

گوگردزدایی از تیوفن توسط باکتری *Pseudomonas stutzeri* SEE-1

محمد صادق شیرسلیمیان، زهرا اعتمادی فر* و گیتی امتیازی

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۳

چکیده

حذف گوگرد از ترکیبات تیوفنی یکی از مسائل مهم در پالایشگاه‌ها و کنترل آلودگی‌های زیست محیطی محسوب می‌شود. یک سویه باکتریایی غنی شده در خاک حاوی MTBE قادر به گوگردزدایی از ترکیب تیوفن می‌باشد که با آنالیز فیلوژنتیکی انجام شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA، این سویه به عنوان *Pseudomonas stutzeri* شناسایی شد. آزمایش‌های گوگردزدایی با سلولهای فعال بدون رشد این باکتری در حضور ترکیب گوگرددار مدل تیوفن و در فاز آبی انجام شد که نتایج به دست آمده با روش اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۲۳۰ نانومتر نشان داد که بیش از ۹۵ درصد از تیوفن با غلظت اولیه ۱۲/۴ میلی مولار پس از ۱۵ ساعت حذف شده است. آنالیز انجام شده با روش کروماتوگرافی گازی (GC) نیز همین میزان کاهش تیوفن را نشان داد. همچنین به منظور بررسی فعالیت گوگردزدایی سلولهای فعال بدون رشد این باکتری در محیط دوفازی حاوی نفت خام، میزان کاهش گوگرد از طریق اندازه‌گیری میزان سولفات آزاد شده با روش کدورت سنجی مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: گوگردزدایی زیستی، تیوفن، سلول فعال بدون رشد، نفت خام، سودوموناس/استوتزری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۳۲۳۶۷، پست الکترونیکی: z_etemadifar@yahoo.com

مقدمه

در حال حاضر همه پالایشگاهها برای حذف گوگرد از سوختهای فسیلی متکی بر تکنیک پر هزینه گوگردزدایی هیدروژنی (Hydrodesulfurization) می‌باشند، یک فرآیند کاتالیتیکی در فشار بالا (۲۵۰-۱۵۰ پوند بر اینچ مربع) و حرارت بالا (۴۲۵-۲۰۰ درجه سانتی‌گراد) که در آن از گاز هیدروژن برای احیای گوگرد به سولفید هیدروژن استفاده می‌شود. حجم وسیعی از ترکیبات غیر آلی گوگردی و همچنین ترکیبات آلی گوگردی ساده از طریق این فرآیند حذف می‌شوند، اما بیش از ۷۰ درصد از گوگرد موجود در نفت خام ترکیبات آروماتیکی گوگردی بر پایه حلقه تیوفن می‌باشند که نسبت به عمل گوگردزدایی این روش مقاوم هستند (۱۱). از این رو، توسعه روشهای جدید مثل گوگردزدایی زیستی یا بیوکاتالیتیک به یکی از جاذبه‌های مهم بیوتکنولوژی در صنعت نفت تبدیل شده است.

میزان گوگرد در نفت‌های خام از ۱۰۰۰ - ۳۰۰۰ ppm متغیر است و مهم‌ترین ترکیب آلوده کننده نفتی محسوب می‌شود (۹). احتراق مواد سوختنی حاصل از نفت خام مثل گازوئیل و بنزین موجب تولید و انتشار اکسیدهای متفاوت گوگرد (SO_x) و بیش از همه به صورت SO₂ می‌شود که با ایجاد بارانهای اسیدی موجب حل شدن مواد ساختمانی، از بین رفتن جنگلها و سمی شدن دریاچه‌ها می‌گردد. همچنین افزایش غلظت گوگرد موجود در اتمسفر با تشکیل آئروسولهای سولفات سبب بروز ناراحتیهای تنفسی و قلبی-عروقی در انسان می‌شود. از طرف دیگر، هر ساله قوانین و استانداردهای موجود برای کنترل میزان گوگرد مجاز سوختهای فسیلی سخت تر می‌شود. به عنوان مثال، سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA) مرز میزان گوگرد مجاز در سوختهای دیزلی و گازوئیل را تا سال ۲۰۱۰، ۱۵ ppm تعیین کرد (۱ و ۱۱).

خاص چروکیده به همراه لبه‌های برآمده بود که پس از برداشتن، محل اثر برداشتن کلنی باقی می‌ماند. پس از پاساژهای مکرر در محیط‌های کشت آزمایشگاهی کلنی‌ها به حالت صاف و گرد تبدیل شدند (شکل ۱).

تعیین ترادف ژن 16S rRNA: به منظور شناسایی مولکولی باکتری مورد نظر، DNA ژنومی آن طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده استخراج شد، سپس واکنش PCR با دو پرایمر رفت RW۰۱ و برگشت DGV۴ انجام شد که توالی پرایمرها به صورت زیر است: پرایمر رفت RW۰۱ (5'AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3') و پرایمر برگشت DGV۴ (5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3'). محصول به دست آمده توسط این دو پرایمر حاوی ۳۷۰ bp بود. برنامه PCR به صورت یک سیکل دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد.

محصول PCR پس از مشاهده بر روی ژل ۱ درصد آگارز، جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی فرستاده شد. توالی به دست آمده با دیگر توالی‌های شناخته شده موجود در بانک ژنی مرکز NCBI با استفاده از برنامه BLASTn مقایسه گردید (۵).

تهیه سلولهای فعال بدون رشد: کشت اولیه باکتری SEE-1 در ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت لوریا برتانی (LB) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از آنکه باکتری به انتهای فاز لگاریتمی رشد خود نزدیک گردید، سلولهای باکتری توسط سانتریفیوژ (دور ۱۸۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) ته نشین شدند. رشد سلولی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل SECOMAM XS 5 ساخت فرانسه) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس

روش گوگردزدایی زیستی به دلیل شرایط عملیاتی متعادل، هزینه‌های پایین و ویژگی مسیرهای متابولیکی به عنوان یک روش مکمل برای فرآیند گوگردزدایی هیدروژنی در نظر گرفته می‌شود. از این رو تغییر زیستی ترکیبات تیوفنی توسط انواعی از سویه‌های باکتریایی از قبیل رودوکوکوس، گوردونیا، میکوباکتریوم، پانی‌باسیلوس، سودوموناس و غیره مورد مطالعه قرار گرفته است (۸، ۹ و ۱۱).

سودوموناس استوتزری یک باکتری با قابلیت‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی بالا، در تجزیه بسیاری از هیدروکربنهای آلیفاتیک و آروماتیک نقش دارد (۷). در این تحقیق به بررسی فعالیت گوگردزدایی یک سویه باکتریایی بر روی تیوفن پرداخته شده است که به مقدار فراوانی در گازوئیل وجود دارد. در فرآیند گوگردزدایی هیدروژنی، مولکول تیوفن از طریق سیس- یا ترانس-۱- بوتن به بوتان و گاز سولفید هیدروژن تبدیل می‌شود (۳). تا به امروز، یک مکانیسمی که گوگرد را از تیوفن غیر استخلاف شده به طور انتخابی جدا کند مانند مسیر ۴S برای دی بنزوتیوفن شناسایی نشده است (۱۰).

مواد و روشها

مواد شیمیایی: تیوفن از شرکت مرک آلمان با درجه خلوص بالا خریداری شد. کیت استخراج DNA (DNP™ Kit) و کیت واکنش PCR از شرکت داخلی سیناژن تهیه شد. پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین توالی از شرکت تگ کپنهاگ دانمارک خریداری شد.

مشخصات باکتری: باکتری SEE-1 که از خاک آلوده به MTBE جداسازی شده بود مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری گرم منفی با تست کاتالاز و اکسیداز مثبت، فاقد اسپور و باسیل می‌باشد که کلنیهای این باکتری بر روی محیط کشت جامد آگار مغزی (نوترینت آگار) به رنگ زرد رنگ پریده، گرد و صاف دیده می‌شوند. کلنیهای تازه جداسازی شده این باکتری خشن و خشک با یک ظاهر

شیب دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و در نهایت افزایش دما تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۲ دقیقه می‌باشد. دمای محل تزریق و آشکارساز، ۲۰۰ و ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. از گاز هلیوم با سرعت جریان ۲ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. درصد تیوفن با استفاده از مساحت پیک حاصل از آشکارساز یونیزاسیون شعله ای (FID) محاسبه گردید (۱۲).

تاثیر عصاره آنزیمی فاقد سلول در حذف تیوفن: به منظور تهیه عصاره آنزیمی فاقد سلول، سلولهای رشد یافته در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی از انتهای فاز لگاریتمی توسط سانتریفیوژ (دور ۱۸۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری شدند، سلولها توسط بافر فسفات استریل (pH = ۷/۱) دو بار شستشو داده شدند و مجدداً در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی ۱۲/۴ میلی‌مولار تیوفن به منظور القای آنزیمهای درگیر در تجزیه آن سوسپانسیون گردیدند. پس از ۲ ساعت، سلولها با بافر فسفات شستشو داده شدند و مجدداً در همین بافر تا رسیدن OD_{۶۰۰} به ۲۰ به حالت سوسپانسیون تبدیل شدند. در مرحله بعد، سلولهای باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (dr.hielscher GmbH مدل VP 200H ساخت آلمان) ۱۰ بار بر روی یخ (هر بار ۱ دقیقه سونیکیت و ۳۰ ثانیه استراحت) شکسته شدند و عصاره آنزیمی پس از جداسازی اجساد خرد شده سلولی با سانتریفیوژ (دور ۱۰۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) به دست آمد (۴). مقدار پروتئین عصاره آنزیمی حاصل با استفاده از معرف برادفورد و منحنی استاندارد پروتئین، ۳۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید (۲). ۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۹ درصد کلرور سدیم حاوی ۱۲/۴ میلی‌مولار تیوفن اضافه گردید و پس از گذشت ۹۰ دقیقه، جذب UV تیوفن خوانده شد و با نمونه حاوی همین مقدار تیوفن بدون عصاره آنزیمی به عنوان کنترل مقایسه گردید.

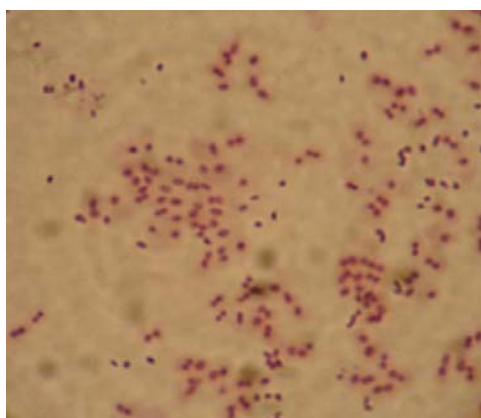
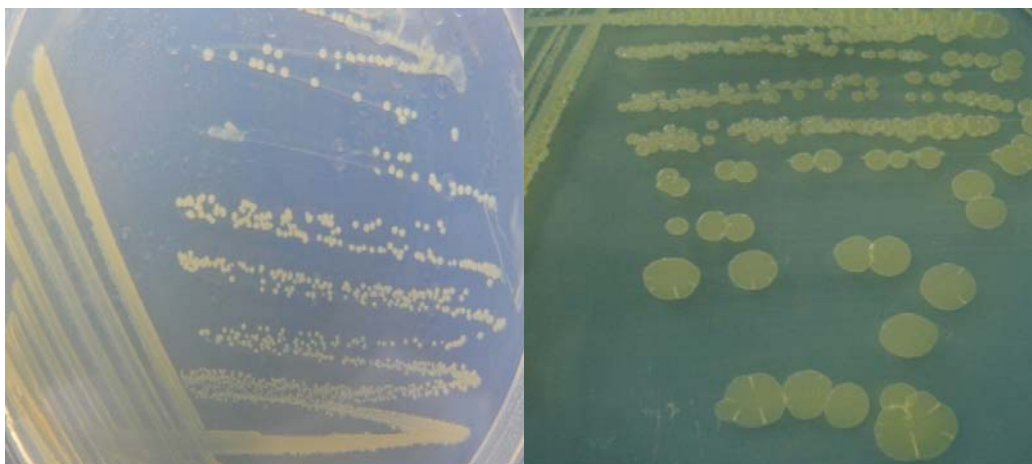
سلولها توسط محلول ۰/۹ درصد کلرور سدیم دو بار شستشو داده شدند و مجدداً همین محلول اضافه شد تا سوسپانسیون سلولی تشکیل گردد که چگالی سلولی آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۳۰ برسد (OD_{۶۰۰} = ۳۰) (۶).

سنجش تیوفن در فاز آبی با روش اسپکتروفتومتر UV: مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۹ درصد کلرور سدیم حاوی ۱۲/۴ میلی‌مولار تیوفن در لوله درب دار اضافه گردید و بر روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ساعت انتقال داده شد. به منظور اندازه‌گیری میزان گوگردزدایی، رقت‌های متفاوت تیوفن در محلول ۰/۹ درصد کلرور سدیم از غلظت ۱۲/۴ میلی‌مولار تیوفن آماده گردید و حداکثر جذب تیوفن در طول موج ۲۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV (مدل ۱۶۰A - UV شرکت شیمادزو ژاپن) اندازه‌گیری شد. معادله منحنی استاندارد تیوفن به صورت $y = ۳/۴۳۷x - ۰/۰۲۱$ ، $R^2 = ۰/۹۹۸$ با استفاده از نرم افزار Excel به دست آمد (y): جذب، x: مقدار تیوفن بر حسب میلی‌مولار).

سنجش تیوفن در فاز گازی با روش کروماتوگرافی گازی (GC): مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی تهیه شده به ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۹٪ کلرور سدیم حاوی ۶۲ میلی‌مولار تیوفن در شیشه درب دار با درب پلاستیکی اضافه گردید. پس از ۲۰ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه)، با سوراخ کردن درب پلاستیکی شیشه‌ها توسط سرنگ ۱ میلی‌لیتری، میزان ۲۰۰ میکرولیتر از هوای بالای سطح مایع جهت شناسایی تیوفن به دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent 6890N ساخت آمریکا) تزریق شد. ستون مورد استفاده HP-5 با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه دمایی نیز بدین ترتیب بود: دمای آون ۳۵ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما ۷ دقیقه، افزایش دما تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد با

بر روی شیکر (۱۶۰ دور در دقیقه)، سلولها با سانتریفیوژ (g) ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و میزان سولفات مایع رویی بر حسب میلی‌گرم در لیتر با روش کدورت سنجی در طول موج ۴۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). معادله منحنی استاندارد سولفات سدیم به منظور اندازه‌گیری میزان سولفات به صورت $y = 0.989x + 0.475$ با استفاده از نرم‌افزار Excel به دست آمد (y: جذب، x: غلظت سولفات بر حسب میلی‌گرم در لیتر).

انجام عمل گوگردزدایی زیستی سلولهای فعال بدون رشد در یک محیط نفتی: جمع‌آوری سلولها از انتهای فاز لگاریتمی و آماده‌سازی سوسپانسیون سلولی با OD_{600} برابر ۲۰ مطابق قسمت قبل انجام شد. میزان ۳ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون سلولی به یک ارلن شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (pH = 7/1) و ۲۵ میلی‌لیتر نفت خام به دست آمده از پالایشگاه اصفهان اضافه گردید. یک ارلن حاوی همین مقادیر از بافر فسفات و نفت خام بدون اضافه کردن باکتری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

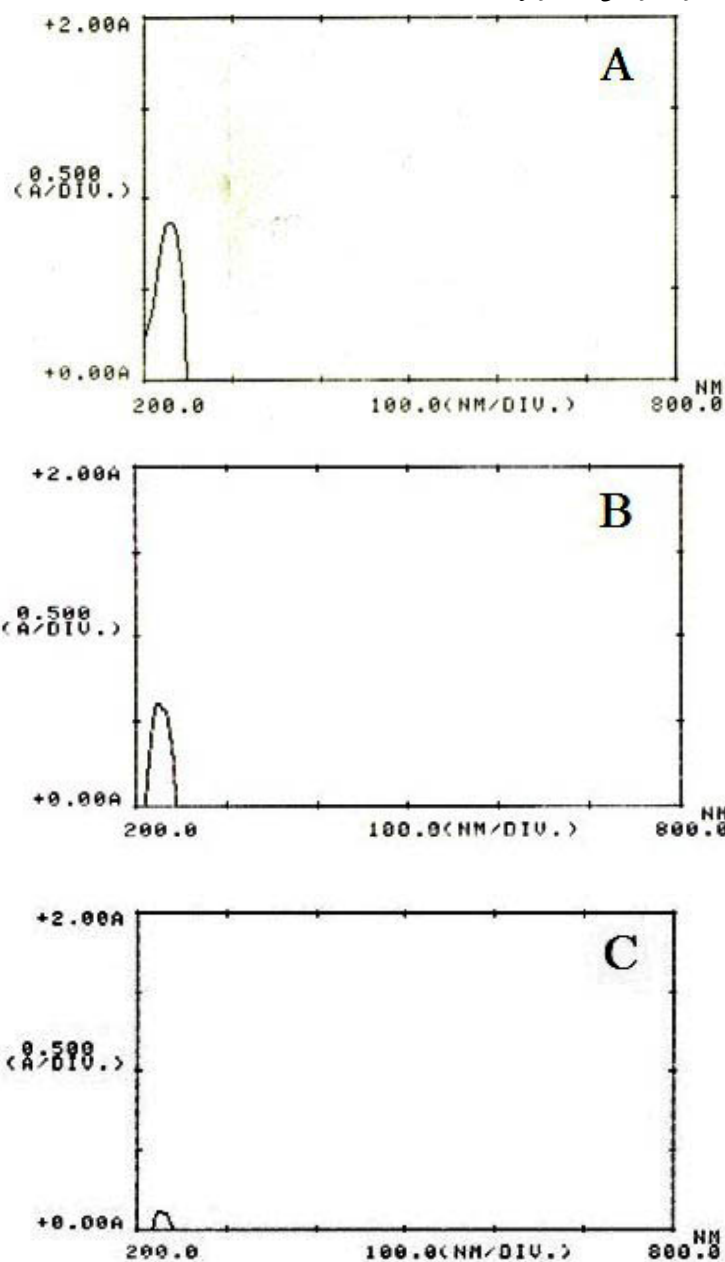


شکل ۱- تصویر کلنی باکتری SEE-1 بر روی محیط آگار مغذی (تصویر چپ مربوط به کلنیهای خشن با ظاهر چروکیده خاص، تصویر راست مربوط به کلنیهای صاف و گرد پس از پاساژهای مکرر) و سلول‌های آن در زیر میکروسکوپ

نتایج و بحث

دسترسی: Af063219.1) نشان می‌دهد. این باکتری پس از شناسایی، در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی HQ438282 به ثبت رسید. تصویر کلنیهای مربوط به این سویه در شکل (۱) نشان داده شده است.

شناسایی سویه مورد استفاده: نتایج به دست آمده نشان داد باکتری مورد استفاده در این تحقیق بیشترین شباهت (>99%) را با گونه *Sordomonas astotenzori* (شماره



شکل ۲- جذب UV تیوفن در طول موج ۲۳۰ نانومتر توسط سلولهای فعال بدون رشد باکتری پس از ۱۵ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد: (A) نمونه کنترل بدون باکتری با رقت ۱/۵۰ (B) نمونه حاوی باکتری با رقت ۱/۲، (C) نمونه حاوی باکتری با رقت ۱/۱۰. (محور افقی: طول موج بر حسب نانومتر، محور عمودی: میزان جذب UV)

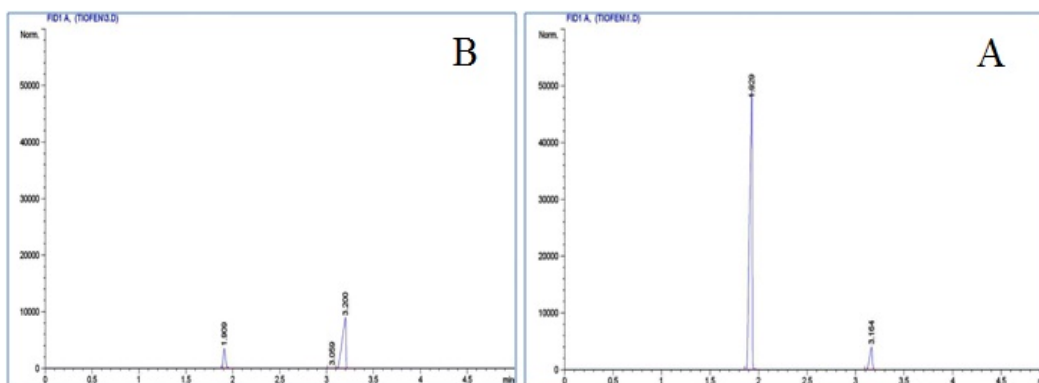
جدول ۱- درصد کاهش تیوفن با غلظت اولیه ۱۲/۴ میلی مولار توسط سلول‌های فعال بدون رشد (آزمایش برای هر نمونه با سه تکرار صورت گرفت که میانگین جذب آنها آورده شده است)

شماره	رقت	جذب در ۲۳۰ نانومتر	مقدار تیوفن باقیمانده (میلی مولار)	درصد کاهش تیوفن (%)
شکل ۲ قسمت B	۱/۲	۰/۵۴۷	۰/۳۳	٪ ۹۷/۴
شکل ۲ قسمت C	۱/۱۰	۰/۱۱۶	۰/۳۹	٪ ۹۶/۸
نمونه کنترل (قسمت A)	۱/۵۰	۰/۸۰۷	۱۲/۰۴	٪ ۲/۹۱

کنترل دو پیک اصلی را نشان می‌دهد، پیک در زمان بازداری ۱/۹ دقیقه که با توجه به کاهش این پیک در نمونه حاوی باکتری به عنوان پیک معرف تیوفن در نظر گرفته می‌شود. همچنین در نمونه کنترل پیک دومی در زمان بازداری ۳/۲ دقیقه مشاهده گردید که مربوط به وجود ناخالصی به همراه تیوفن می‌باشد. با توجه به اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی و ارتفاع پیک تیوفن در زمان بازداری ۱/۹ دقیقه، درصد کاهش تیوفن توسط این باکتری ۹۳/۸۲ درصد به دست آمد.

ارزیابی فعالیت باکتری بر روی تیوفن : از نمونه‌های حاوی سلول‌های فعال بدون رشد این باکتری پس از رسوب دادن توده سلولی، رقت‌های ۱/۲ و ۱/۱۰ از مایع رویی حاوی تیوفن آماده شد و از میزان جذب UV به دست آمده در طول موج ۲۳۰ نانومتر (شکل ۲) و استفاده از معادله خط منحنی استاندارد تیوفن، مقدار تیوفن به صورت جدول (۱) محاسبه گردید. کاهش جزئی درصد تیوفن در نمونه کنترل به دلیل ماهیت فرار بودن آن می‌باشد.

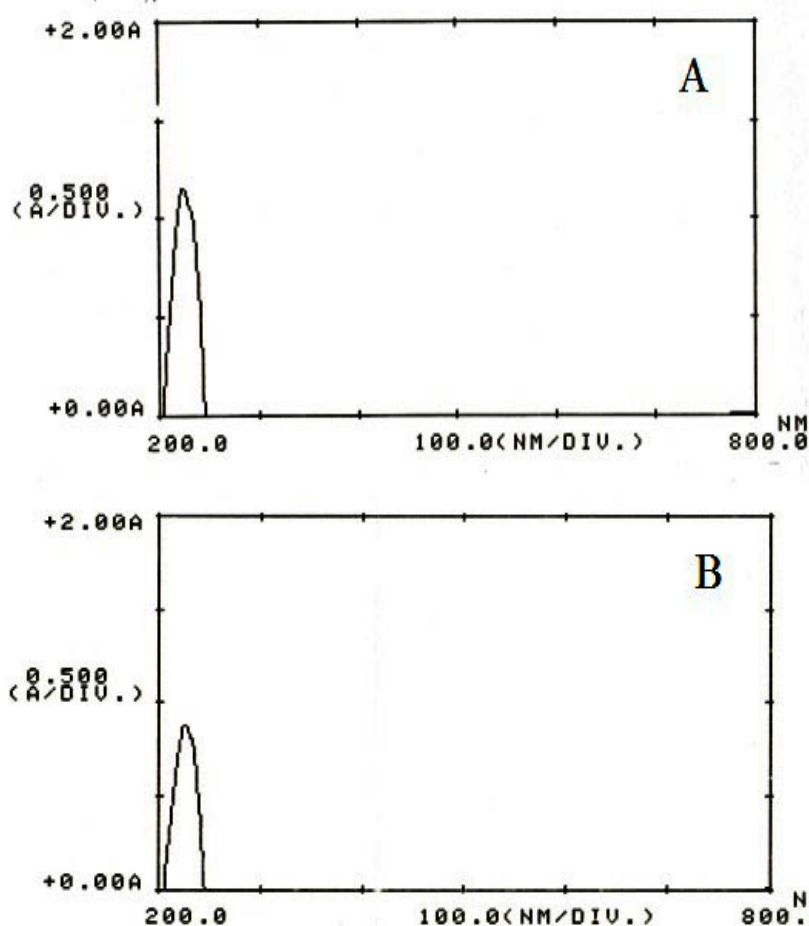
همچنین نمودارهای گاز کروماتوگرام حاصل از عملکرد گوگردزایی باکتری مورد استفاده بر روی تیوفن و همچنین نمونه کنترل حاوی تیوفن بدون باکتری در شکل (۳) نشان داده شده است. کروماتوگرام مربوط به نمونه



شکل ۳- نمودارهای GC نمونه کنترل و نمونه حاوی باکتری مورد مطالعه پس از ۲۰ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد: (A) نمونه کنترل حاوی تیوفن بدون باکتری، (B) نمونه حاوی باکتری. (محور افقی: زمان بازداری بر حسب دقیقه، محور عمودی: پیکوآمپر بر ثانیه)

آنزیمی استخراج شده از باکتری نسبت به نمونه کنترل نشان دهنده تجزیه آنزیمی تیوفن می‌باشد. با توجه به اطلاعات مربوط به جذب UV در طول موج ۲۳۰ نانومتر، درصد کاهش تیوفن توسط عصاره آنزیمی این باکتری ۲۸/۴۹ درصد به دست آمد.

استفاده از کاتالیزور آنزیمی برای حذف تیوفن: با تهیه رقت ۱/۵۰، جذب UV تیوفن نمونه حاوی ۱ میلی لیتر از عصاره آنزیمی باکتری و نمونه حاوی تیوفن بدون عصاره آنزیمی به عنوان کنترل به دست آمد (شکل ۴). کاهش جذب UV در طول موج ۲۳۰ نانومتر توسط عصاره



شکل ۴- تأثیر عصاره آنزیمی فاقد سلول در کاهش جذب UV تیوفن: (A) نمونه کنترل حاوی ۱۲/۴ میلی مولار تیوفن بدون عصاره آنزیمی با رقت ۱/۵۰، (B) نمونه حاوی عصاره آنزیمی باکتری و ۱۲/۴ میلی مولار تیوفن با رقت ۱/۵۰. (محور افقی: طول موج بر حسب نانومتر، محور عمودی: میزان جذب UV)

(۲)، میزان سولفات اندازه گیری شده در نمونه حاوی باکتری نسبت به نمونه کنترل بدون باکتری بیشتر است که نشان دهنده توانایی باکتری در آزاد کردن اتم گوگرد به شکل سولفات از ترکیبات گوگردی آلی موجود در نفت خام می‌باشد.

فعالیت گوگردزایی باکتری در محیط نفتی: پس از جدا کردن فاز آبی و نفت، از مایع رویی جهت تخمین فعالیت گوگردزایی از طریق اندازه گیری میزان سولفات با روش کدورت سنجی استفاده شد و با معادله به دست آمده از منحنی استاندارد سولفات سدیم، مقدار سولفات بر حسب میلی گرم در لیتر به دست آورده شد. با توجه به جدول

جدول ۲- نتایج حاصل از فعالیت گوگردزدایی باکتری در محیط حاوی نفت خام و میزان سولفات اندازه‌گیری شده بر حسب mg/l

نمونه	میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر	غلظت سولفات (mg/l)
ارلن کنترل بدون باکتری	۱/۰۶۱	۳۵۵/۱۵
ارلن حاوی باکتری	۱/۲۲۳	۴۵۳/۳۳

نتیجه‌گیری کلی

در اکثر مقالات موجود از دی بنزوتیوفن به عنوان ترکیب مدل برای مطالعات گوگردزدایی زیستی استفاده می‌شود و اکثر مطالعات بر روی تیوفن به بررسی رشد سویه‌های جداسازی شده بر روی تیوفن به عنوان تنها منبع گوگرد و اندازه‌گیری رشد سویه محدود می‌شود (۸ و ۱۱).

از ارزیابی نتیجه‌های به دست آمده چنین استنباط می‌شود که باکتری *Sudomonas stutzeri* شناسایی شده در این تحقیق توانایی اختصاصی بسیار مطلوبی در

منابع

- ۱- اعتمادی فر، ز.، امتیازی، گ.، نحوی، ا. ۱۳۸۷. بررسی رشد، تنفس و تشکیل بیوفیلم در مخمر *Trichosporon sp.* مصرف کننده
- ۲- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical biochemistry*. 72, 248-254.
- ۳- Brunet, S., Mey, D., Perot, G., Bouchy, C., and Diehl, F. 2005. On the hydrodesulfurization of FCC gasoline: a review. *Applied catalysis A: General*. 278, 143-172.
- ۴- Emtiazi, G. Harirchi, S. and Soroush Noghabi, M. 2008. The Effect of grown cell and cell free extract of *Rhodococcus sp.* and *Paenibacillus sp.* on dimethyl disulfide (DMDS) and diethyl disulfide (DEDS) removal. *World Applied Sciences Journal*. 5, 499-506.
- ۵- Etemadifar, Z. Emtiazi, G. and Christofi, N. 2008. Enhanced desulfurization activity in protoplast transformed *Rhodococcus erythropolis*. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental science*. 3, 795-801.
- ۶- Etemadifar, Z. Emtiazi, G. and Peimanfar, S. 2006. Removal of dibenzothiophene, biphenyl and phenol from waste by *Trichosporon sp.* *Scientific Research and Essay*. 1, 72-76.
- ۷- Lalucat, J., Bannasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E. and Palleroni, N. J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 70, 510.
- ۸- Mohebbali, G. and Ball, A. S. 2008. Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology*. 154, 2169.
- ۹- Monticello, D. J. 2000. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current opinion in biotechnology*. 11, 540-546.
- ۱۰- Prayuenyong, P. 2002. Coal biodesulfurization processes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 24, 493-507.
- ۱۱- Soleimani, M., Bassi, A. and Margaritis, A. 2007. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology advances*. 25, 570-596.
- ۱۲- Wu, Z. and Ondruschka, B. 2006. Aquasonolysis of thiophene and its derivatives. *Ultrasonics sonochemistry*. 13, 86-91.

گوگردزدایی از ترکیب تیوفن دارد. بدیهی است به منظور شناسایی متابولیت‌های حدواسط و مسیر متابولیکی تجزیه تیوفن نیاز به مطالعات بیشتر با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی - اسپکتروفتومتری جرمی (GC-MS) می‌باشد.

سپاسگزاری: نگارندگان بدین وسیله از همکاری گروه زیست‌شناسی به ویژه بخش میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان که در اجرای این طرح کمک نمودند قدردانی می‌نمایند.

دی بنزوتیوفن با روش میکروتیترو پلیت. *مجله زیست‌شناسی ایران*. ج ۲۱ (۵): ص ۸۹۹-۸۹۱.

13- 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA-AWWA-WPCF.

Desulfurization of thiophene by *Pseudomonas stutzeri* SEE-1

Shirsalimian M.S., Etemadifar Z. and Emtiazi G.

Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Desulfurization of thiophenic compounds is one of the important issues in refineries and environmental pollutions control. A bacterium was isolated from MTBE enriched soil was able to desulfurize of the thiophene. It was identified as *Pseudomonas stutzeri* based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence. Desulfurization reactions from thiophene as the model of thiophenic compounds in aqueous phase by resting cells of this strain carried out and the concentration of thiophene was determined by UV-visible spectrophotometer in 230 nm wavelength. The results showed that the reduction of thiophene was 95% (from 12.4 mM to 0.3 mM) after 15 hours. Gas chromatography analysis showed the same results of thiophene desulfurization. Furthermore, The desulfurization activity of resting cells in a biphasic system containing crude oil by determination of released sulfate content turbidimetrically with BaCl₂ was investigated.

Key words: Biodesulfurization, Thiophene, Resting cell, Crude oil, *Pseudomonas stutzeri*