مقایسه کارآیی کاربردی بیوسایدهای فرمالدئیدی و غیرفرمالدئیدی بر توده میکروبی غالب در امولسیون فلزکاری

محمد کارگر[۱،*]، وجیهه زارع[۱]، جاوید امینی[۲]، زهرا منافی[۳]

[۱] جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

[۲] کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، گروه میکروبیولوژی

[۳] رفسنجان، شرکت ملی صنایع مس ایران، مجتمع مس سرچشمه

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱

چکیده

امولسیونهای فلزکاری کاربرد گسترده‌ای در صنعت فلزکاری جهت خنک کردن، کاهش اصطکاک بین سطوح و جلوگیری از خوردگی دارند. هدف از این پژوهش ارزیابی میزان بار میکروبی امولسیون فلزکاری واحد ریخته‌گری مس سرچشمه کرمان و بررسی کارآیی بیوسایدهای فرمالدئیدی و غیرفرمالدئیدی درحذف آن می‌باشد. برای این منظور به مدت ۹ ماه، با روش دوره‌ای منظم از مخزن امولسیون فلزکاری واحد ریخته‌گری مس سرچشمه نمونه‌گیری شد. با استفاده از تستهای امولسیفیکاسیون، کشش سطحی و کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد (HPLC) میکروارگانیسم‌های مخرب مایع امولسیون فلزکاری شناسایی شد. درنهایت کارآیی ۴ بیوساید انتخابی بر روی توده میکروبی غالب بررسی و کفایت بیوساید مؤثر با HPLC تأیید گردید. از بین بیوسایدهای مورد بررسی، گلوتارآلدئید توانایی حذف کامل آلودگی میکروبی امولسیون فلزکاری را داشت. بنابراین استفاده از این بیوساید در دز بالاتر از ۲۰ ppm درامولسیون فلزکاری مورد بررسی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: امولسیون فلزکاری، آلودگی میکروبی، امولسیفیکاسیون، کشش سطحی، بیوساید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ ، پست الکترونیکی: mkargar@jia.ac.ir

مقدمه

امولسیونهای فلزکاری (Metal Working Fluids=MWFs) در صنعت معمولاً برای سوراخ کردن، بریدن، ضربه زدن، ساییدن و صاف کردن ترکیبات فلزی به ابعاد با ارزش استفاده می‌شوند (۳ و ۵). امولسیونهای فلزکاری حاوی روغنها و افزودنیهایی مانند بیوسایدها، بافرهای تنظیم کننده pH، سورفاکتانت‌های معلق، عوامل ضد کف، بازدارنده‌های فساد تدریجی، بازدارنده‌های خوردگی، امولسیفایرها می‌باشند. این ترکیبات ویژگیهایی مانند: پایداری، لیز کنندگی، خاصیت ضد ساییدگی و توانایی ضدکف و قابلیت برطرف کردن ضایعات را به آنها می‌دهند (۱۳ و ۱۵).

در هنگام عملیات تولید فلز، حرارت تولیدی و واکنش پذیری تراشه‌ها منجر به تجزیه امولسیون فلزکاری می‌شود. از نظر شیمیایی ذرات با روغنهای امولسیون واکنش داده و باعث شکسته شدن امولسیون و همچنین موجب تسهیل در رشد باکتریها و قارچها می‌شود. باکتریها از امولسیون، مواد افزودنی و روغن به عنوان غذا استفاده می‌نمایند که منجر به تجزیه بیشتر خنک کننده می‌شود. در اثر فساد امولسیون فلزکاری، کارآیی روان کنندگی و انتقال حرارت آن نیز کاهش می‌یابد (۱۰). اصلی‌ترین منبع غذایی میکروارگانیسم‌های موجود در MWFs، کربن موجود در روغنهای نفتی، اسیدهای چرب و دیگر مواد آلی موجود در

مایع فلز کاری است. وجود آب، انواع هیدروکربنهای پیچیده و نمکهای معدنی می‌توانند شرایط مناسبی را برای رشد باکتریها و قارچها فراهم آورد (۷).

در بیشتر پژوهشهای انجام شده باکتریهای گرم منفی به ویژه گونه‌های مختلف *سودوموناس* و *آسینتوباکتر* به عنوان باکتریهای غالب تخریب کننده امولسیونهای فلزکاری معرفی شده‌اند. همچنین تحقیقات Veillette و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که با وجود افزودن بیوساید به امولسیون فلزکاری باکتریهای گرم منفی مانند سویه‌های *سودوموناس* توانایی تخریب پذیری امولسیونهای فلزکاری را دارند (۱۳ و ۱۴).

یکی از دلایل مؤثر نبودن بیوساید درامولسیونهای فلزکاری افزایش بارمیکروبی تاحد 10^{10} CFU/ml می‌باشد. در این شرایط امکان هیدرولیز وخنثی سازی بیوساید به وسیله میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. به همین دلیل تعیین آلودگی میکروبی با استفاده از بیوساید مناسب و ارزیابی منظم غلظت بیوساید اهمیت دارد. اکثر میکروارگانیسم‌های امولسیون فلزکاری در شرایط هوازی و کمی قلیایی و حرارت ۲۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد رشد می‌کنند. آلودگی زیاد میکروبی، می‌تواند نشان دهنده کم و یا نامناسب بودن فعالیت بیوساید باشد. زیرا در این شرایط به وسیله میکروارگانیسم‌ها هیدرولیز و خنثی می‌گردد. برای تعیین آلودگی میکروبی، ارزیابی منظم غلظت بیوساید و همچنین مشخص بودن دفعات مورد استفاده آن اهمیت دارد (۱۵).

با توجه به قدرت تشکیل بیوفیلم توسط اکثر سویه‌ها باید در زمان تعویض امولسیون فلزکاری، مخزن نگهداری، لوله‌ها، پمپها و سایر قسمتهای در ارتباط با امولسیون فلزکاری، لجن زدایی و توسط شوینده‌ها و گندزداهای مناسب کاملاً شستشو داده شوند (۵).

در واحد ریخته‌گری مس سرچشمه کرمان از ترکیبی به نام امولسیون فلزکاری متعلق به شرکت Richard Appex (HRL) استفاده می‌گردد. محتویات این ماده به صورت انحصاری است و به همین دلیل هیچ گونه اطلاعات علمی و دقیقی در مورد چگونگی استفاده از آن در دسترس نیست و بدیهی است که به دلایل گفته شده نیز مورد پشتیبانی قرار نمی‌گیرد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در هنگام استفاده از امولسیون فلزکاری بایستی حتماً ویژگیهای میکروبی و میزان بیوسایدهای آن در رقت مورد استفاده مرتباً ارزیابی گردد. اما متأسفانه تاکنون، چنین پژوهشی به صورت اصولی و علمی انجام نشده است. همچنین با توجه به اطلاعات به دست آمده از متخصصین مجتمع و مشاهدات حضوری، به دلیل کم بودن عمر استفاده از امولسیون در این سیستم، احتمال آلودگی میکروبی امولسیون فلزکاری مورد استفاده در واحد ریخته‌گری و تأثیر قابل توجه آن بر روی کارآیی محلول امولسیون فلزکاری وجود دارد. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی میزان بار میکروبی امولسیون فلزکاری واحد ریخته‌گری مس سرچشمه کرمان قبل و پس از تعویض امولسیون و تأثیر میکروارگانیسم‌های جدا شده بر روی کاهش کیفیت امولسیون و ارزیابی وجود بیوسایدها در آن با انجام تستهای مقاومت زیستی است.

مواد و روشها

تمامی نمونه‌ها از مخزن ذخیره امولسیون فلزکاری واحد ریخته‌گری پیوسته مس سرچشمه کرمان در مدت ۹ ماه ازشهریور ۱۳۸۶ تا اردیبهشت ۱۳۸۷ با روش دوره‌ای منظم (Grab sampling) در دو نوبت کاری قبل از شروع به کار دستگاه در ابتدای هفته و پس از اتمام کار دستگاه در پایان همان هفته جمع آوری شدند. برای جداسازی سویه‌های میکروبی هوازی شامل باکتریهای مزوفیل، ترموفیل، کپک و مخمرها، پس از تهیه رقتهای متوالی درفسفات بافرسالین (PBS) دارای pH ۷/۲ به ترتیب در محیطهای پلیت کانت آگار، تریپتیکاز سوی براث، پتیتو دکستروز آگار و Y.G.M (Yeast Glucose Agar) تمامی مربوط به شرکت مرک آلمان کشت داده شد. همچنین به منظور ارزیابی باکتریهای

بی‌هوازی احیا کننده سولفات (Sulphate Reducing Bacteria =SRBs) از روش بیشترین شمارش احتمالی (Most Probable Number) در محیط پست گیت B (Post Gate B) شرکت مرک آلمان و کشت در محیطهای اختصاصی تأییدی و محیط دو فازی یاد شده دارای فاز مایع و جامد استفاده شد (۲ و ۶).

برای تفکیک توانایی میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط کامل امولسیون فلزکاری (دارای روغن و الکل) و محیط امولسیون فلزکاری دارای روغن و بدون الکل، از محیط کشت نمکی معدنی (Mineral Salt =M.S.S Solution) واجد دی هیدروژون پتاسیم فسفات (۲گرم درلیتر)، هیدورژن دی پتاسیم (۵ گرم در لیتر)، فسفات سولفات آمونیوم (۳ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم (۰/۰۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۰/۱ گرم در لیتر)، سولفات آهن (۰/۰۱ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۲ گرم در لیتر) و سولفات منگنز (۰/۰۰۲ گرم در لیتر) استفاده شد. محیط جامد امولسیون فلزکاری کامل نیز شامل محیط M.S.S آگاردار واجد روغن خالص امولسیون فلزکاری استریل (۱ درصد) و ایزوپروپیلیک الکل (۱ درصد) بود. همچنین برای ساخت محیط امولسیون فلزکاری بدون الکل به محیط M.S.S آگاردار، روغن فلز کاری خالص افزوده شد. کلونیهای جدا شده به صورت نقطه‌ای (Spot culture) در محیطهای یاد شده کشت داده شد و باکتریهای مزوفیل در ۳۰ درجه سانتی گراد، ترموفیل‌ها در ۴۴/۵ درجه سانتی گراد و مخمرها و قارچها در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری گردیدند.

تستهای آمیزندگی (Emulsification) بر اساس روش پیشنهادی Francy در سال ۱۹۹۱ انجام گرفت .تستهای آمیزندگی در محیط مایع M.S.S واجد ۰/۰۳ گرم عصاره مخمر و ۰/۰۳ گرم گلوگز انجام شد. برای انجام تستهای آمیزندگی از هیدروکربنهای متداول مشتق شده از نفت خام شامل نفت سفید، بنزین و گازوئیل استفاده گردید. تستهای آمیزندگی برروی تمامی کلونیهای جداسازی شده انجام گرفت. هرکدام از کلونیها به شش لوله حاوی محیط M.M.S واجد عصاره مخمر وگلوکز افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس به دو لوله اول ۰/۵ میلی لیتر نفت سفید استریل شده با پالایه غشایی (membrane filter)، ۰/۵ میلی لیتر بنزین استریل به دو لوله دوم و ۰/۵ میلی لیتر گازوئیل استریل به دو لوله سوم افزوده شد و پس از مخلوط کردن با دستگاه vortex در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. درنهایت میزان آمیزندگی جدایه‌ها از صفر تا چهار ثبت گردید (۱ و ۴).

به منظور تأیید توانایی تولید بیوسورفاکتانت، سویه‌های میکربی دارای متوسط آمیزندگی بیش از ۲/۵ تا ۴، برای اندازه گیری کشش سطحی انتخاب شدند و برای اندازه‌گیری کاهش کشش سطحی از دستگاه تنسیومتر (Tensiometer-TDIC, LAUDA) استفاده شد. در این تست سویه‌های انتخاب شده به یک ارلن حاوی ۱۰۰میلی لیتر محیط M.M.S دارای ۰/۰۳ گرم عصاره مخمر و ۰/۰۳ گرم گلوکز تلقیح و به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. کشش سطحی برای هر کلونی به دو صورت بدون سانتریفیوژ و پس از سانتریفیوژ با دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه اندازه گیری و ثبت گردید (۱ و ۴).

به منظور ارزیابی تغییرات میکروبی برروی ساختار MWFs، کلونیهایی که اختلاف کشش سطحی بالاتر از ۹ میلی نیوتن بر متر داشتند به محیطهای MWF1 و MWF2 تلقیح و تأثیرشان بر روی امولسیون با دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد (High Pressure Liquid Chromatography=HPLC) ساخت کشور ژاپن (SHIMADZO 10 AVD) ارزیابی گردید. این تست در محلول آب نمک ۸/۵ گرم در لیتر (S) و دو نوع امولسیون فلزکاری انجام شد. امولسیون فلزکاری مطابق فرمول مورد

استفاده در واحد ریخته گری مس سرچشمه کرمان به صورت ۱ درصد روغن فلز کاری (MWFs ایرانی و خارجی)، ۱ درصد الکل ایزوپروپلیک و ۹۸ درصد آب ساخته شد. سپس ۱میلی لیتر از سوسپانسیون واجد باکتری ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml) درون میکروتیوبهای ۱/۵میلی لیتر ریخته و سه غلظت (۱۰ppm و۱۰۰و۱۰۰۰) از بیوسایدهای فنلی [دوئیساید (Dowicide1)]، فرمالدئیدی [ونساید (VancideTH) و تریس نیترو (TrisNitro)] و گلوتارآلدئید (Glutaraldehyde) به هرکدام از لوله‌ها اضافه و در زمانهای ۱۵ و۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه گرما گذاری گردید. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه درمحیط تریپتیک سوی آگار (TSA) شرکت مرک کشت و پس از ۲۴ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه شمارش کلونیها انجام شد (۱۲) .

حداقل غلظت بازدارنده (Minimum Inhibitory Concentration=MIC) برای بهترین بیوساید درمرحله قبل برای جدایه‌های غالب باکتریها به صورت جداگانه و مخلوط، در دو محیط امولسیون فلزکاری ایرانی (MWF_1)، امولسیون فلزکاری خارجی (MWF_2)، محلول استریل تریپتیک سوی براث (TSB) شرکت مرک و محلول آب نمک اندازه گیری شد. سپس با بررسی کدورت لوله‌ها و همچنین نتایج کشت بر روی محیط TSA حداقل غلظت بازدارنده (MIC) تعیین گردید (۱۱).

به منظور تأیید کارآیی بیوساید مؤثر بر روی باکتریهای غالب جداسازی شده از HPLC استفاده شد. در ابتدا برای هر یک از باکتریهای شناسایی شده به عنوان باکتریهای مخرب و مخلوط آنها سوسپانسیونی معادل با استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml) تهیه شد. درمرحله بعد یک میلی لیتر از هر سوسپانسیون و بیوساید مؤثر شناسایی شده در مرحله قبل به ۲۰۰ میلی لیتر محیط امولسیون فلزکاری استریل مشابه ترکیب مورد استفاده در واحد ریخته‌گری پیوسته مس سرچشمه (امولسیون ایرانی وخارجی) اضافه شد و به مدت ۲ هفته در حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید.

تعیین هویت سویه‌های میکربی با استفاده از آزمونهای فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، سیمون سیترات، سولفید /اندول/موتیلیتی (SIM)، لیزین دکربوکسیلاز (LD)، اورنتین دکربوکسیلاز (OD)، آرژنین دکربوکسیلاز (AD)، آلانین دآمیناز (ADA)، اکسیدیتیو/فرمانتیتیو (OF) و تستهای تخمیر کربوهیدراتها انجام شد (۱۶ و ۱۷).

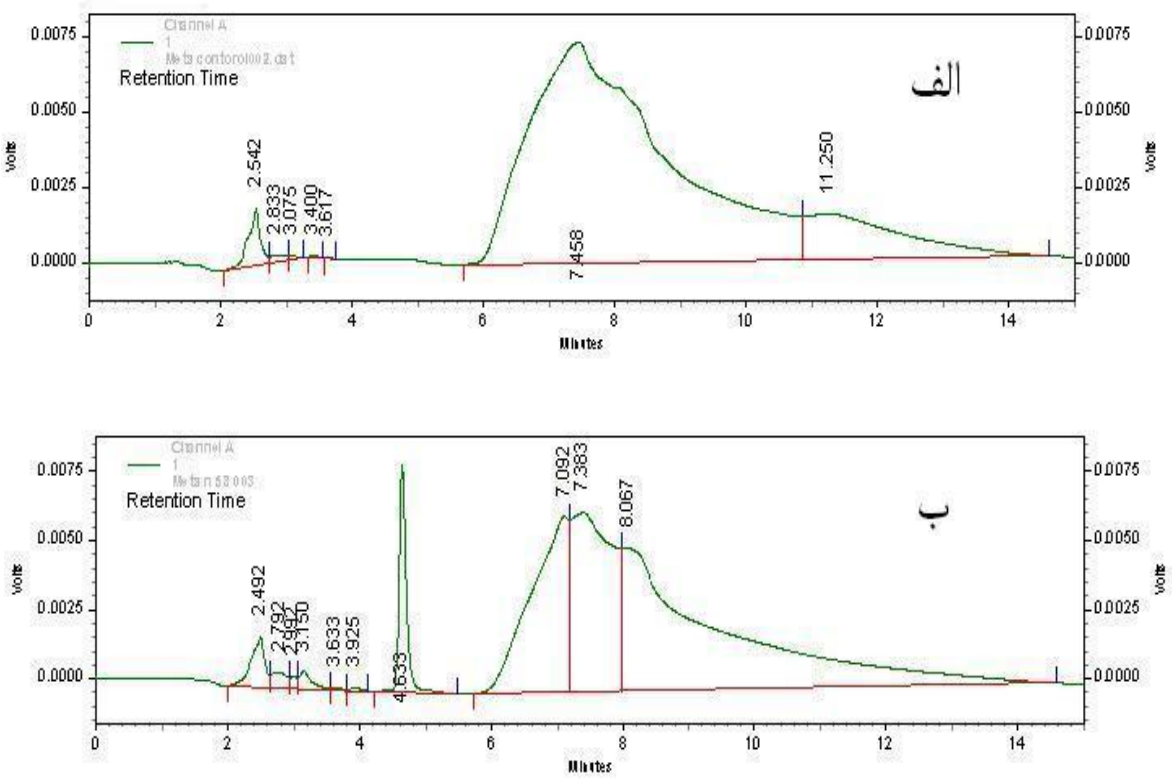
نتایج

به‌طور کلی در این پژوهش از مخزن امولسیون فلزکاری واحد ریخته گری، ۶۶ باکتری مزوفیل (فراوانی ۶۳/۴۶ درصد)، ۲۴ باکتری ترموفیل (فراوانی۲۳/۰۸درصد) و۱۴مخمر (۱۳/۴۶درصد) به عنوان میکروارگانیسم‌های غالب در مدت ۹ ماه جداسازی گردید. دو نوع محیط کشت دارای روغن و الکل (محیط کامل) و محیط فاقد الکل (دارای روغن) برای ارزیابی توانایی رشد تمام میکروارگانیسم‌های جداسازی شده استفاده شد. هیچ کدام از باکتریهای ترموفیل و قارچهای مورد بررسی توانایی رشد برروی محیطهای یاد شده را نداشتند. میکروارگانیسم‌هایی که قادر به استفاده از روغن به عنوان تنها منبع کربن بودند برروی محیط فاقد الکل و آنهایی که توانایی استفاده از الکل و یا روغن و الکل (به صورت توام) را داشتند، قادر به رشد در محیط کامل بودند. از بین جدایه‌های باکتری و مخمر، ۶۵ سویه (۶۲/۵۰درصد) دارای رشد اندک و ۳۹ سویه (۳۷/۵۰درصد) رشد بالایی را داشتند. معیار ارزیابی میزان رشد در این مرحله، مقایسه کشت خطی باکتریها در پلیت‌های یاد شده با نمونه‌های شاهد بود.

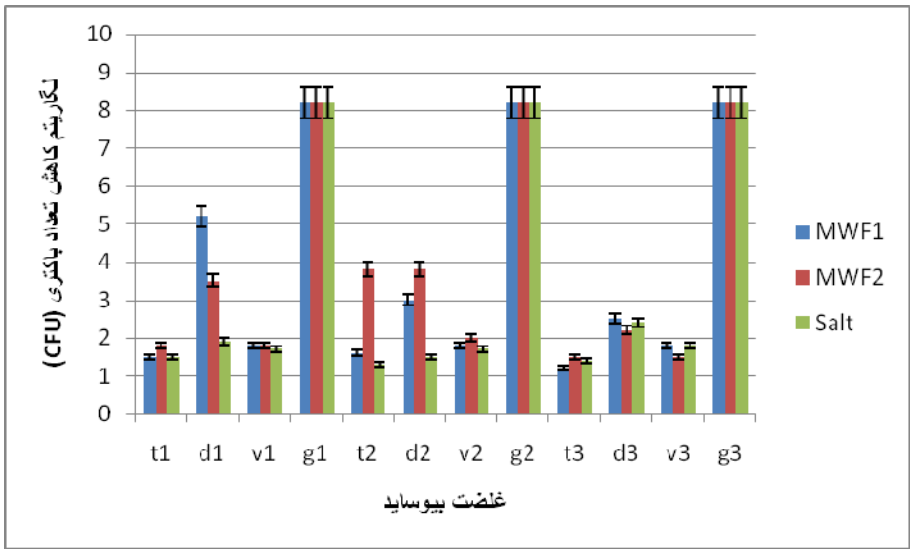
از مجموع میکروارگانیسم‌های مورد بررسی ۱۷ سویه (۱۶/۳۵درصد) که توانایی آمیزندگی مایع فلز کاری (بین

۲/۵ تا ۴) را داشتند، برای اندازه‌گیری کشش سطحی انتخاب شدند. هیچ کدام از باکتریهای ترموفیل، احیاکننده سولفات (SRBs) و قارچها توانایی آمیزندگی هیدروکربن‌های متداول نفتی را نداشتند. از بین ۱۷ سویه مورد بررسی ۱۵ سویه که بیش از ۹ میلی نیوتن بر متر اختلاف کاهش کشش سطحی نسبت به محیط شاهد را داشتند، به منظور آنالیز تخریب‌پذیری زیستی انتخاب گردیدند. آنالیز HPLC و سپس تعیین هویت باکتریها با استفاده از جداول کتاب برگی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) نشان داد که سه سویه *Alcaligenes sp.* (شکل ۱)، *Acinetobacter lwoffi* و *Acinetobacter anitratus* بیشترین اثر تخریبی را در امولسیون فلزکاری دارند (۱۷).

در مرحله بعد کارآیی ۴ بیوساید از گروههای مختلف بیوسایدهای متداول مورد استفاده در امولسیون فلزکاری شامل دو بیوساید فرمالدئیدی (ونساید و تریس نیترو)، یک بیوساید فنلی (دوئیساید) و گلوتارآلدئید برروی سه سویه غالب جدا شده به صورت جداگانه و مخلوط در دو محیط امولسیون فلزکاری (خارجی و ایرانی) و محلول آب نمک بررسی شد. نتایج نشان داد که از بین ۴ بیوساید مورد بررسی درمحیط MWF_1 (ایرانی) و MWF_2 (خارجی)، گلوتارآلدئید (۱۰ ppm) و دوئیساید (۱۰۰۰ ppm) بیشترین کارآیی (توانایی حذف کامل) را برروی هر سه باکتری و مخلوط باکتریهای غالب جداسازی شده را دارند. کارآیی ونساید و تریس نیترو به دلیل کاهش تعداد باکتریها از 10^8 به 10^6 بسیار اندک بود (شکلهای ۲ تا ۵). با استفاده از آزمون آماری ضریب همبستگی پیرسون ($P<0/05$) مشخص گردید که اثر ونساید و تریس نیترو با هم یکسان است و بین اثر این بیوسایدها در رقتهای مختلف ارتباط معنی داری وجود داشت ($P=0/884$).



شکل ۱ – آنالیز HPLC مایع فلزکاری بدون باکتری (الف) و سویه .*Alcaligenes sp* (ب). پیکهای اضافی در نمودار (ب) نشان دهنده تأثیر تخریبی باکتری بر مایع فلز کاری است.



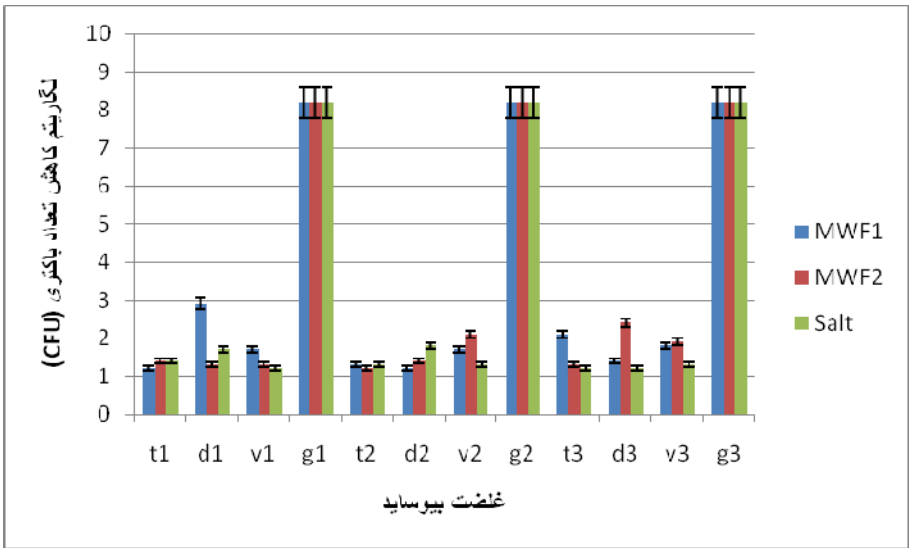
t1=تریس نیترو (۱۰ppm)، t2=تریس نیترو (۱۰۰ppm)، t3=تریس نیترو (۱۰۰۰ppm)

d1=دوئیساید (۱۰ppm)، d2= دوئیساید (۱۰۰ppm)، d3= دوئیساید (۱۰۰۰ppm)

v1=ونساید (۱۰ppm)، v2= ونساید (۱۰۰ppm)، v3= ونساید (۱۰۰۰ppm)

g1=گلوتارآلدئید (۱۰ppm)، g2= گلوتارآلدئید (۱۰۰ppm)، g3= گلوتارآلدئید (۱۰۰۰ppm)

شکل ۲ – مقایسه کارآیی بیوسایدهای مورد پژوهش برروی باکتری *Acinetobacter anitratus*



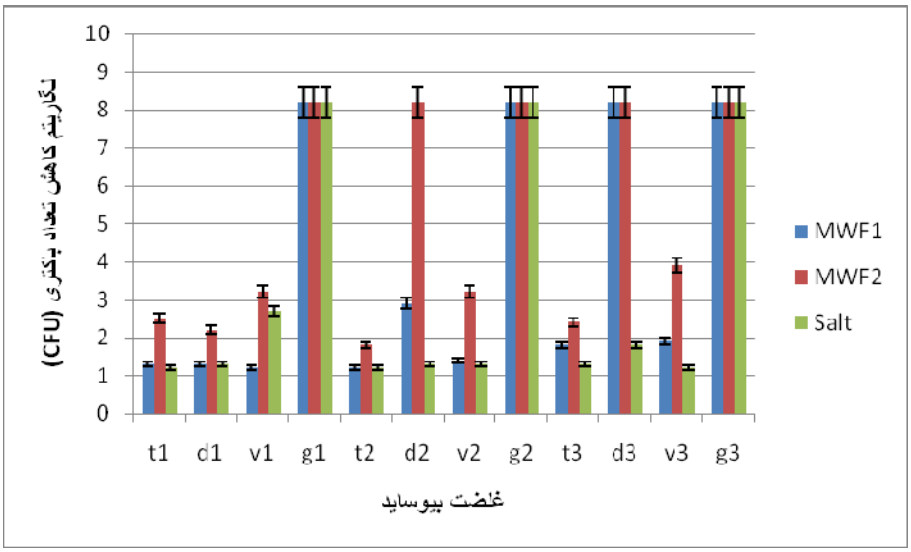
t1=تریس نیترو (۱۰ppm)، t2=تریس نیترو (۱۰۰ppm)، t3=تریس نیترو (۱۰۰۰ppm)

d1=دوئیساید (۱۰ppm)، d2= دوئیساید (۱۰۰ppm)، d3= دوئیساید (۱۰۰۰ppm)

v1=ونساید (۱۰ppm)، v2= ونساید (۱۰۰ppm)، v3= ونساید (۱۰۰۰ppm)

g1=گلوتارآلدئید (۱۰ppm)، g2= گلوتارآلدئید (۱۰۰ppm)، g3= گلوتارآلدئید (۱۰۰۰ppm)

شکل ۳ – مقایسه کارآیی بیوسایدهای مورد پژوهش برروی باکتری *Acinetobacter lwoffi*



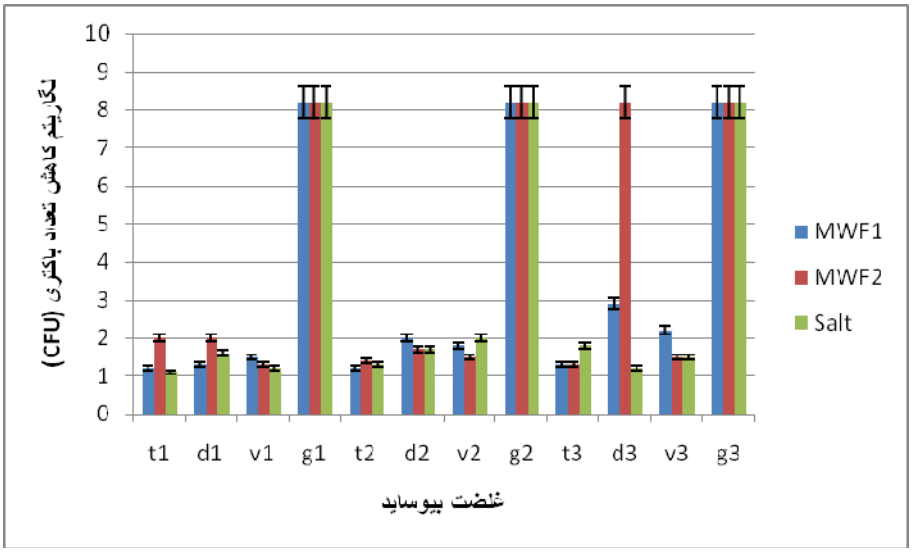
t1=تریس نیترو (۱۰ppm)، t2=تریس نیترو (۱۰۰ppm)، t3=تریس نیترو (۱۰۰۰ppm)

d1=دوئیساید (۱۰ppm)، d2= دوئیساید (۱۰۰ppm)، d3= دوئیساید (۱۰۰۰ppm)

v1=ونساید (۱۰ppm)، v2= ونساید (۱۰۰ppm)، v3= ونساید (۱۰۰۰ppm)

g1=گلوتارآلدئید (۱۰ppm)، g2= گلوتارآلدئید (۱۰۰ppm)، g3= گلوتارآلدئید (۱۰۰۰ppm)

شکل ۴- مقایسه کارآیی بیوسایدهای مورد پژوهش برروی باکتری *Alcaligenes sp*



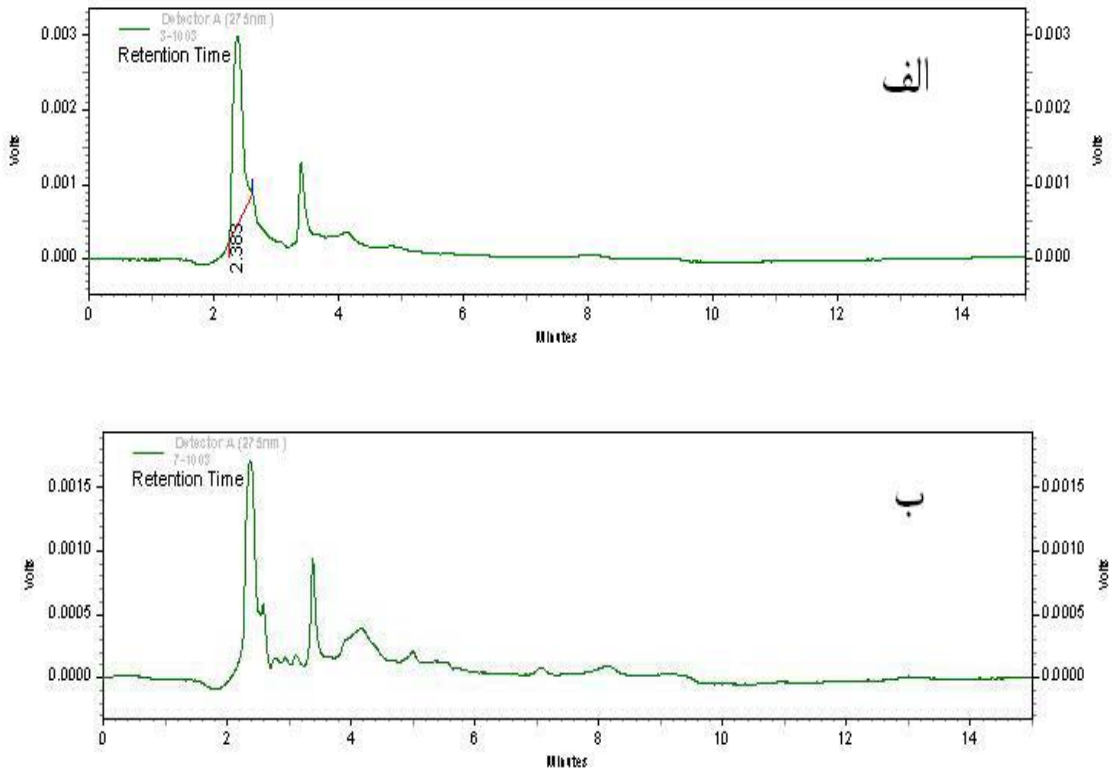
t1=تریس نیترو (۱۰ppm)، t2=تریس نیترو (۱۰۰ppm)، t3=تریس نیترو (۱۰۰۰ppm)

d1=دوئیساید (۱۰ppm)، d2= دوئیساید (۱۰۰ppm)، d3= دوئیساید (۱۰۰۰ppm)

v1=ونساید (۱۰ppm)، v2= ونساید (۱۰۰ppm)، v3= ونساید (۱۰۰۰ppm)

g1=گلوتارآلدئید (۱۰ppm)، g2= گلوتارآلدئید (۱۰۰ppm)، g3= گلوتارآلدئید (۱۰۰۰ppm)

شکل ۵ – مقایسه کارآیی بیوسایدهای مورد پژوهش برروی مخلوط باکتریهای *Alcaligenes sp*، *Acinetobacter lwoffi* و *Acinetobacter anitratus*.



شکل ۶ - آنالیزHPLC مایع فلزکاری واجد گلوتارآلدئید بدون باکتری (الف) و مخلوط سه باکتری *Alcaligenes sp.*، *Acinetobacter lwoffi* و *Acinetobacter anitratus* (ب). یکسان بودن پیکهای نمودار الف با نمودار کنترل (ب) نشان دهنده حذف توده میکروبی غالب به وسیله بیوساید گلوتارآلدئید است.

در این پژوهش حداقل غلظت بازدارنده (MIC) برای بیوساید مؤثر گلوتارآلدئید برای باکتریهای *Alcaligenes sp.*، *Acinetobacter lwoffi*، *Acinetobacter anitratus* و مخلوط هر سه باکتری در دو محیط امولسیون فلزکاری ایرانی (MWF_1)، خارجی (MWF_2)، محلول استریلTSB و محلول آب نمک اندازه‌گیری شد. با بررسی کدورت لوله‌ها و همچنین نتایج کشت بر روی محیط TSA مشخص شد که حداقل غلظت بازدارنده (MIC) برای هر سه باکتری به صورت تک تک و مخلوط آنها درتمام محلولهای تست معادل با ۱۰ppm بود. به منظور تأیید کارآیی گلوتارآلدئید بر روی باکتریهای غالب *Alcaligenes sp.*، *Acinetobacter lwoffi*، *Acinetobacter anitratus* و مخلوط هرسه باکتری از HPLC استفاده شد. به طور کلی نتایج HPLC نمونه‌های دارای مایع فلزکاری واجد باکتری و بیوساید گلوتارآلدئید با نمونه کنترل (مایع فلزکاری واجد بیوساید گلوتارآلدئید و بدون باکتری) نشان داد که تغییرات پیکهای HPLC بسیار ناچیز بود. این مسئله می‌تواند نشان دهنده کارآیی قابل قبول بیوساید گلوتارآلدئید باشد. همچنین مقایسه نتایج آنالیز امولسیون فلزکاری ایرانی (MWF_1) و خارجی (MWF_2) نشان دهنده تأثیر یکسان گلوتارآلدئید بر روی هر دو امولسیون یادشده بود (شکل ۶).

بحث

با توجه به پژوهشهای انجام شده توسط انجمن مهندسان کشور انگلستان تخمین زده شده که در حدود پنجاه هزار

شغل مرتبط با امولسیون فلزکاری وجود دارند. همچنین تعداد کارگران مرتبط با این سیالات بین صد تا دویست هزار نفر برآورده شده است. تنها در کشور انگلستان ماهیانه سیزده هزار لیتر امولسیون فلزکاری دارای روغنهای معدنی و ششصد هزار لیتر امولسیون فلزکاری مخلوط شده با آب مصرف می‌شود (۹ و ۱۰).

در کشور ایران نیز سالیانه مقادیر زیادی امولسیونهای فلزکاری در صنایع مختلف خصوصاً صنعت خودروسازی، فلزکاری و ریخته‌گری استفاده می‌گردد. بسیاری از این امولسیونها وارداتی بوده و به دلیل ارزش اقتصادی بالا باعث خروج مبالغ هنگفتی ارز از کشور می‌شوند. تنها در مجتمع مس سرچشمه کرمان سالیانه هزاران دلار بابت خرید امولسیونهای فلزکاری صرف می‌گردد. محتویات اکثر این امولسیونها انحصاری بوده و در انحصار شرکتهای انگلیسی و آمریکایی می‌باشد. بنابراین اطلاعات مشخصی در مورد ترکیبات این امولسیونها در دسترس نمی‌باشد. همچنین تاکنون هیچ پژوهش جامعی درمورد چگونگی تخریب‌پذیری زیستی و ارزیابی بیوسایدهای مؤثر بر آن در کشور ایران انجام نشده است.

در بیشتر پژوهش‌های انجام شده باکتریهای گرم منفی به ویژه گونه‌های مختلف *سودوموناس* و *آسینتوباکتر* به عنوان باکتریهای غالب در امولسیونهای فلزکاری معرفی شده‌اند که باکتریهای یاد شده موجب تخریب زیستی و ایجاد تغییرات شیمیایی در ساختار امولسیون فلزکاری می‌شوند. همچنین تحقیقات Veillette و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که با وجود افزودن بیوساید به امولسیون فلزکاری، باکتریهای گرم منفی مانند سویه‌های *سودوموناس* توانایی تخریب‌پذیری امولسیونهای فلزکاری را دارند (۱۳ و ۱۴).

در این پژوهش سویه‌های *آسینتوباکتر* و *آلکالیجنز* به عنوان باکتریهای مخرب شناسایی شدند. یکی از دلایل مؤثر نبودن بیوساید در امولسیونهای فلزکاری افزایش بار میکروبی تاحد 10^{10} CFU/ml می‌باشد. در این شرایط امکان هیدرولیز و خنثی‌سازی بیوساید به وسیله میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. به همین دلیل تعیین آلودگی میکروبی با استفاده از بیوساید مناسب و ارزیابی منظم غلظت بیوساید حائز اهمیت است. اکثر میکروارگانیسم‌های امولسیون فلزکاری در شرایط هوازی و کمی قلیایی و حرارت مزوفیل (۲۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد) رشد می‌کنند. آلودگی زیاد میکروبی، می‌تواند نشان دهنده کم بودن فعالیت بیوساید باشد. چون که در این شرایط به وسیله میکروارگانیسم‌ها هیدرولیز و خنثی می‌گردد. برای تعیین آلودگی میکروبی، ارزیابی منظم غلظت بیوساید و همچنین مشخص بودن دفعات مورد استفاده آن اهمیت دارد (۱۵).

Selvaraju و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که به‌ترتیب بیوسایدهای فرمالدئیدی گروتان (Grotan)، بیوبان (Bioban) و بیوساید فنلی پری ونتول (Preventol) بر روی *سودوموناس* و *مایکوباکتریوم* جدا شده از امولسیون فلزکاری بیشترین تأثیر بازدارندگی را دارند. محققین یاد شده دلیل این مسئله را تأثیر بیشتر بیوسایدهای فنلی در دامنه pH اسیدی و خنثی و تأثیر کمتر در pH قلیایی و واکنش ضعیف آن با ترکیبات لیپوفیل دیواره سلولی باکتریها بیان نمودند (۱۲).

در این پژوهش علاوه بر بیوسایدهای فرمالدئیدی (ونساید و تریس نیترو) و فنلی (دوئیساید)، بیوساید آلدئیدی گلوتارآلدئید نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که بیوساید گلوتارآلدئیدی از بیوسایدهای فنلی و فرمالدئیدی در هر دو محیط امولسیون فلزکاری خارجی و ایرانی مؤثرترند. گلوتارآلدئید یک بیوساید آلدئیدی مؤثر در pH قلیایی است. دلیل کارآیی کمتر دوئیساید نسبت به گلوتارآلدئید می‌تواند واکنش فیزیکی ضعیف بیوسایدهای فنلی با ترکیب لیپوفیل دیواره سلولی باکتریها باشد (۱۲). بیوسایدهای ونساید و تریس نیترو در دامنه pH قلیایی عملکرد بهتری دارند. این مسئله

می‌تواند دلیل افزایش فعالییت این بیوسایدها در pH قلیایی نسبت به pH خنثی در امولسیون فلزکاری باشد.

در مورد برخی از بیوسایدها اطلاعات مربوط به حداقل غلظت بازدارنده (MIC) برای بعضی از میکروارگانیسم‌های خاص وجود دارد. MIC کمترین دز تیماری برای پیشگیری از تکثیر جمعیت میکروبی در تستهای آزمایشگاهی و یا کنترل فساد زیستی می‌باشد. در این پژوهش حداقل غلظت بازدارنده (MIC) بیوساید مؤثر گلوتارآلدئید برای باکتریهای *Alcaligenes sp.* ، *Acinetobacter lwoffi*، *Acinetobacter anitratus* و مخلوط هر سه باکتری در دو محیط امولسیون فلزکاری ایرانی (MWF_1)، خارجی (MWF_2)، محلول استریل TSBو محلول آب نمک اندازه گیری گردید. حداقل غلظت بازدارنده (MIC) برای هر سه باکتری به صورت تک تک و مخلوط در تمام محلولهای تست معادل با ۱۰ppm بود.

به طور کلی اختلافات موجود بین پیکها در نمودارهای آنالیز HPLC نشان دهنده ایجاد تغییرات در ساختار اولیه امولسیون فلزکاری است که به یکی از شکلهای، ایجاد متابولیتهای جدید، حذف اجزای سازنده و یا تغییرات بیوشیمیایی (ترانسفورماسیون) قابل ارزیابی است. همچنین این امکان وجود دارد که برعکس چندین جزء یا اجزاء به یک جزء تبدیل شده باشند و یا به صورت کامل از بین رفته باشند. از طرفی این احتمال وجود دارد که این تغییرات توسط یک باکتری با شدت بیشتر و یک باکتری با شدت کمتر رخ داده باشد. در این پژوهش به منظور تأیید کارآیی گلوتارآلدئید برروی باکتریهای غالب یاد شده و مخلوط آنها از آنالیز HPLC استفاده شد. نتایج ارزیابی نمودارهای HPLC در شرایط مختلف نشان داد که در تمامی موارد مورد بررسی اختلاف سطح پیکهای موجود بسیار ناچیز و قابل چشم پوشی بود. این مساله نشان دهنده تأثیر بازدارنده گلوتارآلدئید بر روی میکروارگانیسم‌های مخرب و افزایش کارآیی امولسیون فلزکاری است. تشابه پیکهای HPLC امولسیون ایرانی با نمونه خارجی نشان می‌دهد که گلوتارآلدئید بر روی امولسیون فلزکاری ایرانی (MWF_1) و خارجی (MWF_2) تأثیر یکسانی داشت و این بیوساید به ترتیب بیشترین کارآیی را بر روی باکتریهای *Acinetobacter anitratus*، *Acinetobacter lwoffi* و *Alcaligenes sp.* داشت.

به این ترتیب با ارزیابی کارآیی بیوسایدهای فرمالدئیدی وغیرفرمالدئیدی متداول برروی سویه‌های غالب مخرب مشخص شد که گلوتارآلدئید توانایی حذف توده میکروبی غالب امولسیون فلزکاری مورد استفاده در واحد ریخته‌گری مس سرچشمه کرمان را دارد. با توجه به اینکه یک دز کشنده بیوساید بایستی ۲ تا ۶ برابر بیشتر از میزان MIC باشد (۱۱ و ۱۲)، بنابراین استفاده از بیوساید گلوتارآلدئید با رقت ۲۰ppm برای حذف آلودگیهای میکروبی در امولسیون پیشنهاد می‌گردد. استفاده از این تیمار شیمیایی می‌تواند موجب کاهش فساد زیستی و افزایش طول عمر مفید و کارآیی ضدخوردگی امولسیون فلزکاری شود. همچنین پایش مداوم و مستمر میکروبی و ارزیابی کارایی بیوساید گلوتارآلدئید با انجام تست ASTM D_{3946} به صورت فصلی و تأیید کارایی آن با روش HPLC برای بقای بیشتر امولسیون فلز کاری مورد استفاده در مس سرچشمه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش به شماره طرح ۳۵۴۹ با حمایت مالی و اجرایی مس سرچشمه کرمان انجام شده است. همچنین نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس آتش دهقان و مهندس علی سیدباقری به دلیل حمایتهای علمی و اجرایی صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. کارگر م، کفیل زاده ف، گودرزیان ن، نوحی ا (۱۳۸۵) شناسایی باکتریهای مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آن‌ها در حذف آلاینده‌های نفتی. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره هشتم، شماره ۲: ص ۱۱۸-۱۰۹.

۲. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۰) شناسایی و شمارش باکتریهای احیا کننده سولفات به روش MPN (استاندارد. ۵۸۷) – ص ۱۲-۱.

3. Baltzer IM. Sandin, M, Ahlstrom B, Allenmark, S, Edebo M, Falsen E, Pedersen K, Rodin N, Thompson AR, Edebo L (1989) Microbial growth and accumulation in industrial metalworking fluids. Applied and Enviromental Microbiology 55 (10): 2681-2689.

4. Francy DS, Thomas JM, Raymondz RL (1991) Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. J of Industrial Microb 8(4): 237-246.

5. Fraser VJ, Jones M.M, Medoff G, Zhang Y, Wallace RJ (2000) Flexible fibroptic bronchoscopes with Mycobacterium chelonae, *Mycobacterium chbronchoscope* disinfection machine. AM. Rev. Respiratory. Disease 145: 853-855.

6. Lengke M, Southam G (2006) Bioaccumulation of gold by sulfate reducing bacteria cultured in presence of gold (I)-thiosulfate complex. Geochimica et cosmochimica Acta 70: 3646-3661.

7. Li MA, Lin YH, Tsai, MY, Lin WH (2010) Accurance and characterization of culturable bacteria and fungi in metal working environments. Aerobiology 26: 339-350**.**

8. Rossmoore HW, Rossmoore LA (1991) Effect of microbial growth products on biocide activity in metalworking fluids. International Biodeterioratio, 27: 145-156.

9. Simpson AT, Grovers JA, Unwin J, Piney M (2000) Mineral oil metalworking fluids (MWFs)_development of practical criteria for mist sampling. Annals of occupational Hygien 44(3): 165-172.

10. Simpson AT, Stear M, Groves JA, Piney M, Bradley SD, Stagg S, Crook B (2003) Occupational Exposure to Metalworking Fluid Mist and Sump Fluid Contaminants. Annals of occupational Hygien 47(1): 17-30.

11. Sondossi M, Rossmoore HW (1989) Relative Formaldehyde Resistance Among Bacterial of Biocide- Treated Metal Working Fluid. International Biodeterioration 25: 423-437.

12. Suresh B, Selvaraju UH (2004) Biocidal Activity of Formaldehyde and non Formaldehyde Biocide toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in Pure & Mixed Suspensions in Synthetic Metal Working Fluid & Salin. American Society for Microbiology 71(1): 542-546.

13. Vanaken SF, Brown JA (1986) Common components of industrial metal – working fluids as sources of carbon for bacterial growth. Applied and Environmental Microbiology 51(6): 1165-1169.

14. Veillette M, Thorne PS, Gorden T (2004) Six Month Tracking of Microbal Growth in a Metalworking Fluid After System Cleaning and Recharging. Annals of occupational Hygien 49 (6): 541-546.

15. Virji MA, Woskie SR (2000) Identifying the Determinants of Viable Microorganisms in the Air and Bulk metalworking Fluids. AIHAJ 61: 788-797.

16. Washington WJ, Stephen A, William J, Koneman E, Procop G, Schechenberger P (2006) Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott William's & WilKins: P 340-355.

17. Brenner DJ, Krieg NR, Statey JT (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2, Part B, Springer.

The comparison of practical efficiency of formaldehyde and non formaldehyde biocides on predominant microbial population in metal working fluids

Kargar M.[1], Zare V.[1], Amini J.[2] and Manafi Z.[3]

[1] Microbiology Dept., Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, I.R. of Iran

[2] Microbiology Dept.,, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, I.R. of Iran

[3] National Iranian Copper Company, Rafsanjan, I.R. of Iran

Abstract

Metalworking fluids (MWFs) are extensively used in the metalworking industry to cool and lubricate the tool work piece interface and protect the work piece from corrosion. The aim of this study was to survey the microbial load of MWFs rate and evaluate the effectiveness of formaldehyde and non formaldehyde biocides on microbial elimination in a molding unit at Sarcheshmeh copper complex. During a period of 9 months, two samples were collected per week from sump of molding unit at Sarcheshmeh copper complex by Grab sampling procedure. Using emulsification, surface tension and HPLC tests, MWFs deterioration were detected. Finally, the efficiency of four selective biocides on dominant microbial populations and biocide efficiency were assessed by HPLC. Among formaldehyde and non formaldehyde biocides, glutaraldehyde had the ability for complete removal of MWFs microbial contamination. Therefore this biocide in a dose higher than 20 ppm is recommended in MWFs.

Keywords: Metal working Fluids (MWFs), Microbial contamination, Emulsification, Surface tension, HPLC, Biocide.