

专一性脱硫菌脱硫活性比较与基因保守性研究

熊小超^{1,2} 李望良^{1,2} 李 信¹ 邢建民^{1*} 刘会洲¹

(¹ 中国科学院过程工程研究所 分离科学与工程青年实验室 生化工程国家重点实验室 北京 100080)

(² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 对几株能专一性脱除二苯并噻吩(DBT)中硫元素生成 2-羟基联苯的细菌,即短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)R-6、德氏假单胞菌(*Pseudomonas delafieldii*)R-8、小球诺卡氏菌(*Nocardia globerulea*)R-9、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)R-16、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)LSSE8-1 和戈登氏菌(*Gordonia nitida*)LSSEJ-1 展开研究。对照研究发现它们对 DBT 及其衍生物的代谢活性存在着一定的差异。为了从基因水平分析造成这些差别的原因,对这几株菌的脱硫基因展开了研究。根据 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 脱硫基因的保守区设计引物,PCR 扩增了 R-6、R-8 的脱硫基因。测序结果表明脱硫基因高度保守,与 IGTS8 的相关脱硫基因相似性在 99% 以上。为了进一步验证不同专一性脱硫菌的脱硫基因的保守性,PCR 扩增、克隆了 LSSEJ-1 和 R-9 的整个脱硫操纵子,结果表明脱硫基因在这两株菌中也是高度保守的。与 IGTS8 的相关脱硫基因相比较:R-9 的 *dszA* 与 IGTS8 的 *dszA* 同源性为 99.6%,LSSEJ-1 的 *dszA* 与 IGTS8 的 *dszA* 的同源性为 99.9%,R-9 和 LSSEJ-1 的 *dszB* 的同源性为 99.9%,R-9 的 *dszC* 与 IGTS8 的 *dszC* 同源性是 99.9%,LSSEJ-1 的 *dszC* 与 IGTS8 的 *dszC* 同源性为 99.1%。对比研究认为专一性脱硫嗜温菌的脱硫基因的起源可能相同。

关键词 二苯并噻吩,生物脱硫,专一性脱硫,基因序列,基因保守性,假单胞菌

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2005)05-0733-05

加氢脱硫(HDS)是目前工业上普遍使用的脱硫方法,但是该方法难以脱除复杂环状有机分子,例如被用作生物脱硫(BDS)中的模型化合物——二苯并噻吩(DBT)中的硫。生物脱硫具有选择性高、反应条件温和,并且能够有效脱除 DBT 及其衍生物中的硫的优点^[1]。目前发现的具有特异性脱硫途径的细菌有革兰氏阳性细菌(G^+),如红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)IGTS8^[2]、芽孢杆菌 *Bacillus* sp.^[3]、戈登氏菌 *Gordonia* sp.^[4]等,以及革兰氏阴性细菌(G^-)假单胞菌 *Pseudomonas* sp.^[5]。以 IGTS8 作为研究对象,“四硫途径”脱硫的相关基因被识别与克隆^[6]。DNA 序列分析表明,脱硫相关基因包含 3 个基因 *dszA*、*dszB* 和 *dszC*。它们分别编码 3 种酶: DszA、DszB 和 DszC。这 3 个基因同向转录,*dszA* 的终止密码和 *dszB* 的起始密码重叠,在 *dszB* 和 *dszC* 之间有一个 10bp 的间隔。

1997 年,Denis-Larose 等^[7]以多株 *Rhodococcus* sp. 作为研究对象,阐明了在红球菌中 *dsz* 基因型的高度保守性。2000 年 Duarte 等^[8]运用 PCR-DGGE 手段研究了石油污染土壤的菌群改变情况,他比较了

37 个 *dszA* 序列,证明其高度保守。其中的 30 个序列与 IGTS8 的相似性超过 98%,另两个序列稍有差别,还有 5 个序列的相似性为 95%。Ishii 等^[9]研究了嗜热菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 的脱硫相关基因,分别命名为 *tdszA*、*tdszB* 和 *tdszC*,但是结果表明它们与红球菌 IGTS8 的脱硫基因的同源性并不如前所述的那么高;*tdszA* 编码的蛋白 TdszA 与 DszA 的同源性为 64.5%;*tdszB* 编码的蛋白 TdszB 与 DszB 的同源性为 54.1%;*tdszC* 编码的蛋白 TdszC 与 DszC 的同源性为 51.5%。另外已经报道的 *Bacillus subtilis* 的脱硫基因(GenBank accession AB076745)的同源性为 70%,这与文献报道的脱硫基因高度保守也不相符。

本实验室已经从土壤中分离出几株具有专一性脱硫途径的细菌,分别是短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)R-6、德氏假单胞菌(*Pseudomonas delafieldii*)R-8、小球诺卡氏菌(*Nocardia globerulea*)R-9 和球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)R-16^[10]、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)LSSE8-1 和戈登氏菌 LSSEJ-1(*Gordonia nitida*)等^[11]。随后开展了脱硫相关基因的研究,

基金项目:国家 973 项目(2000048004)、国家 863 计划(2002AA213041)、国家自然科学基金(30370046)

* 通讯作者。Tel 86-10-62555005 E-mail jmxing@home.ipe.ac.cn

作者简介:熊小超(1980-)男,湖北黄冈人,博士研究生,研究方向为生物脱硫。E-mail xcxiang@home.ipe.ac.cn

收稿日期 2004-11-29,修回日期 2005-05-23

LSSE8-1 的 3 个脱硫结构基因(*dszABC*)分别为 1.3、1.0 和 1.2kb。A 基因和 B 基因与 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 的相关基因的同源性为 100% ,C 基因的同源性为 99%^[11]。本文首先对这几株专一性脱硫菌脱硫活性进行比较。随后为了从基因水平研究这几株菌的脱硫代谢之间的差异 ,开展了脱硫相关基因的研究。其中 R-8 是迄今为止仍然保持高脱硫活性的不多见的革兰氏阴性(*G⁻*)菌 ,脱硫相关基因未见报道。它能脱除含硫量为 261mg/L 的加氢脱硫柴油中 65% 的硫^[12] ,可见菌株 R-8 具有很好的应用开发前景。因此本文对 *Pseudomonas delafieldii* R-8 和 *Bacillus brevis* R-6 的脱硫相关基因进行了扩增与序列分析。为了进一步验证脱硫基因在不同专一性脱硫菌中的保守性 ,对 LSSEJ-1 和 R-9 的脱硫基因进行了克隆与序列测定。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 专一性脱硫菌和质粒 :本实验采用的菌株见表 1。pGEM-T 质粒载体购于 Promega 公司。

表 1 专一性脱硫菌株
Table 1 Specific desulfurization bacteria

Bacteria	Source	Strain No.
<i>Bacillus brevis</i>	CGMCC 0571	R-6
<i>Pseudomonas delafieldii</i>	CGMCC 0570	R-8
<i>Nocardia globerula</i>	CGMCC 0781	R-9
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	CGMCC 0643	LSSE8-1
<i>Gordonia nitida</i>	CGMCC 0700	LSSEJ-1

1.1.2 试剂和仪器 :二苯并噻吩(DBT)、苯硫醚、DBT 砷纯度为 99% ,4 ,6-二甲基二苯并噻吩(4 ,6-DMDBT)纯度为 95% ,以上试剂均是美国 Acros Organics 公司产品 ;二羟基联苯(2-HBP)为日本的 TCI 公司生产 ;*Taq* DNA 聚合酶和限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品 ;PCR 所用的引物由 TaKaRa 公司合成。实验中的正己烷和甲醇为色谱纯 ,其余试剂为分析纯。TECHNE PCR 仪由英国 Techne 公司生产。

1.2 脱硫特性分析

1.2.1 细菌培养 :脱硫细菌生长培养基为 BSM^[11]。其中加入 0.1mmol/L 二苯并噻吩(DBT)或相应含硫化合物作为硫源。固体平板由 1.5% 的琼脂制成。细菌在 30℃、转速为 200r/min 的摇床上培养。

1.2.2 细菌生长和脱硫活性测定 :菌体的生长情况用比浊法测定 ,DBT 和 HBP 采用外标法定量^[11]。

脱硫比活性用每克细胞每小时代谢 DBT 的量 $\mu\text{mol}(\text{g}\cdot\text{h})$ 表示。

1.3 细菌总 DNA 的提取

分别将单菌落接种于 BSM 液体培养基中 ,按 Wilson 方法^[13]提取总 DNA。

1.4 R-6 与 R-8 脱硫基因的 PCR 扩增和序列测定

为了成功扩增出脱硫基因 ,首先对在 GenBank 上已经公布 *Bacillus subtilis* 的脱硫基因(GenBank accession No. AB076745)与 IGTS8 *Rhodococcus* sp. (GenBank accession No. L37363)的脱硫操纵子进行保守性比对 ,根据保守区设计引物 primer1 和 primer2。primer1 的序列是 5'-GAGTTCGTCGACCAGGTG-3' ,primer2 的序列是 5'-GCTGAGGTGG TATCCGAAC-3'。

PCR 反应以 R-6、R-8 的总 DNA 为模板 ,以 primer1 与 primer2 为引物 ,在 TECHNE PCR 仪上进行。反应体系 :去离子水 131 μL ,10 \times 反应缓冲液 20 μL ,25mmol/L MgCl_2 12 μL ,上、下游引物(25 $\mu\text{mol/L}$)各 4 μL ,10mmol/L dNTP 溶液 2 μL ,40% 二甲基亚砷 25 μL ,模板 1 μL ,*Taq* 酶 1 μL ,反应总体积 200 μL ,反应前分装为 4 管。反应条件 :94℃ 8min ;94℃ 1min ,55℃ 1min ,72℃ 2min ,30 个循环 ;72℃ 10min。同时设立不加模板 DNA 作为阴性对照反应。反应结束后取部分 PCR 产物在 0.75% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。PCR 产物送 TaKaRa 公司测序。设计引物 primer3、primer4 对 *dszA* 进行扩增 ,primer3、primer4 的序列分别是 5'-ATGACTCAACAACGACAA-3'和 5'-TCATGAAGGTTGTCCTTGC-3'。设计引物 primer5、primer6 对 *dszC* 进行扩增 ,primer5、primer6 的序列分别 5'-ATGACACTGTCACCTGAA-3' 和 5'-TCAGGAGGTGAAGCCGGG-3'。其他操作与上述步骤相同。

1.5 R-9 与 LSSEJ-1 脱硫基因的克隆与序列测定

根据 IGTS8 的脱硫基因序列设计引物如下 :上游引物是 5'-GACAAGCTTCAACGAACCTCACCCAAACAC-3' ,下游引物是 5'-CTCAAGCTTCGCCTGAAACACCCTCATCCAC-3' ,上下游引物的 5'端均设计了 *Hind*Ⅲ 酶切位点 ,其目的是方便克隆的酶切分析。PCR 采用冷启动法 ,反应条件 :94℃ 1min ;94℃ 1min 54℃ 1min ,72℃ 4min ,30 个循环 ;72℃ 10min ,4℃ 保存。取 10 μL 产物进行电泳分析。PCR 产物上样电泳 ,利用 DNA 纯化回收试剂盒进行回收 ,回收物取 1 μL 和 2 μL 进行凝胶电泳分析以确认回收物的浓度。然后按如下体系进行连接 :2 \times rapid ligation buffer 5 μL ,T4 DNA ligase 1 μL ,pGEM-T Vector 1 μL ,纯化后的 PCR 产物 3 μL ,总体积 10 μL 。在 15℃ 下连接

3h。用 CaCl_2 法制备感受态细胞 ,然后用热击法进行转化反应。通过蓝白筛选结合 *Hind* III 酶切提取的质粒检验挑选出阳性克隆。然后将阳性克隆质粒送至上海基康生物技术有限公司进行测序。

2 结果和讨论

2.1 细菌脱硫特性研究

这 5 种专一性脱硫菌都可以在以 DBT 等作为唯一硫源的基础培养基上生长。初始菌浓度为 $OD_{600} = 0.4$,初始底物 DBT 浓度为 0.2mmol/L ,这 5 株菌的生长情况见图 1。

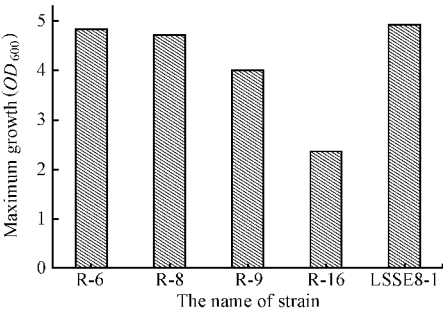


图 1 专一性脱硫菌在以 DBT 为硫源的生长情况
Fig.1 The growth of desulfurization bacteria in a DBT medium

由图 1 可以看出各专一性脱硫菌在以 DBT 为硫源的培养基上生长状况各不相同 ,其中 LSSE8-1 生长最为旺盛。它们对 DBT 代谢速率也不相同 ,脱硫速率采用 $\mu\text{mol DBT 降解/h} \cdot \text{g 干细胞}$ 表示。显示出了各专一性脱硫菌脱硫速率的差异 ,R-8 的脱硫速率最大 ,达到 4.72 ;LSSE8-1 次之 ,为 3.75 ;R-6 的脱硫速率最低 ,为 1.20 。由以上可以看出生长状态良好的细菌其脱硫速率并不一定高。

2.2 R-6、R-8 脱硫相关基因的扩增和测序

R-6、R-8 的脱硫基因的 PCR 产物电泳结果分别如图 2 和图 3 所示。结果显示通过 PCR 扩增到了 3 个不同大小的 DNA 片段。通过与 DNA 标准比较推测它们大小分别为 1.3 , 1.4 和 1.2kb 左右。PCR 的顺利扩增说明脱硫基因的保守性可能较高。

以 R-6、R-8 的总 DNA 为模板 PCR 扩增出来的 3 段 DNA 片段进行了序列测定。*dszA* 的长度是 1362bp ,由起始密码 ATG 始 ,以终止密码 TGA 止 ,编码的酶由 453 个氨基酸组成 ,分子量 49561 。*dszB* 长度是 1098bp ,编码的蛋白质是由 365 个氨基酸构成 ,分子量 38983 。*dszC* 是 1254bp ,编码一个分子量为 44880 的由 417 个氨基酸构成的蛋白质。R-6 、R-8 的这 3 段基因与已公布的 IGTS8 的脱硫基因比较与 IGTS8 的相关脱硫基因的同源性超过了 99% 。

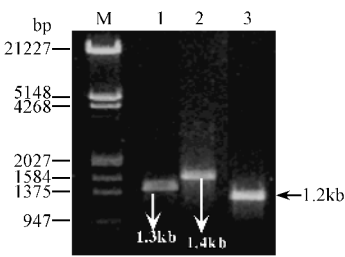


图 2 PCR 扩增 R-6 的脱硫基因结果
Fig.2 Amplification of desulfurization genes from R-6 by PCR
M. Lamada DNA/*Hind* III + *Eco*R I markers ;1. *dszA* ;2. Conserved sequence 3. *dszC*.

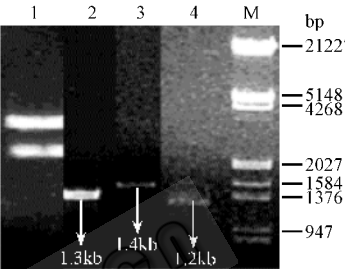


图 3 PCR 扩增 R-8 的脱硫基因结果与 LSSEJ-1、R-9 脱硫操纵子克隆
Fig.3 Amplification of desulfurization genes from R-8 by PCR and analysis of *dsz* cloned plasmid
M. Lamada DNA/*Hind* III + *Eco*R I markers ;1. Clone of the *dsz* operon ;2. *dszA* 3. Conserved sequence ;4. *dszC*.

2.2 LSSEJ-1、R-9 脱硫操纵子的 PCR 扩增与克隆

PCR 扩增整个脱硫操纵子扩增出的 DNA 片段约为 4.5kb 。扩增出来的片段不仅包括脱硫基因 ,还包括脱硫基因的上游和下游部分序列。由于 PCR 产物的两端都有 *Hind* III 酶切位点 ,而载体上和 IGTS8 脱硫操纵子上都没有 *Hind* III 酶切位点 ,因此可以通过用 *Hind* III 酶切提取的质粒检验克隆是否成功。图 3 的结果显示酶切后电泳产生两条带 ,一个约 3.0kb ,另一个约 4.5kb 。电泳结果与预测一致 ,表明整个脱硫操纵子片段已克隆成功。

2.3 LSSEJ-1、R-9 脱硫基因的测序

核苷酸和氨基酸分析软件为 DNAMAN 和美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information , NCBI , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blast 程序。LSSEJ-1、R-9 脱硫基因的测序的结果显示 ,这 4 段序列的同源性很高 ,只有个别的碱基不同。对 R-9 而言 ,A 基因与 IGTS8 的 A 基因的同源性为 99.6% 。共有 5 个碱基发生了突变 :第 97 个碱基是 G 而不是 A ,第 477 个碱基是 C 而不是 T ,第 535 个碱基是 G 而不是 A ,第 598 个碱基中 C 而不是 T ,第 664 个碱基是 G 而不是 A。这

5个碱基的改变导致了其所编码的蛋白有5个氨基酸发生了变化。即第33个氨基酸由天冬氨酸突变成了甘氨酸,第160个氨基酸由酪氨酸突变成了组氨酸,第179个氨基酸由谷氨酸突变成了甘氨酸,第200个氨基酸由缬氨酸突变成了丙氨酸,第222个氨基酸由谷氨酸变成了甘氨酸。对LSSEJ-1而言,A基因与IGTS8的A基因的同源性为99.9%;只有一个碱基发生了突变,即第393个碱基从G突变成了A,这样也导致了第132个氨基酸由缬氨酸变成了甲硫氨酸。由于这些突变并没有改变反应的性质,因此,以上列出的这些氨基酸并不是活性位点的氨基酸。最近,Konishi对A酶的研究表明A酶只有第345个氨基酸残基的改变才会影响其活性,从而认为第345个氨基酸残基才是其活性部位^[14]。这一研究与上述结果是相符的。

R-9和LSSEJ-1的B基因与其它的同源性也很高。二者的B基因与IGTS8的B基因的同源性都高达99.9%。二者各有一处碱基发生了突变。R-9的第965处碱基由A突变成了G。这样的变化导致第322处的氨基酸由天冬氨酸变成了甘氨酸。LSSEJ-1的B基因的第281个碱基由T突变成了G,但这样的变化并没有导致其所编码的氨基酸序列的变化。

R-9与IGTS8的C基因同源性最高,达到99.9%。整个序列中,仅有一个碱基发生了突变,即第265个碱基由T突变成了C,这样的变化导致其C酶上第89个氨基酸由丝氨酸变成了脯氨酸。戈登氏菌LSSEJ-1的C基因与IGTS8的同源性为99.1%,即C基因上有11个碱基发生了突变。它们依次是第38个碱基由G突变成了C,第39个碱基由C突变成了G,第90个碱基由G突变成了A,第91个碱基由T突变成了G,第92个碱基由G突变成了T,第129个碱基由T突变成了G,第131个碱基由C突变成了T,第132个碱基由G突变成了C,第393个碱基由C突变成了T,第863个碱基由G突变成了T,第1133个碱基由T突变成了C。这样的变化导致其所编码的C酶的氨基酸有7处发生了变化。即第13个氨基酸由精氨酸变成了脯氨酸,第25个氨基酸由精氨酸变成了缬氨酸,第26个氨基酸由甘氨酸变成了色氨酸,第31个氨基酸由色氨酸变成了缬氨酸,第44个氨基酸由丝氨酸变成了苯丙氨酸,第288个氨基酸由甘氨酸变成了天冬氨酸,第378个氨基酸由脯氨酸变成了丝氨酸。

R-6、R-8、LSSEJ-1和R-9的脱硫结构基因的序列结果分析表明这些细菌之间脱硫特性之间的差异

并不是由它们的脱硫结构基因不同引起的。上述实验结果表明,即使不同的细菌之间的结构基因高度保守,但是各自的脱硫活性和生长状况还是有一定的差别。这与细菌本身的特性密不可分,例如辅酶的供给、溶剂耐受性甚至是是否产生表面活性剂都对脱硫活性有影响。

虽然Duarte的方法对于研究特定环境下的微生物的生态组成和整个微生物群落的脱硫基因保守性十分有效^[8],但是却很难建立单个微生物与脱硫基因保守性之间的对应关系。上述研究再次证明了脱硫结构基因在不同地域、不同细菌之间(包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌)是极其保守的,说明细菌可能在一定程度上在利用DBT作为硫源进化上有着相关性。细菌在专一性降解DBT作为唯一硫源时表现出高度的经济利用原则:DBT和它的类似物,如DBT砜或硫蒽-9-酮,能诱导脱硫酶的生成;相反,即使在DBT存在的情况下,硫酸盐或一些含硫化合物,如甲硫氨酸与半胱氨酸等含硫氨基酸能强烈地抑制脱硫酶的生成^[15]。DBT在环境与微生物之间的作用与一般环境污染物有所不同,DBT不仅作为降解型物质参与代谢,而且直接提供细胞生长和代谢的硫源。一些对环境微生物的研究也表明,微生物种间的基因的水平迁移是经常发生的^[16]。综合以上分析可以推断:不同细菌的脱硫基因来源可能相同,脱硫基因在这些细菌之间的转移也许是以整个操纵子的形式进行。

3 结论

从脱硫代谢产物分析可以看出,虽然几株菌都是专一性脱硫,并且都没有中间代谢产物积累,但其生长情况和脱硫活性存在一定的差异。对照研究发现短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*) R-6、德氏假单胞菌(*Pseudomonas delafeldii*) R-8、小球诺卡氏菌(*Nocardia globerulea*) R-9、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*) R-16、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) LSSE8-1和戈登氏菌(*Gordonia nitida*) LSSEJ-1的脱硫结构基因和其他专一性脱硫菌一样与IGTS8相关基因也是高度同源的,显示出了在进化关系上的相关性。整个研究表明,脱硫菌脱硫特性的差异并不是由于结构基因引起的。因此,对细胞整体特性的改造、代谢网络的分析和对脱硫结构基因调控区域的研究显得十分必要。

文章中涉及的脱硫基因的测序结果已提交GenBank数据库,R-6、R-8、R-9和LSSEJ-1在DDBJ/

EMBL/GenBank 中的核酸序列数据库索取号分别为 DQ062161、DQ062154、AY714059 和 AY714057。

参 考 文 献

- [1] Gray K A , Mrachko G T , Squires C H. Biotransformation of fossil fuels. *Curr Opin Microbiol* 2003 **6** (3) : 229 – 235.
- [2] Monticello D J. Biotransformation and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol* 2000 **11** (6) : 540 – 546.
- [3] Kohtaro K , Toshiki F , Yasuhiro N , et al. Biotransformation of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 2001 , **91** (3) : 262 – 266.
- [4] Sung-Keun R , Je H C , Young K C , et al. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordonia* strain CYSK1. *Applied Environmental Microbiology* , 1998 **64** (6) : 2327 – 2331.
- [5] John R G , Edwin S O , Daniel C S. Microbial desulfurization of dibenzothiophene : A sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiology Letters* , 1993 **107** : 31 – 36.
- [6] Denome S A , Olson E S , Young K D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain. *Appl Environ Microbiol* , 1993 **59** (9) : 2837 – 2843.
- [7] Denis-Larose C , Labbé D , Bergeron H , et al. Conservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococci*. *Applied Environmental Microbiology* , 1997 **63** (7) : 2915 – 2919.
- [8] Duarte G F , Rosado A S , Seldin L. et al. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. *Applied Environmental Microbiology* , 2001 **67** (3) : 1052 – 1062.
- [9] Ishii Y , Konishi J , Okada H , et al. Operon structure and functional analysis of the genes encoding thermophilic desulfurizing enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000 **270** (1) : 81 – 88.
- [10] Jiang C , Liu H , Xie Y , et al. Isolation of soil bacteria species for degrading dibenzothiophene. *Chinese J Chem Eng* , 2002 **4** (10) : 420 – 426.
- [11] Gou Z , LUO M , Li X , et al. Desulfurization metabolite of *Rhodococcus erythropolis* LSSE-1 and its related desulfurization gene fragments. *Chinese Science Bulletin* , 2003 **48** (22) : 2703 – 2709.
- [12] 姜成英 李 磊 杨永谭 , 等. 表面活性剂对微生物脱除柴油中有机硫的影响. *过程工程学报* , 2002 **2** (2) : 122 – 126.
- [13] Wilson K , Ausubel F M , Brent R , et al. Preparation of genomic DNA from bacteria : Current Protocols in Molecular Biology. New York : Wiley publishers , 1987 : 241 – 242.
- [14] Konishi J , Maruhashi K. Residue 345 of dibenzothiophene (DBT) sulfone monooxygenase is involved in C-S bond cleavage specificity of alkylated DBT sulfones. *Biotechnol Lett* 2003 **25** (14) : 1199 – 1202.
- [15] Kilbane J J , Bielagajones B A , Killbane J J. Utilization of organosulfur compounds by axenic and mixed culture of *R. rhodochrous* IGTS8. *J Gen Microbiol* , 1993 **139** : 3123 – 3129.
- [16] Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* , 1999 **42** : 73 – 91.

Comparison of the desulfurization activity among several bacteria and analysis of the conservation of their desulfurization genes

XIONG Xiao-chao^{1 2} LI Wang-liang^{1 2} LI Xin¹ XING Jian-min^{1*} LIU Hui-zhou¹

(¹ Institute of Process Engineering , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract : Several bacteria , *Bacillus brevis* R-6 , *Pseudomonas delafieldii* R-8 , *Nocardia globerula* R-9 , *Bacillus sphaericus* R-16 , *Rhodococcus erythropolis* LSSE-1 and *Gordonia nitida* LSSEJ-1 , which can convert dibenzothiophene into 2-hydroxybiphenyl and sulfate , were investigated. Desulfurization products were quantitatively determined by HPLC. Result revealed that each of these bacteria desulfurize DBT at a different rate. In order to obtain more information , the fragments encoding desulfurizing enzymes were studied. Desulfurization genes of R-6 and R-8 were separately amplified via PCR with specific primers based on the related sequences of *Rhodococcus* sp. IGTS8. Both sequences are minimally 99% related to IGTS8 sequence. Afterwards , *dsz* operon of LSSEJ-1 and R-9 were amplified and cloned. Sequences are also highly conservative. Data shows that identity of *dszA* between R-9 and IGTS8 is 99.6% , and identity of *dszA* between LSSEJ-1 and IGTS8 is 99.9% ; *dszB* sequence of R-9 and LSSEJ-1 is 99.6% similarity to their counterpart sequence from IGTS8 ; identity of *dszC* between R-9 and IGTS8 is 99.9% , and identity of *dszC* between LSSEJ-1 and IGTS8 is 99.1% . It may be deduced that the origins of desulfurization genes from mesophilic bacteria are the same.

Key words : Dibenzothiophene , Biotransformation , Selective desulfurization , *Pseudomonas* , Gene conservation

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G2000048004) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA213041) ; Chinese National Natural Science Fund (30370046)

* Corresponding author. Tel 86-10-62555005 ; E-mail jmxing@home.ipe.ac.cn

Received date : 11-29-2004