

گوگردزدایی زیستی از دی‌بنزوتیوفن توسط میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به نفت

فاطمه امامی^۱، غلامرضا زرینی^{۲*}، علی کدخدائی^۳، پیمان قشقائیان ترک^۴

^۱ کارشناس ارشد، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

^۲ دانشیار، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

^۳ دانشیار، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

^۴ مهندس ارشد فرآیند، اداره مهندسی پالایش، شرکت پالایش نفت آبادان

نوع مقاله: پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷

چکیده

گوگردزدایی زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها، روش مناسبی برای حذف ترکیبات گوگردی از سوخت‌های فسیلی است. هدف از تحقیق حاضر، معرفی میکروارگانیسم‌های بومی با توان حذف زیستی گوگرد بوده است. برای جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی، نمونه‌های خاک آلوده به نفت نمونه‌برداری شده از پالایشگاه نفت آبادان به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردید. غنی‌سازی نمونه‌های خاک آلوده به نفت، طی ۴ بازکشت در محیط کشت پایه نمکی به همراه ۰/۵ mM دی‌بنزوتیوفن به‌عنوان تنها منبع گوگرد انجام شد که طی آن تعداد ۲۰ جدایه باکتریایی به‌دست آمد. جدایه‌های برتر، بر اساس میزان رشد و کدورت ناشی از مصرف دی‌بنزوتیوفن، انتخاب شدند. به‌منظور بررسی مسیر متابولیکی گوگردزدایی احتمالی در جدایه‌ها، رایج‌ترین مسیر متابولیکی گوگردزدایی، یعنی مسیر 4S، از طریق آزمون گیبس مورد ردیابی قرار گرفت که تولید رنگ آبی می‌توانست تأییدکننده وجود این مسیر در میکروارگانیسم‌ها باشد. برای بررسی مقدار کاهش دی‌بنزوتیوفن از روش GC-MS استفاده شد. جدایه‌های BDS9، BDS18 و BDS37 به ترتیب قادر به حذف ۹۵/۷، ۹۵/۵ و ۸۶/۵٪ از دی‌بنزوتیوفن طی بازه زمانی ۷۲ ساعته بودند.

کلمات کلیدی: گوگردزدایی زیستی، سوخت‌های فسیلی، دی‌بنزوتیوفن، میکروارگانیسم‌های بومی گوگردزدا.

* Zarrini@tabrizu.ac.ir

مقدمه

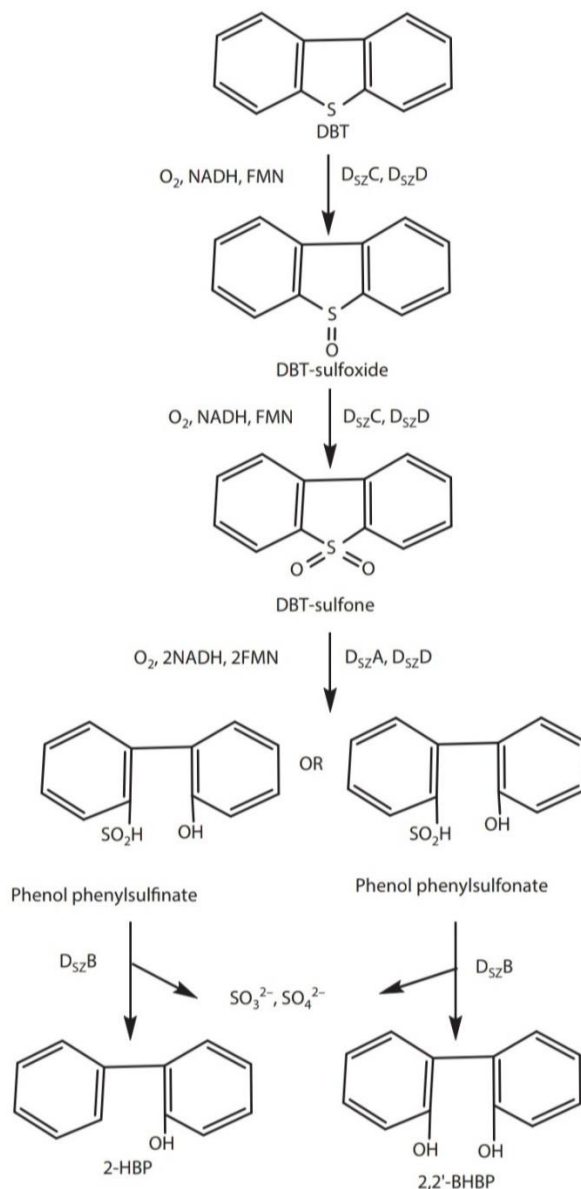
گوگرد، یکی از عناصر بسیار رایج موجود در نفت خام است و تمامی سوخت‌های فسیلی، حاوی انواع ترکیبات گوگردی آلی و معدنی هستند [۱] بیش‌تر گوگرد موجود در نفت خام در قالب تیوفن‌هایی متراکم است؛ بیش از ۷۰٪ گوگرد موجود در نفت خام به شکل دی بنزوتیوفن (DBT) و مشتقات آن (متیله شده و بنزو-DBT) هستند [۲]. ترکیبات هتروآروماتیکی حاوی گوگرد از پایدارترین اجزای نفت خام، در محیط‌زیست هستند [۳]. استفاده از سوخت‌های حاوی ترکیبات گوگردی منجر به انتشار اکسیدهای گوگرد در جو می‌شود که یکی از دلایل باران‌های اسیدی است. علاوه بر این، حتی غلظت‌های پایینی از اکسیدهای گوگرد موجب تحریک دستگاه تنفسی انسان و آسیب به گیاهان می‌شود [۴-۵].

سازمان استاندارد اروپا از سال ۲۰۰۹ تاکنون برای کلیه سوخت‌ها غلظت گوگرد را زیر ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اعمال نموده است [۶]. طبق مطالب ذکر شده، به‌کارگیری روشی برای حذف گوگرد از ترکیبات نفتی بسیار حیاتی است. چندین روش گوگردزدایی برای حذف گوگرد از سوخت‌ها وجود دارد: گوگردزدایی هیدروژنی (HDS)، گوگردزدایی اکسیداتیو (ODS) و گوگردزدایی استخراجی (EDS) [۷]. HDS تکنیکی است که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما به دما و فشار بالایی نیاز دارد. این روش، همچنین برای برخی از ترکیبات گوگرددار سخت تجزیه‌ای مانند DBT آلکیله شده مناسب نیست [۸]. فرآیندهای HDS یا ODS منجر به کاهش کیفیت نفت تصفیه شده می‌شوند و چنین نفت‌هایی نسبت به قبل از گوگردزدایی از کارایی کم‌تری برخوردار خواهند بود [۹-۱۰]. فرآیند EDS اغلب برای گوگردزدایی کامل از نفت ناکافی است و نیازمند فرآیند پایین‌دستی دیگری مانند HDS برای حذف ترکیبات گوگردی باقی‌مانده در نفت است [۱۱].

جایگزین بالقوه برای HDS، گوگردزدایی زیستی (BDS) است که در آن از میکروارگانیسم‌ها برای حذف گوگرد از ترکیبات آلی گوگرددار استفاده می‌شود [۱۲-۱۳]. BDS دارای مزایای بسیاری نسبت به HDS است، مانند حذف ترکیبات گوگرددار آلی در شرایط فشار و دمای محیطی، تولید سوخت‌هایی با مقادیر بسیار کم گوگرد [۱۴]، عدم تشکیل محصولات جانبی نامطلوب [۱۵]، حفظ ارزش گرمایی سوخت [۱۶] و هزینه‌های عملیاتی و سرمایه‌ای کم [۱۷].

مسیرها و واکنش‌های متابولیکی مورد استفاده میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه و تبدیل ترکیبات هتروسیکلیک آروماتیک گوگردی را می‌توان به چهار نوع مختلف طبقه‌بندی نمود: (۱) اکسیداسیون گوگرد؛ (۲) شکست پیوند C-C؛ (۳) شکست پیوندهای C-S و C-C؛ (۴) شکست پیوند C-S (شکست اختصاصی گوگرد) که به‌عنوان مسیر متابولیکی 4S شکل ۱ شناخته می‌شود [۱۸].

هدف ما در این پژوهش، جداسازی میکروارگانیسم‌هایی کارآمد از خاک‌های آلوده به نفت برای گوگردزدایی از ترکیب DBT بوده است.



شکل ۱- گوگردزدایی زیستی از DBT از طریق مسیر 4S

جدول ۱- گزیده‌ای از مقالات مورد بررسی قرار گرفته‌ی داخلی و خارجی

نویسندگان	سال گزارش	عنوان مقاله	نتایج
ترکمنی و همکاران	۱۳۸۸	جداسازی گوگرد از نفت خام سنگین میدان سروش با استفاده از روش زیستی	جداسازی ۳ میکروارگانسیم گوگردزدا با حداکثر راندمان ۸۲٪ طی ۶ روز
رشیدی و همکاران	۱۳۸۶	گوگردزدایی زیستی ۴-متیل دی‌بنزوتیوفن توسط باکتری RIPI-S81	جداسازی یک باکتری گوگردزدا جدید با راندمان ۵۷٪ طی ۱۱۰ ساعت

جداسازی یک باکتری شیمیولیتوتروف اختیاری با راندمان گوگردزدایی بالا	گوگردزدایی از دی بنزوتیوفن توسط باکتری <i>Klebsiella oxytoca</i> جداسازی شده از خاک‌های آلوده به نفت جنوب اهواز	۱۳۹۱	لاله و همکاران
جداسازی سویه باکتریایی گوگردزدا از تیوفن با راندمان ۹۵٪	گوگردزدایی از تیوفن توسط باکتری <i>Pseudomonas stutzeri</i> SEE-1	۱۳۹۱	شیرسلیمیان و همکاران
حذف زیستی ۹۰٪ از دی بنزوتیوفن در غلظت اولیه ۵ mg/L طی ۹۰ دقیقه	گوگردزدایی زیستی دی بنزوتیوفن به عنوان الگوی ترکیب گوگردی نفت کوره با باکتری تثبیت شده بر پلی اتیلن	۱۳۹۸	قربانی برناجی و همکاران
حذف دی بنزوتیوفن، تیوفن و ۲- متیل تیوفن در حضور کنسرسیوم میکروبی جداسازی شده	تجزیه زیستی آلاینده‌های تیوفنی توسط کنسرسیوم میکروبی جدا شده از استان فارس	۱۳۹۷	داودی دهقانی و همکاران
گوگردزدایی جذبی و باکتریایی توسط <i>Bacillus zhangzhouensis</i> جداسازی شده از آب فاضلاب صنایع پتروشیمی با راندمان ۹۹٪	Sequential desulfurization of thiol compounds containing liquid fuels: Adsorption over Ni-doped carbon beads followed by biodegradation using environmentally isolated <i>Bacillus zhangzhouensis</i>	۲۰۲۰	اناند امار و همکاران
جداسازی سویه Eu-32 از ریشه درخت اکالیپتوس، قادر به گوگردزدایی ۰/۲ میلی مولار از DBT طی ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C	dibenzothiophene the of Analysis newly isolated a in pathway metabolic . <i>Rhodococcus</i> spp	۲۰۰۹	اختر و همکاران
جداسازی سویه LKY-5 برای گوگردزدایی از DBT با راندمان ۱۰۰ mg/L طی ۱۴۴ ساعت	Biodegradation of dibenzothiophene by efficient <i>Pseudomonas</i> sp. LKY-5 with the production of a biosurfactant	۲۰۱۹	لی و همکاران
جداسازی جدایه HN4 از نمونه‌های رسوب آلوده به نفت با راندمان ۹۴٪ طی ۱۲۰ ساعت	Biodesulfurization of refractory sulfur compounds in petro-diesel by a novel hydrocarbon tolerable strain <i>Paenibacillus gluconolyticus</i> HN4	۲۰۲۰	الجنیدی و همکاران
جداسازی جدایه XP قادر به گوگردزدایی از بنزونیفتیوفن با راندمان ۹۴/۵٪ طی ۲۴ ساعت	Deep Desulfurization of Diesel Oil and Crude Oils by a Newly Isolated <i>Rhodococcus erythropolis</i> Strain	۲۰۰۶	یو و همکاران
گوگردزدایی از ۱۰۰ mg/L دی- بنزوتیوفن توسط سلول‌های جدایه KWN5 تثبیت شده بر روی آلژینات طی ۲۴ ساعت	Bacterial desulfurization of dibenzothiophene by <i>Pseudomonas</i> sp. Strain KWN5 immobilized in alginate beads	۲۰۲۱	آنتارا و همکاران
جداسازی میکروارگانیسم ترموفیل گوگردزدا از نفت خام با راندمان ۵۰٪	Thermophilic desulfurization of dibenzothiophene and different petroleum oils by <i>Klebsiella</i> sp. 13T	۲۰۱۲	هاتیا و همکاران

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد شیمیایی

دی‌بنزوتیوفن با درجه خلوص ۹۸٪، ۲-هیدروکسی بی‌فنیل و معرف گیبس از شرکت Merck آلمان تهیه شده‌اند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، دارای درجه‌ی آنالیزی بوده و به‌صورت تجاری در دسترس هستند.

۲-۲- نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به نفت

از محل‌های نمونه‌گیری تعیین شده در پالایشگاه آبادان نمونه‌گیری انجام شد. برای برداشت نمونه‌های خاک، با کنار زدن خاک سطحی، نمونه‌ها از عمق حدود ۳۰ سانتی‌متری در کیسه‌های استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردید.

۲-۳- جداسازی میکروارگانیسم‌های گوگردزدا با روش غنی‌سازی

جداسازی میکروارگانیسم‌های گوگردزدا در محیط پایه نمکی^۱ (BSM) مایع و جامد انجام شد.

محیط BSM حاوی ۵ g گلیسرول، ۱ g آمونیوم کلراید، ۲ g پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۴ g دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۲ g منیزیم کلراید، ۰/۰۲ g کلسیم کلراید و ۱۰ ml از محلول نمک‌های فلزی^۲ در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. محلول نمک‌های فلزی حاوی ۰/۵ g/L کلرید آهن، ۰/۵ g/L کلرید روی، ۰/۵ g/L کلرید منگنز، ۰/۱ g/L سدیم مولیبدات و ۰/۰۵ g/L کلرید مس است. این محیط با افزودن ۱۰۰ ppm از ترکیب دی‌بنزوتیوفن به‌عنوان تنها منبع گوگرد، به یک محیط انتخابی برای میکروارگانیسم‌های گوگردزدا تبدیل می‌شود.

در این روش، مقدار ۲ گرم از هر یک از نمونه‌های جمع‌آوری شده در ۲۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی مایع حاوی دی‌بنزوتیوفن در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ارلن‌ها در گرمخانه‌ی شیکردار با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۷ روز در دمای ۳۰°C گرماگذاری شدند. برای بازکشت، مقدار ۲ ml از این کشت‌های اولیه به ۲۰ ml از محیط پایه نمکی حاوی DBT تازه اضافه شد و گرماگذاری به مدت ۷ روز در دمای ۳۰°C صورت گرفت. این بازکشت‌ها به تعداد ۴ بار تکرار شدند. به دلیل تراکم بالای میکروب‌ها در سوسپانسیون، در صورت کشت مستقیم از آن تعداد کلنی‌ها غیرقابل‌شمارش خواهد بود. برای حل این مشکل، سوسپانسیون رقیق‌سازی شده و کشت انجام می‌گیرد. برای رقیق‌سازی از روش رقیق‌سازی متوالی^۳ استفاده شد. برای رقیق‌سازی، سرم فیزیولوژی در حجم ۹ میلی‌لیتر لوله‌های آزمایش، اضافه و اتوکلاو شد. حجم ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه کشت غنی‌سازی شده به لوله حاوی سرم فیزیولوژی اضافه و بدین‌صورت محلول ۱۰^{-۱} تهیه شد. یک میلی‌لیتر از محلول ۱۰^{-۱} به لوله حاوی سرم فیزیولوژی دیگر اضافه و محلول ۱۰^{-۲} به دست آمد. به همین ترتیب، محلول‌های ۱۰^{-۳} تا ۱۰^{-۵} نیز تهیه شدند. در این مرحله، از محلول‌های سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از هر یک از نمونه‌های مورد بررسی، مقدار ۰/۱ ml روی محیط کشت BSM جامد حاوی DBT به‌صورت سطحی با میله‌ی شیشه‌ای خمیده استریل پخش گردید. محیط کشت‌ها به مدت ۴ روز در دمای حدود ۳۰°C گرماگذاری شده و پس از گذشت زمان کافی و رشد میکروارگانیسم‌ها، کلنی‌های ایجاد

¹ Basal Salt Medium

² Metal solution

³ Serial dilution

شده روی محیط به روش چشمی و استرئومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و از هر نوع کلنی، به منظور خالص سازی کشت خطی داده شد.

۲-۴- انتخاب جدایه‌های برتر

از کشت خالص جدایه‌ها، در ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت BSM مایع حاوی DBT تلقیح صورت گرفت و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای 30°C در گرمخانه‌ی شیکردار با دور ۱۵۰ rpm، نمونه‌هایی که در ظاهر محیط کشت مایع، تغییرات قابل توجه ایجاد کرده بودند و میزان رشد (تشکیل بیوفیلم و کدورت محیط کشت) بیش‌تری داشتند، برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند.

۲-۵- آزمون گیبس

جدایه‌های انتخابی در محیط BSM مایع حاوی DBT (در حجم ۲۰ میلی‌لیتر) تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند و برای انجام این آزمون، مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون گیبس، یک روش رنگ‌سنجی است که مسیر متابولیکی گوگردزدایی 4S را در میکروارگانیسم‌ها تشخیص می‌دهد. تشکیل کمپلکس آبی‌رنگ در اثر واکنش معرف گیبس (2,6-dichloroquinone-4-chloroimide) با ۲-هیدروکسی بی‌فنیل که از محصولات واکنش گوگردزدایی در مسیر 4S است، مثبت بودن آزمون را تأیید می‌کند. برای این منظور، ۱۵۰ μl از محیط کشت هر جدایه به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای که از قبل حاوی ۳۰ μl سدیم بی‌کربنات یک مولار بوده‌اند (برای رساندن pH محیط به ۸)، اضافه شد. سپس ۲۰ μl معرف گیبس (۱ mg/ml در محلول اتانول) اضافه نموده و پس از گذشت مدت‌زمان ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، تغییر رنگ محیط بررسی شد. تشکیل کمپلکس آبی‌رنگ، مثبت بودن آزمون را تأیید می‌کند.

۲-۶- تأیید جدایه‌های برتر با آنالیز توسط روش GC-MS

برای تشخیص میزان توانایی جدایه‌ها در گوگردزدایی از دی‌بنزوتیوفن، از دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد که شامل کروماتوگرافی گازی مدل 7890B و طیف‌سنج جرمی مدل 5977A ساخت شرکت Agilent آمریکا، مجهز به سیستم تزریقی از نوع split/splitless و مدل یونیزاسیون بمباران الکترونی بوده و از کتابخانه‌های جرمی^۴ مربوط به NIST و WILEY برخوردار بود. به منظور آنالیز ترکیبات موردنظر از ستون HP5-MS به طول ۶۰ m با قطر داخلی ۰/۲۵ mm و ضخامت فیلم ۰/۲۵ μm استفاده گردید. دمای محل تزریق، دمای Interface و دمای محل یونیزاسیون به ترتیب روی ۲۷۰، ۲۹۹ و 230°C بود. برنامه دمایی ستون با دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد شروع و به مدت ۷ دقیقه در این دما نگه داشته شد، سپس دمای ستون با شیب ۱۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۹۹ درجه سانتی‌گراد رسیده و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما ثابت ماند. نسبت split به صورت ۱ به ۱۰ تنظیم گردیده و حجم تزریقی یک میکرولیتر بود.

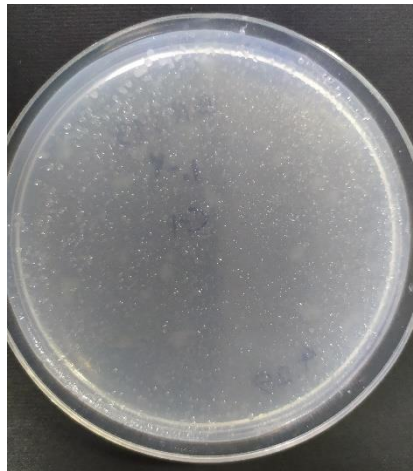
⁴ MS library

۳- نتایج و بحث

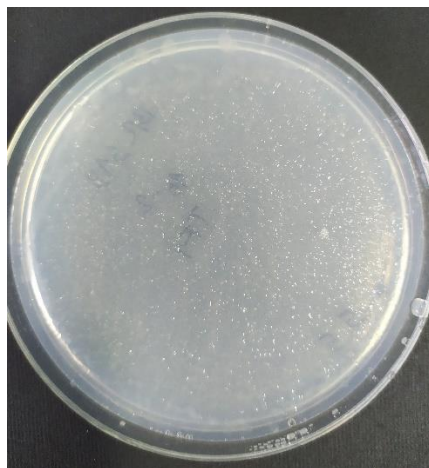
۳-۱- نتایج حاصل از جداسازی میکروارگانیسم‌های گوگردزدا

در پژوهش حاضر، از نمونه‌های محیطی جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف پالایشگاه آبادان، در کل تعداد ۲۰ جدایه باکتریایی با توانایی رشد در محیط گوگردزدایی، خالص‌سازی شد. جدایه‌های خالص‌سازی شده با پیشوند BDS 1-20 نام‌گذاری شدند. بازکشت از هر نمونه به تعداد ۴ بار تکرار شده بود که در شکل ۲ نمونه‌ای از بازکشت‌های مختلف نمونه BRS15 مشاهده می‌شود.

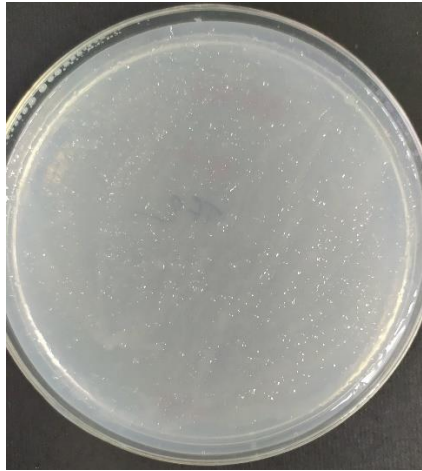
(الف)



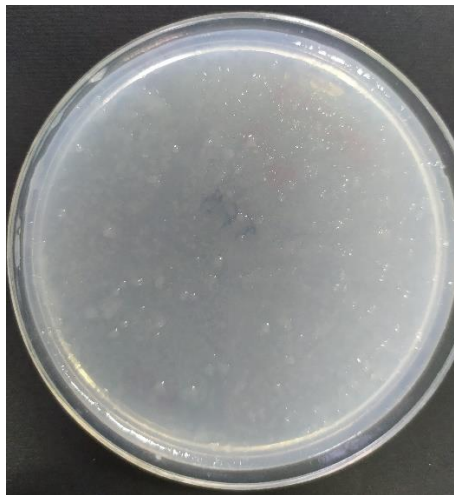
(ب)



(ج)



(د)



شکل ۲- تصویر بازکشت‌های مختلف از نمونه‌ی BRS15. الف) بازکشت اولیه، ب) بازکشت دوم، ج) بازکشت سوم، د) بازکشت چهارم

۲-۳- نتایج حاصل از آزمون گیبس

تشکیل کمپلکس آبی‌رنگ در آزمایش‌های انجام شده با سویه‌های انتخابی مشاهده نشد؛ بنابراین، گمان می‌رود که این سویه‌ها مسیر متابولیکی دیگری را برای گوگردزایی از دی بنزوتیوفن به کار می‌برند. از این رو، آنالیزهای تحلیلی از طریق GC-MS برای تعیین مسیر متابولیکی، در ادامه این پژوهش می‌تواند به کار گرفته شود.

۳-۳- انتخاب جدایه‌های برتر گوگردزدا

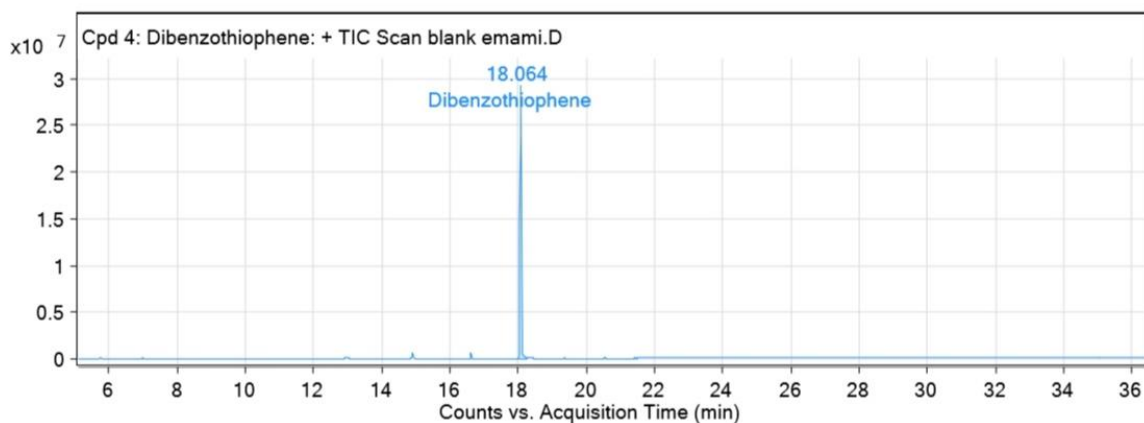
همه جدایه‌های به‌دست آمده، توانایی رشد در محیط BSM به همراه دی‌بنزوتیوفن، به‌عنوان تنها منبع گوگرد را داشتند؛ ولی این توانایی یکسان نبوده و با بررسی تغییر ظاهر محیط‌های کشت و مقایسه آن با کشت شاهد می‌توان معیاری برای انتخاب بر اساس ویژگی‌های رشد میکروارگانیسم‌ها از جمله تشکیل بیوفیلم و میزان کدورت را داشت. با رشد میکروارگانیسم‌ها، محیط کشت BSM حاوی DBT شفاف، کدورت پیدا می‌کند و بیوفیلم تشکیل شده در دیواره

ویال‌ها قابل مشاهده است. بر اساس میزان رشد، ۳ جدایه‌ی BDS9، BDS18 و BDS37، انتخاب شده و برای بررسی دقیق‌تر، با آنالیز GC-MS، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

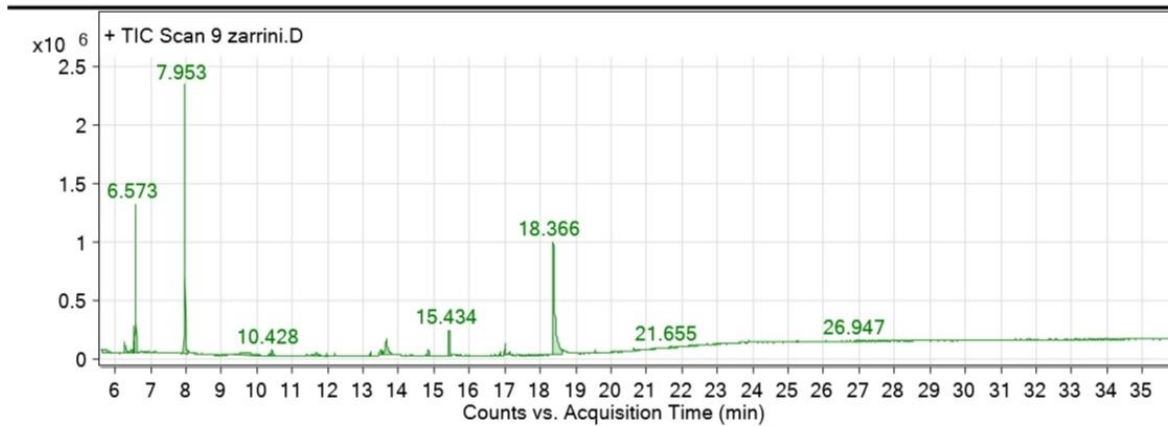
۳-۴- نتایج GC-MS در آنالیز میزان کاهش دی‌بنزوتیوفن

در شکل ۳ کروماتوگرام مربوط به نمونه شاهد و جدایه‌ها آورده شده است که کاهش دی‌بنزوتیوفن و کوتاه شدن پیک آن در نمونه‌های تیمار شده با جدایه‌های انتخابی، در مقایسه با نمونه شاهد قابل مشاهده است. ترکیب دی‌بنزوتیوفن عمدتاً در زمان‌های بازداری ۱۹-۱۸ دقیقه ثبت شده است. متابولیت‌های تولیدشده ناشی از فرآیند گوگردزدایی و رشد جدایه‌ها در جدول ۲ آورده شده است که از میان آن‌ها، ترکیب اتیل بنزن دارای بیش‌ترین فراوانی در محیط بوده است. طی فرآیند گوگردزدایی از DBT توسط این جدایه‌ها، متابولیت‌های حد واسطی تولید می‌شوند که تاکنون در مقالات دیگر گزارش نشده‌اند و ساختار حلقه‌های هیدروکربنی در آن‌ها به‌طور کامل مورد تخریب آنزیمی قرار نمی‌گیرد و بنابراین دارای ارزش گرمایی در نفت هستند. از طرفی وجود ترکیبات جدید و عدم نتیجه مثبت از آزمون گیبس احتمال وجود مسیر متابولیکی متفاوتی از مسیر مرسوم 4S را برای این جدایه‌ها بیش‌تر می‌کند که می‌تواند تنوع متابولیکی میکروارگانیسم‌ها را در تجزیه ترکیبات گوگردی نفتی نشان دهد. در مطالعه Akhtar و همکاران [۱۹] از بین ۱۱۰ جدایه باکتریایی سویه Eu-32 جهت فعالیت گوگردزدایی انتخاب شد و ۲-هیدروکسی بی‌فنیل تولید شده توسط HPLC ردیابی شد. این جدایه ۰/۲ mM از DBT را طی ۷۲ ساعت در دمای 30°C و $\text{pH}=7.0$ گوگردزدایی می‌کند؛ این جدایه در محیط کشتی همراه با ۱ ml/l مخلوط ویتامین رشد می‌یابد. سویه‌های جداسازی شده در پژوهش حاضر، در محیط کشتی ساده بدون محلول ویتامین‌های مختلف رشد می‌یابند که یکی از مزیت‌های آن محسوب می‌شود و امکان کاربردی شدن این جدایه‌ها در فرآیند گوگردزدایی را توجیه‌پذیرتر می‌سازد.

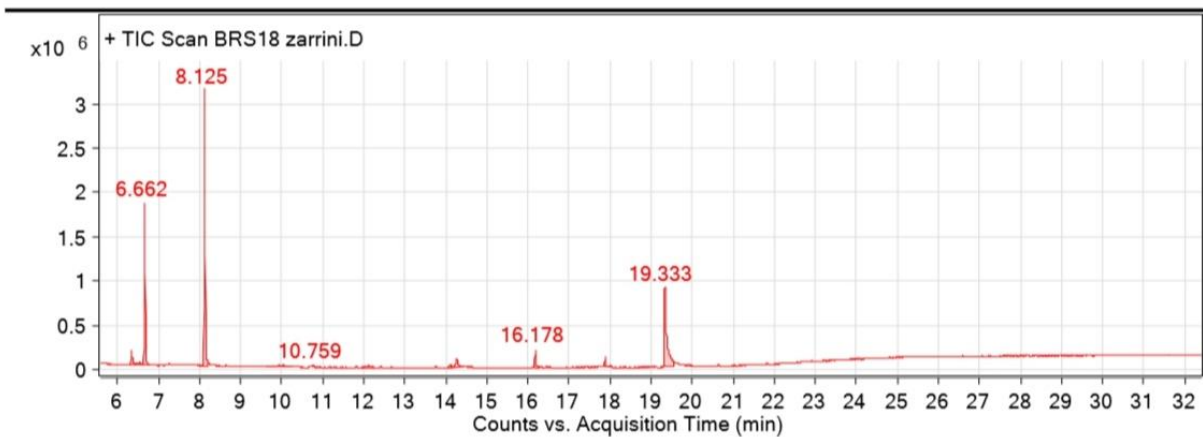
(الف)



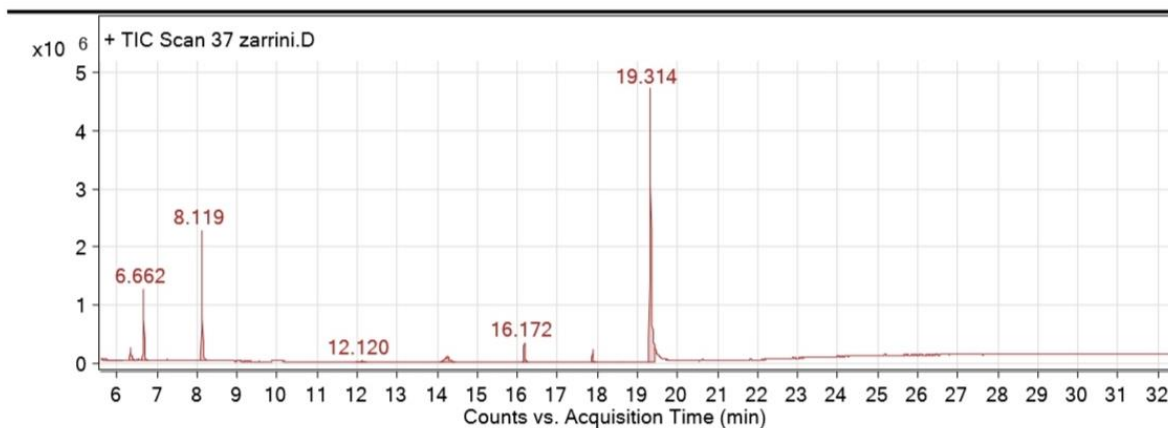
(ب)



(ج)



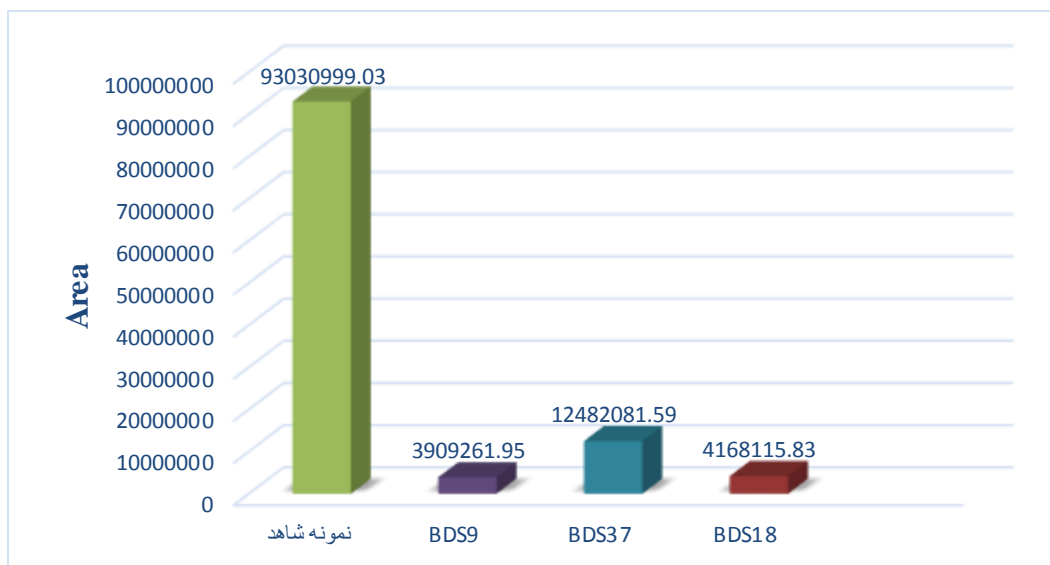
(د)



شکل ۳. کروماتوگرام مربوط به الف) نمونه شاهد، ب) جدایه BDS9، ج) جدایه BDS18، د) جدایه BDS37. واحد محور عمودی کروماتوگرام، فراوانی است. فراوانی، به معنی تعداد مولکول‌های رسیده به آشکارساز دستگاه است. مساحت زیر منحنی پیک DBT، برای هر کدام از جدایه‌ها محاسبه و با مساحت زیر منحنی مربوط به نمونه شاهد مقایسه شد. این مقایسه به صورت نمودار شکل ۴ رسم شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از GC-MS، درصد

توانایی گوگردزدایی از دی‌بنزوتیوفن برای هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد. در این فرمول R درصد حذف دی‌بنزوتیوفن، C_0 مساحت زیر منحنی پیک دی‌بنزوتیوفن در نمونه شاهد و C_A مساحت زیر منحنی پیک دی‌بنزوتیوفن در نمونه‌های تیمار شده با جدایه‌ها است. بر این اساس، جدایه‌های BDS9، BDS18 و BDS37 به ترتیب قادر به گوگردزدایی ۹۵/۷٪، ۹۵/۵٪ و ۸۶/۵٪ از دی‌بنزوتیوفن، طی بازه زمانی ۷۲ ساعته بوده‌اند. الجندی و همکاران در سال ۲۰۲۰ جدایه HN4 را از نمونه‌های رسوب آلوده به نفت جداسازی کردند که دارای راندمان ۹۴٪ طی ۱۲۰ ساعت بود که جدایه‌های معرفی شده در این تحقیق کارایی بالاتری را از نظر زمان عمل و راندمان نشان دادند. یو و همکارانش جدایه XP را با توانایی گوگردزدایی ۹۴/۵٪ طی ۲۴ ساعت از بنزوفتوتیوفن معرفی کردند. در مطالعه رشیدی و همکاران [۲۰]، باکتری گوگردزدای هوازی RIPI-S81 جداسازی شده که قادر به گوگردزدایی ۵۷ درصدی از ۴-متیل دی‌بنزوتیوفن طی مدت ۱۱۰ ساعت است و در مطالعه ترکمنی و همکاران [۲۱]، باکتری مزوفیل MS1-1 جداسازی شده که قادر به حذف گوگرد نفت میدان سروش با راندمان ۷۶٪ طی ۶ روز است. مقایسه توانایی باکتری‌های جداسازی شده در پژوهش حاضر، با سویه‌های جداسازی شده در مطالعات دیگر، تأییدی بر کارایی بالای آن‌ها در گوگردزدایی زیستی است.

$$\%R = \frac{C_0 - C_A}{C_0} \times 100 \quad (1)$$



شکل ۴- میزان کاهش دی‌بنزوتیوفن در نمونه‌های تیمار شده با جدایه‌ها در مقایسه با نمونه شاهد

جدول ۲- متابولیت‌های غالب تولید شده ناشی از فرآیند گوگردزدایی جدایه‌ها از DBT

شماره	نام متابولیت	فرمول مولکولی	زمان بازداری ثبت شده
۱	تولون	C_7H_8	۶/۵
۲	اتیل بنزن	C_8H_{10}	۷/۹
۳	تیمول	$C_{10}H_{14}O$	۱۳/۴
۴	ترنس-۲،۲-دی‌متیل-۴،۶-اکتا دی ان	$C_{10}H_{18}O$	۱۰/۳
۵	پروپان-۲،۲-دی‌اتوکسی	$C_7H_{16}O_2$	۶/۵
۶	۲-هگزن، ۲،۵-دی‌متیل	C_8H_{16}	۶/۴

۱۷/۱	$C_{15}H_{26}O$	نفتالنول	۷
۱۳/۵	C_5H_{10}	سیکلوپنتان	۸
۱۳/۲	$C_{12}H_{18}O_2$	بی سیکلو-۲-ان-۶-ال-تری متیل استات	۹
۱۱/۹	$C_{10}H_{16}O$	۲-بورنانون	۱۰
۶/۵	C_8H_{16}	۲-متیل-۲-هپتن	۱۱

۴- نتیجه گیری

سویه‌های بومی جداسازی شده BDS9، BDS18 و BDS37، توانایی آزادسازی گوگرد از DBT را بدون حمله به اسکلت هیدروکربنی آن و با کارایی حذف تقریباً ۹۰ درصد از محتوای DBT محیط را نشان دادند. تحلیل نتایج آنالیز GC-MS، نشان داد که این جدایه‌ها در طی فرآیند گوگردزدایی از DBT، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که دارای ارزش گرمایی در سوخت‌ها هستند. بررسی عملکرد این باکتری‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌های گوگردزدای هوازی نشان می‌دهد که علی‌رغم سادگی محیط کشت، عملکرد مناسب و رقابتی دارند. از طرفی، بومی بودن این سویه‌ها و توان تجزیه‌ای قابل قبول آن‌ها، امکان استفاده از این سویه‌ها را در مقیاس صنعتی می‌تواند توجیه نماید. نوآوری در کار حاضر، معرفی سویه‌های جدید و بومی با توان حذف گوگرد از ترکیبات نفتی بوده است که در این مطالعه، نتایج GC-MS نیز وجود متابولیت‌های حد واسط جدیدی در فرآیند حذف گوگرد توسط این سویه‌ها را تأیید می‌کند که تاکنون در مقالات خارجی و داخلی گزارش نشده‌اند. همچنین، به کارگیری کنسرسیومی از سویه‌های جداسازی شده به همراه بهینه‌سازی شرایط فرآیند گوگردزدایی در مقیاس بالا، می‌تواند برای گوگردزدایی زیستی از نفت خام در پالایشگاه‌ها، مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

- [1] H. N. Nassar, S. S. Abu Amr, and N. S. El-Gendy, "Biodesulfurization of refractory sulfur compounds in petro-diesel by a novel hydrocarbon tolerable strain *Paenibacillus glucanolyticus* HN4," *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020 287, vol. 28, no. 7, Oct. 2020, pp. 8102–8116.
- [2] N. Akhtar, M. A. Ghauri, and K. Akhtar, "Exploring Coal Biodesulfurization Potential of a Novel Organic Sulfur Metabolizing *Rhodococcus* spp. (Eu-32) – A Case Study," <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2015.1052119>, vol. 33, no. 6, Jul. 2016, pp. 468–472.
- [3] K. A. Gray, G. T. Mrachkott, and C. H. Squires, "Biodesulfurization of fossil fuels," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, 2003, pp. 229–235.
- [4] I. Martínez, M. El-Said Mohamed, V. E. Santos, J. L. García, F. García-Ochoa, and E. Díaz, "Metabolic and process engineering for biodesulfurization in Gram-negative bacteria," *J. Biotechnol.*, vol. 262, Nov. 2017, pp. 47–55.
- [5] C. Canales, J. Eyzaguirre, P. Baeza, P. Aballay, and J. Ojeda, "Kinetic analysis for biodesulfurization of dibenzothiophene using *R. rhodochrous* adsorbed on silica," *Ecol. Chem. Eng. S*, vol. 25, no. 4, Dec. 2018, pp. 549–556.
- [6] Y. Delegan, Y. Kocharovskaya, E. Frantsuzova, R. Streletskii, and A. Vetrova, "Characterization and genomic analysis of *Gordonia alkanivorans* 135, a promising dibenzothiophene-degrading strain," *Biotechnol. Reports*, vol. 29, Mar. 2021.
- [7] N. Gupta, P. K. Roychoudhury, and J. K. Deb, "Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 66, no. 4, Jan. 2005, pp. 356–366.
- [8] T. H. Park, K. A. Cychosz, A. G. Wong-Foy, A. Dailly, and A. J. Matzger, "Gas and liquid phase adsorption in isostructural $\text{Cu}_3[\text{biaryltricarboxylate}]_2$ microporous coordination polymers," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 5, Feb. 2011, pp. 1452–1454.
- [9] K. A. Gray, O. S. Pogrebinsky, G. T. Mrachko, L. Xi, D. J. Monticello, and C. H. Squires, "Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels," *Nat. Biotechnol.* 1996 1413, vol. 14, no. 13, 1996, pp. 1705–1709.
- [10] K. Kodama, "Co-Metabolism of Dibenzothiophene by *Pseudomonas jianii*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 41, no. 7, Jul. 1977, pp. 1305–1306.
- [11] F. Nazari, M. E. Kefayati, and J. Raheb, "Isolation, identification, and characterization of a novel chemolithoautotrophic bacterium with high potential in biodesulfurization of natural or industrial gasses and biogas," vol. 39, no. 10, May 2017, pp. 971–977.
- [12] Y. Izumi, T. Ohshiro, H. Ogino, Y. Hine, and M. Shima, "Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, 1994, pp. 223–226.
- [13] C. Oldfield, O. Pogrebinsky, J. Simmonds, E. S. Olson, and C. F. Kulpa, "Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968)," *Microbiology*, vol. 143, no. 9, 1997, pp. 2961–2973.
- [14] R. A. Omar, N. Verma, and P. K. Arora, "Sequential desulfurization of thiol compounds containing liquid fuels: Adsorption over Ni-doped carbon beads followed by biodegradation using environmentally isolated *Bacillus zhangzhouensis*," *Fuel*, vol. 277, p. 118208, Oct. 2020.
- [15] F. Elmi, Z. Etemadifar, and G. Emtiazi, "A novel metabolite (1,3-benzenediol, 5-hexyl) production by *Exophiala spinifera* strain FM through dibenzothiophene desulfurization," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, May 2015, pp. 813–821.
- [16] A. Aminsefat, B. Rasekh, and M. R. Ardakani, "Biodesulfurization of dibenzothiophene by *Gordonia* sp. AHV-01 and optimization by using of response surface design procedure," *Microbiology*, vol. 81, no. 2, Apr. 2012, pp. 154–159.
- [17] B. Yu, P. Xu, Q. Shi, and C. Ma, "Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 1, Jan. 2006,



pp. 54–58.

- [18] N. Akhtar, M. A. Ghauri, and K. Akhtar, "Dibenzothiophene desulfurization capability and evolutionary divergence of newly isolated bacteria," *Arch. Microbiol.*, vol. 198, no. 6, Aug. 2016, pp. 509–519.
- [19] N. Akhtar, M. A. Ghauri, M. A. Anwar, and K. Akhtar, "Analysis of the dibenzothiophene metabolic pathway in a newly isolated *Rhodococcus* spp," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 301, no. 1, Jan. 2009, pp. 95–102.

[۲۰] رشیدی، لادن، گوگردزدایی زیستی ۴-متیل دی بنزوتیوفن توسط باکتری RIPI-S81، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، ۱۳۸۶، شماره ۲، صفحه ۸۵.

[۲۱] ترکمنی، سارا، جداسازی گوگرد از نفت خام سنگین میدان سروش با استفاده از روش زیستی، نشریه علوم و مهندسی جداسازی، ۱۳۸۸، شماره اول، صفحه ۶۷.