مروری بر تأثیر عوامل شیمیایی و فیزیکی جهش‌زا در افزایش تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی ازطریق سویه انتروباکتر

فاطمه بسحاق[۱]، خسرو رستمی[۲*]، زهرا اصفهانی[۳]

۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲- دانشیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۰۳

پیام‌نگار: Rostami2002@yahoo.com

چکیده

فرایند تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی، فرایند پیچیده و چند محصوله است که در غیاب اکسیژن و نور انجام می‌شود. در این مقاله، با مروری بر عوامل شیمیایی و فیزیکی جهش‌زا در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی تأثیر آنها بر بازده تولید هیدرژن ازطریق سویه انتروباکتر بررسی شده است. با بهره‌گیری از هر دو عامل فیزیکی و شیمیایی جهش‌زا بازده تولید هیدروژن نسبت به سویه وحشی افزایش و بازده تولید سایر محصولات کاهش یافته است. برای غربالگری یاخته‌های جهش یافته، از روش‌های مختلفی مانند بازدهی قند، خودکشی رشدمایه، خودکشی پروتون و وگس پروسکوئر سودجسته شده است؛ اما در نهایت میزان تولید هیدروژن به‌عنوان معیار انتخاب بهترین سویه جهش یافته در نظر گرفته شده است. بازده تولید هیدروژن در جهش‌زایی با عوامل شیمیایی بیشتر از جهش‌زایی با عوامل فیزیکی به‌دست آمده است.

کلیدواژه‌ها: انتروباکتر، اتیل متان سولفونات، اتیدیم برماید، تخمیر در تاریکی، پلاسما، جهش‌زایی، پرتو فرابنفش، هیدروژن زیستی.

۱. مقدمه

برای تولید مداوم و نامحدود محصولاتی که ریزاندامگانها تولید می‌کنند، بهبود و اصلاح ساختار ژنتیکی آنها ضروری است. زیرا سویه‌های وحشی ذاتا تولید و مصرف انرژی و ساخت متابولیت(دگرگشته)های موردنیاز خود را کنترل می‌کنند و امکان تولید فراورده‌های متابولیتی بیش از اندازه نیاز خود را فراهم نمی‌آورند. روش‌های بهبود سویه‌های میکروبی شامل روش‌های نو (جهش‌زایی و ترکیب پروتوپلاست) و نوترکیبی ژنتیکی است. به دو دلیل عمده، هنوز از روش‌های نو استفاده می‌شود. نخست اینکه در مواردی اطلاعات ژنتیکی بنیادی وجود ندارد و دوم این‌که خیلی از محصولات متابولیکی بیش از یک ژن را درگیر می‌کنند. بنابراین، در این موارد از روش‌های نوترکیبی ژنتیکی نمی‌توان بهره گرفت. تفاوت جهش‌زایی و نوترکیبی ژنتیکی در این است که در جهش‌زایی فقط از ذخیره ژنی خود یاخته

* تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری

استفاده می‌شود، در حالی‌که در نوترکیبی ژنتیکی، ژن‌هایی که وجود ندارند وارد یاخته می‌شوند. انباشت ژن‌های چند اندامگان در یک اندامگان، نه تنها از پتانسیل افزایش بازده تولید برخوردار است، بلکه توانایی تولید ترکیبات جدید را نیز خواهد داشت. در یک برنامه هماهنگ و متوازن بهبود سویه، هر روش دیگری را تکمیل خواهد کرد. یکی از بهترین روش‌ها برای افزایش تولید محصول و گسترش سویه‌های صنعتی، جهش میکروبی است که می‌تواند به صورت خودبخودی یا با بهره‌گیری از عوامل جهش‌زا انجام شود. جهش اگرچه به صورت کورکورانه سبب تغییر در سویه والد می‌شود، ولی در مواردی که محصول مورد نظر ناشی از چندین ژن باشد (مثل تولید آنتی‌بیوتیک‌ها) از آن استفاده می‌شود. موفقیت‌های چشمگیری که در ایجاد سویه‌های صنعتی به‌دست آمده، با بهره‌گیری از جهش‌زایی و انتخاب بوده است. جهش میکربی با انگیزه اقتصادی در صنعت تخمیر کاربرد پردامنه‌ای دارد و شامل جهش‌زایی فیزیکی و شیمیایی است. معمولاً غلظت متابولیت‌های تولید شده به‌واسطهٔ سویه وحشی برای فرایندهای اقتصادی خیلی ناچیز است. از طریق یک برنامه جامع بهبود سویه که ممکن است چندین سال به‌طول بکشد می‌توان بازده را تا بیش از ۱۰۰ برابر یا بیشتر افزایش داد. موفقیت این برنامه کاملا تجربی به کاربرد بهینه روش‌های جهش‌زایی و سیستم موثر برای انتخاب سویه جهش یافته پرمحصول بستگی دارد. جهش یافته‌هایی که در فرایند تخمیر به‌کار می‌روند در تولید آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، آمینواسیدها و جز آنها به‌کار می‌روند[۱].

در سال ۱۹۰۴، که دی وریس[1] پیشنهاد داد پرتودهی می‌تواند سبب ایجاد جهش شود، دانشمندان پی بردند که پرتودهی با پرتو ایکس، آلفا، گاما، بتا و نوترون‌ها می‌تواند به جهش در موجودات زنده انجامد؛ بنابراین حوزه پژوهش جهش‌زایی فیزیکی آغاز شد. همچنین زمانی که آئرباک[2] و همکارانش در سال ۱۹۴۳ بیان کردند گاز خردل آثار جهش‌زایی بر موجودات می‌گذارد، حوزه پژوهش جهش زایی شیمیایی مطرح شد[۲]. جهش‌زایی فیزیکی با بهره‌گیری از پرتو فرابنفش (UV) و پرتوهای ایکس، آلفا، گاما، بتا، پلاسما، لیزر، تابش الکترونی، تابش یونی و جز آنها انجام می‌شود. در میان پرتوهای یونیده، پرتو ایکس به‌طور پردامنه‌ای در جهش‌زایی به‌کارگرفته شده است؛ ولی پرتو بتا به‌دلیل قدرت نفوذ خیلی کم به‌ندرت به‌کارگرفته شده است[۲-۱]. کاربرد پلاسما در فشار کم برای جهش‌زایی ریزاندامگانها، با توجه به ویژگی منحصربه‌فرد آن و کاربردش در زمینه‌های بسیاری مانند گندزدایی کردن زیستی و سترون‌سازی ابزار پزشکی حساس به دما مورد توجه قرار گرفته است[۳]. جهش‌زایی شیمیایی با استفاده از موادی شیمیایی چون اسید نیترو، گاز خردل، N متیل-N نیترو-N نیتروزوگوانیدین (NTG)، دی اتیل سولفات، متیل متان سولفونات، اتیل متان سولفونات، اتیلن آمین و جز آنها انجام می‌شود. در زمینه روش‌های جهش‌زایی، ایمنی و سلامت کاربران و بازده جهش مباحثی همیشه نگران کننده‌اند. افزایش عملکرد سویه میکربی در جهش‌زایی فیزیکی و شیمیایی فرصت با ارزشی برای کاهش هزینه‌ها فراهم می‌آورد[۵-۱].

عوامل مؤثر بر جهش‌زایی شیمیایی شامل pH، ترکیب درصد بافر، غلظت عامل جهش‌زا، مدت زمان قرارگرفتن یاخته‌ها در معرض عامل جهش‌زا و فاز رشد یاخته‌هایند. با ترسیم منحنی پایستگی- پاسخ که در شکل (۱) مشاهده می‌کنیم، می‌توان همه این عوامل را بهینه کرد. در این منحنی لگاریتمی، درصد پایستگی یاخته‌ها برحسب زمان درمعرض تأثیر عامل جهش‌زا در ترکیب درصدهای مختلف بافر ترسیم شده است[۱]. پایستگی یاخته‌ها با کاهش pH، افزایش غلظت عامل جهش‌زا و افزایش زمان قرار گرفتن یاخته‌ها در معرض عامل جهش‌زا کاهش می‌یابد[۶]. در جهش‌زایی، دامنهٔ مرگ یاخته‌ها باید بیش از ۹۹ درصد باشد. بنابراین، احتمال می‌رود که هر یاختهٔ زنده مانده‌ای دچار یک یا چند جهش شده باشد. در مورد آنتی بیوتیک‌ها میزان تولید باید به عنوان معیار تأثیر جهش‌زایی در نظر گرفته شود[۱].

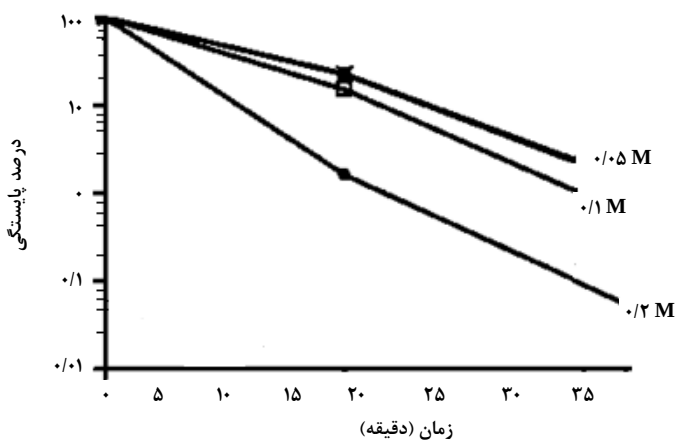
طول موج نامرئی UV بین ۴۰ تا ۴۰۰ نانومتر و سه دامنه ۳۲۰ تا ۴۰۰ (UV-A)، ۲۹۰ تا ۳۲۰ (UV-B) و ۲۲۰ تا ۲۹۰ (UV-C) متغیر است. طیفهای ۱۹۰ تا ۲۲۰ نانومتر فرابنفش دور و ۴۰ تا ۱۹۰ نانومتر فرابنفش خلا نامیده می‌شوند که این طول موج‌ها به دلیل جذب سریعشان در لایه‌های فوقانی جو، به لایه‌های پایینی جوّ وارد نمی‌شوند. مطابق طبقه بندی کمیسیون بین المللی پرتوها، طیف‌های فرابنفش شامل سه دامنه ۳۱۵ تا ۴۰۰ (UV-A)، ۲۸۰ تا ۳۱۵ (UV-B) و ۱۰۰ تا ۲۸۰ (UV-C) است [۷]. بیشترین تأثیر

1. De Vries
2. Auerbach

نامطلوب پرتو فرابنفش بر ریزاندامگانها مربوط به UV-C و بخصوص طول موج ۲۵۴ نانومتر است. در این طول موج، پرتو فرابنفش در غلظت‌های کم به تغییرات ژنتیکی در موجود زنده می‌انجامد و در غلظت‌های بالا، سبب نابودی آن می‌شود. دلیل این امر انرژی نسبتاً زیاد و حداکثر جذب نوری اسیدهای نوکلئیک در محدوده این طول موج است. قرار گرفتن موجودات، بخصوص ریزاندامگانها در معرض پرتو فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر، موجب تغییراتی در توالی DNA ریزاندامگانها می‌شود که ماهیت این تغییرات می‌تواند در مقیاس چند نوکلئوتید و یا گسترده‌تر در سطح ژنوم یا کرموزوم باشد. جهش‌زایی با پرتو فرابنفش باید در غیاب نور انجام شود تا ترمیم نوری رخ ندهد. در جهش‌زایی با پرتو فرابنفش عواملی مانند مدت زمان قرارگیری ریزاندامگانها در معرض پرتو فرابنفش، فاصله و توان لامپ UV اهمیت دارند [۱]. مهمترین اثر جهش‌زایی با پرتو فرابنفش ایجاد دیمرهای(کلیدهای کاهنده) پیریمیدین است. جهش‌زایی با پرتوهای یونیده سبب جهش‌زایی کروموزمی و نقطه‌ای می‌شوند. مواد شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات و متیل متان سولفونات و NTG عوامل الکیل‌دارکننده‌اند و جهش‌زایی با اسید نیترو سبب آمین‌زدایی بازهای آلی می‌شود[۳-۱]. به‌طور کلی، روش جهش- انتخاب در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول، با بهره‌گیری از عوامل جهش‌زا در ریزاندامگانها جهش ایجاد می‌شود و در مرحله دوم جهش یافته‌های مطلوب با راهبردی مشخص انتخاب می‌شوند[۸].

گاز هیدروژن به سبب برخورداری از محتوی انرژی بالا در مقایسه با سوخت‌های فسیلی، تولید آب به عنوان تنها محصول فرعی احتراقش، و امکان به کارگیری مستقیم آن در پیل سوختی و تولید الکتریسیته به عنوان حامل انرژی پاک مورد توجه بسیار قرار گرفته است. روش‌های تولید هیدروژن فیزیکی، شیمیایی و زیستی‌اند. هیدروژن زیستی با روش‌های نورکافت زیستی مستقیم و نامستقیم، تخمیر نوری، تخمیر در تاریکی، جابجایی آب گاز و پیل الکترولیز میکربی تولید می‌شود. تخمیر در تاریکی یکی از روش‌های زیستی تولید هیدروژن است که به طور چشمگیری توسط گونه‌های کلستریدیم و انتروباکتر به طور بی‌هوازی و مستقل از نور انجام می‌شود. در این فرایند، کربوهیدرات‌ها و دیگر رشدمایه‌های آلی تخمیر می‌شوند و پروتون‌ها به منظور تشکیل هیدروژن مولکولی، الکترون‌های ایجاد شده از کاتابولیسم (فروکشت) رشدمایه را دریافت می‌کنند. تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی از جهت مزایایی که دارد، مانند عدم نیاز به نور، بازده بالاتر تولید هیدروژن، نیاز به کنترل ساده‌تر، هزینه‌های عملیاتی کمتر، امکان‌پذیری بیشتر برای صنعتی شدن و بهره‌گیری از انواع رشدمایه مانند پسماندهای آلی نسبت به تولید هیدروژن فوتوسنتزی مورد توجه قرار گرفته است[۹]. ایراد عمدهٔ این روش، بازده و آهنگ کم تولید هیدروژن است که برای تولید هیدروژن در مقیاس صنعتی بهبود سویه لازم است[۱۰].

در این مطالعه با مروری بر عوامل شیمیایی و فیزیکی جهش‌زا در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی ازطریق سویه انتروباکتر تأثیر آنها بر افزایش بازده تولید هیدرژن بررسی شده است.



شکل ۱. منحنی پایستگی- پاسخ[۱].

۲. مسیر متابولیکی تولید هیدروژن زیستی ازطریق سویه *انتروباکتر*

در مسیرهای متابولیکی تولید هیدروژن تخمیری، دو نوع مسیر متابولیکی پایه، یکی برای بی‌هوازی‌های اختیاری مانند انتروباکتر و *اشرشیا کولی* و دیگری برای بی‌هوازی‌های اجباری مانند کلستریدیم پیموده می‌شود[۱۱]. انتروباکتر[1] یک باکتری کموهتروتروف بی‌هوازی اختیاری است که می‌تواند گستره وسیعی از منابع کربنی مانند گلوکز، ساکارز و فروکتوز و انواع رشدمایه‌های آلی، مانند فاضلاب‌ها و لجن‌ها را مصرف کند[۱۰و۹]. این سویه تحت شرایط بی‌هوازی هیدروژن، کربن دی اکسید و متان همراه با اسیدهای آلی و الکل‌ها را تولید می‌کند. مقدار هیدروژن تولید شده از گلوکز به مسیرهای تخمیر و محصول نهایی بستگی دارد. به ازای یک مول گلوکز مصرف شده، اگر محصول نهایی تخمیر بوتیریک اسید باشد حداکثر دو مول هیدروژن (معادله (۱)) و اگر محصول نهایی تخمیر استیک اسید باشد، حداکثر چهار مول هیدروژن (معادله (۲)) تولید می‌شود. ولی اگر محصول نهایی تخمیر پروپیونیک اسید باشد، هیچ هیدروژنی تولید نمی‌شود (معادله (۳))[۹]. نسبت بوتیریک اسید به استیک اسید را غالباً به‌عنوان شاخص تعیین‌کننده در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی به‌کار می‌برند. هر چه این نسبت بیشتر باشد، بازده تولید هیدروژن بیشتر است[۱۲]. تولید پروپیونیک اسید و اتانول در روند تولید هیدروژن محصولات نامطلوب شناخته شده است. تولید اتانول الکترون‌های آزاد را مصرف می‌کند، بنابراین محصول نامطلوب تلقی می‌شود. تولید پروپیونیک اسید نیز هیدروژن را مصرف می‌کند. هرگاه اتانول تولید شود، حداقل دو مول NAD^+ نیز تولید می‌شود. استالدهید با استفاده از یک مول NADH برای تولید اتانول و یک مول NAD^+ متابولیکی می‌شود. حضور اتانول زیاد در محصولات نهایی حاکی از این است که ریزاندامگانها به‌طور موثری هیدروژن تولید نکرده‌اند[۱۳]. گاز هیدروژن در مسیر تخمیر مخلوط اسیدها تولید می‌شود که در شکل (۱)، این مسیر مشاهده می‌شود. در تخمیر مخلوط اسیدها، محصول نهایی می‌تواند شامل مخلوطی از استیک اسید، لاکتیک اسید، فورمیک اسید، اتانول و بوتان دی ال همراه با گاز هیدروژن و کربن‌دی‌اکسید است[۱۴]. همچنین، محصول نهایی تخمیر می‌تواند شامل مخلوطی از بوتیریک اسید و استیک اسید همراه با گاز هیدروژن و کربن دی اکسید[۵] و یا مخلوطی از استیک اسید، لاکتیک اسید، سوکسینات، اتانول و بوتان دی ال همراه با گاز هیدروژن و کربن‌دی‌اکسید[۱۵] ویا مخلوطی از استیک اسید، بوتیریک اسید، لاکتیک اسید، اتانول و بوتان دی ال همراه با گاز هیدروژن و کربن دی اکسید[۱۰] باشد.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2CO_2 \quad (۱)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2 \quad (۲)$$

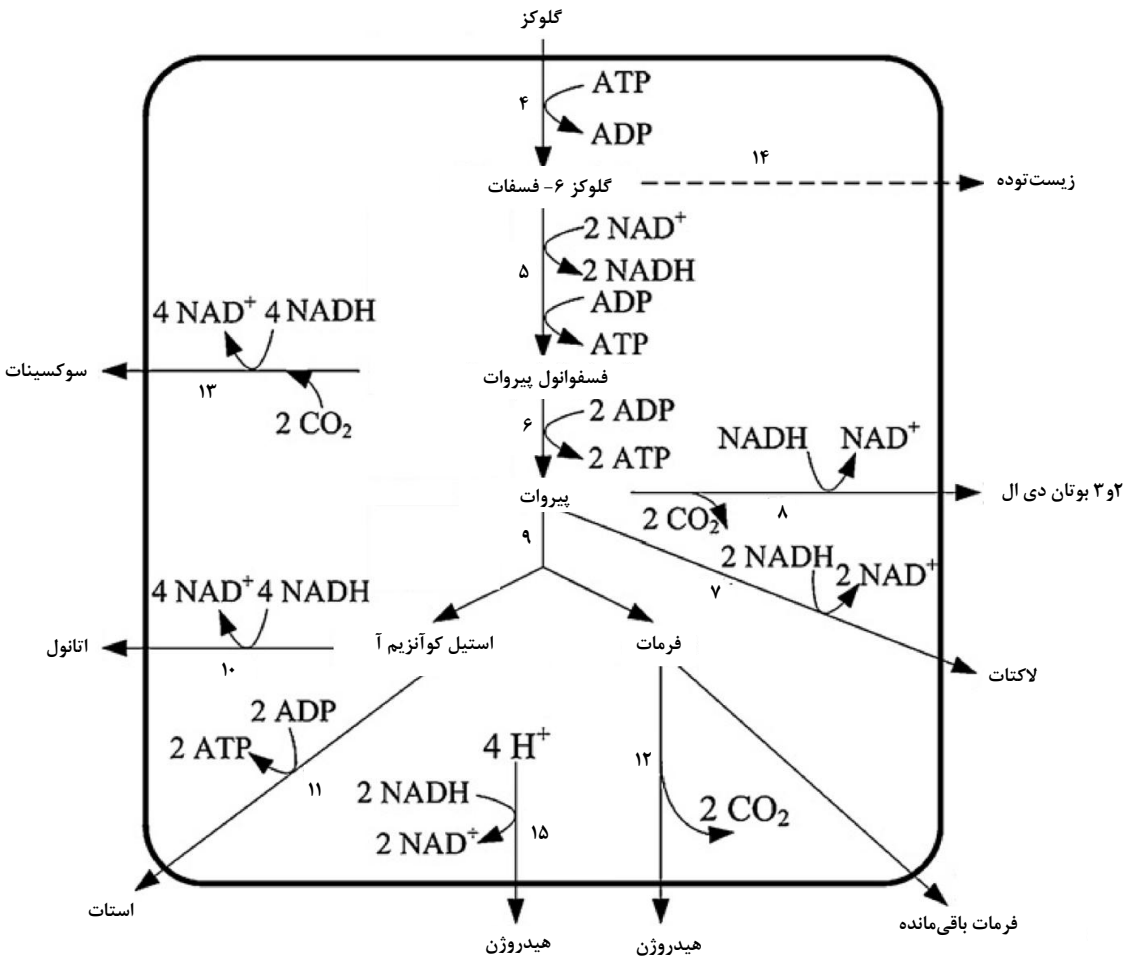
$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O \quad (۳)$$

بازده تولید هیدروژن زیستی در روش تخمیر در تاریکی تا حد زیادی به نوع ریزاندامگانهای بی‌هوازی بستگی دارد که در تخمیر استفاده می‌شوند. مسیر متابولیکی بی‌هوازی تولید هیدروژن ازطریق سویه *انتروباکتر آئروژنز* در شکل (۲)، و واکنش‌های این مسیر در معادلات (۴) تا (۱۵) نموده شده‌اند. در این مسیر متابولیکی، گلوکز به‌واسطهٔ مسیر گلیکولیز به پیروات تبدیل می‌شود (معادلات (۴ تا ۶)). سپس پیروات به‌کمک آنزیم پیروات فرمات لیاز به فرمات و استیل کوآنزیم آ تجزیه می‌شود (معادله (۹)). استیل کوآنزیم آ مطابق معادلات (۱۰) و (۱۱) به استات و اتانول تجزیه می‌شود. با توجه به شرایط، قسمتی از پیروات به لاکتات (معادله (۷)) و قسمتی از آن به ۲ و۳ بوتان دی ال (معادله (۸)) تبدیل می‌شود. سپس در شرایط اسیدی، فرمات به‌واسطهٔ فرمات هیدروژن لیاز فعال و مطابق معادله (۱۲) به کربن‌دی‌اکسید و گاز هیدروژن تجزیه می‌شود[۴]. هیدروژنازها آنزیم‌هایی‌اند که تولید و مصرف هیدروژن را کاتالیز می‌کنند. هیدروژنازها، براساس ساختار جایگاه‌های فعال به سه دسته هیدروژناز آهنی، هیدروژناز نیکل- آهنی و هیدروژناز آهن- آهنی تقسیم می‌شوند. هیدروژنازهای آهن- آهنی و نیکل- آهنی در فرایند تخمیر در تاریکی در کشت خالص یا مخلوط ریزاندامگانهای بی‌هوازی به‌کار می‌روند. واکنش $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ بازگشت‌پذیر است و برای واکنش به ظرفیت کاهش ترکیباتی وابسته‌اند که از توانایی برهمکنش با

1. *Enterobacter Aerogenes*

هیدروژناز برخوردارند[۱۱]. یکی از مشکلات در رشد بی‌هوازی گونه انتروباکتر، مصرف NADH مازاد تولید شده در خلال فرایند تخمیر است. NADH می‌تواند با کاهش پروتون ازطریق هیدروژناز و حامل‌های الکترون به تشکیل هیدروژن در انتروباکتر انجامد. NADH معمولاً در خلال تخمیر گلوکز به پیروات تولید می‌شود. تبدیل پیروات به اتانول، بوتان دی ال، لاکتات و سوکسینات اکسایش NADH را درگیر می‌کند. اگر مسیر تشکیل این متابولیت‌ها بسته شود، غلظت NADH نیز افزایش می‌یابد. بهبود تولید هیدروژن از طریق اکسایش NADH صورت می‌گیرد[۱۰].

به‌طور کلی، هیدروژن از دو مسیر فرمات (معادله (۱۲)) و NADH (معادله (۱۵)) تولید می‌شود. در مسیر فرمات، هیدروژن بیشتری تولید می‌شود. اما جهش‌زایی روی مسیر NADH تأثیر بیشتری دارد و سبب افزایش تولید هیدروژن از این مسیر می‌شود. هیدروژناز به غشای پلاسمایی متصل است و دو زیر واحد در مکان‌های مختلف غشا دارد. یکی از آنها با NADH روی طرف سیتوپلاسمی برهمکنش می‌دهد، و دیگری با پروتون‌ها روی طرف پری پلاسمی برهمکنش دارد[۴].



شکل ۲. مسیر متابولیکی بی‌هوازی تولید هیدروژن از کربوهیدرات‌ها به‌واسطهٔ سویه *انتروباکتر آئروژنز*[۴].

گلوکز + ATP → گلوکز 6-P + ADP (۴)

گلوکز 6-P + ADP + 2Pi + 2 NAD^+→ 2 فسفوانول پیروات + ATP +2NADH (۵)

پیروات + ATP→ADP+ فسفوانول پیروات (۶)

پیروات +NADH→ لاکتات +NAD^+ (۷)

NAD^++ ۲و۳ بوتان دی‌ال + $2CO_2$ →NADH+ پیروات 2 (۸)

فرمات + CoA- استیل →CoA-SH + پیروات (۹)

استیل -CoA +2NADH→ اتانول +2NAD^+ (۱۰)

استیل -CoA + Pi +ADP→ATP + استات (۱۱)

فرمات →CO_2 +H_2 (۱۲)

فسفوانول پیروات + CO_2 +2NADH→ سوکسینات +2NAD^+ +Pi (۱۳)

گلوکز 6-P + 0.97 NH_3 + 0.71PH_3→1.43$C_{4.2}H_8O_{1.25}N_{0.68}P_{0.1}$ + 0.95H_2O+ 1.57Pi (۱۴)

NADH→H_2 +NAD^+ (۱۵)

۳. تأثیر عوامل جهش‌زا در تولید هیدروژن زیستی

تولید هیدروژن زیستی در مقیاس صنعتی با توجه به هزینه های گزاف تولید هنوز عملی نشده است. بنابراین، بهبود دادن و دستیابی به ریزاندامگانها با آهنگ و بازده چشمگیر تولید هیدروژن برای کاربرد در مقیاس صنعتی ضروری است. تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی جهش‌زا بر فرایند تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی برای افزایش بازده و آهنگ تولید هیدروژن بررسی شده است. در جدول (۱) نتایج مطالعات انجام شده در زمینه جهش‌زایی فیزیکی و شیمیایی در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی ازطریق سویه انتروباکتر درج شده است. بازده تولید هیدروژن به صورت مول هیدروژن تولید شده به ازای مول رشدمایه مصرف شده تعریف می‌شود. در این جدول درصد افزایش بازده تولید هیدروژن با معادله (۱۶) محاسبه شده است.

$$\text{درصد افزایش بازده تولید هیدروژن} = ۱۰۰ \times \frac{\text{بازده تولید هیدروژن سویه جهش یافته}-\text{بازده تولید هیدروژن سویه وحشی}}{\text{بازده تولید هیدروژن سویه وحشی}} \quad (۱۶)$$

جدول ۱. نتایج مطالعات انجام شده روی جهش‌زایی در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

نوع جهش‌زایی	ماده جهش‌زا	ریزاندامگان	افزایش بازده تولید هیدروژن (٪)	بازده تولید هیدروژن (مول هیدروژن/ مول گلوکز)	مرجع
شیمیایی	N متیل -N نیترو-N نیتروزوگوانیدین (NTG)	*انتروباکتر آئروژنز*	۱۰۰	۱/۱۷	[۱۴]
شیمیایی	اتیل متان سولفونات (EMS)	*انتروباکتر کلواسا*	۵۰	۳/۴۵	[۱۰]
شیمیایی	NTG	*انتروباکتر آئروژنز*	۳۰	۱/۰۶	[۱۵]
شیمیایی	NTG	*انتروباکتر آئروژنز*	۱۲۰	۱/۷۶	[۱۵]
شیمیایی	اتیدیم برماید (Et Br)	*انتروباکتر آئروژنز*	۴۵	۱/۹۲	[۵]
فیزیکی	پلاسما	*انتروباکتر آئروژنز*	۲۶/۴	۱/۰۸	[۴]
فیزیکی	UV	*انتروباکتر آئروژنز*	۳۰	۱/۷۲	[۵]

راچمن[1] و همکارانش برای اصلاح ژنتیکی سویه *انتروباکتر آئروژنز*، از NTG به عنوان ماده شیمیایی جهش‌زا بهره برده‌اند. در این تحقیق، سلول‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در معرض محلول NTG با غلظت ۶۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷) قرار گرفتند. از دو روش خودکشی رشدمایه[2] با سودجستن از آلیل الکل (۰/۵ میلی مولار) و خودکشی پروتون[3] با استفاده از محلول هم مولار برمات- برماید (غلظت ۳۲/۵ میلی مولار و pH۴/۸) برای غربالگری یاخته‌های جهش یافته استفاده شد. مطابق مندرجات جدول (۱)، بازده تولید هیدروژن سویه وحشی (مول هیدروژن/مول گلوکز) ۰/۵۶ به‌دست آمده است که این مقدار برای سویه جهش‌یافته به (مول هیدروژن/مول گلوکز) به ۱/۱۷ افزایش یافته‌است. تولید اتانول سویه وحشی(مول اتانول/مول گلوکز) ۰/۴۹ گزارش شد، در حالی‌که برای سویه جهش یافته تولید اتانول به (مول اتانول/مول گلوکز) ۰/۳۴ کاهش یافته است. علاوه بر اتانول، بوتان دی ال و استات نیز برای سویه جهش یافته با کاهش تولید همراه بودند [۱۴]. در جدول (۲)، بازده تولید هیدروژن بر حسب (مول هیدروژن/مول گلوکز) و بازده تولید سایر محصولات بر حسب (مول محصول/مول گلوکز) درج شده است.

در این تحقیق، مسیرهای تولید الکل با روش خودکشی رشدمایه، با بهره‌گیری از آلیل الکل (C_3H_6O) و مسیرهای تولید اسید آلی با روش خودکشی پروتون با سودجویی از سدیم برماید (NaBr) و سدیم برمات ($NaBrO_3$) بسته می‌شوند[۱۲]. در روش خودکشی رشدمایه، فقط جهش یافته‌هایی زنده می‌مانند که فاقد ژن‌های الکل دهیدروژناز (ADH) و بوتان دی ال دهیدروژناز (BDDH) باشند. این دو آنزیم فقط تحت شرایط بی‌هوازی در سویه وحشی بیان می‌شوند. مقدار این آنزیم در پاسخ به شرایط رشد، فرق می‌کند[۱۴].

جدول ۲. نتایج حاصل از جهش *انتروباکتر آئروژنز* با NTG [۱۴].

نوع سویه	هیدروژن	کربن دی اکسید	اتانول	بوتان دی ال	استات	لاکتات	پیروات	فرمات
سویه وحشی	۰/ ۵۶	۱/۰۸	۰/۴۹	۰/۳۷	۰/۱۷	۰/۲۹	۰/۰۲	۰/۱۶
سویه جهش یافته	۱/۱۷	۱/۲۲	۰/۳۴	۰/۰۴	۰/۱۴	۰/۳۱	۰/۱۴	۰/۱۸

1. Rachman
2. Substrate Suicide
3. Proton Suicide

آلیل الکل ازطریق الکل دهیدروژناز یا بوتان دی ال دهیدروژناز به آلدهید سمی اکرولین تبدیل می‌شود[۱۲]. یاخته‌هایی که فعالیت الکل دهیدروژناز را بروز می‌دهند ممکن است به‌طور انتخابی ازطریق تیمار با الکل‌های مناسب کشته شوند. بوتینیل، پروپارژیل و آلیل الکل‌ها در خودکشی رشدمایه برای الکل دهیدروژناز مؤثرند. پروپارژیل و آلیل الکل برای *اشرشیا کولی* مؤثرند و برای غربال کردن جهش یافته‌هایی که نقص الکل دهیدروژناز یا آنزیم‌های حساس به دما دارند، به‌کار رفته‌اند. این پاسخ متفاوت به آلیل الکل غربال کردن جهش یافته‌های بدون الکل دهیدروژناز را با کشتن نوع وحشی به سادگی امکان پذیر می‌کند[۱۶]. برای غربال کردن جهش یافته‌های مقاوم به آلیل الکل، یافتن غلظت بازدارنده آلیل الکل، برای ریزاندامگانها اهمیت دارد. این غلظت از سویه‌ای به سویه دیگر متفاوت است. همچنین، این غلظت در شرایط هوازی و بی‌هوازی متفاوت و معمولاً در شرایط بی‌هوازی مقدار کمتری است که احتمالا به دلیل بیان بالاتر الکل دهیدروژناز و بوتان دی ال دهیدروژناز در شرایط بی هوازی و تشکیل مقادیر بالاتر محصول سمی مانند اکرولین است[۱۲].

در روش خودکشی پروتون، جهش یافته‌هایی که توانایی تولید اسید از قند را ندارند شناسایی می‌شوند. این روش یکی از روشهای مستقیم برای انتخاب جهش یافته‌هایی است که نقص در سوخت‌وساز قند دارند و برای دامنه وسیعی از ریزاندامگان‌ها، قندها و شرایط رشد قابل کاربرد است. در این روش، از برمات و برماید به عنوان عامل انتخاب بهره می‌گیرند. غلظت سمی برمات- برماید از سویه‌ای به سویه دیگر فرق می‌کند. اثر برمات- برماید روی رشد سلول‌ها در دامنه مختلف pH اندازه‌گیری می‌شود. غلظت کشنده با کاهش pH اولیه کاهش می‌یابد. پایین ترین غلظت نمک تلفیقی که کاملا بازدارنده رشد باشد، حداقل غلظت کشنده برمات- برماید در نظر گرفته می‌شود[۱۸-۱۷]. یون‌های برمات و برماید برای آزاد شدن برمین در حضور پروتون‌های مازاد واکنش می‌دهند (معادلات (۱۷-۱۸)). تولید اسید از قند به‌کمک باکتری‌های در حال رشد در حضور برمات- برماید در روش خودکشی پروتون با توجه به سمیت بروماین و هیپوبرمایت تولید شده، نتیجه می‌شود.

$$BrO_3^- + 2Br^- + 2H^+ \rightarrow Br_2 + BrO_2^- + H_2O \quad (۱۷)$$

$$BrO_2 + 2Br^- + 2H^+ \rightarrow Br_2 + BrO^- + H_2O \quad (۱۸)$$

حداقل غلظت کشندگی[1] به حداقل غلظت یک آنتی میکروب گفته می‌شود که توسط آن ۹۹/۹ ٪ یاخته‌های اولیه کشته شوند، و کمتر از ۰/۰۱ ٪ باقی بمانند[۱۹]. حداقل غلظت بازدارندگی[2] به حداقل غلظت یک آنتی میکرب می‌گردند که از رشد قابل رؤیت ریزاندامگان بعد از یک شبانه روز گرماگذاری جلوگیری کند[۲۰].

کومار[3] و همکارانش از اتیل متان سولفونات برای جهش سویه *انتروباکتر کلواسا* بهره گرفتند. یاخته‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول اتیل متان سولفونات (۲ v/v٪) در دمای ۳۶ درجه سلسیوس بدون همزدن قرار گرفتند. در این تحقیق از دو روش خودکشی رشدمایه با استفاده از آلیل الکل (۷ میلی مولار) و خودکشی پروتون (محلول هم مولار برمات- برماید با غلظت ۴۰ میلی مولار و pH = ۵/۵) برای غربالگری یاخته‌های جهش یافته بهره گرفتند. بازده تولید هیدروژن برای سویه وحشی (مول هیدروژن/مول گلوکز) ۲/۳ و برای سویه جهش یافته (مول هیدروژن/ مول گلوکز) ۳/۴۵ گزارش شده است [۱۰]. نتایج این تحقیق در جدول (۳) درج شده است که افزایش بازده تولید هیدروژن را پس از جهش سویه نشان می‌دهد. در این جدول بازده تولید هیدروژن بر حسب (مول هیدروژن/مول گلوکز) و بازده تولید سایر محصولات بر حسب (مول محصول/ مول گلوکز) درج شده است.

جدول ۳. نتایج حاصل از جهش *انتروباکتر کلواسا* با اتیل متان سولفونات[۱۰].

نوع سویه	هیدروژن	کربن دی اکسید	اتانول	بوتان دی ال	استات	لاکتات	بوتیرات	زیست‌توده (مول گلوکز/ گرم)
سویه وحشی	۲/۳	–	–	–	–	–	–	–
سویه جهش یافته	۳/۴۵	۰/۳۱	۰/۰۹	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۱	۰/۰۴	۲۶/۲۵

1. Minimum Lethal Concentration (MLC) 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 3. Kumar

در پژوهشی که رامپراکاش و موتوکومار[1] انجام دادند و از اتیدیم برماید و پرتو فرابنفش برای جهش‌زایی سویه *انتروباکتر آئروژنز* استفاده شد، بازده تولید هیدروژن برای سویه وحشی (مول هیدروژن/ مول گلوکز) ۱/۳۲، برای سویه جهش یافته با پرتو فرابنفش (مول هیدروژن/ مول گلوکز) ۱/۷۲ و برای سویه جهش یافته با اتیدیم برماید (مول هیدروژن/ مول گلوکز) ۱/۹۲ به‌دست آمده است. نتایج این تحقیق را در جدول (۴) مشاهده می‌کنید که در آن بازده تولید هیدروژن بر حسب (مول هیدروژن/مول گلوکز)، بازده تولید سایر محصولات بر حسب (مول محصول/مول گلوکز) و زیست‌توده بر حسب (گرم/ مول گلوکز) درج شده است. در جهش‌زایی شیمیایی سلول‌ها به مدت ۵ تا ۲۵ دقیقه (فواصل ۵ دقیقه) در معرض ۱۰ میلی لیتر محلول اتیدیم برماید با غلظت ۲۰ میکروگرم برمیلی لیتر قرار گرفتند. در جهش‌زایی فیزیکی با استفاده از پرتو فرابنفش، یاخته‌ها به مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه (فواصل ۲ دقیقه) در معرض تابش پرتو فرابنفش با طول موج ۲۴۰ نانومتر و از فاصله ۴۸ سانتی‌متری قرار گرفتند. افزایش زمان قرارگیری در معرض پرتو فرابنفش به‌دلیل ایجاد تغییر در DNA سبب کاهش زنده مانی یاخته‌ها می‌شود. پرتو فرابنفش ازطریق غشاء سلولی نفوذ می‌کند و باعث تغییر در مولکول‌های سلول می‌شود و در نتیجه به ساختار مولکول‌های پروتئین آسیب می‌رساند. در جدول (۵) رابطه زمان قرارگیری عامل جهش‌زا در معرض تابش و درصد پایستگی یاخته‌ها نشان داده شده است. در این تحقیق برای غربال کردن سویه‌های جهش یافته از آزمون بازدهی قند بهره برده شده است. اگر بازدهی بهره‌گیری از قند برای یاختهٔ جهش یافته بیشتر از سویه وحشی باشد، عامل جهش یافته مثبت تلقی می‌شود. سرانجام، بهترین یاختهٔ جهش‌یافته از روی میزان تولید هیدروژن تعیین شده است[۵].

جدول ۴. نتایج حاصل از جهش *انتروباکتر آئروژنز* با اتیدیم برماید و UV[۵].

نوع سویه	هیدروژن	استیک اسید	بوتریک اسید	زیست‌توده
سویه وحشی	۱/۳۲	۲/۹	۲/۲	۲/۶
سویه جهش یافته با UV	۱/۷۲	۲/۶	۱/۹	۳
سویه جهش یافته با اتیدیم برماید	۱/۹۲	½	۱/۴	۳/۳

جدول ۵. رابطه زمان در معرض قرار گیری عامل جهش‌زا و درصد پایستگی یاخته‌ها[۵].

جهش‌زایی شیمیایی		جهش‌زایی فیزیکی	
زمان (دقیقه)	درصد پایستگی	زمان (دقیقه)	درصد پایستگی
۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
۵	۷۴	۲	۸۵
۱۰	۶۲	۴	۵۱
۱۵	۳۲	۶	۳۴
۲۰	۱۴	۸	۱۱
۲۵	۶	۱۰	۰

1. Ramprakash and Muthukumar

پلاسما در دمای محیط و جوّی (ARTP)[1] برای بهبود سویه *انتروباکتر آئروژنز* توسط لو[2] و همکارانش به‌کار برده شده است. مطابق مندرجات جدول (۶)، بازده تولید هیدروژن برای سویه وحشی (مول هیدروژن/مول گلوکز) ۰/۸۹۷ و برای سویه جهش یافته (مول هیدروژن/مول گلوکز) ۱/۱۳۴ گزارش شده است. در این تحقیق، یاخته‌ها به مدت ۳ دقیقه در معرض جریان گاز هلیم با شدت ۱۵ لیتر بر دقیقه و توان بسامد رادیویی ۱۰۰ وات با فاصله ۲ میلی‌متر قرار گرفتند. دمای پلاسما روی سطح ورق فلزی ۲۵ تا ۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است. در این شرایط، ۹۸/۹ درصد یاخته‌های وحشی از بین رفتند. برای غربال کردن یاخته‌های باقی‌مانده (حدود 10^5 یاخته) تولید هیدروژن آن‌ها بررسی شد. در بین آن‌ها جهش یافته‌ای با بالاترین میزان تولید هیدروژن، انتخاب شد. تجزیه و تحلیل آزمون umu نشان می‌دهد که الگوی تخریب ژن باکتری‌ها در پلاسما در دمای محیط و جوّی با عوامل جهش‌زای شیمیایی و پرتو فرابنفش کاملاً متفاوت است. آزمون umu بر اساس توانایی عوامل آسیب‌رسان DNA برای ایجاد بیان ژن umuC عامل جهش‌زایی القایی SOS ازطریق تابش یا مواد شیمیایی است[۲۱]. پلاسما در دمای محیط و جوّی می‌تواند به صورت فشرده ساخته شود و چون در شرایط ملایم عمل می‌کند ابزار مناسبی برای کاربرد در زیست فناوری است. برای ارزیابی پایداری سویه جهش یافته از روش کشت پیاپی بهره گرفتند و میزان تولید هیدروژن بررسی شد. پایداری تولید هیدروژن بعد از ۲۵ بار کشت سویه جهش یافته نمایانگر پایداری ژنتیکی سویه جهش یافته است[۴]. در جدول (۶)، تولید هیدروژن بر حسب (لیتر/لیتر) و تولید سایر محصولات بر حسب (میلی‌مول/ لیتر) گزارش شده است. ایتو[3] و همکارانش از NTG به عنوان ماده جهش‌زا برای بهبود ژنتیکی سویه *انتروباکتر آئروژنز* بهره گرفتند. در این تحقیق، یاخته‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول NTG با غلظت یک میلی گرم برمیلی لیتر در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH ۷) قرار گرفتند. از آزمون وگس- پروسکوئر[4] برای غربالگری جهش یافته‌ها بهره گرفتند. فرض شده است که با بهره‌گیری از این آزمون می‌توان جهش یافته‌هایی را که در تولید بوتان دی ال نقص دارند به‌دست آورد. با استفاده از این روش، از میان ۴۰۰۰ کلنی، دو یاختهٔ جهش‌یافته به‌دست آمد که میزان تولید هیدروژن و سایر محصولات آنها بررسی شد. بازده تولید هیدروژن در طول ۱۲ ساعت برای سویه وحشی (مول هیدروژن/مول گلوکز) ۰/۸ و برای سویه‌های جهش یافته (مول هیدروژن/مول گلوکز) ۱/۷۶ و ۱/۰۶ گزارش شده است. نتایج این تحقیق در جدول (۷) درج شده است که در آن بازده تولید هیدروژن بر حسب (مول هیدروژن/مول گلوکز) و بازده تولید سایر محصولات بر حسب (مول محصول/ مول گلوکز) گزارش شده است[۱۵].

جدول ۶. نتایج حاصل از جهش *انتروباکتر آئروژنز* با پلاسما در دمای محیط و جوّی[۴].

نوع سویه	هیدروژن	اتانول	استات	لاکتات
سویه وحشی	۰/۹۴۳	۱۸/۵۹	۱۹/۳۸	۳۳/۰۶
سویه جهش یافته	۱/۰۸۰	۱۶/۹۸	۱۸/۵۹	۳۱/۷۱

جدول ۷. نتایج حاصل از جهش *انتروباکتر آئروژنز* با NTG [۱۵].

نوع سویه	هیدروژن	کربن دی اکسید	اتانول	بوتان دی ال	استات	لاکتات	سوکسینات
سویه وحشی	۰/۸	۱	۰/۶۳	۰/۲۲	۰/۴۴	۰/۲	۰/۱
سویه جهش‌یافته ۱	۱/۷۶	۱/۰۷	۰/۷	۰/۱۱	۱/۰۲	۰/۰۷	۰/۴۲
سویه جهش‌یافته ۲	۱/۰۶	۰/۶۵	۰/۵۶	۰/۰۱	۰/۵۲	۰/۷۳	۰/۱۵

1. Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) 2. Lu 3. Ito 4. Voges–Proskauer

۴. نتیجه‌گیری کلی

انگیزه‌های اقتصادی بزرگترین هدف بهبود سویه است. تولید صنعتی هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی هنوز محقق نشده است زیرا بازده و آهنگ تولید هیدروژن برای تولید در مقیاس صنعتی کم و بنابراین نیاز به بهبود سویه کاملاً مبرم است. در این مطالعه اثر عوامل شیمیایی و فیزیکی جهش‌زا در بهبود سویه *انتروباکتر* و افزایش بازده تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی مرور شده است. تأثیر عوامل شیمیایی جهش‌زا شامل N متیل N- نیترو-N نیتروزوگوانیدین(NTG)، اتیل متان سولفونات (EMS) و اتیدیم برماید (Et Br) و عوامل فیزیکی جهش‌زا شامل پلاسما و پرتو فرابنفش در افزایش تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی بررسی شده است. در تمام تحقیقات انجام شده، با هر دو عامل فیزیکی و شیمیایی جهش‌زا بازده تولید هیدروژن نسبت به سویه وحشی افزایش و بازده تولید سایر محصولات کاهش یافته است. بازده تولید هیدروژن با بهره‌گیری از NTG ۱۰۰،۳۰ و ۱۲۰ درصد، EMS ۵۰ درصد، Et Br ۴۵ درصد، پلاسما ۲۶/۴ درصد و UV۳۰ درصد نسبت به سویه وحشی افزایش یافته است. با توجه به این نتایج بازده تولید هیدروژن در جهش‌زایی با عوامل شیمیایی بیشتر از جهش‌زایی با عوامل فیزیکی به‌دست آمده است. برای غربالگری یاخته‌های جهش یافته از روش‌های مختلفی مانند آزمون بازدهی قند، خودکشی رشدمایه، خودکشی پروتون و وگس پروسکوئر استفاده شده است؛ اما در نهایت بازده تولید هیدروژن به عنوان معیار انتخاب بهترین سویه جهش یافته در نظر گرفته شده است. بهره‌گیری از سویه‌های جهش‌یافته برای تولید هیدروژن با افزایش بازده تولید و کاهش هزینه‌ها به افزایش عملکرد فرایند می‌انجامد.

مراجع

[1] Crueger, W., Crueger, A., "Biotechnology-A textbook of industrial microbiology", 2nd Edition, (1990).

[2] Edward S., D., Batley, J., Parkin, I., Kole, C., Genetics, genomics and breeding of oilseed brassicas, Chapter 8: Mutagenesis. 158-173, 1st Edition, CRC Press, (2012).

[3] Rowlands, R. T., "Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures", Enzyme Microb. Technol. 6, 3-10, (1984).

[4] Lu, Y., Wang, L., Ma, K., Li, G., Zhang, C., Zhao, H., Lai, Q., Li, H. P.,"Characteristics of hydrogen production of an Enterobacter aerogenes mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP)", Biochem. Eng. J. 55, 17–22,_(2011).

[5] Ramprakash, B., Muthukumar, K.,"Biohydrogen production from rice mill wastewater using mutated Enterobacter aerogenes", Eng. Agricul. Environ. Food, 9, 109-115, (2016).

[6] Sidorkina, O., Saparbaev, M., Laval, J., "Effects of nitrous acid treatment on the survival and mutagenesis of Escherichia coli cells lacking base excision repair (hypoxanthine-DNA glycosylase-ALK A protein) and/or nucleotide excision repair", Mutagenesis, 12, 23-27, (1997).

[7] Mckinlay, A. F., Driscoll, C. M. H., Meara, J. R., Pearson, A. J., Saunders, R. D., Stather, J. W., "Advice on protection against ultraviolet radiation", Documents of the NRPB. 13, 1-35, (2002).

[8] Fungaro, M. H. P., Souza Junior, C. L., Azevedo, J. L., Pizzirani-Kleiner, A. A., "Recurrent mutation- selection to improve rennet production in Candidatsukubaensis", Rev. Brasil Genet. 14, 377-382, (1994).

[9] Das, D., Khanna, N., Nag Dasgupta, C., "Biohydrogen production: fundamentals and technology advances", CRC Press, 2014.

[10] Kumar, N., Ghosh, A., Das, D., "Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H_2 production by Enterobacter cloacae", Biotechnol. Letters 23, 537–541, (2001).

[11] Hallenbeck, P. C., Ghosh, D., "Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering ", J. Environ. Manag. 95, 361-364, (2012).

[12] Singh, L., Siddiqui, M. F., Ahmad, A., Rahim, M. H. A., Sakinah, M., Wahid, Z. A. "Application of polyethylene glycol immobilized Clostridium sp. LS2 for continuous hydrogen production from palm oil mill effluent in upflow anaerobic sludge blanket reactor", Biochem. Eng. J. 70, 158–65, (2013).

[13] Peixoto, G., Saavedra, N. K., Varesche, M. B. A., Zaiat, M. "Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor", Int. J. Hydrogen Energy 36, 8953-8966, (2011).

[14] Rachman, M. A., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., "Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by Enterobacter aerogenes", J. Fermen. Bioeng. 83, 358-363, (1991).

[15] Ito, T., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., "High-yield production of hydrogen by Enterobacter aerogenes mutants with decreased acetolactate synthase activity", J. Biosci. Bioeng. 97, 227–232, (2004).

[16] Lorowitz, W., Clark, D., "Escherichia coli mutants with a temperature-sensitive alcohol dehydrogenase", J. Bacteriol. 152, 935-938, (1982).
[17] Winkelman, J., W., Clark, D. P., "Proton suicide: general method for direct selection of sugar transport- and fermentation-defective mutants", J. Bacteriol. 160, 687-690, (1984).
[18] Cueto, P. H., Mendez, B. S., "Direct selection of Clostridium acetobutylicum fermentation mutants by a proton suicide method", Appl. Environ. Microb. 56, 578-580, (1990).
[19] Barry, A. L., Lasner, A. R., "In-Vitro Methods for Determining minimal lethal, concentrations of antimicrobial agents", Am. J. Clin. Pathol. 71, 88-92, (1977).
[20] Andrewes, J. M., "Determination of minimum inhibitory concenteration", J. Antimicrob. Chemother. 48, 5-16, (2001).
[21] Oda, Y., "Development and progress for three decades in umu test systems", Gene. Environ. 38, 1-14, (2016).