علـوم محـیطی سال نهم، شماره سوم، بهار 1391
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.9, No.3, Spring 2012

27 -40

گوگردزدایی از دی بنزوتیوفن توسط باکتری Klebsiella oxytoca جدا سازی شده از خاک‌های آلوده به نفت جنوب اهواز

احمد لاله[1*]، سلیمان امیری[2]، غلامحسین ابراهیمی پور[3]، جواد فخاری[4]

1- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

2- کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

3- دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

4- مربی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: 90/4/14 تاریخ پذیرش: 91/3/13

چکیده

نفت خام مخازن تا حدود 7 درصد گوگرد دارد و بین 50 تا 95 درصد این گوگرد به صورت تیوفن‌های مختلف می‌باشد. در اثر احتراق ترکیبات آلی گوگرددار، اکسیدهای گوگرد تولید شده باعث بارش باران‌های اسیدی و آلودگی زیست‌محیطی می‌شود. در حال حاضر روش رایج برای حذف گوگرد به صورت هیدرودسولفوریزاسیون می‌باشد که علاوه بر صرف هزینه زیاد، مولکول‌های گوگرد به طور کامل از ترکیبات آروماتیک گوگرددار جدا نمی‌شوند، از این رو توجه محققان به روش گوگردزدایی بیولوژیکی معطوف شده است. دی بنزوتیوفن (DBT) به عنوان یک مولکول الگو جهت سنجش توانایی میکروارگانیسم‌ها در گوگردزدایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. باکتری هوازی شیمولیتوآوتوتروف اختیاری جداسازی شده از نقاط آلوده به ترکیبات نفتی اطراف اهواز (دارخوین) ساختار پیوند کربن – کربن را نمی‌شکند و فقط گوگرد را از ساختمان DBT جدا می‌کند. باکتری مذکور نیازی به مواد آلی به عنوان منبع کربن و انرژی برای گوگردزدایی نفت خام ندارد.

واژه‌های کلیدی: شیمولیتوآوتوتروف، دسولفوریزاسیون، دی بنزوتیوفن و نفت خام.

Desulfurization of Dibenzothiophene by *Klebsiella oxytoca* Isolated from Oil-Contaminated Soils in Southern Ahvaz

Ahmad Laleh,*[1] Soleiman Amiri,[2] Gholamhosein Ebrahimipuor[3] and Javad Fakhary[4]

1-Assistant Professor, Department of chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University

2-M.Sc. Faculty of Biological Sciences, Shahid Behshti University

3-Associate Professor,Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University

4-M.Sc. Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University

Abstract

The crude oil of various oil reservoirs contain up to 7% sulfur and between 50 - 95 % of this sulfur is in the form of different thiophenes. The combustion of organosulfur compounds produces sulfur oxides that are the main cause of acidic rain and environmental pollution. The current method for desulfurization is hydrodesulfurization which is too expensive and sulfur does not get completely isolated, therefore, the researchers have focused on biodesulfurization method. Dibenzothiophene (DBT) has been used as a molecule model for validation of microorganisms' ability in desulfurization. There is no report about chemolithoautotrophic bacteria that desulfurizes the crude oil. The isolated ISA4 bacterium which is used in this study does not break the carbon – carbon bond structure, but only removes the sulfur from the skeleton of DBT. From the industrial viewpoint, this bacterium does not require organic materials as energy and a carbon source for desulfurizing the crude oil. ISA4 Bacterium with 100% query and 99% homology is similar to Klebsiella oxytoca.

Keywords: Chemolithoautotrophic, Desulfurization, Dibenzothiophene and Crude oil.

* Corresponding author. *E-mail Address*: a-laleh@sbu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ترکیبات آلی گوگرددار بخش اعظم محتوای ترکیبات گوگردی نفت خام را تشکیل می‌دهند. بین 50 تا 95% گوگرد آلی نفت را گوگرد تیوفنی تشکیل داده که تیوفن‌ها و مشتقات دی بنزوتیوفن و بنزوتیوفن بیش‌ترین سهم را دارند(Soleimani, Bassi *et al.* 2007; Wang and Stout 2007).

احتراق مواد سوختنی حاصل از نفت خام مثل گازوئیل و بنزین موجب آزاد سازی مقادیر زیادی از اکسیدهای سولفور(SO_x) می گردد که باعث آلودگی محیط‌زیست و ایجاد باران‌های اسیدی و غیرفعال شدن کاتالیست‌های شیمیایی می‌شوند (Bhatia and Sharma, 2010).

روش رایج برای حذف گوگرد نفت در پالایشگاه‌ها در حال حاضر به صورت فیزیکو شیمیایی هیدرودسولفوریزاسیون (HDS) می‌باشد، که این روش یک پروسه کاتالیتیکی است که در طی آن بخشی از گوگرد آلی به گاز سولفید هیدروژن بوسیله واکنش فرکشن‌های نفت اولیه با هیدروژن تحت فشار بین 3000-150 pond/in2 و دمای بین 455-290 درجه سانتیگراد تبدیل می گردد (Bhatia and Sharma, 2006). این تکنیک بسیار پرهزینه بوده و انرژی زیادی را مصرف می‌کند. علاوه بر آن، تکنیک مذکور در زدایش گوگرد از ترکیبات هتروسیکلی آروماتیکی گوگرددار همچون بنزوتیوفن، دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیله آن‌ها بطور موثر عمل نمی‌نماید (Borgne and Quintero, 2003).

روند سختگیری قوانین محیطی بر میزان گوگرد مجاز در سوخت‌های فسیلی اثر گذاشته و در دو دهه اخیر غلظت مجاز گوگرد در دیزل از 500 ppm به 15-10 ppm کاهش یافته و در آینده نزدیک نیز کاهش بیشتری خواهد یافت. در حال حاضر گازوئیل تولیدی ایران بیش از 7000 ppm گوگرد دارد و بخاطر سخت‌گیری جامعه بین المللی با سرمایه‌گذاری بیش از یک میلیارد دلار بهبود سیستم پالایشگاه‌ها در دست انجام است که بنا به پیش بینی مسئولین وزارت نفت، تا 5 سال آینده گوگرد موجود در گازوئیل به 500 ppm کاهش می یابد که به معنی دست‌یابی به قوانین دهه گذشته می‌باشد. از این رو توجه محققان به روش گوگردزدایی بیولوژیکی (BDS) معطوف شده که از نظر اکولوژیکی بی خطر، از نظر متابولیکی اختصاصی و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد. این روش نیاز به دما و فشار بالا نداشته و قادر به گوگردزدایی از ترکیبات هتروسیکلی آروماتیکی گوگرددار نیز می‌باشد (Soleimani, Bassi *et al.*, 2007; Davoodi-Dehaghani, Vosoughi *et al.*, 2010). امروزه تحقیقات بسیاری جهت توسعه گوگردزدایی میکروبی هوازی انجام شده است و در تمامی این تحقیقات از دی بنزوتیوفن به عنوان ترکیب مدل استفاده شده است. در این تحقیقات اتم گوگرد بر طبق مسیر اختصاصی 4S از دی بنزوتیوفن جدا شده و محصول 2 - هیدروکسی بی فنیل ایجاد می‌شود (Monticello, 2000; Tao, Yu *et al.*, 2006; Calzada, Heras *et al.*, 2009).

در این مطالعه اثبات و بررسی فعالیت گوگردزدایی باکتری ISA4 بر روی دی بنزوتیوفن (در محیط دو فازی) و نفت خام مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

1-2 محیط های کشت

2-2-1 محیط کشت پایه معدنی 1 (BIM)[1]:

NH_4Cl	0/195 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0/02 g
KH_2PO_4	0/024 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0/01 g
KCl	0/01 g
$FeCl_3$	0/0001 g
Trace Element	1 ml
Deionized Water	100 ml

بعد از تنظیم pH محیط کشت روی 7، محیط کشت در121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه اتوکلاو شد، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات جداگانه اتوکلاو شده و پس از سرد شدن، در شرایط استریل به محیط افزوده شد.

محلول میکرو عناصر نیز شامل 20 میلی‌گرم کلرید مس (II)، 100 میلی‌گرم کلرید نیکل، 200 میلی‌گرم کلرید کبالت، 26 میلی‌گرم سلنیت سدیم، 50 میلی‌گرم مولیبدات سدیم، 30 میلی‌گرم ولفرامات سدیم، 10 میلی‌گرم وانادات سدیم و 1 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 25% در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر بود.

2-2-2 محیط کشت پایه معدنی 2 (بدون گوگرد معدنی):

NH_4Cl	0/195 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0/04 g
KH_2PO_4	0/024 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0/01 g
KCl	0/01 g
$FeCl_3$	0/0001 g
Trace element	1 ml
Deionized Water	100 ml

pH= 7

2-2-3 محیط کشت پایه معدنی 3 یا پایه نفتی:

NH_4Cl	0/1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0/02 g
KH_2PO_4	0/05 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0/01 g
FeSO4 . 7 H2O	0/01 g
Crude Oil	1 ml
Trace Element	1 ml
Deionized Water	100 ml

pH= 7

پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و نفت خام هر کدام جداگانه اتوکلاو شده و پس از سرد شدن، در شرایط استریل به محیط افزوده شدند.

تست گیبس

معرف گیبس (2 و 6 - دی کلرو کینون کلرامید) با ترکیبات فنلی مثل منوهیدروکسی بی‌فنیل و دی هیدروکسی بی‌فنیل تشکیل کمپلکس آبی رنگ می‌دهد و بر اساس شدت رنگ حاصله می‌توان به صورت کمی میزان این ترکیبات را حساب کرد.

20 میکرولیتر از معرف گیبس با 1 میلی‌لیتر از محیط واکنش باکتری که با بی‌کربنات سدیم 0/1 مولار، pH آن به 8 رسانیده شد، مخلوط گردید. بعد از گذشت یک ساعت در دمای اتاق (تا رنگ آبی پایدار مشاهده گردد)، میزان جذب نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 610 نانومتر اندازه گیری شد. برای تعیین مقدار محصول

Archive of SID
www.SID.ir

گوگردزدایی شده از منحنی استاندارد منوهیدروکسی بایفنیل استفاده شد.

مطالعه اسپکتروفتومتری فرابنفش سوبسترا دی بنزوتیوفن (DBT)[2] و محصولات بایفنیل (BP)[3]، منوهیدروکسی بایفنیل (MHBP)[4] و دی هیدروکسی بایفنیل (DHBP)[5]

ترکیبات DBT ، BP، MHBP و DHBP به میزان 200 ppm در دکان حل گردید و در محدوده 200 تا 1000 نانومتر جذب آنها اندازه گیری شد.

مطالعه کروماتوگرافی لایه نازک جهت تشخیص سوبسترا (DBT) و محصولات (BP، MHBP و DHBP)

ترکیبات استانداردDBT، BP، MHBP و DHBP به میزان 200PPM در استون حل شده و با استفاده از لوله مویین قطره بسیار کوچکی از این محلول بر روی کاغذ TLC[6] بارگذاری شد. از سیستم حلال هگزان – اتیل استات با نسبت‌های متفاوت28:1، 28:2، 28:3، 28:4 و 28:5 برای جابجایی لکه بارگذاری شده بر سطح کاغذ TLC استفاده گردید (Van Hamme and Ward 2000).

مطالعه گازکروماتوگرافی

جهت جداسازی و آنالیز کمی سوبسترا (DBT) و محصولات (BP, DHBP و MHBP)، از دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شد.

اندازه گیری توتال گوگرد

جهت اندازه گیری توتال گوگرد نفت خام از دستگاه CHNSO analyzer (Model Vario EL, Germani EL, ementar Analyzer System) استفاده شد.

تهیه نمونه بدین صورت بود که 100 میکرولیتر از نفت خام موجود در محیط کشت باکتری را با استفاده از سمپلر برداشته و با 200 میلی گرم کلرید کلسیم مخلوط و به صورت پودر خشک آماده شد و در نهایت توتال گوگرد پودر حاصل توسط دستگاه CHNSO analyzer اندازه‌گیری شد.

بررسی تجزیه پذیری دکان و هگزادکان

در ارلن‌های شیاردار 250 میلی‌لیتری، حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی1 (دارای منبع گوگرد معدنی) حاوی یک درصد دکان و هگزادکان بصورت جداگانه، پس از تلقیح باکتری (غلظت نهایی 10^6باکتری در میلی لیتر) با دما، pH و دور شیکر به ترتیب 35 درجه سانتیگراد، 7 و 115rpm، به مدت 84 ساعت انکوبه گردیدند. روزانه پس از تنظیم pH در صورت نیاز، دوبار نمونه گیری جهت اندازه گیری کدورت سلولی در طول موج 650 نانومتر صورت گرفت.

بررسی گوگردزدایی بیولوژیکی

گوگردزدایی شیمولیتوآوتوتروفی از *DBT* به عنوان تنها منبع انرژی، الکترون و گوگرد

در ارلن‌های شیاردار 250 میلی‌لیتری، حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی2 (بدون منبع گوگرد معدنی) بعلاوه 5 % DBT (به عنوان سوبسترا) محلول در4 میلی‌لیتر دکان (غلظت نهایی DBT در نهایت 0/2%) که پس از تلقیح باکتری (غلظت نهایی 10^6باکتری در میلی لیتر) با دمای 35 درجه سانتیگراد، دور شیکر rpm 115 و pH= 7 به مدت 45 روز انکوبه گردیدند. روزانه جذب در طول موج 650nm، تست گیبس و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری و بر روی pH= 7 تنظیم می‌شد. در نهایت بعد از اتمام

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش نمونه‌ها برای بررسی وجود سوبسترا و محصول گوگردزدایی شده با دستگاه گاز کروماتوگرافی مورد آنالیز قرار گرفتند.

گوگردزدایی هتروتروفی از DBT به عنوان منبع گوگرد

در ارلن‌های شیاردار 250 میلی لیتری، حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی2 (بدون منبع گوگرد معدنی) و حاوی 200ppm دی بنزوتیوفن (به عنوان سوبسترا) محلول در یک میلی‌لیتر دکان و یک درصد گلوکز که پس از تلقیح باکتری (غلظت نهایی 10^6 باکتری در میلی‌لیتر) در دمای 35 درجه ساتیگراد، دور شیکر 115 rpm و pH= 7 به مدت 15 روز انکوبه گردید. روزانه جذب در طول موج 650nm، تست گیبس و pH نمونه‌ها اندازه گیری و بر روی pH= 7 تنظیم می شد. در نهایت بعد از اتمام آزمایش نمونه‌ها برای بررسی وجود سوبسترا و محصول گوگردزدایی شده با دستگاه گازکروماتوگرافی مورد آنالیز قرار گرفتند.

بررسی گوگردزدایی از نفت خام

در ارلن‌های شیاردار 250 میلی‌لیتری، حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت استریل پایه نمکی شماره 3 بعلاوه یک درصد نفت خام (به عنوان سوبسترا)، سپس با تلقیح باکتری (غلظت نهایی 10^6 باکتری در میلی لیتر) در دمای 35 درجه سانتیگراد، دور شیکر 115rpm و pH= 7 تا 15 روز انکوبه گردیدند. روزانه کدورت در 650nm و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری و بر روی pH= 7 تنظیم می‌شد. و در نهایت برای اندازه‌گیری توتال گوگرد نفت خام 100 میکرولیتر از نفت خام موجود در محیط کشت باکتری را با استفاده از سمپلر برداشته، با 200 میلی گرم کلرید کلسیم مخلوط، به صورت پودر خشک آماده شد و توتال گوگرد پودر حاصل توسط دستگاه CHNSO analyzer اندازه‌گیری شد.

شناسایی میکروارگانیسم به روش کلاسیک و مولکولی

به منظور شناسایی باکتری‌های گوگردزدا از روش‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی و 16s rDNA استفاده شد.

تعیین توالی ژن 16S rDNA

تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16s rDNA توسط شرکت تکاپوزیست و با روش تمام اتوماتیک انجام گرفت.

بررسی همولوژی ژن 16S rDNA تعیین توالی شده

بعد از ویرایش توالی‌های نوکلئوتیدی، این توالی‌ها به کمک نرم افزار Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفتند و همولوژی آن‌ها با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه شد.

نتایج

مطالعه اسپکتروفتومتری فرابنفش سوبسترا (DBT) و محصولات احتمالی(BP، MHBP و DHBP) در دکان

طول موج جذب ترکیب DBT و محصولات مورد انتظار حاصل از گوگردزدایی آن (BP، MHBP و DHBP) با غلظت 200 ppm حل شده در دکان به طور جداگانه در محدوده 200 تا 1000 نانومتر اندازه شد. محدوده جذب DBT با محدوده جذب MHBP و DHBP همپوشانی داشت. چون طول موج جذب MHBP (280 تا 320 نانومتر) و

Archive of SID
www.SID.ir

DHBP (280 تا 340 نانومتر)در ناحیه جذب DBT (280 تا 358 نانومتر) قرار دارد. طول موج جذب BP نیز از 220 تا 300 نانومتر می باشد.

نتایج مطالعه کروماتوگرافی لایه نازک جهت تشخیص DBT و محصولات احتمالی (BP، MHBP و DHBP)

در مطالعه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با فاز ثابت سیلیکاژل و فاز متحرک شامل اتیل استات / هگزان به نسبت‌های 28:1، 28:2، 28:3، 28:4 و 28:5 استفاده شد که بهترین حالت برای جابجایی و جداسازی ترکیبات DBT و محصولات گوگردزدایی شده مورد انتظار (BP، MHBP و DHBP) نسبت 28:3 اتیل استات به هگزان بود که با این وجود باندهای DBT و BP از هم جدا نمی شدند.

بررسی تجزیه‌پذیری دکان و هگزادکان

رشد باکتری ISA4 کشت داده شده در محیط‌های کشت پایه نمکی1 (دارای منبع گوگرد معدنی) حاوی یک درصد دکان و یک درصد هگزادکان به صورت جداگانه بعد از 48 ساعت آنکوباسیون با دما، pH و دور شیکر به ترتیب 35 درجه سانتیگراد، 7 و rpm 115، مشاهده نشد و هم‌چنین هیچگونه تغییرات pH صورت نگرفت.

نتایج گوگردزدایی از DBT، به عنوان تنها منبع گوگرد توسط باکتری ISA4

تست گیبس در محیط کشت پایه نمکی2 (بدون گوگرد معدنی) بعلاوه یک میلی‌لیتر دکان حاوی 200 ppm دی بنزوتیوفن و یک درصد استات سدیم پس از هشت روز مثبت شد.

نتایج آنالیز گاز کروماتوگرافی DBT، DHBP MHBP و BP پس از هشت روز آنکوباسیون نیز نشان دهنده تولید MHBP، DHBP و BP می باشد.

بررسی گوگردزدایی از نفت خام سنگین

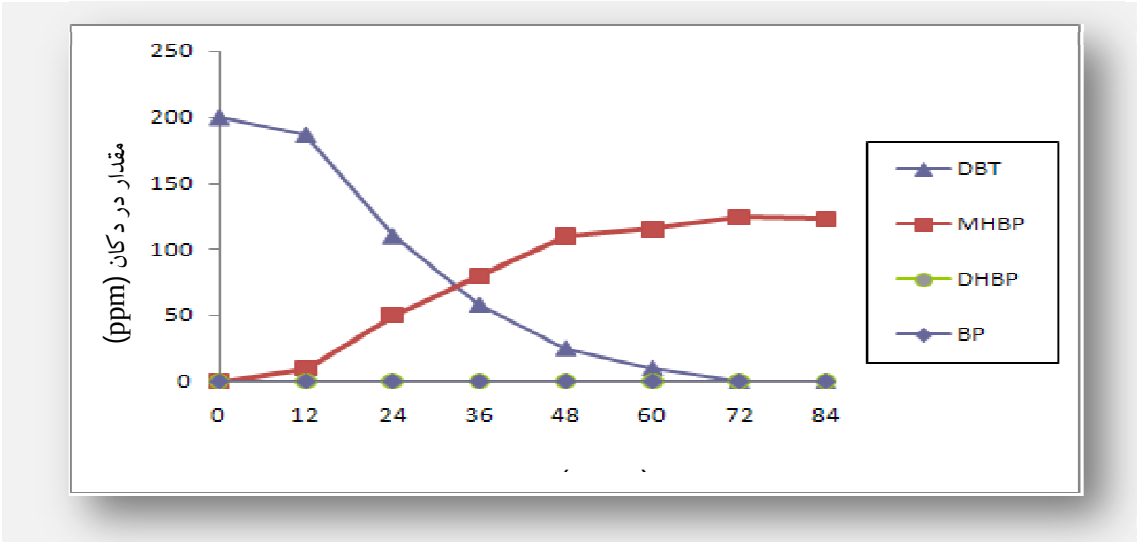
در ارلن‌های شیاردار250 میلی‌لیتری، حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی3 حاوی سولفات و یک میلی‌لیتر نفت خام، با غلظت نهایی 10^6 باکتری در میلی‌لیتر، پس از تلقیح باکتری (غلظت نهایی 10^6 باکتری در میلی لیتر) در دمای 35 درجه سانتیگراد و دور شیکر rpm 115 که pH محیط‌ها روزانه بر روی 7 تنظیم می‌شد. طبق نتایج بدست آمده از دستگاه CHNSO analyzer باکتری ذکر شده در این مطالعه توانسته تمام 5/9 درصد گوگرد نفت خام سنگین جنوب کشور را به صفر برساند.

نتایج کمی سولفورزدایی ازDBT توسط باکتری ISA4 در محیط کشت پایه نمکی2 و سولفات منیزیم بهینه

میزان کمی DBT و تولید MHBP، DHBP و BP در فاز آلی (دکان) توسط باکتری ISA4 با استفاده از GC در شکل 3-1 ارائه شده است. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، باکتری ISA4 در طی 72 ساعت میزان گوگرد DBT را از 200 ppm به صفر رسانید و 123 ppm منو هیدروکسی بایفنیل به عنوان محصول تولید نمود. مقدار تولید DHBP و BP در فاز آلی بسیار ناچیز بود(شکل 3-1). همچنین در فاز آبی بعد از 72 ساعت آنکوباسیون حدود MHBP 89 ppm توسط تست گیبس اندازه‌گیری شد (شکل 3-2).

Archive of SID

www.SID.ir

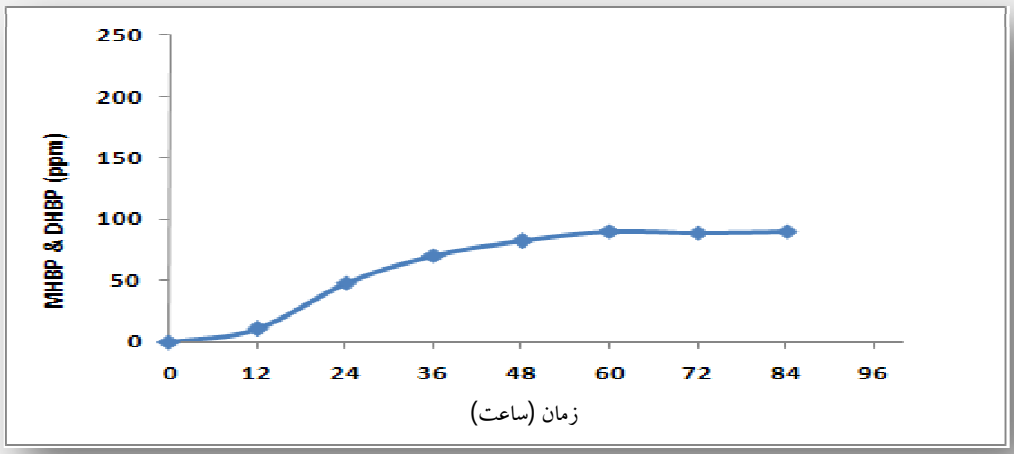


شکل 3-1. بررسی کمی سولفورزدایی از DBT در فاز آلی توسط باکتری ISA4

آنکوباسیون در ارلن‌های شیاردار250 میلی‌لیتری، حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت پایه معدنی 2 بعلاوه یک درصد استات پتاسیم و یک میلی‌لیتر دکان حاوی DBT 200ppm با دما35 درجه سانتیگراد، pH 8، دور شیکرrpm 160، بیومس اولیه OD =0/6 و غلظت سولفات منیزیم بهینه (500ppm) که pH محیط ها بر روی 8 تنظیم می‌شد.

شناسایی مولکولی باکتری ISA4 سولفورزدا از DBT بر اساس 16s rDNA

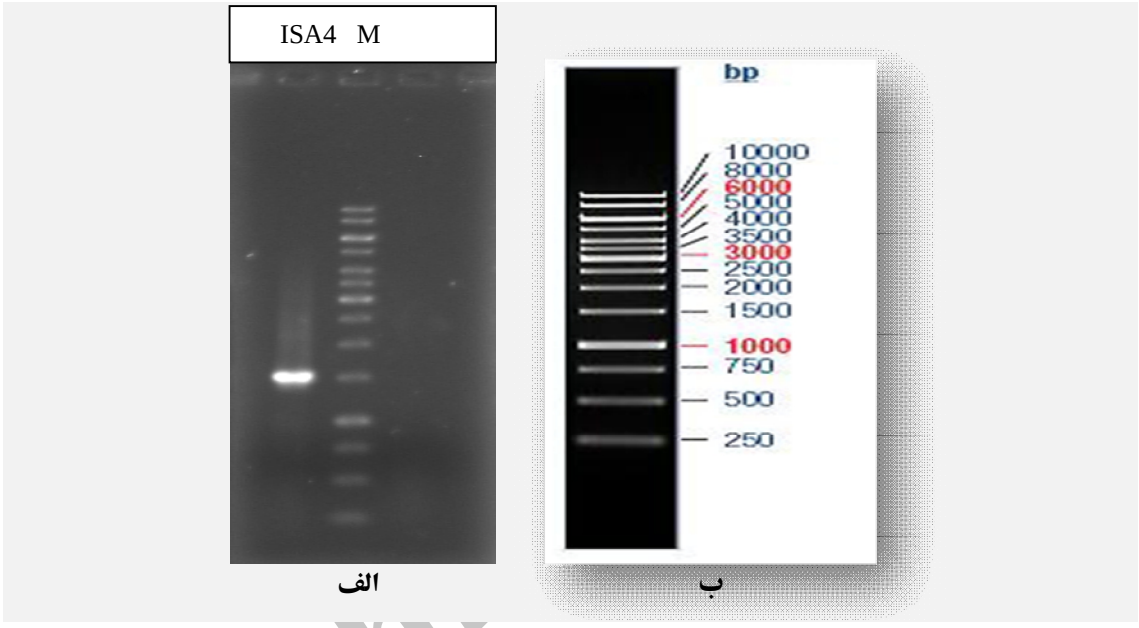
پس از استخراج DNA ژنومی، واکنش PCR بوسیله پرایمرهای rD1 و fD1 Universal جهت تکثیر 16S rDNA با استفاده از DNA ژنومی انجام شد. طول قطعه 16S rDNA بدست آمده در حدود 1600bp می‌باشد که حاکی از درست بودن واکنش PCR در



شکل 3-2. بررسی کمی تولیدMHBP از DBT در فاز آبی توسط باکتری ISA4 با استفاده از نمودار تست گیبس

www.SID.ir

تکثیر 16S rDNA بوده است(شکل 3-1). جهت تعیین توالی نیاز به DNA خالص می‌باشد. برای این منظور ابتدا محصول PCR تولیدی با آنزیم taq پلی مراز، بر روی ژل آگارز ران شد، باند مربوطه در ناحیه حدود 1600 bp از روی ژل بریده شد و توسط کیت تخلیص DNA (High pure PCR product) خالص گردید. با تعیین توالی محصول PCR، 1426 نوکلئوتید بدست آمد (جدول 3-1) و همولوژی بدست آمده با کمک نرم افزار BLAST در NCBI نشان داد که باکتری ایزوله شده با 100 تطابق و 99% همولوژی با *Klebsiella oxytoca* شباهت دارد.



شکل 3- 1 الف) باند 16S rDNA حاصل از PCR بر روی ژل آگارز 1%، M- مارکر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder) ب) نمایی از مارکر kb 1 شرکت فرمنتاز بکار گرفته شده در این الکتروفورز

جدول 3-1: تعیین توالی 16S rDNA باکتری ایزوله شده

GGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGG
AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCT
CTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAG
CGGGGAGGAAGGGAATAAGGTTAATAACCTTGTTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTC
AAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTC
GACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG
GTCCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCC
TTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATA
AAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG
CCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAG
CTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGT

www.SID.ir

مقایسه تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی باکتری ISA4 با باکتری‌های حاصل از همولوژی 16s rDNA

باکتری ISA4 با 97 تا 100 درصد تطابق و 98 تا 100 درصد همولوژی با باکتری‌های *Klebsiella oxytoca*، *Pantoea agglomerans*، *K. pneumoniae*، *Enterobacter aerogenes*، *E. cloacae* و *E. Cancerogenus* خانواده بی‌هوازی اختیاری انتروباکتریاسه شباهت دارد. بیشترین شباهت با 100 درصد تطابق و 99 درصد همولوژی با باکتری *Klebsiella oxytoca* مشاهده می‌گردد و تمام تست‌های شاخص مورفولوژی و بیوشیمیایی انجام شده بجز تولید H_2S در تست TSI با باکتری *Klebsiella oxytoca* مشابه می‌باشند (جدول 3- 2).

جدول 3- 2: مقایسه تست‌های شاخص مرفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری مورد استفاده در این پژوهش (ISA4) با باکتری‌های حاصل از همولوژی 16s rDNA در NCBI

(Hansen, Aucken *et al.*, 2004; Zhang, Schumann *et al.*, 2005; Yoon, Schumann *et al.*, 2006; Li, Li *et al.*, 2008)

تست های بیوشیمیایی	باکتری ISA4	Klebsiella oxytoca	Klebsiella pneumoniae	Pantoea agglomerans	Enterobacter aerogenes	Enterobacter cloacae	Enterobacter cancerogenus
درصد تطابق		100	98	100	99	97	100
درصد همولوژی		99	99	98	98	99	98
شکل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل
واکنش گرم	-	-	-	-	-	-	-
حرکت	-	-	-	+	+	+	+
تولید H_2S (تستTSI)	+	-	-		-	-	-
تولید ایندول	+	+	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+			+	+	
اکسیداز	-	-			-	-	-
رشد در سیمون سیترات	+	+		+	+	+	+
DNAase	-	-			-	-	-
متیل رد	-	-			-	-	-
وکس پروسکوئر	+	+	+	+	+	+	+
احیا نیترات به نیتریت	+	+		+	+	+	+
رشد در دمای 8 درجه سانتیگراد	+	+	+				
رشد در دمای 40 درجه سانتیگراد	+	+	+				
رشد در دمای 52 درجه سانتیگراد	-	-	-				
هیدرولیز اوره	+	+	+		-	+	-

(+) جواب مثبت و (-) جواب منفی

www.SID.ir

بحث

باکتری هوازی شیمولیتوآوتوتروف اختیاری جداسازی شده از نقاط آلوده به ترکیبات نفتی اطراف اهواز (دارخوین) بدون شکستن حلقه آروماتیکی DBT و کاهش ارزش سوخت آن، قادر به گوگردزدایی کامل از DBT و نفت خام می‌باشد به طوری‌که توتال گوگرد نفت خام مورد استفاده را از 5/9% به صفر رسانده است.

حلال دکان، بدلیل سمی نبودن برای باکتری ISA4 و همین‌طور تشخیص DBT و محصولات گوگردزدایی شده (MHBP، DHBP و PB) با استفاده از گاز کروماتوگرافی، نسبت به حلال‌های استون، اتانول، دی متیل فرمامید و هگزادکان انتخاب شده است.

جهت تشخیص DBT و محصولات احتمالی گوگردزدایی شده آن (MHBP، DHBP و یا BP) از روش‌های تست گیبس در محیط کشت مایع (Kayser, Bielaga-Jones et al., 1993)، اسپکتروفتومتری (Yoon, Schumann *et al.*, 2006)، کروماتوگرافی لایه نازک و گاز کروماتوگرافی استفاده شد.

با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ، جذب DBT در طول موج 280 تا 358 نانومتر مشاهده شده و جذب DHBP و MHBP نیز در درون این محدوده می‌باشد. (شکل 3-3 تا 3-7) و در نتیجه نمی‌توان از این روش جهت تشخیص DBT، DHBP و MHBP از همدیگر استفاده کرد، ولی اعتمادی فر و همکاران طول موج‌های 285 نانومتری و 323 نانومتری را جهت اندازه‌گیری ترکیب DBT مورد استفاده قرار داده‌اند (Etemadifar and Emtiazi, 2008)

در مطالعه کروماتوگرافی لایه نازک بهترین حالت برای جابجایی ترکیبات DBT، BP، MHBP و DHBP، نسبت 28:3 اتیل استات به هگزان بود که با این وجود باندهای DBT و BP از هم جدا نمی‌شدند.

از روش گاز کروماتوگرافی برای آنالیز DBT، BP، MHBP و DHBP حلال در دکان مورد استفاده قرار گرفت.

از نمودار استاندارد تست گیبس برای اندازه‌گیری MHBP و DHBP در فاز آبی مورد استفاده قرار گرفت.

با توجه به اینکه همولوژی بزرگتر از 99% و مطابقت ویژگی‌های باکتری مورد بررسی با باکتری پیشنهاد شده، بیان کننده شناسایی در سطح گونه می‌باشد. همولوژی 97% تا کمتر از 99% مطابق شناسایی در سطح جنس می‌باشد همچنین همولوژی 93% تا کمتر از 97% نشان‌دهنده گونه جدید و یا جنس جدید می‌باشد و همولوژی زیر 93% معمولا بیان کننده جنس جدید است و مستلزم اطلاعت بیشتری جهت تائید آن می‌باشد(Han, 2006)

باکتری مورد استفاده در این پروژه (ISA4) هوازی اجباری شیمولیتوآتوتروف اختیاری گوگردزدا از DBT می‌باشد و با 99% همولوژی و همین‌طور تست‌های بیوشیمیایی انجام شده بیشترین شباهت را به باکتری Klebsiella oxytoca دارد و برحسب پیشنهاد Han (2006) یک سویه جدید از Klebsiella oxytoca می‌باشد.

در مورد باکتری‌های شیمولیتوآوتوتروف تیوباسیلوس فرو اکسیدانس لپتواسپیریلوم فرواکسیدانس[7] و سولفولوبوس اسیدوکالداریوس[8]

Archive of SID
www.SID.ir

سودوموناس پوتیدا[9] جهت گوگردزدایی معدنی از ذغال سنگ گزارش شده و گزارشی دال بر زدودن گوگرد از ترکیبات نفتی وجود ندارد (Monticello, 1998)

باکتری‌های ردوکوکوس ردوکروس IGTS8[10]، ردوکوکوس اریتروپولیس D-1[11]، ردوکوکوس اریتروپولیس H-2[12]، ردوکوکوس SY-1[13]، باسیلوس اسفریکوس IGTS9[14]، گوردنیا CYKS-1[15]، نوکاردیا گلوبلا[16]، مایکوباکتریوم G3[17]، کورینه باکتریوم sy1[18]، کورینه باکتریوم MC401[19]، کورینه باکتریوم MC402[20]، آگروباکتریوم MC501[21]، زانتوموناس MC701[22] و آرتروباکتر ECRD-1[23] (Izumi, Ohshiro *et al.*, 1994; Constantí, Giralt *et al.*, 1996) میکروارگانیسم‌هایی هستند که حلقه‌های کربنی دی بنزوتیوفن را نابود نمی‌کنند و فقط گوگرد را از ساختمان آن جدا کرده و برای گوگردزدایی مناسبند; ولی بدلیل نیاز به کربن آلی به عنوان منبع کربن و انرژی در مقایسه با باکتری گوگردزدای مورد استفاده در این پژوهش، از نظر صنعتی ارزش کمتری دارند.

هلند و همکاران[24] در سال 1986 مراحل اولیه اکسیداسیون دی بنزوتیوفن را در گروهی از قارچ‌ها و همچنین کرافورد وگوپتا[25] در سال 1990، اکسیده کردن گوگرد DBT را توسط کانینگهاملا الگانس[26] به دی بنزوتیوفن سولفوکساید و سپس دی بنزوتیوفن سولفون مشاهده کرده‌اند که در این دو مورد، گوگرد از دی بنزوتیوفن جدا نمی‌شود (Crawford and Gupta, 1990)

دیگر میکروارگانیسم‌های گوگرد زدا از دی بنزوتیوفن، شامل گونه‌هایی از جنسهای اسینتوباکتر[27]، ریزوبیوم[28]، ارتروباکتر[29]، بایرنکیا[30] و بروی باکتریوم[31] می‌باشند که این باکتری‌ها از دی بنزوتیوفن نه تنها به عنوان منبع گوگرد بلکه به عنوان منبع کربن و انرژی هم استفاده می‌کنند و بخاطر از دست رفتن کربن و بالطبع کاهش ارزش سوختی، اینگونه بیوکاتالیست‌ها در فرایند گوگردزدایی از سوخت‌های فسیلی استفاده نمی‌شوند (Ohshiro, Ishii *et al.*, 2005)

از باکتری‌های بی‌هوازی قادر به تجزیه دی بنزوتیوفن، تنها یک سویه M6 دسولفووبریو دسولفوریکانس[32] و یک باکتری از جنس کلستریدیوم گزارش شده است (Amund and Akangbou, 1993) که بدلیل تولید H_2S در مخزن بیهوازی و کند رشد بودن از نظر اقتصادی مفید نمی‌باشند.

پی نوشت

[1] Basal Inorganic Medium
[2] dibenzothiophene
[3] Bipheny
[4] 2-hydroxy Biphenyl (monohydroxy Biphenyl)
[5] 2,2'-***Dihydroxybiphenyl***
[6] Thin Layer Chromatography
[7] Leptospirillum ferrooxidans
[8] Sulfolobus acidocaldarius
[9] Pseudomonas putida
[10] Rhodococcus rhodochrous IGTS8
[11] R. erythropolis D-1
[12] Rhodococcus H-2
[13] Rhodococcus SY-1
[14] Bacillus esphaericusIGTS9
[15] Gordona CYKS-1
[16] Nocardia globelula
[17] Mycobacterium G3

Archive of SID
www.SID.ir

5279: A Biocatalyst Formulation Comparison." Energy & Fuels, 23(11): 5491-5495.

Constantí, M., J. Giralt, et al., (1996). Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other sulfur compounds by Agrobacterium MC501 and a mixed culture, Elsevier, 19: 214-219.

Crawford, D.L. and R.K. Gupta (1990). Oxidation of dibenzothiophene byCunninghamella elegans, Springer, 21: 229-231.

Davoodi-Dehaghani, F., M. Vosoughi, et al., (2010). "Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated Rhodococcus erythropolis strain." Bioresource Technology, 101(3): 1102-1105.

Etemadifar, Z. and G. Emtiazi (2008). "Microtitre plate assay for biofilm formation, production and utilization of hydroxybiphenyl by Rhodococcus sp isolated from gasoline-contaminated soil." Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences, 63(7-8): 599-604.

Han, X.Y. (2006). Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis, in: Y.W. Tang, AND C. W. Stratton. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer, 323-326.

Hansen, D.S., H.M. Aucken, et al., (2004). "Recommended test panel for differentiation of Klebsiella species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests." Journal of clinical microbiology, 42(8): 3665.

Izumi, Y., T. Ohshiro, et al., (1994). Selective desulfurization of dibenzothiophene by Rhodococcus erythropolis D-1, Am Soc Microbiol, 60: 223-226.

Kayser, K.J., B.A. Bielaga-Jones, et al., (1993).

[18] Corynebacterium sy1

[19] MC401 Corynebacterium

[20] Corynebacterium MC402

[21] Agrobacterium MC501

[22] Xanthomonas MC701

[23] Rthrobacter ECRD-1

[24] Holland et.al

[25] Craweord & gupta

[26] Cunninghamella elegans

[27] Acinetobacter

[28] Rhizobium

[29] Arthrobacter

[30] Beijerinkia

[31] Brevibacterium

[32] Desulfovibrio desulfuricans M6

منابع

Amund, O. and T. Akangbou (1993). "Microbial degradation of four Nigerian crude oils in an estuarine microcosm." Letters in Applied Microbiology, 16(3): 118-121.

Bhatia, S. and D. Sharma (2006). "Emerging role of biorefining of heavier crude oils and integration of biorefining with petroleum refineries in the future." Petroleum Science and Technology, 24(10): 1125-1159.

Bhatia, S. and D. Sharma (2010). "Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain Pantoea agglomerans D23W". Biochemical Engineering Journal, 50(3): 104-109.

Borgne, S.L. and R. Quintero (2003). "Biotechnological processes for the refining of petroleum." Fuel Processing Technology, 81(2): 155-169.

Calzada, J., S. Heras et al., (2009). "Biodesulfurization of Dibenzothiophene (DBT) Using Pseudomonas putida CECT

Archive of SID
www.SID.ir

Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of Rhodococcus rhodochrous IGTS8, Soc General Microbiol. 139: 3123.

Li, Y.G., W.L. Li, et al., (2008). "Biodegradation of carbazole in oil/water biphasic system by a newly isolated bacterium Klebsiella sp LSSE-H2." Biochemical Engineering Journal, 41(2): 166-170.

Monticello, D.J. (1998). "Riding the fossil fuel biodesulfurization wave." Chemtech, 28(7): 38-45.

Monticello, D.J. (2000). "Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates." Current Opinion in Biotechnology, 11(6): 540-546.

Ohshiro, T., Y. Ishii, et al., (2005). "Dibenzothiophene desulfurizing enzymes from moderately thermophilic bacterium Bacillus subtilis WU-S2B: Purification, characterization and overexpression." Journal of Bioscience and Bioengineering, 100(3): 266-273.

Soleimani, M., A. Bassi, et al., (2007). Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels, Elsevier, 25: 570-596.

Tao, F., B. Yu, et al., (2006). "Biodesulfurization in biphasic systems containing organic solvents." Applied and Environmental Microbiology, 72(7): 4604.

Van Hamme, J.D. and O.P. Ward (2000).Development of a method for the application of solid-phase microextraction to monitor biodegradation of volatile hydrocarbons during bacterial growth on crude oil, Springer, 25: 155-162.

Wang, Z. and S.A. Stout (2007). Oil spill environmental forensics: fingerprinting and source identification, Academic Press.

Yoon, J.H., P. Schumann, et al., (2006). "Isoptericola dokdonensis sp. nov., isolated from soil." International journal of systematic and evolutionary microbiology, 56(12): 2893.

Zhang, Y.Q., P. Schumann, et al., (2005). "Isoptericola halotolerans sp. nov., a novel actinobacterium isolated from saline soil from Qinghai Province, north-west China." International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55(5): 1867.

Archive of SID

www.SID.ir