



The Optimization of Culture Medium *Bacillus thermoamylovorance* Strain EAMYO by RSM and Improvement Biodesulfurization Activity by Starch/Iron Nano Particles

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Etemadi N.¹ PhD,
Akhavan Sepahi A.² PhD,
Yazdian F.³ PhD,
Mohebbi Gh.⁴ PhD,

How to cite this article

Etemadi N, Akhavan Sepahi A, Yazdian F, Mohebbi Gh. The Optimization of Culture Medium *Bacillus thermoamylovorance* Strain EAMYO by RSM and Improvement Biodesulfurization Activity by Starch/Iron Nano Particles. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):127-136.

¹Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Microbiology Department, Life Science Faculty, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

⁴Microbiology & Biotechnology Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Life Science Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

yazdian@ut.ac.ir

Article History

Received: February 20, 2019

Accepted: December 11, 2019

ePublished: June 10, 2020

ABSTRACT

The combustion of fossil fuels containing sulfur results in the release of sulfur dioxide into the atmosphere and environmental pollution. Hence, the researchers focused on biological desulfurization method. Dibenzothiophene is used as a model molecule to study the ability of the desulfurization of microorganisms. The most suitable sources of carbon, nitrogen and sulfur concentration optimized by the response surface method to obtain the highest cell growth and biological desulfurization activity. The performance of iron nanoparticles on the growth and biodesulfurization activity of thermophilic bacterium *Bacillus thermoamylovorans* strain EAMYO was investigated. Characterization of starch-modified iron nanoparticles was performed by TEM and SEM. The images of TEM and SEM of these nanoparticles showed that the Fe_3O_4 and FeO nanoparticles were 20 and 30nm, respectively. The investigating the growth of microorganism in the presence of iron nanoparticles showed that these nanoparticles not only did not have a toxic effect on microorganism growth, but also increased the growth of microorganism in 96h ($\text{OD}_{660} = 1.864, 1.896$ respectively in the presence of nanoparticles FeO and Fe_3O_4), while the highest rate of growth in the absence of nanoparticles in 96h ($\text{OD}_{660} = 1.51$). Also, the activity of desulfurization in the presence of starch/FeO nanoparticles and starch/ Fe_3O_4 /starch increased by 26.52% and 10.75%, respectively, compared to the cells without the coating of iron nanoparticles.

Keywords Thermophilic Bacterium; Bio-Desulfurization; RSM; Starch Modified Iron Nanoparticles

CITATION LINKS

[1] Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RPI90A [2] Toward sulfur-free fuels [3] Selective desulphurization of dibenzothiophene by a soil bacterium: Microbial DBT desulphurization [4] Degredation of organic sulfur compounds and reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 [5] Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rodochrous* IGTS8 [6] Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization [7] DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 with magnetic Fe_3O_4 nanoparticles [8] Preparation and application of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles for wastewater purification [9] Biodesulfurization of Dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles [10] Surface modification of γ - Al_2O_3 nano- particles with gum arabic and its applications in adsorption and biodesulfurization [11] Enhancement of bio-desulfurization capability of a newly isolated thermophilic bacterium using starch/iron nanoparticles in a controlled system [12] Desulfurization activity and reusability of magnetite nanoparticle-coated *Rhodococcus erythropolis* FMF and R [13] Analysis of petroleum biodesulfurization in an airlift bioreactor using response surface methodology [14] DBT desulfurization by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 using magnetic Fe_3O_4 nanoparticles in a bioreactor [15] Biodesulfurization of simulated light fuel oil by a native isolated bacteria *Bacillus Cereus* HN [16] Modeling of DBT biodegradation behaviors by resting cells of *Gordonia* sp. WQ- 01 and its mutant in oil-water dispersions [17] Effects of nicotinamide and riboflavin on the biodesulfurization activity of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* USTB-03 [18] Optimization of nicotinamide and riboflavin in the biodesulfurization of dibenzothiophene using response surface methodology [19] Biodesulfurization of diesel fuels-Past, present and future perspectives [20] Development of citrate-stabilized Fe_3O_4 nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications

بهینه‌سازی محیط کشت *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO به روش سطح پاسخ و ارتقای فعالیت گوگردزایی به وسیله نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته

نرگس اعتمادی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

عباس اخوان‌سپهی PhD

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

فاطمه یزدیان PhD

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

قاسمعلی محبعلی PhD

گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

چکیده

احتراق سوخت‌های فسیلی حاوی گوگرد باعث انتشار دی‌اکسید گوگرد به اتمسفر و آلودگی محیط زیست می‌شود. از این رو توجه محققان به روش گوگردزایی بیولوژیکی معطوف شده است. دی‌بنزوتیوفن (DBT) به‌عنوان یک مولکول مدل برای سنجش توانایی میکروارگانیسم‌ها در گوگردزایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مناسب‌ترین غلظت‌های منبع کربن، نیتروژن و گوگرد برای به‌دست‌آوردن بالاترین رشد سلولی و فعالیت گوگردزایی زیستی به روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شدند. عملکرد نانوذرات آهن بر رشد و فعالیت گوگردزایی زیستی باکتری گرمادوست *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO بررسی شد. مشخصه‌یابی نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته توسط آنالیزهای TEM و SEM انجام شد. تصاویر TEM و SEM این نانوذرات نشان داد که اندازه نانوذرات Fe_0 و Fe_3O_4 به ترتیب ۲۰ و ۳۰ نانومتر است. بررسی رشد باکتری در حضور نانوذرات آهن نشان داد که این نانوذرات نه تنها اثر سمی بر رشد میکروارگانیسم ندارند، بلکه سبب افزایش رشد آن در ۹۶ ساعت شدند (OD_{660} برابر با ۱/۸۶۴ و ۱/۸۹۶ به ترتیب در حضور نانوذرات Fe_0 و Fe_3O_4)، در حالی که بیشترین میزان رشد در عدم حضور نانوذرات در ۹۶ ساعت برابر $\text{OD}_{660} = 1/51$ مشاهده شد. همچنین میزان فعالیت گوگردزایی در حضور نانوذرات Fe_0 اصلاح‌شده با نشاسته و Fe_3O_4 اصلاح‌شده با نشاسته به ترتیب ۲۶/۵۲ و ۷۵/۱۰٪ در مقایسه با سلول فاقد پوشش نانوذرات آهن افزایش یافت.

کلیدواژه‌ها: باکتری گرمادوست، گوگردزایی زیستی، سطح پاسخ، نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۲۰

*نویسنده مسئول: yazdian@ut.ac.ir

مقدمه

امروزه بیوتکنولوژی به‌عنوان روشی مناسب برای ارتقای موثر بسیاری از فرآیندهای زیستی و همچنین برطرف‌کردن بسیاری از مشکلات زیست‌محیطی توجه بسیاری را به خود جلب کرده است.

توانایی متابولیکی مناسب میکروارگانیسم‌ها، یکی از دلایل کاربرد روش‌های بیوتکنولوژی در بسیاری از زمینه‌های علمی است [1]. در سال ۱۹۵۳ اولین گزارش‌های گوگردزایی زیستی از نفت خام منتشر شد [2]. گوگردزایی زیستی یکی از موثرترین روش‌ها برای حذف ترکیبات آلی گوگرددار پیچیده است. این روش به‌دلیل هزینه‌های سرمایه‌گذاری کمتر، انجام فرآیند در شرایط دما و فشار ملایم، عدم نیاز به هیدروژن، عدم تخریب اسکلت کربنی، عدم تولید فرآورده‌های جانبی سمی و حفظ ارزش حرارتی سوخت نسبت به روش شیمیایی گوگردزایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [3].

انواع متعددی از میکروارگانیسم‌ها برای متابولیسم ترکیبات گوگردی و فرآیند گوگردزایی گزارش شده‌اند [4]. کیلیان در سال ۱۹۸۹ یک مسیر فرضی اکسیدکننده برای گوگردزایی توسط میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد کرد [2]. نخستین میکروارگانیسم مزوفیلیک گوگردزدا مطابق با مسیر ۴S که توسط کیلیان در سال ۱۹۹۰ جداسازی شده، *Rodococcus erythropolis* IGTS8 نام دارد [5].

در مرحله گوگردزایی به روش شیمیایی فرآیند تصفیه نفت، تقطیر برشی، واکنش تحت شرایط دما و فشار بالا انجام می‌شود. با افزایش دما ویسکوزیته نفت سنگین کاهش پیدا می‌کند و فرآیند بیودسولفوراسیون (BDS) بهتر انجام می‌شود. خروجی واحد هیدرودسولفوراسیون (HDS) دارای دمای بالا است و سردکردن آن برای انجام فرآیند BDS هزینه‌ای سنگین در بر دارد، بنابراین یکی دیگر از اقدامات، دسترسی به میکروارگانیسم‌هایی است که قادر به انجام BDS در دمای بالا هستند. انجام فرآیندهای بیوتکنولوژیکی در دمای بالا مزایایی از جمله کاهش خطر آلودگی با سایر میکروارگانیسم‌ها، کاهش ویسکوزیته ترکیبات نفتی و افزایش انتشار موثر دسترسی بیولوژیکی ترکیبات آلی دارد. این مزایا منجر به افزایش کاربرد صنعتی میکروارگانیسم‌های ترموفیل شده است [6].

نانوذرات مغناطیسی به‌علت نسبت سطح به حجم زیاد و عدم سمیت کاربردهای زیادی در زمینه‌های بیوتکنولوژی و زیست‌پزشکی دارند [7]. نانوذرات مغناطیسی علاوه بر اینکه در جداسازی مغناطیسی کاربرد دارند، به‌دلیل نسبت سطح به حجم بالا در گروه نانوجاذب‌های مناسب برای بسیاری از ترکیبات از جمله ترکیبات گوگردی و فلزات سنگین مطرح می‌شوند [8]. تحقیقات، افزایش میزان فعالیت گوگردزایی زیستی میکروارگانیسم‌های دارای پوشش نانوذرات مغناطیسی را نشان می‌دهند [9]. افزایش نفوذپذیری غشای میکروارگانیسم‌ها به دی‌بنزوتیوفن (DBT) ممکن است دلیل اصلی افزایش فعالیت گوگردزایی زیستی باشد [7].

می‌توان از نانوذرات به‌صورت پوششی بر سطح سلول‌ها برای افزایش میزان گوگردزایی استفاده کرد، ولی محدودیتی وجود دارد. این نانوذرات هنگام سنتز و بعد از آن دنا توره و تجمع می‌یابند. طی تحقیقی مشخص شد که برای پراکندگی و زیست‌سازگاری آنها می‌توان ترکیبات مختلفی را به کار برد. درواقع این ترکیب با اصلاح سطح این نانوذرات مانع تجمع و دنا توره شدن می‌شود. با انجام این عمل ظرفیت و میزان گوگردزایی نسبت به حالت اصلاح‌نشده دو

تعیین فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم

روش تست گیبس

برای تعیین فعالیت گوگردزایی با این روش، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی میکروارگانیسم در لوله آزمایش ریخته می‌شود. سپس pH نمونه‌ها با استفاده از محلول کربنات سدیم روی ۸ تنظیم و ۱۰۰ میکرولیتر معرف گیبس (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول اتانول مطلق) به آن اضافه می‌شود. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰°C گرماگذاری و بعد از این مدت نمونه به وسیله سانتریفیوژ رسوب‌گیری شد و به این صورت سلول‌ها حذف شدند. بعد از گذشت یک ساعت از افزودن معرف گیبس جذب نوری آن به همراه نمونه شاهد، در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری و داده‌های اسپکتروفتومتر و تغییرات جذب با منحنی استاندارد گیبس مقایسه می‌شود. در نهایت میزان غلظت ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل به دست می‌آید. آزمایشات با سه تکرار انجام و میانگین سه تکرار گزارش شد [11].

آنالیز کروماتوگرافی (HPLC)

این روش یک روش کمی دقیق برای تعیین میزان ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل در نمونه مورد نظر است. در این حالت pH نمونه به وسیله اسید کلریدریک نرمال به pH برابر ۲ تنظیم و سپس حجم مشخصی از آن به وسیله همان حجم از اتیل‌استات استخراج شد. برای اطمینان از استخراج تمام ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل موجود می‌توان استخراج را سه بار تکرار کرد. به این منظور بعد از تنظیم pH نمونه و افزودن حجم مساوی حلال اتیل‌استات به آن، نمونه در یک ظرف شیشه‌ای کاملاً در بسته به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه روی شیکر به هم زده شد و بعد از گذشت زمان مناسب و جدا شدن فاز آلی حلالی از فاز آبی سلول، فاز آلی بالایی به وسیله سرنگ از فاز آبی جدا و در یک شیشه کاملاً تمیز ریخته شد و پس از تبخیر کامل اتیل‌استات حجم مشخصی از حلال استونیتریل به آن اضافه و بخشی از محلول حاصل به ستون C-18 nucleusil-100 به اندازه ۶/۴×۱۰^۳ تزریق شد [12].

بهبودسازی پارامترهای عملیاتی موثر در افزایش رشد و فعالیت گوگردزایی سوبه

بهبودسازی رشد و فعالیت گوگردزایی سوبه منتخب به روش طراحی آزمایش، با استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش و روش سطح پاسخ انجام شد. DBT، منبع کربن و منبع نیتروژن مناسب، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. طبق طراحی آزمایش برای ۳ متغیر، ۲۰ آزمایش (۱۵ آزمایش و ۵ آزمایش تکراری) تعیین شدند. محدوده سطوح متغیرها در جدول ۱ نشان داده شده است. متغیر منبع نیتروژن شامل منبع نیتروژن معدنی (نیترات آمونیوم) و اسیدنیکیوتینیک به میزان مساوی است. همچنین منبع کربن مورد بررسی، بنزوات سدیم است (جدول ۱) [13].

آزمایش‌ها در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت طبق جدول طراحی آزمایش انجام شدند. مقداری از محیط

برابر افزایش می‌یابد [10]. به منظور جلوگیری از کلوخه شدن و اکسیداسیون نانوذرات پایدارسازی آنها ضروری است. برای پایدارسازی نانوذرات روش‌های متعددی وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به پوشش با گروه‌های کربوکسیل (مانند سیتریک اسید)، مواد غیرآلی مانند سیلیکا و پلیمرهایی مانند دکستران، پلی‌اتیلن‌گلیکول و نشاسته اشاره کرد [7].

در مطالعه حاضر میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط باکتری بومی گرمادوست *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO در حضور نانوذرات اصلاح‌شده با نشاسته Fe_3O_4 و Fe_0 به ترتیب mg l^{-1} ۵۸/۸۳^۱ و mg l^{-1} ۵۱/۵۰ پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۵۵°C به دست آمد، در حالی که در سلول فاقد پوشش نانوذرات mg l^{-1} ۴۶/۵۰ گزارش شد. میزان فعالیت گوگردزایی در حضور نانوذرات اصلاح‌شده با نشاسته Fe_3O_4 و Fe_0 به ترتیب ۲۶/۵۲٪ و ۱۰/۷۵٪ در مقایسه با سلول فاقد پوشش نانوذرات افزایش یافت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی و محیط کشت‌های مورد استفاده شامل پتاسیم فسفات، بنزوات سدیم، سدیم هیدروژن فسفات، سولفوریک اسید، نیتریک اسید، کلرید منیزیم، کلرید منگنز، کلرید کلسیم، کلرید آهن، دی‌بنزوتیوفن (۹۹٪)، معرف گیبس (۲) و ۶ دی‌کلروکینون-۴- (کلروایمید)، ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل، دی‌متیل‌فرمامید (۹۹٪) تهیه شدند (مرک؛ آلمان) [1].

محیط کشت‌ها

ابتدا جداسازی میکروارگانیسم‌ها انجام شد. به منظور مطالعه رشد و بررسی میزان فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم از محیط کشت معدنی پایه (BSM) استفاده شد. این محیط در دو قسمت مجزا تهیه و جداگانه استریل شد. جزء اول آن حاوی KH_2PO_4 (۶ گرم بر لیتر)، Na_2HPO_4 (۴ گرم بر لیتر)، NH_4Cl (۱/۲ گرم بر لیتر) و بنزوات سدیم (۲ گرم بر لیتر) و جزء دوم محیط کشت حاوی $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۷۵ گرم بر لیتر)، $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (۴ گرم بر لیتر)، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۱ گرم بر لیتر) و $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (۱ گرم بر لیتر) با pH نهایی حدود ۷/۳ است. DBT در دی‌متیل‌فرمامید حل و به عنوان تنها منبع گوگرد به BSM اضافه شد [11]. همه کشت‌های میکروبی در فلاسک و در دمای ۵۵°C و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شدند. محیط نوترینت آگار غنی‌شده حاوی ۲ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۴ گرم بر لیتر تریپتون و ۲۰ گرم بر لیتر آگار برای خالص‌سازی استفاده شد. کلرید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن و بنزوات سدیم به عنوان منبع کربن به کار برده شدند.

میکروارگانیسم

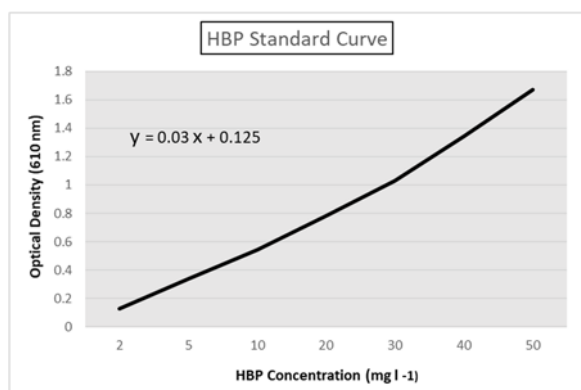
باکتری مورد استفاده، باکتری گرمادوست *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO بود که از مناطق آلوده به نفت در جنوب ایران جداسازی و شناسایی شد [11].

نمونه‌گیری با فاصله زمانی ۲۴ ساعت انجام و رشد باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و فعالیت گوگردزدایی باکتری با تست گیسیس و آنالیز HPLC بررسی شد [14].

یافته‌ها

منحنی استاندارد تست گیسیس

میزان فعالیت گوگردزدایی زیستی از طریق تست گیسیس و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۶۱۰ نانومتر مشخص شد. در تست گیسیس تبدیل میزان جذب نوری به میزان غلظت 2-HBP (میلی‌گرم بر لیتر) از طریق منحنی استاندارد 2-HBP تعیین شد. برای رسم منحنی استاندارد 2-HBP، رقت‌هایی از 2-HBP با محدوده غلظت صفر تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شدند. بر حسب میزان جذب هر یک از غلظت‌ها در تست گیسیس، منحنی استاندارد رسم شد. نمودار ۱ منحنی استاندارد 2-HBP را نشان می‌دهد.



نمودار ۱) منحنی استاندارد 2-HBP حاصل از آزمون گیسیس

پارامترهای عملیاتی موثر در افزایش رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه

سرعت پایین واکنش و فعالیت کم آزمون‌ها از جمله عوامل موثری هستند که سبب کاهش میزان گوگردزدایی زیستی می‌شوند [7, 9]. غلظت‌های مناسب منابع کربن و نیتروژن و غلظت منبع گوگردی از جمله مهم‌ترین عوامل عملیاتی برای بررسی و بهینه‌سازی محیط کشت میکروارگانیسم مورد نظر در افزایش رشد سویه و فعالیت گوگردزدایی زیستی هستند. بنابراین سه پارامتر غلظت‌های بنزوات سدیم (منبع کربن)، نیترات سدیم و اسیدنیکوتینیک غلظت (منبع نیتروژن) و دی‌بنزوتیوفن (منبع گوگردی) برای بهینه‌سازی رشد و فعالیت گوگردزدایی زیستی میکروارگانیسم در محیط کشت BSM در ۵۵°C و ۱۵۰ دور بر دقیقه در نظر گرفته شدند. به روش سطح پاسخ آزمایش‌ها طراحی شدند. دو پاسخ برای هر آزمایش تعیین شد. پاسخ R1 برای بررسی رشد سلولی براساس جذب نوری در ۶۶۰ نانومتر (که به‌طور مستقیم رشد میکروارگانیسم را نشان می‌دهد) و پاسخ R2 تعیین غلظت ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل تولیدشده در اثر مصرف دی‌بنزوتیوفن توسط میکروارگانیسم به روش تست گیسیس در جذب نوری ۶۱۰ نانومتر در نظر گرفته شد.

کشت به‌عنوان شاهد برای ارزیابی جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نگهداری شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱°C توسط اتوکلاو استریل و پس از تلقیح سویه منتخب تحت شرایط استریل، ارلن‌ها در دمای ۵۵°C و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه، به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور قرار داده شدند. رشد باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و فعالیت گوگردزدایی آن با تست گیسیس بررسی شد.

جدول ۱) سطوح متغیرها (بر حسب گرم بر لیتر) در بهینه‌سازی آماری رشد و فعالیت گوگردزدایی سویه

علامت	متغیر	سطح پایین (-)	سطح مرکزی (صفر)	سطح بالا (+)
A	غلظت DBT	۰/۱	۰/۳	۰/۵
B	غلظت منبع کربن	۱	۲	۳
C	غلظت منبع نیتروژن	۰/۶	۱/۲	۱/۸

مشخصه‌یابی نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته

در مطالعه حاضر از نانوذرات آهن Fe₃O₄ و Fe₀ اصلاح‌شده با نشاسته استفاده شد. به‌منظور مشخصه‌یابی نانوذرات مورد استفاده، برای مطالعه ساختار سطحی و مورفولوژی نانوذرات از تصاویر میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی (SEM) و عبوری (TEM) استفاده شد. تصاویر SEM مربوط به نانوذرات آهن با میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل ZEISS تهیه شدند.

پوشش سطح باکتری با نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته

انصاری و همکاران با استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن به‌منظور بررسی نقش آنها در افزایش سرعت گوگردزدایی زیستی میکروارگانیسم *Rodococcus erythropolis* IGTS8، پوششی بر سطح میکروارگانیسم ایجاد کردند [17]. در مطالعه حاضر از روشی مشابه فوق برای پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوذرات آهن استفاده شد. زمانی که میکروارگانیسم‌ها تا انتهای فاز لگاریتمی در محیط BSM رشد کردند، توسط سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شدند. سلول‌ها دو بار با محلول بافر فسفات نمکی شسته و به محیط معدنی پایه تا A₆₆₀=۱ تلقیح شدند. پوشش سطح سویه منتخب با نانوذرات Fe₃O₄ و Fe₀ پوشش‌داده‌شده با نشاسته به این ترتیب انجام شد که ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات آهن تهیه و با ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی در محیط BSM حاوی DBT با غلظت نهایی ۳۰۰ ppm به‌عنوان تنها منبع گوگرد اضافه شد [14].

بررسی رشد و فعالیت گوگردزدایی باکتری دارای پوشش نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته

میکروارگانیسم‌های پوشش‌یافته با نانوذرات آهن اصلاح‌شده با نشاسته در محیط BSM به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۵۵°C و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. به‌منظور بررسی رشد و میزان فعالیت گوگردزدایی میکروارگانیسم،

رابطه (۲)

$$R_2 = +1.68 + 0.37 \times A + 0.14 \times B + 0.22 \times C$$

با توجه به رابطه فوق شرایط بهینه برای سطح پاسخ R_2 تحت تاثیر پارامترهای A و C است. این شرایط در رابطه با پاسخ R_2 برای میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO جدول ۲ معرفی شده است.

نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ R_2 به صورت شکل ۲ شرایط بهینه را به صورت بهتری نشان می دهد. همان طور که در این شکل نشان داده شده است، با افزایش میزان پارامتر A (غلظت منبع گوگرد) به سمت ۱+ (۵۰۰ppm) و افزایش پارامتر B (غلظت منبع کربن) به سمت ۱+ (۳ گرم بر لیتر) مقدار R_2 افزایش می یابد که معادل افزایش غلظت ۲- هیدروکسی بای فنیل (افزایش فعالیت گوگردزایی زیستی) است.

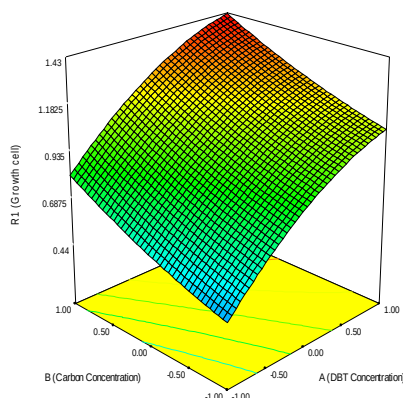
شکل ۲ نشان می دهد در غلظت بالایی از منبع کربن و ترکیبات گوگردی همزمان با افزایش نرخ رشد، میزان فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO نیز افزایش می یابد. همچنین با افزایش منبع نیتروژن نیز میزان فعالیت گوگردزایی افزایش پیدا می کند. دلیل این امر افزایش فعالیت آنزیم های دخیل در فرآیند گوگردزایی در اثر وجود اسیدنیکوتینیک در محیط کشت سلول است.

مشخصه یابی نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته

مورفولوژی نانوذرات آهن توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری و روشی تعیین شد. تصاویر TEM، برای تجسم و مشاهده نانو ساختارها ابزار مناسبی است. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، اندازه نانوذرات آهن ۲۰ و ۳۰ نانومتر است. تصاویر TEM به طور مشخص نشان می دهند که شکل نانوذرات کروی است و توزیع یکنواختی از آنها مشاهده می شود.

Design-Expert® Software

R1
1.412
0.245
X1 = A: A
X2 = B: B
Actual Factor
C: C = 0.70



شکل ۱) برهم کنش پارامتر A (غلظت منبع گوگرد) و B (غلظت منبع کربن) در نمودار سه بعدی سطح پاسخ R_1 برای میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO

با استفاده از نرم افزار Design-Expert (DX7Trial) به روش سطح پاسخ، آنالیز داده ها انجام شد. علاوه بر این، متغیرهای A ، B و C به ترتیب معرف غلظت منابع گوگرد (دی بنزوتیوفن)، کربن (بنزوات سدیم) و نیتروژن (نیترات سدیم و اسیدنیکوتینیک) هستند. همچنین R_1 پاسخ دانسیته نوری در ۶۶۰ نانومتر و R_2 پاسخ تست گیبیس و دانسیته نوری در ۶۱۰ نانومتر است.

متغیرهای زیر در پاسخ R_1 برای میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO مهم و اثرگذار هستند. در نتیجه معادله نهایی برای پاسخ R_1 به صورت زیر است:

رابطه (۱)

$$R_1 = +1.00 + 0.36 \times A + 0.13 \times B + 0.045 \times C$$

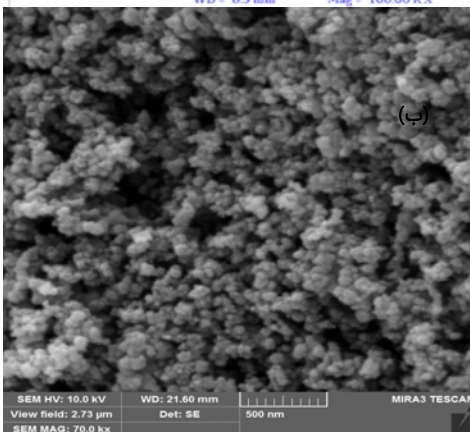
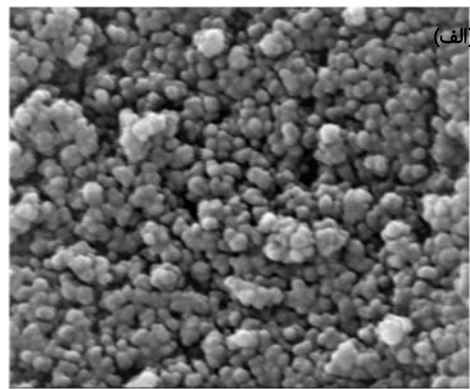
با توجه به رابطه ۱، چنین استنباط می شود که هر سه پارامتر A (غلظت منبع گوگرد)، B (غلظت منبع کربن) و C (غلظت منبع نیتروژن) بر میزان پاسخ R_1 که معادل غلظت سلولی و رشد میکروارگانیسم است، تاثیرگذار هستند. با توجه به این رابطه، شرایط بهینه برای پاسخ R_1 برای میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO مطابق جدول ۲ است.

جدول ۲) شرایط بهینه برای پاسخ R_1 برای میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO

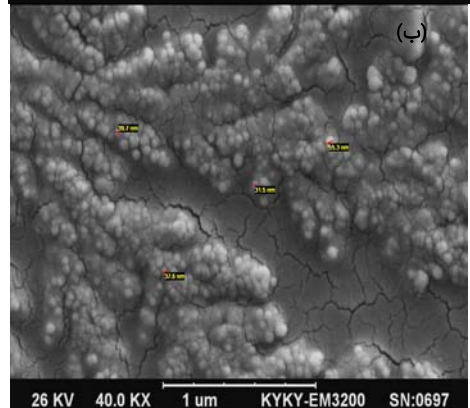
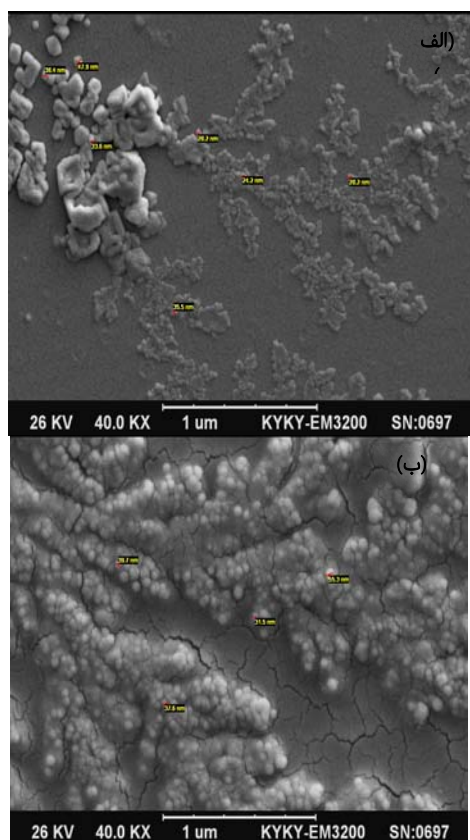
سطح پاسخ	C	B	A
R_1 ۱/۴۱۵۰۸	۰/۷	۰/۹۸	۰/۹۳
R_2 ۲/۳۳۳	۱	۰/۸۸	۱

نمودار سه بعدی سطح پاسخ R_1 برای *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO به صورت شکل ۱ شرایط بهینه را نشان می دهد. همان طور که در این شکل نشان داده شده است، با افزایش میزان پارامتر A (غلظت منبع گوگرد) به سمت ۱+ (۵۰۰ppm) و پارامتر B (غلظت منبع کربن) به سمت ۱+ (۳ گرم بر لیتر) مقدار R_1 افزایش می یابد که معادل افزایش جذب نوری در ۶۶۰ نانومتر است. بنابراین رشد سویه منتخب وابسته به منبع کربن و منبع گوگرد است. ترکیبات گوگردی به میزان کافی در اختیار میکروارگانیسم قرار گرفت و منجر به رشد سویه شد. هر غلظتی از ترکیبات گوگردی برای افزایش نرخ رشد میکروارگانیسم مناسب نیست، زیرا غلظت بحرانی ترکیبات گوگردی نیز برای میکروارگانیسم وجود دارد، به طوری که بالاتر از این غلظت برای میکروارگانیسم سمی است. از طرفی غلظت بالای ترکیبات گوگردی و استفاده از آنها سبب تجمع ۲- هیدروکسی بای فنیل در داخل سلول می شود که اثر کاهشی و سمیت بر میزان رشد سلولی دارد.

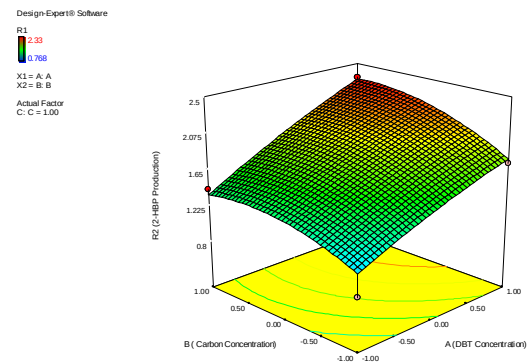
متغیرهای زیر در سطح پاسخ R_2 مهم و اثرگذار هستند. در نتیجه معادله نهایی برای سطح پاسخ R_2 به صورت زیر است:



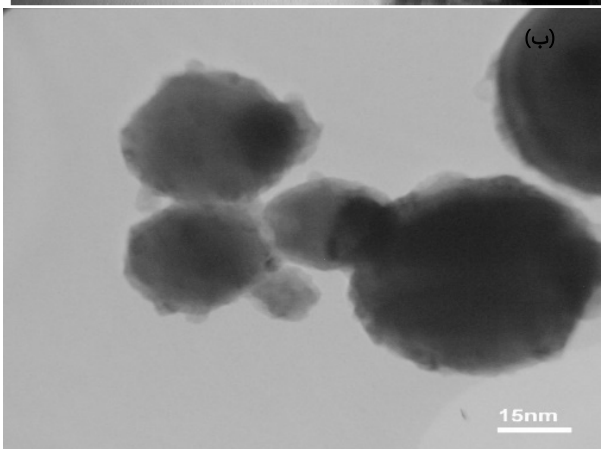
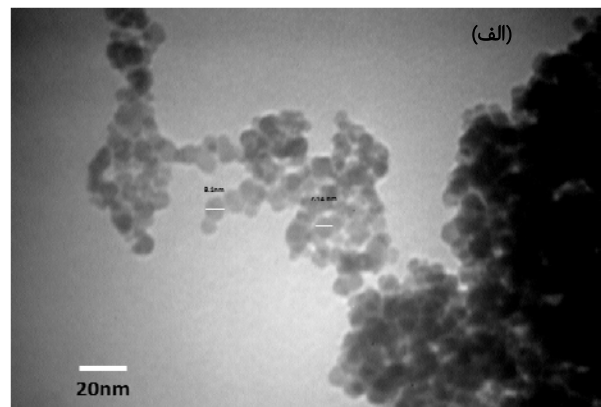
شکل ۴) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات اکسید آهن (الف) و آهن صفر (ب)



شکل ۵) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به سویه EAMYO پوشیده شده با نانوذرات اکسید آهن (الف) و آهن صفر (ب)



شکل ۲) برهم کنش پارامتر A (غلظت منبع گوگرد) و B (غلظت منبع کربن) در نمودار سه بعدی سطح پاسخ R2 برای میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO



شکل ۳) تصاویر TEM نانوذرات اکسید آهن (الف) و آهن صفر (ب)

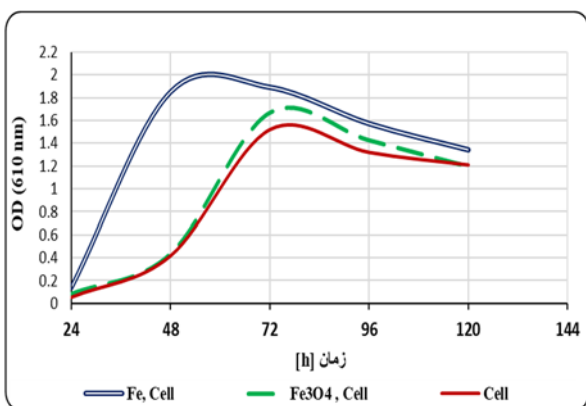
برای بررسی خواص سطحی نانوذرات از تصاویر SEM استفاده شد. مبنای عملکرد این میکروسکوپ، برهم کنش پرتوی الکترونی با ماده است. پرتوهای ساطع شده از این واکنش می توانند برای ارزیابی ها مورد استفاده قرار گیرند. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود در مطالعه حاضر نانوذرات مورد استفاده از ساختاری کاملاً کروی و توزیع مناسب اندازه ذرات برخوردارند و نانوذراتی که به شکل کلوخه دیده می شوند، در حقیقت مجموعه ای با شکل کروی و یکنواخت هستند. شکل ۵ سلول های پوشیده شده از نانوذرات را نشان می دهد. نانوذرات در سطح سلول به خوبی تثبیت شده اند.

حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته میزان فعالیت گوگردزدایی افزایش قابل توجهی داشته است. بررسی میزان فعالیت گوگردزدایی و میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل به روش تست گیس و آنالیز HPLC نشان داد که میکروارگانیزم دارای پوشش نانوذره Fe_0 اصلاح شده با نشاسته بیشترین فعالیت گوگردزدایی را در ۴۸ ساعت نشان می‌دهد و بعد از آن تقریباً ثابت می‌شود و تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل را تا ۱۲۰ ساعت ادامه می‌دهد. در حالی که میکروارگانیزم دارای پوشش نانوذره Fe_3O_4 اصلاح شده با نشاسته و بدون پوشش نانوذره بیشترین میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل را در ۷۲ ساعت نشان می‌دهد.

افزایش تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط میکروارگانیزم دارای پوشش نانوذره Fe_0 اصلاح شده با نشاسته احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت میکروارگانیزم و افزایش نفوذپذیری غشا پس از اتصال نانوذرات است. نانوذرات با جذب سطحی ترکیبات گوگردی دسترس‌پذیری آنها را برای میکروارگانیزم آسان‌تر می‌کند و انتقال DBT به درون میکروارگانیزم و ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل به بیرون میکروارگانیزم از سیتوپلاسم را تسهیل می‌کنند.

نتایج تست گیس نشان داد که میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط میکروارگانیزم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO در حضور نانوذرات اصلاح شده با نشاسته Fe_0 و Fe_3O_4 به ترتیب $58/83 \text{ mg l}^{-1}$ و $51/50 \text{ mg l}^{-1}$ پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای 55°C به دست آمد، در حالی که در سلول فاقد پوشش نانوذرات $46/50 \text{ mg l}^{-1}$ گزارش شد. میزان فعالیت گوگردزدایی در حضور نانوذرات اصلاح شده با نشاسته Fe_0 و Fe_3O_4 به ترتیب $26/52\%$ و $10/75\%$ در مقایسه با سلول فاقد پوشش نانوذرات افزایش یافت (نمودار ۳).

نتایج حاصل از آنالیز HPLC نیز نشان داد که میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط باکتری پوشش‌یافته با نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته در مقایسه با انواع فاقد پوشش آنها افزایش می‌یابد (نمودار ۴).



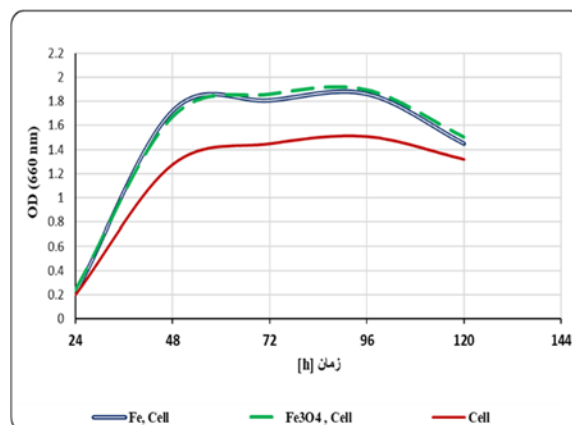
نمودار ۳) میزان فعالیت گوگردزدایی میکروارگانیزم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO در حضور و عدم حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته به روش تست گیس

تاثیر نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته بر میزان رشد و فعالیت گوگردزدایی میکروارگانیزم

یکی از مشکلات فرآیندهای زیستی بازده پایین تولید محصول است. برای دستیابی به این هدف می‌توان از روش تثبیت سلول‌ها روی بسترهای مناسب استفاده کرد [14]. یکی دیگر از مشکلات فرآیندهای زیستی که به صورت سامانه‌های دوفازی هستند، محدودیت انتقال جرم است که در این مورد نیز استفاده از نانوجاذب راه حل پیشنهادی مناسبی است. میزان فعالیت گوگردزدایی زیستی که به طور طبیعی توسط میکروارگانیزم‌ها انجام می‌شود، برای فرآیندهای صنعتی و تجاری پایین است. بنابراین در این مطالعه از نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته به عنوان بستری برای تثبیت میکروارگانیزم استفاده شد.

میزان رشد باکتری در حضور و عدم حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته

رشد باکتری *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO به روش دانسیته نوری (OD) در طول موج 660 nm در حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته نشان داد که این نانوذرات نه تنها اثر سمی بر رشد میکروارگانیزم ندارند، بلکه سبب افزایش رشد این باکتری در ۹۶ ساعت شد ($1/864$ و $1/896$ به ترتیب در حضور نانوذرات Fe_0 و Fe_3O_4)، در حالی که بیشترین میزان رشد در عدم حضور نانوذرات در ۹۶ ساعت، $1/51$ بود. درواقع میزان رشد باکتری در حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته افزایش داشت. نتایج تاثیر نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته بر میزان رشد باکتری مورد مطالعه در نمودار ۲ ارائه شده است.



نمودار ۲) میزان رشد میکروارگانیزم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO در حضور و عدم حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته به روش دانسیته نوری

میزان فعالیت گوگردزدایی سویه EAMYO در حضور و عدم حضور نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته

نمودار ۲ میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل میکروارگانیزم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO را در عدم پوشش و دارای پوشش نانوذرات آهن اصلاح شده با نشاسته نشان می‌دهد. در

مکمل آن استفاده شود باید دو مرحله اساسی در پالایش را مورد بررسی قرار داد: (۱) انتخاب بیوکاتالیست مناسب؛ (۲) جداسازی نفت از بیوکاتالیست و محصولات فرعی

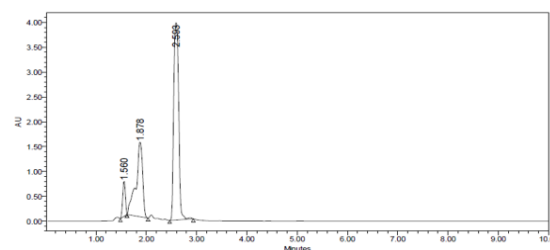
عربیان و همکاران در مطالعه خود روی اثر غلظت‌های مختلف DBT (۲۵۰ تا ۱۲۵۰ ppm) روی میزان فعالیت گوگردزدایی *Bacillus cereus* HN گزارش دادند که با افزایش غلظت DBT میزان فعالیت گوگردزدایی این میکروارگانیسم افزایش یافته است و در غلظت ۱۲۵۰ ppm، فعالیت گوگردزدایی را ۸۰٪ گزارش کردند [15]. جیا و همکاران نشان دادند که در باکتری *Gordonia* سویه WQ-01 و سویه جهش‌یافته WQ-01A میزان فعالیت گوگردزدایی با غلظت DBT ارتباط مستقیم دارد [16]. در مطالعه حاضر نیز با افزایش دی‌بنزوتیوفن تا ۵۰۰ ppm، میزان فعالیت گوگردزدایی سویه EAMYO افزایش می‌یابد که این افزایش را می‌توان به دلیل انتشار بیشتر دی‌بنزوتیوفن دانست.

هی و همکاران اثر نیکوتین‌آمید و ربیوفلاوین را روی فعالیت گوگردزدایی *Rodococcus erythropolis* سویه USTB03 بررسی کردند و نشان دادند که با افزودن ۵ میکرومول نیکوتین‌آمید یا ۲۵ میکرومول ربیوفلاوین به محیط کشت بیش از ۱۳٪ افزایش در فعالیت گوگردزدایی سویه به دست می‌آید [17]. دریکوند و همکاران نشان دادند که افزودن ۶۷/۱۰ میلی‌مول نیکوتین‌آمید و ۳۴/۲ میکرومول ربیوفلاوین در افزایش سرعت گوگردزدایی *Rodococcus erythropolis* سویه R₁ از طریق القای اپرون dsz موثر است. همچنین علی‌رغم افزایش فعالیت گوگردزدایی، منجر به کاهش سرعت رشد و تولید زیست‌توده به دلیل اثر بازدارندگی ۲- هیدروکسی‌بی‌افنیل می‌شود [18]. در تحقیقات دیگر بیان کردند که در *Rodococcus erythropolis* IGTS8 در مسیر گوگردزدایی زیستی تقریباً به ۴ مول NADH به ازای گوگردزدایی یک مول DBT نیاز است [19].

در مطالعه حاضر، افزودن ۶/۰ میلی‌گرم در لیتر نیکوتین‌آمید به محیط کشت میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO بالاترین رشد سلولی و فعالیت گوگردزدایی را در مقایسه با منابع دیگر نیتروژن نشان داد.

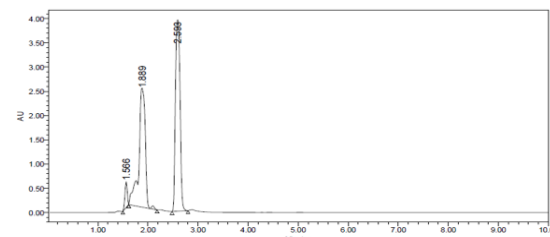
در مطالعات پیشین از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن استفاده شد که علاوه بر افزایش میزان فعالیت گوگردزدایی زیستی میکروارگانیسم‌ها، جداسازی مغناطیسی بیوکاتالیست را سبب می‌شود [12]. استفاده از نانوذرات آهن برای پوشش‌دهی میکروارگانیسم‌ها و تثبیت بهتر آنها مناسب است و می‌توان در هر مرحله‌ای از این فرآیند میکروارگانیسم‌ها را جداسازی کرد. نانوذرات به دلیل سطح ویژه زیاد و انرژی سطحی بالا به صورت محکم بر سطح سلول‌ها جذب می‌شوند.

همچنین نیگام و همکاران نانوذرات مغناطیسی به روش هم‌رسوبی را سنتز کردند که تصاویر TEM آنها نانوذراتی با اندازه تقریباً ۱۰-۸ نانومتر را نشان داد [20]. در مطالعه حاضر اندازه نانوذرات آهن پوشش‌داده‌شده با نشاسته طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی



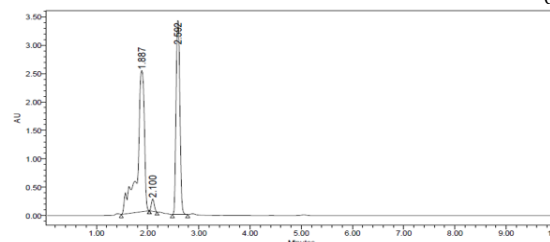
RT	Area	% Area	Height
1 1.560	2634009	6.05	695703
2 1.878	13933627	32.00	1526069
3 2.593	26981176	61.96	4056646

(A)



RT	Area	% Area	Height
1 1.566	1691328	3.43	508167
2 1.889	22248321	45.14	2483468
3 2.593	25350960	51.43	3998883

(B)



RT	Area	% Area	Height
1 1.887	23999796	56.33	2518784
2 2.100	847937	1.99	213910
3 2.592	17750254	41.68	3486943

(C)

نمودار ۴ کروماتوگرام HPLC تولید ۲-هیدروکسی‌بی‌افنیل توسط میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* در عدم حضور نانوذرات (A)؛ در حضور نانوذرات اصلاح‌شده با نشاسته (B)؛ در حضور نانوذرات اصلاح‌شده با نشاسته (C)

بحث

تلاش‌های بسیاری برای توسعه فرآیندهای گوگردزدایی زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که قادر به شکست پیوند کربن-گوگرد باشند انجام شده است و بررسی‌های بنیادی و کاربردی عملکرد خوب این فرآیند در آینده است. از نقطه نظر مهندسی شیمی گوگردزدایی زیستی یک فرآیند استخراج اکسیداسیونی است که در آن باکتری به عنوان یک کاتالیزور عمل می‌کند و واکنش در حضور سلول میکروبی زنده انجام می‌شود. به طور کلی روش‌های گوگردزدایی زیستی با استفاده از فعالیت‌های فیزیولوژیک و آنزیمی میکروارگانیسم‌ها باعث پیشرفت واکنش‌های موثر و تکنولوژی‌های سازگار با محیط زیست شده است [6].

برای فراهم کردن فرآیند گوگردزدایی زیستی که توانایی رقابت با روش هیدروژنی در مرحله صنعتی شدن را داشته باشد و یا به عنوان

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

سهم نویسندگان: نرگس اعتمادی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۶۰٪)؛ عباس اخوان‌سپاهی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۱۰٪)؛ فاطمه یزدیان (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ قاسمعلی محبعلی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

منابع

- 1- Mohebbali G, Ball AS, Rasekh B, Kaytash A. Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(4):578-84.
- 2- Kilbane JJ, Bielaga BA. Toward sulfur-free fuels. *Chem Technol*. 1990;20:747-51.
- 3- Maxwell S, Yu J. Selective desulfurization of dibenzothiophene by a soil bacterium: Microbial DBT desulfurization. *Process Biochem*. 2000;35(6):551-6.
- 4- Kim HY, Kim TS, Kim BH. Degredation of organic sulfur compounds and reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* M6. *Biotechnol Lett*. 1990;12(10):761-4.
- 5- Kilbane JJ, Jackowski K. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol Bioeng*. 1992;40(9):1107-14.
- 6- Kayser KJ, Cleveland L, Park H, Kwak J, Kolhatkar A, Kilbane JJ. Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;59(6):737-46.
- 7- Ansari F, Grigoriev P, Libor S, Tothill IE, Ramsden JJ. DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 with magnetic Fe3O4 nanoparticles. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(5):1505-12.
- 8- Shen YF, Tang J, Nie ZH, Wang YD, Ren Y, Zuo L. Preparation and application of magnetic Fe3O4 nanoparticles for wastewater purification. *Sep Purif Technol*. 2009;68(3):312-9.
- 9- Shan G, Xing J, Zhang H, Liu H. Biodesulfurization of Dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(8):4497-502.
- 10- Zhang H, Shan G, Liu H, Xing J. Surface modification of γ -Al2O3 nano- particles with gum arabic and its applications in adsorption and biodesulfurization. *Surf Coat Technol*. 2007;201(16-17):6917-21.
- 11- Etemadi N, Sepahy AA, Mohebbali G, Yazdian F, Omid M. Enhancement of bio-desulfurization capability of a newly isolated thermophilic bacterium using starch/iron nanoparticles in a controlled system. *Int J Biol Macromol*. 2018;120:1801-9.
- 12- Bardania H, Raheb J, Mohammad-Beigi H, Rasekh B, Arpanaei A. Desulfurization activity and reusability of magnetite nanoparticle-coated *Rhodococcus erythropolis* FMF and *R. erythropolis* IGTS8 bacterial cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2013;60(3):323-9.
- 13- Irani ZA, Mehrnia MR, Yazdian F, Soheily M, Mohebbali G, Rasekh B. Analysis of petroleum biodesulfurization in an airlift bioreactor using response surface methodology.

حدود ۳۰-۲۰ نانومتر تخمین زده شد و تصاویر بیانگر شکل کروی و یکنواخت نانوذرات هستند.

در مطالعات قبلی مشاهده شده است که سلول‌های پوشیده با نانوذرات مغناطیسی (Fe_3O_4)، ۵۶٪ بیشتر از سلول‌های غیرپوشیده فعالیت گوگردزایی از DBT نشان می‌دهند^[7]. دلیل این افزایش فعالیت، تاثیر نانوذرات بر نفوذپذیری غشای میکروارگانیسم‌ها و تسهیل ورود و خروج واکنشگرها و محصولات است. رودوکوکوس‌های پوشیده‌شده با نانوذرات مغناطیسی به راحتی بازیافت می‌شوند و به آسانی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

کریمی و همکاران در بررسی رشد میکروارگانیسم *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 در حضور نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن نشان دادند که این نانوذرات نه تنها اثر سمی بر رشد میکروارگانیسم ندارند، بلکه سبب رشد آن تا ۱۴۸ ساعت ($\text{OD}_{600} = 3/41$) می‌شود، در حالی که بیشترین میزان رشد در عدم حضور نانوذرات تا ۹۶ ساعت ($\text{OD}_{600} = 2/54$) مشاهده شد. درواقع میزان رشد میکروارگانیسم *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 در حضور نانوذرات مغناطیسی حدود ۴٪ افزایش نشان داد. همچنین در بررسی میزان فعالیت گوگردزایی به روش تست گیبس نشان دادند که میکروارگانیسم *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 در حضور نانوذرات مغناطیسی تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل با شدت بیشتری تا ۱۴۸ ساعت ادامه می‌دهد. درواقع در مورد میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط این میکروارگانیسم در ۱۴۸ ساعت ۲۱۰/۰ میلی‌مول بیشترین مقدار است، در حالی که در عدم حضور نانوذرات مغناطیسی بیشترین میزان تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط این میکروارگانیسم در ۹۶ ساعت ۱۸۲/۰ میلی‌مول بود. به طور کلی در این مطالعه، در حضور نانوذرات مغناطیسی حدود ۱۶٪ افزایش در فعالیت گوگردزایی رودوکوکوس مشاهده شد^[14]. بر دنیا و همکاران تاثیر نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با اندازه تقریبی ۸-۵ نانومتر را بر فعالیت گوگردزایی دو میکروارگانیسم *Rhodococcus erythropolis* FMF و *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات مغناطیسی تاثیری بر میزان فعالیت گوگردزایی میکروارگانیسم‌ها ندارند و تنها مزیت استفاده از آنها در جداسازی بیوکاتالیست است^[12].

در مطالعه حاضر تولید ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل توسط میکروارگانیسم *Bacillus thermoamylovorans* EAMYO در حضور نانوذرات Fe_3O_4 و Fe_0 نشاسته به ترتیب ۵۸/۸۳ و $51/50 \text{ mg l}^{-1}$ پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۵۵°C به دست آمد، در حالی که در سلول فاقد پوشش نانوذرات $46/50 \text{ mg l}^{-1}$ بود. میزان فعالیت گوگردزایی سویه در حضور نانوذرات Fe_0 نشاسته و Fe_3O_4 نشاسته به ترتیب ۲۶/۵۲ و ۱۰/۷۵٪ در مقایسه با سلول فاقد پوشش نانوذرات افزایش یافت.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

Jun N. Effects of nicotinamide and riboflavin on the biodesulfurization activity of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* USTB-03. *J Environ Sci*. 2008;20(5):613-8.

18- Derikvand P, Etemadifar Z, Saber H. Optimization of nicotinamide and riboflavin in the biodesulfurization of dibenzothiophene using response surface methodology. *Biol J Microorg*. 2013;1(4):35-40.

19- Mohebbali G, Ball AS. Biodesulfurization of diesel fuels- Past, present and future perspectives. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016;110:163-80.

20- Nigam S, Barick KC, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J Magn Magn Mater*. 2011;323(2):237-43.

Bioresour Technol. 2011;102(22):10585-91.

14- Karimi E, Jeffries C, Yazdian F, Akhavan Sepahi A, Hatamian A, Rasekh B, et al. DBT desulfurization by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 using magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in a bioreactor. *Eng Life Sci*. 2017;17(5):528-35.

15- Arabian D, Najafi H, Farhai F, Molaei Dehkordi A. Biodesulfurization of simulated light fuel oil by a native isolated bacteria *Bacillus Cereus* HN. *J Pet Sci Technol*. 2014;4(1):29-38. [Persian]

16- Jia X, Wen J, Sun Z, Caiyin Q, Xie S. Modeling of DBT biodegradation behaviors by resting cells of *Gordonia* sp. WQ- 01 and its mutant in oil-water dispersions. *Chem Eng Sci*. 2006;61(6):1987-2000.

17- Hai Y, Xudong SU, Qianqian XU, Zhao MA, Chengbin XI,