

شناسایی منشأ و سازوکار ترش شدگی میادین نفتی اسفند، سیوند و دنا در حوضه خلیج فارس با استفاده از روش های میکروبی، استخراج DNA و شناسایی مولکولی

محمد صادقی^۱، مرتضی طبائی^۱، بهنام راسخ^۲، محمد رضا کمالی^۳^۱ گروه اکتشاف معدن، دانشکده مهندسی معدن، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران^۲ پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران^۳ دانشکده مهندسی، دانشگاه ECU استرالیا، غربی، استرالیا

چکیده

هدف از این پژوهش، مطالعات میکروبیولوژی و ژئوشیمیایی روی نمونه های خروجی، ورودی آب دریا و آب تزریقی به میدان های سیوند (SIC C)، دنا (SIC D) و اسفند (SIC E) واقع در منطقه عملیاتی جزیره سیری از توابع شرکت نفت فلات قاره ایران در سکوها نصر و ایلام، شناسایی منشأ گاز سولفید هیدروژن است. از این رو، جهت پی بردن به منشأ ترش شدگی میادین نفتی جزیره سیری، پس از بررسی و مطالعات اولیه و کتابخانه ای و همچنین مشخصات مخزنی، تاریخچه تزریق و تولید میادین، محتمل ترین فرضیه ترش شدگی در این میادین می تواند ناشی از فرایندهای احیای باکتریایی سولفات ها باشد، از این رو، برای اثبات فرضیه، محیط های کشت مورد نیاز رشد باکتری های احیا کننده سولفات تهیه گردید و پس از نمونه برداری میدانی، برخی آزمایش های میکروبیولوژی روی نمونه ها صورت گرفت، از آنجا که در مشاهدات اولیه نمونه برداری، تغییر رنگ نمونه ها از صورتی به سیاه آشکارا گویای آن بود که در نمونه ها، باکتری های احیا کننده سولفات وجود دارند، بدین منظور، روی نمونه های آلوده، فرایند استخراج DNA صورت گرفت و در مرحله تکمیلی، نمونه ها جهت ارزیابی های مولکولی وارد فاز شناسایی مولکولی گردیدند که خروجی نتایج، باکتری ای که بیشترین فراوانی (حدود ۸۱ درصد) را داشته است، باکتری دسولفوویبریو هست که توانایی بسیار بالایی در مصرف هیدروژن در مخازن نفتی را دارد و آنها را به گاز سولفید هیدروژن که همانا منجر به ترش شدگی مخازن نفتی می شود تبدیل می کند. بنابراین، فرضیه اولیه تحقیق که عامل اصلی ترش شدگی میادین نفتی منطقه مورد مطالعه در جزیره سیری، فرایندهای مربوط به باکتری های احیا کننده سولفات که باکتری دسولفوویبریو در آن نقش بسزایی بازی می کند به اثبات می رسد.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

کلیدواژه ها:

باکتری های احیا کننده سولفات

ترش شدگی

گاز سولفید هیدروژن (H₂S)

جزیره سیری

میدان نفتی اسفند، سیوند و دنا

استخراج دی ان ای

شناسایی مولکولی

دسولفوویبریو

۱- پیش نوشتار

هزینه فرایند پالایش و تصفیه نفت می شود (Evans and Dunsmore, 2006). با توجه به روند افزایشی میزان گاز سولفید هیدروژن در مخازن میادین نفتی حوضه خلیج فارس و ایجاد مشکلات فراوان، بررسی منشأ و مکانیسم تولید این گاز در جهت جلوگیری از این روند افزایشی در کلیه میادین حوضه خلیج فارس امری ضروری است.

با توجه به این که با ردیابی علل و منشأ سولفید هیدروژن می توان ریسک اکتشاف و تولید را با روند بهینه سرمایه گذاری کاهش داد، کشور ایران نیز به عنوان یکی از تولیدکنندگان عمده نفت و گاز در جهان، با مشکلات ناشی از گاز H₂S در صنعت نفت و گاز مواجه است؛ بنابراین، مطالعه در خصوص مکانیسم و نحوه ایجاد گاز H₂S در مخازن نفت و گاز می تواند متخصصان این صنعت را در کنترل کاهش اثرات منفی و در نتیجه، هزینه های ناشی از آن یاری رساند.

یکی از مهم ترین چالش های صنعت نفت و گاز در جهان، مشکلات ناشی از گاز سولفید هیدروژن (ترش شدگی) است. جدا از خطراتی که این گاز به دلیل سمی بودن برای کارکنان این صنعت ایجاد می کند، به دلیل خاصیت خوردگی، هزینه های زیادی را چه در بخش بالادستی و چه در بخش پایین دستی به صنعت نفت و گاز در جهان تحمیل می نماید و از کیفیت هیدروکربورها می کاهد. ارزیابی ژئوشیمیایی مخزن جهت تعیین منشأ سولفید هیدروژن در طول دوران تولید و تزریق آب، موضوعی است با اهمیت که با بررسی ویژگی های مخزنی در جهت مدیریت مخازن صورت می گیرد.

میزان گاز سولفید هیدروژن (H₂S) در مخازن نفتی تا ۳ PPM (Part Per Mil) بدون زیان هست و جزئی از فاز گازی به شمار می رود ولی بیشتر از این مقدار زیان آور است. وجود ترکیبات گوگردار در نفت باعث پایین آمدن ارزش اقتصادی و افزایش

تزریقی بوده، در میدان اسفند چهار حلقه چاه تولیدی در سکوی ایلام ۱ قرار دارد و شش چاه تزریقی آب نیز در حال فعالیت است، ضمن آن که در سکوی ایلام ۲، سه چاه تولیدی و در ایلام ۳، پنج حلقه چاه تولیدی همراه با سه چاه تزریقی وجود دارد.

۴- میدان نفتی سیوند و دنا

میدان نفتی سیوند، از میدان‌های نفتی ایران در خلیج فارس است که در استان هرمزگان، در فاصله ۵۰ کیلومتری باختر جزیره سیری واقع شده است. میدان نفتی سیوند (سیری C) در فاصله ۳۴ کیلومتری باختر جزیره سیری به طرف شمال باختری آن واقع در خلیج فارس است و حدود ۱۰۰ کیلومتر بالای خط مرزی قرار دارد. این میدان شامل دو سکوی حفاری فراساحلی و ۱۱ حلقه چاه افقی تولیدی است (برگرفته از سایت شرکت ملی نفت فلات قاره ایران www.iooc.co.ir).

میدان سیوند با ۱۸ حلقه چاه و میدان دنا (سیری دی) با ۲۴ حلقه چاه در باختر جزیره سیری قرار دارند.

۵- زمین‌شناسی میدان نفتی سیوند

ساختمان میدان نفتی سیوند (سیری C) در سال ۱۹۶۷ طی یک سری عملیات لرزه‌نگاری توسط شرکت سوفیران شناخته شد و اکتشاف آن در مراحل بعدی تکمیل گردید (Lake, 2006). این ساختمان به صورت یک طاق‌دیس گنبدی شکل (Antiformal Anticline) هست. طول آن حدود ۱۵.۷ km و عرض آن ۶ km بوده و مساحتی معادل ۹۶ km² را داراست. اولین حلقه چاه اکتشافی این میدان، چاه (SIC-1) است که در سال ۱۹۷۳ حفاری و در لایه سروک به نفت برخورد نمود (Lucia, 2012)، در این میدان، بخش بالایی سازند سروک (بخش میشریف) دارای ویژگی‌های مخزنی است.

تخلخل و تراوایی میانگین به ترتیب ۰.۳۲٪ و ۴۰ میلی داری است. میشریف در میدان مورد مطالعه دارای ستبرای متغیری از ۲۸ تا ۵۲ متر است. در ناحیه شمالی میدان سیری C (سیوند) میشریف دارای بیشترین ستبرای بوده و در قسمت جنوب باختری نازک می‌شود (MacBeth et al., 2005).

از آنجا که افزایش میزان سولفید هیدروژن در مخازن تحت تزریق آب عمدتاً در نتیجه فعالیت میکروبی یا SRB است، لازم است با بررسی تاریخچه تزریق آب در فرایند سیلاب‌زنی به میدان موردنظر، سعی در بررسی و آنالیز میکروبی نمونه‌های تهیه شده گردد تا بتوان به منشأ تولید سولفید هیدروژن در میدان مورد مطالعه پی برد.

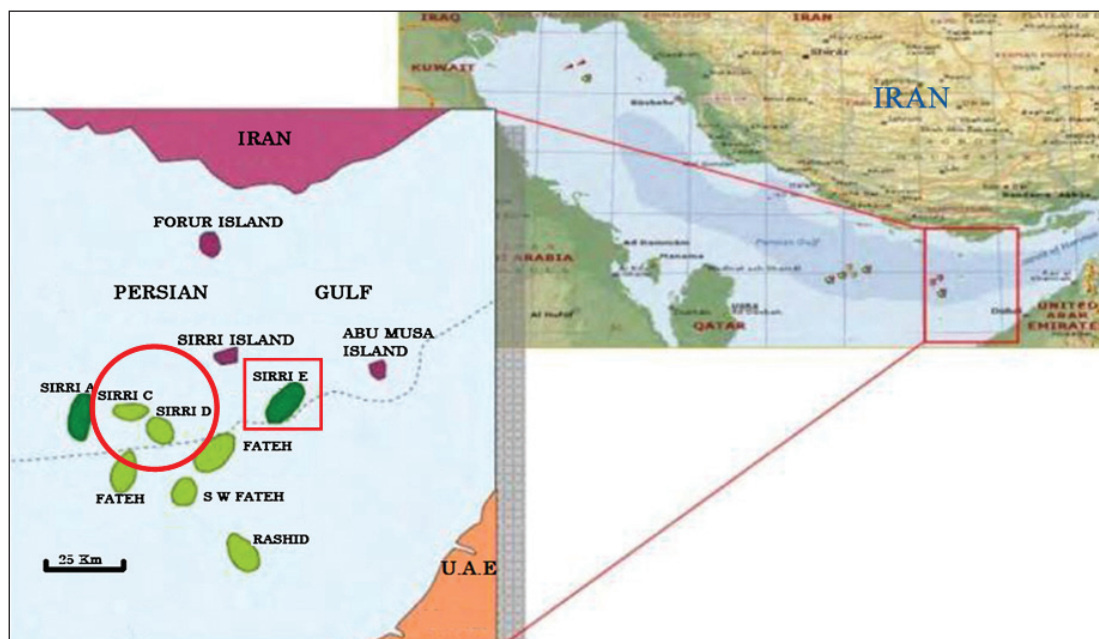
هدف از این پژوهش، شناسایی منشأ ایجاد گاز سولفید هیدروژن است که با مطالعات میکروبیولوژی و ژئوشیمیایی روی نمونه‌های خروجی، ورودی آب دریا و آب تزریقی به میدان‌های سیوند (SIC C)، دنا (SIC D) و اسفند (SIC E) واقع در منطقه عملیاتی جزیره سیری از توابع شرکت نفت فلات قاره ایران در سکوه‌های نصر و ایلام انجام می‌گردد.

۲- موقعیت میدان مورد مطالعه

جزیره سیری در حدود ۷۲ کیلومتری خط ساحلی ایران در جنوب بندر لنگه و ۴۰ کیلومتری باختر جزیره ابوموسی واقع شده است، این جزیره ۱۸ کیلومتر مربع وسعت دارد، طول تقریبی جزیره ۵/۶ کیلومتر و عرض آن حدود ۳ کیلومتر است و موقعیت آن در ۲۷° ۲۵' عرض جغرافیایی و ۳۲° ۵۴' طول جغرافیایی خاوری است. با اکتشاف نفت در خلیج فارس و فعال شدن شرکت نفتی سوفیران در این جزیره، نخستین بار استخراج نفت در این منطقه نفتی در سال ۱۳۵۵ آغاز شد. میدان نفتی منطقه سیری شامل میدان الوند، میدان مشترک نصرت، میدان اسفند، میدان سیوند و دنا می‌باشد (شکل ۱) نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش از ۳ میدان نفتی اسفند (سیری E (SID E))، سیوند (سیری C (SID C)) و دنا (سیری D (SID D)) تهیه شده است.

۳- میدان نفتی اسفند

میدان نفتی اسفند از میدان‌های نفتی ایران است که در جنوبی‌ترین نقطه ایرانی خلیج فارس در ۱۸ کیلومتری جنوب خاوری جزیره سیری بالای خط مرزی واقع شده و فاصله آن تا ساحل ایران حدود ۹۰ کیلومتر است. این میدان در سال ۱۹۶۹ کشف و در سال ۱۹۷۰ به بهره‌برداری رسید. میدان نفتی اسفند دارای ۲۹ حلقه چاه تولیدی و



شکل ۱- نقشه موقعیت جغرافیایی میدان نفتی اسفند (سیری E)، سیوند (سیری C) و دنا (سیری D) واقع در جزیره سیری خلیج فارس (Ghazban, 2007).

۶- بررسی علل تولید گاز سولفید هیدروژن در میادین نفتی

چندین مکانیسم در خصوص ایجاد سولفید هیدروژن در مقیاس زمان زمین‌شناسی و یا در کوتاه‌مدت (در طول عمر تولید از یک مخزن) پیشنهاد شده است، این عوامل که وابستگی زیادی به ویژگی‌های مخزن و دمای آن دارند (Sunde et al., 2004). عبارتند از:

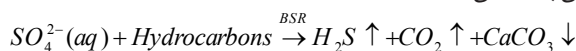
- ۱- احیاء ترموشیمیایی سولفات‌ها (Thermochemical Sulfate Reduction: TSR) توسط گازهای هیدروکربنی (TSR) در دمای بالای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد.
- ۲- تجزیه ترکیبات آلی سولفوردار در دمای بالای ۱۷۵ درجه سانتی‌گراد.
- ۳- تجزیه احیایی فاز کانی سولفیدی مثل منوسولفید آهن FeS یا پیریت FeS₂.
- ۴- احیاء باکتریایی سولفات محلول (Bacterial Sulfate Reduction: BSR) در دمای پایین‌تر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد.

از آنجا که دو پارامتر دما و عمق مخزن نفتی که از ویژگی‌های احیاء ترموشیمیایی سولفات‌ها (TSR) و تجزیه ترکیبات آلی سولفوردار جهت منشأ تولید گاز هیدروژن می‌باشند، و با ویژگی‌های دما و عمق مخزن میادین مورد مطالعه ما (دما و عمق کم فلات قاره) متفاوت می‌باشند، بنابراین، دو مورد اول و دوم نمی‌توانند جهت یافتن منشأ تولید گاز هیدروژن سولفید مفید واقع شوند و همچنین به دلیل عدم مشاهده شواهدی که به حضور کانی‌های سولفیدی نظیر پیریت در منطقه مورد مطالعه بیانجامد (Ghazban, 2007) نیز می‌توان نتیجه گرفت که فرایند احیاء کانی‌های سولفیدی نظیر پیریت نیز نمی‌تواند منشأ تولید گاز سولفید هیدروژن در منطقه مورد مطالعه باشد بنابراین، به بررسی فرایند احیاء باکتریایی سولفات که با ویژگی‌های مخزنی میادین مورد مطالعه سازگاری بیشتری دارد، پرداخته می‌شود.

۷- فرایند احیاء باکتریایی سولفات (Sulfate Reduction Bacterial: SRB)

باکتری‌های احیاءکننده سولفات، گروهی از باکتری‌های بی‌هوازی مقاوم بوده که از سولفات به‌عنوان اصلی‌ترین گیرنده الکترون، در اکسیداسیون بی‌هوازی مواد اولیه آلی استفاده می‌نمایند. بخشی از سولفورهای احیاء شده توسط ارگانیس‌ها جهت سنتز سلولی جذب می‌شوند، اما بخش عمده آنها به فرم یون سولفید در محیط آزاد می‌گردد (Postgate, 1979).

فرایند احیاء باکتریایی سولفات، غالباً در مخازن سطحی و در دماهای پایین (کمتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد) رخ می‌دهد. در این مکانیسم، سولفات مورد نیاز باکتری‌ها می‌تواند از آب همزاد، انحلال‌اندیریت، تزریق آب دریا و یا احیاء پیریت توسط آب تزریقی تأمین شود. این فرایند توسط باکتری‌های اتوتروفیک انجام می‌گیرد. مکانیسم SRB در مخازن دارای کلاهک گازی هم که به دلیل افت فشار تحت روش ازدیاد برداشت از نوع تزریق آب قرار گرفته‌اند نیز مشاهده شده است (Jia et al., 2018). در روش تزریق آب (سیلاب زنی)، آب از طریق چاه‌های تزریق به داخل مخازن هیدروکربنی پمپاژ می‌شود تا ضمن بهینه نمودن فشار مخزن، نفت خام به سمت چاه‌های تولیدی رانده شود. آب مصرفی به دلیل حجم زیاد و قابلیت دسترسی، از آب دریا تأمین می‌شود که حاوی انواع میکروارگانیس‌هاست و می‌تواند در افزایش غیرمنتظره سولفید هیدروژن پس از چند سال بهره‌برداری، در محدوده‌های متفاوت دخالت داشته باشد. در اثر این مکانیسم، سولفات محلول در آب سازندی توسط این باکتری‌ها احیاء شده و به‌صورت سولفید هیدروژن آزاد می‌گردد. این فرایند یکی از منابع اصلی تولید گاز H₂S در رسوبات کم‌عمق و جوان از لحاظ سن زمین‌شناسی به‌شمار می‌رود (Chen et al., 2009).



۸- ترش‌شدگی و تزریق آب در فرایند سیلاب‌زنی

ترش‌شدگی مخازن نفتی یکی از جدی‌ترین مسائل در صنعت نفت طی سال‌های اخیر است. به‌ویژه زمانی که پروژه سیلاب زنی جهت جبران افت فشار مخزن و تولید

نفت با تزریق آب دریا به درون سازند نفتی انجام می‌گردد. پس از مدت کوتاهی از تزریق آب به داخل مخزن میزان قابل‌توجهی سولفید هیدروژن تولید می‌شود (Frazer and Bolling, 1991; Burger et al., 1992).

محتمل‌ترین دلیل ترش‌شدگی مخازن نفتی، رشد و فعالیت باکتری‌های احیاءکننده سولفات (SRB) در زون اختلاط آب دریا که به مخزن تزریق شده و آب سازندی موجود در مخزن است. مجموع هزینه‌ها و خسارات ناشی از خوردگی مرتبط با باکتری‌های احیاءکننده سولفات به‌طور متوسط حدود ۱ تا ۲ میلیارد دلار در سال تنها در آمریکا است (Mueller and Nielsen, 1996).

رسوب سولفید آهن بی‌شکل (آمورف) و تولید پلی سا کاربرد توسط باکتری‌های احیاءکننده سولفات و یا سایر میکروارگانیس‌ها در سازندها موجب انسداد خلل و فرج شده و تأثیر چاه‌های تزریق آب را در افزایش تولید هیدروکربن کاهش می‌دهد (Lappan and Fogler, 1992). مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که بیشترین فرایند ترش‌شدگی در زون‌های مخلوط (سطح تماس آب-نفت)، جایی که آب تزریقی، آب سازندی و هیدروکربن با یکدیگر اختلاط می‌یابند، دیده می‌شود. در این ناحیه، مواد مورد نیاز رشد باکتری‌های احیاءکننده سولفات نظیر الکترون دهنده‌هایی مانند برخی ترکیبات ارگانیکی یا هیدروژن و الکترون گیرنده‌هایی مانند سولفات و همچنین مواد غذایی اصلی مانند نیتروژن، فسفات وجود دارند (Herbert et al., 1985). زون اختلاط شامل غلظت زیادی از یون سولفات حاصل از آب دریا و ترکیبات آلی قابل‌حل موجود در آب سازندی است. اگر شرایط مورد نیاز شیمیایی و فیزیکی در یک محیط بی‌هوازی به وجود آیند، باکتری‌ها فعال شده و سبب تولید سولفید هیدروژن می‌گردند.

۹- پیشروی فرایند ترش‌شدگی در میادین تحت عملیات سیلاب‌زنی

چاه‌های نفت معمولاً در مدت‌زمان برداشت اولیه شیرین بوده ولی زمانی که عملیات تزریق آب به اجرا درمی‌آید، پدیده ترش‌شدگی ابتدا در تعداد اندکی از چاه‌ها مشاهده شده اما پس از مدتی، فرایند ترش‌شدگی در سرتاسر مخزن انتشار می‌یابد. هیل و همکاران (Hill et al., 1990)، تاریخچه میدان نفتی Kuparuk در دریای شمال را که به‌تدریج ترش می‌شد را مورد بررسی قرار دادند. این میدان در ابتدای تولید شیرین بوده اما پنج سال بعد، بعد از عملیات سیلاب‌زنی، سولفید هیدروژن با ماکزیمم غلظت ۴۰ ppm در گاز تولیدی متعلق به ۵ چاه مشاهده شد. پنج سال پس‌از این حادثه، در بیش از ۲۰۰ چاه حضور سولفید هیدروژن در گاز تولیدی ثبت گردید که در ۵۰ چاه تولیدی، غلظت سولفید هیدروژن به بیش از ۱۰۰ ppm می‌رسید. هنگامی که مواد غذایی مورد نیاز فعالیت باکتریایی در آب تزریقی موجود باشد، تولید سولفید هیدروژن بیانگر فعالیت متابولیسمی باکتری‌های احیاءکننده سولفات در مخزن هست. در فرایند سیلاب زنی مخلوط شدن آب دریا که معمولاً حاوی غلظت‌های بالا سولفات (حدود ۲۸۰۰ ppm) با آب سازندی مخزن که حاوی اسیدهای ارگانیکی است، محیطی را فراهم می‌کند که ترکیبات اصلی مورد نیاز رشد باکتری را در بردارد. مطالعات جریانات برگشتی چاه تزریقی نشان می‌دهد که غلظت و فعالیت باکتری‌های احیاءکننده سولفات در اطراف چاه تزریقی بالاست و با افزایش فاصله از چاه تزریقی کاهش می‌یابد (Taylor et al., 1991). با این‌حال، پژوهشگران نتایج معکوسی را برای غلظت سولفید هیدروژن گزارش نمودند به‌طوری که غلظت سولفید هیدروژن در برخی نقاط سازند حدود هفت برابر غلظت معمول آن در داخل سازند بوده است. این نکته نشان می‌دهد که فعالیت باکتری‌های احیاءکننده سولفات می‌تواند در سرتاسر مخزن اتفاق افتد و در نقاطی از مخزن دارای شدت بیشتری باشد. این مطلب توسط هربرت و همکاران (Herbert et al., 1985)، فردی که تأثیر نسبت‌های مختلف آب سازندی و آب دریا را در ارتباط با تولید سولفید هیدروژن تحقیق می‌کرد، نیز مورد تأیید قرار گرفت. مجموعه باکتری‌های احیاءکننده سولفات

۱۱- بحث

۱۱-۱- شرح مراحل انجام کار آزمایشگاهی و نمونه‌برداری میدانی

الف) آماده‌سازی محیط کشت رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات

پیش از نمونه‌برداری میدانی لازم است که محیط کشت موردنیاز جهت رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات در محیط آزمایشگاهی تهیه گردد. به این منظور، چندین محیط کشت با غلظت‌های متفاوت برای رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات فراهم گردید که طبق استاندارد انجمن ملی مهندسان خوردگی (NACE: National Association of Corrosion Engineers) در جدول ۱ در صورتی که یک لیتر آب دریا که غلظت املاح آن یک برابر باشد با مواد جدول ۱ ترکیب گردد و pH آن 7.3 باشد، این محیط، شرایط لازم برای رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات را فراهم می‌کند.

جدول ۲ ترکیبات آب خلیج فارس را نشان می‌دهد. بدین منظور اگر در شرایط آزمایشگاهی آب خلیج فارس جهت آماده‌سازی محیط لازم برای کشت باکتری‌های SRB موجود نباشد، می‌توان ترکیبات جدول ۲ را به یک لیتر آب مقطر اضافه کرد تا همان غلظت مربوط به شوری آب خلیج فارس به دست آید. به بیان دیگر، اگر یک لیتر آب مقطر در دسترس باشد، لازم است که ترکیبات طبق استاندارد انجمن ملی مهندسان خوردگی (NACE) در جدول ۱ در صورتی که یک لیتر آب دریا که غلظت املاح آن یک برابر باشد، با مواد موجود در جدول ۲ ترکیب گردد و pH آن 7.3 تنظیم گردد. شرایط لازم برای رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات فراهم می‌شود.

لازم به یادآوری است که آنالیز فیزیکی‌وشیمیایی مکانی که می‌خواهد از آنجا نمونه تهیه گردد را از قبل باید دانست و برای آن باید محیط کشت در آزمایشگاه تهیه گردد، مثلاً در مورد نمونه‌برداری از آب خلیج فارس باید میزان املاح یا نمک آن را بدانیم که 38000 - 40000 mg/Lit یعنی حدود ۴ درصد (۴ گرم در ۱۰۰ سی‌سی) باید به نمونه‌ها نمک اضافه گردد.

برای آن که بتوان ردیابی بهتری از باکتری‌های احیاکننده سولفات در طول مسیر لوله‌های انتقال نفت از سکوها تولیدی به منطقه عملیاتی سیری داشت، لازم می‌بود که طراحی الگوی نمونه‌برداری بدین صورت باشد که بخشی از نمونه‌ها از مرحله مکش از دریا، برخی در مرحله میانی و بخشی هم در مرحله آخر نمونه‌برداری گردد، از آنجایی که ممکن است باکتری‌های احیاکننده سولفات در غلظت‌های متفاوت از شوری آب دریا خودشان را نشان دهند، بدین منظور محیط‌های کشت در سه غلظت متفاوت تهیه گردید، محیط کشت با ۴ برابر غلظت شوری آب دریا (SW-4X= four) متفاوت تهیه گردید، یک برابر غلظت شوری آب دریا (استفاده از آب مقطر) (DW-1X= one time the salinity of distilled water) و تهیه محیط کشت با تنها ۱۰ درصد غلظت شوری آب دریا.

کشت‌شده در مطالعه هربرت از آب دریای شمال تفکیک شدند، آب دریا و یا آب سازندی به‌تنهایی به رشد و فعالیت باکتری‌های احیاکننده سولفات کمک نکرده اما زمانی که این نوع آب در نسبت‌های مختلف باهم ترکیب شوند، می‌تواند مقادیر قابل‌توجهی سولفید هیدروژن تولید شود. تولید H_2S می‌تواند توسط محدودیت در منبع کربن آلی مورد نیاز باکتری‌ها (۲۵ درصد آب سازند افزون بر ۷۵ درصد آب دریا) و یا توسط محدودیت در منبع سولفات (۷۵ درصد آب سازند افزون بر ۲۵ درصد آب دریا) کنترل شود. این یافته‌ها درک بهتری از پدیده ترش‌شدگی در نواحی مخلوط، جایی که آب تزریقی با آب سازندی و نفت مخلوط می‌شود، فراهم می‌کند (Frazer and Bolling, 1991; Burger et al., 1992). این زون مخلوط همراه با حرکت جبهه آب تزریقی جابه‌جا شده و همزمان با جابه‌جایی به سمت چاه تولیدی، درجه حرارت آن افزایش می‌یابد.

۱۰- شرایط مورد نیاز جهت رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات

مخزن نفت محیط پیچیده‌ای است که باکتری‌های SRB در سرتاسر سیستم داخلی آن یافت می‌شود. باکتری‌های احیاکننده سولفات در شرایط بسیار سخت مخزن مانند حرارت، فشار و شوری بالا حضور داشته و به رشد و فعالیت می‌پردازند (Rosnes et al., 1991 a, b).

باکتری‌های احیاکننده سولفات در یک محیط همگن هوازی غیرفعال می‌شوند. با این حال، این باکتری‌ها می‌توانند ساعات یا روزهای بسیاری را در آب هوازی سپری کنند. این باکتری‌ها اگر مجدداً در شرایط بی‌هوازی قرار گیرند، دوباره فعالیت خود را بازمی‌یابند. باکتری‌های احیاء کننده سولفات، pH خنثی را برای رشد ترجیح می‌دهند. در آزمایشگاه، فعالیت در بازه pH بین 5.5 تا 8.5 مشاهده می‌شود. با این وجود، باکتری‌های احیاکننده سولفات در آب‌های اسیدی‌تر نیز مشاهده شده‌اند. دمای بهینه برای بیشتر باکتری‌های احیاکننده سولفات شناخته‌شده در حدود ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. در رسوب‌های آب‌زی طبیعی، فعالیت پایین احیای سولفات همچنان می‌تواند تا صفر درجه سانتی‌گراد قابل اندازه‌گیری باشد.

باکتری‌های احیا کننده سولفات واکنش‌های متعددی را نسبت به غلظت‌های نمک از خود نشان می‌دهند. نمونه‌هایی که در آب بدون نمک فعالیت دارند، ممکن است در غلظت‌های نمک بالاتر از ۲۰ تا ۳۰ g NaCl/L، فعالیت آنها متوقف شود. فعالیت بیشتر باکتری‌های احیا کننده سولفات در صورتی که غلظت NaCl از ۵۰ تا ۱۰۰ g/L بیشتر شود به طرز شدیدی دچار کاهش می‌شود.

باکتری‌های احیاکننده سولفات مانند دیگر فرم‌های موجودات زنده برای انجام اعمال متابولیک خود و رشد، نیاز به یک رژیم تغذیه‌ای دارند. حتی هنگامی که نیازهای تغذیه‌ای به‌طور کامل برطرف شود، هنوز هم تعدادی از نیازهای فیزیکی که برای رشد و فعالیت آنها لازم است، بایستی فراهم گردد (Tüccar et al., 2020).

جدول ۱- مواد لازم جهت اضافه کردن به یک لیتر آب دریا (یک برابر غلظت) برای کشت باکتری‌های SRB.

مقدار لازم	حالت ماده	نام تجاری	ترکیب
3 cc	مایع	M-169	سدیم‌لاکتات (Sodium lactate)
1 gr	دانه‌ای	M-36	عصاره مخمر (Yeast Extract)
0.1 gr	پودر	M-66	آسکوربیک اسید (Ascorbic Acid)
4 μ L	مایع (داخل یخچال نگهداری می‌شود)		تیوگلیکولات اسید (Thioglycolic Acid)
1 gr	پودر دانه‌ای سفید	8	سدیم‌استات (Sodium Acetate)
0.2 gr	پودر سفید	27	سولفات منیزیم ($MgSO_4$)
0.2 gr	پودر سفید	31	فروس آلومینیم سولفات $Fe(SO_4)_2(NH_4)_2 \cdot 6H_2O$

جدول ۲- ترکیبات آب دریای خلیج فارس جهت اضافه کردن به آب مقطر.

مقدار لازم	ترکیب
24.5 gr	کلرید سدیم NaCl
1.1 gr	کلرید کلسیم CaCl ₂
11.1 gr	کلرید منیزیم MgCl ₂
4 gr	بی کربنات سدیم Na ₂ SO ₄

– **نمونه برداری از آب دریای خلیج فارس:** از آنجا که بیشتر میادین نفتی ایران وارد نیمه دوم عمر خودشان شده‌اند و برداشت نفت با فشار اولیه مخزن امکان‌پذیر نیست، برای جبران کاهش فشار مخازن از روش‌های ازدیاد برداشت استفاده می‌کنند و چون در خلیج فارس قابل‌دسترس‌ترین روش ازدیاد برداشت، استفاده از آب دریا جهت تزریق به میدان نفتی است و چون آب دریا حاوی مواد خوراکی بسیار مهمی جهت رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات است، لازم بود که از خط لوله‌ای که از دریای خلیج فارس آب را به داخل سکوها‌ی تزریق نفت می‌رساند، نمونه برداری شود. به همین منظور، از ابتدای لوله‌های تزریق آب دریا (ورودی)، میانه راه و مرحله پایانی (خروجی آب دریا) آن نمونه آب دریا گرفته شد که بتوان در محیط‌های آماده قابل کشت باکتری‌های احیاکننده سولفات آنها را کشت داد.

آب ورودی و خروجی لوله‌های تزریق آب دریا به دو سکوی نصر و ایلام از هر قسمت (ابتدای مسیر تزریق، میانه تزریق و انتهای مسیر تزریق) به مقدار ۲۰ لیتر نمونه برداری گردید و سپس نمونه‌های ۲۰ لیتری روی آنها تاریخ نمونه برداری (۱۳ تیر ماه ۱۳۹۸ تهیه آب ورودی به لوله‌های تزریق سکوها نصر و ایلام و ۱۴ تیر ماه ۱۳۹۸ تهیه آب خروجی از لوله‌های تزریقی به سکوها نصر و ایلام) و محل نمونه برداری ذکر گردید و تمامی نمونه‌ها جهت مراحل بعدی به دفتر آزمایشگاه شیمی جزیره سیری منتقل شدند. همچنین نمونه‌ای از آب تزریقی که روی سکوها نصر و ایلام در مرحله پایانی وارد چاه می‌شوند، نیز تهیه گردید و نمونه‌ها جهت انجام فیلتراسیون همراه با پمپ خلأ و کشت دادن به آزمایشگاه جزیره سیری منتقل گردیدند (شکل ۳).

۵۰ عدد ویال ۱۰۰ سی‌سی جهت آماده‌سازی و ضدعفونی و استریل (به‌وسیله اتوکلاو (AutoClave) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد) کردن تهیه گردید و به منطقه عملیاتی جهت نمونه برداری منتقل گردیدند و هر کدام از این ۵۰ عدد ویال به‌وسیله ۲۵ سی‌سی محلول حاوی محیط کشت باکتری احیاکننده سولفات توسط Dispenser توزیع گردید (شکل ۲).

ب) نمونه برداری از منطقه عملیاتی جزیره سیری

– **شرایط نمونه برداری استاندارد:** با توجه به اهمیت نمونه برداری در آزمون‌های میکروبی، آزمایشگاه باید نمونه‌ای را دریافت کند که هنگام جابه‌جایی و نگهداری آسیب‌نندیده باشد و یا تغییری در آن ایجاد نشده باشد. همچنین بهتر است نمونه در برابر آلودگی‌های خارجی ناشی از هوا، ظرف‌های نمونه برداری و جابه‌جایی نامناسب حفظ شود؛ و همچنین در هنگام نمونه برداری باید بسیار دقت گردد که هیچ حباب هوایی درون ویال‌های سرمی مشاهده نشود، چون شرایط بی‌هوازی برای رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات الزامی است و آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد زیرا بسیاری از میکروب‌ها شامل اغلب باکتری‌های احیاکننده سولفات در اثر تماس با اکسیژن می‌میرند (Whitby and Skovhus, 2010) و همچنین ویژگی‌های نمونه‌ها باید به‌طور کامل مشخص و ثبت گردند. اگر نمونه‌ها به‌طور صحیح برداشت یا جابه‌جا نشده باشند، نماینده مناسبی از محل موردنظر نبوده و تحلیل در مورد آنها نادرست خواهد بود. دمای نمونه هنگام نمونه برداری باید یادداشت شود. ظرف‌های نمونه برداری باید خشک، تمیز و استریل باشند و تا زمان استفاده استریل باقی بمانند. برای این منظور، می‌توان آنها را در ورق‌های آلومینیمی پیچید و در اتوکلاو استریل نمود.



شکل ۲- نمونه‌های ویال ۲۵ سی‌سی نام‌گذاری شده جهت کشت باکتری‌های احیاکننده سولفات.



شکل ۳- نمونه آب تزریق شده به چاه‌های تزریقی واقع در سکوه‌های نصر (راست) و ایلام (چپ).

برخی از نمونه‌های آب دریا (آب تزریقی به سکوها) به حدی آلودگی داشتند که بیشتر از یک لیتر امکان فیلتر کردن آنها وجود نداشت، زیرا تمامی منافذ کاغذ فیلتراسیون به خاطر ذرات معلق زیادی که در آنها وجود داشت پر می‌گردید و امکان انجام فیلتر وجود نداشت (شکل‌های ۴ و ۵).

۱۱-۲- نتایج به دست آمده از فیلتر کردن نمونه‌های آب تزریقی توسط دستگاه

پمپ خلأ

پس از آن که نمونه‌های آب تزریقی به سکوه‌های نصر و ایلام توسط دستگاه پمپ فیلتر گردیدند، نتایج بسیار جالبی به دست آمد که به شرح ذیل می‌باشد:



شکل ۵- کاغذ فیلتر نمونه‌های آب خروجی از لوله‌های تزریقی به سکوی ایلام.



شکل ۴- کاغذ فیلتر نمونه‌های آب خروجی از لوله‌های تزریقی به سکوی نصر.

تبدیل می‌گردید (شکل ۶). در آزمایشگاه (پیش از نمونه‌برداری) به نمونه‌های آماده‌سازی محیط‌های کشت باکتری‌های احیاکننده، سولفات محلول Resazurin اضافه گردید که این محلول معرف محیط کشت باکتری‌های احیاکننده سولفات است که رنگ صورتی به محلول می‌دهد و هنگامی که نمونه به محلول اضافه گردد و شاهد تغییر رنگ به سمت رنگ‌های تیره باشیم، این خود نشانه‌ای از وجود باکتری‌های احیاکننده سولفات در نمونه‌ها خواهد بود که در شکل ۶ تغییر رنگ نمونه‌ها نشان داده شده است.

۱۱-۳- تغییر رنگ نمونه‌های منتقل شده به محیط کشت SRB

بعد از اتمام نمونه‌گیری، تمامی نمونه‌های تهیه شده از آب دریا و آب تزریقی به ویال‌های ۱۰۰ سی‌سی حاوی محیط‌های کشت رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات منتقل شدند.

پس از گذشت دو روز از انتقال نمونه‌های آب دریا، آب تزریقی و کاغذهای فیلتر شده به ویال‌های ۱۰۰ سی‌سی و ۲۵ سی‌سی، تغییرات رنگ در محیط‌های کشت بسیار آشکار بود، به گونه‌ای که از رنگ صورتی به رنگ‌های تیره



شکل ۶- تغییر رنگ مشاهده‌شده (صورتی به زرد) پس از دو روز انتقال نمونه‌های آب همراه نفت و آب تزریقی به ویال‌ها.

۱۱-۴- مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها جهت استخراج DNA
پس از انتقال نمونه‌ها از منطقه عملیاتی سیری به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشگاه صنعت نفت، مدت ۳ الی ۱۴ روز به نمونه‌ها زمان داده شد که در شرایط استاندارد در داخل انکوباتور (گرم‌خانه) نگهداری شوند تا در صورت وجود باکتری‌های احیاکننده سولفات بتوانند کاملاً رشد کنند و پس از گذشت یک ماه تمامی نمونه‌ها از انکوباتور خارج و آماده انتخاب نمونه‌های کاندید جهت استخراج DNA گردیدند. پس از سپری شدن زمان گرم‌خانه‌گذاری (انکوباتور)، حضور یا عدم حضور باکتری‌ها در نمونه‌های درون ویال‌های ۱۰۰ و ۲۵ سی‌سی با توجه به جدول ۳ تعیین می‌گردد.

۱۱-۶- انتخاب نمونه‌های اصلی جهت انجام آزمایش‌های استخراج DNA

در ابتدا، نمونه‌های تهیه‌شده از منطقه عملیاتی سیری ۵۵ عدد بودند. از آنجا که برخی از نمونه‌ها به دلایل گوناگونی مانند این که باکتری‌های احیاکننده سولفات نتوانسته بودند در آنها رشد کنند یا به‌طور کلی حاوی باکتری SRB نبودند و همچنین برخی، نمونه‌های تکراری تهیه گردیده بود، بنابراین با حذف این نمونه‌ها، در نهایت، جهت انجام مطالعات و آزمایش‌های تکمیلی استخراج DNA و شناسایی مولکولی، تعداد ۱۷ عدد نمونه ویال ۱۰۰ سی‌سی به همراه ۶ عدد ویال ۲۵ سی‌سی انتخاب شدند که از فیلتر کردن آب‌های تزریقی و آب دریا به‌دست آمده بودند. این انتخاب با توجه به مشاهدات اولیه و تغییر رنگ شگرفی که این نمونه‌ها داشتند (از رنگ صورتی به رنگ کاملاً سیاه) برگزیده شدند (شکل ۸). نمونه‌هایی که جهت مطالعات تکمیلی انتخاب شدند (باکتری‌های احیاکننده سولفات در آنها رشد کرده‌اند، و تغییر رنگ (از قرمز یا صورتی به رنگ تیره یا سیاه کامل) در آنها وجود داشت)، در جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

۱۱-۵- تقسیم‌بندی اولیه نمونه‌های تهیه‌شده از منطقه عملیاتی سیری

جهت شناسایی بهتر نمونه‌ها، لازم است که آنها دسته‌بندی گردند و به دلیل زیاد بودن پارامترهای دسته‌بندی و عدم هماهنگی معنادار بین نمونه‌ها، به‌ناچار دسته‌بندی ترکیبی از همه پارامترها و عوامل متغیر شامل (نوع نمونه، چاه، میدان، سکو، رنگ و...) صورت گرفت که طبق آن، نمونه‌ها به ۸ دسته تقسیم گردیدند که در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. هدف از این نوع دسته‌بندی این است که نمونه‌هایی که باکتری

جدول ۳- راهنمای تشخیص حضور یا عدم حضور باکتری‌های مهم شاخص خوردگی میکروبی.

ردیف	نام باکتری	مشخصات ظاهری رشد باکتری (بعد از گرم‌خانه‌گذاری)	زمان گرم خانه‌گذاری (روز)
۱	احیاکننده سولفات (SRB)	رسوب سیاه‌رنگ در محیط کشت	۲۸
۲	تولیدکننده اسید (APB) (Acid Produce Bacteria)	ایجاد رنگ زرد در محیط کشت	۱۴
۳	احیاکننده آهن (IRB) (Iron Reduction Bacteria)	ایجاد رنگ سبز یا سیاه در محیط کشت	۳۰
۴	هتروتروف (HB) (Heterotroph Bacteria)	کدر شدن محیط کشت	۷



شکل ۷-۸ دسته‌بندی مختلف نمونه‌های تهیه‌شده از منطقه عملیاتی جزیره سیری.

جدول ۴- ویژگی‌های نمونه‌هایی که تغییر رنگ داده‌اند (از قرمز یا صورتی به رنگ تیره یا سیاه کامل) و باکتری‌های احیا کننده سولفات در آنها رشد کرده‌اند.

شماره نمونه	نام سکو	شماره چاه	نوع نمونه	درجه غلظت نمونه
۱	نصر	نصر ۶	آب تزریقی	SW-4X
۲	نصر	نصر ۶	آب تزریقی	DW-4X
۳	نصر	نصر ۵	آب تزریقی	SW-1X
۴	نصر	نصر ۵	کشت فیلتر آب تزریقی	DW-1X
۵	نصر	نصر ۵	کشت فیلتر آب تزریقی	SW-1X
۶	نصر	نصر ۶	کشت فیلتر آب تزریقی	DW-1X
۷	نصر	نصر ۶	کشت فیلتر آب تزریقی	SW-1X
۸	نصر	نصر ۶	ورودی آب دریا قبل از تزریق بیوساید	
۹	نصر	نصر ۵	خروجی آب دریا بعد از تزریق بیوساید	
۱۰	ایلام	ایلام	ورودی آب دریا قبل از تزریق بیوساید	
۱۱	ایلام	ایلام	خروجی آب دریا بعد از تزریق بیوساید	



شکل ۸- تمام ۲۳ عدد نمونه‌های کاندید شده جهت انجام آزمایش‌های استخراج DNA از آنها.

فراوان دیگری در فرایند استخراج DNA شد. نخستین فرایندهای آزمایشگاهی روتین برای استخراج DNA، بر پایه راهبردهای سانتریفیوژ بر اساس چگالی توسعه یافتند. هم‌اکنون روش‌های اختصاصی فراوانی برای استخراج DNA خالص ایجاد شده‌اند. روش‌ها بیشتر به صورت کیت‌های تجاری موجودند (Shams et al., 2020).

– مراحل استخراج DNA نمونه‌ها: از آنجا که استخراج DNA و شناسایی مولکولی نمونه‌های DNA استخراجی، بسیار هزینه‌بر هستند، و همچنین چون هدف اصلی پروژه تعیین منشأ ترش‌شدگی در میدان‌های مورد مطالعه است، و به دلیل آن که بیشتر نمونه‌های انتخاب شده شرایط محیطی یکسانی داشتند، تنها یک نمونه جهت مطالعات استخراج DNA انتخاب شد که نمونه انتخابی بایستی ترکیبی از تمامی نمونه‌ها باشد و به عنوان نماینده کل نمونه‌های آلوده به باکتری‌های احیاکننده سولفات، جهت مطالعات بعدی استخراج دی‌ان‌ای و شناسایی مولکولی باشد که در ادامه به ذکر جزئیات آن پرداخته می‌شود (شکل ۱۱).

در شکل‌های ۹ و ۱۰ می‌توان نمونه‌های انتخاب شده از ویال‌های ۲۵ سی‌سی کشت فیلتر آب تزریقی و همچنین ویال‌های ۱۰۰ سی‌سی انتخاب شده را که باکتری‌های احیاکننده سولفات به‌خوبی در آنها توانسته‌اند رشد کنند را مشاهده نمود.

۱۱-۷- استخراج دی‌ان‌ای (DNA Extraction)

استخراج دی‌ان‌ای فرایندی است که طی آن دی‌ان‌ای با کمک ترکیبی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی از نمونه جداسازی می‌شود. دی‌ان‌ای نخستین بار توسط فردریش میشر (Miescher Friedrich)، پزشک سوئسی در سال ۱۸۶۹ استخراج گردید (Lothridge and Jones, 2005; Dahm, 2008). امروزه استخراج دی‌ان‌ای یک روش مرسوم در زیست‌شناسی مولکولی و آنالیزهای جرم‌شناسی است. در استخراج به روش شیمیایی، انواع مختلفی کیت وجود دارد که در زمان کمتر، امکان استخراج و انتخاب صحیح دی‌ان‌ای را فراهم می‌کند (Yoshikawa et al., 2011). پس از میشر تلاش‌های دیگری نیز به این منظور صورت گرفت و سبب پیشرفت‌های



شکل ۹- نمونه‌های ویال‌های ۲۵ سی‌سی انتخاب شده که باکتری‌های SRB به‌خوبی در آنها رشد کرده‌اند.



شکل ۱۰- نمونه‌های ویال‌های ۱۰۰ سی‌سی انتخاب شده که باکتری‌های SRB به‌خوبی در آنها رشد کرده‌اند.



شکل ۱۱- نمونه‌های آب‌های تزریقی انتقالی از ویال‌های ۱۰۰ سی‌سی به فالکون‌های ۵۰ سی‌سی جهت ترکیب نمونه انتخابی.

چسبیده‌اند، جدا می‌شوند و سپس قسمت بالایی محلول به یک لوله فالکون جدید دیگری منتقل می‌گردد و مجدداً یک‌بار دیگر عمل استخراج فنل تکرار می‌شود.

مرحله هشتم: در این مرحله، محلول به یک فالکون جدید و تمیز دیگری منتقل گشته و حجم مساوی الکل کلروفرم-ایزوآمیل به آن اضافه می‌گردد سپس دوباره آنها را مخلوط کرده و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دور نسبی ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ می‌گردد. این عمل استخراج دو بار تکرار می‌گردد. لازم به یادآوری است که در این مرحله نسبت حجمی کلروفرم به ایزوآمیل نسبت ۱ به ۲۴ است (Chloroform-isoamyl alcohol 24:1 (V/V)).

مرحله نهم: در این مرحله، محلول به فالکون جدید منتقل گردیده و سپس با اضافه کردن نسبت حجمی ۱ به ۱۰ از سه مول سدیم استات و نسبت حجمی ۱ به ۲ از پروپانول آنها را به آرامی ترکیب می‌کنیم تا DNA رسوب کند و پس از آن، نمونه داخل انکوباتور به مدت یک ساعت در دمای ۲۰°C قرار داده می‌شود (Spencer, 2004).

مرحله دهم: در این مرحله نیز نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور نسبی ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردیده و سپس مایع رویی همان‌گونه که در شکل ۱۲ نشان داده شده است، دور ریخته می‌شود و DNA حاصل شده با ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول (۷۰٪) شستشو می‌گردد، سپس مجدداً این بار به مدت ۵ دقیقه با دور نسبی ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ کرده، آنگاه باید تلاش کرد که اتانول باقیمانده با دقت دور ریخته و محلول کاملاً خشک گردد تا به‌طور کلی اتانول از محلول حذف گردد. این عمل تا زمانی که اتانول برداشته شود تکرار می‌گردد (در این مرحله، باقیمانده نمک یا ایزوپروپانول از بین می‌رود و باید یک‌بار تکرار شود) (شکل ۱۳).

مرحله یازدهم: در این مرحله، DNA حاصل شده مجدداً در ۲۰-۳۰ میکرو لیتر آب استریل و ۰.۱-۰.۲ میکرو لیتر ریبونوکلاز به حالت تعلیق در آورده می‌شود و اجازه داده می‌شود که حداقل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حل شود (Spencer, 2004).

۱۱-۸- خالص‌سازی نمونه DNA

در این مرحله، برای آنکه DNA به‌صورت کامل خالص‌سازی شود، لازم است که مجدداً داخل دستگاه سانتریفیوژ در شرایط عدم حضور هوا یا اکسیژن (خلا) قرار داده شود و در این حالت هرگونه ترکیب یا مواد اضافی مانند اتانول یا فنول و مواد دیگری که در حین مراحل یازده گانه به آن اضافه گردیده است و به‌عنوان ناخالصی تلقی می‌شوند را (در صورت وجود) در حالت عدم حضور هوا یا اکسیژنی که در محیط وجود دارد با ایجاد مکش هوا و شرایط خلأ از DNA جدا می‌گردد (شکل ۱۴).

پروتکل (Protocol) و روش‌های میکروبیولوژی محیطی برای استخراج DNA: طبق استاندارد که تعریف شده است، برای استخراج DNA باید به ترتیب مراحل ذیل انجام شود تا پروتکل‌های لازم جهت استخراج صحیح DNA رعایت گردد (Doyle, 1991; Wang, 2006; Gietz, 2014).

همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، برای مطالعات استخراج دی‌ان‌ای و شناسایی مولکولی، تنها یک نمونه که شامل مجموعه ترکیبی از آب‌های تزریقی، آب ورودی دریا و خروجی دریا و نمونه کشت‌های فیلتر شده از آب‌های تزریقی نیاز است که DNA آنها استخراج گردد. به همین منظور، تمامی نمونه‌ها به نمونه بزرگ‌تری منتقل شدند و سپس با وزن کردن، به دو قسمت مساوی تقسیم شدند زیرا برای انجام مرحله سانتریفیوژ لازم است که وزن طرفین دستگاه سانتریفیوژ یکسان باشد که عمل جدایش به‌صورت صحیح صورت گیرد (Spencer, 2004).

مرحله اول: در این مرحله لازم است که نمونه‌ها به مدت دو دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردند و پس از انجام سانتریفیوژ، مابقی محلول دور ریخته می‌شود و تنها ۲ میلی لیتر از محلول سانتریفیوژ شده که در دیواره نمونه‌ها است، به مرحله بعدی منتقل می‌گردد.

مرحله دوم و سوم: در این دو مرحله که به‌صورت همزمان صورت می‌گیرند، لازم است که محلول خروجی از سانتریفیوژ داخل گلوله‌هایی قرار داده شود و روی دستگاه لرزاننده به مدت یک دقیقه چرخش گلوله‌ها در تماس با محلول لیز یا بافر قرار گیرد تا بدین وسیله محلول لیز یا بافر در آن کاملاً مخلوط شود و سپس محلول به‌دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، داخل انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده می‌شود.

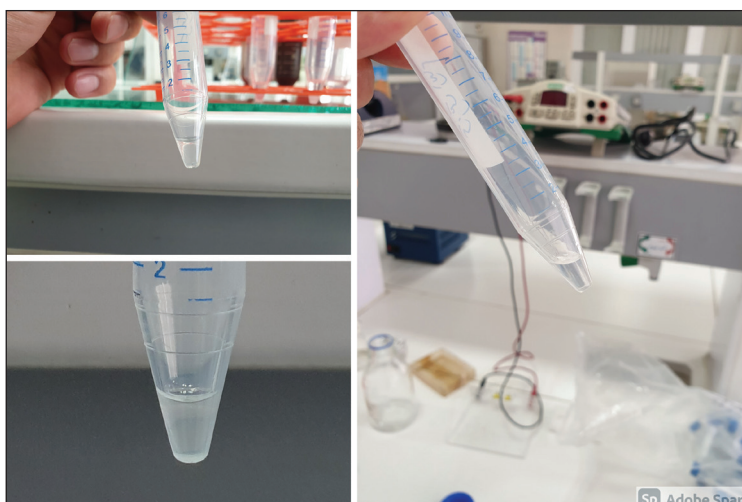
مرحله چهارم و پنجم: در این مرحله سدیم دو دسیل سولفات (SDS= Sodium dodecyl sulfate) یک درصد وزنی و پروتیناز پتاسیم (proteinase K) به محلول اضافه می‌گردد و مجدداً محلول به مدت ۱۰ ثانیه توسط دستگاه لرزاننده چرخانده و سپس محلول به‌دست آمده به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد داخل انکوباتور قرار داده می‌شود.

مرحله ششم: در این مرحله، حجم مساوی از فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (phenol-chloroform-isoamyl alcohol) به محلول اضافه گردیده و چندین بار با وارونه کردن فالکون، محتوای محلول، مخلوط می‌گردد. لازم به یادآوری است که در این مرحله نسبت‌های حجمی فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت‌های ۱ به ۲۴ به ۲۵ هستند (Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)).

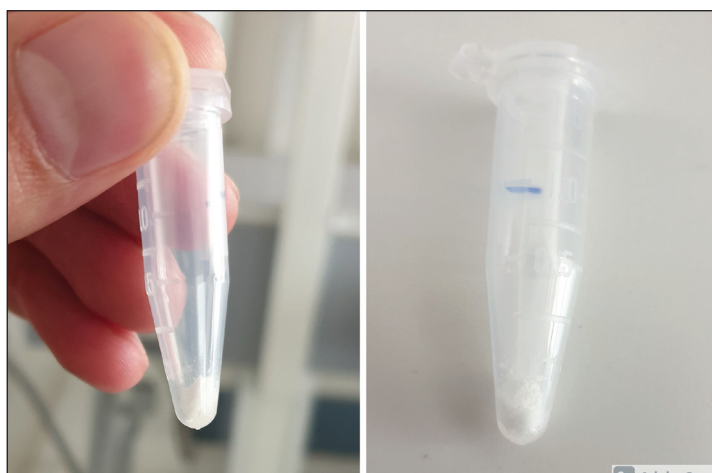
مرحله هفتم: در این مرحله نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور نسبی ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ می‌شوند و پس از آن، تنها بخش‌هایی از نمونه که به دیواره انتهای فالکون



شکل ۱۲- برداشتن لایه بالایی از محلول حاوی DNA به وسیله پیت مدرج میکرو لیتری (بعد از سانتریفیوژ).



شکل ۱۳- مراحل خالص سازی یا جداسازی DNA از اتانول.



شکل ۱۴- نمونه DNA خالص سازی شده خروجی از مرحله آخر دستگاه سانتریفیوژ خلأ.

لازم است که از هر نمونه ۲ میکرولیتر برداشته شود و روی دستگاه نانو دراپ قرار گیرد و به دستگاه ۱۵ ثانیه اجازه داده شود تا فرایندهای تست روی نمونه را انجام دهد و در نهایت، نتایج روی مانیتور متصل به دستگاه به نمایش گذاشته می‌شود (شکل ۱۵).

۱۱-۹- آزمون خلوص DNA نمونه‌ها توسط دستگاه نانو دراپ

جهت اندازه‌گیری میزان غلظت و خلوص نمونه‌های DNA، لازم است که از دستگاه نانو دراپ استفاده گردد. به همین منظور، جهت آزمون نمونه‌ها، این عمل برای تک‌تک ۶ نمونه DNA استخراجی از نمونه‌ها صورت گرفت و به این منظور



شکل ۱۵- خروجی نتایج حاصل از تست خلوص سازی DNA روی مانیتور دستگاه نانو دراپ.

۱۲- نتایج

۱۲-۱- نتایج حاصل از خلوص سازی DNA نمونه‌ها

پس از قرار دادن دو میکرولیتر از نمونه DNA ها روی دستگاه نانو دراپ، نتایج حاصل شده از ۶ نمونه استخراجی که به صورت منحنی‌های استاندارد در شکل ۱۶ به خوبی نشان داده شده است.

نتایج خروجی از دستگاه نانو دراپ دارای سه پارامتر هست که هر کدام از پارامترها به ترتیب به صورت ذیل تعریف می‌گردند:

یک تست مربوط به غلظت DNA دو رشته‌ای است که با واحد ng/μl اندازه‌گیری می‌شود و برای کار PCR (Polymerase Chain Reaction) باید بیشتر از ۳۰ ng/μl باشد. یک عدد مربوط به جذب 260A/280A است که نشان‌دهنده میزان پروتئین و RNA در نمونه است. به این صورت که اگر این عدد از 1.08 کمتر باشد، یعنی نمونه آلودگی به پروتئین دارد.

به منظور اندازه‌گیری خلوص DNA، میزان جذب محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. DNA، نور یووی (Ultra Violet (UV)) را در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کند. این در حالی است که پروتئین‌های آروماتیک، نور یووی را در ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کنند.

یک عدد مربوط به جذب 260A/230A است که نشان‌دهنده آلودگی به فنول است. به این صورت که اگر این عدد بیشتر از 0.2 باشد یعنی نمونه DNA ما خالص است به طوری که تا 0.15 قابل قبول است اما اگر عدد زیر 0.1 باشد، یعنی نمونه آلودگی به فنول دارد (Dahm, 2008; Yoshikawa et al., 2011).

نتایج تمامی ۶ نمونه‌ای که DNA آنها استخراج شده است، به صورت خلاصه در جدول ۵ نشان داده شده است.

با مشاهده نتایج حاصل از دستگاه نانو دراپ روی ۶ نمونه DNA استخراجی، می‌توان به این نتیجه دست یافت که تمامی نمونه‌های استخراجی کاملاً خالص می‌باشند و هیچ گونه آلودگی به پروتئین و فنول در آنها وجود ندارد و تمامی ۶ نمونه مورد آزمایش، شرایط لازم برای مرحله بعد که شناسایی مولکولی نمونه‌های DNA استخراجی است را دارا می‌باشند.

از آنجا که استاندارد آزمایشگاه شناسایی مولکولی نمونه‌های ارسالی باید حداقل غلظت DNA را دارا باشند (که این عدد برابر ۳۰۰۰ نانوگرم هست)، با بررسی نتایج نمونه‌ها مشخص شد که تمامی نمونه‌ها حتی از حداقل غلظت لازم نیز به مراتب از غلظت بالاتری برخوردار هستند ($66 \times 50 = 3300 > 3000 \text{ ng}$).



شکل ۱۶- گراف خروجی از نتایج تست خالص سازی DNA دستگاه نانو دراپ.

جدول ۵- نتایج تست دستگاه نانو دراپ DNA استخراجی از ۶ نمونه مورد آزمایش.

شماره نمونه	غلظت DNA (ng/μl)	جذب 260A/280A	جذب 260A/230A	آلودگی به پروتئین	آلودگی به فنول
شماره ۱	555.3	1.37	0.57	ندارد	ندارد
شماره ۲	114.4	2.76	0.13	ندارد	ندارد
شماره ۳	910.3	1.36	0.66	ندارد	ندارد
شماره ۴	215.7	1.55	0.3	ندارد	ندارد
شماره ۵	200.6	1.60	0.27	ندارد	ندارد
شماره ۶	66	1.90	0.18	ندارد	ندارد

۱۲-۲- تنوع توالی‌یابی مولکولی
 تنوع توالی در ژن 16S به‌طور گسترده برای توصیف جوامع میکروبی مختلف استفاده می‌شود. با توسعه مداوم پلتفرم‌های توالی‌یابی با توان بالا، پلت فرم توالی‌یابی ارتقا یافته ایلومینا (Illumina sequencing platform) به تدریج به روشی مهم برای مطالعه ترکیب و ساختار جامعه میکروبی در نمونه‌های محیطی تبدیل شده است و این روش می‌تواند ما را به هدف خود که شناسایی مولکولی است، برساند (Caporaso et al., 2011; Hess et al., 2011).

۱۲-۴- باکتری احیاکننده سولفات گونه دسولفوویبریو

حفظ دقت و قابلیت اطمینان داده‌های توالی‌یابی، کنترل کیفیت (QC) در هر مرحله از فرایند توالی‌یابی انجام می‌گردد. گردش کار فرایند شناسایی مولکولی در شکل ۱۷ به‌خوبی نشان داده شده است.

باکتری‌های این گروه مربوط به دلتا پروتئوباکتری‌های بی‌هوازی و مزوفیل می‌باشند که به‌طور گسترده در آب شیرین، آب دریا و سیستم‌های صنعتی یافت می‌شوند (Shi et al., 2011). این باکتری‌ها در شرایط بی‌هوازی، سولفات را برای کسب انرژی احیا کرده و آن را به سولفید هیدروژن تبدیل می‌نمایند. سپس یون‌های سولفات را به‌عنوان پذیرنده الکترون به یون سولفید تبدیل می‌کنند (Williamson IV, 2013). از جنس‌های مشهور این باکتری‌ها، می‌توان به Desulfovibrio و Desulfotumaculum اشاره نمود. جنس دسولفوویبریو عموماً در آب‌های با مقدار زیاد بار آلی و خاک‌های غرقابی دیده می‌شوند. این باکتری‌ها سلول‌های میله‌ای یا

۱۲-۳- آماده‌سازی و توالی‌یابی

از نمونه DNA استخراج شده تا به دست آمدن داده‌های نهایی در هر مرحله از فرایند توالی‌یابی مانند PCR، خالص‌سازی، آماده‌سازی کتابخانه‌ای و تعیین توالی، بر کیفیت و کمیت داده‌ها تأثیر می‌گذارد. از طرفی، کیفیت داده‌ها مستقیماً بر نتایج تجزیه و تحلیل اطلاعات بعدی تأثیر می‌گذارد (Youssef et al., 2009). به همین منظور،

۱۲-۵- نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نمونه‌ها

پس از انجام آنالیزهای مرتبط با شناسایی مولکولی روی DNA نمونه استخراجی، طیفی از باکتری‌هایی که در نمونه استخراجی وجود داشتند (با مراجعه به مطالعات کتابخانه‌ای و تحلیل‌ها و دسته‌بندی‌های آماری) به دست آمد که نتایج خروجی شناسایی مولکولی به شرح جدول ۶ است. همچنین برای درک بهتر فراوانی نسبی تمامی گونه‌های باکتریایی موجود در نمونه استخراجی در شکل ۱۸ نیز قابل مشاهده هستند.

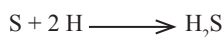
همان‌گونه که می‌دانیم، در میان باکتری‌های احیاکننده سولفات‌ها (SRB)، گونه‌های دسولفوویبریو با توانایی مؤثر در مصرف هیدروژن، معمولاً به‌عنوان عامل اصلی خوردگی بی‌هوازی به‌شمار می‌روند (Dinh et al. 2004)؛ و با مشاهده نتایج به‌دست آمده از شناسایی مولکولی نمونه‌ها (جدول ۵ و شکل ۱۸)، این مطلب مجدداً اثبات می‌گردد که بیشترین گونه‌ای که منجر به ترش‌شدگی میادین نفتی منطقه مورد مطالعه شده است، گونه دسولفوویبریو می‌باشد که از نظر فراوانی نسبی، بیشترین میزان فراوانی در شناسایی مولکولی نمونه‌های مورد مطالعه را دارد، به‌طوری که حدود ۸۱ درصد فراوانی را فقط این جنس به خود اختصاص داده است.

خمیده دارند. آنها توان اکسیداسیون استات- لاکتات و دی‌اکسید کربن را به‌عنوان سوبستراهای معمول دارند و همچنین از یون‌های سولفور و یاد دیگر ترکیبات گوگردی (مانند سولفیت، تیوسولفات و...) به‌عنوان پذیرنده‌های الکترون استفاده می‌نمایند (Williamson IV, 2013).

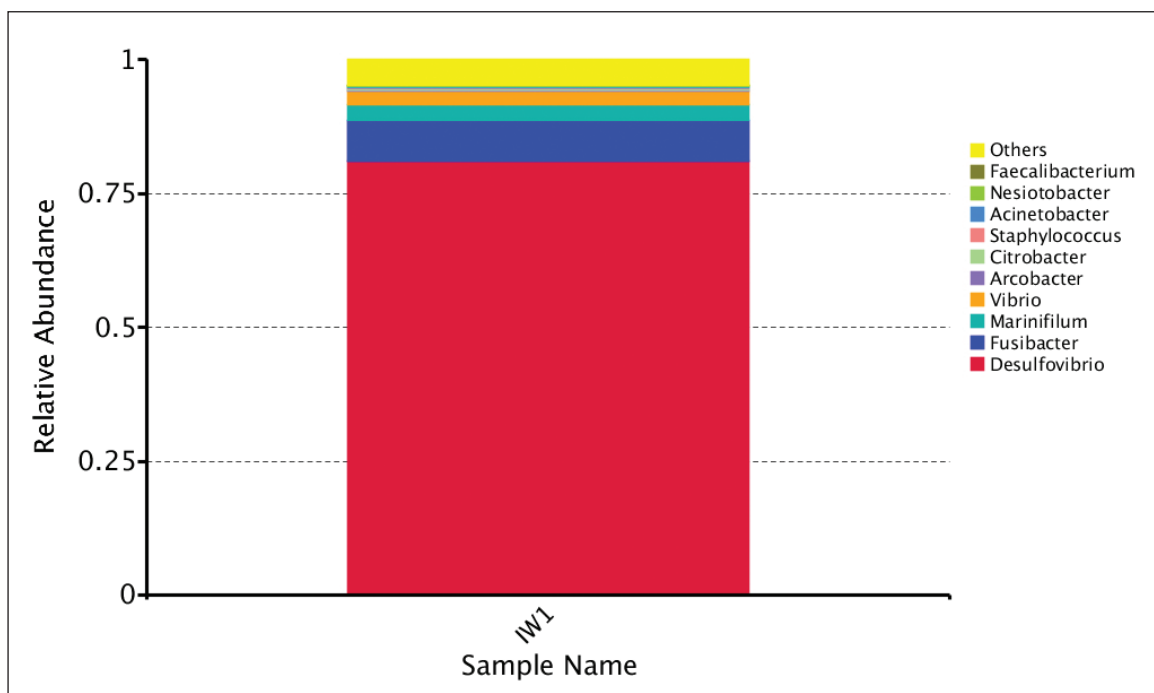
به‌بیان دیگر، باکتری دسولفوویبریو با تبدیل سولفات به H₂S (که در یک شرایط بی‌هوازی انجام می‌گیرد) و بر اساس واکنش‌هایی که در آنها شرکت می‌کند، منجر به تولید گاز هیدروژن سولفید یا گاز ترش در مخازن نفتی می‌گردد. به بیان ساده‌تر، این باکتری با مصرف هیدروکربن موجود در میادین نفتی، آنها را به گاز سولفید هیدروژن که منجر به ترش‌شدگی در مخازن نفتی می‌شود، تبدیل می‌کند.



در زمانی که ماده آلی در اختیار نباشد، باکتری مورد نظر در واکنش‌های زیر شرکت می‌کند.



شکل ۱۷- گردش کار فرایند شناسایی مولکولی.



شکل ۱۸- درصد فراوانی نسبی گونه‌های باکتریایی موجود در نمونه مورد مطالعه پس از شناسایی مولکولی.

جدول ۶- مقادیر به‌دست‌آمده برحسب درصد فروانی نسبی گونه‌های موجود در نمونه مورد مطالعه پس از شناسایی مولکولی.

	Desulfovibrio	Fusibacter	Marinifilum	Vibrio	Arcobacter	Citrobacter	Staphylococcus	Acinetobacter	Nesiotobacter	Faecalibacterium	Others
IW1	0.8110	0.076	0.0290	0.024797	0.002	0.002	0.002	0.00199	0.0019	0.001416	0.046971

۱۳- نتیجه‌گیری

نهایی به‌دست آمد که حدود ۸۱ درصد نمونه‌ها حاوی باکتری دسولفوویبریو است و با بررسی ویژگی‌های این باکتری دریافتیم که این باکتری توانایی بسیار بالایی در مصرف هیدروژن موجود در مخازن نفتی دارد و با شرکت در واکنش‌های شیمیایی، با مصرف هیدروکربن موجود در میادین مورد مطالعه، آنها را به گاز سولفید هیدروژن یا همان گاز ترش تبدیل می‌کند به بیان ساده‌تر، منشأ اصلی تولید گاز ترش در منطقه مورد مطالعه، حضور باکتری دسولفوویبریو است.

سیاسگزاری

این مقاله مستخرج از رساله دکترا و تحت حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه صنعتی اصفهان و همچنین شرکت نفت ملی ایران است. از این رو، نگارندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند که از ریاست واحد تحقیق و پژوهش شرکت نفت فلات قاره ایران جناب آقای دکتر رستمی به جهت در اختیار قرار دادن داده‌های مورد نیاز این مقاله و همچنین جناب آقای مهندس حسینی که با تلاش‌های ایشان امکان حضور در منطقه عملیاتی جزیره سیری امکان‌پذیر گردید و همچنین کارکنان زحمتکش آزمایشگاه جزیره سیری جناب آقایان مهندس بیات و مهندس زارعی که کمک بسیار شایانی جهت نمونه‌برداری از منطقه عملیاتی جزیره سیری داشتند، تقدیر و تشکر ویژه به‌عمل آید. همچنین بر خود واجب می‌دانیم که از زحمات بی‌دریغ و مسئولانه تمامی کارکنان و کارشناسان واحد بیوتکنولوژی پژوهشگاه صنعت نفت تهران به‌ویژه مهندس فروغی که در هنگام انجام فرایندهای آزمایش‌ها میکروبیولوژی کمک‌های کارشناسی و تجهیزاتی به ما کردند کمال تشکر و قدردانی را بنماییم.

هدف از انجام این پژوهش، بررسی منشأ ترش‌شدگی یا تولید گاز هیدروژن سولفید در میادین نفتی (اسفند، سیوند و دنا) واقع در منطقه عملیاتی سیری (حوضه خلیج فارس) است که پس از بررسی‌های اولیه و مطالعات کتابخانه‌ای و دسترسی به داده‌های مخزنی و همچنین با توجه به بررسی میادین نفتی‌ای که شرایط مشابهی از نگاه ویژگی‌های مخزنی (دما، فشار و عمق) با میادین نفتی مورد مطالعه داشتند و همچنین جهت ازدیاد برداشت از آن میادین مانند میادین مورد مطالعه، از روش‌های سیلاب زنی یا تزریق آب استفاده می‌کردند، این نتیجه اولیه به‌دست آمد که منشأ تولید گاز هیدروژن سولفید در میادین مورد مطالعه می‌تواند ناشی از فرایند احیای باکتری‌های سولفات باشد که برای اثبات این فرضیه، نمونه‌برداری از منطقه مورد مطالعه و همچنین کشت نمونه‌ها در محیط‌های آماده رشد باکتری‌های احیاکننده سولفات انجام شد. در ابتدا، تغییر رنگ نمونه‌ها از صورتی به رنگ کاملاً سیاه که گویای حضور باکتری‌های غیر هوازی و باکتری‌های احیاکننده سولفات است، مشاهده شد. سپس با مشاهده نتایج حاصل از فیلتراسیون نمونه‌های آب دریای خروجی، ورودی و آب تزریقی به سکوها نصر و ایلام که گویای آلودگی‌های بسیار زیاد به حضور باکتری‌های آلوده‌کننده در نمونه‌های فیلتر شده بود، مواجه شدیم. پس از آن، برای اثبات دقیق‌تر فرضیه و ادعای خود اقدام به استخراج DNA از نمونه‌هایی شد که احتمال حضور باکتری‌های احیاکننده سولفات در آنها به‌مراتب بیشتر از بقیه نمونه‌ها بوده است و پس از استخراج DNA نمونه‌ها، آنها را جهت مطالعات تکمیلی و شناسایی مولکولی تحت آزمایش‌ها PCR و آنالیزهای مرتبط با سکانس مولکولی قرار دادیم. در نهایت، پس از تهیه گزارش از خروجی نتایج حاصل از شناسایی مولکولی و ترسیم درصد فراوانی ترکیبات موجود در نمونه DNA استخراجی با روش‌های بسیار به روز، این نتیجه

References

- Burger, E. D., Addington, D. V., and Crews, A. B., 1992. Reservoir souring: bacterial growth and transport, in Proceedings of the Fourth International IGT Symposium on Gas, Oil, and Environmental Biotechnology: p. 1.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., and Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample: Proceedings of the national academy of sciences, v. 108, Supplement 1, p. 4516–4522.
- Chen, T., He, Q., Lu, H., Peng, P., and Liu, J., 2009. Thermal simulation experiments of saturated hydrocarbons with calcium sulfate and element sulfur: Implications on origin of H₂S: Science in China Series D: Earth Sciences, v. 52, no. 10, p. 1550–1558.
- Dahm, R., 2008. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research: Human genetics, v. 122, no. 6, p. 565–581.
- Dinh, H. T., Kuever, J., Mußmann, M., Hassel, A. W., Stratmann, M., and Widdel, F., 2004. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms: Nature, v. 427, no. 6977, p. 829–832.
- Doyle, J., 1991. DNA protocols for plants, in Molecular techniques in taxonomy: Springer, p. 283–293.
- Evans, P., and Dunsmore, B., 2006. Reservoir Simulation of Sulfate Reducing Bacteria Activity in the Deep Sub-Surface, in CORROSION 2006: NACE International.
- Frazier, L. C., and Bolling, J. D., 1991. Hydrogen sulfide forecasting techniques for the Kuparuk River Field, in International Arctic Technology Conference: Society of Petroleum Engineers.
- Ghazban, F., 2007. Petroleum geology of the Persian Gulf. Joint publication: Tehran University Press and National Iranian Oil Company, Tehran.
- Gietz, R. D., 2014. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, in Yeast Genetics: Springer, p. 1–12.
- Herbert, B. N., Gilber, P. D., Stockdsle, H., and Watkinson, R. J., 1985. Factors controlling the activity of sulphate-reducing bacteria in reservoirs during water injection.
- Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T.-W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D. S., Chen, F., and Zhang, T., 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen: Science, v. 331, no. 6016, p. 463–467.
- Hill, D. E., Bross, S. V., and Goldmann, E. R., 1990. The Impacts of Microbial Souring of a North Slope Oil Reservoir, in International Congress on Microbial Influenced Corrosion, Knoxville, TN (October 1990).
- Jia, Y., Khanal, S. K., Shu, H., Zhang, H., Chen, G.-H., and Lu, H., 2018. Ciprofloxacin degradation in an anaerobic sulfate-reducing bacteria (SRB) sludge system: mechanism and pathways: Water research, v. 136, p. 64–74.
- Lake, L. W., 2006. Petroleum engineering handbook: Society of Petroleum Engineers.
- Lappan, R. E., and Fogler, H. S., 1992. Effect of Bacterial Polysaccharide Production on Formation Damage: doi:10.2118/19418-PA.
- Lothridge, K., and Jones, R. W., 2005. Principles of Forensic DNA for Officers of the Court: An Interactive, Computer-Based Training Tool for Attorneys and Judges: Drake L. Rev., v. 54, p. 671.
- Lucia, F. J., 2012. Carbonate Reservoir Characterization: An Integrated Approach: Springer Berlin Heidelberg.
- MacBeth, C., Stephen, K. D., and McInally, A., 2005. The 4D seismic signature of oil–water contact movement due to natural production in a stacked turbidite reservoir: Geophysical Prospecting, v. 53, no. 2, p. 183–203.
- Mueller, R. F., and Nielsen, P. H., 1996. Characterization of thermophilic consortia from two souring oil reservoirs.: Applied and environmental microbiology, v. 62, no. 9, p. 3083–3087.
- Postgate, J. R., 1979. The Sulphate-Reducing Bacteria: Cambridge University Press.
- Rosnes, J T, Graue, A., and Torleiv, L., 1991a. Activity of sulfate-reducing bacteria under simulated reservoir conditions: SPE Production Engineering, v. 6, no. 02, p. 217–220.
- Rosnes, J. T., Torsvik, T., and Lien, T., 1991b. Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters: Applied and environmental microbiology, v. 57, no. 8, p. 2302–2307.
- Shams, A., Beigi, M. H., Ghomi, H., Forootan, F. S., Sabouri, A., and Iravani, O., 2020. Localization and optimization of DNA extraction kit for PCR reaction for genetic fingerprinting: Medical Genetic Research Journal, v. 1, no. 1, p. 4.
- Shi, X., Xie, N., and Gong, J., 2011. Recent progress in the research on microbially influenced corrosion: a bird's eye view through the engineering lens: Recent Patents on Corrosion Science, v. 1, no. 2, p. 118–131.
- Spencer, J. F. T., 2004. Environmental microbiology: Springer.
- Sunde, E., Thorstenson, T., Lillebo, B.-L., and Bodtker, G., 2004. H₂S inhibition by nitrate injection on the Gullfaks field: CORROSION 2004.
- Taylor, S. K., Blenkinsopp, S. A., and Costerton, J. W., 1991. A water injection well backflow study: the location of sulfate-reducing bacteria and hydrogen sulfide production in a petroleum reservoir formation, in Proceedings of the Fourth IGT Symposium on Gas, Oil, and Environmental Biotechnology: p. 279–286.
- Tüccar, T., İlhan-Sungur, E., and Muzer, G., 2020. Bacterial Community Composition in Produced Water of Diyarbakır Oil Fields in Turkey: Johnson Matthey Technology Review.

- Wang, K., 2006. *Agrobacterium protocols*: Springer.
- Whitby, C., and Skovhus, T. L., 2010. *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems: Proceedings from the International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (ISMOS-2)*, 2009: Springer Netherlands.
- Williamson IV, C. H. D., 2013. *An investigation of microbial diversity and microbiologically influenced corrosion in automotive fuel environments*: Colorado School of Mines.
- Yoshikawa, H., Dogruman-Ai, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., and Sultan, N., 2011. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples: *Parasitology research*, v. 109, no. 4, p. 1045–1050.
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najar, F. Z., Roe, B. A., and Elshahed, M. S., 2009. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys: *Applied and environmental microbiology*, v. 75, no. 16, p. 5227–5236.

Original Research Paper

Identification of the origin and mechanism of reservoir souring of Esfand, Sivand, and Dena oil fields in the Persian Gulf basin with the use of microbial methods, DNA extraction, and molecular sequencing

Mohammad Sadeghi^{*1}, Morteza Tabaei¹, Behnam Rasekh², Mohammad Reza Kamali³

¹ Department of Mining Exploration, Faculty of Mining Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

²Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran

³Faculty of Engineering, Edith Cowan University, Western Australia, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 2022 June 22

Accepted: 2022 August 17

Available online: 2022 December 22

Keywords:

Sulfate-reducing bacteria

Reservoir souring

Hydrogen sulfide gas (H₂S)

Siri Island

Esfand, Sivand and Dena oil fields

DNA extraction

Molecular sequencing

Desulfovibrio

ABSTRACT

The purpose of this research is to identify the source of hydrogen sulfide gas using microbiological, geochemical studies on samples of output, input sea water, and injection water to Sivand (SIC C), Dana (SIC D), and Esfand (SIC E) located in the operational area of Siri Island. Therefore, in order to find out the origin of the reservoir souring of the oil fields of Siri Island, after the initial and library studies, as well as the reservoir characteristics, the history of injection and production of the fields, the most probable hypothesis of the reservoir souring in these fields can be caused by the processes of bacterial sulfate reduction (BSR). Therefore, the culture media required for the growth of sulfate-reducing bacteria was prepared to prove the hypothesis. After field sampling, some microbiology tests were performed on the samples. Since, in initial observations of the sampling, the change in the color of the samples from pink to black indicated that the samples contained sulfate-reducing bacteria. For this purpose, DNA extraction was carried out on the infected samples. In the complementary stage, the samples entered the molecular identification phase. The output of the results was that the bacteria with the highest frequency (about 81%) are Desulfovibrio bacteria, which can consume hydrogen in the oil reservoir and turn them into hydrogen sulfide gas. Therefore, the primary hypothesis of the research is proven. That is the main cause of reservoir souring of the oil fields in Siri Island, the processes related to SRB in which Desulfovibrio bacteria plays a significant role.

* Corresponding author: Mohammad Sadeghi; E-mail: Sadeghi1556@gmail.com

E-ISSN: 2645-4963; Copyright©2021 G.S. Journal & the authors. All rights reserved.

doi: 10.22071/GSJ.2022.347690.2008

dor: 20.1001.1.10237429.1401.32.4.26.2

