



تعیین حضور / عدم حضور باکتری‌های احیا کننده سولفات در
آب‌های مختلف (شور، تولیدی و هیدرولیتیک)
مورد استفاده در صنایع نفت، گاز و پتروشیمی، هوایی، غذایی،
آب و فاضلاب و سایر صنایع.

باکتری‌های احیاکننده سولفات (SRB) (Sulfate Reducing Bacteria) یک گروه از باکتری‌های بی‌هوازی هستند که از هیدروژن به عنوان منبع اصلی برای بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی خود به جای اکسیژن استفاده می‌کنند. به همین دلیل باکتری‌های احیاکننده سولفات، بی‌هوازی هستند و در حضور اکسیژن مهار می‌شوند.

این باکتری‌ها دارای توانایی مشترک احیا سولفات به هیدروژن سولفید هستند. سولفید تولیدشده در نتیجه رشد باکتری‌های SRB با فلزات (معمولاً آهن) واکنش می‌دهد و به تشکیل سولفیدهای سیاه منجر می‌شود. در نتیجه مشکلاتی را ایجاد می‌کند که از بوی تخم‌مرغ فاسد شروع می‌شود و به سیاه شدن تجهیزات، آب‌ها و تشکیل بیوفیلم یا اسلایم (Slime) و آغاز فرآیندهای خوردگی میکروبی تاسیسات فلزی منتج می‌شود. یکی از مهمترین عوامل خوردگی فولاد در صنایع نفت و گاز، خوردگی ناشی از گاز سولفید هیدروژن است. بسیاری از تاسیسات نفت و گاز از جنس فولاد کربنی بوده و به خوردگی با گاز سولفید هیدروژن حساس هستند.

شناسایی میکروارگانیسم‌های SRB به علت عدم رشد آنها در آب‌های جاری و تمایل به رشد در عمق و تشکیل بیوفیلم‌ها (اسلایم) دشوار بوده و لازم است در زمان نمونه‌برداری جهت تست، مناطق عمقی را مد نظر قرار داد. در صورتی که اسلایم‌ها تخریب شوند و باکتری‌ها در آب رها شوند امکان شناسایی باکتری‌های SRB در آب‌های جاری وجود دارد. کیت MicrobCheck™ SRB، با فرمولاسیونی اصلاح‌شده و منحصربه‌فرد، و براساس استانداردهای مرجع NACE و API، با افزایش دقت و سهولت شناسایی باکتری‌های SRB، زمان مورد نیاز برای شناسایی را نیز تا مقدار قابل توجهی کاهش می‌دهد. در کیت SRB از محیط و شرایطی استفاده می‌شود که شرایط انتخابی را برای باکتری‌های بی‌هوازی که قادر به احیا سولفات هستند، فراهم می‌کند. همچنین منبع آهن مورد نیاز را نیز در اختیار آنها قرار می‌دهد. تست کیت MicrobCheck™ SRB به صورت 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. 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.
با توجه به اینکه باکتری‌های احیاکننده سولفات به طور مستقیم در آب جاری رشد نمی‌کنند بلکه در اعماق و در بیوفیلم‌ها رشد می‌کنند، دقت کنید که از جایگاه مناسب نمونه‌گیری انجام شود.
پس از آنکه نمونه اضافه شد، فالكون را تکان ندهید یا نچرخانید. اجازه دهید گوی خود بر روس سطح مایع شناور شود.



روش انجام تست

نمونه برداری آب

حداقل ۲۵ ml نمونه جمع آوری کنید.

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

روی فالکون، تاریخ و نام نمونه را یادداشت کنید.

توجه داشته باشید که میکروارگانیسمها در نبود آب قادر به رشد نیستند. در سیستمهای محتوی آب و نفت، ارگانیسمها در فاز بینابینی و فاز آبی یافت می‌شوند. بنابراین خیلی مهم است که نمونه برداری از این قسمت‌ها انجام شود. ویال‌های نمونه برداری باید محتوی نمونه‌های تازه جمع‌آوری شده از این فازها و لایه نازکی از روغن معدنی روی سطح نمونه‌ها باشد. نفت یا روغن اضافه سطح نمونه را می‌توانید با قطره چکان از روی نمونه بردارید.

نمونه برداری خاک

یک گرم نمونه خاک مورد نظر را در دمای 15°C - 4°C به آزمایشگاه منتقل کنید. نمونه مورد نظر را در ۲۰ ml آب استریل حل کرده و ورتکس کنید.

توجه داشته باشید که برای آزمون‌هایی که باید در محل صورت گیرد و امکان تهیه سوسپانسیون وجود ندارد، یک گرم از خاک را مستقیماً به کیت اضافه کرده و تا ۲۰ ml آب استریل اضافه کنید.

توجه داشته باشید در شرایطی تست SRB ممکن است در زمانی بسیار کوتاه مثلاً در کمتر از ۳۰ دقیقه سیاه شود. این نشانه‌ای از حضور هیدروژن سولفید در نمونه است که به سرعت با آهن موجود در محیط کشت SRB واکنش می‌دهد. باید توجه داشت که وجود مقادیر بیش از ۲۰ ppm هیدروژن سولفید در نمونه، باعث ایجاد نتیجه مثبت کاذب می‌شود. برای حذف گاز هیدروژن از نمونه، مقدار ۳۰ ml از نمونه را در یک لوله ریخته، در آن را ببندید و به مدت ۱۰ ثانیه تکان دهید. سپس به مدت ۲۰ ثانیه اجازه دهید لوله ثابت بماند. پس از آن، می‌توانید از این نمونه برای انجام آزمایش استفاده کنید. در این شرایط باکتری‌های SRB توسط سایر باکتری‌ها در اسلایم حفظ شده و در حضور اکسیژن، از محیط حذف نمی‌شوند.

گرماگذاری

فالکون را در دمای اتاق 25°C - 21°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



چنانچه باکتری‌های SRB در نمونه وجود داشته باشد، پس از گرماگذاری، رسوب سیاه رنگی در پایین لوله تشکیل می‌شود. یک حلقه اسلایم سیاه رنگ به دور گوی و یا اسلایم سیاه رنگ از رشد باکتری در پایین لوله تشکیل می‌شود. براساس نوع رشد باکتری در فالکون می‌توان نتایج را تفسیر کرد.



الگوهای واکنش

الگوهای واکنشی متفاوتی در صورت رشد باکتری‌های SRB در فالكون مشاهده می‌شود:

واکنش شماره ۱: سیاه شدن کف فالكون یا Blackening Base (BB): واکنش BB با تشکیل رسوب سیاه در کف فالكون شناخته می‌شود. در ابتدای تشکیل رسوب با نگاه کردن به زیر فالكون قابل تشخیص است. در ادامه به تدریج به سمت بالا گسترش پیدا می‌کند. سیاه شدن می‌تواند به شکل نقاط سیاهی در اطراف دیواره‌های فالكون کمی بالاتر از مخروط کف فالكون نیز اتفاق بیفتد. در واکنش BB، محیط شفاف است و حلقه اسلایم در اطراف گوی دیده نمی‌شود. واکنش BB نشانه‌ای از رشد باکتری‌های بی‌هوازی رشدیافته در مناطق عمیق مانند *Desulfovibrio* است.

واکنش شماره ۲: سیاه شدن اطراف گوی یا Blackening around the ball (BT): در واکنش BT، حلقه اسلایم در اطراف گوی دیده می‌شود. اسلایم معمولاً به رنگ سفید، خاکستری، بژ یا زرد است و به سمت بالای گوی امتداد پیدا می‌کند. باید توجه شود که تشکیل اسلایم از ویژگی‌های این کیت نیست و لازم است به سیاه شدن آن توجه کرد. سیاه شدن معمولاً به شکل نقاط سیاهی شروع می‌شود و به آرامی درون اسلایم گسترش پیدا می‌کند. واکنش BT اغلب نشانه حضور بی‌هوازی‌های تشکیل دهنده اسلایم است که شامل باکتری‌های SRB نیز می‌شود.

واکنش شماره ۳: ترکیبی از سیاه شدن در کف فالكون و اطراف گوی یا Combination of Blackening in Base and Ball (BA):

در واکنش ۳، سیاه شدن هم در کف فالكون و هم در اطراف گوی مشاهده می‌شود. در این شرایط این امکان وجود داد که سطح داخلی فالكون سیاه نشود. در صورتی واکنش از نوع ۳ یا BA در نظر گرفته می‌شود که در ابتدا حالت‌های BB یا BT رخ نداده باشد. در صورتی که یکی از دو واکنش ۱ یا ۲ پیش از ۳ رخ داده باشد باید تمرکز بر روی آن باشد.

دو نوع واکنش دیگر نیز ممکن است در کیت MicrobCheck™ SRB رخ دهد که هرچند نشانه مثبتی از حضور باکتری‌های SRB نیستند، اما به این دلیل که می‌توانند اطلاعات کامل تری از فعالیت‌های میکروبی درون نمونه بدهند، دارای ارزش هستند.

حباب‌هاز گاز: گاهی اوقات در روز اول یا دوم گرماگذاری در فالكون MicrobCheck™ SRB مشاهده می‌شوند. با وارد آوردن ضربات آهسته به فالكون آزمایش، این حباب‌ها از قسمت پایینی فالكون حرکت کرده و به سرعت به گوی شناور می‌رسند. به نظر می‌رسد این گاز متان باشد که توسط باکتری‌های تولیدکننده متان رشدیافته در شرایط به شدت احیایی کف فالكون، تولید شده است.

ساختار ابرمانند شبه‌ژل: در برخی نمونه‌ها، سایر باکتری‌های هتروتروف بی‌هوازی نیز ممکن است حضور داشته باشند. این باکتری‌ها اغلب سریع‌تر از باکتری‌های SRB رشد می‌کنند. در این صورت ساختارهای ابرمانند شبه ژل (Cloudy Gel-Like) تشکیل می‌شوند که به عنوان واکنش شماره ۴ شناخته می‌شوند. ساختارهای GC در یک سوم پایینی فالكون تست دیده می‌شوند. ساختارهای GC می‌توانند گسترش پیدا کنند و کل مایع تست را کدر کنند. باید توجه داشت که این ساختارها پایدار هستند و مرزهای مشخصی دارند. ساختار GC به عنوان تست مثبت برای SRB در نظر گرفته نمی‌شوند. در صورتی که واکنش GC با واکنش‌های BB یا BT دنبال شود، می‌توان حضور باکتری‌های SRB را مثبت در نظر گرفت.

تخمین جمعیت تقریبی و قدرت تهاجمی باکتری‌ها

چنانچه نتیجه آزمایش مثبت باشد، می‌توانید جمعیت باکتری و میزان تهاجم آنها را مطابق با جدول زیر تخمین بزنید. واکنش سریع‌تر زمانی رخ می‌دهد که جمعیت باکتری بیشتر باشد.

پتانسیل تهاجمی	تاخیر زمانی (روز)	جمعیت تقریبی باکتری (cfu / ml)
بسیار تهاجمی	۱	۶۸۰۰۰۰۰
بسیار تهاجمی	۲	۷۰۰۰۰۰
بسیار تهاجمی	۳	۱۰۰۰۰۰



بسیار تهاجمی	۴	۱۸۰۰۰
بسیار تهاجمی	۵	۵۰۰۰
تهاجم متوسط	۶	۱۲۰۰
تهاجم متوسط	۷	۵۰۰
نرمال	۸	۲۰۰

کنترل کیفی تست کیت MicrobCheck™ SRB

برای تایید کیفیت و عملکرد کیت MicrobCheck™ SRB می‌توان سویه‌های مشخص شده را کشت داد و الگوهای واکنشی را بررسی کرد. بعد از اضافه کردن رقت باکتری صبر کنید تا سوسپانسیون وارد محیط شود و از تکان دادن فالكون بپرهیزید. کیت را در دمای محیط نگهداری کنید و به مدت ۱۰ روز واکنش‌ها را مورد بررسی قرار دهید.

ارگانیزم (ATCC)	الگو
<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	واکنش ۴
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	واکنش ۴
<i>Proteus vulgaris</i> (13315)	واکنش ۴
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (DSM1924)	واکنش‌های ۱ و ۳
<i>P. aeruginosa</i> (27853) + <i>D. desulfuricans</i> (DSM1924)	واکنش‌های ۲ و ۳

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 یخ زدگی شدیداً جلوگیری شود.

امحا و دفع

تست کیت‌ها 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.

