



نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران  
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

## حذف بیوکاتالیتیک گوگرد از مشتقات آلکیل دی بنزوتیوفن

لادن رشیدی<sup>۱\*</sup>، قاسمعلی محبعلی<sup>۲</sup>، جعفر توفیقی داریان<sup>۱</sup>، بهنام راسخ<sup>۲</sup>،  
محمد رضا طلایی<sup>۲</sup>، اشک کی تاش<sup>۲</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی، دپارتمان مهندسی شیمی، دانشکده فنی - مهندسی دانشگاه تربیت

مدرس ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵. تهران، ایران\*

۲. دپارتمان میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

۳. دانشگاه اصفهان پژوهشکده شیمیائی جهاد دانشگاهی

[rash\\_12001@yahoo.com](mailto:rash_12001@yahoo.com)

### چکیده

امروزه گوگردزدایی بیولوژیکی (BDS) با استفاده از میکروارگانیسم ها به نحو موثری بر روی ترکیبات هتروسیکلی آروماتیکی گوگرددار عمل می نماید. در این تحقیق ما به بررسی عملکرد گوگردزدایی باکتری جدید گوگردزدا بنام RIPI-S81 پرداخته ایم که توسط واحد میکروبیولوژی پژوهشگاه صنعت نفت از میداین نفتی جدا شده است. این باکتری قادر به گوگرد زدایی از دی بنزوتیوفن و تبدیل آن به ۲- هیدروکسی بی فنیل بر طبق مسیر اختصاصی 4S می باشد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، باکتری فوق توانایی ویژه ای در گوگردزدایی از ۴- متیل دی بنزوتیوفن و ۶و۴- دی متیل دی بنزوتیوفن طی فاز رشد خود داشته است. همچنین سلولهای فعال بدون رشد این باکتری قادر به گوگردزدایی از دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیل آن می باشند. ساختار مولکولی متابولیت های حاصل از عملکرد گوگردزدایی باکتری مذکور توسط آنالیز دستگاهی GC-MS مورد شناسایی قرار گرفتند.

**کلمات کلیدی:** گوگردزدایی بیولوژیکی، دی بنزوتیوفن، ۴ و ۶-دی متیل دی بنزوتیوفن، ۴-متیل دی بنزوتیوفن.

## مقدمه

ترکیبات آلی گوگرددار بخش اعظم محتوای ترکیبات گوگردی نفت خام را تشکیل می دهند. میزان ترکیبات آلی گوگرددار موجود در نفت خام ایران بین ۰/۲۵ الی ۳/۲۳ درصد وزنی تخمین زده شده است، لذا ایران از جمله کشورهایی است که دارای بالاترین مقدار ترکیبات آلی گوگرددار در ذخایر نفتی خود می باشد (۱). احتراق مواد سوختنی حاصل از نفت خام مثل گازوئیل و بنزین موجب تولید و نشر اکسیدهای گوگردی شده که باعث آلودگی محیط زیست و ایجاد باران های اسیدی و غیرفعال شدن کاتالیستهای شیمیایی می شوند. همچنین باران های اسیدی موجب حل شدن مواد ساختمانی، سمی شدن دریاچه ها و از بین رفتن جنگلها می شود (۲). کلیه پالایشگاهها جهت زدایش گوگرد از سوخت های فسیلی متکی بر تکنیک گوگردزدایی هیدروژنی (HDS) می باشند. این تکنیک بسیار پرهزینه بوده و انرژی زیادی را مصرف می کند. علاوه بر آن، تکنیک مذکور در زدایش گوگرد از ترکیبات هتروسیکلی آروماتیکی گوگرداری همچون بنزوتیوفن، دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیل آنها بطور موثر عمل نمی نماید (۳).

در میان مشتقات آلکیل دی بنزوتیوفن، آن دسته از مشتقات که در آنها اتم گوگرد در مجاورت استخلافهای موقعیت ۴ یا ۶ قرار گرفته است، بیشترین مقاومت را در برابر عملکرد گوگردزدایی تکنیک HDS از خود نشان داده اند [۴و۱]. ویژگی اصلی مقاومت این ترکیبات به ممانعت فضایی ایجاد شده در هنگام شکستن پیوند کربن- گوگرد بستگی دارد. در حقیقت استخلافهای موجود در موقعیت های ۴ و ۶ از مرحله حذف بتا در تکنیک گوگردزدایی هیدروژنی جلوگیری می کنند. لذا مسیر گوگردزدایی مستقیم<sup>۱</sup> کاملاً در مشتقات آلکیل دی بنزوتیوفن مهار می شود (۴).

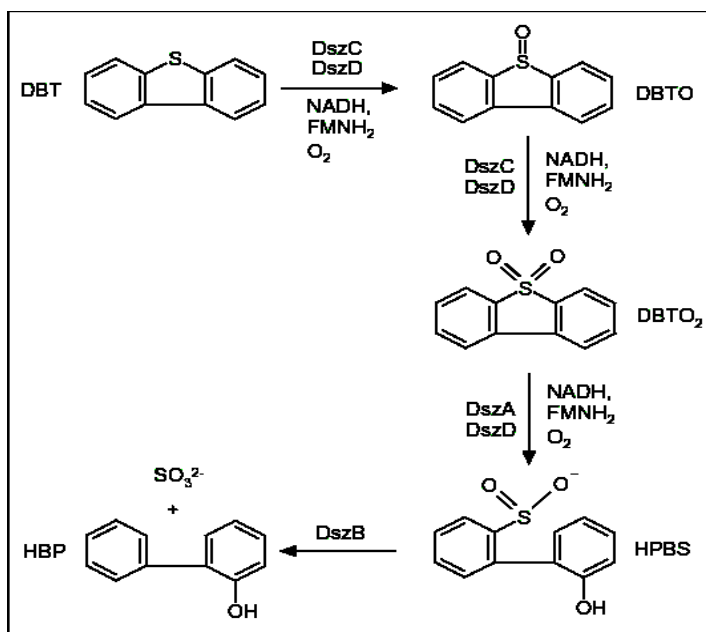
امروزه استفاده از میکروارگانیزم ها روش جدیدی برای زدایش گوگرد از اجزاء هیدروکربنی بوده ، بدون آنکه تغییری در اسکلت کربنی ترکیبات گوگرددار ایجاد شود. گوگردزدایی بیولوژیکی به عنوان تکنیک مکمل تکنیک HDS مطرح می باشد. این روش نیاز به دما و فشار بالا نداشته و قادر به گوگردزدایی از ترکیبات هتروسیکلی آروماتیکی گوگرددار می باشد. همچنین روش مذکور از نظر محیط زیست بسیار سودمند می باشد [۱].

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 از دی- بنزوتیوفن جدا شده و محصول ۲- هیدروکسی بی فنیل ایجاد می شود، در این نوع مسیر متابولیکی اختصاصی گوگردزدایی هوازی، چهار مرحله آنزیمی دخالت دارند که به همین دلیل آن را مسیر 4S نامیده اند. این مسیر در شکل (۱) نشان داده شده است [۵].

تاکنون باکتریهای هوازی متعددی گزارش شده اند که قادر به گوگردزدایی از دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیل آن بر طبق مسیر پیشنهادی 4S می باشند. از میان آنها [۶] R. erythropolis H-2.

<sup>۱</sup> - Direct Desulfurization (DDS)

بر اساس نتایج بدست آمده، باکتری RIPI-S81 جزء آن دسته از باکتری‌هایی است که قادر به گوگردزدایی از دی بنزوتیوفن و مشتقات آن بوده، بدون آنکه به اسکلت کربنی آنها لطمه بزند. در این مقاله ما به بررسی فعالیت گوگردزدایی باکتری مذکور بر روی دی بنزوتیوفن و دو مشتق آلکیل آن یعنی ۴-متیل دی بنزوتیوفن و ۶و۴-دی متیل دی بنزوتیوفن پرداخته ایم که به مقدار فراوانی در گازوئیل وجود دارند. لازم به ذکر است که این کار برای اولین بار در ایران انجام شد.



شکل (۱) - مسیر 4S در *R. erythropolis* IGTS8

## مواد و روش ها

### ۱- مشخصات باکتری

باکتری RIPI-S81 یک باکتری جدید گوگردزدا بوده که توسط پژوهشگاه صنعت نفت از میادین نفتی جداسازی شده و مورد بررسی قرار گرفت. باکتری RIPI-S81 گرم مثبت، هوازی اجباری، فاقد اسپور و کوکوباسیل می باشد که کلنی های این باکتری بر روی محیط کشت جامد آگاردار به رنگ صورتی رنگ پریده (گلبه ای)، گرد، صاف و صیقلی و منظم و اندکی محدب دیده می شوند. باکتری مزبور یک باکتری مزوفیل بوده که در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به خوبی رشد می نماید.

### ۲- مواد شیمیایی

دی بنزوتیوفن (DBT) از طریق شرکت مرک آلمان با درجه خلوص مناسب خریداری شد. ۴-متیل دی بنزوتیوفن از شرکت آلدریچ-سیگما با درجه خلوص بالا و ۶و۴-دی متیل دی بنزوتیوفن توسط شرکت

آلد ریچ آمریکا سنتز شد. بقیه مواد شیمیایی مورد نیاز از قبیل حلالها با درجه آنالیتیکی مناسب از طریق شرکت های معتبر خریداری شدند.

### ۳- محیط کشت باکتری

یک لیتر از محیط کشت مورد نیاز جهت رشد باکتری RIPI-S81 در دو قسمت آماده سازی و مورد استفاده قرار گرفت. جزء اول شامل: ۶ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۴ گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۱/۲ گرم  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  و ۲ گرم  $\text{C}_7\text{H}_5\text{Na}_2$  (سدیم بنزووات) بوده که در ۸۵۰ میلی لیتر آب عاری از یون (دیو نیزه شده) حل می شوند ( $\text{pH} = 7/08$ ).

جزء دوم شامل: شامل عناصر معدنی بوده که در ۱۵۰ میلی لیتر از آب دیو نیزه حل می شوند. این اجزاء شامل ۰/۷۵ گرم  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۴ گرم  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۱ گرم  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  و ۰/۰۰۱ گرم  $\text{FeCl}_3$  می باشند.

هریک از ترکیبات آلی گوگردار در حلال دی متیل فرمامید (DMF) حل شدند و به عنوان تنها منبع گوگرد جهت رشد باکتری به محیط کشت اضافه شدند.

### ۴- روش های آنالیز

ساختار شیمیایی متابولیت های حاصل از عملکرد گوگردزدایی باکتری مذکور بر روی دی بنزوتیوفن، ۴-متیل دی بنزوتیوفن و ۶و۴- دی متیل دی بنزوتیوفن توسط آنالیز دستگاهی گاز کروماتوگرافی- اسپکتروفتومتری جرمی (GC-MS)، متشکل از دو قسمت دستگاه GC (مدل Varian 3400 محصول مشترک آمریکا- آلمان) و اسپکتروفتومتری جرمی (MS) (مدل SaturnII - نوع تله یونی می باشد) تعیین شد.

رشد سلولی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Uv mini 1240 CE شرکت شیمادزوی ژاپن) در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد.

مقدار ترکیبات فنولیک انباشته شده در محیط واکنش توسط تست گیبس تعیین شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از معرف تازه گیبس (۰/۱ گرم از ۲ و ۶ - دی کلرو کینون کلرامید در ۱۰ میلی لیتر اتانول) با ۵ میلی لیتر از محیط واکنش باکتری ( $\text{pH}=8$ ) مخلوط شد. واکنش مثبت زمانی رخ میدهد که پس از گذشت یک ساعت از مدت زمان گرمخانه گذاری نمونه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، مقدار انباشتگی ترکیبات فنولیک در نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه گیری می گردد. لحظه شروع و شدت تولید ترکیبات فنولیک در نمونه توسط تابانیدن اشعه ماوراء بنفش (۲۵۴nm) مشاهده گردید که بوسیله دستگاه UV (مدل UVG-54 آلمان) انجام شد. در اینجا واکنش مثبت زمانی رخ می دهد که در اثر تابانیدن اشعه ماوراء بنفش به نمونه رنگ بنفش - آبی با خاصیت فلوروسانس در نمونه ظاهر گردد. جهت بررسی و تعیین متابولیت های حاصل از عملکرد گوگردزدایی باکتری بر روی منابع گوگردی موجود در نمونه ها از روش استخراج با حلال اتیل استات استفاده شد. بدین ترتیب که در ابتدا  $\text{pH}$  نمونه ها به ۲

کاهش داده شده و سپس به مقدار هم حجم نمونه اتیل استات به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس لایه رویی مجزا و جهت آنالیز ارسال گردید.

#### ۵- واکنش سلول فعال بدون رشد<sup>۱</sup>

کشت اولیه باکتری RIPI-S81 در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۳۰۰ میلی لیتر از محیط کشت و ۲۰ ppm از محلول دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۱۰۰۰۰۰ ppm) به مدت ۷۸ ساعت انجام شد. پس از آنکه باکتری به انتهای فاز لگاریتمی رشد خود نزدیک گردید، سلولهای باکتری توسط سانتریفیوژ (۴۰۰ rpm) به مدت ۸ دقیقه ته نشین شد. سپس توسط بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH = ۷/۰۸) دو بار شستشو داده شدند. مجدداً بافر فسفات اضافه می شود تا سوسپانسیون سلولی تشکیل گردد که دانسیته سلولی آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر به ۳۰ برسد (OD<sub>۶۶۰</sub> = ۳۰).

۶ عدد ویال درب دار کوچک با ظرفیت ۲ میلی لیتر آماده شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی به هر یک از ویال ها افزوده گشت. مقدار ۲۰۰ ppm از محلول دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۱۰۰۰۰۰ ppm) به ۲ عدد از ویال ها افزوده شد و به دو ویال بعدی ۲۰۰ ppm از محلول ۴-متیل دی-بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۲۰۰۰۰ ppm) و به دو ویال آخر ۲۰۰ ppm از محلول ۴و۶-دی-متیل دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۲۰۰۰۰ ppm) افزوده گشت. سه ویال درب دار دیگر نیز آماده شد و در داخل هر ویال ۴/۰ میلی لیتر بافر و ۲۰۰ ppm از هر یک از منابع گوگردی بطور مجزا ریخته شده و به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. تمامی ویال ها بر روی شیکر رفت و برگشتی (rpm) (۲۲۵) واقع در گرمخانه ۳۰°C انتقال داده شدند.

#### ۶- ارزیابی فعالیت گوگردزدایی (سیستم واکنش فاز آبی)

۸ فلاسک استریل با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر آماده و مقدار ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت به داخل هر یک از فلاسکها ریخته شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به تمامی ارلن ها اضافه گردید. به دو فلاسک اول ۲۰ ppm از محلول دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۱۰۰۰۰۰ ppm) اضافه شد و به دو فلاسک دوم ۲۰ ppm از محلول ۴-متیل دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۱۰۰۰۰ ppm) و به دو فلاسک سوم ۲۰ ppm از محلول ۴و۶-دی-متیل دی بنزوتیوفن در حلال دی متیل فرمامید (۱۰۰۰۰ ppm) و به دو فلاسک آخر ۱۰ ppm از هر یک از منابع گوگردی فوق اضافه شد. تمامی فلاسک ها به روی شیکر تنظیم شده در دور ۱۲۰ rpm واقع در گرمخانه دمای ۳۰°C انتقال داده شدند.

<sup>۱</sup> - Resting cells

## نتایج

### ۱- ارزیابی فعالیت گوگردزدایی باکتری بر روی مشتقات آلکیله

نتایج حاصل از عملکرد گوگردزدایی باکتری بر روی منابع گوگردی مختلف در جدول (۱) آورده شده اند. فاز تاخیر رشد این باکتری بر روی ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن حدود ۱۸ ساعت تخمین زده شد که مشابه فاز تاخیر آن بر روی دی بنزوتیوفن است. نمونه های حاوی دی بنزوتیوفن یا ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگردی موجود در محیط پس از ۱۴ روز مورد آزمایش و بررسی قرار گرفتند. لیکن فعالیت گوگردزدایی باکتری بر روی ۴- متیل دی بنزوتیوفن با فاز تاخیر حدود ۱۰ روز انجام شد. پس از آن باکتری وارد فاز لگاریتمی رشد می شود. طی این ۱۰ روز هیچگونه رشدی در محیط کشت حاوی ۴- متیل دی بنزوتیوفن مشاهده نشد. لذا نمونه های حاوی ۴- متیل دی بنزوتیوفن پس از گذشت ۱۷ روز مورد آزمایش و بررسی قرار گرفتند.

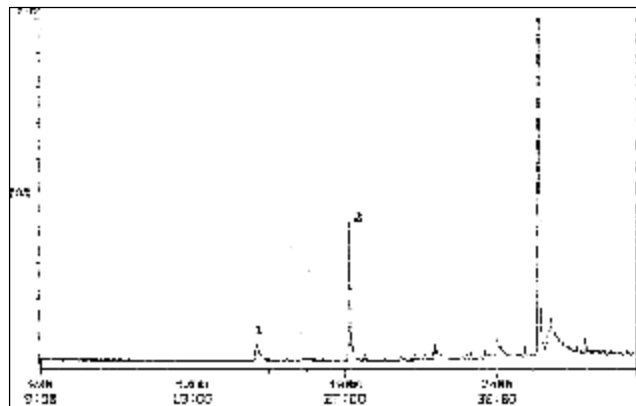
جدول (۱) نتایج آزمایشات انجام شده بر روی نمونه های حاوی منابع گوگردی معین

نوع منبع گوگردی	pH	OD <sub>۶۶۰</sub>	تست گیبس: OD <sub>۶۱۰</sub>	آزمایش UV
DBT	۷/۱۵	۱/۴۱۵	۱/۲۶۵	بسیار(مثبت)
4-MDBT	۷/۲۵	۱/۳۲	۰/۸۱۳	مثبت
4,6-DMDBT	۷/۲	۱/۳۶۲	۰/۷۳۹	مثبت
DBT و 4-MDBT و 4,6-DMDBT	۷/۱۹	۱/۷۲۳	۱/۲۳۵	بسیار مثبت

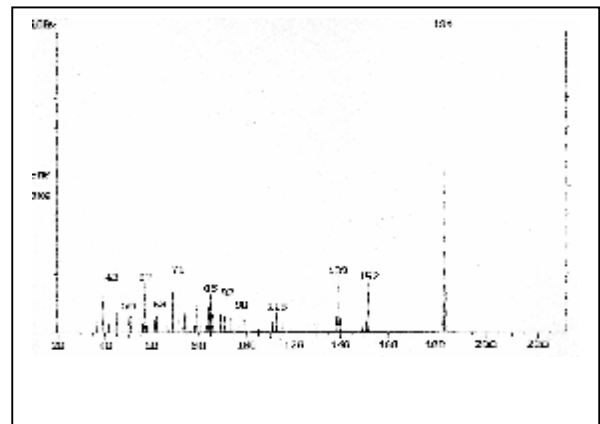
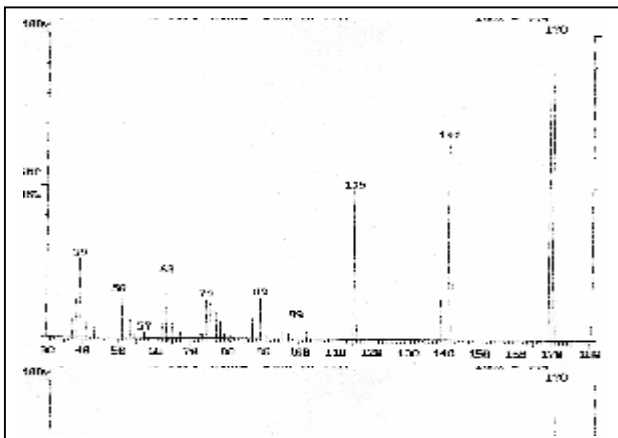
جهت بررسی فعالیت گوگردزدایی سلولهای فعال بدون رشد این باکتری، پس از گذشت ۲۴ ساعت از گرمخانه گذاری، نمونه های حاوی سلولهای فعال بدون رشد و منابع گوگردی مذکور جهت آنالیز دستگاهی GC-MS ارسال شدند و نتایج حاصله بیانگر توانایی سلولهای فعال بدون رشد این باکتری در گوگردزدایی از این مشتقات آلکیله دی بنزوتیوفن بود.

### ۲- تعیین متابولیت های حاصل از گوگرد زدایی باکتری RIPI-S81 در شرایط رشد بر روی DBT و 4-MDBT و 4,6-DMDBT

کروماتوگرام GC-MS حاصل از عملکرد گوگردزدایی باکتری RIPI-S81 بر روی دی بنزوتیوفن در شکل (۲) نشان داده شده است. پیک نمایانگر دی بنزوتیوفن در محدوده اسکن ۱۸۱۰ با زمان بازداری ۲۷/۰۹ دقیقه مشاهده گردید و پیک دیگری در اسکن ۱۴۱۳ با زمان بازداری ۲۱/۲۶ دقیقه مشاهده شد که توسط دستگاه آنالیز GC-MS، ۲- هیدروکسی بی فنیل شناسایی گردید. طیف جرمی دی بنزوتیوفن با جرم یون مولکولی (m/z) ۱۸۴ و طیف جرمی متابولیت آن با جرم یون مولکولی (m/z) ۱۷۰ در شکل (۳) آورده شده اند. این نتایج خود بیانگر این واقعیت است که باکتری RIPI-S81 مسیر اختصاصی گوگردزدایی 4S را طی می نماید.



شکل (۲) - کروماتوگرام GC-MS نمونه حاوی دی بنزوتیوفن ۱- پیک نمایانگر ۲- هیدروکسی بی فنیل. ۲- پیک نمایانگر دی بنزوتیوفن



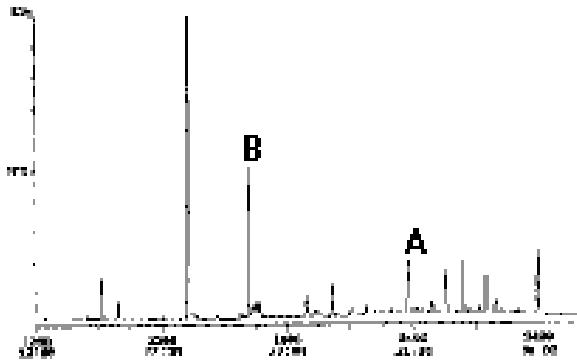
شکل (۳) - A : طیف جرمی دی بنزوتیوفن : جرم یون مولکولی (m/z) ۱۸۴.

B : طیف جرمی ۲- هیدروکسی بی فنیل (2-HBP): جرم یون مولکولی (m/z) ۱۷۰.

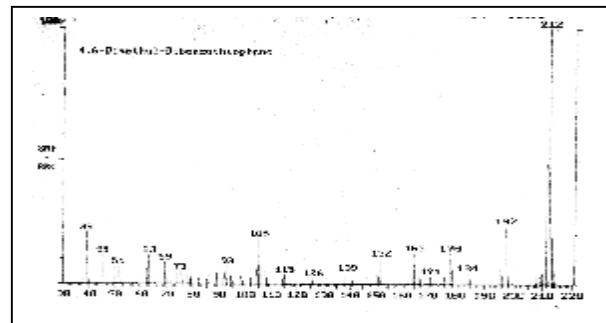
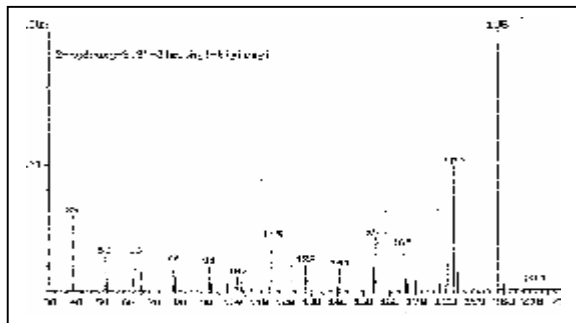
کروماتوگرام GC-MS نمونه حاوی ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن، دو پیک را با زمان های بازداری ۲۵/۳۹ دقیقه و ۳۱/۲۶ دقیقه در شماره اسکن های ۱۷۱۲ و ۲۰۹۶ نشان می دهد (شکل ۴).

طیف جرمی پیکی که در زمان بازداری ۲۵/۳۹ دقیقه مشاهده شد، بیانگر یک ترکیب فنولیک (دارای گروه هیدروکسیله) بوده که جرم یون مولکولی آن (m/z) ۱۹۸ می باشد. این ترکیب بر اساس شکست های طیف جرمی و جستجوی کتابخانه ای ۲- هیدروکسی ۳ و ۳- دی متیل بی فنیل شناسایی شد و طیف جرمی آن کاملاً مطابق با طیف جرمی ارائه شده برای این ماده در مقالات معتبر می باشد (۱۰ و ۱۱). پیک دوم که در زما

ن بازداری ۳۱/۲۶ دقیقه مشاهده شد، همان ترکیب ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن با جرم یون مولکول ( $m/z$ ) ۲۱۲ تشخیص داده شد (شکل ۵).



شکل (۴) - کروماتوگرام GC-MS نمونه حاوی ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن A: پیک نمایانگر ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن و B: پیک نشان دهنده ۲- هیدروکسی ۳ و ۳- دی متیل بی فنیل .

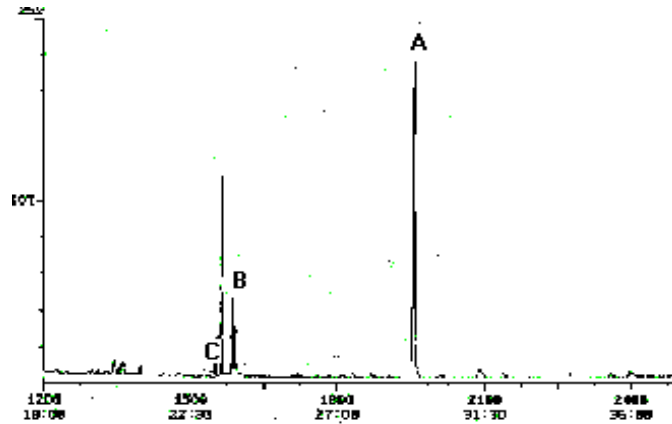


شکل (۵) A- طیف جرمی ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن (4,6-DMDBT) با جرم مولکولی ۲۱۲.  
B: طیف جرمی متابولیت حاصل از ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن با جرم مولکولی ۱۹۸ به نام ۲- هیدروکسی ۳ و ۳- دی متیل بی فنیل (2-HDMBP).

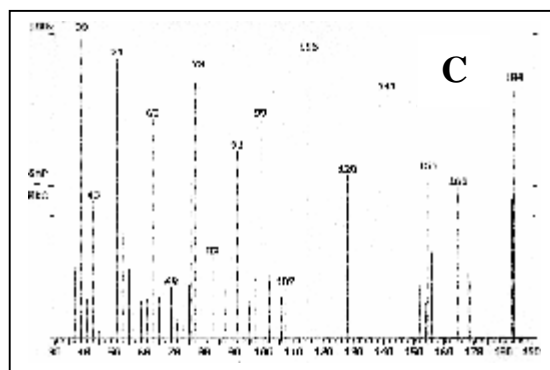
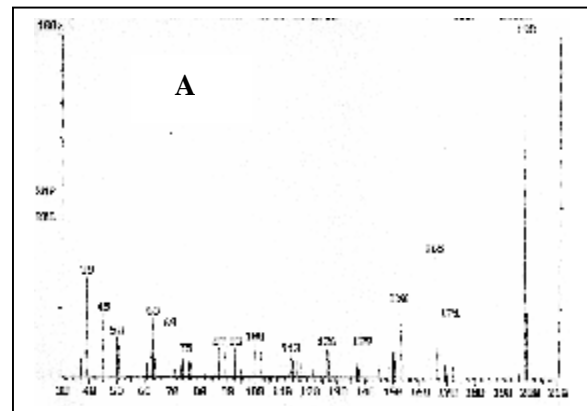
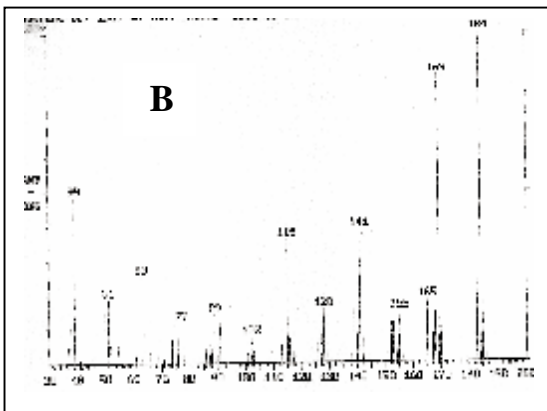
کروماتوگرام GC-MS نمونه حاوی ۴- متیل دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگردی موجود در محیط واکنش در شکل (۶) نشان داده شده است. پیک هایی که در زمان های بازداری ۲۳/۱۹ دقیقه و ۲۳/۴۸ دقیقه در شماره اسکن های ۱۵۵۳ و ۱۵۹۰ کروماتوگرام مزبور مورد شناسایی واقع شده اند، ترکیبات فنولیکی دارای گروه های هیدروکسی هستند که طیف های جرمی مربوط به آنها نیز در شکل (۷C و ۷B) آورده شده اند. طیف جرمی حاصل از پیک اول یک ترکیب فنولیک به نام ۲- هیدروکسی - ۳ - متیل بی فنیل با جرم یون مولکولی ( $m/z$ ) ۱۸۴ شناسایی گردید و طیف جرمی حاصل از پیک دوم نشانگر ماده ۲- هیدروکسی - ۳ - متیل بی فنیل با جرم یون مولکولی ( $m/z$ ) ۱۸۴ بود که به میزان بیشتری در محیط واکنش تولید شد. این طیف های جرمی کاملاً مطابق با طیف های جرمی ارائه شده در مقالات معتبر ۱۱ و ۱۰ بوده و جستجوی کتابخانه ای نیز تایید کننده تولید ترکیبات مذکور در محیط واکنش باکتری می باشد.



همچنین پیکی که در زمان بازداری ۲۹ / ۱۹ دقیقه مشاهده می شود همان ۴- متیل دی بنزوتیوفن با جرم یون مولکولی (m/z) ۱۹۸ بوده که دقیقاً با پیک استاندارد این ماده مطابقت دارد. طیف جرمی این ماده نیز در شکل (۷ A) آورده شده است.



شکل (۶) - کروماتوگرام GC-MS نمونه حاوی ۴-متیل دی بنزوتیوفن، A: پیک نمایانگر 4-MDBT و B: پیک نمایانگر ۲- هیدروکسی ۳- متیل بی فنیل C: پیک مربوط به ۲- هیدروکسی ۳- متیل بی فنیل.



شکل (۷) - A: طیف جرمی مربوط به ۴- متیل دی بنزوتیوفن (4-MDBT) با جرم مولکولی ۱۹۸.  
 B: طیف جرمی نمایانگر ۲- هیدروکسی ۳- متیل بی فنیل (2-HMBP) با جرم مولکولی ۱۸۴.  
 C: طیف جرمی نمایانگر ۲- هیدروکسی ۳- متیل بی فنیل (2'-HMBP) با جرم مولکولی ۱۸۴.

## بحث و نتیجه گیری کلی

- ۱- باکتری طی فاز رشد خود تولید ترکیبات دارای گروه هیدروکسی می نماید که توسط تست گیبس و آزمایش تابانیدن اشعه ماوراء بنفش در نمونه ها تایید شده است.
- ۲- عملکرد گوگردزدایی باکتری از ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن به خوبی دی بنزوتیوفن بوده و باکتری بدون هیچ مشکلی ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن را گوگردزدایی می کند. لیکن رشد و تکثیر سلول های باکتری RIPI-S81 در محیط کشت حاوی ۴- متیل دی بنزوتیوفن با تاخیر، (فاز تاخیر تقریباً ۱۰ روز) شروع شد. به نظر می رسد که این مشکل به نوع سوبسترا مربوط است.
- ۳- بر اساس نتایج حاصله، این باکتری به حلقه های بنزنی دی بنزوتیوفن حمله نکرده و گروههای متیل متصل به حلقه را به عنوان منبع کربن مورد مصرف قرار نمی دهد.
- ۴- در طیفهای جرمی بدست آمده، هر شکست بیانگر حذف یک مولکول یا اتم می باشد که تعیین کننده ساختار شیمیایی آن ماده می باشد و طیف جرمی هر ماده مختص به خود آن ماده است. لذا با مشاهده طیف جرمی متابولیت حاصل از گوگردزدایی از ۶۴- دی متیل دی بنزوتیوفن می توان دریافت که شکست یون مولکول  $198(m/z)$  با حذف یک گروه متیله ( $CH_3$ ) به جرم یون مولکول  $15(m/z)$  آغاز شده تا پیک نمایانگر شکست یون مولکول  $183(m/z)$  را نتیجه دهد و شکست جرم یون مولکول  $183(m/z)$  با از دست دادن  $[CH=CHOH]$  به جرم یون مولکول  $42(m/z)$  به پیک دیگری به جرم یون مولکول  $141(m/z)$  تبدیل می شود. لذا این طیف ۲- هیدروکسی -  $3$  و  $3$ - دی متیل بی فنیل (-2- HDMBP) شناسایی گردید.
- ۵- با مشاهده طیف جرمی متابولیت اصلی حاصل از عملکرد گوگردزدایی باکتری RIPI-S81 بر روی ۴- متیل دی بنزوتیوفن (شکل ۷B) مشاهده گردید که شکست جرم یون مولکول  $184(m/z)$  با از دست دادن یون  $H^+$  و حذف یک گروه متیله، شکست یون مولکول  $169(m/z)$  را ایجاد کرده که با حذف جرم یون مولکول CO تبدیل به شکست جرم یون مولکول  $141(m/z)$  شده که این شکست نیز با از دست دادن مولکول  $C_2H_2$  به یون مولکول  $115(m/z)$  تبدیل می شود. لذا ترکیب مزبور دقیقاً ۲- هیدروکسی - ۳- متیل بی فنیل می باشد.
- ۶- همچنین با توجه به نتایج حاصل از کروماتوگرام GC-MS نمونه حاوی ۴- متیل دی بنزوتیوفن، مشاهده گردید که حاصل عملکرد گوگردزدایی باکتری RIPI-S81 بر روی ۴- متیل دی بنزوتیوفن دو ماده هیدروکسی بی فنیلی می باشد که مقدار یکی از آنها بیشتر است. بنابراین به نظر می رسد که سیستم آنزیمی میکروب RIPI-S81 هر دو پیوند کربن - گوگرد را در ساختار اصلی مولکول دی بنزوتیوفن می شناسد. لیکن بطور گزینشی تمایل باکتری مذکور در شکستن پیوند کربن - گوگرد و رهاسازی گوگرد از یکسو بیشتر است.

## منابع و مراجع

1. Marcelis, C.L.M. An aerobic biodesulfurization of thiophenes. Thesis Wageningen University. ISBN: 90- 5808- 767- 0. 2002.
2. Monticello D.J. Riding the fossil fuel biodesulfurization wave. Chemtech. 28(7): 38-45. 1998.
3. 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): 298-304. 2001.
4. Breysse, .M., Djega-ariadassou, G., Pessayre, S., Geantet, CH., Vrinat, M., Perot, G., Lemaire, M. Deep desulfurization: reactions, catalysts and technological challenges. Catalysis today. 84:129-138. 2003.
5. Ohshiro T., Izumi Y. Microbial desulfurization of organic sulfur Compounds in petroleum. J. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(1): 1-9. 1999.
6. Ohshiro T., Hirata T. Desulfurization of dibenzothiophene derivatives by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2. FEMS. Microbiology. Letters. 142(1): 65-7. 1996
7. Kayser K.J., Bielaga- Jones B.A., Jackowski K., odusan O., kilban J.J. Utilization of organosulfur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. J.Gen. Microbiol 139: 3123-3129.1993.
8. Grossman M.J., Lee M.K., Prince R.C., Minak – Bernero V., George G.N., Pickering I.J. Deep desulfurization of extensively hydrodesulfurized Middle distillate oil by *Rhodococcus sp.* Strain ECRD-1. Appl. Environ. Microbiol.1949-1952. 2001.
9. Nekodzuka S., Kambe T.N., Nomura N.LU.J., Nakahara J. Specific desulfurization of dibenzothiophone by *Mycobacterium* G3. Biocatalysis and Biotransformation. 15(1): 17-27. 1997.