

# 红球菌 SDUZAWQ 对有机硫和无机硫的耐受性研究及脱硫基因的克隆

佟明友<sup>1</sup> 蔡晓凤<sup>2</sup> 曾义勇<sup>2</sup> 刘如林<sup>1</sup> 许平<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南开大学生命科学学院 天津 300071)

(<sup>2</sup>山东大学 微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要:**以筛选得到的红球菌 SDUZAWQ 为对象,研究其在不同浓度的有机硫化物二苯并噻吩(DBT)存在下的脱硫能力,以及在 0.2mmol/L DBT 和不同浓度  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  同时存在下的脱硫情况。当 DBT 浓度高达 6mmol/L 时,菌株仍能生长,而且检测出产物 2-羟基联苯(2-HBP)的存在,说明该菌株具有耐受较高浓度 DBT 的能力。当 DBT 和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  同时存在时,DBT 为菌株 SDUZAWQ 所利用,并且也检测出 2-HBP,并非如文献所报道的红球菌在无机硫存在下不代谢 DBT,表明该菌株能够耐受一定浓度的无机硫酸盐。对相关脱硫基因的克隆和测序结果显示,完整脱硫基因 *dszABC*、其上游调控序列和 *dszD* 的序列与模式菌株 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 的同源性分别是 99%、100% 和 100%。

**关键词:**二苯并噻吩,生物脱硫,红球菌,有机硫,硫酸盐

中图分类号:Q935;Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0576-04

目前,由于低硫含量的原油储量不断减少,所以有必要精炼高硫含量的原油,以减少燃烧后二氧化硫的排放量,从而避免对环境造成严重的污染<sup>[1]</sup>。传统的加氢脱硫法(Hydrodesulfurization,简称HDS)成本较高,而且难以脱除化石燃料中的含硫杂环化合物。而生物脱硫方法(Biosulfurization,简称BDS)条件温和、设备简单、且具有高度的专一性,能够脱除燃料中杂环含硫化合物中的有机硫,且不损失燃料的热值,是一种很有前途的脱硫方法,应用前景十分广泛<sup>[2]</sup>。二苯并噻吩(Dibenzothiophene,简称DBT)是化石燃料中含有的一种典型的有机含硫化合物,从而被选作微生物脱有机硫反应的模式化合物。

通过对模式菌株红球菌(*Rhodococcus erythropolis* IGTS8,简称IGTS8)的生物脱硫分子机理的研究,发现脱硫菌株中存在一个 120 kb 的质粒;脱硫基因 *dszA*、*-B* 和 *-C* 已被克隆和表达<sup>[3-4]</sup>。其中 *DszC* 催化两步连续的单加氧反应,将 DBT 转变成为 DBTO<sub>2</sub><sup>[5]</sup>。*DszA* 和 *DszB* 将 DBTO<sub>2</sub> 转化成 2-HBP 和亚硫酸盐。*DszC* 和 *DszA* 均是末端加氧酶,其催化活力需要 *dszD* 的表达产物黄素还原酶来提供 FMNH<sub>2</sub><sup>[6]</sup>。

Omori 等<sup>[7]</sup>报道,在进行生物脱硫的过程中,如果培养基中含有硫酸盐,红球菌将会先利用硫酸盐,因而不降解 DBT;Rhee 等<sup>[8]</sup>也有类似的报道,指出当在含 DBT 的培养基中加入硫酸盐时,戈登氏菌将不会利用 DBT,表明硫酸盐能够抑制脱硫酶的产生。Piddington 等<sup>[9]</sup>认为,筛选对无机硫不敏感的脱硫菌株有利于生物脱硫的应用。本文研究了红球菌 SDUZAWQ 对 DBT 和硫酸盐的耐受性,并且对其脱硫基因及上游调控序列进行了克隆和测序。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**红球菌 *Rhodococcus* sp. SDUZAWQ 是本实验室筛选分离得到的一株能在 30℃ 下专一脱除有机含硫化合物中的硫的菌株,使用的培养基是在基本无机盐培养基(Basal Salts Medium,BSM)<sup>[10]</sup>中添加 DBT 作为硫源的 BSMD 培养基。生理生化鉴定 SDUZAWQ 为 *Rhodococcus erythropolis*。在 GenBank 中的 16S rDNA 序列检索号为 AY077846。在 DNA 重组操作中,选用的受体菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ ,由本实验室保藏,克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司;LB 培养

基金项目:国家自然科学基金项目(20590368,29977011);中国石油化工股份有限公司重点项目(104003);国家“十五”科技攻关项目(2004BA713B09-5)

\* 通讯作者。Tel:86-531-88364003 Fax:86-531-88567250 E-mail:pingxu@sdu.edu.cn

作者简介:佟明友(1955-),男,辽宁抚顺人,教授级高工,硕士,研究方向为石油微生物学。E-mail:tongmy@fripp.com.cn

其他作者:冯翠卿<sup>2</sup>,于波<sup>2</sup>,李福利<sup>2</sup>

收稿日期:2004-12-13,修回日期:2005-03-31

基<sup>[11]</sup>中添加氨苄青霉素的浓度是 100 $\mu$ g/mL。

**1.1.2 试剂和仪器:**二苯并噻吩(Dibenzothiophene, DBT)购自 Sigma 公司,纯度为 98%,用无水乙醇配制成 50mmol/L 的母液备用。所有限制性内切酶和 DNA 聚合酶均购自大连 TaKaRa 公司。UV-240 紫外分光光度计购于日本岛津公司。

## 1.2 SDUZAWQ 菌株基因组和大质粒的提取

具体操作参照文献[11]中提取基因组 DNA 和质粒的常规方法。

## 1.3 PCR 扩增

采用常规方法,根据已发表的序列<sup>[6]</sup>设计引物,100 $\mu$ L 反应体系包括:0.8mmol/L dNTP,0.4nmol/L 引物 I,0.4nmol/L 引物 II,2.5 U DNA 聚合酶。按以下程序分别对完整脱硫基因 *dszABC*、上游调控序列和 *dszD* 基因进行 PCR 扩增:①完整脱硫基因 *dszABC*(LA Taq 酶):94 $^{\circ}$ C 30s,56.6 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 5min,反应 30 个循环;②上游调控序列的扩增(*Pyrobest* DNA 聚合酶):94 $^{\circ}$ C 45s,63.2 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环;③*dszD* 基因的扩增(*Ex Taq* 酶):94 $^{\circ}$ C 45s,59 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环。

## 1.4 脱硫酶 DszD 的酶活检测

参照文献[12]的方法,使用 UV-240 紫外分光光度计在 340nm 下检测 DszD 的酶活。

## 1.5 高效液相色谱检测方法

高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)样品处理方法为:取样 0.5mL 加入 1mL 的无水乙醇混匀 2~3min 后,用 12000r/min 高速离心 20min,将上清用 0.45 $\mu$ m 的有机相滤头过滤,滤过液作为 HPLC 分析的样品。

Agilent 1100 Series 高压液相仪配置有可变波长紫外检测器(VWD),Hypersil ODS 柱子(填料颗粒 5 $\mu$ m,柱长 100mm,直径 4.6 $\mu$ m)和自动进样系统。条件为:流动相为甲醇:水=80:20,流速为 0.7mL/min,柱子恒温 30 $^{\circ}$ C,于 280nm 检测物质的吸收峰。

## 2 结果

### 2.1 DBT 对菌体生长和产物生成的影响

以 5% 的接种量,把种子液加入到含有不同浓度 DBT(0.1~10mmol/L)的 BSM 培养基中,在 30 $^{\circ}$ C 摇床上进行振荡培养。在不同的时间段内取样测定菌体的浓度,同时取样 0.5mL,置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中待使用 HPLC 检测培养液中的 DBT 浓度和 2-HBP 浓度。

由图 1 可以看出,当 DBT 浓度高达 6mmol/L 时,菌株还能够生长;在浓度为 10mmol/L 时,菌株生长

严重受到抑制,几乎不生长;当 DBT 浓度为 2mmol/L 时,摇床培养 96h 后所获得的菌体浓度最高,达 5.83g/L。从图 1 中也可以看出,随着 DBT 浓度增加,菌株的生长周期延长。用 0.2mmol/L DBT 培养的菌株的生长周期最短,40h 后就进入了衰退期;在含 0.5mmol/L DBT 的培养液中生长时,菌株在 50h 左右进入衰退期;用 2mmol/L DBT 培养液培养的菌株在 120h 才到达衰退期,比 0.2mmol/L 的生长周期延长了 2 倍左右。而且,DBT 浓度越高,菌体的生长周期越长,这是由于高浓度 DBT 会对细胞的生长产生抑制作用。

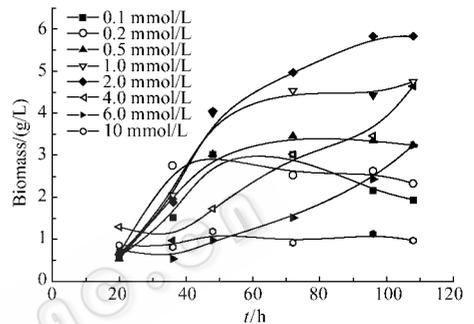


图 1 菌体在不同 DBT 浓度的培养液中的生长情况

Fig.1 Growth of bacteria cultivated with various concentrations of DBT

在 0.1~10mmol/L 的 DBT 浓度下,2-HBP 的生成情况如图 2 所示。在含有 0.5mmol/L 和 1mmol/L 的 DBT 培养液中生成的 2-HBP 浓度最高,达到 0.4mmol/L。当 DBT 的浓度为 4mmol/L 和 6mmol/L 时,培养液中也检测出了 2-HBP 的存在,表明其中还是有部分的 DBT 被利用,这说明菌体在高浓度的 DBT 下也能够生长。在 DBT 浓度为 10mmol/L 时,几乎没有产生 2-HBP,说明 10mmol/L 的 DBT 抑制了细胞的生长。

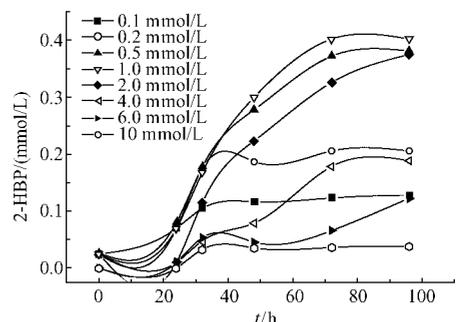


图 2 在含不同 DBT 浓度的培养液中所产生的 2-HBP

Fig.2 Production of 2-HBP in the culture with different concentrations of DBT

### 2.2 无机硫对微生物脱除有机硫的影响

在 BSM 培养基中,加入 0.2mmol/L 的 DBT,同时

加入不同浓度的  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  于  $30^\circ\text{C}$  摇床中培养 42h 后收集菌体,测定所产生的 2-HBP 浓度。由图 3 可以看出,当  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \leq 1\text{mmol/L}$  时,菌体所产生的 2-HBP 的浓度变化不大。在含  $0.2\text{mmol/L}$  DBT 的培养液中,大约生成了  $0.14\text{mmol/L}$  的 2-HBP;当  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  浓度升到  $5 \sim 10\text{mmol/L}$ ,发酵液中 2-HBP 的浓度略有下降。可以认为在菌体的整个生长过程中,利用 DBT 的浓度受所加入的  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  浓度的影响不大,这不同于 Omori 等<sup>[7]</sup>和 Rhee 等<sup>[8]</sup>的报道。他们指出,当在含 DBT 的培养基中加入硫酸盐时,红球菌和戈登氏菌将不会利用 DBT,表明硫酸盐能够抑制脱硫酶的产生。另据 Oshiro 等<sup>[13]</sup>报道, $0.5\text{mmol/L}$  无机硫能完全抑制红球菌脱硫酶的活性。本实验室筛选出的菌株 SDUZAWQ 对硫酸盐不敏感的特性,将有利于生物脱硫技术的开发与利用。

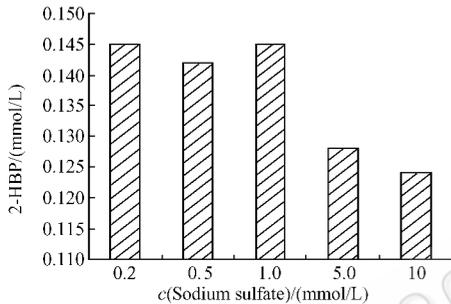


图 3 不同浓度的  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  对菌株产生 2-HBP 的影响

Fig.3 Effect of various concentrations of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  on the production of 2-HBP

### 2.3 脱硫基因和调控序列的克隆和测序

根据已发表的模式菌株 IGTS8 的脱硫基因序列设计引物,用 PCR 的方法扩增完整脱硫基因 *dszABC*、其上游调控序列以及 *dszD* 的序列(图 4)。

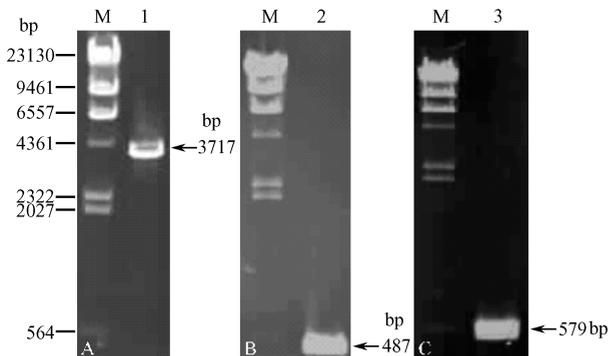


图 4 PCR 扩增完整脱硫基因 *dszABC*、其上游调控序列以及 *dszD* 序列的结果

Fig.4 Amplification of *dszABC*, upstream regulatory sequence and *dszD* by PCR

M. Lambda  $\lambda$  DNA/*Hind*III marker; A-1. Gene cluster *dszABC*; B-2.

Upstream regulatory sequence; C-3. Desulfurization gene *dszD*.

测序结果显示,红球菌 SDUZAWQ 完整脱硫基因 *dszABC* 与模式菌株 IGTS8 的同源性是 99%。该基因的序列已提交 GenBank 数据库,在 DDBJ/EMBL/GenBank 中的序列号是 AY789136。

PCR 扩增上游调控序列所使用的 *Pyrobest* DNA 聚合酶是一种具有高保真性的聚合酶,能大大地降低由 PCR 反应所带来的实验误差。经过对上游调控序列的双链测序后,得到了 487bp 的 DNA 序列,其中后面的 102bp 位于 *dszA* 基因内部,所以脱硫基因上游调控序列实际上为 385bp,其碱基序列与 IGTS8 的同源性是 100%。

脱硫酶 *DszD* 的酶活检测结果显示,转化子能使 NADH 的光密度降低,把 NADH 的氢传递给 FMN(图 5)因此认为脱硫基因 *dszD* 已被正确克隆。测序结果表明,该基因的大小为 579bp,与 IGTS8 的 *dszD* 基因序列的同源性是 100%,在 DDBJ/EMBL/GenBank 中的序列号是 AY789135。

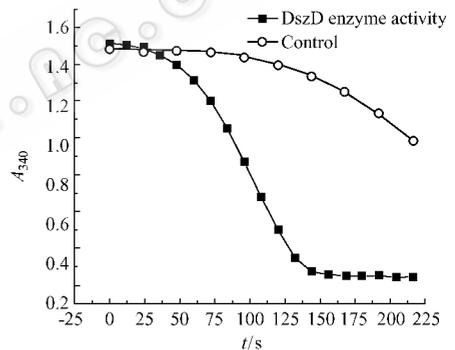


图 5 *DszD* 酶活检测

Fig.5 Enzyme activity of *DszD*

### 3 讨论

红球菌 SDUZAWQ 是一株能够在  $30^\circ\text{C}$  下专一性地脱除 DBT 中的硫原子的菌株。在较高浓度的 DBT 的存在下,该菌株仍然能够生长并且脱硫,显示出耐受 DBT 的特性。但据文献报道<sup>[7,8]</sup>,硫酸盐的存在能够阻遏脱硫酶的形成,从而抑制了 DBT 的降解。在含有  $0.2\text{mmol/L}$  DBT 的培养基中,当加入  $5 \sim 10\text{mmol/L}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  时,仍能测出 2-HBP 的生成,说明该菌能够耐受较高浓度的硫酸盐。为了研究菌株 SDUZAWQ 耐受 DBT 和硫酸盐的分子机理,我们对完整脱硫基因 *dszABC*、其上游调控序列以及 *dszD* 基因进行了克隆和测序。与模式菌株 IGTS8 比对后发现,三者的同源性分别为 99%、100% 和 100%。Reichmuth 等<sup>[14]</sup>指出,至今人们仍未纯化出任何相应的作用于脱硫酶基因 *dsz* 调控位点上的阻遏或激活

蛋白。因此还有待于在分子水平上进一步研究菌株 SDUZAWQ。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Monticello D J. Riding the fossil fuel biodesulfurization wave. *Chemtech*, 1998, **7**: 38 - 45.
- [ 2 ] McFarland B L. Biodesulfurization. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**: 257 - 264.
- [ 3 ] Denome S A, Oldfield C, Nash L J. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 6707 - 6716.
- [ 4 ] Piddington C S, Kovacevich B R, Rambosck J. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 468 - 475.
- [ 5 ] Lei B, Tu S C. Gene overexpression, purification, and identification of a desulfurization enzyme from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 as a sulfide/sulfoxide monooxygenase. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 5699 - 5705.
- [ 6 ] Gray K A, Pogrebinsky O S, Mrachko G T, et al. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnol*, 1996, **14**: 1705 - 1709.
- [ 7 ] Omori T, Saiki Y, Kasuga K, et al. Desulfurization of alkyl and aromatic sulfides and sulfonates by dibenzothiophene-desulfurizing

*Rhodococcus* sp. strain SY1. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**: 1195 - 1198.

- [ 8 ] Rhee S K, Chang J H, Chang Y K, et al. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated Gordona strain CYKS-1. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2327 - 2331.
- [ 9 ] Piddington C S, Kovacevich B R, Rambosck J. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 468 - 475.
- [ 10 ] 许平, 冯翠卿, 李福利, 等. 微生物脱有机硫的催化剂制备和条件. *科学通报*, 2002, **47**: 275 - 279.
- [ 11 ] Sambrook J, Russell W D. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [ 12 ] Matsubara T, Ohshiro T, Nishina Y, et al. Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1179 - 1184.
- [ 13 ] Ohshiro T, Suzuki K, Izumi Y. Regulation of dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *J Ferment Bioeng*, 1996, **81**: 121 - 124.
- [ 14 ] Reichmuth D S, Hittle J L, Blanch H W, et al. Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* oxidoreductase gene. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **67**: 72 - 79.

## The innate ability of *Rhodococcus* sp. SDUZAWQ to tolerate sulfur in petroleum

TONG Ming-you<sup>1</sup> CAI Xiao-feng<sup>2</sup> ZENG Yi-yong<sup>2</sup> LIU Ru-lin<sup>1</sup> XU Ping<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(<sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** Removal of sulfur from petroleum can be accomplished by various means. One method is to use microorganisms, such as bacteria. In the present study, strain *Rhodococcus* sp. SDUZAWQ was employed to test the effects of various concentrations of dibenzothiophene (DBT) and sulfate, had on this removal process. Desulfurization was accomplished, using Basal Salts Medium (BSM), supplemented with 0.2mmol/L DBT and different concentrations of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Growth of SDUZAWQ was pronounced, even when the concentration of DBT was increased to 6mmol/L. Furthermore, it should be noted that the end product of DBT desulfurization, 2-hydroxybiphenyl (2-HBP), was detected as well. This finding was significant because it demonstrated the bacteria's ability to withstand high concentrations of organosulfur. Dibenzothiophene was utilized when both DBT and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were present in the culture medium. Additionally, 2-HBP was produced. These data are in contrast to previous studies that indicated that DBT could not be metabolized by *Rhodococcus* sp. in the presence of sulfate. Finally, cloning and sequencing of the gene cluster *dszABC*, its upstream regulatory sequence and *dszD*, demonstrated that they share 99%, 100% and 100% with those of *R. erythropolis* IGTS8, respectively.

**Key words:** Dibenzothiophene, Biodesulfurization, *Rhodococcus* sp., Organosulfur, Sulfate

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (20590368, 29977011); China Petroleum & Chemical Co., Ltd. Key Program (104003); The 10th Five-Year National Key Technologies Research and Development Program (2004BA713B09-5)

\* Corresponding author. Tel: 86-531-88364003; Fax: 86-531-88567250; E-mail: pingxu@sdu.edu.cn

Other authors: MA Cui-qing<sup>2</sup>, YU Bo<sup>2</sup>, LI Fu-li<sup>2</sup>

Received date: 12-13-2004