علـــوم محـــیـــطی ۱۰ ، زمستان ۱۳۸٤
ENVIRONMENTAL SCIENCES 10 , Winter 2006
۵۱-۵۸

زندگی متانوژنیک (باکتریهای مولد گاز متان) در محیط زیست دشوار مخازن نفتی

میترااالسادات طباطبایی
دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
مهناز مظاهری اسدی
دکترای میکروبیولوژی، استادیار سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

چکیده

نفت ترکیب پیچیده‌ای از انواع هیدروکربن‌ها است که در اعماق زمین تحت فشار دمای بالا اعماق شکل گرفته است. تاکنون مطالعات متعددی در سراسر دنیا وجود میکروارگانیسم‌های بومی مخازن نفتی با شرایط دشوارمخزنی اعم از دمای بالا، شوری بالا و فشار بالا را به اثبات رسانده است. آرکی باکترها در واقع باکتری‌های باستانی با ویژگی‌های منحصر به فرد از لحاظ ساختار و ژنتیک بوده و در سومین عرصه حیات قرار دارند، قادر به تحمل این شرایط ویژه و دشوار مخازن دشوار مخزنی می‌باشند. مهم‌ترین آرکی‌های مخازن نفتی متانوژن‌ها می‌باشند که آرکی‌هایی هستند که قادر به تولید گاز متان به عنوان بخشی از متابولیسم داخلی خود می‌باشند. در این مطالعه به بررسی حضور و رشد متانوژن‌ها در دمای بین ۲۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و نیز شوری تا حد اشباع پرداختیم. گاز کروماتوگرافی و میکروسکوپ فلورسنت برای بررسی رشد متانوژن‌ها در شرایط مختلف به‌کار گرفته شده است. کشت به روش کاملاً بی‌هوازی در Serum bottle با تنظیم اتمسفر CO_2+H_2 انجام گرفت.

کلیدواژه‌ها: متانوژن ، نفت، دما، شوری.

Methanogenic Life under Extreme Conditions in an Oil Reservoir

Mitra Sadat Tabatabaee
Ph.D. Student in Microbiology, Research and Science Campus, Azad University
Mahnaz Mazaheri Assadi, Ph. D.
Assistant professor, Scientific and Industrial Research Organization of Iran

Abstract

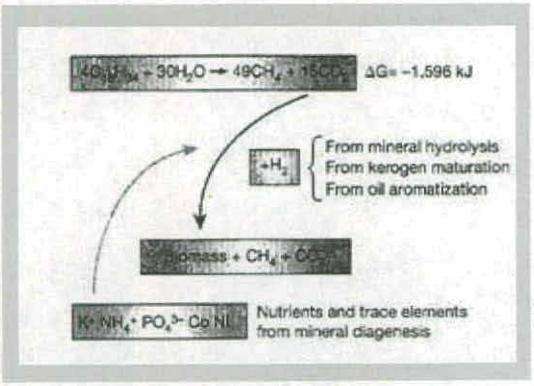
Petroleum, which is a complex component of hydrocarbons, has been formed in the deep subsurface under conditions of high pressure, salinity and temperature. By now, several different studies have proved the presence of indigenous microorganisms consistent with the extreme conditions of oil reservoirs such as high temperature, high salinity and pressure. Archaea are an ancient group of bacteria with unique structural and genetic properties that are placed in the third domain of life and are able to endure the extreme and exclusive conditions of these reservoirs. The main archaeal residents in oil reservoirs are methanogens that produce methane as a part of their internal metabolism. In this investigation the presence and growth of methanogens at temperatures between 20°c to 60°c and salinities up to the level of saturation have been studied. Gas chromatography and electron microscopic observations were examined to study methanogenic life. Cultivation was done under anaerobic conditions in serum bottles with atmospheric adjustment of N_2, CO_2+H_2.

Keywords: Methanogens, Oil, Temperature, Salinity.

مقدمه

گرچه مبحث حضور باکتری‌ها در اعماق زمین در اوایل قرن ۲۱ مطرح شد، اما به تازگی وجود حیات در اعماق زمین در مجامع علمی مورد پذیرش قرار گرفته است. تردید در مورد بیوسفر زمین از اثبات بومی بودن ارگانیسم‌های ردیابی شده در این سیستم نشأت می‌گرفت، اما با ایجاد تکنیک‌های نمونه‌گیری پیشرفته که اصیل بودن میکرو ارگانیسم‌های جدا شده از اعماق زیرزمین را ثابت می‌کرد، این تردیدها از بین رفت(Head *et al.*, 2003).شواهد نشان می‌دهند که بیوسفر اعماق، زیر سطح دریا و خشکی تا ۳ کیلومتر زیر سطح امتداد دارد، با مطرح شدن تجزیه زیستی نفت احتمال گسترش آن تا حداقل ۴ کیلومتر زیر سطح ادامه می‌یابد(Britt-Robert, 2002).بیومس پروکاریوتی زیر سطح زمین در بر دارنده g $۱۰^{۱۷} \times ۵-۳$ کربن است که ۱۰۰-۶۰ درصد کل کربن موجود در بیومس گیاهی را شامل می‌شود. به طور معمول سلول‌های پروکاریوتی واجد نسبت نیتروژن و فسفر بالاتر از بیومس گیاهی (حدود ۱۰ برابر بیشتر)می‌باشد، لذا سهم میکرو ارگانیسم‌های عمقی در ذخایر نیتروژن و فسفر به شدت حائز اهمیت و توجه است (Whiteman *et al.*, 1995). بیوسفر عمقی دارای اهمیت زیادی از لحاظ میزان عناصر کلیدی است. با همه این اوصاف، این حقیقت که حضور بسیاری از ارگانیسم‌ها که مصرف کننده یا تولید کننده ترکیبات معدنی و آلی در ایجاد انرژی و بیومس هستند اهمیت آنها را در حیطه فرآیندهای بیوشیمیایی نشان می‌دهد. یکی از همین فرآیندهای کلیدی در عمق زمین دگرگونی هیدروکربن‌های نفتی برای ایجاد نفت سنگین به وسیله تجزیه زیستی است (Head *et al.*, 2003). یکی از اولین تحقیقاتی که در مورد میکروبیولوژی اعماق زمین انجام شد منتج به جداسازی باکتری‌های احیا کننده سولفات از چاه نفت شد. در کنار این ایزوله‌ها قشر عظیمی از باکتری‌های بی‌هوازی و آرکی‌ها با ویژگی‌های فیزیولوژیک مناسب رشد در اعماق زیرزمین نیز ایزوله شدند(Orphan *et al.*, 2000). فرآیندهای آرام بی‌هوازی در زیر زمین فراوان می‌باشد که به صورت تجزیه زیرزمینی هیدروکربن‌ها در ارتباط با احیای آهن و متانوژنز بوده و یا در مخازن نفتی با وفور سولفات به صورت احیای سولفات می‌باشد (Zengler *et al.*, 1999). متانوژنز که یک فرآیند منحصراً بی‌هوازی است عموماً در تجزیه نفتی مخازنی دیده می‌شود که فاقد سولفات آزاد باشد و با توجه به اطلاعات ایزوتوپیک موجود، متان سبک متناوباً با متان ترموژنیک همراه می‌شود(Head *et al.*, 2003).

متانوژنها به احتمال قوی اعضای بومی میکروفلورای مخازن نفتی هستند. متانوژن‌هایی که تاکنون معرفی شده‌اند اکثراً از انواعی هستند که CO_2 را به متان احیا می‌کنند و این در حالی است که گزارشات اندکی از متانوژن‌های استوکلاستیک وجود دارد. متانوژنز سرنوشت حجم زیادی از CO_2های حاصل از تجزیهٔ زیستی نفت در غیاب سولفات آزاد است (شکل ۱).



شکل ۱ - شیمی تجزیه هیدروکربنها در بیشتر مخازن نفتی در غیاب سولفات

در طی ۵۰ سال گذشته، تحقیقات روی میکرواورگانیسم‌ها در محیط‌های غیر قابل زیست مانند PH بالا، دمای بالا، غلظت مواد غذایی و فشار، اطلاعات وسیعی را در رابطه با تنوع و منشأ بزرگ زندگی میکروبی در اختیار ما قرار داده است. آرکی‌ها که

سومین عرصه از میدان حیات می‌باشند شامل تعداد کثیری از اکستریموفیل‌ها هستند که در این محیط‌ها مثل چشمه‌های آب گرم، دریاچه‌های نمک و آتشفشان‌های زیر آب زندگی می‌کنند (Eckburg *et al.*, 2003) و یکی از این محیط‌ها مخازن نفتی به‌عنوان شکلی از بیوسفر اعماق است.

پدیده‌ای که باعث تمیز آرکی باکترها ازیوباکتری‌ها می‌شود ساختار ریبوزومی آرکی‌هاست که اولین بار در هالوفیل‌ها مشخص شد که بیشتر اسیدی هستند تا بازی، به علاوه ماشین همانندسازی و ساختار RNA پلیمراز وابسته به DNA در این‌ها منحصر به فرد بوده و با توجه به ساختار زیرواحدهای آن ارتباط نزدیک‌تری را با یوکاریوت‌ها در قیاس با پروکاریوت‌ها از خود نشان می‌دهند(Engelhard *et al.*, 1999). ویژگی دیگر متمایز کنندهٔ آرکی‌ها از باکتری‌ها ترکیب لایه‌های سطحی آن‌ها است. آرکی‌ها دارای فلاژین‌های ویژه و لیپیدهای با پیوندهای اتری هستند و فاقد مورین در دیواره می‌باشند(Brown *et al.*, 1992). لایه‌های سطحی گلیکوپروتئین این‌ها می‌تواند ساختارهای شبه کریستالی را که به محکمی به غشاء سلولی چسبیده‌اند، ایجاد کند. لذا هیچ فضای پری پلاسمی باقی نخواهد ماند (Brock *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1992; Eckburg *et al.*, 2003; Engelhard *et al.*, 1999).

از آنجا که عرصه جدیدی از زیست شناسی با نام subsurface biology در جهان هر روز به صورت گسترده‌تری مطرح می‌شود، مطالعه در این زمینه به صورت بومی در کشور نفت خیز ما ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری به دو روش هوازی در شیشه های فانل در پیچ دار و بی‌هوازی در Hungate tube با درب Crimp seal شده از شیر separator سر چاه نفتی انجام شد. چهار نمونه نفتی PG2,N3C3 (بی‌هوازی) و BB1, E0P4 (هوازی)(از مخازن ایلام، بی بی و سیری) نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه بوده‌اند.

جداسازی

از آنجا که متانوژن‌ها موجودات به شدت بی‌هوازی هستند، از کشت به روش serum bottle که توسط Miller و Wollin در سال ۱۹۷۳ ارائه شده بود استفاده شد (Federok *et al.*, 2000; Holowenko *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 1999; Zeikus, 1977). شیشه‌های سرمی تا نیمه از محیط کشت پر می‌شد و سپس تنظیم اتمسفریک با گاز N_2 و $CO_2 + H_2$ انجام می‌گرفت. کشت‌های جامد در پلیت و یا لوله آزمایش به صورت Slant در جار بی‌هوازی با تنظیم اتمسفریک با N_2 و $CO_2 + H_2$ در حضور گاز پک Aو C انجام می‌شد. گرما گذاری در c ۴۰° به مدت ۲۱ روز صورت می‌گرفت.

محیط‌های کشت مورد استفاده

در این مطالعه سه محیط کشت Mineral Salt-Methanol (Atlas *et al.*, 1988) برای کشت اولیه، LPBM برای غنی‌سازی انتخابی و رشد متانوژن‌ها (Zeikus, 1977) و Medium 141 –Methanognium media-DSMZ list of media که محیطی بسیار غنی با انواع محرک‌های رشد متانوژنیک بود، مورد استفاده قرار گرفت. سه سوبسترای اصلی متانوژنیک یعنی CO2+H2 و فرمات (به صورت فرمات سدیم) ومتانول به نسبت ۱ درصد به تمام محیط‌ها افزوده شد.

کشت‌ها ابتدا در LPBM انجام گرفت تا به علت فقدان حضور ترکیبات سولفاته و ترکیبات آلی رقبای احیا کننده سولفات و هتروتروفیک از کشت حذف شده و سپس کشت مجدد برای تقویت رشد متانوژنیک در DSMZ صورت گرفت. به علاوه برای حذف یوباکترها از سه آنتی بیوتیک پنی سیلین (برای حذف گرم مثبت‌ها)،

استرپتومیسین (حذف گرم منفی‌ها) و اریترومایسین (به عنوان باکتری وسیع الطیف) به میزان ۵۰ mg/l (۱۵) در تمام محیط‌های کشت استفاده میشد(Boone *et al.*, 2001).برای بررسی کلونی‌های متانوژنیک به محیط‌های کشت ۲ درصد آگار آگار (Brown *et al.*, 1992; Zeikus, 1977) افزوده شد.

بررسی رشد

مشاهدات ماکروسکوپی در محیط جامد و مایع ، مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری، فلورسنت و الکترونی (SEM) و گاز کروماتوگرافی با دستگاه کروماتوگراف مدل SRI8010 در حد PPM (close found 6% cyanopropyle- 94% dimethyle polysicloxane) برای حصول اطمینان از متانوژنز، بکار برده شد.

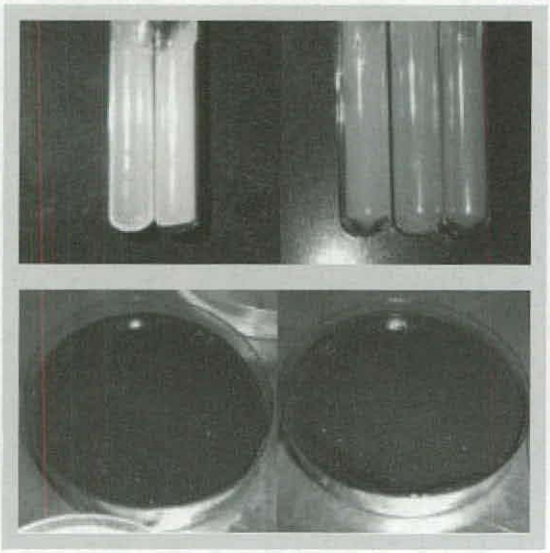
نتایج و بحث

مطالعات ماکروسکوپی

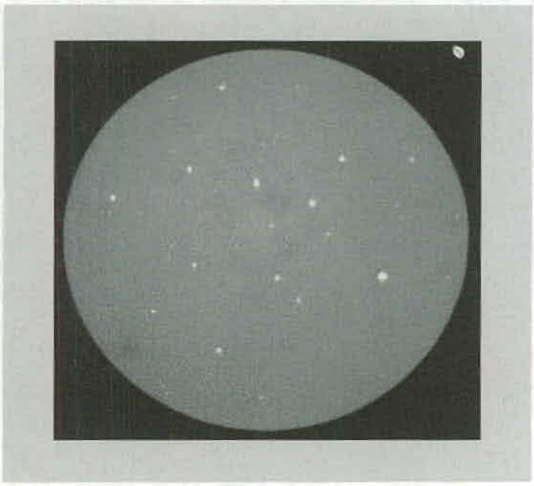
کنده شدن Slantها از کف لوله آزمایش که حاصل از تولید گاز بود، همچنین حل شدن نفت در محیط‌های مایع و نیز مشاهده کلونی‌های بسیار ریز فلورسنت در سطح پلیت حاکی از رشد متانوژنیک بود. برای تمییز کلونی‌ها از روش ارائه شده توسط Edwards و Mc Bride (Zeikus, 1977) استفاده شد. در این روش پلیت‌هایی که به صورت خطی کشت داده شده بودند، در برابر نور ماوراء بنفش با طول موج بلند قرار می‌گیرند و کلونی‌های ریزی به صورت فلورسنت در سطح پلیت دیده می‌شوند (کلونیهای کوچکتر از ۰/۵ میکرون خاصیت فورسنت ندارند) (Zeikus, 1977) (شکل ۲).

مطالعات میکروسکوپی

میکروسکوپ نوری: این میکروارگانیسم‌ها به هیچ عنوان به رنگ آمیزی گرم پاسخ نمی‌دهند زیرا اصولاً جزو دسته متانوژن‌های اکستریموفیل (هالوفیل و ترموفیل) بوده و به علت دیواره پروتئینی به رنگ آمیزی گرم پاسخ نمی‌دهند. تنها برای بررسی رشد میکروبی با میکروسکوپ نوری از رنگ آمیزی منفی با مرکب چین استفاده شد(شکل ۳).



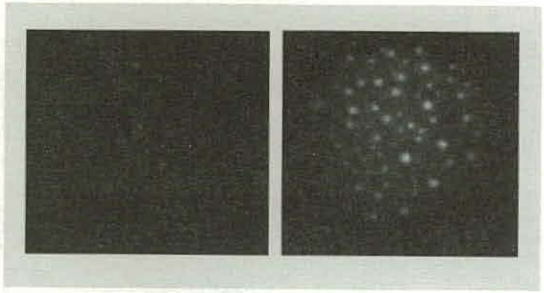
شکل۲- کنده شدن Slant از کف محیط پس از تولید گازو کلونیهای فلورسنت



شکل ۳- تصویر لام رنگ آمیزی منفی

میکروسکوپ فلورسنت: (Buchenau *et al.*, 2004; Doddema *et al.*, 1987; Mink *et al.*, 1977)در سال ۱۹۷۷ Mink و Dugan روش استفاده از میکروسکوپ فلورسنت را برای شناسایی نسبی و اولیه متانوژن‌ها ارائه

دادند. آن‌ها بیان کردند که فاکتور F420 در شرایط اکسیده قادر به تولید فلورسنت سبز-آبی است(Mink *et al.*, 1977) (شکل ۴).



شکل ٤-تصاویر متانوژنهای فلورسنت

میکروسکوپ الکترونی نگاره: Scanning electron microscopy ابزاز دقیقی برای بررسی مورفولوژی متانوژنها است (شکل ۵).

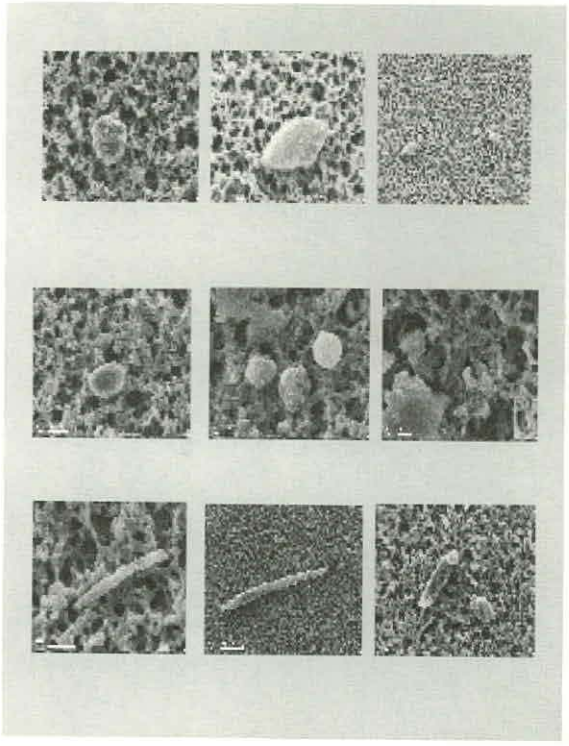
بررسی تولید گاز

ردیابی گاز متان توسط گاز کروماتوگراف معرفی شده در مواد و روش‌ها حاکی از فعالیت متانوژنیک در نمونه‌های نفتی مورد بررسی بود.

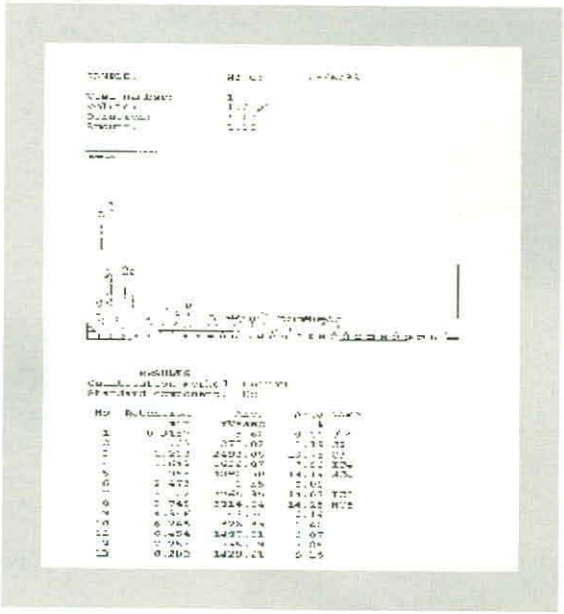
بررسی تاثیر دما

تاثیر دما در دو فرایند نگهداری و کشت لحاظ شد. مشاهده شد که متانوژن‌ها به حیات خود در نمونه‌هایی که چه در ۴ °c (BB1 و E0P4) و چه در ۲۵ °c نگهداری شده‌اند ادامه دادند.

سپس نمونه‌ها در دماهای مختلف انکوبه شدند که گرماگذاری از ۲۰ °c آغاز شد. به ترتیب گرماکذاری در ۲۰و۲۵و ۳۰و۳۵و۳۷و ۴۰ درجه سانتی گراد انجام شد(که ۴۰ °c دمای ثابت برای مابقی مطالعات قرار گرفت). با افزایش دما میزان متان قابل ردیابی در مدت زمان کمتری(۱۵ روز) و با میزان بیشتری قابل ردیابی شد. چنانکه در نمونه N3C3 که دماهای ۵۰ °c و ۶۰ °c نیز مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که در ۶۰ °c مدت زمان گرماگذاری به ۶ روز تقلیل یافت و میزان متان قابل ردیابی از حد PPM به حد درصد رسید (سنجش بوسیله دستگاه Crome pack مدل۴۳۸) (شکل۶).



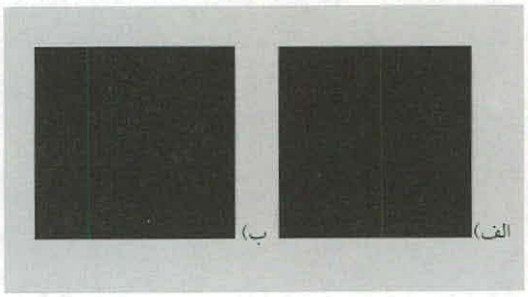
شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره



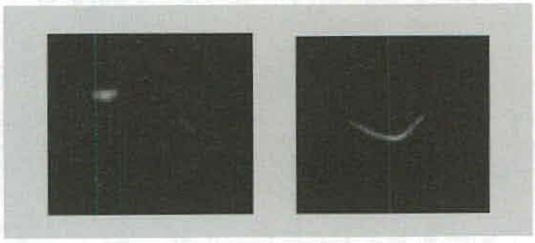
شکل ٦ - بررسی تأثیر دماهای مختلف بر رشد باکتریهای متانوژن

بررسی تاثیر غلظت نمک (NaCl) بر رشد

هیچگونه رشد متانوژنیک در محیط فاقد نمک ردیابی نشد. بررسی رشد از غلظت ۱/۸ درصد با توجه به فرمولاسیون محیط DSMZ آغاز شد. سپس غلظت‌های ۱/۸و۲/۴و ۳/۵و ۴/۵و ۶و ۹و ۱۲و ۱۴و ۱۷و ۲۰و ۲۲و ۲۴و ۲۶و ۳۰ و ۳۲ (درصد اشباع در $^{\circ}c$ ۲۵)و ۳۴و۳۶ درصد نمک NaCl بررسی شد و مشاهده می‌شد که با افزایش غلظت تا ۱۲ درصد بر تعداد باکتری‌ها در مشاهدات میکروسکوپی افزوده می‌شد (شکل۷) اما در غلظت‌های بالاتر گرچه بر تنوع مورفولوژیک افزوده می‌شد ، از تعداد باکتری‌ها کاسته می‌شد(شکل ۸).



شکل ۷-الف) غلظت۲/٤ درصد ب) غلظت۱۲ درصد



شکل۸- غلظت۳۰ درصد نمک

نتیجه گیری

تمام اطلاعات به‌دست آمده دراین مطالعه اعم از یافته‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و گاز گروماتوگرافی حاکی از حضور متانوژن‌ها در نفت خام به عنوان دسته‌ای از میکرو ارگانیسم‌های بومی مخازن نفتی بود.

تحقیقات متعددی در سراسر دنیا مؤید حضور متانوژن‌ها در نفت خام بوده است.با توجه به اینکه مخازن نفتی به عنوان نمونه‌ای از اکوسیستم زیر سطح زمین دارای شرایط اکستریم بادما، شوری و فشار بالا هستند توقع می‌رفت که متانوژن‌های ایزوله شده در این مطالعه نیز قادر به تحمل شرایط دشوار مخزنی باشند. نتایج حاصل از بررسی تغیرات دما و شوری بیانگر تحمل پذیری حیطه وسیعی از تغییرات محیطی در شرایط کاملاً بی‌هوازی در این میکروارگانیسم‌ها بود. و این خود نشانگر شرایط و ویژگی‌های منحصر به فرد این آرکی‌های نفت‌زی است. با انجام این مطالعه وجود متانوژن‌های نفت‌زی به عنوان ساکنان بومی اکوسیستم مخازن نفت ایران اثبات می‌گردد که گستره جدیدی از مطالعات زمین شناسی، میکروبیولوژی و بیوژئوشیمی را دربرابرمان باز می‌کند.

منابع

Atlas, R.M., A.E. Brown, K.W. Dobra, and L. Miller (1988). *Experimental microbiology, Fundumental publishing company* –second edition. and application – New York Mackmillan

Boone, D.R., and R.W Castenholz (2001). *Burgey's manual of systematic bacteriology*. vol 1 second edition .

Britt – Robert R. (2002). Bizarre creature in Idaho raises prospects for life on mars- Extremophiles- SETI institute-online

Brock, T.D. and M.T. Madigan (1991). *Biology of microorganisms* Prentice hall.Inc sixth edition.

Brown, L.R., A. Azodpour, A. Vadie (1992). A study of the interaction between organisms, microbial by– Product and oil bearing formation material Barttesville project office u.s Department of energy – Barthesville, oklahma final report.

Buchenau, B. and R.K. Thauer (2004). Tetrahydrofulate specific enzyme in Methanosarcina barker and growth dependence of this mehanogenic archaean of folic acid or p-aminobenzioc acid Archives of microbiology, published online.

Whiteman, W.B.F., Pffeifer, P. Blum and A. Klein (1999). What archaea have to tell biologists- Genetics, 152 : 1245-1248.

www.Hood.edu/Academic/biology/ferrier/SEMbact - Preparing bacterial samples for SEM

Zeikus, J.G. (1977). The biology of methanogenic bacteria, *Bacteriological reviews,* 42: 514- 541.

Zengler, H., H.H. Richnow, R. Rossello – Mora, W. Michaelis and F. Widdle (1999). Methane formation from long chain alkanes by anaerobic microorganism. *Nature.* 401 (16): 266- 269.

Doddema, H.J. and G.D. Vogels (1987). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology,* 36 (5): 752-754.

Eckburg, P.B., P.W. lepp, and D.A. Relman (2003). Archaea and their potential role in human disease. *Infection and immunity*, 71 (2): 594 – 596.

Federok, Ph.M., D. Coy, M.J. Salloum, and M.J. Dudas (2000). Methanogenic potential of tailing sands extraction plants. *Can.J.Microbiol.*, 48: 21-23.

Head, I.M., D.M Jones and S.R Larter (2003). Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature,* 426 (20): 344-352.

Holowenko, F.M. M.D. mackinnon,and Ph. M Federok (2000). Methanogens and sulfate reducing bacteria in oil sands fine tailing waste. *can . J.Microbiol,* 46: 927-937.

Kandler, O. and H. Koing (1998). Cell wall polymers in archaea – CMLS, *cell. Mol . life, Sci.,* 54: 305 – 308.

Mink, R.W. and P.R Dugan (1977). Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology,* 33 (3): 713-717.

Orphan, V.J., L.T. Taylor, D. Hafenbradl, and E.F Delong (2000). Culture dependant and culture independent characterization of microbial assemblages associated with high temperature petroleum reservoir *Applied and Environmental microbiology,* 66 (2): 700 – 711 .

Rapheal, S.V., K.R. Swaminathan, and K. Lalitha (2003). Metabolic characteristics of an aerobe isolated from a methylotrophic methanogenic enrichment culture. *J. Biosci*, 28 (2): 235-242.

Engelhard, M., and M. Volker (1999). Bioenergetics of archaea, *Microbiology and molecular biology reviews,* 63 (3): 570 – 620 .

Warren, E., B.A. Bekins, and E.M. Godsy (1999). Inhibition of acetoclastic methanogenesis by crude oil from Bemidji, Minnesota u.s.Geological survey toxic substances hydrology program *Proceeding of technical meeting , Charleston, south Carolina.* Vol 3.

Whiteman, W.B.,, D.C. Coleman, and W.J. Wiebe (1995). Prokaryotes : the unseen Majority – *proc.Natl.Acad .Sci. us*– P6578- 6583.