



دانشکده علوم
گروه زیست‌شناسی
پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

عنوان:

جداسازی و شناسایی باکتری‌های افزایش‌دهنده برداشت نفت از پسماند نفتی و خاک‌های آلوده
به پسماند نفتی پالایشگاه آبادان

نگارش:

امین عقیفی

استاد راهنما:

دکتر حسین معتمدی

اساتید مشاور:

دکتر بهرام علیزاده

مهندس هادی لیلوی

خرداد ۱۳۹۰



تقدیم به:

الہہ مہر و نیکی، مادر عزیزم
و
اسوہ استقامت و تلاش، پدر بزرگوارم

تشکر و قدردانی:

اینک که به لطف الهی رساله به پایان رسیده و این مرحله از تحصیل را با موفقیت به اتمام رسانیده ام پس از سپاس از پروردگار منان بر خود لازم می بینم از همه عزیزانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش مرا یاری کرده اند قدردانی نمایم.

از خانواده مهربانم که هر چه دارم از گرمی وجودشان است.

از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقای **دکتر حسین معتمدی** که در این مسیر با راهنمایی ها و هدایت های دلسوزانه همواره مرا مورد لطف خود قرار دادند، تشکر و قدردانی می نمایم.

همچنین از اساتید مشاور بزرگوام جناب آقای **مهندس هادی لیلوی** و جناب آقای **دکتر بهرام علیزاده** که با زحمات بی شائبه یاریگر بنده در این پژوهش بودند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقای **مهندس سید حسین حسینی** که در انجام آزمایش های تعیین مقدار هیدروکربن های کلی نفت و کروماتوگرافی گازی در آزمایشگاه نفت گروه زمین شناسی کمک شایانی داشتند تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید محترم جناب آقای **دکتر محمد رعایایی اردکانی** و جناب آقای **دکتر احمد فرج زاده** که داوری این پایان نامه را پذیرا شدند صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

از سرکار **خانم تریکان** و جناب آقای **اسدی** و سرکار **خانم احمدیان** کارشناسان محترم گروه زیست شناسی قدردانی می نمایم.

از جناب آقای **عباس شیرولی پور** که امکان انجام نمونه گیری در پالایشگاه آبادان و انجام آزمایش اندازه گیری مقدار کربن موجود در پسماند نفتی را فراهم ساختند تشکر می نمایم.

در پایان از محبت های بی دریغ همکلاسی هایم سرکار خانم **ها طناز لایق** و **فاطمه شیخی** و تمامی دوستان عزیزی که برادرانه مرا مورد لطف و یاری خود قرار دادند به ویژه جناب آقای **مصطفی عموپور** سپاسگزاری و قدردانی می نمایم.

امین عقیفی

خرداد ۱۳۹۰



این پایان نامه با حمایت مالی
شرکت پالایش نفت آبادان
به پایان رسیده است.

فهرست مطالب

| صفحه | عنوان |
|------|---|
| ۱ | فصل اول: مقدمه و هدف |
| ۲ | ۱-۱- مقدمه |
| ۳ | ۲-۱- اهداف تحقیق |
| ۴ | فصل دوم: مروری بر منابع موجود |
| ۵ | ۱-۲- نفت خام |
| ۵ | ۲-۲- شیمی نفت خام |
| ۶ | ۱-۲-۲- ترکیبات پارافینی (الیفاتیک) |
| ۷ | ۱-۲-۲-۱- آلکان های خطی |
| ۷ | ۲-۲-۲-۱- آلکان های شاخه دار |
| ۸ | ۳-۲-۲-۱- سیکلوانکان ها |
| ۸ | ۴-۲-۲-۱- موم ها |
| ۹ | ۲-۲-۲-۲- هیدروکربن های آروماتیک |
| ۹ | ۱-۲-۲-۲- هیدروکربن های آروماتیک تک حلقه ای |
| ۱۰ | ۲-۲-۲-۲- هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای |
| ۱۱ | ۳-۲-۲- ترکیبات رزین |
| ۱۲ | ۴-۲-۲- بخش آسفالتن |
| ۱۳ | ۱-۴-۲-۲- ساختار آسفالتن |
| ۱۳ | ۲-۴-۲-۲- محتوای عنصری آسفالتن |

- ۱۳.....۲-۴-۳-مشکلات ناشی از آسفالتن
- ۱۴.....۲-۳-پسماندهای نفتی
- ۱۴.....۲-۳-۱-پسماندهای نفتی در محیط
- ۱۶.....۲-۳-۲-سمیت اکولوژیکی پسماندهای نفتی
- ۱۷.....۲-۳-۳-ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای در محیط
- ۱۸.....۲-۴-سرنوشت نفت در محیط‌های طبیعی
- ۱۹.....۲-۵-تجزیه میکروبی هیدروکربن‌های نفت
- ۱۹.....۲-۶-باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی
- ۲۱.....۲-۷-فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مؤثر بر تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها
- ۲۱.....۲-۷-۱-حالت فیزیکی هیدروکربن‌های نفتی
- ۲۲.....۲-۷-۲-غلظت هیدروکربن‌های نفت
- ۲۳.....۲-۷-۳-ترکیب شیمیایی نفت یا هیدروکربن‌ها
- ۲۴.....۲-۷-۴-دما
- ۲۵.....۲-۷-۵-اکسیژن
- ۲۵.....۲-۷-۶-مواد مغذی
- ۲۶.....۲-۷-۷-درجه شوری
- ۲۶.....۲-۷-۸-فشار
- ۲۷.....۲-۷-۹-اثر محتوای رطوبت (فعالیت آب)
- ۲۷.....۲-۷-۱۰-اثر pH
- ۲۸.....۲-۸-سازش جوامع میکروبی با ترکیبات هیدروکربنی
- ۲۹.....۲-۹-مکانیسم‌های سازش جوامع میکروبی با هیدروکربن‌های نفتی
- ۲۹.....۲-۹-۱-انتقال افقی ژن‌های عملکردی میان باکتری‌ها

- ۲-۹-۲-نقش پلاسمیدها در سازش جامعه میکروبی به ترکیبات هیدروکربنی.....۳۰
- ۲-۱۰-۱-کاربردهای باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن.....۳۱
- ۲-۱۰-۱-اصلاح زیستی جایگاه‌های آلوده به نفت.....۳۱
- ۲-۱۰-۱-۱-اصلاح زیستی درجا.....۳۱
- ۲-۱۰-۱-۱-الف-روش تهویه زیستی.....۳۲
- ۲-۱۰-۱-۱-ب-تجزیه زیستی درجا.....۳۲
- ۲-۱۰-۱-۱-ج-تزریق زیستی.....۳۲
- ۲-۱۰-۱-۱-د-ازدیاد زیستی.....۳۳
- ۲-۱۰-۱-۲-اصلاح زیستی Ex situ.....۳۳
- ۲-۱۰-۱-۲-الف-کاشتن زمین.....۳۴
- ۲-۱۰-۱-۲-ب-کمپوست کردن.....۳۴
- ۲-۱۰-۱-۲-ج-توده‌های زیستی.....۳۴
- ۲-۱۰-۱-۲-د-راکتورهای زیستی.....۳۵
- ۲-۱۰-۱-۳-فاکتورهای که اصلاح زیستی مناطق آلوده را تحت تأثیر قرار می‌دهند.....۳۵
- ۲-۱۰-۱-۴-مزیت‌های اصلاح زیستی.....۳۶
- ۲-۱۰-۲-افزایش بازیابی نفت با استفاده از میکروارگانیسم‌ها.....۳۷
- ۲-۱۰-۲-۱-تاریخچه افزایش بازیابی نفت با استفاده از میکروارگانیسم‌ها.....۳۷
- ۲-۱۰-۲-۲-مکانیسم‌های افزایش بازیابی نفت میکروبی.....۳۸
- ۲-۱۰-۲-۲-الف-تجزیه زیستی نفت خام.....۳۸
- ۲-۱۰-۲-۲-ب-تولید گاز.....۳۸
- ۲-۱۰-۲-۲-ج-تولید مواد شیمیایی.....۳۹
- ۲-۱۰-۲-۲-د-انسداد انتخابی.....۳۹

- ۲-۱۰-۳-۵-بیوسورفاکتانت‌ها.....۳۹
- ۲-۱۰-۲-۲-و-سایر تکنیک‌ها.....۴۱
- ۲-۱۰-۳-کاربرد باکتری‌های افزایشنده برداشت نفت در اصلاح زیستی محیط.....۴۱
- ۲-۱۱-۱۱-متابولیسم ترکیبات هیدروکربنی نفت.....۴۲
- ۲-۱۱-۱-تجزیه هوازی هیدروکربن‌های نفتی.....۴۳
- ۲-۱۱-۱-۱-مسیر تجزیه هوازی آلکان‌ها.....۴۴
- ۲-۱۱-۱-۲-مسیر تجزیه هوازی هیدروکربن‌های آروماتیک.....۴۵
- ۲-۱۱-۱-۳-مسیر تجزیه هوازی ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای.....۴۶
- ۲-۱۱-۲-تجزیه بی‌هوازی هیدروکربن‌های نفتی.....۴۷
- ۲-۱۱-۲-۱-مسیر تجزیه بی‌هوازی هیدروکربن‌های آروماتیک تک‌حلقه‌ای.....۴۸
- ۲-۱۱-۲-۲-مسیر تجزیه بی‌هوازی ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای.....۴۸
- ۲-۱۲-۱۲-ترکیبات سمی نفت برای میکروارگانیسم‌ها.....۵۰
- ۲-۱۲-۱-ترکیبات آروماتیک.....۵۰
- ۲-۱۲-۲-سیکلوآلکان‌ها.....۵۰
- ۲-۱۲-۳-آلکان‌ها.....۵۱
- ۲-۱۳-۱۳-اثرات سمی حلال‌های آلی روی میکروارگانیسم‌ها.....۵۱
- ۲-۱۳-۱-تجمع حلال‌های آلی.....۵۱
- ۲-۱۳-۲-نقصان در وضعیت انرژی سلول.....۵۱
- ۲-۱۳-۳-تحت تأثیر قرار گرفتن برخی از پروتئین‌های تثبیت شده در غشاء سلولی.....۵۲
- ۲-۱۳-۴-تغییر در سیالیت غشاء سلولی.....۵۲
- ۲-۱۴-۱۴-سازش به ترکیبات هیدروکربنی نفت در باکتری‌های گرم منفی.....۵۳
- ۲-۱۴-۱-سازش در سطح غشاء سیتوپلاسمی.....۵۳

- ۵۳.....۲-۱۴-۱-۱-درجه اشباع اسیدهای چرب.....
- ۵۴.....۲-۱۴-۱-۲-ایزومریزاسیون سیس/ترانس اسیدهای چرب غیراشباع.....
- ۵۴.....۲-۱۴-۱-۳-ترکیب گروه رأسی فسفولیپید.....
- ۵۵.....۲-۱۴-۱-۴-دینامیک تغییر و تبدیل فسفولیپیدها.....
- ۵۵.....۲-۱۴-۲-سازش در سطح غشاء خارجی.....
- ۵۶.....۲-۱۴-۳-سازش در سطح دیواره سلولی.....
- ۵۶.....۲-۱۴-۴-سازش توسط تغییر و تبدیل حلال‌ها.....
- ۵۷.....۲-۱۴-۵-سازش توسط ترشح فعال حلال‌ها.....
- ۵۸.....۲-۱۴-۶-سازش در سطح لایه S.....
- ۵۸.....۲-۱۵-۱۵-مقاومت به حلال‌های آلی در باکتری‌های گرم مثبت.....
- ۵۹.....۲-۱۵-۱-ایجاد محافظت از طریق آندوسپورها.....
- ۵۹.....۲-۱۵-۲-القاء واحد تنظیمی استرس عمومی.....
- فصل سوم: مواد و روش‌ها.....**
- ۶۱.....
- ۶۲.....۳-۱-مواد و وسایل.....
- ۶۶.....۳-۲-روش کار.....
- ۶۶.....۳-۲-۱-نمونه‌گیری.....
- ۶۶.....۳-۲-۲-جداسازی باکتری‌های افزایشنده برداشت نفت.....
- ۶۷.....۳-۲-۳-تست افزایش برداشت نفت و غربالگری باکتری‌های افزایشنده برداشت نفت.....
- ۶۸.....۳-۲-۴-اندازه‌گیری محتوای کربن موجود در پسماند نفتی.....
- ۶۹.....۳-۲-۵-اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت.....
- ۶۹.....۳-۲-۶-اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت باقیمانده.....

- ۷۰-۲-۳-۷ بررسی مکانیسم‌های مورد استفاده توسط باکتری‌ها در افزایش برداشت نفت.....
- ۷۰-۲-۳-۱-۷-۳-۱ تکنیک گسترش نفت.....
- ۷۰-۲-۳-۲-۷-۲-۳ همولیز اریتروسیت‌های خون گوسفند.....
- ۷۰-۲-۳-۳-۷-۲-۳ بررسی تجزیه زیستی ترکیبات اشباع شده موجود در پسماند نفتی.....
- ۷۱-۲-۳-۸-۲-۳ رسم منحنی رشد جدایه‌های AOR₁ و AOR₂ در محیط پایه معدنی.....
- ۷۲-۲-۳-۹-۲-۳ بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌های AOR₁ و AOR₂ در محیط پایه معدنی.....
- ۷۲-۲-۳-۱-۹-۲-۳ بهینه‌سازی منبع نیتروژن.....
- ۷۳-۲-۳-۲-۹-۲-۳ بهینه‌سازی منبع فسفات.....
- ۷۳-۲-۳-۱۰-۲-۳ شناسایی فیلوژنتیک سویه‌های افزاینده برداشت نفت براساس توالی 16S rRNA.....
- ۷۴-۲-۳-۱-۱۰-۲-۳ تخلیص ژنوم.....
- ۷۴-۲-۳-۲-۱۰-۲-۳ بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده.....
- ۷۴-۲-۳-۳-۱۰-۲-۳ انتخاب پرایمرها.....
- ۷۴-۲-۳-۴-۱۰-۲-۳ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.....
- ۷۵-۲-۳-۴-۱۰-۲-۳ ترکیبات مخلوط و برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.....
- ۷۶-۲-۳-۵-۱۰-۲-۳ ارزیابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.....
- ۷۶-۲-۳-۵-۱۰-۲-۳ الف-الکتروفورز.....
- ۷۷-۲-۳-۵-۱۰-۲-۳ ب-تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز.....
- ۷۷-۲-۳-۶-۱۰-۲-۳ تعیین توالی ژن 16S rRNA.....
- ۷۸-۲-۳-۱۱-۲-۳ بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های AOR₁ و AOR₂.....
- ۷۸-۲-۳-۱-۱۱-۲-۳ مورفولوژی.....
- ۷۸-۲-۳-۲-۱۱-۲-۳ رنگ‌آمیزی گرم.....
- ۷۸-۲-۳-۳-۹-۳ تست اسنات.....

| | |
|----|--|
| ۷۹ | تست کاتالاز ۴-۹-۳ |
| ۷۹ | تست اکسیداز ۵-۹-۳ |
| ۷۹ |OF تست ۶-۹-۳ |
| ۸۰ | تست اوره آز ۷-۹-۳ |
| ۸۰ | تست سیترات ۸-۹-۳ |
| ۸۰ | تست احیای نیترات ۹-۹-۳ |
| ۸۱ | تست TSI ۱۰-۱۱-۲-۳ |
| ۸۱ | بررسی حرکت و تولید اندول ۱۱-۱۱-۲-۳ |

۸۳ فصل چهارم: نتایج

| | |
|----|---|
| ۸۴ | ۱-۴ نتایج جداسازی باکتری‌های افزاینده برداشت نفت |
| ۸۴ | ۲-۴ تست افزایش برداشت نفت و غربالگری باکتری‌های افزاینده برداشت نفت |
| ۸۵ | ۳-۴ اندازه‌گیری میزان کربن موجود در پسماند نفتی |
| ۸۵ | ۴-۴ اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت |
| ۸۵ | ۵-۴ اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت باقیمانده |
| ۸۵ | ۶-۴ بررسی مکانیسم‌های مورد استفاده توسط باکتری‌ها در افزایش برداشت نفت |
| ۸۵ | ۱-۶-۴ تکنیک گسترش نفت |
| ۸۷ | ۲-۶-۴ بررسی همولیز گلبول‌های قرمز |
| ۸۷ | ۳-۶-۴ بررسی تجزیه زیستی ترکیبات اشباع شده (آلیفاتیک) موجود در پسماند نفتی |
| ۸۷ | ۱-۳-۶-۴ کروماتوگرافی گازی هیدروکربن‌های نفتی موجود در پسماند نفتی |
| ۸۸ | ۲-۳-۶-۴ کروماتوگرافی گازی مایع رویی حاصل از تیمار باکتری AOR_1 |
| ۹۰ | ۲-۳-۶-۴ کروماتوگرافی گازی مایع رویی حاصل از تیمار باکتری AOR_2 |

| | |
|-----|--|
| ۹۰ | ۷-۴-رسم منحنی رشد جدایه‌های AOR_1 و AOR_2 در محیط پایه معدنی..... |
| ۹۲ | ۸-۴-بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌های AOR_1 و AOR_2 در محیط پایه معدنی..... |
| ۹۲ | ۱-۸-۴-بهینه‌سازی منبع نیتروژن..... |
| ۹۲ | ۲-۸-۴-بهینه‌سازی منبع فسفات..... |
| ۹۳ | ۹-۴-شناسایی باکتری‌های افزایشنده برداشت نفت AOR_1 و AOR_2 |
| ۹۳ | ۱-۹-۴-شناسایی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی..... |
| ۹۴ | ۲-۹-۴-شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های AOR_1 و AOR_2 |
| ۹۴ | ۱-۲-۹-۴-بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده..... |
| ۹۵ | ۲-۲-۹-۴-نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی..... |
| ۱۰۱ | فصل پنجم: بحث |
| ۱۰۳ | ۱-۵-جداسازی باکتری‌های افزایشنده برداشت نفت..... |
| ۱۰۵ | ۲-۵-غربالگری باکتریهای افزایشنده برداشت نفت..... |
| ۱۰۷ | ۳-۵-بررسی مکانیسم‌های مورد استفاده توسط باکتری‌ها در برداشت نفت..... |
| ۱۰۷ | ۱-۳-۵-تست گسترش نفت و همولیز گلبول‌های قرمز..... |
| ۱۰۸ | ۲-۳-۵-تفسیر نمودارهای حاصل از کروماتوگرافی گازی..... |
| ۱۰۹ | ۴-۵-تفسیر منحنی رشد جدایه‌های AOR_1 |
| ۱۱۰ | ۵-۵-بررسی بهینه‌سازی شرایط رشد جدایه‌های AOR_1 و AOR_2 در محیط پایه معدنی..... |
| ۱۱۰ | ۱-۵-۵-بهینه‌سازی منبع نیتروژن و فسفات..... |
| ۱۱۲ | ۶-۵-پیشنهادات..... |
| ۱۱۳ | منابع مورد استفاده..... |
| ۱۲۲ | چکیده انگلیسی..... |

فهرست جداول

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| جدول ۱-۲- جنس‌های عمده باکتری‌ها و قارچ‌های تجزیه‌کننده نفت..... | ۲۰ |
| جدول ۱-۳- مواد شیمیایی مورد استفاده..... | ۶۲ |
| جدول ۲-۳- محیط‌های کشت مورد استفاده..... | ۶۴ |
| جدول ۳-۳- تجهیزات و مورد استفاده..... | ۶۵ |
| جدول ۳-۴- پرایمرهای انتخاب شده جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... | ۷۴ |
| جدول ۳-۵- اجزا و مقادیر مطلوب در مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... | ۷۵ |
| جدول ۳-۶- برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... | ۷۶ |
| جدول ۱-۴- مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت باقیمانده و درصد برداشت نفت..... | ۸۶ |
| جدول ۲-۴- نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی دو سویه افزاینده برداشت نفت..... | ۹۴ |
| جدول ۳-۴- نتیجه‌ی BLAST توالی 16s rRNA سویه‌ی AOR1..... | ۹۷ |
| جدول ۴-۴- نتیجه‌ی BLAST توالی 16s rRNA سویه‌ی AOR2..... | ۹۸ |

فهرست اشکال و تصاویر

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| شکل ۱-۲- نمونه‌هایی از ترکیبات آلیفاتیک..... | ۸ |
| شکل ۲-۲- نمونه‌هایی از ترکیبات آروماتیک..... | ۱۰ |
| شکل ۳-۲- نمونه‌هایی از ترکیبات رزین..... | ۱۱ |
| شکل ۴-۲- شکل فرضی از ساختار مولکول آسفالتن..... | ۱۲ |
| شکل ۵-۲- اصول اساسی تجزیه هوازی هیدروکربن‌ها..... | ۴۳ |
| شکل ۶-۲- تجزیه آلکان‌ها توسط جنس اسینتوباکتر..... | ۴۴ |
| شکل ۷-۲- مسیر تجزیه هوازی هیدروکربن‌های آروماتیک تک‌حلقه‌ای..... | ۴۵ |
| شکل ۸-۲- مسیر تجزیه هوازی نفتالن..... | ۴۷ |
| شکل ۹-۲- مسیر تجزیه بی‌هوازی تولوئن..... | ۴۸ |
| شکل ۱۰-۲- مسیر تجزیه بی‌هوازی نفتالن و متیل نفتالن..... | ۴۹ |
| تصویر ۱-۳- نمایی از دستگاه اکستراکتور..... | ۶۹ |
| تصویر ۱-۴- نمونه تیمار شده..... | ۸۴ |
| تصویر ۲-۴- نمونه شاهد..... | ۸۴ |
| تصویر ۳-۴- تست گسترش نفت: قبل از افزودن سوسپانسیون باکتری..... | ۸۶ |
| تصویر ۴-۴- تست گسترش نفت: پس از افزودن سوسپانسیون باکتری..... | ۸۶ |
| تصویر ۵-۴- تست همولیز جدایه AOR ₂ | ۸۷ |
| تصویر ۶-۴- تست همولیز جدایه AOR ₁ | ۸۷ |
| تصویر ۷-۴- کیفیت استخراج DNA مربوط به جدایه‌های AOR ₁ و AOR ₂ | ۹۵ |
| تصویر ۸-۴- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای جدایه‌های AOR ₁ و AOR ₂ | ۹۶ |

فهرست نمودارها

| صفحه | عنوان |
|----------|--|
| ۸۸..... | نمودار ۱-۴- کروماتوگرافی گازی پسماند نفتی..... |
| ۸۹..... | نمودار ۲-۴- کروماتوگرافی گازی مایع رویی جدایه AOR ₁ |
| ۹۰..... | نمودار ۳-۴- کروماتوگرافی گازی مایع رویی جدایه AOR ₂ |
| ۹۱..... | نمودار ۴-۴- منحنی رشد جدایه AOR ₁ |
| ۹۱..... | نمودار ۵-۴- منحنی رشد جدایه AOR ₂ |
| ۹۲..... | نمودار ۶-۴- بهینه‌سازی منبع نیتروژن..... |
| ۹۳..... | نمودار ۷-۴- بهینه‌سازی منبع فسفات..... |
| ۹۹..... | نمودار ۸-۴- درخت فیلوژنتیکی سویه‌ی AOR ₁ |
| ۱۰۰..... | نمودار ۹-۴- درخت فیلوژنتیکی سویه‌ی AOR ₂ |

| | |
|--|------------------|
| چکیده فارسی | |
| نام خانوادگی: عفیفی | نام: امین |
| عنوان پایان نامه: جداسازی و شناسایی باکتری‌های افزاینده برداشت نفت از پسماند نفتی و خاک‌های آلوده به پسماند نفتی پالایشگاه آبادان | |
| استاد راهنما: دکتر حسین معتمدی اساتید مشاور: دکتر بهرام علیزاده و مهندس هادی لیلوی | |
| درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد | رشته: زیست‌شناسی |
| گرایش: میکروبیولوژی | |
| دانشگاه: شهید چمران اهواز | |
| دانشکده: علوم | |
| تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۹۰/۳/۳۱ | تعداد صفحات: ۱۲۲ |
| کلید واژه‌ها: پسماند نفتی، هیدروکربن‌های کلی نفت، کروماتوگرافی گازی | |
| <p>در پالایشگاه‌های نفت در سراسر دنیا در بخش‌های ذخیره، فرآوری و انتقال نفت همواره مقدار زیادی پسماند نفتی تولید می‌شود. پسماندهای نفتی اثرات مخرب و زیان‌باری را در محیط زیست به جای می‌گذارند و تعداد زیادی از ترکیبات موجود در آنها دارای خاصیت سرطان‌زایی و سمیت قوی برای سیستم ایمنی هستند. در میان روش‌های موجود برای خنثی کردن اثرات مضر این ترکیبات، اصلاح زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های ساکن در این محل‌های آلوده یکی از پرکاربردترین روش‌ها است. هدف از مطالعه حاضر جداسازی باکتری‌های ساکن پسماند نفتی پالایشگاه آبادان و نیز خاک‌های آلوده به پسماند نفتی به منظور استفاده از آن‌ها در افزایش استحصال نفت از پسماند نفتی و در نتیجه افزایش بازدهی تولید و کاهش اثرات زیست محیطی آن است. برای این منظور پسماند نفتی به محیط پایه نمکی تلقیح شد و با انکوباسیون باکتری‌های موجود در پسماند تکثیر داده شدند. سپس باکتری‌ها به منظور مشخص شدن توانایی افزایش برداشت نفت به درون محیط بازیابی نفت تلقیح شدند. در نتیجه این تحقیق ۸ جدایه باکتریایی از پسماندهای نفتی و خاک‌های آلوده به پسماند نفتی جداسازی شد. اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های کلی نفت با روش Soxhlet-extraction نشان داد دو جدایه AOR_1 و AOR_2 جداسازی نفت را با تشکیل یک رویه شناور طی ۷ روز به ترتیب با بازدهی ۹۰ و ۷۰ درصد در سطح پسماند ۵ درصد در مخلوط پسماند- شن انجام می‌دهند. جدایه AOR_1 با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی باسیل گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت و AOR_2 باسیل گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت و منفی تشخیص داده شد. به منظور شناسایی دقیق، ژن 16SrRNA این دو جدایه تکثیر و تعیین توالی شد. با استفاده از برنامه BLAST موجود در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی جدایه AOR_1 بیشترین شباهت را به باکتری <i>Pseudomonas stutzeri</i> و جدایه AOR_2 بیشترین شباهت را به باکتری <i>Klebsiella pneumoniae</i> نشان داد. منحنی رشد این دو جدایه با استفاده از رقت‌سازی متوالی در محیط پایه معدنی رسم شد. اثرات منابع مختلف نیتروژن و فسفات نیز بر روی رشد این دو جدایه در محیط پایه معدنی نیز تعیین شد. نترات سدیم و دی‌سدیم هیدروژن فسفات بهترین منبع نیتروژن و فسفات برای جدایه AOR_1 و کلرید آمونیوم و دی‌آمونیم هیدروژن فسفات بهترین منبع نیتروژن و فسفات برای جدایه AOR_2 بود. از مایع رویی حاصل از تیمار این دو جدایه در محیط‌های بازیابی نفت به منظور بررسی تجزیه زیستی ترکیبات اشباع شده، کروماتوگرافی گازی به عمل آمد. جدایه AOR_2 تجزیه ترکیبات اشباع شده سنگین ۳۵ تا ۴۰ کربنی و تبدیل آنها به محصولات سبک‌تر را نشان داد.</p> | |

فصل اول

مقدمه و هدف

در پالایشگاه‌های نفت در سراسر دنیا در بخش‌های ذخیره، فرآوری و انتقال نفت همواره مقدار زیادی پسماند تولید می‌شود؛ به عنوان مثال در پالایشگاه‌های نفت در کشور هندوستان تقریباً سالیانه ۲۸ هزار تن پسماند نفتی 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 روبه‌رو هستند (۴۲). این پسماندهای نفتی اثرات مخرب و زیان باری را در محیط زیست به جای می‌گذارند. انهدام نامناسب پسماند نفتی باعث آلودگی محیط زیست مخصوصاً آلودگی خاک می‌شود و برای آب‌ها نیز تهدیدی جدی به حساب می‌آیند. همچنین پسماند نفتی محتوی چندین ترکیب سمی هیدروکربنی است که خاصیت سرطان‌زایی و خاصیت سمیت قوی برای سیستم ایمنی دارند (۵۵). پالایشگاه‌های نفت در سراسر جهان از فن‌آوری‌های 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 روش‌ها است (۴۲). با کمک این روش‌های اصلاح زیستی تهدید برای آب‌های جاری کاهش یافته و میزان تجزیه زیستی افزایش می‌یابد (۵۵). علاوه بر این، در این پسماندهای نفتی مقدار زیادی نفت باقی می‌ماند که برداشت این مقدار نفت با کمک باکتری‌ها می‌تواند از لحاظ اقتصادی اهمیت زیادی داشته باشد. با استفاده از باکتری‌های افزاینده برداشت نفت می‌توان این مقدار نفت موجود در پسماند نفتی را بازیابی کرد. 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 افزایش بازیافت نفت می‌شوند از جمله: با تولید گازهایی مانند هیدروژن، نیتروژن، متان و دی‌اکسیدکربن که ویسکوزیته نفت را کاهش می‌دهند و خصوصیات جریان نفت را بهبود می‌بخشند، تولید اسیدها (اسیدهای با وزن مولکولی پایین عمدتاً اسیدهای چرب با وزن مولکولی پایین)، تولید حلال‌هایی مانند الکل‌ها و کتون‌هایی که کمک سورفاکتانت‌های شاخص هستند، تولید بیوسورفاکتانت‌ها که کشش بین سطحی میان سطح آب/سنگ و نفت را کاهش می‌دهند،

تولید بیوپلیمرها و تولید بیومس میکروبی (۴۷). در مورد هر باکتری می‌بایست روش عمل آن در افزایش بازیافت نفت مشخص شود تا بتوان از آن به طور مناسبی در این فرایند استفاده کرد. علاوه بر این، فلور باکتریایی، درصد آلودگی با ترکیبات نفتی مختلف و حتی نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده نفت در مناطق مختلف متفاوت است و هر کدام از این محیط‌ها گزینه‌های مناسب برای جستجوی این گونه باکتری‌ها هستند. به این ترتیب می‌توان به سویه‌ها یا حتی گونه‌های جدید با کارایی‌های متفاوت دست پیدا کرد و بهترین و کارآمدترین آن‌ها را برای اهداف بعدی انتخاب نمود.

۱-۲- اهداف تحقیق

اهداف زیر در زمینه این تحقیق مدنظر هستند:

(۱) جداسازی و شناسایی باکتری‌های افزاینده برداشت نفت از پسماند نفتی یا خاک‌های آلوده به پسماند

نفتی

(۲) بررسی توانایی این جدایه‌ها جهت افزایش برداشت نفت از لجن در محیط آزمایشگاه

(۳) بهینه‌سازی فاکتورهای رشد لازم برای بیان توان حداکثر باکتری

(۴) در صورت امکان تعیین مکانیسم عملکرد این جدایه‌ها در افزایش برداشت نفت