الاقتران البكتيري كطريقة لتعيين مواقع الجينات المسؤولة عن بلمرة السكريات المتعددة في بكتريا *Bacillus subtilis*

د. خالد دحام احمد زينة وجيه الجادر يسرى عبد الرزاق الرفاعي

قسم علوم الحياة / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

٢٠١١ / ٠٧ / ٣١ ٢٠١١ / ١٠ / ٠٥

Abstract

The present study includes utilization of the bacterial conjugation between the local isolate *Bacillus subtilis* and the laboratory strain *Escherichia coli* K-12 JM83 in order to determine the location of genes involved in production of polysaccharides in *B. subtilis*. The results revealed that in presence of glucose and lactose in growing media as a carbon source separately, the bacteria *B. subtilis* yield polysaccharides of 9.38 g/l and 2,51g/l respectively. After conjugation, the JM83 trans conjugation isolate showed a remarkable reduction in polysaccharides yield (1.00 g/l) after growing in media containing lactose and no significant increase of polysaccharides yield in presence of glucose (3.00 g/l) these results may indicate that the genes sharing in polysaccharides production in *B. subtilis*, may be located on its chromosomal DNA and not on its plasmid DNA.

الخلاصة

تتضمن الدراسة الحالية استخدام الاقتران البكتيري بين العزلة المحلية *Bacillus subtilis* والسلالة المختبرية *Escherichia*.coli k-12 JM83 من اجل تعيين مواقع الجينات المسؤولة عن إنتاج السكريات المتعددة في بكتريا *B. subtilis*. أظهرت النتائج أن بوجود سكري الكلوكوز واللاكتوز كمصدر كاربوني كلاً على حدا في الوسط الغذائي فإن البكتريا *B. subtilis* أعطت إنتاجية للسكر المتعدد قدرت بـ ٩.٣٨غم/لتر و ٢.٥١ غم/لتر على التوالي. بعد إجراء الاقتران فان العزلة المقترنة من بكتريا JM83 أظهرت اختزالاً ملحوظاً في

إنتاجية السكر الم تعدد (.٠٥١ غم/لتر) بعد نموها في وسط يحتوي على اللاكتوز كمصدر كاربوني وكذلك لا توجد زيادة ذات أهمية في إنتاج السكر المتعدد بوجود الكلوكوز (٣.٠ غم/لتر) هذه النتائج ربما تشير بان الجينات المساهمة في انتاج السكر المتعدد واقعة على الـDNA الكروموسومي لبكتريا *B. subtilis* وليست على الـDNA البلازميدي لها.

المقدمة

تعد البكتريا *Bacillus subtilis* عصيات موجبة لصبغة كرام تنمو هوائياً على الاكار المغذي وتكون سبورات داخلية مقاومة ، معظمها تنتج إنزيم الكاتاليز وتنتج الحامض بدون غاز من تخمر الكلوكوز، مستعمراتها الجيدة غير م نتظمة. ويعد النوع *Bacillus subtilis* من أكثر الأنواع شيوعاً في الأغذية والعينات السريرية والمزارع المختبرية وهي رمية Saprophytes ومحبة للحرارة اختيارياً Facultative thermophilic لها القدرة على النمو بمدى ١٢-٥٥°م، سبوراتها مقاومة للحرارة ومستعمراتها ناعمة لز جة بيضاء اللون (١).

يعتبر السكر المتعدد الخارج خلوي الذي تنتجه البكتريا *B. subtilis* إثناء نموها من أهم أنواع السكريات المتعددة المايكروبية ، يتكون من ٩٤.٣ % سكر متعدد (كلوكوز، كالكتوز، فركتوز) و٥.٧% بروتين (٢). ويتميز بصفات كيم يائية متجانسة وصفات فيزيائية ن ادرة كاللزوجة العالية ومرونته الكاذبة وعدم حساسيته لمديات واسعة من درجات الحرارة، لذلك يستخدم بشكل واسع في المجالات الصناعية كمثبتات في صناعة الورق والحبر والسيراميك والصناعات التطبيقية ومن أهمها الصناعات النفطية (٣).

يحدث الاقتران البكتيري بانتقال المادة الوراثية باتجاه واحد أي من واهب له قدرة الإخصاب إلى المستلم ويتطلب الانتقال وجود عامل الخصوبة F-plasmid في الجراثيم الواهبة التي تحوي على الجينات المسؤولة عن تشفير بروتين يدعى pilin والذي يدخل في تكوين الشعيرات الموجودة على سطح الخلية الجرثومية الواهبة والتي تلعب دوراً مهماً في عملية الاقتران من خلال حدوث التماس بين الخلايا الواهبة والمستلمة (٤). وتنتقل البلازميدات بآلية الاقتران البكتيري إلى الخلية الأخرى حيث يمكن نقل المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وكذلك إنتاج الذيفانات من جنس إلى أخر من البكتريا بواسطة انتقال المادة الوراثية خارج الكروموسومية وهذه العملية تحصل في العديد من الأجناس (٥).

الهدف من البحث هو تعيين مواقع الجينات المشفرة للانزيمات المشاركة في عملية إنتاج السكريات المتعددة من البكتريا *B. subtilis*.

المواد وطرائق العمل

١) عزل البكتريا *B. subtilis*

تم عزل البكتريا *B. subtilis* من التربة باستخدام طريقة التخافيف المتسلسلة حيث تم اخذ ١ غم من التربة ووضعت في أنابيب اختبار معقمة حاوية على ١٠ مل من الماء المقطر والمعقم وتم تخفيفه لغاية ($١٠^{-٦}$). لقحت قطرة من كل تخفيف في أطباق بتري حاوية على وسط الاكار المغذي (Nutrient Agar) وحضنت في درجة حرارة ٢٨ ±١م^{o} لمدة ٢٤ ساعة ونقلت المستعمرات المنفردة التي تميزت بقوامها اللزج إلى أطباق حاوية على وسط الاكار المغذي وحضنت تحت نفس درجة الحرارة مدة ٣ أيام للحصول على عدة عزلات نقية (٦).

٢) السلالة *E. coli* k-12 JM83 المختبرية:

جهزت هذه السلالة من قبل الدكتور خالد دحام في مختبرات علوم الحياة /كلية التربية/ جامعة الموصل) علماً بان هذه السلالة خالية من البلازميدات.

٣) الفحوصات التشخيصية :

تم تشخيص بكتريا *B. subtilis* بإجراء الفحوصات التشخيصية على العزلة وشملت الاختبارات المذكورة من قبل Holt وKrieg (٧)، وهي صبغة كرام و اختزال النترات وإنتاج الاوكسيديز (Oxidase text) والكاتليز (Catalase test) وتحلل النشا والجيلاتين وتخمر السكريات وشملت السكروز واللاكتوز واجريت هذه الفحوصات استنادا إلى ما جاء في (٦).

٤) الأوساط الزرعية:

أ -وسط أكار مستخلص الخميرة والشعير :Yeast Malt Extract Agar

استخدم هذا الوسط لحفظ وتنشيط البكتريا *B. subtilis* وحضر حسب ماجاء في Hayens وجماعته (٨).

ب -وسط اللقاح: Inoculum Medium

يتكون هذا الوسط من مكونات الوسط السابق نفسها عدا افتقاره إلى الاكار وزع الوسط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠مل بواقع ٥٠مل لكل دورق ثم عقم بجهاز المؤصدة عند ضغط ١٥ باوند/انج^{٢} ودرجة حرارة ١٢١ ^{o}م مدة ١٥ دقيقة.

ج- وسط الإنتاج:

استخدم الوسط الموصوف من قبل Souw وDemain (٩) باعتباره وسط لإنتاج السكر المتعدد من قبل بكتريا *B. subtilis*. يتكون هذا الوسط من المواد الاتية (غم/لتر): كلوكوز ٣٠، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ٥.٠، كبريتات المغنيسيوم المائية ٠.٢، كبريتات الامونيوم

٢.٠، حامض الستريك ٢.٠، حامض البوريك ٠.٠٠٠٦، اوكسيد الزنك ٠.٠٠٠٦، كلوريد الحديد المائية ٠.٠٠٠٢٤، كاربونات الكالسيوم ٠.٠٠٢، حامض الهي دروكلوريك ٠.١٣، ضبط الاس الهيدروجيني عند ٠.٠٧. حضر الوسط ثم وزع في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل بواقع ١٠٠ مل لكل دورق، عقم الوسط بجهاز الموصدة عند ضغط ١٥ باوند/انج^{٢} ودرجة حرارة ١٢١ ^{o}م مدة ١٥ دقيقة، وبعد ذلك لقح بواسطة اللقاح المحضر بعمر ٤٨ ساعة وبنسبة لقاح ٤% ثم حضن بالحاضنة الهزازة عند درجة حرارة ٢٨ ±١^{o} م وبمعدل ١٥٠ دورة/دقيقة لمدة ٧ أيام.

اختبار المقاومة للمضادات الحيوية:

تم إجراء اختبار المقاومة للبكتريا *B. subtilis* لـ(٧) أنواع من مضادات الحيوية والمجهزة من قبل شركة Bioanalyse، وذلك بإتباع طريقة Bauer وجماعته (١٠)، قيست منطقة التثبيط (Inhibition zone) وهي المساحة حول الأقراص الخالية من النمو الجرثومي بعد التحضين لمدة (١٨-٢٤ ساعة) عند درجة حرارة ٢٨^{o}م وتم تسجيل النتائج حسب توصيات منظمة الصحة العالمية (١١).

استخلاص السكر المتعدد والكتلة الحيوية:

اجري استخلاص السكر المتعدد والكتلة الحيوية حسب ما ذكره Tait وجماعته (١٢) وبعد تحضين بكتريا *B. subtilis* في وسط الإنتاج لمدة ٧ أيام سحبت الدوارق من الحاضنة الهزازة ثم أجريت عليها عملية البسترة Pesteurization بالحمام المائي في درجة حرارة ٦٠ ^{O}م مدة ١٠ دقائق لغرض قتل الخلاي ا الجرثومية والحفاظ على البيئة المحلية من التلوث بهذه الجراثيم. تركت الدوارق بعد ذلك لكي تبرد وتم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي لكل دورق وأجريت عملية نبد مركزي عند (٩٠٠٠ دورة /دقيقة) لمحتوى كل دورق ولمدة ٣٠ دقيقة جمع الراسب في أطباق زجاجية صغيرة وموزونة م سبقاً وجففت في فرن كهربائي بدرجة حرارة ٦٠ ^{O}م مدة ٢٤ ساعة وتم احتساب الكتلة الحيوية للخلايا المترسبة . ولغرض تقدير السكر المتعدد في طبق الراشح الجرثومي فقد أخذ ١٠ مل منه وأضيف إليه ٣٠ مل من الاسيتون (بنسبة ١:٣)، ثم طرد مركزياً عند سرعة (٩٠٠٠ دورة /دقيقة) لمدة ٣٠ دقيقة ونقل السكر المتعدد المترسب في أطباق زجاجية معلومة الوزن وجففت محتوياتها في الفرن الكهربائي عند ٦٠ ^{O}م لمدة ٢٤ ساعة وتم احتساب وزن الكتلة الحيوية والسكر المتعدد بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس .

الاقتران البكتيري:

اجري الاقتران وفق طريقة Olsen وجماعته (١٣)، وذلك بتلقيح انبوبتين حاويتين على ٥ مل من وسط المرق المغذي بمستعمرة منفردة من بكتريا *B. subtilis* كعزلة واهبة ومستعمرة

منفردة من سلالة *E. coli* JM 83 المختبرية كسلالة مستلمة والتي تختلف بعليمتين وراثيتين (المقاومة والحساسية) للمضادات الحيوية وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ ±٢ °م لمدة ٤-٥ ساعات للوصول إلى الطور اللوغارتمي إذ كانت الكثافة الضوئية (Oplical density) ٠.٤-٠.٦ عند الطول الهوجي ٥٩٠nm.

وتم مزج ٠.١ مل من مزرعة الخلايا الواهبة مع ٠.١ مل من مزرعة الخلايا المستلمة أي نسبة ١:١ وأضيف إلى المزيج ٥ مل من وسط المرق المغذي وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ ±٢ °م لمدة ساعتين ، ثم نشر ٠.١ مل من مزيج الاقتران على وسط حاوي على مضادين حيويين بالتراكيز النهائية المستخدمة والذين استخدما كعلائم وراثية فضلاً عن ذلك تم تحضير أطباق سيطرة Control plates بنشر ٠.١ مل من كل مزرعة بكتيرية من الخلايا الواهبة والمستلمة على انفراد على تلك الأطباق الحاوية على المضادين الحيويين اعلاه وحضنت الأطباق جميعها عند درجة حرارة ٣٧ ±٢ °م لمدة ٢٤ ساعة.

كذلك اجري الاقتران البكتيري بوجود الإدرار المعقم بالترشيح (١٤) بين العزلة *B. subtilis* والسلالة *E. coli* JM 83 المختبرية في أنابيب اختبار معقمة حاوية على ٥ مل من الإدرار (ذات الأس الهيدروجيني ألحامضي)، حيث اخذ ٠.١ مل من كل من الخلية الواهبة والمستلمة في الطور اللوغارتمي وأضيف إليها ٥ مل من الإدرار وحضن المزيج في درجة حرارة ٣٧ ±٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ثم نشر ٠.١ مل م ن مزيج الاقتران على أطباق الأكار المغذي الحاوي على المضادين المختلفين كما مذكور أعلاه وحضرت أطباق سيطرة . ولوحظت نتائج الاقتران منفردة، أعيد زرع المستعمرات التي تم الحصول عليها من عملية الاقتران على الوسط نفسه الحاوي على المضادين الحيويين للتأكد من ثبوتية ا لصفة المكتسبة وأجريت الاختبارات البايوكيميائية للتأكد من جنس البكتريا المقترنة ثم حسب تردد الاقتران حسب ما جاء في (١٥).

النتائج والمناقشة

١) تشخيص بكتريا *B. subtilis* المعزولة من التربة

عند عزل البكتريا ظهرت مستعمراتها ملساء Smooth ولزجة القوام Mucoid بيضاء اللون على وسط الاكار المغذي وعند صبغها بصبغة كرام ظهرت بشكل عصوي موجب لصبغة كرام، مكونة للسبورات، أجريت عليها مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية وكما مبين في الجدول (١) وأوضحت النتائج أن البكتريا تعود إلى جنس *Bacillus* حسب الطريقة المذكورة في (٧).

الجدول (١): الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *B. subtilis*

الاختبارات	النتيجة	تخمر السكريات	النتيجة
اختبار الاوكسيديز	+	سكر الفركتوز	+
اختبار اليوريز	-	سكر المانوز	-
اختبار الكتاليز	+	سكرالسيليوبايوز	-

اختبار المثيل الحمر	−	سكر السكروز	+
اختبار فوكس بروكور	−	سكر اللاكتوز	−
اختبار الستريت	+		
اختبار الاندول	−		
تحليل النشا	+		
تحليل الجيلاتين	+		

الإشارة (−) تعني سالبة Negative و (+) تعني موجبة Positive

٢) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية :

اجري هذا الاختبار باستخدام طريقة الانتشار القياسية للمضادات وكما ذكر في المواد وطرائق العمل، إذ أظهرت بكتريا *B. subtilis* حساسيتها للمضادات الحيوية (Nalidixic acid، Tetracycline، Chloramphenicol، Neomycine) وبأقطار تثبيط (٣٥،٣٠،٢٥،٢٠، ٢٠ ملم) على التوالي في حين أظهرت البكتريا مقاومة للمضادين الحيويين Amoxicillin و Metronedazol وكما موضح في الجدول (٢). إن نمط المقاومة لأكثر من مضاد حيوي في العزلات الجرثومية ربما يعود إلى أن بعض الجينات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية قادرة على التعبير عن نفسها وتشفر أنزيمات قادرة على تحطيم المضادات الحيوية وبذلك تظهر المقاومة مما يدعم تواجد هذه الجينات على نفس جزيئة الـ DNA للبلازميد R في الخلية الجرثومية (١٦).

الجدول (٢): اختبار حساسية البكتريا *B. subtilis* للمضادات الحيوية.

المضادات الحيوية		التركيز (mcg)	الحساسية	قطر الحساسية (ملم)
Nalidixic acid	(Nal)	٣٠	S	٢٠
Cefoxitine	(cfo)	٣٠	S	٢٥
Amoxiciline	(Ax)	٢٥	R	-
Metronedazol	(Met)	٥	R	-
Tetracycline	(Te)	٣٠	S	٣٠
Chloramphenicol	(c)	٣٠	S	٣٥
Neomycin	(N)	٣٠	S	٢٠
Erythromycin	(Er)	١٥	R	-
Streptomycin	(St)	٥٠	S	٣٥

إذ تشير R إلى مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

إذ تشير S إلى حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

٣) الاقتران البكتيري:

بعد إجراء اختبار المقاومة للمضادات الحيوية للعزلتين *B. subtilis* و *E. coli* JM 83 حيث كانت البكتريا *Bacillus* مقاومة للمضاد Erythromycin وحساسة للمضاد

أما السلالة JM 83 كانت على العكس تماماً أي مقاومة للمضاد Streptomycine وحساسة للمضاد Erythromycin، بعدها اجري الاقتران ما بين العزلتين باستخدام المرق المغذي وكما جاء في فقرة المواد وطرائق البحث ولم نحصل على آية مستعمرة مقترنة على الإطلاق بوجود المرق المغذي لذلك اجري الاقتران باستخدام الإدرار كوسط مغذي بين العزلتين إذ نميت العزلة *B. subtilis* ذات العلائم الوراثية (Er^R ،Str^S) وسلالة الـ JM 83. ذات العلائم الوراثية (Er^S ،Str^R) إذ حضر مزيج الاقتران بأخذ ٠.١ من المزرعة البكتيرية من كل في العزلات المذكورة أعلاه وأضيف إليها ٥ مل من الإدرار المعقم وبعد التحضين لمدة ساعتين والفرش تم الحصول على مستعمرات مقترنة على وسط غذائي بوجود الادرار حيث انه ربما يحوي هرمونات وأنزيمات أو مواد محفزة لعمل ية الاقتران . أعيد زرع المستعمرات المقترنة على نفس الوسط الحاوي على المضادين الحيويين (Er^s ,Str^R)، أجريت الاختبارات الكيموحيوية والشكلية والمزرعية على المستعمرات المقترنة وأوضحت النتيجة بأنها كانت سالبة لصبغة كرام أي وردية عصوية وكانت موجبة لاختبار المثيل ا لأحمر الاندول على العكس من البكتريا *B. subtilis* فهي سالبة لهذه الاختبارات وذات صفات وراثية (Str^R ، Er^S) بلغ تردد الاقتران 0.27×10^{-5} (١٤).

إن نجاح عملية الاقتران البكتيري بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام *B. subtilis* وتلك السالبة لصبغة كرام سلالة الـ JM 83 وضحه (١٧) في دراسته عن الاقتران الجرثومي بين الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام وبين أن الاقتران ولكونه آلية لانتقال المادة الوراثية بين مدى واسع من المضايف لذلك انتقلت مورثات المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام Erythromycin، Tetracycline من جرثومة *Staphylococcus .aureus* إلى جرثومتي *E. coli* و *Klebsiella pneumonia* وبالمثل تنتقل المقاومة للمضادات Amikacin، Kanamycin، Streptomycin ومجموعتي مضادات Macrolides و Lincesamides إلى جرثومة *Campylobacter coli*.

٤) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للمستعمرات المقترنة.

بعد إجراء الاقتران البكتيري بين العزلتين عزلة *B. subtilis* وسلالة JM83 *E. coli* تم اختبار حساسية العزلة JM83 المقترنة للمضادات الحيوية إذ أظهرت العزلة حساسيتها للمضادات الحيوية (Cefoxitine، Amoxicilline، Tetracycline، Chloramphenicol) وباقطار حساسية (٣٠، ٣٠ ، ٢٧، ٨ ملم) على التوالي في حين

أظهرت هذه البكتريا مقاومة للمضادات الحيوية (Nalidixic acid، Metronedazol، Neomycine) وكما موضح في الجدول (٣).

الجدول (٣): اختبار حساسية البكتريا المقترنة للمضادات الحيوية

المضادات الحيوية	التركيز (mcg)	الحساسية	قطر الحساسية (ملم)
Nalidixic acid	30	R	—
Cefoxitine	30	S	30
Amoxicilline	25	S	30
Metronedazol	5	R	—
Tetracycline	30	S	27
Chloramphenicol	30	S	27
Neomycine	30	R	—

إذ تشير R إلى مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

إذ تشير S إلى حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

من ملاحظة نتائج الجدول (٣) تبين أن هناك انتقالاً لمقاومة المضادات الحيوية Amoxicilline و Neomycine المشفرة من قبل الـ DNA البلازميدي والتي استطاعت إن تعبر عن نفسها في المضيف الجديد (سلالة JM83) ومنحت المقاومة لسلالة JM83 لكل من المضادين الحيويين Amoxicilline و Neomycine، حيث من المحتمل انتقال نوع من البلازميدات نتيجة عملية الاقتران مابين عزلة الـ *B. subtilis* وسلالة *E. coli* JM83 هذا البلازميد من المحتمل أن يكون حاوياً على جينات مانحة المقاومة للمضادين الح يويين Amoxicilline و Neomycine على أساس أن سلالة *E. coli* JM83 هي المستقبلة وعزلة الـ*B. subtilis* هي الواهبة.

٥) إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي من بكتريا *B. subtilis* باستخدام مصدرين كاربونيين.

أظهرت النتائج الواردة في الجدول (٤)، عند استخدام المصدر الكاربوني اللاكتوز بنسبة ٣% في وسط الانتاج المذكور كما ورد في المواد وطرائق العمل أن هناك إنتاجية عالية من السكر المتعدد الخارج خلوي إذ بلغت (٩.٣٨ غم/لتر)، في حين كانت إنتاجية السكر المتعدد باستخدام الكلوكوز بوصفه مصدراً كاربونياً (٢.٥١ غم/لتر). لقد عزز سكر اللا كتوز في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي و ربما يعزى السبب في ذلك إلى قدرة البكتريا *B. subtilis* على استغلال اللاكتوز من خلال الفعالية العالية لإنزيم بيتا كالكتوسايدس β-galactosidase الذي تنتجه البكتريا والذي يعمل على تكسير اللاكتوز الى كلوكوز وكالكتوز وهذ ه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه الباحثين من أمكانية استخدام اللاكتوز بوصفه

مصدراً كاربونياً لإنتاج السكريات المتعدد باستخدام تقنية الهندسة الوراثية (١٨) وتتفق مع ما توصل إليه الصميدعي (١٩) من استخدام سكر اللاكتوز بوصفه مصدراً كاربونياً لإنتاج السكر المتعدد الزانثان باستخدام المزارع المختلطة من البكتريا *Xanthamonas compestris* ATCC 13951 والخميرة *Klyveromyces lactis* في الوسط الغذائي الحاوي على سكر اللاكتوز. أما فيما يتعلق بالكتلة الحيوية فقد انخفض انتاجها حيث بلغت (٠.٧٦ غم/لتر) عند استخدام سكر اللاكتوز، ولعل السبب في تناقص الكتلة الحيوية يعود إلى نفاذ المغذيات في الوسط وتراكم مواد الأيض في أثناء التخمر في حين كانت إنتاجية الكتلة الحيوية باستخدام سكر الكلوكوز أعلى إذ بلغت (١.٥٣ غم/لتر) ويعزى ذلك لسهولة تمثيل الأحياء الدقيقة له. وهذه النتيجة قريبة من نتائج كثير من البحوث إذ أكد كل من (٩ ، ٢٠ ، ٢١) أن الكلوكوز أعطى إنتاجية عالية من الكتلة الحيوية. أما فيما يخص الأس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض على نحو اعتيادي ويعزى هذا إلى إنتاج البكتريا لعدد من النواتج الأيضية الثانوية الحامضية التي أدت إلى انخفاض الأس الهيدروجيني النهائي.

٦) إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي من العزلة المقترنة باستخدام مصدرين كاربونين مختلفين:

بعد إجراء عملية الاقتران البكتيري بين العزلة *B. subtilis* والسلالة JM83 تم تنمية العزلة الناتجة من الاقتران على وسط الإنتاج المذكور وكما ورد في مواد وطرائق ال بحث وبعد إجراء التحليل، أظهرت نتائج استخدام المصدر الكاربوني الكلوكوز في وسط الإنتاج بنسبة ٣% إلى زيادة في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي حيث كانت (٣.٠٠ غم/لتر) بالمقارنة بإنتاجية البكتريا المحلية *B. subtilis* قبل عملية الاقتران (٢.٥١ غم/لتر) وهذه النتيجة قريبة لنتائج كثير من الباحثين حيث أكدوا أن الكلوكوز يعزز إنتاج السكريات المتعددة المايكروبية المنتجة من البكتريا أو الفطريات (٢٠ ، ٢١).

وأظهرت نتائج استخدام المصدر الكاربوني اللاكتوز في وسط الإنتاج بنسبة ٣% إلى انخفاض انتاج السكر المتعدد بشكل كبير وم لحوظ إذ بلغت (١.٥ غم/لتر) مقارنة بالإنتاجية التي تم الحصول عليها من العزلة المحلية *B. subtilis* قبل عملية الاقتران حيث كانت (٩.٣٨ غم/لتر) كما في الجدول (٤) وهذا يدل على ضعف قابلية العزلة ال مقترنة على استغلال سكر اللاكتوز أي أن العزلة المقترنة تمتلك فعالية و اطئة لأنزيم بيتا كالكتوسايديس (β-galactosidase) المسؤول عن تكسير اللاكتوز إلى كلوكوز وكالكتوز علماً بان بكتريا JM83 تحوي ترقيناً لجزء من الجين LacZ المسؤول عن تشفير β-galactosidas كما ورد في نمطها الوراثي، كذلك الحال بالن سبة للكتلة الحيوية حيث انخفضت إنت اجيتها، وهذه النتيجة قريبة لما توصل إليه الجادر (٢٢) من أن سكر اللاكتوز لا يدعم إنتاج السكر المتعدد الزانثان

من بكتريا *Xanthamonas compestris* ATCC 13951 ، وكما بين الشاهري (٢٣) من أن اللاكتوز لا يدعم إنتاج البوليولان من فطر *Aureobasidium pullulan* لنفس السبب.

أضف إلى ذلك فان قيمة الإنتاجية للسكر المتعدد بوجود سكر اللاكتوز في السلالة المختبرية (١.٦٢ غم/لتر) هي اكبر لتلك في السلالة المختبرية المقترنة (١.٥غم/لتر) وكذلك هناك زيادة في الإنتاجية بوجود سكر الكلوكوز من ٢ الى٣ غم/لتر بعد إجراء عملية الاقتران.

إن النتيجة التي تم الحصول عليها تؤشر بأن الجينات المسؤولة عن بلمرة السكريات المتعددة في البكتريا الواهبة *B. subtilis* ربما واقعة على الـ DNA الكروموسومي لها، وهذا يتفق مع ما أشارت اليه البحوث عن توصيف الجينات المسؤولة عن التخليق الحياتي للسكريات المتعددة الدهنية في بكتريا *E. coli* و *Salmonella eraterica* إن هذه الجينات توجد في قطعة من كروموسوم هذه البكتريا وهي waa (rfa) بشكل تجمع جيني . أضف إلى ذلك فان البحوث العلمية والتي تتعلق بالجينات waa قد تم تعيين موقعها في Gram-negative bacteria اخرى مثل *Brodetella* وبينت النتائج أن هذه الجينات احتلت نفس المواقع في بكتريا *E. coli* و *Salmonella eraterica* (٢٤).

الجدول (٤): قيم الكتلة الحيوية وتراكيز السكريات المتعددة في العزلات المحلية والعزلات المقترنة

البكتريا	المصدر الكاربوني	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	السكر المتعدد (غم/لتر)	الـ pH النهائي
العزلة المحلية	لاكتوز	٠.٧٦ (٠.٠٤)	٩.٣٨(٠.٠١)	٥.٧٨ (٠.٠٢)
B. subtilis	كلوكوز	١.٥٣ (٠.١٢)	٢.٥١(٠.١٩)	٥.٦٢ (٠.٠٣)
العزلة المختبرية	لاكتوز	٢.٤٥ (٠.٠١)	١.٦٢ (٠.٠١)	٦.٢١ (٠.٠٨)
***E.coli* JM 83**	كلوكوز	٢.٢٧ (٠.٠٣)	٢.٠٠(٠.٠٢)	٦.١٣ (٠.٠٣)
العزلة الناتجة من	لاكتوز	٠.٣٦ (٠.٠١)	١.٥٠ (٠.٠٢)	٦.١٢ (٠.١٧)
الاقتران البكتيري	كلوكوز	٠.٣٠ (٠.٠٣)	٣.٠٠ (٠.٠٥)	٦.٠١ (٠.١٩)

القيم الواردة في أعلاه تمثل معدل مكررين، النتائج بين القوسين تمثل الانحراف المعياري (.C.D)

المصادر

1) Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marimon, B.P. and Simmons, A., (Eds.). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology". 4th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. (1996).

2) Patil, S. V.; Bathe, G. A.; Patil, A. V. and Patil, R. H.; Salunkea, B. K. Vol. 8:14-17. (2009).

3) Devuyst, L. and Degeest, B.. Microbiol. Rev. 23: 153-356 (1999).

4) Atlas, R.M. "Principles of Microbiology". 1st ed., Mos by-year Book, Inc., St. Louis, U.S.A. (1995).

5) Chinedum, Ch. S.; Abdullah, N.; Siang, T.W. and Wan, H.Y. J. Microbiol., 43: 251-256. (2005).

6) Freileder, D. "Molecular biology, a comprehensive introduction to prokaryotes and eukaryotes". Science books international, Van nostrand, Reinhold company, Washing ton, U.S.A. (1983).

7) Holt, J. G., Krieg, N. R.; Sneath, P.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. "Bergeys Manual of Determintive bacteriology". Williams of Wilkins U.S.A. (1994).

8) Hayens, W. C.; Wickerham, L. J. and Hesseltine, C. W. Appl. Microbialk.3:361-368. (1955).

9) Souw, P., and Demain, A.L Appl. Environ. Microbiol. 37:1186-1192. (1979).

10) Bauer, A.W.; Kirbay, W.A.W.; Sherris, J.S. and Turk, M. Am. J. clin. Panthol.,45:493-496. (1966).

11) Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuk, C. "Basic Laboratory procedures in clinical bacteriology". World Health Organization, Geneva. (1991).

12) Tait, M.L.; Sutherland, L.W. Sturman, A.J.C. Gen, J. Microbiol. 132:1483-1492. (1986).

13) Olsen, J.E.; Brown, D.J.; Baggesen, D.L. and Bisgaard, M. Infect., 108:243-260. (1992).

14) Schaberg, D.; Richmond, M.; SKyes, R. Antimicrob. Agents chemother., 11:449-450. (1977).

15) Salle, A.J. "Fundamental Principles of Bacteriology". 7th ed., McGraw- Hill Book Company, New York, U.S.A. (1973).

16) Rasool, S.A: Ahmed, A.; Khan, S. and Wahab, A. J. Bot., 35: 243-248. (2003).

17) Courvalin, P. Antimicrob. Agents. J. Chemother., 38:1447-1451. (1994).

18) Walsh, P.M.; M.J. Haas, and G.A. Appl. Environ. Microbial. 47:253-257. (1984).

١٩) الصميدعي، طه عبد الوهاب خميس ، رسالة ماجستير / كلية التربية / جامعة الموصل/العراق. (٢٠٠١).

20) Shin, L.; Kim, Y.H.; Lee, K.S.; Kim, Y.N. and Byun, S.M. Biotecnol. Letts. 9:621-624. (1987).

21) West, T.P. and Reed-Hamer, B. Microbios. 67:117-124. (1991).

٢٢) الجادر، زينة وجيه حميد ، رسالة ماجستير / كلية التربية / جامعة الموصل / العراق. (٢٠٠٥).

٢٣) الشاهري، يوسف جبار اسماعيل ، رسالة ماجستير / كلية التربية / جامعة الموصل / العراق. (١٩٩٩)

24) Regue, M.; Climent, N.; Abitiu, N.; Codevch, N.; Nerino, S.; Izquiedo, L.; Altarriba, M. and Tomas, J. M.. Genetic. J. of Bacteriol. 183: 3264-3573. (2001).