Archive of SID

گوگرد زدایی زیستی ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن توسط باکتری RIPI-S۸۱

لادن رشیدی*+، جعفر توفیقی داریان
تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی مهندسی، بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵

قاسمعلی محبعلی، اشک کیتاش، بهنام راسخ
تهران، پژوهشگاه صنعت نفت، واحد میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی

چکیده: استفاده از میکرواورگانیسم ها روش دیگری برای زدایش گوگرد از اجزای هیدروکربنی بوده، بدون آن‌که تغییری در اسکلت کربنی آنها ایجاد شود. امروزه، گوگرد زدایی زیستی از دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیله آن، زمینه اصلی پژوهش‌های گوگرد زدایی از برش های نفتی است. RIPI-S۸۱ یک باکتری گوگرد زدای هوازی جدید است که قادر به گوگرد زدایی از دی بنزوتیوفن و تبدیل آن به ۲- هیدروکسی بی فنیل طبق مسیر اختصاصی ٤S است. این باکتری توسط واحد میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی پژوهشگاه صنعت نفت از میادین نفتی جداسازی و خالص‌سازی شده است. در این تحقیق، به بررسی زدایش گوگرد از ٤- متیل دی بنزوتیوفن (یکی از مشتقات آلکیله دی بنزوتیوفن) توسط باکتری RIPI-S۸۱ پرداخته می‌شود. پس از آن که ساختار مولکولی متابولیت های حاصل از عملکرد باکتری ذکر شده روی این ماده به وسیله‌ی دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف‌سنج جرمی (GC-MS) تعیین شد، کاهش مقدار ٤-MDBT طی رشد باکتری و تبدیل آن به متابولیت های تعیین شده، به وسیله‌ی تجزیه‌ی دستگاهی HPLC اندازه گیری شد. سپس منحنی رشد این باکتری، در محیط کشت حاوی ٤- متیل دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگردی موجود در محیط مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری حدود ۵۷ درصد از ٤- متیل دی بنزوتیوفن را در فاز رشد خود طی مدت ۱۱۰ ساعت طبق مسیر اختصاصی ٤S گوگرد زدایی کرد. همچنین سلول‌های فعال بدون رشد (Resting cells) این باکتری نیز قادر به گوگرد زدایی از این ماده هستند.

واژه‌های کلیدی: ٤- متیل دی بنزوتیوفن، دی بنزوتیوفن، گوگردزدایی زیستی، باکتری RIPI-S۸۱.

KEY WORDS: 4-methyl dibenzothiophene, Dibenzothiophene, Biodesulfurization, RIPI-S81.

مقدمه

در دهۀ گذشته، توجه فراوانی به محیط زیست و حفظ هوای عاری از هر گونه آلودگی شده است. مصرف مواد سوختی که به میزان لازم گوگرد زدایی نشده اند، موجب آلودگی محیط زیست می‌شوند. احتراق مواد سوختی حاصل از نفت خام مثل، بنزین، گازوییل و ... موجب نشر و تولید اکسیدهای گوگردی شده که باعث آلودگی محیط زیست، تولید باران های اسیدی و غیرفعال‌سازی

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: Ladan_rsh@myway.com

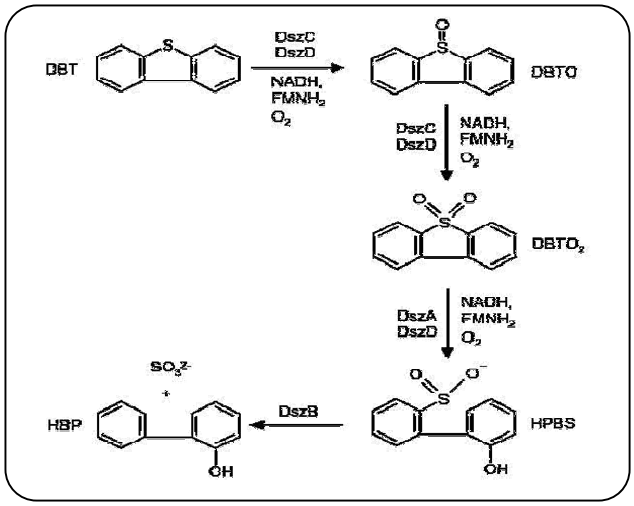
www.SID.ir

Archive of SID

کاتالیست های شیمیایی می‌شود [۱]. محتوای گوگرد نفت خام منابع متفاوت دنیا بین ۰/۰۳ تا ۸ درصد وزنی تخمین زده شده است که بخش اعظم آن را ترکیب‌های آلی گوگرد دار تشکیل می دهند. میزان ترکیب‌های آلی گوگرد دار موجود در نفت خام ایران بین ۰/۲۵ الی ۳/۲۳ درصد وزنی است، لذا ایران از جمله کشورهایی است که بالاترین مقدار ترکیب‌های آلی گوگرد دار را در ذخایر نفتی خود دارد. ترکیب‌های سیکلیک گوگرد آلی مثل دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیله آن دارای تعداد بیشتری از پیوندهای کربن ـ گوگرد در حلقه های آروماتیکی خود هستند. بیشتر دی بنزوتیوفن‌های آلکیله در محدوده‌ی نقاط جوش بیش از ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد ظاهر می‌شوند [۲].

برای زدایش گوگرد از سوخت های فسیلی، همه پالایشگاه ها متکی بر فن پر هزینه گوگردزدایی هیدروژنی HDS[۱] هستند که نیازمند انرژی فراوانی است. افزون بر این، فن مذکور در زدایش ترکیبات گوگردی هتروسیلیک (بنزوتیوفن و دی بنزوتیوفن های آلکیله) بـه طـور موثـری عمـل نمی کنـد [۳]. مـولکول‌هـای دی بنزوتیوفن دارای استخلاف های آلکیله در موقعیت های ۴ و ۶ بیشترین مقاومت را در برابر عملکرد گوگرد زدایی فن HDS اعمال کرده و طی عملیات، موجب کهنه شدن کاتالیست ها، آلودگی محیط زیست، افزایش دما و فشار می‌شوند [۲]. بنابراین، توسعه‌ی فناوری‌های جدید مثل گوگردزدایی بیولوژیکی علاقه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است.

در گوگرد زدایی زیستی، مهار فرایندهای متابولیکی باکتری‌های مناسب به منظور زدایش گوگرد از سوخت های فسیلی، در شرایط متعادل (محیطی و فیزیولوژیکی) انجام شده و به دما و فشارهای بالای فن HDS نیاز ندارد [۴]، لذا هزینه‌های عملیاتی و ظرفیت دستگاه ها پایین بوده و مقدارهای اندکی از گازهای گلخـانه ای و فراورده‌های فرعی نامطلوب تولید می‌شوند [۵]. پژوهش‌های بسیاری در زمینه گوگرد زدایی زیستی انجام شده که در همه آنها از دی بنزوتیوفن (DBT) به عنوان یک ترکیب مدل پژوهشی استفاده شده است. در این ارتباط دو مسیر بیوشیمیایی شناسایی شده است. مسیر اول موسوم به *کوداما*، یک مسیر تجزیه ای است که منجر به تجزیه اسکلت کربنی دی بنزوتیوفن شده و بنابراین، اجرای آن موجب کاهش ارزش حرارتی سوخت می‌شود. در حال حاضر از مسیر دوم که همان مسیر اختصاصی ۴S است، برای زدایش گـوگـرد از ترکیب‌هـای دی بنزوتیوفن و مشتقـات آلکیله



شکل ۱ـ مسیر ٤ S در *R.erythropolis* IGTS8.

آن استفاده می‌شود [۶]. در این مسیر بیوشیمیایی، گوگرد از دی بنزوتیوفن جدا شده و محصول ۲ـ هیدروکسی بی فنیل ایجاد می‌شود. در این نوع مسیر متابولیکی اختصاصی گوگرد زدایی هوازی، چهار مرحله آنزیمی دخالت داشته که به همین دلیل این مسیر را ۴S نامیده اند. مسیر اختصاصی گوگرد زدایی هوازی از دی بنزوتیوفن در شکل ۱ نشان داده شده است [۵].

تاکنون باکتری های هوازی بسیاری گزارش شده اند که قادر به گوگرد زدایی از دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیله آن طبق مسیـر اختصاصی ۴S هستنـد. از میان آنها می‌توان: 1- 5- *R.erythropolis* KA2 [۷]، 1- 5- 2- rK *R.erythropolis* [۸]، *Mycobacterium* G3 [۹]، *Rhodococcus* P32C1 [۱۰ و ۱۱]، *B.subtilis* WU-S2B [۱۲]، *Pseudomonas aeroginusa* [۱۳]، *R.erythropolis* IGTS8 [۱۴] را نام برد. در این تحقیق به بررسی گوگردزدایی بیولوژیکی از ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن پرداخته می‌شود. این مشتق آلکیله به مقدار فراوانی در گازوییل وجود داشته و در برابر فن HDS بسیار مقاوم است [۳].

لازم به ذکر است که تاکنون پژوهش‌های بسیاری در زمینه گوگرد زدایی بیولوژیکی از دی بنزوتیوفن انجام شده است، ولی مقاله‌های چاپ شده در زمینه گوگرد زدایی از مشتقات آلکیله آن به دلیل مشکلات مربوط به شناسایی متابولیت‌ها و سنتز این مـواد انـدک بـوده است. ایـن پژوهش (گوگردزدایـی از مشتقـات آلکیله دی‌بنزوتیوفن) برای نخستین بار در ایران و در پژوهشگاه صنعت نفت انجام شد.

(۱) Hydrodesulfurization

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های باکتری

RIPI-S۸۱ یک باکتری جدید گوگرد زدا بوده که توسط پژوهشگاه صنعت نفت از میدان‌های نفتی جداسازی شده و مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری با استفاده از روش های غنی سازی متوالی در محیط کشت جداسازی شده است. RIPI-S۸۱ ، یک باکتری گرم مثبت، هوازی اجباری، فاقد اسپور و کوکوباسیل است. باکتری مزبور مزوفیل بوده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بـه خوبی رشـد می‌کـند کـه تعیین ویژگی‌های کامل باکتری در دست اقدام است.

مواد شیمیایی

دی بنزوتیوفن از شرکت مرک آلمان و۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن به وسیله‌ی شرکت آلدریچ ـ سیگما سنتز شد. بقیه مواد شیمیایی مورد نیاز از قبیل حلال‌ها با درجه تجزیه‌ای مناسب از شرکت‌های معتبر خریداری شدند.

محیط کشت باکتری

یک لیتر از محیط کشت مورد نیاز برای رشد باکتری، در دو قسمت آماده سازی و مورد استفاده قرار گرفت. جزء نخست شامل: KH_2PO_4 (۶ گرم)، Na_2HPO_4 (۴ گرم) NH_4NO_3 (۱/۲ گرم) و سدیم بنزووات (۲ گرم) بوده که در ۸۵۰ میلی لیتر آب عاری از یون حل می شوند (pH = ۷/۰۸) . جزء دوم شامل عنصرهای معدنی بوده که در ۱۵۰ میلی‌لیتر از آب عاری از یون حل می‌شوند. این اجزاء شامل $MgCl_2\times6H_2O$ (۰/۷۵ گرم)، $MnCl_2 \times 4H_2O$ (۰/۰۰۴ گرم)، $CaCl_2\times2H_2O$ (۰/۰۰۱ گرم) و $FeCl_3$ (۰/۰۰۱ گرم) هستند. ترکیب آلی گوگرد دار در حلال دی متیل فرمامید (DMF) حل شده و به‌عنوان تنها منبع گوگرد برای رشد باکتری به محیط کشت اضافه شد.

روش های تجزیه

ساختار شیمیایی متابولیت‌های حاصل از عملکرد گوگرد زدایی باکتری ذکر شده روی دی بنزوتیوفن و ۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن به‌وسیله‌ی تجزیه دستگاهی گاز کروماتوگرافی ـ طیف‌سنجی جـرمـی (GC-MS)، متشکـل از دو قسمـت دستگـاه GC (مـدل Varian ۳۴۰۰ ساخت مشترک آمریکا ـ آلمان) و طیف‌سنجی جرمی (MS) (مدل SaturnII ـ نوع تله یونی است) تعیین شد. به‌منظور تعیین میزان ۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن باقی مانده در محیط واکنش باکتری، از دستگاه HPLC (مدلWaters ۶۰۰E، قطر و طول ستون به ترتیب ۳/۹ میلی متر و۳۰ سانتی متر، آشکارساز UV مدل۴۹۰) استفاده شد. رشد سلولی به وسیله‌ی دستگاه طیف‌سنج (مدل Uv mini ۲۴۰ CE شرکت شیمادزوی ژاپن) در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار ترکیب‌های فنولیک محیط واکنش به وسیله آزمایش *گیبس* تعیین شد. به این ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرو لیتر از معرف تازه *گیبس* (۰/۱ گرم از ۲، ۶ ـ دی کلرو کینون کلرامید در ۱۰ میلی لیتر اتانول) با ۵ میلی لیتر از محیط واکنش باکتری مخلوط می شود و پس از گذشت یک ساعت از زمان گرم‌خانه گذاری نمونه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ترکیب‌های فنولیک، به وسیله دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود [۱۵]. برای بررسی و تعیین متابولیت های حاصل از عملکرد گوگرد زدایی باکتری روی منبع گوگردی موجود در نمونه ها، از روش استخراج با حلال اتیل استات استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا pH نمونه ها به ۲ کاهش داده شده و سپس به مقدار هم حجم نمونه، اتیل استات به آن اضافه و به طور کامل مخلوط شد. سپس لایه رویی مجزا و برای تجزیه ارسال شد.

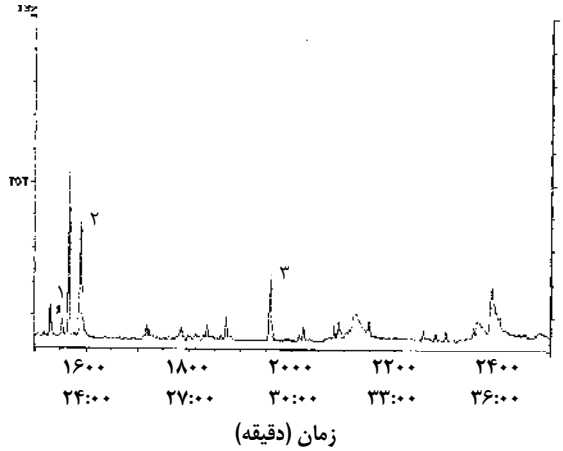
واکنش سلول های فعال بدون رشد[1]

کشت اولیه باکتری (RIPI-S۸۱) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت و ۲۰ mg/l از محلول دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۱۰۰۰۰۰ mg/l) به‌مدت ۷۸ ساعت انجام شد. سلول‌های باکتری از انتهای فاز لگاریتمی رشد خود (OD $_{۶۶۰}$=۱/۵) به وسیله‌ی سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm، در مدت زمان ۲۰ دقیقه) جمع آوری شده و سپس به وسیله بافر فسفاتـه ۰/۱ مولار(pH = ۷/۰۸) دو بار شستشو داده شد. بافر فسفاته دوباره اضافه شده تا تعلیق سلولی تشکیل شود و چگالی سلولی آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر به ۳۰ برسد (OD $_{۶۶۰}$=۳۰). ۲ عدد ویال درب دار کوچک با ظرفیت ۲ میلی لیتر آماده شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از تعلیق سلولی و ۲۰۰ mg/l از محلول ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامیـد (۲۰۰۰۰ mg/l) بـه هـر یـک از ویـال هـا افـزوده شـد.

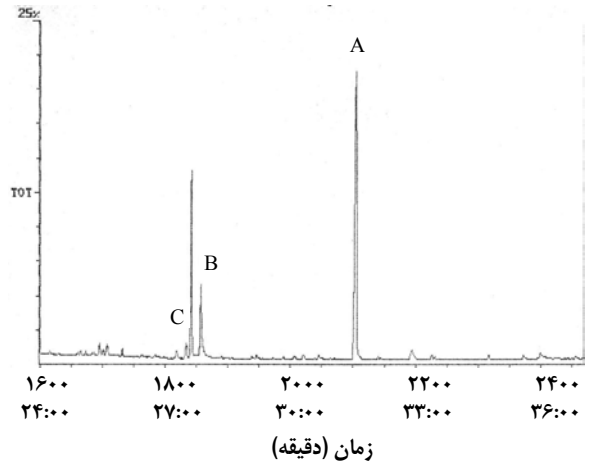
(۱) Resting cells

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲ـ کروماتوگرام GC-MS مربوط به باکتری در حال رشد در محیط کشت حاوی ٤ـ متیل دی بنزوتیوفن.



شکل ۳ـ کروماتوگرام GC-MS مربوط به واکنش سلول های فعال بدون رشد باکتری RIPI-S۸۱.

یک ویال درب‌دار دیگر را به عنوان شاهد در نظر گرفته و تمامی ویال‌ها را روی شیکر رفت و برگشتی (۲۲۵ rpm) به گرم‌خانه‌ای با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد.

رسم منحنی رشد باکتری RIPI-S۸۱ در محیط کشت آبی حاوی ۴ ــ متیل دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگردی

ابتدا ۵ لیتر محیط کشت را ساخته و سپس در شرایط به طور کامل استریل به میزان ۱۰ درصد حجم/حجم از مایع تلقیحی (پیش کشتی حاوی DBT) با ۱/۷۲۹ = $_{۶۶۰}$OD به محیط کشت اضافه شد. سپس محتویات فلاسک بزرگ در ۹۰ فلاسک استریل با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر، هر یک به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر تقسیم شد. سپس مقدار ۴۰ mg/l از محلول استریل ۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۲۰۰۰۰ mg/l) به هر یک از فلاسک های ۱۰۰ میلی لیتری بالا اضافه شد. نمونه ها روی شیکری با دور ۱۲۰ rpm در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. سپس در فاصله‌های زمانی معین، دوتا از فلاسک ها برای انجام آزمایش‌ها، تعیین pH، چگالی سلولی ($_{۶۶۰}$OD)، انباشتگی کمی و کیفی ترکیب‌های فنولیک به وسیله‌ی آزمایش گیبس، تجزیه ترکیب‌های فنولیک و تعیین مقدار آنها به وسیله‌ی دستگاه‌های GC-MS و HPLC برداشته شد. در اینجا دو فلاسک به عنوان شاهد (دارای محیط کشت حاوی همان مقدار اولیه ۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن) در نظر گرفته شد. نمونه‌های استخراج شده برای تعیین نوع و مقدار متابولیت‌های تشکیل شده، مورد تجزیه قرار گرفتند.

نتیجه‌ها و بحث

براساس نتیجه‌های حاصل از تجزیه دستگاهی GC-MS مشاهده شد که باکتری مزبور قادر به گوگردزدایی از ۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن طی رشد بوده (شکل۲) و سلول های فعال بدون رشد باکتری نیز قادر به گوگرد زدایی از این ماده هستند (شکل ۳) و کروماتوگرام های حاصل از هر دو واکنش، متابولیت های یکسانی را نشان می دهند. مطابق کروماتوگرام به دست آمده، در شماره اسکن ۱۹۵۵ و در زمان بازداری ۲۹/۱۹ دقیقه (شکل ۲)، پیک ۳ با جرم یون مولکولی (m/z) ۱۹۸ ظاهر شد که این ماده ۴ ـ متیل دی بنزوتیوفن تشخیص داده شد. طیف جرمی حاصل از این پیک در شکل ۴ـ الف نشان داده شده است.

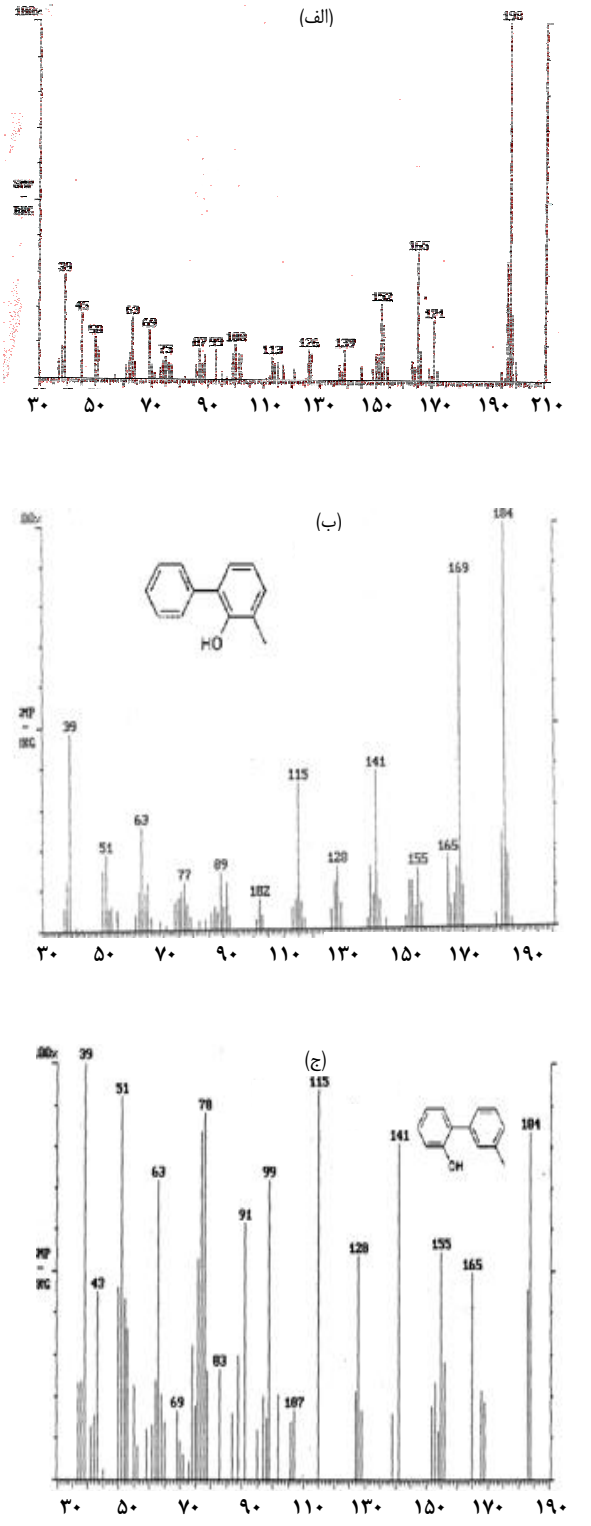
در اسکن ۱۵۹۰ پیک ۲ با زمان بازداری ۲۳/۴۸ دقیقه با جرم یون مولکولی (m/z) ۱۸۴ (شکل۲) مشاهده شد که این پیک نیز بر اساس جستجوی کتابخانه ای یک ترکیب فنولیک (دارای گروه هیدروکسیلی) شناسایی شد. طیف جرمی حاصل از پیک مزبور در شکل ۴ـ ب نشان داده شده است. بر اساس جستجوی کتابخانه‌ای و بررسی مراجع [۱۶و۱۷]، طیف جرمی مذکور مربوط به ترکیبی به نام ۲ـ هیدروکسی، ۳ــ متیل بی‌فنیل است. پیک ۱ در اسکن ۱۵۵۳ با زمان بازداری ۲۳/۱۹ دقیقه و جرم یون مولکولی (m/z) ۱۸۴ (شکل۲)، نیز یک ترکیب فنولیک تشخیص داده شد. این ماده به مقدار اندکی در محیط تولید شده است. طیف جرمی حاصل از این پیک نیز تایید کننده وجود گروه هیدروکسیلی روی حلقه بنزنی است (شکل۴ـ ج). از مطابقت این طیف جرمی با طیف جرمی ارایه شده در مقاله‌های معتبر

www.SID.ir

Archive of SID

[۱۶و۱۷]، پیک مزبور ۲ـ هیدروکسی ـ ´۳ـ متیل بی‌فنیل تشخیص داده شد. با توجه به طیف جرمی ارایه شده در شکل ۴ـ ب می‌توان اظهار داشت که، شکست یون مولکول ۱۸۴ با از دست دادن H^+ و سپس حذف یک گروه متیلی به پیک دیگری که نمایان‌گر یون مولکول ۱۶۹ است، تبدیل شده و در نهایت با حذف CO از یون مولکول ۱۶۹ به پیکی با یون مولکول (m/z) ۱۴۱ تبدیل شده است ($C_6H_5C_5H_4^+$). افزون بر آن یون مولکول (m/z) ۱۴۱ با حذف C_2H_2 به یون مولکول (m/z) ۱۱۵ تبدیل می‌شود. تمامی این شکست‌هایی که در طیف جرمی یک ماده دیده می‌شوند، ساختار مولکولی آن ماده را تعیین می‌کنند. شکست‌های موجود در طیف جرمی ۲ـ هیدروکسی ـ ´۳ـ متیل بی فنیل نیز مطابق اصول شرح داده شده برای متابولیت نخست، به طور کامل قابل توجیه و بررسی است.

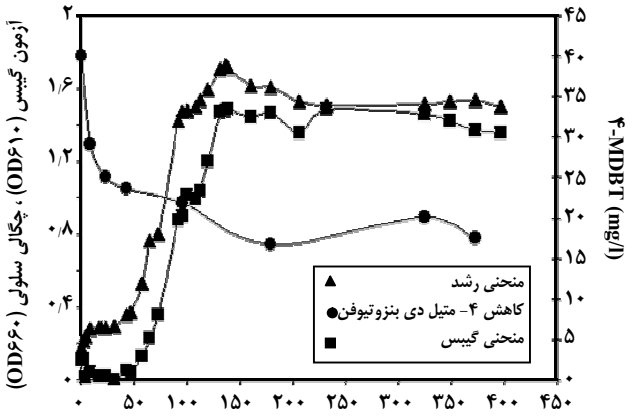
در کروماتوگرام‌های GC-MS به دست آمده (شکل ۲ و ۳)، افزون بر پیک های مورد شناسایی واقع شده، پیک دیگری که به عنوان متابولیت حاصل از عملکرد باکتری روی ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن در نظر گرفته شود، مشاهده نشد. متابولیت های حاصل از عملکرد سلول های فعال بدون رشد باکتری روی ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن، همان موردهای ذکر شده در پیش تعیین شد (شکل ۳) و به این ترتیب ثابت شد که سلول های فعال بدون رشد باکتری نیز قادر به گوگرد زدایی از این ماده هستند. زمانی که یک کلنی از باکتری، از محیط کشت جامد غنی شده به محیط کشت حاوی ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگردی اضافه شد، مشاهده شد که فاز تاخیر رشد آن طولانی می باشد (۱۰ روز) بـه نظـر می رسد که علت طولانی بودن فاز تاخیر رشد باکتری، انتقال کلنی از محیط کشت غیر اختصاصی به محیط کشت اختصاصی بوده است. بنابراین، آغاز رشد لگاریتمی باکتری به تاخیر افتاده است. همچنین القاء پذیری ژن‌های گوگرد زدایی نیز مد نظر است که نیازمند پژوهشی فراتر است. بنابراین، برای رفع مشکل تاخیر فاز رشد، مایع تلقیحی از باکتری که روی DBT رشد کرده بود، تهیه و با ترسیم منحنی رشد باکتری، مشاهده شد که رشد باکتری به تقریب در ۱٫۷۲۷ =.ﻏﻏ OD به حداکثر می رسد و فـاز لگاریتمی رشد آن نیز به نسبت طـولانی است. رشد و مقدار انباشتگی ترکیب‌های هیدروکسیلی به وسیله‌ی آزمایش گیبس ارزیابی شد (شکل ۵). تجزیه (HPLC) حاصل از استخراج کشت باکتریایی بیانگر کاهش ۴-MDBT طی فاز لگاریتمی و تثبیت آن در فاز ساکن است. این بدان معنی است کـه باکتری متابولیت هـا



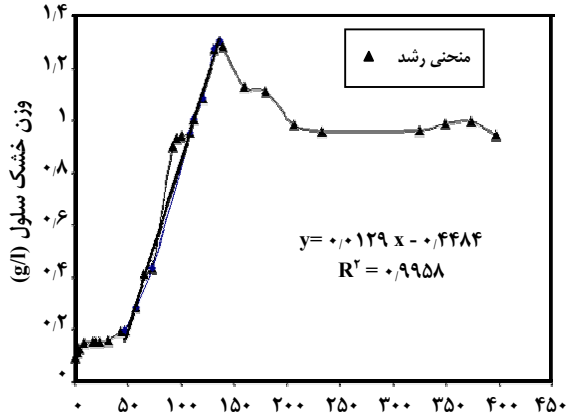
شکل ٤ـ الف ـ طیف جرمی ٤ـ متیل دی بنزوتیوفن با جرم مولکولی ۱۹۸، ب ـ طیف جرمی ۲ـ هیدروکسی ۳ـ متیل بی فنیل با جرم مولکولی ۱۸٤، ج ـ طیف جرمی ۲ـ هیدروکسی´ ۳ـ متیل بی فنیل با جرم مولکولی۱۸٤.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۵ ـ مصرف٤ـ متیل دی بنزوتیوفن و تولید متابولیت های حاصل طی رشد باکتری RIPI-S٨١.



شکل ٦ـ منحنی رشد باکتری در محیط کشت حاوی ٤ـ متیل دی بنزوتیوفن (بر اساس وزن خشک سلول (g/lit) در واحد زمان) و معادله‌ی خط عبور داده شده از فاز لگاریتمی رشد.

را مورد مصرف قرار نمی دهد. ماکسیمم کاهش 4-MDBT به وسیله‌ی دستگاه HPLC طی ۱۱۰ الی ۱۳۶ ساعت حاصل شد. معادله‌ی خط عبور کننده از فاز لگاریتمی رشد باکتری با استفاده از منحنی رشد به دست آمد (شکل ۶). شیب خط، بیانگر تغییرهای توده زیستی باکتری در واحد زمان است، لذا میانگین مقدار توده زیستی x=۰/۹۰۵۳۹۶۵۶ محاسبه شد و با استفاده از رابطه‌ی: $Dx/Dt = \mu X$ شدت رشد ویژه باکتری ($\mu = ۰/۰۱۵۷۹۴۲\ h^{-1}$) محاسبه شد.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتیجه‌های به دست آمده و مقایسه آن با کارهای انجام شده در زمینه گوگردزدایی، می‌توان اظهار داشت که باکتری RIPI-S٨١ از توانایی مناسب برای حذف گوگرد از دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیله آن برخوردار است. این باکتری طی رشد خود روی دی بنزوتیوفن و مشتق آلکیله آن یعنی ۴ـ متیل دی بنزوتیوفن، ترکیب‌های هیدروکسیل‌دار را تولید و در محیط متراکم می‌سازد. این باکتری به حلقه‌های بنزنی دی بنزوتیوفن حمله نکرده و گروه‌های متیل متصل به حلقه را به‌عنوان منبع کربن مصرف نمی‌کند. همچنین باکتری مزبور دی بنزوتیوفن را با میزان و سرعت بیشتری گوگرد زدایی می‌کند. به نظر می‌رسد که تفاوت میزان و سرعت گوگردزدایی از دی بنزوتیوفن و مشتق آلکیله آن به نوع سوبسترا مربوط باشد، که باید تحت بررسی بیشتری قرار گیرد.

بررسی عملکرد این باکتری در مقایسه با سایر باکتری های گوگرد زدای هوازی نشان می‌دهد، علی‌رغم سادگی محیط کشت، این باکتری از عملکرد مناسب، مطلوب و قابل رقابتی برخوردار بوده و حذف محلول‌های حاوی ویتامین‌های متنوع و نیز به حداقل رسانیدن عنصرهای کم‌یاب، بر نحوه و میزان عملکرد باکتری تاثیر منفی نداشته است. در شناسایی متابولیت‌های حاصل از گوگردزدایی ۴ـ متیل دی بنزوتوفن نیز نتیجه مشابهی با کارهای انجام شده قبلی [۱۶ و ۱۷] به دست آمد و مشاهده شد که باکتری RIPI-S٨١ طی رشد خود دو نوع متابولیت تولید می‌کند.

بیشتر بودن مقدار ۲ـ هیدروکسی ۳ـ متیل بی فنیل در مقایسه با ۲ـ هیدروکسی، ´۳ متیل بی فنیل بیانگر آن است که سیستم آنزیمی باکتری، هر دو پیوند کربن ـ گوگرد (C-S) را در ساختار اصلی مولکول دی بنزوتیوفن می‌شناسد، لیکن در شکستن پیوند کربن ـ گوگرد (C-S) و رهاسازی گوگرد از یک سو به صورت گزینشی عمل می کند. در واقع ابتدا شکستن پیوند کربن ـ گوگرد اختصاصی نیست ولی بعد از مدتی گرایش باکتری به شکستن یکی از دو پیوند کربن ـ گوگرد بیشتر می‌شود.

بررسی‌هایی که در زمینه گوگرد زدایی انجام شده است، محدود به گوگرد زدایی از دی بنزوتیوفن (در محیط آبی و پلی فازیک)، تعیین متابولیت‌های حاصل، شناسایی باکتری، ترسیم منحنی رشد باکتری و ... بوده است. تاکنون شرکت‌های معتبر

www.SID.ir

Archive of SID

سازنده مواد شیمیایی توانسته اند، تعداد اندکی از مشتقات آلکیله دی بنزوتیوفن را (مانند 4-MDBT، 4،6-DMDBT) سنتز نمایند که از بیشترین میزان مقاومت در برابر گوگرد زدایی کاتالیتیک برخوردار بوده و نیز در مقایسه با سایر ترکیب‌های گوگردی بیشترین مقدار را در گازوییل و برش‌های سنگین‌تر نشان می‌دهند. سنتز متابولیت‌های حاصل از گوگردزدایی فرایندهای بیولوژیک هوازی و بی هوازی دشوار بوده و بنابراین، شناسایی کیفی و کمی آنها پرهزینه خواهد بود. این محدودیت، در اجرای این پژوهش موثر بوده است. در این پژوهش شناسایی و تعیین کیفی متابولیت ها با استفاده از دستگاه GC-MS و با استناد به نتیجه‌های موجود در مقاله‌ها انجام شد و پس از اطمینان از گوگردزدایی ٤ـ متیل دی بنزوتیوفن توسط باکتری مزبور، منحنی رشد باکتری در محیط واکنش حاوی ٤ـ متیل دی بنزوتیوفن (به عنوان تنها منبع گوگردی) ترسیم شد. طی رشد باکتری، افزون بر آن که تغییر تراکم سوبسترا در محیط واکنش به روش HPLC تعیین شد، هم‌زمان به کمک دستگاه GC-MS متابولیت های تولید شده مورد ارزیابی دقیق تری قرار گرفتند. بدین صورت مشاهده شد که طی رشد باکتری مقدار ٢ـ هیدروکسی ٣ـ متیل بی فنیل بیشتر از ٢ـ هیدروکسی، ٣´ متیل بی فنیل است. در پایان متذکر می شویم که مانند کارهای انجام شده در مقاله‌های [١٢، ١٦ و ١٧] باکتری مذکور قادر به گوگرد زدایی از مخلوط دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیله آن نیز است (داده ها ذکر نشده اند).

تاریخ دریافت: ٨٤/٦/٥ ؛ تاریخ پذیرش: ٨٥/٨/٢٩

مراجع

[1] Monticello, D.J., Riding the Fossil Fuel Biodesulfurization Wave, *Chemtech*., **28**(7), 38 (1998).

[2] Marcelis, C. L. M., Anaerobic Biodesulfurization of Thiophenes, Thesisi Wageningen University, ISBN:90-5808-767-0 (2002).

[3] Rhee, S.K., Chang, J.H., Chang, Y.K., Chang, H.N., Desulfurization of Dibenzothiophene and Diesel Oils by a Newly Isolated *Gordona* Strain CYKS1, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2327 (1998).

[4] Nekodzuka, S., Kambe, T. N., Nomura, N. LU. J., Nakahara, T., Specific Desulfurization of Dibenzothiophene by *Mycobacterium sp*. Strain G3., *Biodesulfurization and Biotransformation*, **15**(1), 17 (1997).

[5] MC farland, B.L., Biodesulfurization, *J. Curr.Opin. Microbiol*., **2**, 257 (1999).

[6] Onaka, T., Okumura, K., Suzuki, M., Analysis of Biodesulfurization Products Using Solid-Phase Extraction, *J. Chromatogr. Sci.*, **35**, 417 (1997).

[7] Kobayashi, M., Onaka, T., Ishii, Y., Konishi, J., Takaki, M., Okada, H., Ohta, Y., Koizumi, K., Suzuki, M., Desulfurization of Alkylated Forms of Both Dibenzothiophene and Benzothiophene by a Single Bacterial Strain, *FEMS Microbial. Lett.*, **187**, 123 (2000).

[8] Kobayashi, M., Horiuchi, K., Yoshikawa, O., Hirasawa, K., Ishii, Y., Fujino, K., Hiroshi, S., Maruhashi, K., Kinetic Analysis of Microbial Desulfurization of Model and Light Gas Oils Containing Multiple Alkyl-dibenzothiophenes, *J. Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**(2), 298 (2001).

[9] Okada, H., Numura, N., Nakahara, T., Maruhashi. K., Analaysis of Substrate Specificity of the Desulfurization Bacterium *Mycobacterium sp*. G3., *J. Biosci. Bioeng.*, **93**(2), 228 (2002).

[10] Maghsoudi, S., Kheirolomoom, A., Vossoughi, M., Tanaka, E., Katoh, S., Selective Desulfurization of Dibenzothophene by Newly Isolated *Corynebacterium sp*. Starin P32C1.,

www.SID.ir

Archive of SID

J. Biochem. Eng., **5**, 11 (2000).

[11] Maghsoudi, S., Vossoughi, M., Kheirolomoom, A., Tanaka, E., Katoh, S., Biodesulfurization of Hydrocarbons and Diesel Fuels by *Rhodococcus sp*. Starin P32C1, *J. Biochem. Eng.*, **8**, 151 (2001).

[12] Kirimura, K., Furuya, T., Nishii, Y., Ishii, Y., Kino, K., Usami, SH., Biodesulfurization of Dibenzothiophene and its Derivaties through the Selective Cleavage of Carbon- Sulfur Bonds by a Moderately Thermophilic Bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B, *J. Biosci. Bioeng.*, **91**(3), 262 (2001).

[13] Watanabe, K., Noda, K.I., Ohta, Y., Maruhashi, K., Desulfurization of Light Gasoil by a Novel Recombinant Strain from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biotech. Lett.,* **24**, 897 (2002).

[14] Kayser, K.J., Bielaga-jones, B.A., Jackowski, K., Odusan, O., Kilbane, J.J., Utilization of Organosulfur Compounds by Axenic and Mixed Cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 3123 (1993).

[15] Monticello, D.J., Kilbane, J.J., Microemulsion Process for Direct Biocatalytic Desulfurization of Organosulfur Molecules, US Patent No. 5, 358, 870 (1994).

[16] Li, F.L., Xu, P., Ma, C.Q., Luo, L.L., Wang, X.SH., Deep Desulfurization of Hydro-desulfurization-Treated Diesel Oil by a Facultative Thermophilic Bacterium *Mycobacterium sp.*X7B*, FEMS. Microbiol. Lett.*, **223**, 301 (2003).

[17] Castorena, G., Suarez, C., Valdez, I., Amador, G., Fernandez, L., Borgne, S.LE., Sulfur selective Desulfurization of Dibenzothiophene and Diesel Oil by Newly Isolated *Rhodococcus sp. Strains*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **215**, 157 (2002).

www.SID.ir