مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۲۴۵-۲۳۳)

جداسازی و بهینه‌سازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هگزامین

سعید میردامادی، پونه خلیل‌زاده، افسانه رجبی، فرزانه عزیزمحسنی، مسعود فلاح پور، محمدرضا بختیاری و مهران کیانی‌راد
سازمان پژوهشهای‌علمی‌وصنعتی‌ایران، پژوهشکده‌بیوتکنولوژی، تهران، خیابان‌فرصت شماره۱۷
E-mail: mirdamadi@irost.com
(دریافت: ۸۰/۱۱/۳۰ ؛ پذیرش:۸۱/۸/۷)

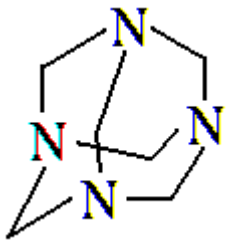
چکیده

دراین تحقیق میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هگزامین از نمونه‌های تصفیه‌خانه کارخانه تولیدکننده هگزامین، جدا شدند. اگرچه گزارشات کمی در مورد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هگزامین وجود دارد، ولی دراین پژوهش۲۹ باکتری (کوکسی gr^-،gr^+ و کوکوباسیل gr^-، gr^+) ۳ کپک و۲ مخمر جدا شدند که توانایی رشد و تجزیه بیولوژیک هگزامین درمحیط حاوی۱۰۰۰ میلی‌گرم درلیتر هگزامین را دارا بودند. ازبین میکروارگانیسم‌های جداشده۹ نمونه باکتری و۲ نمونه مخمر درغلظت۱۰۰۰۰ میلی‌گرم درلیتر هگزامین آداپته و باکتریها بیش از۵۰٪ و مخمرها۱۰۰٪ هگزامین را تجزیه نمودند. پس از بهینه‌کردن محیط و آداپته‌کردن سویه‌ها ۱۲ نمونه باکتری‌از خانواده میکروکوکاسه‌ها و پسودوموناداسه قدرت تجزیه بیش‌از۵۰ درصد هگزامین، دو قارچ آلترناریا با توان۵۳ و۳۲ درصد تجزیه و یک مخمر با توان تجزیه ۸۵٪ هگزامین را درمحیط دارای۵۰۰۰۰ میلی‌گرم هگزامین پیدا نمودند.

واژه‌های‌کلیدی: *هگزامین، هگزامتیلن‌تترامین، تجزیه‌بیولوژیکی، تصفیه‌پساب‌های‌صنعتی.*

مقدمه

حفظ محیط‌زیست یکی‌از مسائل مهمی‌است که همیشه مورد توجه بشر بوده‌است. یکی‌از عمده آلوده‌کننده‌های محیط‌زیست، پساب‌های‌صنعتی کارخانه‌ها می‌باشد، که برای تصفیه و رساندن به شرایط قابل قبول، نیاز به میکروارگانیسم‌های مناسب دارند، لذا تهیه استارتر کالچرهای میکروبی و استفاده صنعتی‌از آنها یکی از راه‌حل‌های مناسب و سریع درتصفیه این پسابها می‌باشد. وجود هگزامین درپساب‌های‌صنعتی کارخانه‌های تولید ویا مصرف‌کننده هگزامین باعث افزایش BOD (Biological Oxygen Demand) و COD (Chemical Oxygen Demand) می‌گردد، که تصفیه بیولوژیکی یکی‌از راه‌حل‌های مناسب برای این‌مشکل است. هگزامین یک ترکیب ازت‌دار با فرمول‌شیمیایی $C_6H_{12}N_4$ و آرایش‌اتمی‌زیر می‌باشد (Smith *et al.,* 1987):



هگزامین با نامهای دیگر ازجمله: هگزامتیلن‌ترامین (HMT)، متن‌آمین (Methenamine)، Formine، decan ($1,3,5,7$-tetra azarricyclo $(3.3.1.1^{37})$، Urotropine، Aminoform و ... نیز شناخته شده‌است (Gary *et al.,* 1992). این‌ماده بصورت بلورهای براق، سفید و پودری‌شکل می‌باشد که ابتدا شیرین مزه و سپس تلخ می‌شود. محلول ۱۰٪ هگزامین دارای pH برابر ۹-۸ و حلالیت‌آن درآب در ۲۰°C برابر ۸۷۴ گرم‌درلیتر و در ۶۰°C برابر ۸۴۴ گرم‌درلیتر است (Karr *et al.,* 1993; Venkiteswarn, 1973). هگزامین ازمتانول و آمونیاک ساخته می‌شود و همچنین از واکنش فرمالدئید با آمونیاک ترکیب جامد الماس مانندی بنام هگزامین تولید می‌شود، که درمحیطی با pH اسیدی به فرمالدئید و یونهای آمونیوم هیدرولیز می‌شود (Karr *et al.,* 1993; Gary *et al.,* 1992). درضمن هگزامین به رطوبت حساس می‌باشد و در رطوبت پایین‌تراز ۶۰٪ نگهداری می‌شود. درانتقال آن باید از دستکش، عینک دودی و سیستم‌های تهویه مناسب استفاده شود (استاندارد ۳۴۶۶).

هگزامین درصنایع مختلفی‌ازجمله: صنعت‌لاستیک (شتاب‌دهنده در ولکانیزه‌کردن‌لاستیک)، صنعت مواد قابل‌انفجار[مواد قابل‌احتراق بنام RDX (هگزوژن)، HMX (اکتوژن)، HMTA

(هگزامتیلن‌تری‌پراکسیدامین)]، صنعت‌سوخت (قرصهای‌سوخت، قرصهای‌بدون‌دود، Camping Tablet)، صنعت ترکیبات‌رزینی (PM/MF/UF ثابت‌کننده‌رزین‌مایع، PM/MF/UF پودرگچ‌بری، رزین‌های کربو هیدرات، ولکانیزاسیون رزین‌های وینیل و Coplymer و ...) و صنعت‌داروئی بصورت داروهای Formine, Urotropine, Crystazol, Helmito بر علیه میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردد. این ماده دردستگاه ادراری بعلت اسیدی‌بودن ادرار هیدرولیزشده و تولید فرمالدئید نموده که اثر ضدباکتریایی دارد اما درمقابل عفونت ناشی‌از کاندیدا بی‌اثر است. درصنعت عکاسی (ثابت‌کننده‌ظهور)، صنعت‌ترکیبات‌آلی (نگهدارنده محصولات تازه، جذب‌گازهای فسفوژن، بو برها، جاذب‌گازهای‌سمی)، د صنعت‌متالورژی (محدودکننده در برابر اسیدها و هیدروژن سولفید)، درصنعت پوست و خز و چرم(به عنوان نگهدارنده، صنعت‌کاغذ و سلولز (تیمارسطحی درطی ساخت‌کاغذها و مقوای نازک درمرحله دفع‌آب، فیبرهای سلولزی)، صنعت روغن (نگهدارنده برای گریس و روغن‌ها)، درصنعت کود (ضدکلوخه Anticake دربرابر اوره، در دامداری‌ها)، درتشخیص‌طلا و جیوه و بیسموت، پایدارکننده و سخت کننده اوره فرمالدئید، درصنعت نساجی، در مواد افزودنی جهت جلوگیری از خوردگی Anti Corrosionegents، درمواد حدواسط حشره‌کشها، درمعرف‌های شیمیایی، همچنین دررنگ‌آمیزی با Methenamine Silver Stains جهت تشخیص برخی عفونتها نیز کاربرد دارد (Tuncer *et al.,* 1998; Venkiteswarn, 1973).

وجود مقادیر بالای این‌ترکیبات درپساب بسیاری‌از کارخانه‌های‌صنعتی‌که بدلیل خاصیت ضدمیکروبی و مقاومت به تجزیه مدت طولانی باقی می‌ماند، باعث مرگ میکروارگانیسم‌های‌محیطی شده و بهم‌خوردن شدید اکوسیستم محیط را سبب می‌گردد. دراین پژوهش سعی‌گردید میکروارگانیسم‌های مقاوم تجزیه‌کننده هگزامین جداسازی گردد سپس مقاومت و قدرت تجزیه هگزامین آنها تا حد ممکن افزایش یابد تا بتوان درسیستمهای تصفیه حاوی هگزامین کارخانه‌ها استفاده گردد.

موادو روشها

ابتدا از ۱۴ موقعیت مختلف حوضچه هاضم، لجن خشک‌شده، حوضچه هوادهی‌سطحی، خروجی تصفیه‌خانه‌فاضلاب، واحدهای Waste Pit و غیره کارخانه تولیدکننده‌هگزامین نمونه‌گیری شد. سپس عمل غربالگری (Screening) درمحیط کشت پایه نوترینت‌براث، پلیت کانت‌آگار و سابرو دکستروز آگار حاوی ۱۰ گرم‌درلیتر هگزامین انجام شد و پس‌از کشت و گرماگذاری در۳۰°C باکتری‌ها، قارچها و مخمرهای متعددی جدا شدند.

بررسی محیط‌های رشد و تجریه هگزامین

محیط‌های‌کشت استفاده‌شده درجداسازی و شمارش‌کلنی میکروارگانیسمها عبارتنداز: محیط‌کشت نوترینت آگار، محیط‌کشت پلیت‌کانت‌آگار، محیط‌کشت سابرو دکستروز آگار و محیط‌کشت اختصاصی جهت برسی میزان تجزیه هگزامین بنام محیط مینرال سالت (محیط‌کشت‌حداقل) که ترکیبات آن عبارتند از: ۱۰گرم KH_2PO_4 ، ۰/۲گرم $MgSO_4$ &$7H_2O$، ۰/۱گرم NaCl، ۰/۱گرم $CaCl_2$، ۱گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۰۳گرم $FeCl_3$ &$6H_2O$ و ۱گرم در لیتر هگزامین که‌به‌عنوان منبع‌کربن و ازت استفاده شد. پس‌از جداسازی سویه‌های‌مقاوم و تجزیه‌کننده به‌تدریج غلظت هگزامین درمحیط تا۱۰۰ گرم‌درلیتر افزوده تا سویه‌ها به مقادیر بالاتر آداپته گردیدند.

میکروارگانیسم‌های جدا شده درمحیط‌های مختلف از نظر میزان تجزیه‌هگزامین موردارزیابی قرارگرفت. این محیط‌ها شامل محیط‌کشت حداقل (مینرال سالت مدیوم) که هگزامین تنها منبع‌کربن آن‌بود. محیط‌کشت حداقل‌حاوی۰/۲٪ گلوکز، محیط‌کشت حداقل‌حاوی۰/۲٪ گلوکز و۰/۴٪ عصاره مخمر، محیط‌کشت‌دارای۰/۱٪ پپتون و محیط‌کشت‌دارای۰/۱٪ پپتون‌و۰/۲٪ گلوکز. پس‌از انتخاب بهترین محیط‌کشت، شرایط بهینه تجزیه هگزامین مورد بررسی قرارگرفت (Doronina *et al.,* 1997; Azach *et al.,* 1995; Adroer *et al.,* 1990).

تست اندازه‌گیری مقادیر بالای هگزامین

برای اندازه‌گیری مقادیربالای هگزامین ازروش Chromotropic Acid Spot Test Solution استفاده شد. رقت‌های مختلفی‌از نمونه حاوی هگزامین تهیه شد و به نسبت ۵ : ۱ با اسیدسولفوریک ۱N مخلوط شد و تا خروج کامل فرمالدئید حاصل از شکسته‌شدن هگزامین حرارت داده‌شد. طی حرارت وجود فرمالدئید با معرف اسیدکرومو تروپیک مورد آزمایش قرارگرفت. برای‌اطمینان‌از شکسته‌شدن کامل هگزامین توسط اسید، درزمانهای مشخص یک قطره‌از نمونه با یک‌قطره معرف کروموتروپیک‌اسید دریک شیشه ساعت مخلوط و تولید رنگ بنفش نشانه عدم تکمیل واکنش بود. پس‌از تکمیل واکنش حجم اسید باقی‌مانده درحضورمتیل‌رد با NaOH (۰/۱N) تیترگردید (Venkiteswarn, 1973 ; استاندارد ۳۴۶۶). منحنی استاندارد برای محدوده ۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر رسم‌گردید.

معرف کروموتروپیک شامل۱۰۰ میلی‌گرم اسید کروموتروپیک‌که با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و سپس۳ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ افزوده و خوب مخلوط گردید. پس‌از سردشدن به تدریج۲۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ افزوده گردید. درحین افزودن اسید

دمای‌محلول نباید بالا رود واگرمعرف بنفش‌شد باید دومرتبه ساخته‌شود (Venkiteswarn, 1973).

تست هگزامین برای مقادیرکم

دراین روش از دستگاه اسپکتوفتومتر استفاده شد و منحنی استاندارد برای محدوده ۰/۶ میلی‌گرم درصد تا ۵ میلی‌گرم درصداز هگزامین رسم‌شد. رقت‌های مختلفی‌از نمونه حاوی هگزامین تهیه شد، سپس ml ۲ از هر رقت برداشته با افزودن ml ۲۵ معرف کروموتروپیک‌اسید و با رساندن‌به‌حجم۵۰ml با اسیدسولفوریک رقیق شده با نسبت مساوی درآب‌مقطر، مخلوطی تهیه شدکه در بن‌ماری درحال‌جوش به مدت۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس به سرعت درحمام‌یخ سرد و با اسیدسولفوریک رقیق‌شده با نسبت‌مساوی‌از آب‌مقطر، به‌حجم‌اولیه رسانده، با دستگاه اسپکتوفتومتر در ^{nm} ۵۷۰ و برعلیه بلانک بررسی‌شد (Smith *et al.,* 1987).

روش ساخت معرف کروموتروپیک اسید بدین‌صورت‌است‌که ۱۰۰ میلی‌گرم کروموتروپیک‌اسید را در۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل‌کرده۵۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک به آرامی و درحمام آب‌یخ افزوده و درنهایت حجم آن با اسیدسولفوریک ۱:۱ به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده‌شد. محلول باید بی‌رنگ باشد (Smith *et al.,* 1987).

بررسی منبع‌کربن مناسب

منابع مختلف کربن شامل نشاسته، آب‌پنیر، گلوکز، ملاس، لاکتوز و سوکروز بطور مجزا درمحیط‌کشت حاوی۱٪ هگزامین تلقیح‌شد و میزان تجزیه هگزامین بررسی شد.

بررسی مقادیر مختلف منبع‌کربن

درمحیط‌کشت مقادیر۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵درصد منبع‌کربن‌انتخابی اضافه‌شد، سپس میزان‌رشد و تجزیه هگزامین توسط باکتری‌ها بررسی‌شدند.

بهینه‌کردن منبع‌ازت

منابع مختلفی‌از ازت‌معدنی شامل۱گرم NH_4NO_3 ، NH_4Cl ، $Ca(NO_3)_2$ ، KNO_3 ، $NaNO_3$ ، $(NH_4)_2SO_4$ ، $NH_4H_2PO_4$ ، و منابع ازت‌آلی شامل پپتون، عصاره‌مخمر (Yeast extract) و پودرآب خیسانده‌ذرت (Corn Steep Powder) موردآزمایش قرارگرفت.

منابع فوق بصورت‌جداگانه به محیط افزوده و باکتری‌های انتخابی‌از نظر رشد و تجزیه هگـزامین بررسی شدند.

بهینه سازی مقدار منبع ازت:

درمرحله بهینه‌سازی مقدار ازت‌مصرفی، مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ گرم‌درلیتـر منبـع ازت انتخابی به محیط‌کشت اضافه وباکتری‌ها از نظر رشد و تجزیه هگزامین بررسی شدند.

بهینه‌سازی pH محیط

محیط بهینه با pHهای‌مختلف ازpH ۲ تا۱۰ تهیه و بـاکتری‌هـای‌انتخـابی ازنظررشـد و تجزیـه هگزامین بررسی‌شدند. pH محیط‌ها با استفاده از HCl و NaOH ۰/۱ نرمال تنظیم گردید.

آداپته‌کردن میکروارگانیسم‌ها به‌غلظت بالای هگزامین

باکتری‌های تجزیه‌کننده هگزامین بتدریج درمحیط‌های‌کشت حاوی مقادیر افزاینده هگزامین از ۱ تا ۵۰ گرم درلیتر کشت‌داده شدند و میزان رشد، مقاومت و تجزیه هگزامین درآنها بدست‌آمد. کلیه مواد شیمیایی بجز ملاس، CSL و آب‌پنیر (Whey) از شرکت Merck تهیه شدند.

نتیجه و بحث

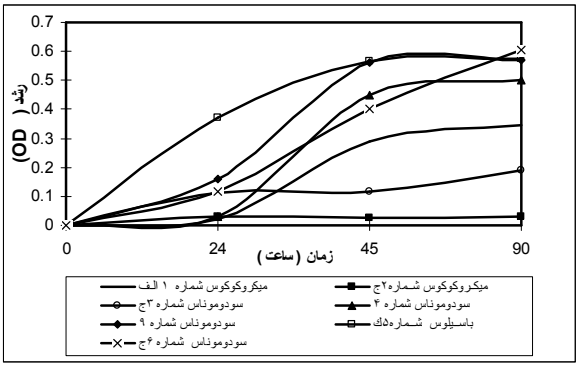
با استفاده‌از محیط‌های کشت مختلف و غربالگری نمونه‌های مختلف شامل لجن‌فعال، نمونه‌های تصفیه‌خانه و غیره ۲۹باکتری مختلـف شـامل کوکسـی گـرم‌مثبـت و گـرم‌منفـی، کوکوباسـیل گرم‌مثبت و گرم‌منفی و باسیل گرم‌مثبت اسپوردار، ۳نوع کپـک و ۲مخمـر، جداسـازی گردیـد که‌قادر به رشد و تجزیه هگزامین درمحیط‌کشت بودند.

مقایسه محیط‌های کشت مختلف نشان‌داد که برخـی‌از باکتریهـا و تقریبـاً کلیـه مخمرهـای جداشده از نمونه‌ها قادر به رشد در محیط‌های حاوی هگزامین بودند. با افزایش غلظت هگزامین تا حد۱۰گرم درلیتر درمحیط‌های حاوی پپتون و گلوکز بسیاری از میکروارگانیسمها کاملاً رشد نمودند که با وجود رشد کامل، مصرف هگزامین توسط آنها بسیار کم بود و درهیچ موردی حتی به۵۰٪ نرسید. رشد حاصل دراین محیط‌ها به دلیل استفاده میکروارگانیسـم‌هـا از مـواد مغـذی موجود درمحیط و مقاوم بودن آنها به هگزامین بود. ولی درمحیط حداقل که تنها منبع غـذایی قابل استفاده برای میکروارگانیسم‌ها هگزامین بود، رشد بسیار به کندی صورت‌گرفـت و درطـی

زمان رشد مصرف هگزامین مشاهده گردید. بطوریکه ۶ باکتری موفق به تجزیه هگزامین تا ۹۰٪ و ۲ مخمر موفق به تجزیه هگزامین تا ۱۰۰٪ گردیدند. لازم به ذکر است که میکروارگانیسم‌های دیگر نیز قادر به مصرف هگزامین به نسبتهای مختلف بودند.

براین اساس تعداد ۴۸ مخمر جداشده ازپساب‌های‌صنعتی مختلف نیز از نظر مقاومت و تجزیه هگزامین بررسی گردیدند، که مشخص‌شد همگی به هگزامین مقاوم بودند و تنها ۳ مورد از آنها قدرت تجزیه هگزامین را نشان دادند.

شکل۱ نشان‌دهنده منحنی رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌های جدا شده می‌باشد. میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در OD ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Siebold *et al.,* 1995). همانگونه که مشاهده می‌شود بهترین رشد باکتری بعد از ۹۰ ساعت تا OD حدود۰/۶ رسیده‌است.



شکل۱- مقایسه رشد چند نمونه از باکتری‌های تجزیه‌کننده هگزامین.

لازم به ذکراست‌که بسیاری‌از نمونه‌ها درمحیط‌کشت کدورت یکنواخت تولید نمی‌نمودند و میکروارگانیسم‌ها بصورت توده‌ای رشد نموده و کاملاً به‌هم چسبیده بودند لذا نه ازطریق شمارش‌کلنی و نه‌از طریق اندازه‌گیریOD قادر به بررسی میزان رشد نبوده و تنها میزان جرم سلول تولیدی مورد مقایسه قرار می‌گرفت. لذا بررسی‌های ما بیشتر بر روی میزان تجزیه هگزامین معطوف ومقایسه میزان تجزیه هگزامین با رشد سلولی بود. با توجه به اینکه میکروارگانیسم‌ها از پساب کارخانه‌های تولیدکننده هگزامین و فرمالدئید جدا شده بودند ۶ نمونه از باکتری‌های جداشده هم قدرت تجزیه هگزامین را داشتند و هم قدرت تجزیه فرمالدئید درحالیکه هیچکدام از مخمرهای جدا شده چنین توانایی را نشان ندادند. دربین این میکروارگانیسم‌ها یک باسیل g^- از خانواده پسودوموناس که بیشترین تجزیه را با میزان ۵۸٪ هگزامین بعد از ۸۶ ساعت نشان داد و ۵ باکتری دیگر نیز توانستند ۱۴٪ تا ۵۰٪ از هگزامین را تجزیه نمایند که همگی از خانواده میکروکوس و پسودوموناس بودند.

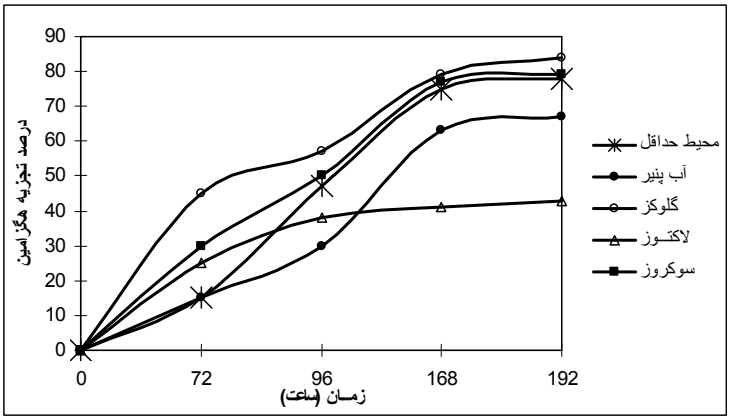
درسال۱۹۹۹ مقاله‌ای توسط"Chou و Huang" گزارش شده است که در آن عدم تجزیه بیولوژیکی هگزامین مطرح گردیده و از روش "Electro-Fenton Method" برای تیمار هگزامین درپسابهاب حاوی هگزامین وکاهشCOD استفاده شده است. اما نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان داد که برخی از میکروارگانیسمها قادر به تجزیه هگزامین هستند.

در ۱۹۸۶ "Painter" و "King" مقاله‌ای مبنی‌بر حذف۱۰۰٪ ترکیبات هگزامینی با استفاده از لجن فعال (Activated Sludge) گزارش کرده‌اند.

درسال۱۹۹۴ "Colquhoun" و "Ballay" دو میکروارگانیسم با پیگمان صورتی‌کندرشد Pink Pigmented Facultative Methylothropic (PPFM) که از لجن فعال حاوی هگزامین جدا شده است را گزارش نمودند که قادر به تجزیه هگزامین بودند دراین پژوهش نیز ما چند سویه جدا نمودیم‌که ایجاد رنگ صورتی می‌نمودند. جالب اینکه سویه‌های‌فوق درشرایط نامناسب که تجزیه هگزامین انجام نمی‌دهند رنگ کرمی ایجاد می‌نمودند و تنها درمحیط‌هایی که قادر به تجزیه هگزامین بودند رنگ صورتی ایجاد شد.

مقاله دیگری که توسط "Painter" و "King" انتشار یافته (۱۹۸۶) ازیافتن میکروارگانیسم‌های متعددکه درمحیط حاوی هگزامین به‌عنوان تنها منبع‌کربن استفاده می‌کنند، خبر داده است.

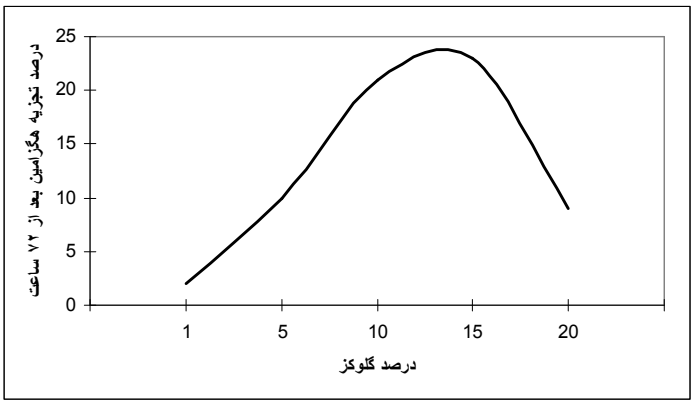
برای میکروارگانیسم‌هائی‌که قادربه تجزیه هگزامین درحد بالایی بودند منابع‌کرین و ازت محیط بهینه شد. نتایج حاصل‌از بررسی منابع مختلف‌کربن درمنحنی شماره۲ نشان‌داده شده‌است.



شکل۲- مقایسه چند منبع مختلف کربن، جهت تجزیه بهتر هگزامین توسط بهترین سویه باکتری تجزیه‌کننده هگزامین(Pseudomonas sp. شماره۹).

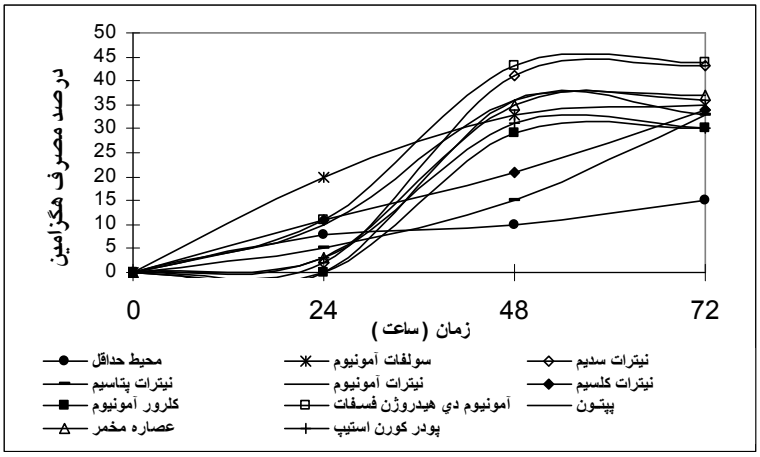
همانگونه که درشکل فوق ملاحظه می‌شود بیشترین حذف هگزامین درمحیط‌های حاوی منابع مختلف کربن ارجمله آب‌پنیر (Whey)، گلوکز و سوکروز می‌باشد. البته میزان حذف درمحیط حداقل‌که فاقد منبع‌کربن مشخصی نیز نباشد و تنها منبع غذایی آن هگزامین است نیز بخوبی دیگر محیط‌ها بوده است. محیط‌های حاوی منابع کربن باعث افزایش رشد سلولها در مرحله اول گشته و سپس با کاهش میزان منبع‌کربن، میکروارگانیسم ناچار از هگزامین استفاده می‌نماید. برهمین‌اساس مقادیر مختلف منابع‌کربن مورد ارزیابی قرارگرفت.

شکل۳ نشان می‌دهد که مقدار۱/۵گرم‌درلیتر گلوکز بهترین غلظت بوده و باعث رشد بهتر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد.



شکل۳- مقایسه مقادیر مختلف گلوکز درتجزیه هگزامین توسط بهترین سویه باکتری تجزیه‌کننده هگزامین(Pseudomonas sp. شماره۹).

لازم به ذکراست‌که هرمنبع‌کربن دیگری نیزکه براساس نوع میکروارگانیسم استفاده شده نتیجه خاصی داشت. برای مثال باکتریهای باسیل یا کوکوباسیل g^- که بیشتر از خانواده پسودوموناسه بودند قادر به مصرف لاکتوز بوده درحالیکه برخی دیگر از سویه‌ها از این منبع استفاده نمی‌نمودند. باسیلهای g^+ بر روی محیط حاوی نشاسته بخوبی محیط‌های دیگر قادر به رشد بودند. درحالیکه بسیاری دیگر این قدرت را نداشتند. لذا گلوکز راکه برای همه سویه‌ها قابل استفاده بود انتخاب، و میزان آنرا بهینه نمودیم. نتایج انتخاب بهترین منبع ازت درشکل۴ نشان داده‌شده‌است.

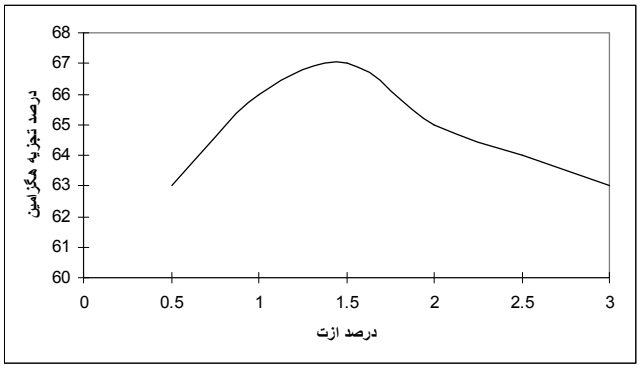


شکل۴- بررسی بهترین منبع ازت برای تجزیه هگزامین توسط بهترین سویه باکتری تجزیه‌کننده هگزامین(Pseudomonas sp. شماره۹).

همانگونه‌که ملاحظه می‌گردد بهترین منبع ازت، آمونیوم‌دی‌هیدروژن‌فسفات و ماده بعدی نیترات‌سدیم بودکه درمحیط حاوی این مواد تجزیه هگزامین درحد مطلوبی انجام می‌گرفت. احتمالاً آمونیوم‌دی‌هیدروژن‌فسفات از ۳طریق مختلف باعث افزایش میزان تجزیه هگزامین می‌گردد. اول بخاطر وجود منبع ازت، دوم وجود منبع فسفات مناسب و سوم به دلیل اینکه این ماده پس‌از هیدرولیز و مصرف ازت بیشتر، حالت اسید درمحیط ایجاد می‌نماید. هگزامین درمحیط بدلیل تولید آمین ایجاد pH قلیایی می‌نماید که با سیستم بافری KH_2PO_4 آنرا کنترل می‌نمودیم. ولی‌این‌ماده نیز احتمالاً سیستم بافری را درحین فرآیند تخمیر،کمک‌نموده و تنظیمpH بهتر انجام گرفته‌است. بهرحال این ماده جهت افزایش میزان تجزیه هگزامین درمحیط انتخاب و مقدار آن بهینه گردید. همانگونه‌که درشکل۵ مشاهده می‌شود، میزان بهینه منبع ازت جهت تجزیه هگزامین دراین پژوهش ۱/۵گرم‌درلیتر بدست آمد.

البته لازم به ذکراست‌که برخی باکتریها درحضور $NaNo_3$ و برخی درحضور آمونیوم‌سولفات نیز بخوبی آمونیوم‌دی‌هیدروژن‌فسفات، هگزامین‌را تجزیه می‌نمودند.

باتوجه‌به‌اینکه همه میکروارگانیسم‌ها درحضور آمونیوم‌دی‌هیدروژن‌فسفات بخوبی قادربه تجزیه هگزامین بودند، این ماده جهت اجرای مراحل بعدی‌کار انتخاب شد. pH محیط بین ۲ تا ۱۰ تنظیم و سپس میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هگزامین درآنها تلقیح و میزان تجزیه هگزامین درزمانهای مختلف محاسبه گردید.



شکل۵- بررسی بهترین مقدار آمونیوم دی هیدروژن فسفات جهت تجزیه هگزامین توسط بهترین سویه باکتری تجزیه‌کننده هگزامین(Pseudomonas sp. شماره ۹)

بهترین pH رشد باکتریها درمحدوده pH ۸/۵ – ۶/۵ بوده و همانگونه‌که ذکرشد درمحیطی‌که فاقد سیستم بافری بود، pH محیط به بالاتر از ۸/۵ می‌رسید که باعث کاهش رشد و تجزیه هگزامین می‌گردید لذا جهت تنظیم pH از سیستم بافری KH_2PO_4 استفاده شد. لازم‌به‌ذکر است که برخی پژوهشگران از سیستم بافری K_2HPO_4 استفاده نموده بودند که اثرکمتری درجهت جلوگیری از افزایش pH نشان داد. با توجه به سیستم بافری استفاده شده به همراه آمونیوم‌دی‌هیدروژن‌فسفات pH معادل۶/۵ جهت‌کل محیط‌ها انتخاب گردید و با بررسی بعمل‌آمده و درطی آزمایش نشان‌داده‌شد که تغییر عمده‌ای درآن صورت نمی‌گیرد. با بهینه‌شدن شرایط تجزیه هگزامین توسط سویه‌های فوق، میکروارگانیسم‌ها به مقادیر بالاتر هگزامین آداپته گردیدند. از بین میکروارگانیسمهای جدا شده ۱۸ نمونه باکتری، ۳ نمونه مخمر و نمونه کپک به غلظت۵۰ گرم در لیتر هگزامین آداپته و در این محیط رشد نمودند. از بین نمونه‌های فوق همگی بخوبی درمحیط حاوی هگزامین رشد نموده ولی تنها ۱۲ نمونه باکتری از خانواده میکروکوکاسه‌ها و پسودوموناداسه قدرت تجزیه بیش از۵۰ درصد هگزامین، دو قارچ آلتر ناریا با توان۵۳ و ۳۲ درصد تجزیه و یک مخمر با توان تجزیه ۸۵٪ هگزامین را تجزیه نمودند.

Reference

Adroer, N., Cases, C., demas, C., and Sola, C. (1990). Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*, Applied Microbiology and Biotechnology, **33,** 217–220.

Malkit, A., Henis, Y., Oren, A., Gurevich, P., Sarig, S., (1995). Transformation of formaldehyde by a *Halomonas* sp. ,Can. J. Microbiol. **41,** 548–553.

Bransome, E.D., Henney, J.E., Fay, J.T., Novitch, M., Halperin J.A., Rockville, M.D. (1978). Encyclopedia of chemical technology, third ed., John Wiley and Sons , Canada.

Calquhoun, K.O., Ballay, D., Asano, T., Bhamidi Marri, R., Chin, K.K., Dahlberg, A.G., Grabow, W.O.K. (1994). Chemical and petrochemical waste management, Industrial waste treatment, Water Sci. Technol., **30(3),** 95–101.

Chou, S., Huang, Y.-H. (1999). Treatment of high strength hexamine containing wastewater by Electro-fenton Method, Wat. Res., **33(3),** 751–756.

Doronina, N.V., Ezhov, V.A., Trotsenko, Yu.A. (1997). Aerobic biodegradation of formaldehde, methanol and methylamine by immobilized methlobacterium extorquens cells, Applied Bioche-mistry and Microbiology, **33(2),** 138–141.

Gary, L., Madsen and Bruno Jaselskis, (1992). Spectrophestometric determination of HMT, Analyst, **117,** 1785.

Karr, C.L., Sharma, S.K., Hatcher, W.M., Harper, T.R. (1993). *Proc.* Int. Symp. Modell. Simul. Control Hydrometal Processes. Puble by Canadian Institute of Mining. Metallurgy and Petroleum, Xerox Tower, Montreal, Que, Can. P. 227–236.

Painter, H.A., King, E.F. (1986). The need for apply tests in biodegrability assessments, Chemosphere, **15(4),** 471–472.

Siebold, M., Frieling P.V., Joppien R., Rindfleisch, D., Schugerl, K., and Roper, H. (1995). Comparison of the production of lactic acid by three different Lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. Process Biochemistry, **30(1),** 81–95.

Smith, A., and Colquhon, K.O. (1987). Biodegradation of Hexamine, Chemosphere, **16(7),** 1555–1556.

Tuncer, S., Erguven, S., Kocagoz, S., Unal, S. (1998). Comparison of cytochemical staining, Immunoflouresence and PCR for diagnosis of *Pheumo cystis carinii* on sputum samples, Scand. J. Infect. Dis., **30,** 125–128.

The United Staets Pharma Copeia, The National Formulary (USP) 24, United States Pharma Copeiol Convention, Rockvill, MD., 2000. 1062–1063.

Venkiteswarn, S.L. (1973). Specification for HMT (Hexamine), In: Indian Standards Institution, first revision, IS: 4306–1973.

استاندارد شماره ۳۴۶۶، ویژگی‌های هگزامین، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، چاپ اول شهریور ۱۳۷۳