

دراسة الظروف المثلى لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات من عزلة محلية لبكتريا *Bacillus cereus* B₅

شيماء ذياب جدوع السهلاني

آمال كاظم غضبان الاسدي

قسم علوم الاغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة - البصرة / العراق

E-mail: alsahlany.shayma@gmail.com

الخلاصة

تبين أن أعلى ناتج من متعدد هيدروكسي البيوترات PHB من بكتريا *Bacillus cereus* B₅ كان ٦.٢ غم PHB \ لتر وكتلة حيوية بمقدارها ٨.٤ غم \ لتر وبلغت النسبة المئوية لحاصله 73.8 %. باستعمال أفضل ظروف التنمية لإنتاج لمتعدد هيدروكسي البيوترات PHB التي تضمنت درجة حرارة ٣٥ م° ومدة حضن ٤٨ مع التهوية باستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة \ دقيقة ساعة وحجم لقاح ٢% ودالة حامضية ٧ ووسط الإنتاج المستعمل أحتوى على ١% كلوكوز كمصدر كاربوني والبيبتون 0.25 % كمصدر نيتروجيني .

الكلمات المفتاحية : متعدد هيدروكسي البيوترات ، الظروف المثلى ، بكتريا *Bacillus cereus***Study of optimum conditions for Polyhydroxybutyrate production from local isolate of *Bacillus cereus* B₅**

Shayma Thyab Gddoa Al-Sahlany

Amal Kadhim Al-Asady

Food Science Department . Agriculture College . Basrah University . Basra / Iraq

Abstract:

The highest Polyhydroxybutyrate (PHB) production from *Bacillus cereus* B₅ were 6.2 g / L, biomass 8.4 g / L and 73.8% the yield by the using optimum conditions, incubation temperature 35° C, for 48 hours aerobically by using shaking incubator on 150 rpm / min , 2% inoculum volume, the pH value was 7, and the production media was content 1% glucose as carbon source and 0.25 % peptone as nitrogen source.

Keywords: pHB, optimum conditions, *Bacillus cereus*.**المقدمة :**

(Lee,1996). يعد متعدد هيدروكسي البيوترات (PHB) Polyhydroxybutyrate من أبرز عناصر هذه المجموعة فهو يمتلك خصائصاً ميكانيكية مشابهة لخصائص متعدد البروبيلين بالإضافة لكونه قابلاً للتحلل وغير سام ويمكن إنتاجه من مصادر كاربونية رخيصة الثمن (Aswini et al., 2014).

ذكر Lee(1996) أن PHB بوليمر متجانس يتكون من أحماض دهنية أليفاتية تحتوي مجاميع من الهيدروكسيل ، درجة انصهاره هي ١٧٩ م° ودرجة تبلوره ٨٠%، يبدأ بالذوبان في درجة حرارة أعلى من ٥٠ م° ويشبه خواص متعدد البروبيلين Polypropylene و متعدد الأثيلين Polyethylene في إمكانية معالجته بالحرارة ومقاومته

تنتج البوليمرات الحيوية من مواد طبيعية متجددة renewable natural materials نتيجة نمو الأحياء المجهرية عليها وإن العديد من الأحياء المجهرية قادرة على إنتاج بوليمرات قابلة للتحلل في الطبيعة منها بعض الطحالب والخمائر والبكتريا ، إذ تنتج أنواعاً مختلفة من هذه البوليمرات منها متعدد هيدروكسي الالكانات (PHA) Polyhydroxyalkanoates والتي تتجمع في الخلايا كمصدر للطاقة والكاربون ويزداد تجمعها عند حدوث نقص المغذيات في وسط النمو ويكون النيتروجين المتاح قليلاً

٢- أجري النبذ المركزي بسرعة ٥٠٠٠ دورة ١ دقيقة لمدة ١٥ دقيقة تم التخلص من الراشح وأخذ الراسب (الكتلة الحيوية) وغسل بالماء المقطر ثم غسل بمزيج (اسيتون: إيثانول) بنسبة (١:١).

٣- أضيف ٣ مل من محلول Sodium hypochlorite تركيزه ١٢% ثم أضيف ٣ مل من مذيب الكلوروفورم بعدها تم الحضان عند درجة حرارة ٣٧ م ولمدة ساعتين .

٤- أجري النبذ المركزي مرة أخرى بسرعة ٥٠٠٠ دورة ١ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة، أذ ظهرت ثلاثة أطوار في أنبوبة الاختبار وهي الطور السفلي يحتوي على PHB المذاب في الكلوروفورم والطور الوسطي يحتوي على مكونات الخلية عدا PHB والطور العلوي يحتوي على محلول Sodium hypochlorite. تم التخلص من الطور العلوي باستعمال ماصة باستور ثم رشح الطوران الوسطي والسفلي بورقة ترشيح Whatman 1. الراشح الناتج يحتوي على متعدد هيدروكسي البيوترات PHB مذاب بالكلوروفورم تم التخلص من المذيب باستعمال الفرن على درجة حرارة ٦٠ م إذ تم الحصول على PHB .

٥- يضاف ١٠ مل من حامض الكبريتيك تركيزه ٩٨% الى PHB الناتج من العزلات البكتيرية ويوضع في حمام مائي عند درجة ١٠٠ م ولمدة ١٠ دقائق ليتحول PHB الى Crotonic acid بعدها يقرأ الامتصاص الضوئي باستعمال UV-spectrophotometer عند طول موجي ٢٣٥ نانومتر ويتم حساب كمية PHB الناتجة من خلال المنحنى القياسي معادلة خطه المستقيم $y=24.984x$ (Soam et al., 2012; Law and Slepecky, 1961).

الظروف المثلى لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات

١- درجة حرارة المثلى: استعملت عدة درجات حرارة لإنتاج PHB من وسط الانتاج وهي (45,40,37,35,32,25) م للحصول على أفضل درجة حرارة لإنتاج PHB عند دالة حامضية ٧ وحجم لقاح ١% ومدة حضان ٤٨ ساعة وبحاضنة هزازة سرعتها ١٢٠ دورة ١ دقيقة وتم حسبت كمية PHB الناتج .

٢- حجم اللقاح الأمثل: لمعرفة أفضل حجم لقاح بكتيري استعمل (10, 5, 2,1,0.5) مل من المزرعة البكتيرية المنشطة لبكتريا B.cereus لكل ١٠٠ مل من وسط الانتاج وللحصول على أفضل حجم لقاح عند دالة حامضية ٧ ودرجة حضان ٣٢ م ومدة حضان ٤٨ ساعة وبحاضنة هزازة سرعتها ١٢٠ دورة ١ دقيقة وحسبت كمية PHB الناتج.

للماء ١٠٠%. قدر إنتاج PHB من بكتريا B.subtilis ATCC 6633 وتحت ظروف مختلفة باستعمال المطياف الضوئي عند طول موجي ٢٣٥ نانومتر وظهرت النتائج أن أعلى إنتاج له كان بعد ٢٤ ساعة وعند دالة حامضية ٧ ودرجة حرارة ٣٠ م فقد بلغ 10.4981 ملغم ١ مل كما وجد أن المانيتول و الكلايسين أفضل المصادر الكربونية والنيتروجينية إذ بلغ الإنتاج PHB 23.6623 ملغم ١ مل و 14.6217 ملغم ١ مل على التوالي Tamdogan and Sidal, (2011) . يمكن (Narayanan and Ramana 2012) من إنتاج PHB من بكتريا B.mycoides DFCl المعزولة من تربة الحقائق وذلك بتنميتها في وسط Glucose-peptone broth ودرس تأثير نسب الكلوكوز والبيتون والدالة الحامضية في نمو الخلايا وإنتاج PHB وتكوين السبورات ولاحظ أن 17.34 غم ١ لتر كلوكوز و 7.03 غم ١ لتر بيتون ودالة حامضية 7.3 قد اعطت أعلى وزن للخلايا الجافة والذي بلغ 4.35 غم ١ لتر و PHB 3.32 غم ١ لتر وبحصيلة 76.32 % (وزن ١ وزن) بينما تكوين السبورات كان ضئيلاً جداً بعد الحضان لمدة ٧٢ ساعة. وجاءت هذه الدراسة إلى إيجاد افضل ظروف التنمية لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات PHB من عزلة بكتيرية محلية.

المواد وطرائق العمل

العزلة البكتيرية : تم الحصول على عزلة بكتيرية تعود لبكتريا B5 Bacillus cereus من قسم علوم الأغذية ١ كلية الزراعة ١ جامعة البصرة معزولة محليا من ثمار التفاح الموجود في أسواق مدينة البصرة

وسط إنتاج PHB: حضر الوسط بإذابة 10 غم كلوكوز و 2.5 غم مستخلص الخميرة و 0.5 غم KH_2PO_4 و 0.2 غم $MgSO_4.7H_2O$ و 0.1 غم NaCl في لتر، عدلت الدالة الحامضية إلى 7 (Aly et al., 2013)

إنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات واستخلاصه بطريقة

Sodium hypochlorite –Chloroform

١- لقح ١٠٠ مل من وسط إنتاج PHB الموجود في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل بالمزرعة البكتيرية المنشطة في وسط Nutrient broth المجهد من شركة Salucea الهولندية ، وضعت الدوايق في حاضنة هزازة بسرعة ١٢٠ دورة ١ دقيقة وبدرجة حرارة ٣٢ م ولمدة ٤٨ ساعة.

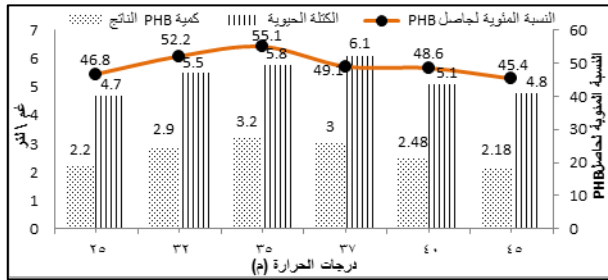
النتائج والمناقشة

تأثير الظروف المثلى في إنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات

PHB

1-درجة الحرارة

يوضح الشكل (1) تأثير درجة حرارة الحضانة في كمية PHB الناتجة ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة من العزلة البكتيرية *Bacillus cereus* B5 وكان ناتج PHB (2.2، 2.9، 3.2، 3، 2.48، 2.18) غم ١ لتر لدرجات الحرارة (25، 32، 35، 37، 40، 45) م على التوالي. وبلغ مقدار الكتلة الحيوية عند درجة حرارة 35 م 5.8 لتر وكانت النسبة المئوية لـ PHB 55.1%، وأعطت العزلة B5 أعلى كتلة حيوية عند درجة حرارة 37 م وبلغت 6.1 غم ١ لتر وكانت نسبة حاصل PHB عند هذه الدرجة 49.1% . وقد تكون درجة حرارة 35 م هي الدرجة الملائمة للأنزيمات التي تدخل في تفاعلات تكوين PHB في العزلة البكتيرية B5.



شكل (1) تأثير درجة حرارة الحضانة في كمية متعدد هيدروكسي البيوترات الناتج ومقدار الكتلة الحيوية والنسبة المئوية لـ PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5

بينت العديد من الدراسات تأثير درجة حرارة الحضانة في تكوين الكتلة الحيوية وإنتاج PHB، فقد وجد (Nisha, 2011) أن أفضل درجة حرارة لإنتاج PHB من بكتريا *B. sphareicus* كانت 30-35 م. بينما بين (Singh et al., 2013) أن نقصان إنتاج PHB عند ارتفاع درجات الحرارة قد يكون بسبب قلة نشاط انزيم PHB polymerase. واتفقت النتائج مع نتائج Bhuwal et al. (2014) إذ ذكر أن أفضل درجة حرارة لإنتاج PHB من *Bacillus* كانت 35 م وبلغ الإنتاج 4.274 غم ١ لتر بعد 72 ساعة من النمو كما وجد أن ارتفاع درجة الحرارة الحضانة أكثر من 35 م يؤثر

3-الدالة الحامضية الابتدائية المثلى: أستخدم وسط الإنتاج بدالات حامضية مختلفة هي (5, 6, 7, 8, 9) لإيجاد أفضل دالة حامضية للإنتاج عند درجة حضانة 32 م وحجم لقاح 1% ومدة حضانة 48 ساعة وبحاضنة هزازة سرعتها 120 دورة ١ دقيقة وحسبت كمية PHB الناتج .

4- مدة التخمر المثلى: درست مدد زمنية مختلفة لتخمير وسط إنتاج بوليمر PHB وهي (24, 48, 72, 96, 120) ساعة من النمو للحصول على أفضل مدة تخمير عند دالة حامضية 7 ودرجة حرارة حضانة 32 م وحجم لقاح 1% وبحاضنة هزازة سرعتها 120 دورة ١ دقيقة وحسبت كمية PHB .

5-سرعة الاهتزاز المثلى: حضان وسط إنتاج بوليمر PHB بحاضنة هزازة ويسرع اهتزاز مختلفة هي (80, 100, 120, 150, 170, 200) دورة ١ دقيقة مع وجود عينة للمقارنة في حاضنة ساكنة وثبتت بقية ظروف الإنتاج لإيجاد أفضل سرعة اهتزاز عند الحضان .

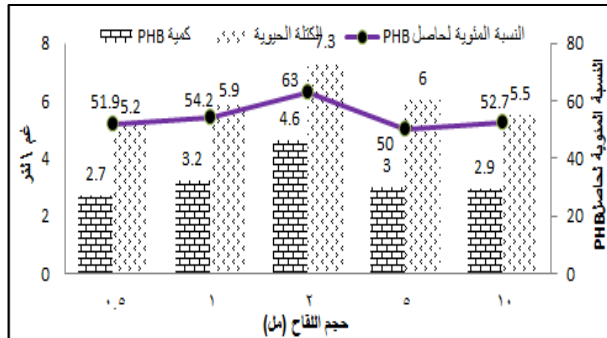
6-المصدر كاربوني الأمثل: استعملت عدة أنواع من الكربوهيدرات لاستبدال سكر الكلوكوز في وسط الإنتاج والذي نسبته 1% ومن هذه الكربوهيدرات (الفركتوز ، كالاكتوز، المانوز ، المالتوز ، السكرز ، النشا) وثبتت بقية الظروف من أجل الحصول على أفضل مصدر كاربوني لإنتاج PHB .

7-المصدر النتروجيني الأمثل: استعملت المصادر النيتروجينية التالية (بيتون، تريبتون، كبريتات الامونيوم، كلوريد الامونيوم، Casamino acids) لاستبدال المصدر النيتروجيني (مستخلص الخميرة) الموجود في وسط الإنتاج وإيجاد أفضل مصدر نيتروجيني مع تثبيت بقية ظروف الإنتاج الأخرى. جمعت الظروف المثلى المتحصل عليها من خلال الدراسة الحالية وطبقت لأجل الحصول على أفضل ناتج من متعدد هيدروكسي البيوترات من عزلة محلية.

تقدير الكتلة الحيوية: بعد انتهاء مدة الحضان فصلت الخلايا عن الراشح باستعمال النبذ المركزي ويسرعة 5000 دورة ١ دقيقة لمدة 20 دقيقة وأخذ الراسب وغسل بالماء المقطر مرتين قبل التجفيف ثم جففت بالفرن عند 55 م ولمدة 12 ساعة ثم وزنت لتقدير الكتلة الحيوية حسب المعادلة التالية (Salakkam, 2012) .

وزن الخلايا الجافة = (وزن الكتلة بعد التجفيف مع الانبوبة - وزن

الانبوبة) × 100



شكل (2) تأثير حجم اللقاح البكتيري في كمية متعدد هيدروكسي البيوترات المنتج ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة من والنسبة المئوية لحاصل PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5

٣- الدالة الحامضية الابتدائية

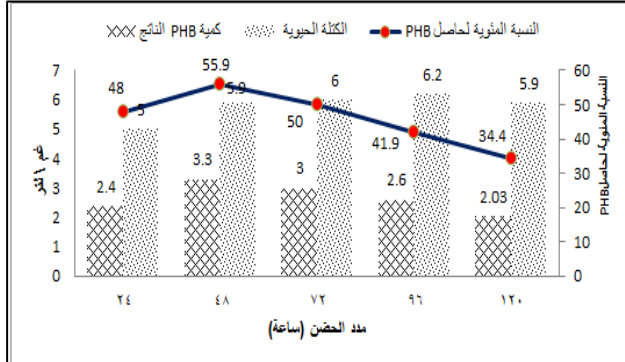
يبين الشكل (3) تأثير استعمال دوال حامضية مختلفة في مقدار PHB الناتج والكتلة الحيوية المتكونة من العزلة المحلية B5 ، إذ بلغ انتاج PHB (2.5 ، 2.91 ، 3.1 ، 2.6 ، 2.2) غم / لتر للدوال الحامضية (٥ ، ٦ ، ٧ ، ٨ ، ٩) على التوالي . وظهرت أعلى كمية للكتلة الحيوية عند الدالة الحامضية ٧ إذ بلغت ٦ غم / لتر وأقل كتلة حيوية عند الدالة الحامضية ٩ وكانت 4.7 غم / لتر بينما كانت أعلى نسبة مئوية لحاصل PHB عند الدالة الحامضية ٧ وهي 51.6 % . وقد يعود السبب في التأثير الكبير للدوال الحامضية في إنتاج PHB إلى الدور الذي تلعبه في أتاحته التوافر الحيوي لبعض العناصر النادرة في وسط الانتاج والتي تحتاجها البكتريا للنمو والإنتاج (Grothea et al., 1999). واتفقت هذه النتائج مع نتائج دراسة (Nisha (2011 إذ وجد أن أفضل دالة حامضية ابتدائية لإنتاج PHB من بكتريا *B.sphareicus* هو ٧ وبلغ 1.82 غم / لتر وأن الدالة الحامضية القاعدية تؤدي إلى خفض الإنتاج وتقلل من كمية الكتلة الحيوية المتكونة. ذكر (Flora et al. (2010 أن أعلى نسبة مئوية لحاصل PHB المنتج من بكتريا *B.sphareicus* كانت 25% تم الحصول عليها عند استعمال دالة حامضية من 6.5-7.5 وبين أن الدوال الحامضية المرتفعة تؤدي إلى خفض نسبة تجمع PHB داخل الخلايا ويصبح معدل استهلاك PHB يساوي تقريباً معدل تكوين PHB داخل الخلية. بين (Aly et al. (2013 أن أفضل دالة حامضية لإنتاج PHB من عزلة محلية لبكتريا *B.cereus* كان ٧ بعد مدة حضن ٤٨ ساعة وبلغت النسبة المئوية لحاصل PHB ٥٨ % .

سلبياً في إنتاج PHB. واختلفت النتائج مع (Nair et al. (2008 إذ بين أن أفضل درجة حرارة حضن كانت ٤٠م° عند إنتاج PHB من بكتريا *B.cereus* SKC وكانت نسبة الحاصل ٣٠ % .

٢- حجم اللقاح

أظهرت النتائج أن أفضل حجم لقاح بكتيري لإنتاج PHB من العزلة B5 كان ٢ % (92 × 910 وحدة تكوين مستعمرة / مل) من وسط الإنتاج وبلغ ناتج PHB 4.6 غم / لتر وكانت كمية الكتلة الحيوية 7.3 غم / لتر بينما نسبة المئوية للحاصل بلغت ٦٣ % بينما كان مقدار PHB الناتج من أحجام اللقاح (0.5 ، 1 ، ٥ ، 10) % من وسط الإنتاج (2.7 ، 3.2 ، ٣ ، 2.9) غم / لتر على التوالي (شكل 2). انخفاض حجم اللقاح يتطلب وقتاً أطول لنمو الخلايا وإنتاج المنتج المطلوب والكميات القليلة من اللقاح البكتيري تحتوي أعداد قليلة من البكتريا ويكون افراز الانزيمات المطلوبة للإنتاج قليل، أما الكميات الكبيرة من حجم اللقاح يسبب في استهلاك الاوكسجين وتناقص المواد المغذية من وسط الانتاج بسرعة كبيرة ولا يتيح الفرصة لإنتاج المادة المطلوبة . واتفقت النتائج مع ما ذكره Nisha (2011) بأن أفضل حجم لقاح لإنتاج PHB كان ٢% من بكتريا *B.sphareicus* وبلغ إنتاج PHB 1.63 غم / لتر بينما كان مقدار الكتلة الحيوية 3.5 غم / لتر، كما وجد أن زيادة حجم اللقاح أكثر من ٢% أدى إلى انخفاض في كمية الكتلة الحيوية المتكونة. في حين بين (Aly et al. (2013 أن حجم لقاح ٢% من بكتريا *B.cereus* أعطى أعلى نسبة حاصل من PHB بلغت 43 % . واختلفت النتائج مع ما وجدته (Kulpreecha et al. (2009 بأن أفضل حجم لقاح من بكتريا *B.megaterium* كان 4 % إذ أعطى أعلى نسبة من حاصل PHB بلغت ٤٣ %، كما ذكر Hamieh et al. (2013 أن حجم اللقاح ٣ مل / ١٠٠ مل من وسط الانتاج أعطى أعلى كمية إنتاج من PHB بلغت 0.367 غم / ١٠٠ مل من وسط الإنتاج وباستعمال بكتريا *B.thuringiensis* في حين كانت أقل كمية إنتاج عند استعمال حجم اللقاح ٧ مل / ١٠٠ مل من وسط الانتاج بلغ الناتج 0.139 غم / ١٠٠ مل .

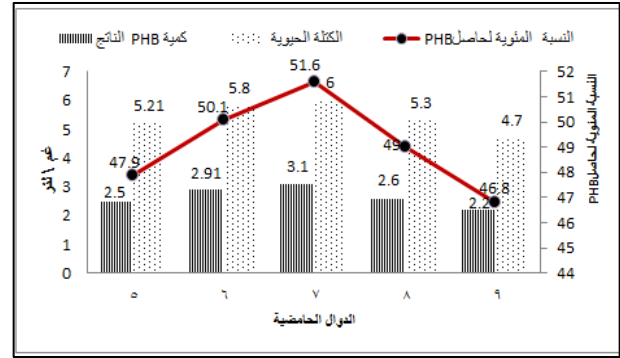
وبلغت نسبة حاصله 83.78 % وبعد ٤٨ ساعة حصل انخفاض في إنتاج PHB وازدادت لزوجة الوسط بسبب إنتاج السبورات وقلة المصادر الكربونية والنيتروجينية لذا تلجا البكتريا الى استهلاك PHB



شكل (4) تأثير مدة الحضانة في كمية متعدد هيدروكسي البيوترات الناتج ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة والنسبة المئوية لحاصل PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5

٥- سرعة اهتزاز الحاضنة

أظهر الشكل (5) تأثير سرعة اهتزاز الحضانة في إنتاج PHB من العزلة المحلية *B. cereus* B5 وكان أعلى إنتاج لبوليمر PHB عند سرعة اهتزاز ١٥٠ دورة ١ دقيقة أذ بلغ 4.8 غم ١ لتر وكان مقدار الكتلة الحيوية المتكونة 8.1 غم ١ لتر في حين كان إنتاج PHB في سرع الاهتزاز (٨٠، ١٠٠، ١٢٠، ١٧٠، ٢٠٠) دورة ١ دقيقة (2.5، 2.95، 3.35، 4، 3.71 غم ١ لتر على التوالي. وانخفض مقدار الكتلة الحيوية بزيادة سرعة الاهتزاز عن ١٥٠ دورة ١ دقيقة إذ بلغت (7.5 و ٧) غم ١ لتر لسرعة الاهتزاز (١٧٠، ٢٠٠) دورة ١ دقيقة على التوالي. بينما كان إنتاج PHB في الحاضنة الساكنة 1.6 غم ١ لتر والكتلة الحيوية المتكونة بلغت 3.2 غم ١ لتر. وتحدد سرعة الاهتزاز نمو السلالات البكتيرية وفعاليتها في إنتاج PHB ويعتقد أن سرعة الاهتزاز يمنع تكاثر الخلايا ويساعد في انتشار الخلايا والاستفادة من العناصر المعدنية المتوفرة في وسط النمو.

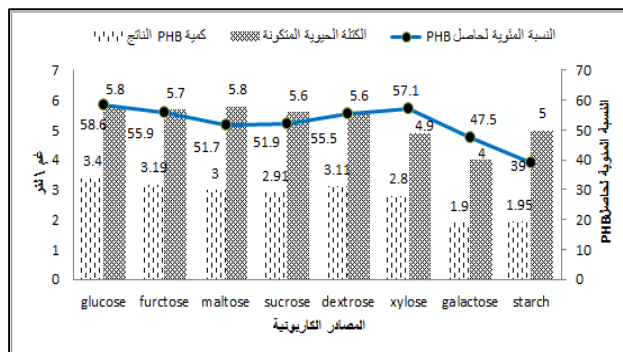


شكل (3) تأثير الدوال الحاضنة في كمية متعدد هيدروكسي البيوترات المنتج ومقدار الكتلة الحيوية والنسبة المئوية لحاصل PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5

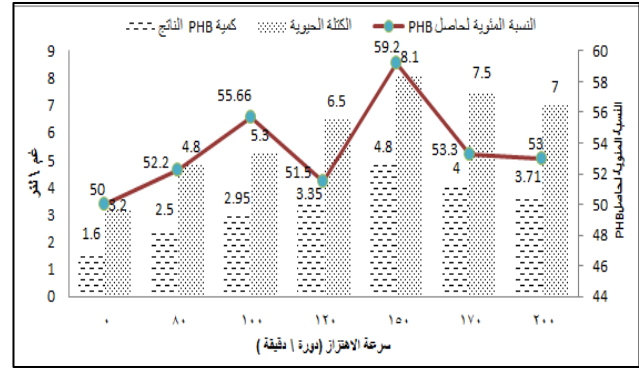
4 - مدة حضانة

أظهرت النتائج أن أفضل مدة حضانة لإنتاج PHB كانت ٤٨ ساعة وبلغ 3.3 غم ١ لتر ووزن الخلايا الجافة 5.9 غم ١ لتر وبلغت النسبة المئوية لحاصل PHB 55.9 %، بينما بلغ الإنتاج في مدة الحضانة (٢٤، ٧٢، ٩٦، ١٢٠) ساعة (2.4، 3، 2.6، 2.03 غم ١ لتر على التوالي (شكل 4). وقد يعود السبب في انخفاض كمية PHB الناتج بتقدم مدة الحضانة إلى استهلاكه من قبل البكتريا في تكوين السبورات نتيجة الوصول إلى طور الهلاك ونفاذ مواد المغذية من وسط الإنتاج. واتفقت هذه النتيجة مع (Nisha (2011 إذ وجد أن أفضل مدة حضانة لإنتاج PHB من بكتريا *B. sphaericus* كانت ٤٨ ساعة وبلغت النسبة المئوية لحاصل PHB ٤٤ % وتناقص الإنتاج بعد زيادة مدة الحضانة أكثر من ٤٨ ساعة. أشار (Benoit (1990 ; Nam and Ray (1985) عند إنتاج PHB من بكتريا *Bacillus* يجب تحديد مدة الحضانة المثلى بسبب أن بكتريا *Bacillus* في مرحلة تكوين السبورات تستهلك PHB المتكون في خلاياها، غالباً ما تبدأ مرحلة تكوين السبورات في نهاية طور الثبات وفي هذه المرحلة تحتاج البكتريا إلى المغذيات من أجل تكوين السبورات وبالتالي تضطر إلى استهلاك PHB في حالة نفاذ المغذيات. كما وجد (Yüksekdağ et al. (2004 أن بعد ٧٢ ساعة من مدة الحضانة حصل انخفاض في كمية PHB الناتج بسبب نقص المغذيات وزيادة في الفعاليات الأيضية والتي لها تأثير سلبي في إنتاج PHB. بين (Prasanna et al. (2011 أن أفضل مدة حضانة لإنتاج PHB من بكتريا *B. megaterium* كانت ٤٨ ساعة

5.8 غم ١ لتر. وكانت النسبة المئوية لحاصل PHB 58.6 % .
 ويعد الكلوكون والفركتوز من السكريات الاحادية البسيطة التي
 تستطيع البكتريا استعمالها بسهولة في النمو وإنتاج نواتجها
 الايضية ومنها PHB هذه النتائج توافقت مع (Shah 2014) إذ
 استعمل ٤ مصادر كاربونية هي الكلوكون والفركتوز والسكرورز
 والمالتوز لإنتاج PHB من *B.subtilis* G151 ووجد ان
 الكلوكون والفركتوز أعطت أعلى إنتاج من PHB بلغ (0.02 ،
 0.018) غم ١ لتر على التوالي، اما السكرورز والمالتوز أعطت
 إنتاجية منخفضة لكونها سكريات ثنائية اصعب تحلاً واستهلاكاً
 من السكريات الاحادية بالنسبة لبكتريا. بين Shekharaiyah
 (2005) أن أفضل مصدر كاربوني لإنتاج PHB من *Bacillus*
spp. كان الكلوكون بتركيز ١ % وبلغ إنتاج PHB 0.4 غم ١ لتر
 بينما السكريات الثنائية مثل المالتوز والسكرورز المتعددة مثل
 السيليلوز أعطت ناتج منخفض من PHB وقد يعود السبب إلى
 عدم امتلاك العزلة الانزيمات المحللة لهذه السكريات. وجد
 (Kumar et al. 2009) أن أفضل مصدر كاربوني لإنتاج
 PHB من بكتريا *B.cereus* EG444 هو الكلوكون إذ أعطى
 أعلى نسبة حاصل بلغت ٦٧ % مقارنة مع السكريات الأخرى
 المستعملة في الدراسة. بينما ذكر (Nair et al. 2008) ان تنميت
 بكتريا *B.cereus* SKC على مصادر كاربونية مختلفة بينت أن
 الكلوكون كان أفضلها لإنتاج PHB وبلغت النسبة المئوية لحاصله
 ١٨ % . لاحظ (Pradhan 2014) أن المالتوز كان أفضل
 المصادر الكاربونية لإنتاج PHB من بكتريا *B.cereus* SEI
 وبلغ PHB الناتج 5.63 غم ١ لتر بينما كان الدكستروز اقل
 المصادر الكاربونية لإنتاج PHB وأعطى ناتج مقداره 0.4 غم ١
 لتر.



شكل (6) تأثير المصادر الكاربونية المختلفة في كمية متعدد
 هيدروكسي البيوتيرات المنتج ومقدار الكتلة الحيوية والنسبة المئوية
 لحاصل PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5



شكل (5) تأثير سرعة اهتزاز الحاضنة في كمية متعدد هيدروكسي
 البيوتيرات الناتج ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة والنسبة المئوية لحاصل
 PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5

وهذه النتائج تطابقت مع ما ذكره (Wei et al. 2011) بأن
 أفضل معدل اهتزاز للحاضنة عند إنتاج PHB يجب أن يكون بين
 150-200 دورة ١ دقيقة وزيادة السرعة عن ٢٠٠ دورة ١ دقيقة
 يؤثر سلبياً. كما بين (Berekaa and Al Thawadi 2012)
 أن أفضل سرعة اهتزاز للحاضنة عند إنتاج PHB من
B.megaterium كانت 150 دورة ١ دقيقة. وجد (Flora et
 al. 2010) أن أعلى نسبة مئوية لحاصل PHB كانت ٨٣ % عند
 سرعة اهتزاز ٢٠٠ دورة ١ دقيقة بينما كانت نسبة الحاصل ٦٣ %
 عند سرعة اهتزاز ١٥٠ دورة ١ دقيقة وباستعمال انواع من بكتريا
Bacillus في حين اختلفت النتائج مع ما وجده (Ghate et al.
 2011) بأن أفضل سرعة اهتزاز كانت 170 دورة ١ دقيقة وبلغ
 إنتاج PHB 0.284 غم ١ لتر من بكتريا *B.subtilis* ، كما أشار
 (Aly et al. 2013) أن أفضل سرعة اهتزاز لإنتاج PHB من
 بكتريا *B.cereus* كان ١٢٠ دورة ١ دقيقة وبلغت نسبة حاصل
 PHB ٤٣ % .

٦- المصدر الكاربوني

يوضح الشكل (6) تأثير استعمال المصادر الكاربونية
 المتنوعة في إنتاج PHB من العزلة المحلية B5 فقد أعطى
 الكلوكون أعلى إنتاج من PHB بلغ 3.4 غم ١ لتر وكان ناتج
 الفركتوز 3.19 غم ١ لتر وجاءت كميات PHB المنتجة من
 المصادر الكاربونية المالتوز والسكرورز والدكستروز والزايلوز
 والكلكتوز والنشأ (3 ، 2.91 ، 3.11 ، 2.8 ، 1.9 ، 1.95) غم
 ١ لتر على التوالي، وكانت الكتلة الحيوية المتكونة بوجود الكلوكون

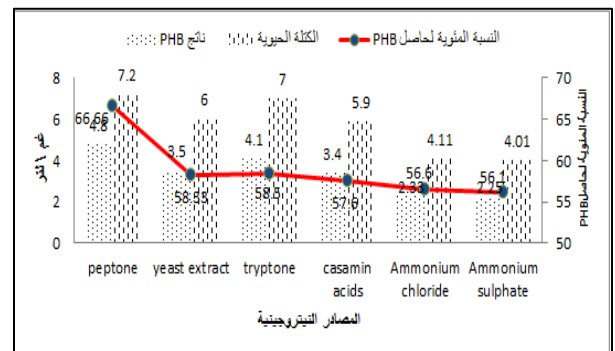
وجاءت النتائج متوافقة مع (Aarthi and Ramana (2011) أذ وجد أن الببتون أفضل مصدر نيتروجيني أستعمله في إنتاج PHB من بكتريا *B.mycoides* كما بين ان المصادر النيتروجينية تزيد من نمو الخلايا وتجمع حبيبات PHB فيها. ذكر (Singh (2011) أن الببتون بتركيز ١ % كان أفضل المصادر النيتروجينية لإنتاج PHB من أنواع عائدة لبكتريا *Bacillus* وبلغ إنتاج PHB 5.423 غم ١ لتر والنسبة المئوية لحاصل 71.5 % بينما كان ناتج PHB من المصدر النيتروجيني غير العضوي فوسفات الامونيوم $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4.914 غم ١ لتر. واختلفت النتائج مع Borah et al. (2002) أذ وجد أن أفضل مصدر نيتروجيني هو beef extract أذ أعطى أعلى نسبة حاصل من PHB بلغت 81.6 % باستعمال بكتريا *B.mycoides* ، جمعت أفضل الظروف المثلى المتحصل عليها من خلال التجارب السابقة وطبقت في تجربة مستقلة للحصول على أعلى إنتاج من PHB أذ بلغ 6.2 غم ١ لتر بينما كانت الكتلة الحيوية المتكونة 8.4 غم ١ لتر وكانت النسبة المئوية لحاصل PHB 73.8 %.

المصادر

- Aarthi, N. and Ramana, K.V. (2011) Identification and Characterization of Polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. International Journal of Environmental Sciences, 1(5): 744-756.
- Aly, M.M.; Albureikan, M.O.; El Rabey, H. and Kabia, S.A. (2013) Effects of culture conditions on growth and Poly-β-hydroxybutyric acid by *Bacillus cereus* MM7 isolated from soil samples from Saudi Arabia. Life Science Journal, 10(4): 1884-1891.
- Aswini, P.; Kavitha, P.; Revathy, A.R. and Babujanathanam, R. (2014) Poly β hydroxy butyrate (PHB) biosynthesis in *Bacillus*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 28(1):8-11.
- Benoit, T.G.; Wilson, G.R. and Baygh, C.L. (1990) Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, Letters in Applied Microbiology, 10:15-18.

٧- المصدر النيتروجيني Nitrogen source

يبين الشكل (7) تأثير استعمال المصادر النيتروجينية المتنوعة في إنتاج PHB والكتلة الحيوية المتكونة من العزلة المحلية B₅ أذ ظهر أن أفضل مصدر نيتروجيني هو الببتون أذ أعطى أعلى ناتج من PHB بلغ 4.8 غم ١ لتر بينما كان مقدار الكتلة الحيوية الناتجة 7.2 غم ١ لتر، بينما بلغ ناتج PHB من المصادر النيتروجينية (مستخلص الخميرة، التربتون، casamina acids ، كلوريد الامونيوم، كبريتات الامونيوم) (3.5، 4.1، 3.4 ، 2.33 ، 2.25) غم ١ لتر على التوالي بينما كانت الكتلة الحيوية الناتجة (6 ، 7 ، 5.9 ، 4.11 ، 4.01) غم ١ لتر على التوالي. وقد يعود سبب ارتفاع ناتج PHB والكتلة الحيوية من المصادر النيتروجينية العضوية (مستخلص الخميرة، التربتون ، casamina acids) مقارنة بالمصادر غير العضوية (كلوريد الامونيوم، كبريتات الامونيوم) لاحتواء المصادر العضوية على أحماض امينية وبيبتيدات تحفز الفعاليات الايضية والانزيمات الخاصة بإنتاج PHB بينما المصادر غير العضوية تؤدي الى خفض الدالة الحامضية في وسط النمو من خلال تكوين بعض الحوامض غير العضوية مثل H_2SO_4 وهذا يسبب زيادة في سرعة النمو وإنتاج كميات قليلة من PHB .



شكل (7) تأثير المصادر النيتروجينية المختلفة في كمية متعدد هيدروكسي البيوترات الناتج ومقدار الكتلة الحيوية والنسبة المئوية لحاصل PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B₅

- Berekaa, M.M. and Al Thawadi, A. M. (2012) Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters. **African Journal of Microbiology Research**, 6(4): 838-845.
- Bhuwal, A. K.; Singh, G.; Aggarwal, N. K.; Goyal, V. and Yadav, A. (2014) Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. **Bioresources and Bioprocessing**, 1:1-11.
- Borah, B. ; Thakur, P.S. and Nigam, J.N. (2002) The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly β -hydroxy butyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. **Journal of Applied Microbiology**, 92: 776-783.
- Flora, G.D.; Bhatt, K. and Tuteja, U.(2010) Optimization of culture condition for poly- β - hydroxybutyrate production from isolated *Bacillus* species. **Journal of Cell and Tissue Research**, 10(2) 2235-2242 .
- Flora, G.D.; Bhatt, K. and Tuteja, U.(2010) Optimization of culture condition for poly- β -hydroxybutyrate production from isolated *Bacillus* species. **Journal of Cell and Tissue Research**, 10(2) 2235-2242 .
- Ghate, B.; Pandit, P.; Kulkarni, C.; Mungi, D.D. and Patel, T.C. (2011) PHB production using novel agro-industrial sources from different *Bacillus* species. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 2(3): 243-249.
- Grothea, E.; Moo-Younga, M. and Chisti, Y. (1999) Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**, 25:132-141.
- Hamieh, A.; Olama, Z. and Holail, H. (2013) Microbial production of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic using agro-industrial waste products. **Global Advanced Research Journal of Microbiology**, 2(3) 54-64.
- Kulpreecha, S.; Boonruangthavorn, A.; Meksiriporn, B. and Thongchul, N. (2009) Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxy butyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 107: 240-245.
- Kumar, T. ; Singh, M. Purohit, H.J. and Kalia, V.C. (2009) Potential of *Bacillus* sp. to produce Poly hydroxybutyrate from biowaste. **Journal of Applied Microbiology**, 106 : 2017-2023.
- Law, J. H. and Slepecky, R. A. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, 82:33-36.
- Lee, S. Y .(1996) Bacterial poly hydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, 49: 1-14.
- Nair, S.S.; Reddy, H. and Ganjewala, D. (2008) Screening and characterization of biopolymers Poly hydroxybutyrate producing bacteria. **Advance Biotechnology** 7(4):13-18.
- Nam, D.H. and Ryu, D.D.Y.(1985) Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans*. **Antimicrobiology Agents and Chemotherapy**, 27: 789-801.
- Narayanan, A. and Ramana, K.V. (2012) Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physicochemical process parameters. **Biotechnology**, 2:287-296.
- Nishida, H. and Tokiwa, Y. (1993) Distribution of poly(β -hydroxy butyrate) and poly(ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. **Journal of Environmental Polymer Degradation** 1: 227-233.
- Pradhan, S. (2014) Optimization and characterization of bioplastic produced by *Bacillus cereus* SE1. MSc. thesis, national Institute of technology Rourkela, Odisha, India. 26p.
- Prasanna, T. ; Ajay Babu, P.; Dhanavara Lakshmi, P. ; Chakrapani, R. and Ramachandra Rao, C.S.V. (2011) Production of Poly (3-hydroxybutyrate) by *Bacillus* species isolated from soil. **Journal of Pharma Research & Reviews**, 1:15-18.
- Salakkam, A. (2012) Bioconversion of biodiesel by-products to value added chemicals. Ph.D. thesis. Faculty of Engineering and Physical Sciences, University of Manchester, UK. 217p.

- Shah, K.R. (2014) Optimization and production of Polyhydroxybutarate (PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 3(5): 377-387.
- Shekharaiah, C. P. S. (2005) Isolation, screening and selection of efficient Poly- β -hydroxybutyrate(PHB) synthesizing bacteria. MSc thesis, Dharwad University of Agricultural Sciences, India.
- Singh, G.; Kumari, A.; Mittal, A.; Yadav, A. and Aggarwal, N.K.(2013) Poly β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water. **BioMed Research International**, 1-10.
- Singh, G.; Mittal, A.; Kumari, A.; Goel, V.; Aggarwal, N.K. and Yadav, A. (2011) Optimization of Poly-B-hydroxybutyrate Production from *Bacillus* species. **European Journal of Biological Sciences**, 3 (4): 112-116.
- Soam, A.; Singh, A.K. Singh, R. and Shahi, S.K.(2012) Optimization of culture conditions for bio-polymer producing *Bacillus mycoides* (WSS2) bacteria from sewage . **International journal of current discoveries and innovations**, 1(1): 27-32.
- Tamdogan, N. and Sidal, U.(2011) Investigation of poly- β -hydroxy butyrate (PHB) production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 under different conditions. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 17 (Suppl A): S173-S176.
- Wei, Y.H.; Chen, W.C.; Huang, C.K.; Wu, H.S.; Sun, Y.M. ; Lo C.W. and Janarthanan, O. M. (2011) Screening and evaluation of Poly hydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. **International Journal of Molecular Science**, 12:252-265.
- Yüksekdağ, Z.N.; Aslim, B.; Beyatli, Y. and Mercan, N.(2004) Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. **African Journal of Biotechnology**, 3(1):63-66.