# تجزیه بیولوژیکی ماده شیمیایی مورفولین (دی اتیلن ایمیدواکسید)

دکتر گیتی امتیازی ـ دکتر محمد حسین حبیبی
دانشگاه اصفهان ـ دانشکده علوم

**خلاصه:**

دی اتیلن ایمیدواکسید ماده‌ای است که در صنعت کاربرد بسیاری دارد و به عنوان حلال رزین، رنگ، و همچنین به عنوان ماده ضد خوردگی و حشره‌کش از آن استفاده می‌شود. این ترکیب شیمیایی صنعتی پس از استفاده کارخانجات عموماً وارد محیط زیست می‌گردد. چون مورفولین قابل تبدیل به نیتروز و مورفولین می‌باشد و این ماده سرطان‌زا است بقاء و تجزیه مورفولین در محیط حائز می‌باشد.

میکروبهای تجزیه کننده این ماده از لجن فعال تصفیه فاضلاب اصفهان جداسازی گردید. نوع و تعداد این باکتریها بررسی شده است.

## مقدمه:

مورفولین (دی اتیلن ایمیدوکسید) یک ماده شیمیائی است که در صنایع مصرف زیاد دارد بطوری که مصرف امریکا در سال ۱۹۷۵ حدود ۱۱۰۰۰ تن بوده است. مورفولین و مشتقات آن به عنوان دارو حلال مومها، رزینها علف‌کش، ماده شفاف کننده و ضد اکسیداسیون بکار برده می‌شود که پس از مصرف به میزان قابل توجهی وارد آبها می‌شود. مطالعات اولیه در سال ۱۹۵۰ نتوانست تجزیه بیولوژیکی مورفولین را اثبات کند (۱). در سال ۱۹۷۲ اعلام شد که مورفولین غیر قابل تجزیه بیولوژیکی در ۵ روز است (۲) در حالی که در سال ۱۹۵۵ اعلام شده بود که تجزیه بیولوژیکی مورفولین با تاخیر انجام می‌شود (۳)

در این مقاله روشهائی برای جداسازی، شمارش میکروبهای تجزیه مورفولین ارائه شده است.

## شرح روشها و مواد

۱ـ اثبات وجود باکتری تجزیه کننده مورفولین در لجن فعال.

دراین آزمایش از ارلن ۲۵۰ میلی لیتر حاوی محیط کشت اصلی استفاده شده این ارلن حاوی ۷۵ میلی لیتر محیط کشت اصلی و ۲۵ میلی لیتر نمونه تلقیح شده می‌باشد. ارلن در درجه حرارت ۲۷C در روی بهم زن قرار داده می‌شود و روزانه میزان مورفولین نمونه تلقیح شده و نمونه شاهد (تلقیح نشده) اندازه‌گیری و مقایسه ش (کم شدن مورفولین در نمونه تلقیح



شده) نشانه وجود میکرولارگانیسمهای تجزیه کننده آن می‌باشد). بعد از آنکه میزان مورفولین موجود در ارلن مورد آزمایش توسط باکتریها تمام می‌شد میزان ۰/۱ml از این محیط را به ارلن ـ دیگری حاوی محیط اصلی انتقال داده شد اینبار رشد میکرو ارگانیسمها بصورت کدورت سنجی مطالعه و با مصرف مورفولین مقایسه شد.

بعد از سه بار انتقال باکتریها به محیط مورفولین دار باکتریها روی محیط مورفولین آگار جداسازی و شناسایی شد.

## تهیه محیط کشت اصلی برای جداسازی میکروبهای تجزیه کننده مورفولین

محیطی که برای جداسازی میکروبهای تجزیه کننده مورفولین ساخته شد حاوی ۱۰mM مورفولین و محیط پایه بود محیط پایه حاوی نمکهای اساسی برای رشد این نوع میکروارگانیسمها می‌باشد و حاوی $kH_2Po_4$ ۱ گرم در لیتر، $k_2HPO_4$ ۱ گرم در لیتر، $FeCl_3$ ۰/۰۰۴ گرم در لیتر و $MgSO_4$ ۰/۰۰۴ گرم در لیتر می‌باشد.

## شمارش میکروبها روی محیطهای جامد

بمنظور تعیین تعداد میکروبهای تجزیه کننده مورفولین در آب نمونه رقیق شده را روی محیط مورفولین آگار دار کشت داده شد و تعداد آن با تعداد میکروبهایی که روی محیط پایه آگاردار رشد می‌کردند مقایسه شد. (۴)

لازم به تذکر است که محیط پایه حاوی مواد معدنی لازم برای رشد می‌باشد.

تعداد احتمالی میکروبهای تجزیه کننده مورفولین در آب و پساب با بکار گرفتن روش MPN تعیین شد. در این روش محیط کشت مخصوصی که حاوی مواد معدنی لازم و ۰/۱mM مورفولین می‌باشد بکار برده می‌شود. به ۲۵ لوله آزمایش ۵ میلی لیتر از این محیط کشت اضافه می‌شود و به یکسری از ۵ لوله میزان ۱ میلی لیتر از آب و یکسری لوله‌های دیگر ۰/۱ از نمونه مورد آزمایش که تا میزان $10^{-4}$ رقیق شده اضافه شد لوله‌ها را در آنکوباتور ۲۷C برای مدت یکماه قرار می‌دهیم سپس میزان مورفولین زرد و لوله‌هایی که حاوی مورفولین تجزیه نشده بودند نارنجی می‌شود با شمارش تعداد لوله‌های زرد تعداد احتمالی باکتری تجزیه کننده مورفولین بدست می‌آید.

## تست رنگ سنجی:

برای تعیین وجود مورفولین در نمونه مورد آزمایش ۰/۱ میلی لیتر ۱٪ وزنی نفتوکوئینین و ۰/۱ میلی لیتر محلول ۱ مولار هیدروکسید سدیم به نمونه مورد آزمایش اضافه می‌شود. پس از ۲۰ دقیقه ظاهر شدن رنگ نارنجی نشانه وجود مورفولین و رنگ زرد نشانه تجزیه آن می‌باشد.

لازم به تذکر است که نفتوکوئین با عامل آمین مورفولین کمپلکس نارنجی می‌دهد که نشانه وجود مورفولین در نمونه می‌باشد.

## تعیین میزان رشد باکتریهای تجزیه کننده مورفولین

چون باکتریهای ایزوله شده تجزیه کننده مورفولین به صورت مجتمع رشد می‌کنند به محیط کشتهای مختلف میزان ۱٪ Tween_80 اضافه شد تا باکتریها به صورت جدا از هم رشد کنند سرعت رشد بوسیله کدورت سنجی و بوسیله درصد مصرف مورفولین در محیطهای مختلف اندازه‌گیری و زمان تقسیم آن تعیین شد.

## بحث و نتیجه گیری:

تلقیح نمونه آزمایش به محیط کشت حاوی مورفورلین نشان داد که تجزیه مورفولین بعد از سه روز دوران کمون شروع می‌شود و بین ۱۴-۱۱ روز تکمیل می‌شود انتقال مقدار جزئی از این محیط به محیطهای دیگر نشان داد که تجزیه مورفولین سریعتر و حداکثر تا ۵ روز کامل می‌شود. پس از جداسازی میکروبهای تجزیه کننده مورفولین به صورت خالص تهیه شده هیچکدام از میکروارگانیسمهای حاصل گرم منفی نبودند و تمام آنها اسید فاست بوده که احتمالاً میکوباکتریا می‌باشد. (۵)

تستهای اولیه روی این میکروارگانیسمها انجام گرفته شده و برای تائید آنکه می‌توانند مورفولین را مصرف کنند به محیط کشت مایع حاوی مورفولین تلقیح شدند. از میان باکتریهای ایزوله شده فقط چند نمونه نشان دادند که قادر به تجزیه

جدول ۱: شمارش باکتریها روی محیطهای مختلف

| نوع محیط کشت | مدت آنکوباسیون (روز) | تعداد باکتری |
|---|---|---|
| نوترینت آگار (NA) | ۱۶ | $۱/۵\times۱۰^{۸}$ |
| مورفولین ـ MSA | ۱۶ | $۱/۲\times۱۰^{۷}$ |
| MSA | ۱۶ | $۱/۹\times۱۰^{۷}$ |
| آگارجدید ـ MSA | ۱۲ | $۲\times۱۰^{۸}$ |
| آگاروز ـ MSA | ۱۲ | $۲\times۱۰^{۸}$ |
| آگار خالص ـ MSA | ۱۲ | $۵\times۱۰^{۸}$ |

MSA=Mineral Salt Agar

NA= Nutrient Agar

مورفولین به عنوان تنها منبع کربن هستند. این گونه‌ها گرم مثبت، اکسید از منفی، کاتالاز مثبت، اسید فاست میله‌ای می‌باشد. قسمت اول آزمایش اثبات میکرد که مورفولین در پساب قادر به تجزیه است ولی در مدت طولانی (حداکثر ۱۴ روز) این مدت بستگی به چند مورد دارد یا اینکه القاء آنزیمهای تجزیه کننده ترکیباتی مثل مورفولین نباید بیش از ۱ تا ۲ ساعت باشد و یا اینکه تعداد میکروارگانیسمهای تجزیه کننده در محیط کم می‌باشد.

برای تعیین تعداد میکروبهای احتمالی تجزیه کننده مورفولین محیط جامد استفاده شد ولی این روش موفق نبود. چون بعضی از میکروبهای الیگوتروف که قادر به تجزیه مورفولین در محیط مایع نبودند در محیط جامد رشد می‌کردند که می‌تواند علت آن استفاده از آگار باشد.

همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد از روی شمارش میکروارگانیسمها روی مورفولین آگار نمی‌توان تعداد میکروبهای تجزیه کننده مورفولین را تعیین کرد. همان طور قبلاً هم نشان داده شده است که میکروبهای موجود در خاک می‌توانند از آگار موجود در محیطهای پایه فاقد منبع کربن استفاده کنند (۶) بنابراین رشد روی محیط آگار که تنها یک ماده غذایی کربن دارد به معنی مصرف آن ماده نیست، از این رو برای تعیین میزان میکروبهای تجزیه کننده مورفولین از روش (Most probable Number(MPN استفاده شد. در این روش نشان داده شد که تعداد میکروبهای تجزیه کننده مورفولین در لجن فعال تصفیه آب اصفهان ۸۸ ـ ۱۰ و تعداد آن در آب رودخانه ۱۴ عدد در هر میلی لیتر از نمونه می‌باشد.

همانطور که بوسیله MPN مشخص شد تعداد میکروبهای تجزیه کننده مورفولین در نمونه آب نسبتاً کم می‌باشد و شاید هم به این دلیل باشد که دوران کمون طولانی برای تجزیه این ماده لازم است. از طرف دیگر رشد میکروبهای ایزوله شده در محیطهای مختلف کند است که دلیل دیگر برای طولانی شدن مدت تجزیه این ماده می‌باشد. سرعت رشد باکتریهای ایزوله شده در محیط کشتهای مختلف در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. این آزمایش در دو نوبت انجام گرفته و اعداد نشان داده شده بیانگر معدل دو آزمایش می‌باشد.

همانطور که جدول نشان می‌دهد زمان تقسیم این میکروارگانیسمها حتی در محیط غنی کند است.

بنابراین بطور کلی مورفولین ماده‌ای که قابل تجزیه بوسیله میکروارگانیسمهای کند رشد می‌باشد و چون تعداد میکروبهای تجزیه کنده مورفولین در آب کم می‌باشد تجزیه مورفولین به صورت کند صورت میگیرد یکی از مواد حاصل از تجزیه میکروبی مورفولین، آمونیاک است از ۱mM مورفولین میزان ۰/۷۵mM آمونیاک تولید می‌شود که نشان دهنده آن است که مقداری از آمونیاک در ترکیبات سلولی تثبیت می‌شود و میزانی از آن به صورت آمونیاک آزاد می‌شود



جدول ۲: سرعت رشد باکتریهای ایزوله شده در محیط کشتهای مختلف

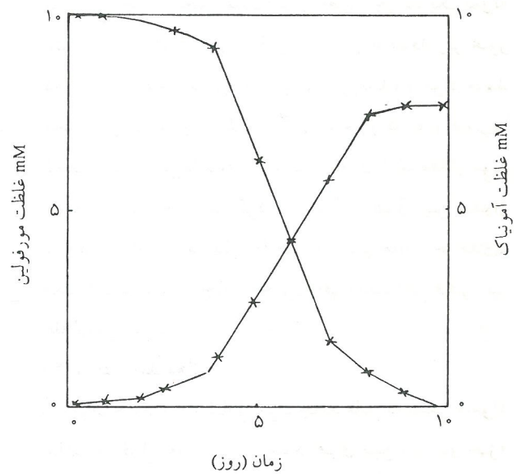
| نوع محیط کشت | روش‌اندازه‌گیری رشد | مدت زمان دو برابر شدن (ساعت) |
|---|---|---|
| نوترینت برات + Tween80 | الف | ۱۳/۶ |
| مورفولین +MS | الف + ب | ۱۰/۹ |
| مورفولین +Tween+MS | الف + ب | ۱۵/۹ |
| استات +Tween80+MS | الف + ب | ۱۲/۸ |
| Tween80+MSالف | ۱۱ | |

الف = اندازه‌گیری رشد بروش کدورت سنجی ($\lambda$= 600 nm)

ب = اندازه‌گیری رشد با استفاده از تعیین مورفولین تجزیه شده

Mineral Salt = MS

در منحنی شماره ۱ میزان رشد میکروباکتریها را در ۱۰mM مورفولین و میزان تجزیه مورفولین و تولید آمونیاک را نشان می‌دهد.




شکل ۱: تجزیه میکروبی مورفولین و تولید آمونیاک

تولید آمونیاک از مورفولین اثبات تجزیه کامل مورفولین می‌باشد.

References


1. Swope, H.G.,& Kenna, M., Effect of organic compunds on biochemical oxygen demand. Sewage and Industrial Waste Engineering, 21 (1950) 467-468.
2. Alexander,M.,Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. Biotechnology and Bioengineering 15 (1973) 611-647.
3. Mills, E. J. & Stack, V. T., Suggested Procedure For evaluation of biological oxidation of organic chemicals. sewage and industrial wastes, 27 (1955) 1061-1064.
4. Wolinsky, E.& Rynearson, T.K., Mycobacteria in soil and their relation to the disease-associated strains. American Review of Respiratory Disease,97 (1968)1032-1037.
5. Sneath, P.H.A.,1986. Bergey, s Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. pp. 1104-1207. Williams & Wilkins.
6. Marshall, A., Whiteside, J.S.& Alexander, M., Problems in the use of agar for the enumeration of soil microorganisms. soil Sience Society Proceedings (1960) 61-62.