最强。

原因是 4°C 时微生物的代谢活动较缓慢, 操作过程中对微生物的性能影响较小, 活性损失较少。

2.2.2 PVA 和 SA 浓度比选择: SA 水溶液是一种电荷密度很高的聚电解质, 在二价阳离子的作用下可以发生溶胶-凝胶转变, PVA 在饱和硼酸溶液中能够发生交联^[8,9]。在本研究中使用的包埋材料 PVA 在浓度超过 7wt% 时结块, 无法进行固定化操作, 因此选取了 7wt% 为包埋材料的总浓度。图 1 是 PVA 和 SA 浓度比对固定化的影响曲线, 随 PVA 和 SA 浓度比的增加, 固定化细胞降解能力先增后降, 而其使用寿命一直增加, PVA 和 SA 合适的浓度比为 6:1。

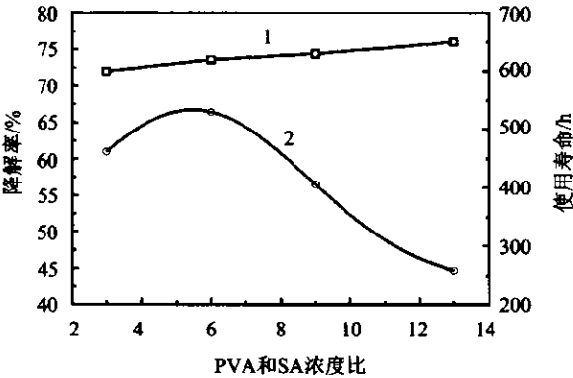


图 1 PVA 与 SA 浓度比对固定化细胞性能的影响
1 使用寿命, 2 降解率

2.2.3 沉淀剂 CaCl_2 的影响: 沉淀剂包括硼酸和 CaCl_2 , 由于硼酸在水中的溶解性能的影响, 不易测定其确切浓度, 于是采用其饱和溶液, 而 CaCl_2 易溶于水, 因此考察了 CaCl_2 对固定化小球密度和脱硫效果的影响, 结果见图 2, 当 CaCl_2 的浓度大于 1% 时, 其浓度的改变对固定化小球的密度和固定化细胞的脱硫能力影响甚微。

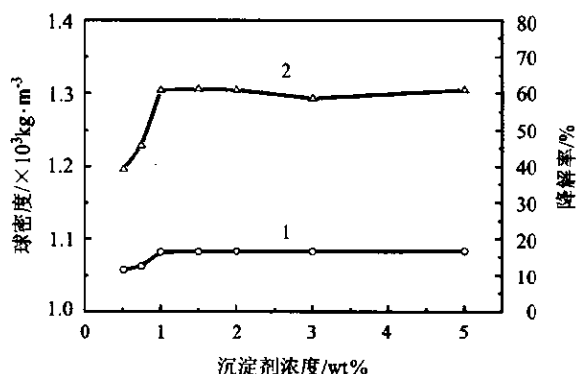


图 2 沉淀剂对固定化细胞性能的影响

1 固定化球密度, 2 降解率

2.2.4 细菌浓度的选择: 包埋细菌的浓度是影响固定化后细菌的脱硫性能的另一重要因素, 图 3 是考察结果。可以看出: 随着细菌浓度的增大 DBT 降解率升高, 细菌浓度高于 0.05 g/mL 时, 随着细菌浓度的升高, 降解率的基本保持稳定。

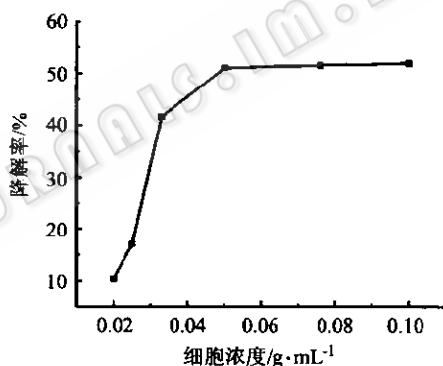


图 3 UP-3 细胞浓度对 DBT 降解的影响

2.3 固定化细胞的使用条件考察

细菌 UP-3 固定化以后, 与生长细胞相比其脱硫活性明显降低, 脱硫速率缓慢, 图 4 是固定化 UP-3 对 DBT 降解率与降解时间的关系曲线, 由图可以看出, 固定化 UP-3 的最佳降解时间为 5 d, 笔者便把 5 d 作为每批次的反应时间, 进行后续考察。

使用温度是固定化细胞性能的重要影响因素, 图 5 是 UP-3 固定化细胞的使用温度与降解效果变化曲线, 曲线表明: 随着温度的增加 UP-3 固定化细胞对 DBT 的降解率先增后降; 温度在 28℃ ~ 32℃ 之间时, 固定化细胞的脱硫性能最好; 3 次使用 UP-3 固定化细胞的脱硫性能比较稳定, 使用寿命实验表明固定化细胞一般在第 7 次使用的时候, 效果显著下降。其原因是细胞的最佳生长温度为 30℃, 在此温度附近细胞的新陈代谢能力强, 各种酶的活性高; 另外经过固定化之后, 大大减小了产物的反馈抑制作用, 包埋载体对固定化细胞又起了一个保护作用, 从而保证了在 28℃ ~ 32℃ 之间, 固定化

细胞具有稳定高效的脱硫能力。

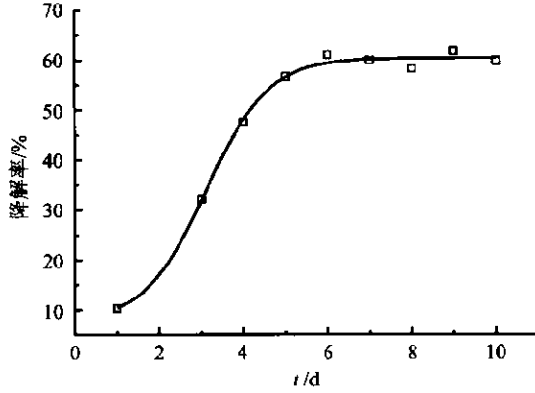


图 4 DBT 降解率与降解时间关系曲线

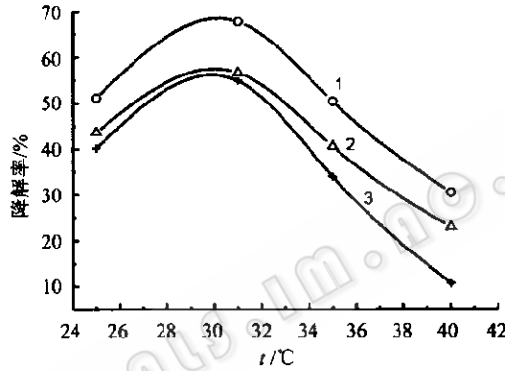


图 5 DBT 降解率随温度的变化曲线

3 结论

选取 PVA 和 SA 混合物为包埋法固定化载体, 对脱硫菌 UP-3 细胞的固定化条件进行了优化, 在 4℃ 交联、PVA 和 SA 混合物总浓度 7wt%、两者浓度比为 6:1、细胞浓度为 0.05 g/mL 条件下, 制备的固定化 UP-3 细胞具有最佳的脱硫性能; 当 DBT 浓度为 2.7 mmol/L 时, 降解率超过 60%, 远远超过 UP-3 的静息细胞对 DBT 的降解率 13%; 固定化 UP-3 细胞对 DBT 的最佳降解时间为 5 d, 最佳使用温度 28℃ ~ 32℃。

参考文献

- [1] 陈惠敏. 炼油设计, 2001, 31 (9): 1~5.
- [2] 黄彦君, 浦跃武, 叶代启, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (2): 89~92.
- [3] Furuya T, Kirimura K, Kino K, *et al.* FEMS Microbiology Letter, 2001, 204 (1): 129~133.
- [4] Onaka T, Konishi J, Ishii Y, *et al.* Journal Bioscience and Bioengineering, 2001, 92 (2): 193~196.
- [5] Chang J H, Chang Y K, Ryu H W, *et al.* FEMS Microbiol Letter, 2000, 182 (2): 309~312.
- [6] Naito M, Kawamoto T, Fujino K, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55 (3): 374~378.
- [7] Kirimura K, Furuya T, Nishii Y, *et al.* Journal Bioscience and Bioengineering, 2001, 91 (3): 262~267.
- [8] 翟晓萌, 李道棠. 环境科学, 2000, 21 (6): 80~84.
- [9] 王建龙, 施汉昌. 工业微生物, 1998, 28 (2): 35~39.