

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΘΕΙΩΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ

**Κ. Δήμος¹, Π. Καλογερόπουλος¹, Ο. Χατζηλάμπρος¹, Σ. Σαρρής², Θ. Λυμπεροπούλου³,
Δ. Χατζηνικολάου⁴, Δ. Μαμμά¹, Ν. Παπαγιαννάκος², Δ. Κέκος^{1*}**

¹ Εργαστήριο βιοτεχνολογίας, ² Εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών, ³ Οριζόντιο Εγαστήριο Ελέγχου Ποιότητας Διεργασιών και Προϊόντων, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

⁴ Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

(*kekos@chemeng.ntua.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη βιολογική αποθείωση ενώσεων που απαντώνται στα διάφορα κλάσματα πετρελαίου. Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση παραμέτρων που επηρεάζουν την παραγωγή κυτταρικής μάζας με υψηλή αποθειωτική ικανότητα από το βακτήριο *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων πηγών θείου (θειοφαίνιο-TH, διβενζοθειοφαίνιο-DBT, διμεθυλοσουλφοξείδιο- DMSO), η επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής θείου καθώς και της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Κυτταρική μάζα που παρήχθη στις βέλτιστες συνθήκες χρησιμοποιήθηκε για την αποθείωση του DBT τόσο σε υδατικό όσο και σε διφασικό σύστημα. Στο στάδιο της αποθείωσης μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη, της κυτταρικής συγκέντρωσης και της συγκέντρωσης του DBT.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιομηχανία πετρελαίου έρχεται αντιμέτωπη με τις απαιτήσεις ριζικής μείωσης των εκπομπών διοξειδίου του θείου (SO₂). Οι ενώσεις του θείου στο πετρέλαιο χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανόργανες (SO_x, H₂S) και οργανικές (αρωματικές ή αλειφατικές θειόλες, σουλφίδια ή ετεροκυκλικές ενώσεις). Μεταξύ των παραπάνω, οι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις όπως το διβενζοθειοφαίνιο (DBT) και τα παράγωγά του, το 4,6-διμεθυλοδιβενζοθenoφαίνιο (4,6-DMDBT), για παράδειγμα, οι κύριες θειικές ενώσεις του Gasoil και συνεπώς του Diesel, έχουν μεγάλη σημασία.

Με βάση τα νέα νομοθετικά πλαίσια που αφορούν στη μείωση της περιεκτικότητας σε θείο στα καύσιμα (10 ppm στα υγρά καύσιμα κίνησης με βάση την οδηγία Directive 2009/30/EC και 0.5% κ.β στα ναυτιλιακά καύσιμα σύμφωνα με την οδηγία Directive 2012/33/EU) είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων και χαμηλού κόστους διεργασιών αποθείωσης. Η υλοποίηση των ορίων στόχων με τις υπάρχουσες τεχνικές αποθείωσης είναι εξαιρετικά ενεργοβόρα. Η βιολογική αποθείωση (BioDeSulfurization - BDS) προβάλλει τα τελευταία χρόνια ως μια περιβαλλοντικά φιλική και χαμηλών ενεργειακών απαιτήσεων διεργασία αποθείωσης πετρελαϊκών κλασμάτων. Επιλεγμένα μικροβιακά στελέχη μπορούν και διασπούν τις θειούχες ενώσεις του πετρελαίου καταναλώνοντας το θείο που περιέχεται σε αυτές. Πραγματοποιείται δε, τόσο από αναερόβιους όσο και από αερόβιους μικροοργανισμούς. Δύο είναι τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια αερόβιας αποικοδόμησης των θειοφαινίων (TH) που έχουν μελετηθεί: το μονοπάτι Kodama και το μονοπάτι 4S. Τεχνολογικό ενδιαφέρον έχει μόνο το μονοπάτι 4S καθώς οδηγεί σε πλήρη απομάκρυνση του θείου με ταυτόχρονη παραγωγή 2-υδρόξυ-διφαινύλιου (2-hydroxy-biphenyl, 2HBP) με αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται το ανθρακικό περιεχόμενο του επεξεργαζόμενου καυσίμου^[1].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η ανάπτυξη του εμβολίου πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani). Για την βελτιστοποίηση του μέσου ανάπτυξης, το βακτήριο *R. rhodochrous* IGTS8 αναπτύχθηκε στο Basalt Salt Medium (BSM) το οποίο περιείχε την κατάλληλη πηγή άνθρακα (γλυκόζη) και την κατάλληλη

πηγή θείου (DBT, DMSO και TH).^[2] Για τον προσδιορισμό της αποθειωτικής ικανότητας των κυττάρων, εφαρμόστηκε η τεχνική των μη αναπτυσσόμενων κυττάρων (resting cells) σε υδατικό και διφασικό σύστημα όπως περιγράφεται βιβλιογραφικά.^[2,3] Οι συγκεντρώσεις του DBT και του προϊόντος αποθείωσης 2-υδρόξυ-διφαινύλιου (2HBP) προσδιορίστηκαν με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.^[2]

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Μελέτη των συνθηκών ανάπτυξης του βακτηρίου *R. rhodochrous* IGTS8

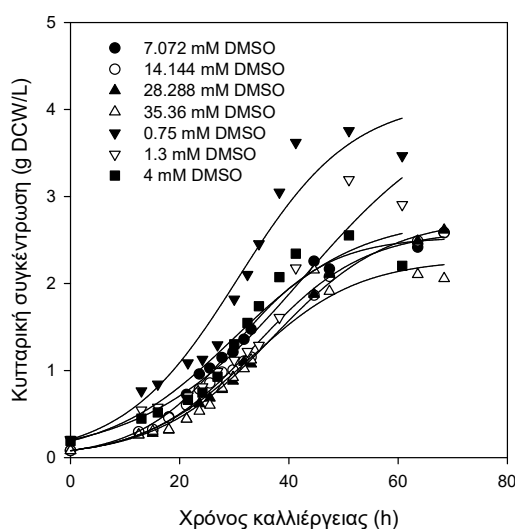
Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση παραμέτρων που επηρεάζουν την παραγωγή κυτταρικής μάζας με υψηλή αποθειωτική ικανότητα από το βακτήριο *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση τριών πηγών θείου ήτοι DMSO, DBT και TH. Τα αποτελέσματα της μέγιστης κυτταρικής ανάπτυξης (X_{max}) παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Επίδραση της πηγής S στην παραγωγή βιομάζας

Πηγή S	Μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση (X_{max} , g DCW/L)
TH	0.76
DBT	1.93
DMSO	2.83

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 1 το βακτήριο αναπτύσσεται καλύτερα όταν το DMSO χρησιμοποιείται ως πηγή θείου, γεγονός που μπορεί να αποδωθεί στη χαμηλή διαλυτότητα των TH και DBT στο νερό με αποτέλεσμα τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά τους στα κύτταρα.

Επιλέχθηκε το DMSO ως πηγή θείου για τους επόμενους πειραματισμούς, όπου διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO (από 0.75 mM έως 35.36 mM) στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Σε όλους τους πειραματισμούς πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη σε συγκέντρωση 20 g/L. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO στην ανάπτυξη του βακτηρίου *R. rhodochrous* IGTS8.

Αύξηση της συγκέντρωσης του DMSO οδηγεί σε μείωση της παραγόμενης κυτταρικής μάζας. Συγκεκριμένα δεκπλασιασμός της συγκέντρωσης του DMSO (από 1.3 σε 14.14 mM) οδηγεί σε 23% μείωση της κυτταρικής μάζας. Η μείωση αυτή σε υψηλές συγκεντρώσεις θείου ερμηνεύεται από την παρεμπόδιση που εμφανίζει το υπόστρωμα στην ανάπτυξη.

Ακολουθώντας διατηρώντας σταθερή την πηγή και την συγκέντρωση του θείου στο μέσο καλλιέργειας (DMSO, 1.3 mM), μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα (γλυκόζη) στην ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Επίδραση της συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή βιομάζας

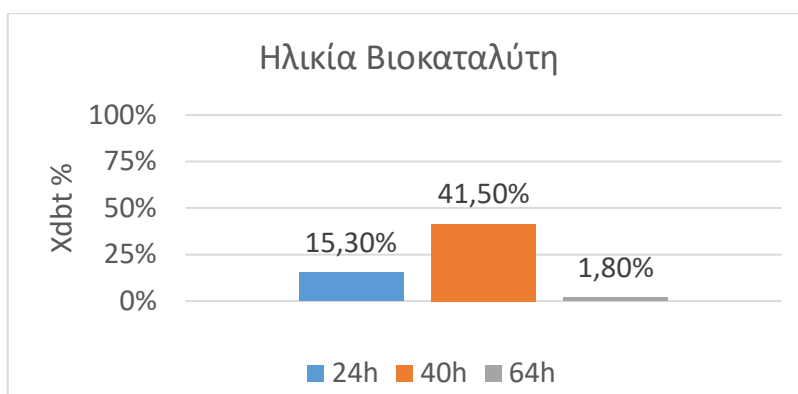
Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	X _{max} (g DCW/L)
10	2.04
20	3.35
30	2.85
40	2.38

Προκύπτει ότι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας επιτυγχάνεται για συγκέντρωση γλυκόζης 20 g/L. Αυξάνοντας την συγκέντρωση της γλυκόζης παρατηρείται μείωση της παραγόμενης βιομάζας και αυτό πιθανά οφείλεται σε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με αυτά των del Olmo et al. [2]

2. Μελέτη της αποθειωτικής ικανότητας μη αναπτυσσόμενων κυττάρων του βακτηρίου *R. rhodochrous* IGTS8 σε υδατικό και διφασικό σύστημα

Μετά την βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής του βιοκαταλύτη (*R. rhodochrous* IGTS8) εξετάστηκε η αποθειωτική ικανότητα αυτού σε υδατικό και διφασικό σύστημα.

Αρχικά μελετήθηκε επίσης η επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη στην αποθείωση του DBT, συγκέντρωσης 1.125 mM σε υδατικό σύστημα. Χρησιμοποιήθηκαν μη αναπτυσσόμενα κύτταρα του βιοκαταλύτη σε συγκέντρωση 7.5 g DCW/L. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.

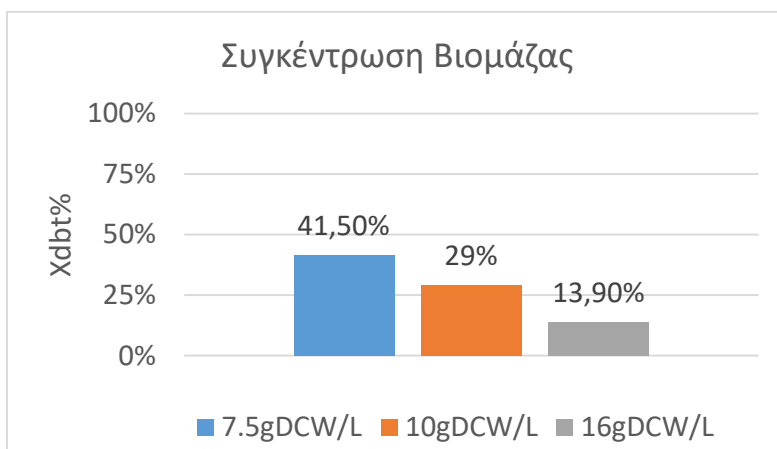


Σχήμα 2: Η επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη στην αποθείωση του DBT

Τα μεγαλύτερο ποσοστό αποθείωσης 41.5%, επιτεύχθηκε από τα κύτταρα που ελήφθησαν μετά από 40 ώρες καλλιέργειας. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στο άνω σημείο της εκθετικής φάσης

ανάπτυξης (Σχήμα 1). Κύτταρα που ελήφθησαν από τη φάση στασιμότητας, δηλ. μετά από 64 ώρες ανάπτυξης εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλή αποθειωτική ικανότητα.

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της κυτταρικής μάζας ηλικίας 40 ωρών, στην αποθείωση του DBT σε υδατικό σύστημα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Η επίδραση της συγκέντρωσης βιομάζας στην αποθείωση του DBT

Η αύξηση της συγκέντρωσης της κυτταρικής μάζας οδήγησε με μείωση του ποσοστού αποθείωσης του DBT. Αυτό οφείλεται πιθανά σε προβλήματα μεταφοράς μάζας, ειδικά μεταφοράς οξυγόνου, το οποίο απαιτείται για την αποθείωση του DBT.

Ακολούθως μελετήθηκε η αποθείωση διαφόρων συγκεντρώσεων DBT από τα μη αναπτυσσόμενα κύτταρα του βακτηρίου σε διφασικό σύστημα δωδεκανίου/νερού σε αναλογία 1/1 (ο/ο). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αποθειωτική ικανότητα μη αναπτυσσόμενων κυττάρων σε διφασικό σύστημα δωδεκανίου/νερού.

Συγκέντρωση DBT (mM)	Ποσοστό αποθείωσης (%)
1	47
5	45
7.5	14
10	0.1

Ποσοστό αποθείωσης ίσο με 47% επιτεύχθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση DBT. Αύξηση της συγκέντρωσης του DBT στην οργανική φάση οδηγεί σε μείωση του ποσοστού αποθείωσης.

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της κυτταρικής συγκέντρωσης των μη αναπτυσσόμενων κυττάρων στην αποθείωση του DBT σε διφασικό σύστημα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Η βέλτιστη συγκέντρωση κυττάρων ήταν τα 12 g DCW/L ενώ με περεταίρω αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης μειώνεται το ποσοστό αποθείωσης του DBT. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται σε περιορισμούς στη μεταφορά μάζας και στην δυσκολία κάποιων κυττάρων να έλθουν σε επαφή με την οργανική φάση όπου είναι διαλυμένο το DBT^[4].

Πίνακας 5. Επίδραση της κυτταρικής συγκέντρωσης στην αποθείωση του DBT σε διφασικό σύστημα δωδεκανίου/νερού

Συγκέντρωση κυτταρικής μάζας (g DCW/L)	Ποσοστό αποθείωσης (%)
20	0
15	0.1
12	13.68
10	5.63

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Υψηλή παραγωγή κυτταρικής μάζας από το βακτήριο *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 επιτυγχάνεται κατά την ανάπτυξη του σε DMSO ως πηγή θείου συγκέντρωσης 1.3 mM και πηγή άνθρακα γλυκόζη συγκέντρωσης 20 g/L. Η ηλικία του βιοκαταλύτη φαίνεται να είναι σημαντική παράμετρος της διαδικασίας αποθείωσης. Κύτταρα της ύστερης εκθετικής φάσης ανάπτυξης εμφανίζουν υψηλή αποθειωτική ικανότητα σε σχέση με αυτά της φάσης στασισιμότητας. Η υψηλή συγκέντρωση κυτταρικής μάζας κατά την αποθείωση του DBT τόσο σε υδατικό όσο και σε διφασικό σύστημα δωδεκανίου/νερού, οδηγεί σε μείωση του ποσοστού αποθείωσης, πιθανά λόγω προβλημάτων μεταφοράς μάζας. Τέλος αύξηση της συγκέντρωσης του DBT στην οργανική φάση οδηγεί σε μείωση της αποθείωσης αυτού.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Ανάπτυξη συνδυασμένης χημικής και βιολογικής διεργασίας για την υπερ-αποθείωση πετρελαϊκών προϊόντων- [DeerDesOil]», και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ 2014-2020), Δράση ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ (κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-02074).

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] F. Li, Z. Zhang, J. Feng, X. Cai, P. Xu. J. Biotechnol. 127 (2007) 222-228.
- [2] G. Mohebali, A. S. Ball. Int. Biodeter. Biodegr. 110 (2016) 163-180.
- [3] C. H. del Olmo, V. E. Santos, A. Alcon, F. Garcia-Ocho. Biochem. Eng. J. 22 (2005) 229-237.
- [4] S. Maghsoudi, M. Vossoughi, A. Kheiriloom, E. Tanaka, S. Katoh. Biochem. Eng. J. 8 (2) (2001) 151-156