گوگردزدایی زیستی از ترکیب مدل دی بنزو تیوفن
با استفاده از باکتری Rhodococcus FMF

سالومه چگینی، بابک بنکدارپور *
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر
babakb@aut.ac.ir

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران
دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

برخی مشخصه‌های گوگردزدائی باکتری بومی رودوکوکوس FMF با استفاده از ترکیب DBT، بررسی گردید. منحنی رشد باکتری در دو محیط کشت با دو منبع کربنی گلیسرول و اتانول (۲۰ میلی‌مولار) و با سه غلظت اولیه متفاوت DBT (60ppm, 40ppm, 20ppm) بدست آمد و مشاهده شد که رشد باکتری و میزان محصول تولید شده بروی محیط کشت حاوی گلیسرول با غلظت اولیه20ppm از DBT بیشتر است . همچنین میزان تغییرات سرعت ویژه رشد (m) در فاز لگاریتمی در محیط گلیسرول با افزایش غلظت DBT از 20ppm به 40ppm افزایش می‌یابد و افزایش بیشترDBT(تا 60ppm) تاثیر چندانی روی m ندارد. ولی اثر افزایش غلظت BT بروی m در محدوده ppm 20-60 در محیط اتانول ناچیز مشاهده شد. همچنین میزان ماکزیمم درصد تجزیه DBT با افزایش غلظت اولیه DBT در هر دو محیط کاهش می‌یابد.

کلمات کلیدی: گوگردزدایی زیستی، Rhodococcus FMF، DBT، 2HBP

مقدمه

یکی از مسائل پالایش و مصرف سوختهای فسیلی از جمله نفت خام و برشهای نفتی وجود ترکیبات گوگردی، نیتروژن دار، اکسیژن دار و فلزات در آنها می‌باشد که اشکالات متعددی را چه در حین مصرف و چه در حین پالایش ایجاد می‌کند که مهمترین آنها عبارتند از : آلوده سازی محیط زیست، ایجاد خوردگی در دستگاهها، مسموم نمودن کاتالیزورهای واحدهای پالایشی ،پایین آمدن راندمان دستگاهها و ایجاد ناپایداری در فرآورده ها.در این میان گوگرد و ترکیبات گوگردی از اهمیت خاصی برخوردار هستند و حذف جزیی و یا کلی آنها بخش مهمی را در عملیات پالایش به خود اختصاص می‌دهد. [۱]

در حال حاضر مقادیر زیادی دی اکسید گوگرد حاصل از سوختهای فسیلی وارد جو می شود که عامل مهم بارانهای اسیدی می‌باشد[۲]،[۳]. هدف این تحقیق ارزیابی و بررسی سینتیکی گوگردزدایی از ترکیب مدل DBT توسط باکتری هوازی رودوکوکوس FMF در غلظتهای مختلف سوبسترای گوگردی و همچنین با استفاده از منابع کربنی مختلف در محیط کشت می‌باشد.

کلیات

به طور کلی در گوگردزدایی دو روش شیمیایی و بیولوژیکی مطرح می‌باشد.در میان روشهای شیمیایی معمول در حذف گوگرد روش گوگرد زدایی کاتالیستی در حضور هیدروژن HDS[۱] از کاربرد گسترده‌تر و تنوع بیشتری فرآیندی برخوردار است و در بسیاری از کشورها مورد استفاده واقع می‌شود. این روش به دلیل نیاز به گاز هیدروژن و کاتالیستهای مخصوص که اکثراً تولید کنندگان انحصاری دارند و نیز شرایط سخت عملیاتی (دما و فشار بالا) و نیز مصرف بالای انرژی مستلزم هزینه بالا می‌باشد. در ضمن روش HDS برای ترکیبات گوگرددار حلقوی مانند دی بنزوتیوفن کارآیی ندارد. لذا استفاده از سولفوزدایی زیستی جهت انجام این فرآیندارائه شده که به دلیل عدم نیاز به هیدروژن و کاتالیستهای شیمیایی و همچنین شرایط عملیاتی ملایم و نیز کارآیی بالاتر و هزینه کمتر، تحقیقات وسیعی را به خود اختصاص داده است. البته روش BDS در جهت صنعتی شدن نیاز به انجام پژوهشهای متعددی دارد لذا در طی دهه اخیر، میلیونها دلار صرف توسعه روشهای حذف گوگرد با استفاده از میکروارگانیسمها شده است.

به طور کلی دو روش گوگرد زدایی میکروبی مطرح است:

گوگردزدایی با میکروبهای هوازی[۲]

گوگردزدایی با میکروبهای بی هوازی[۳]

۱- HDS: hydro- desulfurization

۲- Aerobic

۳-Anaerobic

در روش اول، باکتری مورد نظر، ترکیبات آلی گوگرد دار را در مجاورت هوا اکسید کرده و به محصولات محلول در فاز آبی تبدیل می‌کند که با انحلال این ترکیبات در فاز آبی، گوگردزدایی از نفت صورت می‌گیرد.از معایب این روش این است که در برخی از مکانیزمهای آن بخشی از هیدروکربنهای گوگرددار از نفت جدا می‌شوند و عملاً باعث کاهش مقدار نفت می‌شوند. در روش دوم یا روش بی‌هوازی، باکتری در مجاورت گاز هیدروژن یا نیتروژن، یک سری واکنشهای گوگرد زدایی به کمک هیدروژن انجام می‌دهد. این واکنشها سرعت کمی دارند ولی محصولات آن گاز H2S و هیدروکربنهای فاقد گوگرد است. از مزایای عمده این روش عدم کاهش میزان نفت می‌باشد. [۲]،[۴]

به طور کلی میزان گوگرد موجود در نفت خام، بسته به نوع منبع آن بین ۰/۰۲۵ تا بعضاً حدود ۷/۸۹ درصد وزنی متغیر است [۴]. بعنوان مثال نفت خاورمیانه حدود۳ – ۱/۵درصد وزنی گوگرد دارد [۳].گوگرد به طور کلی به دو صورت معدنی و آلی در نفت وجود دارد. علاوه بر گوگرد خالص، سولفات، سولفیت، تایوسولفات و سولفید بیش از ۲۰۰ ترکیب آلی گوگرد دار در نفت شناسایی شده است که شامل سولفیدها، تیولها یا مرکاپتانها و تیوفنها می‌باشد که تیوفن و دی بنزوتیوفن ها دارای عوامل جانشین و مولکولهای بسیار پیچیده تر می‌باشند.به طور کلی میزان گوگرد در ترکیبات مختلف نفتی عموماً به ترتیب زیر افزایش می‌یابد. [۲]،[۳]،[۵]

(اشباعها[۱]) آلکانها< آروماتیکها[۲] < رزینها[۳] < آسفالتینها[۴]

از فراوان ترین و مقاوم ترین ترکیبات آلی گوگرد در نفت خام تیوفن ها هستند. از میان ترکیبات مختلف تیوفنی در نفت، دی بنزوتیوفن(DBT) درصد بیشتری را به خود اختصاص داده است ، به طوریکه حدود ۷۰ درصد کل محتوای گوگردی نفت خام در تگزاس و بیش از ۴۰٪ کل محتوای گوگردی نفت خام در خاور میانه را DBT و DBT های دارای عوامل جانشین تشکیل می دهند.مولکول دی‌بنزوتیوفن دارای دو جزء بنزنی و یک تیوفن می باشد. گزارشهای حاکی از استفاده از این ماده به عنوان الگو در مقالات آورده شده است. [۲]- [۶]. بدلیل غلظت زیاد DBT در نفت خام و دشواری حذف کامل آن به روشهای شیمیایی متعارف، پژوهشگران، DBT را به عنوان یک الگوی مقاوم برای ترکیبات آلی گوگردی منظور نموده اند به طوری که در اغلب تحقیقات، به جای گوگرد زدایی از نفت خام و زغال سنگ، گوگرد زدایی از DBT بررسی می شود. در بین مکانیسمهای شناسایی شده مکانیسم 4Sمناسبترین مسیراکسیداسیون اتم گوگرد و تجزیه پیوند C-S در DBT می باشد که بعنوان تنها مسیری که حداقل اکسیداسیون روی اتمهای کربن را ایجاد می‌کند آورده شده است.

[۱]- Saturates

[۲]- Aromatics

[۳] - Resins

[۴]- Asphaltenes

مواد و روشها

میکروارگانیسم

در این تحقیق از باکتری بومی رودوکوکوس FMF که از خاک اطراف پالایشگاه نفت تبریز جدا شده است و مشکوک به دارا بودن فعالیت گوگردزدایی اختصاصی از مسیر 4S می‌باشد استفاده شده است. این باکتری به صورت Slant از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

محیط کشت

در این پروژه از یک محیط پایه نمکهای معدنی به نام BSM[۱] استفاده شده است. سعی شده است تا مواد شیمیایی با حداکثر خلوص تهیه شوند. PH محیط بااضافه کردنHCL نرمال و سود نرمال روی ۷/۲ تنظیم شده و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو All American مدل No.25x در دمای ۱۲۱° C استریل گردید.
منبع کربن اضافه شده به محیط پایه BSM گلیسرول و اتانول با غلظت ۲۰ میلی مولار بوده است ومنبع گوگرد اضافه شده به محیط پایه BSM دی‌بنزوتیوفن (DBT) در غلظتهای مختلف 60ppm,40ppm,20ppm از محلول ۵ درصدی DBT در دی متیل فرم آمید بوده است. منابع کربنی و گوگردی جداگانه و با استفاده از فیلتر بیولوژیکی استریل گردیدند. کلیه ظروف شیشه‌ای با اسید کلریدریک ۲ نرمال acid wash شدند.

محیط نگهداری باکتریها

برای نگهداری باکتریها در یخچال از محیط مغذی رودوکوکوس [۲] استفاده شد که این محیط شامل نوترنیت برات (8gr/lit) ، عصاره مخمر(0.5gr/lit) و گلوکز(10gr/lit) می‌باشد. [۳]

محلول ذخیره 2-HBP

محلول ذخیره ۲ هیدروکسی بای فنیل با غلظت شامل ۱/۷گرم 2HBP[۳] در یک لیتر اتانل مطلق (ppm ۱۷۰۰) بود که برای رسم منحنی استاندارد غلظتهای ۲HBP به کار رفت.

محلول معرف گیبس[۴]

محلول معرف گیبس شامل ۱۰ میلی گرم 2,6-Dichloroquinon-4-chloromide در یک میلی لیتر اتانل مطلق می‌باشد.

آزمون گیبس[۵]

---

[۱]- Basal salt medium

[۲]-Rhodococcus Medium (RM)

[۳]- 2- Hydroxybiophenyl

[۴]-Gibbs reagent

[۵]- Gibbs Assay

مقدار ۵ میلی لیتر از محلول رویی کشت را در یک لوله آزمایش ریخته شد و PH آن با کربنات سدیم ۱۰ درصد به ۸ رسانده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از معرف گیبس به آن اضافه و مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور $30^{\circ}C$ - ۲۵ قرار داده شد تا رنگ آبی دیده شود. سپس مخلوط حاصل را در سانتریفوژ مدل Biofuge-Stratas)Heraeus) سانتریفوژ کرده (۵۰۰۰-۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ -۵ دقیقه) و سپس جذب نوری محلول رویی در طول موج ۶۱۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Jasco (V-500) خوانده شد و برای تعیین میزان محصول گوگرد زدایی از منحنی استاندارد 2HBP استفاده گردید.

آزمون گیبس ساده

تست گیبس ساده برای اندازه‌گیری کیفی و تایید توانایی حذف گوگرد توسط میکروارگانیسم می‌باشد و مشاهده رنگ آبی در اثر افزودن معرف گیبس نشانه مثبت بودن تست گیبس و تولید محصول عمل گوگرد زدایی یعنی 2HBP می‌باشد. [۳]،[۸]،[۹]

آزمون گیبس استاندارد

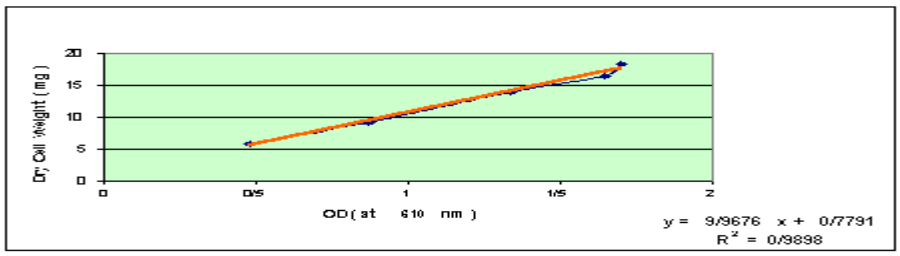
تست گیبس استاندارد برای اندازه‌گیری کمی تولید 2HBP (محصول عمل گوگرد زدایی) با استفاده از DBT توسط باکتریهای گوگردزدا می‌باشد. در این آزمون بعد از مشاهده رنگ آبی میزان کمی محصول 2HBP با استفاده از منحنی استاندارد 2HBP به طور تقریبی قابل محاسبه می‌باشد. [۳]،[۸]،[۹]

منحنی استاندارد 2-HBP

برای تهیه منحنی استاندارد 2-HBP ابتدا محلولهای 2HBP با غلظتهای مختلف (۰ ppm تا ۱۰ ppm) تهیه و پس از اجرای آزمون گیبس منحنی جذب نوری آنها در طول موج ۶۱۰ نانومتر رسم شد. برای رقیق سازی از محیط کشت BSM استفاده گردید. قابل ذکر است که با تغییر شرایط آزمایش، مانند تعویض کووت و غیره، منحنی استاندارد جدید رسم شد. همچنین هر منحنی استاندارد از میانگین دو تکرار بدست آمده است.

روش اندازه‌گیری وزن خشک سلولی

روش اندازه‌گیری وزن خشک سلولی بدین صورت بود که ابتدا منحنی استاندارد وزن خشک سلولی رسم شد و سپس در مقادیر مختلف جذب نوری مقدار وزن خشک مشخص گردید.



نمودار ۱- منحنی استاندارد وزن خشک سلولی بر حسب OD در ۶۱۰ نانومتر

کشت باکتری در محیطهای گلیسرول و اتانول با غلظتهای متفاوت (60ppm,40ppm,20ppm)DBT

برای تهیه منحنی رشد باکتری، ابتدا از کلنی خالص باکتری، سوسپانسیون هموژنی در سرم فیزیولوژیکی (NaCl ۰/۸۵٪) تهیه شد، به طوریکه کدورت آن تقریباً برابر لوله شماره یک استاندارد مک فارلند[۱] بود. [۳] (کدورت حاصل از مخلوط یک میلی لیتر (۱ml) از کلراید باریم ۰/۰۴۸ مولار با۹۹ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۰/۱۸ مولار می‌باشد که برابربا ۰/۲-۰/۱۶ در طول موج ۶۲۵ نانومتر می‌باشد [۱۰].سپس به هر ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط گلیسرول و اتانول با غلظتهای ۲۰ppm، ۴۰ppm، ۶۰ppm از DBT به میزان ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مذکور تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۱۰ روز در شیکر انکوباتور مدل Kühner ISF-1-w در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰rpm (دور در دقیقه) نگهداری شد و در زمانهای مختلف نمونه گیری (۵ میلی‌لیتر برای آزمون گیبس و ۲ میلی لیتر برای آزمایشاتHPLC[۲]) انجام گرفت.

قابل ذکر است که PH نمونه‌های HPLC ابتدا با استفاده از HCl نرمال به عدد ۲ رسانده شد. همچنین از آنجا که آزمون گیبس بیشتر جنبه کیفی دارد و بدلیل خطاهای موجود در آزمایش و همچنین واکنش دادن معرف گیبس با تمام ترکیبات آروماتیک هیدروکسیل دار بعضی از نمونه‌ها برای انجام تست HPLC به پژوهشگاه صنعت نفت داده شد.

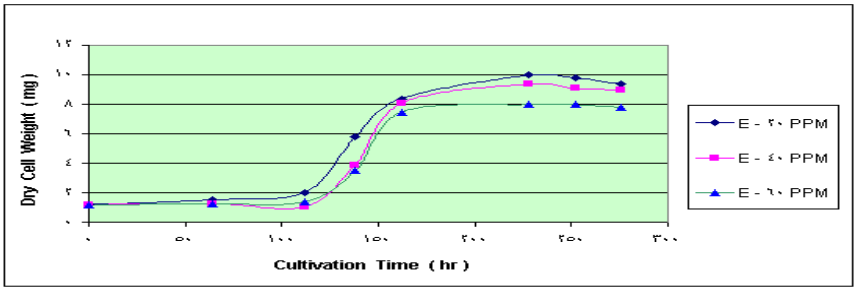
نتایج

منحنی‌های رشد باکتری R-FMF، تغییرات میزان PH ، میزان تولید محصول 2HBP با زمان، حداکثر درصد تجزیه DBT بر اساس غلظت اولیه DBT و مقایسه سرعت اولیه تولید محصول 2HBP در محیطهای حاوی گلیسرول و اتانول درسه غلظت اولیه ۲۰ppm،۴۰ppmو ۶۰ppm از DBT(دما: ۳۰°c و سرعت شیکر: ۲۰۰ دور در دقیقه) رسم شده است.

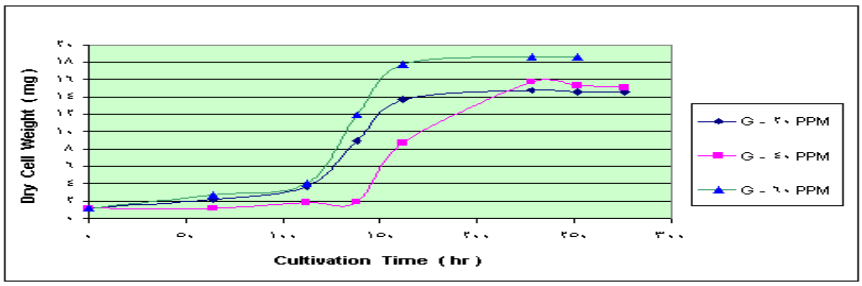
[۱]-Mc Farland standard

[۲]-High- performance liquid chromatography

(الف)

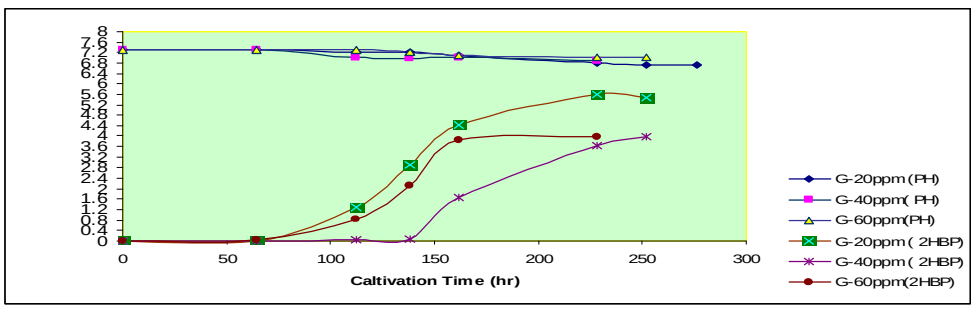


(ب)

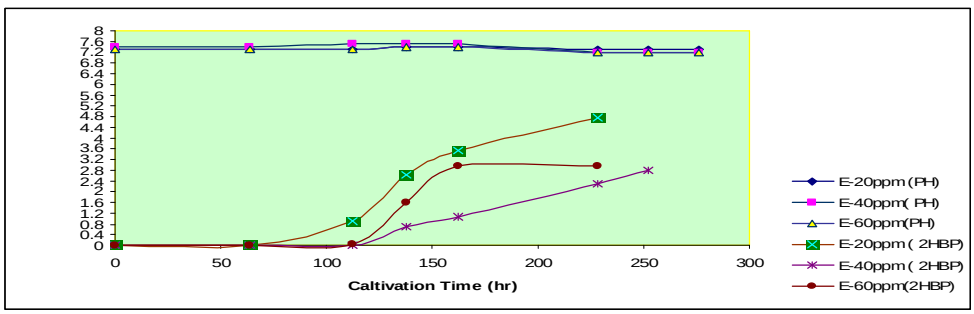


نمودار ۲- منحنی های رشد در دو محیط الف – گلیسرول و ب – اتانول

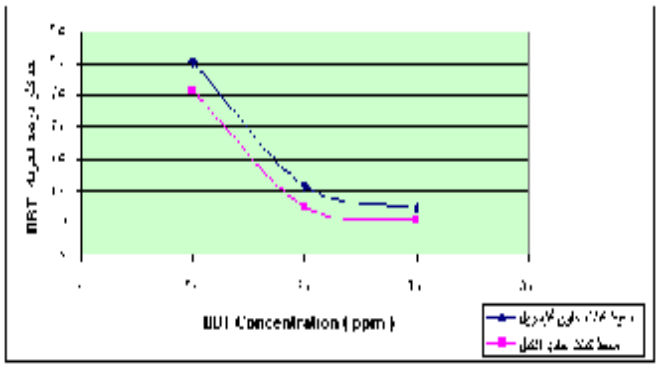
(الف)



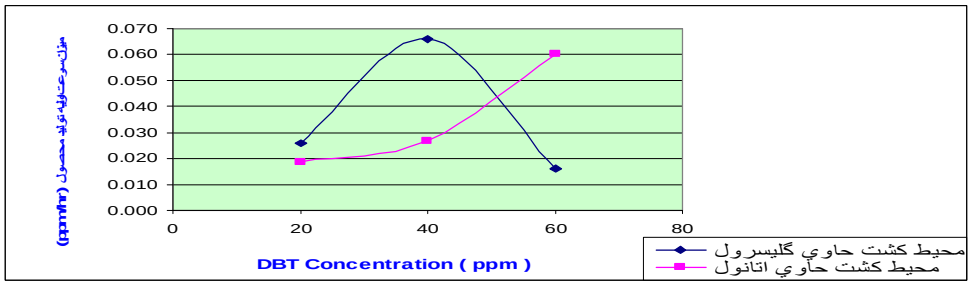
(ب)



نمودار۳- تغییرات میزان PH و میزان تولید محصول 2HBP بر حسب ppm با غلظتهای متفاوت DBT در دو محیط الف- گلیسرول و ب- اتانول



نمودار ۲-مقایسه حداکثر درصد تجزیه DBT بر اساس غلظت اولیه DBT



نمودار۵-منحنی مقایسه سرعت اولیه تولید محصول 2HBP در دو محیط کشت گلیسرول و اتانول

جدول ۱ – مقایسه حداکثر درصد تجزیه DBT بر اساس غلظت اولیه DBTبر اساس آزمون گیبس و HPLC

محیط کشت	حداکثر درصد تجزیه DBT بر اساس آزمون گیبس	حداکثر درصد تجزیه DBT بر اساس آزمون HPLC
G - 20 PPM	30.35	32.47
G - 40 PPM	10.8	10.28
G - 60 PPM	7.29	7.93
E - 20 PPM	25.75	25.5
E - 40 PPM	7.57	9
E - 60 PPM	5.34	4.83

تغییرات m فاز لگاریتمی نسبت به غلظت DBT

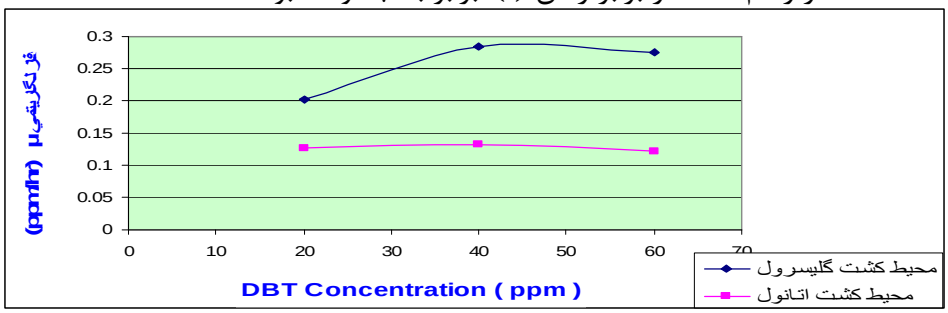
برای بدست آوردن سرعت ویژه رشد در فاز لگاریتمی (μ فاز لگاریتمی) نمودار نیمه لگاریتمی Lnx (x = وزن خشک سلولی) در فاز لگاریتمی بر حسب زمان رسم شد. شیب خط حاصله برابر با μ فاز لگاریتمی است. زیرا می‌دانیم:

$$\frac{dx}{x} = mdt$$

در نتیجه با انتگرال گرفتن از طرفین خواهیم داشت:

$$Ln\frac{x}{x_c} = mt$$

پس شیب خط حاصله از رسم Lnx در برابر زمان (t)، برابر با μ خواهد بود.



نمودار ۶-منحنی مقایسه تغییرات m فاز لگاریتمی نسبت به غلظت DBT در دو محیط گلیسرول و اتانول

بحث و نتیجه گیری

در محیط کشت حاوی اتانول افزایش غلظت DBT در محدوده 20-60 ppm تاثیر قابل ملاحظه‌ای بروی مقدار μ نداشت ،ولی در محیط کشت حاوی گلیسرول با افزایش غلظت DBT از 20 ppm تا 40 ppm در مقدار μ افزایش مشاهده شد، در حالیکه افزایش بیشتر غلظتDBT تا 60 ppm تاثیری بروی میزان μ نداشت. در محیط کشت حاوی اتانول غلظت DBT تاثیری بروی فاز وقفه نداشت، در حالی که در محیط کشت حاوی گلیسرول بیشترین زمان فاز وقفه در غلظت 40 ppm از DBT مشاهده شد.

در محدوده شرایط مورد استفاده در آزمایشات بیشترین میزان μ در محیط کشت حاوی گلیسرول بدست آمد و زمان وقفه بدست آمده در محیط کشت حاوی گلیسرول مشابه یا کمتر از فاز وقفه در محیط کشت اتانول بوده است.

میزان وزن خشک اندازه‌گیری شده در دو محیط گلیسرول و اتانول به ترتیب مربوط به 60ppm – G و E -20 ppm بوده است. این در حالی است که میزان تغییرات PH در این دو حالت کمتراز حالات دیگر بوده است.

در هر دو محیط کشت اتانول و گلیسرول با افزایش غلظت DBT ماکزیمم درصد تجزیه DBT کاهش پیدا می‌کند. ولی به طور کلی در محیط کشت حاوی گلیسرول میزان ماکزیمم درصد تجزیه DBT بیشتر از محیط کشت حاوی اتانول بود.

در محیط کشت حاوی گلیسرول میزان سرعت اولیه تولید محصول 2HBP با افزایش غلظت اولیه DBT تا حدود 40 ppm افزایش می‌یابد ولی در غلظتهای اولیه DBT بالاتر از محدوده 40 ppm اثرات بازدارندگی DBT برای سرعت اولیه تولید محصول 2HBP دیده شد. ولی اثرات بازدارندگی غلظت اولیه DBT بروی سرعت اولیه تولید محصول در محیط کشت حاوی اتانول دیده نشد و در این محیط با افزایش غلظت اولیه DBT سرعت اولیه تولید محصول نیز افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

تشکر از آقای بهنام راسخ و همه عزیزانی که مرا در تهیه این آلازم می دانم. در ضمن این تحقیق باحمایت مالی شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده های نفتی ایران انجام شده است.

منابع و مراجع

۱. ابوالحمد، گیتی، مبانی پالایش نفت، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۷۵).

۲. جمشیدی، امیرمسعود; بررسی فرآیند گوگردزدایی از نفت به روش میکروبی در یک جت راکتور. پایان نامه دکترا – دانشگاه صنعتی امیرکبیر – تابستان (۱۳۷۹).

۳. خادم، فیروزه; مظاهری اسدی، مهناز; طرح جداسازی باکتریهای گوگردزدای آلی برای استفاده در گوگردزدایی از نفت خام، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران (پژوهشکده بیوتکنولوژی)؛ ۱۳۷۹-۱۳۷۸).

4. Shennan J.L., "Microbial attack on sulfur – containing Hydrocarbons. Implications for the Biodesulfurization of oils and coal"., J. Chem.Tech. Biotechnol; Vol 67; 109-120; (1996).

5. Monticello D.J., "Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates", Current opinion in Biotechnology; 11; 540-546, (2000).

6. Monticello D.J., "Riding the fossil fuel biodesulfurization wave., CHEMTECH; 38-45, (1998).

۷. وهاب‌زاده، فرزانه، مغازه، آزاده.، دستور کار آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، آبان (۱۳۷۶).

۸. اکبرزاده شعرباف ، س - راهب ، ج –آقایی ، ا- کارخانه‌ای ، ع - «بررسی و مقایسه میزان فعالیت سولفورزدایی در باکتری بومی رود و کوکوس FMF، هفتمین گنگره ملی مهندسی شیمی ایران، دانشگاه تهران، آبان (۱۳۸۱).

9. Rhee S.K., Chang J.H.,Chang Y.K.,Chang H.N.; "Desulfurization of DBT and Diesel Oils by a Newly Isolated Gordona Strain.CYKS1."Applied and Environmental Microbiol; Vol.64; No.6; June.

10. . Mc Farland standards. Technical Data # 2900a / 98.07.