"أنتاج البولي-بيتا- هيدروكسي بيوتيريت (Poly-β-hydroxybutyrate) من عزلات محلية من بكتريا الرايزوبيوم"

د. رعد حساني سلطان
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل
E-mail: raadsultan@yahoo.com

وجدان سالم قاسم
المعهد التقني/الموصل– العراق

الاستلام 2012 / 07 / 12
القبول 2012 / 10 / 16

Abstract

In this study, five isolates of *Sinorhizobium meliloti* were obtained from root nodules of alfalfa plants collected from agricultural soils of different regions of Nineveh governorate/Iraq. Local isolates, RW8, RW9, RW10, RW11 and RW12 incubated for periods 1, 2, 3, 4 and 5 days. Biomass (g/l), production of poly-β-hydroxybutyrate (g/l) and production percentage (of dry cell weight) were recorded. Results revealed that RW9 isolate was the best among isolates of *S. meliloti*. It gave the best production percentage of poly-β-hydroxybutyrate which reached 43.05 % when grown in YEM (Yeast Extract Mannitol Broth) medium two days of incubation, whereas maximum average of biomass production reached 1.97 g/l. The effect of addition of different carbon sources growth medium on poly-β-hydroxybutyrate production by *S. meliloti* isolate RW9 showed that glucose, as carbon source, promote the productivity of the polymer that reached to 65.07 % two days after incubation. The optimal concentration of glucose to support highest production was 2.0 % that enhance production to 82.55 %. The effect of addition of different nitrogen sources at 0.10 % concentration to YEM broth medium (supplemented with 2.0 % glucose) revealed that glutamic acid gave the best productivity which reached 86.51 % two days after incubation. The effective concentration of glutamic acid support the best productivity was the used concentration (0.10 %). According to the obtained results RW9 isolate which accumulated high level of poly-β-hydroxybutyrate may be superior to be employed in industrial production when this isolate grown in optimum conditions.

الخلاصة

عزلت في هذه الدراسة خمسة عزلات من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت النامية في ترب زراعية مختلفة من محافظة نينوى/العراق. وشملت العزلات: RW8, RW9, RW10, RW11 و RW12. نميت هذه العزلات الخمسة لمدد تحضين 1, 2, 3, 4 و 5 أيام. دوّن كل من الكتلة الحيوية (غم/لتر) و أنتاج البولي-بيتا-هيدروكسي بيوتيريت (غم/لتر) ونسبة الأنتاج المئوية (من وزن الخلية الجاف). أظهرت نتائج هذه الدراسة أن العزلة RW9 *S. meliloti* الأفضل من بين عزلات بكتريا *S. meliloti* المدروسة والتي أعطت أفضل نسبة أنتاج للـ PHB بلغت عند زراعتها في وسط YEM السائل (مستخلص الخميرة والمانيتول السائل) 43.05 % وبعد يومين من التحضين, في حين بلغ أقصى معدل لأنتاجية الكتلة الحيوية 1.97 غم/لتر. أظهرَ أضافة مصادر كاربونية مختلفة في الوسط أن أنتاجية PHB من العزلة RW9 *S. meliloti* أن الكلوكوز عزز أنتاجية للبوليمر بنسبة 65.07 % بعد يومين من التحضين. وعند مستوى 2 % من الكلوكوز سجلت نسبة الأنتاج 82.55 % بعد يومين من التحضين. أن أختبارات تأثير أضافة مصادر نايتروجينية مختلفة مضافة بتركيز 0.10 % الى وسط YEM (المضاف اليه 2.0 % كلوكوز) بينت أن حامض الكلوتاميك حقق أفضل أنتاجية بلغت 86.51 % بعد يومين من التحضين. أن أفضل تركيز من هذا الحامض حقق أفضل نسبة أنتاج كان التركيز المدروس (0.10 %). وأستناداً الى هذه النتائج فأنه يمكن أعتماد العزلة RW9 من *S. meliloti* في الأنتاج الصناعي عند تنميتها في الظروف المثلى.

المقدمة

تعد ظاهرة تجمع وتراكم النفايات البلاستيكية واحدة من أهم المشاكل البيئية التي تواجه المجتمعات المعاصرة والتي بخلاف النفايات الورقية والقماشية بل وحتى المعدنية لاتتأثر بعوامل الجو وهي كذلك غير قابلة للتحلل البايولوجي بواسطة مايكروبات التربة (1). أن أنتاج مواد بلاستيكية حيوية Bioplastic قابلة للتحلل البايولوجي Biodegradable تعتبر أولوية بيئية ملحة ولهذا لازالت الأبحاث التطويرية في شدة زخمها لأنتاج هذا النوع من البلاستيك من مواد اولية طبيعية قابلة للتجدد مثل المنتجات والمصادر الزراعية بدلاً من أستخدام المواد الأولية البتروكيمياوية (2). يعد البولي- بيتا- هيدروكسي بيوتيريت Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) بوليمرحيوي يتبع صنف البوليستر وشخّص وعزل لأول مرة من قبل عالم الأحياء المجهرية الفرنسي Maurice Lemoigne عام 1925م. أن الـ PHB هو النوع الأكثر شيوعاً ضمن Polyhydroxyalkanoate (PHA) صيغته الكيمياوية -{O-CH(CH_3)-CH_2- $(C{=}O)\}_n$ - (3). وينتج بواسطة أحياء دقيقة كبكتريا *Rhizobum* و *eutsrophus*

*Ralstonia*و *Bacillus megateiun* أستجابة للظروف الفيزيائية غير المناسبة ويكون كمخزن للطاقة يستخدم أو يستهلك عند الضرورة (4). ويتميز الـ PHB بعدة صفات منها أنه غير قابل للذوبان في الماء ومقاوم للأشعة فوق البنفسجية وضعيف تجاه الحوامض والقواعد ويذوب في الكلوروفورم ودرجة الذوبان 175° م ودرجة التجمد 15° م غير سام وله أهمية متزايدة في المجال الطبي حيث يستعمل في تصنيع الخيوط الجراحية القابلة للتحلل وكذلك يستخدم كوسيلة لتنظيم وأفراز ومن ثم أمتصاص الجسم لبعض الأدوية حيث يغلف الدواء بطبقة رقيقة من هذا البوليمر تتحلل ببطء داخل الجسم وفق الية زمنية محددة وبهذا يعمل ببطء كمادة حاملة للأدوية الى هدفها فيما يعرف بـ Drug delivery (5).

أشارت أحدى الدراسات بأن أضافة 100 ملغم/لترمن PHB الى المزرعة المائية لـ *Artemia franciscana* كان له تأثير وقائي وشفائي تجاه *Vibrio campbellii* (6). قام الباحث Tombolini واخرون (7) بتشخيص الجينات الداخلة في تصنيع الـ PHB في بكتريا *Sinorhizobium meliloti* العزلة 41 وأفترض وجود أربعة جينات مشفرة تدخل في تصنيع الـ PHB وهي: (*phaA*) β-ketothiolase, (*phaB*) acetoacetyl-CoA reductase, (*phaC*) PHB-synthase وجين رابع أشير اليه بـ ORF1. وظيفة PHB في بكتريا الرايزوبيوم تكمن في زيادة أصابتها للنبات البقولي وتحفيز تكوين العقد الجذرية ومن ثم تثبيت النايتروجين الجوي (8). في الظروف المثلى كان أفضل أنتاجية للـ PHB من البكتريا *Ralstonia eutropha* العزلة ACM1296 في وسط مستخلص الخميرة والببتون والمدعم بالفركتوز حيث بلغت 70.0 % من وزن الخلية الجاف (9). في دراسة تم عزل 29 عزلة للجنس *Bacillus* من اراضي عشبية في تركيا ووجد أن الأنتاج تراوح 1.06–41.67 % (وزن/حجم) بالأعتماد على وزن الخلية الجاف (10). في محاولة للحصول على عزلات بكترية كفوءة في أنتاج الـ PHB تم جمع عزلات من مناطق بيئية هندية مختلفة ولقد تم دراسة الظروف المثلى للأنتاجية لعشرة عزلات (11).

تهدف هذه الدراسة الى تحديد ظروف أنتاج PHB من عزلات محلية للبكتريا *S. meliloti* المعروفة بمقدرتها على أنتاج نسبة عالية من PHB .

مواد العمل وطرائقه

العزلات البكتيرية :

عزلت بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت *Medicago sativa* L.. حيث تم جمع النباتات من مناطق زراعية مختلفة من محافظة نينوى/العراق شملت مناطق: يارمجة, الرشيدية, حاوي الكنيسة, حمام العليل والقيارة.

الأوساط الزرعية :

1. وسط التربتون ومستخلص الخميرة : Trypton Yeast Extract (TY) medium

أستخدم هذا الوسط لتنمية عزلات بكتريا الرايزوبيوم و في تنقية وحفظ وأدامة البكتريا ويتكون من (غم/لتر): تربتون, 5.0؛ مستخلص الخميرة, 3.0؛ $CaCl_2.2H_2O$, 0.12؛ يكمل الحجم الى 1 لتر. يتم تضبيط الرقم الهيدروجيني الى 7.0 (12).

2. وسط مستخلص الخميرة والمانيتول : Yeast Extract Mannitol (YEM) Medium

أستخدم هذا الوسط في تحضير لقاح بكتريا الرايزوبيوم وأنتاج البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتيريت. يتكون هذا الوسط مما يأتي (غم/لتر): مانيتول, 10.0؛ مستخلص الخميرة, 1.0؛ K_2HPO_4, 0.5؛ $MgSO_4.7H_2O$, 0.2؛ NaCl, 0.1؛ يكمل الحجم بالماء المقطر الى 1 لتر ثم يضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.8 (13).

عزل وتنقية بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات المضيفة :

عزلت بكتريا *Sinorhizobium mleliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت. نقيت عزلات بكتريا الرايزوبيا بطريقة التخطيط على وسط التربتون ومستخلص الخميرة (TY) الصلب (16). بعدها وضعت الأطباق في حاضنة النمو بدرجة حرارة 28 ±2 °م ولمدة 2–4 يوم. بعد أنتهاء التحضين التقطت المستعمرات الشفافة لأجراء الدراسات اللاحقة عليها.

الأختبار الرجعي (العكسي) :

لقحت جذور بادرات الجت منماة لمدة يومين على موائل وسط تنمية النبات الخالي من النايتروجين بعزلات الرايزوبيوم من أجل التأكد من قدرتها على إصابة الشعيرات الجذرية لنبات الجت وللتأكد أن البكتريا هي *S. mleliloti* (13).

الظروف الزرعية لإنتاج البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتيريت :

تحضير لقاح الرايزوبيا :

حضر لقاح بكتريا *S. mleliloti* بنقل جزء من مزرعة البكتريا النامية على وسط TY الصلب الى دورق مخروطي سعة 100 مل يحتوي على 20 مل من وسط YEM المعقم. حضن الوسط في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 28 ±2 °م ولمدة 24 ساعة.

تحضير الوسط الزرعي لأنتاج البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتيريت :

من أجل تنمية بكتريا الرايزوبيوم وإنتاج ألـ PHB حضر وسط YEM المعقم وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.8. وزع الوسط في دوارق مخروطية حجم 250 مل وبمقدار 50 مل لكل دورق وبمعدل 3 دوارق لكل معاملة. سدت فوهات الدوارق بأحكام بسدادات قطنية. عقمت

بالمعقام عند ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121 °م ولمدة 20 دقيقة. لقحت لاحقاً بلقاح الرايزوبيوم بعمر 24 ساعة وبنسبة 2.0%. وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة وبمعدل هز 150 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 28 ±2 °م ولفترات تحضين مختلفة وهي: 1, 2, 3, 4 و 5 يوم (14).

تقدير الكتلة الحيوية :

تم تقدير الكتلة الحيوية حسب طريقة Duta واخرون (15) وأجري طرد مركزي لسائل المزرعة بعد أنتهاء فترة التحضين وبمعدل 6000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة. جمع الراسب في أطباق معلومة الكتلة والتجفيف في فرن بدرجة 80 °م ولمدة 24 ساعة, بعد ذلك سجل مقدار الكتلة الحيوية الجافة بأستخدام الميزان الحساس.

أستخلاص البولي-بيتا-هيدروكسي بيوتيريت :

بعد التحضين أجري الطرد المركزي لكل مكرر من ناتج التخمير لمدة 15 دقيقة وبمعدل 6000 دورة/دقيقة. غسل الراسب بالماء المقطر ثم جففت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 100 °م. أضيف هايبوكلورايد الصوديوم 5 % ثم حضنت بدرجة حرارة 60 °م لمدة ساعة واحدة من أجل كسر الجدار الخلوي للبكتريا. أجري الطرد المركزي عند 6000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم أخذ الراسب لمعاملات أخرى. باستخدام 96 % (حجم/حجم) أيثانول:أسيتون (1:1) أستخلص دهن الخلية والجزيئات الأخرى عدا الـ PHB من الراسب. أستخلص الـ PHB وذلك بإضافة الكلوروفورم في أنبوبة الأختبار الحاوية على الراسب والمغمورة في الحمام المائي. حصًل على بلورات من PHB بعد تبخر الكلوروفورم (16). الطريقة المتبعة محددة لاستخلاص PHB عالي النقاوة وتزيد نقاوته عن 70 % (17).

تقدير البولي-بيتا-هيدروكسي بيوتيريت :

لتحويل الـ PHB المستخلص الى حامض الكروتونيك (Crotonic acid) (Merk Co./ India), أضيف 98 % حامض الكبريتيك الى بلورات الـ PHB مع التسخين بدرجة 60 °م ولمدة ساعة واحدة. قيست الكثافة الضوئية لحامض الكروتونيك في المحلول عند طول موجي 235 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي بالأشعة فوق البنفسجية طراز (CECIL CE 1021). حُسَب محتوى حامض الكروتونيك بالأعتماد على المنحني القياسي بأستخدام حامض الكروتونيك القياسي وذلك بعمل تراكيز مختلفة منه (16). كما حُسَبت أنتاجية الـ PHB من وزن الخلية الجاف (18).

تأثير مصادر كاربونية مختلفة في الوسط الغذائي في نمو البكتريا *S. meliloti* العزلة RW9 وإنتاج الـ PHB :

في هذه التجربة درس تأثير 1.0 % (وزن/حجم) من مصادر كاربونية مختلفة كل على حدة على نمو البكتريا *S. meliloti* وأنتاج ألـ PHB والمصادر الكاربونية المضافة هي: أرابينوز, فركتوز, كالاكتوز, كلوكوز, لاكتوز, مانيتول, مانوز, رافينوز, رايبوز, سكروز, زايلوز. ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.8. وزع الوسط بثلاثة مكررات لكل معاملة ثم عقم الوسط ولقح لاحقاً. أخذت النتائج بعد مرور يومين من التحضين.

تأثير تراكيز مختلفة لأفضل مصدر كاربوني في نمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 وإنتاج PHB:

درس تأثير تراكيز مختلفة لأفضل مصدر كاربوني دعم أنتاج PHB, أذ كانت التراكيز المحضرة كالاتي: 1.0, 1.5, 2.0 و 2.5 غم/100 مل. ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.8 وزع الوسط الى الدوارق المخروطية ثم التعقيم والتلقيح كما ذكر سابقاً. دونت النتائج من الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر) و PHB (غم/لتر) بعد مرور يومين من التحضين.

تأثير إضافة مصادر نايتروجينية مختلفة على نمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 وأنتاج PHB :

أضيفت مصادر نايتروجينية مختلفة كل على أنفراد في وسط التخمير والذي يحتوي على الكلوكوز كمصدر كاربوني وبتركيز 2.0 % لمعرفة تأثيرها على نمو البكتريا وأنتاج الـ PHB. المصادر النايتروجينية المضافة بتركيز 1.0 % (وزن/حجم) وكالاتي: $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, $NaNO_3$, KNO_3, أسباراجين حامض الكلوتاميك, حامض الكازامينو, الكلايسين. متابعة التجربة بعد فترة تحضين يومين وتدوين النتائج كما مر سابقاً.

تأثير إضافة تراكيز مختلفة لأفضل مصدر نايتروجيني في نمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 وإنتاج الـ PHB :

أضيفت تراكيز مختلفة (0.05, 0.10, 0.15 و 0.20 % وزن/حجم) لأفضل مصدر نايتروجيني الى وسط التخمير والذي يحتوي على الكلوكوز كمصدر كاربوني وبتركيز 2.0 % لمعرفة تأثيرها على نمو عزلة الرايزوبيا وإنتاج الـ PHB (17) .

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا المنتجة لـ PHB:

أظهرت نتائج عزل الرايزوبيا من العقد الجذرية لنباتات الجت المأخوذة من خمسة مناطق زراعية مختلفة من محافظة نينوى وتنقية البكتريا ومن ثم أجراء الأختبار الرجعي (العكسي) (*R.* -host specificity) نجاح العلاقة التعايشية التخصصية لهذه العزلات الخمسة مع نباتات الجت وعليه فالعزلات المحلية تعود لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* ولتمييزها عن العزلات المختبرية الأخرى أعطيت الأسماء التالية RW8, RW9, RW10, RW11 و RW12. وعلى مستوى القطر لا توجد دراسات سابقة تناولت ظروف أنتاج البوليمر Poly-β-hydroxybutyrate سواء من عزلات عالمية أو محلية. وتعد هذه الدراسة هي الأولى في هذا المجال من حيث عزل بكتريا *S. meliloti* محلية مختلفة معزولة متضمنة أهم الظروف المؤثرة في أنتاجية هذا البوليمر الهام.

تأثير مدد التحضين المختلفة في نمو عزلات بكتريا *S. meliloti* وأنتاج PHB:

من أجل متابعة أنتاجية الـ PHB ومعدلات الكتلة الحيوية في عزلات بكتريا *S. meliloti* المحلية تم التحضين لمدد مختلفة تراوحت من يوم واحد الى خمسة ايام حيث من المعروف أن هذه البكتريا تزداد كتلتها الحيوية بعد التخمير لمدة أربعة الى خمسة أيام (14). أظهرت النتائج أن لمدد التحضين للأيام 1, 2, 3, 4 و5 تأثير في نمو بكتريا *S. meliloti* وأنتاج الـ PHB (الجدول 1) وأعطت العزلة RW9 أفضل أنتاج بلغ 43.05 % بعد يومين من التحضين ومع تقدم مدة التحضين أنخفضت نسبة الأنتاج حتى وصلت الى 38.35 % بعد 5 أيام من التحضين. وبالنسبة للعزلات RW10 و RW8 و RW12 فكانت أفضل في نسبة أنتاجها لـ PHB بعد 3 أيام من التحضين حيث بلغت 31.25 و 28.68 و 28.38 % على التوالي (الجدول 1). وسجلت أقل نسبة أنتاجية للـ PHB في العزلة RW11 حيث بلغت 25.49 % بعد يومين من التحضين. توافقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Mercan واخرون (14) حيث أن مدة تحضين يومين كانت أفضل مدة لأنتاجية الـ PHB في بكتريا *Rhizobium* spp. العزلة 2426 في وسط YEM السائل. ولاحظ الباحث أنه بعد تحضين 48 ساعة حصل أنخفاض في أنتاجية الـ PHB مع زيادة لزوجة الوسط بعد مدة تحضين 72, 96 و 120 ساعة.

أظهرت نتائج الدراسة التي قام بها الباحثين Chaijamrus و Udpuay (19) أن أفضل أنتاجية للـ PHB من بكتريا *B. megaterium* ATCC6748 تم ملاحظتها بعد 45 ساعة من التحضين عندما أستخدما وسط المولاس وسائل نقيع الذرة بتركيز 4.0 %. وأن بعد

مدة تحضين 48 ساعة كانت الظروف الزرعية غير مناسبة والتي تسببت في نقصان أنتاجية الـ PHB حيث أن زيادة اللزوجة كان مترافقاً مع زيادة أنتاجية السكر المتعدد الخارجي (EPS) وناتجاً عنه تحديد أو عجز في نقل الأوكسجين وبالتالي مؤدياً الى نقصان أنتاجية الـ PHB. وكلما أزدادت مدة التحضين أدى ذلك الى النقصان في أنتاجية الـ PHB ولساعات التحضين 72 و 120 ساعة على التوالي (19).

فيما يخص نمو عزلات الرايزوبيا المحلية الخمسة فقد كانت أعلى أنتاجية من الكتلة الحيوية كانت للعزلة *Sinorhizobium meliloti* RW11 أفضل أنتاجية حيث بلغت 1.97 غم/لتر بعد أربعة أيام من التحضين (الجدول 1). كذلك لاحظ الباحث Mercan واخرون (14) أزدياد معدلات الكتلة الحيوية مع زيادة مدة التحضين حيث بلغت أقصاها بعد 120 ساعة من التحضين, وأستنتج الباحث أنه بالرغم من زيادة معدلات الوزن الجاف للخلايا عند 120 ساعة تحضين الا أن الأنخفاض في أنتاجية الـ PHB يدل على أن بكتريا الرايزوبيا قد أستغلت الـ PHB كمصدراً للكاربون ومسببة عنه ظرف غير مناسب في وسط التخمير. الذي يظهر أنه يحصل في المرحلة الأولى من التخمير أنقسام خلوي نشيط فضلاً عن تحويل كامل للمصدر الكاربوني الى كتلة حيوية بدون أنتاج الـ PHB, وفي المرحلة الثانية من عملية التخمير يتم فيه تصنيع الـ PHB بشكل نشط في الخلايا المنتجة وفي ظروف تحديد الأوكسجين وفرط توافر المصدر الكاربوني (20).

الجدول (1) : تأثير مدد التحضين المختلفة في نمو وأنتاج البولي-بيتا-هيدروكسي بيوتيريت (PHB) بوساطة عزلات محلية مختلفة من بكتريا *Sinorhizobium meliloti* نامية في وسط MSY.

العزلة	مدة التحضين (يوم)	الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر)	PHB غم/لتر	الإنتاج %
RW8	1	0.95 (±0.04)♦	0.23 (±0.17)	24.21
	2	1.20 (±0.03)	0.35 (±0.33)	29.16
	3	1.29 (±0.09)	0.37 (±0.58)	28.68
	4	1.33 (±0.14)	0.37 (±0.12)	27.81
	5	1.48 (±0.10)	0.36 (±0.03)	24.32
RW9	1	0.51 (±0.03)	0.19 (±0.14)	37.25
	2	0.72 (±0.09)	0.31 (±0.22)	43.05
	3	0.80 (±0.12)	0.33 (±0.41)	41.25
	4	0.76 (±0.05)	0.30 (±0.57)	39.47
	5	0.73 (±0.03)	0.28 (±0.38)	38.35
	1	1.01 (±0.11)	0.20 (±0.30)	19.80

RW10	2	(0.08±) 1.09	(0.29±) 0.32	29.35
	3	(0.05±) 1.12	(0.17±) 0.35	31.25
	4	(0.07±) 1.07	(0.24±) 0.33	30.84
	5	(0.04±) 1.00	(0.32±) 0.30	30.00
RW11	1	(0.09±) 1.17	(0.11±) 0.27	23.07
	2	(0.03±) 1.53	(0.09±) 0.39	25.49
	3	(0.04±) 1.68	(0.14±) 0.36	21.42
	4	(0.10±) 1.97	(0.07±) 0.39	19.79
	5	(0.06±) 1.91	(0.54±) 0.33	17.27
RW12	1	(0.05±) 1.10	(0.21±) 0.24	21.81
	2	(0.09±) 1.48	(0.26±) 0.36	24.32
	3	(0.03±) 1.55	(0.19±) 0.44	28.38
	4	(0.08±) 1.66	(0.15±) 0.41	24.69
	5	(0.10±) 1.44	(0.29±) 0.34	23.61

♦كل قيمة تمثل معدل لثلاث مكررات. الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري.

تظهر النتائج المستحصل عليها والمذكورة في الجدول (1) أن من بين العزلات الخمسة المحلية لبكتريا *S. meliloti* المعزولة والمدروسة أظهرت العزلة RW9 تفوقاً في النسبة المئوية لأنتاج الـ PHB حيث بلغت النسبة المئوية للأنتاج 43.05 % (من وزن الخلية الجاف) بعد يومين من التحضين. وعليه تم أختيار العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 لأجراء التجارب اللاحقة وبمدة تحضين يومين. ان تصنيع الـ PHB من قبل البكتريا المحفزة على تكوين العقد الجذرية والمثبتة للنايتروجين تعد صفة موروثة في جميع أنواع بكتريا الـ *Rhizobium* (20).

تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة في نمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 و أنتاج الـ PHB :

أظهرت نتائج دراسة مصادر كاربونية مختلفة الى وسط التخمير في نمو البكتريا *S. meliloti* العزلة RW9 وإنتاجية الـ PHB (الجدول 2) أن الكلوكوز أفضل مصدر كاربوني حيث حقق أفضل أنتاجية (65.07 %) بعد يومين من التحضين. وقد تفوّق الكلوكوز على السكروز و المانيتول اللذان وصلت نسبة أنتاجهما من الـ PHB الى 45.83 و 42.85% على التوالي وبعد يومين من التحضين. تتفق هذه النتيجة مع نتيجة الباحث Mercan (21) عندما درس تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة على الإنتاجية في عزلات مختلفة من الـ *Rhizobium* ونتيجة الباحث Chandrashekharaiah (11) عند دراسته تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة على الإنتاجية في عزلات مختلفة معزولة من الترب الهندية ومخلفات

المصانع. من الواضح أن أعلى محتوى للـ PHB في الخلية الحية يعتمد على نوع المزرعة وأختلاف أجناس الرايزوبيا (20).

أما فيما يخص تأثير أضافة المصادر الكاربونية المختلفة الى وسط YEM على نمو البكتريا *S. meliloti* العزلة RW9 فقد أظهرت النتائج أن المانوز و السكروز والرايبوز دعموا إنتاجية الكتلة الحيوية حيث بلغت أعلى معدلات 1.10 و 0.96 و 0.90 غم/لتر على التوالي وبعد يومين من التحضين (الجدول 2).

الجدول (2): تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة الى الوسط الغذائي في نمو وإنتاج البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتيريت (PHB) في بكتريا *Sinorhizobium meliloti* عزلة RW9 بعد يومين من التحضين.

المصادر الكاربونية 1 % (وزن/حجم)	الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر)	PHB غم/لتر	الإنتاج %
أرابينوز	0.61♦ (±0.09)	0.12 (±0.09)	34.42
فركتوز	0.82 (±0.03)	0.25 (±0.60)	30.48
كالاكتوز	0.78 (±0.08)	0.24 (±0.30)	30.76
كلوكوز	0.63 (±0.05)	0.41 (±0.15)	65.07
لاكتوز	0.65 (±0.15)	0.21 (±0.53)	34.11
مانيتول	0.70 (±0.07)	0.30 (±0.24)	42.85
مانوز	1.10 (±0.10)	0.39 (±0.37)	35.45
رافينوز	0.80 (±0.05)	0.24 (±0.33)	30.00
رايبوز	0.90 (±0.03)	0.35 (±0.11)	38.88
سكروز	0.96 (±0.07)	0.44 (±0.40)	45.83
زايلوز	0.84 (±0.04)	0.28 (±0.10)	33.33

♦ كل قيمة تمثل معدل لثلاث مكررات. الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري.

تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز على نمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 وأنتاج الـ PHB :

بينت نتائج دراسة تأثير أضافة تراكيز مختلفة من الكلوكوز على نمو عزلة الرايزوبيا المحلية وأنتاجية الـ PHB (الجدول 3) أن بزيادة تركيز سكر الكلوكوز المضاف بوصفه مصدر كاربوني ازدادت نسبة أنتاجية الـ PHB حيث بلغت 76.38 عند التركيز 1.5 % وبعد يومين من التحضين. أن زيادة التراكيز المضافة من سكر الكلوكوز الى وسط التخمير ازدادت نسبة

الإنتاجية حيث بلغت أقصاها عند التركيز 2.0 % حيث بلغت الإنتاجية 82.55%. أن زيادة التراكيز المضافة من الكلوكوز الى ما فوق 2.0 % أدى الى النقصان في النسبة المئوية لأنتاج الـ PHB حيث بلغت نسبة الأنتاجية 54.94 % عند التركيز 2.5 % وبعد يومين من التحضين. لقد وجد أن أفضل أنتاجية للـ PHB من عزلة البكتريا *Streptomyces griseorubignosus* DBCC 719 والبالغة 9.5 % من وزن المايسليا الجاف في الطور الثابت المبكر والمنماة في الوسط التركيبي المدعم بـ 2.0 % (وزن/حجم) كلوكوز بوصفه مصدراً للكاربون (22).

أظهرت النتائج (الجدول 3) أن أضافة تراكيز مختلفة من الكلوكوز الى الوسط الغذائي أدى الى زيادة نمو بكتريا *S. meliloti* العزلة RW9 بزيادة تركيز المصدر الكاربوني المضاف الى وسط YEM السائل حيث بلغ أقصاه (0.91 غم/لتر) عند التركيز المدروس 2.5 % وبعد يومين من التحضين.

الجدول (3): تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكلوكوز الى الوسط الغذائي في نمو وأنتاج البولي-بيتا-هيدروكسي بيوتيريت (PHB) في بكتريا *Sinorhizobium meliloti* عزلة RW9 بعد يومين من التحضين.

الكلوكوز % (وزن/حجم)	الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر)	PHB غم/لتر	الأنتاج %
1.0	0.66 (±0.09)♦	0.43 (±0.54)	65.15
1.5	0.72 (±0.06)	0.55 (±0.22)	76.38
2.0	0.86 (±0.08)	0.71 (±0.11)	82.55
2.5	0.91 (±0.11)	0.50 (±0.30)	54.94

♦ كل قيمة تمثل معدل لثلاث مكررات. الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري.

تأثير مصادر نايتروجينية مختلفة على نمو العزلة المحلية RW9 *S. meliloti* وإنتاج الـ PHB :

أظهرت نتائج أضافة مصادر نايتروجينية مختلفة وبنسبة 0.10 % الى وسط MSY السائل والحاوي على 2.0 % كلوكوز (الجدول 4) أن أفضل مصدر نايتروجيني أعطى أفضل نسبة أنتاجية من الـ PHB هو حامض الكلوتاميك حيث بلغت نسبة الإنتاجية 86.51%. أن المصدر النايتروجيني الأسباراجين كان المصدر النايتروجيني الثاني الذي أعطى أفضل دعم للنسبة المئوية للأنتاج حيث بلغت النسبة 84.33 % أعقبه حامض الكازامينو والكلايسين بنسبة أنتاج 83.72 و 83.52 % على التوالي. أن أضافة كبريتات الأمونيوم كمصدر نايتروجيني الى وسط التخمير (YEM) السائل والمدعم بـ 2.0 % كلوكوز قد أدى الى تثبيط قليل في

النسبة المئوية لإنتاج الـ PHB حيث بلغت 82.14%. أزدادت نسبة التثبيط مع إضافة المصادر النايتروجينية اللاعضوية الأخرى مثل كلوريد الأمونيوم ونترات الصوديوم ونترات البوتاسيوم حيث بلغت نسبة أنتاجية الـ PHB 81.25 , 80.0 و 76.71 % على التوالي.

الجدول (4): تأثير إضافة مصادر نايتروجينية مختلفة الى الوسط الغذائي في نمو وأنتاج البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتيريت (PHB) في بكتريا *Sinorhizobium meliloti* عزلة RW9 بعد يومين من التحضين (الوسط مدعم بالكلوكوز 2.0 %).

المصادر النايتروجينية 0.10 % (وزن/حجم)	الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر)	PHB غم/لتر	الأنتاج %
$(NH_4)_2SO_4$	0.84♦ (±0.11)	0.69 (±0.13)	82.14
NH_4Cl	0.80 (±0.07)	0.65 (±0.27)	81.25
$NaNO_3$	0.75 (±0.04)	0.60 (±0.22)	80.00
KNO_3	0.73 (±0.09)	0.56 (±0.19)	76.71
أسباراجين	0.83 (±0.06)	0.70 (±0.44)	84.33
حامض الكلوتاميك	0.89 (±0.08)	0.77 (±0.29)	86.51
حامض الكازامينو	0.86 (±0.13)	0.72 (±0.18)	83.72
الكلايسين	0.85 (±0.05)	0.71 (±0.35)	83.52

♦كل قيمة تمثل معدل لثلاث مكررات. الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري.

أتفقت نتيجة دراستنا مع ما توصل اليه الباحث Bonartseva واخرون (23) حيث توصلوا الى أن أفضل مصدر نايتروجيني قد دعم أفضل محتوى من الـ PHB في خلايا بكتريا *R. leguminosarum* bv. *trifolii* كان الكلوتامين بوصفه مصدراً للنايتروجين. حيث كانت الأنتاجية أعلى في العزلات الفعالة في تثبيت النايتروجين عن تلك الأقل كفاءة في تثبيت النايتروجين حيث بلغت الأنتاجية 45.0 % من وزن الخلية الجاف. في حين كان المحتوى للـ PHB في الخلايا أقل بكثير عند أضافة أحماض عضوية مثل السكسنيت و الفيوماريت والأستيت. وأختلفت مع ما توصل اليه الباحث Mercan (21) حيث توصل الى أن أفضل تراكم للبوليمر الحيوي الـ PHB تم الحصول عليه من البكتريا *S. meliloti* العزلة Y11 كان 26.23 % وفي البكتريا *Bradyrhizobium japonicum* العزلة S Irat Fab كان 26.78 % المنماة في الوسط YEM السائل الحاوي على peptone Protease بوصفه مصدراً للنايتروجين. أما البكتريا *R. leguminosarum* bv. *viciae* فقد أنتجت 48.13 % من الـ PHB في وسط YEM السائل الحاوي على الأسباراجين بوصفه مصدراً للنايتروجين.

أختلفت نتائج الباحث Mercan واخرون (14) حيث أن أعلى نسبة لأنتاج الـ PHB في العزلات المدروسة من بكتريا الرايزوبيوم في الأوساط الحاوية على السستين والكلايسين بوصفهما مصدري للنايتروجين عند تنمية البكتريا *Rhizobium* spp. العزلة 2426 والعزلة 640 والتي بلغت 70.0 و 61.43 % على التوالي. وتوصل اخرون (18) أن أنتاجية الـ PHB في خلايا بكتريا *Azotobacter chroococcum* العزلة 1735 انه بوجود مستخلص اللحم ارتفعت الإنتاجية الى أكثر من 75.0 % من وزن الخلية الجاف بعد 48 ساعة من التحضين.

أما فيما يتعلق بنمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 فلم يحدث تغييراً واضحاً عند أضافة المصدر النايتروجيني حامض الكلوتاميك بنسبة 0.1 % (وزن/حجم) الى وسط YEM السائل والمضاف اليه الكلوكوز بتركيز 2.0 % (وزن/حجم) بوصفه مصدراً للكاربون. تناقصت معدلات الكتلة الحيوية عند أضافة المصادر النايتروجينية الأخرى الى حد أن بعض المصادر النايتروجينية كان مثبطاً لنمو الرايزوبيا مع أقل معدل للكتلة الحيوية الذي بلغ 0.73 غم/لتر عند أضافة المصدر نترات البوتاسيوم (الجدول 4).

تأثير إضافة تراكيز مختلفة من حامض الكلوتاميك في نمو العزلة *S. meliloti* RW9 وإنتاج الـ PHB:

بينت نتائج أضافة تراكيز مختلفة من حامض الكلوتاميك الى وسط YEM السائل (الجدول 5) أن التركيز 0.1 % قد أعطى أعلى نسبة أنتاج حيث بلغت 86.66 %. أستخدم الباحث Mercan واخرون (14) التركيز 1.0 % للمصدر النايتروجيني السستين في وسط YEM السائل والذي اعطى أفضل أنتاجية من الـ PHB والبالغة 74.03 % في البكتريا *Rhizobium* spp. العزلة 2426 بعد يومين من التحضين. أختلفت التراكيز المثلى من المصادر النايتروجينية لدعم أفضل أنتاجية من الـ PHB وبأختلاف المصادر النايتروجينية (18,10).

أوضحت نتائج أضافة تراكيز مختلفة من المصدر النايتروجيني حامض الكلوتاميك في نمو العزلة المحلية *S. meliloti* RW9 (الجدول 5) أن التركيز 0.05 % (وزن/حجم) أدى الى تثبيط أنتاج الكتلة الحيوية حيث بلغ معدل أنتاج الكتلة الحيوية 0.81 غم/لتر. وعند زيادة تركيز المصدر النايتروجيني المضاف الى 0.1 % (وزن/حجم) أدى الى زيادة معدل الكتلة الحيوية للرايزوبيا المدروسة حيث بلغ معدل الكتلة الحيوية المدروس 0.90 غم/لتر. أما أضافة حامض الكلوتاميك الى وسط YEM السائل وبالتركيز 0.15 % (وزن/حجم) فقد أدى الى زيادة في معدل الكتلة الحيوية, حيث بلغ المعدل 0.99 غم/لتر. وأن زيادة تركيز المصدر

النايتروجيني المضاف أدى الى بداية تضاؤل معدل الكتلة الحيوية حيث بلغ 0.97 غم/لتر عند التركيز 0.20 % (وزن/حجم) (الجدول 5).

أن الأنتاج العالمي لـ PHB وصل الى 96 % تقريباً من وزن الخلية الجاف من البكتريا *Alcaligenes lotus* (24) وأن ما تم التوصل اليه من نسبة أنتاج بلغت 86.66 % تعد نسبة عالية من عزلة محلية لبكتريا *S. meliloti* وتعد هذه العزلة واعدة لأنتاج أعلى فيما أذا عرضَت الى أحد المطفرات الفيزياوية أو الكيمياوية.

الجدول (5): تأثير أضافة تراكيز مختلفة من المصدر النايتروجيني حامض الكلوتاميك في نمو وأنتاج البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتيريت (PHB) في بكتريا *Sinorhizobium meliloti* عزلة RW9 بعد يومين من التحضين.

تركيز حامض الكلوتاميك % (وزن/حجم)	الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر)	PHB غم/لتر	الأنتاج %
0.05	(0.05±) 0.81♦	(0.12±) 0.68	83.95
0.10	(0.40±) 0.90	(0.19±) 0.78	86.66
0.15	(0.08±) 0.99	(0.23±) 0.74	74.74
0.20	(0.20±) 0.97	(0.27±) 0.70	72.16

♦كل قيمة تمثل معدل لثلاث مكررات. الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري.

المصادر

1) Anderson A.J. and Dawes E.A., Microbiol. Rev., 54: 450-472 (1990).

2) Page W.J., Canadian J. Microbiol., 141: (Supp. 1). 1-3 (1995).

3) Steinduchel A., Polyhydroxyalkanoic acids. In Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources,ed. by Byrom, D. Stockton, New York, pp. 124-213 (1991).

4) Stal L.J., FEMS Microbiol. Rev., 103: 169-180 (1992).

5) Muizniece-Brasava S., Ph.D. Thesis, Latvia University of Agriculture, Jelgava. Latvia (2006).

6) Defoirdt T., Halet D, Vervaeren H., Boon N., de Wiele T.V., Sorgeloos P., Bossier P. and Verstraete W., Environ. Microbiol., 9: 445-452 (2007).

7) Tombolini R., Povolo S., Buson A., Squartini A. and Nuti M.P., Microbiol., 141: 2553-2559 (1995).

8) Wang C., Saldanha M., Sheng X., Shelswell K.J., Walsh K.T., Sobral W.S. and Charles T.C., Microbiol., 253: 388-398 (2007).

9) Tabandeh F. and Vasheghani-Farahani E., Iran. Polymer J., 12: 37-42 (2003).

10) Yilmaz M., Soran H. and Beyatli Y., World J. Microbiol. & Biotechnol., 21:565-566 (2005).

11) Chandrashekharaiah P.S., M.Sc. Thesis, University of Agricultural Sciences, College of Agriculture, Dharwad, India (2005).

12) Khanuja S.P.S. and Kumar S., Indian J. Exp. Biol., 26: 665-667 (1988).

13) Vincent J.M. A manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP. Hanbook. No.15 Oxford Blackwell Scientific Publication Oxford Ltd., U.K. pp. 113-131 (1970).

14) Mercan N., Aslim B., Yuksekdag Z.N. and Beyatli Y., Turk. J. Biol., 26: 215-219 (2002).

15) Duta F.P., Franca F.P. and Lopes L.M.A., Proc. Biotechnol., 9: 391-398 (2006).

16) Ghate B., Pandit P., Kulkarni C., Mungi D.D. and Patel T.S., Interna. J. Pharma Bio. Sci., 2: 242-248 (2011).

17) Kumar B.S. and Prabakarn G., Indian J. Biotechnol., 5: 76-79 (2006).

18) Khanafari A., Sepahei A.A. and Mogharab M., Iran J. Health Sci. Eng., 3: 193-198 (2006).

19) Chaijamrus S. and Udpuay N. Agri. Eng. Interna., X: 1-12 (2008).

20) Bonartsev A.P., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Furina E.K., Makhina T.A., Livshits V.A., Boskhomdzhiev A.P., Ivanov E.A., Iordanskii A.L. and Bonartseva G.A., Appl. Microbiol., 27: 295-307 (2007).

21) Mercan N., Ph.D. Thesis, Pamukkale University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Denizli, Turky (2002).

22) Manna A., Banerjee R. and Paul A.K., Current Microbiol., 39: 153-158 (1999).

23) Bonartseva G., Myshkina V. and Zagreba E., Mycrobiol., 64: 40-46 (1995).

24) Fiechter A., Plastics from bacteria and for bacteria, Springer-Verlage, New York, U.S.A., 77-93 (1990).