به نام خدا

دانشگاه شاهد

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان:

شناسایی، جداسازی و تعیین ترادف ژن‌های dsz A, B, C از سویه تازه جدا شده *Stenotrophomonas kho ۴* از خاک‌های آلوده به نفت اهواز

نگارش:

محمد زارعی

استادان راهنما:

۱- دکتر ایرج رسولی

۲- دکتر محمد رعایایی اردکانی

استاد مشاور:

دکتر حمید گله‌داری

دی ماه ۱۳۸۹

دانشگاه شاهد

دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی
با تاییدات الهی و استعانت از حضرت ولیعصر "عج"

جلسه دفاعیه پایان نامه آقای **محمد زارعی** به شماره دانشجویی **۸۶۷۵۸۶۵۰۳** در رشته
میکروبیولوژی در مقطع کارشناسی ارشد

تحت عنوان:

جداسازی، شناسایی و تعیین توالف ژن های dsz ABC از سویه تازه جدا شده *Stenotrophomonas kh04* از خاک های آلوده به نفت اهواز

به ارزش ۸ واحد راس ساعت ۱۱ روز **چهارشنبه** مورخ **۱۳۸۹/۱۰/۱۵** در دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تشکیل گردید. هیات داوران پس از استماع دفاعیات و پرسش های لازم، نمره و درجه ایشان را به شرح زیر اعلام میدارند:

نمره پایان نامه به عدد ۱۸/۲۵ نمره پایان نامه به حرف هجده و بیست صدم درجه عالی

درجه عالی۲۰-۱۸ بسیار خوب ۱۷/۹۹-۱۶ خوب ۱۵/۹۹-۱۴ قابل قبول ۱۳/۹۹-۱۲ و غیر قابل قبول کمتر از ۱۲

عنوان	نام ونام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	امضا
استاد راهنما مسئول	دکتر ایرج رسولی	استاد	
استاد راهنمای دوم	دکتر محمد رضا پایی اردکانی	دانشیار	
استاد مشاور	دکتر حمید گله داری	دانشیار	
داور اول	دکتر چهره جواد حامدی	استادیار	
داور دوم	دکتر سیدلطیف موسوی گرگری	دانشیار	
نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	دکتر منیژه کومی	استادیار	
نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر حمیدرضا توپدی	استادیار	

	اظهار نامه دانشجو	شماره : تاریخ:

اینجانب محمد زارعی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژ ی گرایش میکروبی دانشکده علوم دانشگاه شاهد، گواهی می‌دهم که پایان نامه تدوین شده حاضر با عنوان " جداسازی، شناسایی و تعیین توالی ژن‌های dsz A، dsz B و dsz C از باکتری تازه جدا شده *Stenotrophomonas* sp. strain skho4" به راهنمایی استاد محترم جناب آقای دکتر ایرج رسولی، توسط شخص اینجانب انجام و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن، مورد تایید است و چنان چه هر زمان، دانشگاه کسب اطلاع کند که گزارش پایان نامه حاضر صحت و اصالت لازم را نداشته، دانشگاه حق دارد، مدرک تحصیلی اینجانب را مسترد و ابطال نماید هم چنین اعلام می دارم در صورت بهره گیری ا ز منابع مختلف شامل گزارش های تحقیقاتی، رساله، پایان نامه، کتاب، مقالات تخصصی وغیره، به منبع مورد استفاده و پدید آورنده آن به طور دقیق ارجاع داده شده و نیز مطالب مندرج در پایان نامه حاضر تاکنون برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی توسط اینجانب و یا سایر افراد به هیچ کجاارایه نشده است.در تدوین متن پایان نامه حاضر، چارچوب مصوب تدوین گزارش های پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه شاهد به طور کامل مراعات شده و نهایتا" این که کلیه حقوق مادی ناشی از گزارش پایان نامه حاضر، متعلق به دانشگاه شاهد می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو محمد زارعی

امضاء دانشجو:

تاریخ: ۸۹/۱۰/۱۴

تقدیم به پدرم که یادش همیشه مایه دلگرمی بود.

مادرم، برادرانم و همسرم که در تمام مراحل زندگی پشتیبان من هستند و ارسلان تنها بهانه زندگیم.

با تقدیر و تشکر فراوان از مادر، همسر، برادران و خواهران عزیزم که تمام داشته‌هایم حاصل کمک‌های آنهاست.

همچنین لازم است که به رسم ادب از :

- مدیریت محترم گروه زیست شناسی دانشگاه شاهد
- پرسنل و کارشناسان پر تلاش گروه دانشکده علوم دانشگاه شاهد
- پرسنل و کارشناسان پر تلاش دانشگاه شاهد
- گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز
- ریاست محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی دانشگاه شهید چمران اهواز جناب آقای دکتر رعایایی
- جناب آقای دکتر نجف زاده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
- همکلاسی‌های بزرگوار که در حل مشکلات و در سختی‌ها همواره اینجانب را مورد لطف خود قرار دادند.
- دانشجویان کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی دانشگاه شهید چمران اهواز
- اساتید بزرگوارم در دوره کارشناسی
- اساتید بزرگوارم در دوره کارشناسی ارشد

و تمامی کسانی که در انجام هر چه بهتر این رساله اینجانب را یاری دادند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

محمد زارعی

دی ماه ۱۳۸۹

فهرست مطالب:

چکیده فارسی i

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- راه حل‌ها ۷
۱-۳-گوگرد زدایی زیستی ۱۱
۱-۴- هدف ۱۲

فصل دوم: کلیات

۲-۱- نفت خام ۱۵
۲-۲- گوگرد در نفت خام ۱۸
۲-۳- انتشار دی اکسید گوگرد ومشکلات ناشی از آن ۲۳
۲-۴- محدودیت گوگرد در ساخت های فسیلی ۲۴
۲-۵- گوگرد زدایی هیدروژنی ۲۵
۲-۶- بیودسولفوریزاسیون ۲۸
۲-۷- ترکیبات مدل در گوگرد زدایی زیستی ۲۹
۲-۸- گوگرد زدایی بیولوژیک هوازی ۳۰
۲-۸-۱- مسیر کوداما ۳۲
۲-۸-۲- مسیر 4S ۳۵
۲-۸-۳- سرعت ومیزان توانایی گوگرد زدایی هوازی ۳۸
۲-۹- گوگرد زدایی بی هوازی ۴۲
۲-۱۰- مقایسه گوگرد زدایی هوازی و بی‌هوازی از ترکیبات الی گوگردی ۴۳
۲-۱۱- تاریخچه گوگرد زدایی ۴۵
۲-۱۲- باکتری استنوتروفوموناس (*Stenotrophomonas* kho۴) ۴۷
۲-۱۳- HPLC ۴۸
۲-۱۳-۱- اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC ۴۸
۲-۱۳-۲- روش رسم منحنی ۵۰
۲-۱۴- جداسازی ژن‌های ناشناخته ۵۰
۲-۱۴-۱- شکست آنزیمی و تهیه کتابخانه ژنی ۵۰
۲-۱۴-۲- استفاده از پروب ۵۱

عنوان | صفحه

۲-۱۴-۳- استفاده از PCR ۵۲
۲-۱۵- مقدمه‌ای بر PCR ۵۳
۲-۱۵-۱- طراحی پرایمر ۵۷
۲-۱۶- الکتروفورز ۵۹

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- مواد و دستگاه های مورد استفاده ۶۲
۳-۱-۱- مواد مورد استفاده ۶۲
۳-۱-۲- وسایل ودستگاه های مورد استفاده ۶۵
۳-۲- مقدمه ۶۶
۳-۳- باکتری استنوتروفوموناس ۶۷
۳-۴- محیط کشت ۶۷
۳-۴-۱- محیط کشت نوترینت براث ۶۷
۳-۴-۲- محیط کشت LB ۶۷
۳-۴-۳- محیط کشت پایه نمکیBSM ۶۹
۳-۵- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۷۰
۳-۵-۱- تهیه نمونه برای انجام HPLC ۷۰
۳-۵-۲- HPLC و تزریق نمونه ۷۱
۳-۶- آزمون گیبس ۷۱
۳-۶-۱- تهیه روش نمونه برای انجام آزمایش گیبس ۷۱
۳-۶-۲- روش انجام آزمون گیبس ۷۲
۳-۷- بررسی رشد باکتری ۷۲
۳-۸- استخراج ژنوم ۷۲
۳-۹- استخراج پلاسمید ۷۴
۳-۱۰- PCR ۷۵
۳-۱۰-۱- شرایط انجام واکنش PCR در این تحقیق ۷۵
۳-۱۰-۲- طراحی پرایمر ۷۶
۳-۱۰-۳- گرادیان دمایی PCR ۷۷
۳-۱۰-۴- شرایط PCR ۷۷
۳-۱۱- الکتروفورز ۷۷

عنوان | صفحه

۳-۱۱-۱- تهیه بافرTBE ۷۷
۳- ۱۱-۲- تهیه ژل الکتروفورز ۷۸
۳- ۱۱-۳- loading buffer ۷۸
۳- ۱۱-۴- نشانگر اندازه size marker ۷۹
۳- ۱۱-۵- تهیه محلول اتیدیوم برماید ۷۹
۳- ۱۱-۶- روش انجام الکتروفورز ۷۹
۳- ۱۲- کلونینگ ۷۹
۳- ۱۲-۱- PCR کلونینگ ۸۰
۳- ۱۲-۲- تخلیص محصول PCR ۸۰
۳- ۱۲-۳- تهیه سلول‌های مستعد و ترانسفورمیشن ۸۱
۳- ۱۲-۴-الحاق ligation ۸۱
۳- ۱۲-۵- روش تهیه سلول مستعد ترانسفورمیشن ۸۲
۳- ۱۲-۶- غربال سلول‌های ترنسفورم شده ۸۳
۳- ۱۲-۶-۱ غربال انتخابی با استفاده از آنتی بیوتیک و ملونی آبی-سفید ۸۳
۳- ۱۲-۶-۲- کلون PCR ۸۳
۳- ۱۳-تخلیص از روی ژل ۸۵
۳- ۱۴- تعیین ترادف ژن‌های dsz ABC ۸۶
۳-۱۵- بررسی بیوانفورماتیکی ژن های dsz ۸۶

فصل چهارم: نتایج

۴- ۱- نتایج بررسی رشد باکتری ۸۸
۴- ۲- نتایج آزمون گیبس ۸۸
۴- ۲-۱- نتایج ازمون گیبس کیفی ۸۸
۴۴- ۲-۲- تهیه استاندارد گیبس ۹۰
۴- ۲-۳- نتایج گیبس کمی ۹۰
۴-۳- نتایج HPLC ۹۱
۴- ۳-۱- نتایج بررسی تایید مسیرS۴از طریق HPLC ۹۲
۴-۳-۱-۱- نتایج بررسی کیفی تولید ۲HBP توسط HPLC ۹۲
۴-۳-۱-۲- نتایج بررسی کمی تولید ۲HBP توسط HPLC ۹۴
۴-۴- نتایج حاصل از استخراج DNA ۹۵

عنوان	صفحه

۴-۵- نتایج حاصل از انجام واکنش PCR ۹۷
۴- ۶- نتایج PCR کلونینگ ۱۰۰
۴- ۶-۱- غربال با استفاده از تشکیل کلونی‌های آبی و سفید ۱۰۰
۴- ۶-۲- غربال با استفاده از روش کلون PCR ۱۰۱
۴- ۶-۳-غربال با استفاده از روش تخلیص پلاسمید ۱۰۲
۴-۶-۴- نتایج حاصل از تخلیص از روی ژل ۱۰۳
۴-۶-۵-شناسایی با استفاده از تعیین ترادف ۱۰۴
۴- ۷- نتایج تعیین ترادف ۱۰۴
۴-۸- بیوانفورماتیک ۱۱۰

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱- بررسی نتایج شناسایی مسیر بیوشیمیایی گوگردزدایی ۴S ۱۱۵
۵-۱-۱- بررسی و تحلیل نتایج شناسایی مسیر بیوشیمیایی ۴S از طریق HPLC..... ۱۱۵
۵-۱-۲- تحلیل نتایج آزمون گیبس ۱۱۵
۵-۲- جداسازی ژن‌های dsz ABC ۱۱۶
۵-۳- تحلیل نتایج طراحی پرایمر ۱۱۶
۵-۴- تحلیل نتایج کلونینگ ۱۱۹
۵-۴-۱- غربال با استفاده از تشکیل کلونی‌های آبی-سفید ۱۱۹
۵-۴-۲- هضم آنزیم ۱۲۰
۵-۵- بیوانفورماتیک ۱۲۰
۵-۶- بررسی نتایج حاصل از جداسازی ژن‌های dsz ABC ۱۲۱
۵-۷- نتیجه گیری ۱۲۳
۵-۸- پیشنهادات ۱۲۳
منابع ۱۲۴
چکیده لاتین ۱۳۴

عنوان صفحه

فهرست جداول:

جدول ۱-۱ ..... ۴
جدول ۱-۲ ..... ۶
جدول ۱-۳ ..... ۷
جدول ۱-۴ ..... ۹
جدول۲-۱ ..... ۱۵
جدول۲-۲ ..... ۱۶
جدول۲-۳ ..... ۴۱
جدول۲-۴ ..... ۵۷
جدول ۳-۱ ..... ۶۲
جدول ۳-۲ ..... ۶۵
جدول ۳-۳ ..... ۶۸
جدول ۳-۴ ..... ۶۹
جدول ۳-۵ ..... ۷۶
جدول ۳-۶ ..... ۷۷
جدول ۳-۷ ..... ۸۱
جدول ۳-۸ ..... ۸۵
جدول ۴-۱ ..... ۸۹
جدول ۴-۲ ..... ۹۲
جدول ۴-۳ ..... ۹۸
جدول ۴-۴ ..... ۹۸
جدول ۴-۵ ..... ۱۱۰

فهرست تصاویر:

تصویر ۱-۱ ..... ۵
تصویر ۱-۲ ..... ۱۰
تصویر ۲-۱ ..... ۱۷
تصویر ۲-۲ ..... ۱۷
تصویر ۲-۳ ..... ۲۰
تصویر ۲-۴ ..... ۲۱

عنوان | صفحه

تصویر ۲-۵ ..... ۲۶
تصویر ۲-۶ ..... ۲۶
تصویر ۲-۷ ..... ۲۹
تصویر ۲-۸ ..... ۳۰
تصویر۲ -۹ ..... ۳۴
تصویر ۲-۱۰ ..... ۳۹
تصویر ۴-۱ ..... ۸۹
تصویر ۴-۲ ..... ۹۳
تصویر ۴-۳ ..... ۹۳
تصویر ۴-۴ ..... ۹۶
تصویر ۴-۵ ..... ۹۶
تصویر ۴-۶ ..... ۹۷
تصویر ۴-۷ ..... ۹۹
تصویر ۴-۸ ..... ۹۹
تصویر ۴-۹ ..... ۱۰۰
تصویر ۴-۱۰ ..... ۱۰۲
تصویر ۴-۱۱ ..... ۱۰۳
تصویر ۴-۱۲ ..... ۱۰۳
تصویر ۴-۱۳ ..... ۱۰۵
تصویر ۴-۱۴ ..... ۱۰۶
تصویر ۴-۱۵ ..... ۱۰۷
تصویر ۴-۱۶ ..... ۱۰۷
تصویر ۴-۱۷ ..... ۱۰۸
تصویر ۴-۱۸ ..... ۱۰۸
تصویر ۴-۱۹ ..... ۱۰۹
تصویر ۴-۲۰ ..... ۱۰۹
تصویر ۵-۱. ..... ۱۲۲
تصویر ۵-۲ ..... ۱۲۲

عنوان صفحه

فهرست نمودارها:

نمودار ۱-۱ ..... ۶
نمودار ۲-۱ ..... ۱۶
نمودار ۴-۱ ..... ۸۸
نمودار ۴-۲ ..... ۹۰
نمودار ۴-۳ ..... ۹۱
نمودار ۴-۴ ..... ۹۴
نمودار ۴-۵ ..... ۹۵

جداسازی، شناسایی و تعیین ترادف ژن‌های dszA، dszB و dszC از باکتری تازه جدا شده *Stenotrophomonas* sp. Strain skho۴

نویسنده: محمد زارعی

استادان راهنما:

۱- دکتر ایرج رسولی

۲- دکتر محمد رعایایی اردکانی

استاد مشاور:

دکتر حمید گله داری

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد

رشته تحصیلی: بیوتکنولوژی گرایش: میکروبی

دانشگاه: شاهد دانشکده: علوم تاریخ دفاع: دی ماه ۸۹

چکیده

رها شدن گاز SO_2 در اثر احتراق سوخت‌های فسیلی یکی از علل اصلی آلودگی زیست محیطی و بیماری‌های تنفسی می‌باشد. عمده‌ترین ماده گوگردی موجود در نفت خام و برش‌های آن به صورت دی-بنزوتیوفن و مشتقات الکیله آن می باشد. در گوگردزدایی زیستی، حذف گوگرد از برش‌های نفتی با استفاده از باکتری‌ها توسط محصولات ژن‌های dszABC که اولین بار از باکتری *Rhodococcus erythropolis* strain IGTS۸ جدا شدند از طریق مسیرمتابولیکی ۴S انجام می‌شود.

در این تحقیق مسیر بیوشیمیایی گوگردزدایی زیستی ۴S در باکتری *stenotrophomonas* که kho۴ نامیده شد و برای اولین بار از خاک‌های آلوده به نفت اهواز جدا شده بود، با استفاده از HPLC و آزمون گیبس، شناسایی شد، و ژن‌های dszA، dszB و dszC که در این مسیر بیوشیمیایی حاضرند شناسایی شدند و با استفاده از طراحی پرایمر دجنره جداسازی و تکثیر و سپس تعیین ترادف شد.

مقایسه ترادف ژن‌های dszA، dszB و dsz C از باکتری *Stenotrophomonas* sp. Strain kho۴ با باکتری*Rhodococcus erythropolis* strain IGTS۸، ۸۹ درصد شباهت نشان داد که بر وجود شباهت بالا در میان ژن‌های dszA، dszB و dszC از باکتری‌های گوگردزدای مختلف دلالت داشت.

با شناسایی مسیر بیوشیمیایی ۴S و ژن‌های dszA، dszB و dszC در باکتری *Stenotrophomonas* sp. Strain kho۴، می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، توان گوگرد زدایی آن را بالا برده و یا در گوگردزدایی از برش‌های نفتی توسط باکتری‌ها از آن‌ها استفاده شود.

کلمات کلیدی: دی‌بنزوتیوفن، گوگردزدایی زیستی، ژن‌های dsz، مسیر ۴s، *Stenotrophomonas*

فصل یک

مقدمه

فصل یک مقدمه

۱-۱- مقدمه:

در حال حاضر سوخت‌های فسیلی پس از غذا مهمترین منبع انرژی انسانی هستند و بسیاری از مواردی که باعث آسایش زندگی بشر شده است ناشی از استفاده از سوخت‌های فسیلی می‌باشد. قسمت عمده‌ای از انرژی مورد نیاز ما (بیش از ۸۵ درصد) از سوخت‌های فسیلی، ۸ درصد از انرژی هسته‌ای و ۷ درصد از سایر منابع تولید انرژی، نظیر انرژی‌های هیدروالکتریکی و بادی و چوب به دست می‌آید. سوخت-های فسیلی به طور عموم شامل نفت خام، زغال سنگ، گاز طبیعی و شیست قیری می‌باشد. دراین میان نفت خام با تولید ۴۰ درصد از انرژی مورد نیاز بشر در صدر قرار دارد و به دنبال آن گاز طبیعی با تولید ۲۴ درصد انرژی و زغال سنگ با تولید ۲۲ درصد در مکان‌های بعدی قرار می‌گیرند [۱]. البته این آمار در کشور ما بیشتر به سمت مصرف گاز طبیعی می‌باشد. با توجه به اهمیت سوخت‌های فسیلی در جامعه بشری تولید و استفاده از این مواد به طور چشم‌گیری در جوامع بشری در حال گسترش می‌باشد و می‌تواند عامل مهم و تعیین کننده‌ای در وضعیت اقتصادی کشورهای مختلف باشد. با این وجود سوختن این مواد برای تولید انرژی با مشکلاتی نیز همراه شده است که با توجه به پیشرفت صنایع، این مشکلات در وضعیت حاد تری نیز قرار خواهند گرفت. نفت خام به طور عموم شامل مجموعه‌ای از هیدروکربن‌ها می‌باشد که در آن عناصر دیگری نیز در پیوند با آن‌ها نظیر گوگرد، نیتروژن و برخی از فلزات وجود دارند. گازی که از سوختن این مواد تولید می‌شود به طور عموم شامل مونوکسید کربن (CO)، دی‌اکسید گوگرد (SO_2)، اکسیدهای نیتروژن(NO_X)، ذرات معلق و گازهای فرار هیدروکربنی می‌باشد [۲]. احتراق سوخت‌های فسیلی باعث آزاد شدن گاز دی‌اکسیدگوگرد و اکسیدهای نیتروژن در درون جو می‌شود که با بخار آب موجود در هوا و ابرها واکنش داده و تولید اسید سولفوریک و اسید نیتریک می‌کنند و به همراه باران و برف نازل می‌شوند و باعث بارش باران‌های اسیدی و یا تولید مه با pH پایین می‌شوند. به علاوه دی اکسید گوگرد و اکسیدهای نیتروژن در هوا باعث تشکیل هواویزهایی با قطر ۲/۵ میکرومتر در جو می‌شوند که می‌توانند در مسافت‌های طولانی جابه‌جا شوند [۴و۵]. همچنین احتراق سوخت‌های فسیلی باعث تولید دود، غبار و ذرات معلق در هوا می‌شود که درنتیجه باعث ایجاد آلودگی هوا و مشکلات ناشی از آن مانند بیماری‌های تنفسی و قلبی-عروقی و سرطان ریه می‌گردد [۶و۷و۸]. با توجه به اینکه دی‌اکسیدگوگرد موجود در هوا توسط جریان‌های هوا کیلومترها جابه‌جا می‌شود،لذا می‌تواند اثر مخرب خود را حتی هزاران کیلومتر دورتر از محل تولید خود بر-

جای بگذارد، بنابراین کاهش مقدار دی‌اکسید گوگرد یک همکاری بین‌المللی را می‌طلبد. ساده‌ترین راه کاهش دی اکسیدگوگرد موجود در هوا کاهش میزان گوگرد موجود در سوخت‌های مورد مصرف در حمل و نقل مانند بنزین و گازوییل که به میزان زیادی در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌باشد، چون آن‌ها بزرگترین منبع تولید دی‌اکسیدگوگرد هستند و به همین دلیل بسیاری از کشورها سعی کرده‌اند تا با وضع قوانینی بتوانند سوخت‌های دارای گوگرد کمتر و سازگارتر با محیط زیست تولید کنند. به همین دلیل در سال ۱۹۹۳در کشور ایالات متحده تولید و فروش گازوییل حاوی گوگرد بالاتر از ppm[۱] ۵۰۰ را ممنوع کردند و در سال ۱۹۹۸ اتحادیه اروپا مقدار مجاز گوگرد در گازوییل را ppm ۳۵۰ و ppm ۵۰ به ترتیب برای سال‌های ۲۰۰۰ و ۲۰۰۵ تعیین کردند [۹]. کشورهای کانادا و ایالات متحده نیز همان حدود را برای مقدار گوگرد مجاز در گازوییل و بنزین برای سال ۲۰۰۰ و ۲۰۰۵ تعیین کردند [۱۰و۱۱]. کشورهای کانادا و ایالات متحده از ابتدای ژانویه سال ۲۰۰۶ تصمیم گرفتند که میزان گوگرد موجود در سوخت گازوییل و بنزین را به ترتیب به ppm ۱۵ و ppm ۳۰ برسانند و مقدار مجاز گوگرد موجود در گازوییل را برای سال ۲۰۱۰ ۱۰ppm تعیین کردند [۱۲و۱۳]. برآوردهای آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده، تولید سوخت پاک و کاهش محتوای گوگرد، نیتروژن و ذرات معلق ناشی از احتراق سوخت‌های فسیلی را از نظر اقتصادی و سلامتی جمعیت بشر، بسیار سودآور دانسته است. برآورد هزینه‌های مرتبط با بیماری‌های تنفسی نشان می‌دهد که با کاهش میزان گوگرد و سایر مواد مضر در سوخت‌های فسیلی می‌توان میزان این بیماری-ها را تا حد قابل قبولی کاهش داد (جدول ۱-۱). مرکز کیفیت هوا و حمل و نقل در آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا، موارد ذکر شده در جدول ۱-۱ را در ارتباط مستقیم با کیفیت سوخت دانسته و سودآوری تولید سوخت پاک را تأیید نموده است. در این براورد گوگرد از عوامل تعیین کننده مهم در ایجاد آلودگی زیست محیطی تلقی می‌گردد [۵]. با توجه به این‌که سود سالانه حاصل از اجرای طرح سوخت پاک در حدود ۷۰/۳ میلیارد دلار است و هزینه مورد نیاز برای اجرای آن به ازای هر موتور ۱۲۰۰ تا ۱۹۰۰ دلار و به ازای هر بشکه ۵-۴ سنت می‌باشد لذا در حدود ۴/۳ میلیارد دلار در سال هزینه خواهد داشت لذا سود آوری آن محرز می‌باشد. مواردی که در جدول ۱-۱ عنوان شده لزوم اجرای طرح سوخت پاک و به تبع آن هوای پاک را از لحاظ اقتصادی توجیه پذیر می‌کند. دولت‌ها و سازمان‌های مسئول در سطح جهانی مشکلات حاصل از احتراق سوخت‌های فسیلی را شناسایی کرده و قوانین مرتبط با استفاده از سوخت‌های فسیلی را در جهت کاهش مضرات آن اصلاح می‌کنند.

۱ - ppm: parts per million

جدول ۱-۱ برآورد سالانه کاهش ضررهای انسانی و اقتصادی با اجرای طرح سوخت پاک[۵]

بیش از ۸۳۰۰ مرگ زود هنگام	**بیش از ۷۵۰۰۰۰ ابتلا به بیماری‌های تنفسی**	**بیش از ۱.۵ میلیون مورد از دست دادن کار روزانه**	**۲.۶ میلیون تن NO_x، ۱۱۰۰۰۰تن ذرات معلق و ۱۷۰۰۰ تن آلاینده سمی**

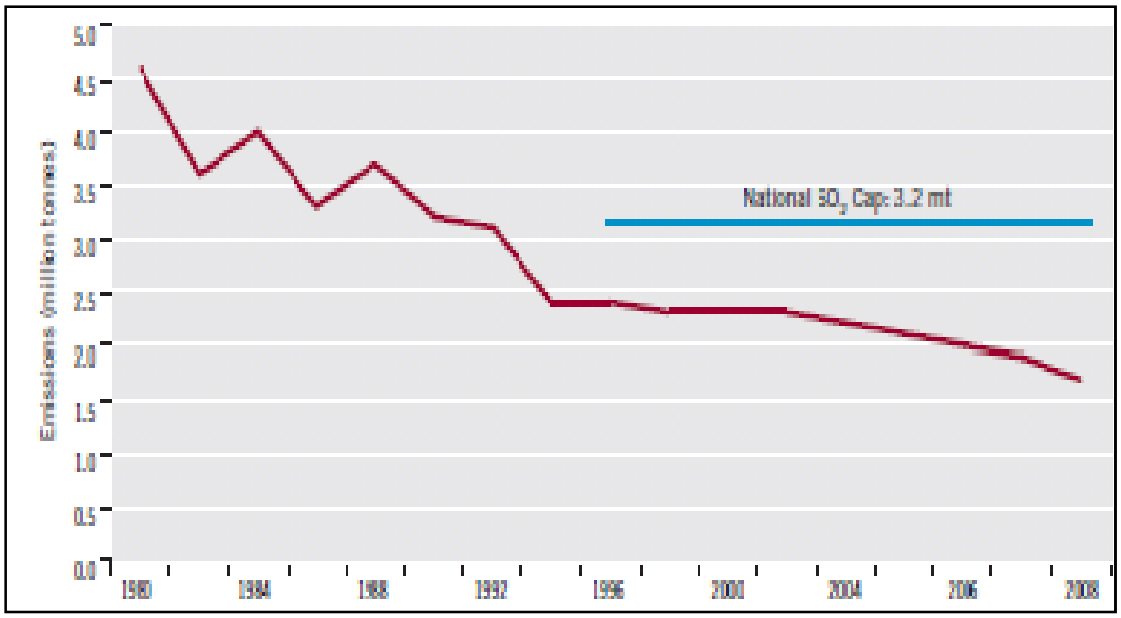
در جدول ۱-۲ وتصویر ۱-۱ روند افزایش سختگیری جهانی بر میزان گوگرد مجاز در گازوییل ارائه شده است. در سال‌های أخیر محتوای گوگرد مجاز موجود در گازوییل و سوخت دیزل به علت استفاده بیشتر توسط جمعیت بشری و صنایع از اهمیت بیشتری برخوردار بوده است، زیرا از یک طرف مقدار گوگرد موجود دراین سوخت‌ها نسبت به برش‌های نفتی دیگر بسیار بیشتر است و از طرف دیگر، دی‌اکسیدگوگرد و دیگر اکسیدهای گوگرد حاصل از مصرف بسیار بالا این سوخت‌ها در سطح جهانی، علاوه بر آلاینده بودن سبب مسمومیت کاتالیزور های مورد استفاده در سیستم‌های اگزوز در اتومبیل‌ها و انواع موتورهای انفجار درونی می‌شود. این کاتالیزورها باعث احتراق هیدروکربن‌های باقیمانده و پایدار در برابر احتراق در اگزوز شده و آلاینده های تولید شده از اتومبیل‌ها را کاهش می‌دهند [۱۴و۱۵]. گوگرد همچنین سبب کاهش بازده کراکینگ کاتالیتیک[۱] و مراحل هیدروژنیزاسیون[۲] در پالایشگاه‌ها می‌شود که در اثر آلودگی کاتالیزورهایی است که در مراحل پالایش استفاده می‌شوند [۱۶].

جدول۱-۲. روند افزایش سخت‌گیری جهانی در میزان گوگرد موجود در گازوییل‌های تولیدی[۱۷]

سال	۱۹۹۵	۲۰۰۰	۲۰۰۵	۲۰۱۰
میزان گوگرد مجاز در گازوییل بر حسب ppm	۵۰۰	۳۵۰	۳۰	۱۰

۱ - Catalytic crackikg

۲ - Hydrogenization



تصویر ۱-۱. تأثیر محدودیت‌های جهانی بر میزان انتشار گاز دی‌اکسیدگوگرد در سال‌های أخیردر کانادا[۱۸]

بنابراین مراجع وآژانس‌های مختلف بین‌المللی خواستار کاهش هرچه بیشتر گوگرد در سوخت‌های فسیلی هستند. برای مثال در دو دهه اخیر غلظت مجاز گوگرد در سوخت دیزل از ۵۰۰ppm به ۱۰-۱۵ppm کاهش یافته و در آینده نزدیک نیز کاهش بیشتری خواهد داشت (نمودار ۱-۱). البته مشکل فقط در رابطه با گوگرد نبوده و مقادیر مختلفی از نیتروژن و فلزات نیز در سیالات نفتی مشکل‌ساز هستند که در آینده‌ای نه‌چندان دور در مورد غلظت مجاز این ترکیبات نیز قوانین شدیدتری وضع خواهد شد[۱۶و۱۷]. مشکلات چند دهه أخیر در دنیا از نظر کاهش ذخایر سوخت‌های فسیلی، افت کیفی آن‌ها و افزایش قیمت و از سوی دیگر مشکلات حاصل از پیشرفت صنعت و بالطبع پیچیده‌ترشدن واحد های پالایشگاهی و افزایش هزینه تمام شده انرژی و سخت‌گیری قوانین زیست محیطی کشورهای پیشرفته را بر ان داشته است تا با ساده‌ترین و کم هزینه‌ترین شکل ممکن این مسائل را حل نموده و الکوی پالایش خود را به منظور افزایش تولید تغییر دهند [۶ و۱۶]. در حال حاضر گازوییل تولیدی ایران بیش از ۷۰۰۰ppm گوگرد دارد و احتراق این گازوییل در وسایل نقلیه سنگین بسیار بحرانی می‌نماید. به دلیل سخت‌گیری جامعه بین‌المللی، بهبود سیستم پالایشگاه‌ها با سرمایه گذاری بیش از یک میلیارد دلار در دست انجام است که بنابر پیش‌بینی مسئولین وزارت نفت، تا چند سال آینده گوگرد موجود در گازوییل باید به ۵۰۰ppm کاهش یابد که به معنی دست یابی به قوانین جهانی در دهه گذشته است.