جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته موجود در سیال حفاری چاه ۳۲ فتح واقع در منطقه نفتی آزادگان جنوبی

نوشین چنگیز[۱]، عباس اخوان‌سپهی*[۱] و کامبیز تحویلداری [۲]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

۲- دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

چکیده

تجزیه زیستی نشاسته مورد استفاده در سیال حفاری توسط میکرو ارگانیسم‌ها، باعث کاهش غلظت این ماده در ترکیب و در نتیجه کاهش کارایی سیال می‌شود. پژوهش حاضر با هدف شناسایی باکتری‌های عمده تجزیه کننده نشاسته در سیال حفاری، جهت تعیین رشد و فعالیت این ارگانیسم‌ها انجام شده است. برای این منظور باکتری‌های موجود در سیال برگشتی از چاه جداسازی و فعالیت آمیلازی آنها با استفاده از تست هیدرولیز نشاسته بررسی گردید. جدایه با بیشترین توانایی تجزیه نشاسته در ۳ دمای ۳۷ °C، ۴۵ °C و ۵۵ °C به‌عنوان سویه منتخب با روش 16 SrRNA مورد شناسایی قرار گرفت و منحنی رشد سویه منتخب رسم گردید. ۵۴ سویه باکتری شامل ۲۶ باسیل گرم مثبت، ۲۲ باسیل گرم منفی و ۶ کوکوسی گرم مثبت جداسازی شدند. ۱۸ جدایه از ۲۶ باسیل گرم مثبت اسپوردار بودند. ۳ جدایه در هر ۳ دمای ۳۷°C، ۴۵°C و ۵۵°C رشد و فعالیت آمیلازی قابل توجهی داشت. باکتری با توانایی ایجاد بیشترین هاله آمیلازی به‌عنوان جدایه منتخب برگزیده شد. نتایج حاصل از آنالیز 16 SrRNA، شباهت ۹۹/۸٪ جدایه منتخب به باسیلوس لیکنی فرمیس را نشان داد. فعال‌ترین تجزیه کنندگان نشاسته در شرایط ویژه چاه، باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار متعلق به جنس باسیلوس نظیر باسیلوس لیکنی فرمیس جدا شده در این تحقیق می‌باشد. شناسایی عوامل تجزیه به منظور انتخاب بیوساید مناسب در جهت ممانعت از تجزیه زیستی حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: تجزیه زیستی، نشاسته، سیال حفاری

مقدمه

سیال حفاری (گل حفاری) شامل فاز مایع پیوسته‌ای است که بسته به مایع اصلی تشکیل‌دهنده به یکی از ۳ شکل سیال با پایه آبی (WBMs)[۱]، سیال با پایه روغنی (OBMs)[۲] و سیال با پایه سنتزی (SBMs)[۳] وجود دارد. ترکیب سیال به میزان زیادی به شرایط اختصاصی چاه مانند دما و فشار اعماق چاه، زمین‌شناسی و عوامل دیگر بستگی دارد.

1. Water- Based Muds
2. Oil- Based Muds
3. Synthetic- Based Muds

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی akhavansepahy@gmail.com

سیال حفاری پایه آبی با پایه پلیمر آلی نسبت به سایر سیال‌های ساخته شده، با وجود کارایی بالاتر، سمیت کمتر و سازگاری بیشتر با محیط، تجزیه‌پذیری زیستی بالایی دارد [۱]. پلیمرهای آلی با وزن مولکولی بالا، منبع اصلی کربن و انرژی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. به این ترتیب که آنزیم‌های اختصاصی بر پیوندهای درون مولکولی پلیمرها اثر نموده و واحدهای مونومری را آزاد می‌سازند که به‌عنوان منابع C، N و P توسط میکروارگانیسم‌ها مصرف می‌شوند [۲]. مصرف متابولیک ترکیبات آلی درون سیال توسط گروهی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها انجام می‌شود. پلیمرهایی مانند نشاسته و مشتقات آن برای افزایش ویسکوزیته سیال به آن افزوده می‌شود. نشاسته توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها (قارچ‌ها، باکتری‌ها) تخمیر می‌گردد [۳]. میکروارگانیسم‌های هوازی باعث تجزیه بیولوژیک و سریع سیال می‌شود. تجزیه بی‌هوازی که بسیار آهسته‌تر از انواع هوازی رخ می‌دهد فرآیند مهمی است که منجر به ایجاد تغییراتی در پارامترهای سیال می‌شود [۱].

لازم به ذکر است که فرآیند تجزیه زیستی برای سمیت‌زدایی از ضایعات سیال حفاری نیز مفید می‌باشد [۲]. تعداد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها به‌ترکیب شیمیایی سیال و پارامترهای دیگری از قبیل دما، pH و شرایط آب مخزن بستگی دارد. با توجه به وجود مواد پلیمری در بیشتر فرمولاسیون‌های جدید مورد استفاده در ساخت سیال و کمتر بودن غلظت نمک در فرمولاسیون‌ها از میزان نمک اشباع، احتمال تخمیر پایه پلیمری از جمله نشاسته افزایش می‌یابد. از سوی دیگر به علت کمبود آب و مشکل دسترسی به منابع آب برای ساخت سیال از آب dewater[1] استفاده می‌شود که آلودگی میکروبی بالایی داشته و باعث تشدید فرآیند تخمیر می‌گردد [۴ و ۵]. آمیلاز، آنزیم تولیدی توسط باکتری‌ها در فرآیند تجزیه نشاسته می‌باشد. تجزیه زیستی نشاسته مورد استفاده در سیال توسط میکروارگانیسم‌ها، به مرور زمان باعث کاهش غلظت مورد نظر این ماده در ترکیب و در نتیجه کاهش کارایی سیال می‌شود [۳]. ممانعت از تجزیه عوامل پلیمری، شامل استفاده از عوامل بیوسایدی[2] مناسب است [۲ و ۶]. شناسایی نسبتا دقیق میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نشاسته می‌تواند به انتخاب بیوساید مناسب کمک کند [۷]. در مطالعه Nnubia و Okpokwssili در ۱۹۹۲، ۳۲ ایزوله جداسازی شد که شامل ۶ قارچ متعلق به جنس پنی‌سیلیوم و ۲۶ باکتری گرم مثبت متعلق به جنس‌های باسیلوس، استافیلوکوکوس، میکروکوکوس، کورینه باکتریوم و نوکاردیا بود. در بررسی میکروبیولوژی خرده‌های گل حفاری توسط Nnubia و Okpokwssili، همچنین بررسی پتانسیل تجزیه زیستی سیال حفاری توسط سویه‌های استافیلوکوک خاک توسط Nweke و همکاران در سال ۲۰۰۴ [۹]، از تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری‌های جداشده استفاده شد که مشابه با روش‌های شناسایی مورد استفاده در پژوهش حاضر می‌باشد با این تفاوت که در این پژوهش سویه منتخب با روش آنالیز سکانس 16 SrRNA نیز مورد شناسایی دقیق‌تر قرار گرفت. پژوهش حاضر با هدف شناسایی باکتری‌های عمده تجزیه‌کننده نشاسته در سیال حفاری به منظور کنترل رشد و فعالیت این ارگانیسم‌ها، انتخاب مناسب‌ترین بیوساید و درنهایت افزایش عمر مفید و زمان ماندگاری نشاسته در سیستم انجام شده است. در این پژوهش توانایی باکتری‌های ایزوله شده از سیال حفاری در تجزیه نشاسته در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی اولیه باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته

در این تحقیق نمونه‌گیری از سیال برگشتی چاه ۳۲ فتح

۱. آب حاصل از سیال خروجی از سیستم، مواد جامد و یا خاک مرطوب، جدا شده به روش سانتریفیوژ، فیلتر، یا فرآیندهای جداسازی جامد و مایع و نیز آب‌های محیطی حاصل از شست‌شو و سایر کاربری‌ها در مجموعه است که تا حدی پالایش و تصفیه شده و مجددا" در ساخت سیال مورد استفاده قرار می‌گیرد.

2. Biocide

واقع در منطقه نفتی آزادگان جنوبی انجام شد. برای نمونه‌گیری از ظروف شیشه‌ای دردار که در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱۵۱ psi اتوکلاو شده بود، استفاده گردید [۱۰]. نمونه در کمترین زمان ممکن در شرایط استریل و دمای ۴°C به آزمایشگاه منتقل شد [۸]. سپس با استفاده از روش سریال رقت، رقت‌های متوالی از نمونه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و میزان ۱ ml از هر یک از سوسپانسیون‌های حاصل در پلیت‌های استریل ریخته شد. نمونه بر روی ۲ محیط کشت متفاوت مینرال سالت مدیوم[1] (شامل ۱۰ gr/lit NaCl، ۰/۴۲ gr/lit $MgSO_4$، ۰/۲۹ gr/lit KCl، ۰/۸۳ gr/lit KH_2PO_4، ۱/ ۱ gr/lit Na_2HPO_4، ۰/۴۲ gr/lit $NaNO_3$ و ۱/۵ ٪ وزنی- حجمی آگار در یک لیتر) و بوشنل هاس آگار[2] (شامل ۱ gr/lit KH_2PO_4، ۱ gr/lit K_2HPO_4، ۱ gr/lit NH_4NO_3، ۰/۲ gr/lit $7H_2O$، ۰/۰۵ gr/lit $FeCl_3$، ۰/۰۲ gr/lit $CaCl_2.2H_2O$ و ۱/۵ ٪ وزنی- حجمی آگار در یک لیتر) با منبع کربن نشاسته سیب‌زمینی به میزان ۴٪ وزنی مطابق با مقدار نشاسته موجود در سیال، اتوکلاو شده و با دمای حدود ۴۵°C و pH معادل ۹/۵ (مطابق با pH سیال در چاه) در شرایط استریل پورپلیت شد [۹، ۱۱ و ۱۲]. به منظور رشد و جداسازی باکتری‌های مزوفیل و ترموفیل از هر رقت در هر دو محیط BHA و MSM، دو پلیت در ۲ دمای ۳۷°C و ۴۵ °C، تحت شرایط هوازی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. باکتری‌های موجود در نمونه طی کشت‌های متوالی ۴ منطقه‌ای از کلنی‌های باکتریایی رشدیافته روی محیط‌های MSM و BHA، خالص‌سازی شدند. به منظور شناسایی اولیه باکتری‌های جداشده علاوه بر مشاهده میکروسکوپی شامل رنگ‌آمیزی گرم و رنگ‌آمیزی اسپور، تست‌های پتاس (برای تأیید رنگ‌آمیزی گرم)، کاتالاز و اکسیداز نیز انجام شد.

بررسی فعالیت آمیلازی باکتری‌های جداسازی‌شده

به منظور تشخیص باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته، تست هیدرولیز نشاسته انجام شد. در این روش هر یک از باکتری‌های جداشده در ۳ دمای ۳۷، ۴۵ و ۵۵ °C در محیط کشت استارچ آگار[3]، شامل نوترینت با افزودن ۲۰٪ وزنی نشاسته، با pH ۹/۵ کشت خطی تهیه گردید. پلیت‌ها در دما و زمان مناسب گرماگذاری شد. سپس به منظور بررسی هیدرولیز نشاسته از محلول لوگل به عنوان معرف استفاده گردید. برای هر آزمایش ۳ بار تکرار در نظر گرفته شد. در نهایت قطر هاله‌های آمیلازی در اطراف خط رشد و نیز میانگین قطر هاله‌ها برای هر باکتری در هر دما اندازه‌گیری شده و مقایسه گردید. در ادامه از میان باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته در هر ۳ دما ، باکتری با قطر هاله آمیلازی بیشتر، به‌عنوان سویه منتخب برگزیده شد. سویه منتخب با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی بیشتر شامل تست سیمون سیترات، حرکت، تخمیر قند آرابینوز، VP، هیدرولیز لیستین، رشد در ۶/۵٪ NaCl و فعالیت دزوکسی ریبونوکلئازی مورد شناسایی دقیق‌تر قرار گرفت.

شناسایی مولکولی سویه منتخب (تعیین ترادف ژنی)[4]

جهت تأیید نهایی شناسایی جدایه با فعالیت آمیلازی بیشتر در میان ۳ سویه منتخب، از روش مولکولی 16 SrRNA استفاده شد. برای این منظور ابتدا باکتری روی محیط برین هارت اینفیوژن آگار[5] کشت چمنی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید.

سپس با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) نسبت به استخراج DNA ژنومی اقدام شد. پس از آن با استفاده از آغازگرهای 27F: 5- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 و 1492R: 5- GGTTACCTTGTTACGACTT_3، عمل تکثیر 16S rRNA ژنوم باکتری صورت گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ µlit شامل: ۲/۵ µlit بافر، ۳/۵ µmol از $MgCl_2$، ۲۰۰ µmol از dNTPs، ۱/۲۵ واحد از آنزیم از Taq DNA Polymerase، ۰/۴ µmol از هر

1. Mineral Salt Medium: MSM
2. Bushnel Hoss Agar: BHA
3. Starch Agar
4. Sequencing
5. Brain Heart Infusion Agar: BHI Agar

آغازگر، ۱ µlit از نمونه DNA و ۱ µlit آب مقطر دی یونیزه انجام گردید. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای°C ۹۵ به مدت ۰/۵ دقیقه، اتصال در دمای °C ۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای °C ۷۲ به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار Blast توالی ژن 16 SrRNA جدایه مورد بررسی با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک اطلاعات ژنی جهت تأیید شناسایی باکتری با استفاده از آنالیز توالی DNA، تطبیق داده شد [۱۳].

رسم منحنی رشد سویه منتخب

برای رسم منحنی رشد ابتدا سوسپانیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط BHI Agar تهیه شد. سوسپانسیون با حجم تلقیح ۱٪ به محیط مولر هینتون براث[1] با pH ۹/۵ اضافه شد. سپس در فواصل زمانی ۲ ساعته، به مدت ۹۶ ساعت، جذب نوری OD [2] محیط کشت حاوی باکتری در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد و منحنی مربوطه رسم گردید.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته

در نتایج حاصل از پورپلیت نمونه سیال، اکثر کلنی‌های رشد یافته به رنگ سفید، کرم و یا بی‌رنگ بودند. همچنین کلنی‌هایی به رنگ‌های زرد و نارنجی نیز در میان سویه‌های کوکوس مشاهده شد. در نهایت، ۵۴ سویه باکتری جداسازی گردید که براساس رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده لام میکروسکوپی؛ ۲۶ باسیل گرم مثبت، ۲۲ باسیل گرم منفی و ۶کوکوسی گرم مثبت جداسازی شد. در رنگ‌آمیزی اسپور، ۱۸ جدایه از ۲۶ باسیل گرم مثبت، اسپوردار بود.

با انجام رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، تست‌های پتاس، کاتالاز و اکسیداز برای تمام سویه‌های جداسازی شده، جنس بسیاری از سویه‌ها به‌ترتیب زیر تعیین گردید:

- کوکسی‌های گرم مثبت جداشده متعلق به جنس میکروکوکوس و بعضاً استافیلوکوکوس می‌باشد.
- باسیل‌های گرم مثبت جداسازی‌شده اسپوردار با توجه به شرایط هوازی رشد متعلق به جنس باسیلوس می‌باشد.
- باسیلوس‌ها باکتری‌های غالب در میان نمونه‌های جداسازی شده، می‌باشد.
- هیچ سویه‌ای از خانواده انتروباکتریاسه درمیان باسیل‌های گرم منفی جداسازی شده، یافت نشد.

نتایج بررسی فعالیت آمیلازی باکتری‌های جداسازی شده از سیال برگشتی از چاه نشان داد که از میان ۵۴ باکتری جدا شده، ۳ باکتری در هر ۳ دمای ۳۷، ۴۵ و ۵۵°C توانایی رشد و فعالیت آمیلازی داشتند. پس از ۳ بار تکرار هر آزمایش و با اندازه‌گیری و مقایسه قطر هاله‌های آمیلازی در اطراف خط رشد، باکتری با قطر هاله آمیلازی بیشتر در هر ۳ دما به‌عنوان سویه منتخب، برگزیده شد. قطرهاله‌های آمیلازی مربوط به ۳ باکتری با توانایی رشد و تولید آمیلاز در هر ۳ دما در جدول ۱ نشان داده شده است.

براساس خصوصیات مورفولوژیک و با استفاده از آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی Bergy [۱۴]، هر ۳ از جنس باسیلوس تشخیص داده شدند. در شکل‌های ۱ و ۲ پلیت با هیدرولیز نشاسته مثبت و منفی مشاهده می‌شود. شکل ۳ نمودار فراوانی نسبی باکتری‌های هیدرولیزکننده نشاسته نسبت به کل باکتری‌های جداسازی شده در دماهای ۳۷، ۴۵ و ۵۵°C را نشان می‌دهد.

1. M-H Broth:Mueller Hinton Broth
2. Optical Density

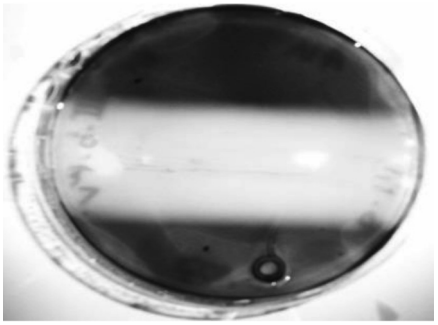
جدول ۱- قطر هاله‌های آمیلازی مربوط به ۳ باکتری با توانایی رشد و تولید آمیلاز در هر ۳ دمای ۳۷، ۴۵ و ۵۵°C

مرتبه آزمایش	اول			دوم			سوم		
دمای آزمایش (°C)	۳۷	۴۵	۵۵	۳۷	۴۵	۵۵	۳۷	۴۵	۵۵
قطر هاله آمیلازی باکتری 1B (mm)	۲۳	۲۰	۱۹	۲۰	۱۹	۱۸	۲۲	۲۰	۲۰
قطر هاله آمیلازی باکتری 7B (mm)	۲۸	۲۶	۲۷	۲۷	۲۶	۲۷	۲۹	۲۵	۲۴
قطر هاله آمیلازی باکتری 16B (mm)	۲۲	۲۳	۱۷	۲۲	۲۲	۱۸	۲۰	۲۳	۱۷

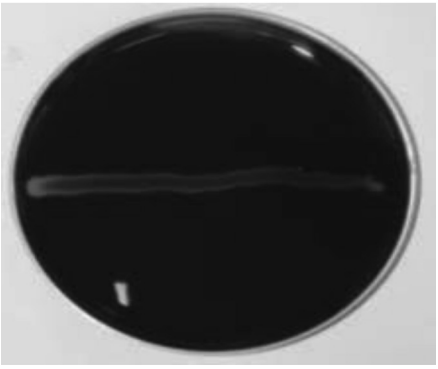
نتایج حاصل از آنالیز 16 S rRNA با استفاده از نرم‌افزار Blast، شباهت ۹۹/۸٪ جدایه منتخب به باسیلوس لیکنی فرمیس را تایید می‌نماید. در جدول ۲ میزان تشابه سویه منتخب با نزدیک‌ترین گونه ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی Eztaxon نشان داده شده است. در شکل ۴ توالی نوکلئوتیدی 16 Sr RNA سویه مشاهده می‌شود. آنزیم آمیلاز جزء متابولیت‌های اولیه باکتری است که در فاز لگاریتمی رشد تولید می‌شود. در شکل ۵ منحنی رشد سویه منتخب نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، باکتری در بازه زمانی حدود ۴۸-۸ ساعت پس از تلقیح در فاز لگاریتمی رشد، قرار دارد.

در مطالعات مشابه ایزوله‌های ترموفیل بیشتری مورد مطالعه قرارگرفته‌اند که احتمالا" علت این امر آن است که اغلب مخازن نفتی در عمق هستند. جایی که دما بالاست و همچنین ترموفیل‌ها دارای آنزیم‌های مقاوم به گرما هستند که در فرآیندهای صنعتی بسیار مورد توجه می‌باشد. از مطالعات مشابه می‌توان به Ezzat و همکاران اشاره کرد که آلودگی باکتریایی را عامل خوردگی میکروبی لوله‌ها و تورهای غربال چاه، جمع شدن بیومس در چاه‌های تزریق و تولید سولفید هیدروژن در عمق که منجر به ترش‌شدگی مخازن می‌شود، تشخیص دادند [۱۵]. همچنین در بررسی تجزیه زیستی نشاسته توسط Watcharakul و همکاران، ۱۲ نمونه سیال حفاری با پایه نشاسته بررسی گردید و باکتری‌های تخمیرکننده نشاسته از هر ۱۲ نمونه جدا شد. ۳ نمونه حاوی باسیل‌های اسپوردار بود که به Bacillus subtilis شباهت داشت[۱۴] .

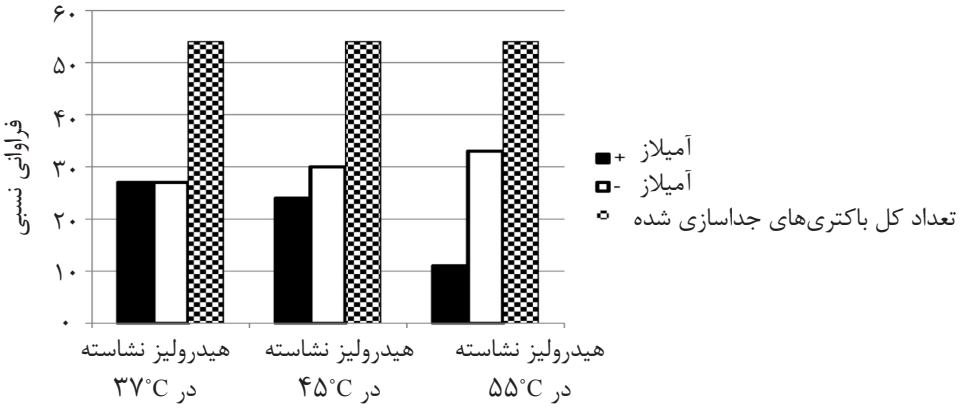
در پژوهش حاضر نیز آلودگی و تخمیر باکتریایی به‌عنوان عامل کاهش غلظت نشاسته در سیال شناخته شد که از میان باکتری‌های جداسازی شده، مشابه بررسی‌های پیشین، باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار نسبت به سایرین فعالیت آمیلازی بیشتری داشتند. شناخت عوامل تجزیه می‌تواند جهت چگونگی کنترل رشد و فعالیت این ارگانیسم‌ها و نیز انتخاب بیوساید مناسب برای ممانعت از تجزیه زیستی سودمند باشد. در حال حاضر از بیوسایدهایی نظیر آلدئیدها و ترکیبات چهارتایی آمونیوم با دوز مصرفی ۰/۱٪ (۱۰۰۰ ppm) برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها در سیال استفاده می‌شود.



شکل ۱- پلیت هیدرولیز نشاسته مثبت



شکل ۲- پلیت هیدرولیز نشاسته منفی



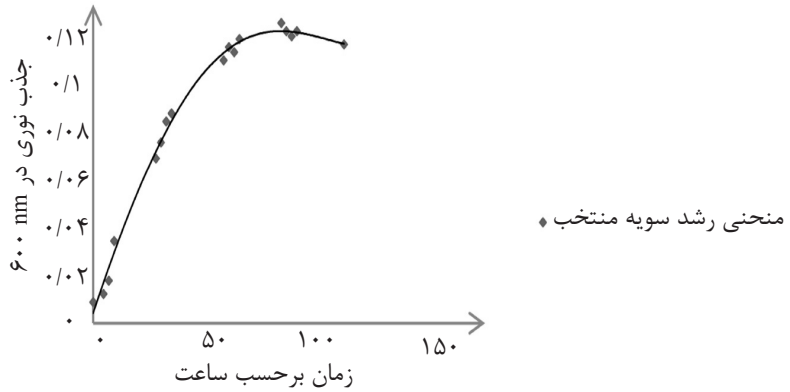
شکل ۳- فراوانی نسبی باکتری‌های هیدرولیزکننده نشاسته نسبت به کل باکتری‌های جداسازی شده در دماهای ۳۷، ۴۵ و ۵۵°C

جدول ۲- میزان تشابه سویه منتخب با نزدیک‌ترین گونه ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی Eztaxon

نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	شماره دست‌یابی نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت (٪)
سویه منتخب	Bacillus licheniformis ATCC 9945a	JN042159	۹۹/۸

```
GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTG
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGG
GGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
```

شکل ۴- توالی نوکلئوتیدی 16 SrRNA سویه منتخب



شکل ۵- منحنی رشد سویه منتخب در شرایط هوازی، محیط کشت M-H Broth، pH ۵/۹ و دمای ۴۵°C

نتیجه‌گیری

در ایـن پژوهـش ۵۴ سـویه باکتـری شـامل ۲۶ باسـیل گـرم مثبـت، ۲۲ باسـیل گـرم منفـی و ۶ کوکسـی گـرم مثبـت جداسـازی شـدند. ۱۸ جدایـه از ۲۶ باسـیل گـرم مثبـت اسـپوردار بودنـد. ۳ جدایـه در هـر ۳ دمـای ۳۷ و ۴۵، ۵۵°C قابلیـت رشـد و فعالیـت آمیـلازی داشـت. جدایـه منتخـب بـا ایجـاد بیشـترین هالـه آمیـلازی در هـر ۳ دمـا مـورد آنالیـز 16SrRNA قـرار گرفـت کـه نتایـج حاصـل بـا اسـتفاده از نرم‌افـزار Blast، شـباهت ۹۹/۸٪ جدایـه منتخـب بـه باسـیلوس لیکنـی فرمیـس را نشـان داد. ایـن تحقیـق نشـان می‌دهـد کـه باکتری‌هـا بـا وجـود دمـا، pH و حتـی نمـک بـالا در ترکیـب سـیال، باعـث تجزیـه زیسـتی نشاسـته و کاهـش غلظـت آن در سـیال می‌شـوند. فعال‌تریـن تجزیه‌کننـدگان نشاسـته در ایـن شـرایط ویـژه، باسـیل‌های گـرم مثبـت اسـپوردار متعلـق بـه جنـس باسـیلوس نظیـر باسـیلوس لیکنـی فرمیـس جـدا شـده در ایـن تحقیـق می‌باشـد. شناسـایی عوامـل تجزیـه بـه منظـور انتخـاب بیوسـاید مناسـب بـه منظـور ممانعـت از تجزیـه زیسـتی حائـز اهمیـت اسـت.

تشکرو قدردانی

بدین‌وسـیله از شـرکت ملـی حفـاری ایـران اداره کنتـرل، نظـارت و بررسـی‌های فنـی خدمـات سـیال حفـاری، بـه جهـت حمایـت از تحقیقـات منتهـی بـه ایـن نتایـج، تشـکر و قدردانـی می‌نماییـم.

مراجع

[1]. Leja k. and Lewandowicz G., *"Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers-a Review,"* Polish J. of Environ. Stud. Vol. 19, No. 2, pp. 255-256, 2010.

[2]. Turkiewicz A., *"The rol of microorganisms in the oil and gas industry,"* Tom. 13, ISSN, 1506-218X, pp. 227-240, 2011.

[3]. Davis J. B. and Updegraff D. M., *"Microbiology in the Petroleum Industry," Bactoriology Reviews*, Vol. 18, pp. 229, 1954.

[4]. Paulsen J. E., Omland TH., Igeltjorn H., Aas N. and Solvang, S. A., *"Drill cuttings disposal, balancing zero discharge and use of best available technique,"* SPE/IADC 85296, SPE/IADC Middle East Drilling Technology Conference & Exhibition, Abu Dhabi, UAE, pp. 1-11, 2003.

[5]. Smith J. P., *"Application of discharge modeling in environmental assessment of deepwater drilling discharge,"* Presentation to meeting of the Petroleum Environmental Research Forum (PERF), Fall, Exxon Mobil Upstream Resaerch Co., Houston TX, 2003.

[6]. Turkiewicz A., Brzeszcz J. and Kapusta P., *"The application of biocides in the oil and gas industry,"* Oil & Gas Institue, pp. 103-112, Krakow, 2013.

[7]. Jerry M. Neff, *"Composition,Enviromental Fates, and Biological Effect of Water Based Drilling Muds and Cutting Discharged to the Marine Enviroment: A Synthesis and Annotated Bibliography,"* Battelle, pp. 5, 11-13, 82, 2005.

[8]. Nnubia C. and Okpokwasili G., *"The microbiology of drill mud cutting from a new-offshore oilfield in nigeria,"* Invironmental Polloution, 82, pp. 153-156, 1992.

[10]. Cazorla F., Romero D., Perez-Gorcia A., Lagtenberg B., De Vicente A. and Bloemberg G, *"Isolation and characterization of antagonistic Bacillus subtilis strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity,"* Gor. Applied Microbiology ISSN, PP. 1364-1370, 2007.

[9]. Nweke C. O. and Okpokwasili G. C., *"Drilling fluid base oil biodegradation potentional of a soil staphylococcus species,"* African Journal Biotechnology, Vol. 2(9), pp. 293-295, 2003.

[11]. Roland M., *"HANDBOOK OF Microbiological Media,"* 4th, CRC Press U. S. A., 2004.

[12]. Wongsa P., *"Isolation and characterization of novel strain of pseudomonas aeroginosa and serratia marcescense possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, disel oil, and lubricating oil,"* Current Microbiology, Vol. 49, pp. 415- 422, 2004.

[13]. Joo M., Hur S., Han Y., and Kim J., *"Isolation, identification and characterization of Bacillus strains from the traditional korean soybean-fermented food, chungkookjang,"* Journal of Applied Biology and Chemistry, 50 (4), pp. 202-210, 2007.

[14]. Kapusta P. and Turkiewicz A., *"Investigations on microbiological degradation of polymers applied in drilling fluids technology,"* Tom 11, pp. 1213-1224, 2009.

[15]. Mavroudis D., *"Downhole environmental risks associated with drilling and well completion practices in the cooper/eromanga basins,"* Report Book 2001, Department of Primary Industries and Resources South Australia, p. 11, 2001.