

研究报告

一株 C_X-DBT 脱硫菌的筛选及发酵条件优化

詹晓¹ 冯守帅¹ 张玲¹ 黄兴² 唐嘉鼎² 吴泉钱² 杨海麟^{1*}

(1. 教育部工业微生物技术重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 无锡市城市环境卫生有限公司 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】从大型工业油田石油污染土样中分离鉴定一株能专一性脱除 C_X-DBT 的脱硫菌株, 分析其对 C_X-DBT 的脱硫途径, 并确定菌体最优发酵条件。【方法】以二苯并噻吩(DBT)为唯一硫源底物, 多次富集并分离可代谢 C_X-DBT 菌株, 通过形态学、生理生化实验及 16S rRNA 基因序列分析对筛选菌株 JDZX13 进行鉴定。采用 GC-MS 鉴定菌株对 C_X-DBT 的代谢产物, 确定其相应的脱硫途径。通过单因素发酵实验确定最佳碳源、氮源、微量元素、MgCl₂、温度及 pH 的水平范围, 并采用正交实验进一步优化。【结果】该菌株鉴定为戈登氏菌属, 命名为戈登氏菌 JDZX13 (KP993297), 其 C_X-DBT 代谢途径为“4S 途径”。最佳发酵条件为: 蔗糖 15.0 g/L、NH₄Cl 2.0 g/L、MgCl₂ 0.1 g/L、微量元素 1.0 mL/L、pH 7.0、温度 35 °C。【结论】获得一株通过“4S 途径”代谢 C_X-DBT 的脱硫菌株 JDZX13, 经过进一步优化实验, 强化了菌株的生长和脱硫能力, 该研究结果对石油生物脱硫技术的开发具有重要参考意义。

关键词: 戈登氏菌 JDZX13, 二苯并噻吩, 生物脱硫, 正交实验

Isolation of a C_X-DBT desulfurizing strain and optimization of its fermentation conditions

ZHAN Xiao¹ FENG Shou-Shuai¹ ZHANG Ling¹ HUANG Xing² TANG Jia-Ding²
WU Quan-Qian² YANG Hai-Lin^{1*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Wuxi City Environmental Sanitation Co. Ltd., Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study is to isolate and identify a novel bacterial strain capable of selectively desulfurizing C_X-DBT, and then to determine its desulfurizing pathway and optimize the culture condition. [Methods] C_X-DBT was used as the sole sulfur resource to enrich the bacterial cultures, and then GC-MS was used to determine C_X-DBT desulfurizing pathway by analyzing the metabolic productions. The new culture, strain JDZX13, was identified based on the

Foundation item: Scientific Program of Jiangnan University (No. JUSRP11538, JUSRP51402A); The Program of the Innovation Plan of Jiangsu Province (No. SJZZ_0153)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918119; E-mail: biocatalysis123@163.com

Received: June 02, 2015; Accepted: July 15, 2015; Published online (www.cnki.net): February 03, 2016

基金项目: 江南大学自主科研计划科研基金项目(No. JUSRP11538, JUSRP51402A); 江苏省 2014 年度普通高校毕业生科研创新计划项目(No. SJZZ_0153)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918119; E-mail: biocatalysis123@163.com

收稿日期: 2015-06-02; 接受日期: 2015-07-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-03

morphological, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequence profiles. Single factor test and orthogonal design method were performed to determine the optimal biodesulfurization conditions. **[Results]** The new strain JDZX13 belonged to *Gordonia* sp. and named as *Gordonia* sp. JDZX13 (KP993297), which could selectively desulfurize C_X -DBT by "4S pathway". The optimum operating conditions were found as 15 g/L of sucrose, 2 g/L of NH_4Cl , 0.1 g/L of $MgCl_2$, 1 mL of metal solution, at pH 7.0 and 35 °C. **[Conclusion]** A bacterial strain JDZX13 was successfully isolated and identified with the utilization of C_X -DBT by "4S pathway". After a serial optimizations, the cell growth and desulfurizing capability were further enhanced. This result would be an important reference for further exploring the petroleum biodesulfurization technology.

Keywords: *Gordonia* sp. JDZX13, Dibenzothiophene, Biodesulfurization, Orthography design

石油大量燃烧提供能量促进经济发展,但同时也释放了大量的硫氧化物。这类物质是 PM 2.5 的重要组成部分,被人体吸收后会引发一系列呼吸道疾病,所形成的酸雨给生态环境造成恶劣影响^[1-2]。随着人们环保意识的加强,各国颁布了一系列法规来控制燃料油的硫含量。2006 年美国和加拿大车用柴油和汽油硫含量分别从 500 mg/L 和 350 mg/L 降到 15 mg/L 和 30 mg/L^[3]。目前,美国和欧洲的柴油最大硫含量已控制在 10 mg/L 以下^[4]。2013 年,中国车用柴油的硫含量也从 350 mg/L 降到 50 mg/L 以下^[5]。这些越来越苛刻的政策法规给石油精炼产业带来了巨大的成本压力。目前燃料油主要脱硫技术为加氢脱硫。加氢脱硫即在高温、高压、催化剂的作用下,利用氢气还原硫化物中的硫形成硫化氢而将硫脱除。该技术具有反应条件苛刻、高温高压、消耗大量氢、产生大量二氧化碳、设备要求高等缺点^[1]。此外,该技术对二苯并噻吩类(C_X -DBT)含硫化合物脱硫效率极低^[6]。深度脱硫后的燃油主要含硫化合物为 C_X -DBT。为了提供符合规定的低硫燃料,关键是研发对 C_X -DBT 具有高效脱硫能力的新技术。

生物脱硫技术利用微生物特有的酶促作用将燃料油中的硫在温和条件下高效脱除。该技术因能在常温常压下,不影响石油辛烷值的情况下,高效地脱除 C_X -DBT 顽固性硫化物的硫,而受到世界各国研究者的广泛关注^[7]。“4S 途径”即通过四步酶促反应将 C_X -DBT 的硫脱除并保持苯环结构,是目前被认为最适合石油生物脱硫的途径^[8]。最近 10 年来,

研究者围绕这一途径的脱硫菌进行了深入挖掘,分离出多株具有“4S 途径”的菌株如 *Rhodococcus* sp. SA11^[9]、*Lysinibacillus sphaericus* DMT-7^[10]、*Microbacterium* sp. NISOC-06^[11]等。但该技术要应用到实际生产中仍然有很多瓶颈问题,其中最大的挑战是要取代传统脱硫工艺,菌体脱硫效率需要维持在 1.2–3.0 mmol/(g·h),而目前即使通过基因改造的工程菌株最大脱硫效率也只有 0.28 mmol/(g·h),难以满足工业需求^[3,12]。为此开发新的高效脱硫菌株,对促进生物脱硫工业化应用具有重要意义。本研究从新疆克拉玛依油田采样,筛选了一株具有“4S 途径”的菌株,并利用单因素实验和正交实验优化培养条件,强化菌体生长和脱硫能力,为进一步促进该菌株在石油脱硫中的应用提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

二苯并噻吩(DBT)、4,6-二甲基二苯并噻吩(4,6-DMDBT)和二羟基联苯(2-HBP),购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。GC-2010 气相色谱仪,购于岛津企业管理(中国)有限公司。

1.2 菌株和培养基

菌株为本实验室从新疆克拉玛依油田被石油污染的土壤中经富集、筛选获得。

无硫无机盐基本培养基(BSM, g/L)^[13]: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.0, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.0, NH_4Cl 2.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, 微量元素 1 mL, 蒸馏水 1 L, pH 7.0–7.2。

富集培养基: BSM 培养基中加入 10 g 甘油作

为碳源, 0.3 mmol/L DBT 作为唯一硫源。

微量元素(g/L): CuCl₂·2H₂O 0.1, ZnCl₂ 0.2, CaCl₂ 20, H₃BO₃ 0.05, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2, CoCl₂·6H₂O 0.4, FeCl₃·6H₂O 4, AlCl₃·6H₂O 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.8。

以上培养基均于 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.3 C_X-DBT 脱硫菌的分离、鉴定及其脱硫途径的确定

取 1 g 污泥加入到富集培养液中, 30 °C、170 r/min 振荡培养 4 d, 按 1% 的接种量转接到新鲜富集培养基中, 连续富集 4 次。再用涂布法和划线法相结合获得单菌落。将获得的不同单菌落接种到新鲜富集培养基中培养 4 d, 用 GC-FID 分析各菌株对 DBT 的利用情况。将代谢 DBT 能力最强的菌株进一步纯化后, 分别接种到含 0.3 mmol/L DBT 或 4,6-DMDBT 为单一硫源的富集培养基中, 培养 50 h 后, 用 GC-MS 分析发酵产物, 从而确定菌株 JDZX13 对 C_X-DBT 的脱硫途径。

1.4 菌株 JDZX13 生理生化及分子生物学鉴定

1.4.1 生理生化测定: 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[14]和《常见细菌鉴定手册》^[15]进行形态和部分生理生化鉴定。

1.4.2 分子生物学鉴定: 将处于对数生长期的菌株 JDZX13 在 8 000 r/min 条件下离心 5 min 收集菌体, 用上海生工的 DNA 抽提试剂盒提取总基因组 DNA。以总 DNA 为模板, 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 为通用引物, PCR 扩增 16S rRNA 基因序列^[16]。PCR 产物送至上海生工测序。测序结果在 GenBank 中进行同源性比对, 采用 MEGA 6.0 软件构

建系统发育树。

1.5 发酵条件优化

1.5.1 单因素实验确定关键因素及水平: 采用单因素实验考察碳源(甘油、乙醇、蔗糖和葡萄糖)、氮源(酵母粉、胰蛋白、NaNO₃、尿素和 NH₄Cl)、微量元素、MgCl₂、pH、温度对菌体生长和脱硫的影响, 确定关键因素及水平。

1.5.2 正交实验设计: 利用 Design-Expert 软件, 以 L₂₇(3¹¹) 因素水平设计方案(表 1), 以菌浓为指标, 选择较优的培养条件组合。

1.6 检测及数据处理方法

1.6.1 菌体浓度的测定: 通过测定不同菌液浓度在 620 nm 波长的吸收值, 每个浓度平行 3 次, 取平均值后构建菌体溶度(干重)与 OD₆₂₀ 的线性关系图。发酵液中菌体浓度可根据其在 620 nm 波长下的光密度及其和细胞干重的线性关系获得。

1.6.2 发酵产物的提取, 定性和定量测定: 取适量发酵液用盐酸酸化 pH 2.0 以下, 加入等体积的乙酸乙酯充分萃取, 8 000 r/min 离心 5 min, 使有机相和水相分层。取上层有机相在 GC-MS 中分析代谢产物, 在 GC-FID 检测 DBT 和 2-HBP 的浓度^[17-18]。气相色谱分析中色谱柱型号为 DB-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 色谱分析条件: 检测器和进样器温度为 270 °C, 载气为氮气, 总流速为 8.3 mL/min, 分流比为 5:1, 氢气为 FID 检测燃烧气, 流速为 30 mL/min, 空气为助燃气, 流速为 400 mL/min, 柱温采用程序升温控制, 柱温初始为 200 °C, 然后以 5.0 °C/min 升至 270 °C, 保留 1 min, 分析时间为 15 min。

1.6.3 数据处理方法: DBT 脱除率(%)=(菌体处理

表 1 正交设计因素水平表
Table 1 Factors and levels for orthography design

水平 Level	A 蔗糖 Sucrose (g/L)	B NH ₄ Cl (g/L)	C MgCl ₂ (g/L)	D 微量元素 Metal solution (mL/L)	E pH	F 温度 Temperature (°C)
1	15	2	0.1	0	6.0	30
2	20	4	0.2	1	7.0	35
3	25	6	0.3	2	8.0	37

前 DBT 浓度-菌体处理后 DBT 浓度)/菌体处理前 DBT 浓度 $\times 100$; 采用 Design-Expert. V8.06.1 进行正交实验设计。

2 结果与分析

2.1 C_X -DBT 脱硫菌的分离及鉴定

从新疆克拉玛依油田采集被石油长期污染的水样和污泥中筛得一株能利用 DBT 为硫源的菌株 JDZX13。在培养 3 d 后将 0.3 mmol/L DBT 完全转化。通过对菌株 JDZX13 形态学和生理生化分析, 菌株在平板上培养 3 d 后, 菌落较小, 呈粉红色, 不透明, 边缘整齐, 有荚膜, 革兰氏染色阳性, 甲基红阳性, 氧化酶呈阴性, 过氧化氢酶阳性。其细胞形态如图 1 所示, 部分生理生化特征如表 2 所示。

通过对 1 433 bp 的 16S rRNA 基因测序, 所得序列在 NCBI 的 GenBank 中通过 BLAST 程序进行相似性序列检测分析。选取相似性较高的菌株通过 MEGA 6.0 软件中 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 并将其序列上传至 GenBank, 登录号为 KP993297。由图 2 可以看出菌株 JDZX13 与 *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 (AY864338.1) 具有非常近的亲缘关系。结合其形态和生理生化特性确定 JDZX13 菌株为戈登氏菌属, 命名为 *Gordonia* sp. JDZX13。

2.2 JDZX13 对 C_X -DBT 脱硫途径分析

以 DBT 和 4,6-DMDBT 作为 C_X -DBT 的模式物, 将菌体分别培养在含 0.3 mmol/L DBT 或 4,6-DMDBT 的富集培养基中培养 50 h, 取发酵液用乙酸乙酯萃取, 并用 GC-MS 进行代谢产物分析。在以 DBT 为底物的发酵液中有两个峰, 通过与 GC-MS 数据文库比对分析确定停留时间在 18.45 min 和 7.93 min 的分别为 DBT 和 2-HBP (图 3A)。在以 4,6-DMDBT 为底物的发酵液中也有两个显著的峰, 通过与 GC-MS 数据文库比对分析, 在 25.11 min 和 15.48 min 的分别为 4,6-DMDBT 和 4,6-二甲基羟基联苯(4,6-DMHBP, 图 3B)。Bahuguna 等^[10]用新筛的菌株 *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 处理 DBT

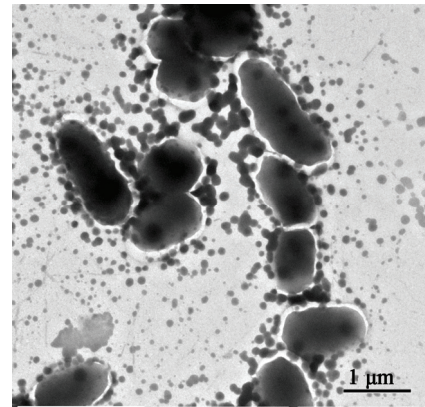


图 1 JDZX13 透射电子显微镜图

Figure 1 Transmission electron micrograph (TEM) of clustered JDZX13 cells

15 d 后, 用高压液相色谱分析其代谢产物, 最后检测到 2-HBP 的存在, 从而确定该菌株脱硫途径为“4S 途径”。Akhtar 等^[19]用高压液相色谱和 GC-MS 分析 *Rhodococcus* sp. Eu-32 代谢 DBT 的产物, 检测到发酵产物中同时含有 2-HBP 和联苯, 从而确定该菌株脱硫途径为“4S 途径”的扩增。结合 Kilbane^[3]对“4S 途径”机理的分析, 推断 JDZX13 菌株通过“4S 途径”代谢 C_X -DBT (图 3C)。

2.3 菌株单因素实验发酵优化

2.3.1 碳源对菌体生长和脱硫的影响: 碳源是细胞

表 2 JDZX13 菌株部分生理生化特征
Table 2 Partly biochemical and physiological characteristic of the strain JDZX13

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
氧化酶实验 Oxidase enzyme test	-	吲哚实验 Indole test	-
接触酶实验 Contact enzyme test	+	脲酶实验 Urease test	+
淀粉水解实验 Starch hydrolysis	-	明胶水解 Gelation hydrolysis	-
硫化氢生成 H ₂ S production	+	硝酸盐还原实验 Nitrate reduction test	-
柠檬酸盐实验 Citrate utilization test	+	甲基红实验 Methyl Red test	+
革兰氏染色实验 Gram staining test	+	芽孢染色实验 Spore staining test	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

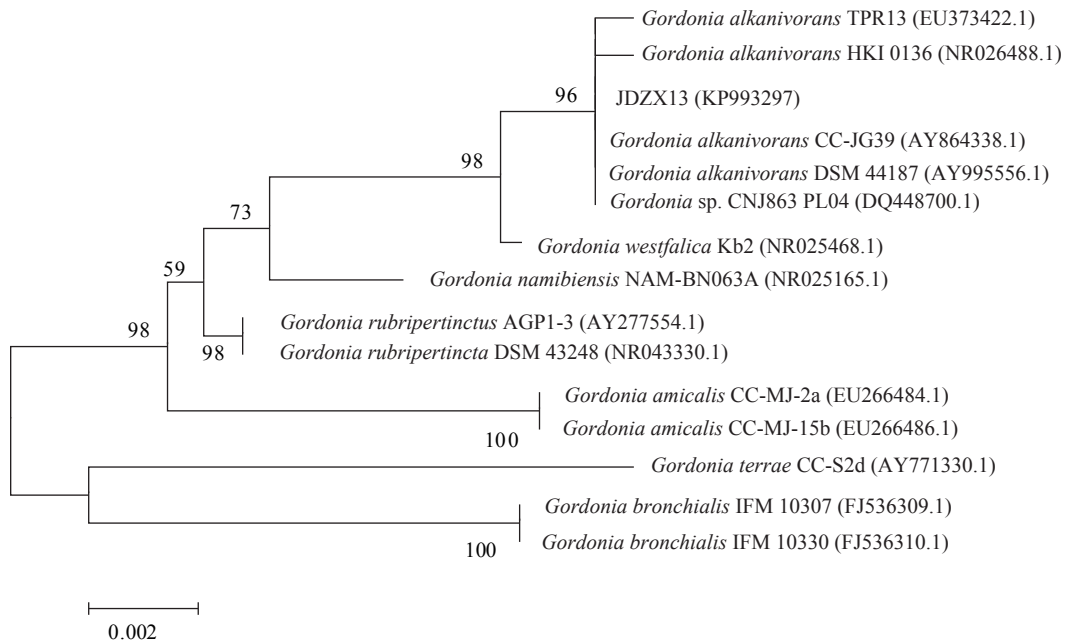


图 2 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 JDZX13 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain JDZX13 based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号中的序列号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类至同一分支概率; 标尺刻度代表 0.2% 的序列差异。

Note: Number in parenthesis represent the sequence's accession number in GenBank. The number at each branch point in the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.2% sequence divergence.

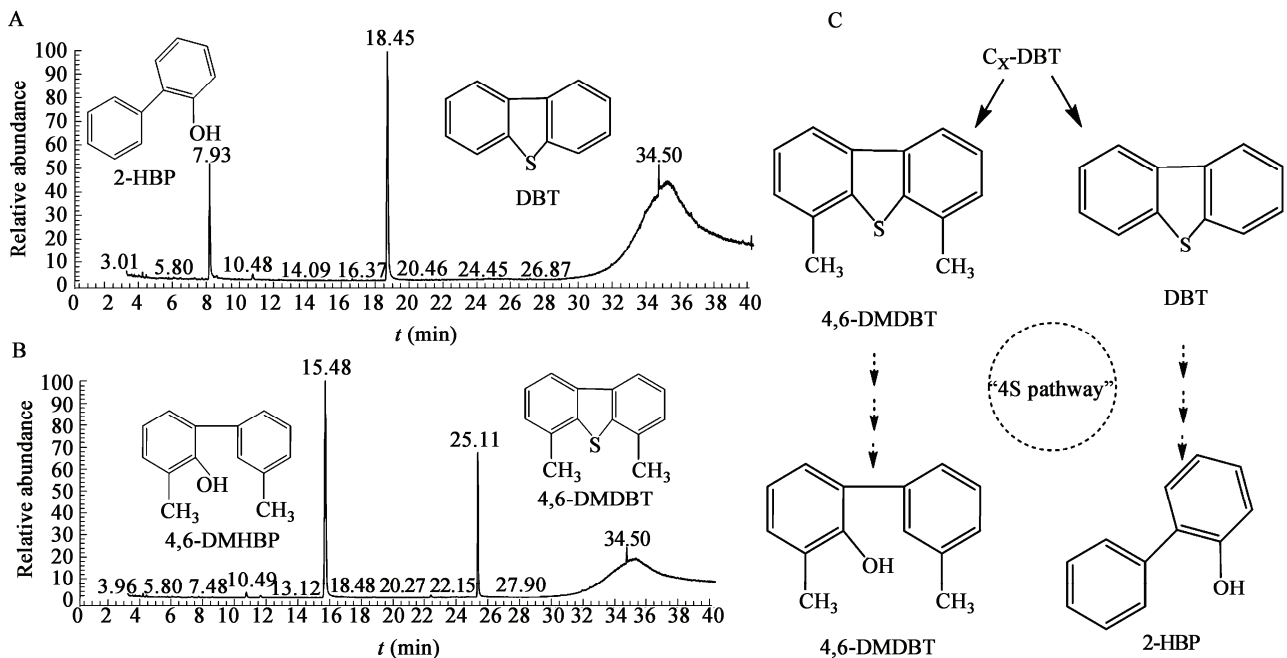


图 3 菌株 JDZX13 的 C_x-DBT 脱硫途径分析

Figure 3 Analysis of C_x-DBT desulfurizing pathway by JDZX13

的重要组成成分及能量来源,实验考察甘油、乙醇、蔗糖和葡萄糖在 10–40 g/L 的浓度范围内对菌体的生长和 DBT 脱硫情况(图 4A、B),可以看出蔗糖相对于其他碳源更有利于菌体生长和 DBT 脱硫。蔗糖浓度在 10–20 g/L 时,菌体浓度和 DBT 脱除率随蔗糖浓度的增加而提高;而在 20–40 g/L 范围内,菌体和 DBT 脱除率有明显下降。综上分析,确定蔗糖为最佳碳源,最佳浓度由正交实验进一步确定。

2.3.2 氮源对菌体生长和脱硫的影响:不同菌体都有各自的氮源偏好,培养基中最佳氮源的选取对菌体的生长和 DBT 脱硫至关重要。因此分别考察酵母粉和胰蛋白作为有机氮源;尿素、 NaNO_3 和 NH_4Cl 作为无机氮源对菌体的生长和 DBT 脱硫的影响(图 4C、D)可以看出,菌体更偏好有机氮源,但菌体在有机氮源中几乎无脱硫能力,可能原因是有机氮源中含有硫酸根离子,从而抑制菌株中脱硫基因的表达。无机氮源中,以 NH_4Cl 为唯一氮源的培养基中,DBT 的脱除率最高,其次是尿素。综上分析,为了得到高效脱硫的培养条件,选择 NH_4Cl 为最佳氮源,浓度范围为 2–6 g/L。

2.3.3 MgCl_2 和微量元素对菌体生长和脱硫的影响: Mg^{2+} 和一些微量元素是细胞中许多酶的重要组成部分,直接影响着菌体的生长和代谢。考察一定浓度范围内 MgCl_2 和微量元素对菌体生长和脱硫的影响(图 4E、F)的结果表明, MgCl_2 在 0.1–0.5 g/L 浓度范围内对菌体生长影响微弱,但 MgCl_2 浓度超过 0.4 g/L,对 DBT 脱硫有一定的抑制作用,可能原因是高浓度 Mg^{2+} 对脱硫酶的活性有一定的抑制作用。因此选择 MgCl_2 浓度范围为 0.1–0.3 g/L。微量元素混合液为 0–1 mL/L 时,随着微量元素的增加,菌体的生长和 DBT 的脱除率也在增加;但当微量元素混合液高于 2 mL/L,菌体的生长受到抑制,同时 DBT 的脱除率也在降低,因此确定微量元素浓度范围为 0–2 mL/L。

2.3.4 温度对菌体生长的影响:在不同培养温度下,菌体浓度随时间的变化情况如图 4G 所示。温

度是菌体生长的重要条件,温度直接影响细胞内脱硫酶的活性。由图 4 可知,温度在 30–37 °C 最有利于菌体生长,当温度低于 20 °C 和高于 40 °C 时,菌体生长受到抑制,当温度高于 45 °C 以上时,菌体生长完全被抑制。因此选取 30–37 °C 范围进行正交实验。

2.3.5 pH 对菌体生长的影响:培养基中的初始 pH 影响着营养物质的解离状态,制约着细胞的物质吸收利用效率。不同初始 pH 对菌体生长的影响如图 4H 所示,可以看出,初始 pH 为 7.0 左右时,菌体生长最好,当 pH 6.0 以下或 8.0 以上时,菌体生长受到抑制。在初始 pH 5.0 以下和 pH 11.0 以上时菌体几乎不生长。因此选取初始 pH 6.0–8.0 进行正交实验。

2.4 正交实验结果与分析

根据单因素实验结果,选择蔗糖(A)、 NH_4Cl (B)、 MgCl_2 (C)、微量元素(D)、pH (E)和温度(F) 6 个因素按 $L_{27}(3^{11})$ 正交实验表进行实验优化,确定最优发酵条件。实验方案及结果如表 3 所示,方差分析如表 4 所示。

根据正交实验结果进行极差分析和方差分析可知,发酵温度 $P < 0.01$,非常显著;蔗糖和 NH_4Cl 交互作用 $P < 0.05$,较显著。各因素对菌体生长影响主次顺序为:F (温度) > AB > E (pH) > C (MgCl_2) > D (微量元素) > A (蔗糖) > B (NH_4Cl)。综合各因素对菌体生长交互影响,确定最佳发酵条件为: $A_1B_1C_1D_2E_2F_2$,即蔗糖为 15 g/L, NH_4Cl 为 2 g/L, MgCl_2 为 0.1 g/L,微量元素混合液为 1 mL/L, pH 为 7.0,温度为 35 °C。为进一步验证优化结果,在最优发酵条件下,菌体培养 81 h 浓度达到 4.44 g/L,是优化前的 3.7 倍;DBT 脱除率在 48 h 达到 98%,相比于优化前的 60 h 时 97%,时间缩短 12 h,脱硫效率提高了 26.3%。与本研究相比, Papizadeh 等^[11]用新分离脱硫菌株 *Microbacterium* sp. NISOC-06 处理 1 mmol/L DBT 14 d 后, DBT 脱除率为 94.8%。Santos 等^[20]用新分离脱硫菌株 *Gordonia* sp. F.5.25.8 处理 1 mmol/L

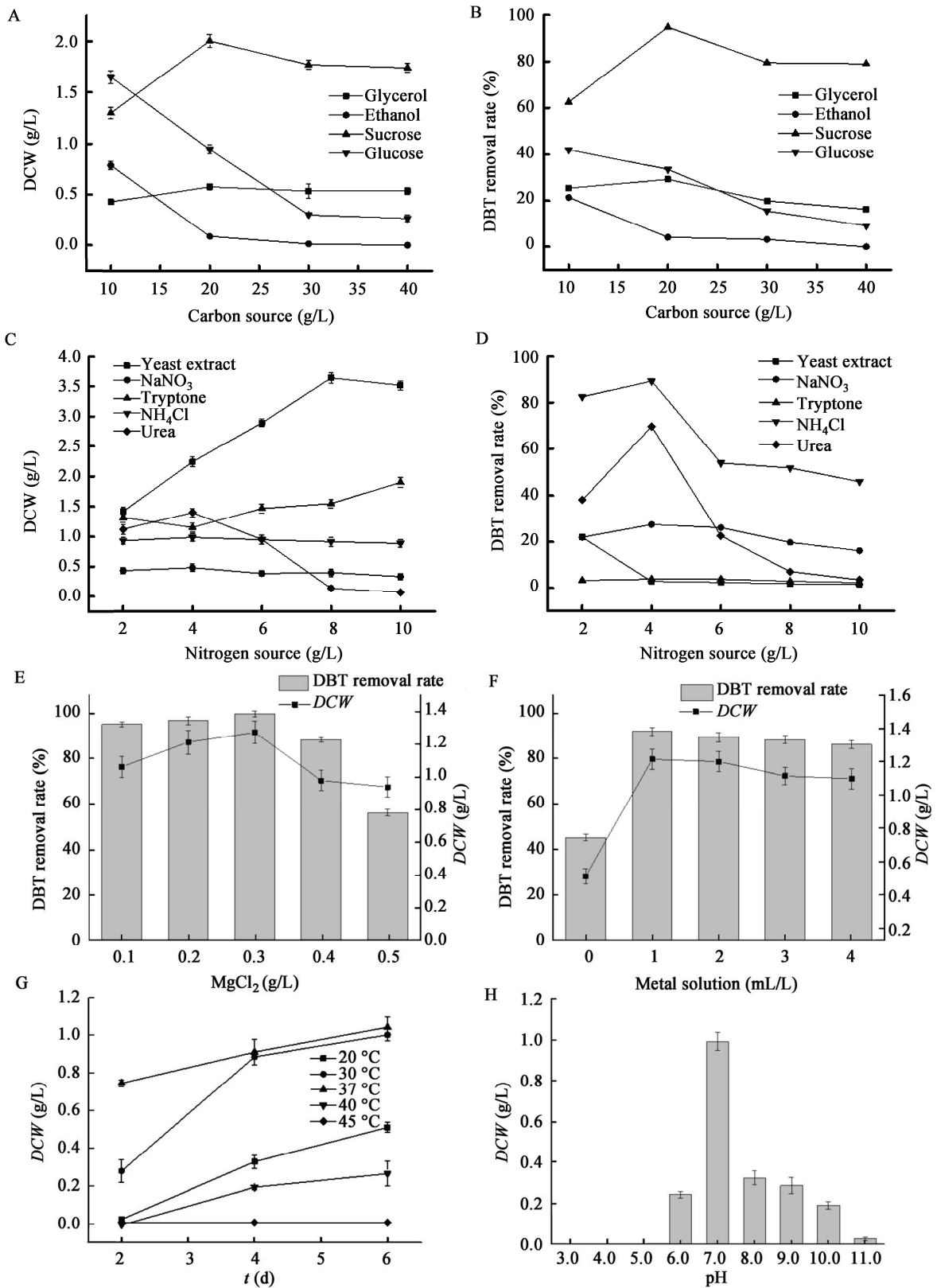


图 4 培养基单因素实验发酵结果

Figure 4 The results of single factor experiment in culture medium

注：A：培养基中不同碳源浓度对菌体生长的影响；B：培养基中不同碳源浓度对 DBT 脱除率的影响；C：培养基中不同氮源浓度对菌体生长的影响；D：培养基中不同氮源浓度对 DBT 脱除率的影响；E：培养基中不同 $MgCl_2$ 浓度对菌体生长和 DBT 脱除率的影响；F：培养基中不同微量元素浓度对菌体生长和 DBT 脱除率的影响；G：不同培养温度对菌体生长的影响；H：培养基中不同初始 pH 对菌体生长的影响。

Note: A, B, C, D, E, F: Displayed the effect of carbon source, nitrogen source, $MgCl_2$, metal solution, temperature, pH in culture medium on growth and DBT removal rate in strain JDZX13, respectively.

表 3 正交实验方案与结果
Table 3 Design and results of orthogonal test

处理号 Treatment number	因素 Factor								菌浓 Cell density (g/L)
	A	B	(A×B) ₁	(A×B) ₂	C	D	E	F	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.89
2	1	1	1	1	2	2	2	2	1.71
3	1	1	1	1	3	3	3	3	1.65
4	1	2	2	2	1	1	2	3	1.59
5	1	2	2	2	2	2	3	1	0.13
6	1	2	2	2	3	3	1	2	1.14
7	1	3	3	3	1	1	3	2	1.14
8	1	3	3	3	2	2	1	3	1.03
9	1	3	3	3	3	3	2	1	0.49
10	2	1	2	3	1	3	3	2	1.11
11	2	1	2	3	2	1	1	3	0.20
12	2	1	2	3	3	2	2	1	0.88
13	2	2	3	1	1	3	1	1	1.00
14	2	2	3	1	2	1	2	2	1.67
15	2	2	3	1	3	2	3	3	1.47
16	2	3	1	2	1	3	2	3	1.44
17	2	3	1	2	2	1	3	1	0.49
18	2	3	1	2	3	2	1	2	0.97
19	3	1	3	2	1	2	2	3	1.30
20	3	1	3	2	2	3	3	1	0.35
21	3	1	3	2	3	1	1	2	0.34
22	3	2	1	3	1	2	3	2	1.65
23	3	2	1	3	2	3	1	3	0.86
24	3	2	1	3	3	1	2	1	0.08
25	3	3	2	1	1	2	1	1	0.86
26	3	3	2	1	2	3	2	2	1.43
27	3	3	2	1	3	1	3	3	1.29
K_1	1.09	0.94	1.08	1.33	1.22	0.86	0.81	0.58	
K_2	1.02	1.07	0.96	0.86	0.88	1.11	1.18	1.24	
K_3	0.91	1.02	0.98	0.83	0.92	1.05	1.03	1.20	
R	0.18	0.13	0.12	0.50	0.34	0.25	0.37	0.66	

表 4 方差分析
Table 4 Analysis of variance

差异来源 Source of variation	平均值 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F valve	P 值 P valve
蔗糖 Sucrose (A)	0.15	2	0.07	4.30	0.452 8
NH ₄ Cl (B)	0.08	2	0.04	0.86	0.644 0
MgCl ₂ (C)	0.63	2	0.32	0.46	0.061 7
微量元素 Metal solution (D)	0.32	2	0.16	3.73	0.197 6
PH (E)	0.62	2	0.31	1.92	0.064 7
温度 Temperature (F)	2.52	2	1.26	3.64	0.001 0
AB	1.50	4	0.38	14.88	0.025 5
残差 Residual	0.85	10	0.09	4.44	—
总和 Cor toal	6.66	26	—	—	—

DBT 15 d 后, DBT 脱除率为 73%。综上分析, 新筛得脱硫菌株 JDZX13 相对于一些文献报道的菌株具有较高脱硫能力, 在最优发酵条件下, 菌体的生长的速率、细胞得率和脱硫效率都得到显著提高。然而要达到工业应用水平的脱硫效率, 还需深入分析限制菌体脱硫效率的关键因素, 并采用物理诱变、化学诱变或基因工程手段对菌体进一步改造。

3 结论

本研究从新疆克拉玛依油田筛得一株 C_x-DBT 脱硫菌株, 并通过生理生化和分子生物学鉴定为戈登氏菌属。通过 GC-MS 分析 DBT 和 4,6-DMDBT 脱硫产物, 确定该菌株脱硫途径为“4S 途径”。通过单因素实验和正交实验优化, 确定最佳发酵条件: 蔗糖 15 g/L, NH₄Cl 2 g/L, MgCl₂ 0.1 g/L, 微量元素混合液 1 mL/L, pH 7.0, 温度 35 °C。在最优发酵条件下培养 81 h, 生物量达到 4.44 g/L, 较优化前提提高了 3.7 倍; DBT 脱除率在 48 h 达到 98%, 相比于优化前的 60 h 时 97%, 时间缩短 12 h, 脱硫效率提高了 26.3%。该脱硫菌株以及优化实验预计在石油脱硫技术的开发利用中具有一定参考价值。

参考文献

- [1] Dube G, Osifo P, Rutto H. Preparation of bagasse ash/CaO/ammonium acetate sorbent and modelling their desulfurization reaction[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2014, 16(5): 891-900
- [2] Boniek D, Figueiredo D, Batista dos Santos AF, et al. Biodesulfurization: a mini review about the immediate search for the future technology[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2015, 17(1): 29-37
- [3] Kilbane JJ II. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(3): 305-314
- [4] Srivastava VC. An evaluation of desulfurization technologies for sulfur removal from liquid fuels[J]. Rsc Advances, 2012, 2(3): 759-783
- [5] Mu MR, Jiang L, Zhang DH, et al. Revision of sulfur content in new automobile diesel standard and its impacts[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science), 2013, 31(4): 523-526 (in Chinese)
- [6] 牟明仁, 姜莉, 张代华, 等. 车用柴油新标准的硫含量修订及其影响[J]. 沈阳师范大学学报: 自然科学版, 2013, 31(4): 523-526
- [7] Mohebbi G, Ball AS. Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels[J]. Microbiology, 2008, 154(8): 2169-2183
- [8] Le Borgne S, Quintero R. Biotechnological processes for the refining of petroleum[J]. Fuel Processing Technology, 2003, 81(2): 155-169
- [9] Singh S, Kang SH, Mulchandani A, et al. Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 437-444
- [10] Mohamed ME-S, Al-Yacoub ZH, Vedakumar JV. Biocatalytic desulfurization of thiophenic compounds and crude oil by newly isolated bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 112
- [11] Bahuguna A, Lily MK, Munjal A, et al. Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 isolated from diesel contaminated soil[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(6): 975-982
- [12] Papizadeh M, Ardakani MR, Ebrahimipour G, et al. Utilization of dibenzothiophene as sulfur source by *Microbacterium* sp. NISOC-06[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26(7): 1195-1200
- [13] Soleimani M, Bassi A, Margaritis A. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(6): 570-596
- [14] Chen H, Zhang WJ, Chen JM, et al. Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6-DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD-19[J]. Bioresource

- Technology, 2008, 99(9): 3630-3634
- [14] Buchana RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 382-533 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 382-533
- [15] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Manual System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001: 348-392 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 348-392
- [16] Feng SS, Yang HL, Xin Y, et al. Isolation of an extremely acidophilic and highly efficient strain *Acidithiobacillus* sp. for chalcopyrite bioleaching[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(11): 1625-1635
- [17] Okada H, Nomura N, Nakahara T, et al. Analyses of substrate specificity of the desulfurizing bacterium *Mycobacterium* sp. G3[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(2): 228-233
- [18] Mezcuca M, Fernández-Alba AR, Rodríguez A, et al. Chromatographic methods applied in the monitoring of biodesulfurization processes - State of the art[J]. Talanta, 2007, 73(1): 103-114
- [19] Akhtar N, Ghauri MA, Anwar MA, et al. Analysis of the dibenzothiophene metabolic pathway in a newly isolated *Rhodococcus* spp.[J]. Fems Microbiology Letters, 2009, 301(1): 95-102
- [20] Santos SCC, Alviano DS, Alviano CS, et al. Characterization of *Gordonia* sp. strain F.5.25.8 capable of dibenzothiophene desulfurization and carbazole utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(3): 355-362

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果，产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有：研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>，点击作者投稿区，第一次投稿请先注册，获得用户名和密码，然后依照提示提交稿件，详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确，数据可靠，简明通顺，重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码，未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出，多于3人时列出前3人，后加“等”或“et al.”，作者姓前、名后，名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整，不用缩写，不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.1189)