

血红蛋白基因在脱硫菌 R-8 中的表达及其在柴油脱硫中的应用

李焕杰¹, 余志坚^{1,3}, 熊小超², 李玉光², 王海胜¹, 李信^{1*}

(¹中国农业科学院研究生院生物化学与分子生物学实验室, 北京 100081)

(²中国科学院过程工程研究所绿色过程与工程重点实验室, 北京 100080)

(³东华理工大学生物系, 抚州 344000)

摘要 【目的】旨在构建一株优良的工程菌株, 对血红蛋白基因在柴油的生物脱硫领域的应用做初步的探索。【方法】以德氏假单胞菌(*Pseudomonas delafieldii*) R-8 为出发菌株, 通过基因工程的手段, 构建透明颤菌(*Vitreoscilla*)血红蛋白基因表达质粒并电击导入原始菌株, 得到重组菌 *P. delafieldii* R-8-2。【结果】R-8-2 菌株的 CO 差光谱在 419 nm 处有特征峰出现, 表明血红蛋白在脱硫菌中得到了有效表达。R-8-2 菌株和 R-8 菌株相比, 生长得到改善, 相同培养条件下菌体密度比 R-8 提高了 20%, 最大脱硫活性能够达到 R-8 的 2.4 倍。在实际柴油脱硫实验中, R-8-2 菌株能将柴油的硫含量降至 96.6 mg/L, 脱硫率达到 69.9%, 而 R-8 仅为 57.2%。【结论】R-8-2 是在较低溶氧条件下仍能保持较高的菌体密度和脱硫活性的基因工程菌株, 具有良好的应用前景, 该研究为血红蛋白基因在生物脱硫工业的应用提供参考。

关键词: 生物脱硫; 透明颤菌血红蛋白基因; 德氏假单胞菌 R-8; 工程菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1026-07

随着世界经济的发展和人类对能源的持续开发, 低硫石油燃料日益减少, 高硫石油的开发使用成为必然。然而硫可使某些催化剂中毒, 腐蚀金属设备, 并且高硫石油燃烧产生的硫氧化物排入大气, 形成酸雨, 直接危害人类健康和生态环境^[1]。因此对石油产品进行低成本、高效率的脱硫方法研究就成为热点。生物脱硫技术(Bio-sulfurization, BDS)选择性高, 专一性强, 反应条件温和, 能够有效脱除二苯并噻吩(dibenzothiophene, DBT)及其衍生物中的硫, 是催化加氢深度脱硫技术的重要补充, 因此越来越受到国内外研究者的关注^[2]。

专一性生物脱硫是一个复杂的耗氧过程, 为了

维持一定的脱硫速率, 该过程需要保持较高的通气量, 但过高的通气量有可能造成油品不必要的挥发。透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb)是一种氧结合蛋白, 它能提高菌体细胞对氧的利用率, 在菌体密度增加条件下, 不增加系统的供氧量, 仍能使细胞的代谢和生长正常进行, 促进细胞更好的进行产物合成, 从而提高细胞中目的产物的产量和收率^[3-4]。有关血红蛋白基因(*Vitreoscilla* hemoglobin gene, *vgb*)的应用已有一些文献报道, 如 2000 年于慧敏等^[5]在产聚 β -羟基丁酸酯(PHB)的大肠杆菌中表达 *vgb*, 大大提高了菌体浓度和细胞中的 PHB 含量。2007 年熊小超等^[6]构建了异源表达血红蛋白的红

基金项目: 国家“863 计划”——国家高技术研究发展计划项目(2006AA02Z209)

* 通信作者。Tel: +86-10-82109694 E-mail: lixin@mail.caas.net.cn

作者简介: 李焕杰(1984-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事微生物脱硫研究。E-mail: lihuanjie2002@163.com

收稿日期: 2009-02-17; 修回日期: 2009-04-11

球菌 LSSE8-1-*vgb* 提高了菌株对氧的利用率, 脱硫速率得到提高。2008 年张立国等^[7]利用 *vgb* 在非硫细菌中的表达, 使得基因工程菌的菌体密度比对照菌增加了 24% ~ 32%。

德氏假单胞菌(*Pseudomonas delafieldii*)R-8^[8](ZL 01115921.9)是由中国科学院过程工程所分离得到的一株革兰氏阴性脱硫菌。目前国内外尚无该菌的血红蛋白基因工程菌构建方面的研究报道。因此, 本研究拟以 R-8 菌为出发菌株, 通过基因工程的手段, 将血红蛋白基因 *vgb* 表达质粒导入原始菌株, 构建出在较低溶氧条件下仍能保持较高的菌体密度和脱硫速率的基因工程菌。以期能为生物脱硫提供优良的菌株, 并为生物脱硫的工业应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒: 本实验所采用质粒 pPR9TT^[9]和 pGEM-*vgb* 分别由中国农业科学院生物所的陈明研究员和中国科学院过程工程所的熊小超博士惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。dNTP、LA-Taq 聚合酶、回收与连接试剂盒、限制性内切核酸酶购自宝生物大连工程公司(TaKaRa)。二苯并噻吩(DBT)购自美国 Sigma 公司; 二羟基联苯(2-hydroxybiphenyl, 2-HBP)购自日本 TCI 公司。正己烷和甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基: 无机盐培养基(BSM)及 LB 培养基参考文献 10]。

1.2 菌株培养

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 采用 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C, 转速为 200 \times g 的摇床中培养。德氏假单胞菌采用 BSM 培养基, 其中加入 0.2 mmol/L 的 DBT 作为硫源, 于 30 $^{\circ}$ C, 转速为 200 \times g 的摇床中培养。

1.3 脱硫基因启动子及血红蛋白基因的克隆

1.3.1 引物: 根据 R-8 的脱硫基因启动子序列(GenBank No. DQ062154)和透明颤菌血红蛋白基因序列(GenBank No. L21670)分别设计引物(表 1), 扩增目的基因。

1.3.2 基因的克隆: PCR 扩增 R-8 脱硫质粒(120 kb 的线状质粒)的大小为 723 bp 的脱硫基因启动子片段(*Pdsz*)及大小为 441 bp 的 pGEM-*vgb* 上的血红蛋白基因片段(*vgb*)。扩增的 *vgb* 不含启动子序列, 为使 *vgb* 能在 R-8 菌株中有效表达, 因此克隆 R-8 脱硫基因启动子, 使 *vgb* 的表达受 *Pdsz* 的调控。

实验方法参考文献 11]。

表 1 引物的名称和序列

Table 1 Primer name and sequence

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
<i>Pdsz</i> 1	CAAGGTACCCACCCAAACC	19	<i>Kpn</i> I
<i>Pdsz</i> 2	ATTCTGCAGTTCATCGCGTATG	22	<i>Pst</i> I
<i>vgb</i> 1	TAACTGCAGCCAGCAAACCA	20	<i>Pst</i> I
<i>vgb</i> 2	CCAAGCTTATTCAACCGC	18	<i>Hind</i> III

1.4 血红蛋白基因表达质粒的构建与鉴定

克隆到的 *Pdsz* 和 *vgb* 测序验证后经酶切连接构建载体 pMD-*Pdsz-vgb*, pMD-*Pdsz-vgb* 与 pPR9TT 质粒均用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切, 连接转化至 *E. coli* DH5 α 感受态, 在 50 μ g/mL Amp 的 LB 平板上培养筛选含表达质粒的重组菌。表达质粒酶切鉴定后命名为 pPR-*Pdsz-vgb*。构建图谱如图 1。实验方法参考文献 11]。

1.5 pPR-*Pdsz-vgb* 在原始菌 R-8 中的表达与鉴定

制备 R-8 菌的感受态细胞, 质粒 pPR-*Pdsz-vgb* 电击转化原始菌。电转参数为 15 kV/cm, 400 Ω , 25 μ F。30 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后在含有 Amp 的 BSM 培养基平板上培养 4 d, 挑取蓝色菌落培养, 提质粒并酶切验证。携带有重组表达质粒 pPR-*pdsz-vgb* 的脱硫重组菌命名为 R-8-2。

1.6 分析方法

1.6.1 重组菌的 CO 差光谱测定: 血红蛋白类物质的 CO 差光谱在 419 nm 左右具有特征吸收峰, 可以作为 Vhb 的快速检测方法^[9]。将培养到对数后期的 R-8-2 细胞以 8000 \times g 离心 10 min, 收集菌体后重悬于磷酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH7.5)中, 进行超声波破碎。同时设立原始菌 R-8 作为阴性对照。具体方法参考文献 6, 12]。

1.6.2 生长细胞脱硫活性的测定: R-8-2 菌株和 R-8 菌株以 4% 的接种量接种于 0.2 mmol/L DBT 的 BSM 培养基中培养, 设定不同摇床转速培养, 以考察 R-8-2 菌株和 R-8 菌株的生长及脱硫差异。按不同时间取样测定菌体生长和脱硫活性。菌体生长量以 OD_{600} 值表示, 脱硫活性采用高效液相色谱(HPLC)进行定量分析(外标法), 重复 3 次取平均值, 具体方法参考文献 10]。

1.6.3 静息细胞脱硫活性的测定: 菌体培养 72 h, 离心收集菌体, 用生理盐水重悬, 制成细胞浓度为 6.0 g dry cell/L 的静息细胞脱硫催化反应剂, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 DBT 进行脱硫反应, 每 2 h 取样进行 HPLC 分析测定脱硫活性, 重复 3 次取平均值。

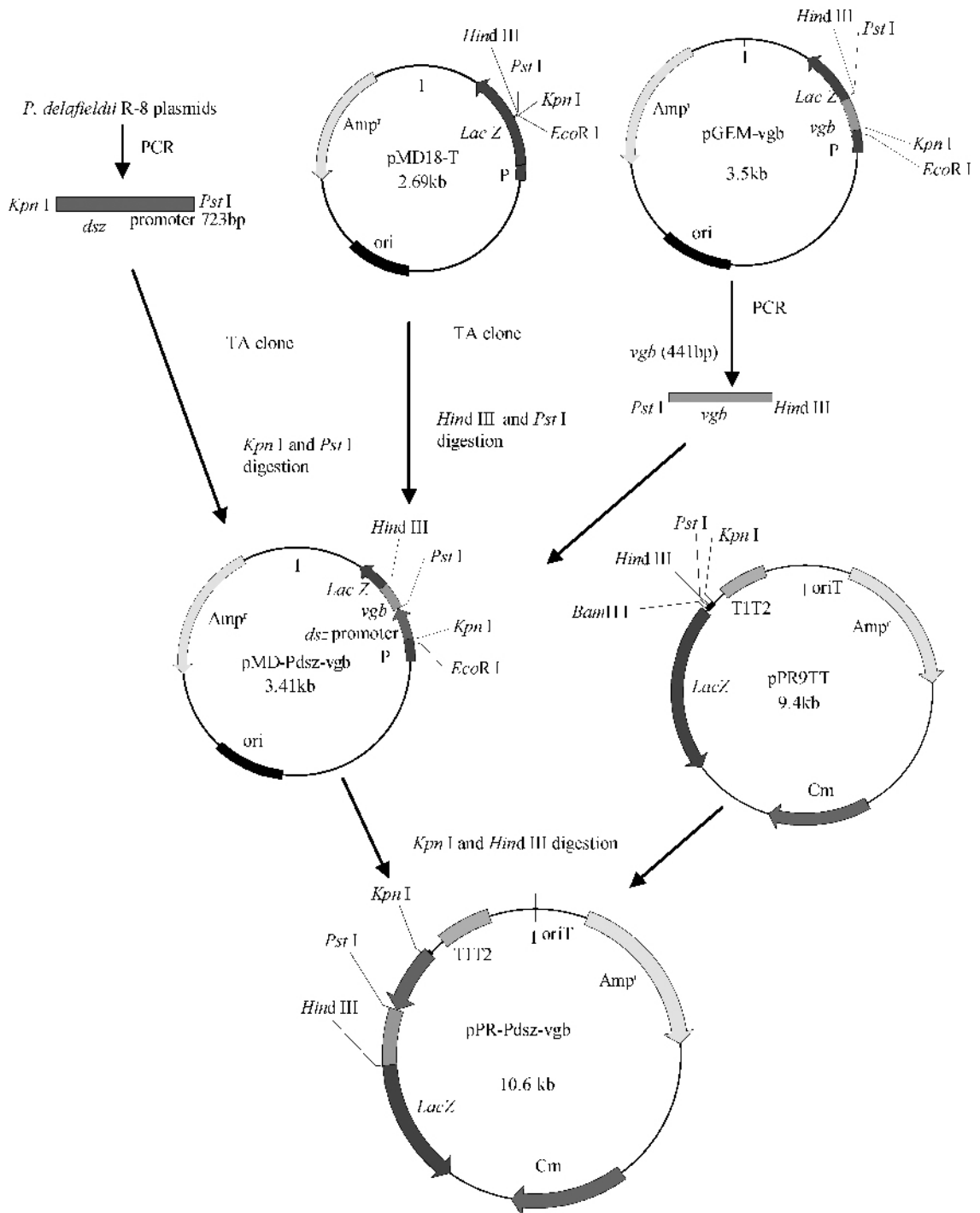


图 1 血红蛋白基因表达载体 *pPR-Pdsz-vgb* 的构建图谱

Fig. 1 Construction of *vgb* expression plasmid *pPR-Pdsz-vgb*.

1.6.4 柴油脱硫活性的测定:取 R-8-2 菌株和 R-8 菌株的静息细胞分别与柴油样品(硫含量为 320.5 mg/L)混合(油水相体积比 1:4)进行柴油脱硫反应,每 2 h 取油相进行硫含量的测定,以柴油中的硫含量(mg/L)降低来表示对柴油的脱硫活性。硫含量的测定方法采用 RPA-200 微库仑仪进行分析,重复 6 次取平均值,具体方法参考文献 [10]。

2 结果

2.1 脱硫基因启动子及血红蛋白基因的克隆

分别以 R-8 脱硫质粒和 *pGEM-vgb* 质粒载体为模板,扩增得到 *dsz* promoter 的 PCR 产物大小约为 723 bp, *vgb* 的 PCR 产物大小约为 441 bp,与预计大小相符,说明产物是特异的。选出扩增得到目的片

段的重组质粒,测序分析结果与 GenBank 报道的序列一致。

2.2 血红蛋白表达载体 pPR-Pdsz-vgb 的酶切鉴定

用 1.4 的方法构建表达载体并对构建成功的载体进行酶切验证。将 pPR-Pdsz-vgb 转化原始菌 R-8 通过 Amp 抗性和蓝斑筛选到含有该表达载体的重组菌 R-8-2。

2.3 R-8-2 菌株的 CO 差光谱分析

将 R-8-2 菌株的无细胞提取液经过 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原作用处理后通入 CO 气体,随着 CO 的通入,溶液由无色变为浅红色。400 nm ~ 500 nm 之间的差光谱如图 2 所示,在 419 nm 左右有一明显的波峰出现。CO 差光谱结果表明, Vhb 在 R-8-2 菌株中得到了有效表达。

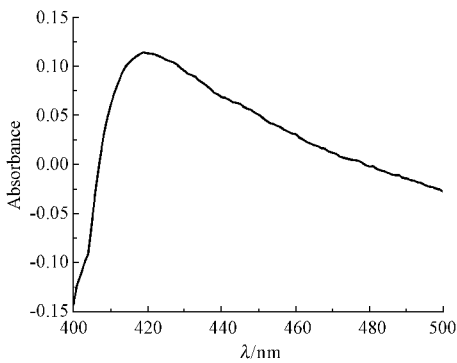


Fig.2 R-8-2 菌株的 CO 差光谱

Fig.2 CO-difference spectrum of R-8-2 containing vgb.

2.4 R-8-2 菌株和 R-8 菌株生长状况的对比

R-8-2 菌株与 R-8 菌株在含有 0.2 mmol/L DBT 的 BSM 培养基中的生长情况如图 3。其中 a、b 分别表示转速为 $200 \times g$ 、 $80 \times g$ 的情况菌体生长情况。由图可见, R-8-2 菌株表现出较高的生长速率,受摇床转速影响较小。进入生长静止期, R-8 菌的 OD_{600} 为 6.8,低转速下仅为 6.4;而重组菌 R-8-2 则能达到 8.1,低转速下进入对数期有所延迟,但生长后期仍能达到 8.0,菌体密度比原始菌提高了约 20%。

2.5 R-8-2 菌株和 R-8 菌的脱硫活性比较

2.5.1 R-8-2 和 R-8 生长细胞脱硫活性比较:考察了 vgb 的表达对脱硫菌体生长过程中脱硫活性的影响。图 4 表示的是菌体在生长过程中发酵液的 DBT 消耗和 2-HBP 生成情况。在转速 $200 \times g$ (图 4-A) 的情况下, R-8-2 菌体在 54 h 几乎能将培养基中的 DBT 降解 98%,而 R-8 菌株在 72 h 时 DBT 的降解率为 80%。当摇床转速降为 $80 \times g$ (图 4-B),虽然 R-8-2 和 R-8 的脱硫活性都下降得十分明显,但 R-8-2 菌

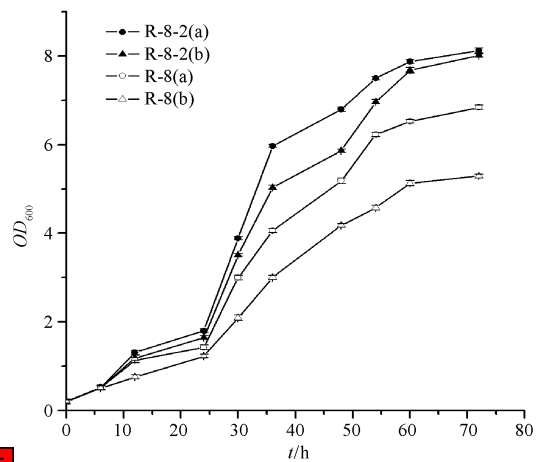


Fig.3 R-8-2 菌株与 R-8 菌株的生长比较曲线

Fig.3 Growth curve of R-8-2 and R-8 (a $200 \times g$; b $80 \times g$)

株受的影响相对较小,在 72 h 时仍能降解培养基中 95% 的 DBT,而 R-8 还不到 60%。表明 R-8-2 菌株比 R-8 菌株在低溶氧条件下有着更高的脱硫活性。

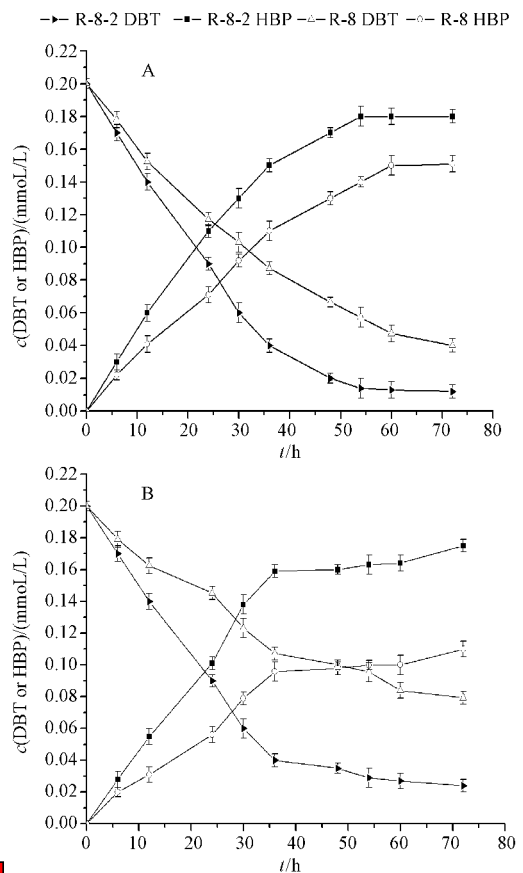


Fig.4 R-8-2 菌株与 R-8 菌株在摇床转速为 $200 \times g$ (A) 和 $80 \times g$ (B) 下的生长过程脱硫比较曲线

Fig.4 Courses of DBT desulfurization by growing cells of R-8-2 and R-8 at $200 \times g$ (A) and $80 \times g$ (B).

2.5.2 R-8-2 和 R-8 静息细胞脱硫活性比较:为了减少菌体生长对脱硫作用的影响,进一步考察了 R-

8 菌株及 R-8-2 菌株静息细胞脱硫活性的差异。如图 5 所示,在转速 $200 \times g$ (图 5-A)的情况下,R-8-2 菌株静息细胞在 8 h 几乎能将 DBT 代谢完全,转化成 2-HBP。R-8-2 静息细胞在 2 h 的最大脱硫活性为 $29.2 \mu\text{mol DBT/g dry cell/h}$,而 R-8 菌株的最大脱硫活性仅为 $17.5 \mu\text{mol DBT/g dry cell/h}$ 。当摇床转速降为 $80 g$ (图 5-B),R-8-2 和 R-8 的脱硫活性都有所下降,但 R-8-2 的最大脱硫活性仍能达到 $24.3 \mu\text{mol DBT/g dry cell/h}$,而 R-8 仅为 $10.1 \mu\text{mol DBT/g dry cell/h}$,R-8-2 是 R-8 的 2.4 倍。可见,在低溶氧的条件下,引入了血红蛋白基因的 R-8-2 菌株仍然能够保持比较高的脱硫活性。

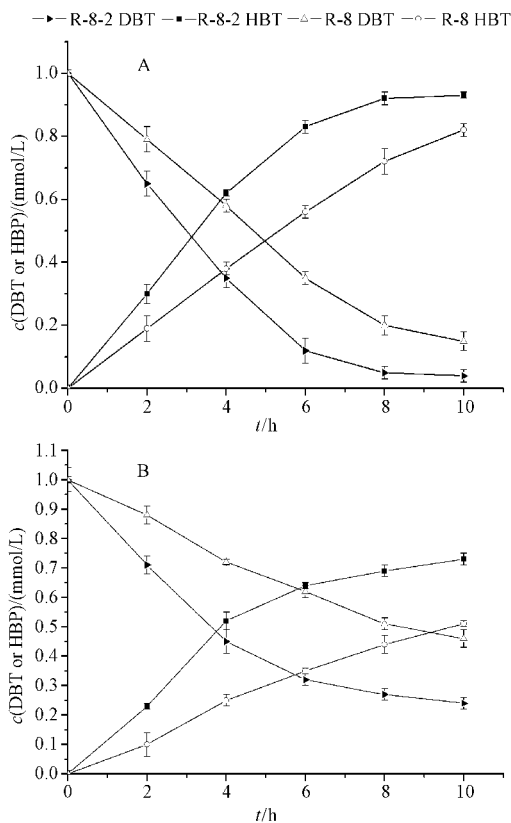


图 5 R-8-2 菌株与 R-8 菌株静息细胞在摇床转速为 $200 \times g$ (A) 和 $80 \times g$ (B) 下的脱硫比较曲线

Fig. 5 Courses of DBT desulfurization by resting cells of R-8-2 and R-8 at $200 \times g$ (A) and $80 \times g$ (B).

2.5.3 R-8-2 和 R-8 对柴油的脱硫活性比较: 为了考察工程菌在实际应用中的脱硫性能,比较研究了 R-8-2 菌株和 R-8 菌株对柴油的脱硫作用。采用起始硫含量为 320.5 mg/L 的加氢后柴油,如图 6 所示,R-8-2 的脱硫速率要高于 R-8。最终,R-8-2 能将柴油的硫含量降至 96.6 mg/L ,脱硫率达到 69.9% ,而 R-8 仅为 57.2% 。R-8-2 远远低于经过相同条件下

R-8 菌株处理的柴油硫含量。

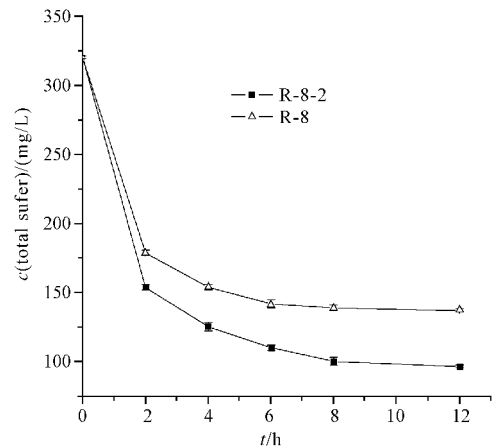


图 6 R-8-2 菌株与 R-8 菌株的柴油脱硫比较曲线(油水比 1:4)

Fig. 6 Courses of diesel desulfurization by resting cells of R-8-2 and R-8.

实验结果表明,与 R-8 菌株相比,引入血红蛋白表达质粒 pPR-Pdsz-vgb 的脱硫工程菌株 R-8-2 具有更高的脱硫活性,能够明显降低柴油中的硫含量,比原始菌株 R-8 更具应用价值。

3 讨论

德氏假单胞菌 R-8 是一株具有很好的应用前景的石油生物脱硫菌株^[14],其生长过程专一性好氧,然而在发酵的后期,菌体密度增大以及代谢产物的积累会阻碍氧的传递,这势必会影响脱硫反应的进行。vgb 的异源表达在一定程度上能改善细胞在低溶氧条件下的生长状况。本研究将携带有 vgb 的穿梭质粒在 R-8 中得以表达,R-8-2 菌株和 R-8 菌株相比有更大的菌体量,不但在低溶氧的条件下脱硫活性高于原始菌,在一般的脱硫过程中也表现出较高的活性,是 R-8 的 2.4 倍。在柴油体系中的脱硫也达到了 69.9% 。因此 R-8-2 是一株优良的脱硫工程菌株。

生物脱硫技术能否成功地应用于石油工业,亟待解决的问题是脱硫菌株的高密度发酵问题。应用基因工程的方法可以对优良的微生物脱硫菌株进行改造,构建能更有效脱除石油中硫化物的高效脱硫工程菌,以期应用于超深度脱硫技术。本研究首次利用 *P. delafieldii* R-8,运用基因工程的手段构建了脱硫能力得到提高的血红蛋白基因脱硫工程菌 R-8-2,为生物脱硫提供了一株优良的工程菌株,对于血红蛋白基因应用于石油的生物脱硫领域作了初步的探索,为脱硫工程菌的实际应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Ohshiro T, Izumi Y. Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63(1):1-9.
- [2] Gallardo M E. Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(22):7156-7160
- [3] Wakabayashi S, Matsubara H, Webster D A. Primary sequence of a dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*, 1986, 322:481-483.
- [4] Khosla C, Bailey J E. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: Molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, 1988, 214(1):158-161.
- [5] 于慧敏, 尹进, 沈忠耀, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在产 PHB 重组大肠杆菌中的克隆表达. 清华大学学报(*Journal of Tsinghua University*), 2000, 40(2):32-35.
- [6] Xiong XC, Xing JM, Li X, et al. Enhancement of biodesulfurization in two-liquid systems by heterogeneous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11):2394-2397.
- [7] 张立国, 罗人明, 王晓磊, 等. 透明颤菌血红蛋白基因克隆及在紫色非硫细菌中的表达. 河北工业科技(*Hebei Journal of Industrial Science and Technology*). 2008, 25(1):1-4.
- [8] 姜成英, 刘会洲, 邢建民, 等. 德氏假单胞菌菌株及其在脱除含硫有机化合物中硫的应用. 中国发明专利. 申请号 01115921.9.
- [9] Pedro M S, Ilaria D B, Svein V, et al. New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195:91-96.
- [10] 李焕杰, 余志坚, 李信, 等. 脱硫工程菌的构建及其脱硫性能分析. 生物工程学报(*Chinese Journal Biotechnology*) 2008, 24(12):2034-2040.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫译. 第二版. 北京科学出版社(*Beijing: Science Press*), 1999, 6-69.
- [12] 于慧敏, 史悦, 沈忠耀, 等. CO 差光谱法分析重组大肠杆菌中的透明颤菌血红蛋白. 清华大学学报(*Journal of Tsinghua University*) 2002, 42(5):615-618.
- [13] 白雪晶, 熊小超, 李信, 等. 脱硫菌 *Rhodococcus*. sp. LY822 专一性脱硫活性及相关基因的研究. 过程工程学报(*The Chinese Journal of Process Engineering*), 2008, 8(1):125-129.
- [14] 罗明芳, 姜成英, 刘会洲, 等. 脱硫菌 R-8 的生长及其生物降解水中二苯并噻吩. 过程工程学报(*The Chinese Journal of Process Engineering*). 2002, 2(3):252-256.
- [15] 熊小超, 李望良, 李信, 等. 专一性脱硫菌脱硫活性与基因保守性研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*). 2005, 45(5):733-737.
- [16] 候仲轩, 刘会洲, 陈家镛, 等. 专一性脱硫菌的分离与鉴定. 中国科学 B 辑(*Sciencei China B*). 2002, 5(32):397-405.
- [17] 姜成英, 李磊, 陈家镛, 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(*The Chinese Journal of Process Engineering*). 2002, 2(2):122-126.
- [18] Kazuaki H, Yoshitaka I., Morio K, et al. Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(2):239-246.
- [19] Matsui T, Hirasawa K, Koizumi K, et al. Optimization of the copy number of dibenzothiophene desulfurizing genes to increase the desulfurization activity of recombinant *Rhodococcus* sp. *Biotechnology Letters*, 2001, 23:1715-1718.
- [20] Folsom B R, Schieche D R, Digrazia P M, et al. Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11):4967-4972.
- [21] Nakayama N, Matsubara T, Ohshiro T, et al. A novel enzyme, 2-hydroxybiphenyl sulfinate desulfinate (DszB), from a dibenzothiophene desulfurizing bacterium *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 'gene over expression and enzyme characterization, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 1598:122-130.

Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Pseudomonas delafieldii* R-8 and its application to diesel desulfurization

Huanjie Li¹, Zhijian Yu^{1,3}, Xiaochao Xiong², Yuguang Li², Haisheng Wang¹, Xin Li^{1*}

(¹ Laboratory of Biochemical and Molecular Biology, Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(² Laboratory of Separation Science and Engineering, State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(³ Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China)

Abstract [Objective] To construct an engineering strain of higher desulfurization activity with *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) for desulfurization of diesel. **[Methods]** We constructed the *vgb* expressing plasmid, pPR-Pdsz-*vgb* and transformed by electroporation to *Pseudomonas delafieldii* R-8, then obtained a genetic engineering strain R-8-2. **[Results]** The results of CO-difference spectrum analysis indicated that R-8-2 expressed *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) having biological activity expressed in strain R-8-2. Compared with the wild-type R-8, the density of strain R-8-2 increased by 20%, and its desulfurization activity is also higher in the lower deliquescence oxygen environment. In the end, about 69.9% of total sulfur in diesel oil was removed by strain R-8-2, whereas only 57.2% of sulfur was removed by strain R-8. **[Conclusion]** The activity of strain R-8-2 was enhanced and furthermore, the work is helpful for further development in biodesulfurization.

Keywords: desulfurization; *vgb*; *Pseudomonas delafieldii* R-8; engineering strain

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z209)

Corresponding author. Tel: +86-10-82109694; E-mail: lixin@mail.caas.net.cn

Received: 17 February 2009/ Revised: 11 April 2009

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective]、[Methods]、[Results]、[Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
- (1)在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
- (2)建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
- (3)建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
- (4)摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
- (5)摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP等。
- (6)句子的开头处最好不要使用数字。