نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

جداسازی یک میکروارگانیسم ترموفیل بومی و بررسی عملکرد آن جهت گوگرد زدایی بیولوژیکی

سید ابوالفضل حسینی[۱*]،سهیلا یغمایی[۲]، سید محمد موسوی بفرویی[۳]

۱. *دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی ونفت دانشگاه صنعتی شریف*

۲. *عضو هیئت علمی دانشکده مهندسی شیمی ونفت دانشگاه صنعتی شریف*

۳. *دانشجوی دکتری دانشکده مهندسی شیمی ونفت دانشگاه صنعتی شریف*

hoseini_sa@yahoo.com

چکیده

جهت انجام سولفور زدایی بیولوژیکی بیوکاتالیست مناسب از نمونه خاکهای آلوده به مواد نفتی از پالایشگاه تهران ومناطق جنوبی ایران جدا و خالص سازی گردید.تعداد ۱۶ گونه مزوفیل و۷ گونه ترمو فیل با توانایی رشد بر روی ماده گوگردی دی بنزوتیوفن(DBT) شناسایی گردید ومتابولیتهای تولیدی آنها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اهمیت میکروارگانیسم های ترمو فیل یک گونه از آنها با توانایی تبدیل DBT به ۲-هیدروکسی بی فنیل(2-HBP) انتخاب گردید.2-HBP محصول مسیر متابولیکی خاصی به نام 4-S است.درادامه اثر برخی پارامترهای موثر در حذف DBT مانند pH ،دما ونحوه رشد میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: سولفور زدایی بیولوژیکی، دی بنزوتیوفن، ترموفیل، مسیرمتابولیکی S–۴

مقدمه

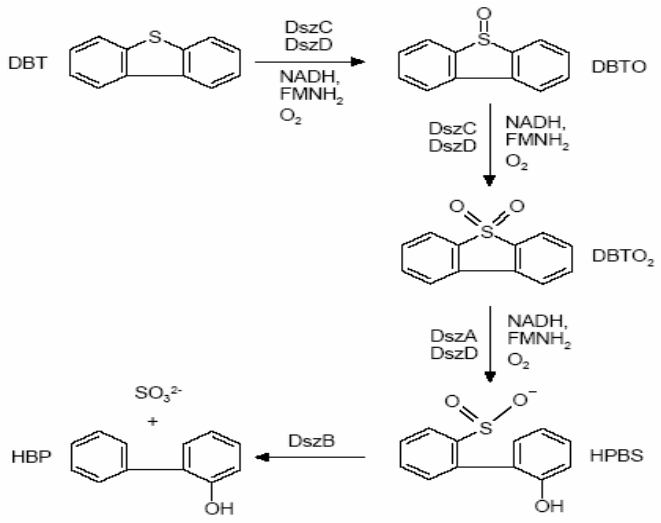
با توجه به رشد میزان گوگرد در مخازن نفت جهان و همچنین افزایش کیفیت مورد نظر در میزان گوگرد مجاز سوخت های نفتی به نظر می رسد استفاده از تکنیک های قدیمی حذف گوگرد جهت رسیدن به این مقادیر، سخت و تا حدودی دور از دسترس است. میزان گوگرد مخازن جهان در سال ۱۹۹۰ از عدد۱/۱۳ ٪ تا سال ۲۰۱۰ تا عدد ۱/۲۷ ٪ افزایش خواهد یافت. همچنین استانداردهای کشورهای مختلف روز به روز به اعداد کمتری تا حدود ۳۰ تا ppm ۵۰ کاهش می یابد.(۱)

در حال حاضر از چندین روش مختلف در صنعت جهت حذف گوگرد استفاده می شودکه در تعدادی از آنها کاهش مقدار گوگرد به۳۰۰تا ppm ۵۰۰ ممکن است. از جمله این روشها می توان به استخراج با حلال، واکنشهای اکسیداسیون، جذب سطحی، استفاده از کاتالیست های فلزی و گوگردزدایی با هیدروژن (HDS) اشاره کرد. عمده ترین روشی که در حال حاضر استفاده صنعتی دارد HDS می باشدکه یک فرایند کاتالیستی در دما و فشار بالا و در حضور گاز هیدروژن می باشد. سینتیک این روش و انواع راکتورهای آن به طور مفصل بررسی شده است. (۲و۳) در فرایند HDS رشد هزینه های فرایند نسبت به کاهش گوگرد به صورت نمایی رشد می کند و همین عامل باعث می شود که رسیدن به غلظت های کم گوگرد با هزینه بالایی همراه باشد. البته طرح هایی نوین و ساختارهایی جدید از راکتورها و کاتالیستها هم معرفی شده است (۴و۵) که به افزایش کارایی این روش ها کمک می کنند ولی باز هم تا رسیدن به استانداردهای مورد نیاز فاصله وجود دارد و سرمایه گذاری بالایی را می طلبند.

در روش جدید سولفورزدایی بیولوژیکی(BDS) از یک گونه میکروارگانیسم که اغلب باکتری می باشد جهت حذف گوگرد ازدی بنزوتیوفن(DBT) استفاده می شود. میکروارگانیسم های مختلفی روی DBT موثر هستند که طی مسیر های متابولیکی مختلفی روی آن اثر می کنند.مسیر های متابولیکی شناخته شده تا به حال عبارتند از:مکانیزم تخریبی DBT (DBT Degradation pathway) همراه با شکست پیوند کربن-کربن ومکانیسم تخریب کامل DBT (Total mineralization pathway) ومکانیسم بی هوازی(Anaerobic pathway) و در نهایت مسیر متا بولیکی ۴-s .

میکروارگانیسم هادراکثراین مسیرها علاوه بر اینکه به گوگرد حمله می کنند خود ترکیب هیدروکربنی را نیز تجزیه می کنند که نقطه ضعفی برای آنها به شمار می آید زیرا ارزش حرارتی سوخت را کاهش می دهند.اما مسیر متابولیکی ۴-s بدون دست زدن به حلقه های کربنی فقط گوگرد را به صورت so_3^{2-} از DBT جدا می کند و به خاطر همین در BDS این مسیر دارای اهمیت ویژه ای است.(۶)

گونه های میکروبی گوناگونی تا به حال گزارش شده اند که توانایی حذف ترکیبات گوگردی را دارند.از این دسته میتوان بهRhodococcus erythropolisD-1,(۷)Rhodococcus rhodochrous(۸)R-8delafieldiiR,(۹) و Pseudomonas aeruginosa(۱۰) اشاره کرد. مسیر متابولیکی ۴-s و آنزیم های دخیل در آن به طور گسترده ای مورد بررسی قرارگرفته اند. (۱۲و۱۳و۱۱) مسیر متابولیکی ۴-s در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل۱ - مسیر متابولیکی 4-s برای تبدیل DBT به 2-HBP

از جمله اقداماتی که در جهت اقتصادی تر شدن این فرایند مورد نظر است ایجاد تغییرات ژنتیکی لازم جهت حذف مرحله آخر واکنش (با حذف ژن DszB) آنزیمی است تا ماده HBPS را به عنوان سورفکتانت و یک محصول جانبی با ارزش بازیابی نمود.(۱۴)

در مواقعی که BDS برای خروجی واحد های HDS جهت حذف بیشتر گوگرد طراحی می شود باید این مطلب مد نظر باشد که خروجی واحد HDS دارای دمایی بالا است و سرد کردن آن برای BDS هزینه ای سنگین در بر دارد.بنابر این یکی دیگر از اقدامات درصورت نیاز مقاوم کردن میکروارگانیسم ها برای انجام فعالیت در دمای بالا می باشد.گونه هایی همچون Paenibacillus sp. Strain (A11-2)(۱۵) و Mycobacterium phlei WU-F1 (۱۶)در محدوده دمایی ۶۰-۵۰ درجه سلسیوس توانایی فعالیت دارند اما میزان فعالیت آنها نسبت به گونه های مزوفیل کمتر است.با توجه به این نکته مثبت در این پروژه نیز یک میکرواگانیسم با توانایی رشد در دمای ۴۵ درجه جداسازی گردید.

مواد و روشها

باکتری مورد استفاده در همین فعالیت جداسازی شد.این باکتری گرم مثبت , اکسیداز مثبت و متحرک است.تمام مواد مورداستفاده به عنوان محیط کشت از محصولات شرکت مرک بوده اند اما مخلوط ویتامین از مواد ساخت شرکت فلوکا تهیه گردید. از دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا(HPLC) جهت اندازه گیری متابولیت ها استفاده شده است.دستگاه Waters مجهز به شناساگر های RI و Dual Absorbance بوده است که آزمایشها در طول موج۲۸۰ nm انجام گرفته است.فاز جاری سیستم مخلوط ۵۰٪ حجمی از آب و استو نیتریل با دبی ۱/۵ ml/min می باشد.ستون از نوع Hypersil c- 18 (300*5.6 mm) است که ۲۰ میکرو لیتر تزریق به آن در هر مورد آزمایش انجام گرفته است.زمانهای خروج مواد به ترتیب برای HBPS,ET-AC,DBTO2,2-HBP,DBT بر حسب دقیقه ۸/۵/۷،۱۸/۲/۵/۳و۱/۲ بوده است.

میزان رشد سلولی با اندازه گیری دانسیته نوری در ۶۰۰nm به وسیله اسپکتروفتومتر انجام شده است.ترکیب محیط کشت مورد استفاده در جدول۱ آورده شده است.

روش انجام آزمایش

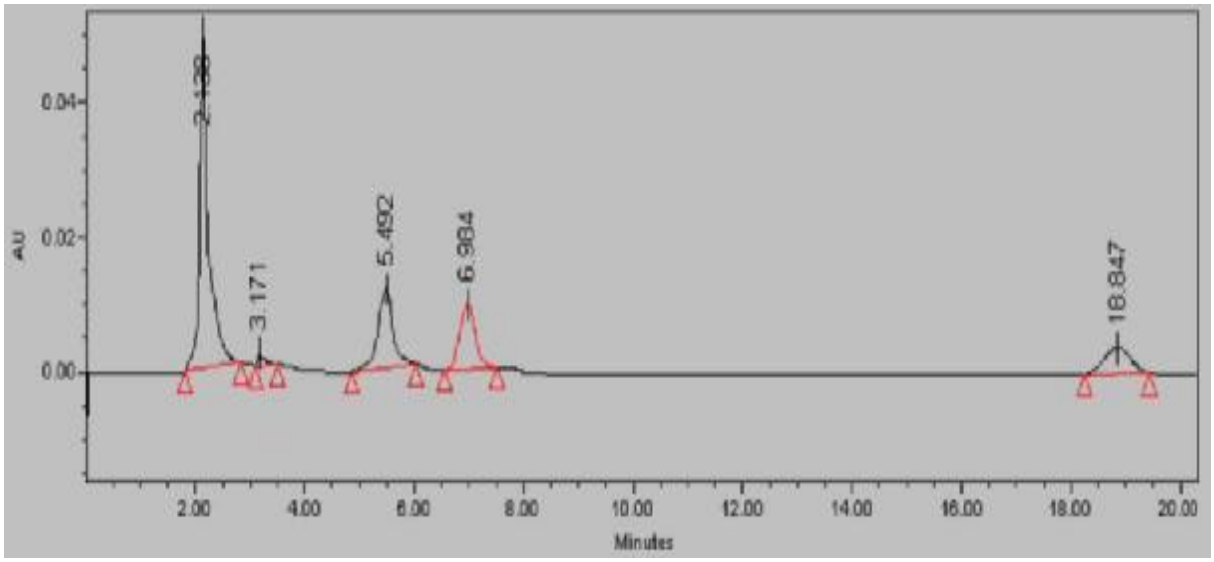
واکنشها در ارلنهای ۲۵۰cc حاوی ۵۰ cc محیط کشت انجام گرفته است.DBT به صورت محلول در اتانول (۱۰۰ mM)تهیه و در مراحل مورد نیاز، به محیط کشت ها اضافه میشود.منبع کربن گلوکز (۱۰gr/lit) است که به صورت فیلتر استریل بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت، به آن اضافه می گردد.pH محیط کشت بدون تنظیم حدود ۷/۵ است که به علت وجود نمک های مناسب بافر خوبی را ایجاد می کند.برای بررسی اثر pH، بافرهای اولیه روی pH مورد نظر تنظیم شده و سپس آزمایش صورت گرفته است.در نمونه گیری ۲cc از محیط کشت برداشته و با HCl(6N) مقدار pH به حدود ۱/۵ رسانده شده، سپس به وسیله ۲cc اتیل استات عملیات استخراج متابولیت ها صورت گرفته است.بعد از استخراج به علت وجود ناحیه دو فازی برای جداسازی فازها و ته نشین شدن باکتری ها ابتدا به مدت ۱۵min در ۲۰۰۰ rpm عملیات سانتری فوژ انجام گرفته وسپس محلول روئی با فیلتر های ۰/۲۲ µm صاف شده است.در نهایت ۲۰ µl از اتیل استات به دستگاه HPLC تزریق شده است. نمونه پیک به دست آمده در شکل ۲ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیب محیط کشت مورد استفاده (۱۷)

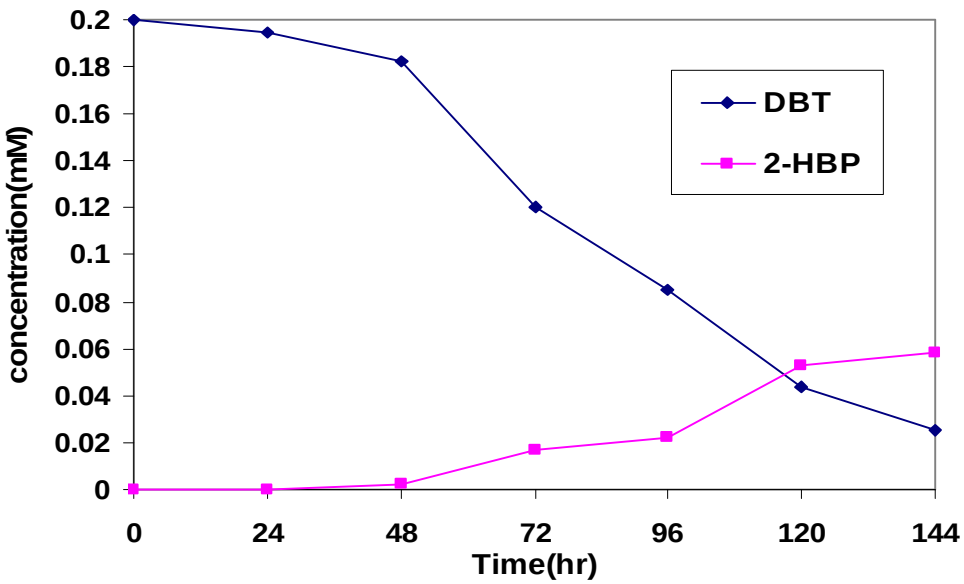
مقدار(mg)	مخلوط ویتامین	مقدار(gr)	محلول فلزی	مقدار(gr)	محیط اصلی
۴۰۰	Calcium pantothenate	۰/۱	Na_2MoO_4	۴	K_2HPO_4
۲۰۰	Inositol	۰/۵	$FeCl_2.4H_2O$	۰/۵	KH_2PO_4
۴۰۰	Niacin	۰/۵	$ZnCl_2$	۱	NH_4Cl
۴۰۰	Pyridoxine hydrochloride	۰/۵	$MnCl_2.4H_2O$	۰/۲	$MgCl_2.6H_2O$
۲۰۰	P-Aminobenzoic acid	۰/۰۵	$CuCl_2$	۰/۰۲	$CaCl_2$
۰/۵	Cyanocobalamin	۰/۰۵	$Na_2WO_4.2H_2O$	۰/۰۱	NaCl
ml۱۰۰۰	آب مقطر	ml۱۰۰۰	آب مقطر	ml۱۰	محلول فلزی
				ml۱	مخلوط ویتامین
				ml۱۰۰۰	اب مقطر

نتایج

سوش ترموفیل جداسازی شده مطابق شکل ۳ مقدار DBT را ۸۷/۵ ٪ کاهش داده و محصول 2-HBP را تولید می کند.مقادیر OD که نشان دهنده رشد جرم سلولی است و همچنین تغییرات pH محیط در حین رشد در شکل ۴ آورده شده است.به علت بافر بودن محیط تغییرات شدیدی در pH مشاهده نمی شود. در مرحله استخراج متابولیت ها، محلول دو فازی تقریبا پایداری ایجاد می شود که حاکی از تولید سورفکتانت است که می تواند شامل ماده HBPS نیز باشد.

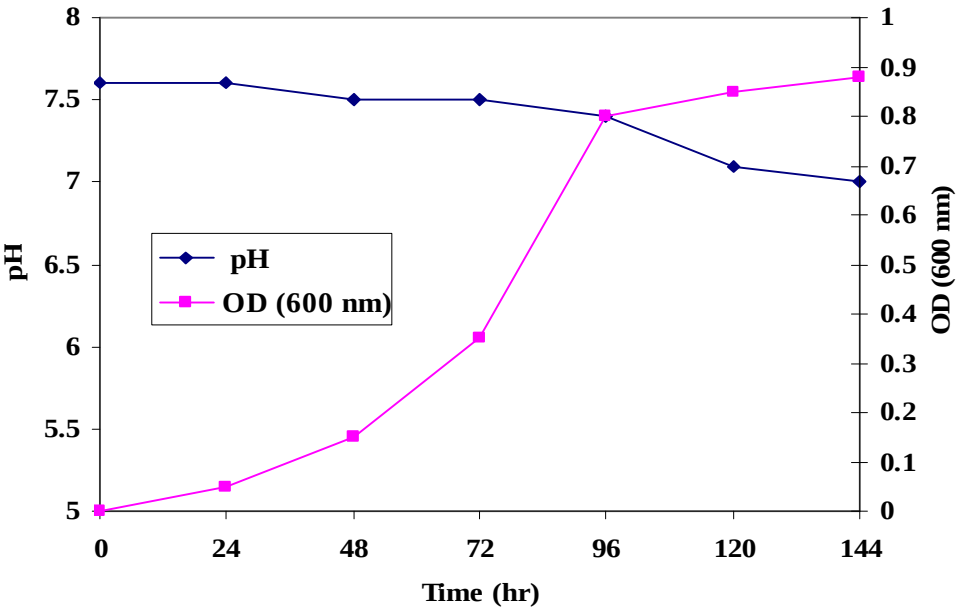


شکل۲- پیک دستگاه HPLC برای موادHBPS,ET-AC,DBTO2,2-HBP,DBT

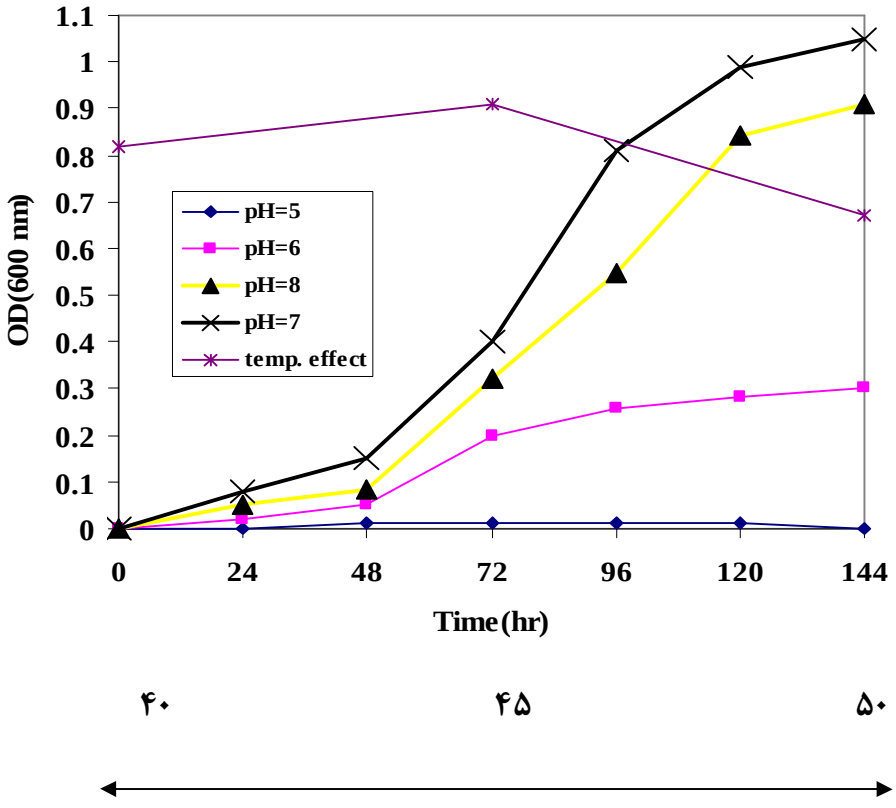


شکل ۳-تبدیل DBT به 2-HBP طی مسیر متابولیکی ۴-s

بررسی اثر pH بر روی رشد سوش نشان می دهد که این سوش در محدودهpH بین ۶/۵ تا ۸/۰ رشد مناسبی دارد و تبدیل DBT به 2-HBP طی مسیر متابولیکی ۴-s را انجام میدهد.مناسبترین pH همان ۷ است و در pH های پایین تر از۵ رشد مطابق شکل ۵ متوقف می شود.دمای بهینه نیز برای رشد این سوش با محیط کشت ذکر شده مطابق شکل ۵ حدود ۴۵ درجه سانتی گراد است. آزمایشها نشان می دهد که مقادیر OD که نشانگر رشد سلولی است ارتباط مستقیمی با تبدیل DBT دارد.



شکل ۴-تغییرات pH و OD در حین تبدیل DBT به 2-HBP طی مسیر متابولیکی 4-s



شکل ۵- اثر pH و دما روی رشد میکروارگانیسم

بحث ونتیجه گیری

۱- سوش جدا شده در این پروژه قابلیت فعالیت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد دارد که می تواند از لحاظ صنعتی دارای اهمیت باشد.

۲- این سوش در دمای ۴۵ درجه سانتی گرادو pH خنثی قادر به تبدیل DBT به 2-HBP طی مسیر متابولیکی s– ۴ است ودر طی مدت ۶ روز حدود ۸۷/۵ درصد DBT را تبدیل می کند

۳- این سوش در مقایسه با سوشهای شناخته شده از فعالیت کمتری برخوردار است اما با بررسی فاکتورهای بیشتر و استفاده از محیط های کشت بهینه برای رشد آن امکان افزایش فعالیت آن وجود دارد.استفاده از منابع کربنی دیگر مثل اتانول و همچنین سلولهای در حال سکون(Resting cell) می تواند نتایج بهتری را به دست بدهد.

٤- از موازنه جرم وپیک های به دست آمده به نظر می آید که مقدار 2-HBP تولیدی کمتر ازDBT مصرفی است که احتمالا به صورت محصولات واسطه از قبیل HBPS در محیط تجمع پیدا کرده است.این ماده خود را در امولسیون شدن دو فاز نیز نشان میدهد.البته این عامل از این جهت که به آمدن ترکیبات گوگردی به داخل سلول کمک می کند مفید است واز طرفی دیگر فرایندهای بعدی جداسازی فازها را با مشکل مواجه می کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شرکت نفت مناطق مرکزی ایران که در تامین بخشی از هزینه انجام آزمایشات همکاری نموده اند و همچنین از کارکنان مرکزتحقیقات مهندسی بیوشیمی ومحیط زیست دانشگاه صنعتی شریف به خصوص سرکار خانم زهرا قبادی که در جداسازی سوش ها ما را یاری نمودند قدردانی می شود.

منابع و مراجع

1. US EPA Office of Transportation and Air Quality, HD 2007 rule overview, November 20, 2002. 2- Kocal, Joseph, A.," Process for the desulfurization of a hydrocarbonaceous oil", US Patent No .6277271, August 21, 2001.

2. Cabrera,Carlos, A.," Process for the desulfurization of a hydrocarbonaceous oil", US Patent No .6171478, January 9, 2001.

3. Michèle Breysse, Gérald Djega-Mariadassou,Stéphanie Pessayre ,Christophe Geantet,Michel Vrinat , Guy Pérot , Marc Lemaire," Deep desulfurization: reactions, catalysts and technological challenges", Catalysis Today,vol.84,pages 129-138,2003.

4. Chunshan Song, Xiaoliang Ma," New design approaches to ultra-clean diesel fuels by deep

5. desulfurization and deep dearomatization", Applied Catalysis B: Environmental,vol.41,pages 207-238,2003.

6. Christopher Oldfield, Olga Pogrebinsky, Julie Simmonds,Edwin S. Olson,Charles F. Kulpa, " Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by Rhodococcus sp. strain IGTS8 (ATCC 53968)", Microbiology,vol.143,pages 2961-2973,1997.

7. Hiroyuki, H.,Hiroyasu,S.,Ikuo,S.,Takeshi,K.,"High cell density culture of rhodococcus rhodochrous by pH-stat feeding and dibenzothiophene degradation",journal of fermentation and bioengineering,vol.85,no.3,pages 334-338,1998.

8. Takashi,O.,Keitaro,S.,Yoshikazu,I.,"Regulation of debanzothiophene degrading enzyme activity of rhodococcus erythropolis D-1",journal of fermentation and bioengineering ,vol.81, no.2,pages 121-124,1996.

9. M.F. Luo, J.M. Xing, Z.X. Gou, S. Li, H.Z. Liu, J.Y. Chen," Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of Pseudomonas delafieldii R-8 in the presence of dodecane", Biochemical Engineering Journal,vol.13,pages 1-6,2003.

10. Ken-Ichi Noda, Kimiko Watanabe, Kenji Maruhashi," Isolation of the Pseudomonas aeruginosa Gene Affecting Uptake of Dibenzothiophene in n-Tetradecane", journal of bioscience and bioengineering, vol.95, no.5, pages 504-511, 2003.

11. Mamie Z. Li, Charles H. Squires, Daniel J. Monticello, John D. Childs," Genetic Analysis of the dsz Promoter and Associated Regulatory Regions of Rhodococcus erythropolis IGTS8", journal of bacteriology,pages 6409-6418,nov.1996.

12. Christopher S.P,.Iddington,B., R.Kovacevich, J. Rambosek," Sequence and Molecular Characterization of a DNA Region Encoding the Dibenzothiophene Desulfurization

Operon of Rhodococcus sp. Strain IGTS8", Applied and environmental microbiology",pages 468-475,feb.1995.

13. L.M. Watkins,,R. Rodriguez, D. Schneider, R. Broderick, M. Cruz, R. Chambers, E. Ruckman, M. Cody, and G.T. Mrachko," Purification and characterization of the aromatic desulfinase, 2-(20-hydroxyphenyl)benzenesulfinate desulfinase", Archives of Biochemistry and Biophysics,vol.415,pages 14-23.2003.

14. Kevin A. Gray, Gregory T. Mrachko, Charles H. Squires," Biodesulfurization of fossil fuels", Current Opinion in Microbiology,vol.6,pages 229-235,2003.

15. Toshimitsu,O.,Jin,K.,Yoshitaka,I.,Kenji,M.,"Desufurization Characteristics of Thermophilic Paenibacillus sp.strian A11-2 against Asymmetrically Alkylated Dibenzothiophenes",journal of bioscience and bioengineering,vol.92,no.2,pages193-196,2001.

16. Jin, K., Yoshitaka,I.,Toshimitsu,O.,Yoshinori,O.,Masanori,S.,Kenji,M.," Purification and Characterization of Dibenzothiophene Sulfone Monooxygenase and FMN-Dependent NADH Oxidoreductase from the Thermophilic Bacterium Paenibacillus sp. Strain Al l-2", journal of bioscience and bioengineering,vol.90,no.6,pages 607-613,2000.

17. S. Maghsoudi, A. Kheirolomoom, M. Vossoughi, E. Tanaka, S. Katoh," Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. strain P32C1", Biochemical Engineering Journal,vol.5,pages 11-16,2000.