

苯并噻吩脱硫菌株的筛选及脱硫活性研究

李国强¹, 李京浩¹, 马挺², 李珊珊¹, 李红¹, 梁凤来¹, 刘如林^{1*}

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 南开大学环境科学学院, 天津 300071)

摘要: 从孤岛油田油浸土样中筛选到 1 株能降解苯并噻吩(BT)的脱硫菌, 经初步鉴定该菌为戈登氏菌属(*Gordona* sp.)。实验证明: 该菌能以类似于 4S 途径脱除 BT 及其衍生物中的硫, 但是不能脱除二苯并噻吩(DBT)及其衍生物中的硫。GC-MS 分析表明该途径的终产物为邻羟基苯乙醛或其异构体苯并呋喃。在以 BT 为唯一硫源的培养基中 30 ℃培养 48h, *Gordona* sp. C-6 能降解 0.15mmol/L 的 BT, 终产物占发酵培养基中 BT 加入量的 50%, 其余 BT 在有氧培养过程中挥发。通过 Matlab 拟合曲线确定以邻羟基苯乙酸为标准品进行产物定量检测的方法。

关键词: 苯并噻吩; 微生物脱硫; 戈登氏菌; 定量分析

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1181-05

Isolation and Characterization of a Benzothiophene-Desulfurizing Bacterium

LI Guo-qiang¹, LEE kyongho¹, MA Ting², LI Shan-shan¹, LI Hong¹, LIANG Feng-lai¹, LIU Ru-lin¹

(1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. College of Environment Sciences and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A benzothiophene-desulfurizing strain was isolated and identified as *Gordonia* sp. C-6, which could degrade benzothiophene (BT) in a way analogous to the 4S pathway. It was found strain C-6 had the ability to grow in KT-BT medium whose sole source of sulfur was BT or its derivatives, whereas it couldn't grow well in a medium with DBT and its derivatives as the sole source of sulfur, the desulfurized product was identified as 2-(2'-hydroxyphenyl) ethanol or its isomer benzofuran by GC-MS analysis. Desulfurization activity of strain C-6 was investigated. About 0.15mmol/L (50%) BT was desulfurized by strain C-6 after it was incubated in KT-BT medium at 30 ℃ for 48h, the residual BT has volatilized during aerobic fermentation. The quantitative detection of the benzothiophene-desulfurizing products was established with *o*-hydroxyphenylacetic acid as standard compound, the standard curve was fitted by Matlab.

Key words: benzothiophene; biodesulfurization; *Gordonia* sp.; quantitative detection

随着环保意识的增强, 世界各国对燃料油的含硫量要求越来越严格, 燃料油低硫化成为石油深加工的趋势。但是仅靠传统的加氢脱硫(HDS)工艺实现燃料油的低硫化非常困难。近 40 多年, 作为 HDS 工艺补充的微生物脱硫技术(BDS)已经取得了很大进展, 有大量专一降解 DBT 的菌株被筛选出来, 如: *Rhodococcus erythropolis* strains IGTS8^[1]、*Rhodococcus* sp. strain SY1^[2]、*Rhodococcus* sp. strains B1、If、Ig 和 Ih^[3]、*Rhodococcus* sp. strain ECRD-1^[4]、*Gordona* sp. strain CYKS1^[5]、*Nocardia* sp. strain CYKS2^[6] 和 *Corynebacterium* sp. strain SY1^[7], 并对 DBT 微生物脱硫酶^[8]、分子转运^[9]、启动子调控^[10]及脱硫基因的直接进化^[11]等进行了大量的研究。然而, 石油或其馏分油中的杂环含硫化合物除了 DBT 还有 BT 及其衍生物。因此, 要发展微生物脱硫工艺还必须筛选能够降解 BT 的菌株。目前国外报道的 BT 脱硫菌株有: *Gordonia* sp. 213E^[12]、*Sinorhizobium* sp. KT55^[14]、*Gordonia* sp. T08^[13]、*Rhodococcus* sp. WU-K2R^[15] 和 *M. goodii* X7B^[16]。推测其脱硫途径

为: BT → BT-亚砷 → BT-砷 → 苯并-2-氧-1, 2-氧硫杂芑 → 邻羟基苯乙烯或邻羟基苯乙醛^[12, 18]。另外还分离到 3 株能同时脱除 BT 和 DBT 中有机硫的菌株: *Paenibacillus* sp. strain A11-2^[17]、*Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1^[18] 和 *Rhodococcus* sp. SDUZAWQ^[19]。国内对专一脱除 BT 中有机硫的菌株还未见报道。本研究从孤岛油田油浸土样中筛选到 1 株能高效降解 BT 的菌株, 研究了 BT 微生物脱硫产物的定量测定方法, 以期对燃油脱硫, BT 代谢机理, BT 脱硫产物的定量测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

Gibb's 试剂(2, 6-二氯醌, 4-氯酰亚胺)、二苯并噻吩、苯并噻吩、2-甲基苯并噻吩、3-甲基苯并噻吩、

收稿日期: 2005-06-18; 修订日期: 2005-09-06

基金项目: 天津市自然科学基金项目(05YJFJC00700)

作者简介: 李国强(1978~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为石油微生物。

* 通讯联系人, E-mail: meor@nankai.edu.cn

5-甲基苯并噻吩、2-羧基苯并噻吩均购自 Sigma-Aldrich 公司; 苯酚, 邻甲酚, 邻氯苯酚, 邻硝基苯酚, 邻羟基苯乙酸等均为国产分析纯。

1.2 培养基

KT 培养基^[20] (g/L): K_2HPO_4 2.56; KH_2PO_4 2.08; NH_4Cl 1.00; $MgCl_2$ 0.25; $CaCl_2$ 0.001; Glucose 5.00; 柠檬酸三铵 0.005; 琥珀酸钠 5.00; pH 7.2。

KT-BT 培养基: BT 溶于无水乙醇配成 50mmol/L 母液, 按照一定的比例(除 BT 梯度试验外均加入 0.3mmol/L)加入 KT 培养基中。(BT 为唯一硫源)

GM 培养基 (g/L): Na_2HPO_4 1.84; KH_2PO_4 3.16; NH_4Cl 1.00; $MgCl_2$ 0.10; $CaCl_2$ 0.001; $FeCl_3$ 0.001; $MnCl_2$ 0.004; Glucose 3.00; BT 0.04; pH 7.4。

1.3 脱硫菌株的筛选

取 1g 孤岛油田油浸土样于 100mL KT-BT 培养基中(BT 终浓度 0.3mmol/L), 置 250r/min 旋转摇床 30℃富集培养 48h。吸取 2mL 富集菌液移至新的 50mL KT-BT 培养基中进行培养, 培养条件同上。在 KT-BT 固体平板上划线, 初步分离纯种。挑取单菌落接入装有 5mL LB 培养基的试管内, 30℃振荡培养 30h, 作为种子液。取 2mL 种子液接入装有 50mL KT-BT 培养基的 250mL 三角瓶中, 30℃振荡培养 72h, 对发酵液进行检测, 以确定菌株是否对 BT 有降解作用。

1.4 脱硫菌株的鉴定

1.4.1 生理生化特征分析

生理生化特征分析参见常用细菌系统鉴定手册^[21]。

1.4.2 16S rDNA 序列分析

以菌株基因组 DNA 为模板, 用 16S rDNA 通用引物扩增得到近全长的 16S rDNA。PCR 产物测序后在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 使用 Clustal W Version 1.8 和 PHYLIP package programme 进行各序列间的同源性和进化距离的分析与比较。

1.5 BT 及其脱硫产物的分析

1.5.1 培养基中 BT 的定量分析

等体积的乙酸乙酯抽提培养基中的 BT 后, 用高压液相色谱 (Agilent 1100 Series) 测定 BT 的含量。色谱条件: 150mm × 4.6mm, 内装粒度为 5 μ m 的 C_{18} 填充物, 流动相甲醇: 水为 80: 20 体积比, 流动相

速度为 1mL/min, 检测波长 225nm。

1.5.2 BT 脱硫产物的定性分析

等体积的乙酸乙酯抽提培养基中的 BT 后, 将抽提液浓缩 40 倍, 用于 GC-MS (HP6890GC/5973MS 色谱-质谱联用仪) 分析脱硫产物的结构。色谱条件: HP25MS 石英毛细管色谱柱 (30m × 0.25mm × 0.25 μ m), 色谱进样口及 GC-MS 接口温度均为 250℃, 升温程序: 50℃保持 2min, 以 15℃/min 升至 250℃, 保持 10min。质谱条件: EI 电离源, 电子能量 70eV, 离子源温度 250℃, 扫描范围 30~ 500 u。

1.6 菌株对 BT 及衍生物等有机硫的降解及测定

1.6.1 标准曲线测定

BT 及衍生物微生物脱硫机理还不清楚, 因其脱硫产物也可以和 Gibb's 试剂反应, 推测其脱硫途径与 DBT 脱硫的 4S 途径类似, 其产物可能是邻羟基苯乙烯或邻羟基苯乙醛, 但 2 种化合物均没有商品销售。本文用它们的结构类似物苯酚, 邻甲酚, 邻氯苯酚, 邻硝基苯酚, 邻羟基苯乙酸为样品。以样品浓度和样品与 Gibb's 试剂反应产物的吸光度的关系测定了标准曲线。

1.6.2 发酵液中 BT 脱硫产物的定量分析

将发酵液离心去除菌体后, 调 pH 8.0, 按体积比为 100: 1 加入 Gibb's 试剂, 30℃反应 30min, 测定其 630nm 处吸光度, 并计算出相应的产物浓度。

2 结果与讨论

2.1 脱硫菌株的筛选与鉴定

按照上述筛选方法, 筛选得到 1 株降解 BT 的脱硫菌株, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》对菌株作了初步鉴定。

(1) 形态特征 为革兰氏阳性菌, 菌体呈短杆状, 大小为 (0.8~ 1.0) μ m × (2~ 3) μ m, 不运动, 具有典型的八字型排列。在 KT-BT 固体培养基上, 为橙红色, 菌落圆形, 蜡状质地, 较粘稠, 不透明, 凸起, 有光泽, 不产生水溶性色素, 边缘整齐。插片培养表明, C-6 无气生菌丝, 有很不发达的基内菌丝。

(2) 生理生化特征 如表 1 所示。

(3) 16S rDNA 鉴定 将此序列与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), 得到了 29 种与菌株 C-6 同源性较高的棒杆菌 (Corynebacterineae) 16S rDNA 序列。采用 ClustalX1.8 对所获得的核苷酸序列进行比对分析, 得到序列之间的相似值; 另外, 用 MEGA2.0 计算出序列的系统进化距离。采用邻位相连法构建出 C-6

菌株和 GenBank 中 29 个亲缘关系较近的棒杆菌的系统发育树,如图 1 所示.分析表明,菌株 C-6 和 *G. terrae*、*G. namibiensis*、*G. rubripertinctus* 和 *G. bronchialis* 的相似率较高,进化距离较小,其中与 *Gordonia terrae* 16S rDNA (GenBank accession No. X79286) 的进化距离最小、相似值最高,分别为 0.0021 和 99.8%.

表 1 C-6 的生化特征

Table 1 Biochemical characteristics of C-6 strain	
生化特征	结果
氧化酶	-
接触酶	+
葡萄糖氧化发酵	氧化型
乙醇氧化发酵	氧化型
M.R(甲基红)	-
运动	-
淀粉水解	-
硝酸盐还原	+
产 _酸 气	-
生长条件	好氧

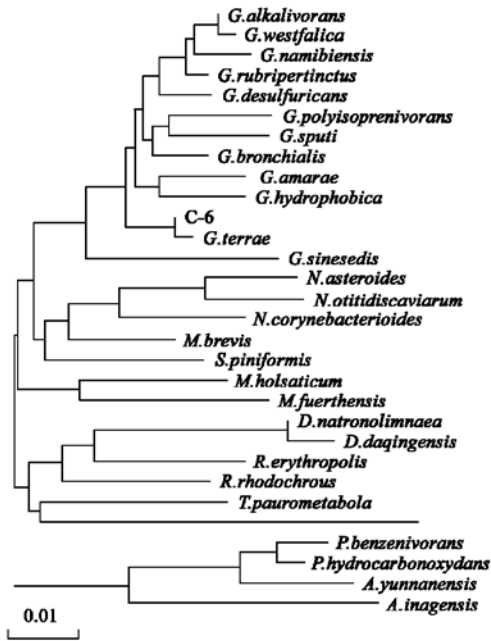


图 1 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株间的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the comparison of 16S rDNA sequence of other actinomycetes which have closed relationship of 16S rDNA.

由以上鉴定结果,推断 C-6 菌株属于戈登氏菌属(*Gordona* sp.),命名为 *Gordona* sp. C-6.

2.2 BT 脱硫产物的定性分析

以 4% 的接种量将 C-6 接入 KT-BT 培养基,培养 60h 后,用乙酸乙酯抽提 BT 的脱硫产物.浓缩 40

倍,GC-MS 定性分析 BT 脱硫产物.结果如图 2 所示,经质谱计算机系统检索确定 BT 脱硫产物为邻羟基苯乙醛或其异构体苯并呋喃.

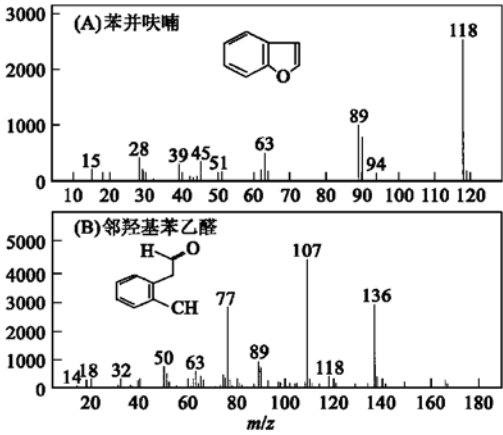


图 2 BT 脱硫产物的质谱图

Fig. 2 MS analysis of BT desulfurized products

2.3 BT 降解产物的测定方法

BT 及其衍生物的脱硫菌株已有大量报道,其筛选标准多为产物是否能与 Gibb's 试剂产生阳性反应,这样筛选到的菌株以 4S 或者类似于 4S 途径脱除 BT 及其衍生物中的硫.而 BT 的衍生物以烷基取代基为最多,因此可以选择和 BT 微生物脱硫产物结构最相似的邻羟基苯乙酸作为 BT 微生物脱硫产物的标准品做标准曲线.图 3 是以邻羟基苯乙酸为底物测得的 A_{630nm} 值为纵坐标,底物浓度为横坐标用 Matlab 拟合的标准曲线,其计算式为:

$$y = 5.574x + 0.1379$$

式中, y 为产物在 630nm 下的吸光度; x 为产物浓度.

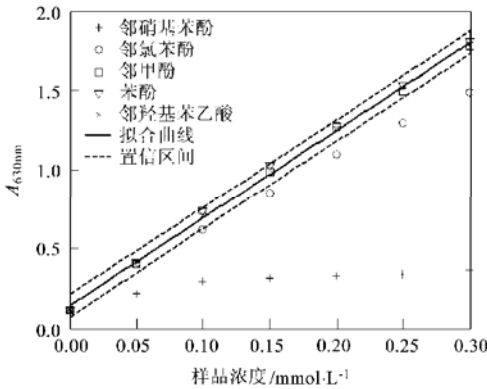


图 3 邻羟基苯乙酸 Gibb's 反应的拟合曲线及各标准品在 95%置信区间的分布

Fig. 3 Fitting curve of *o*-hydroxyphenylacetic acid and the distributing of five standard compounds

拟合的 SSE 和 R^2 值分别为 0.003 87 和 0.998 23, 拟合优度非常好.

从图 3 可以看出分别以邻甲酚、邻羟基苯乙酸或者苯酚为底物测得的数据点都落在置信度为 95% 的置信区间内, 而邻氯苯酚和邻硝基苯酚数据点与标准曲线偏离较远. 这可能是因为当酚羟基邻位为推电子基团甲基或羧基时对酚羟基活性影响较小而当其邻位为强吸电子基团氯基或硝基时对酚羟基活性影响较大所致. 因此, 以邻羟基苯乙酸为标准品绘制的标准曲线可以作为衡量 BT 及其衍生物微生物脱硫产物生成量的标准.

2.4 GM 培养基中 BT 挥发量的测定

研究发现, 在用 GM 培养基培养菌体时, 培养基中的 BT 极易挥发, 因此, 测定了不同时间 BT 在无菌 GM 培养基中的剩余量, 测定结果如图 4 所示, 从图 4 中可以看出: BT 在 30℃, 200r/min 培养条件下, 培养到 14h 时 80% 的 BT 已经挥发了, 18h 后培养基中的 BT 含量基本稳定在 0.04mmol/L, 此时 BT 的剩余量只有加入量的 8%.

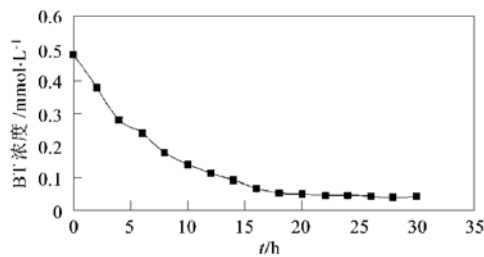


图 4 GM 培养基中 BT 的残留曲线
Fig. 4 Volatile curve of BT in GM medium

2.5 Gordona sp. C-6 对不同杂环有机硫化化合物的利用情况

为了确定 *Gordona* sp. C-6 对不同杂环有机硫化化合物的利用情况, 分别在 15 种含有不同有机硫源的 KT 培养基将 *Gordona* sp. C-6 培养 72h, 在 A_{600nm} 下测定菌体浓度, 结果见表 2 所示. 可以看出, *Gordona* sp. C-6 不仅可以利用酵母粉、BT、酪素作为唯一硫源生长, 而且还可以利用硫酸根、2-甲基苯并噻吩、5-甲基苯并噻吩和二甲基亚砷为唯一硫源时良好生长. 但是利用 3-甲基苯并噻吩、2-羧基苯并噻吩为唯一硫源时, 菌体生长较慢. *Gordona* sp. C-6 在 DBT 及其衍生物中生长更差. 由此可见, *Gordona* sp. C-6 对有机硫源有一定的选择性, 只能利用含硫氨基酸、BT 及部分 BT 烷基取代物(如 2-甲基苯并噻吩、5-甲基苯并噻吩等), 而对 DBT 及其

衍生物基本不利用.

表 2 *Gordona* sp. C-6 的硫底物特异性
Table 2 Sulfur compound specificity of *Gordona* sp. C-6

硫源	菌体浓度(A_{600nm})
无	0.0
硫酸钠	0.92
酵母粉	1.262
(水解)酪蛋白氨基酸	1.173
二甲基亚砷	1.498
苯并噻吩	1.438
2-甲基-苯并噻吩	0.862
3-甲基-苯并噻吩	0.328
5-甲基-苯并噻吩	1.327
2-羧基苯并噻吩	0.226
二苯并噻吩	0.145
1-甲基-二苯并噻吩	0.149
2-甲基-二苯并噻吩	0.208
3-甲基-二苯并噻吩	0.162
4-甲基-二苯并噻吩	0.193

2.6 Gordona sp. C-6 生长和脱硫动态曲线

用 GM 培养基在适宜生长条件下观察了菌体生长与脱硫的动态, 结果如图 5 所示. 可以看出, *Gordona* sp. C-6 生长延滞期比较长, 18h 才进入对数生长期, 开始迅速生长, 产物迅速积累, 残糖和 pH 下降. 48h 后菌体生长进入稳定期, 产物浓度上升趋势变缓, 残糖量也基本维持恒定, pH 值由 7.2 下降到 4.4, 并开始稳定, 说明 *Gordona* sp. C-6 生长过程中有酸性物质产生. 在 48h 发酵周期内 *Gordona* sp. C-6 将 0.15mol/L 的 BT 转化为相应的产物, BT 的转化率为 50%. 但是, 在发酵周期结束后, 用 HPLC 未能检测到培养基中残留的 BT. 推测是因为在实验过程中 BT 在 GM 培养基中极易挥发所致. 因此不能以 BT 的剩余量来判定 BT 是否全部被降解, 而应该采用产物生成量的方法来衡量 BT 的降解率. 因此, 如何解决发酵过程中 BT 的挥发, 稳定

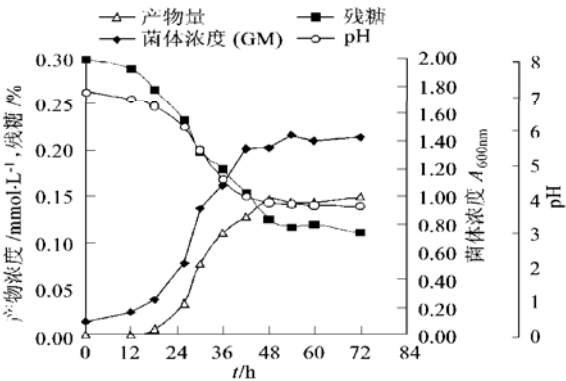


图 5 C-6 生长和脱硫的动态曲线
Fig. 5 Kinetics curve of growth and desulfurization of C-6

发酵过程的 pH 值使菌体的生长和脱硫处于最佳状态等问题是进一步研究模型化合物(BT)微生物脱硫需要考虑的重要问题。

3 结论

(1) 筛选到 1 株能特异性脱除 BT 中的硫的菌株,经初步鉴定为 *Gordona* sp. C-6.

(2) 以邻羟基苯乙酸为标准品与 Gibb's 试剂反应,通过 Matlab 拟合曲线确定了 BT 产物定量检测的方法。

(3) 在 GM 培养基中研究了 *Gordona* sp. C-6 的脱硫活性,在 48h 内生成了 0.15mmol/L 的邻羟基苯乙醛,其余的 BT 在发酵过程中挥发。

参考文献:

- [1] Kilbance J J, Jackowski K. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8[J]. Biotechnol. Bioeng., 1992, **40**: 1107~ 1114.
- [2] Omori T, Saiki Y, Kasuga K, et al. Desulfurization of alkyl and aromatic sulfides and sulfonates by dibenzothiophene desulphurizing *Rhodococcus* sp. strain SY1 [J], Biosci. Biotechnol. Biochem., 1995, **59**: 1195~ 1198.
- [3] Denis-Larose C, Labbe D, Nergeron H, et al. Conservation of plasmid encoded dibenzothiophene desulphurisation genes in several *rhodococci* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**: 2915~ 2919.
- [4] Lee M K, Senius J D, Grossman M J. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, **61**: 4362~ 4366.
- [5] Rhee Sung Keum, Chang Je Hwan, Chang Yong Keun, et al. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by a newly isolated *Gordona* sp. Strain CYKS1 [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**(6): 2327~ 2331.
- [6] Chang Je Hwan, Rhee Sung Keum, Chang Yong Keun, et al. desulfurization of diesel oil by a newly isolated dibenzothiophene-degrading *Nocardia* sp. Strain CYKS2 [J]. Biotechnol. Prog., 1998, **14**: 851~ 855.
- [7] Toshio Omori, Lisa M, Yuko S, et al. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1 [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**(3): 911~ 915.
- [8] Denome S A, Olson E S, Young K D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. IGTS8 [J]. Appl. Environ. Microb., 1993, **59**: 2837~ 2843.
- [9] Daniel J Monticello, Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, **11**: 540~ 546.
- [10] Mamie Z Li, Charles H S, Daniel J M, et al., Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 [J]. Journal of Bacteriology, 1996, **178**(22): 6409~ 6418.
- [11] Coco W M, Levinson W E, Crist M J, et al. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes [J]. Nat. Biotechnol., 2001, **19**(4): 354~ 359.
- [12] Steven C Gilbert, John Morton, et al. Isolation of a unique benzothiophenedesulphurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulphurization pathway [J]. Microbiology, 1998, **144**: 2545 ~ 2553.
- [13] Matsui T, Onaka T, Maruhashi K, et al. Benzo[b] thiophene desulfurization by *Gordonia rubropertinctus* strain T08 [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, **57**: 212~ 215.
- [14] Yasuhiro Tanaka, Toshimitsu Onaka, Toru Matsui, et al. Desulfurization of Benzothiophene by the Gram-Negative Bacterium, *Sinorhizobium* sp. KT55 [J]. Current Microbiology, 2001, **43**: 187~ 191.
- [15] Kohtaro Kirimura, Toshiki Furuya, Rika Sato, et al. Biodesulfurization of Naphthothiophene and Benzothiophene through Selective Cleavage of Carbon-Sulfur Bonds by *Rhodococcus* sp. Strain WU-K2R [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 3867~ 3872.
- [16] Li Fuli, Xu Ping, Feng Jinhui, et al. Microbial Desulfurization of Gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B Immobilized-Cell System [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 276~ 281.
- [17] Jin Konishi, Toshimitsu Onaka, Yoshitaka Ishii. Demonstration of the carbon-sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **187**: 151~ 154.
- [18] Morio Kobayashi, Toshimitsu Onaka, Yoshitaka Ishii, et al. Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strain [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **187**: 123~ 126.
- [19] 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.
- [20] Tanaka Y, Matsui T, Konish J, et al. Biodesulfurization of benzothiophene and dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus* strain [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **59**: 325~ 328.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.