

# گوگردزدایی گازی توسط باکتری *Rhodococcus P32C1* تثبیت شده روی پایه پلیمری

هادی ناظم بکایی\*<sup>+</sup>، منوچهر وثوقی، ایران عالمزاده

تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، صندوق پستی ۱۱۳۶۵-۶۱۹۱

سعید مقصودی

تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مهندسی شیمی

**چکیده:** به منظور گوگردزدایی بیولوژیکی از گازوییل، باکتری بومی *Rhodococcus P32C1* روی پایه‌های پلیمری تثبیت شد. پایه‌های آلژینات و پلی اتیلن از میان انواع متفاوت پایه‌هایی که برای تثبیت سلول به کار می‌روند به دلیل ارزان‌تر بودن، روش تثبیت ساده‌تر، امکان دسترسی بهتر و سازگاری مناسب‌تر با باکتری انتخاب شدند. آزمایش‌های اولیه گوگردزدایی در حضور ترکیب گوگرددار مدل دی بنزوتیوفن و در فاز آبی انجام شد و در نتیجه میزان تبدیل دی بنزوتیوفن توسط سلول‌های تثبیت شده در آلژینات و روی پلی اتیلن به ترتیب ۱/۰۶ میلی‌مول در ساعت به ازای هر کیلوگرم جرم خشک سلولی و ۰/۱۸ میلی‌مول در ساعت به دست آمد. به منظور بررسی فعالیت گوگردزدایی سلول‌های تثبیت شده در محیط آلی، میزان کاهش گوگرد کل یک نمونه گازوییل اندازه‌گیری شد که در شرایط عملیاتی بهینه، سلول‌های تثبیت شده در آلژینات و روی پلی اتیلن باعث کاهش به ترتیب ۱۰ و ۴ درصد گوگرد کل نمونه گازوییل شده بودند.

**واژه‌های کلیدی:** گوگردزدایی بیولوژیکی، سلول‌های تثبیت شده، آلژینات، دی بنزوتیوفن.

**KEY WORDS:** Biodesulfurization, Immobilized cells, Alginate, Dibenzothiophene.

## مقدمه

سخت‌تر شده و تولید کنندگان سوخت در سراسر جهان برای حفظ موقعیت خود در بازار ملزم به رعایت این قوانین و استانداردها شده‌اند.

استاندارد میزان گوگرد مجاز سوخت دیزل مورد استفاده در حمل و نقل، در آمریکا، در سال جاری باید به حد ۱۵ ppmw برسد که در سال ۲۰۰۳ این استاندارد ۵۰۰ ppmw بوده است. در اروپا استاندارد حد مجاز گوگرد سوخت دیزل مورد استفاده در سال ۲۰۰۵، ۵۰ ppmw بوده و تا اوایل سال ۲۰۰۸ این میزان باید به ۱۰ ppmw برسد [۱،۲]. همچنین در ژاپن تا سال ۲۰۰۸ میلادی

ترکیب‌های گوگرددار موجود در نفت و برش‌های آن، مشکلاتی را در صنعت نفت ایجاد کرده‌اند که آلودگی محیط زیست مهم‌ترین آنها به شمار می‌رود. این ترکیب‌ها پس از احتراق به صورت اکسیدهای متفاوت گوگرد ( $SO_x$ ) و بیش از همه به صورت  $SO_2$  آزاد می‌شوند.  $SO_2$  سبب بروز ناراحتی‌های تنفسی به‌ویژه در کودکان و افراد پیر، تشکیل باران‌های اسیدی و سرعت بخشیدن به تشکیل آئروسول می‌شود. این موارد منجر به وضع قوانین و استانداردهایی برای کنترل میزان  $SO_2$  تولیدی به‌منظور کاهش آلودگی‌های زیست محیطی شده است. هر ساله این قوانین

\*E-mail: hbokaee@yahoo.com

\*عهده دار مکاتبات

مطالعات ژنتیکی گسترده‌ای روی این باکتری‌ها انجام شده است اما تحقیقات کمی روی جنبه‌های مهندسی و توسعه صنعتی فرایند گوگردزدایی بیولوژیکی صورت گرفته است، همچنین اصلاحات ژنتیکی و بهبود فعالیت باکتری قادر به حل دو مشکل اصلی توسعه صنعتی فرایند گوگردزدایی بیولوژیکی نیستند. این دو مشکل عبارت‌اند از: جداسازی فاز آلی از آبی و امکان استفاده مجدد از سلول‌ها در فرایند.

فعالیت‌های انجام شده برای توسعه صنعتی این فرایند، همگی به‌صورت سیستم‌های سه فاز (آب/سلول/سوخت آلی) بوده است. در این سیستم‌ها فاز آلی با فاز آبی حاوی سلول‌ها مخلوط شده و تولید امولسیون می‌کند که جداسازی سوخت آلی امولسیون شده بسیار مشکل است. از طرف دیگر بازیابی سلول‌ها از چنین سیستمی مشکلات دیگری را مطرح می‌سازد. تثبیت کردن سلول‌ها به‌عنوان راهی برای حل مشکل جداسازی میکرواورگانسیم از فاز آلی و امکان استفاده مجدد از آن، در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق، باکتری P32C1 به دو روش تثبیت شده است. در روش اول باکتری در داخل ژل آلژینات (روش به دام اندازی) و در روش دوم روی پلی اتیلن (روش جذب سطحی فیزیکی) تثبیت شده و سپس عملکرد گوگردزدایی باکتری تثبیت شده به این دو روش مقایسه شده است.

### مواد شیمیایی

دی بنزو تیوفن (DBT)، ۲- هیدروکسی بی‌فینیل (۲-HBP) و گلیسیرول از شرکت Merck، آلژینات از BDH و پلی اتیلن از بازار داخلی تهیه شده‌اند.

### میکرواورگانسیم

باکتری *Rhodococcus P32C1* که از خاک‌های ایران جداسازی شده است [۱۳] به‌خاطر توانایی آن در گوگردزدایی از دی بنزو تیوفن مورد استفاده قرار گرفته است.

### روش‌ها

#### روش تهیه معلق سلولی

در ابتدا P32C1 در محیط کشت A حاوی ۰/۲۵ mM دی‌بنزو تیوفن (منبع گوگرد) و ۵ گرم بر لیتر گلیسیرول (منبع کربن) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm رشد داده

استفاده از سوخت دیزل با میزان گوگرد بیش از ۱۰ ppmw مجاز نیست [۲]. پیش بینی شده است که در ۵ تا ۱۰ سال آینده رعایت استانداردهای میزان گوگرد صفر، در سراسر جهان الزامی خواهد بود [۳]. این در حالی است که استانداردهای میزان گوگرد مجاز سوخت دیزل (و سوخت‌های دیگر) در ایران با استانداردهای جهانی تفاوت زیادی دارد و روند حرکت در رسیدن به سوخت‌های کم گوگرد نیز با توجه به استانداردهای آینده جهانی بسیار کند می‌باشد. از طرف دیگر براساس آمار موجود [۴]، میزان تقاضا برای سوخت‌ها در آینده روند رو به افزایش دارد، بنابراین گوگردزدایی با سرعت و حجم بیشتر و در عین حال انتخاب روش‌های با کارایی بالاتر و اقتصادی‌تر ضروری خواهد بود.

روش گوگردزدایی با هیدروژن<sup>(۱)</sup> متداول‌ترین روش گوگردزدایی در صنعت است اما برای رسیدن به استانداردهای یاد شده هزینه‌های زیادی را تحمیل می‌کند [۵ و ۶]. این هزینه‌ها ناشی از نیاز به دما و فشارهای بالاتر و مصرف هیدروژن بیشتر است. افزون بر آن HDS در گوگردزدایی از ترکیب‌های گوگردار پیچیده به‌طور کامل موفق نبوده است و این در حالی است که رسیدن به استانداردهای آینده مشروط به گوگردزدایی از چنین ترکیب‌هایی است.

گوگردزدایی به روش بیولوژیکی یکی از روش‌هایی است که به‌عنوان روشی مکمل یا جایگزین برای روش مرسوم HDS در سال‌های اخیر در جهان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. میکرواورگانسیم‌های متفاوتی با قابلیت حذف گوگرد از ترکیب‌های گوگردار موجود در سوخت‌ها، بدون تغییر در ساختار و ارزش حرارتی سوخت، شناسایی و جداسازی شده‌اند و مطالعات مفصلی روی برخی از آنها به‌منظور شناسایی آنزیم‌های مسئول گوگردزدایی و نقش هر یک انجام شده است. در این میان کامل‌ترین تحقیقات انجام شده به باکتری *Rhodococcus sp. IGTS8* اختصاص داشته است [۷-۱۰]. همچنین توانایی حذف گوگرد از ترکیب‌های گوگردار پیچیده (مانند دی بنزو تیوفن و مشتقات شاخه دار آن) توسط بسیاری از این میکرواورگانسیم‌ها گزارش شده است [۱۱، ۱۲]. باکتری *Rhodococcus P32C1* استفاده شده در این تحقیق نیز توانایی مصرف دی بنزو تیوفن، حذف گوگرد از آن و تبدیل آن به ۲- هیدروکسی بی‌فینیل را دارا است [۱۳]. اگرچه مطالب بسیاری در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های مستعد حذف گوگرد از ترکیب‌های ساده و پیچیده گوگردار منتشر شده و

(۱) Hydrodesulfurization (HDS)

تمام پودر آلزینات سدیم، هم‌زدن ادامه داشته تا محلولی به‌طور کامل یکنواخت به دست بیاید و تمام حباب‌های هوای داخل محلول خارج شوند [۱۴]. به این محلول، معلق سلولی (۳۰g/l) و با نسبت ۱ به ۶ افزوده شده و در حدود یک ساعت هم‌زدن ادامه داشته است تا مخلوط یکنواختی از سدیم آلزینات - سلول به‌دست آید. مخلوط سدیم آلزینات - سلول به کمک هوای فشرده به‌وسیله‌ی یک سرنگ قطره قطره به محلول  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ مولار، افزوده شده است. پس از تزریق تمام مخلوط، به مدت نیم ساعت هم‌زدن ادامه داشته تا دانه‌هایی یکنواخت تشکیل شوند. دانه‌های آلزینات کلسیم، به قطر تقریبی ۳ میلی متر، با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول تازه کلسیم کلرید دوآبه ۰/۱ مولار شسته شده و سپس به وسیله کاغذ صافی از محلول جدا شده اند. دانه های به دست آمده به این ترتیب در محلول کلرید کلسیم دوآبه ۰/۱ مولار تازه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند تا در زمان لازم برای آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

### روش تثبیت سلول در پلی اتیلن

۲۰ گرم گرانول پلی اتیلن با آب مقطر شسته شده، خشک شده و توزین شده است. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده است. گرانول‌های پلی اتیلن تحت شرایط استریل به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت A استریل (حاوی ۰/۲۷ mM دی بنزوتیوفن) افزوده شده‌اند. از پیش کشت با  $\text{OD}_{600} = 1$  به میزان ۱۰ درصد تلقیح به محیط کشت انجام شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm دماگذاری شده است. پس از سه روز محیط کشت تخلیه شده و پایه پلی اتیلنی با آب مقطر استریل شستشو داده شده تا هرگونه سلول تثبیت نشده باقی مانده روی سطح خارج شود [۱۵-۱۸].

### بررسی فعالیت گوگردزایی سلول‌های تثبیت شده در آلزینات

دانه‌های آلزینات حاوی سلول‌های تثبیت شده  $\text{P32C1}$  را در ۲۵ میلی‌لیتر محلول کلسیم کلرید دوآبه ۰/۱ مولار (حاوی ۰/۲ mM دی بنزوتیوفن) و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm قرار داده و برای تعیین فعالیت گوگردزایی آنها، میزان دی‌بنزوتیوفن باقی‌مانده در محلول اندازه گیری شده است (شکل ۳).

در آزمایشی دیگر و به منظور بررسی فعالیت سلول‌های تثبیت شده، در گوگردزایی از گازوییل (فاز آلی)، همان مقدار دانه‌های آلزینات به ۲۵ میلی‌لیتر گازوییل اضافه شده، تحت شرایط یکسان

جدول ۱- ترکیب محیط کشت A.

ماده	مقدار
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	۴ g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	۱ g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	۰/۵ g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	۰/۲ g
$\text{CaCl}_2$	۰/۰۲ g
$\text{NaCl}$	۰/۰۱ g
محلول فلزی	۱۰ ml
محلول ویتامینی	۱ ml
Deionized water	۱ liter
محلول فلزی	
$\text{FeCl}_2$	۰/۵ g
$\text{ZnCl}_2$	۰/۵ g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۵ g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۰/۱ g
$\text{CuCl}_2$	۰/۰۵ g
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۵ g
HCl	۱۲۰ mmol
Deionized water	۱ liter
محلول ویتامینی	
Calcium Pantothenate	۴۰۰ mg
Pyridoxine hydrochloride	۴۰۰ mg
Niacin	۴۰۰ mg
Inositol	۲۰۰ mg
P-aminobenzoic acid	۲۰۰ mg
Cyanocobalamin	۰/۵ mg
Deionized water	۱ liter

شده است. پس از ۳ روز، سلول‌ها سانتریفوژ شده و دو مرتبه با بافر پتاسیم فسفات (pH=7) شسته شده و سپس در مقدار حداقلی از همان بافر معلق شده‌اند. معلق سلولی حاصل برای تثبیت مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیب محیط کشت A در جدول ۱ ارایه شده است.

### روش تثبیت سلول در آلزینات

محلول (w/v) ۳ درصد سدیم آلزینات در آب مقطر ساخته شده است. اضافه کردن پودر سدیم آلزینات به آهستگی و در دمای محیط انجام شده و به مدت یک ساعت نیز پس از افزودن

جدول ۲- پایداری شیمیایی دانه‌های آلزینات حاوی سلول‌های تثبیت شده (R. P32C1) در محیط‌های متفاوت.

محیط مورد استفاده	قطر اولیه دانه های آلزینات (mm)	قطر دانه‌های آلزینات پس از ۲ هفته (mm)
آب مقطر	۲٫۹	۲٫۹
کلسیم کلرید ۰٫۱ مولار	۲٫۷	۲٫۷
بافر پتاسیم فسفات (pH=۷)	۳٫۲	۳
هگزادکان	۲٫۹	۰٫۲
گازوییل	۳	۲٫۹

به منظور بررسی امکان استفاده مجدد از سلول‌ها، تعداد مراحل گوگردزایی توسط سلول‌های تثبیت شده روی پلی اتیلن آزمایش شده است. برای این کار، سلول‌های تثبیت شده پنج مرتبه با محیط کشت A تازه (بدون تلقیح) و  $0.27 \text{ mM}$  دی بنزوتیوفن و سه مرتبه با محیط بافر فسفات (بدون تلقیح) و همان مقدار دی بنزوتیوفن تغذیه شده اند و فعالیت گوگردزایی آنها بررسی شده است (شکل ۴). در هر دو حالت برای تعیین فعالیت گوگردزایی، میزان دی بنزوتیوفن باقی‌مانده در محلول اندازه گیری شده است.

در آزمایشی دیگر و به منظور بررسی فعالیت سلول‌های تثبیت شده، در گوگردزایی از گازوییل (فاز آلی)، پایه‌های پلی اتیلنی دو مرتبه با بافر فسفات (pH=۷) شسته شده، سپس  $100$  میلی‌لیتر گازوییل به آنها افزوده شده و تحت شرایط یکسان فعالیت گوگردزایی سلول‌ها بررسی شده است (جدول ۴).

### دستگاه‌ها

فرمنتور استفاده شده در این تحقیق، با نام Chemap ساخت سوئیس،  $5$  لیتری و از نوع هم‌زن‌دار با هم‌زن نوع توربین چهار تیغه‌ای و دارای baffle بوده است. هوای استریل مورد نیاز به کمک صافی‌های کربنی نصب شده روی فرمنتور تأمین شده است. همچنین برای تعیین غلظت دی‌بنزوتیوفن (DBT) و  $2$  - هیدروکسی بی‌فنیل (۲-HBP) از دستگاه HPLC مجهز به پمپ HPLC pump ۵۱۵ Waters و شناساگر UV (۲۴۸۷) Waters و Dual absorbance detector استفاده شده است. ستون مورد استفاده  $\mu$ Bonda Pak C1۸ با اندازه‌ی ذره‌های  $10$  میکرون و ابعاد  $250 \times 4/6$  میلی متر بوده است.

برای اندازه گیری غلظت گلیسرول از همان دستگاه استفاده شده است با این تفاوت که شناساگر مورد استفاده RI (۲۴۱۰) Waters و Refractive Index detector) بوده است و ستون ۱ Sugar-Pak با ابعاد  $300 \times 6/5$  میلی متر و دمای  $70$  درجه سانتی‌گراد به کار گرفته شده است.

تجزیه گوگرد کل به وسیله‌ی دستگاه X-Ray و بر اساس استاندارد ASTM D-۴۲۹۴، در پژوهشگاه صنعت نفت انجام شده است. مشخصات گازوییل مورد استفاده در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین مقدار جذب نور در طول موج  $660$  نانومتر برای تعیین میزان رشد سلولی، به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شده است.

فعالیت گوگردزایی سلول‌ها بررسی شده است. (جدول ۴) به منظور انتخاب محیط آبی مناسب برای بررسی عملکرد گوگردزایی P32C1، پایداری پایه های آلزینات ساخته شده در محیط‌های متفاوت آزمایش شده است. نتیجه‌های این آزمایش‌ها در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به نتیجه‌های این جدول، کلسیم کلرید مناسب‌ترین ماده برای انجام آزمایش‌های گوگردزایی در فاز آبی تشخیص داده شد. (اگرچه با توجه به این جدول، آلزینات در آب نیز به‌طور کامل نامحلول است اما آب خالص تعادل فشار اسمزی داخل سلولی را به هم زده و منجر به متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شود) همچنین با توجه به نتیجه‌های جدول ۲، آلزینات در مجاورت گازوییل پایداری به نسبت خوبی داشته است. پلی اتیلن در تمامی محیط‌های آبی و آلی آزمایش شده برای آلزینات پایدار بوده است.

### بررسی فعالیت گوگردزایی سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن

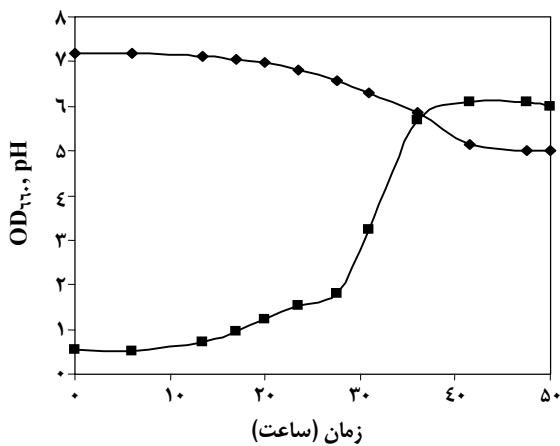
$100$  میلی‌لیتر محیط کشت جدید (محیط A حاوی  $0.27 \text{ mM}$  دی بنزوتیوفن) و بدون تلقیح به ارلن حاوی سلول‌های تثبیت شده روی پایه پلی اتیلنی اضافه و سپس عمل گوگردزایی سلول‌های تثبیت شده P32C1 بررسی شده است. سپس کل محیط کشت داخل ارلن تخلیه شده و پایه پلی اتیلنی (حاوی سلول‌های تثبیت شده) دو مرتبه با آب مقطر شسته شده و سپس در محیط عاری از مواد مغذی، گوگردزایی سلول‌های تثبیت شده P32C1 بررسی شده است.  $100$  میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH=۷) حاوی  $0.27 \text{ mM}$  دی بنزوتیوفن، محیط عاری از مواد مغذی مورد استفاده بوده است. برای تعیین فعالیت گوگردزایی، دی بنزوتیوفن باقی‌مانده در محلول اندازه گیری شده است (شکل ۳).

## نتیجه‌ها و بحث

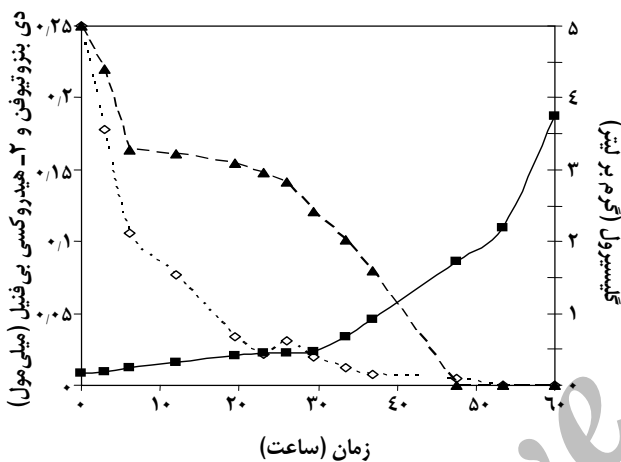
در شکل ۱ منحنی رشد باکتری و تغییرهای pH و در شکل ۲ روند تغییرهای غلظت DBT، ۲-HBP و گلیسیرول نشان داده شده است. این نتیجه‌ها مربوط به رشد باکتری در ۳/۵ لیتر محیط کشت حاوی ۰/۲۵ mM دی بنزوتیوفن در فرمنتور و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دور ۴۰۰ rpm و میزان هوادهی ۰/۵ v.v.m بوده است. این نتیجه‌ها پایداری فعالیت گوگردزایی باکتری *Rhodococcus P* که از زمان جداسازی و خالص سازی آن مدت زمانی گذشته است را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که این باکتری توانایی تبدیل DBT به ۲-HBP را در فاز رشد دارا است. روند تغییرهای منبع کربنی مورد نیاز رشد که در این تحقیق گلیسیرول بوده نیز مورد بررسی قرار گرفته است. مطابق شکل ۲ ورود باکتری به فاز سکون با اتمام منبع کربن همراه بوده است و بدین ترتیب محدودکنندگی منبع کربن برای فاز رشد تأیید می‌شود. در تحقیق قبل [۱۳] عدم بازدارندگی رشد برای DBT تا غلظت ۰/۵ mM تأیید شده بود.

شکل ۳ میزان حذف DBT در فاز آبی را برای سلول‌های تثبیت شده در دو پایه نشان می‌دهد. با توجه به این شکل مشاهده می‌شود که سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن، DBT را سریع‌تر از سلول‌های تثبیت شده در آلژینات تبدیل کرده‌اند. در حالتی که سلول‌های تثبیت شده روی پلی اتیلن در مجاورت محیط کشت مغذی A دی بنزوتیوفن را تبدیل کرده‌اند مکانیسم غالب تثبیت، جذب سطحی فیزیکی بوده است و تبدیل سریع‌تر DBT به دلیل رشد سلول‌های کنده شده از سطح پایه در محیط کشت است، ولی در حالتی که سلول‌های تثبیت شده روی پلی اتیلن در محیط بافری دی بنزوتیوفن را تبدیل کرده‌اند امکان رشد سلول‌های کنده شده از سطح پایه، به علت نبود مواد مغذی لازم برای رشد، وجود نداشته است، در نتیجه مکانیسم تثبیت در این حالت به احتمال ترکیبی از جذب سطحی فیزیکی و به دام افتادن داخل منافذ پلی اتیلن است.

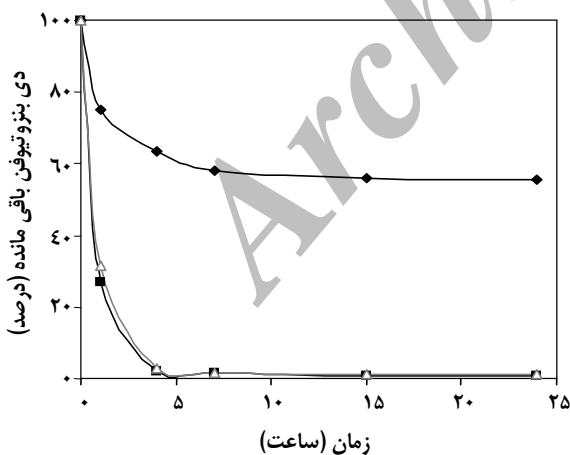
از طرف دیگر شمارش تعداد سلول‌های تثبیت نشده یا نشت کرده (leakage) از پایه‌ها پس از ۲۴ ساعت بیانگر تثبیت بهتر سلول‌ها در آلژینات است به طوری که پس از این مدت هیچ‌گونه نشستی از داخل آلژینات دیده نشد، در حالی که بخشی از سلول‌های تثبیت شده روی پلی اتیلن در هر بار تخلیه از سطح آن کنده می‌شدند. (مقدار نشت سلول‌ها در حالتی که در محیط بافری گوگردزایی کرده‌اند بسیار کمتر از حالتی بوده است که سلول‌ها



شکل ۱- منحنی رشد P32C1 (■) و تغییرات pH محیط (♦) در فرمنتور.



شکل ۲- روند تغییرات غلظت DBT (♦)، ۲-HBP (■) و گلیسیرول (▲) در فرمنتور.



شکل ۳- روند حذف DBT به وسیله سلول‌های تثبیت شده P32C1. ♦ : سلول‌های تثبیت شده در آلژینات، ■ : سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن و در مجاورت محیط کشت A، ▲ : سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن و در مجاورت محیط بافری.

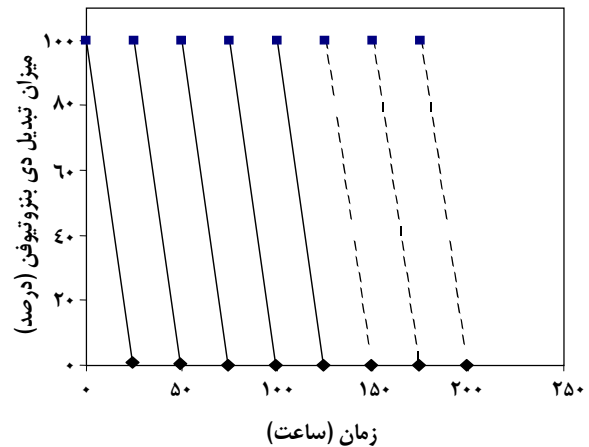
جدول ۳- مشخصات گازوییل تولیدی در شرکت ملی نفت ایران مورد استفاده در این تحقیق.

Distillation, D-۸۶ @ ۳۵۷ °C	vol%	۹۰
F.B.P	°C	۳۸۵
Density @ ۱۵ °C	Kg/L	۰٫۸۵
Color	-	۳
Flash Point	°C	۵۴
Sulfur Total	% mass	۰٫۷۴
Viscosity Kinematic @ ۳۷۸ °C	mm <sup>۲</sup> /s	۲-۵٫۵
Cloud Point	°C	۱٫۵
Pour Point	°C	-۴
Carbon Residue (max)	% mass	۰٫۱
Ash (max)	% mass	۰٫۰۱
Cetane Index	-	۵۰

در محیط کشت A دی بنزوتیوفن را تبدیل کرده‌اند). دلیل دیگر تبدیل کمتر DBT به وسیله آلزینات، وجود مقاومت‌های نفوذی بیشتر در مقایسه با پلی اتیلن است. DBT برای رسیدن به سلول‌های تثبیت شده در آلزینات باید ابتدا از سطح ژل آلزینات عبور کند و سپس در داخل آلزینات به دیواره سلولی برسد که هر دو از مقاومت‌های اصلی انتقال جرم محسوب می‌شوند. DBT برای رسیدن به سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن با چنین مقاومت‌هایی روبرو نیست.

در شکل ۴ تعداد مراحل فعالیت گوگردزایی سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن و در مجاورت محیط کشت A و محیط بافری نشان داده شده است. (پس از پنجمین مرحله، محیط بافری حاوی DBT جایگزین شده است) با توجه به این شکل، در هر مرحله گوگردزایی، DBT پس از ۲۴ ساعت کامل تبدیل شده است و همچنین امکان استفاده مجدد از سلول‌های تثبیت شده روی پلی اتیلن با حفظ قابلیت گوگردزایی تأیید شده است.

در جدول ۴ نتیجه‌های مقایسه سرعت گوگردزایی اولیه سلول‌های آزاد P۳۲C۱ با سلول‌های تثبیت شده P۳۲C۱ آورده شده است. با توجه به این جدول، نرخ گوگردزایی اولیه از DBT به وسیله سلول‌های P۳۲C۱ تثبیت شده در آلزینات (۱/۰۶ میلی مول در ساعت به ازای هر کیلوگرم جرم خشک سلولی) از نرخ گوگردزایی اولیه از DBT توسط سلول‌های آزاد P۳۲C۱ (۱/۸۶ میلی مول در ساعت به ازای هر کیلوگرم جرم خشک سلولی) کمتر بوده است که به دلیل وجود مقاومت‌های انتقال جرم است. همان گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، سلول‌های تثبیت شده در آلزینات قادر به تبدیل تمام DBT نیز نبوده‌اند در حالی که آزمایش‌های انجام شده روی سلول‌های آزاد، تبدیل کامل DBT به وسیله آنها را تأیید کرده‌اند. اگرچه آزمایش‌های انجام شده علت عدم تبدیل کامل DBT توسط سلول‌های تثبیت شده در آلزینات را مقاومت‌های نفوذی در برابر عبور مولکول‌های DBT نشان داده‌اند اما به منظور بررسی دقیق‌تر این مساله به مطالعات بیشتری نیاز است. در مورد سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن، به دلیل این‌که امکان تعیین دقیق تعداد سلول‌های تثبیت شده روی پایه وجود نداشته است، نرخ گوگردزایی سلول‌های تثبیت شده بر مبنای واحد مستقل از میزان سلول‌ها بیان شده است. در این مورد نرخ تبدیل DBT (نرخ گوگردزایی از DBT) معادل ۰/۱۸ میلی مول بر ساعت به دست آمده است و پس از ۲۴ ساعت کل DBT تبدیل شده است (شکل ۴).



شکل ۴- تعداد مراحل گوگردزایی توسط سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن. هر مرحله ۲۴ ساعت بوده است و علامت (■) بیان‌گر افزودن DBT در ابتدای هر مرحله، و علامت (◆) بیان‌گر اتمام آن است. از مرحله ششم به بعد (که با خط چین نشان داده شده است)، گوگردزایی از DBT در مجاورت محیط بافری (pH=۷) انجام شده است.

دلیل آن تماس غیر مستقیم سلول‌ها با گازوییل است. میزان حذف گوگرد از نمونه گازوییل به وسیله سلول‌های تثبیت شده در آلزینات و پلی اتیلن به ترتیب ۱۰ و ۴ درصد به دست آمده است.

### نتیجه‌گیری نهایی

توانایی گوگردزادایی باکتری P332C1 از گازوییل در حالت تثبیت نشده، طبق نتیجه‌های تحقیق قبلی [۱۹]، به صورت جدول ۶ گزارش شده است. همان گونه که در این جدول مشاهده می‌شود، با افزایش میزان گوگرد برش نفتی، درصد گوگردزادایی کاهش یافته است.

گازوییل مورد استفاده در تحقیق حاضر ۷۴۰۰ ppm گوگرد داشته است، در نتیجه حداکثر میزان گوگردزادایی معادل با ۱۰ درصد در حالت تثبیت شده عددی قابل قبول و در حد توانایی میکرواورگانیزم است. با این وجود، علی‌رغم به کارگیری غلظت به نسبت بالای سلولی در این تحقیق، نتیجه‌های به دست آمده از گوگردزادایی گازوییل به وسیله سلول‌های تثبیت شده بیان‌گر فعالیت کم سلول‌ها است. در نتیجه استفاده از غلظت‌های بالاتر و تعداد بیشتر سلول در مطالعات آینده، به منظور توسعه فرایند، الزامی خواهد بود.

از ارزیابی نتیجه‌های به دست آمده چنین استنباط می‌شود که پایه آلزینات به دلیل نشتی کمتر سلول‌ها از آن و حفاظت بهتر از آنها (به‌ویژه در مجاورت گازوییل)، برای تثبیت سلول‌ها نسبت به پلی اتیلن مناسب‌تر است، اما به خاطر وجود مقاومت‌های انتقال سوبسترات (DBT) و فراورده (۲-هیدروکسی بی فنیل) نیاز به اصلاحاتی در ساختار دارد. استفاده از آلزینات در فرمتورهای صنعتی به علت مقاومت مکانیکی پایین آن نیز مشکلاتی ایجاد می‌کند و از این رو باید اصلاحاتی روی خواص مکانیکی این پایه پلیمری طبیعی انجام شود تا استفاده از آن را در صنعت توجیه‌پذیر سازد.

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۲/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۰/۱۹

جدول ۴- مقایسه نرخ گوگردزادایی اولیه سلول‌های تثبیت شده و تثبیت نشده P332C1.

شرایط آزمایش	نرخ گوگردزادایی (تبدیل DBT)
P332C1 تثبیت نشده	$1,86 \text{ mmol.kg dcw}^{-1}.\text{hr}^{-1}$
P332C1 تثبیت شده در آلزینات	$1,06 \text{ mmol.kg dcw}^{-1}.\text{hr}^{-1}$
P332C1 تثبیت شده در پلی اتیلن	$0,18 \text{ mmol.kg}^{-1}.\text{hr}^{-1}$

جدول ۵- فعالیت سلول‌های تثبیت شده در گوگردزادایی از گازوییل.

نوع پایه به کار رفته برای تثبیت سلول‌ها	درصد وزنی گوگرد گازوییل پس از گوگردزادایی
آلزینات	۰,۶۷
پلی اتیلن	۰,۷۱

جدول ۶- توانایی گوگردزادایی باکتری P332C1 در حالت تثبیت نشده.

دیزل HDS	دیزل اتمسفریک	نوع دیزل
۳۰۳ ppm	۱۰۰۰ ppm	میزان گوگرد اولیه
۱۵۶ ppm	۷۶۳ ppm	میزان گوگرد پس از گوگردزادایی
۴۸,۵ درصد	۲۳,۷ درصد	درصد گوگردزادایی

به منظور بررسی فعالیت گوگردزادایی P332C1 در فاز آلی (گازوییل)، نتیجه‌های به دست آمده از گوگردزادایی در فاز آبی برای طراحی آزمایشی با شرایط مشابه مورد استفاده قرار گرفت و مطابق توضیح‌های ارائه شده در بخش روش‌ها، آزمایش برای هر دو حالت تثبیت در آلزینات و پلی اتیلن انجام شد. جدول ۵ نتیجه‌های عملکرد گوگردزادایی از گازوییل به وسیله سلول‌های تثبیت شده در دو پایه را نشان می‌دهد. با توجه به نتیجه‌های این جدول، سلول‌های تثبیت شده در آلزینات فعالیت گوگردزادایی بهتری نسبت به سلول‌های تثبیت شده در پلی اتیلن نشان می‌دهند که

### مراجع

- [1] Song, C., Ma, X., *Applied Catalysis B: environmental*, **41**, p.207 (2003).
- [2] Chang, T., *Petroleum Technology Quarterly Catalysis*, **8**(2), p.21 (2003).
- [3] Babich, I.V., Moulijn, J.A., *Fuel*, **82**, p.607 (2003).

- [4] Ross, J., Lepage, J.P. and Confuorto, N., *Hydrocarbon Processing*, p.47 (2003).
- [5] Lee, C.K., McGoven, S., *Petroleum Technology Quarterly*, **6**(4), p.35 (2001/2002).
- [6] Kennedy, J., Clean Diesel Fuel Implementation Workshop, November 20-21, 2002, Houston, Texas, USA.
- [7] Denome, S.A., Olson, E.S. and Young, K.D., *App. Environ. Microbiol.*, **59**(9), p.2837 (1993).
- [8] Gray, A.K., Progrebinsky, O.S., Mrachko, G.T., Xi, L., Monticello, D.J. and Squires, C.H., *Nature Biotechnology*, **14**, p.1705 (1996).
- [9] Oldfield, C., Pogrebinsky, O., Simmonds, J., Olson, E. and Kulpa, C., *Microbiology*, **143**, p.2961 (1997).
- [10] Gray, K.A., Mrackko, G.T. and Squires, C.H., *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, p.229 (2003).
- [11] Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., Saitoh, K., Ushiyama, H. and Maruhashi, K., *Biotechnol. Bioeng.*, **83**(4), p.399 (2003).
- [12] Kobayashi, M., Horiuchi, K., Yoshkawa, O., Hirasawa, K., Ishii, Y., Fujino, K., Sugiyama, H. and Maruhashi, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(2), p.298 (2001).
- [۱۳] مقصودی، سعید؛ "حذف گوگرد از برش‌های میان تقطیر نفتی به روش بیولوژیکی" پایان نامه دکترا، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف (۱۳۷۸).
- [14] Bickerstaff, G.F., "Immobilization of Enzymes & Cells", Humana Press Inc., Totawa, NJ, pp.61-66 (1997).
- [15] Chang, J.H., Chang, Y.K., Ryu, H.W. and Chang, H.N., *FEMS Microbiology Letters*, **182**, p.309 (2000).
- [16] Veliky, I.A., McLean, R.J.C., "Immobilized Biosystems: Theory and Practical Applications", Chapman & Hall. Glasgow, pp.1-129 (1994).
- [17] Phillips, C.R., Poon, Y.C., "Immobilization of cells", Springer-Verlag. Berlin, pp.91-127 (1988).
- [18] Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C. and Tramper, J., "Immobilized Cells : Basics and Applications", Elsevier Science, (1996).
- [19] Maghsoudi, S., Vossoughi, M., Kheirolomoom, A., Tanaka, E. and Katoh, S., *Biochemical Eng. J.*, **8**, p.151 (2001).