روش‌های جدید تشخیص و شمارش باکتری‌های احیا کننده سولفات و ویژگی های فیزیولوژیک موثر در شناسایی آنها

روحا کسری کرمانشاهی*[۱]، طاهره قشقایی[۲]

[۱] استاد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)
*** نویسنده مسئول:** rkasra@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۰۱

چکیده

باکتری‌های احیاکننده سولفات (SRB)، باکتری‌هایی بی‌هوازی هستند که از سولفات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون استفاده نموده و تولید H_2S می‌کنند. SRBs از نظر مشکلات شدیدی مانند ترش کردن ذخایر نفت و گاز و خوردگی میکروبی تجهیزات آن دارای اهمیت اقتصادی زیادی می‌باشند. بنابراین شناسایی و شمارش سریع آنها حائز اهمیت است. روش‌هایی که برای شناسایی SRBs استفاده می‌شود به دو دسته تقسیم می‌شوند: ۱- روش‌های شناسایی مستقیم. ۲- روش‌های کشت. روش‌های شناسایی مستقیم شامل روش‌های استفاده از پروب‌های الیگونوکلئوتیدی و پرایمرهای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR: Polymerase Chain Reaction)، روش FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) برای آشکارسازی و شمارش باکتری‌ها در رسوبات، شناسایی و شمارش باکتری‌ها با روش PCR رقابتی (Competitive PCR) می‌شوند. روش‌های مولکولی (شناسایی مستقیم) روش‌های سریع و قابل اطمینانی می‌باشند، درحالی که روش‌های وابسته به کشت در صورت داشتن وقت کافی مقرون به صرفه هستند. بنابراین مطالعه ویژگی های عمومی که در شناخت باکتری های احیا کننده سولفات موثر می‌باشد هنوز هم دارای اهمیت ویژه ای است.

کلمات کلیدی: باکتری های احیا کننده سولفات، روش‌های جدید تشخیص، ویژگی‌های فیزیولوژیک.

New Methods for Detection and Enumeration of Sulfate Reducing Bacteria and Effective Physiologic Features in Detection of SRBs

Rouha- kasra Kermanshahi *[1], Tahereh Ghashghaei [2]

1. Professor, Faculty of basic Sciences, Alzahra university, Tehran
2. M.Sc. student, Faculty of basic Sciences, Alzahra university, Tehran
*** Corresponding Author: rkasra@yahoo.com**

Submission: January 03, 2012 Acceptance: April 21, 2012

Abstract
Sulfate reducing bacteria (SRB), are anaerobic bacteria that use sulfate as final electron acceptor and produce H_2S. SRBs have great economic importance in the oil industry, where they cause severe problems, including sourting of oil and gas deposits and corrosion of production facilities. Considerable effects have been directed toward the development of rapid methods for detection and enumeration of SRB in natural and industrial environments. In general, the methods used to enumeration SRB can be divided into the following two categories. 1) direct detection methods. 2) culture methods. The direct detection methods developed recently include: 1) the use of oligonucleotide probes and PCR primer. 2) FISH method for detection and enumeration of bacteria in sediments, 3) detection and enumeration of bacteria by competitive PCR. Molecular methods are rapid and trust worthy but in the case of having enough time, culture methods are cheaper and save money. So, Studing of general features that are effective on detection of SRBs are still important.
***Keywords**:* Sulfate reducing bacteria, new methods, physiologic features.

۱- مقدمه

باکتری‌های احیا کننده سولفات (SRBs)گروه متنوعی از باکتری‌های بی‌هوازی هستند که توانایی استفاده از سولفات را به عنوان پذیرنده نهایی الکترون دارند و به همراه آن H_2S تولید می‌نمایند.

باکتری‌های احیا کننده‌ی سولفات از موارد با اهمیت اکولوژیکی در معدنی کردن مواد آلی در محیط‌های بی‌هوازی هستند. برای مثال در رسوبات دریایی بیش از ۵۰٪ مواد آلی ممکن است به وسیله احیاء سولفات اکسید شوند. در برخی محیط‌ها با میزان پایین سولفات، مثل دریاچه‌های آب شیرین، احیاء سولفاتی باکتری‌ها ممکن است هنوز در فرایندهای معدنی کردن مهم باشد.

SRBs اهمیت اقتصادی مهمی در صنعت نفت دارند، جایی که آنها سبب مشکلات شدیدی از جمله ترش کردن ذخایر نفت و گاز و خوردگی تجهیزات می‌شوند.

تلاش‌های زیادی در جهت توسعه روش‌های قابل اعتماد و سریع برای شمارش و شناسایی SRBs در محیط‌های طبیعی و صنعتی انجام شده است. به طور کلی روش‌هایی که برای شمارش SRBs استفاده می‌شود، به دو دسته تقسیم می‌شوند:

۱- روش‌های شناسایی مستقیم

۲- روش‌های کشت.

روش‌های کشت برای شمارش SRBs بر اساس روش محتمل‌ترین تعداد[1] به طور وسیعی برای چندین دهه استفاده شده است [۱و۲]. روش‌های جدید شمارش و شناسایی باکتری‌های SRB شامل موارد زیر می‌باشد:

۱- استفاده از پرایمرهایی[2] که قطعات ژنی 16SrRNA[3] را مورد هدف قرار می‌دهند، که برای شناسایی باکتری‌های SRB به کار می‌روند [۳،۴،۵،۶ و۷].

۲- روش FISH[4] برای آشکارسازی و شمارش باکتری‌ها در رسوبات.[۳،۸،۹،۱۰و۱۱].

۳- استفاده از پروب‌های الیگونوکلئوتید و پرایمرهای PCR[5] برای شیرابه محل دفن زباله‌ها[6] جهت شناسایی باکتری‌های SRB [۱۳،۱۴و۱۵].

٤- شناسایی و شمارش باکتری‌ها در رسوبات ساحلی با کمک PCR رقابتی[7] [۱۶،۱۷،۱۸و۱۹].

۲- شرح روش‌ها

۲-۱- شناسایی SRBs با استفاده از پرایمرهایی که قطعات ژنی 16SrRNA را در رسوبات عمیق دریا مورد هدف قرار می‌دهند

جمعیت باکتریایی احیاکننده سولفات در رسوبات عمیق حوضچه گرم آرام غربی[8] توسط آنالیزهای فیلوژنتیک مولکولی با استفاده از پرایمرهایی که قطعه ژنی 16SrRNA را مورد هدف قرار می‌دهند، بررسی شد. کتابخانه ژنی 16SrRNA ویژه از ۵ لایه رسوب از ۱۲ سانتی‌متری هسته WPO ساخته شد. کلون‌ها در ۵ کتابخانه از طریق چندشکلی بودن طول قطعات محدود شونده[9] تمایز داده شدند.

نحوه شناسایی: پرایمرها برای هدف قرار دادن 16SrRNA مربوط به SRB های آلفاپروتئـــــــوباکتر استفاده شدند،

---

[1] Most Probable Number: MPN

۲- پرایمر قطعه‌ای از DNA می‌باشد که مکمل قسمتی از DNA تک رشته‌ای است و می‌تواند به آن متصل شود تا آنزیم DNA پلیمراز بتواند کار تکثیر DNA را آغاز نماید.

۳- 16SrRNA: بخشی از ترکیب زیر واحد 30S ریبوزوم پروکاریوتی است.

[4] Fluorescence in situ hybridization

۵- به طور کلی Polymerase Chain Reaction (PCR) به روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA تا حد مشاهده آنها توسط روش‌های ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می شود.

[6] Land fill leachate

۷- در این روش علاوه بر DNA هدف، کنترل داخلی هم وجود دارد. کنترل داخلی یک توالی، یک توالی DNA غیر هدف است که از طریق تکنیک ترکیب پرایمر (composit primer) توالی پرایمری مشترک با DNA هدف در دو طرف کنترل داخلی قرار می‌گیرند و این امکان را فراهم می‌آورند که هر دو قطعه DNA تحت شرایط یکسان در یک مخلوط واکنش تکثیریابند. در این روش همواره رقابتی بین قطعه هدف و کنترل داخلی ایجاد می‌شود و زمانی که تعداد نسخه‌های این دو قطعه برابر باشند، تقریباً تکثیر یکسانی هم خواهند داشت، این ویژگی در حقیقت اساس روش نیمه کمی competitive PCR است.

[8] WPO: West Pacific Warm Pool

[9] RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

که PCR را با استفاده از الگوهای DNA حاصل از رسوبات WPO انجام دهند. جفت پرایمرهای SRB385F-907R برای تکثیر ژن 16SrRNA مربوط به SRB استفاده شدند. محصولات PCR در حامل یا وکتور[۱] مورد نظر PMD-18T 18T کلون شدند و مخلوط اتصال (Ligation) برای ترانسفورم[۲] سلول‌های مستعد اشریشیاکلی (Ecoli) استفاده شدند. قطعات الحاقی کلون‌ها تکثیر شدند و توسط رسوب‌دهی با اتانول خالص شدند. سپس قطعات برای ۸ ساعت یا بیشتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با آنزیم محدودکننده‌ی[۳] MspI هضم شدند. نتایج واکنش با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید مشخص شد. کلون‌های نماینده با الگوی RFLP متفاوت از هر کدام از کتابخـانه‌ها برای توالی‌یابی انتخاب شدند. این نکته استنباط شد که کلون‌ها در چهار گروه که بسیار نزدیک به دسولفوتوماکولوم، دسولفاسینیوم، دسولفومونیل و دسولفانیوتیکوس بودند قرار داشتند .

۲-۲-روش FISH برای شناسایی و شمارش باکتری‌های احیا کننده‌ی سولفات

هیبریداسیون درجای فلورسنت (FISH) نیز برای ۵ لایه رسوب حوضچه گرم آرام غربی جهت آشکارسازی و شمارش SRBs استفاده شد. در این روش نمونه‌های رسوبات برای ۸ ساعت با فرمالدهید ٤٪ تثبیت شدند و دوبار با PBS(Phosphate buffered saline)(100m mol l^{-1} NaCl،10m mol l^{-1} Na_3PO_4) شسته شدند و سرانجام در PBS/EtOH (Phosphate buffered saline/Ethanol)(۱:۱) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های ذخیره شده رقیق شدند و توسط روش فراصوت ملایم برای ۳۰-۲۰ ثانیه تیمار شدند.

بخشی از آن از میان فیلترهای پلی‌کربناتی ۰/۲ میکرو مولار عبور داده شدند و نمونه‌های حاصل برای روش FISH مورد استفاده قرار گرفتند. برای دو رگه سازی پروب‌های زیر مورد استفاده واقع شدند: پروب EUB338 که برای قلمرو باکتریایی اختصاصی می‌باشد، پروب SRB385 که برای اکثر اعضای SRBs اختصاصی است، پروب DMF228 که برای گروه دسولفوتوماکولوم اختصاصی است. پروب‌های الیگونوکلئوتید سنتز شدند و با کربوکسی فلورسین نشان‌دار شدند، سپس نمونه‌ها بعد از اثر دادن با پروب‌ها زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنت بررسی و شمارش شدند.

تنها بخش کوچکی از جمعیت باکتریایی را تشکیل می‌دهند (۱/۹۵-۰/۳٤درصد) و بالاترین میزان را در لایه‌ی ۳ سانتی‌متری (۱/۹۵٪) داشتند و یک تمایل کاهش وابسته به عمق را در طول هسته ۱۲ سانتی‌متری دارا بودند. حضور SRBs سیگما پروتئوباکتر در رسوبات عمیق دریا به وسیله روش FISH با استفاده از پروب‌های الیگونوکلئوتیدی ویژه SRB یعنی SRB385 مشخص و تأیید شد.

تعداد کل سلولی طیفی را از تقریبا 10^6 تا حدود 10^7 سلول بر گرم را در برگرفت. درصد تعداد باکتریایی در شمارش سلولی از ٦۰٪ در لایه‌ی سطحی تا ۲۰ ٪ در لایه انتهایی کاهش یافت. نتایج نشان دادند که محتوی SRB نسبتاً پایین است و بخش کوچکی از جمعیت باکتـــــــریایی را (۱/۹۵-۰/۳٤درصد) تشکیل می‌دهد. همچنین FISH نشان داد که SRBs در هسته WPO میله‌ای- کوکسی بودند و آنها به طور جداگانه در رسوبات توزیع شدند، بدون اینکه تجمعاتی مشاهده شوند.

۲-۳-روش توسعه پروب های[٤] الیگونوکلئوتیدی و پرایمرهای PCR برای شناسایی زیر گروه‌های فیلوژنتیکی باکتری‌های احیاکننده سولفات

دسته‌های پرایمر PCR برای ژن 16SrRNA مربوط به شش گروه باکتریایی احیا کننده سولفات طراحی و به منظور

۱- حامل (بردار، وکتور): قطعه‌ای از DNA است که دارای مبدأ همانندسازی مستقل است و می‌تواند قطعه DNA مورد نظر ما را به درون سلول میزبان هدف حمل کند.

۲- ترانسفورم کردن سلول‌های مستعد به معنی انتقال DNA خارجی به درون سلول‌های مستعد می‌باشد.

۳- آنزیم‌های محدودکننده آنزیم‌هایی هستند که توالی خاصی از DNA را شناسایی می‌کنند و برشی در آن ایجاد می‌نمایند. هر گونه تغییر در جایگاه برش آنها مانع برش شده و در نتیجه طول قطعه ایجاد شده تغییر می‌یابد.

٤- پروب عبارتست از قطعه‌ای از DNA که نشاندار شده و برای جستجوی توالی خاصی از DNA به کار می‌رود.

شناسایی SRBs در نمونه‌های محل دفن زباله ها استفاده شدند. شش گروه generic/subgeneric متمایز گردید، که شامل دسولفوتوماکولوم، دسولفوبولبوس، دسولفوباکتریوم، دسولفوباکتر، دسولفوکوکوس- دسولفونما- دسولفوسارسینا، دسولفو ویبریو- دسولفومیکروبیوم بودند. ویژگی‌های پیش‌بینی شده ترکیبات پرایمرهای PCR و پروب‌های الیگونوکلئوتیدی با DNA مربوط به سویه‌های مرجع تأیید شد. دستورالعمل PCR مستقیم و nested PCR [1] برای 16SrRNA در landfill استفاده شد. سه تا از گروه SRBs توانستند با استفاده از PCR مستقیم شناسایی شوند (دسولفوتوماکولوم، دسولفوباکتر، دسولفوکوکوس- دسولفونما- دسولفوسارسینا) زمانی که nested PCR استفاده شد دو گروه دیگر هم شناسایی شدند (دسولفوبولبوس، دسولفو ویبریو- دسولفومیکروبیوم). تنها دسولفوباکتریوم نتوانست در نمونه‌های محل دفن زباله‌ها با استفاده از PCR مستقیم و nested شناسایی شود.

٤-۲- شناسایی و شمارش باکتری‌های احیا کننده سولفات در رسوبات به وسیله PCR رقابتی

توزیع باکتری‌های احیاکننده‌ی سولفات در رسوبات ورودی رودخانه کولن [2] در انگلیس که غلظت‌های نمکی متفاوتی را در بر می‌گیرد به وسیله PCR رقابتی [3] بررسی شد. در این جا یک دسته پرایمر جدید و روش کمّی که از PCR استفاده می‌کند بررسی می گردد. یک دسته پرایمر برای ژن دیس سیمیلاتوری سولفید ردوکتاز [4] طراحی شده است و تکثیر PCR با استفاده از دسته منفرد پرایمرهای ویژه‌ی (DSR) که محصولات PCR را با اندازه‌های مورد انتظار ایجاد می‌کند، انجام می گردد. نتایج نشان دادند که PCR با استفاده از پرایمرهای جدید طراحی شده برای شناسایی انتخابی SRB از یک نمونه طبیعی مفید است. این نوع پرایمر برای تخمین تعداد سلول‌ها با روش PCR رقابتی به کار برده می شود. در این روش از یک رقیب استفاده شده است که حدود ۲۰٪ کوتاه تر از ناحیه طراحی شده DSR می باشد.

این روش برای نمونه‌های ورودی رودخانه کولن به همراه اندازه‌گیری همزمان میزان احیای سولفات استفاده شده است. تراکم بالایSRB که طیفی را از ۰/۲تا $۱۰^{۸}\times$ ۵/۷ سلول بر میلی‌لیتر رسوبات در برمی‌گیرد. با استفاده از PCR رقابتی تخمین زده شد. در این روش فرض بر این است که همه SRBs یک نسخه منفرد از DSR را دارند. با استفاده از این تخمین میزان احیای سولفات ویژه از $۱۰^{-۱۷}$ تا $۱۰^{-۱۵}$ ۱۰مول SO_4 بر سلول بر روز تخمین زده شد. نتایج نشان دادند که PCR رقابتی ابزار قدرتمندی برای تخمین سریع تعداد SRBs در محل است و برتر از روش‌های وابسته به کشت می‌باشد. با این حال در صورتی که شرایط برای شناسایی این باکتری‌ها فراهم نباشد، می توان با استفاده از روش‌های دیگری که در ادامه بحث خواهد آمد آنها را شناسایی کرد.

۳- ویژگی‌های فیزیولوژیک مؤثر در شناسایی باکتری های احیا کننده سولفات

۱-۳-تعریف باکتری‌های SRB بر اساس خصوصیات فیزیولوژیک آنها

SRBs دسته یا گروهی از باکتری های چـــند شکلی و بی‌هوازی مطـلق بوده که از لحاظ واکنش گرم، جزء باکتری‌های حقیقی گرم منفی هستند. این نوع باکتری بیش از دو میلیارد سال است که در کره زمین زندگی می کند. امروزه نیز در کلیه خاک‌ها و آب‌های آلوده و دریاها به وفور یافت می شوند و از سولفات یا دیگر ترکیبات اکسید شده

۱- در این روش ابتدا یک جفت پرایمر ناحیه خارجی منطقه هدف را تکثیر می‌کند، سپس یک جفت پرایمر برای تکثیر ناحیه داخلی تر (هدف) استفاده می‌شود به این ترتیب از تکثیر غیر اختصاصی ممانعت می‌شود.

[2] Coln

۳- در این روش علاوه بر DNA هدف، کنترل داخلی هم وجود دارد. کنترل داخلی یک توالی، یک توالی DNA غیر هدف است که از طریق تکنیک ترکیب پرایمر (composite primer) توالی پرایمری مشترک با DNA هدف در دو طرف کنترل داخلی قرار می‌گیرند و این امکان را فراهم می‌آورند که هر دو قطعه‌ی DNA تحت شرایط یکسان در یک مخلوط واکنش تکثیر یابند. در این روش همواره رقابتی بین قطعه هدف و کنترل داخلی ایجاد می‌شود و زمانی که تعداد نسخه‌های این دو قطعه برابر باشند، تقریباً تکثیر یکسانی هم خواهند داشت، این ویژگی در حقیقت اساس روش نیمه کمی competitive PCR است.

[4] DSR :Dissimilatory Sulfide Reductase

سولفور و یا سولفور عنصری به عنوان منبع الکترون استفاده کرده و با احیای این ترکیبات موجب تولید سولفید هیدروژن می شوند. در برخی گونه‌ها متابولیسم تخمیری نیز امکان دارد با این حال کربوهیدرات ها به ندرت تجزیه می شوند [۲۱].

۲-۳- ویژگی های عمومی در شناخت SRBs

بسیاری از گونه های این گروه (SRBs) دارای خصوصیات زیر می باشند [۲۱]:

الف) وجود سیتوکرم C و یا سیتوکروم b

ب) وجود آنزیم سولفیت ردوکتاز، دسولفوویریدین و دسولفوروبیدین

ج) در بسیاری از گونه ها هیدروژناز وجود دارد.

د) احیای نیترات به آمونیوم در بسیاری از سویه ها منفی است لیکن در برخی سویه ها وجود دارد.

ه) برخی از سویه ها دارای توانایی تثبیت نیتروژن می باشند که در جداسازی آن ها اهمیت دارد.

و) جنس‌ها و گونه‌های مختلف SRB با توجه به الگوی مصرف ترکیبات آلی متفاوت بوده و بر این اساس دو دسته وجود دارد:

I) بسیاری از گونه ها با مصرف غیر کامل (ناتمام) ترکیبات آلی نظیر لاکتات آنها را به استات و دی اکسید کربن تبدیل می نمایند.

II) برخی گونه ها با اکسیداسیون کامل استات و ترکیبات آلی دیگر آنها را به دی اکسید کربن تبدیل می نمایند.

ز) درصد مولی GC برای DNA مابین ۶۷-۳۷٪ متفاوت است.

٤- روش های اساسی در شناخت باکتری‌های احیاکننده سولفات و یا سولفور

I) باکتری هایی که قادر به اکسیداسیون کامل استات به دی اکسید کربن می باشند:

این باکتری ها از سولفور به عنوان پذیرنده الکترون استفاده می نمایند، سولفات به هیچ عنوان احیا نمی شود. این گروه از باکتری‌ها جزء باکتری هایی هستند که احیا جذبی سولفور را انجام می دهند، در این دسته جنس دسولفوروموناس[1] وجود دارد.

II) باکتری هایی که قادر به احیا جذبی سولفات می باشند: سولفیت، تیوسولفات و یا دیگر ترکیبات اکسید شده سولفوری به عنوان پذیرنده الکترون می باشند، این باکتری ها به نام باکتری های احیاکننده جذبی سولفات معروفند [۲۱]. گروه (II) بر اساس ویژگی های فیزیولوژیک به گروه های زیر تقسیم می شود:

الف) در این گروه سلول ها آزاد بوده و به صورت تک، جفت یا به صورت زنجیره ای وجود دارند. این گروه بر اساس برخی خصوصیات فیزیولوژیک به صورت زیر طبقه‌بندی می شوند (جدول ۱).

ب) در این دسته سلول ها به شکل سارسینایی می باشند و برخی اوقات اشکال نامنظم دیده می شود. اشکال کوکسی و یا بیضوی شکل تکی نیز که اغلب تحرک هم دارند دیده می‌شوند و اکسیداسیون کامل اسیدهای چرب و یا بنزوات وجود دارد، جنس شاخص این گروه دسولفوسارسینا[2] است.

ج) سلول ها به صورت دسته های چندسلولی و نیز رشته ای قابل انعطاف با حرکت خزنده وجود دارد، اکسیداسیون کامل اسیدهای چرب وجود دارد، جنس شاخص این گروه دسولفونما[3] است.

۵- ویژگی های مختلف کاربردی در شناسایی گونه‌های مختلف باکتری های احیاکننده سولفور و سولفات

الف- جنس دسولفوروموناس: روش شناسایی و افتراق این جنس از دیگر باکتری های احیاکننده دفعی سولفور بر اساس واکنش های فیزیولوژیکی استوار است. خصوصیات اصلی ویژه این جنس توانایی آنها در رشد بر روی استات به عنوان تنها منبع آلی کربنی است. در این حالت استات با تنفس بی‌هوازی به دی اکسید کربن تبدیل شده و از طرف دیگر سولفور به سولفید احیا می شود.

[1] Desulfuromonas sp.
[2] Desulfosaricina
[3] Desulfonema

جدول ۱: مشخصات اصلی برخی جنس های باکتری های احیاء کننده سولفات[۲۱]

گروه	شکل سلولی	خصوصیات فیزیولوژیک	تولید اسپور	جنس شاخص
گروه ۱	میله ای- مارپیچی، ویبریویی و فنری	اکسیداسیون ناتمام لاکتات به استات و CO_2 برخی گونه ها اسیدهای چرب را به صورت کامل اکسید می نمایند.	ندارد	Desulfovibrio
گروه ۲	میله ای و صاف و غیرمتحرک	اکسیداسیون ناتمام لاکتات یا پیروات به استات و CO_2	ندارد	Desulfomonas
گروه ۳	کروی (تحت تمام شرایط)	اکسیداسیون کامل اسیدهای چرب یا بنزوات	ندارد	Desulfococcus
گروه ٤	بیضوی تا میله ای با انتهای گرد و گاهاً کوکوسی	اکسیداسیون کامل استات به CO_2، رشد در آب دریا بهتر صورت می گیرد.	ندارد	Desulfobacter
گروه ٥	بیضوی، اغلب به شکل لیمو با انتهای مشخص و تیز	اکسیداسیون ناکامل پروپیونات یا لاکتات به استات و CO_2	ندارد	Desulfobulbus
گروه ٦	باسیلی صاف تا کمی خمیده با انتهای مشخص و تیز	-	دارد	Desulfotomaculum

گیرنده الکترون: جنس دسولفورومونـاس قادر به استفاده از سولفات، تیوسولفات و سولفیت به عنوان منبع گیرنده الکترون نیست. این ویژگی در شناسایی و افتراق این جنس با گونه های اکسیدکننده استات و احیاکننده سولفات (SRB) نظیر گونه های دسولفوتوماکولوم و دسولفوباکتر از اهمیت خاص و منحصر به فردی برخوردار است [۲۱]. توانایی استفاده از سولفور و تبدیل آن به H_2S از جمله ویژگی های جنس های کامپیلو باکتر، وایلونلا و برخی SRBs مربوط به جنس دسولفوویبریو است، لیکن جنس های ذکر شده هیچ کدام قادر به اکسیداسیون استات به CO_2 نیستند و برای احیای سولفور نیاز به فومارات و یا هیدروژن دارند. برخلاف اکثر باکتری های احیاکننده دفعی سولفور که میله ای شکل می باشند. اکثر سویه های جنس دسولفورومونـاس بیضوی بوده و دارای حرکت با تاژه جانبی یا نیمه قطبی هستند [۲۱]. بر اساس مطالعات فوق سه ویژگی جنس دسولفورومونـاس عامل افتراق آن است:

I) قدرت رشد تحت شرایط بی هوازی بر روی استات.

II) عدم توانایی استفاده از سولفات و تیوسولفات و سولفیت به عنوان منبع گیرنده الکترون.

III) تحرک با تاژه جانبی.

ب) جنس دسولفوویبریو

I) ویژگی های مورفولوژیک: شکل خمیده و تحرک بسیار زیاد از جمله خصوصیات منحصر به فرد است.

II) عدم مقاومت گرمایی به صورتی که در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد پس از ۵ دقیقه از بین می رود. این خاصیت موجب شناسایی و افتراق آن نسبت به گونه های جنس دسولفوتوماکولوم می گردد.

III) تست دسولفوویریدین برای اکثر گونه ها مثبت است.

روش انجام تست: سوسپانسیون سلولی را با چند قطره سود 2N آغشته کرده و به سرعت در مجاورت نور با طول موج ۳٦٥nm قرارمی دهند، مشاهده فلورسنس قرمز نشانه حضور این جنس است.

سه ویژگی فوق اکثر سویه های این جنس را از سویه های جنس دسولفوباکتر، دسولفوکوکوس، دسولفوسارسینا و دسولفوفوبوس مجزا می سازد [۲۱].

ج) جنس دسولفومونـاس

I) عدم وجود مقاومت حرارتی

II) عدم توانایی در استفاده از چربی مونوکربوکسیلیک به عنوان منبع الکترونی
III) عدم تحرک
ه) جنس دسولفوکوکوس
I) شکل کوکوئیدی
II) توانایی رشد بر روی بنزوات به عنـــوان منبع کربن، سویه‌های دسولفوسارسینا نیز این توانایی را دارند، اما شکل این سویه ها در محیط حاوی آگار به صورت سارسینایی است [۲۲]. همان طور که در قسمت های قبلی توضیح داده شد اغلب سویه های جداشده از خوردگی های آهن و یا آلیاژهای مربوط به جنس دسولفوویبریو است، بنابراین روش غنی‌سازی این جنس به صورت مفصل مورد بحث قرار می گیرد.

٦- غنی سازی جنس های مختلف SRBs

به منظور غنی سازی و سپس کشت هر کدام از جنس های باکتری های احیا کننده سولفات روش‌ها و الگوهای مختلف وجود دارد. این روش‌ها در اصل بر پایه خواص فیزیولوژیکی است که در قسمت های قبلی ذکر شد [۲۱و ۲۲]. به طور کلی برای هر جنس محیط کشت حاوی کلیه نمک های معدنی مورد نیاز، سولفات و منبع کربن مناسب است. در صورتی که pH محیط و شرایط پتانسیل اکسیداسیون و احیا به طور صحیحی تنظیم شود رشد SRBs به سهولت به دست می آید [۲۳].

۷- جداسازی و غنی سازی جنس دسولفوویبریو

همان طور که در قسمت های قبلی توضیح داده شده است این جنس از احیا کننده های سولفات در اکثر خوردگی های میکروبی حاصل از SRBs حضور دارد و به عنوان مثال در لوله های انتقال آب سیستم خنک کننده آب صنعتی و خط تولید کارخانه قند نیز گزارش گردیده است [۲۵]. برای کشت و غنی سازی این جنس، نیاز به پتانسیل اکسیداسیون و احیا به نسبت پایین در حدود ۱۵۰- mv است. تحت این شرایط نفوذ اکسیژن به درون محیط کشت به شدت کاهش یافته و رشد تسهیل می گردد. در محیط کشت SRBs اغلب از نمک های آهن به عنوان نوعی نشان‌گر (اندیکاتور) جهت درک احیای سولفات استفاده می شود. در صورتی که سولفات احیا شود و به سولفید تبدیل شود در طی واکنش با یون های آهن تولید سولفید آهن سیاه رنگ می کند که نشانه رشد این باکتری هاست [۲۶]. برخی از میکروارگانیسم‌ها و SRBsبر اثر تولید بیوفیلم سبب خوردگی میکروبی می شوند [۲۹].

۸- روش‌های کاهش پتانسیل اکسیداسیون و احیای محیط

I) استفاده از نمک Na_2S به غلظت یک میلی‌متر در محیط کشت: استفاده از نمک Na_2S خالص با غلـظت ۱mM می‌تواند میزان پتانسیل اکسید و احیا را تا حدی کاهش دهد، لیکن در صورتی که سویه ها نسبت به اکسیژن حساس‌تر باشند این روش کارایی ندارد. در ضمن افزایش بیش از حد (بیش از ۱mM) موجب سیاه شدن محیط کشت می گردد که متعاقب آن تشخیص با مشکل مواجه می شود [۲۲].
II) استفاده از نمک تیوگلیکولات سدیم و یا تیولاکتات با غلظت ۱mM: این روش نیز کارایی زیادی در کاهش نفوذ اکسیژن دارد، لیکن هنگامی که مخلوط تیوگلیکولات سدیم (۱mM) همراه با آسکوربات (۱mM) استفاده شود، نتایج بهتری به دست می آید [۲۲و۲۳].
III) استفاده از نمک تازه سدیم دی تیونیت: از جمله معایب این روش اشکال در استریل شدن کامل نمک سدیم دی تیونیت است.
IV) استفاده از روش آگار مخلوط[1]: در این روش از کشت جامد جهت جداسازی غنی سازی استفاده می شود. این روش مزایا و معایبی دارد، لیکن از هر جهت برای به دست آوردن کلنی های جداسازی شده و خالص مناسب است. اغلب از روش آگار مخلوط معمولاً پس از غنی سازی نمونه ها (به یکی از سه روش قبلی) جهت تفکیک سویه ها استفاده می شود.

[1] Shake agar

۹- نحوه کشت به روش آگار مخلوط

برای کشت از لوله های درپیچ دار به طـول حداقل۲۰ سانتی‌متر استفاده می شود. قطر لوله ها اهمیت چندانی ندارد ولی لوله های با درب قابل اتوکلاو توصیه می شود. بر طبق این روش پس از اضافه کردن عناصر اصلی محیط کشت به محیط، در حد ۱-۰/۸٪ آگار خالص اضافه می شود، سپس محلول حاصل اتوکلاو شده و پس از اتوکـــــلاو تا دمای ۵۰-۴۵ درجه سانتی‌گرادسرد می شود. در همین حـین نمونه‌های حاوی باکتری با رقت های مختلف به محلول فوق اضافه شده و به آرامی تکان داده می شود تا به طور کامل مخلوط شود و سپس درب لوله را بسته و انکوباسیون در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام می گیرد. پس از طی شدن مدت زمان لازم، کلنی سیاه- خاکستری موجود در عمق محیط کشت نشانه رشد است؛ نکته اصلی در کشت به روش آگار مخلوط نیاز به درجه خلوص بالا از آگار است و همچنین برای این که بتوان حداکثر تفکیک را در کلنی ها ایجاد کرد نیاز به ساخت رقت های مختلف از نمونه غنی شده است.

۱۰- روش جداسازی جنس دسولفوویبریو

روش های مختلفی با ترکیبات مختلف جهت جداسازی باکتری های جنس دسولفوویبریو موجود است که در این میان از سه محیط کشت زیر بیشتر استفاده شده است (جدول۲). روش عمومی جهت جداسازی باکتری های جنس دسولفوویبریو استفاده از محیط کشت B است. طبق این روش یک محلول پایه شامل کلیه ترکیبات محیط B ساخته می شود، سپس ۲ml از محیط پایه برداشته شده و با ۱٪ وزنی/حجمی آگار خالص، ۰/۰۱ ٪ سدیم آسکوربات و ۰/۰۱ ٪ سدیم تیوگلیکولات مخلوط نموده و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اتوکلاو انـــجام می‌گیرد، پس از اتوکلاو، pH محیط بررسی می شود. در صورتی که اجزا به صورت صحیح استفاده شده باشد، pH در این مرحله در ۲۵ درجه سانتی‌گراد حدود ۷/۵ است [۲۶]. سپس به روش آگار مخلوط که قبلاً توضیح داده شد، نمونه‌ها وارد محیط کشت می گردد. پس از ۵-۴ روز کلنی های سیاه حاصل از رشد جنس دسولفوویبریو در لوله هایی که دارای رقت کمتر است، دیده می شود [۲۸]. امکان دارد کلنی های دیگری به رنگ‌ها و اشکال دیگری به غیر از سیاه-خاکستری دیده شود که اهمیتی از لحاظ تشخیص SRB ندارد و از آنها چشم پوشی می گردد. پس از گذشت مدت زمان لازم جهت گرمخانه گذاری برای جداسازی کلنی‌ها می توان لوله آزمایش را به صورت استریل درون یک پلیت استریل شکست و با استفاده از پی‌پت پاستور کلنی را جداسازی و برای مراحل بعدی استفاده کرد. قبل از وارد شدن به مراحل بعدی برای اطمینان از خالص بودن کشت، کلنی ها درون سرم فیزیولوژیک استریل حل شده و با استفاده از میکروسکوپ خالص بودن کشت بررسی شود. پس از اطمینان از کشت خالص سلول ها به محیط B (جدول ۲) با Na_2S اضافه می شود [۲۲و۳۰].

۱۱- نتیجه گیری

با توجه به اینکه SRBs باکتری‌هایی کند رشد هستند، شناسایی سریع آنها با روش‌های مولکولی می‌تواند بسیار مفید واقع شود. روش‌های مولکولی نیاز به صرف وقت زیادی ندارد از این جهت مناسب هستند. روش FISH روش دقیق و نسبتاً سریعی برای شمارش و شناسایی SRBs است اما تنها مشکل آن هزینه بالای انجام آن می‌باشد. در میان روش‌های مولکولی روش‌های تکثیر باPCR روش‌های متداول هستند. روش‌های PCR با پرایمرهای 16srRNA برای تشخیص باکتری‌هایSRB راه دقیق و سریعی است. البته در برخی روش‌های مولکولی مثل Competitive PCR که برای تعیین کمی باکتری‌ها استفاده می‌شود گاهی نتیجه حاصله دقیق نمی‌باشد و در نتیجه برای بدست آوردن نتیجه دقیق‌تر می‌توان از روش‌های وابسته به کشت مثل MPN استفاده کرد و نیز برای شناسایی از محیط کشت ها و خصوصیات فیزیولوژیک مطالعه شده استفاده نمود.

جدول ۲: ترکیبات محیط کشت لازم جهت رشد جنس دسولفوویبریو

ترکیبات	غلظت (گرم بر لیتر آب مقطر)		
	محیط B	محیط C	محیط D
KH_2PO_4	۰/۵	۰/۵	۰/۵
NH_4Cl	۱	۱	۱
$CaSO_4$	۱	–	–
Sodium Citrate	–	۰/۳	–
Na_2SO_4	–	٤/٥	–
$MgSO_4 . 7 H_2O$	۲	۰/٦	–
Sodium lactate	۳	۰/٦	–
Sodium pyruvate	–	–	۳/٥
$CaCl_2 . H_2O$	–	۰/٦	۰/۱
$FeSO_4 . 7 H_2O$	۰/٥	۰/۰۰٤	۰/۰۰٤
$MgCl_2 . H_2O$	–	–	۱/٦
Yeast extract	۱	۱	۱

مراجع

1. F.vester and K.Ingvoren.(1998). Improved most probable number method to detect sulfate reducing bacteria with natural media and radiotracer. Applied and environmental microbiology. Vol 64, Pp. 1700-1707.
2. C. Hubert et al. (2005). Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. Appllied Microbial Biotechnology. Vol. 68, Pp. 272- 282.
3. E. B. A. Wieringa, J. Overmann, and H. Cypionka . (2000). Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. Environmental Microbiology.Vol. 2, NO. 4, Pp. 417-427.
4. W. Peng and et al. (2008). Molecular survey of sulfate reducing bacteria in the deep sea sediment of the west pacific warm pool. Vol.7, NO.3, Pp. 269- 275.
5. W. Manz et al. (1997). Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides.FEMS Microbiology Ecology.Vol. 25, Pp. 43-61.
6. G.Voordouw and et al. (1996). Characterization of 16S rRNA genes from oiled filed microbial communities indicates the presence of avariety of sulfate reducing, fermentative and sulfide oxidizing bacteria. Applied and environmental microbiology. Vol.62, NO. 5, Pp. 1623-1629.
7. U. Bockelmann et al. (2000). Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates (river snow) in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 33. Pp.157-170.
8. R. I. Amann et al. (1992). Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-Reducing Bacteria in Multispecies Biofilms. Applied and environmental microbiology. Vol.58, NO.2, Pp. 614-623.

9. C. G Chaucke, D. A Dorrington. and P. D Rose. (2000). Techniques used to investigate the microbial echology of sulfate reducing bacteria in sludge bioreactors. Presented at the WISA 2000 Biennial Conference. Sout Africa. 28 may- 1 june 2000.
10. R. Amann, B. M. Fuchs ,and S. Behrens.(2001). The identification of microorganisms by fluorescenc *in situ* hybridisation. Environmental biotechnology.Vol. 12,Pp. 231-236.
11. J. L. Sanz. T. Kochling. (2007). Molecular biology techniques used in wasterwater treatment: An overview. Process Biochemistry. Vol.42, Pp. 119-133.
12. J. Kleikemper. et al. (2002). Activity and diversity of sulfate reducing bacteria in petroleum hydrocarbon- contaminated aquifer. Applied and environmental microbiology. Vol. 68, NO.4,Pp. 1516- 1523.
13. R.J Daly.k,sharp, and A . J. Mac carthy. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate reducing bacteria. Microbiology.Vol. 146,Pp. 1693-1705.
14. V. Zinkevich. I. B. Beech, (2000). Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. FEMS Microbiology Ecology.Vol 34, Pp. 147-155.
15. M. D Kane, L. K Poulsen, and D. A stahl. (1993). monitoring enrichment and isolation of sulfate reducing bacteria by using oligonucleotid hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. Applied and environmental microbiology. Vol. 95, Pp. 682- 686.
16. R. kondo and et al. (2004). Detection and enumeration of Sulfate reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR . geomicrobiology journal. Vol. 21, Pp.141-157.
17. A.Dar Shabir, and et al.(2006). Analysis of diversity and activity of sulfate- reducing bacteria communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and dsrB genes as molecular markers.Applied and environmental microbiology. Vol.73, NO.2, Pp.594.
18. I. R. Perez-Jimenez. L. Y. Young and L. J. Kerkhof (2001). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfate reductase (*dsr*AB)genes. FEMS Microbiology Ecology. Vol.35, Pp.145-150.
19. A. Dhillon et al. (2003). molecular characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. Applied and environmental microbiology. Vol. 69,NO.5,Pp. 2765-2772.
20. J. Leloup, and et al. (2005).diversity of the dsrAB (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. FEMS Microbiology Ecology. Vol 55. Pp. 230-238.
21. J. T. Stanley, MP. Brayant. N. Pfenning and J. G. Holt. Bergey's manual of systematic bacteriology. William and Wilkins.London.Ed^{8th}. 1986.

۲۲- روحا- کسری کرمانشاهی، موج خالقی(۱۳۷٤)، جداسازی و شناسایی باکتری های عامل خوردگی بیولوژیک از پساب های صنعتی پالایشگاه نفت. چهارمین کنگره ی ملی خوردگی.

23. L.L. Barton. Characteristics and activities of sulphate reducing bacteria. Newyork. London: Plenum press. 1995.
24. O.J. Hao, et al. (1996). Sulfate reducing bacteria. Crit. Rev. Environmental Science and technology. Vol .26,Pp. 155-187.
25. M.Setareh, R. Javaherdashti. (2003). Assessment and control of MIC in a sugar cane factory. Materials and corrosion .Vol.54, Pp. 259-263.

۲٦- ایوب. ترکیان، روحا کسری- کرمانشاهی و محمود مرعشی. (۱۳۷۵). بررسی خوردگی در لوله های آب رسانی گاز کنگان توسط باکتری ها. مجموعه مقالات کنگره ی سراسری بهداشت آب، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

۲۷- ایوب. ترکیان، روحا کسری- کرمانشاهی و مهدی امین. (۱۳۷۵)، جداسازی و شناسایی و نقش میکروارگانیسم های UASBکشتارگاه اصفهان، مجله ی تحقیقات آب و انرژی دانشگاه صنعتی شریف. صفحه ی ۲۲-٦.

۲۸- آرش فتاح الحسینی، احمد ساعتچی، محمد حسین فتحی، روحا کسری- کرمانشاهی.(۱۳۸٤). بررسی خوردگی میکروبی فولادی کربنی با روش ماکزیمم آنتروپی. انجمن خوردگی، نهمین کنگره ی ملی خوردگی. صفحه ی ۲٥٦-۲٤۹.

29. Sh.Shakeri, R. Kasra-Kermanshahi, M. Momeni- Moghaddam and G. Emtiazi. (2007). Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. Biofouling. Vol 23, No 2, Pp79- 86.

30. R. cord- ruwisch.(1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate reducing bacteria. Journal of microbiological methods. Vol.4, Pp. 33-36.