عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت من أنظمة التبريد للشركة العامة للأسمدة الكيمياوية والمسببة للتآكل

أ.م.د. عدنان نعمة / جامعة ديالى – كلية التربية /الرازي
أ.م.د. عبد الكريم فليح / جامعة البصرة – كلية الهندسة
الآنسة وجدان حسن / جامعة البصرة – كلية العلوم

تضمنت الدراسة عد وعزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت من أنظمة تبريد الشركة العامة للأسمدة الكيمياوية الجنوبية في محافظة البصرة إذ جمعت (108) عينة ماء من أربعة مواقع لأنظمة التبريد فضلاً عن الماء المعامل المجهز للأنظمة والماء الخام الذي جمع من شط العرب للفترة من أيلول 1999 ولغاية 2000 . حسبت أعداد الجراثيم المختزلة للكبريت في العينات باتباع طريقة العد الأكثر احتمالا وباستخدام وسط (API) السائل ووجد أن أعدادها في أنظمة التبريد أعلى من أعدادها في الماء المعامل والماء الخام كما حسبت النسبة المئوية للجراثيم المختزلة للكبريت المكونة للسبورات إذ كانت أعلى نسبة لها (61%) في عينات الماء المعامل وأقلها كانت (26%) في عينات الموقع in-A.

صمم جهاز خاص لتوفير الظروف اللاهوائية الإجبارية للجراثيم المختزلة للكبريت اعتمادا على إزالة الأوكسجين من غاز النيتروجين بتمريره عبر ملف نحاسي مسخن يحتوي على مسحوق النحاس ، كذلك يوفر هذا الجهاز غاز ثاني أوكسيد الكربون أثناء عملية الزرع .

تم عزل (51) عزلة جرثومية نقية باستخدام وسد (API) الصلب المدعم بالعوامل المختزلة للأوكسجين والمشبع بغازي N2، Co2 باتباع طريقة تدوير الأنابيب وشخصت الجراثيم اعتمادا على الصفات والاختبارات المذكورة في موسوعة بيركي (1994) إذ شخصت ثلاثة أجناس هي :

Desulfobulbus و *Desulfobacterum* و *Desulfotomacuhum* الذي شخص منه نوعان هما *D.geothermicum* و *D.thermoacetoxidans* ولأول مرة في العراق .

المقدمة واستعراض المراجع :

شهدت العقود الأخيرة اهتماماً كبيراً في دراسة الجراثيم المختزلة للكبريت Sulfure reducing bacteria وخاصة بعد التعرف على التآكل Corrosion الذي تسببه تلك الجراثيم في أنواع عديدة من المعادن ، وأصبحت خطراً يواجه العديد من الشركات والمصانع كشركات توليد الطاقة الكهربائية والصناعات الكيمياوية وخطوط أنابيب نقل النفط وأنابيب نقل مياه المجاري ومياه الشرب ومنظومات التبريد والتدفئة المركزية [17] .

كان يعتقد حتى عام 1970 أن الجراثيم المختزلة للكبريت موجودة بأنواع قليلة تعود لجنسين فقط وأن لها القدرة على استهلاك اللاكتيت والبيروفيت وبعض المركبات العضوية كمصدر للطاقة ، إلا أن الدراسات الحديثة تشير إلى أن الجراثيم المختزلة للكبريت تظهر تنوعا وراثيا وفسيولوجياً وقد وصف ما يقارب المائة من مانحات الإلكترونات في عملية اختزال الكبريتات [26] .

تقع الجراثيم المختزلة للكبريت ضمن الجراثيم السالبة لصبغة غرام متباينة التغذية [21] . وقد اعتمد في تصنيف هذه المجموعة على الصفات الشكلية والأيضية فضلاً عن بعض المعايير الكيمياوية مثل النسبة المئوية للكوانين والسايتوسين في DNA ، ووجود أو غياب الصبغات ودراسة الحوامض النووية مثل تهجين DNA/rDNA [34] .

صنف Cam و Postgate (1965) جنس *Desulfomaculum* على أنه يضم ثلاثة أنواع هي : *D.orientis* ، *D.ruminis* و *D.nigrificans* وقد صنفت سبعة أنواع جديدة أضيفت إلى هذا الجنس المكون للسبورات والمحب للحرارة المعتدلة والعالية [14] ، كما صنف نفس الباحثان (1966) جنس *Desulfovibrio* على أنه يضم خمسة أنواع هي :

D.vulgaris و *D.desulfuricans* و *D.salexigens* و *D.africans* و *D.gigas* وقد أضاف Magot وجماعته (1992) (16) النواع D.oxyclinae إلى الجنس العائد إلى عائلة *D.sulfovibrionaceae* وهو جنس غير مكون للسبورات محب للحرارة المعتدلة .

تعد الجراثيم المختزلة للكبريت مجموعة غير متجانسة وتظهر تغايرا واسعا في الصفات الشكلية ، عزلت أجناساً منها محب للبرودة والبعض الآخر محب للحرارة المعتدلة [31] .

ويرى Pfennig وجماعته (1981) [22] أن تلك الجراثيم هي مجموعة فسيولوجية وبيئية واحدة . وقد أظهر التصنيف الذي ورد في الطبعة التاسعة لموسوعة بيرجي [14] تقسيم هذه المجموعة إلى أربع تحت مجموعات ، تتضمن تحت المجموعة الأولى الجنس المكون للسبورات *Desulotomaculum* الحاوي على عشر أنواع ، أما تحت المجموعة الثانية فتشمل الأجناس غير المكونة للسبورات التي تؤكسد المادة العضوية أكسدة غير تامة إلى أستيت وتحتوي على خمسة أجناس في حين تشمل تحت المجموعة الثالثة جراثيم غير مكونة للسبورات تؤكسد المادة العضوية أكسدة تامة إلى ثاني أوكسيد الكربون تضم ستة أجناس ، وتضم المجموعة الرابعة جراثيماً غير مكونة للسبورات تؤكسد المادة العضوية أكسدة تامة إلى ثاني أوكسيد الكربون وتكون محبة لدرجات الحرارة المتطرفة متمثلة بجنسين فقط ، تنتمي الأجناس التابعة تحت المجموعة [3] والجنس *Desulfobulbus* إلى عائلة Desulfobacteriaceae [24] .

إن أكثر الجراثيم المختزلة للكبريت عصيات مستقيمة أو منحنية وأحيانا كروية أو بيضوية أو حلزونية ، تتراوح أقطارها من 0.3–0.4 مايكروميتر ، وقد تتواجد بشكل خلايا مفردة أو أزواج وأحيانا تجمعات وبعضها يكوّن سلاسل خيطية ، وهي جراثيم سالبة لصبغة غرام ، إلا أن بعض الأنواع الخيطية تكون موجبة ، بعضها متحرك والبعض الآخر غير متحرك ، أما الحركة فقد تكون بواسطة أسواط قطبية أو محيطية أو حركة انزلاقية [14] .

تنمو بدرجات تتراوح بين 25–44ْ م ، بعضها ينمو في درجة حرارة أقل من 10ْ م وبعضها محب للحرارة ينمو في درجات حرارة تتراوح بين 55–65ْ م ، تنمو هذه الجراثيم في أس هيدروجيني متعادل 6.8–7.4 ولا تنمو في قيم أقل من 6 وأعلى من 9 ، هذه الجراثيم كيمياوية ذاتية التغذية Chemolithotroph تستعمل

الكبريت ومركباته كمستقبل نهائي للاليكترونات خلال عمليات الأيض التنفسي [7،34] ، أي تختزل الكبريتات والثايوكبريتات والنترات إلى كبريتدات [9] .

أشار Rozanova وجماعته (1991) [27] إلى أن هذه الجراثيم تستخدم اللاكتيت والبايروفيت والبروبونيت والأيثانول والحوامض الدهنية والعديد من المصادر الأخرى كمصادر أساسية للكربون وانتاج الطاقة [34،35] ، تنمو العديد من أنواع الجراثيم المختزلة للكبريت ذات الأكسدة التامة وغير التامة بوجود الهيدروجين كمانح للالكترون لاختزال الكبريتات وهذه الميزة مهمة لأنها تعد المفتاح الرئيسي لحصول عملية التآكل وتسمى Hydrogenophilic [25] .

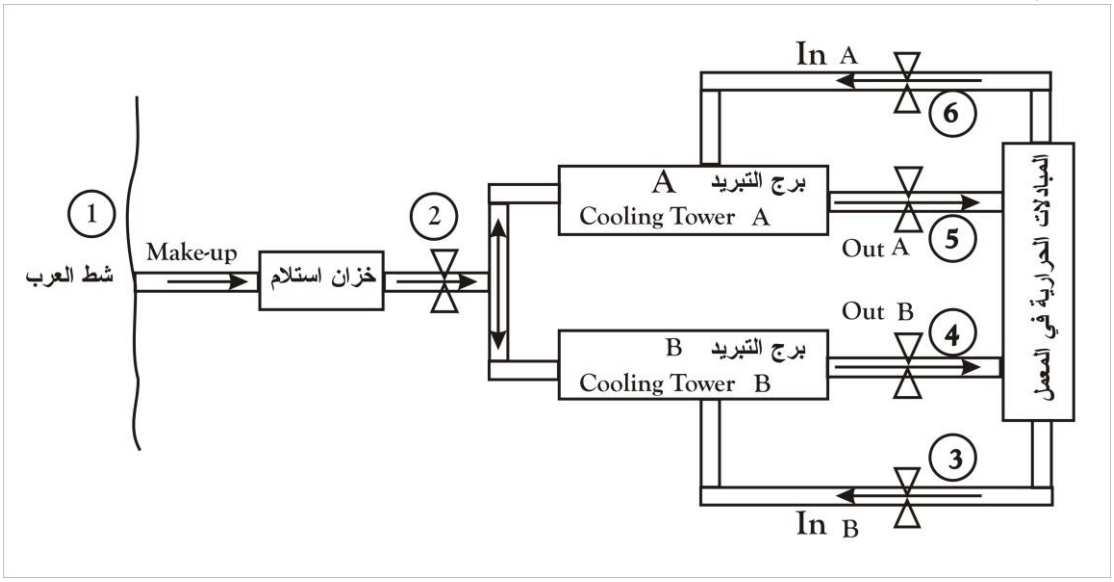
تعد الجراثيم المختزلة للكبريت واسعة الانتشار في البيئات المائية البرية ، ويستدل على وجودها من رائحة كبريتيد الهيدروجين واسوداد الماء والرواسب نتيجة تكون كبريتيد الحديدوز [22] ، وهي تفضل النمو في بيئات لاهوائية تتوفر فيها المواد العضوية والكبريتات الذاتية ، فقد تم عزلها من حقول الذرة والرز ورواسب المياه العذبة والبحرية ومن براز الإنسان والحيوان والعقد الجذرية لبعض النباتات [10،21] .

تعد وحدة تبريد الماء في الشركة العامة للأسمدة الجنوبية ، ذات أهمية في تبريد الوحدات ذات العلاقة بانتاج اليوريا ، إذ تهدف هذه الدراسة الى عزل وتشخيص الجراثيم المختزلة للكبريت من المياه المجهزة لهذه الوحدة

طرائق العمل :

جمع العينات : Sample Collection

جمعت 108 عينة ماء من أربع محطات لأنظمة الشركة العامة للأسمدة الكيمياوية الجنوبية في محافظة البصرة خلال الفترة الممتدة من شهر أيلول 1999 ولغاية آيار 2000 بواقع مترين لكل عينة . وكما مبين في الشكل (1) ، محطات جمع العينات :



شكل (1) محطات جمع العينات من أنظمة التبريد في الشركة العامة للأسمدة الكيميائية ومحطتي الماء المعامل والماء الخام

إن المحطة الأولى تمثل الماء الخام عند منطقة محيلة الواقعة على شط العرب أما المحطة 2 (Make-up) تمثل الأنبوب الذي يمر فيه الماء من شط العرب إلى خزان الاستلام ، ويعامل هذا الماء بالكلور بعد ترشيحه

المحطتان 3 و 6 (out-A وout-B) تمثلان الماء المبرد الخارج من برج التبريد إلى المبادلات الحرارية في المعمل .

المحطتان 4 و 5 (In-A وIn-B) تمثلان الماء العائد من المبادلات الحرارية في المعمل إلى برج التبريد مرة أخرى .

جمع العينات قيد الدراسة باستخدام قناني بلاستيكية مقمعة حجم 500مل ، قيست بعض الصفات الكيمياوية والفيزياوية للعينات ، تضمنت درجة الحرارة والأس الهيدروجيني وتكيز الكبريتات [30] .

أوساط عزل وإنماء وعد وتشخيص الجراثيم :

استخدم وسط API (American Petrolem Institute) المحوَّر عن API (1975) [2] لعزل الجراثيم المختزلة للكبريت وإنمائها والمكون من :

المادة	الكمية غم/لتر
خلاصة الخميرة	1
كبريتات المغنيسيوم المائية	0.2
كبيريتات الحديديك الأمونياتية	0.2
كلوريد الصوديوم	1
فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين	0.01
حمض الأسكوربيك	0.1
لاكتات الصوديوم	2.24
آكر	15

أكمل الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر ثم أضيف إليه العوامل المختزلة الآتية قبيل عملية الزرع بعد تعقيمهما بجهاز الموصدة الكهربائية :

1- ثنائي ثايونيت الصوديوم 0.3 غم/لتر .
2- سيستين 0.28 غم/لتر .
3- مثيل أمين 0.4 غم/لتر .
4- محلول بيكاربونات الصوديوم 8% (30 مل/لتر)
5- محلول كبريتيد الصوديوم 24% (3 مل/لتر)

أضيفت المواد 1 ، 2 و 3 إلى الوسط أثناء إشباعه بغازي النتروجين وثنائي أوكسيد الكربون وأضيف المحلولين 4 و 5 إلى الوسط بعد أن شبع المحلول الأول بغاز ثاني أوكسيد الكاربون والمحلول الثاني بغاز النتروجين لبضع دقائق [33] .

استخدم وسط API السائل في عد الجراثيم المختزلة للكبريت ، إذ حضر من مكونات وسط API الصلب نفسها ما عدا الأكر مع إضافة ثاني ثايونيت الصوديوم . كذلك استخدم وسط API السائل في اختبارات الجراثيم المختزلة للكبريت إذ استبدل المصدر الكربوني لاكتات الصوديوم بأحد المصادر الكربونية الآتية: خلات الصوديوم وبنزوات الصوديوم وبروبونات الصوديوم وبيوتارات الصوديوم وحمض البالمتك [14] .

عد الجراثيم المختزلة للكبريت :

أ- عد الجراثيم المختزلة للكبريت الكلية :

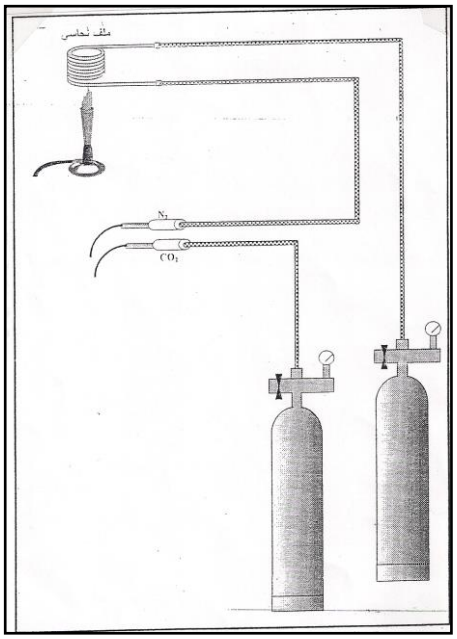
اتبعت طريقة العد الأكثر احتمالاً (MPN) Most Probable Number لحساب أعداد الجراثيم في 100 مل من العينة الأصلية ، إذ حضر وسط API السائل وبعد تعقيمه ترك في الحمام المائي بدرجة 5w°م ، ثم أضيف إليه مادة ثنائي ثايونيت الصوديوم المعقمة واستخدمت أنابيب زجاجية محكمة الغطاء حجم 25 مل في عملية الزرع ، قسمت إلى ثلاث مجاميع ، كل مجموعة مؤلفة من (5 أنابيب) ، أضيفت إلى المجموعة الأولى 10 مل من العينة ، و 1 مل للمجموعة الثانية ، أما المجموعة الثالثة فقد أضيف لها 0.1 مل من العينة ، ملئت الأنابيب تماماً بالوسط الزرعي وأغلقت بإحكام وأحيط الغطاء بشريط من شمع البرافين ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 7 أيام وسجلت النتيجة الموجبة بظهور اللون الأسود وتم حساب أعداد الجراثيم المختزلة للكبريت بالاعتماد على جداول العد الأكثر احتمالاً .

ب- عد الجراثيم المختزلة للكبريت المكونة للسبورات (Sass وجماعته ، 1997) :

لقحت الأنابيب بنفس السابقة ، ووضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 65°م لمدة 7 أيام ، سجلت النتيجة الموجبة بظهور اللون الأسود وتم حساب أعداد الجراثيم المكونة للسبورات في 100 مل من العينة الأصلية بالاعتماد على جداول الأكثر احتمالاً آنفة الذكر .

الزرع باستخدام الغاز والعوامل المختزلة :

استخدم غاز ثاني أوكسيد الكربون والنتروجين بنسبة 80:20% (Badziong وجماعته 1978) ، صمم جهاز خاص لعملية الزرع محمور عن (Hardy ، 1981)[13] (شكل 2) :



شكل (2) جهاز الزرع اللاهوائي

لغرض توفير الظروف اللاهوائية اللازمة لنمو الجراثيم المختزلة للكبريت ، يتكون الجهاز من أنابيب بلاستيكية وأخرى نحاسية ، يمر غاز النتروجين من الأسطوانة عبر أنبوب بلاستيكي متصل بأنبوب نحاسي يلف عدة لفات لزيادة المساحة السطحية المعرض للهب ، يحتوي الأنبوب النحاسي على برادة النحاس التي تعمل بمساعدة الحرارة على اختزال الأوكسجين والحصول على غاز النتروجين الخالي من الأوكسجين من الطرف الآخر الذي ينتهي بأنبوب نحاسي رفيع شكله حرف L ، كذلك يمر غاز ثاني أوكسيد الكربون من الأسطوانة عبر أنبوب بلاستيكي إلى النهاية الرفيعة لأنبوب نحاسي على شكل حرف L أيضاً ، تسهل النهايتين إدخال الغاز في الأنابيب والدوارق الزجاجية بسهولة بدون التعرض للتلوث . تمت كل عمليات الزرع أثناء تنقية المستعمرات وتشخيصها باستخدام غاز ثاني أوكسيد الكربون والنتروجين الخالي من الأوكسجين وإضافة العوامل المختزلة المذكورة .

عزل وتنقية الجراثيم المختزلة للكبريت :

تم الحصول على مزارع خليطة بزرع (1) مل من العينة على وسط API السائل في أنابيب زجاجية ثم حضنت بدرجة حرارة (37)°م ولمدة سبعة أيام ، وللحصول على مستعمرات مفردة Isolated Colonies أو متباعدة بعضها عن البعض الآخر ، اتبعت طريقة تدوير الأنابيب Roll tupe Method (15) بأخذ (1) مل من المزرعة النامية بعمر (24–48) ساعة لتحضير سلسلة من التخافيف العشرية باستخدام محلول فسيولوجي ملحي معقم ، ثم أخذ (0.1) مل من التخافيف العشرية وزرعت في أنابيب تحتوي على وسط API الصلب بدرجة حرارة (45)°م ، أغلقت الأنابيب بإحكام وتم تدويرها بين راحتي اليد ووضعت في الثلاجة لفترة قصيرة لغرض تصلب الوسط ثم نقلت إلى الحاضنة بدرجة حرارة (37)°م وحضنت لمدة (1–3) يوم ، بعد فترة الحضن ظهرت مستعمرات سوداء منفصلة ثم تنقيتها بأخذ جزء من المستعمرات المعزولة بواسطة ماصة باستور معقمة ونقلت إلى وسط API السائل لغرض تنشيطها ثم زرعت على وسط API الصلب لإعادة تنقيتها مرة أخرى تحت الظروف نفسها للحصول على مزارع نقية ثم أخذ جزء من المزرعة وصبغت بصبغة كرام للتأكد من نقاوتها

ولفصل العزلات المكونة للسبورات عن تلك غير المكونة لها ، وذلك باستخدام صبغة الملكايت الأخضر Malachite green لملاحظة السبورات ومعرفة نقاوتها [14] .

تشخيص الجراثيم المختزلة للكبريت :

سجلت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط API الصلب من حيث الشكل والحجم واللون ، أما شكل الجراثيم فقد حدد بتحضير مسجات جرثومية صبغت بصبغة كرام فضلاً عن تحديد شكل وحجم البورات كما درست حركة الجراثيم باستخدام القطرة المعلقة Hanging drop .

اختبرت قابلية العزلات المختزلة للكبريت غير المكونة للسبورات على أكسدة المادة العضوية من خلال تحديد الناتج النهائي للأكسدة لفصل تحت المجموعة (2) التي تؤكسد المادة العضوية (لاكتات الصوديوم) أكسدة غير تامة إلى خلات عن تحت المجموعة (3) التي تؤكسد المادة العضوية أكسدة تامة إلى ثاني أوكسيد الكربون والماء ، إذا لقح وسط API السائل بالعزلات وحضنت في درجة (37)ْ م وبعد ظهور النمو تم الكشف عن جذر الخلات بأخذ (1) مل من راشح المزرعة في أنبوبة اختبار وأضيف إليه (2) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (20% باستخدام كحول أثيلي بتركيز 10% كمذيب) بعدها أضيفت قطرات من كاشف الفينونفثالين ظهور اللون الوردي ، وضعفت شدته أو اختفائه عند التسخين دلل وجود الخلات [32] ، وشخص الجنس Desulfobulbus العائد لتحت مجموعة (2) بالاعتماد على :

استهلاك المصادر الكربونية :

تم اختبار قابلية الجراثيم على استهلاك المصادر الكربونية باستخدام وسط API السائل بعد استبدال المصدر الكربوني لاكتات الصوديوم بالمصدرين الكاربونيين :

- خلات الصوديوم (1.1) غم / لتر .
- بروبيونات الصوديوم (50.6) غم / لتر .

لقح الوسط بالجراثيم وحضنت بدرجة حرارة (37)ْ م لمدة ثلاثة أيام وسجلت النتيجة موجبة بظهور اللون الأسود .

تحديد درجة حرارة النمو المثلى :

تم تحديد درجة حرارة النمو المثلى للعزلات بإنمائها في درجة حرارة (24و40و65و70)ْ م إذ لقح وسط API السائل بالعزلات وحضنت لمدة ثلاثة أيام وحددت درجة حرارة النمو المثلى من خلال تحديد كثافة النمو باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي (580) نانوميتر [8] ، أما الجنس Desulfobacterium العائد لتحت المجموعة (3) فقد شخصت اعتماداً على :

1- استهلاك المصادر الكاربونية : اتبعت الطريقة الآنفة الذكر باستبدال المصدر الكاربوني لاكتات الصوديوم بالمصادر الكاربونية الآتية :

* خلات الصوديوم (1.1) غم / لتر .
* بنزوات الصوديوم (7.2) غم / لتر .
* حامض الأدبيسك (0.25) غم / لتر .

2- حساب زمن التضاعف generation time [20] .

تشخيص الجراثيم المختزلة للكبريت المكونة لسبورات :

شخصت الأنواع العائدة لجنس Desulfotomaculum الذي يعود إلى تحت مجموعة (1) اعتماداً على الاختبارات الآتية مع اتباع الطرق السابقة الذكر :

1- أكسدة المصادر الكربونية .

2- استهلاك المصادر الكاربونية .

اختبرت قابلية العزلات على استهلاك المصادر الكربونية الآتية :

- خلات الصوديوم (1.1) غم / لتر .
- بيوتارات الصوديوم (1.6) غم / لتر .
- حامض البالمتك (0.25) غم / لتر .

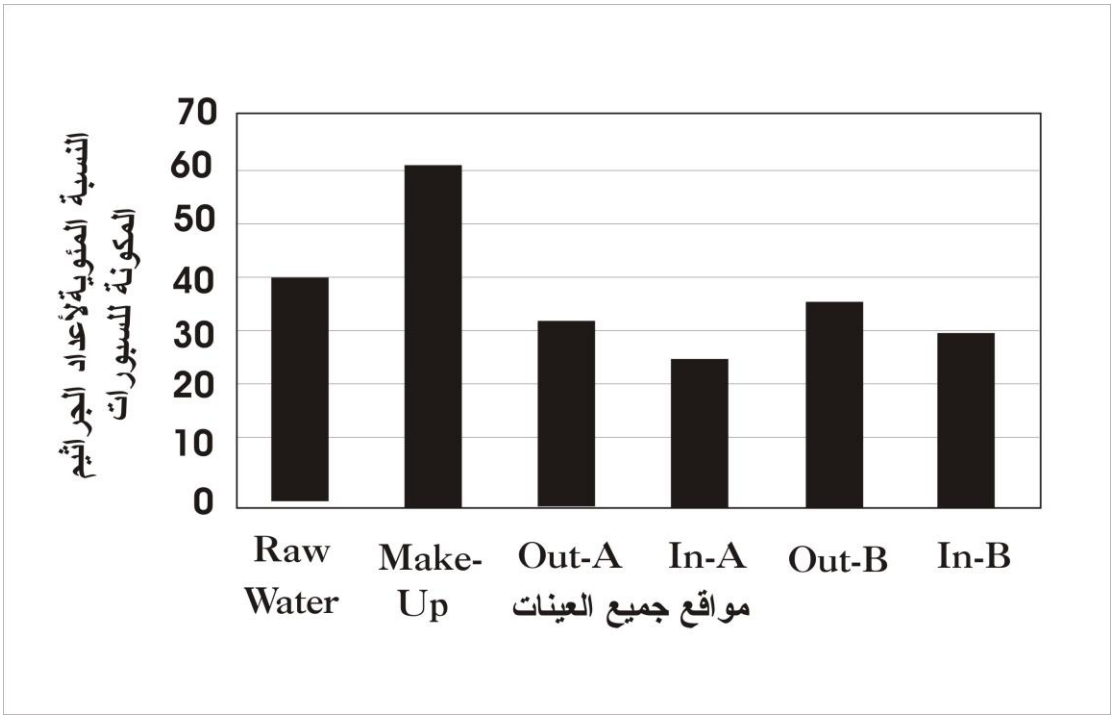
وحددت درجة حرارة النمو المثلى للعزلات بإنمائها في درجات حرارة (25 ، 40 ، 50 ، 60 ، 65)°م إذ تصبح وسط API السائل بالعزلات وحضنت لمدة (3) أيام وحددت درجة حرارة النمو المثلى كما ذكر سابقاً [23] .

*** التحليل الإحصائي :**

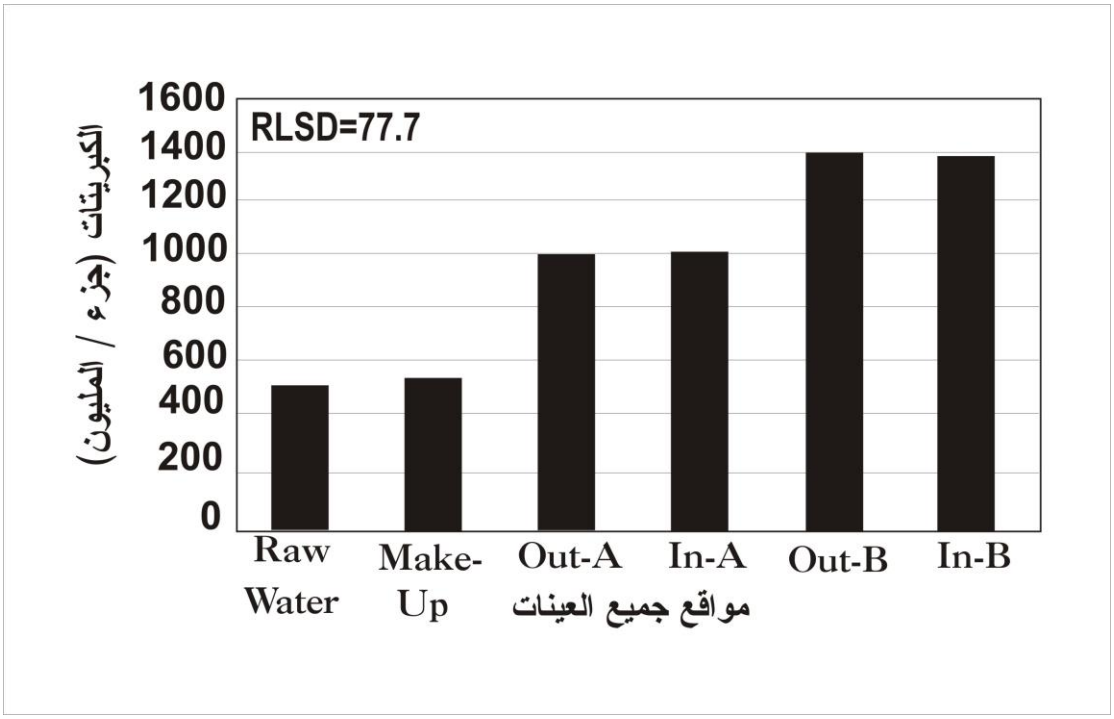
تم التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام تحليل التباين Anova test واستخدمت طريقة أقل فرق معنوي معدل R.L.S.D لمقارنة المتوسطات [1] .

النتائج والمناقشة :

قيست الصفات الفيزياوية والكيمياوية المتمثلة بدرجة الحرارة والأس الهيدروجيني وتركيز الكبريتات شكل 3 و 4 و 5 وذلك لدورها المهم في نمو الجراثيم المختزلة للكبريت ولمعرفة مدى ملائمة البيئات التي جمعت منها العينات لنمو تلك الجراثيم .

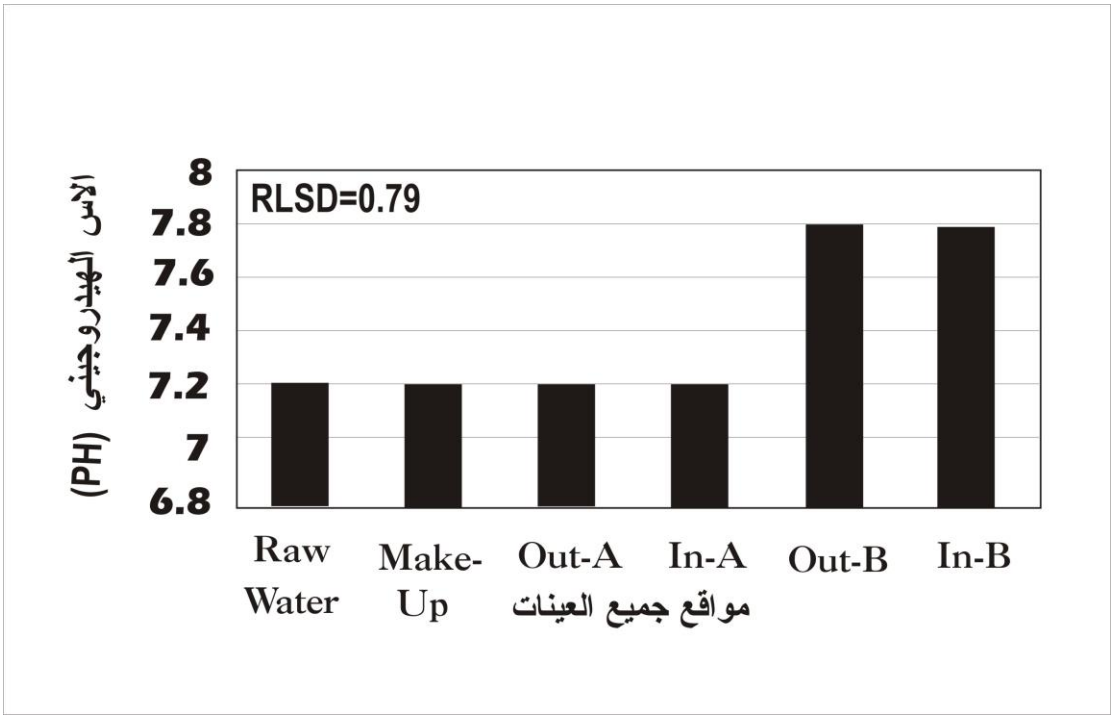


شكل (3) درجات الحرارة لمياه مواقع جمع العينات



شكل (4) تراكيز الكبريتات في مياه مواقع جمع العينات

أضهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية في قيم الأس الهيدروجيني بين مواقع جمع العينات ، شكل (5) .



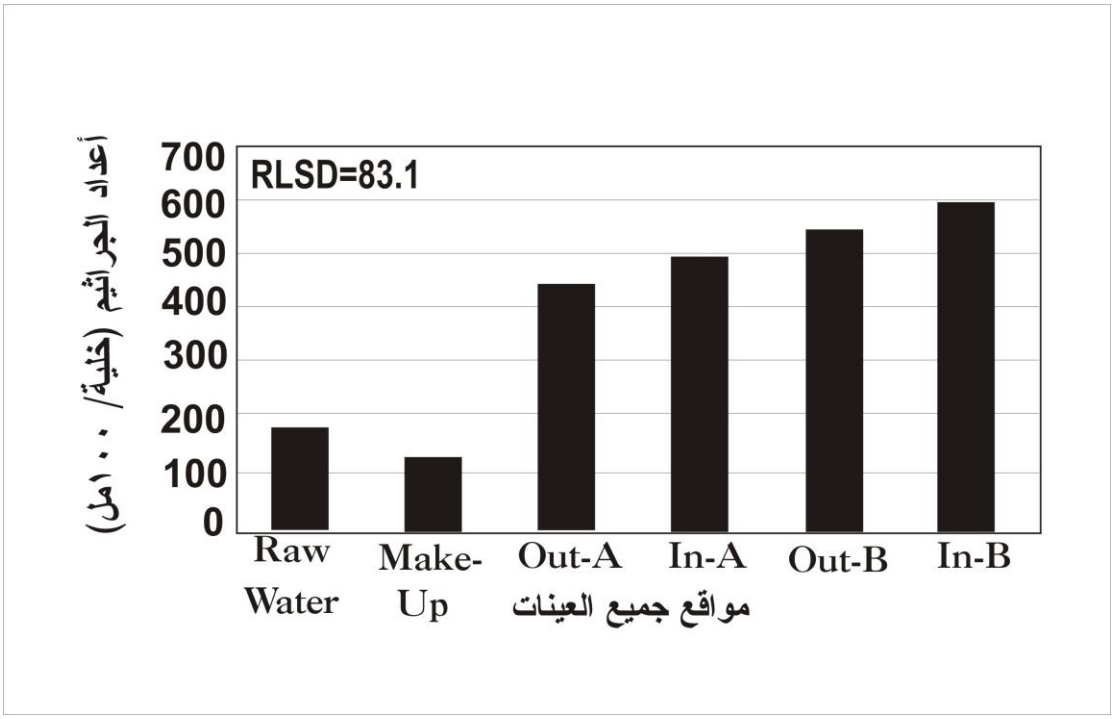
شكل (

في حين سجلت فروق عالية المعنوية $P < 0.01$ في درجة الحرارة العالية بين الموقعين (out-A و out-B) والمواقع الأخرى التي لم تظهر فروق معنوية فيما بينها . وقد ارتفعت درجة الحرارة في الموقعين(in-A و in-

B) نتيجة لعمليات تبريد المبادلات الحرارية (شكل3) ، كما ارتفع تركيز الكبريتات في مواقع أنظمة التبريد عن الماء المعامل والماء الخام نتيجة لحدوث تبخر في المياه المستخدمة في عمليات التبريد مما يؤدي إلى زيادة تركيز الأملاح فيها ، إذ كانت الزيادة في الكبريتات في برج التبريد B معنوية لكثرة استخدام ذلك البرج في التبريد مقارنة ببقية المواقع الأخرى ، وقد وجد علاقة طردية بين زيادة تركيز الكبريتات وأعداد الجراثيم في مواقع جمع العينات (شكل4) ، مما يعكس تأثير الكبريتات المباشر على نمو وفعالية تلك الجراثيم [26] ، إذ إنها تعد العامل المحدد لنمو الجراثيم المخزلة للكبريت ، كما يعد وجودها مؤثراً حيوياً على حصول التآكل المايكروبي وتزداد حدته كلما زاد تركيز الكبريتات بسبب زيادة كمية الكبريتيد المنتج ولا تتمكن ولا تتمكن مختزلات الكبريت من النمو وإحداث التآكل إلا بوجود كميات كافية من الكبريتات إذ تعمل كمستقبل نهائي للالكترونات في المسارات الأيضية لتلك الجراثيم [28] .

عد الجراثيم للكبريت :

أظهرت نتائج عد الجراثيم المختزلة للكبريت في عينات قيد الدراسة ظهور كثافات جرثومية عالية في عينات المواقع (out-A و in-A و out-B و in-B) مقارنة مع عينات موقعي الماء المعامل والماء الخام شكل (6) .



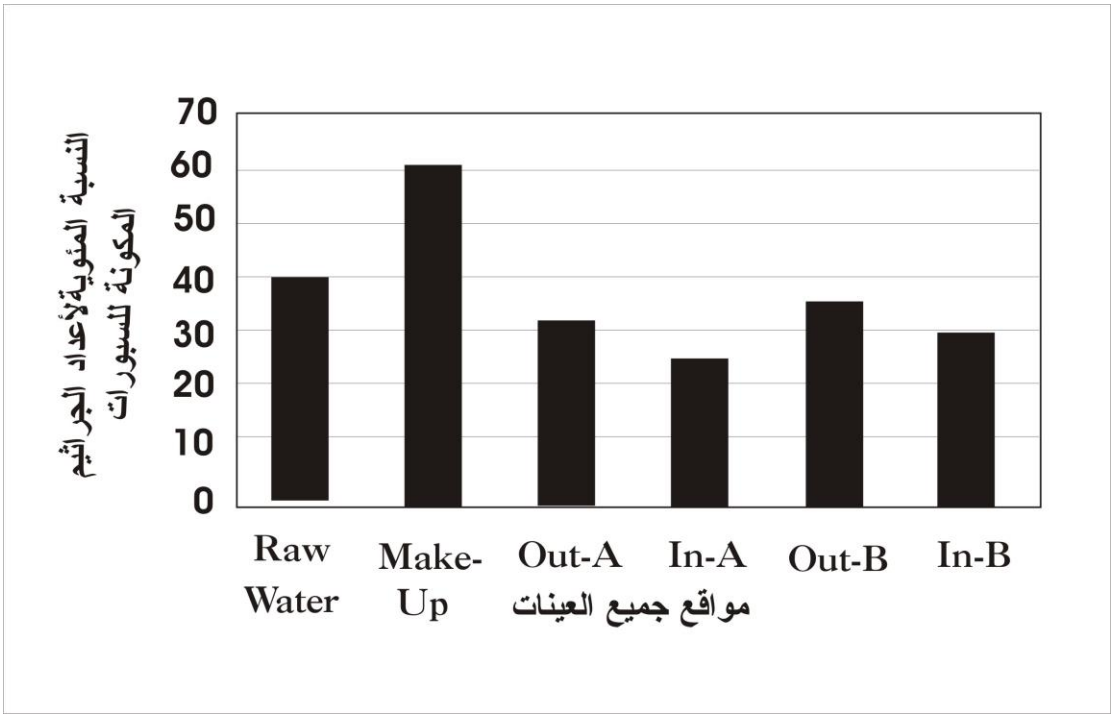
شكل (6) أعداد الجراثيم المختزلة للكبريت في مواقع جمع العينات

ويعود السبب في ذلك إلى توفر الظروف الملائمة لنموالجراثيم في أنظمة التبريد خصوصاً التركيز العالي للكبريتات وقد تفوق الموقعين out-B و in-B على بقية المواقع في أعداد الجراثيم ، إذ ظهرت أعلى تركيز للكبريتات كما ازدادت أعداد الجراثيم في الموقع in-A على الموقع out-B وفي الموقع in-B على الموقع out-B على الرغم من أن الزيادة غير معنوية إلا أنها قد تعود إلى ارتفاع درجة حرارة تلك المواقع مما يشجع نمو الجراثيم المختزلة للكبريت ، اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (Sanders,1988)[28] ، كما أن ترشيح الماء ومعاملته بالكلور في موقع الماء المعامل تقل فيه أعداد الجراثيم وهذا يتفق مع ما سجله

(Hardy,1981)[13] الذي أشار إلى أن أعداد الجراثيم في المياه غير المعاملة كانت (22) خلية/مل ، في حين كانت في المياه المرشحة والمكلورة (6) خلية/مل .

انخفضت أعداد الجراثيم المختزلة للكبريت في عينات الماء الخام المأخوذ من الطبقات تحت السطحية بسبب وجود كميات معتدلة من الأوكسجين وقلة تركيز الكبريتات ، فضلاً عن حركة الماء وعدم استقرار الجراثيم لتكوين مستعمرات ، اتفقت هذه النتائج مع (Widdel,1997)[34] وعززت من قبل (Hardy,1981) و (Magot) وجماعته (1997)[16] وMahmoud وجماعته (2008) [17] الذين أشاروا إلى وجود كثافات جرثومية عالية في مياه البحر المستخدمة في حقن آبار النفط ، إذ تعد البحار والبحيرات المالحة مواطن دائمة لتلك الجراثيم نظراً لزيادة تراكيز الكبريتات [29] .

إن الظروف غير الملائمة تشجع الجراثيم على تكوين السبورات ، لذا فقد أظهرت نتائج حساب النسبة المئوية للجراثيم المختزلة للكبريت المكونة للسبورات من معدل أعداد الجراثيم ظهور أعلى نسبة لها في عينات الماء المعامل 61% تلتها عينات الماء الخام 40% شكل(7).



شكل (7) النسبة المئوية للجراثيم المختزلة للكبريت المكونة للسبورات في مياه مواقع جمع العينات

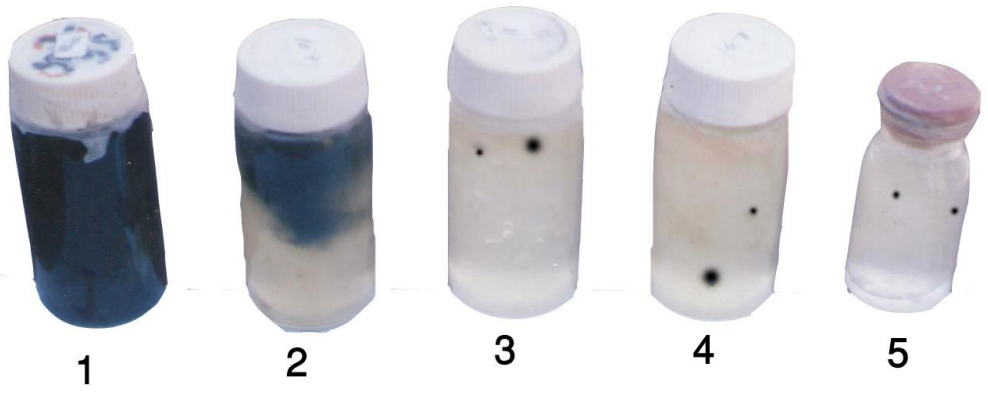
إذ أن ظروف الماء المعامل (المعامل بالكلور والترشيح) والظروف الهوائية في عينات الماء الخام تشجع الجراثيم على تكوين السبورات في حين توفر الظروف الملائمة في أنظمة التبريد والمبادلات الحرارية خصوصاً تدوير مياه التبريد وتوفير كميات كافية من الكبريتات والظروف اللاهوائية الإجبارية نتيجة نموها تحت الغشاء الأحيائي (Biofilme) تساعد تلك الجراثيم على أن تكون في حالة نمو خضري [17،6] .

العزل والتشخيص :

أظهرت طريقة العزل والتنقية تحت الظروف اللاهوائية باستخدام غازي النتروجين وثاني أوكسيد الكربون بنسبة 80 : 20% مع إضافة العوامل المختزلة للأوكسجين كفاءة عالية في عزل الجراثيم المختزلة

للكبريت ، إذ ظهرت مستعمرات سوداء دلالة على نمو تلك الجراثيم بعد 18–24 ساعة من الحضن على درجة حرارة 37 ْم وباستخدام وسط API الصلب .

تبدو المستعمرات ذات شكل دائري منتظم الحواف قطرها يتراوح بين 1.5–2.5 ملم ، ويزداد حجمها مع زيادة فترة الحضن حتى يتحول الوسط الزرعي الذي تنمو عليه إلى اللون الأسود بصورة كاملة بعد 3–5 أيام من الحضن كما مبين في الشكل (8) .



التداخلات بين مجاميع جرثومية مختلفة ضمن الغشاء الاحيائي

شكل (8) الحاضنات

إن إحتواء الوسط الزرعي على الحديد الذي يمتد مع الكبريتيد الناتج من اختزال الكبريتات يؤدي إلى تكوين كبريتيد الحديدوز الأسود الذي يعد مؤشراً لنمو مختزلات الكبريت [18،19] .

إن استخدام وسط API السائل والصلب في عد وعزل الجراثيم المختزلة للكبريت كونه يحتوي على اللاكتيت كمادة أساسية لنمو ما يقارب 80% من تلك الجراثيم [4] ، كما يحتوي هذا الوسط على مصادر الكبريتات الضرورية لنمو الجراثيم مثل كبريتات الحديديك الأمونياكية وكبريتات المغنيسيوم ، وقد ساهمت إضافة العوامل المختزلة للأوكسجين واستخدام محلول بيكاربونات الصوديوم كمحلول دارئ Buffer Solution ومصدر لغاز ثاني أوكسيد الكربون [11،12،19] فضلاً عن تزويد الوسط بالكبريت من قبل العوامل المختزلة للأوكسجين (ثنائي ثايونيت الصوديوم والستين ومثيل الأمين ومحلول السلفايد) في جعل خصائص الوسط انتقائية لعزل الجراثيم المختزلة للكبريت فضلاً عن تقليل الفترة الزمنية اللازمة للنمو ، إذ أن هذه الجراثيم تحتاج أثناء نموها إلى ظروف اختزالية وجهد اختزالي يصل إلى (–100) ملي فولت [4] .

شخصت ثلاثة أجناس من الجراثيم المختزلة للكبريت هي :

Desulfobacterium و *Desulfobulbus* و *Desulfotomaculum* المشخص من النوعين *D.geothermicum* و *D.thermoacetoxidans* ، اعتمد التشخيص على قابلية الجراثيم في استهلاك المصادر الكاربونية وعلى درجة حرارة النمو المثلى فضلاً عن الصفات المجهرية والحركة وكما مبين في الجدول

(1) وعلى الرغم من استخدام اللاكتيت كمصدر كاربوني وحيد في أوساط العزل ، ولم تعزل سوى الأجناس المذكورة أعلاه وذلك لتباين توزيع الجراثيم المختزلة للكبريت حسب عمق المياه ، إذ يتواجد البعض منها في عمود الماء في حين يعود أغلبها في القصر مثل جنس *Desulfovibrio* المتواجد في الطين والرواسب [34] .

جدول (1) الصفات التشخيصية للجراثيم المعزولة خلال الدراسة

الصفات	*Desulfotomaculum*		*Desulfobulbus*	*Desulfobacterium*
	D.geothermicum	*D.thermoacetoxidans*		
شكل الخلايا وأبعادها	عصوية (1×26) مايكروميتر	عصوية (1×2.8) مايكرومتر	بيضوية – عصوية (1.1×2.1) مايكرومتر	بيضوية – عصوية (1.2×2.3) مايكرومتر
شكل السبورات وأبعادها	بيضوية (1.2×1.4) مايكرومتر	بيضوية (1.2×1.4) مايكرومتر	غير مكونة	غير مكونة
الحركة	متحركة	متحركة	متحركة	متحركة
أكسدة المادة العضوية أكسدة تامة إلى Co2	غير تامة	تامة	غير تامة	تامة
أيض المصادر الكربونية				
لاكتات الصوديوم	+	+	+	+
خلات الصوديوم	-	+	+	
بيوتارات الصوديوم	+	+		
بروبيونات الصوديوم			+	
بنزوات الصوديوم				+
حامض البالمتك (16C)	+	+		
حامض الأديبك (8 C)				+
زمن التضاعف (ساعة)				≤ 12
درجة حرارة النمو المثلى(ْم)				
25-40	-	-	+	
50	+	+		
≥ 60	-	-	-	

(+) 90% من العزلات موجبة للاختبار	(-) 90% من العزلات سالبة للاختبار

الاستنتاجات :

إن وجود الكبريتات لها دور في زيادة أعداد الجراثيم المختزلة للكبريت ، كما أن إحتواء مياه أنظمة التبريد تحتوي على كثافات جرثومية عالية مقارنة مع الماء الخام والماء المعامل ، وممكن اختزال فترة نمو الجراثيم باستخدام غازي النتروجين وثاني أوكسيد الكربون ، مع استخدام العوامل المساعدة ، ولأول مرة في العراق تم عزل الأجناس *Desulfobulbus* و *Desulfobacterium* ، ونوعين من جنس *Desulfotomaculum* هما *D.geothermicum* و *D.thermoacetoxidaus* .

Abstract

Aiming to study the numeration ,isolation and identification of sulfur reducing bacteria (SRB) from cooling system of General State of Fertilizers Company Southern Region (GSFC) in Basrah city was investigated . (108) samples of water were collected from four sites of cooling system in addition treated water and raw water that are collected from Shatt Al-Arab river during the period September 1999–may2000.

The most probable number method was employed in counting the total number of SRB by using liquid (API) media , the result showed that the total SRB numbers in cooling water system is more than that observed in treated water samples .

Furthermore, the high percentage of spore forming sulfate reducing bacteria was (61%) in treated water while in station in–A was (26%).

An arbitrary desecrated apparatus was designed which is necessary for SRB growth by removing of oxygen from nitrogen gas the nitrogen gas was passed through a heated copper coil containing a copper powder . Also carbon dioxide was provided by this apparatus. .

By means of rolling tube method isolated of pure sulfate reducing bacteria was obtain by using solid (API) media supplemented with oxygen reducing agent and which was saturated with C2 and N2 gases , the bacteria was identified according to Bergy ,manual of systematic bacteriology (1994) . Three genus of SRB were detected for the first time in Iraq , i.*e Desulfobulbus* , *Desulfobacterium* and *Desulfotomaculum* ,

two spices of the third genus were also identified *D , geothermicum* and *D. thermoacetoxideans* .

المصادر

1- الراوي , فاتح محمود و خلف الله , عبد العزيز محمد (2000) .تصميم و تحليل التجارب الزراعية ,جامعة الموصل , دار الكتب ص 488

2- APHA (1985). Standard Methods for the examination of water and waste water 16th American Public Health association Washington.

3- Badziong, W., Tauer, R.K. and Zeikus,J.G. (1978). Isolation and characterization of Desulfovibrio growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. Arch. Microbiol. 116: 41-49.

4- Battersby, N.S.; Stwart, D.J and Sharma, A. P.(1985).Micrological Problems in the offshore oil and industries. APPI. Bacteiol. 227-235.

5- Campbell, L.L. and Posgate, J.R. (1965). Classification of the spore forming sulfate reducing bacteria. Cited by: Star, M.P; Slop, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegl, H.G. (ed). The Prokaryotes a handbook of habitates, isolation and identification of bacteria. Vol.2. Berlin. Springer-Verlage.

6- Canfield, D.E. and Raiswell. (1990). The evolution of the sulfur cycle. American. J.of.Sc. 299: 697-723.

7- Cord- Ruwisch,R; Klcinitz, w. and Widdle, F. (1987). Sufate-Reducing Bacteria and their activities in oil production. J. Pet. Technol. 10: 97-106.

8- Crolet, J.L.; Daumas, S. and Magot, M. (1993). PH regulation by sulfate reducing bacteria. National Association Corrosion Engineers (NACE). Housteon. Texas, 93, paper: 1-18.

9- Cypionka, H.; Widdle, F. and Ptenning, N. (1985). Survival of sulfate reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate- free oxygen sulfide gradients. FEMS Ecol. Microbiol. 31: 39-45.

Dethiosulfovibrio Peptidovorans gen. Nov.

10- Finster, K., Coates, J.D.; Liesack, W. and Pfenning, N. (1997). Desulformonas thiophila sp. Nov., a new obligately sulfure- reducing bacterium from noxic fresh water sediment. Bacteriol. 47: 754-758.

11- France, F.P. and Lutterbath, M.T. (1996). Variation in sessile microflora during biofilm formation on ALSA- 304 Stainless steel coupons. J. Microbiol. 17: 6-10.

12- Hamilton. W.A. (1985). Sulfate reducing bacteria and an aerobic corrosion. Annu. Rev. Microbiol. 39:195-217.

13- Hardy, J.A. (1981). The enumeration isolation and characterization of sulfate- reducing bacteria from north sea water. AOOI. Bacteriol. 51: 505-516.

14- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneth, P.H.; Staley, J.T and Williams, S.T. (eds). 994. Bergeys Manual of determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wikins.

15- Hungate, R.E. (1969).A role tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (eds). Method in Microbiology. Vol. 313. London, New York, Academic press.

16- Magot, M.; Ravot, G; Campaignolle, X.; Ollivier, B.; Patel, B.K.C.; Fardeau, M.L.; Thomas, P.; Crolet, J.L. and Garcia, J.I. (1997).

17- SP. Nov., a new anaerobic slightly Halophlic, thiosulfate- reducing. Bacterium from corrding offshore oil wells. J. Syst. Bacterio. 47: 818-824.

18- Mahmoad, M. N.; Abdel- Samie, M.E.; El-Mokadem, M.T.; Abdel-Raheim, S.S. and Ghazy, E.A. 2008. Development of biofilm (bf) on mild steel surfaces immersed in Suez Gulf Sea water. J. of. APPI.Sc.Res. 4: 1799-1804.

19- Mara, D.D. and William, D.J.A. (1970). The evaluation of media used to enumerate sulphate reducing bacteria. APPI. Bact. 33: 543-552.

20- Mcinerney, M.J and Sublette, K.I. (1997). Petroleum microbiology. Biofouling, Sourcing and improved oil recovery. In Hurst. C.J.; Kundsen, G.R., Mcinerney, M.J.; Stet2-enbach, L.D. and Walter, M.V. (ed). Manual of environmental microbiology. ASM Press. Washington, D.C. pp. 600-607.

21- Pelezar, M.J.; Reid, R.D. and Cham, E.C.S. (1982). Microbiology, 4th ed. McGraw Hill, Inc. New York.

22- Perry, J.J. and Staley, J.T. (1997). Microbiology: Dynamic and Diversity, Har count Brace Publishers, New York, London, Sydney, Tokyo, 911 pp.

23- Pfenning, N; Widdle, F. and Truper, H.E. (1981). The dissimilatory sulfate Reducing Bacteria. In: Starr, M.P.; Slop, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegel, H.G. (eds). The Prokaryotes, a handbook of habitates, isolation and identification of bacteria, vol.2. Berlin, Springer- Verlage. 926-940.

24- Post gate, J.R., and Campbell, I.L. (1966). Classification of Desulfovibrio species. The non sporulating sulfate reducing bacteria- Rev. Bacteriol. 30: 732-738.

25- Rabus, R.; Fukui, M.; Wilkes, H. and Widdle, F.(1996). Degradative capacities and RNA- targeted Whole-cell hybridization of sulfate reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing Alkylbenzens from crude oil. APPI. Environ-Microbiol. 62:3605.

26- Robinson, M. and Kilgallon. (1994). Hydrogen embrittlement of cathodically protected high strength, low alloy steels exposed to sulfate reducing bacteria. Corrosion. 50: 626-635.

27- Rooney- Varga, J.N.; Genthner, B. R. Devereus, R.; Willis, S.G..; Friedman, S.D. and Hines, M. E. (1998). Phylogentic and Physiological diversity of sulphate reducing bacteria isolated from a salt marsh sediment. APPI. Microbial. 21: 557-568.

28- Rozanova, E.P.; Galushko, A.S. and Ivanova, A.E. (1991). Distribution of sulfate reducing bacteria utilizing lactate and fatty acid in anaerobic ecotypes of flooded Petroleum reservoirs. Microbiol. 60: 251-256.

29- Sanders, P.F. (1988). Monitoring and Control of sessile microbes: Cost effective way to reduce microbial corrosion. In Sequcira, C.A.C. and Tiller, A.K.(ed). Microbiol corrosion. Elsevier Applied. Science. London and New York. Pp. 191-232.

30- Sass, H.G.; Cypionka, H. and Babenzien, H. (1997). Vertical distribution of sulfate reducing bacteria at the oxic- anoxic interface in sediment of the oligotrophic lacke. Stechlin- FEMS Ecol. Microbiol. 22: 245-255.

31- Taras, M.J. (1961). Water analysis. Hopkins. O.C.I.J.Am. water works Ass. Pp. 2483-2484.

32- Teske, A; Wawer, C.; Muyzer, G. and Ramsing, N. 1996. Distibution of sulfate Reducing Bacteria in Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most- proble number count and denatured gradient gel electrophoresis of PcR- Amplifled ribosomal DNA Fragments. Applied. And Environ. Microbio. 62: 1405-1415.

33- Vogel, A.I. (1996). A textbook of Practical organic chemistry. 3th. London.

34- Widdle, F. and Pfennig, N. (1977). A new anaerobic, Sporin, acetate oxidizing sulfate Reducing bacterium, Desulfotomaculum (emend) acetoxidans. Cited by Starr, M.P.; Slop,H.; Truper, H.; Balows, A., and Schlegl, H.G. (eds.). The prokaryotes a handbook of habitates, isolation and identification of bacteria. Vol. 2 Berlin, Springer Verlage.

35- Widdle, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- Reducing Bacteria. In: A.J.B. Zchnder, Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley and Sons, New York, pp. 469-585.

36- Widdel. F. (1992). Microbiol corrosion. In: Finn, R. K.; Prave, P.; Schlingman, M.; Crueger, W.; Esser, K.; Thauer, R. and Wagner, F. Biotechnology focus 3, fundementals, Application, information (ed.). Oxford Press. New York pp. 216-299.