

# 石油生物催化脱硫菌 *Agrobacterium tumefaciens* UP3 的分离筛选

史德青 赵金生 侯影飞 杨金荣 孔 瑛\*

(石油大学化学化工学院 东营 257061)

**摘 要:** 从胜利油田被原油污染的土壤中筛选到一株能有效降解模型化合物二苯并噻吩(DBT)的菌株。根据常规的形态分析、生理生化性状及 16S rDNA 序列分析,将其鉴定为根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* UP3)。该菌不能以十二烷、十六烷、液体石蜡和萘作为唯一碳源和能源生长,具有工业应用的潜力。对该菌株 DBT 降解能力的初步研究表明,54h 内可将 500mg/L 的 DBT 降解至 150mg/L。对降解产物的分析表明,根癌土壤杆菌降解 DBT 的途径与 Kodama 路线及 4-S 路线不同。

**关键词:** 石油,生物催化脱硫,筛选,根癌土壤杆菌 UP3

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2004)02-0248-03

由于环境保护的压力,世界各国对成品油的含硫量限制日趋严格,因而石油产品的深度脱硫技术受到石油炼制工业的极大重视,成为当前炼油技术研究的热点<sup>[1]</sup>。

石油生物催化脱硫是利用微生物产生的酶选择性地将从油品中含硫化合物转化为水溶性硫化物,然后油水分离以实现油品脱硫的目的<sup>[2]</sup>。与加氢脱硫相比它具有投资少、运行成本低和容易脱除噻吩类化合物等优点<sup>[3]</sup>。近年来,国内外科学工作者以 DBT 为模型化合物,筛选培育出一批能够有效降解杂环硫的菌株,主要分为两类,一类菌株只将 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 4-S 路线,如 *Rhodococcus erythropolis* H-2<sup>[4]</sup>、*Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1<sup>[5]</sup> 等菌株;另一类菌株将 DBT 中的一个苯环破坏,而 C-S 键依然保存,含硫的部分变为水溶性有机物 3-羟基-2-甲酰基-苯并噻吩,其降解历程称为 Kodama 路线,如 *Rhizobium meliloti* Orange 1<sup>[6]</sup>。

本文从胜利油田油井附近土壤采样,进行了生物催化脱硫菌种选育,得到了一株对 DBT 有降解效果的菌种,对该菌种的分类地位进行了鉴定,并初步研究了它对 DBT 的降解能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌源:** 被含硫较多的原油污染的泥土。

**1.1.2 培养基:** 基本盐溶液:每升蒸馏水中加入 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, CaCl<sub>2</sub> 0.001g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g, pH 为 7.0。富集培养基:基本盐溶液中加入 1% 的大豆蛋白胨和 0.1% 的 DBT。筛选固体培养基:富集培养基中加 2% 的琼脂粉在培养皿中制成固体平板。脱硫试

验培养基:每升基本盐溶液中加入 10g 蔗糖, 0.001g 生物素, 0.001g 谷氨酸。

### 1.2 脱硫微生物的富集、筛选和纯化

从每个土样中称 5g 土放入 50mL 已加入 0.1% DBT 的基本盐溶液中,在 28℃、200r/min 条件下培养 4d,转入 50mL 富集培养基中,在上述条件下培养 3d 后取 5mL 培养物转入 50mL 新鲜的富集培养基中,如此往复 4 次,取最后的培养物 1mL 稀释 10<sup>6</sup> 倍涂布到筛选培养基平板中,培养箱中 30℃ 下培养 3d,选择能把 DBT 降解为水溶性物质的菌落做进一步研究。

### 1.3 菌种鉴定

将筛选到的降解菌进行传统的形态及生理生化性状鉴定。参照文献 [7] 的方法测定其 16S rDNA 序列,利用 BLAST 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。

### 1.4 菌株生长曲线的测定

取该菌株的培养物,以空白样作参比测出其最大吸光度。以生长 48h 后的菌株为接种菌,分别接种 10 瓶,摇床培养。每隔一段时间取一瓶培养物稀释 10 倍,在其最大吸光度波长处测定培养物的吸光度。以吸光度为纵坐标时间为横坐标做出曲线,即为微生物的生长曲线。

### 1.5 脱硫试验

在 50mL 脱硫试验用培养基中加入 25mg DBT,实验在摇床中进行,180r/min,温度 30℃。培养一定时间后用 0.8 体积的正己烷萃取反应后培养液中剩余的 DBT,4℃、10000r/min 离心 15min,取 1μL 正己烷相进气相色谱分析 DBT 含量。

### 1.6 代谢产物分析方法

脱硫试验进行 2d 后,调整培养液的 pH 至 2.0,然后加入 0.8 体积的乙酸乙酯,充分震荡后,离心混合液,DBT 及其氧化代谢产物被萃取在乙酸乙酯相中,取 1μL 乙酸乙酯相进行

基金项目:中国石油天然气集团公司中青年创新基金资助项目(w000424)

\* 通讯作者。E-mail: kongy@hdpu.edu.cn

作者简介:史德青(1972-)男,江苏人,讲师,博士,主要从事石油微生物方面的研究。Tel: 86-546-8391029; Fax: 86-546-8396872; E-mail: shidq@hdpu.edu.cn

收稿日期:2003-06-25,修回日期:2003-10-13

GC-MS 分析。

## 2 结果

### 2.1 降解菌的筛选

从胜利油田孤岛采油厂油井附近土壤中,筛选到一株 DBT 的降解菌,编号为 n3.3。该菌在含 25mg DBT 的 50mL 富集培养基中 30℃ 摇床培养,并以不接种的含同样量 DBT 的富集培养液为空白对照,取样经色谱定量分析,结果表明:与不接种的富集培养液相比,n3.3 菌株 54h 后把培养基中 70% 的 DBT 降解,从而初步证明 n3.3 菌株具有降解 DBT 的能力。

### 2.2 降解菌 n3.3 的鉴定

n3.3 菌落呈白色,粘稠状,表面光滑,细胞呈杆状,有周生鞭毛,能运动,不形成芽孢,革兰氏阴性,不抗酸,氧化酶、接触酶阳性,丙二酸钠、酒石酸钠产碱实验阳性,丙酸钠产碱实验阴性,赤藓糖产酸实验阳性,松三糖和己醇产酸实验阴性。

对该菌种做了 16S rDNA 寡核苷酸分析,其序列长度为 1387bp,在 GenBank 中的登录号为 AY364329。该菌的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的其它 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 *Agrobacterium albertimagni* 16S ribosomal 及 *Agrobacterium tumefaciens* strain c58 等。根据 rDNA 同源性在系统发育中的分类原则并结合表型特征,参考《Bergey's Manual of Determinative Bacteria》第九版,并结合菌种的形态、生理生化性状分析,最终将 n3.3 菌株归类于土壤杆菌属,定名为根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)UP3。

### 2.3 菌株降解二苯并噻吩能力的测定

把菌株接种在脱硫试验用培养基中,进行 DBT 的降解实验(图 1)。从图 1 可以看到,该菌株在生长曲线的指数期和部分稳定期降解 DBT 的速度最快。54h 后,培养液中 DBT 的含量从 500mg/L 下降到 150mg/L 左右。

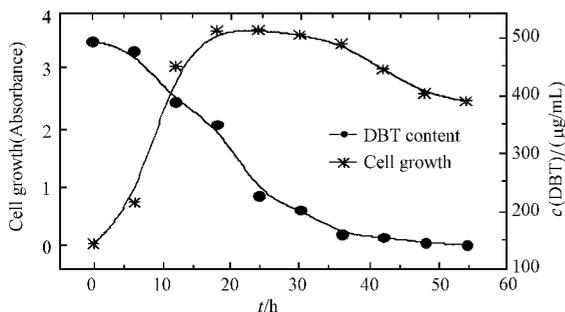


图 1 DBT 降解曲线及菌株的生长曲线

Fig.1 Time courses of DBT concentration and cell concentration

### 2.4 降解菌的碳源利用试验

用十二烷和十六烷分别代表石油组分中不同长度的直链烷烃,用液体石蜡代表有支链的饱和烷烃,用萘代表不饱和和芳烃,以它们作碳源来考察菌种对石油中饱和烃和芳香烃的作用。结果表明此菌种不能以上述烃类作为唯一碳源和能源来支持生长,说明该菌株在脱除含硫化合物时不会明显

降低石油组分中各种烃的含量。因此,该菌株具有生物脱硫的工业应用潜力。

### 2.5 二苯并噻吩降解产物分析

脱硫试验进行 2d 后,用乙酸乙酯萃取培养基中的 DBT 及其代谢产物,取 1 $\mu$ L 进行 GC-MS 分析。代谢产物的色谱图如图 2 所示,其质谱图如图 3 所示。各未知化合物的 GC-MS 解析如下:色谱图中保留时间为 3.5min 的物质为溶剂;保留时间为 10.39min 的化合物在质谱图中其分子离子峰为 m/z122,特征峰为 m/z122、m/z105、m/z77、m/z51 和 m/z28,经质谱计算机系统检索和人工图谱解析,并与纯化合物谱图核

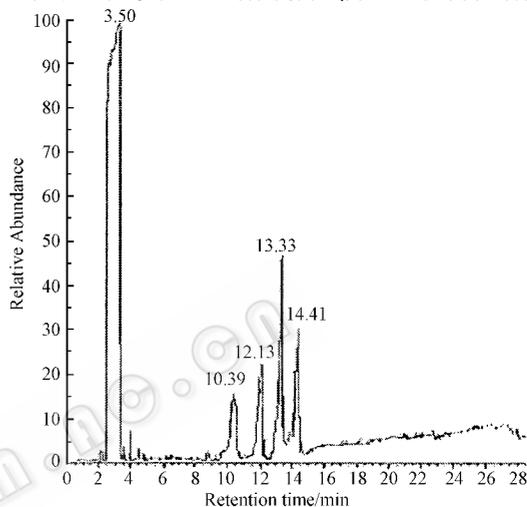


图 2 DBT 降解产物的色谱图

Fig.2 The chromatogram of the products of DBT degradation

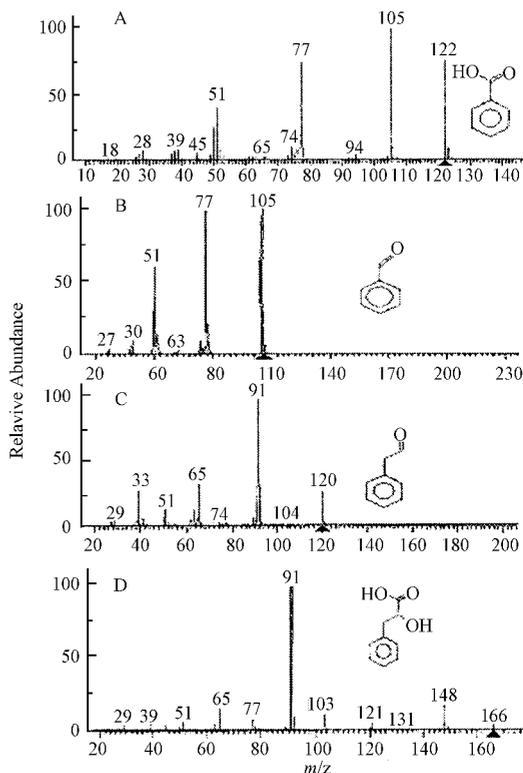


图 3 四种化合物的质谱图

Fig.3 The mass spectrogram of the products of DBT degradation

对 确定其为苯甲酸。保留时间为 12.13min、13.33min 和 14.41min 的化合物用同样的方法可以确定出其结构分别为苯甲醛、苯乙醛和 2-羟基苯丙酸。色谱图中保留时间为 18.22min 的吸收峰,可确定其为 DBT。检测到的几种降解中间产物和终产物与前人研究中报道过的 Kodama 路线及 4-S 路线中的中间产物均不相同,在 4-S 路线中,终产物为 2-羟基联苯和亚硫酸盐,在 Kodama 路线中,一个苯环被破坏,生成 3-羟基-2-甲酰基-苯并噻吩<sup>[8]</sup>。由此可以说明此菌种可能遵从一种尚未发现的脱硫机理进行 DBT 的降解。DBT 降解产物的乙酸乙酯萃取相中除 DBT 外未发现含硫化合物,说明有机硫被降解成极性较大的水溶性物质,从而与油相分离。但水相中的含硫化合物可能由于浓度较低,并受到其它组分的影响而较难检测到。因此,此菌种的脱硫机理尚待进一步研究。

### 3 讨论

石油生物催化脱硫的研究已有一些相关报道,能够降解模型化合物 DBT 的菌种主要有:*Pseudomonas* sp.(假单胞菌属)、*Acinetobacter* sp.(不动杆菌属)、*Corynebacterium* sp.(棒杆菌属)、*Brevibacterium*(短杆菌属)、*Beijerinck*(拜叶林克氏菌属)和 *Rhizobium*(根瘤菌属)等细菌,以及 *Rhodococcus erythropolis*(红平红球菌)和 *Nocardia* sp.(诺卡氏菌属)等放线菌,并基本搞清楚了它们作用于 DBT 的代谢过程中的中间产物,其代谢途径主要有 Kodama 路线和 4-S 路线。

本文以 DBT 降解菌的筛选为目的设计了富集培养液,利用该培养液分离到能有效降解 DBT 的菌株,根据传统的分类方法和分子生物学技术将其归类为根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。根瘤土壤杆菌在生物催化脱硫方面的研究尚未见文献报道。该菌株的碳源利用实验证明:

它不能以模型化合物十二烷、十六烷、液体石蜡和萘为唯一的碳源生长,具有石油生物脱硫的工业应用潜力。对该菌株降解 DBT 的特点做了初步的研究,该菌株能把不溶于水的 DBT 降解为水溶性的物质,利用 GC-MS 方法定性推断出该菌株降解 DBT 的中间产物有苯甲醛、苯乙醛和 2-羟基苯丙酸,终产物为苯甲酸。而以往报道过的 Kodama 路线的降解终产物 3-羟基-2-甲酰基-苯并噻吩,4-S 路线的终产物为 2-羟基联苯,均与该菌株对 DBT 的降解终产物不同,因此其降解机理尚待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Monticelli D J. Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **51**(4): 756-760.
- [2] 钱伯章, 吴虹. 石油生物脱硫技术及其前景. 炼油设计, 1999, **29**(8): 26-30.
- [3] Kilbane I I, John J. Mutant microorganism useful for cleavage of organic C-S bonds. US Patent 5,104,801, 1992-04-14.
- [4] Ohshiro T, Hirata T, Izumi Y. Desulfurization of dibenzothiophene derivatives by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, **142**: 65-70.
- [5] Kobayashi M, Onaka T, Ishii Y, et al. Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strain. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **187**: 123-126.
- [6] Frassinetti S, Setti L, Corti A, et al. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Canada Journal of Microbiology*, 1998, **44**: 289-297.
- [7] Paabo S, Wilson A C. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts. *Nature*, 1988, **334**: 387-388.
- [8] McForland B L. Biotransformation. *Microbiology*, 1999, **2**: 257-264.

## Isolation of Dibenzothiophene-degrading Bacterium *Agrobacterium tumefaciens* UP3

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

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

**Abstract:** A dibenzothiophene (DBT)-degrading bacterium was isolated from oil-contaminated soil from Shengli oil field by enrichment technique. Traditional taxonomy, assays of its 16S rDNA sequence homology identified it as *Agrobacterium tumefaciens* UP3. This strain cannot grow on n-dodecane, n-hexadecane, liquid olefin and naphthalene as its sole carbon and energy source, so this strain can be used in industry potentially. The DBT degrading ability of this bacterium was studied. The content of DBT decreased from 500 mg/L to 150 mg/L within 54 hours. The analysis of the metabolic product of DBT shows that the degrading mechanism of *Agrobacterium tumefaciens* is different from Kodama and 4-S mechanism.

**Key words:** Petroleum, Biotransformation, Screening, *Agrobacterium tumefaciens* UP3

Foundation item: Supported by CNPC Innovation Fund (w000424)

\* Corresponding author. Tel 86-546-8391029; Fax 86-546-8396872; E-mail kongy@hdpu.edu.cn

Received date: 06-25-2003