فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۱۳- ۲۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده پسماند نفت از مخزن بهره‌برداری شماره ۹ مسجد سلیمان

یلدا شینی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران، sheyni@yahoo.com
حسین معتمدی *: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، hhmotamedi@yahoo.com
احمدعلی پوربابایی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران، ahmadalipb@gmail.com

چکیده

مقدمه: زیست پالایی یکی از روش‌های موثر برای حذف آلاینده‌های نفتی است. هدف از مطالعه حاضر جداسازی باکتری‌های بومی پسماند نفت مخزن بهره بردای شماره ۹ مسجدسلیمان و بررسی تأثیر استفاده از آن‌ها در کاهش ترکیبات سنگین نفت و تبدیل آن‌ها به ترکیبات سبک است .

مواد و روش‌ها: به منظور تکثیر باکتری‌های موجود در پسماند نفت، ۲درصد پسماند نفتی به محیط پایه معدنی تلقیح و پس از گرماگذاری و رشد، جهت سنجش تجزیه پسماند به میزان ۵ درصد به محیط حاوی مخلوط پسماند و نفت تلقیح شد. سپس، در زمان های مختلف میزان هیدروکربن‌های باقیمانده نفت اندازه‌گیری شدند. شناسایی باکتری‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام شد. منحنی رشد جدایه‌های منتخب رسم و بهینه‌سازی منابع نیتروژن و فسفات برای آن‌ها انجام شد. از کروماتوگرافی گازی برای تعیین میزان تجزیه هیدروکربن‌های پسماند استفاده شد.

نتایج: در این تحقیق ۱۰ جدایه باکتریایی از پسماند نفت جداسازی شد. اندازه‌گیری هیدروکربن‌های کلی نفت با روش Soxhlet-extraction نشان داد که دو جدایه MIS_1 و MIS_2 تجزیه‌کنندگی نفت را در طی ۷ روز، به ترتیب با بازدهی ۶۲ و ۷۲ درصد انجام می‌دهند. به‌علاوه این دو جدایه به ترتیب در ساعت ۴۸ و ۱۲۰ به انتهای فاز لگاریتمی می‌رسند. بهترین منبع نیتروژن و فسفات برای هر دو جدایه نیز، به ترتیب نیترات آمونیوم و پتاسیم دی هیدروژن فسفات بود. این جدایه‌ها در آزمون‌های تشخیصی به ترتیب *Arthrobacteraurescens* و *Pseudomonasaeruginosa* تشخیص داده شدند. تحلیل کروماتوگرافی گازی جدایه‌ها نشان داد سودوموناس بیش‌ترین میزان تجزیه ترکیبات سنگین و تبدیل آن‌ها به ترکیبات سبک را انجام می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: باکتری‌های ساکن پسماند نفت قادر به استفاده ار هیدروکربن‌های موجود در پسماند به عنوان منبع کربن و انرژی هستند و با متابولیزه کردن این ترکیبات، موجب کاهش آن‌ها در محیط زیست از طریق شکستن آن‌ها و تبدیل به ترکیبات سبک و یا فرار می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: زیست پالایی، پسماند نفتی، هیدروکربن‌های کلی نفت، کروماتوگرافی گازی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

ذرات جامد موجود در نفت خام استخراج شده که در مخازن نفتی ذخیره می‌شوند به همراه واکس، آب و امولسیون‌های نفتی، مواد چسبناک لجنی را در کف مخازن پدید می‌آورند که همواره مشکل ساز بوده و در ضمن کاهش ظرفیت مخازن مشکلات خوردگی را نیز در نقاط مختلف مخزن[1] به دنبال دارند. این امر موجب می‌شود تا دردوره‌های مناسب نسبت به پاک‌سازی مخازن و خارج ساختن لجن‌های مذکور اقدام کنند. ویژگی لجن‌ها در مخازن یکسان نبوده و تفاوت‌های چشمگیری در بین این لجن‌ها وجود دارد(۱). در پالایشگاه‌های نفت در سراسر دنیا در بخش‌های ذخیره فرآوری و انتقال نفت، همواره مقدار زیادی پسماند تولید می‌شود. برای مثال در پالایشگاه‌های نفت در کشور هندوستان تقریبا سالیانه ۲۸ هزار تن پسماند که مخلوطی از پسماند هیدروکربنی مضر است تولید می‌شود. تیمار یا از بین بردن این پسماندهای نفتی موضوع مهمی است که صنایع نفتی با آن روبه رو هستند. این پسماندهای نفتی اثرات مخرب و زیان‌باری را در محیط زیست بر جای می‌گذارند. انهدام نامناسب پسماند نفتی باعث آلودگی محیط زیست به‌ویژه آلودگی خاک می شود و برای آب‌ها نیز تهدیدی جدی به حساب می آید. همچنین پسماند نفتی محتوی چندین ترکیب سمی هیدروکربنی است که خاصیت سرطان‌زایی و خاصیت سمیت قوی برای سیستم ایمنی دارند(۲). پالایشگاه‌های نفت در سراسر جهان از فن آوری‌های مختلفی از جمله روش‌های تیمار زیستی، شیمیایی و فیزیکی برای مدیریت این پسماندها که طی فرآیند پالایش و ذخیره نفت تولید می‌شوند استفاده می‌کنند. در میان انواع روش‌های موجود برای خنثی کردن اثرات مضر این ترکیبات در جایگاه‌های آلوده، اصلاح زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های ساکن در محل‌های آلوده یکی از پرکاربردترین روش‌هاست(۳). این باکتری‌ها در منابع مختلفی از جمله آب، فاضلاب، خاک‌های آلوده به نفت، پسماند نفتی و غیره وجود دارند و با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی باعث تجزیه نفت می‌شوند از جمله با تولید گازهایی مانند: هیدروژن، نیتروژن، متان و دی اکسید کربن که ویسکوزیته نفت را کاهش می‌دهند و ویژگی‌های جریان نفت را بهبود می‌بخشند؛ تولید اسیدها (اسیدهای با وزن مولکولی پایین)، تولید حلال‌هایی مانند الکل‌ها و کتون‌هایی که کمک سورفاکتانت‌های شاخص هستند؛ تولید بیوسورفاکتانت‌ها که کشش بین سطحی آب/ سنگ و نفت را کاهش می‌دهند(۴). مهمترین عواملی که در تجزیه زیستی مؤثرند، نوع ترکیبات نفتی و میزان هواخوردگی آن‌هاست. هواخوردن باعث افزایش تبخیر اغلب ترکیبات نفتی که خاصیت سمی دارند می‌شود. علاوه بر منبع کربن لازم است منابع دیگری بخصوص نیتروژن و فسفر در محیط فراهم شوند تا تجزیه ترکیبات هیدروکربنی نفت را تحریک کند(۱).

هدف از این تحقیق حاضر، بررسی حضور باکتری‌هایی است که قادر به تجزیه هیدروکربن‌های موجود در پسماند نفت موجود در مخزن بهره‌برداری نفت شماره ۹ بی بیان، به منظور استفاده از آن‌ها در فرآیند زیست پالایی پسماند نفتی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه گیری از پسماند نفتی که در کف مخزن ذخیره نفت واحد بهره‌برداری شماره ۹ منطقه بی بیان شهرستان مسجد سلیمان، ته‌نشین شده بود، هنگام لایه روبی مخزن، توسط واحد عملیات شرکت نفت مسجد سلیمان انجام شد. نمونه پسماند مخزن بهره‌برداری نفت، درون ظروف شیشه ای در پیچ دار استریل ریخته شد و سریع به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد. به منظور هوادهی مناسب درب آن‌ها به شکل نیمه باز گذاشته شد.

غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های ساکن پسماند

به این منظور از یک محیط پایه معدنی حاوی K_2HPO_4(۰/۸)، KH_2PO_4(۰/۲)، $CaSO_4.2H_2O$(۰/۰۵)، $MgSO_4.H_2O$(۰/۵)، $FeSO_4.7H_2O$(۰/۰۹)، $(NH4)_2SO_4$(۱) (گرم در لیتر) که تنها منبع کربن و انرژی آن ۲ درصد پسماند نفت استریل بود، ساخته شد. ۱ گرم از پسماند نفتی به عنوان تلقیح باکتریایی وارد شد و ارلن‌ها به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از این مدت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع به محیط کشت پایه معدنی حاوی پسماند و آگار (۱/۵ درصد) تلقیح و کشت خطی از آن تهیه شد. محیط‌ها به مدت ۷ روز در انکوباتور ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و پس از خالص‌سازی در نوترینت آگار نگه داری شدند(۵).

غربال‌گری باکتری‌های تجزیه کننده پسماند نفت

از یک رآکتور زیستی ۵۰۰ میلی‌لیتری متحرک برای تشخیص میزان توانایی باکتری‌های خالص شده در تجزیه پسماند نفتی استفاده شد. برای این منظور، پسماند نفت با شن‌های شسته شده و استریلیزه رودخانه مخلوط شد تا غلظت ۵ درصد (w/w) از پسماند نفتی ایجاد شود. نمونه‌ها با توجه به اندازه گیری محتوای کربن موجود در پسماند نفتی با روش ASTM-D189، برای ایجاد نسبت کربن: نیتروژن: فسفر ۱۰۰: ۵ : ۱ با اوره و یا نیترات آمونیوم غنی شدند. یک نمونه تلقیح نشده هم به‌عنوان شاهد انتخاب شد. ارلن‌ها برای مدت ۷ روز و در شیکرانکوباتور در دمای (۲ ± ۲۸) درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm گرماگذاری شدند. در این صورت بررسی تجزیه پسماند نفتی به شکل چشمی هم امکان‌پذیر است.

اندازه گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت (TPH)[۲]

اندازه گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت TPH با استفاده از روش Soxhlet-extraction و به شکل وزنی تعیین شد. مقدار ۶/۲۵ گرم از پسماند نفتی برای استخراج هیدروکربن‌های کلی نفتدرون یک انگشتانه ریخته شد. عصاره گیری از پسماند نفتی با استفاده از حلال دی‌کلرومتان انجام شد. عصاره تهیه شده در دمای اتاق توسط تبخیر حلال در یک هود بخار خشک شد و سپس، مقدار هیدروکربن‌های کلی پسماند به شکل وزنی تعیین شد(۶ و ۷).

اندازه گیری مقدار TPH باقیمانده

پس از انجام تیمار پسماند نفتی با باکتری‌های جداسازی شده در محیط سنجش میزان تجزیه کنندگی نفت، پسماندهای باقیمانده موجود در محیط جمع آوری و مقدار هیدروکربن‌های باقیمانده در آن با روش بالا اندازه گیری شد. پس از انجام این آزمایش، دو جدایه باکتریایی به نام‌های MIS_1 و MIS_2 برای شناسایی بیشتر و انجام آزمایش‌های تکمیلی انتخاب شد(۶).

بررسی تجزیه زیستی ترکیبات اشباع شده موجود در پسماند نفتی

بررسی تجزیه زیستی ترکیبات اشباع موجود در پسماند نفتی با استفاده از کروماتوگرافی گازی[3] در محدوده دمایی ۳۵ تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰۰ دقیقه انجام شد. به این منظور از ستون CPSil5CB60 متری استفاده شد. به این شکل که ابتدا ۵ دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد ماند، سپس، ۱درجه، ۱ درجه به دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد رسید. ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه ماند و سپس ۲ درجه، ۲ درجه به دمای ۲۲۰ درجه رسید و در نهایت ۲۰۰ دقیقه در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد ماند. مقدار یک میکرولیتر از محلول‌های باقی مانده تیمار شده با باکتری به منظور مشخص شدن نوع ترکیبات اشباع و آروماتیک موجود، به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. همچنین، مقداری از مایع رویی پسماند نفتی نیز با حلال نرمال هپتان مخلوط شد و آسفالتن و رزین آن جداسازی شد. مقداری از مایع باقیمانده به منظور مشخص شدن نوع ترکیبات اشباع موجود در پسماند نفتی به دستگاه کروماتوگرافی‌گازی تزریق شد. نمودارهای به دست آمده از دستگاه کروماتوگرافی گازی با همدیگر مقایسه شدند.

رسم منحنی رشد جدایه‌های MIS_1 و MIS_2 در محیط پایه معدنی

رسم منحنی رشد با روش رقت‌سازی متوالی در بافر فسفات و شمارش کلونی در ترپتیکاز سویآگار[4]، هر ۱۲ ساعت و به مدت ۷ روز انجام شد. به منظور رسم منحنی رشد، باکتری در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط Bushnel-Haas، $MgSO_4.7H_2O$(۰/۲)، $CaCl_2.2H_2O$(۰/۰۰۲)، (۱) KH_2PO_4، K_2HPO_4 (۱)، NH_4NO_3 (۱) و $FeCl_3$ (۰/۰۵) (گرم در لیتر) حاوی ۲ درصد پسماند نفتی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت داده شد و به مدت ۷ روز در دمای۲ ± ۲۸ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm انکوبه شد. در ساعت صفر و پس از هر ۱۲ ساعت یک‌بار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشت و پس از تهیه رقت‌های سریال در محیط کشت ترپتیکاز سوی آگار به شکل دو تکرار، کشت داده شد. میانگین کلونی‌های رشد کرده در دو پلیت شمارش شد(۸).

بهینه‌سازی منابع نیتروژن و فسفات

به منظور بهینه‌سازی منبع نیتروژن و فسفات، جدایه‌های MIS_1 و MIS_2 در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط Bushnel-Haas با منابع نیتروژن مختلف شامل: (۱)$NaNO_3$، (1)NH_4NO_3 و (۰/۷۵) $(NH_2)_2CO$ (گرم در لیتر)برحسب اکی‌والان نیتروژن در NH_4NO_3 (کنترل) کشت داده شدند. همچنین، برای فسفات نیز در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط Bushnel-Haas با منابع فسفات مختلف شامل(گرم در لیتر) (۱)KH_2PO_4، (۰/۸۴)NaH_2PO_4 برحسب میزان اکی والان فسفر در نمونه کنترل (KH_2PO_4) کشت داده شدند. اسیدیته محیط‌ها قبل از اتوکلاو بر روی ۷ تنظیم شد. فلاسک‌ها پس از تلقیح یک میلی‌لیتر از کشت باکتری در شیکر انکوباتور دار در دمای (۲ ± ۲۸)درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰ rpmگرماگذاری شدند. رشد باکتری‌ها با روش رقت‌سازی متوالی در فاز رشد نمایی باکتری تعیین شد(۸).

شناسایی و تعیین توالی *16S rRNA* دو جدایه برتر MIS_1 و MIS_2

شناسایی دو جدایه MIS_1 وMIS_2 از طریق تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن *16S rRNA*

انجام شد. به منظور استخراج ژنوم دو جدایه MIS_1 و MIS_2 از کیت استخراج ژنوم شرکت تکاپوزیست استفاده شد. برای اطمینان از استخراج و بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده، ۵ میکرولیتر از محلول حاوی ژنوم بر روی ژل آگاروز یک درصد با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز[5] از پرایمرهای عمومی (توالی پرایمر) Fd_1 و (توالی پرایمر) Rp_1 که قابلیت تکثیر ژنوم در ناحیه ژن *16S rRNA* را داشتند استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای انتخاب شده برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

پرایمر رفت	۳۷ باز	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Fd1
پرایمر برگشت	۳۷ باز	CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT	Rp1

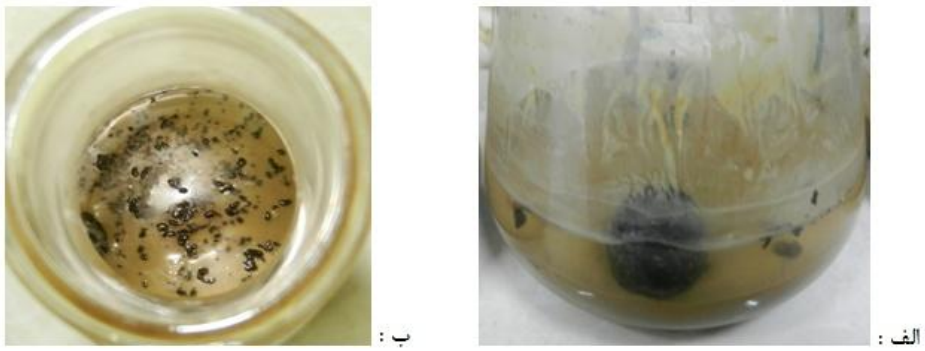
با در نظر گرفتن تعداد نمونه و حجم مورد نیاز (۲۵ میکرولیتر) با استفاده از ترکیبات واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل dNTPs، $MgCl_2$، پرایمرها، بافر و آب مقطر استریل، مخلوط اصلی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تهیه شد. واکنش PCR در برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه،) ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه)، اتصال پرایمر ها (۶۲ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه) و سنتز (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۵۰ ثانیه) و در نهایت یک مرحله طویل سازی انتهایی(۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه) انجام شد. محصول PCR در ژل آگاروز ۱درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) و در کنار نشانگر ۱ کیلوباز الکتروفورز شد.

با مشاهده تک باند مشخص قرار گرفته در ناحیه ۱۵۰۰ جفت بازی، محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج مربوط به تعیین توالی با استفاده از نرم افزار بیوادیت[6] مرتب شده و توسط برنامه بلاست[7] موجود در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[8] بررسی شد.

نتایج

با استفاده از تیمار نمونه پسماند نفت در محیط پایه معدنی که تنها منبع کربن و انرژی آن پسماند نفتی بود، سپس، تلقیح آن به پلیت‌های نفت- آگار، ۱۰جدایه باکتریایی از پسماند نفت جداسازی شد. در محیط سنجش میزان تجزیه کنندگی پسماند نفت، تجزیه باکتری‌ها به شکل چشمی دیده شد. پسماند نفت به شکل تکه‌های ریز شناوری که توانایی اتصال به یکدیگر را نداشتند بر روی سطح محیط دیده شد(شکل ۱)؛ در حالی که در محیط شاهد هیچ گونه تجزیه کنندگی پسماند دیده نشد.

مقدار کربن موجود در پسماند نفتی به شکل درصد جرمی با استفاده از روش ASTM-D189 برابر ۸۳/۴ درصد محاسبه شد. اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی موجود در پسماند نفتی با روش Soxhlet-extraction و با استفاده از حلال دی کلرومتان انجام شد. مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت موجود در ۶/۲۵ گرم پسماند نفتی، ۱/۷۲۵ گرم به‌دست آمد. میزان هیدروکربن‌های باقی مانده از تیمار باکتری‌ها و میزان تجزیه‌کنندگی آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است.



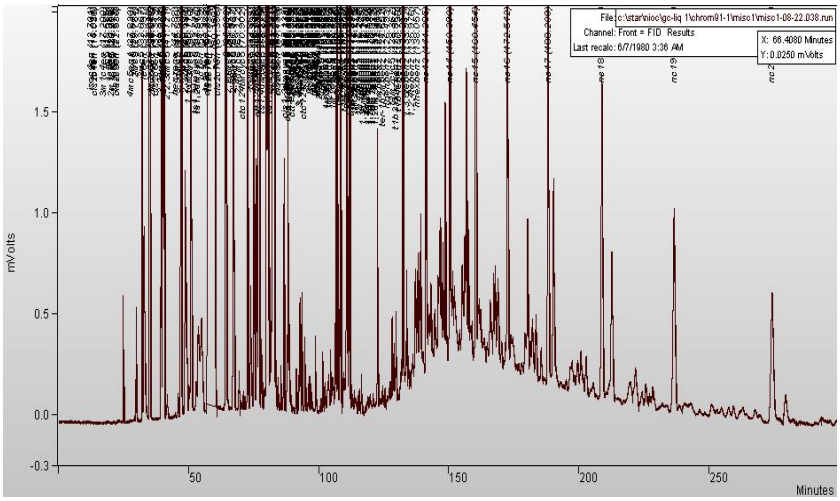
شکل۱- الف: نمونه شاهد؛ ب: نمونه پسماند تیمار شده با باکتری

جدول ۲- مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت باقیمانده و درصد میزان تجزیه کنندگی پسماند نفت

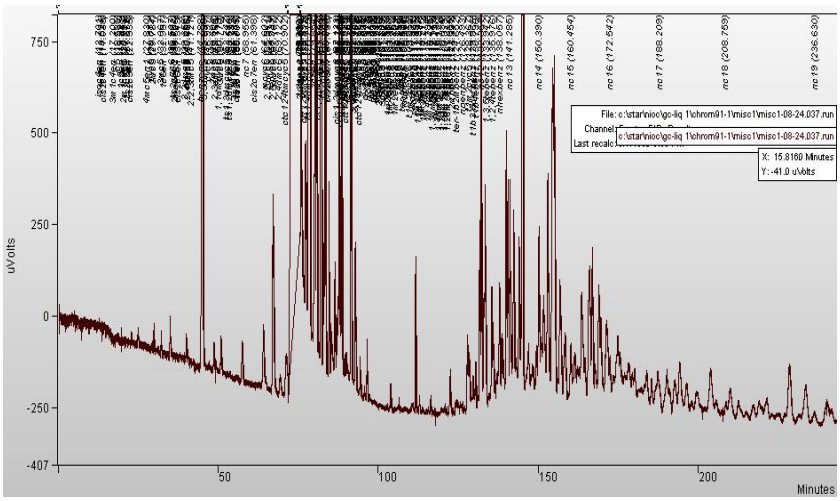
سویه	مقدار پسماند نفت (گرم)	مقدار هیدروکربن‌های باقی مانده نفت (گرم)	میزان تجزیه کنندگی پسماند نفت (درصد)
MIS_1	۶/۲۵	۱/۰۷	۶۲
MIS_2	۶/۲۵	۰/۹	۷۲
MIS_3	۶/۲۵	۱/۱۱	۵۷
MIS_4	۶/۲۵	۲/۱۶	۱۸
MIS_5	۶/۲۵	۱/۳۱	۵۱
MIS_6	۶/۲۵	۱/۴۲	۴۰
MIS_7	۶/۲۵	۲/۳۴	۱۰
MIS_8	۶/۲۵	۲/۳۰	۱۰
MIS_9	۶/۲۵	۱/۵۶	۳۵
MIS_{10}	۶/۲۵	۱/۶۴	۲۴
شاهد	۶/۲۵	۲/۴۱	۵

تزریق یک میکرولیتر از مایع رویی پسماند به‌دست آمده از استخراج هیدروکربن‌های نفتی موجود در پسماند نفتی، وجود انواع ترکیبات اشباع شده از ۷ تا ۲۰ کربن را نشان داد. شکل۲ و ۳ نتیجه حاصل از کروماتوگرافی گازی پسماند نفتی را نشان می‌دهند. شکل ۲ منحنی ترکیبات اشباع و شکل ۳ ترکیبات آروماتیک را نشان می‌دهد. همان گونه که در این دو کروماتوگرام مشاهده می‌شود، ترکیبات سنگین در این منحنی با فاصله گرفتن از خط پایه خود را نشان داده است.

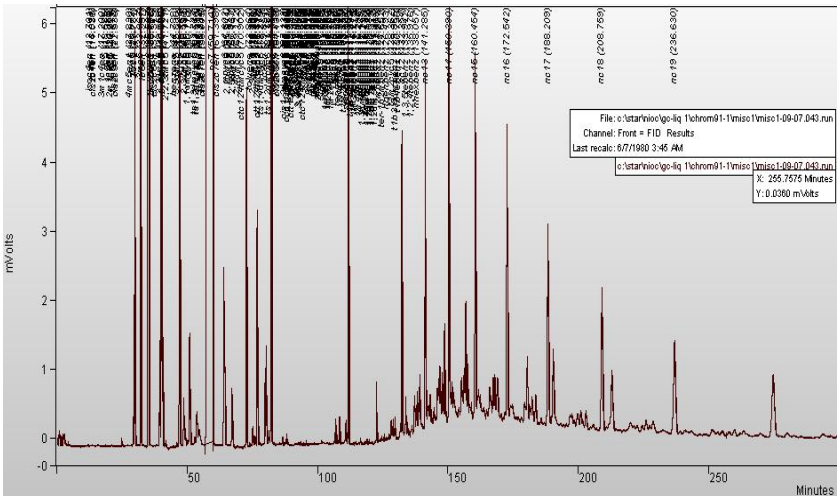
تزریق یک میکرولیتر از مایع رویی پسماند حاصل از تیمار جدایه‌های MIS_1 و MIS_2 که حاوی هیدروکربن‌های برداشت شده توسط این باکتری‌ها بود، در کروماتوگرافی گازی نشان داد که تمامی ترکیبات آلکان در مایع رویی جدایه MIS_1 و MIS_2 وجود دارند. این کروماتوگرام‌ها نشان می‌دهند که میزان ترکیبات سنگین کاهش یافته و منحنی افزایش ترکیبات سبک را نشان می‌دهد.



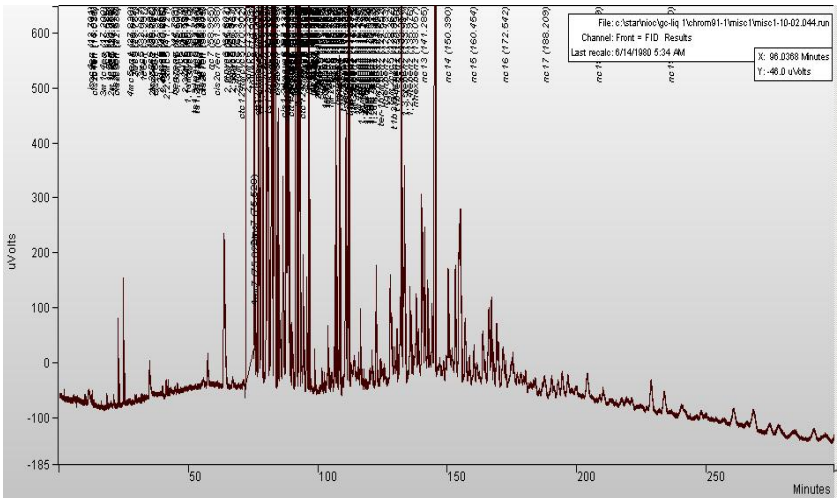
شکل۲- کروماتوگرافی گازی ترکیبات اشباع در پسماند نفتی



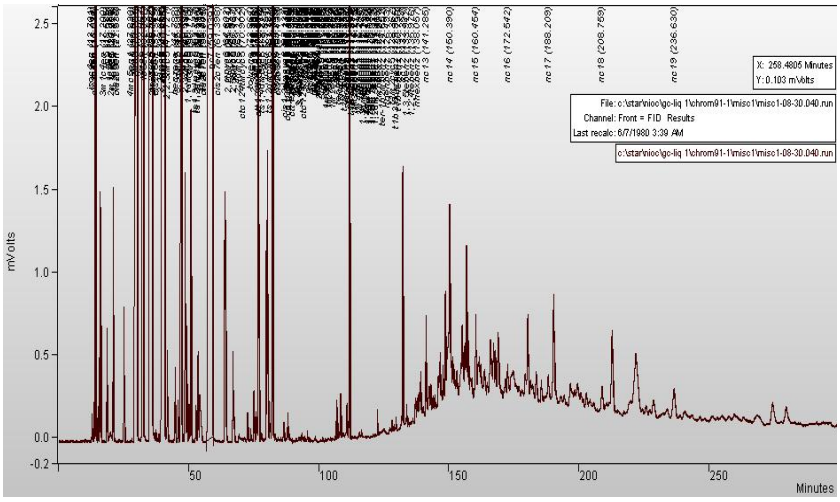
شکل ۳- کروماتوگرافی گازی ترکیبات آروماتیک در پسماند نفتی



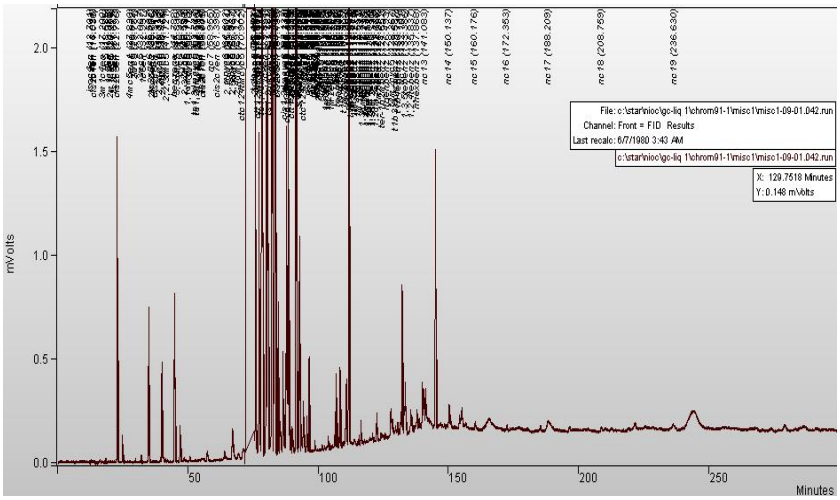
شکل ۴- کروماتوگرافی گازی ترکیبات اشباع مایع رویی پسماند باقی مانده حاصل از تیمار جدایه MIS_1



شکل ۵- کروماتوگرافی گازی ترکیبات آروماتیک مایع رویی پسماند باقیمانده حاصل از تیمار جدایه MIS_1

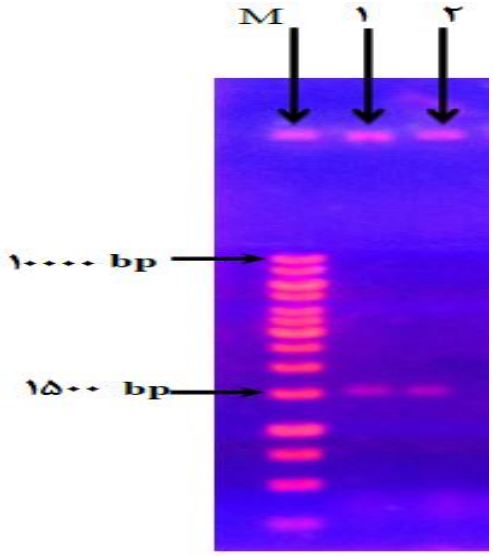


شکل ۶- کروماتوگرافی گازی ترکیبات اشباع مایع رویی پسماند باقی مانده حاصل از تیمار جدایه MIS_2



شکل ۷- کروماتوگرافی گازی ترکیبات آروماتیک مایع رویی پسماند باقی مانده حاصل از تیمار جدایه MIS_2

در واکنش زنجیره ای پلیمراز برای دو سویه MIS_1 و MIS_2 تکثیر قطعه *16S rRNA* با موفقیت همراه بود و قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی در الکتروفورز مشاهده شد(شکل ۸). براساس نتایج به دست آمده از مقایسه توالی ژن*16S rRNA*، ۲ سویه با اطلاعات موجود در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی، مشخص شد که سویه MIS_1، *Arthrobacter aurescens* و سویه MIS_2، *Pseudomonas aeruginosa* است. این باکتری‌ها در بانک ژنی به ترتیب با شماره دسترسی KF991512.1 و KF991513.1 ثبت شدند.



شکل ۸- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز برای جدایه‌های MIS_1 و MIS_2

M: شاخص[۹] ۱ کیلو بازی، **۱:** فرآورده واکنش زنجیره ای پلیمراز حاصل از جدایه MIS_1،

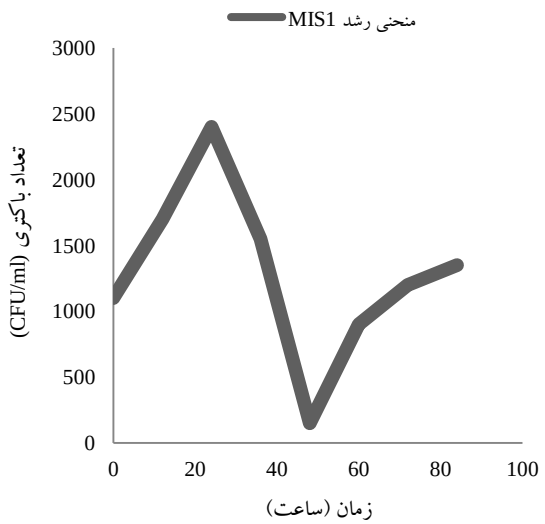
2: فرآورده واکنش زنجیره ای پلیمراز حاصل از جدایه MIS_2

همانگونه که از نتایج جدول مشخص می‌شود جدایه MIS_1 یک باکتری میله ای گرم مثبت هوازی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی است که با توجه به سایر ویژگی‌ها به جنس آرتروباکتر متعلق است. جدایه MIS_2 جزو باکتری میله ای گرم منفی هوازی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت است و باکتری به جنس سودوموناس متعلق است.

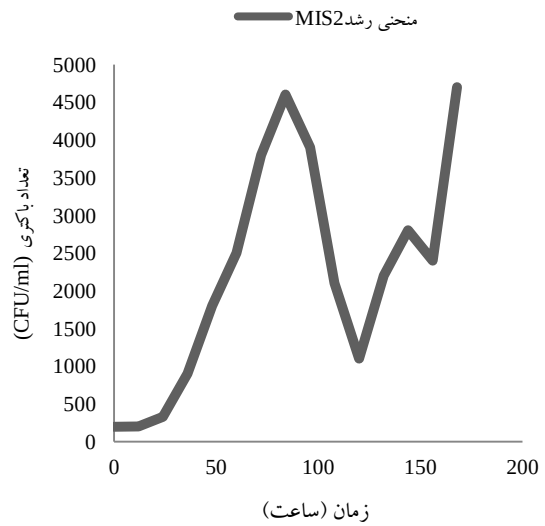
رسم منحنی این دو جدایه در محیط پایه معدنی و با روش رقت‌سازی متوالی انجام شد. همانطور که مشاهده می‌شود(شکل ۹)، جدایه MIS_1 پس از گذشت ۲۴ ساعت برای نخستین بار به بیش‌ترین میزان رشد خود می‌رسد و سپس، در ساعت ۴۸ وارد فاز مرگ می‌شود و دوباره شروع به رشد می‌کند. جدایه MIS_2 (شکل ۱۰) رشد بسیار سریعی در طی ۷ روز دارد و در محیط پایه معدنی پس از ۸۴ ساعت به حداکثر رشد خود می‌رسد و سپس رفته رفته در ساعت ۱۲۰ به حداقل رشد رسیده و دوباره شروع به رشد با سرعت بالا می‌کند. به همین ترتیب در طی ۷ روز انکوباسیون چندین مرحله رشد لگاریتمی و سپس فاز مرگ برای هر دو باکتری وجود دارد.

جدول۳- نتایج ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آزمون‌های بیوشیمیایی دو جدایه تجزیه کننده پسماند نفت

Character or test	Strain	
	MIS_2	MIS_1
Cell Shape	Rod	Rod
Colony colour	Brown	Cream
Gram Reaction	–	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	–
Motility	–	–
Indol production	–	–
Citrate Utilizitation	+	+
Urease	+	–
TSI	Alk-Alk	Acid-Acid
O-F Test	+	+
Nitrate Reduction	+	–
MR-VP	(+ MR – , VP)	(+ MR – , VP)

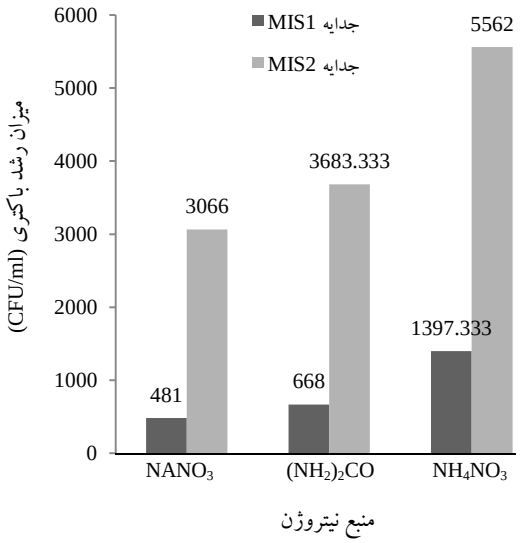


شکل۹- منحنی رشد جدایه MIS_1



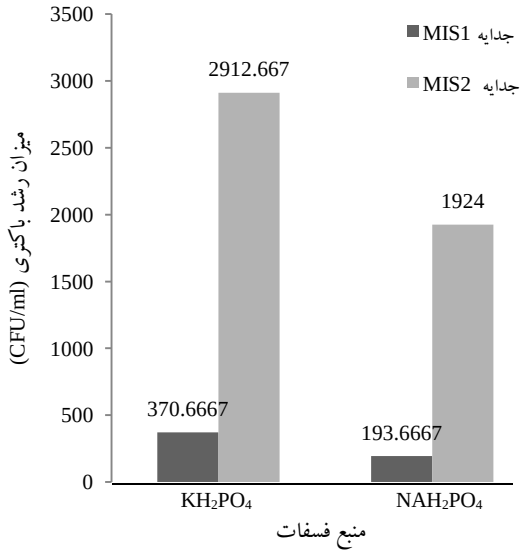
شکل۱۰- منحنی رشد جدایه MIS_2

همانگونه که از شکل۱۱ ملاحظه می‌شود بهترین منبع نیتروژن برای رشد جدایهMIS_1، نیترات آمونیوم است. در حالی که اوره و نیترات سدیم تأثیر کمتری در رشد این جدایه در محیط پایه معدنی مربوطه داشتند. همچنین، بر طبق این شکل، بهترین منبع نیتروژن برای رشد جدایه MIS_2 هم، نیترات‌آمونیوم بود، در حالی که اوره و نیترات سدیم میزان رشد کمی را در محیط پایه معدنی موجب می‌شوند.



شکل۱۱- نمودار مقایسه ای بهینه سازی منبع نیتروژن

همچنین، بهترین منبع فسفات برای رشد جدایهMIS_1، پتاسیم دی هیدروژن فسفات است. در حالی که سدیم دی هیدروژن فسفات تأثیر کمتری در رشد این جدایه در محیط پایه معدنی مربوطه داشتند. همچنین، بر طبق شکل ۱۲ بهترین منبع فسفات برای رشد جدایه MIS_2، نیز پتاسیم دی هیدروژن فسفات بوده در حالی که سدیم دی هیدروژن فسفات میزان رشد کمی را در محیط پایه معدنی موجب می‌شوند.



شکل۱۲- نمودار مقایسه ای بهینه سازی منبع فسفات

بحث و نتیجه‌گیری

در میان انواع روش‌های موجود برای کاهش اثرات مضر ترکیبات نفت در جایگاه‌های آلوده، اصلاح زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های ساکن در این محل‌های آلوده یکی از پرکاربردترین روش‌هاست. با کمک این روش‌های اصلاح زیستی تهدید برای آب‌های جاری کاهش و میزان تجزیه زیستی افزایش می‌یابد(۹، ۱۰). علاوه بر این چون در این پسماندهای نفتی مقدار زیادی نفت باقی می‌ماند و این کار هم از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ زیست محیطی دارای مزیت است، با استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده پسماند نفت می‌توان این آلودگی را بدون هزینه‌های زیاد کنترل کرد(۱۱). در این پژوهش، با استفاده از تیمار نمونه پسماند در محیط پایه معدنی که تنها منبع کربن و انرژی آن پسماند نفتی بود و سپس، تلقیح آن به پلیت‌های نفت- آگار، ۱۰ جدایه باکتریایی جداسازی شد. جدایه MIS_1 و MIS_2 به ترتیب متعلق به جنس آرتروباکتر و سودوموناس تشخیص داده شدند. سودوموناس‌ها از فراوان ترین جنس‌های باکتری در محیط هستند و در بررسی‌های انجام شده در مورد جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی به فراوانی جداسازی شده اند و پتانسیل بالایی در استفاده از این ترکیبات برای رشد و متابولیسم دارا هستند.

ژوزف و همکاران[۱۰] در طی تحقیقی مشابه در مورد اصلاح زیستی پسماندهای نفتی و جداسازی نفت از پسماندهای نفتی، جداسازی باکتری را از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی و با روشی مشابه انجام دادند و تنها موفق به جداسازی سویه‌های مختلف جنس باسیلوس شدند(۵). در یک بررسی که توسط هلمی و همکاران[۱۱] در مورد اصلاح زیستی پسماند نفتی و تجزیه زیستی پسماندهای نفتی انجام شد جداسازی باکتری انجام نشد اما از باکتری *Azotobactervinelandii AV* ^{01} برای جداسازی نفت صورت از پسماند نفتی و از کنسرسیوم میکروبی حاوی *Bacillus cereus* BL^{01}، *Pseudomonas stuzeri* BL^{02} و *Bacillus sp.* BL^{04} به منظور تجزیه زیستی پسماندهای نفتی استفاده شد(۱۱). آیوتامونو و همکاران[۱۲] یک بررسی در مورد اصلاح زیستی پسماندهای نفتی انجام دادند. در این بررسی گونه‌های سودوموناس و باسیلوس از پسماندهای نفتی جداسازی شد و به مخلوط پسماند نفتی و خاک کشاورزی که با نسبت ۶ به ۱ با هم مخلوط شده بودند به منظور اصلاح زیستی تلقیح شد. میزان کاهش هیدروکربن‌های کلی نفت پسماند نفتی پس از ۲ هفته انجام اصلاح زیستی بین ۴۰ تا ۵۲ درصد و پس از ۶ هفته بین ۶۳ تا ۸۴ درصد بود(۴).

در این پژوهش، به منظور غربال‌گری باکتری‌های تجزیه کننده پسماند نفت از محیط‌های سنجش میزان تجزیه‌کنندگی نفت حاوی پسماند نفتی، شن‌های شسته شده و استریل رودخانه و محیط پایه معدنی استفاده شد. پسماند نفتی باغلظت ۵ درصد به این محیط‌ها افزوده شد و شن‌های رودخانه به منظور ایجاد حالت سایش و کمک به تجزیه کنندگی پسماند نفت بررسی شد. در این آزمون پس از ۷ روز تیمار درون این محیط‌ها برداشت نفت به شکل چشمی دیده شد. اندازه‌گیری مقدار کربن‌های کلی باقیمانده درصد برداشت نفت متفاوتی را برای باکتری‌های مختلف نشان داد یکی از باکتری‌ها جداسازی شده از پسماند نفتی ۷۲ درصد برداشت نفت را نشان داد و دارای بالاترین تجزیه کنندگی پسماند نفت بود. ژوزف و همکاران طی تحقیقی مشابه با استفاده از همین روش به غربال‌گری باکتری‌های تجزیه کننده نفت پرداختند. در

این تحقیق برای تجزیه کنندگی نفت از همین محیط‌های سنجش تجزیه کنندگی نفت استفاده شد و پسماند نفتی با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ درصد به این محیط‌ها اضافه شد. در این‌جا نیز پس از ۷ روز تیمار تجزیه کنندگی نفت به شکل چشمی دیده شد(۵). اپکو و همکارانتحقیقی با عنوان میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از محیط حاوی پسماند نفتی انجام دادند. در این تحقیق میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از محیط آلوده به پسماند نفتی مطالعه شد. این مطالعه نشان داد که *سودوموناس آئروژینوزا* بالاترین میزان تجزیه زیستی را در میان دیگر باکتری‌های جداسازی شده دارد(۱۲). بهلولگیل وهمکاران[۱۳] در طی یک مطالعه آزمایشگاهی در مورد مکانیسم‌های برداشت نفت در فرآیندهای MEOR تجزیه زیستی ترکیبات نفتی را به عنوان یکی از مکانیسم‌های برداشت نفت معرفی کردند. در این بررسی مشخص شد که در طی تجزیه زیستی ترکیبات سنگین‌تر نفتی به ترکیبات سبک تر تبدیل می‌شوند و با کاهش ویسکوزیته نفت، اجزا موجود در آن، به محصولات با ارزش‌تری تبدیل می‌شوند. این تجزیه زیستی به اجزا سبک‌تر نفت به‌خصوص ترکیبات پارافینی محدود می‌شود. جنس‌های سودوموناس، باسیلوس و آرتروباکتر در تجزیه ترکیبات نفتی کارایی بالایی دارند(۱۳). ماکوت و همکاران[۱۴] تحقیقی به منظور تعیین فلور باکتریایی خاک‌های آلوده با محصولات نفتی انجام دادند. در این مطالعه، گونه‌های مختلف باکتری از جمله کلبسیلا و سودوموناس از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی شد(۱۴). کاموترا و همکاران[۱۵]. در تحقیقی که در مورد اصلاح زیستی پسماندهای نفتی انجام دادند یک کنسرسیوم میکروبی متشکل دو سویه *Pseudomonas aeruginosa* و یک *Rhodococcus sp* از خاک‌های آلوده به پسماندهای نفتی جداسازی شد. این کنسرسیوم میکروبی قادر به تجزیه ۹۰ درصد از هیدروکربن‌ها در محیط مایع پس از ۶ هفته بود(۱۵) همان‌طور که مشاهده می‌شود در هیچ یک از بررسی‌ها تجزیه کنندگی پسماند نفت بیش از ۹۰ درصد نبود. علت آن را می‌توان به‌وسیله انجام تحقیقاتی در مورد نوع ترکیبات هیدروکربنی که در این ۱۰ درصد باقیمانده وجود دارند مشخص کرد. ممکن است این ۱۰ درصد باقیمانده ترکیبات رزین یا آسفالتنی باشند که امکان برداشت آن‌ها توسط باکتری وجود ندارد. در مجموع می‌توان گفت تجزیه آلودگی‌های حاصل از پسماند نفتی با استفاده از این باکتری‌ها وجود دارد و می‌توان با افزودن منابع نیتروژن و فسفر مناسب به خاک‌های آلوده به این ترکیبات نفتی رشد این باکتری‌ها را تحریک و تسریع کرد. نتیجه این عمل تجزیه ترکیبات موجود در پسماند نفتی و کاهش سمیت آن‌هاست.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر خود را از شرکت ملی مناطق نفت خیز جنوب اهواز، واحد ایمنی، بهداشت و محیط[۱۶]، شرکت بهره‌برداری نفت و گاز مسجد سلیمان، آقایان نجف بهادری و مهندس رامتین آموی، واحد پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مسجد سلیمان، آقای مهندس حسین محمدپور، تمامی کارکنان محترم آزمایشگاه اداره شیمیایی مناطق نفت خیز جنوب اهواز، آقایان مهندس یحیوی، دکتر سعید شجاع و مهندس امین عفیفی به خاطر همکاری در مراحل مختلف تحقیق ابراز می‌نمایند. تحقیق حاصل مربوط به پایان نامه کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم بوده و از کلیه حامیان این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Arvanitis N, Katsifas E, Chalkou K, Meintanis C, Karagouni A. A refinary sludge deposition site: Presence of nahH and alkJ genes and crude oil biodegradation ability of bacterial isolates. *Biotechnology Lett* 2008; 30: 2105-10.

(2) Bossert I, Bartha R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In:R. M. Atlas,editor. PetroleumMicrobiology. 1th ed. New York; CN: MacMillan Publishing company; 1984.

(3) May Long R. The distribution and diversity of polycyclic aromatic compound-degrading bacteria and key degradativegenes [Dissertation]. England: Exeter Univ.; 2008.

(4) Ayotamuno M, Okparanma R, Nweneka E, Ogaji S, Probert S. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. *Applied energy* 2007; 84(9): 936-43.

(5) Joseph P, Joseph A. Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge. *Journal of hazardous materials* 2009; 161(1): 522-25.

(6) Jones D. M, Douglas A. G, Parkes R. J, Taylor J, Giger W, Schaffner C. The recognition of biodegraded petroleum-derived aromatic hydrocarbons in recent marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 1983; 14(3): 103–08.

(7) Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 2000; 40(4): 339-46.

(8) Trindade P, Sobral L, Rizzo A, Leite S, Soriano A. Bioremediation of a weathered and a recently oil- contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 2005; 58(4): 515-22.

(9) Kanaly R. A, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*2000; 182(8): 2059-67.

(10) Mishra S, Jyot J, Kuhad R. C, Lal B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and environmental microbiology* 2001; 67(4): 1675-81.

(11) Helmy Q, Kardena E, Nurachman Z. Application of Biosurfactant Produced by Azotobactervinelandii AV01 for Enhanced Oil Recovery and Biodegradation of Oil Sludge. *International Journal of Civil & Environmental Engineering* 2010; 10(1): 7-14 .

(12) Dibble J, Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol* 1979; 37(4): 729-739 .

(13) BehlulgilK and Mehmetoglu M. Bacteria for improvement of oil recovery: A laboratory study. *Energy sources* 2002; 24(5): 413-22.

(14) Makut M and Ishaya P. Bacterial species associated with soils contaminated with used petroleum products in Keffi town, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4(16): 1698-1702.

(15) Cameotra S. S and Singh P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration& Biodegradation* 2008; 62(3): 274- 80.

---

[1]- Pitting
[2]- Total petroleum Hydrocarbon
[3]- Gas chromatography
[4]- Trypticase soy agar
[5]- Polymerase Chain Reaction
[6]- Bio edit
[7]- BLAST
[8]- NCBI
[9]- Ladder
[10]- Joseph P, et al.
[11]- Helmy Q, et al.
[12]- Ayotamuno M, et al.
[13]- BehlulgilK, et al.
[14]- Makut M, et al.
[15]- CameotraS. S, et al.
[16]- HSE

Isolation and identification of oil sludge degrading bacteria from production tank Number 9 Masjed Soleiman

Yalda Sheyni
M.Sc. Student of Microbiology, Islamic Azad University, Qom branch, Iran, yalda.sheyni@yahoo.com
Hossein Motamedi *
Associate Professor of Microbiology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran, hhmotamedi@yahoo.com
Ahmad-ali Pourbabaee
Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Qom branch, Iran, ahmadalipb@gmail.com

Abstract

Introduction: "Bioremediation" is one of the most effective methods to remove petroleum contaminants. The aim of the present study is to isolate the indigenous bacteria from the waste petroleum in the Masjed Soleiman No. 9 production tank and to examine the effect of their application on the elimination of petroleum heavy chain hydrocarbons and converting them into light compounds.

Materials and methods: Two percent of petroleum sludge was inoculated to the mineral basal medium and after proliferation of its indigenous bacteria, they were inoculated into the mixture of oil sludge and sand at level of 5%, and the amount of total hydrocarbons and residual oil were measured and compared. The isolates were identified based on biochemical tests and 16S rRNA gene sequencing. Optimization of nitrogen and phosphate sources was done based on growth curves of selected isolates. Gas chromatography was used to determine degradation of sludge hydrocarbons.

Results: In this study, 10 bacterial isolates were isolated from petroleum sludge. Measurement of petroleum total hydrocarbons, using Soxhlet-extraction method, showed that two isolates named MIS1 and MIS2 are able to decompose oil sludge hydrocarbons within 7 days, with the yields of 62% and 72%, respectively. Furthermore, the two isolates reach the end of the logarithmic phase at 48 and 120 hrs, respectively. The best source of nitrogen and phosphate for both isolates was ammonium nitrate and potassium di hydrogen phosphate, respectively. The isolates were identified as *Arthrobacter aurescens* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. In gas chromatography analysis it was revealed that *Pseudomonas aeruginosa* was more potent in degradation of heavy chain hydrocarbons and their conversion to light chain compounds.

Discussion and conclusion: Resident bacteria are present in the oil sludge and are able to degrade the heavy petroleum compounds and convert them into light compounds. These bacteria are effective in the reduction of environmental pollution and production of low molecular weight hydrocarbons.

Key words: Bioremediation, Oil sludge, Total petroleum hydrocarbons, Gas chromatography

* Corresponding author
Received: August 3, 2013 / **Accepted:** November 6, 2013