

脱硫菌 Fds-1 的分离鉴定及其对柴油脱硫特性的研究

马 挺¹, 佟明友^{1,2}, 张 全², 梁凤来¹, 刘如林^{1*}

(¹ 南开大学生命科学学院 天津 300071)

(² 中国石油化工股份有限公司抚顺石油化工研究院 抚顺 113001)

摘 要 从含硫土壤中分离筛选出一株专一性脱硫菌 Fds-1, 经生理生化指标和 16S rRNA 序列分析鉴定其属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。用 Gibb's 试剂显色和气相色谱-质谱联用分析表明, 该菌株通过“4S”途径脱除有机硫。实验发现 Fds-1 的最佳脱硫活性在 30℃, 在此温度下 72h 内能脱除约 0.5mmol/L DBT 中的有机硫。Fds-1 菌株对有机硫化物的利用情况和柴油脱硫前后烃组分比较都进一步证明该菌株适合于柴油生物脱硫。利用休止细胞对不同组分柴油的脱硫研究表明, 脱硫菌株 Fds-1 对精制柴油中的 DBT 类化合物的降解能力强。因此, 该菌株对精制低硫柴油的深度脱硫具有应用意义。

关键词 生物脱硫; 二苯并噻吩; 多相分类鉴定; 枯草芽孢杆菌; 柴油

中图分类号 Q939 Q938 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2006)01-0104-07

含硫燃料会污染环境, 各国对燃料中硫含量提出日益严格的要求^[1]。最新《世界汽车燃油规范》规定使用无硫或硫含量为 5~10mg/L 的汽油和柴油。2002 年我国实施的新燃油标准(GB252-2000)规定, 柴油中硫化物的含量不得超过 200mg/L(<0.2%), 目前正在制定新的标准即含硫量不大于 50mg/L(资料来源:剑桥能源协会)^[2]。传统的加氢脱硫(Hydro-desulfurization, 以下简称 HDS)对石油中的少量有机硫很难脱除。生物脱硫(Bio-desulfurization, 以下简称 BDS)可以脱除 HDS 技术难脱除的残余有机硫。BDS 技术在美国和日本开发较早, 国内近年来开展了此项研究, 并取得了一定的成绩^[3~6]。

二苯并噻吩(DBT)是石油馏分中有机硫化物的代表。BDS 的早期工作主要集中于对可降解 DBT 微生物的筛选, 最初筛选到的菌株不能专一性的脱除 DBT 中的硫元素, 降低了烃的燃烧值^[7]。美国筛选的专一性脱硫菌 IGTS8, 可通过“4S”途径^[8]将 DBT 降解为 2-羟基联苯(2-HBP), 其特点是硫被氧化为硫酸盐进入水相, 没有热值的损失^[9]。

目前所报道的用于脱硫的菌株多为诺卡氏放线菌型的菌株如红球菌^[8], 本文则首次报道一株以“4S”途径脱硫的菌株——枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Fds-1 的筛选、鉴定及其对柴油的脱硫特性研究, 表明该菌株适合于脱除低硫柴油中的 DBT 及

其衍生物, 对精制低硫柴油的深度脱硫有应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 脱硫菌株 Fds-1 从胜利油田高硫油井附近的油浸土壤中分离得到, 诱变和驯化后交由中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)保藏。

1.1.2 培养基: ①基本培养基: 葡萄糖的质量浓度为 10.0g/L, 其它成分的质量浓度分别为 NH₄Cl 2.0g/L, KH₂PO₄ 6.3g/L, K₂HPO₄ 8.0g/L, MgCl₂·6H₂O 0.2g/L, 微量元素溶液母液和维生素溶液母液的加入量各为 1.0mL/L, pH 值 7.0~7.2。微量元素母液含有 0.5g/L FeCl₂·4H₂O, 0.5g/L ZnCl₂, 0.5g/L MnCl₂·4H₂O, 0.1g/L NaMoO₄·2H₂O, 0.05g/L CuCl₂, 0.05g/L NaWO₄·2H₂O 和 120mmol/L HCl。维生素母液含有 400mg/L 泛酸钙, 200mg/L 肌醇, 400mg/L 烟酸, 400mg/L 盐酸吡哆醇, 200mg/L 对氨基甲苯和 0.5mg/L 维生素 B12。②选择培养基: 在上述基本培养基中加入一定浓度的 DBT 或其它含硫有机化合物。

1.1.3 试剂 二苯并噻吩(DBT), 4-甲基二苯并噻吩(MDBT), 4,6-二甲基 DBT(DMDBT), 苯并噻吩(Benzothiophene, BT), 3-甲基苯并噻吩(MBT), 噻吩(Thiophene, T), 2-甲基噻吩(MT), 2,5-二甲基噻吩

基金项目: 中国石油化工股份有限公司资助项目(101080); 天津市自然科学基金资助项目(05YFJMJC00700)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-22-23505967; E-mail: meor@nankai.edu.cn

作者简介: 马 挺(1977-), 男, 天津市人, 博士后, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: tingma@nankai.edu.cn

收稿日期 2005-05-11, 接受日期 2005-06-06, 修回日期 2005-07-14

(DMT)和 2-甲基硫茛(MTN)购自 ACOROS 公司;苯硫醚(thioanisole)苯硫酚(thiophenol)茛(fluorine)二苯并呋喃(dibenzofurane, DBF)和噻吨-9-酮(Thioxanthen-9-one, TXTO)购自 Aldrich 公司;各种限制性内切酶、T4 连接酶、PCR 所用的高保真 DNA 聚合酶、dNTPs、X-gal 及 IPTG 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 专一性脱硫菌株的筛选

从山东孤岛油田、新疆独山子炼油厂等地采集被高硫原油污染的土壤样品 30 个。分别称取 1g 样品接种在 50mL 选择培养基(含 0.27mmol/L DBT)中,于 30℃ 200r/min 恒温振荡培养 4d。培养物自然沉降 2h,取上清转接到同样培养基中,同样条件培养 4d。取上述培养物,室温下 5000g 离心 10min,取上清液作 Gibb's 分析(DBT 经“4S”途径降解后,生成的产物 2-HBP 与 2,6-二氯醌-4-亚胺在碱性环境下反应生成蓝色靛酚衍生物)。取 Gibb's 反应呈阳性的培养物涂于选择培养基琼脂平板上,30℃ 静置培养 2~3d,挑取单菌落接种于上述相同的选择培养基中,30℃ 200r/min 恒温振荡培养 2d,挑选生长状态良好的菌株培养物做 Gibb's 分析,有蓝色反应的菌株即为能够专一性断裂 DBT 中的 C-S 键,生成 2-HBP 与硫酸盐的目的菌株。

1.3 生理生化指标的测定

各项生理生化指标的测定均参照参考文献 [10, 11] 以及《常见细菌系统鉴定手册》[12] 的方法进行。

1.4 16S rRNA 的扩增、测序和系统发育树的构建

16S rRNA 的扩增参照文献 [13] 描述的方法,PCR 产物连接到 pGEM T-easy vector 上,序列测定由大连宝生物公司完成(测序号 TJS1371)。将菌株 Fds-1 的 16S rRNA 序列递交 GenBank 进行序列比对,将从数据库中获得 22 种不同芽孢杆菌的 16S rRNA 序列用 Clustal W version 1.8 和 Mega2.0 进行各序列间的同源性和进化距离的分析与比较,并构建系统发育树。

1.5 DBT 脱硫实验

取活化的 Fds-1 种子液以 1% 接种量接入 50mL/500mL 的摇瓶中,加入终浓度 0.27mmol/L 的 DBT。30℃ 振荡培养,不同时间取样分析菌体浓度及菌株脱硫活性。

1.6 生物催化剂的制备和柴油脱硫实验

将菌株在以 0.2mmol/L DBT 为单一硫源的基本培养基中培养 48h,离心收集细胞。0.9% 的生理盐水洗涤两次,用 0.067mol/L 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH7.5)重新悬浮细胞成浓度为 11g/L 的休止细胞,

加入 1%(W/V) 的葡萄糖,制备成生物催化剂,用于柴油脱硫。取此生物催化剂 50mL 接入 500mL 的摇瓶中,加入 15mL 精制柴油。30℃ 振荡培养,不同时间取样分析总硫含量。

1.7 分析方法

1.7.1 菌体浓度分析 细胞浓度的测定利用细胞干重与细胞悬液在 660nm 的光密度(OD_{660})之间的线性关系[14]。

1.7.2 Fds-1 菌株脱硫活性的测定 DBT 中的硫被“4S”途径微生物利用后终产物为 2-HBP。Gibb's 试剂与 2-HBP 反应生成蓝色靛酚衍生物。 OD_{595} 比色后,通过标准曲线可以得出培养物中 2-HBP 的摩尔浓度,终产物 2-HBP 的浓度反映了菌种的脱硫活力[14]。

1.7.3 Fds-1 菌株降解 DBT 的代谢产物分析:将 Fds-1 菌株接入含有 0.54mmol/L DBT 的基本培养基中,培养 48h,用乙酸乙酯萃取培养液。取 2 μ L 萃取液,采用 PE Autosystem GC/Q-Mass 910 气相色谱-质谱联用仪分析。

1.7.4 硫含量的分析 柴油中的硫元素的质量浓度用 WK-2D 微库仑仪测定。

1.7.5 硫组分的分析 柴油中的含硫组分用 GC-AED 联用定性分析测定。

2 结果

2.1 筛选、诱变和驯化

从 160 个菌株中筛选出一株对 DBT 具有专一性脱硫能力的菌株,将其接入基础盐加 DBT 的富集培养基中,28~30℃ 振荡培养 2d。取上述培养液离心,收集细胞,再用生理盐水洗涤后制成适当浓度的菌悬液。分装 10mL 菌悬液在培养皿中,置 30W 紫外灯下,距 20cm 照射 1~6min,每隔 30s 取样。不同紫外线(U.V.)处理时间的菌液梯度稀释后涂布在培养皿上,与没经照射的对照细胞涂布培养皿一起培养 2d。通过这些培养皿上生长的菌落数可以计算不同照射时间的致死率。选致死率在 70% 左右的存活细胞进行单菌落扩大培养后,接入摇瓶作脱硫能力对比。从对比实验中选出脱硫能力强的突变株,将该突变株接至基础盐加 DBT 的富集培养基中反复传代培养驯化,脱硫活力可提高 10%~40%,将驯化 1 个月后得到的菌株编号为 Fds-1。

2.2 形态特征

菌株 Fds-1 革兰氏染色为阳性,好氧,杆状细胞。细胞壁厚,周生鞭毛,产芽孢,位于细胞中部。

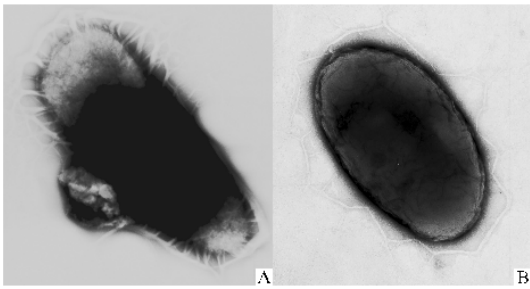


图 1 菌株 Fds-1 的电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of strain Fds-1

A : Spore (23000 ×) ; B : Early bacterium cell without spore (30000 ×) .

菌体大小为(0.5 ~ 1.0) μm × (3 ~ 8) μm ,平均长度 4.6 μm。在选择培养基平板上培养 48h 后可形成直径为 1 ~ 2mm 的菌落,干燥,边缘不齐,黄色或乳白色,培养 72h 后菌落突起,边缘皱褶,金黄色或暗红棕色。

2.3 生理生化特征

表 1 为菌株 Fds-1 的主要生理生化特征。

表 1 Fds-1 菌株的生理生化特征

Table 1 The characters of physiology and biochemistry for Fds-1

Characteristics	Results		Characteristics	Results	
	Fds-1	<i>B. subtilis</i>		Fds-1	<i>B. subtilis</i>
Spore staining	+	+	Nitrate reduction	+	+
Catalase	+	+	Growth at 50℃	+	W
Anaerobic growth	-	W	Growth at pH5.7	+	+
V. P.	+	+	Growth with 7% NaCl	-	+
V. P. < pH6	+	+	Starch hydrolysis	+	+
V. P. > pH7	-	-	Glutin liquefaction	+	+
M. R.	+	+	Casein decompose	+	+
Glucose oxidation	-	-	Glucose fermentation	+	+
Citrate utilization	+	+	Xylose fermentation	+	+

+. Positive ; -. Negative ; w. Weak reaction.

2.4 构建系统发育树

测得菌株 Fds-1 编码 16S rRNA 的基因序列有 1542bp,在 GenBank 中的登记注册号为 AY920496。根据 16S rDNA 序列相似性构建系统发育树(图 2)。其中 Fds-1 与 *Bacillus subtilis* (AF333249) 的亲缘关系最近,相似性大于 99 % ,形成一个簇群。根据以上特征分析,故将 Fds-1 分类为枯草芽孢杆菌,命名为

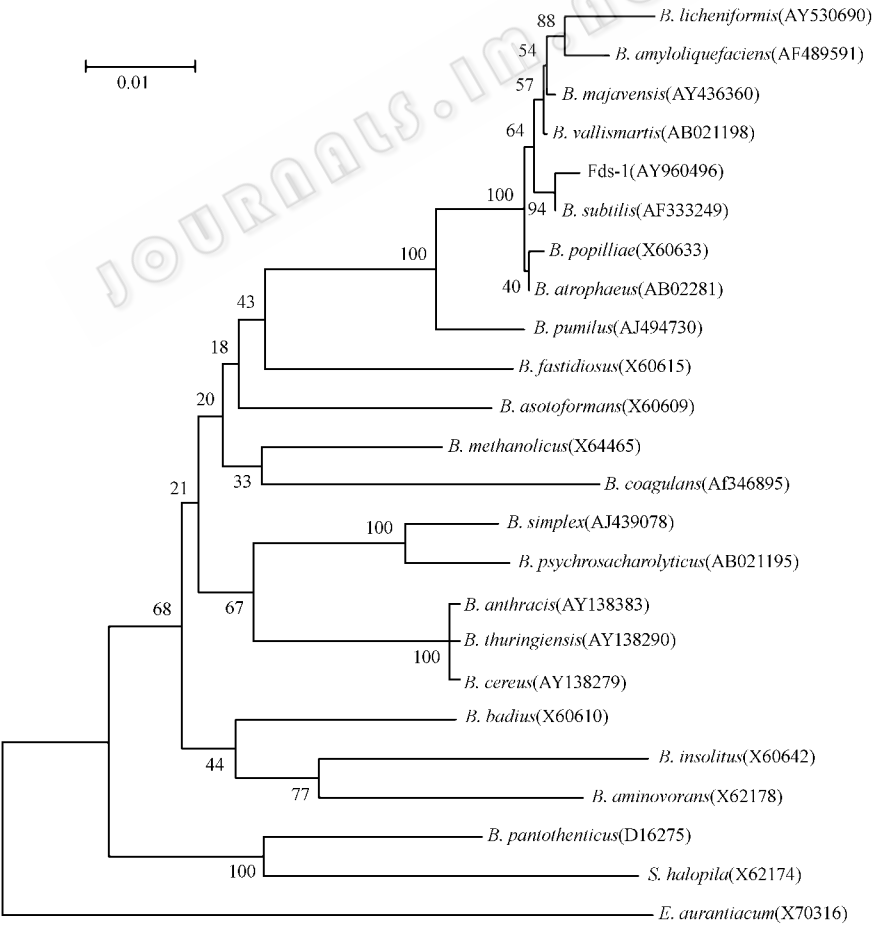


图 2 根据 16S rRNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences homology

Evolutionary distances showed in the figure were calculated by mega 2.0 ;Bootstrap = 1000. Bar , 0.01 substitution per nucleotide.

Bacillus subtilis Fds-1。

2.5 Fds-1 菌株降解 DBT 的代谢产物分析

图 3 是用气相色谱 – 质谱联用仪分析 Fds-1 降解 DBT 的代谢产物得到的图谱。结果显示 ,DBT 经过 Fds-1 菌株降解后 ,部分被转化为 2-HBP,这与 “4S”途径的最终产物一致 ,说明该菌株通过断裂 C-S 键的 “4S”途径降解 DBT。

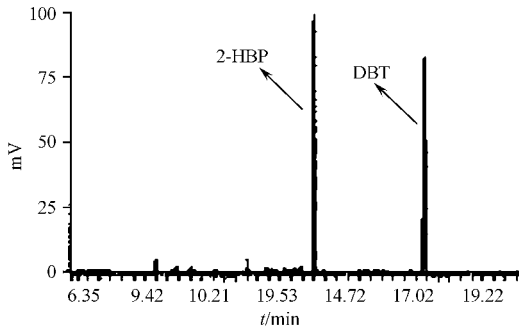


图 3 Fds-1 降解 DBT 的代谢物质谱图

Fig.3 MS-GC of the metabolins for DBT degradation by Fds-1

2.6 不同温度下 Fds-1 菌株生长和脱硫动态曲线

Kirimura 报道了嗜热枯草芽孢杆菌 WU-S2B 对 DBT 的脱硫特性和效果^[15] ,指出该菌在 30 ~ 50℃ 下 120h 内能完全脱除 0.54mmol/L DBT 中的有机硫生成 2-HBP,尤其在 50℃ 时活性最高。本文对 Fds-1 在不同温度下的生长和脱硫动态做了分析(图 4)。发现 Fds-1 的最佳脱硫活性在 30℃ ,在此温度下菌株对数生长期为 32 ~ 72h ,80h 内能脱除约 0.5mmol/L DBT 中的有机硫 ;在 37℃ 情况下 Fds-1 最终菌浓不变 ,但是生长对数期变短 (24 ~ 56h) ,80h 内只能降解约 0.3mmol/L 的 DBT ;25℃ 不是菌体生长的最适温度 ,生长较 30℃ 缓慢 ,因而菌体在脱硫方面也受到一定影响 ,值得一提的是 Fds-1 菌株 ,在 50℃ 时虽然生长较为缓慢 ,但是能脱除约 0.2mmol/L DBT 中的有机硫 ,这可能是因为在 50℃ 下脱硫酶的活性受到抑制 ,因而生长较为缓慢的缘故。我们可以根据这个特点进一步驯化菌株 ,并改善脱硫工艺。

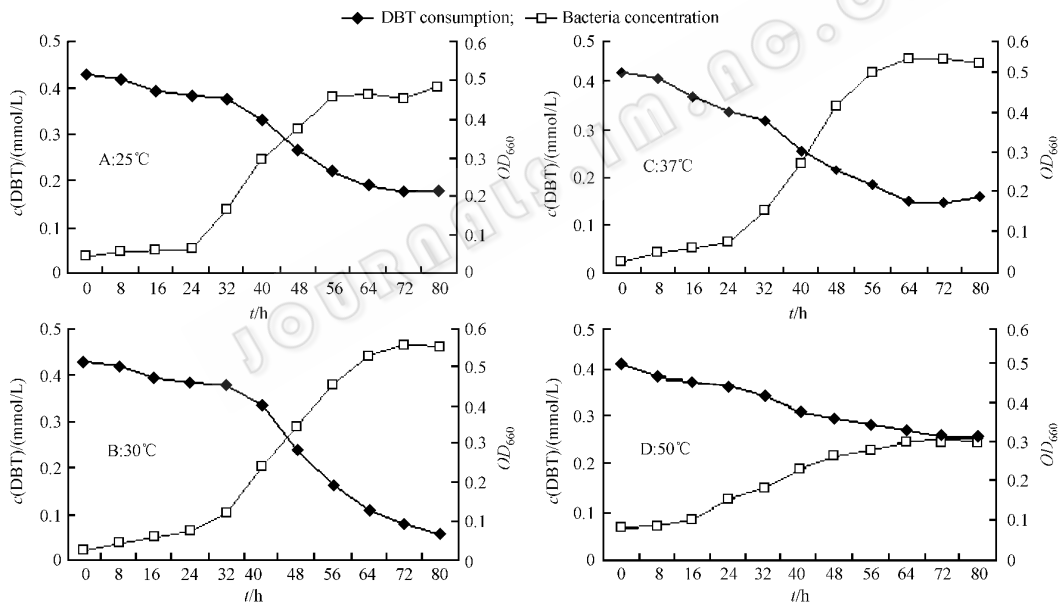


图 4 不同温度下 Fds-1 的生长和脱硫曲线

Fig.4 The growth and desulfurization curve of Fds-1 at different temperatures

2.7 Fds-1 对有机硫源的优先选择性

为了证明 Fds-1 菌株主要以 DBT 类化合物为硫源 ,比较了菌株在不同硫化物为单一硫源培养基中的生长情况。这些硫化物是 DBT ,DMDBT ,邻甲基苯磺酸 (MPS) ,TXTO ,MBT ,MT ,DMT ,MTN ,T ,BT。图 5 为 Fds-1 菌株在不同硫源的培养基中培养 48h 后的菌体浓度比较 ,可以看出 ,Fds-1 优先选择 DBT 及其侧链取代物等有机硫化物为硫源 ,而在苯并噻吩 ,噻吩类化合物硫源中生长缓慢 ,这表明该菌株适于脱除油品中的 DBT 类有机硫。

2.8 Fds-1 生物催化剂对精制柴油和焦化柴油脱硫比较

精制柴油和焦化柴油是两种加工工艺生产的柴油。本文所用的 1 号精制柴油硫含量 910mg/L。焦化柴油硫含量 1099.8mg/L。图 6 是精制柴油与焦化柴油中典型的有机含硫化物分布与含量的比较。二者含硫化物的区别是焦化柴油中主要含硫醇 (X-SH) 噻吩和苯并噻吩及其侧链烷基取代物 (Cx-BT) ,精制柴油主要含 DBT 及其侧链烷基取代物 (Cx-DBT)。

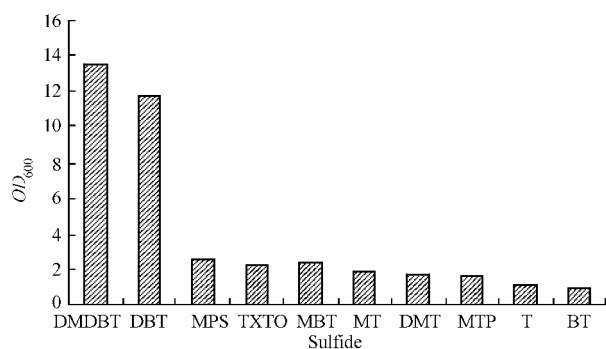


图5 Fds-1 对有机硫源的优先选择性

Fig.5 Preferential selection of sulfur source by Fds-1 strain
DMDBT : 4,6-dimethyl dibenzothiophene ; DBT : Dibenzothiophene ; MPS : O-methyl propanesulfonic acid ;TXTO :Thioxanthene-9-one ; MBT :3-methyl benzothiophene ; MT :2-methyl thiophene ; DMT :2,5-dimethyl thiophene ; MTN :2-methyl thiophene ; T :Thiophene ; BT : Benzothiophene.

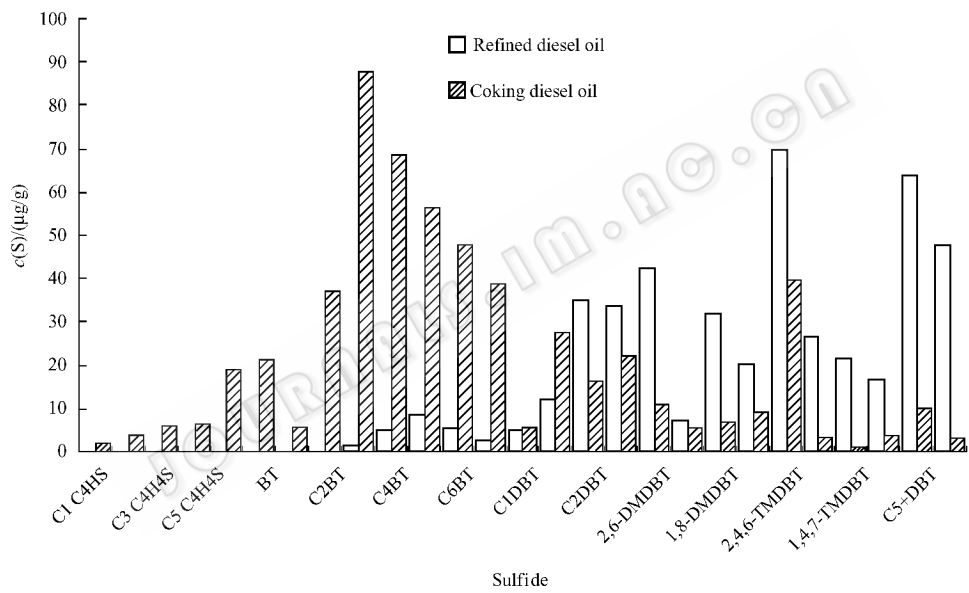


图6 精制柴油与焦化柴油中典型有机含硫化合物的分布及含量比较

Fig.6 Comparison of the sulfuric distributing and content in refined diesel oil and coking diesel oil
C1 means methyl- ;C2 means dimethyl- or ethyl- ;The rest may be deduced by analogy.

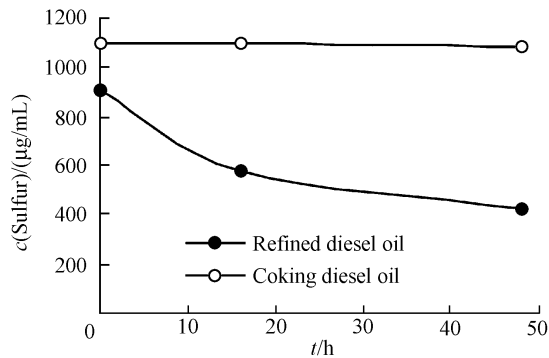


图7 Fds-1 对精制柴油和焦化柴油的处理效果

Fig.7 Efficiency of the treatment of Number 1 diesel and coking diesel by Fds-1 strain

休止细胞法脱除柴油中的有机硫是目前国内外常用的方法^[16,17]。图7是用Fds-1制备的生物催化剂对上述柴油脱硫前后硫含量的变化。从图7可知,Fds-1菌株对焦制柴油脱硫能力很低,对精制柴油的硫脱除率较强,16h之内使其硫含量从910mg/L降低到575.9mg/L,脱除率36.7%。上述结果表明脱硫菌株Fds-1不适于降解焦化柴油中含量较多的硫醇和苯并噻吩类化合物,而对精制柴油中含量较多的DBT类化合物的降解能力强。筛选或利用基因工程手段构建脱除不同含硫底物的菌株对于深度脱硫技术的广泛应用和科学指导性有着积极的促进作用。

3 讨论

目前,各国政府都开始采取各种脱硫措施以降低燃料油中的有机硫,美国计划从2005年开始将柴油中的硫含量从340mg/L降至20mg/L,欧盟计划从2005年开始将柴油中的硫含量从130mg/L降至50mg/L,日本则计划将柴油中的硫含量降至无硫水平。然而,目前工业上常用的加氢脱硫法(HDS)存在成本较高、高温、高压、专一性较差等缺点,不能针对某些有机含硫化合物如烷基化二苯并噻吩(Alkyl-DBT)进行深度脱硫。BDS技术作为传统HDS技术的补充,能解决上述缺点,从而促使各国的燃料油低

硫化目标成为现实。

本文从油浸土壤中分离到一株专一性脱硫微生物 Fds-1, 经鉴定为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*。该菌可以 DBT 为唯一硫源, 转化生成 2-HBP, 说明该菌株可通过断裂 C-S 键的“4S”途径脱除柴油中的 DBT。目前所研究的能进行 BDS 的菌株有: 玫瑰红球菌 *Rhodococcus rhodochrous*^[18]、红串平红球菌 *Rhodococcus erythropolis*^[19]、球形诺卡氏菌 *Nocardia globelula*^[20]、嗜热芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp.^[21]、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium* sp.^[22]、戈登氏菌 *Gordona* sp.^[23]、节杆菌 *Arthrobacter* sp.^[24]、球形芽孢杆菌 *B. sphaericus*^[25]、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*^[15] 和草分枝杆菌 *Mycobacterium phlei*^[26] 等等。我们分离的 Fds-1 与 Kirimura 等人报道的嗜热枯草芽孢杆菌 WU-S2B 不同^[15], 它是一株在 50℃ 以上不能生长繁殖的常温菌, 因此它有可能是一株尚未被报道过的脱硫新菌株。经过在 DBT 培养基中的不断传代、驯化, Fds-1 的脱硫能力正逐渐增强。

经 70℃ 处理 1h 后 Fds-1 依然存活, 并在 30℃ 依然保持较强的生长和脱硫能力, 说明芽孢杆菌的具有很强的抗逆能力。此外, 我们发现在 Fds-1 生长过程中 DBT 消耗量明显大于 2-HBP 生成量, 84h 后几乎检测不到 DBT 的存在, 但是此时消耗的 DBT 并没有转化为等量的 2-HBP, 同时发现 Fds-1 不能利用正构或异构烷烃作为生长所需的碳源(数据未给出), 这区别于一些能以碳氢化合物为碳源的经 4S 途径脱硫的菌株, 说明(1) Fds-1 同时消耗 DBT 作为其生长的碳源和硫源, 因此该菌株很可能是集破坏 C-C 键和 C-S 键的酶系于一身的菌株;(2) Fds-1 对 DBT 的代谢并非全部生成 2-HBP, 有可能降解为其它终产物。目前正在研究枯草芽孢杆菌 Fds-1 脱硫的代谢途径、脱硫的关键步骤和限速酶, 以确定该菌和其它菌株(如红平红球菌 IGTS8、嗜热芽孢杆菌 WU-2B 和类芽孢杆菌 A11-2)脱硫机理的异同点。从脱硫酶最佳作用温度来看 Fds-1 的脱硫酶系有别于嗜热枯草芽孢杆菌 WU-2B, 据此结合脱硫酶的序列分析可以推测催化的分子机制。

利用休止细胞制备的生物催化剂对不同组分柴油的脱硫研究表明: 脱硫菌株 Fds-1 不适于降解焦化柴油中的硫醇和苯并噻吩类化合物, 而对精制柴油中的 DBT 类化合物的降解能力强。通过气相色谱-质谱(GC-MS)分析证明该菌株对 DBT 的代谢产物为 2-HBP, 进一步的温度实验证明该菌的一些生长和脱硫特性, 最后对柴油的脱硫研究表明该菌株

适合于脱除低硫柴油中的 DBT 及其衍生物。该菌株最具有特色的是其可在 50℃ 条件下进行脱硫反应, 不仅可以据此改良脱硫工艺和条件, 还可以根据比较脱硫菌株的异同分析生物脱硫的底物摄取和酶反应机理。因此, 该菌株的发现对脱硫机理的完善及精制低硫柴油的深度脱硫具有重要的理论意义和应用价值。

参 考 文 献

- [1] Monticello DJ. Biocatalytic desulfurization, the biorefining of petroleum factors. *Hydro-carbon Processing*, 1994, **73**(2): 39-45.
- [2] 张德义. 含硫原油加工技术. 北京: 中石化出版社, 2003, 7: 284-291.
- [3] 马 挺, 刘 健, 佟明友, 等. 红球菌 DS-3 脱除二苯并噻吩中有机硫的性能初探. *微生物学报*, 2002, **42**(6): 726-731.
- [4] 许 平, 李福利, 俞 坚, 等. 脱硫微生物生产和燃油脱有机硫. *科学通报*, 2001, **46**(18): 1529-1533.
- [5] 缙仲轩, 刘会洲, 罗明芳, 等. Isolation and identification of nondestructive desulfurization bacterium. *中国科学(B 辑)*, 2002, **45**(5): 521-530.
- [6] 于 丽, 李本高, 肖宝清, 等. Primary study on biodesulfurization from hydrotreating diesel oil. *石油学报(石油加工)*, 2003, **19**(3): 38-42.
- [7] Hartdegen FJ, Coburn JM, Roberts RL. The microbial desulfurization of petroleum. *Chem Eng Prog*, 1984, **80**: 63-67.
- [8] Campbell IM. An orphaned child makes good the story of US DoE/PETC's foray into fossil fuel biodesulphurization. *Am Chem Soc Div Petroleum Chem Preprints*, 1993, **38**(2): 275-278.
- [9] Monticello DJ. Microbial desulfurization of fossil fuels. *Annual Review of Microbiology*, 1985, **39**: 371-389.
- [10] Fritze D, Pukall R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 35-37.
- [11] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**: 256-264.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, et al. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**: 416-426.
- [14] Maghsoudi S, Kheirloom A, Vossoughi M, et al. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp. strain P32C1. *Biochem Eng J*, 2000, **5**: 11-16.
- [15] Kirimura K, Furuya T, Nishii Y, et al. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B. *J Biosci Bioeng*, 2001, **91**(3): 262-266.

- [16] 佟明友, 马挺, 张全, 等. 利用休止细胞选择性脱除柴油中有机硫的研究. *环境科学*, 2005, **1**: 295 – 298.
- [17] Samir AA, Claire L, Michel W, *et al.* Multi-criteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33** (3-4): 446 – 454.
- [18] Denome SA, Oldfield C, Nash LJ, *et al.* Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 6707 – 6717.
- [19] Izumi Y, Ohshiro T, Ogino H, *et al.* Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (1): 223 – 226.
- [20] US Patent 6,195,570. 2001, 3, 6.
- [21] Konishi J, Ishii Y, Onaka T, *et al.* Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 3164 – 3169.
- [22] Omori T, Monna L, Saiki Y, *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 911 – 915.
- [23] Sung-Keun R, Je HC, Yong KC, *et al.* Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordona* strain, CYKS1. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 2327 – 2331.
- [24] Lee MK, Senius JD, Grossman MJ. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 4362 – 4366.
- [25] US Patent 4,632,906, 1986, 12, 30.
- [26] Nekodzuka S, Nakajima KT, Nomura N, *et al.* Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Mycobacterium* sp. strain G3. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1997, **15**: 17 – 27.

Screening, identification of the strain Fds-1 for microbial desulfurization specially and its ' use in diesel oil desulfurization

MA Ting¹, TONG Ming-you^{1,2}, ZHANG Quan², LIANG Feng-lai¹, LIU Ru-lin^{1*}

(¹ College of Life Sciences, NanKai University, Tianjin 300071, China)

(² Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, SINOPEC, Fushun 113001, China)

Abstract: A strain Fds-1, which can specially break the C-S bond of dibenzothiophene (DBT) and convert DBT into 2-hydrobenzophene (2-HBP), was screened out from soil soaked with crude oil and identified as *Bacillus subtilis*. Both Gibb's reaction and GC-MS analysis proved that this bacterium could remove sulfur of DBT by "4S" pathway. The optimal temperature of desulfurization is 30°C. At this temperature, Fds-1 could remove 0.5mmol/L organ sulfur of DBT in 72h, so it is suitable to decrease the sulfur content of diesel oil. The final product named 2-HBP is a water-soluble compound. This research focused on the desulfurization methods of diesel oil using Fds-1 resting cells. The results showed Fds-1 exhibited strong degradation capacity of DBT and alkyl-DBT in diesel oil. Experiments of two diesel oil samples for desulfurization proved that Fds-1 did not break the carbon-carbon backbone and the calorific value of diesel oil was reserved. Therefore strain Fds-1 is significant to deep biodesulfurization comparing the hydro-desulfurization of diesel oil.

Keywords: Biodesulfurization; Dibenzothiophene; *Bacillus subtilis*; Multi Taxonomy Determination; Diesel oil