تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال چهارم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۷۹-۸۹
دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۱۳ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۵/۲۵

شناسایی میکروسکوپی باکتری‌های رشته‌ای غالب حجیم‌کننده لجن در زلال‌کننده‌های واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان با روش اسلاید پنهان

منا حسینی‌راد [۱]، گیتی امتیازی [۲]، زرین‌دخت امامی [۱]* و قاسم غفاری [۳]
[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] بخش اسمز معکوس، پالایشگاه نفت اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

بالکینگ (یا حجیم شدن لجن)، شناور شدن توده‌های لجن، در اثر رشد بیش از اندازه باکتری‌های رشته‌ای و یا غیررشته‌ای در فرآیند تصفیه پساب است که کاهش کیفیت فرآیند تصفیه و جریان خروجی را به دنبال دارد. با توجه به این که ازدیاد نوکاردیوفرم‌ها (Nocardioforms) و *Beggiatoa* به ترتیب نشانه وجود ترکیبات روغنی بالا و وجود گوگرد در سیستم است، با شناسایی باکتری‌های غالب بالکینگ‌کننده، می‌توان به عوامل ایجاد آن پی برد و به راهکارهایی جهت کنترل اختصاصی بالکینگ دست یافت. در این مطالعه، شناسایی باکتری‌های بالکینگ‌کننده، در واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان، با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و تهیه اسلاید پنهان انجام شد. اسلاید پنهان، تکنیکی مفید برای تحلیل نمونه‌های محیطی است که در آن، یک لام میکروسکوپی درون نمونه محیطی مورد نظر قرار می‌گیرد. در این روش می‌توان با استفاده از یک پوشش ژلاتینی اختصاصی نازک بر روی لام، گرایش به سوی تجمع انتخابی باکتری‌های نمونه را تحریک نمود. با مطالعه میکروسکوپی لام‌ها، تشخیص باکتری‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و واکنش آنها به رنگ‌آمیزی‌های گوناگون انجام شد و نوکاردیافرم‌ها و *Nostocoida limicola* به عنوان باکتری‌های رشته‌ای غالب شناسایی شدند. *Nostocoida limicola* در گروه پلانکتومایست‌های زائده‌دار قرار دارد. در این پژوهش، برای نخستین بار طی مطالعات میکروسکوپی اسلاید پنهان شکل زائده‌دار این باکتری به وضوح مشاهده گردید. همچنین روابط معنی‌داری میان غلبه این باکتری‌ها و شرایط بهره‌برداری سیستم یافت شد که بر مبنای آنها، می‌توان به روش‌هایی برای کنترل اختصاصی بالکینگ دست یافت.

واژه‌های کلیدی: اسلاید پنهان، حجیم‌کننده لجن رشته‌ای، پالایشگاه نفت اصفهان، روش میکروسکوپی، نوکاردیافرم‌ها (Nocardioforms)، *Nostocodia limicola*

* emami@iaufala. ac. ir

مقدمه

فرآیند لجن فعال روشی است که بیشترین کارآیی را در سیستم‌های بزرگ تصفیه پساب به صورت زیستی داشته، روش هوازی متداول در تصفیه پساب‌های شهری و صنعتی (Yuanhao Zhao, 2012) نظیر آب‌های آلوده به مواد نفتی است. تصفیه پساب‌های صنعتی به این روش معمولاً در سه مرحله مقدماتی، ثانویه و نهایی انجام می‌شود. مرحله مقدماتی عمدتاً فیزیکی است و مواد معلق و جامد موجود در پساب از طریق آشغال‌گیری، گذراندن از صافی و لخته‌سازی حذف می‌شود. مرحله ثانویه به صورت زیستی است و در روش لجن فعال، مواد آلی درون حوضچه‌های هوادهی توسط باکتری‌ها، به عنوان یک رآکتور زیستی، تجزیه می‌شوند. مرحله نهایی نیز شامل زلال‌سازی، ضد عفونی و گذراندن از صافی برای استفاده مجدد از پساب تصفیه شده است (غفاری، ۱۳۸۸).

بیشتر تأسیسات تصفیه زیستی به روش لجن فعال با مشکلات بهره‌برداری (نظیر انسداد صافی ها یا عدم ته‌نشینی لجن) ناشی از پدیده بالکینگ درگیرند (Speirs *et al*., 2009)، که به کاهش راندمان تصفیه پساب و کاهش کیفیت ته‌نشینی لجن منجر می‌شود (Yuanhao Zhao, 2012). بالکینگ، شناور شدن توده‌های لجن، در اثر رشد بیش از اندازه باکتری‌های رشته‌ای و یا غیر رشته‌ای است که بر اساس آن، دو نوع بالکینگ رشته‌ای و غیر رشته‌ای وجود دارد. بالکینگ رشته‌ای به وسیله باکتری‌های رشته‌ای و بالکینگ غیر رشته‌ای یا زوگله‌آیی توسط باکتری‌های غیر رشته‌ای و به دلیل ترشح بیوپلیمرهای خارج سلولی به وجود می‌آید (امتیازی، ۱۳۷۹؛ Eikelboom, 1982؛ Bitton, 2005). تقریباً در تمامی سیستم‌های تصفیه پساب به روش لجن فعال، باکتری‌های رشته‌ای وجود دارند که حضور آنها، تا زمانی که تراکمی در حد معمول داشته باشند، می‌تواند موجب بهبود کیفی برخی از خصوصیات لجن شود. اما زمانی که رشد و تکثیر این باکتری‌ها افزایش یابد و بحرانی گردد، بالکینگ رشته‌ای ایجاد شده و مشکلات جدی در فرآیند تصفیه رخ می‌دهد (بدلیانس قلی کندی، ۱۳۸۲؛ Gerardi, 2006).

تاکنون حدود ۳۰ نوع باکتری رشته‌ای به عنوان عوامل ایجادکننده بالکینگ شناخته شده‌اند (امتیازی، ۱۳۷۹). باید دانست که تقریباً ۹۰ تا ۹۵ درصد از موارد بالکینگ توسط ۱۰ نوع باکتری رشته‌ای *Sphaerotilus natans*، *Haliscomenbacter hydrosis*، *Microthrix parvicella*، گونه‌های *Nocardia*، *Beggiatoa*، *Thiothrix* و گونه‌های 021n، 1701، 0041 و 0092 ایجاد می‌شوند (Jenkins *et al*., 1984; Gerardi, 2008).

شایان ذکر است که هر فرآیند تصفیه بیولوژیکی، جمعیت میکروبی خاص خود را دارد که در شرایط ویژه محیطی حاکم بر آن سیستم فعالیت می‌نماید، بنابراین شناسایی این باکتری‌ها تا حد زیادی می‌تواند تعیین‌کننده شاخص‌های محیطی باشد. از این رو، می‌توان باکتری‌ها را به عنوان شاخص زیستی این سیستم‌های تصفیه دانست (Gerardi, 2006).

به دلیل رشد کُند باکتری‌های رشته‌ای و دشواری تهیه کشت خالص از آنها، انجام روش‌های متداول کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی، برای شناسایی این باکتری‌ها سخت و زمان‌بر است. از این رو، شناسایی

آنها عمدتاً با استفاده از روش‌های میکروسکوپی صورت می‌گیرد (Kanagawa *et al.*, 2000). در این روش‌ها، مجموعه‌ای از ساختارهای ریخت‌شناختی اختصاصی باکتری‌های رشته‌ای مانند: طول، قطر و شکل، شکل سلول‌های درون رشته‌ها، وجود یا عدم وجود دیواره عرضی در بین این سلول‌ها، دارا بودن انشعابات حقیقی و کاذب، تشکیل ساختارهای اختصاصی نظیر اجسام گل مانند (rosset) و جوانه (budding)، قابلیت تحرک این رشته‌ها، وجود یا عدم وجود غلاف پیرامون باکتری‌های رشته‌ای، ذخایر اکسیدهای آهن و منگنز در غلاف، حضور گرانول‌های ذخیره‌ای مانند: دانه‌های متاکروماتیک، چربی و گوگردی درون رشته‌ها، پاسخ به رنگ‌آمیزی‌های گوناگون نظیر گرم و نایسر و خصوصیاتی از این دست، به منظور شناسایی باکتری‌های رشته‌ای بررسی می‌شوند (امتیازی، ۱۳۷۹؛ Gerardi, 2008).

در واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان، زلال‌کننده ها (clarifiers) به صورت دو حوضچه A و B تعبیه شده‌اند (غفاری، ۱۳۸۸). بالکینگ به وجود آمده در آنها سبب اشغال حجم زیادی توسط لجن می‌شود که به دلیل کاهش فشردگی لجن، به سهولت ته‌نشین نشده، فرآیند تصفیه را با مشکل مواجه می‌نماید (امتیازی، ۱۳۷۹؛ Liao *et al.*, 2004). از آن جا که تاکنون در ایران، باکتری‌های رشته‌ای مولد بالکینگ در پساب‌های نفتی شناسایی نشده‌اند، در این مطالعه، بررسی میکروسکوپی عمده‌ترین عوامل ایجاد کننده بالکینگ در تصفیه‌خانه این واحد صنعتی انجام گرفت. ضمن آن که برای نخستین بار روش اسلاید پنهان برای تشخیص این باکتری‌ها و نمونه‌برداری از سیستم تصفیه استفاده شد. تکنیک اسلاید پنهان، روش مفیدی برای تحلیل نمونه‌های محیطی است که در این روش، یک لام میکروسکوپی شیشه‌ای درون نمونه مورد نظر، مانند خاک، پساب یا لجن فعال قرار می‌گیرد. با این روش می‌توان به وسیله یک پوشش ژلاتینی اختصاصی نازک بر روی لام، گرایش به سوی تجمع انتخابی باکتری‌های موجود در نمونه را تحریک نمود، که برای این منظور، ترکیبات اختصاصی برای ایجاد گرایش شیمیایی در میان باکتری‌ها به پوشش آگاروزی اسلاید افزوده می‌گردد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی تنوع باکتری‌های رشته‌ای در بخش‌های مختلف تأسیسات تصفیه‌خانه، نمونه‌گیری به صورت جداگانه از حوضچه‌های هوادهی، زلال‌کننده‌ها و مخزن هاضم، درون بطری‌های شیشه‌ای یک لیتری انجام و به آزمایشگاه منتقل گردید. در زمان انتقال و در تمام مدت مطالعه، درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد و به صورت رو باز نگهداری شد.

ابتدا در نمونه‌های جمع‌آوری شده به صورت تازه، قابلیت تحرک رشته‌ها با استفاده از روش لام مرطوب مطالعه شد. برای مطالعات ریخت‌شناسی باکتری‌های رشته‌ای نظیر: طول، قطر و شکل، وجود انشعابات حقیقی و کاذب در طول این رشته‌ها، داشتن دیواره عرضی، حضور غلاف در پیرامون باکتری‌ها، وجود ساختارهای ریختی خاص، مانند جوانه و نیز حضور گرانول‌های ذخیره‌ای نظیر دانه‌های متاکروماتیک درون رشته‌ها، همچنین، بررسی واکنش این باکتری‌ها نسبت به رنگ‌های مختلف، رنگ‌آمیزی گرم، به روش

اصلاح شده Hucker و رنگ‌آمیزی نایسر، بر روی اسمیرهای خشک شده از نمونه‌ها انجام شد (Louvet *et al*., 2011).

شایان ذکر است که در تهیه اسمیر از باکتری‌های رشته‌ای، به دلیل تغییر ساختار ریختاری این رشته‌ها در اثر حرارت، تثبیت باکتری‌ها بر روی لام، با استفاده از حرارت انجام نمی‌شود و اسلایدها فقط خشک و بدون تثبیت شدن رنگ‌آمیزی می‌شوند (Jenkins *et al*., 2004; Gerardi, 2008).

بررسی وجود گرانول‌های گوگردی درون باکتری‌های رشته‌ای با آزمون اکسیداسیون گوگرد (آزمون S) و به صورت لام مرطوب، با استفاده از محلول آبی سولفید سدیم با غلظت ۱ گرم بر لیتر صورت گرفت که در نتیجه آن، گرانول‌ها به رنگ زرد روشن مشاهده شدند (Jenkins *et al*., 2004; Gerardi, 2008).

حضور ذخایر منگنز درون غلاف باکتری‌های رشته‌ای، با به‌کارگیری محلول آبی پرمنگنات پتاسیم در لام مرطوب مطالعه شد. در این روش، ذخیره‌های منگنز به صورت گرانول‌های قهوه‌ای رنگ مشاهده می‌شوند.

مطالعه وجود ذخایر اکسید آهن در این باکتری‌ها نیز، بر روی اسمیرهای خشک شده از نمونه‌ها، انجام شد. به منظور بررسی ذخایر اکسید آهن فرو، از ترکیب هم حجم محلول‌های آبی فرو سیانید پتاسیم ۲ درصد و استیک اسید ۵ درصد به صورت داغ، و سپس رنگ‌آمیزی زمینه با محلول آبی سافرانین ۲ درصد استفاده شد. ذخایر اکسید آهن فریک نیز با همین روش، اما با جایگزینی محلول آبی فری سیانید پتاسیم ۲ درصد به جای فرو سیانید پتاسیم، مطالعه شدند (Cullimore and McCann, 1978). با این روش، ذخایر آهن فرو به رنگ آبی و ذخایر آهن فریک به صورت سبز رنگ، به شکل توده‌های نامنظم، در زمینه‌ای حاوی باکتری‌های قرمز رنگ قابل مشاهده هستند.

در بخش دیگری از این پژوهش، مطالعه باکتری‌های رشته‌ای موجود در نمونه به صورت غیر مستقیم، به روش اسلاید پنهان انجام شد که در آن، چهار سری لام با روکش نازکی از محیط‌کشت آگار-آگار با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر، حاوی یکی از مواد $FeSO_4$ با غلظت ۰/۵ میلی‌مول، $FeSO_4$ به مقدار ۱ میلی‌مول، $MnSO_4$ به میزان ۰/۵ میلی‌مول و Na_2S به غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر، تهیه شد. لام‌ها به وسیله گیره‌های چوبی درون ظروف پلاستیکی حاوی نمونه، به ارتفاع حدود ۵ سانتی‌متر معلق شد و ظرف‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط تاریکی نگهداری و در فواصل زمانی ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز، از هر مجموعه از لام‌ها، یک عدد از نمونه خارج و پس از خشک شدن، توسط رنگ‌آمیزی گرم بررسی گردید.

لازم به ذکر است که نمونه‌ها، توسط میکروسکوپ مانیتورینگ نوری Nikon مدل YS-100 و میکروسکوپ فاز متضاد Nikon مدل E200 مطالعه شد.

نتایج

بررسی اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده با رنگ‌آمیزی گرم نشان‌دهنده غلبه باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت به گرم منفی و نیز یکسان بودن تنوع باکتری‌های رشته‌ای در نمونه‌های جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف تصفیه‌خانه واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان بود.

نتایج حاصل از مشاهده لام مرطوب و انجام رنگ‌آمیزی های گرم و نایسر، همچنین بررسی گرانول‌های گوگردی و ذخایر اکسید های آهن فرو، فریک و منیزیم در باکتری‌های رشته‌ای و نیز خصوصیات ریختاری اختصاصی آنها جمع‌آوری گردید (جدول ۱) و این اطلاعات، با داده‌های موجود در جداول‌ها و کلیدهای شناسایی باکتری‌های رشته‌ای مقایسه شد. حاصل این مقایسه نشان‌دهنده غالب بودن باکتری‌های نوکاردیافرم (شکل ۱) و *Nostocodia limicola* (شکل ۲) در نمونه لجن فعال واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان بود. ضمن آن که، گونه‌های 0041 (شکل ۴)، 1701 (شکل ۵) و *Haliscomenbacter hydrosis* (شکل ۶)، با مقادیر کمتر در نمونه مربوط به این واحد تصفیه مشاهده شدند.

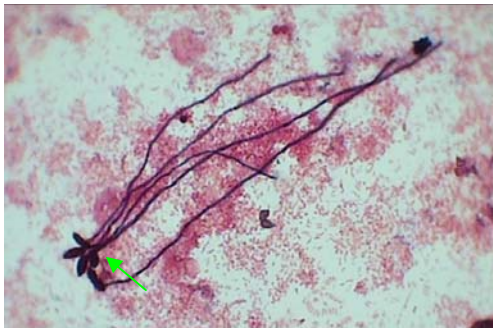
مشاهده اسلایدهای پنهان توسط رنگ‌آمیزی گرم پس از گذشت هر ۱۰ روز، علاوه بر تأیید حضور باکتری‌های رشته‌ای نام برده، غلبه انواع خاصی از این باکتری‌ها در هر مرحله از بررسی، حضور انواعی از باکتری‌های رشته‌ای که پیش از این در پساب مورد نظر مشاهده نشده‌اند و نیز وجود ساختارهای ریختی منحصر به فرد مربوط به برخی از این باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

بدین صورت که در روز دهم، غلبه *Nostocodia limicola* به فرم منحصر به فرد جوانه زننده یا زائده‌دار (شکل ۳) و در مقادیر زیاد، گونه 0041، *Thiothrix* به صورت رشته‌های نسبتاً طویل (شکل ۸) و به شکل گل مانند (شکل ۹) و نیز *Beggiatoa* به صورت رشته‌های کوتاه (شکل ۱۱) به میزان نسبتاً زیاد و باکتری‌های نوکاردیافرم، *Haliscomenbacter hydrosis* و گونه 1701 به مقدار کمتر مشاهده شد. در طبقه‌بندی‌های تبارشناسی و از لحاظ خصوصیات ژنتیکی، *Nostocodia limicola* در گروه پلانکتومایست‌های زائده‌دار قرار دارد (Fuerst, 2005)، ولی در هیچ یک از پژوهش‌های انجام شده تصویر میکروسکوپی از این باکتری به حالت زائده‌دار و به شکل جوانه زننده دیده نشد. در این پژوهش، طی مطالعات میکروسکوپی اسلاید پنهان در روز دهم برای نخستین بار زوائد این باکتری در یک انتهای رشته به وضوح مشاهده گردید (شکل ۳).

در دومین مرحله از مطالعه اسلایدهای پنهان در روز بیستم، *Nostocodia limicola* و گونه 0041 به میزان زیاد، *Haliscomenbacter hydrosis* به صورت رشته‌های بسیار طویل و با فراوانی نسبتاً بالا و باکتری‌های نوکاردیافرم، *Beggiatoa* (شکل ۱۰) و گونه 1701 در مقادیر نسبتاً کم یافت شدند.

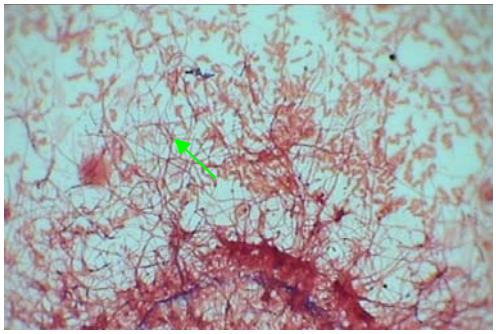
در روز سی‌ام این پژوهش نیز، همچنان فراوانی *Nostocodia limicola* در اسلایدها بالا بود. علاوه بر آن، مقادیر بسیار بالایی از *Haliscomenbacter hydrosis* به صورت کلاف‌های مو مانند (شکل ۷)، رشته‌های بسیار طویل *Thiothrix*، گونه 0041 و *Microthrix parvicella* (شکل ۱۲) که تاکنون به صورت قابل توجهی در نمونه یافت نشده بود، ملاحظه گردید. اما در چهلمین روز پژوهش، باکتری‌های رشته‌ای، تنها به صورت تجمع‌های کوچک و به مقدار بسیار اندک و پراکنده در میان لجن، درون اسلایدها مشاهده شدند (شکل‌های ۱ تا ۱۲).

شکل ۱- رشته‌های گرم مثبت و دارای انشعابات حقیقی ویژگی اکتینومیست‌های نوکاردیافرم



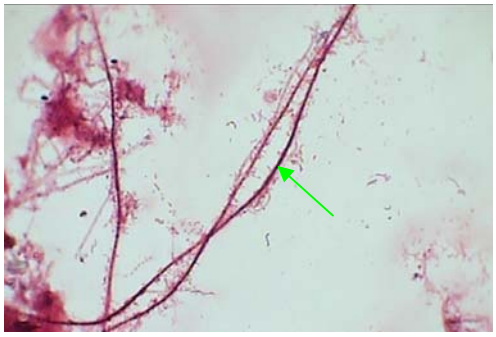
شکل ۳- شکل منحصر به فرد *Nostocodia limicola* به صورت زائده‌دار در مطالعات اسلاید پنهان

شکل ۵- رشته‌های خمیده گرم منفی و غلاف‌دار مطابق با ویژگی‌های ریختی گونه 1701

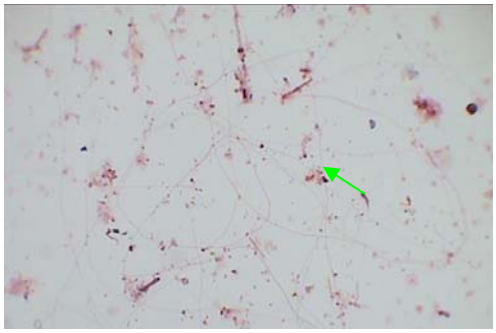


شکل ۷- رشته‌های در هم پیچیده شده و متراکم *Haliscomenbacter hydrosis* به صورت کلاف مو مانند طی مراحل انتهایی پژوهش‌های اسلاید پنهان

شکل ۲- باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت و نایسر مثبت مارپیچی مطابق با خصوصیات ریختی *Nostocodia limicola*

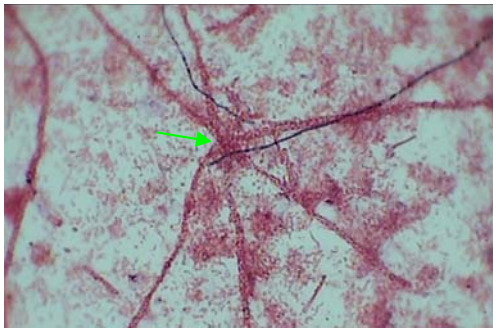


شکل ۴- باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت و غلاف‌دار با رشد اتصالی سایر باکتری‌ها به غلاف آن مربوط به گونه 0041

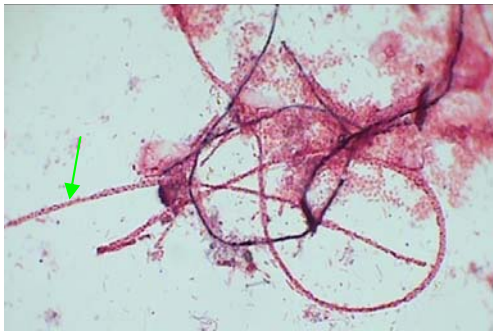


شکل ۶- ساختارهای رشته‌ای بسیار نازک مربوط به *Haliscomenbacter hydrosis* با واکنش گرم منفی و غلاف‌دار

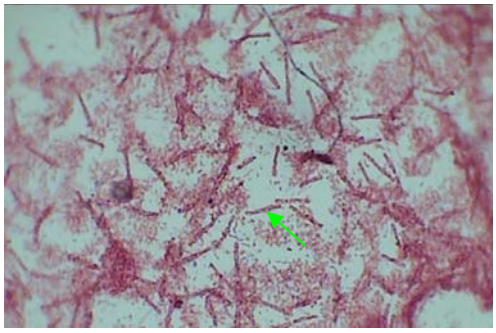
شکل ۸- رشته‌های گرم منفی و غلاف‌دار، حاوی ذخایر آهن و گرانول‌های گوگردی از خصوصیات بارز *Thiothrix*



شکل ۹- رشته‌های *Thiothrix* به شکل منحصر به فرد گل مانند در اوایل مطالعات اسلاید پنهان



شکل ۱۰- باکتری‌های رشته‌ای گرم منفی، متحرک و مارپیچی و نیز دارای ذخایر فراوان آهن و گوگرد مطابق با خصوصیات ریختی *Beggiatoa*



شکل ۱۱- رشته‌های قطور و کوتاه *Beggiatoa* به شکل کاملاً اختصاصی در مراحل ابتدایی پژوهش‌های اسلاید پنهان

شکل ۱۲- رشته‌های گرم مثبت نازک، مارپیچی و اسپاگتی شکل از اختصاصات شکل ظاهری *Microthrix parvicella*

جدول ۱- برخی خصوصیات باکتری‌های رشته‌ای حجیم‌کننده لجن در پساب پالایشگاه نفت اصفهان

نام باکتری	واکنش گرم	نایسر	غلاف	تحرک	ذخیره گوگرد	ذخیره آهن	وجود دیواره عرضی	طول رشته (mμ)	قطر رشته (mμ)	شکل سلول	دانه‌های PHB	توضیحات
نوکاردیافرم‌ها	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	۲۰-۱۰	۱	نامنظم	مثبت	انشعاب حقیقی
Nostocodia limicola	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۳۰۰-۱۰۰	۱/۴-۱/۲	مارپیچی	منفی/مثبت	تشکیل جوانه
گونه 0041	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	۵۰۰-۱۰۰	۱/۶-۱/۴	مستقیم	منفی	اتصال سایر باکتری‌ها به غلاف
گونه 1701	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	۸۰-۲۰	۰/۸-۰/۶	خمیده/مستقیم	مثبت	-
Haliscomenbacter hydrosis	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	۱۰۰-۲۰	۰/۵	مستقیم	منفی	رشته‌های بسیار نازک
Thiothrix	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	مثبت	منفی	۲۰۰-۵۰	۱/۴-۰/۸	خمیده/مستقیم	مثبت	تشکیل اجسام گل مانند
Beggiatoa	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	۵۰۰-۱۰۰	۳-۱	مارپیچی	مثبت	رشته‌های قطور
Microthrix parvicella	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	۴۰۰-۱۰۰	۰/۸	مارپیچی	مثبت	رشته‌های اسپاگتی شکل

بحث

با توجه به چگونگی عملکرد سیستم تأسیسات تصفیه پساب در واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان و چرخش پیوسته و متوالی پساب در بین بخش‌های مختلف تأسیسات تصفیه‌خانه، خصوصاً بازگشت بخشی از لجن ته‌نشین شده در زلال‌کننده‌ها به حوضچه‌های

هوادهی، یکسان بودن تنوع باکتری‌های رشته‌ای در بخش‌های مختلف تصفیه‌خانه قابل پیش‌بینی بود.

عوامل و شاخص‌های محیطی در مورد غلبه باکتری‌های رشته‌ای نام برده در لجن فعال و بروز پدیده بالکینگ توسط آنها، بسیار مؤثرند، این عوامل در پژوهش‌های بسیاری مطالعه شده‌اند. در بررسی‌هایی که توسط Gerardi (۲۰۰۸) و نیز Richard و همکاران (۲۰۰۳) به صورت جداگانه انجام شده است. وجود غلظت‌های بالایی از ترکیبات روغنی و گریس مانند و نیز، کم بودن نسبت غذا به باکتری (Food/Microorganism یا F/M)، یا به بیان دیگر، کم بودن میزان بار آلی، در پساب، در اغلب موارد موجب غلبه دسته‌ای از باکتری‌های رشته‌ای، با نام کلی باکتری‌های نوکاردیافرم می‌شود (Richard *et al.*, 2003; Gerardi, 2008). با توجه به وجود مقادیر بسیاری از ترکیبات نفتی، روغنی و گریس مانند، در پساب جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف پالایشگاه نفت اصفهان، مشاهده فراوانی بالایی از باکتری‌های نوکاردیافرم، امری قابل توجیه است که می‌تواند به نوعی بیانگر کم بودن نسبت غذا به باکتری، در پساب مورد نظر نیز باشد.

در برخی دیگر از پژوهش‌ها، باکتری *Gordonia* به عنوان یکی از اجزای اکتینومیست‌های نوکاردیافرم معرفی شده است (Shen and Young, 2005). Stringfellow و Cohen (۱۹۹۹) نیز *Gordonia* را به عنوان یکی از رین باکتری‌های رشته‌ای غالب در لجن فعال و بالکینگ پساب‌های نفتی دانسته‌اند.

Jenkins و همکاران (۱۹۹۳a)، *Nostocodia limicola* را در پساب‌هایی با غلظت‌های بالایی از انواع سولفیدها و اسیدهای آلی، از عوامل اصلی ایجاد کننده بالکینگ معرفی نموده‌اند. بنابراین، به دلیل وفور ترکیبات گوگردی در پساب‌های نفتی، حضور فراوانی زیادی از این باکتری رشته‌ای در لجن فعال تصفیه‌خانه پالایشگاه نفت اصفهان، اجتناب‌ناپذیر است. کمبود میزان نیتروژن و فسفر، به عنوان مواد غذایی اصلی، در تمامی پساب‌های صنعتی، دلیل دیگری برای غلبه *Nostocodia limicola* است که در پژوهشی توسط Andreasen و Nielsen (۱۹۹۷) بیان شده است. از آن جایی که پساب‌های نفتی، به عنوان یکی از انواع پساب‌های صنعتی، غالباً با فقر مواد مغذی نام برده مواجه‌اند، غلبه این باکتری، در پساب پالایشگاه نفت، به علت فقر در ترکیبات حاوی نیتروژن و فسفر در این پساب نیز، قابل توجیه است.

در بالکینگ این پساب، همچنین مقادیر نسبتاً قابل توجهی از گونه 0041 مشاهده شد، که با توجه به نتایج مشاهده شده توسط Strom و Jenkins (۱۹۸۴)، عامل افزایش فراوانی این باکتری، پایین بودن نسبت غذا به باکتری، یا به عبارتی میزان بار آلی کم در پساب، بیان شده است. از این رو، حضور گونه 0041 به میزان نسبتاً زیاد در بالکینگ پساب پالایشگاه، همانند وفور نوکاردیافرم‌ها، بر کم بودن نسبت F/M در این پساب دلالت می‌نماید.

وفور باکتری‌های *Haliscomenbacter hydrosis* و گونه 1701، در مطالعات Jenkins و همکاران (۱۹۹۳b)، بیانگر کمبود میزان اکسیژن محلول (Dissolved Oxigen یا DO)، در پساب است. با توجه به مشاهده مقادیر به نسبت کمتر این دو نوع باکتری، در پساب پالایشگاه، احتمالاً ضعف اندکی در سیستم هوادهی تأسیسات این تصفیه‌خانه وجود دارد، که موجب کمبود نسبی میزان اکسیژن محلول در پساب

می‌گردد.

در بخش دیگری از این پژوهش، مطالعه لجن فعال و بالکینگ پساب تصفیه‌خانه واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان، با استفاده از روش اسلاید پنهان انجام شد. در این روش مطالعه، که برای نخستین بار در جهان استفاده شده است، از سویی اطلاعاتی در مورد حضور سایر باکتری‌های رشته‌ای که با مقادیر کمتر در این پساب حاضرند و تحت شرایط محیطی دشوارتر نظیر کاهش غلظت اکسیژن محلول و افزایش غلظت ترکیبات روغنی، نفتی و گوگردی می‌توانند غالب شوند، به دست می‌آید. از سوی دیگر، قابلیت و راهکار مقاومت انواع باکتری‌های رشته‌ای در مقابله با شرایط سخت، برای بقا در این شرایط، با یکدیگر مقایسه می‌شود. از این رو باکتری‌هایی که قادر به مقاومت در چنین شرایطی باشند، می‌توانند به ترکیبات مغذی موجود بر روی اسلایدها متصل شوند و با استفاده از آنها بقا یابند و یا حتی رشد کنند.

مشاهده فراوانی بالایی از *Nostocodia limicola* در تمام مدت زمان مطالعه اسلایدهای پنهان، به‌خصوص در دهمین روز، حاکی از مقاومت بالای این باکتری در برابر شرایط سخت محیطی، به ویژه در غلظت‌های بسیار بالای ترکیبات گوگردی و اسیدهای آلی است (Jenkins *et al*., 1993a). ضمن آن که بروز شکل جوانه زننده این باکتری در دهمین روز بررسی را نیز می‌توان مکانیسمی برای غلبه بر این شرایط دشوار دانست.

پیدایش مقادیر نسبتاً بالایی از باکتری‌های *Beggiatoa* و *Thiothrix*، که در بررسی میکروسکوپی مستقیم نمونه، به ندرت دیده شده بودند، در این اسلایدها، به ویژه در روز سی‌ام، قابلیت بالای بقای آنها، خصوصاً در وفور ترکیبات گوگردی را نشان می‌دهد، که پژوهش‌های صورت گرفته توسط Williams و Unz (۱۹۸۵) نیز، غلبه آنها، در مقادیر بالای ترکیبات گوگردی در پساب را بیان می‌نماید. افزایش چشمگیر میزان *Haliscomenbacter hydrosis* در کل مدت مطالعه نیز مؤید توان غلبه این باکتری، به‌خصوص در غلظت بسیار پایین اکسیژن محلول است (Jenkins *et al*., 1993b).

در مورد *Microthrix parvicella* که در بررسی مستقیم نمونه پساب مشاهده نشد، اما در اسلایدهای پنهان، خصوصاً در مراحل انتهایی پژوهش به وفور مشاهده شد، Richards (۲۰۰۳) توانایی این باکتری برای بقا در شرایط سخت، به ویژه در غلظت‌های زیاد ترکیبات روغنی، همچنین، نسبت غذا به باکتری پایین و نیز در لجن فعال با سن طولانی (Long Sludge Age) را عامل غلبه *Microthrix parvicella* دانسته است.

تکرار این آزمایش‌ها و مشاهده نتایج مشابه نشان داد که افزایش زمان ماند و نیز زمان ماند هیدرولیکی در این تأسیسات تصفیه پساب می‌تواند به غالب شدن سویه‌های مذکور منجر شود.

نتیجه‌گیری

آن چه از مطالعات میکروسکوپی فراوانی نسبی باکتری‌های رشته‌ای بالکینگ تصفیه‌خانه واحد بازیافت آب پالایشگاه نفت اصفهان، به صورت مستقیم و غیر مستقیم، از طریق روش اسلاید پنهان به دست آمد، از سویی نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های بسیار در جمعیت و تنوع باکتری‌های رشته‌ای موجود در پساب پالایشگاه نفت اصفهان، به عنوان یک پساب صنعتی و پساب‌های شهری و انسانی است. از سوی دیگر، بیانگر وجود

ارتباط مستقیم میان ترکیبات موجود در پساب، شرایط و شاخص‌های حاکم بر تأسیسات تصفیه‌خانه با انواع باکتری‌های رشته‌ای غالب در نمونه است.

هر چند تشخیص و شناسایی این باکتری‌ها، در اکثر موارد با تلاش برای تهیه کشت خالص از این باکتری‌ها، استفاده از روش‌های گوناگون از جمله روش‌های میکروسکوپی و نیز تکمیل و تأیید این شناسایی از طریق روش‌های مولکولی نظیر PCR (Polymerase Chain Reaction)، FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) و DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) صورت می‌پذیرد، اما به دلیل غیر قابل کشت بودن برخی از این باکتری‌ها، با تشکیل کتابخانه ژنومی می‌توان ژنوم آنها را تکثیر کرده و از این طریق، آنها را از جنبه مولکولی شناسایی کرد. بنابراین، با شناسایی این باکتری‌ها، تا حدود زیادی می‌توان به ویژگی‌ها و شاخص‌های دخیل در فرآیند تصفیه پی برد و از این طریق، با بررسی دقیق‌تر و عملی‌تر ارتباط میان آنها، با روش‌های مناسب‌تر برای ممانعت، کنترل و مهار بروز پدیده بالکینگ در فرآیند تصفیه این پساب دست یافت. ضمن آن که می‌توان بهترین راه برای جلوگیری از رشد این گونه باکتری‌ها را، حذف هر چه بیشتر ترکیبات نفتی و گریس مانند از پساب ورودی به تأسیسات تصفیه‌خانه پالایشگاه، از طریق احداث یک حوضچه انتخابگر (selector) دانست.

تشکر و قدردانی

از همکاری و تلاش مسؤولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، به ویژه کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی این واحد، سرکار خانم شادی شاهسار و نیز کارکنان بخش تحقیق و توسعه پالایشگاه نفت اصفهان، به خصوص مهندس محمود طاهری و مهندس عباس هدایتی، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

امتیازی، گ. (۱۳۷۹) میکروبیولوژی و کنترل آلودگی آب هوا و پساب. انتشارات مانی، اصفهان.

بدلیانس قلی کندی، گ. (۱۳۸۲) میکروبیولوژی کاربردی آب و فاضلاب. چاپ دوم، انتشارات آییژ، تهران.

غفاری، ق. (۱۳۸۸) تصفیه فاضلاب صنعتی پالایشگاه اصفهان. واحد بازیافت آب، اداره آموزش پالایشگاه نفت اصفهان، اصفهان.

Andreasen, K. and Nielsen, P. H. (1997) Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology 63: 3662-3668.

Bitton, G. (2005) Wastewater microbiology. 3nd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Cullimore, D. R. and McCann, A. E. (1978) The identification, cultivation and control of iron bacteria in ground water. Aquatic Microbiology 6: 219-261.

Eikelboom, D. H. (1982) Biosorption and prevention of bulking sludge by means of high floc loading. In: Bulking of activated sludge: preventative and remedial method (eds. Chambers, B. and Tomlinson, E. J.) Halsted Press, New York.

Fuerst, J. A. (2005) Intracellular compartmentation in Planctomycetes. Annual Review of Microbiology

59: 299-328.

Gerardi, M. H. (2006) Wastewater bacteria. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Gerardi, M. H. (2008) Microscopic examination of the activated sludge process. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. (1993a) Causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2nd ed., Lewis Publishers, Boca Raton.

Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. T. (1993b) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. Lewis Publishers, Inc., Chelsea.

Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. T. (2004) Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems. 3nd ed., IWA Publishing, London.

Jenkins, D., Richard, M. G. and Neethling, J. B. (1984) Causes and control of activated sludge bulking. Water Pollution Control 84: 455-472.

Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M. and Wagner, M. (2000) Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. Applied and Environmental Microbiology 66: 5043-5052.

Liao, J., Lou, I. and Reyes, F. L. d. l. (2004) Relationship of species-specific filament levels to filamentous bulking in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology 70: 2420-2428.

Louvet, J. N., Attik, G., Dumas, D., Potier, O. and Pons, M. N. (2011) Simultaneous gram and viability staining on activated sludge exposed to erythromycin: 3D CLSM time-lapse imaging of bacterial disintegration. International Journal of Hygiene and Environmental Health 214(6):470-477.

Richard, M., Brown, S. and Collins, F. (2003) Activated sludge microbiology problems and their control. 20th Annual USEPA national operator trainers conference, Buffalo, New York.

Richards, A. (2003) Effects of detergent use on water quality in Kathmandu, Nepal. Ms.C. Thesis, Cornell University, Massachusetts, USA.

Shen, F. T. and Young, C. C. (2005) Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus *Gordonia* by 16S rRNA gene targeted genus specific primers. FEMS Microbiology Letters 250: 221-227.

Speirs, L., Nittami, T., McIlroy, S., Schroeder, S. and Seviour, R. J. (2009) Filamentous Bacterium Eikelboom type 0092 in activated sludge plants in Australia is a member of the phylum *Chloroflexi*. Applied and Environmental Microbiology 75: 2446-2452.

Stringfellow, W. T. and Cohen, L. A. (1999) Evaluation the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. Elsevier Science Ltd. 33: 2535-2544.

Strom, P. F. and Jenkins, D. (1984) Identification and significance of filamentous microorganisms in activated sludge. Water Pollution Control Federation 56: 449-459.

Williams, T. M. and Unz, R. F. (1985) Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa* and Eikelboom type 021N strains. Applied and Environmental Microbiology 49: 887-898.

Yuanhao Zhao, B. E. (2012) Detection and analysis of sludge bulking events using data mining and machine learning approach. Ms.C. Thesis, Marquette University, Milwaukee, Wisconsin.

Microscopic detection of dominant bulking producing filamentous bacteria in Isfahan oil refinery water recycling unit plant by the buried slide technique

Mona Hosseini rad [1], Giti Emtiazi [2], Zarrindokht Emami *[1] and Ghasem Ghaffari [3]

[1] Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[3] Reverse Osmosis Unit, Isfahan Oil Refinerying Company, Isfahan, Iran

Abstract

Bulking is the floation of sludge flocculent due to excessive growth of filamentous or non filamentous microorganisms in the process of wastewater treatment that can lead to further deterioration of treatment process and effluent quality. Nocardiaforms and *Beggiatoa* build-up are due to presence of excess oil component and sulfur in the system, respectively. Hence by identifying the main cause of bulking bacteria, we can recognize its formation and finding solutions to specific bulking control. This study was carried out to identify the main microorganisms responsible for the bulking at Isfahan oil refinery water recycling unite by using microscopical methods and buried (or contact) slide technique. Buried slide is a useful technique to analyze environmental samples in which a microscope slide is embedded in an expected sample. The contact slide method might have a bias toward selective colonization by using specific thin agar cover on the slide. By microscopic studying of different slides, identification of filamentous bacteria was carried out based on morphological characteristics and their reaction to different staining. Dominant filamentous bacteria were identified as nocardioforms actinomycete and *Nostocoida limicola. Nostocoida limicola* belongs to the genetic category of the budding Planctomycete. For the first time, the budding formations of these bacteria were clearly seen in contact slides in this study. Furthermore some relationships were found between the dominance of these bacteria and the conditions of the wastewater treatment plant, which based on them, the methods to specific bulking control could be obtained.

Key words: Buried slide, Filamentous bulking, Isfahan oil refinery, Microscopical method, Nocardioforms, *Nostocodia limicola*

* emami@iaufala.ac.ir