

جداسازی باکتری بومی گرمادوست *Bacillus thermoamylovorans* گوگردزدا و بهینه‌سازی محیط کشت

نرگس اعتمادی^۱، عباس اخوان‌سپهی^{۱*}، قاسمعلی محبعلی^۲ و فاطمه یزدیان^۳

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشکده محیط زیست، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

۳- گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۸

چکیده

فرایند گوگردزدایی زیستی برای حذف گوگرد از سوخت‌های فسیلی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. هدف این پروژه جداسازی میکروارگانیسم گرمادوست دارای فعالیت گوگردزدایی زیستی از دی بنزوتیوفن به عنوان تنها منبع گوگرد و بررسی شرایط بهینه محیط کشت رشد و فعالیت گوگردزدایی می‌باشد. به منظور بررسی رشد سلولی و فعالیت گوگردزدایی زیستی میکروارگانیسم از محیط کشت پایه معدنی حاوی دی بنزوتیوفن استفاده گردید. برای بهینه‌سازی محیط کشت، منابع مختلف کربن و نیتروژن و همچنین غلظت‌های مختلف منبع گوگردی استفاده شدند. یافته‌های پژوهش نشان می‌دهند که بیشترین میزان رشد سلولی پس از ۹۶ h گرماگذاری به‌دست می‌آید. نتایج گیبس نشان می‌دهد که میکروارگانیسم، گوگرد موجود در دی بنزوتیوفن را از طریق مسیر 4s حذف می‌کند، ۲- هیدروکسی بی‌فنیل به عنوان محصول انتهایی فرایند گوگردزدایی زیستی در ۷۲ h بیشترین مقدار (۲۶/۱ mg/L) بود. نتایج پژوهش نشان داده است که سوبیه ترموفیل جدا شده دارای توانایی حذف گوگرد از دی بنزوتیوفن می‌باشد و امکان ارتقای این فرایند با بهینه‌سازی محیط کشت وجود دارد.

کلمات کلیدی: گوگردزدایی زیستی، باکتری گرمادوست، دی بنزوتیوفن، رشد سلولی، بهینه‌سازی.

مقدمه

می‌شوند، محدودیت‌هایی را در زمینه مصرف این مواد ایجاد کرده‌اند [۱]. همه سوخت‌های فسیلی حاوی ترکیبات آلی گوگرددار می‌باشند که در اثر احتراق آن‌ها اکسیدهای گوگردی به فضا انتشار می‌یابند [۲] که اثرات زیانباری را بر سلامت و محیط زیست دارد. دی اکسید گوگردی (SO₂) در

نفت خام یکی از منابع مهم تولید انرژی است. حضور آلاینده‌های مختلف که در مراحل پالایش و احتراق سوخت‌های حاصل از نفت خام ایجاد

*مسئول مکاتبات

آدرس الکترونیکی: A_akhavan@iau-tnb.ac.ir
شناسه دیجیتال: (DOI: 10.22078/pr.2019.3557.2659)

[۳]. همچنین اغلب میکروارگانیسم‌های گوگردزدا مزوفیل می‌باشند که شرایط دمایی ملایم را برای فرآیند گوگردزایی زیستی فراهم می‌نمایند [۲]. در سال ۱۹۹۰، کیلبان میکروارگانیسم *Rhodococcus erythropolis IGTS8* را به عنوان اولین میکروارگانیسم گوگردزدا (که مسیر 4S را طی می‌کند) معرفی نمود که توانایی حذف گوگرد و تولید محصول عاری از گوگرد به عنوان محصول نهایی و بدون آسیب به ساختمان دی‌بنزوتیوفن را دارد [۲]. در ایران نیز سوبه‌هایی از جمله *Gordonia RIPI* [۳] توسط گروه بیوتکنولوژی پژوهشگاه صنعت نفت ایران جداسازی و شناسایی شده است که قادر به حذف اختصاصی گوگرد از دی بنزوتیوفن می‌باشد.

در مواقعی که گوگردزایی زیستی برای خروجی واحدهای HDS جهت حذف بیشتر گوگرد طراحی می‌شود، انجام فرایند گوگردزایی زیستی مستلزم سرد نمودن خروجی و صرف هزینه سنگین می‌باشد. بنابراین به منظور رفع این مانع استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که قادر به فعالیت در دمای بالا هستند، ارجحیت دارد [۶]. آنزیم‌هایی که به وسیله این میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند بشدت در برابر حرارت پایدار بوده و معمولاً در برابر دنا توره کننده‌های شیمیایی از قبیل دترجنت‌ها، حلال‌های آلی و شرایط سخت از نظر pH مقاوم هستند [۷]. [۶]. تا به حال تلاش‌های زیادی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست گوگردزدا انجام شده است. میکروارگانیسم *Sulfolobus acidocaldarius* قادر به انجام فرایند گوگردزایی و اکسیداسیون DBT در دمای ۷۰ °C می‌باشد [۸]. با توجه به مزیت‌های استفاده از میکروارگانیسم‌های ترموفیل در این زمینه می‌توان با نمونه‌برداری و جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی از محیط‌های آلوده و منابع نفتی کشور پیشرفت چشمگیری در فرایند گوگردزایی زیستی صورت گیرد.

در این پژوهش سعی شده که میکروارگانیسم ترموفیل دارای

اتم‌سفر نزدیک سطح زمین فراوان است و می‌تواند عامل تشکیل ذرات آئروسول سولفات باشد و باعث ایجاد بیماری‌های تنفسی شوند [۳].

حضور گوگرد در سوخت‌های فسیلی منجر به آلودگی محیط زیست و ایجاد باران‌های اسیدی، خوردگی در ادوات و تجهیزات پالایش، خرابی زودرس موتورهای مولد انرژی و غیر فعال ساختن کاتالیست‌های فلزی و کاهش ارزش حرارتی می‌شود. همچنین باران‌های اسیدی موجب حل شدن مواد ساختمانی، سمی شدن دریاچه‌ها و از بین رفتن جنگل‌ها می‌شود [۴]. درصد بیشتری از ترکیبات گوگردی نفت خام به شکل ترکیبات آلی هستند (تیول‌ها، تیواترها و ترکیبات تیوفنی حلقوی هتروسیکلیک مانند تیوفن، بنزوتیوفن، دی بنزوتیوفن و مشتقات آلکیل‌ها) [۵].

روش‌های مختلفی برای حذف گوگرد از نفت خام وجود دارد که متداول‌ترین روش گوگردزایی با هیدروژن (HDS) است. این روش در صنعت به کار می‌رود و فرآیندی کاتالیستی می‌باشد که طی آن ترکیبات آلی گوگرددار به سولفید هیدروژن تحت شرایط عملیاتی (دما و فشار) بالا تبدیل می‌شوند [۶]. فرآیند گوگردزایی با هیدروژن به دلیل فشار و دمای بالا از هزینه‌های زیادی برخوردار است. همچنین به علت مقاومت بالای ترکیبات تیوفنی و هتروسیکلیک آروماتیک گوگرددار به روش گوگردزایی با هیدروژن، تولید مواد سمی جانبی و کاهش ارزش حرارتی سوخت، فناوری‌های نوین گوگردزایی به عنوان فرآیندهای مکمل و یا جایگزین آن ابداع شده‌اند. گوگردزایی زیستی یکی از این روش‌هاست [۷]. در پژوهش‌های انجام شده برای توسعه گوگردزایی زیستی از بنزوتیوفن به عنوان ترکیب مدل استفاده می‌شود [۷ و ۵].

انواع متعددی از میکروارگانیسم‌ها برای متابولیسم ترکیبات گوگردی از جمله: میکروارگانیسم‌های گرم مثبت، گرم منفی و مخمرها پیشنهاد شده است

دی بنزوتیوفن^۱ (۰/۹۹)، معرفر گیبس (۰/۲) دی کلروکینون ۴- (کلروایمید)، ۲- هیدروکسی بای فیل، دی متیل فرمامید (۰/۹۹) [۳].

محیط‌های کشت

میکروارگانسیم در این پژوهش جداسازی گردید. به منظور مطالعه و بررسی میزان فعالیت گوگردزایی میکروارگانسیم از محیط کشت معدنی پایه (BSM)^۲ استفاده شد. این محیط در دو قسمت مجزا تهیه و جداگانه استریل شد. جزء اول این محیط کشت حاوی (g/l): (۶) KH_2PO_4 ، (۴) Na_2HPO_4 ، (۱/۲) NH_4Cl ، (۲) بنزوات سدیم و جزء دوم محیط کشت حاوی (۰/۷۵) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، (۰/۰۴) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، (۰/۰۱) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، (۰/۰۱) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ با pH نهایی حدود ۷/۳ می‌باشد. DBT در دی متیل فرمامید حل شده و به‌عنوان تنها منبع گوگرد به BSM اضافه گردید [۹]. همه کشت‌های میکروبی در فلاسک و در دمای 55°C و 150 rpm گرم‌گذاری شدند. محیط نوترینت آگار غنی شده^۳ حاوی عصاره مخمر 2 g/L ، تریپتون 4 g/L و غلظت آگار 20 g/L برای خالص‌سازی و جداسازی استفاده شد.

نمونه برداری و غنی‌سازی و جداسازی میکروارگانسیم گوگردزدا از ترکیب مدل

تجربه‌های قبلی در زمینه جداسازی میکروارگانسیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی و مولد بیوسورفکتانت نشان می‌دهد که نمونه‌های مناطق آلوده به ترکیبات نفتی می‌توانند منابع مناسبی جهت جداسازی این میکروارگانسیم‌ها باشند [۱۰]. برای انجام این پروژه از ۴۰ ناحیه مختلف نمونه‌برداری انجام شد. اکثر مناطق نمونه‌برداری شده دارای سابقه آلودگی طولانی مدت به لجن‌های نفتی بودند. در این مناطق برای مدت‌های طولانی لجن‌های نفتی در بشکه‌هایی جمع‌آوری شده بودند. جهت نمونه‌برداری از ظروف شیشه‌ای درب‌دار و

توانایی فعالیت گوگردزایی به صورت بومی از مناطق جنوبی و آلوده به نفت کشور پس از انجام مراحل غنی‌سازی و غربالگری جداسازی گردید. پس از وارد نمودن توالی ژن 16S rRNA سویه جدا شده در سایت NCBI مشخص گردید که سویه منتخب با ۹۷٪ قرابت به سویه *Bacillus thermoamylovorans* با شماره NR117028.1 شباهت دارد. سویه جداسازی شده به نام EAMYO نام‌گذاری شد. شرایط بهینه رشد و فعالیت گوگردزایی به منظور ارتقای فرایند گوگردزایی سویه جدا شده بررسی گردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده و مقایسه آن با کارهای انجام شده در زمینه گوگردزایی، می‌توان اظهار داشت که باکتری *Bacillus thermoamylovorans* سویه EAMYO از توانایی مناسب برای حذف گوگرد از دی‌بنزوتیوفن برخوردار است. این باکتری طی رشد خود در دمای 55°C ، دی‌بنزوتیوفن را مصرف نموده و ترکیب‌های هیدروکسیل‌دار را تولید و در محیط متراکم می‌سازد. میکروارگانسیم مذکور از طریق مسیر 4s و به طور هوازی ترکیب گوگردی دی‌بنزوتیوفن را به ۲-هیدروکسی بی‌فنیل تبدیل می‌نماید. نتایج نشان داد که این سویه در ۹۶ h بیشترین رشد ($\text{OD}_{660} = 1$) را در دمای 55°C و pH ۷/۳ داشته و در ۷۲ h بیشترین فعالیت گوگردزایی زیستی را دارد و میزان تولید 2-HBP در ۷۲ h برای سویه EAMYO طبق منحنی استاندارد گیبس $26/1\text{ mg/L}$ به‌دست آمد.

مواد و روش

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. این مواد عبارتند از: فسفات پتاسیم (KH- PO_4)، فسفات سدیم (Na_2HPO_4)، کلرید منیزیم ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)، کلرید منگنز ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)، کلرید کلسیم ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)، کلرید آهن ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)،

1. Dibenzothiophene (DBT)

2. Basal Salt Medium

3. Enrichment Nutrient Agar

۲۴ h انجام شد. میزان رشد میکروارگانیسم‌ها از طریق میزان جذب نوری در ۶۶۰ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway, UV-visible) اندازه‌گیری شد و سویه‌های دارای رشد به منظور بررسی فعالیت گوگردزایی انتخاب شدند. فعالیت گوگردزایی و میزان ترکیبات فنولیک از طریق تست گییس تعیین گردید. به این ترتیب که ابتدا μL ۱۰۰ از معرف تازه گییس (g/۱ معرف در ۱۰ mL اتانول مطلق) با ۵ mL از سوسپانسیون میکروبی مخلوط می‌شود. محلول حاصل به مدت ۳۰ min در دمای 30°C گرماگذاری می‌شود. سپس جذب نوری آن به همراه نمونه شاهد، بعد از گذشت ۱ hr در طول موج ۶۱۰ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway, UV-visible) اندازه‌گیری می‌شود.

بررسی منحنی رشد و فعالیت گوگردزایی زیستی سویه منتخب

از کلنی خالص در محیط نوترینت برات کشت ۴۸ h تهیه می‌گردد. به منظور مطالعه و بررسی رشد و میزان فعالیت گوگردزایی زیستی میکروارگانیسم‌ها از محیط کشت BSM استفاده گردید. میزان جذب نوری^۱ کشت سویه منتخب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. از مایه تلقیح به ارلن‌های حاوی محیط پایه معدنی منتقل گردید. DBT با غلظت ۱۰۰ g/L (ppm) اضافه گردید. محیط‌های کشت در دمای 55°C و ۱۵۰ rpm و یک ارلن شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. نمونه‌گیری با فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۴۴ h انجام گردید. میزان رشد سویه از طریق میزان جذب نوری در ۶۶۰ nm با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید و همزمان اندازه‌گیری تست گییس در طول موج ۶۱۰ nm بر روی نمونه‌ها به منظور بررسی فعالیت گوگردزایی سویه در زمان‌های مختلف انجام گردید.

کیسه‌های نایلونی زیپ‌دار استفاده گردید. مقدار ۱۰ mL از نمونه‌های مایع و ۵ g از نمونه‌های جامد به‌طور جداگانه در فلاسک‌های حاوی محیط BSM حاوی ۵۰ ppm دی بنزوتیوفن کشت داده شدند. به منظور جلوگیری از رسوب و کدورت در محیط، این محیط در دو قسمت مجزا تهیه و جداگانه استریل گردید. پس از اتوکلاو شدن دو قسمت محیط کشت به صورت استریل به یکدیگر اضافه شده و DBT به عنوان تنها منبع گوگردی در غلظت ۵۰ ppm اضافه گردید. به منظور جلوگیری از شوک حرارتی، انکوباسیون کشت نمونه‌ها در طی ۷ روز با دور ۱۵۰ rpm به ترتیب در دمای ۳۰، ۴۵، 55°C به مدت ۲۴، ۴۸، ۹۶ hr انجام گرفت.

نمونه‌هایی که در جداسازی‌های اولیه در محیط پایه معدنی به همراه DBT رشد نسبتاً خوبی از خود نشان داده بودند، در پلیت حاوی نوترینت آگار غنی شده به روش پور پلیت انجام گرفت، سپس پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای 55°C گرماگذاری شدند. در طی این مدت هر ۲۴ h رشد کلنی‌ها بررسی شده و تک کلنی‌های به‌دست آمده، مجدداً بر روی پلیت دیگر به روش کشت خطی کشت داده شدند. خالص‌سازی کلنی‌ها بر اساس اختلاف ریخت‌شناسی انجام گردید. تجدید کشت تا زمان اطمینان از خالص بودن سویه‌ها انجام شد.

انتخاب سویه‌های دارای قابلیت رشد

بعد از خالص‌سازی پلیت‌های کشت، هر سویه به تنهایی در محیط کشت BSM کشت داده شد. سوسپانسیون با کدورت نیم مک فارلند از هر یک از سویه‌ها تهیه گردید و به فلاسک حاوی محیط BSM تلقیح شد. DBT با غلظت نهایی ۵۰ ppm اضافه گردید. محیط‌های کشت در دمای 55°C و ۱۵۰ rpm و همراه فلاسک شاهد بدون سلول انکوبه شدند. نمونه‌گیری با فاصله زمانی

1. Optical Density (OD)

می‌باشد. DBT با غلظت ۱۰۰ mg/L (ppm) اضافه گردید. محیط‌های کشت در دمای ۵۵ °C و ۱۵۰ rpm و یک ارلن شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. میزان رشد سویه و فعالیت گوگردزدائی در زمان‌های مختلف با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین غلظت منبع گوگردی برای رشد سلولی و فعالیت گوگردزدائی

از کشت ۴۸ hr به محیط کشت پایه معدنی برای بهینه‌سازی منبع گوگرد تلقیح می‌شود. در هر آزمایش غلظت ترکیب گوگردی (دی بنزوتیوفن) افزوده شده به محیط کشت تغییر یافت. DBT با غلظت‌های ۷۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰ mg/L (ppm) اضافه گردید. محیط‌های کشت در دمای ۵۵ °C و ۱۵۰ rpm و یک ارلن شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. میزان رشد سویه و فعالیت گوگردزدائی در زمان‌های مختلف با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

بحث و نتایج

جداسازی سویه گوگردزدای ترموفیل

میکروارگانیسم‌ها برای رشد و فعالیت‌های بیولوژیکی به گوگرد نیاز دارند. میکروارگانیسم‌ها بر حسب آنزیم‌ها و مسیرهای متابولیکی توانایی فراهم کردن گوگرد از منابع مختلف را دارا می‌باشند. باکتری *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 دارای فعالیت گوگردزدایی اختصاصی از دی‌بنزوتیوفن به عنوان یک مولکول مدل می‌باشد. از ۴۰ مورد نمونه‌برداری و طی روش‌های غنی‌سازی و غربالگری، چندین سویه با توانایی گوگردزدایی از DBT جدا شدند. به دلیل سرعت رشد و توانایی گوگردزدایی بالاتر، سویه EAMYO برای ادامه پژوهش انتخاب گردید. این سویه قادر به رشد و فعالیت گوگردزدایی در دمای ۵۵ °C می‌باشد. این سویه ترموفیل جداسازی شده قادر است ۲۶/۱، ۲- هیدروکسی بای فنیل در طی ۷۲ h گرماگذاری تولید کند.

تعیین خصوصیات و شناسایی سویه منتخب

خصوصیات ظاهری کلنی اعم از سطح کلنی، قوام، رنگ، حاشیه و اندازه کلنی و خصوصیات میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. از تست‌های تشخیص بیوشیمیایی (کاتالاز، اکسیداز، سیترات، و تخمیر قندها) برای شناسایی نوع میکروارگانیسم جدا شده استفاده شد. استخراج DNA و توالی‌یابی ژن 16S rRNA جهت شناسایی ژنتیکی سویه و تشخیص گونه میکروبی انجام گرفت.

بهینه‌سازی محیط کشت

به منظور بهبود رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه مناسب‌ترین منبع کربن، نیتروژن تعیین گردید. همچنین اثر غلظت‌های مختلف منبع گوگرد در رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه بررسی گردید.

تعیین منبع کربن برای رشد و فعالیت گوگردزدائی سلول

مایه تلقیح از کشت ۴۸ hr به محیط کشت پایه معدنی اضافه گردید. در هر آزمایش ترکیب کربنی محیط را تغییر داده شد. ترکیبات کربنی مورد استفاده شامل گلوکز، اتانل، گلیسرول و بنزوات سدیم می‌باشد. DBT با غلظت ۱۰۰ mg/L (ppm) اضافه گردید. محیط‌های کشت در دمای ۵۵ °C و ۱۵۰ rpm و یک ارلن شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. میزان رشد سویه و فعالیت گوگردزدائی در زمان‌های مختلف با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین منبع معدنی نیتروژن برای رشد و فعالیت گوگردزدائی سلول

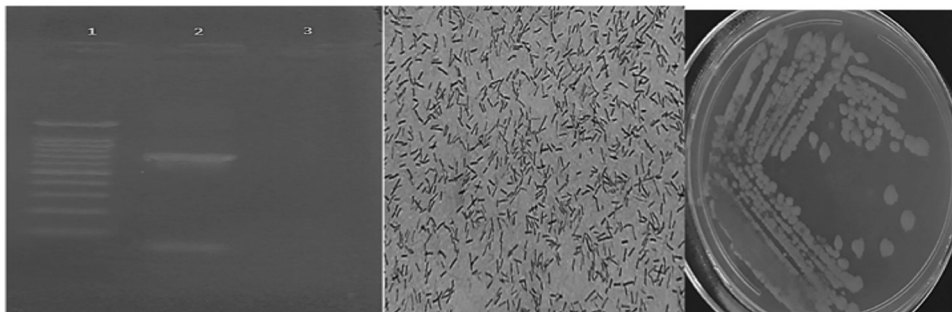
از کشت ۴۸ h به محیط کشت پایه معدنی تلقیح می‌شود. در هر آزمایش ترکیب نیتروژنی محیط را تغییر یافت. ترکیبات نیتروژنی مورد استفاده شامل کلرید آمونیوم، نیترات سدیم، نیترات آمونیوم

توالی یابی 16S rRNA و آنالیز فیلوژنتیک

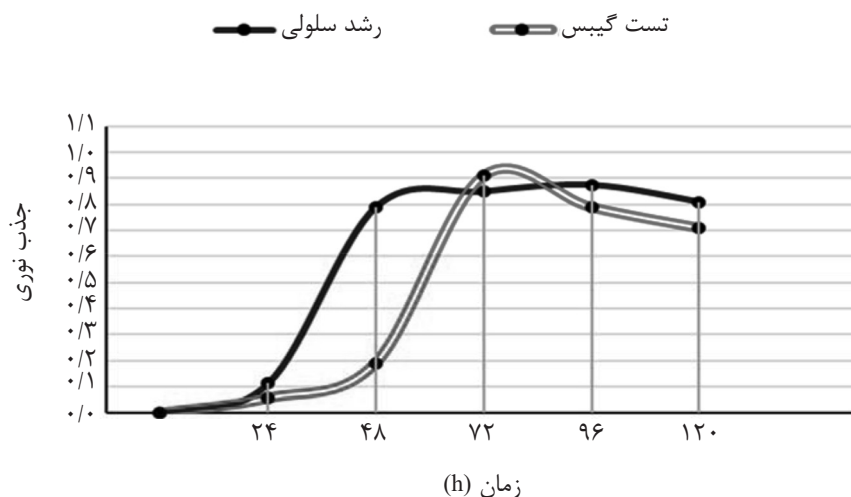
سویه منتخب دارای کلنی کرم رنگ و لزج با اندازه متوسط و در رنگ آمیزی گرم به رنگ بنفش و به شکل باسیل های متراکم دارای اسپور، هوازی، غیر متحرک، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بود (شکل ۱). خصوصیات شکلی و بیوشیمیایی مشخص کرد که سویه متعلق به گونه باسیلوس می باشد. پس از استخراج PCR، DNA با پرایمرهای عمومی انجام گرفت. نتیجه الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۱ آورده شده است. به وسیله توالی یابی ژن 16S rRNA و انجام Nucleotide blast توالی ژن 16S rRNA در سایت NCBI میکروارگانیسم جداسازی شده با ۹۷٪ قرابت *Bacillus thermoamylovorans* با شماره NR117028.1 تعیین گردید. سویه جداسازی شده به نام EAMYO نام گذاری شد.

منحنی رشد و فعالیت گوگردزایی سویه منتخب در محیط مدل

شکل ۲ میزان رشد سویه EAMYO در محیط مدل



شکل ۱ کلنی های خالص، رنگ آمیزی گرم و باندهای مربوط به محصول PCR ژن 16S rRNA سویه EAMYO



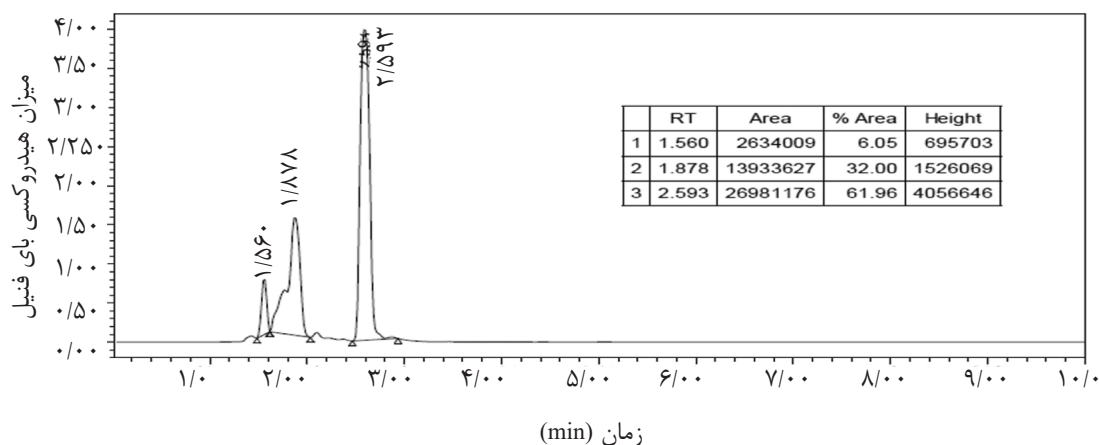
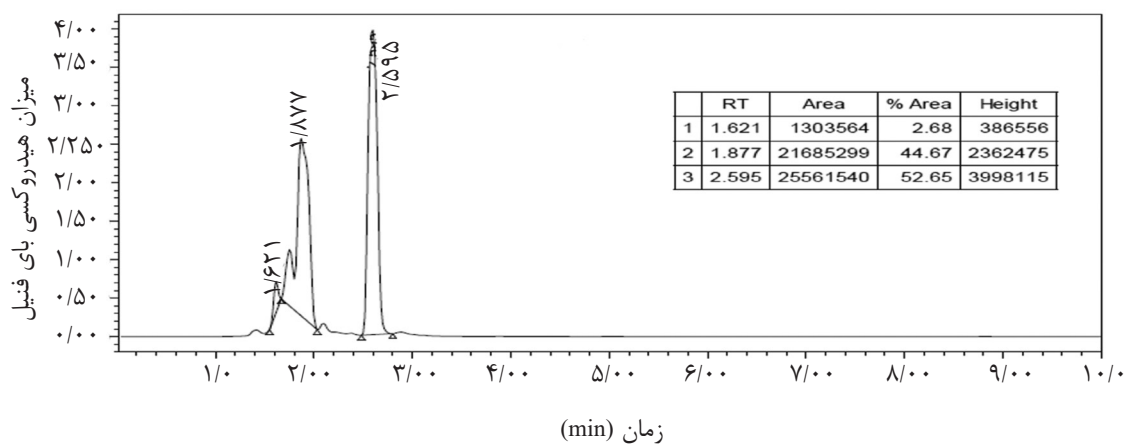
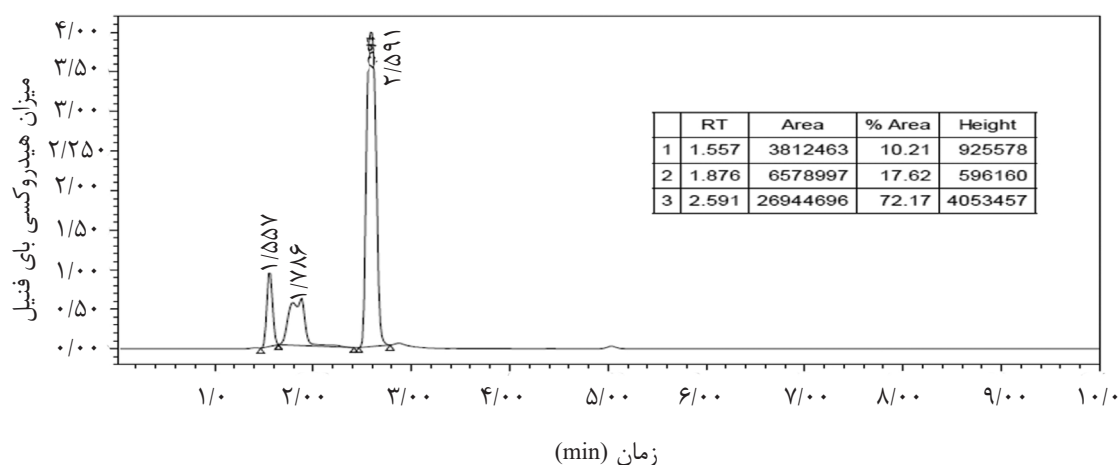
شکل ۲ سرعت رشد و فعالیت گوگردزایی سویه EAMYO در زمان های مختلف در دمای ۵۵ °C (به ترتیب OD₆₁₀ و OD₆₀₀)

BSM با غلظت نهایی (100 mg/L) DBT به عنوان تنها منبع گوگرد را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، سویه پس از طی مرحله تاخیر وارد مرحله رشد لگاریتمی می شود و در طی ۹۶ h گرماگذاری بیشترین میزان رشد را دارد.

در شکل ۲ میزان تولید 2-HBP توسط سویه در طول دوره رشد نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود میزان فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم و میزان تولید 2-HBP، متناسب با رشد میکروارگانیسم است. زیرا میزان تولید 2-HBP در مرحله تاخیر باکتری به میزان خیلی کم می باشد و در مرحله لگاریتمی رشد، میزان تولید 2-HBP بسیار افزایش می یابد. بیشترین میزان تولید در طی ۷۲ h گرماگذاری به دست آمد. پس از آن مقدار 2-HBP کاهش می یابد. فعالیت گوگردزایی سویه EAMYO پس از ۲۴ h افزایش می یابد.

میکروارگانسیم پس از ۷۲ h به دلیل تجمع 2-HBP کاهش می‌یابد. میزان تولید 2-HBP در ۷۲ h برای سویه EAMYO طبق منحنی استاندارد گیسیس، $26/1 \text{ mg l}^{-1}$ به دست آمد. نتایج حاصل از HPLC (ستون C-۱۸ nucleusil-۱۰۰ به اندازه $4/6 \times 60 \text{ mm}$) نیز بیانگر کاهش فعالیت گوگردزدایی در طی ۹۶ h گرماگذاری می‌باشد (شکل ۳).

در نهایت نتایج گیسیس نشان می‌دهد که میکروارگانسیم گوگرد موجود در DBT را از طریق مسیر 4S حذف می‌کند. گزارش شده است که 2-HBP برای میکروارگانسیم سمی است و تجمع آن در محیط کشت به عنوان محصول گوگردزدایی اثر مهاری بر رشد میکروارگانسیم و احتمالاً بر میزان فعالیت گوگردزدایی دارد [۱۰]. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که فعالیت گوگردزدایی



شکل ۳ کروماتوگرام HPLC (الف) کنترل مثبت (20 mg l^{-1} ، 2-HBP)، (ب) تولید ۲-هیدروکسی بای فنیل توسط سویه EAMYO بعد از ۷۲ h، (ج) تولید ۲-هیدروکسی بای فنیل توسط سویه EAMYO بعد از ۹۶ h گرماگذاری.

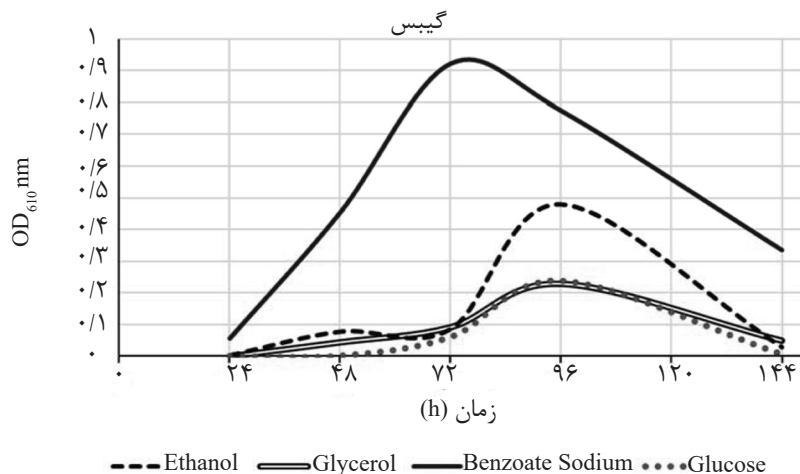
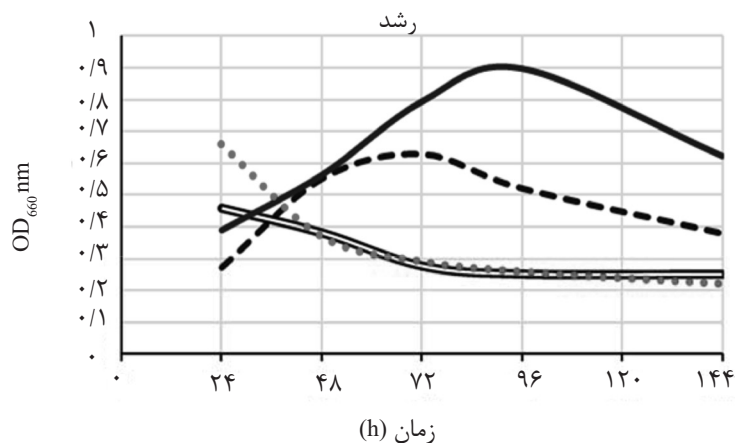
بهینه‌سازی محیط کشت

منبع کربن مناسب برای رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه

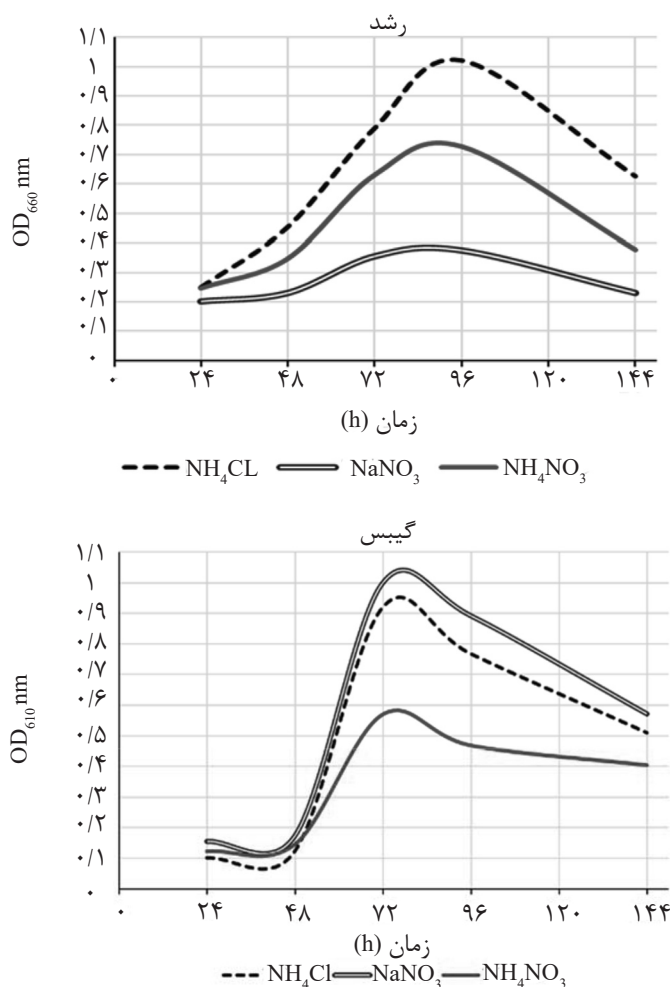
میزان رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه با تغییر ترکیبات کربنی بررسی شد و طبق نتایج به‌دست آمده بنزوات سدیم مناسب‌ترین منبع کربن برای سویه مورد نظر می‌باشد. استفاده از این منبع کربنی باعث افزایش رشد و افزایش فعالیت گوگردزدایی سویه گردید. نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. استفاده از اتانول، گلوکز و گلیسرول به عنوان منبع کربن در رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه EAMYO موثر نبوده‌اند.

منبع نیتروژن مناسب برای رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه

میزان رشد سویه با تغییر ترکیبات نیتروژنی بررسی شد و طبق نتایج به‌دست آمده کلرید آمونیوم مناسب‌ترین منبع نیتروژنی برای رشد سویه مورد نظر می‌باشد. با مشاهده نتایج در شکل ۵ (الف)، استفاده از این منبع نیتروژنی در رشد سویه موثر بوده و باعث افزایش رشد سویه گردیده است. در بررسی میزان فعالیت گوگردزدایی، مناسب‌ترین منبع نیتروژنی با توجه به نتایج در شکل ۵ (ب)، نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن مناسب در فرایند گوگردزدایی سویه EAMYO انتخاب گردید.



شکل ۴ رشد سلولی و فعالیت گوگردزدایی سویه EAMYO در محیط کشت حاوی منابع کربنی مختلف



شکل ۵ رشد سلولی و فعالیت گوگردزایی سویه EAMYO در محیط کشت حاوی منابع نیتروژنی مختلف

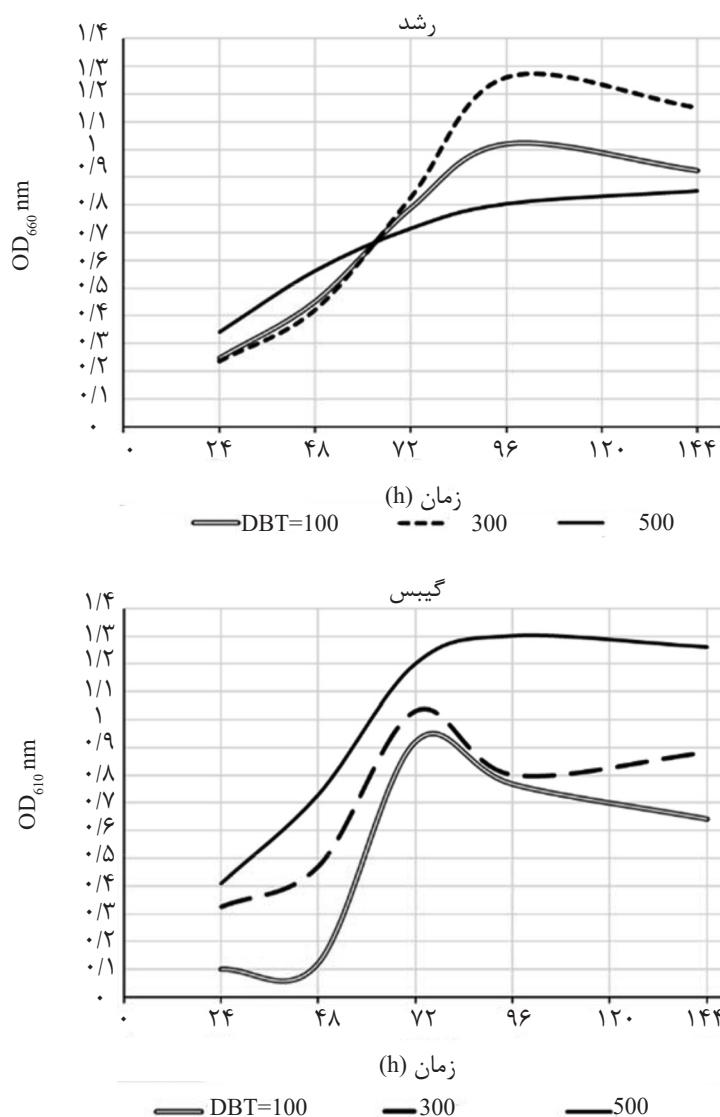
گوگردزایی شیمیایی است. این روش تحت شرایط عملیاتی ملایم و با هزینه کم انجام می‌شود که از جمله مهمترین مزیت آن نسبت به روش شیمیایی می‌باشد. با این حال سرعت پایین فرآیندهای زیستی و جداسازی بیوکاتالیست پس از اتمام فرآیند از معایب روش‌های زیستی می‌باشد که کاربردهای صنعتی آن را با محدودیت‌هایی همراه نموده است [۱۱].

اغلب میکروارگانیسم‌ها، گوگردزایی زیستی را از طریق مسیر 4s انجام می‌دهند. این روش شیوه مناسبی برای حذف زیستی و انتخابی گوگرد از ترکیبات آلی نفت خام می‌باشد. طی مسیر 4s ترکیبات گوگردی از طریق ۴ مرحله اکسیداسیون به ۲- هیدروکسی بی‌فنیل، بدون تخریب اسکلت کربنی تبدیل می‌شوند.

غلظت مناسب منبع گوگرد برای رشد و فعالیت گوگردزایی سویه
در این بررسی اثر غلظت‌های مختلف DBT به عنوان تنها منبع گوگرد بر رشد و فعالیت گوگردزایی سویه بررسی گردید. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت DBT از ۱۰۰ ppm به ۳۰۰ باعث افزایش رشد سویه گردید ولی با افزایش غلظت تا ۵۰۰ ppm روند کاهشی در رشد سویه مشاهده گردید (شکل ۶ الف). در بررسی فرآیند گوگردزایی نتایج نشان داد که با افزایش غلظت DBT، جذب نوری به دست آمده در تست گیس افزایش یافت و در نتیجه فعالیت گوگردزایی سویه EAMYO افزایش یافت (شکل ۶ ب).

نتیجه‌گیری

گوگردزایی زیستی روشی جایگزین و مکمل روش



شکل ۶ رشد سلولی و فعالیت گوگردزایی سویه EAMYO در محیط کشت با غلظت‌های مختلف DBT.

ترکیبات آلی و سرعت واکنش بهبود می‌یابد. این میکرو ارگانیسم‌ها به دلیل دسترسی بیولوژیکی به سوبستراهای هیدروفوب کم محلول از قبیل پلی آروماتیک و هیدروکربن‌های آلیفاتیک که در دمای بالا بهبود می‌یابد. همچنین در دمای بالا واکنش گوگردزایی به دلیل افزایش انتقال مواد، افزایش می‌یابد. برای گوگردزایی زیستی به صورت تجاری لازمست میکروارگانیسم‌هایی یافته شوند که گوگردزایی را در دمای بالا انجام دهند [۷ و ۸]. بر طبق گزارشات اعلام شده میکرو ارگانیسم‌های مختلفی وجود دارند که از پتانسیل گوگردزایی برخوردارند و اغلب میکروارگانیسم‌های گوگردزای

اغلب میکرو ارگانیسم‌هایی که از این مسیر برای حذف ترکیبات گوگردی استفاده می‌کنند هوازی و مزوفیل می‌باشند [۱۲]. در پالایشگاه‌ها، گوگردزایی در شرایط حرارتی و فشار بالا انجام می‌پذیرد [۷]. از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نخواهد بود که گوگردزایی در شرایط محیط انجام شود.

بدین ترتیب انجام فرایندهای بیوتکنولوژیکی در دمای بالا مزایایی دارد از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: شرایط دمای بالا همراه با کاهش خطر آلودگی می‌باشد. همچنین باعث کاهش ویسکوزیته و افزایش انتشار موثر ترکیبات آلی شده و از این رو دسترسی بیولوژیکی و حلالیت

۵۵ °C، دی‌بنزوتیوفن را مصرف نموده و ترکیب‌های هیدروکسیل‌دار را تولید و در محیط متراکم می‌سازد. میکروارگانیسم مذکور از طریق مسیر 4s و به طور هوازی ترکیب گوگردی دی‌بنزوتیوفن را به ۲-هیدروکسی بی‌فنیل تبدیل می‌نماید. نتایج نشان داد که این سویه در pH ۹۶ بیشترین رشد ($OD_{600} = 1$) را در دمای ۵۵ °C و ۷/۳ °C داشته و در ۷۲ h بیشترین فعالیت گوگردزایی زیستی را دارد و میزان تولید 2-HBP در ۷۲ h برای سویه EAMYO طبق منحنی استاندارد گیبس ۲۶/۱ mg/L به دست آمد.

انصاری و همکاران رشد و فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم *Rhodococcus* را بررسی نمودند، نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد در ۷۲ °C میکروارگانیسم *Rhodococcus* بیشترین رشد ($OD_{600} = 2$) و بیشترین غلظت ۲-هیدروکسی بی‌فنیل ۰/۱۵ °C دارد [۹]. گزارش شده است که 2-HBP برای میکروارگانیسم‌ها سمی می‌باشد و تجمع آن در محیط کشت به عنوان محصول گوگردزایی زیستی اثر مهاری بر رشد میکروارگانیسم‌ها و احتمالاً بر میزان فعالیت گوگردزایی دارد [۱۰، ۱۵]. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم پس از ۷۲ h به دلیل تجمع 2-HBP کاهش می‌یابد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تولید 2-HBP در ۷۲ °C برای میکروارگانیسم جدا شده ۲۶/۱ mg/L می‌باشد که پس از ۷۲ h این مقدار به ۲۲/۱ کاهش می‌یابد. اما در رشد میکروارگانیسم کاهش مشاهده نشد و رشد در ۹۶ h به حداکثر مقدار خود رسید. همچنین نتایج حاصل از استخراج و HPLC محیط کشت حاوی میکروارگانیسم منتخب بعد از ۷۲ و ۹۶ گرم‌گذاری در ۵۵ h نشان می‌دهد که بیشترین میزان تولید 2-HBP در کروماتوگرام مربوط به ۷۲ گرم‌گذاری مشاهده می‌شود که بالاترین پیک حدود ۴۴/۶۷٪ در ۲ min مشاهده می‌شود در حالیکه بعد از ۹۶ گرم‌گذاری حدود ۳۲٪ مشاهده می‌شود.

گزارش شده مزوفیل هستند [۳]. تا به حال تلاش‌های زیادی برای به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های گرمادوست انجام شده است [۱۳].

بنابراین با توجه به مزیت‌های استفاده از میکروارگانیسم‌های ترموفیل در این زمینه می‌توان با نمونه‌برداری و جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی از محیط‌های آلوده و منابع نفتی کشور پیشرفت چشمگیری در فرایند گوگردزایی زیستی صورت گیرد. انجام عمل غربال‌سازی مناسب جهت به‌دست آوردن میکروارگانیسم‌های ترموفیل ضروری می‌باشد که در این پژوهش رعایت شده و دستیابی به سویه ترموفیل گوگردزا ممکن شده است.

کونیشی و همکاران چندین سویه متعلق به جنس *Paenibacillus* را شناسایی کردند که می‌توانند تحت شرایط دمای بالا رشد کنند و به طور ویژه پیوندهای کربن و گوگرد را در ترکیبات آلی گوگردی بشکنند و فعالیت گوگردزایی را نشان دادند [۷]. ونگ و همکاران دو گونه از باکتری ترموفیل *Paenibacillus* را جداسازی کردند که قادر به گوگردزایی زیستی از نفت می‌باشند. این دو سویه فعالیت گوگردزایی در دمای ۴۰-۵۵ °C و از طریق مسیر S4 دارا بودند و با افزایش دما در ۵۴ °C، فعالیت گوگردزایی زیستی افزایش یافت [۱۴]. کریمورا و همکاران سویه‌ای از *Bacillus subtilis* سویه WU-S2B را که قادر به فعالیت گوگردزایی در دمای بالا بود گزارش دادند [۸].

در این پژوهش سعی شده که میکروارگانیسم ترموفیل دارای توانایی فعالیت گوگردزایی به صورت بومی از مناطق جنوبی و آلوده به نفت کشور جداسازی شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده و مقایسه آن با کارهای انجام شده در زمینه گوگردزایی، می‌توان اظهار داشت که باکتری *Bacillus thermoamylovorans* سویه EAMYO از توانایی مناسب برای حذف گوگرد از دی‌بنزوتیوفن برخوردار است. این باکتری طی رشد خود در دمای

بنزوات سدیم افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ترکیب شیمیایی منبع کربن مورد استفاده در محیط کشت تاثیر مهمی در مقدار و سرعت فعالیت گوگردزدایی دارد.

دری‌کوند و همکاران کلرید آمونیوم را به میزان ۴ g/L به محیط کشت *Paenibacillus valdalius* سویه PD2 برای بررسی فعالیت گوگردزدایی اضافه نمود [۱۷]. در بررسی ترکیبات نیتروژن معدنی بر روی رشد و فعالیت گوگردزدایی میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* سویه EAMYO نتایج پژوهش نشان داد که رشد سلولی در حضور کلرید آمونیوم افزایش یافت در حالیکه فعالیت گوگردزدایی سویه در حضور نیترات سدیم بعنوان منبع نیتروژن افزایش یافت.

عربی‌ان و همکاران در پژوهش خود بر روی اثر غلظت‌های DBT ppm ۲۵۰ تا ۱۲۵۰ بر روی میزان فعالیت گوگردزدایی *Bacillus cereus* سویه HN گزارش دادند که با افزایش غلظت DBT میزان فعالیت گوگردزدایی این میکروارگانیسم افزایش یافته و در غلظت ۱۲۵۰ ppm، فعالیت گوگردزدایی را ۸۰٪ بیان کردند [۱۸]. در پژوهش حاضر نیز با افزایش میزان دی بنزوتیوفن، میزان فعالیت گوگردزدایی سویه EAMYO افزایش می‌یابد. این افزایش در میزان فعالیت گوگردزدایی را می‌توان به دلیل انتشار بیشتر دی بنزوتیوفن دانست.

با بررسی فاکتورهای بیشتر و بهینه‌سازی محیط‌های کشت، امکان افزایش رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه وجود دارد. استفاده از منبع کربن مناسب بنزوات سدیم و منبع نیتروژن مناسب و همچنین افزایش غلظت DBT تا غلظت ۳۰۰ ppm می‌تواند نتایج بهتری را به دست دهد و باعث ارتقای فرایند گوگردزدایی میکروارگانیسم ترموفیل جداسازی شده شود.

پاپی‌زاده و همکاران در پژوهش خود که جداسازی میکروارگانیسم گوگردزدا از خاک‌های نفتی اهواز بود *Enterobacter* سویه NISOC-03 را جدا کرده و اثر منابع کربنی اتانل، گلیسرول، گلوکز و بنزوات سدیم را بر فعالیت گوگردزدایی میکروارگانیسم بررسی کردند. در این پژوهش نتایج نشان داد که در حضور بنزوات سدیم به‌عنوان منبع کربن، سویه NISOC-03 ۶۴٪ از DBT در فاز رشد لگاریتمی مصرف می‌شود. در حالیکه در حضور گلوکز به‌عنوان منبع کربن ۱۹/۶٪ از DBT متابولیزه می‌شود [۱۶]. در پژوهش حاضر به منظور دستیابی به منبع کربن مناسب رشد و فعالیت گوگردزدایی ترکیبات مختلف کربنی به محیط کشت پایه معدنی افزوده شد و نتایج بررسی نشان داد که بنزوات سدیم مناسب‌ترین منبع کربن مورد استفاده در محیط کشت پایه معدنی می‌باشد و میزان رشد سلولی و فعالیت گوگردزدایی سویه منتخب در حضور

منابع

- [1]. Stanislaus A., Marafi A. and Rana M. S., "Recent advances in the science and technology of ultra-low sulfur diesel (ULSD) production," Catal. Today. Vol. 153, pp. 1-68, 2010.
- [2]. Kilbane J., "Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels," Curr. Opin. Biotechnol. Vol. 17, pp. 305-314, 2006.
- [3]. Mohebbi G. and Ball A., "Biodesulfurization of diesel fuels: Past, present and future perspectives," Interna. Biodeterio. Biodegra., Vol. 110, pp. 163-180, 2016.
- [4]. Kodama K., Umehara K., Shimizu K., Nakatani S., Minuda Y. and Yamada K., "Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway," Agr. Biol. Chem., Vol. 37, pp. 45-50, 1973.

- [5]. Singh S. and Schwan A., "Sulfur metabolism in plants and related biotechnologies," In: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 4, pp. 257-271, 2011.
- [6]. Kashefi K. and Lovley D. R., "Extending the upper temperature limit for life," *Science*, Vol. 301, Issue 5635, pp. 934-934, 2003.
- [7]. Konishi J., Onaka T., Ishii Y. and Suzuki M., "Demonstration of the carbon sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. Strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene," *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 187, pp. 151-154, 2000.
- [8]. Kirimura K., Furuya T., Nishii Y., Ishii Y., Kino K. and Usami S., "Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B," *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 91, pp. 262-266, 2001.
- [9]. Ansari F., Grigoriev P., Libor S., Tothill I. and Ramsden J., "DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGST8 with magnetic Fe_3O_4 nanoparticles," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 102, pp. 1505-1512, 2009.
- [10]. Mohebbali G., Ball A., Rasekh B. and Kaytash A., "Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A," *Enz. Microb. Technol.*, Vol. 40, pp. 578-584, 2007.
- [11]. Karimi E., Yazdian F., Rasekh B., Jeffryes C., Akhavan Sepahi A., Shahmoradi S., Omidi M., Azizi M., Esmaeili Bidhendi M. and Hatamian A., "DBT desulfurization by decorating bacteria using modified carbon nanotube," *Fuel*, Vol. 216, pp. 787-795, 2018.
- [12]. Kayser K., Cleveland L., Park H., Kwak J., Kolhatkar A. and Kilbane J., "Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 59, pp. 737-746, 2002.
- [13]. Rothchild L. and Mancinelli R., "Life in extreme environments," *Nature*, Vol. 409, pp. 1092-1101, 2001.
- [14]. Wang J., Davaadelger B., Salazar J., Butler R., Pombert J., Kilbane J. and Stark B., "Isolation and characterization of an interactive culture of two *Paenibacillus* species with moderately thermophilic desulfurization ability," *Biotechnol. Lett.*, Vol. 37, pp. 2201-2211, 2015.
- [15]. Shavandi M., Sadeghizadeh, M., Khajeh, K., Mohebbali, G. and Zomorodipour, A., "Genomic structure and Promoter analysis of the *dsz* operon for dibenzothiophene biodesulfurization from *Gordonia alkanivorans* RIPI90A," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 87, pp. 1455-1461, 2010.
- [16]. Papizadeh M., Roayaei Ardakani M. and Motamedi H., "Growth-phase dependent biodesulfurization of Dibenzothiophene by *Enterobacter* sp. strain NISOC-03," *Pollution*, Vol. 3, pp. 101-111, 2017.
- [17]. Derikvand P., Etemadifar Z. and Saber H., "Sulfur removal from dibenzothiophene by newly isolated *paenibacillus validus* strain pd2 and process optimization in aqueous and biphasic (model-oil) systems," *Pol. J. Microbiol.*, Vol. 64, No. 1, pp. 47-54, 2015.
- [18]. Arabian D., Najafi H., Farhadi F. and Molaei Dehkordi A., "Biodesulfurization of simulated light fuel oil by a native isolated bacteria *Bacillus cereus* HN," *J. Pet. Sci. Technol.*, Vol. 4, No. 1, pp. 31-40, 2014.



Petroleum Research

Petroleum Research, 2019(December-January), Vol. 29, No. 108, 39-41

DOI: 10.22078/pr.2019.3557.2659

The Isolation Desulfurizing Native Thermophilic Bacteria *Bacillus thermoamylovorance* and Optimization Culture Medium

Narges Etemadi¹, Abbas Akhavan Sepahi^{1*}, Ghasemali Mohebali² and Fatemeh Yazdian³

1. Microbiology Group, Faculty of Life Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Iran

2. Microbiology and Biotechnology Research Group, Environment and Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (IRPI), Iran

3. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Iran

A_akhavan@iau-tnb.ac.ir

DOI: 10.22078/pr.2019.3557.2659

Received: February/05/2019

Accepted: June/18/2019

INTRODUCTION

On combustion of the fossil fuels, sulfur dioxide is released into the environment and causes air pollution and acid rain. Therefore, for limiting the amount of sulfur dioxide emitted into the atmosphere, it is necessary that the sulfur in the fossil fuels be decreased [1]. There are different manners to eliminate sulfur from fossil fuels; one of the manners is hydro-desulfurization (HDS) which is the most commonly used [1]. In addition, bio-desulfurization is deliberated frequently as a possible alternative to the HDS method applied commonly in refineries. In this manner,

microorganisms eliminate organic sulfur from oil fractions without breaking down the carbon skeleton of the organic sulfur derivatives via 4S pathway [2]. Moreover, thermophilic bacteria are important for commercial bio-desulfurization. The use of thermophilic bacteria has some advantages since it is not necessary to cool-down the oil fractions following the HDS, which it makes this process less expensive [3]. In this study, we describe the isolation and identification of a novel thermophilic desulfurizing *Bacillus thermoamylovorans* capable of utilizing DBT at up to 55 °C as the sole sulfur source for growth

with the aim of more efficiency in commercial bio-desulfurization. Finally, it is helpful to achieve microorganisms which illustrate much higher desulfurization capability at high temperatures.

MATERIALS AND METHODS

About 40 samples including oil, oil-polluted wastewater, and oily soil samples were harvested from Iranian Oilfields. In addition, samples were inoculated in enrichment BSM, including DBT (50 mg l^{-1}) as the sole sulfur source at 55 °C. To identify the cell growth and bio-desulfurization activity, basal salt medium containing DBT was used. Primary enrichment cultures were provided by adding 10 g samples to BSM (100 ml) supplemented with DBT (50 mg l^{-1}) at 150 rpm at different temperature 30, 42, 50, 55 °C for 20 days. For microbial strain selection, each enrichment culture was spread on to ENA agar and incubated at 55 °C. Moreover, the cultures were prepared by adding colonies to BSM (100 ml) supplemented with of DBT (50 mg l^{-1}) at 150 rpm and 55 °C separately. For primary selection of desulfurizing microbial strain(s), the Gibb's assay was done. The isolated strain that showed a higher ability to grow in DBT was selected. For classification of this strain, a range of morphological, biochemical, and molecular methods were done according to standards for microbial identification in Bergy's manual of systematic bacteriology. Isolates were identified with gram reaction, spore formation, cellular and colonial morphology, metabolic products, catalase reaction, oxygen requirement and motility test. Identification of this strain was performed by PCR amplification and sequencing of 16S rRNA gene. For optimization of the culture medium, different carbon and nitrogen source

and also the different concentrations of sulfur source were used. Furthermore, optimization of BDS capability and cell growth was carried out in different concentrations of carbon and nitrogen source.

RESULTS AND DISCUSSION

From 40 sampling, enrichment, and screening assessment, several thermophile bacteria strains were selected as DBT desulfurizing strain. Strain EAMYO was isolated from an oily soil collected from oilfields. This strain was found to be appropriate for further investigation based on its more effective bio-desulfurization capability. Until now, different microorganisms have been isolated and recognized as desulfurizing DBT via 4S pathway [2]. One of this important microorganisms is thermophilic microorganisms. In addition, these microorganisms are important for commercial bio-desulfurization. In this effort, we describe the capability of a novel isolated thermophilic bacterium, *Bacillus thermoamylovorans* to desulfurize and utilize DBT as the sole sulfur source for growth via 4S pathway at up to 55 °C. Morphological and biochemical characterization of the isolates indicated that it is *Bacillus* sp. In addition, species level confirmation of the isolate was done by 16S rDNA sequencing. Based on BLAST search analysis of the 16S rRNA gene indicated that this strain was related most closely to *Bacillus thermoamylovorans* (97%) having accession number NR117028.1. The growth rate and desulfurizing capability of strain EAMYO on DBT (100 mg l^{-1}) as the alone sulfur were studied as follows: the maximum cell concentration on DBT was achieved after incubation for 96 h. The maximum desulfurizing capability and production HBP were observed

after 72 h in the exponential phase. Moreover, *B. thermoamylovorans* grew in BSM medium with DBT at 55 °C and showed maximum growth ($OD_{660} = 0.850$) after 72 h of cultivation. Also, the maximum producing 2-HBP after 72 h was $26.13 \pm 0.12 \text{ mg l}^{-1}$ according to the curve calibration Gibbs assay.

Finally, the findings have illustrated that the maximal cell growth has achieved after 96 h incubation. The Gibbs results have shown that this strain has eliminated the sulfur in DBT by 4S pathway and 2-hydroxybiphenyl, as the end product of the desulfurization process was produced at the maximal concentration (26.1 mg l^{-1}) at 72 h. In addition, the results of research have illustrated that the isolated thermophilic strain is capable of eliminating sulfur in DBT, and this process may be improved by optimization of the culture media.

CONCLUSIONS

The Bio-desulfurization is based on 4S pathway. In the pathway, the carbon skeleton of the organic sulfur derivatives such as DBT is not break down, but converted to 2-HBP thus caloric value of the fossil fuels is not decreased. Thermophiles microorganisms have been isolated from geothermally heated soils, hot springs, and oil reservoirs. Bio-desulfurization is currently most attractive as a step following the HDS, which in turn requires elevated temperatures. If bio-desulfurization has been performed around 45 °C and higher, it would be unessential to chill the HDS-treated diesel oil to medium temperatures. In addition, it has advantages of increased enzymatic rates and diminished contamination by undesirable bacteria [4]. Also, the bio-desulfurization process would be

increased due to the higher mass transfer rate at higher temperatures [5]. In the commercial bio-desulfurization process, it is helpful to achieve microorganisms which illustrate much higher desulfurization capability at high temperatures (around 55 °C). Although bio-desulfurization at thermophilic temperatures have shown high removal efficiency, the high cost of associated energy use makes the process uneconomical. Finally, in this study, the new thermophilic strain capable to desulfurize DBT at 55°C has been described by us.

REFERENCES

- [1]. Kilbane J., "Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels," *Curr. Opin. Biotechnol.* Vol.17, pp. 305-314, 2006.
- [2]. Mohebbi G. and Ball A., "Biodesulfurization of diesel fuels: Past, present and future perspectives," *Interna. Biodeterio. Biodegra.*, Vol. 110, pp. 163-180, 2016.
- [3]. Konishi J., Onaka T., Ishii Y. and Suzuki M., "Demonstration of the carbon sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. Strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene," *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 187, pp. 151-154, 2000.
- [4]. Kirimura K., Furuya T., Nishii Y., Ishii Y., Kino K. and Usami S., "Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B," *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 91, pp. 262-266, 2001.