



تعیین حضور / عدم حضور باکتری‌های احیاکننده نیترات یا نیتريت

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

دنیتریفیکاسیون (Denitrification) از لحاظ زیست‌محیطی بسیار مهم است زیرا نیتروژن موجود در جو (N_2) حاصل این فرآیند است و توسط باکتری‌های احیاکننده نیترات و نیتريت (NRB) انجام می‌شود. بنابراین باکتری‌های NRB به‌عنوان گروه شاخصی از باکتری‌ها، قادر به تجزیه مواد آلی دارای نیتروژن هستند. این باکتری‌ها نیترات را به نیتريت و سپس نیتروژن گازی احیا می‌کنند. دنیتریفیکاسیون کامل به احیا تا رسیدن به نیتروژن گازی گفته می‌شود.

اگر باکتری‌های NRB در خاک شناسایی شوند، حاکی از عملکرد کارآمد چرخه نیتروژن در خاک است. در صورتی که در آب، جمعیت زیادی از باکتری‌های NRB شناسایی شود، نشان از وجود مقادیر قابل توجهی از نیترات در آب است. احتمال می‌رود که در کنار میزان بالای مواد آلی، میزان اکسیژن در این آب‌ها کم باشد و شرایط بی‌هوازی حاکم باشد.

نیتريت معمولاً به‌عنوان جلوگیری‌کننده از خوردگی در آب‌های خنک‌کننده و مایعاتی که در معرض فلزات هستند استفاده می‌شود. برخی از میکروارگانیسم‌هایی که به‌طور معمول از اکسیژن جو استفاده می‌کنند، دارای قابلیت استفاده از نیتريت به‌عنوان منبع اکسیژن نیز هستند. در این فرآیند، نیتريت به گاز نیتروژن احیا می‌شود و بلافاصله مایع حاوی آن خاصیت خوردگی پیدا می‌کند. در واقع حضور باکتری‌های NRB باعث حذف عناصر پیشگیری‌کننده از خوردگی می‌شود. از طرف دیگر باکتری‌های NRB می‌توانند با سرکوب رشد باکتری‌های احیاکننده سولفید، حذف سولفید هیدروژن و مصرف هیدروژن باعث کاهش خوردگی شوند. تست کیت MicrobCheck™ NRB به‌صورت یک فالكون ۵۰ ml حاوی محیط کشت و گوی شناور طراحی شده‌است.

توصیه تولیدکننده

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

روش انجام تست

آماده‌سازی

حداقل ۲۵ ml نمونه را جمع‌آوری کنید.

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

روی فالكون، تاریخ و نام نمونه را یادداشت کنید.

گرماگذاری

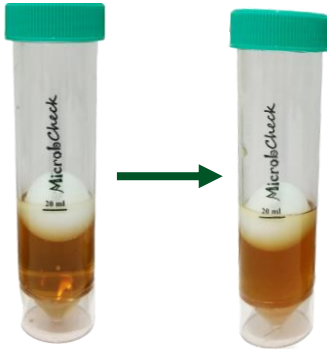
فالكون را در دمای اتاق ($25 - 21^\circ C$) و به دور از نور خورشید گرماگذاری کنید.

فالكون حاوی نمونه را به‌صورت روزانه به‌مدت ۵ روز بررسی کنید. زمانی که اولین واکنش کدر شدن یا تشکیل حباب مشاهده‌شد، براساس جدول تفسیر نتایج، نتیجه را بررسی کنید. بررسی روزانه فالكون‌ها، به‌ویژه در سه روز اول گرماگذاری، برای تعیین مقدار آلودگی به باکتری‌های NRB اهمیت بالایی دارد.



توجه داشته باشید در صورتی که نمونه مورد بررسی از محیط‌هایی با دمای بالاتر جمع‌آوری شده‌اند، فالكون‌ها را در دمای برابر با همان محیط، گرماگذاری کنید.

تفسیر نتایج



این کیت دارای محلول A و B و نیز پودر روی است که برای بررسی نتیجه آزمایش به روش زیر مورد استفاده قرار می‌گیرد:

- ۱- ابتدا حدود سه قطره از محلول A و سه قطره از محلول B را در یک لوله آزمایش بریزید، لوله را تکان دهید تا به خوبی با هم مخلوط شوند.
- ۲- حدود ۱ ml از محیط داخل فالكون را بردارید و به لوله حاوی محلول A و B اضافه کنید. لوله را تکان دهید تا محلول به خوبی هموژن شود.
- ۳- حدود ۲ دقیقه صبر کنید. تغییر رنگ به قرمز نشان‌دهنده احیای نیترات به نیتريت است. در این صورت نتیجه را مثبت گزارش کنید.

در صورتی که تغییر رنگ مشاهده نشد به صورت زیر عمل کنید:

- ۴- مقدار بسیار کمی از گرد روی را، برای مثال با استفاده از آغشته کردن خلال دندان یا چوب کبریت به روی، با نمونه تماس دهید. نتیجه به دو صورت زیر امکان پذیر است:
(الف) عدم تغییر رنگ که به معنای احیاء کامل نیترات به گاز است. در این حالت نتیجه را مثبت گزارش کنید.
(ب) ایجاد رنگ قرمز که به معنای عدم احیاء نیترات می‌باشد. در این حالت نتیجه را منفی گزارش کنید.
- توجه کنید که** افزودن مقادیر زیادی از گرد روی نتیجه آزمایش را منفی کاذب نشان خواهد داد.

الگو واکنش

تنها الگوی واکنش در این تست کیت تشکیل فوم (FO) است. در این الگو، معمولاً محلول ابری باقی می‌ماند اما نشانه اصلی الگوی رشد FO، حضور تعداد بسیار زیادی حباب است که بیش از ۵۰٪ از فضای اطراف و زیر گوی را پوشش داده‌اند. این الگو نشان می‌دهد که دنیتریفیکاسیون به صورت کامل رخ داده‌است و باکتری‌های NRB در نمونه حضور دارند. تخمین جمعیت باکتری‌ها با استفاده از فاصله زمانی تشکیل این فوم محاسبه می‌شود.

تخمین جمعیت تقریبی و قدرت تهاجمی باکتری‌ها

سرعت ایجاد تغییرات در محیط داخل فالكون به صورت نیمه‌کمی نشان از تعداد باکتری‌های NRB موجود در نمونه است. نتیجه مثبت پس از یک تا دو روز نشان‌دهنده آلودگی بالای NRB (قدرت تهاجمی بالا)، پس از دو تا سه روز نشان‌دهنده آلودگی متوسط (قدرت تهاجمی متوسط) و بیش از سه روز نشان‌دهنده آلودگی کم (قدرت تهاجمی پایین) است.

توجه کنید که باکتری‌های روده‌ای، یکی از بزرگترین گروه‌های باکتری‌های NRB هستند که باکتری‌های کلیفرم نیز در این گروه قرار می‌گیرند. کلیفرم‌ها می‌توانند دنیتریفیکاسیون را در شرایط بی‌هوازی در محیط احیایی انجام دهند. بنابراین در صورتی که میزان بالایی از باکتری‌های NRB شناسایی شود، لازم است حضور باکتری‌های کلیفرم نیز مورد بررسی قرار بگیرد.

در صورتی که بعد از گذشت دو روز، نتیجه تست منفی بود و تشکیل گاز مشاهده نشد، جمعیت باکتری‌ها بسیار کم است و به عنوان غیرتهاجمی در نظر گرفته می‌شود.



توجه کنید که محیط استفاده شده در MicrobCheck™ NRB می تواند رشد مجموعه ای از باکتری های هوازی اختیاری و باکتری هایی که تنفس نیتراتی انجام می دهند را حمایت کند. در صورتی که در نمونه مورد بررسی آلودگی دیگری نیز وجود داشته باشد می تواند رشد کند که با ایجاد ساختارهای ابری در محیط همراه خواهد بود. این محیط با گذر زمان کدرتر می شود. اگر باکتری های NRB نیز وجود داشته باشند با تولید گاز متمایز خواهند شد.

پتانسیل تهاجمی	تاخیر زمانی (روز)	جمعیت تقریبی باکتری (cfu / ml)
بسیار تهاجمی	۱	۱۰۰۰۰۰۰
بسیار تهاجمی	۲	۲۰۰۰۰۰
تهاجم متوسط	۳	۵۰۰۰۰
پایین	۴	۱۰۰۰۰

کنترل کیفی تست کیت MicrobCheck™ NRB

برای تایید کیفیت و عملکرد کیت MicrobCheck™ NRB می توان سویه های مشخص شده را کشت داد و الگوهای واکنشی مشخص شده را بررسی کرد. بعد از اضافه کردن رقت باکتری صبر کنید تا سوسپانسیون وارد محیط شود و از تکان دادن فالكون بپرهیزید. فالكون را در دمای محیط نگهداری کنید و به مدت ۵ روز واکنش ها را مورد بررسی قرار دهید.

ارگانیزم (ATCC)	الگو
<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	تشکیل ساختارهای ابری همراه با تولید گاز یا فوم
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	تشکیل جزئی ساختارهای ابری همراه با تولید گاز یا فوم
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (12228)	تشکیل ساختارهای ابری بدون تولید گاز یا فوم
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (19606)	بدون تشکیل ساختارهای ابری همراه با تولید گاز یا فوم
<i>Escherichia coli</i> (25922)	تشکیل ساختارهای ابری همراه با تولید گاز یا فوم

بهترین زمان مصرف

انقضای کیت ها ۶ ماه است و لازم است در دمای یخچال (۴ - ۸ °C) نگهداری شوند. توصیه می شود از تغییرات مکرر دما و نگهداری در فریز و یخ زدگی شدیداً جلوگیری شود.

امحا و دفع

تست کیت ها 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 فالكون ها 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.

