متوفرة على الموقع: http://www.basra-science-journal.org

ISSN –1817 –2695

دراسة الظروف المثلى لانتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي (الرامنولبيد) من العزلة المحلية P.a. 28 لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

وائل علي سوادي*   امال كاظم غضبان   غياث حميد مجيد

قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة /جامعة البصرة

الاستلام 20-11-2012، القبول 28-1-2013

الخلاصة

تم عزل 35 عزلة محلية لبكتريا *Pseudomonas* من مصادر متنوعة وشخصت 29 عزلة منها على انها *P. aeruginosa*. اختبرت قدرة هذه العزلات على انتاج المركبات الحيوية ذات النشاط السطحي (الرامنولبيد) وباستعمال زيت زهرة الشمس كمصدر كاربوني ونخالة الحنطة كمصدر نتروجيني .واختيرت العزلة P.a. 28 والتي مصدرها تربة بئر نهران عمر النفطي لكونها الاعلى انتاج واعلى فعالية استحلاب .

حددت الظروف المثلى لانتاج الرامنولبيد من العزلة المحلية P.a. 28 . اذ بينت النتائج ان امثل وسط انتاج كان يتكون من زيت زهرة الشمس 4 % كمصدر كاربوني ونخالة الحنطة (0.6 %) كمصدر نتروجيني وامثل دالة حامضية كانت 7 وامثل حجم لقاح كان 1 % وكانت ظرو ف التخمر المثلى هي 30 °م لمدة 60 ساعة باستعمال الحاضنة الهزازة على سرعة 180 دورة / دقيقة وقد بلغت كمية الرامنولبيد حوالي 28.9 غم / لتر. شخص الرامنولبيد بتقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة وتبين ان البكتريا تنتج نوعين منه هما الاحادي والثنائي الرامنولبيد .

كلمات مفتاحية : *Pseudomonas aeruginosa* ، رامنولبيد ، انتاج ، الظروف المثلى

1. المقدمة Introduction

تمتاز المواد الحيوية ذات النشاط السطحي biosurfactants بكونها مركبات امفوتيرية تحتوي على طرف محب للماء hydrophilic واخر كاره للماء hydrophobic اذ تتمكن من التجمع بين الأسطح وخفض الشد بينها وكذلك الشد السطحي ، وهي تنتج على الأسطح الحيه كاسطح الخلايا الميكروبية او خارج الخلايا [1].

هناك العديد من المواد الحيوية ذات النشاط السطحي التي تنتج بفعل الأحياء المجهرية كالرامنولبيد الذي ينتج من بكتريا *Pseudomonas* والسوفورولبيد الذي ينتج من العديد من انواع خميرة *Torulopsis* كما ان لبعض الأحياء المجهرية القدرة على تغير اسطح جدران خلاياها مثل خميرة *Candida lipolytica* اذ تنتج سكريات متعددة Lipopolysaccharides مرتبطة بالجدران عند تنميتها على n-alkanes . ان العديد من سلالات بكتريا *P. aeruginosa* يمكن ان تنتج عدداً كبيراً من انواع الرامنولبيد اذ انه لغاية عام 1999 تم تحديد 28 تركيب مختلف من الرامنولبيد المتشابهة في مكوناتها . تتأثر انواع الرامنولبيد بعوامل عديدة منها السلالة البكتيرية وظروف الوسط ونوع نظام التخمر اذ يمكن انتاجه بتخمرات مزارع الدفعة الواحدة batch cultures وتخمرات المزارع المستمرة Continouos cultures وباستعمال الخلايا الحرة Free cells والخلايا المقيدة immobilized cells [3;2]

ازدادت الرغبة في العمل على انتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي (المستحلبات الحيوية) ميكروبياً فقد استعملت تلك المواد على نحو متزايد كبديل عن المواد المصنعة كيميائياً وذلك لما لها من مميزات عالية الجودة مثل إنخفاض السمية وقابلية التكسير الحيوي biodegradation ورخص الثمن وصديقة للبيئة إذ تدخل في معالجة المخلفات الصناعية وازالة المواد الضارة [4], كذلك استعمالاتها الواسعة في الصناعات الغذائية والمستحضرات الطبية والصيدلانية وصناعة الزيوت وامكانية عملها في مدى واسع من درجات الحرارة والدوال الحامضية والتركيز الملحي [5].

هناك العديد من العوامل المؤثرة في انتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي مثل المصدر الكاربوني اذ تتمكن العديد من الاحياء المجهرية من تخليق انواع مختلفة من تلك المواد عندما تنمو على مصادر كاربونية مختلفة .

هدفت هذه الدراسة الى البحث عن عزلة محلية من جنس بكتريا *Pseudomonas* ذات كفاءة عالية في انتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي وتحديد الظروف المثلى للانتاج .

2. المواد وطرائق العمل

بعد ان تم عزل 35 عزلة محلية من بكتريا *Pseudomonas* من مصادر متنوعة كالخضروات والفواكه ومشتقات الالبان وانواع الترب وعينات شعر شخصت 29 عزلة منها على انها *Pseudomonas aeruginosa* وتم غربلتها من حيث قدرتها على انتاج مواد النشاط السطحي وتبين ان افضل عزلة كانت P.a. 28 والتي مصدرها تربة بئر نهران عمر النفطي كل ذلك تم في دراسات سابقة . درست الظروف المثلى لانتاج الرامنولبيد من تلك العزلة فقد استخدم في البداية وسط الانتاج الذي اعتمد من قبل [6] والمحور من قبل [7] والمتكون من (غم/لتر) : 0.5 KH_2PO_4 و 1 K_2HPO_4 و 0.1 KCl و 0.5 $MgSO_4.7H_2O$ و 0.008 $FeSO_4.6H_2O$ و 0.05 $CaCl_2.2H_2O$ و 40 مل Sunflower oil و 0.1 Yeast extract و 6 Urea أضيف للوسط 0.05 (مل/لتر) من محلول العناصر النزرة trace elements المتكون من Br % 0.026 , Cu % 0.05 , Mn % 0.05 ,

0.07 % Zn أذيبت المكونات في كمية من الماء المقطر ضبطت الدالة الحامضية على 7.0 .

2-1 تقدير الكتلة الحيوية Estimation of the biomass

قدرت الكتلة الحيوية لكافة العزلات باتباع طريقة حساب الوزن الجاف , اذ تم النبذ المركزي للوسط الزرعي بسرعة 10000 دورة / دقيقة بدرجة حرارة 4 م لمدة 15 دقيقة ، اخذ الراسب الذي يمثل الخلايا البكتيرية وغسل بالماء المقطر واعيد النبذ ثم جفف الراسب على درجة حرارة 100 م لمدة 24 ساعة ثم وزن [8] .

2-2 الكشف عن المواد الحيوية ذات النشاط السطحي Detection for biosurfactant

اتبعت طريقة اختبار انهيار القطرة Drop Collapsing Test للكشف عن وجود المواد الحيوية ذات النشاط السطحي و استعملت صفائح 96-well microtiter plat lid اذ وضع 2 مايكرولتر من زيت معدني mineral oil في الحفر وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة بعدها وضع على سطح الزيت 5 مايكرولتر من الراشح الخالي من الخلايا البكتيرية وترك لمدة دقيقتين ثم فحص شكل قطرة الزيت [9].

2-3 تقدير فعالية الاستحلاب Emulsification test

اتبعت الطريقة المحورة من قبل [7] اذ أضيف 0.5 مللتر من الراشح الخالي من الخلايا البكتيرية إلى أنبوبه تحتوي على 7.5 مل من محلول [20mM Tris HCl (pH7) و $MgSO_4$ 10 mM] و 0.1 من الكيروسين. رجت الأنابيب بشدة لمدة دقيقتين بوساطة المازج Vortex وتركت ساعة واحدة , قيس الامتصاص الضوئي بطول موجي 540 نانومتر . زيادة الامتصاص الضوئي يعبر عن زيادة في فعالية الاستحلاب الناتجة من معدل ثلاث مكررات.

2-4 الكشف عن الرامنوليبد بوساطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Detaction of Rhamnolipid by Thin layer chromatography (TLC)

اتبعت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin layer chromatography باستعمال صفائح هلام السليكا (20×20) سم وبسمك 0.25 ملم المجهزة من شركة Merek لتشخيص الرامنوليبد ، استعمل نظام المذيب المكون من الكلوروفورم : الميثانول : حامض الخليك (2:15:60) (حجم:حجم:حجم) تبعا لطريقة [11] . كما استعملت لتحديد عدد ومواقع البقع وتحديد مكونات المركب .

2-5 تقدير كمية الرامنوليبد Detection of Rhamnolipid quantity

جفف المستخلص الدهني العسلي اللون بعد ان اجري الترسيب الحامضي للوسط الخالي من الخلايا عند دالة حامضية 2 باستعمال حامض HCL 2 عياري ثم اجري الاستخلاص بالمذيبات الكلوروفورم والميثانول (1:2) ثم جفف بوساطة المبخر الدوار على درجة حرارة 60 م لحين ثبات الوزن والحصول على مستخلص دهني عسلي (الرامنوليبد) [12] .

2-6 تعيين الظروف المثلى لانتاج الرامنوليبد Optimum Condition of Rhamnolipid Production

درس تأثير العديد من العوامل لتعيين الظروف المثلى لإنتاج الرامنولبيد من العزلة المحلية P.a. 28 لبكتريا *P. aeruginosa* وكما يلي:

1- مصدر الكاربون Carbon source

استعملت المصادر الكاربونية التالية : زيت زهرة الشمس وزيت الذرة وزيت الزيتون والكليسيرول والهكساديكان والتولوين والكلوكوز والبرافين والمانيتول والنفط الخام وبنسبة 4 مل/100 من وسط الانتاج لمعرفة تثيرها في انتاج الرامنوليبد . لقحت الاوساط بالمزرعة المنشطة بعمر 16 ساعة بنسبة لقاح 1 % وحضنت عند درجة حرارة 30 م في حاضنة هزازة بسرعة 180

دورة/الدقيقة لمدة 72 ساعة ، قدرت بعدها فعالية الاستحلاب لتحديد افضل مصدر كاربوني .

2- مصدر النتروجين Nitrogen source

درس تاثير المصادر النتروجينية التالية :اليوريا ونترات الامونيا ونترات الصوديوم وحامض الكلوتاميك والذرة البيضاء ونخالة الحنطة والشرش وبنسبة 0.6 غم/100 مل من وسط الانتاج ثم اجريت الخطوات السابقة نفسها لاختيار افضل مصدر نتروجيني .

3- تركيز المصدر الكاربوني Concentration of Carbon source

أستعمل المصدر الكاربوني الأفضل بالتراكيز التالية 0 و1 و2 و3 و4 و5 و6 و7 مل/100 مل من وسط الانتاج والمصدر النتروجيني الامثل ثم اكملت الخطوات السابقة نفسها لاختيار افضل تركيز للمصدر الكاربوني للانتاج .

4- تركيز المصدر النتروجيني Concentration of nitrogen source

أستعمل المصدر النتروجيني الأفضل بالتراكيز التالية : 0.0 و0.1 و0.2 و0.3 و0.4 و0.5 و 0.6و0.7 و0.8 و0.9 غم/100 مل من وسط الانتاج والمصدر الكاربوني الامثل ثم اكملت الخطوات السابقة نفسها لاختيار افضل تركيز للمصدر النتروجيني للانتاج

5- درجة الحرارة: Temperature

درس تأثير مدى من الدرجات الحرارية لتحديد أفضل درجة حرارة للإنتاج وشملت 25 و28 و30 و35 و40 و42 و45 و50 °م لقحت الأوساط بالمزرعة المنشطة بعمر16 ساعه وبنسبة لقاح 1 % وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة 180 ختيار افضلها ولمدة 60 ساعة .

6- الدالة الحامضية الابتدائية Initial pH

درس تاثير العديد من الدوال الحامضية في وسط انتاج مواد النشاط السطحي و شملت 4 و5 و6 و7 و8 و9 و10لاختيار افضلها .

7- مدة الحضن Period of Incubation

اختير مدى واسع من فترات الحضن لوسط الانتاج وهو (20 و24 و30 و36 و42 و48 و54 و60 و66 و72) ساعة لانتخاب افضلها.

8- سرعة الاهتزاز shaking speed

اختيرت السرع التالية للحاضنه الهزازة : 100 و120 و150 و180 و200 و220 دورة/الدقيقة لانتخاب افضلها للانتاج .

9- حجم اللقاح volume of Inoculum

درس تاثير عدد من حجوم اللقاح لاختيار أفضل حجم لانتاج الرامنولبيد وكانت 1 و2 و3 و4 و5 و6 و7 مل/100 مل من وسط الانتاج .

3 - النتائج والمناقشة Results and Discussion

3-1 الظروف المثلى لانتاج الرامنولبيد Optimum Conditions for Rhamnolipids Production

1 – المصدر الكاربوني والمصدر النتروجيني

يبين الجدول (1) فعالية الاستحلاب للاستدلال على انتاج الرامنولبيد بوساطة العزلة المحلية P.a.28 باستعمال مصدر كاربوني بنسبة 4 % ومصدر نتروجيني بنسبة 0.6 غم/100 مل وتشير النتائج المستحصل عليها إلى أن أعلى فعالية استحلاب كانت عند استعمال زيت زهرة الشمس كمصدر كاربوني ونخالة الحنطة كمصدر نتروجيني فقد بلغ الامتصاص الضوئي 2.410 على طول موجي 540 نانوميتر يأتي بعدها استعمال زيت زهرة الشمس كمصدر كاربوني مع الشرش كمصدر نتروجيني ثم استعمال زيت زهرة الشمس مع اليوريا. يتبين من النتائج أن أفضل مصدر كاربوني كان زيت زهرة الشمس ومع كافة المصادر النتروجينية وهذا يتفق مع ما توصل إليه [7] و [13] . تبين النتائج بأن المصادر الكاربونية غير الذائبة في الوسط وخاصة الزيوت النباتية قد أعطت نتائجا أعلى من المصادر الكاربونية الذائبة مثل الكلوكوز والمانيتول والدبس وهذا يتفق مع ما توصل

إليه كل من [14] و [15] و [16] ويعود السبب في ذلك إلى استغلال البكتريا للوسط الذائب بسرعة عالية في انتاج الطاقة والكتلة الحيوية وعدم الحاجة إلى إنتاج المركبات المحللة للمصدر الكاربوني أما في حالة الزيوت النباتية فان البكتريا تعمل على انتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي لغرض تحلل المواد الدهنية وجعلها أكثر قطبية وانتاج الاحماض الدهنية التي تدخل في تركيب منتجات الأيض الثانوية وانتاج الطاقة وزيادة مساحة التصاق البكتريا مع الزيوت في الوسط , أما سبب انخفاض الإنتاج باستعمال النفط الخام يعود إلى تعقيد تركيبه ألذي منع البكتريا من تحلله لذلك لم تتمكن البكتريا من إنتاج كمية كافية من تلك المواد . يعود السبب في انخفاض الإنتاج باستعمال الكلوكوز إلى انخفاض الدالة الحامضية للوسط بسبب إنتاج الحوامض مثل حامض البوريك الذي يثبط البكتريا على الانتاج وهذا يتفق مع توصل اليه [17] و [18] .

جدول 1 تاثير المصدر الكاربوني والمصدر النتروجيني في انتاج الرامنوليبد بوساطة العزلة المحلية P.a.28 .

كاربون / نتروجين	الامتصاص الضوئي على طول موجي 540 نانومتر						
	اليوريا	نترات الامونيوم	نترات الصوديوم	حامض الكلوتامك	نخالة الحنطة	الذرة البيضاء	الشرش
زيت زهرة الشمس	2.237	0.125	2.163	1.570	2.410	0.415	2.306
زيت الزيتون	2.035	0.205	1.966	2.029	1.645	0.690	0.807
زيت الذرة	1.577	0.205	1.470	0.255	1.815	0.630	1.189
الكليسيرول	1.130	0.128	0.290	0.361	0.864	0.110	0.114
المانيتول	0.119	0.110	0.033	0.027	0.180	0.085	0.075
الدبس	0.390	0.295	0.349	0.394	0.768	0.080	0.479
المولاس	0.705	0.288	0.329	0.286	0.470	0.301	0.298
الكلوكوز	0.409	0.165	0.222	1.076	0.480	0.174	0.055
زيت البرافين	0.095	0.148	0.032	1.107	0.155	0.040	0.025
النفط الخام	1.066	0.879	0.974	1.060	1.129	0.110	0.833

2 – تركيز المصدر الكاربوني Concentration of carbon source

يشير الجدول (2) إلى استعمال تراكيز مختلفة من زيت زهرة الشمس المنتخب كأفضل مصدر كاربوني وهي (0 و1 و2 و3 و4 و5 و6 و7) % وتركيز ثابت من نخالة الحنطة كمصدر نتروجيني ، ويلاحظ ارتفاع كمية الرامنوليبد المنتجة بزيادة تركيز المصدر الكاربوني والتي صاحبتها زيادة واضحة في الكتلة الحيوية اذ كان التركيز الأمثل 4 % فقد ارتفع الانتاج من أدنى مستوى 0.177 نانومتر عند تركيز 1 % إلى أعلى مستوى إذ بلغ 2.210 نانومتر مقدر كامتصاص ضوئي على طول موجي 540 نانوميتر ثم بدأ بالانخفاض تدريجياً ، كذلك الحال مع الكتلة الحيوية من 0.22 غم/لتر الى 2.52 غم/لتر اما الدالة الحامضية فانها لم تسجل اختلافات كبيرة اذ يبين الجدول ان عدم احتواء الوسط على المصدر الكاربوني لم يسجل اي انخفاض بالدالة الحامضية بل على العكس ارتفعت قيمة الدالة الحامضية مما سبب الانخفاض في الفعالية نتيجة عدم انتاج الرامنوليبد اما بوجود المصدر الكاربوني فان الدالة الحامضية انخفضت الى مدى بين (5.64–5.86) . يعود الانخفاض في النمو والانتاج إلى تأثير التراكيز العالية للزيت في الحالة الفسلجية للخلية او ان التراكيز العالية للمصادر الكاربونية تكون سامة للخلايا البكتيرية مما يؤدي الى تثبيط النمو وانخفاض الانتاج ، فقد وجد [19] ان التراكيز العالية من

الإيثانول تؤدي الى خفض انتاج المواد الحيوية ذات النشاط السطحي .

جدول 2 تاثير تركيز المصدر الكاربوني في انتاج الرامنولبيد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية لوسط الانتاج

زيت زهرة الشمس %	الامتصاص الضوئي 540 نانوميتر	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية النهائية
0	0.177	0.22	7.46
1	1.832	1.77	5.86
2	1.840	1.81	5.75
3	1.938	1.89	5.68
4	2.210	2.52	5.68
5	1.979	2.41	5.64
6	1.966	2.38	5.68
7	1.894	2.21	5.77

3 – تركيز المصدر النتروجيني . The Concentration of nitrogen source

يوضح الجدول(3) حصول زيادة تدريجية في فعالية الاستحلاب التي تعد مؤشراً على زيادة إنتاج الرامنولبيد إذ كانت أقصى فعالية عند تركيز 6 غم/لتر وهي 2.351 نانومتر والتي صاحبها ارتفاع في الكتلة الحيوية من 0.23 غم/لتر عند عدم اضافة النخالة الى 2.02 غم/لتر التي كانت هي الاخرى ترتفع بارتفاع تركيز المصدر النتروجيني والتي ارتفعت قليلا عند تركيز 7 غم/لتر وانخفضت بعدها بارتفاع التركيز متوافقة مع انخفاض فعالية الاستحلاب . اما الدالة الحامضية فقد انخفضت الى 6.52 في المعاملة الخالية من المصدر النتروجيني ويعود هذا الانخفاض البسيط الى استغلال مادة مسخلص الخميرة كمصدر نتروجيني والتي سجلت أقل فعالية نتيجة قلة إنتاج الرامنولبيد بسبب انخفاض الكتلة الحيوية بدات بعدها الدالة الحامضية بالانخفاض الى ان وصلت الى 5.65 والتي سجلت أعلى فعالية استحلاب والتي تمثل أعلى انتاج للرامنولبيد عند تركيز 6 غم/لتر من المصدر النتروجيني . وتفسر الزيادة في الفعالية عند التراكيز المنخفضة من النخالة الى حاجة البكتريا إلى المصدر النتروجيني للحصول على الكتلة الحيوية في طور النمو اللوغارتيمي وان الزيادة في تركيز المصدر النتروجيني يقلل من نسبة N/C والتي تؤدي الى تثبيط انتاج الرامنولبيد ووجد ان تحديد كمية المصدر النتروجيني ونفاذه من الوسط خلال طور الثبوت يؤدي الى زيادة كبيرة بالانتاج وقد توافقت هذه النتائج مع دراسة [6] و [11] .

جدول 3 تاثير تركيز المصدر النتروجيني (نخالة الحنطة) في انتاج الرامنوليبد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية لوسط الانتاج

المصدر النتروجيني (غم/لتر)	الامتصاص الضوئي 540 نانومتر	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية النهائية
0	0.566	0.23	6.52
1	1.188	1.41	6.19
2	2.041	1.62	6.01
3	2.219	1.74	5.86
4	2.230	1.87	5.85
5	2.232	1.99	5.71
6	2.351	2.02	5.65
7	2.290	2.22	5.54
8	2.280	2.05	5.55
9	0.685	1.4	5.54

4- الدالة الحامضية الابتدائية Initial pH

يبين الجدول (4) إن أعلى انتاج للرامنوليبد كان عند الدالة الحامضية الابتدائية 7 وقد بلغ 2.251 نانومتر على الرغم من ان الكتلة الحيوية لم تكن أعلى ما يمكن فقد كانت 3.44 غم /لتر بينما بلغت 3.83 غم/لتر عند الدالة الحامضية 8 وكما هو الحال في الظروف السابقة فان حصيلة انتاج الرامنوليبد كانت موازية للكتلة الحيوية فقد حصل أعلى إنتاج عند الدالة الحامضية 7 ثم انخفض عند الدالة 8 مع استمرار ارتفاع الكتلة الحيوية . اما الدالة الحامضية فانها لم تتغير في المعاملة الاولى التي بدات بعدها بالارتفاع للوصول الى اقصاها عند المعاملة الاخيرة التي كانت 6.22 تطابقت هذه النتائج مع دراسة [7] و [20] اذ اوضحا أن أفضل انتاج للرامنوليبد كان عند دالة حامضية 7 .

جدول 4 تاثير الدالة الحامضية الابتدائية في انتاج الرامنوليبد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية لوسط الانتاج

الدالة الحامضية الابتدائية	الامتصاص الضوئي (540 نانومتر)	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية
4	0.173	1.57	4.89
5	1.262	1.65	4.90
6	1.920	1.92	5.08
7	2.251	3.44	5.62
8	1.68	3.83	5.81
9	1.38	3.5	5.97
10	1.664	0.11	6.22

5 – درجة الحرارة The temperature

يشير الجدول (5) الى أن أفضل درجة حرارة للانتاج الرامنوليبد كانت 30 °م إذ أعطت أعلى فعالية استحلاب فكان الامتصاص الضوئي 2.389 أما الكتلة الحيوية فقد بلغت أقصاها 5.75 غم/لتر عند درجة حرارة 40 °م وكانت الدالة الحامضية 5.68 عند أعلى انتاج . تطابقت هذه النتائج مع ما ذكره [21] الذي أكد على أن الكتلة

الحيوية تنخفض مع ارتفاع درجة الحرارة عن 40 °م وان أقصى إنتاج وأعلى فعالية استحلاب كانت في درجات حرارة تراوحت بين 30-40 °م ، وتطابقت النتائج مع [7] و [22] الذين ذكروا ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الرامنولبيد او المواد الحيوية ذات النشاط السطحي هي 30-34 °م .

جدول 5 تاثير درجة الحرارة في انتاج الرامنولبيد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية لوسط الانتاج

درجة حرارة التخمر (°م)	الامتصاص الضوئي (540 نانومتر)	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية النهائية
25	0.831	3.5	5.49
28	1.275	3.57	5.25
30	2.389	3.64	5.68
35	1.522	5.15	5.75
40	1.107	5.75	5.34
42	0.934	3.63	5.33
45	0.147	1.76	5.33
50	0.113	1.51	7.04

6- مدة التخمر **Fermentation period**

يبين الجدول (7) أن افضل مدة تخمر لانتاج الرامنولبيد كان 60 ساعة وتشير النتائج إلى ارتفاع تدريجي في فعالية الاستحلاب من 0.226 بعد 20 ساعة إلى أن بلغت أقصاها بعد مرور 60 ساعة إذ بلغت 2.231 نانومتر ثم بدات بالانخفاض . رافق هذا الارتفاع زيادة في الكتلة الحيوية فقد بلغت اقصاها بعد مرور 36 ساعة وهي 4.69 غم/لتر ثم بدأت بالانخفاض إلى أن بلغت 3.44 غم/لتر بعد مرور 60 ساعة . ويعود السبب في انخفاض الانتاج بعد مرور 60 ساعة الى انخفاض تركيز المصدرين الكاربوني والنتروجيني وانتاج منتجات ايضية ثانوية اخرى يمكن ان تتداخل مع انتاج الرامنولبيد [23] . اما الدالة الحامضية النهائية فانها انخفضت بشكل مستمر بعد 20 ساعة اذ بلغت 6.4 واستمرت بالانخفاض مع انتهاء مدة التخمر. تطابقت النتائج مع ما توصل له [24] من إن أفضل إنتاج للرامنولبيد من بكتريا *P. aeruginosa* كان بعد مرور 60 ساعة .

جدول 6 تاثير مدة التخمر في انتاج الرامنولبيد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية لوسط الانتاج

مدة التخمر (ساعة)	الامتصاص الضوئي 540 نانومتر	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية النهائية
20	0.226	1.46	6.40
24	0.240	1.53	6.21
30	0.740	2.12	6.00
36	1.039	4.69	5.93
42	1.146	3.72	5.78
48	1.586	3.74	5.75
56	1.896	3.57	5.71
60	2.231	3.44	5.62
66	1.303	2.42	5.48
72	0.963	2.3	5.43

7 – سرعة الحاضنة الهزازة

يبين الجدول (7) ان اقصى فعالية استحلاب بلغت عند السرعة 180 دورة/دقيقة اذ بلغت 2.401 نانومتر ثم بدات بالانخفاض وفي الوقت نفسه لوحظ ارتفاع مستمر للكتلة الحيوية حتى بلغ 4.30 غم/لتر عند السرعة 220 دورة/دقيقة . اما الدالة الحامضية فانها اخذت بالانخفاض الى ادنى مستوياتها عند السرعة 200 دورة/دقيقة واخذت بعدها بالارتفاع . اتفقت النتائج مع [24] اذ بينوا ان افضل سرعة لانتاج الرامنولبيد من بكتريا *P. aeruginosa* كانت عند 180 دورة/دقيقة .

جدول 7 تاثير سرعة الحاضنة الهزازة في انتاج الرامنولبيد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية

سرعة الحاضنة (دورة/دقيقة)	الامتصاص الضوئي 540 نانومتر	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية النهائية
100 rpm	0.882	1.64	6.40
150 rpm	1.730	2.01	6.35
180 rpm	2.401	3.02	5.58
200 rpm	2.193	3.80	5.34
220 rpm	2.045	4.30	5.23

8 – حجم اللقاح Volume of inoculm

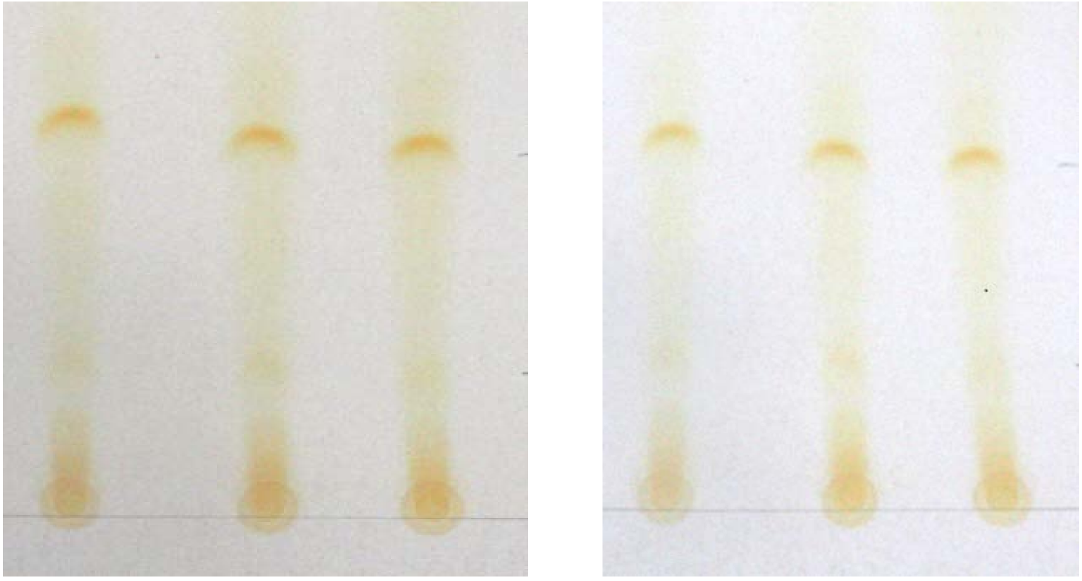
تشير النتائج في الجدول (8) إلى أن أعلى فعالية استحلاب كانت 2.411 نانومتر عندما كان حجم اللقاح 1 % وبلغت الفعالية ادنى مستوياتها عند أعلى نسبة لقاح والتي كانت 1.513 نانومتر عند 7 % ويلاحظ من الجدول انخفاض فعالية الاستحلاب كان ملحوظا عند حجم لقاح 2 % اذ بلغت 1.825 نانومتر ثم بدات بالانخفاض التدريجي . اتفقت النتائج مع نتائج [26,25,23] الذين أكدوا أن 1% هو أفضل حجم لقاح لانتاج أعلى كمية من المواد الحيوية ذات النشاط السطحي .

جدول8 تاثير حجم اللقاح في انتاج الرامنولبيد والكتلة الحيوية والدالة الحامضية النهائية لوسط الانتاج

حجم اللقاح %	الامتصاص الضوئي 540 نانومتر	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الدالة الحامضية النهائية
1	2.411	3.02	5.58
2	1.825	3.33	5.61
3	1.796	4.19	5.61
4	1.749	4.40	5.57
5	1.675	4.80	5.53
6	1.607	4.98	5.53
7	1.513	5.20	5.54

3-2 تشخيص المركب المنتج

شخص المركب باستعمال تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة وقد تبين انه مكون من جزئين الاول دهني والاخر سكري اذ اعطى نتيجة موجبة مع كاشف مولش الخاص بالكشف عن السكريات فقد ظهرت البقع بلون بنفسجي مزرق ، كما ظهرت بلون اخضر مع كاشف 4 – ميثوكسي بنزالديهايد الخاص بالكشف عن الدهون السكرية . ظهرت البقع في موضعين مختلفين باستعمال حامض الكبريتيك كمحلول اظهار وبقيم R_f مساوية الى 0.31 و 0.72 وهي مقاربة لقيم R_f المستحصل عليها من دراسات اخرى باستعمال النظام المذيب نفسه (كلوروفورم : ميثانول : حامض خليك 2:15:65 حجم/حجم/حجم) . اذ كانت قيمة R_f مساوية الى 0.32–0.72 [27] (الشكل1،) .



شكل (1) التنقية الاولية للرامنولبيد المنتج بوساطة العزلة المحلية P.a. 8 لبكتريا *P. aeruginosa*

Referances

المصادر

[1]- Karanth, N.G.K.; Deo, P.G. and Veenanadig, N.K.(1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, **77**: 116–123.

[2]- Chen, S.Y.; Lu, W.B.; Wei, Y.H.; Chen, W.M. and Chang, J.S. (2007). Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnology Progress*, 23(3):661–666.

[3]-Chayabutra, C.; Wu, J. and Ju, L.K. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol Bioeng.*, 72(1):25–33

[4]-Hua, Z.; Chena, J.; Luna, S. and Wang, X. (2003). Influence of biosurfactants produced by *Candida Antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research*, 37(17): 4143–4150

[5]-Soberon-Chavez, G.; Lepine, F. and Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa. Applied Microbiology Biotechnology*, 68:718–725.

[6]-Robert M.; Mercade M.E.; Bosch M.P.; Parra J.L.; Espuny M.J.; Manresa M.A. and Guinea J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, 11(12) : 871-874.

[7]- صيفور ، محمد (2001) . انتاج المستحلبات الحيوية من بكتريا *Pseudomonas* sp. رسالة ماجستير/ كلية العلوم جامعة بغداد.

[8]-Baig, M.A.; Shafiq, K.; Ali, S. and Haq, I. (2003). Effect of urea as aninducer of ß-fructofuranosidase *Saccharomyces* fermentation. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2):106-108.

[9]-Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M. and McInerney, M.J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal Microbiological Methods*,. 56. 339-347.

[10]-Patel, R.M. and Desia, A.G. (1997). Surface active Properties of Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3 . *Journal of Basic Microbialogy*, 37(4):281-286.

[11]-Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U. and Wagner, F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of Pseudomonas species DSM 2874. *Z Naturforsch*., 40(1-2): 61-67.

[12]-Zawawi, R.B.M. (2005). Production of biosurfactant by locally isolated bacteria from petrochemical waste. M Sc. Thesis. Universiti Teknologi Malaysia. 172p

[13]-Haba, E.; Pinazo, A.; Jauregui, O.; Espuny, M.J.; Infante, M.R. and Manresa,A. (2003) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3) : 316-322.

[14]Thaniyavarn, J.; Chongchin, A.; Wanitsuksombut, N.; Thaniyavarn, S.; Pinphanichakarn, P.; Leepipatpiboon, N.; Morikawa, M. and Kanaya, S. (2006). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52:215–222.

[15]-Abouseoud, M.; Maachi, R. and Amrane, A.(2007). Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1(1): 340-347.

[16]-da Rosa, F.C.; Michelon, M.; Burkert, J.F.d.; Kalil, S.J. and Burkert, C.A.V.(2010). Production of a rhamnolipid type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10

grown on glycerol. *African Journal of Biotechnology*, 9(53): 9012-9017.

[17]-Yong, Z.; Jun-jiang, G.; Guo-liang, Z.; Bin, Y.; Wen-jie, Z. and Qin, M.(2007). Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. *Journal of Zheijang University Science, A*. 8(9):1514-1520.

[18]-Muller, M.M.; Hormann, B.; Kugel, M.; Syldatk C. and Hausmann, R. (2011). Evaluatio n of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparis on to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Applied Microbiology Biotechnology*, 89(3) :585 – 592.

[19]-Palejwala, S. and Desai, J.D.(1989). Production of an extracellular emulsifier by a gram negative bacterium. *Biotechnology Letters*, 11(2):115-118.

[20]-Charyulu, E.M. and Gnanamani, A.(2010). Condition stabilization for *Pseudomonas aeruginosa* MTCC5210 to yield high tests for extra cellular Antimicrobial secondary metabolite using response surface methology. *Current research in Bacteriology*, 3(4): 197-213.

[21]-Guerra-Santos, L.H.; Kappeli, O. and Fiechter, A. (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology Biotechnology*, 24(6) : 443-448.

[22]-Neto, D.C.; Meira, J.A.; Tiburtius, E.; Zamora, P.P.; Bugay, C.; Mitchel, D.A. and Krieger N.(2009). Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. *Biotechnology Journal*, 4(5): 748–755.

[23]-Anyanwu and Chukwud, U. (2010). Surface activity of extracellular products of a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated soil. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(2): 225-235.

[24] - صيفور، محمد و اولاد هدار، حورية و عزيز، غازي منعم (2003) انتاج المستحلبات الحيوية من بكتريا *Bacillus licheniformis* و *B. subtilis* ، مجلة علوم المستنصرية ، 14 (1):(71-77) .

[25]-Sotirova, A., Spasova, D. Vasileva-Tonkava, E.and Galabova, D. (2009). Effects of rhamnolipid biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 164(3):297-303.

[26]-Onbasli, D.and Aslim, B.(2009). Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. *Journal of Environmental Biology* , 30(1): 161-163 .

[27]-Arino, S.; Marchal, R. and Vandecasteele, J.P.(1996). Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas species* . *Applied Microbiology Biotechnology*, 45(1-2): 162-168.

Studing Of Optimal Conditions For Production Of Biosurfactant (Rhamnolipid) By The Local Isolate P.a. 28 of *Pseudomonas aeruginosa*

Amal K. Ghadban Wael A. swadi* Geyath H.Majeed

Dep. Food Science / College of Agriculture / Basrah University

Abstract

Thirty five isolates of *Pseudomonas* were isolated from different sources, only 29 isolates were identified as *P. aeruginosa*, the ability of isolates were tested for production of biosurfactant (Rhamnolipid) using sunflower oil as carbon source and wheat bran as nitrogen source. The isolates P.a. 28 which was isolated of petroleum well of Nehran Omer was selected for its high production of biosurfactant.

The optimal conditions for the production of rahmnolipid by the local isolate P.a. 28 were studied which represented by a media consist of 4% sunflower oil as a carbon source, 0.6 % wheat bran as a nitrogen source with pH 7 ,1% volume of inoculum and the incubation temperature was 30 ° C using shaking incubator at 180 rpm for 60 hours . The maximum production of rhamnolipid was (28.9 g/l). Rhamnolipid was identified by using thin-layer chromatography, The results observed that this isolate prodused two kinds of monorhmnolipid and dirhamnolipid.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Rhamnolipid, Production, optimal Condition.