بسم الله الرحمن الرحيم

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 :

دکترفرخ 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 سیستم‌های آبرسانی در مقیاس آزمایشگاهی و میدانی

نگارش :

منا بهرامی

از این پایان نامه در تاریخ ۱۹/ ۲ / ۱۳۹۵ 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

استاد راهنما: دکتر محمد کارگر

استاد مشاور: دکتر فرخ رخ بخش زمین

داور: دکتر اشرف کریمی نیک

مدیر گروه تخصصی
دکتر بابک خیرخواه

معاونت پژوهشی دانشگاه
دکتر حجت بابایی

چکیده

اهمیت و هدف پژوهش: باکتری‌های احیا کننده سولفات در مقادیرآلودگی کم آب مشکل‌ساز نیستند و تنها در مواقعی که تعداد آنها در محیط زیست‌شان کنترل نشود رشد سریعی کرده و نتیجهِی 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 باتوجه به اهمیت جلوگیری از خوردگی که سالیانه خسارات زیادی به تاسیسات ، در صنایع مختلف وارد می‌سازند، این باکتری‌ها به مسئله‌ی حیاتی تبدیل شده است. ازطرفی استفاده از مواد ضدعفونی کننده در حذف بیوفیلم، دارای خطرات زیست محیطی می‌باشد. لذا پژوهش حاضر به حذف باکتری‌های احیاکننده 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 برباکتری‌های 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 چهاربیوساید انتخابی بر روی توده‌ی میکروبی غالب بر تست‌های ASTM3946 و MIC بررسی شد.

یافته‌ها: اثر امواج رادیویی بر باکتری‌های احیا کننده سولفات درمدت زمان‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری را نشان داد که طی گذشت زمان اثر کاهنده چشم‌گیری دیده شد. همچنین بهترین تاثیربیوسایدها بر این باکتری‌ها گلوتارآلدهید و کمترین اثر مربوط به تریس‌نیترو می باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان دادکه 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 نمونه‌گیری

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 نمونه‌گیری

در مجموع در فواصل زمانی مختلف (هردوهفته یکبار)ازآب 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 دراین مرحله ۲۰ نمونه آب جمع آوری و در شرایط سرمایی[1] به آزمایشگاه ارسال و بلافاصله در محیط‌های کشت مورد نظر تلقیح[2] 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 سی‌سی به طورجداگانه به ویال‌های حاوی۵ سی‌سی محیط کشت‌های مذکور در شیشه‌های دارای درب الاستیکی تلقیح و به مدت ٤-۲ هفته در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس گرمخانه گذاری شدند و هر ۳ روز یکبار از لحاظ رشد و سیاه شدن محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج یادداشت گردید.

[1] Cool Box
[2] Inoculation

جدول۳-٤ مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت API:(Sigma)

مقدار مواد در ۱۰۰۰سی‌سی آب مقطر	مادهٔ شیمیایی	مقدار مواد در ۱۰۰۰سی‌سی آب مقطر	مادهٔ شیمیایی
0.01 gr/lit	Ferrous Ammonium Sulfate $(NH_4)Fe(So_4)_2.6H_2O$ (Merck-Germany)	1.0 gr/lit	Yeast Extract (Merck-Germany)
10.0 gr/lit	Sodium Chloride NaCl (Merck-Germany)	0.2 gr/lit	Magnesium Sulfate $MgSo_4$ (Merck-Germany)
0.1 gr/lit	Ascorbic Acid $C_6H_8O_6$ (Merck-Germany)	0.01 gr/lit	Dipotassium Phosphate K_2HPo_4 (Merck-Germany)

pH= 7.4 ± 0.2

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

مقدار مواد در ۱۰۰۰سی‌سی آب مقطر	مادهٔ شیمیایی	مقدار مواد در ۱۰۰۰سی‌سی آب مقطر	مادهٔ شیمیایی
0.5 gr/lit	Sulfate Heptahydrate $FeSo_4.7H_2O$ (Merck-Germany)	0.1 gr/lit	Ascorbic Acid $C_6H_8O_6$ (Merck-Germany)
3.5 gr/lit	Sodium Lactate $C_3H_5NaO_3$ (Merck-Germany)	2.0 gr/lit	Magnesium Sulfate Heptahydrate $MgSo_4.7H_2O$ (Merck-Germany)
1.0 gr/lit	Ammonium Chloride NH_4Cl (Merck-Germany)	0.5 gr/lit	Dipotassium Phosphate K_2HPo_4 (Merck-Germany)
0.1 gr/lit	Thioglycolic Acid (Merck-Germany)	1.0 gr/lit	Calsium Sulfate $CaSO_4$ (Merck-Germany)

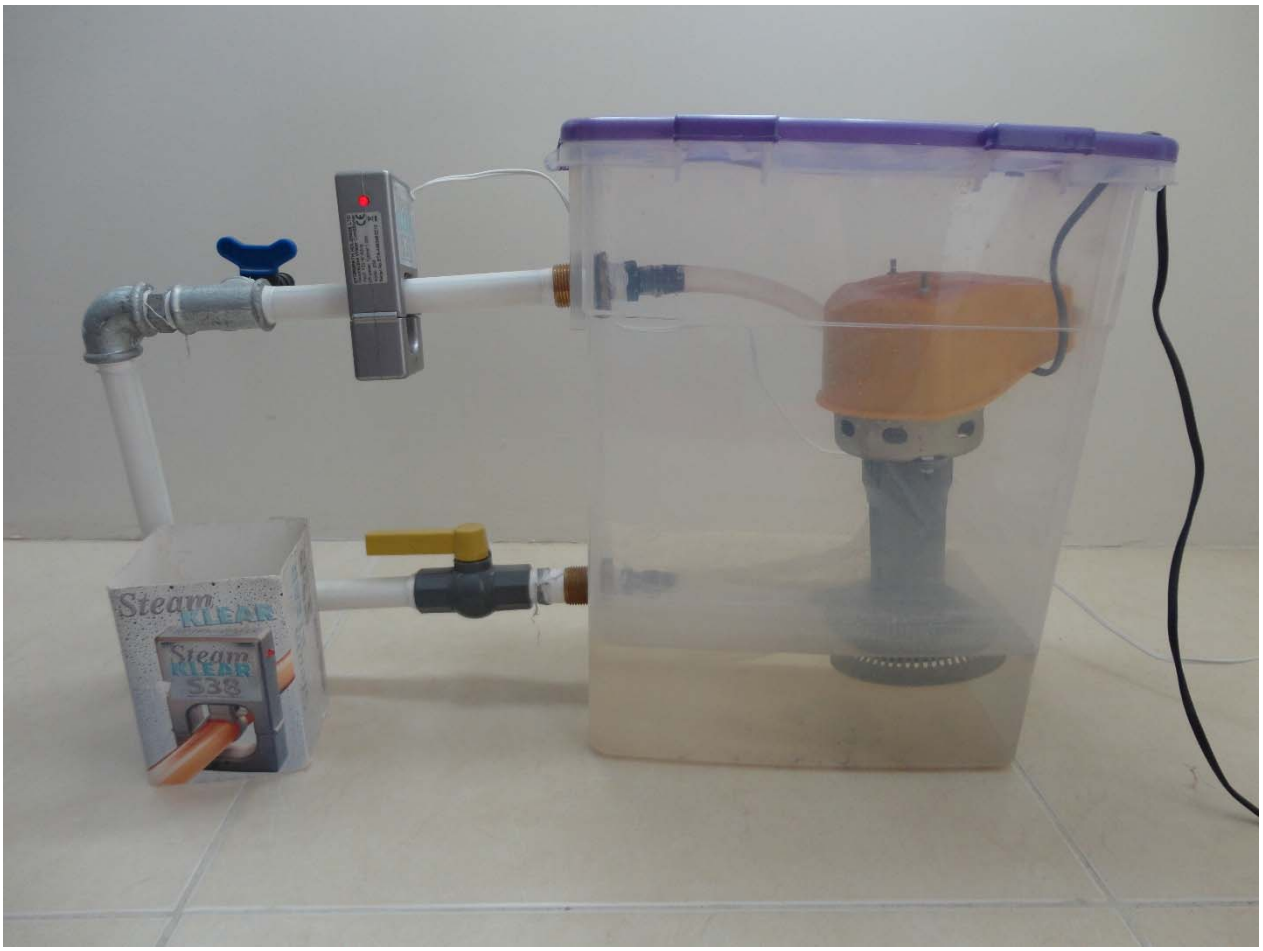
pH= 7.0 - 7.2

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

۳-٤- 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 ۳۰×۱۵×۲۵ سانتیمتر و حجم ۱۰ لیتراستفاده شد که در کف مخزن مورد نظر یک لوله خروجی آب در نظر گرفته شد که در ادامه یک شیر نمونه‌برداری 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 ٦ لیتر از آب مورد نظر که قبلا 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 زمانی۳۰، ٦۰، 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 نمونه ها طبق روش بیشترین تعداد احتمالی (روش ۳ لوله‌ای) به محیط های API تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سیلسیوس به مدت ٤-۲ هفته گرمخانه گذاری و روزانه از لحاظ رشد و عدم رشد بررسی و نتایج بر اساس جداول MPN[3] محاسبه و یادداشت گردید.

[3] Most Probable Number

فصل چهارم

نتایج

٤-١- تایید حضور باکتری‌های احیا کننده سولفات در نمونه آب کارخانه سیمان ممتازان کرمان

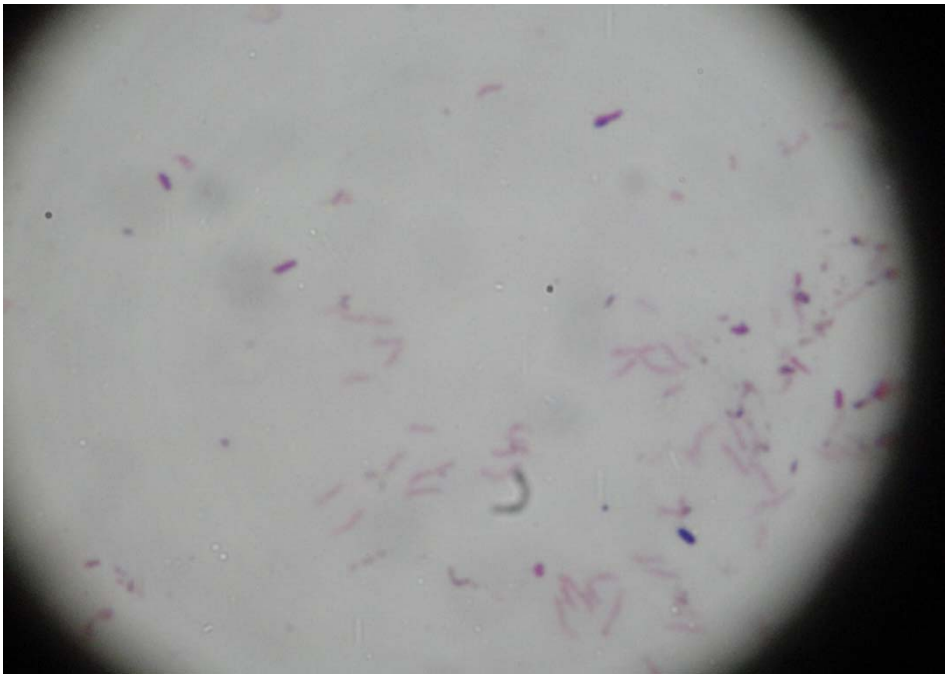
بر اساس بند ۳ روش کار، وجود و عدم وجود باکتری‌های احیا کننده سولفات در آب کارخانه سیمان مورد بررسی و در محیط‌های API و Post gate B تلقیح داده شدند و با ایجاد رنگ سیاه و تولید بوی نامطبوع در محیط کشت‌ها حضور این باکتری‌ها در نمونه آب مورد تایید قرار گرفت.

شکل ٤-١: تایید وجود باکتری‌های احیا کننده سولفات در نمونه آب

٤-٢- ارزیابی کلونی‌های دارای توانمندی احیا سولفات و جداسازی و خالص‌سازی آنها

به منظور جداسازی جدایه های مورد نظر طبق بند۷ 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 درشت نمایی کم میکروسکوپ تصویر باکتری‌های متحرک و ماپیچی 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 ٤-٢: تشکیل کلونی‌های سیاه رنگ توسط باکتری‌های احیا کننده سولفات بر محیط کشت API



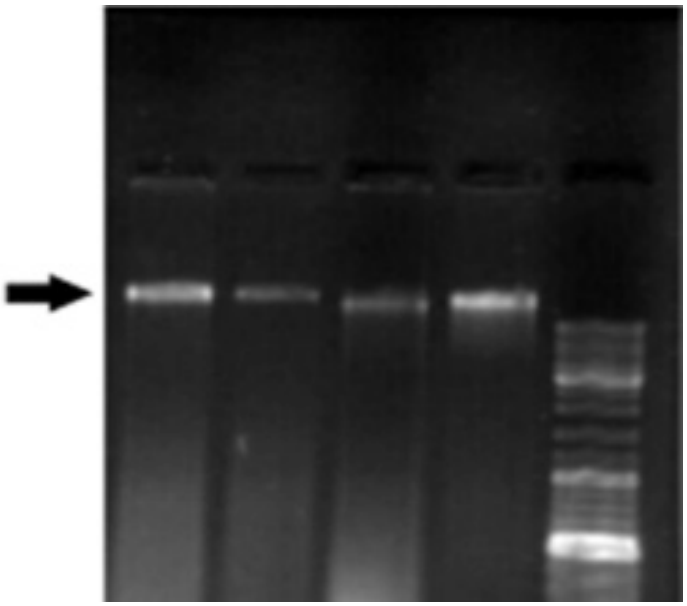
شکل ٤-٣: باکتری‌های احیا کننده سولفات در زیر میکروسکوپ با درشت نمایی ۱۰۰ در رنگ آمیزی گرم

٤-٣- نتایج تشخیص هویت جدایه‌های مشکوک به باکتری‌های احیا کننده سولفات

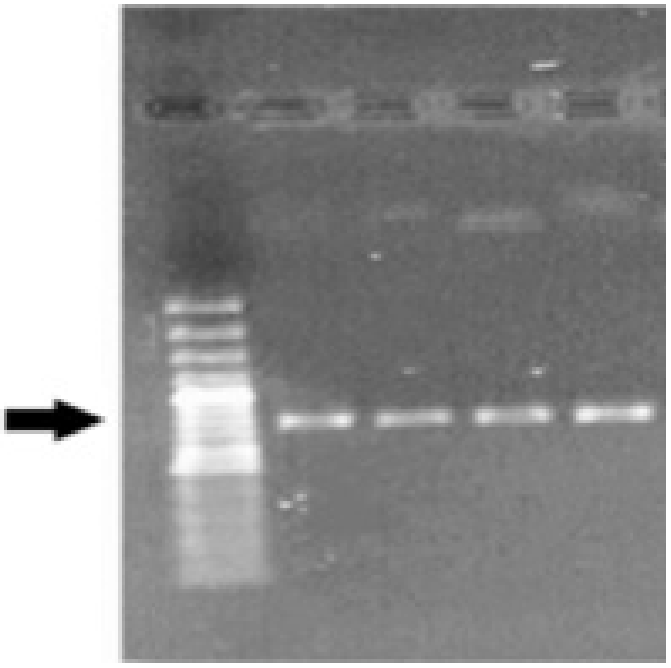
با توجه به بدست آوردن کلونی‌های خالص از بند ۷و۹ روش کار وارسال آنها به آزمایشگاه جهت آنالیز مولکولی، با روش PCR نتایج به شرح زیر بدست آمد:

شکل ٤-٤: کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت Post gate B Agar و ویال‌های سرمی

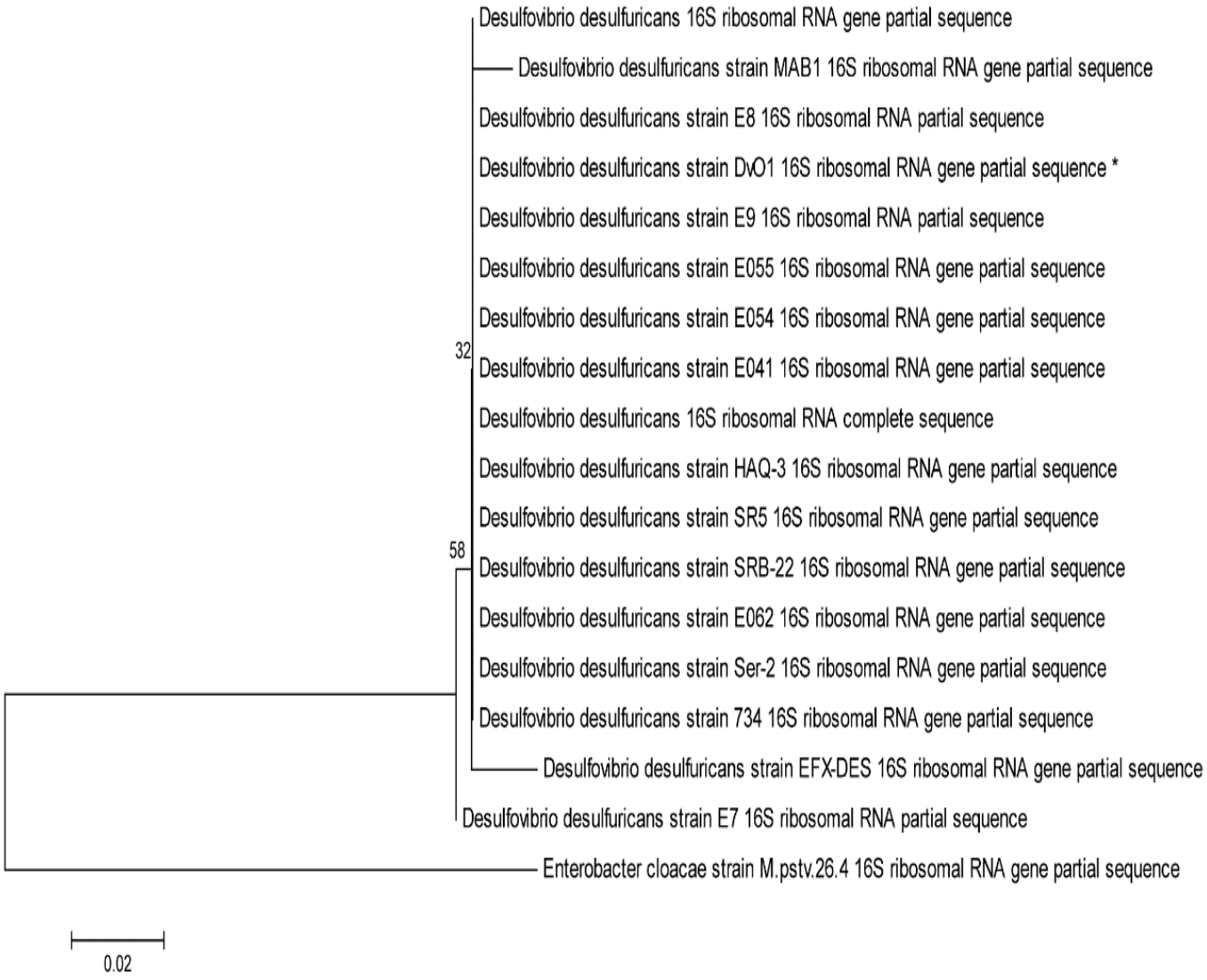
با توجه به رشد باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی و مشاهدات میکروسک.پی وشناسایی مولکولی برای تایید نتایج حاصل از تحقیق، برای تعیین غلظت DNA از اسپکتوفتومتری استفاده شد. نسبت جذب ۲٦۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر محاسبه و غلظت DNA ۱/۸ گزارش شد. وجود باند قوی روی زل آگارز ۱٪ پس از الکتروفورز نشان دهنده‌ی استخراج مناسب DNA بوده است. در شکل ٤-٥ استخراج DNA نشان داده شده است.با استفاده از پرایمر یونیورسال ناحیه ژنومی استخراج و تکثیر شد. پس از الکتروفورز باند در ناحیهbp ۸۰۰ مربوط به نمونه قابل مشاهده بود که در شکل ٤-٦ قابل مشاهده است. در نهایت محصول PCR مورد توالی یابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی مولکولی و بلاست توالی‌ها تایید کننده شباهت ژنتیکی باکتری‌های شناسایی شده درآب کارخانه سیمان ممتازان کرمان با باکتری دسولفوویبریو دسولفوریکانس و دسولفوویبریو ولگاریس شناسایی شد.



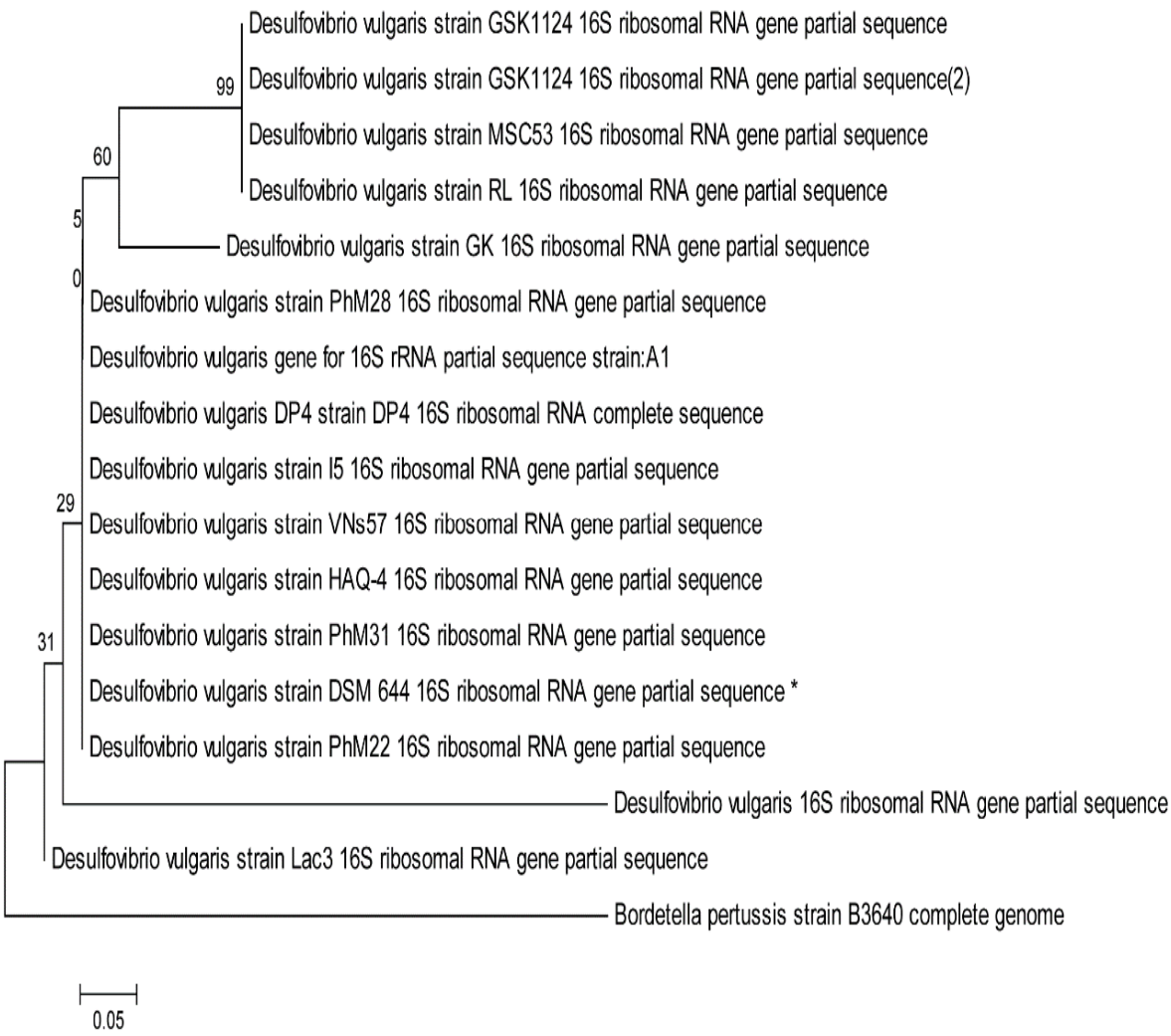
شکل ٤-٥: محصول ژل الکتروفورز استخراج DNA



شکل٤-٦: محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز



شکل ٤-٧ :درخت فیلوژنیک باکتری**Desulfovibrio desulforicans** به روش **Neighbor joining**



شکل ٤-٨ :درخت فیلوژنیک **Desulfovibrio vulgaris** به روش **Neighbor joining**

٤-٤- نتایج تاثیر امواج رادیویی برکاهش 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 رسوب‌زدای هیدروپث 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 ٤-١ نتایج اثر امواج رادیویی بر باکتری‌هایSRBs در مقیاس آزمایشگاهی

MPN	تعداد نتایج مثبت شده در۰/۱ سی‌سی			تعداد نتایج مثبت شده در ۱ سی‌سی			تعداد نتایج مثبت شده در ۱۰ سی‌سی			زمان
۱۱۰<	+	+	+	+	+	+	+	+	+	نمونه اولیه
۱۱۰<	+	+	+	+	+	+	+	+	+	۳۰ دقیقه
۱۱۰<	–	+	+	+	+	+	+	+	+	٦۰ دقیقه
۱۱۰	–	+	+	+	+	+	+	+	+	۹۰ دقیقه
٤٦	–	–	+	+	+	+	+	+	+	۱۲۰ دقیقه
٤/۳	–	–	–	–	–	+	+	+	+	۱٦۰ دقیقه
۱/۵	–	–	–	–	–	+	–	+	+	۱۸۰ دقیقه

با توجه به نتایج ذکر شده در جدول ٤-١ 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.

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

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