فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۴۷- ۵۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

غربال‌گری، خالص‌سازی و شناسایی دیاتومه‌های سیستم تصفیه پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه

الهام محمدیان: کارشناس ارشد سیستماتیک اکولوژی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، mohamadian_77@yahoo.com
ناصر کریمی*: استادیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، nkarimie@yahoo.com
بهنام راسخ: دکتری بیوشیمی، گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، rasekhb@ripi.ir
حمیدرضا قاسم‌پور: دانشیار مهندسی شیمی و بیوتکنولوژی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران، ghasempour2009@gmail.com
سوما دهلوی: کارشناس ارشد سیستماتیک اکولوژی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، soma.dehlavi2009@gail.com

چکیده

مقدمه: وجود پالایشگاه‌های متعدد در ایران، اهمیت تصفیه پساب را توجیه می‌کند. ریز جلبک‌ها با توجه به تنوع و کاربرد فراوان، در این امر برتری دارند. از ریزجلبک‌های موثر، می‌توان به باسیلاریوفایت، که به دیاتومه‌ها معروف هستند، اشاره کرد که از نظر اکولوژی بسیار موفق هستند. بهترین روش، جستجوی دیاتومه‌ها در محل آلودگی است. با توجه به مطالعات پالمر، با شناسایی گونه‌های مقاوم، می‌توان از آن‌ها به عنوان یک شاخص آلودگی آلی، برای تخمین کیفیت آب استفاده کرد. محاسبه حجم زیستی هر سلول، به عنوان اندازه‌گیری توده زیستی نسبی است. با مطالعه دیاتومه‌های سیستم تصفیه پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه، علاوه بر کمک به غنای گونه‌ای کشور، می‌توان گونه‌های مقاوم به آلودگی نفتی را شناسایی و معرفی کرد، تا در مطالعات بعدی برای تصفیه زیستی استفاده شود.

مواد و روش‌ها: از ۶ ایستگاه تعیین شده در سیستم تصفیه پساب شرکت پالایش نفت کرمانشاه، نمونه‌برداری انجام شد. پس از انتقال به آزمایشگاه و با تهیه سری رقت از نمونه‌ها در محیط بی جی مایع، و در طی پاساژهای متوالی و متعدد ریزجلبک‌ها خالص شدند. سپس، دیاتومه‌ها با کلونی‌های قهوه‌ای در پلیت‌های جدید پاساژ داده شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، شناسایی شدند. میانگین مساحت و حجم زیستی سلول‌ها، بر حسب میکرومتر مربع با استفاده از روش هیلبراند[1]، محاسبه شد.

نتایج: عدم رشد باکتری در محیط نوترینت آگار پس از ۴۸ ساعت، نشان دهنده موثر بودن روش خالص‌سازی به کار برده شده با استفاده از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بود. همچنین، در این پژوهش، با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر رده‌های مختلفی از دیاتومه‌ها شناسایی شد، که بیشتر به جنس‌های نویکولا، نیتزسشیا و فراستولیا متعلق بودند. در میان جنس‌ها و گونه‌های شناسایی شده، گونه فراجیلاریا کاپوسینا دارای بیش‌ترین حجم زیستی در سلول بود.

بحث و نتیجه‌گیری: در بررسی جنس‌ها و گونه‌های سیستم تصفیه پساب شرکت پالایش کرمانشاه، به علت آلودگی، تنوع دیاتومه‌ها بسیار پایین بود. بسیاری از جنس‌های شناسایی شده مطابق با گزارشات قبلی بود. *فراجیلاریا کاپوسینا* حجم بیشتر توده زیستی نسبی را تشکیل داد. بر طبق جنس‌های شناسایی شده و شاخص پالمر، پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه، آلودگی کمابیش بالایی دارد. همچنین، با توجه به این پژوهش، می‌توان جنس‌های فراجیلاریا و پینولاریا را به عنوان جنس‌های جدید مقاوم به آلودگی نفتی گزارش کرد.

واژه‌های کلیدی: دیاتومه، شرکت پالایش نفت کرمانشاه، پساب، غربال‌گری

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

۶۳ درصد از منابع نفتی دنیا در خاورمیانه قرار دارند (۱). با توجه به اینکه در ایران پالایشگاه‌های متعددی وجود دارد، اهمیت تصفیه پساب، قبل از ورود به محیط زیست، افزایش می‌یابد. امروزه تصفیه زیستی توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. از موجوداتی که در تصفیه زیستی نقش دارند، می‌توان به گیاهان، باکتری‌ها و جلبک‌ها اشاره کرد (۲). بنابر دلایل متعددی در تصفیه پساب پالایشگاه، ریزجلبک‌ها برتری دارند. از ریزجلبک‌های موثر می‌توان به باسیلاریوفایت، که به دیاتومه‌ها معروف هستند، اشاره کرد (۳). شواهد روزافزون نشان از نقش ریزجلبک‌ها در اکسیداسیون و تجزیه هیدروکربن‌ها و تصفیه زیستی پساب پالایشگاه نفت دارد (۴ و ۵). در نخستین گام برای تصفیه زیستی، باید جنس‌ها و گونه‌های مقاوم را شناسایی کرد. بهترین روش، جستجوی آن‌ها در محل آلودگی است. مرحله پس از یافتن سویه، خالص‌سازی، شناسایی و کشت بهینه خواهد بود. بررسی حذف آلاینده‌ها توسط سویه غربال شده در مرحله بعدی قرار دارد (۶).

قدیمی‌ترین و ابتدایی‌ترین موجودات فتوسنتتیک، ریزجلبک‌ها هستند که با انجام فرآیند فتوسنتز، اکسیژن جو را ایجاد کرده‌اند، و به دنبال آن لایه اوزون بوجود آمده است. بدین ترتیب ریزجلبک‌ها حیات سایر موجودات را بر روی زمین امکان‌پذیر ساخته‌اند. امروزه توده زیستی جلبکی در صنعت‌های متعددی کاربرد دارد. توده زیستی جلبکی می‌تواند به عنوان ماده اولیه سوخت زیستی، ماده غذایی برای انسان و دام، در بخش سلامت و داروسازی و همچنین، در بخش کشاورزی به عنوان کود، استفاده شود (۱، ۷ و ۸).

رده دیاتومه‌ها، بیشتر تک سلولی است که از نظر توزیع، جهانی هستند و طیف وسیعی از زیستگاه‌ها، مانند استخرهای آب شیرین تا دریاچه‌های بسیار شور را در برمی‌گیرند. در میان جانداران آبزی در زمین، دیاتومه‌ها بیش‌ترین تنوع و فراوانی را دارا هستند (۳). همچنین، در میان سایر فیتوپلانکتون‌ها، همیشه و یا بیشتر یک یا چند گونه از دیاتومه‌ها، نمونه غالب است. دیاتومه‌ها از نظر اکولوژی بسیار موفق و کاربردهای محیط زیستی وسیعی دارند. از دیاتومه‌ها می‌توان به عنوان شاخص تغییرات محیط زیستی و تغییرات طولانی مدت در آب‌های جاری، نهرها، دریاچه‌ها، قطب شمال، جنوب و دریاچه‌های شور و شیرین استفاده کرد (۹). علاوه بر آن به عنوان شاخص اسیدیته آب‌های سطحی و همچنین، به عنوان شاخص یوتروفیکاسیون دریاچه‌هاست. همچنین، خاک‌های دیاتومه، که برای حفاظت غلات، بقولات و دانه‌های روغنی در انبارها بکار گرفته می‌شود، از دیگر کاربردهای دیاتومه‌هاست (۳ و ۶). دیاتومه‌ها طیف وسیعی از نظر شکل و اندازه را در برمی‌گیرند. در نمونه مخلوط ممکن است تعداد زیادی از دیاتومه‌های کوچک حجم کمی از توده زیستی را به خود اختصاص دهند، در حالی که دیاتومه‌های بزرگ‌تر که حتی فراوانی کمتری دارند حجم غالب را تشکیل می‌دهند. بنابراین، محاسبه حجم هر سلول به عنوان اندازه‌گیری توده زیستی نسبی است (۹).

فلور ریزجلبکی مناطقی از جهان، به‌ویژه در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه هنوز به خوبی شناسایی نشده است. با اهمیت روز افزون این موجودات، شناسایی و مطالعه آن‌ها نیز گسترده می‌شود. در محیط‌های آبی مختلف، فراوانی و تنوع هر یک از این جوامع جلبکی و نقش آن‌ها متفاوت است (۱۰). آلاینده‌ها با تغییر در اندازه جمعیت‌های گونه‌ها باعث کاهش تنوع، پیچیدگی و ثبات اجتماعات فیتوپلانکتونی می‌شوند (۶). گونه‌های جلبکی مختلف میزان حساسیت‌های متفاوتی نسبت به آلودگی‌ها

بروز می‌دهند (۱۱). در مورد واکنش ریز جلبک‌ها به عوامل محیطی مانند اسیدیته، فلزات سنگین، شوری و مواد غذایی اطلاعات اکولوژی زیادی وجود دارد و گونه‌های شاخص زیادی در این مورد معرفی شده است (۶ و ۱۲).

شرکت پالایش نفت کرمانشاه، یکی از قدیمی‌ترین پالایشگاه‌های ایران است. بنابراین، منطقه مناسبی برای جستجوی دیاتومه‌های مقاوم است. پساب تولیدی در شرکت پالایش نفت کرمانشاه توسط سیستم‌های طراحی شده و در طی فرآیندهای مختلف تصفیه می‌شود. در نخستین مرحله واحد ای‌پی‌ای[۲]، که یک واحد تصفیه فیزیکی محسوب می‌شود، قرار دارد. سپس، مراحل تصفیه به ترتیب شامل: تانک یکنواخت ساز، تانک خنثی‌سازی، حوضچه منعقدکننده، حوضچه هوادهی، زلال کننده‌ها، تغلیظ کننده، بسترهای خشک کننده لجن و حوضچه کلرزنی است.

با مطالعه تاکسونومیکی دیاتومه‌های سیستم تصفیه پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه، علاوه بر کمک به غنای گونه‌ای کشور، می‌توان گونه‌های مقاوم به آلودگی نفتی را شناسایی و معرفی کرد. علاوه بر آن با محاسبه حجم زیستی[۳] دیاتومه‌های جدا شده، نسبت توده زیستی هر دیاتومه تعیین می‌شود (۹). همچنین، می‌توان با توجه به گونه‌های جدا شده درجه آلودگی پساب خروجی را تعیین کرد. همچنین، با خالص‌سازی جلبک‌های بومی می‌توان در مطالعات بعدی با استفاده از آن‌ها به عنوان روشی مکمل، بدون ایجاد تغییرات اساسی در روند فعلی عملکرد تصفیه خانه، و با صرف هزینه‌های کمتر سبب افزایش عملرد تصفیه بیولوژیکی پساب پالایشگاهی شد. بنابراین، این کار با هدف بررسی غربال‌گری، خالص‌سازی و شناسایی دیاتومه‌های سیستم تصفیه پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

مشخصات محل مورد مطالعه

شرکت پالایش نفت کرمانشاه از سال ۱۳۱۴ در شمال شهر کرمانشاه، با موقیعت ۴۷ درجه و ۴ دقیقه شرقی و ۱۹ درجه و ۳۴ دقیقه شمالی، و در کنار رودخانه قره سو فعالیت خود را با تولید روزانه ۴۲۰۰ بشکه آغاز کرد . نفت خام آن از نفت شهر و افرینه اهواز تامین می‌شود و در حال حاضر تولید روزانه آن ۳۰۰۰۰ بشکه در روز است.

ایستگاه‌های نمونه‌برداری

به طور کلی تعداد ایستگاه‌های نمونه‌برداری در یک پیکره آبی با توجه به اهداف مطالعه، ماهیت شاخص‌های مورد سنجش، عمق محیط و پستی و بلندی بستر، نوع بستر و جنس آن و در نهایت، شرایط اطراف آن تعیین می‌شود. میزان دقت مورد نیاز در تعیین تعداد ایستگاه‌ها نقش بزرگی را ایفا می‌کند. در مواردی که شرایط یک محیط آبی از جمله تالاب‌ها و دریاچه‌ها یکنواخت است، حداقل ۳ ایستگاه منظور می‌شود (۶).

در این پژوهش، با توجه به این که شاخص‌های محیطی (از جمله اکسیژن محلول) مورد سنجش نیست و هدف اصلی تعیین تنوع جلبکی و جداسازی آن‌هاست، در مجموع ۶ ایستگاه تعیین شد. ۳ ایستگاه در حوضچه هوادهی، محل ورود پساب به حوضچه و قسمت‌های هوادهی و خروجی حوضچه، و ۳ ایستگاه دیگر شامل: زلال کننده‌ها، حوضچه کلرزنی و حوضچه ماهی بودند. ایستگاه‌های مورد نظر انتخاب شدند که معرف ناحیه پیرامون خود هستند.

روش نمونه‌برداری

از جلبک‌هایی که به طور طبیعی بر روی دیواره قسمت‌های مختلف حوضچه هوادهی بودند، شامل محل ورود پساب به حوضچه، قسمت‌های وسط حوضچه و

در نهایت، خروجی حوضچه، به شکل تصادفی، نمونه‌برداری انجام شد. سایر ایستگاه‌ها به ترتیب عبارتند از: زلال کننده‌ها، حوضچه کلرزنی و حوضچه ماهی، که از قسمت‌های مختلف به شکل تصادفی و به روش تراشیدن از سطح، نمونه‌برداری انجام شد. هر نمونه به شکل جدا گانه در ظرف‌های شیشه‌ای دهانه گشاد استریل، ریخته شد. نمونه‌ها در شرایط تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد (۶ و ۱۳).

تهیه سری رقت با استفاده از محیط کشت مایع بریستول[4] به همراه آنتی بیوتیک

پس از حذف گل و لای موجود در نمونه‌ها، برای تغلیظ نمونه‌ها، در آزمایشگاه از روش سانتریفوژ[5] شد. در این روش ابتدا نمونه‌ها در ۱۵۰۰ دور در دقیقه[6] به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد (۱۰). پس از آن در شرایط عاری از میکروب[7]، سری رقت، تا رقت 10^{-5}، با استفاده از محیط کشت مایع بریستول تهیه شد. برای تهیه محیط کشت مایع بریستول، ۱۰ میلی‌لیتر از هر کدام از استوک‌های سدیم نیترات ۲/۹۴ میلی‌مولار، کلسیم کلرید ۲ آب ۰/۱۷ میلی‌مولار، منیزیم سولفات ۷ آب ۰/۳ میلی‌مولار، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۴۳، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۱/۲۹ میلی‌مولار، سدیم کلرید ۰/۴۳ میلی‌مولار، با یکدیگر مخلوط و سپس، [8] اسیدیته ۸ تنظیم شد. سپس، لوله‌ها به مدت ۲۱ روز، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با شرایط ۲۴ ساعت نور دهی در ژرمیناتور[9] با رطوبت ۵۰ درصد انکوبه شدند (۴، ۵، ۱۴-۱۶). برای حذف پروتوزوآهای موجود در نمونه از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد (۱۷).

انتقال به محیط جامد

پس از گذشت ۲۱ روز از آخرین رقتی که باعث ایجاد رنگ سبز شده بود و یک رقت قبل و پس از آن را به محیط بریستول آگار و بی جی[10] آگار، سدیم نیترات ۰/۵ گرم، کلسیم کلرید ۲ آب ۰/۰۳۶ گرم، منیزیم سولفات ۷ آب ۰/۰۷۵ گرم، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۴ گرم، سیتریک‌اسید ۰/۰۰۶ گرم، فریک‌آمونیوم سیترات ۰/۰۰۶ گرم، EDTA (۲ نمک سدیم) ۰/۰۰۱ گرم، سدیم کربنات ۰/۰۲ گرم، مخلوط عناصر فلزی میکرو ۱/۰ میلی‌لیتر، آگار (در صورت نیاز) ۱۰/۰ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، به شکل کشت خطی[11] و کشت مخلوط با محیط[12] و به همراه آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، که پس از استریل کردن توسط اتوکلاو[13]، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، به محیط کشت اضافه می‌شد، انتقال داده (شکل ۲-الف) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۲۴ ساعت نور دهی در ژرمیناتور با رطوبت ۵۰ درصد به مدت یک هفته انکوبه شد (۱۳ و ۱۷).

خالص‌سازی نهایی و تولید کشت عاری از باکتری

برای خالص‌سازی نهایی و حذف کامل باکتری‌ها، کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت‌های جامد به محیط کشت مایع برستول حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تلقیح شد(۱۷). نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت در یخچال نگه داری شدند. سپس، نمونه‌ها را در محیط بی جی آگار به شکل خطی کشت داده و به مدت یک هفته در ژرمیناتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نور دهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت ۵۰ درصد نگهداری شدند (۴ و ۵). برای اطمینان از حذف تمام

باکتری‌ها، نمونه بر روی محیط نوترینت آگار[۱۴] کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۷).

جداسازی دیاتومه‌ها

پس از خالص‌سازی نهایی، کلونی‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شد. دیاتومه‌ها دارای کلونی‌های قهوه‌ای رنگ بودند (شکل ۲-ب). به منظور کشت ایزوله توسط آنس در پلیت‌های جدید پاساژ داده شدند (شکل ۲-ج).

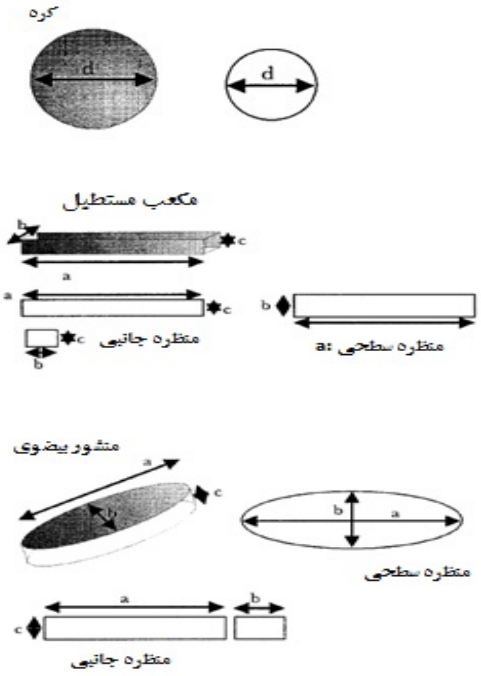
شناسایی دیاتومه‌ها

به منظور شناسایی، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری[۱۵] بررسی شد. نمونه‌ها قبل از مشاهده در زیر میکروسکوپ توسط فرمالین مرک[۱۶] ۳۷ درصد، در غلظت نهایی ۴ درصد، و فیکساتور لوگول یدین[۱۷]، پتاسیم یدید ۱۵۰ گرم، یدین ۵۰ گرم، آب مقطر ۹۸۰ میلی‌لیتر، استیک‌اسید گلاسیال ۲۰ میلی‌لیتر، تثبیت شد (۱۰، ۱۳ و ۱۸):

تشخیص و شناسایی دیاتومه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی شامل دکتر ادوارد و همکارانش[۱۸]، سورجلوس و همکارش[۱۹]، کلید شناسایی بیگس[۲۰] و کلید شناسایی لوویس[۲۱] انجام شد (۶، ۱۹ و ۲۰).

محاسبه مساحت و حجم زیستی

برای اندازه‌گیری ابعاد دیاتومه‌های شناسایی شده از نرم افزار دوربین دینو کپچر ۰/۲[۲۲] استفاده شد. ابعاد اندازه‌گیری شده میانگین مجموع ۵ نمونه است. پس از اندازه‌گیری ابعاد، میانگین مساحت یک سلول، بر حسب میکرومتر مربع و میانگین حجم زیستی یک سلول، بر حسب میکرومتر مربع با استفاده از روش هیلبراند[۲۳]، بر اساس اشکال هندسی سلول‌ها و با استفاده از فرمول‌های زیر (شکل ۱) محاسبه شد (۹).



$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 = \frac{\pi}{6} \cdot d^3$$
$$A = 4 \cdot \pi \cdot r^2 = \pi \cdot d^2$$

A: مساحت
V: حجم

$$V = a \cdot b \cdot c$$
$$A = 2 \cdot a \cdot b + 2 \cdot b \cdot c + 2 \cdot a \cdot c$$

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot a \cdot b \cdot c$$
$$A = 2 \cdot \frac{1}{4} \cdot \pi \cdot a \cdot b + \frac{1}{2} \cdot \pi \cdot (a+b) \cdot c = \frac{\pi}{2} \cdot (a \cdot b + [a+b] \cdot c)$$

شکل ۱- معادلات محاسبه مساحت و حجم زیستی، a: طول، b: عرض، c: ارتفاع

نتایج

خالص‌سازی

از آنجا که محیط بریستول فاقد منبع کربن است، بنابراین، گونه‌های فتوتروف غالب می‌شوند و استفاده از آنتی‌بیوتیک باعث شد تا تمام باکتری‌ها حذف شده و پس از ۴۸ ساعت بر روی محیط نوترینت آگار هیچ باکتری رشد نکند. همچنین، تا ۳ پاساژ متوالی نیز در کشت جلبک‌ها، هیچ گونه آلودگی باکتریایی مشاهده نشد (شکل ۲).

شکل ۲- الف: انتقال به محیط کشت جامد ب: کلونی‌های قهوه‌ای دیاتومه ج: کلونی‌های دیاتومه خالص شده

شناسایی دیاتومه‌ها

میزان آلودگی ایستگاه‌های نمونه‌برداری از ایستگاه اول به ایستگاه ششم به ترتیب کاهش می‌یابد. جلبک‌های شناسایی شده (شکل ۳) با توجه به ایستگاه‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ آمده است.

محاسبه مساحت و حجم زیستی

میانگین مساحت یک سلول و میانگین حجم زیستی یک سلول دیاتومه‌های شناسایی شده، با توجه به ایستگاه‌های نمونه‌برداری، در جدول ۲ آمده است.

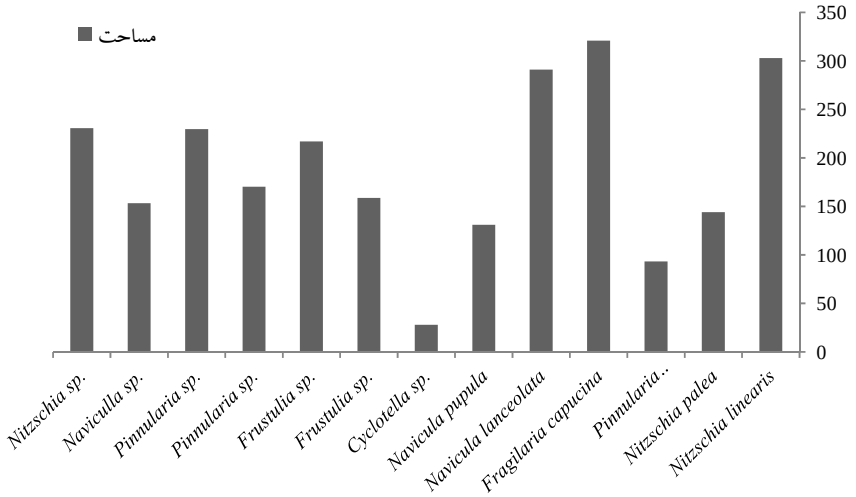
شکل ۳- دیاتومه‌ها با عدسی ۴۰ ×، عکس با دوربین دینوکپچر ۰/۲ (مقیاس عکس نمونه‌ها یکسان نیست.) الف: *Navicula lanceolata* ب: *Fragilaria capucina* ج: *Pinnularia cardinalis* د: *Nitzschia palea* ه: *Nitzschia linearis* و: *Navicula pupula* ی: *Cyclotella sp* ط: *Frustulia sp*. ر: *Nitzschia sp*. س:. *Pinnularia sp* ص: *Pinnularia sp*. ع: *Naviculla sp*. ک:. *Frustulia sp*

جدول ۱- جلبک‌های شناسایی شده با توجه به ایستگاه‌های نمونه‌برداری

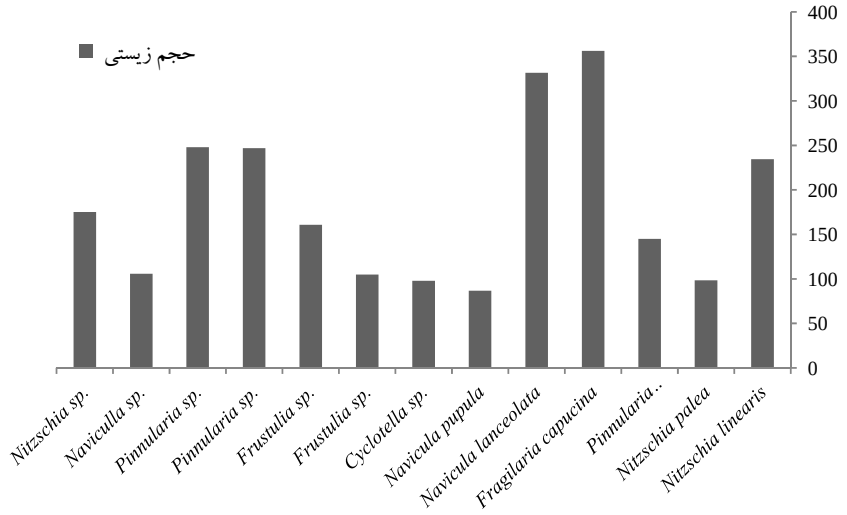
علامت اختصاری	ایستگاه	جنس‌های شناسایی شده
A	ورود پساب به حوضچه هوادهی	*Nitzschia linearis, Nitzschia sp.*
B	حوضچه هوادهی	*Nitzschia linearis, Nitzschia sp.*
C	خروجی حوضچه هوادهی	*Nitzschia sp.*
D	زلال کننده	*Frustulia sp., Pinnularia cardinalis, Nitzschia palea, Fragilaria capucina, Naviculla sp., Navicula lanceolata, Nitzschia sp.*
E	کلرزنی	*Pinnularia sp. , Cyclotella sp. , Frustulia sp.*
F	حوضچه ماهی	*Frustulia sp., Navicula pupula, Pinnularia sp., Naviculla sp.*

جدول ۲- مساحت و حجم زیستی دیاتومه‌ها بر اساس ایستگاه نمونه‌برداری

ایستگاه	نام دیاتومه شناسایی شده	مساحت um^2	حجم زیستی $um^3 . cell^{-1}$
A, B	*Nitzschia linearis*	۳۰۲/۷۶۹۸	۲۳۴/۵۵۵۵
C	*Nitzschia sp.*	۲۳۰/۶۹۲۶	۱۷۵/۲۰۴۹
D	*Nitzschia palea*	۱۴۴/۱۲۹۳	۹۸/۴۰۳۳
D	*Pinnularia cardinalis*	۹۳/۱۷۹۵	۱۴۴/۹۰۵۴
D	*Fragilaria capucina*	۳۲۰/۸۳۹۷	۳۵۶/۱۲۳۶
D	*Navicula lanceolata*	۲۹۱/۰۱۴۲	۳۳۱/۷۰۲۵
D	*Frustulia sp.*	۱۵۸/۷۲۷۰	۱۰۴/۷۹۸۵
E	*Pinnularia sp.*	۲۲۹/۵۶۷۰	۲۴۷/۹۳۶۷
E	*Cyclotella sp.*	۲۷/۹۲۱۴	۹۷/۹۴۱۴
F	*Navicula pupula*	۱۳۰/۹۹۴۶	۸۶/۸۱۳۸
F	*Frustulia sp.*	۲۱۷/۰۹۵۶	۱۶۰/۸۱۸۹
F	*Pinnularia sp.*	۱۷۰/۲۹۰۱	۲۴۶/۹۰۴۵
D, F	*Naviculla sp.*	۱۵۳/۲۸۱۷	۱۰۵/۸۸۵۴



شکل ۴- نمودار شماره ۱) مساحت یک سلول دیاتومه، بر حسب میکرو متر مربع



شکل ۵- نمودار شماره ۲) حجم زیستی یک سلول دیاتومه، بر حسب میکرومتر مکعب بر سلول

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، عدم رشد باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار، نشان‌دهنده موثر بودن روش استفاده شده در خالص‌سازی دیاتومه‌ها است. پراکندگی جنس‌ها، مطابق با بررسی‌های انجام شده را می‌توان به این شکل گزارش کرد که در حوضچه هوازنی (۳ ایستگاه اول) فقط جنس *نیتزشیا* مشاهده شد، و پس از آن به علت کاهش آلودگی تنوع در سایر ایستگاها افزایش یافت. در سایر ایستگاه‌ها *نویکولا*، *فراستولیا* و *پینولاریا* شناسایی شد. اما جنس *سیکلوتلا* و *فراجیلاریا* تنها در حوضچه زلال‌کننده مشاهده شد.

کولکویتز و مارسون[۲۴] برای نخستین بار جلبک را به عنوان شاخص آلودگی آلی معرفی کردند (۶). بر طبق گزارشات پالمر[۲۵] در سال ۱۹۶۹ آلودگی‌های آلی نسبت به سایر آلودگی‌ها، فلور جلبکی را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد. پالمر تحقیقات گسترده‌ای را به منظور شناسایی گونه‌های مقاوم و معرفی یک شاخص آلودگی آلی برای تخمین کیفیت آب انجام داد. در نهایت پالمر ۲۰ جلبک را به عنوان گونه‌های شاخص آلودگی مشخص کرد و به آن‌ها اعداد ۱ تا ۵ (حساس تا مقاوم) را اختصاص داد (۲۱). کاتانئو و همکارانش[۲۶] شاخص پالمر را در مطالعات دریاچه لائرنس به کار بردند و به جلبک‌ها اعداد ۱۵ تا ۲۴ (آلودگی متوسط تا آلودگی زیاد) اختصاص دادند (۶). مطابق با شاخص آلودگی پالمر، و گزارش جنس‌های *نویکولا* و *نیتزشیا* (با عدد شاخص۳) در این پژوهش، و همچنین، بررسی‌های کاتانئو و همکارانش و مشاهده جنس *سیکلوتلا* (با عدد شاخص ۲۵) در این بررسی، پساب شرکت پالایش نفت کرمانشاه آلودگی کمابیش بالایی دارد و حتماً باید قبل از ورود به رودخانه قره‌سو، به طور موثرتری تصفیه شود.

استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان شاخص زیست-محیطی در سایر مطالعات ایران و جهان نیز بررسی شده است. از جمله، در بررسی تنوع جلبکی پساب خروجی برکه‌های تثبیت تصفیه فاضلاب، در شهرستان‌های گیلان غرب و اسلام‌آباد در استان کرمانشاه، دیاتومه *سندموس* توسط الماسی و اشرفی[۲۷] در سال ۲۰۱۲ به عنوان گونه غالب گزارش شده است و با توجه به گونه‌های مشاهده

شده، کارایی این برکه‌ها در تصفیه خوب و راهبردی گزارش شد (۲۲). از دیگر بررسی‌ها می‌توان به مطالعه رمضان نژاد و همکارانش[۲۸] در سال۲۰۱۲ در بررسی اکولوژیک سرچشمه چشمه آبگرم کیله سفید سرپل ذهاب کرمانشاه، اشاره کرد. در این مطالعه، با توجه به این که مجموعه میکروبی بیشتر از موجودات هتروتروفیک تشکیل شده است، کیفیت آب ضعیف است. همچنین، در این پژوهش، گزارش شده است که با افزایش دشواری‌های بیولوژیک، تعداد گونه‌ها کاهش و فراوانی آن‌ها افزایش خواهد یافت (۲۳).

راجاسولوچانا و همکارانش، فلور جلبکی پساب پالایشگاه انوره در هند[۲۹] (۴) و سیواسوبرامانیان و همکارش[۳۰] فلور جلبکی پساب پالایشگاه کاکینادا در هند[۳۱] را مطالعه کردند. سپس، توانایی جلبک‌های جدا شده در تصفیه پساب پالایشگاه آزمایش شد (۵). برخی از جنس‌های شناسایی شده در این پژوهش، با گزارش سیواسوبرامانیان و راجاسولوچانا مطابقت دارد. اما برخی از جنس‌هایی که قبلا گزارش شده است، مثل *سیمبلا* و *سیندرا*، مشاهده نشده است. این تفاوت به علت تفاوت در میزان و نوع آلودگی است. مقایسه جلبک‌های جداسازی شده با سایر پژوهش‌های انجام شده در ایران بر روی جوامع جلبکی مناطق نزدیک به شرکت پالایش نفت کرمانشاه، برای مثال مطالعه بر روی جامعه جلبکی رودخانه قره سو توسط عطازاده و شریفی[۳۲] در سال ۲۰۱۲، تفاوت زیادی را نشان می‌دهد (۲۴). با توجه به پژوهش‌های انجام شده تغییر شرایط محیط زیست ریز جلبک‌ها، باعث تغییر در ساختار جامعه می‌شود. بنابراین، در بررسی‌های انجام شده در این پژوهش، جنس‌ها و گونه‌های دیاتومه‌های سیستم تصفیه پساب شرکت پالایش کرمانشاه، به علت آلودگی، تنوع بسیار پایین را نشان دادند. با توجه به این پژوهش، می‌توان *پینولاریا* و *فراجیلاریا* را برای نخستین بار به عنوان جنس‌های مقاوم به آلودگی نفتی گزارش کرد.

بر اساس بررسی‌های انجام شده، *فراجیلاریا کاپوسینا*، *نیتزشیا لینیاریس* و *نویکولا لانسئولاتا*، به ترتیب، دارای بیش‌ترین مساحت هستند. ولی این ترتیب در ارتباط با حجم زیستی متفاوت است، و *فراجیلاریا کاپوسینا*، *نویکولا لانسئولاتا*، جنس‌های *پینولاریا* و سپس، *نیتزشیا لینیاریس* دارای بیش‌ترین حجم زیستی است. بنابراین، *فراجیلاریا کاپوسینا* و *نویکولا لانسئولاتا*، درصد عمده توده زیستی را به خود اختصاص می‌دهند.

گزارش فلور این اکوسیستم، نه تنها برای مطالعه زیستگاه‌های آبی کشور از لحاظ بررسی‌های فلوریستیک و کاربردی حایز اهمیت است؛ بلکه با مطالعه تاکسونومیکی دیاتومه‌های سیستم تصفیه پساب خروجی شرکت پالایش نفت کرمانشاه و خالص‌سازی جلبک‌های بومی، می‌توان در مطالعات بعدی با استفاده از آن‌ها، به عنوان روشی مکمل، بدون ایجاد تغییرات اساسی و با صرف هزینه‌های کمتر در روند فعلی، عملکرد تصفیه‌خانه و عملکرد تصفیه بیولوژیکی پساب پالایشگاهی را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

از شرکت پالایش نفت کرمانشاه برای کمک‌های مالی و فراهم‌آوری امکان نمونه‌برداری از سیستم تصفیه پساب تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) A. Demirbas MFD. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*. 2011; 52: 163–70.

(2) Willey N. Phytoremediation, methods and reviews. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2007.

(3) Smol JP, Stoermer EF. The diatoms: applications for the environmental and earth sciences. 2nd ed. New Yourk: Cambridge University Press; 2010.

(4) Rajasulochana P, Dhamotharan, R, Murugesan, S, Rama Chandra Murthy A. Bioremediation of Oil Refinery Effluent By Using Scenedesmus Obliquus. *Journal of American Science*. 2009; 5 (4): 17-22.

(5) Sivasubramanian V, Muthukumaran M. Large scale phycoremediation of oil drilling effluent. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2012; 3 (4): 5-17.

(6) Edward G. Bellinger DCS. Freshwater Algae, Identification and Use as Bioindicators. 1st ed. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd; 2010.

(7) Sivakumar G, Xu J, Thompson RW, Yang Y, Randol-Smith P, Weathers PJ. Review: Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology*. 2012; 107: 1-9.

(8) Markou DG. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters. *Applied Energy*. 2011; 88: 3389–401.

(9) Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollingher U, Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*. 1999;35(2):403-24.

(10) Cheraghpour J. *Study of phytoplankton community in Gandoman wetland*. Kermanshah: Kermanshah University; 2007.

(11) Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R. Review: Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*. 2011; 37: 1362–75.

(12) Raquel González CG-B, Mónica Rouco, Victoria Lopez-Rodas, Eduardo Costas. Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicology*. 2012; 109: 25-32.

(13) Richmond A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnol and Appl Pycol: Australia: Blackwell Science Ltd; 2004.

(14) Atlas RM. *Handbook of microbiological media*. 3ed ed. London: CRC Press LLC; 2004.

(15) Costa JAV, de Morais MG, Dalcanton F, da Cruz Reichert C, Durante AJ. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cianobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2006; 61 (c): 105-10.

(16) Greque de Morais , Alberto Vieira Costa J. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers and Management*. 2007; 48 (7): 2169-73.

(17) Subhash S, Lipton A, Paulraj R. Antibiotic exposure to minimize microbial load in live feed Isochrysis galbana used for larval rearing of Indian pearl oyster Pinctada fucata. *Curret Science*. 2004; 87 (10):1339-40.

(18) Kianmehr H. The biology of The Algae Mashhad: Ferdowai University of Mashhad; 2009. 19.

(19) Patrik lavence ps. Manual on Prodution and Use of Live Food for Aquaculture. Rome: food and agreculture organization of united nations; 1996.

(20) F. chalabian AM. Thallophytes. 2ed ed. Tehran, Iran: Aeezh; 2008.

(21) Palmer CM. A Composite range of algae tolerance organic pollution. *Journal of Phycology*. 1969; 5(1):78-82.

(22) Almasi A, Sharafi K. Different types of algae in the effluent wastewater stabilization ponds. *Zahedan Journal of Research Medical Science.* 2010; 13(1): 6-7.

(23) Ramazannegad R, Ghassemi HR, Atazadeh I, Zahedi M. Ecological Studies of the Headwater of a Thermal Spring in Kilesephyd, Sar-e-Pol-e-Zohab in Kermanshah Province, Iran. *Environmental Science*. 2012; 9: 87-95.

(24) Atazadeh I, Sharifi M. Influence of zinc on productivity and species composition in algal periphyton communities. *Algological Studies*. 2012; 138(1) :57-73.

[1]- Helmut Hillebrand
[2]- APA
[3]- Biovolume
[4]- Bristol Solution
[5]- CRU-5000 Centrifuge IEC
[6]- RPM
[7]- Aseptic
[8]- AZ. pH/MV/TEMP METER 86502
[9]- Conviron version 6
[10]- BG
[11]- Strike
[12]- Pour Plate
[13]- Astell Scientific, Model ASB260
[14]- Nutrient Agar
[15]- Lecia Galen III, Cat Number: 317506
[16]- Merk
[17]- Lugol's Iodin
[18]- Dr Edward G. Bellinger et al
[19]- Sorgeloos et al
[20]- Barry J. F. Biggs
[21]- Lewis
[22]- DinoCapture 2. 0
[23]- Helmut Hillebrand
[24]- Kolkwitz and Marsson (1908**)**
[25]- Palmer (1969)
[26]- Cattaneo *et al.* (1995**)**
[27]- Almasi A, Sharafi K
[28]- Ramazannegad, R et al
[29]- Ennore, a suburb of Chennai, India
[30]- Sivasubramanian, V et al
[31]- Kakinada, Andhrapradesh, India
[32]- Atazadeh I, Sharifi M

Isolation, Screening and Identification of Diatoms from Kermanshah Oil Refinery Wastewater Treatment Systems

Elham Mohamadian
M.Sc. of Ecology, Razi University, Kermanshah, Iran, mohamadian_77@yahoo.com
Naser Karimi *
Associate professor of Plant physiology, Razi University, Kermanshah, Iran, nkarimie@yahoo.com
Behnam Rasekh
Ph.D of Biochemistry, Research Institude of Petroleum Indudstry, Tehran, Iran, rasekhb@ripi.ir
Hamidreza Ghasempour
Associate professor of Chemical engineering and Biotechnology, Science and Research Branch, Azad University, Kermanshah, Iran, ghasempour2009@gmail.com
Soma Dehlavi
M.Sc. of Ecology, Kurdistan University, Sannandaj, Iran, soma.dehlavi2009@gail.com

Abstract

Introduction: There are many oil refineries in Iran, so waste water should be treated. Algal remediation is one of the best methods. The class of Bacillariophyta (diatoms) has distinct ecological preferences and tolerances, making them useful indicators of contemporary ecological conditions. Isolation and selection of microorganisms is the first step in bioremediation. Palmer assessed the tolerance of algal species to organic pollution, and incorporated the data into an organic pollution index for rating water quality. Biovolume is used as a measure of relative algal biomass. The present work was conducted to isolate and select the tolerance diatoms from Kermanshah Oil Refinery wastewater treatment systems. This helped to improve diatoms community of Iran and prepare a list of tolerance diatom in bioremediation.

Materials and methods: Wastewater samples were collected aseptically at six points in and transferred to the laboratory. The serial diluted were prepared in BG broth, and then samples were cultured into Bristol agar and BG agar with chloramphenicol. Finally they were cultured in NA to assurance that there are no bacteria. The brown diatoms colonies were cultured in new plates. The samples were observed through microscope, and keys were used to classify them. Also biovolume according to geometric shapes (um^3) were calculated.

Results: There was no bacterial growth after 48 hours thus this method is an applied method in order to isolate diatoms. A variety of classes were observed such as *Navicula, Nitzschia* and *Frustulia*. Analysis of the biovolume revealed that the species of *Fragilaria capucina* has the maximum biovolume.

Discussion and conclusion: This research revealed that the diatoms diversity in Kermanshah Oil Refinery wastewater treatment systems is low due to the high rate of organic pollution according to Palmer index. Also *Pinnularia, Fragilaria* can be used in the list of tolerance diatoms.

Key words: Diatoms, Kermanshah Oil Refinery, Wastewater, Screening

* Corresponding author
Received: May 27, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013