الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690
Email: utjsci@utq.edu.iq Website: http://jsci.utq.edu.iq

دراسة الظروف المثلى لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات من عزلة محلية لبكتريا *Bacillus cereus* B_5

شيماء ذياب جدوع السهلاني آمال كاظم غضبان الاسدي
قسم علوم الاغذية ـ كلية الزراعة ـ جامعة البصرة ـ البصرة / العراق
E-mail: alsahlany.shayma@gmail.com

الخلاصة

تبين أن أعلى ناتج من متعدد هيدروكسي البيوترات PHB من بكتريا *Bacillus cereus* B_5 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 مْ 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 والببتون 0.25 % كمصدر نتروجيني .

الكلمات المفتاحية : متعددهيدروكسي البيوترات ، الظروف المثلى ،بكتريا Bacillus cereus

Study of optimum conditions for Polyhydroxybutyrate production from local isolate of *Bacillus cereus* B_5

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* B_5 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 :

تنتج البوليمرات الحيوية من مواد طبيعية متجدده 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 الالكانوات Polyhydroxyalkanoates (PHA) والتي تتجمع في الخلايا كمصدر للطاقة والكاربون ويزداد تجمعها عند حدوث نقص المغذيات في وسط النمو ويكون النيتروجين المتاح قليلاً (Lee,1996). يعد متعدد هيدروكسي البيوترات (PHB) Polyhydroxybutyrate من أبرز عناصر هذه المجموعة فهو يمتلك خصائصاً ميكانيكية مشابهة لخصائص متعدد البروبلين 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 مْ ودرجة تبلوره ٨٠%، يبدا بالذوبان في درجة حرارة أعلى من ٥٠مْ ويشبه خواص متعدد البروبلين Polypropylene و متعدد الأثيلين Polyethylene في إمكانية معالجته بالحرارة ومقاومته

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 \ مل كما وجد أن المانيتول و الكلايسين أفضل المصادر الكاربونية والنيتروجينية إذ بلغ الإنتاج PHB 23.6623 ملغم \ مل و 14.6217ملغم \ مل على التوالي Tamdogan and Sidal, (2011).تمكن Narayanan and Ramana (2012) من إنتاج PHB من بكتريا B.mycoides DFCI المعزولة من تربة الحدائق وذلك بتنميتها في وسط Glucose–peptone broth ودرس تأثير نسب الكلوكوز والببتون والدالة الحامضية في نمو الخلايا وإنتاج PHB وتكوين السبورات ولاحظ أن 17.34 غم \ لتر كلوكوز و 7.03 غم \ لتر ببتون ودالة حامضية 7.3 قد اعطت أعلى وزن للخلايا الجافة والذي بلغ 4.35 غم \ لتر و PHB 3.32 غم \ لتر وبحصيلة 76.32 % (وزن \ وزن) بينما تكوين السبورات كان ضئيلاً جداً بعد الحضن لمدة ٧٢ ساعة. وجاءت هذه الدراسة إلى ايجاد افضل ظروف التنمية لإنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات PHB من عزلة بكتيرية محلية.

المواد وطرائق العمل

العزلة البكتيرية : تم الحصول على عزلة بكتيرية تعود لبكترياB5 Bacillus cereus من قسم علوم الأغذية \ كلية الزراعة \ جامعة البصرة معزولة محليا من ثمار التفاح الموجود في أسواق مدينة البصرة

وسط إنتاج PHB:حضر الوسط بإذابة 10غم كلوكوز و2.5غم مستخلص الخميرة و0.5غم KH_2PO_4 و0.2 غم $MgSO_4.7H_2O$ و0.1 غم NaCl في لتر، عدلت الدالة الحامضية إلى7 (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 المجهز من شركة Salucea الهولندية ، وضعت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة ١٢٠ دورة \ دقيقة وبدرجة حرارة ٣٢ م ولمدة ٤٨ ساعة.

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

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

٤- أجري النبذ المركزي مرة أخرى بسرعة ٥٠٠٠ دورة \ 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 .

5- 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 يقرا 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) مْ للحصول على أفضل درجة حرارة لإنتاج PHB عند دالة حامضية ٧ وحجم لقاح ١% ومدة حضن ٤٨ ساعة وبحاضنة هزازة سرعتها ١٢٠ دورة \ دقيقة وثم 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 افضل حجم لقاح عند دالة حامضية ٧ ودرجة حضن ٣٢ م ومدة حضن ٤٨ ساعة وبحاضنة هزازة سرعتها ١٢٠ دورة \ دقيقة وحسبت كمية PHB الناتج.

٣-الدالة الحامضية الابتدائية المثلى: أستعمل وسط الانتاج بدالات حامضية مختلفة هي (5, 6, 7, 8, 9) لإيجاد أفضل دالة حامضية للإنتاج عند درجة حضن ٣٢ م وحجم لقاح ١% ومدة حضن ٤٨ ساعة وبحاضنة هزازة سرعتها ١٢٠ دورة \ دقيقة وحسبت كمية PHB الناتج .

٤- مدة التخمير المثلى :درست مدد زمنية مختلفة لتخمير وسط إنتاج بوليمر PHB وهي (120,96,72,48,24) ساعة من النمو للحصول على أفضل مدة تخمير عند دالة حامضية ٧ ودرجة حرارة حضن ٣٢ م وحجم لقاح ١% وبحاضنة هزازة سرعتها ١٢٠ دورة \ دقيقة وحسبت كمية PHB .

٥-سرعة الاهتزاز المثلى: حضن وسط انتاج بوليمر PHB بحاضنة هزازة وبسرع اهتزاز مختلفة هي(120,100,80 ,200,170,150) دورة \ دقيقة مع وجود عينة للمقارنة في حاضنة ساكنة وثبتت بقية ظروف الإنتاج لإيجاد افضل سرعة اهتزاز عند الحضن .

٦-المصدر كاربوني الامثل: استعملت عدة أنواع من الكربوهيدرات لاستبدال سكر الكلوكوز في وسط الإنتاج والذي نسبته ١% ومن هذه الكربوهيدرات (الفركتوز ، كالاكتوز، المانوز ، المالتوز ، السكروز ، النشا) وثبتت بقية الظروف من اجل الحصول على افضل مصدر كاربوني لإنتاج PHB .

٧-المصدر النتروجيني الامثل: استعملت المصادر النايتروجينية التالية (ببتون، تربتون، كبريتات الامونيوم، كلوريد الامونيوم ،Casamino acids) لاستبدال المصدر النيتروجيني(مستخلص الخميرة) الموجود في وسط الإنتاج ولإيجاد 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 الحضن فصلت الخلايا عن الراشح باستعمال النبذ المركزي وبسرعة ٥٠٠٠ دورة \ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة وأخذ الراسب وغسل بالماء المقطر مرتين قبل التجفيف ثم جففت بالفرن عند 55 ° م ولمدة ١٢ ساعة ثم وزنت لتقدير الكتلة الحيوية حسب المعادلة التالية (Salakkam, 2012) .

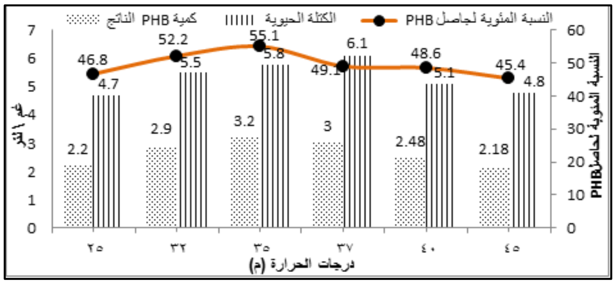
وزن الخلايا الجافة =(وزن الكتلة بعد التجفيف مع الانبوبة – وزن الانبوبة \ الحجم)× ١٠٠

النتائج والمناقشة

تأثير الظروف المثلى في إنتاج متعدد هيدروكسي البيوترات PHB

1-درجة الحرارة

يوضح الشكل (1) تأثير درجة حرارة الحضن في كمية PHB الناتجة ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة من العزلة البكتيرية Bacillus cereus B5 وكان ناتج PHB (2.2 ، 2.9 ، 3.2 ، ٣ ، 2.48، 2.18) غم \ لتر لدرجات الحرارة (25 ،32، 35 ، ٣٧ ، ٤٠، ٤٥) م على التوالي. وبلغ مقدار الكتلة الحيوية عند درجة حرارة ٣٥ م 5.8 غم \ لتر وكانت النسبة المئوية لحاصل PHB ٥٥.1% ، وأعطت العزلة B5 اعلى كتلة حيوية عند درجة حرارة ٣٧ م وبلغت 6.1 غم \ لتر وكانت نسبة حاصل PHB عند هذه الدرجة 49.1 % . وقد تكون درجة حرارة ٣٥مْ هي الدرجة الملائمة للأنزيمات التي تدخل في تفاعلات تكوين PHB في العزلة البكتيرية B5 .



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

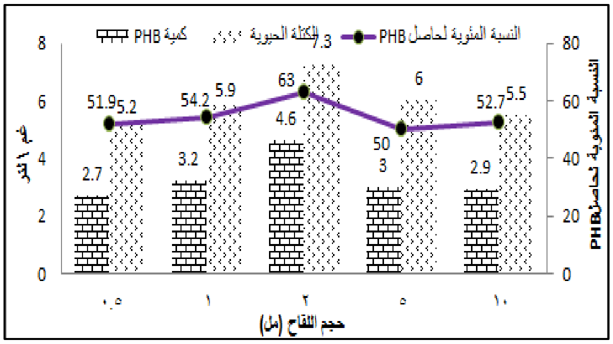
بينت العديد من الدراسات تأثير درجة حرارة الحضن في تكوين الكتلة الحيوية وانتاج PHB، فقد وجد Nisha (2011) أن افضل درجة حرارة لإنتاج PHB من بكتريا *B.sphareicus* كانت 30-35 مْ. بينما بين Singh *et al.* (2013) أن نقصان إنتاج PHB عند ارتفاع درجات الحرارة قد يكون بسبب قلة نشاط انزيم PHBpolymerase. واتفقت النتائج مع نتائج Bhuwal *et al.* (2014) إذ ذكر أن أفضل درجة حرارة لإنتاج PHB من *Bacillus* كانت ٣٥ ° م وبلغ الانتاج 4.274 غم \ لتر بعد ٧٢ ساعة من النمو كما وجد أن ارتفاع درجة الحرارة الحضن اكثر من ٣٥ ° م يؤثر

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

٢ – حجم اللقاح

أظهرت النتائج ان افضل 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 حجوم 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 المنتوج 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) بان افضل حجم لقاح لإنتاج PHB كان ٢% من بكتريا B.sphareicus وبلغ أنتاج PHB 1.63 غم \ لتر بينما كان مقدار الكتلة الحيوية 3.5 غم \ لتر، كما وجد ان زيادة حجم اللقاح أكثر من ٢% أدى إلى انخفاض في كمية الكتلة الحيوية المتكونة. في حين بين Aly *et al.* (2013) ان حجم لقاح ٢% من بكتريا *B.cereus* أعطى أعلى نسبة حاصل من PHB بلغت 43 % .

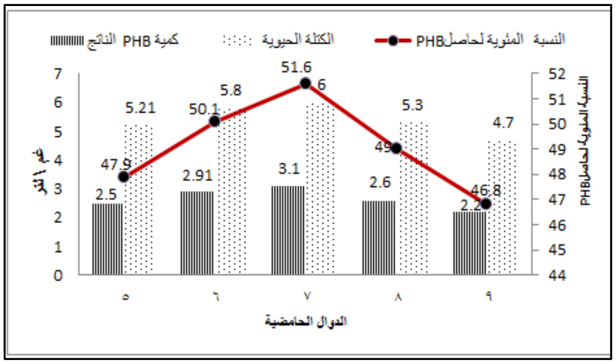
واختلفت النتائج مع ما وجده Kulpreecha et al. (2009) بان افضل حجم لقاح من بكتريا B.megaterium كان 4 % أذ أعطى أعلى نسبة من حاصل PHB بلغت ٤٣ %، كما ذكر Hamieh et al.(2013) أن حجم اللقاح ٣ مل \ ٥٠ مل من وسط الانتاج أعطى اعلى كمية إنتاج من PHB بلغت 0.367 غم ٥٠\ مل من وسط الإنتاج وباستعمال بكتريا B.thuringiensis في حين كانت أقل كمية إنتاج عند استعمال حجم اللقاح ٧ مل \ ٥٠ مل من وسط الانتاج بلغ الناتج 0.139 غم \ ٥٠ مل .



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

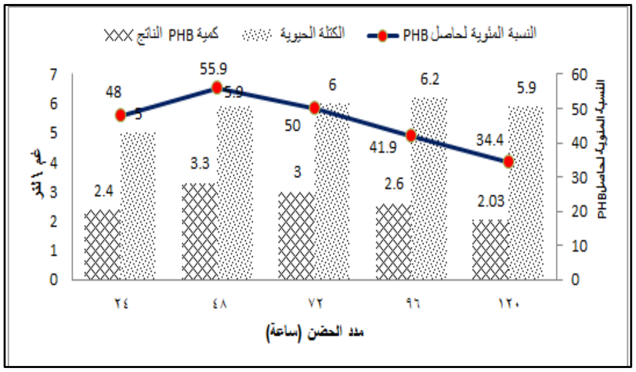
يبين الشكل (3) تأثير استعمال دوال حامضية مختلفة في مقدار PHB الناتج والكتلة الحيوية المتكونة من العزلة المحلية B5 ، إذ بلغ انتاج PHB (2.5 ، 2.91 ، 3.1 ،2.6 ، 2.2) غم \ لتر للدوال الحامضية (٥ ،٦ ،٧ ،٨ ،٩) على التوالي . وظهرت أعلى كمية للكتلة الحيوية عند الدالة الحامضية ٧ اذ بلغت ٦ غم \ لتر واقل كتلة حيوية 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 أتاحه 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 1.82غم \ 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 الى خفض نسبة تجمع PHB داخل الخلايا ويصبح معدل استهلاك PHB يساوي تقريبا 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 % .



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

4 –مدة حضن

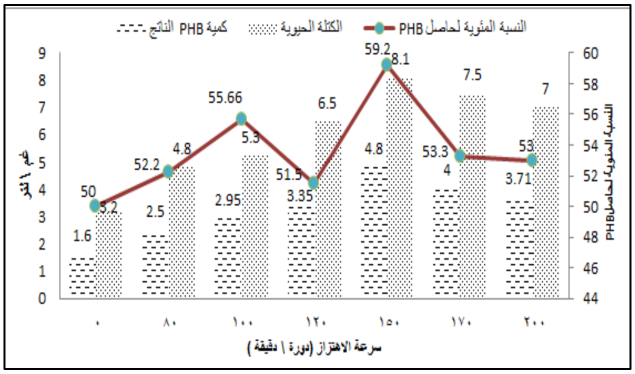
أظهرت النتائج أن افضل مدة حضن لإنتاج PHB كانت ٤٨ ساعة وبلغ 3.3غم \ لتر ووزن الخلايا الجافة 5.9 غم \ لتر وبلغت النسبة المئوية لحاصل PHB 55.9 %، بينما بلغ الانتاج في مدد الحضن (٢٤، ٧٢، ٩٦، ١٢٠) ساعة (2.4 ، 3 ، 2.6 ، 2.03) غم \ لتر على التوالي (شكل 4). وقد يعود السبب في انخفاض كمية PHB الناتج بتقدم مدة الحضن إلى استعماله 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 افضل مدة حضن لإنتاج PHB من بكتريا B.sphareicus كانت ٤٨ ساعة وبلغت النسبة المئوية لحاصل PHB ٤٤ % وتناقص الانتاج بعد زيادة مدة الحضن أكثر من ٤٨ ساعة . أشار Benoit (1990) ; Nam and Ray (1985) عند إنتاج PHB من بكتريا Bacillus يجب تحديد مدة الحضن المثلى بسبب ان 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 الحضن حصل انخفاض في كمية PHB الناتج بسبب نقص المغذيات وزيادة في الفعاليات الايضية والتي لها تأثير سلبي في إنتاج PHB. بين Prasanna *et al.*(2011) أن أفضل مدة حضن لإنتاج PHB من بكتريا B.megaterium كانت ٤٨ ساعة وبلغت نسبة حاصله 83.78 % وبعد ٤٨ ساعة حصل انخفاض في إنتاج PHB وازدادت لزوجة الوسط بسبب إنتاج السبورات وقلة المصادر الكاربونية والنيتروجينية لذا تلجا البكتريا الى استهلاك PHB



شكل (4) تأثير مدة الحضن 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 الحضن في إنتاج PHB من العزلة المحلية B.cereus B5 وكان أعلى إنتاج لبوليمر PHB عند سرعة اهتزاز ١٥٠ دورة \ دقيقة أذ بلغ 4.8 غم \ لتر وكان مقدار الكتلة الحيوية المتكونة 8.1 غم \ لتر في حين كان إنتاج PHB في سرع الاهتزاز (٨٠ ، ١٠٠ ،١٢٠، ١٧٠، ٢٠٠) دورة \ دقيقة (2.5 ، 2.95 ،3.35 ، 4 ، 3.71) غم \ لتر على التوالي. وانخفض مقدار الكتلة الحيوية بزيادة سرعة الاهتزاز عن ١٥٠ دورة \ دقيقة إذ بلغت (7.5 و٧)غم \ لتر لسرعة الاهتزاز (170،٢٠٠) دورة \ دقيقة على التوالي. بينما كان إنتاج PHB في الحاضنة الساكنة 1.6 غم \ لتر والكتلة الحيوية المتكونة بلغت 3.2 غم \ لتر. وتحدد سرعة الاهتزاز نمو السلالات البكتيرية وفعاليتها في إنتاج PHB ويعتقد أن سرعة الاهتزاز يمنع تكتل الخلايا ويساعد في أنتشار الخلايا والاستفادة من العناصر المعدنية المتوفرة في وسط النمو.

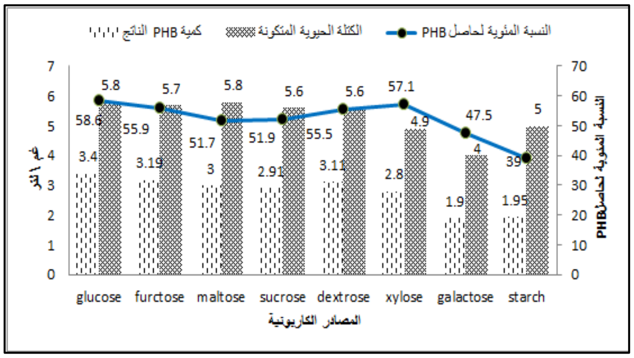


شكل (5) تأثير سرعة اهتزاز الحاضنة في كمية متعدد هيدروكسي البيوترات الناتج ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة والنسبة المئوية لحاصل PHB من العزلة المحلية لبكتريا *B. cereus* B5

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

٦- المصدر الكاربوني

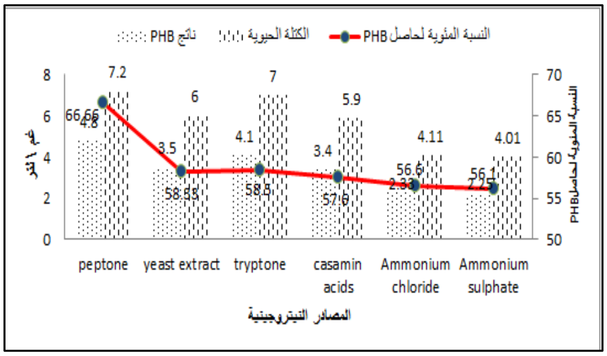
يوضح الشكل (6) تأثير استعمال المصادر الكاربونية المتنوعة في إنتاج PHB من العزلة المحلية B5 فقد أعطى الكلوكوز أعلى إنتاج من PHB بلغ 3.4 غم \ لتر وكان ناتج الفركتوز 3.19غم \ لتر وجاءت كميات PHB المنتجة من المصادر الكاربونية المالتوز والسكروز والدكستروز والزايلوز والكلاكتوز والنشأ (٣، 2.91، 3.11 ، 2.8 ، 1.9 ،1.95) غم \ لتر على التوالي، وكانت الكتلة الحيوية المتكونة بوجود الكلوكوز 5.8 غم \ لتر. وكانت النسبة المئوية لحاصل PHB 58.6 %. ويعد الكلوكوز والفركتوز من السكريات الاحادية البسيطة التي تستطيع البكتريا استعمالها بسهولة في النمو وإنتاج نواتجها الايضية ومنها PHB هذه النتائج توافقت مع Shah (2014) أذ استعمل ٤ مصادر كاربونيه هي الكلوكوز والفركتوز والسكروز والمالتوز لإنتاج PHB من B.subtilis G151 ووجد ان الكلوكوز والفركتوز أعطت أعلى إنتاج من PHB بلغ (0.02 ، 0.018) غم \ لتر على التوالي، اما السكروز والمالتوز أعطت إنتاجية منخفضة لكونها سكريات ثنائية اصعب تحللاً واستهلاكاً من السكريات الاحادية بالنسبة لبكتريا. بين Shekharaiah (2005) أن أفضل مصدر كاربوني لإنتاج PHB من Bacillus spp. كان الكلوكوز بتركيز ١% وبلغ إنتاج PHB 0.4 غم \ لتر بينما السكريات الثنائية مثل المالتوز والسكريات 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 الكلوكوز أذ 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 الكلوكوز 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 \ لتر بينما كان الدكستروز اقل المصادر الكاربونية لإنتاج PHB وأعطى ناتج مقداره 0.4 غم \ لتر.



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

٧- المصدر النتروجيني Nitrogen source

يبين الشكل (7) تأثير استعمال المصادر النيتروجينية المتنوعة في إنتاج PHB والكتلة الحيوية المتكونة من العزلة المحلية B_5 أذ ظهر أن أفضل مصدر نيتروجيني هو البيتون أذ أعطى أعلى ناتج من PHB بلغ 4.8 غم \ لتر بينما كان مقدار الكتلة الحيوية الناتجة 7.2 غم \ 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 \ لتر على التوالي بينما كانت الكتلة الحيوية الناتجة (6 ،7 ، 5.9 ، 4.11 ، 4.01) غم \ 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 وببتيدات 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

وجاءت النتائج متوافقة مع Aarthi and Ramana (2011) أذ وجد أن البيتون 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 البيتون بتركيز ١% كان أفضل المصادر النيتروجينية لإنتاج PHB من أنواع عائدة لبكتريا Bacillus وبلغ إنتاج PHB 5.423 غم \ لتر والنسبة المئوية لحاصل 71.5 % بينما كان ناتج PHB من المصدر النتروجيني غير العضوي فوسفات الامونيوم (NH4)2HPO4 4.914 غم \ 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 \ لتر بينما كانت الكتلة الحيوية المتكونة 8.4 غم \ لتر وكانت النسبة المئوية لحاصل PHB 73.8 %.

المصادر　　References

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* MM7isolated from soil samples from Saudi Arabia. Life Science Journal, 10(4): 1884-1891.

Aswini, P.; Kavitha, P.; Revathy, A.R. and Babujanarthanam, 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.

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 polyβ-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 argo-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 *Bacilluscirculans*. **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-hydroxybutyrates) by *Bacillus* species isolated form soil. **Journal of Pharma Research & Reviews,** 1:15-18.

Salakkam, A. (2012) Bioconversion of biodiesel by-products to valueadded 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.