



تعیین حضور باکتری‌های وابسته به آهن در آب‌ها

(شور، تولیدی و هیدرولیتیک).

مورد استفاده در صنایع نفت، گاز و پتروشیمی، صنایع هوایی، صنایع غذایی، آب و فاضلاب و غیره

آهن در متابولیسم انرژی نقش مهمی دارد به همین دلیل رقابت زیستی زیادی برای آن وجود دارد. باکتری‌های وابسته به آهن (Iron-Related Bacteria) به گروهی از باکتری‌ها گفته می‌شود که متابولیسم خود را با دریافت کربن از دی‌اکسیدکربن هوا و گرفتن انرژی مورد نیاز خود از آهن محلول انجام می‌دهند. این باکتری‌ها باعث انباشت آهن در بخش‌هایی که تجمع رشد میکروبی (بیوفیلم - اسلایم) وجود دارد، می‌شوند. معمولاً این انباشت آهن به شکل کریستال‌های فریک آهن در قالب اکسیدها، هیدروکسیدها و گاهی کرومات‌ها است. این فرایند باعث ایجاد رنگ قرمز - قهوه‌ای (آجری) می‌شود. نتیجه فعالیت این باکتری‌ها می‌تواند باعث ایجاد خوردگی در تاسیسات صنایع مختلف از جمله نفت، گاز، آب و فاضلاب و همچنین ایجاد بو، طعم بد و رنگ قرمز در آب آشامیدنی شود.

شناسایی و شمارش باکتری‌های وابسته به آهن به دلیل تنوع گروه‌های باکتری متعلق به آن (باکتری‌های احیاکننده آهن و باکتری‌های اکسیدکننده آهن) دشوار است. کیت MicrobCheck™ IRB قادر به شناسایی و تخمین نسبی جمعیت هر دو دسته از باکتری‌های مربوط به آهن است.

تست کیت MicrobCheck™ IRB به صورت یک فالكون ۵۰ ml حاوی محیط کشت و گوی شناور طراحی شده است.

توصیه تولیدکننده

از تماس با جداره داخلی فالكون و در آن خودداری کنید و در شرایط استریل آزمایش را انجام دهید. پس از باز کردن در فالكون، آن را وارونه، به صورتی که کف آن به سمت زمین باشد، روی سطحی تمیز قرار دهید. دقت کنید که از جایگاه مناسب نمونه‌گیری را انجام دهید.

توجه داشته باشید که باکتری‌های IRB به طور عمده بر روی سطوح و نه مستقیماً در آب جاری، رشد می‌کنند. به همین دلیل در صورتی که نمونه‌برداری فقط از آب جاری انجام شود، آزمایش می‌تواند علی‌رغم وجود باکتری‌های مربوطه، با نتیجه منفی کاذب همراه باشد. برای رها شدن باکتری‌های IRB درون آب، لازم است کمی شرایط محیط تغییر پیدا کند. مثلاً پمپ‌زنی آب تغییر پیدا کند یا از یک شوک شیمیایی ملایم استفاده شود. این شوک می‌تواند با دوز کم هیپوکلریت انجام شود.

روش انجام تست

آماده‌سازی

حداقل ۲۵ ml نمونه جمع‌آوری کنید.

مقدار ۱۹ ml از نمونه را داخل فالكون ریخته و در آن را ببندید.

پس از آنکه نمونه اضافه شد، فالكون را تکان ندهید یا نچرخانید. اجازه دهید گوی خود بر روی سطح مایع شناور شود.

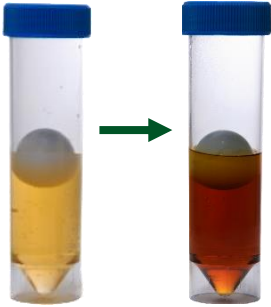
روی فالكون، تاریخ و نام نمونه را یادداشت کنید.



گرماگذاری

فالكون را در دمای اتاق (۲۵ - ۲۱ °C) و به دور از نور خورشید گرماگذاری کنید. نمونه را به صورت روزانه به مدت ۸ روز مشاهده کنید. تاریخ اولین واکنش مشاهده شده را یادداشت کنید. در صورت منفی بودن واکنش، نمونه را تا روز چهاردهم نگه داشته و روزانه بررسی کنید.

حضور / عدم حضور



الگوی از نتایج مثبت در کیت MicrobCheck™ IRB تعریف شده است که می تواند مشخص کننده دو ویژگی اصلی باکتری های IRB، یعنی هوازی یا بی هوازی بودن آنها باشد.

باکتری های IRB بی هوازی با تشکیل رسوب قهوه ای - نارنجی، خاکستری و یا سیاه رنگ در کف فالكون مشخص می شوند.

باکتری های IRB هوازی با تشکیل لایه ای قهوه - نارنجی در اطراف گوی شناور مشخص می شوند. حباب گاز و یا لایه ای از کف هم ممکن است در این حالت در اطراف گوی مشاهده شود.

توجه داشته باشید که در شرایطی که نمونه آب از گاز اشباع باشد، ممکن است حباب های گاز بر

روی دیواره فالكون تشکیل شود. لازم به ذکر است که این حباب های گاز نشانه فعالیت باکتری نیست. تنها حباب هایی که در اطراف گوی شناور مشاهده می شوند نشان از فعالیت باکتری های IRB است.

جمعیت متنوعی از باکتری های IRB هوازی و بی هوازی با تغییر رنگ محیط به قهوه ای - نارنجی در تمام طول فالكون همراه است که نشان از وجود ترکیبی از باکتری های IRB با نیازهای هوایی متنوع، از بی هوازی تا کم هوازی و هوازی است.

الگوهای واکنش

در تست کیت MicrobCheck™ IRB مجموعه ای از واکنش ها قابل مشاهده است. برای بهتر دیدن این واکنش ها بهتر است فالكون ها در جلوی نور بررسی شوند تا الگوی رشدی بهتر مشخص شود.

باید توجه کرد که هر کدام از واکنش های ذکر شده به روش منحصرفردی توسط سوبه های مختلف تولید می شوند. بنابراین، می توان گفت هیچ فرم خاصی از هیچ کدام از الگوهای واکنشی ذکر شده وجود ندارد زیرا این الگوها توسط مدل رشد باکتری ها کنترل می شوند.

رشد به صورت ابری (CL): وقتی جمعیتی از باکتری های هوازی وجود داشته باشد، رشد اولیه ممکن است به صورت ابری یا پفی باشد. این رشد با رنگ خاکستری دیده می شود. در صورتی که فالكون کمی چرخانده شوند، ابرها برای حفظ موقعیت در فالكون حرکت می کنند. به طور معمول محیط در زیر منطقه ابری، تاریک تر و در بالای آن، روشن تر است.

رشد به صورت ژل قهوه ای (BG): در این واکنش، رشد در کف فالكون به صورت حالت ژله ای با رنگ قهوه ای رخ می دهد. در صورتی که فالكون چرخانده شود یا ژل از کف فالكون جدا شود، ساختار و موقعیت خود را حفظ می کند. ژل قهوه ای می تواند تمام مخروط داخلی کف فالكون را اشغال کند. معمولاً محیط در بالای این ژل کاملاً شفاف و بی رنگ است. حجم ژل قهوه ای در ابتدا افزایش می یابد و بعد از آن کم می شود.

رشد به صورت ابر قهوه ای (BC): به جز زمانی که جمعیت باکتری های IRB در نمونه زیاد باشد، واکنش BC، معمولاً دومین واکنش است و اغلب به دنبال CL، FO یا RC رخ می دهد. این واکنش به صورت محلول قهوه ای کثیفی دیده می شود و ممکن است با حلقه قهوه ای در اطراف گوی همراه باشد.



رشد به صورت فوم (FO): این واکنش به آسانی قابل تشخیص است زیرا حباب‌های گاز یک حلقه فومی در اطراف گوی ایجاد می‌کنند. گاهی اوقات حباب‌ها در اطراف بیش از ۵۰٪ از سطح زیرین توپ تجمع می‌کنند. گاهی حباب‌های گاز بر روی دیواره‌های فالدکون جمع می‌شوند اما تا زمانی که در اطراف گوی نباشند، قابل قبول نیست. در این الگو، محلول معمولاً شفاف باقی می‌ماند اما با تغییر رنگ به زرد یا سبز همراه است. گاهی حباب‌ها ممکن است با اسلایم پوشانده شوند. در این صورت حباب‌ها با رنگ‌های مختلفی مانند قهوه‌ای، نارنجی، زرد یا خاکستری دیده می‌شوند. زمانی که اسلایم با فوم ترکیب می‌شوند، ساختار فوم به صورتی سفت می‌شود که گوی را از محلول بلند می‌کند یا آن را به زیر سطح محلول فرو می‌برد. الگوی فوم با شرایطی که به صورت به دلیل شرایط فوق اشباع اکسیژن، حباب تولید می‌شود، متفاوت است. حباب‌های تصادفی معمولاً بعد از ۲ روز از بین می‌روند. الگوی رشد فوم معمولاً نشانگر نمونه‌ای است که جمعیت باکتری بی‌هوازی زیادی دارد و با تست مثبت در MicrobCheck™ SRB نیز همراه است.

رشد به صورت قرمز و کمی ابری (RC): محیط به صورت محلول شفاف تا قهوه‌ای تیره باقی می‌ماند. معمولاً بعد از مشاهده BR در اطراف گوی، در محلول نیز ساختار ابری BC تشکیل می‌شود.

رشد به صورت حلقه قهوه‌ای (BR): حلقه‌ای از اسلایم قهوه‌ای - قرمز تا قهوه‌ای تیره در اطراف گوی تشکیل می‌شود. حلقه تشکیل شده معمولاً محکم است و بیش از ۳ mm عرض دارد. در برخی موارد، واکنش BR می‌تواند گوی را به داخل دیواره فالدکون قفل کند. در این صورت وقتی فالدکون برعکس شود، گوی در جای خود باقی می‌ماند و محیط در بالای گوی قرار می‌گیرد.

رشد به صورت ابر سبز (GC): محلول به رنگ سبز تغییر می‌یابد. هر چند ساختارهای مشخص ابر یا ژل مانند تشکیل نمی‌شود اما در محیط ساختارهای ابری مشاهده می‌شود. حلقه اسلایم در اطراف گوی تشکیل نمی‌شود. ویژگی ابری محلول به تدریج افزایش پیدا می‌کند و محلول به رنگ سبز تیره تبدیل می‌شود. هرچقدر مقدار ساختارهای ابری و رنگ سبز محلول بیشتر شود، احتمال رخداد واکنش BR نیز افزایش پیدا می‌کند.

رشد به صورت مایع سیاه (BL): معمولاً دومین یا سومین واکنش نسبت به واکنش اول است. BL به صورت مناطق سیاه بزرگ در کف و همچنین دیواره‌های فالدکون دیده می‌شود. در این واکنش، محلول شفاف باقی می‌ماند.

رشد به صورت پرزگونه (Fuzzy): در کمتر از ۱٪ از تست‌ها مشاهده می‌شود. در صورتی که این نتیجه به دست آید حاکی از عبور آب از منطقه‌ای است که فعالیت قارچی در آن وجود داشته‌است. پرزها معمولاً به صورت یک لایه سفید تا خاکستری در اطراف و همچنین بالای گوی دیده می‌شوند. رشد این پرزها می‌تواند گوی را در داخل دیواره فالدکون برای مدتی قفل کند. محلول معمولاً شفاف باقی می‌ماند اما ممکن است توده‌های گلبولاری دیده شود. با گذشت زمان، محلول نیز ابری می‌شود که ناشی از جمعیت‌های بزرگی از اسپورهای قارچی در آب است.

واکنش‌های BL، GC، RC و BG می‌تواند نشانگر خطرات بهداشتی باشد.

با توجه به اینکه باکتری‌های IRB در اسلایم‌ها و تجمعی از باکتری‌ها حضور دارند، زنجیره‌ای از انواع الگوهای واکنش‌ها با توجه به ماهیت باکتری‌های موجود در نمونه، می‌تواند رخ دهد.

زنجیره الگوی مشاهده شده جمعیت غالب باکتری

باکتری‌های IRB همراه با رسوب کربنات و حضور برخی از باکتری‌های تولید کننده اسلایم	BC - WB - BR
ترکیبی از باکتری‌های هتروتروف IRB با اکثریت غالب سودوموناس	CL - GC
ترکیبی از باکتری‌های هتروتروف IRB همراه با برخی باکتری‌های انتریک (احتمالاً/نتروباکترها)	CL - BG
ترکیبی از باکتری‌های هتروتروف	CL - BC



ترکیبی از باکتری‌های هتروتروف همراه با برخی باکتری‌های تولیدکننده اسلایم	CL – BC - BR
باکتری‌های IRB همراه با ترکیبی از باکترهای هوازی	CL - FO
باکتری IRB هوازی همراه با رسوب سفید رنگ کربنات	CL - BC
باکتری‌های بی‌هوازی همراه با برخی از باکتری‌های IRB هتروتروف هوازی	FO - CL
باکتری‌های بی‌هوازی همراه با برخی باکتری‌های IRB هتروتروف هوازی و باکتری‌های انتریک (احتمالاً/انتروباکتر، سیتروباکتر و سراسیا)	FO – CL - RC
ترکیبی از باکتری‌های بی‌هوازی، انتریک و برخی باکتری‌های IRB تشکیل دهنده اسلایم	FO- CL – BC - BR
ترکیبی از باکتری‌های بی‌هوازی و IRB همراه با باکتری‌های تشکیل دهنده اسلایم هوازی	FO – BR - BC
ترکیبی از باکتری‌های بی‌هوازی و هوازی با جمعیت غالب سودوموناس	FO - GC
ترکیبی از باکتری‌های بی‌هوازی، سودوموناس و باکتری‌های انتریک	FO – GC - BL
جمعیت غالب سودوموناس	GC
جمعیت غالب سودوموناس همراه با برخی باکتری‌های IRB انتریک	GC - BL
جمعیت غالب باکتری‌های انتریک	RC – CL -BR

تخمین جمعیت تقریبی و قدرت مهاجمی باکتری‌ها

قدرت مهاجمی باکتری‌های IRB موجود در نمونه آب براساس مدت زمان گرماگذاری طی شده برای مشاهده اولین واکنش تعیین می‌شود. زمان نهفتگی ۵ روز یا کمتر به‌عنوان قدرت مهاجمی بالا در نظر گرفته می‌شود. قدرت مهاجمی متوسط در زمانی بین ۵ تا ۸ روز تعریف می‌شود و زمان ۸ تا ۱۰ روز نشان‌دهنده قدرت مهاجمی پایین باکتری‌های IRB است. زمان نهفتگی بالای ۱۰ روز به‌عنوان پس‌زمینه و نرمال در نظر گرفته می‌شود. در جدول زیر رابطه میان زمان نهفتگی با درجه مهاجمی و تعداد نسبی باکتری‌های IRB شرح داده شده‌است.

در صورتی که تعداد باکتری‌های نمونه میزان بسیار مهاجمی یا مهاجم متوسط را نشان دهد، لازم است حضور کلیفرم‌ها نیز مورد بررسی قرار بگیرد تا اطمینان حاصل شود که باکتری کلیفرم روده‌ای در نمونه حضور ندارد. باید توجه داشت که در صورتی که تست برای کل باکتری‌های کلیفرم انجام شود می‌تواند با نتیجه مثبت همراه باشد زیرا برخی از باکتری‌هایی که منجر به واکنش شده‌اند از باکتری‌های انتریک محیطی هستند. در صورتی که الگوی رخداد واکنش شامل GC نیز باشد، لازم است یک تست برای حضور باکتری‌های سودوموناس تولیدکننده فلورسنت نیز انجام شود.

پتانسیل مهاجمی	تاخیر زمانی (روز)	جمعیت تقریبی باکتری (cfu / ml)
بسیار مهاجمی	۱	۵۴۰۰۰۰
بسیار مهاجمی	۲	۱۴۰۰۰۰
بسیار مهاجمی	۳	۳۵۰۰۰
بسیار مهاجمی	۴	۹۰۰۰
بسیار مهاجمی	۵	۲۳۰۰
تهاجم متوسط	۶	۵۰۰
تهاجم متوسط	۷	۱۵۰
تهاجم متوسط	۸	۲۵
نرمال	۹	≤ ۱۰



کنترل کیفی تست کیت MicrobCheck™ IRB

برای تایید صحت و عملکرد کیت MicrobCheck™ IRB می‌توان سویه‌های مشخص شده را کشت داد و الگوهای واکنشی را بررسی کرد. بعد از اضافه کردن سوسپانسیون باکتری، فالكون را تکان ندهید و اجازه دهید به آرامی وارد محیط بشود. فالكون‌های تلقیح شده را در دمای °C ۲۵ - ۲۱ به مدت ۸ روز نگهداری کنید و به صورت روزانه فعالیت و واکنش‌ها را بررسی کنید. برخی از تست‌ها بالا ممکن است در طول زمان از یک الگوی واکنشی به الگوی دیگری تغییر پیدا کنند. برای مثال *C. freundii* بعد از ۵ تا ۸ روز باعث قفل شدن گوی در دیواره فالكون می‌شود. لازم است تست *E. coli* در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام شود.

الگوانیسم (ATCC)	الگو
<i>Citrobacter freundii</i> (8090)	GC
<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	BR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	GC
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (19606)	GC
<i>Enterobacter cloacae</i> (23355)	CL - BG
<i>Proteus vulgaris</i> (13315)	CL - BC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (13883)	RC - BC
<i>Escherichia coli</i> (25922)	FO

بهترین زمان مصرف

انقضای کیت‌ها ۶ ماه است و لازم است در دمای یخچال (۴ - ۸ °C) نگهداری شوند. توصیه می‌شود از تغییرات مکرر دما و نگهداری در فریز و یخ‌زدگی شدیداً جلوگیری شود.

امحا و دفع

تست‌کیت‌ها پس از استفاده و رشد باکتری کاملاً آلوده هستند. در نتیجه لازم است اتوکلاو شوند یا در کوره سوزانده شوند. در صورتی که این امکان وجود ندارد، در زیر هود، در فالكون‌ها را باز کنید و آن را با مایع سفیدکننده با غلظت ۵ تا ۱۰٪ پر کنید. اجازه دهید یک شب بماند و بعد از آن دور بریزید.

