

# 专一脱硫菌催化氧化原油脱硫的研究

唐琼,徐岚清,冯昊,黎贤彬,孙佳欣,谢纤羽

(乐山师范学院化学学院,四川 乐山 614000)

**摘要:**燃烧石油所产生的  $\text{SO}_2$  可导致环境污染,为了有效地脱去原油中的硫,采用实验室驯化、富集得到的微生物作为专一脱硫菌株,对原油中含硫化合物二苯并噻吩(DBT)进行了脱硫研究。着重探讨了微生物驯化、富集培养体系,培养温度,摇床转数和微生物初始浓度等因素对生物催化脱硫效率的影响,并结合气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析方法对氧化脱硫机理进行了探讨。结果表明:以甘油作为碳源、DBT 作为唯一硫源的培养体系来驯化、富集得到的微生物,能够有效地将 DBT 上的硫脱下来。DBT 的脱硫率随培养温度、摇床转速、生物接种量的变化而不同;随着培养温度、摇床转速的增加,脱硫效率先增加后降低;生物接种量越大,脱硫效率越高,直至平缓。生物催化脱硫反应条件优化为:温度  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,摇床转速  $180\text{ rpm}$ ,生物接种量  $3\text{ mL}$ ,使 DBT 的脱硫率达到了  $95.01\%$ 。微生物催化脱硫反应是通过 4S 途径将 DBT 转化成油溶性的 2-羟基联苯(2-HBP)并释放出硫来,同时 DBT 原有的碳骨架得以保存完好,使得原油的热值不受影响。

**关键词:**原油,二苯并噻吩;专一脱硫菌;生物脱硫

**中图分类号:**X703

**文献标志码:**A

## 引言

石油中的硫含量达  $2\%$  以上<sup>[1]</sup>,而燃烧石油产品时所产生的  $\text{SO}_2$  正是引起酸雨、 $\text{PM}_{2.5}$  超标等一系列环境问题的主要污染物之一<sup>[2]</sup>。因此,原油的深度脱硫已成为世界急需解决的问题<sup>[3]</sup>。目前,工业上常用的脱硫方法是加氢脱硫,它是在金属催化剂的作用下,通过高温、高压催化加氢将油中的有机硫转化成  $\text{H}_2\text{S}$  而脱去。但此法运行条件苛刻,能耗高,且难以脱除杂环化合物中的硫<sup>[4,5]</sup>。近年来迅速发展起的生物脱硫技术是在不影响燃油固有结构的基础上选择性脱除有机硫,它不影响

燃油的热值,且能够有效脱除二苯并噻吩(Dibenzothiophene, DBT)及其衍生物中的硫<sup>[6-7]</sup>,因此被认为是 21 世纪降低石油产品硫含量的有效途径,越来越受到国内外研究者的关注。

噻吩及其衍生物是石油中的主要含硫化合物,其含硫量占原油中有机硫总量的  $50\% \sim 90\%$ ,而苯并噻吩和 DBT 占噻吩类的  $70\%$  以上,是含硫杂环化合物中最典型的代表<sup>[8]</sup>。此类物质结构复杂,化学性质稳定,尤其是 4 位和 6 位有取代基的 DBT 系列,由于具有空间位阻效应,是公认的最难脱除的有机硫化物<sup>[9]</sup>。本文采用生物催化氧化对原油中含硫化合物 DBT 进行脱硫研究,着重

收稿日期:2017-06-22

基金项目:国家自然科学基金(21507052);2017 年省级大学生创新创业训练计划项目(201610649015)

作者简介:唐琼(1975-),女,四川仁寿人,教授,博士,主要从事污染控制与资源化方面的研究,(E-mail)tangqiong75@163.com

探讨微生物驯化富集、DBT 初始浓度、温度、摇床转数和微生物接种量等因素对生物催化脱硫效率的影响,并对氧化脱硫机理进行了探讨。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

纯度为 99% 的二苯并噻吩(Sigma, 中国);正己烷、甲酸、乙腈、甲醇、甘油及培养基,均为分析纯,产自成都市科龙化工试剂厂,用前没有进一步纯化。

立式高压灭菌锅(YXQ-LS-50S11, 博迅);高速离心机(TDZ4-WS, Cence); ZP-A 摇床(开元); PHS-3 型 pH 计(雷磁);紫外-可见分光光度计(Jasco V-550 UV/vis, Jasco);高效液相色谱仪(LC-2010A HT, 日本岛津);气相色谱-质谱联用仪(ISQLT Single Quadrupole Mass Spectrometer, TRACE 1310 Gas Chromatograph, Thermo.)。

### 1.2 培养基的成分

经过对培养基进行分析比较,最后选用由  $2.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $4.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NaHPO}_4$ ,  $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的甘油组成的无硫无机盐基础培养基(Basal Salts Medium, BSM)<sup>[10]</sup>。

### 1.3 微生物的驯化、富集

微生物的驯化富集以甘油为碳源, DBT 为硫源作为培养体系,过程如下:

取 10 g 被石油污染的土壤与 100 mL BSM, 于 250 mL 锥形瓶中混合,再加入作为唯一硫源的 DBT 乙醇溶液形成混合液,其中 DBT 的终浓度为  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将装有混合液的锥形瓶放在摇床上,在室温下以 200 rpm 的转速进行富集培养 5 天,然后将混合液在 4000 rpm 下离心 10 min。取上清液 5 mL,加入到装有 100 mL 新鲜 BSM 培养基和硫源的锥形瓶中,继续富集培养 5 天。再取上清液重复进行富集培养,这样重复培养 4 次后,将所富集到的微生物培养液作为生物催化脱硫的微生物种子。

### 1.4 微生物脱硫实验

在 250 mL 锥形瓶中,将一定量的培养基和 DBT 溶

液混合,并接种一定量的脱硫微生物。将装有混合液的锥形瓶放在摇床上,在一定转速和温度下进行培养。7 天后,取一定量的培养液用等体积的正己烷进行萃取。将萃取后的有机相用高效液相色谱仪分析其中 DBT 的浓度。每个样品做三个平行样。

### 1.5 分析检测方法

(1) 菌液浓度由分光光度法在 620 nm 下测定吸光度,用离心后的培养液做空白调零。依据吸光度及其和细胞干重绘制成的标准曲线,通过计算得到菌液细胞干重,从而获得细胞浓度。

(2) 用高效液相色谱仪(HPLC)分析 DBT 及其产物 2-羟基联苯(2-HBP)的浓度。将培养后的微生物混合液用等体积正己烷萃取,萃取后的有机相用 HPLC 分析测定。分析条件:分离柱为 XBridge-C18 柱( $150 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}$ , 粒径  $3.5 \text{ nm}$ ),柱温  $30^\circ\text{C}$ ;流动相为乙腈与 0.2% 甲酸的混合物(两者的比为 6:4),流速为  $1 \text{ mL}/\text{min}$ 。DBT 检测波长为 275 nm,进样量  $5.0 \mu\text{L}$ 。

(3) 用 GC-MS 分析氧化产物。GC 条件:进样口温度  $320^\circ\text{C}$ ;载气为高纯 He,恒流模式,流速  $1 \text{ mL}/\text{min}$ ; 1:20 分流进样,进样量  $1 \mu\text{L}$ ;色谱柱为 TG-SQC (Thermo PN 26070-1300,  $30 \text{ m}\times 0.25 \text{ mm}\times 0.25 \text{ m}$ );柱升温程序:初始温度  $80^\circ\text{C}$ ,保持 0.5 min,以  $40^\circ\text{C}/\text{min}$  的速率升温至  $200^\circ\text{C}$ ,保持 0.5 min,以  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  的速率升温至  $210^\circ\text{C}$ ,保持 8 min,再以  $40^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度升温至  $300^\circ\text{C}$ ,保持 2 min。MS 条件:电子轰击电离(EI)源,电子能量 70 eV;离子源温度  $280^\circ\text{C}$ ,质谱传输线温度  $280^\circ\text{C}$ ,溶剂延迟时间 5 min,扫描荷质比范围 40~300。产物的鉴定采用 GC-MS 中自带的 Nist-05 标准谱图库,匹配度大于 90%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微生物驯化富集

微生物的驯化富集以甘油为碳源, DBT 为硫源。从被石油污染的土壤表面收集的微生物,在添加了 DBT ( $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作为唯一硫源的 BSM 中,经一系列的培养、驯化后,微生物和 DBT 的含量随培养时间的变化如图 1 所示。

从图 1 可知,随着微生物浓度的增加, DBT 浓度下降,当培养四天(即 96 小时)时,培养液中 DBT 浓度接

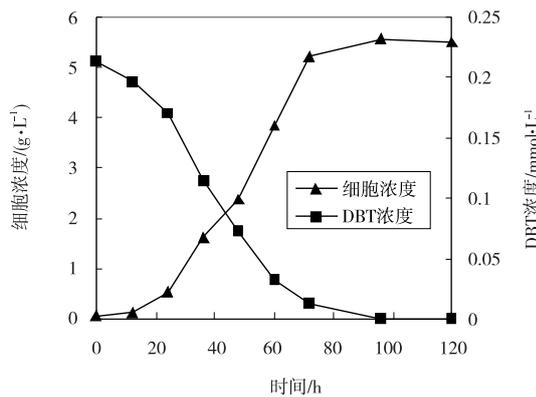


图 1 微生物和 DBT 浓度随培养时间的变化

近于零,此时微生物细胞浓度达到最大值,为  $5.57 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,由此表明微生物的生长与 DBT 脱硫是一个相关过程,两者是同时发生的,这说明微生物在生长繁殖的新陈代谢过程中,需要消耗 DBT 中的硫源来满足合成细胞机体对硫元素的需要。研究结果表明驯化富集到的微生物对 DBT 的生物脱硫效果很显著。

## 2.2 温度对 DBT 生物氧化脱硫的影响

在培养基体积为  $100 \text{ mL}$ 、DBT 终浓度为  $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、微生物接种量为  $5 \text{ mL}$ 、摇床转速为  $200 \text{ rpm}$  的条件下,分别设置  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  的温度梯度,培养 7 天,考察培养温度对 DBT 生物脱硫效率的影响,结果如图 2 所示。

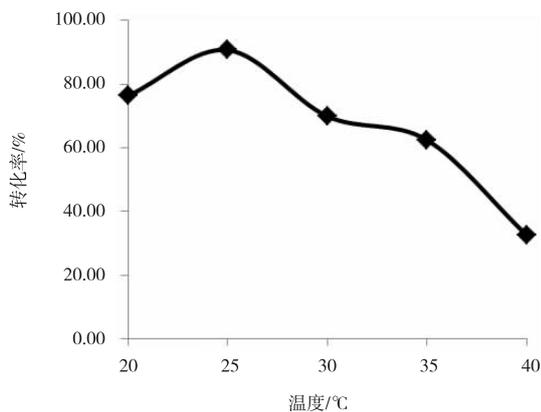


图 2 温度对 DBT 脱硫转化的影响

从图 2 可知,微生物的脱硫效率随着温度的上升而先增加后降低,当温度升高到  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  时,DBT 的脱硫转换率达到了最高,为  $90.74\%$ ;但当温度继续增加时,DBT 的转化率急剧下降,当温度为  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  时,DBT 的转换率仅为  $32.53\%$ 。其主要原因是微生物的生长代谢与温度息息相关,一般情况下,一定温度范围内,微生物的酶活性

随温度的升高而上升,但是当温度超过这一范围后,会抑制酶的活性,从而降低催化效率,甚至使其失活。研究表明所筛选、富集出的微生物其酶活性最适温度在  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  左右,低于此温度,酶活性降低,而当温度达到  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  时,微生物的生长会受到严重的影响,从而降低 DBT 的转化率。

## 2.3 转速对 DBT 生物氧化脱硫的影响

在培养基体积为  $100 \text{ mL}$ 、DBT 终浓度为  $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、微生物接种量为  $5 \text{ mL}$ 、培养温度为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  的条件下,分别设置  $160 \text{ rpm}$ 、 $180 \text{ rpm}$ 、 $200 \text{ rpm}$  和  $220 \text{ rpm}$  的摇床转速,培养 7 天,考察转数对 DBT 生物脱硫效率的影响,结果如图 3 所示。

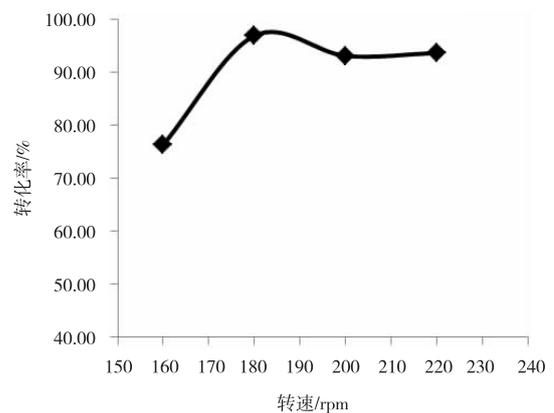


图 3 转速对 DBT 脱硫转化的影响

从图 3 可知,当摇床转数从  $160 \text{ rpm}$  增加到  $220 \text{ rpm}$  的过程中,微生物对 DBT 的脱硫转化率呈现先增加后轻微降低的现象。转速在  $180 \text{ rpm}$  时,DBT 转换率达到了最高,为  $96.83\%$ 。其主要原因是摇床的转速决定了培养基中溶解氧的含量,对于好养微生物,氧气浓度的变化对生长代谢和催化速率有影响,但是水中溶解氧浓度是有上限的,达到这个上限后摇速再增加溶解氧也不会明显增加;而另一方面,摇床转数过高,锥形瓶里的液体在高速旋转下产生较强的剪切作用力,这会影响微生物的生长代谢,从而导致脱硫效率不会继续增加甚至略有降低。

## 2.4 微生物初始浓度对 DBT 生物氧化脱硫的影响

在培养基体积为  $100 \text{ mL}$ 、DBT 终浓度为  $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、培养温度为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、摇床转速为  $180 \text{ rpm}$  的条件下,分别接种  $0.5 \text{ mL}$ 、 $1.0 \text{ mL}$ 、 $2.0 \text{ mL}$ 、 $3.0 \text{ mL}$ 、 $4.0 \text{ mL}$  和  $5.0 \text{ mL}$  的生物富集培养物,培养 7 天,考察微生物初始浓度对 DBT 生物脱硫效率的影响,结果如图 4 所示。

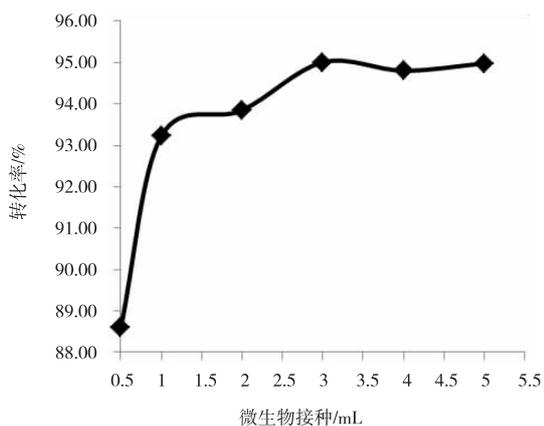


图4 微生物接种量对DBT脱硫转化的影响

从图4可知,接种量在0.5 mL增加到3 mL的过程中,脱硫效率逐渐上升,接种量为3.0 mL时DBT转换率达到了最高,为95.01%,之后继续增大接种量,转化率

略有波动。其主要原因是在接种量为0.5 mL~3 mL时,微生物量随着时间的增加呈几何数增长,初始接种量越大,微生物浓度也就越高,所以催化效率也越高。而当接种量超过3 mL时,DBT转化率不再增加,这主要是因为:随着反应产物2-羟基联苯和 $\text{SO}_4^{2-}$ 的增加,整个体系的传质速率受到影响,从而影响反应的正向进行,使反应速率降低<sup>[11]</sup>;此外,还存在一些不确定的因素,比如微生物已经利用完了碳源和其它营养物质<sup>[12]</sup>,从而也会影响其生长代谢。

## 2.5 微生物脱硫机理的探讨

为了考察微生物对DBT氧化脱硫的机理,在最优条件下,将脱硫微生物培养4天,然后用等体积正己烷萃取微生物混合液,将萃取后的有机相用GC-MS分析测定。其色谱、质谱图分别如图5、图6所示。

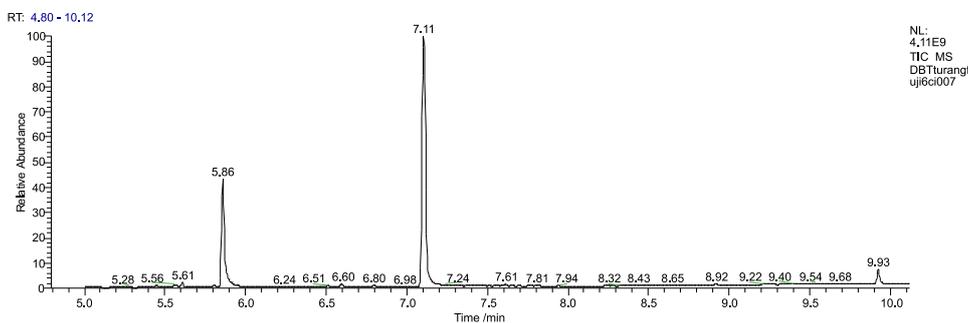
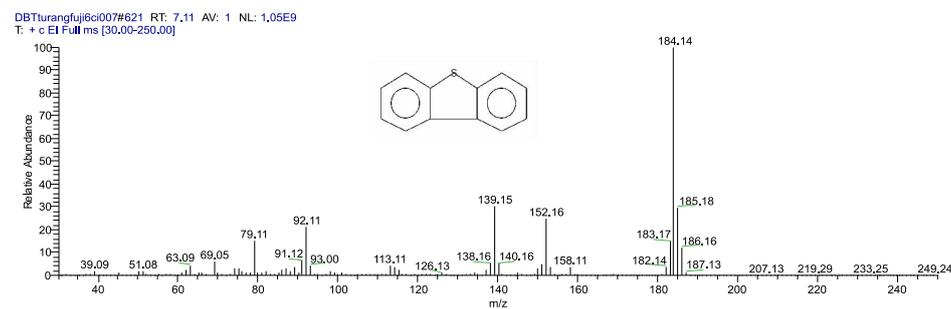
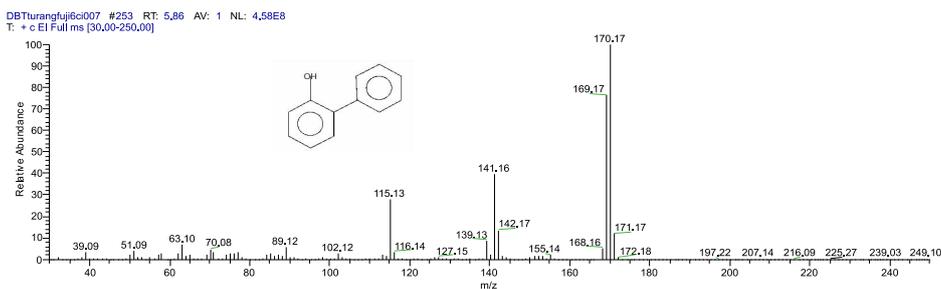


图5 GC-MS分析得到的氧化产物色谱图



(a) DBT分子量为184



(b) 2-HBP分子量为170

图6 保留时间为7.11 min和5.86 min物质的质谱图

从图 5、图 6 可知,从被油污染的土壤里通过筛选、驯化、富集得来的脱硫菌株能够将 DBT 催化氧化脱硫,最终产物为 2-羟基联苯(2-HBP)。有研究表明,微生物脱除 DBT 类硫需要 4 种酶:DBT 单加氧酶(dszC)、DBT 双加氧酶(dszA)、黄素还原酶(dszD)和 HPBS 脱硫酶的共同参与<sup>[13-14]</sup>。dszC 和 dszA 的活力依赖于 dszD。在 dszD 的存在下,dszC 和 dszA 将 DBT 依次氧化为相应的亚砷类(DBTO)、砷类(DBTO<sub>2</sub>)和磺酸盐类(HPBS);dszB 进一步将 HPBS 氧化脱硫,生成 2-HBP 和 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>。其详细脱硫途径如图 7 所示。

从图 7 可知,在这一反应过程中,噻吩类化合物只是作为硫源而不是碳源,微生物选择性地攻击 DBT 中的 C-S 键,使 C-S 键断裂,释放出硫元素,生成油溶性的 2-羟基联苯(此物又回到油相)。整个反应中碳碳结构不受到破坏,使得烃类化合物的碳骨架完好保存下来,从而最大限度地保留了石油产品的燃烧值。

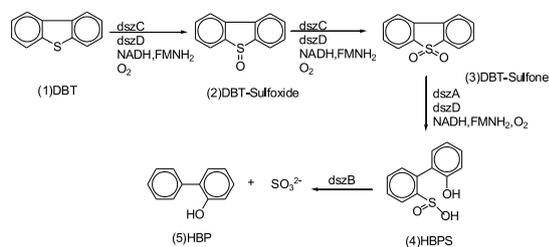


图 7 生物催化 DBT“4S”脱硫途径

### 3 结论

本文采用生物催化氧化,对原油中含硫化合物二苯并噻吩进行了脱硫研究,着重探讨了微生物驯化、富集,温度,转速和生物接种量等因素对生物催化脱硫效率的影响,并对其催化脱硫机理进行了探讨。结论如下:

(1)以甘油作为碳源、DBT 作为唯一硫源的培养体系来驯化、富集得到的微生物能够有效脱除 DBT 分子中的硫元素,微生物生长和 DBT 脱硫同时发生。

(2)微生物的脱硫率随培养温度、摇床转速、生物接种量的变化而不同。随着培养温度、摇床转速的增加,脱硫效率先增加后降低。生物接种量越大,脱硫效率越高,直至平缓。生物催化脱硫反应条件优化为:温度 25 ℃,摇床转速 180 rpm,生物接种量 3 mL,使 DBT 的脱

硫率达到了 95.01%。

(3)微生物催化脱硫的机理是:催化反应通过 4S 途径,将 DBT 转化成油溶性的 2-羟基联苯(2-HBP)并释放出硫来,同时烃类化合物碳骨架得以保存完好,从而不影响原油的热值。

### 参考文献:

- [1] 陈晗.模拟柴油生物脱硫机理及动力学研究[D].杭州:浙江大学,2010.
- [2] 邓建.高硫原油加工过程硫化氢中毒风险辨识及分级方法研究[D].北京:中国石油大学,2013.
- [3] ZENG X Y,XIAO X Y,LI Y,et al.Deep desulfurization of liquid fuels with molecular oxygen through graphene photocatalytic oxidation[J].Applied Catalysis B: Environmental,2017,209:98-109.
- [4] AL-DEGS Y S,EI-SHEIKH A H,AL-BAKAIN R Z, et al.Conventional and upcoming sulfur-cleaning technologies for petroleum fuel:a review[J].Energy Technology,2016,4(6):679-699.
- [5] YU M X,ZHANG N,FAN L W,et al.Removal of organic sulfur compounds from diesel by adsorption on carbon materials[J].Reviews in Chemical Engineering,2015,31(1): 27-43.
- [6] BONIEK D,FIGUEIREDO D,SANTOS A F B,et al. Biodesulfurization:a mini review about the immediate search for the future technology[J].Clean Technologies and Environmental Policy,2015,17(1):29-37.
- [7] MARTINEZ I,SANTOS V E,ALCON A,et al.Enhancement of the biodesulfurization capacity of Pseudomonas putida CECT5279 by co-substrate addition[J].Process Biochemistry,2015,50(1):119-124.
- [8] 陈晗,李伟.增溶剂强化模拟柴油生物脱硫研究[J].高校化学工程学报,2017,31(3):720-725.
- [9] RASHAD J,ARNO D K.Desulfurization of heavy oil[J].Applied Petrochemistry Research,2012,1(1-4):3-19.
- [10] JIANG X,YANG S,LI W.Biodesulfurization of model compounds and deasphalted bunker oil by mixed culture[J].Applied Biochemistry Biotechnology,2014,172

- (1):62-72.
- [11] TANG Q,LIN S,CHENG Y,et al.Enhanced biodesulfurization of bunker oil by ultrasound pre-treatment with native microbial seeds[J].Biochemical Engineering Journal,2013,77:58-66.
- [12] SETTI L,FARINELLI P,DI S,et al.Developments in destructive and non-destructive pathways for selective desulfurizations in oil-biorefining processes[J].Applied Microbiology Biotechnology,1999,52(1):111-117.
- [13] ALVES L,MARQUES S,MATOS J,et al.Dibenzothiophene desulfurization by *Gordonia alkanivorans* strain 1B using recycled paper sludge hydrolyzate[J].Chemosphere,2008,70(6):67-973.
- [14] MONTICELLO D J.Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates[J].Current Opinion in Biotechnology,2000,11(6):540-546.

### Study on Biodesulfurization of Crude Oil by Desulphurized Bacteria

TANG Qiong, XU Lanqing, FENG Hao, LI Xianbin, SUN Jiabin, XIE Xianyu

(Department of Chemistry, Leshan Normal University, Leshan 614000, China)

**Abstract:** The  $\text{SO}_2$  produced by burning oil can lead to environmental pollution. In order to remove the sulfur from the crude oil effectively, laboratory domestication and enrichment of microbes are used as specific desulfurization strain. The effects of various parameters for the desulfurization procedure such as temperature, rotating speed of rocking bed and biocatalyst initial concentration are discussed, and the mechanism of biodesulfurization is studied by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis method. The results show that the sulfur on DBT can be removed by the native microbial cells through the 4S pathway and the oil soluble 2-hydroxy biphenyl (2-HBP) is formed without resulting in a loss in the fuel value or energy loss. The desulfurization rate varies with the temperature of culture, rotating speed of rocking bed and the initial amount of biocatalyst. The desulfurization rate increased first and then decreased with the increase of culture temperature and rotating speed. The greater the amount of biocatalyst, the higher the desulfurization rate until to a certain degree. The optimum conditions of biocatalytic desulfurization are as follows: temperature 25 °C, shaking speed 180 rpm, inoculation rate 3 ml, and the desulfurization rate of DBT reaches 95.01%. Microbial catalytic desulfurization is to transform DBT into oil-soluble 2-hydroxy biphenyls (2-HBP) and release sulfur through 4S process. Meanwhile, the original carbon skeleton of DBT is well preserved, so that the calorific value of crude oil is not affected.

**Key words:** crude oil; Dibenzothiophene; desulphurized bacteria; biodesulfurization