

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد کرمان

دانشکده علوم پایه ، گروه میکروبیولوژی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.)

رشته: زیست شناسی، گرایش: میکروبیولوژی

عنوان:

ارزیابی فعالیت بازدارندگی امواج رادیویی و بیوسایدها در استقرار باکتری‌های احیا کننده  
سولفات جدا شده از سیستم‌های آبرسانی در مقیاس آزمایشگاهی و میدانی

استاد راهنما:

دکتر محمد کارگر

استاد مشاور:

دکتر فرخ رخ بخش زمین

نگارش:

منا بهرامی

بهار ۱۳۹۵



بسمه تعالی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان  
پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد  
عنوان :

ارزیابی فعالیت بازدارندگی امواج رادیویی و بیوسایدها در استقرار باکتری های احیا کننده سولفات جدا شده  
از سیستم های آبرسانی در مقیاس آزمایشگاهی و میدانی

نگارش :

منا بهرامی

از این پایان نامه در تاریخ ۱۳۹۵ / ۲ / ۱۹ با حضور اساتید راهنما ، مشاور و هیات داوران در دانشگاه آزاد  
اسلامی واحد علوم و تحقیقات کرمان و اخذ نمره ۱۸ با موفقیت ، دفاع به عمل آمد و مورد تایید قرار  
گرفت

کارگر

استاد راهنما: دکتر محمد

استاد مشاور: دکتر فرخ رخ بخش زمین

داور: دکتر اشرف کریمی نیک

معاونت پژوهشی دانشگاه  
دکتر حجت بابایی

مدیر گروه تخصصی  
دکتر بابک خیرخواه

## چکیده

**اهمیت و هدف پژوهش:** باکتری‌های احیا کننده سولفات در مقادیر آلودگی کم آب مشکل ساز نیستند و تنها در مواقعی که تعداد آنها در محیط زیست‌شان کنترل نشود رشد سریعی کرده و نتیجه‌ی آن هجوم میکروبی می‌باشد که با ترشح پلیمر خارج سلولی سبب تشکیل لایه‌ای به نام پلیمر بر سطح شده و باعث خوردگی میکروبی می‌شود. بنابراین با توجه به اهمیت جلوگیری از خوردگی که سالانه خسارات زیادی به تاسیسات، در صنایع مختلف وارد می‌سازند، این باکتری‌ها به مسئله‌ی حیاتی تبدیل شده است. از طرفی استفاده از مواد ضد عفونی کننده در حذف بیوفیلم، دارای خطرات زیست محیطی می‌باشد. لذا پژوهش حاضر به حذف باکتری‌های احیا کننده سولفات با امواج رادیویی به عنوان روش جایگزین برای روش‌های مرسوم دارای هزینه‌های بالا پرداخته است.

**روش کار:** این مطالعه به صورت تجربی به منظور ارزیابی فعالیت بازدارندگی امواج رادیویی و بیوسایدها بر باکتری‌های احیا کننده سولفات صورت گرفت. بعد از نمونه گیری آب، خالص سازی کلونی های سیاه دارای توانمندی احیا سولفات با توجه به تفاوت‌های ظاهری شناسایی و جداسازی شدند و آنالیز مولکولی با روش PCR بر روی جدایه‌ها صورت گرفت. سپس فعالیت بازدارندگی امواج رادیویی با تاثیر آنها بر روی نمونه‌های خالص سازی شده ارزیابی گردید و در نهایت کارایی چهار بیوساید انتخابی بر روی توده‌ی میکروبی غالب بر تست‌های ASTM3946 و MIC بررسی شد.

**یافته‌ها:** اثر امواج رادیویی بر باکتری‌های احیا کننده سولفات در مدت زمان‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری را نشان داد که طی گذشت زمان اثر کاهنده چشم‌گیری دیده شد. همچنین بهترین تاثیر بیوسایدها بر این باکتری‌ها گلو تار آلدهید و کمترین اثر مربوط به تریس‌نیترو می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که امواج رادیویی توانایی کاهش و حذف باکتری‌های احیا کننده سولفات را داشته و از این رو انجام آزمون‌های تکمیلی به منظور انجام مطالعات گسترده‌تر و مقایسه آن با بیوسایدهای شیمیایی پیشنهاد می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** باکتری‌های احیا کننده سولفات، امواج رادیویی، بیوساید، آنالیز مولکولی

### ۳-۲- نمونه گیری

#### ۳-۲-۱- مکان نمونه گیری

در خصوص نمونه گیری از آب برای جداسازس باکتری‌های احیا کننده سولفات موثر در خوردگی بیولوژیک از آب مورد استفاده از مدار آب صنعتی خط تولید کارخانه سیمان ممتازان کرمان واقع در کیلومتر ۳۲ جاده کرمان-رفسنجان استفاده شد.

#### ۳-۲-۲- نحوه نمونه گیری

در مجموع در فواصل زمانی مختلف (هر دو هفته یکبار) از آب صنعتی مورد نظر نمونه برداری انجام و نمونه ها در ظرف در پیچدار استریل شیشه‌ای ریخته شد بطوریکه شیشه با دست و محیط اطراف برخورد نکند و مقدار آب ریخته شده طوری در نظر گرفته شد که نصف حجم شیشه خالی باشد. در مجموع در این مرحله ۲۰ نمونه آب جمع آوری و در شرایط سرمایی<sup>۱</sup> به آزمایشگاه ارسال و بلافاصله در محیط‌های کشت مورد نظر تلقیح<sup>۲</sup> شدند.

### ۳-۳- کشت نمونه های آب ارسالی به آزمایشگاه

برای بررسی وجود یا عدم وجود باکتری‌های احیا کننده سولفات از محیط های مایع اختصاصی رشد این گروه از باکتری‌ها شامل API و Post gate B استفاده شد. از کلیه نمونه‌های آب ارسالی به آزمایشگاه مقدار ۱ سی سی به طور جداگانه به ویال‌های حاوی ۵ سی سی محیط کشت‌های مذکور در شیشه‌های دارای درب الاستیکی تلقیح و به مدت ۲-۴ هفته در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و هر ۳ روز یکبار از لحاظ رشد و سیاه شدن محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج یادداشت گردید.

---

<sup>۱</sup> Cool Box

<sup>۲</sup> Inoculation

جدول ۳-۴ مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت API: (Sigma)

ماده‌ی شیمیایی	مقدار مواد در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر	ماده‌ی شیمیایی	مقدار مواد در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر
Yeast Extract (Merck-Germany)	1.0 gr/lit	Ferrous Ammonium Sulfate (NH <sub>4</sub> )Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Merck-Germany)	0.01 gr/lit
Magnesium Sulfate MgSO <sub>4</sub> (Merck-Germany)	0.2 gr/lit	Sodium Chloride NaCl (Merck-Germany)	10.0 gr/lit
Dipotassium Phosphate K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck-Germany)	0.01 gr/lit	Ascorbic Acid C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> (Merck-Germany)	0.1 gr/lit

pH= 7.4 ± 0.2

جدول ۳-۵ مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت Post gate B: (AMW)

ماده‌ی شیمیایی	مقدار مواد در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر	ماده‌ی شیمیایی	مقدار مواد در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر
Ascorbic Acid C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> (Merck-Germany)	0.1 gr/lit	Sulfate Heptahydrate FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck-Germany)	0.5 gr/lit
Magnesium Sulfate Heptahydrate MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck-Germany)	2.0 gr/lit	Sodium Lactate C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> (Merck-Germany)	3.5 gr/lit
Dipotassium Phosphate K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck-Germany)	0.5 gr/lit	Ammonium Chloride NH <sub>4</sub> Cl (Merck-Germany)	1.0 gr/lit
Calcium Sulfate CaSO <sub>4</sub> (Merck-Germany)	1.0 gr/lit	Thioglycolic Acid (Merck-Germany)	0.1 gr/lit

pH= 7.0 - 7.2



شکل ۲-۳ نمایی از محیط کشت های API و Post gate B ساخته شده

### ۳-۴- طراحی و ساخت سیستم گردش آب در مقیاس آزمایشگاهی

طراحی و ساخت سیستم گردش آب در مقیاس آزمایشگاهی به عنوان مدلی مشابه واحد صنعتی مورد نظر در کارخانه سیمان ممتازان کرمان به شرح ذیل انجام شد:

در این خصوص از یک ظرف پلاستیکی شفاف به ابعاد  $25 \times 15 \times 30$  سانتیمتر و حجم ۱۰ لیتر استفاده شد که در کف مخزن مورد نظر یک لوله خروجی آب در نظر گرفته شد که در ادامه یک شیر نمونه برداری آب روی آن نصب شد و سپس لوله در انتها به عنوان ورودی وارد مخزن مورد نظر شده و دستگاه مولد امواج رادیویی روی بدنه‌ی لوله در قسمت بالا نصب شد و عمل سیرکوله شدن آن توسط یک پمپ آب با قدرت ۵۰ وات انجام شد و برای تیمارهای مورد نظر دستگاه طراحی شده به کار گرفته شد.



شکل ۳-۳ نمایی از ساخت سیستم گردش آب به همراه دستگاه مولد امواج رادیویی

### ۳-۵- بررسی تاثیر امواج رادیویی روی کاهش یا حذف باکتری‌های احیا کننده سولفات در مقیاس آزمایشگاهی

در خصوص تاثیر امواج روی باکتری‌های احیا کننده سولفات، مخزن دستگاه طراحی شده با ۶ لیتر از آب مورد نظر که قبلاً حضور باکتری‌های احیا کننده سولفات در آنها اثبات شده بود پر شد و قبل از تیمار نمونه آب با امواج رادیویی، یک نمونه از آب تهیه و برای کشت باکتری‌های مورد نظر به آزمایشگاه ارسال شد و در ادامه در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، و ۱۸۰ دقیقه امواج رادیویی روی آب تاثیر داده شد و نمونه‌ها به طور جداگانه تهیه و به آزمایشگاه ارسال شدند و کلیه نمونه‌ها طبق روش بیشترین تعداد احتمالی (روش ۳ لوله‌ای) به محیط‌های API تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲-۴ هفته گرمخانه گذاری و روزانه از لحاظ رشد و عدم رشد بررسی و نتایج بر اساس جداول MPN<sup>۳</sup> محاسبه و یادداشت گردید.

<sup>3</sup> Most Probable Number



## فصل چهارم

### نتایج

#### ۴-۱- تایید حضور باکتری‌های احیا کننده سولفات در نمونه آب کارخانه سیمان ممتازان کرمان

بر اساس بند ۳ روش کار، وجود و عدم وجود باکتری‌های احیا کننده سولفات در آب کارخانه سیمان مورد بررسی و در محیط‌های API و Post gate B تلقیح داده شدند و با ایجاد رنگ سیاه و تولید بوی نامطبوع در محیط کشت‌ها حضور این باکتری‌ها در نمونه آب مورد تایید قرار گرفت.



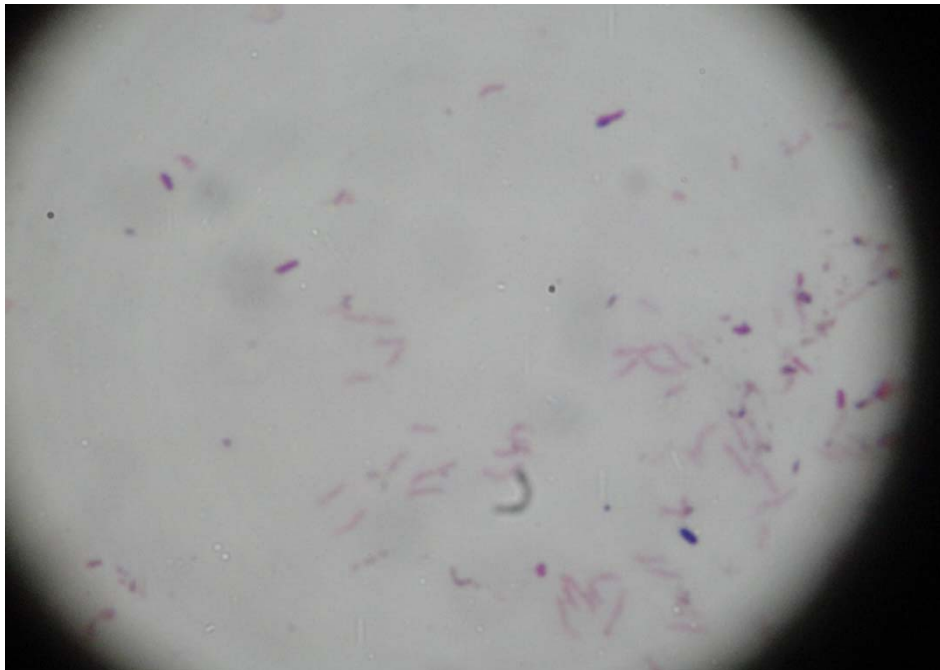
شکل ۴-۱: تایید وجود باکتری‌های احیا کننده سولفات در نمونه آب

#### ۴-۲- ارزیابی کلونی‌های دارای توانمندی احیا سولفات و جداسازی و خالص‌سازی آنها

به منظور جداسازی جدایه‌های مورد نظر طبق بند ۷ روش کار با هدف بدست آوردن کلونی خالص، کلونی‌های باکتری‌های احیا کننده سولفات با توجه به تفاوت‌های ظاهری که با ایجاد کلونی‌های سیاه رنگ بوده، شناسایی و جداسازی گردیدند و بر این اساس در نتیجه‌ی تهیه گسترش مرطوب و با درشت‌نمایی کم میکروسکوپ تصویر باکتری‌های متحرک و مایچی دیده شد و پس از رنگ آمیزی گرم با کلونی‌های بدست آمده باکتری‌های قرمز رنگ با لنز ۱۰۰ مشاهده شد که نشان دهنده‌ی گرم منفی بودن باکتری‌های احیا کننده سولفات است.



شکل ۴-۲: تشکیل کلونی‌های سیاه رنگ توسط باکتری‌های احیا کننده سولفات بر محیط کشت API



شکل ۴-۳: باکتری‌های احیا کننده سولفات در زیر میکروسکوپ با درشت نمایی ۱۰۰ در رنگ آمیزی گرم

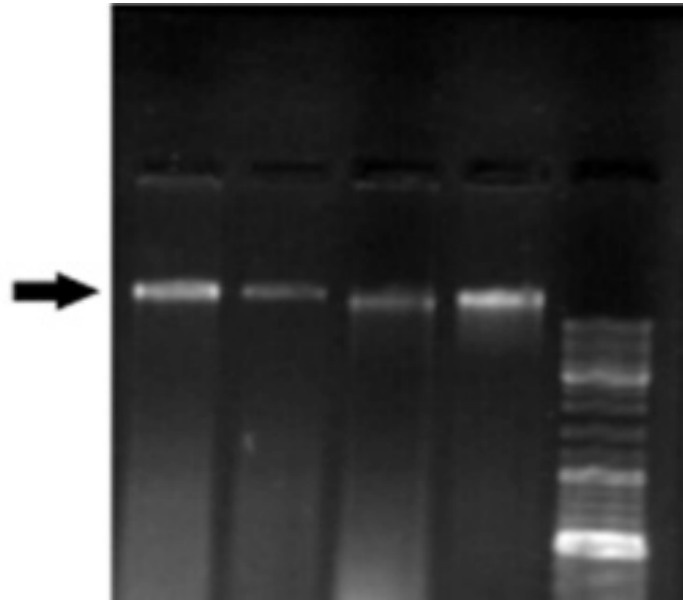
#### ۴-۳- نتایج تشخیص هویت جدایه‌های مشکوک به باکتری‌های احیا کننده سولفات

با توجه به بدست آوردن کلونی‌های خالص از بند ۹ و ۷ روش کار و ارسال آنها به آزمایشگاه جهت آنالیز مولکولی، با روش PCR نتایج به شرح زیر بدست آمد:

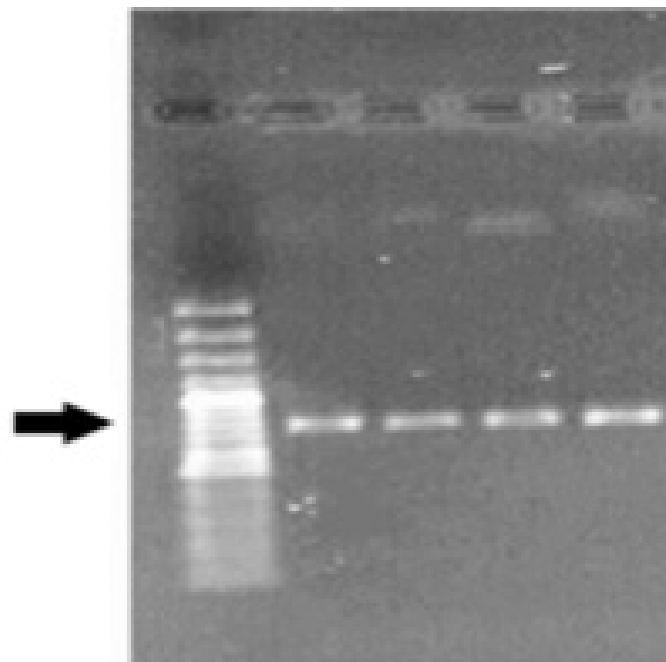


شکل ۴-۴: کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت Post gate B Agar و ویال‌های سرمی

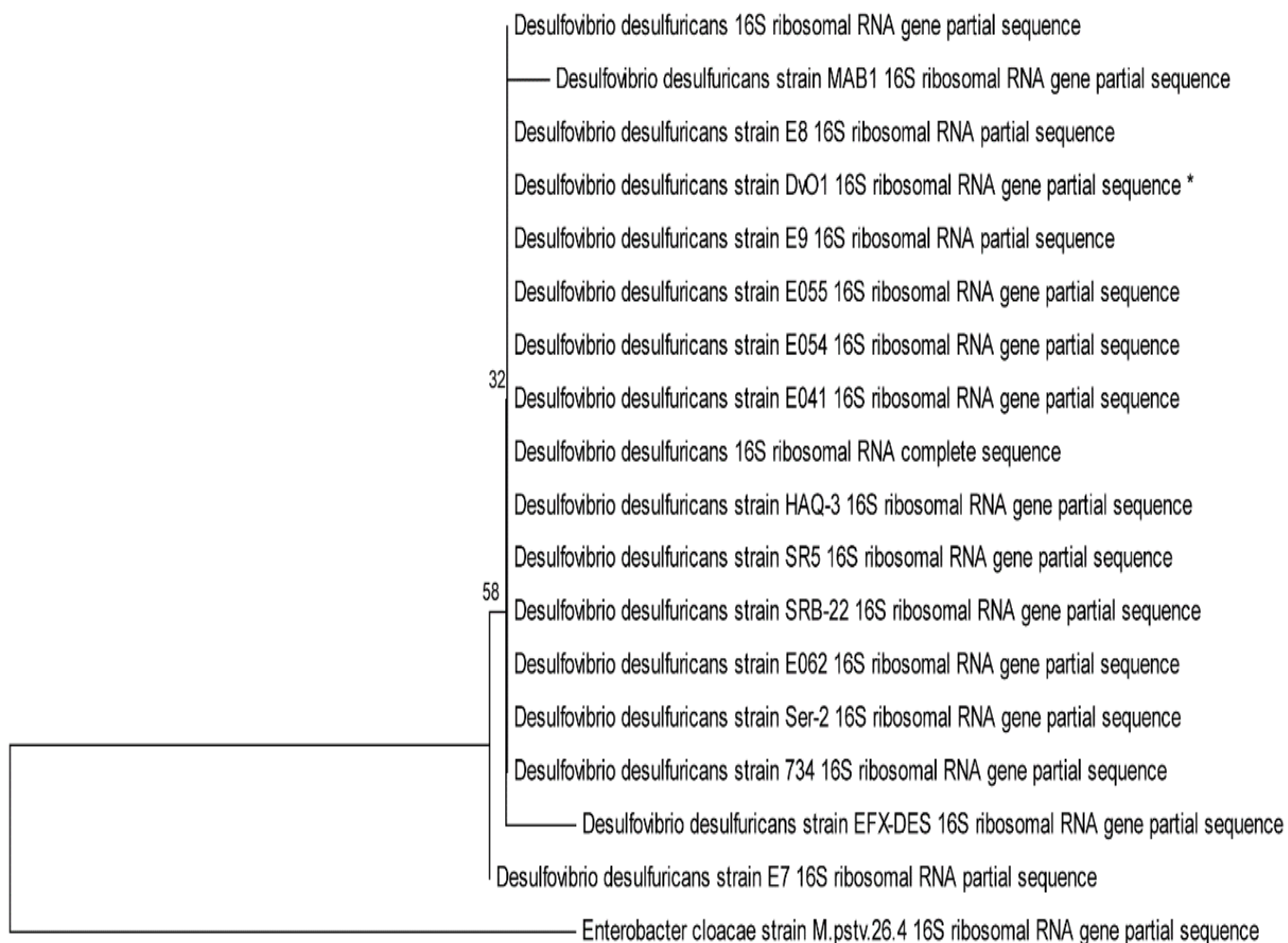
با توجه به رشد باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی و مشاهدات میکروسکپی و شناسایی مولکولی برای تایید نتایج حاصل از تحقیق، برای تعیین غلظت DNA از اسپکتوفتومتری استفاده شد. نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر محاسبه و غلظت DNA ۱/۸ گزارش شد. وجود باند قوی روی زل آگارز ۱٪ پس از الکتروفورز نشان دهنده‌ی استخراج مناسب DNA بوده است. در شکل ۴-۵ استخراج DNA نشان داده شده است. با استفاده از پرایمر یونیورسال ناحیه ژنومی استخراج و تکثیر شد. پس از الکتروفورز باند در ناحیه ۸۰۰ bp مربوط به نمونه قابل مشاهده بود که در شکل ۴-۶ قابل مشاهده است. در نهایت محصول PCR مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی مولکولی و بلاست توالی‌ها تایید کننده شباهت ژنتیکی باکتری‌های شناسایی شده در آب کارخانه سیمان ممتازان کرمان با باکتری دسولفوویبریو دسولفوریکانس و دسولفوویبریو ولگاریس شناسایی شد.



شکل ۴-۵: محصول ژل الکتروفورز استخراج DNA

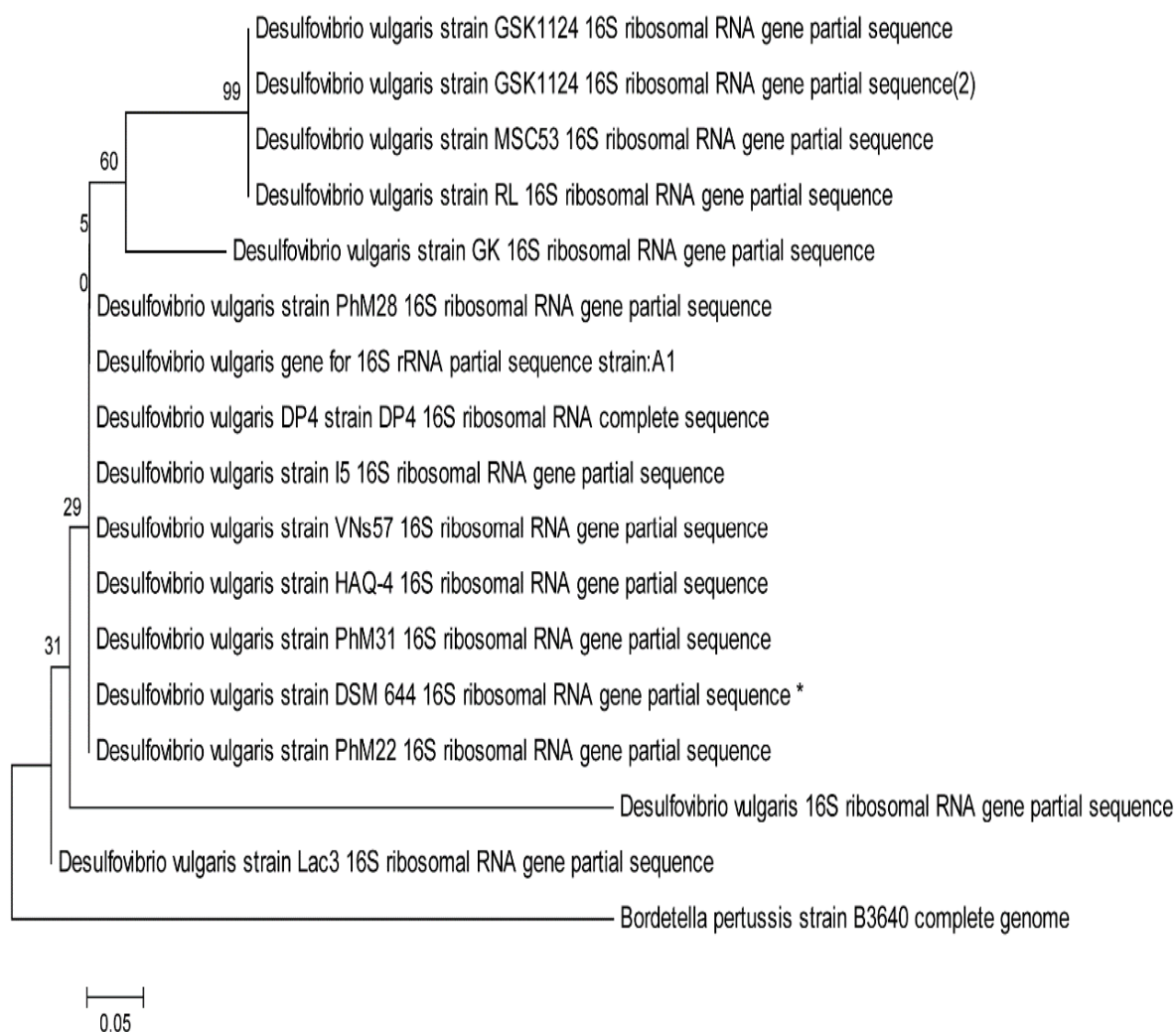


شکل ۴-۶: محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز



0.02

شکل ۴-۷: درخت فیلوژنیک باکتری *Desulfovibrio desulfuricans* به روش Neighbor joining



شکل ۴-۸: درخت فیلوژنیک *Desulfovibrio vulgaris* به روش Neighbor joining

#### ۴-۴- نتایج تاثیر امواج رادیویی بر کاهش یا حذف باکتری‌های احیا کننده سولفات در شرایط آزمایشگاهی

دبی آب در سیستم نمونه آزمایشگاهی قریب ۵۰۰ لیتر در ساعت بود که بر اساس حجم آب در گردش، نرخ عبور آب از دستگاه رسوب‌زای هیدروپت قریب ۷۵ مرتبه در ساعت اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده از کشت ۳ لوله‌ای هریک از نمونه‌های آب مورد آزمون در فواصل زمانی مختلف، در جدول زیر طبق روش MPN بررسی شده اند:

جدول ۴-۱ نتایج اثر امواج رادیویی بر باکتری‌های SRBs در مقیاس آزمایشگاهی

زمان	تعداد نتایج مثبت شده در ۱۰ سی‌سی			تعداد نتایج مثبت شده در ۱ سی‌سی			تعداد نتایج مثبت شده در ۰/۱ سی‌سی			MPN
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
نمونه اولیه	+	+	+	+	+	+	+	+	+	۱۱۰<
۳۰ دقیقه	+	+	+	+	+	+	+	+	+	۱۱۰<
۶۰ دقیقه	+	+	+	+	+	+	+	+	-	۱۱۰<
۹۰ دقیقه	+	+	+	+	+	+	+	+	-	۱۱۰
۱۲۰ دقیقه	+	+	+	+	+	+	+	-	-	۴۶
۱۶۰ دقیقه	+	+	+	+	-	-	-	-	-	۴/۳
۱۸۰ دقیقه	+	+	-	+	-	-	-	-	-	۱/۵

با توجه به نتایج ذکر شده در جدول ۴-۱ می‌توان نتیجه گرفت پس از ۳ ساعت گردش آب و عبور از دستگاه در نمونه آزمایشگاهی میزان باکتری‌های احیا کننده سولفات به صفر میل کرده و حدود ۲۲۵ مرتبه عبور آب از دستگاه اثرات حذف این باکتری‌ها دیده می‌شود.

$$\text{کارایی حذف} = \frac{\text{تعداد باکتری‌ها در روز آخر} - \text{تعداد باکتری‌ها در روز اول}}{\text{تعداد باکتری‌ها در روز اول}} \times 100$$

$$\text{کارایی حذف در مقیاس آزمایشگاهی} = \frac{110-1/5}{110} \times 100 \longrightarrow 98/6$$