تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase

احمد طلال حكمت

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام	تاريخ القبول
2013/05/19	2013/06/05

ABSTRACT

The study was conducted in order to create the best conditions (physical and chemical factors) that necessary for the growth of the *Bacillus subtilis* and its production of the Xylanase enzyme.

The results include isolation and diagnosis of (40) isolates of bacteria: *Bacillus subtilis* obtained from (30) soil samples and study the effect of some physical factors (period and temperature of incubation, pH of the medium, ventilation) on bacterial growth and its production of an Xylanase enzyme. The results showed that best growth and its production of the enzyme was obtained when the incubation is (48) hours and the temperature (30) C^o , pH of the medium (7) and incubation with shaking at (200) rpm where the optical density value of bacterial growth was reached (0.25) and activity of the enzyme product was (3.41) unit / ml. The effect of some chemical agents (carbon and nitrogen source for medium) on bacterial growth and its production of an Xylanase enzyme and the results revealed that the carbon source (Xylan) gave the best growth and production of the enzyme compared with other of carbon sources (Starch, Cellulose, Xylose, Glucose, Sucrose, Maltose, Lactose), where the optical density value of growth was (0.25) and the enzyme activity (3.41) unit / ml. Regarding the effect of the nitrogen source (organic and inorganic) in medium on growth and production of the enzyme, the results showed that the best bacterial growth and the production of an Xylanase enzyme occur when organic nitrogen sources (Peptone, Beef extract, Yeast extract, Casien) were supplemented in the medium compared with inorganic nitrogen sources (KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, $NaNO_3$). Peptone and Yeast extract were the best nitrogen sources for stimulation of bacterial growth and the production of

the enzyme with optical density value of growth reached (0.29 , 0.286) and the enzyme activity was (3.92 , 3.9) unit / ml.

الخلاصة

أجريت الدراسة بهدف إيجاد أفضل الظروف الزرعية (العوامل الفيزيائية والكيميائية) الضرورية لنمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase.

تضمنت نتائج الدراسة عزل وتشخيص (40) عزلة من بكتريا *Bacillus subtilis* المأخوذة من (30) عينة تربة وعند دراسة تأثير البعض من العوامل الفيزيائية (فترة ودرجة حرارة التحضين، الرقم الهيدروجيني للوسط، التهوية) على النمو البكتيري وإنتاج أنزيم Xylanase. أظهرت النتائج أن أفضل نمو وإنتاج للأنزيم حصل عند فترة تحضين (48) ساعة ودرجة حرارة (30) م^{o} ورقم هيدروجيني للوسط (7) والتحضين بحاضنة هزازة بسرعة (200) rpm إذ بلغت قيمة الكثافة الضوئية للنمو البكتيري (0.25) وبلغت فعالية الأنزيم المنتج (3.41) وحدة/مل. أما تأثير بعض العوامل الكيميائية (المصدرين الكاربوني والنيتروجيني للوسط) على النمو البكتيري وإنتاج أنزيم Xylanase وبينت النتائج أن المصدر الكاربوني (Xylan) أعطى أفضل نمو وإنتاج للأنزيم مقارنة بالمصادر الكاربونية الأخرى (Starch، Cellulose، Xylose، Glucose، Sucrose، Maltose، Lactose) إذ بلغت قيمة الكثافة الضوئية للنمو (0.25) وفعالية الإنزيم بلغت (3.41) وحدة/مل. أما فيما يخص تأثير المصدر النيتروجيني (العضوي وغير العضوي) في الوسط الزرعي على النمو وإنتاج الأنزيم إذ بينت النتائج أن أفضل نمو بكتيري وإنتاج لأنزيم Xylanase كان عند توفر المصادر النيتروجينية العضوية (Peptone، Beef extract، Yeast extract، Casien) المضافة الى الوسط الزرعي مقارنة بالمصادر النيتروجينية الغير عضوية (KNO_3، $(NH_4)_2SO_4$، NH_4NO_3، $NaNO_3$). يعد Peptone و Yeast extract أفضل المصادر النيتروجينية في تحفيز النمو البكتيري وإنتاج الأنزيم إذ بلغت قيمة الكثافة الضوئية للنمو (0.29، 0.286) وفعالية الأنزيم بلغت (3.92، 3.9) وحدة /مل.

المقدمة

لبكتريا *Bacillus subtilis* العديد من الاستخدامات أهمها كعامل محفز مناعي في علاج العديد من أمراض القنوات البولية والهضمية ولها دور مهم في منع التأثير الإشعاعي الصادر عن الفضلات الإشعاعية نتيجة امتلاكها لصفة الالتصاق على سطح تلك الفضلات وتعمل البكتريا ايضاً على تحويل بعض المواد الضارة للإنسان إلى مركبات بسيطة غير ضارة وفضلاً

عن ذلك تستعمل في إنتاج العديد من المركبات المهمة في الصناعات الغذائية والدوائية منها α-amylase و Hyaluronic acid [5] [19].

إن نمو البكتريا *Bacillus spp.* وإنتاجها للإنزيمات يتأثر بعوامل فيزيائية كدرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتهوية وبعوامل كيميائية كنوعية المصدر الكاربوني والنتروجيني للوسط الزرعي وغيرها من العوامل، إذ تختلف التأثيرات بحسب النوع والعزلة والسلالة البكتيرية المستخدمة وذلك بالاعتماد على التركيب الجيني للبكتريا وتكيفاتها بالبيئة التي تعيش فيها [25]

إن إنتاج الأنزيمات الخارج خلوية الصناعية يكون واسع النطاق من خلال استعمال العزلات الميكروبية التي تعطي أعلى إنتاج مقارنة باستعمال المصادر النباتية والحيوانية [2]. تعد أنزيمات Xylanases من الأنزيمات الخارج خلوية المنتجة صناعياً وتنتج من قبل العديد من البكتريا والفطريات والخمائر والنباتات والحيوانات. يعد الجنس البكتيري Bacillus من أهم المصادر البكتيرية المستخدمة في الإنتاج والمتضمن عدة أنواع منها *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* و *Bacillus pumilus* و *Bacillus coagulans* و *Bacillus licheniformis* و *Bacillus stearothermophilus* [7].

تعمل أنزيمات Xylanases على تحلل D-Xylan (الذي هو متعدد سكريات غير متجانس يتركب من وحدات من D-Xylosyl المرتبطة بآصرة من نوع β- D-(1,4)) بشكل كامل إلى وحدات صغيرة من السكر D-Xylose من خلال التحلل المائي للأواصر β- D-(1,4) نتيجة فعل نوعين من الأنزيمات هما أنزيمات Endo-β-xylanases التي تعمل على السلاسل الرئيسية للزيلان والثانية أنزيمات β-xylosidases التي تحلل مركب Xylo-oligosaccharides (الناتج بفعل أنزيمات Endo-β-xylanases) لينتج سكر D-Xylose، إذ أن البعض من الأحياء المجهرية تنتج النوعين من الأنزيمات بينما البعض الآخر ينتج فقط النوع الأول من الأنزيمات Endo-β-xylanase كبكتريا *Bacillus subtilis* [20] [8].

لأنزيمات Xylanases استعمالات عدة أهمها المساهمة في تحسين عملية الهضم للغذاء من قبل الحيوانات وتليين الفواكه وترويق العصائر والتحويل الحيوي للفضلات الزراعية وإطلاق الزيوت النباتية وتحسين كثافة البيرة وفي صناعة الورق واستخلاص القهوة وتحسين عجين دقيق الحنطة والخبز المنتج [21].

ففي الدراسة الحالية سيتم دراسة تأثير بعض تلك العوامل على نمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase.

المواد وطرائق العمل

- **المواد :**
- **عينات التربة :** جمعت (30) عينة من الترب المأخوذة من مناطق مختلفة ضمن مدينة الموصل.
- **الوسط الزرعي السائل Sorenson broth medium :** حضر بإضافة العديد من المواد وكما موضح في الجدول (1) وضبط رقمه الهيدروجيني عند (7) [1].

الجدول (1) : المواد الكيميائة المستخدمة في تحضير الوسط Sorenson broth medium وكمياتها.

المادة	الكمية (غرام / لتر)
Xylan	2
NH_4NO_3	1
K_2HPO_4	0.5
NaCl	0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.5
$FeSO_4.6H_2O$	0.02

- **محلول (DNS) 3,5-dinitrosalicylic acid :** حضر بحسب [14]، جرى التحضير بإضافة (10) غم من NaOH إلى (700) مل من الماء المقطر مع المزج المستمر وأضيف إليه (300) غم من Na-K tratrate وبعد تجانس المزيج تم إضافة (10) غم من 3,5-dinitrosalicylic acid و (0.5) غم من Na_2SO_4 والفينول بكمية (2) غم ومع التحريك المستمر بعد كل إضافة وبعدها كُمِلَ الحجم إلى (1000) مل باستخدام الماء المقطر وجرى حفظ المزيج بعيداً عن الضوء لغرض الاستعمال.

- **طرائق العمل :**

أ/ العزل والتشخيص :

حضرت عدة تخافيف من عينات الترب وزرعت على وسط Nutrient agar (Difco) وحضنت بدرجة (30) م° ولمدة (24) ساعة وبظروف هوائية وبعد انتهاء فترة التحضين شخصت البكتريا بالاعتماد على الخصائص الزرعية والصبغية والاختبارات الكيموحيوية واستناداً إلى [9].

ب/ تحضير الوسط الزرعي الملقح بالعزلة البكتيرية *Bacillus subtilis* :

لقح (20) مل من الوسط Sorenson broth medium بـ (0.2) مل من المزرعة البكتيرية السائلة لعزلة واحدة من البكتريا *Bacillus subtilis* وبعمر (18) ساعة، لغرض استخدام الوسط الملقح في تجارب تأثير البعض من العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو البكتريا وإنتاجها لأنزيم Xylanase.

ج/ تأثير بعض العوامل الفيزيائية على نمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase [11] [20] :

- فترة ودرجة الحرارة التحضين :

تم عمل ثلاث مكررات من الوسط الزرعي وحُضِنَ بفترات زمنية مختلفة (24، 48، 72) ساعة وبدرجات حرارة مختلفة (20، 30، 40) م° في حاضنة هزازة بسرعة (150) rpm.

- الرقم الهيدروجيني :

ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط المستخدم قبل التلقيح عند درجات مختلفة (4، 5، 6، 7، 8، 9، 10) وبثلاث مكررات لكل رقم هيدروجيني وبعد التلقيح البكتيري حُضِنت الأوساط عند أفضل فترة تحضين ودرجة حرارة (التي أعطت في التجربة السابقة (تأثير فترة التحضين ودرجة الحرارة) أفضل نمو وإنتاج لأنزيم Xylanase) وتمثلت بفترة تحضين (48) ساعة وبدرجة حرارة (30) م° واستخدمت الحاضنة الهزازة في التحضين بسرعة (150) rpm.

- التهوية :

تم عمل ثلاث مكررات من الوسط الزرعي الملقح واستخدمت ظروف النمو (فترة التحضين (48) ساعة وبدرجة حرارة (30) م° ورقم هيدروجيني عند (7)) والتي أعطت في التجارب السابقة أفضل نمو وإنتاج لأنزيم Xylanase وباستخدام الحاضنة الهزازة بسرعتين (150 و 200) rpm.

د/ تأثير بعض المصادر الكاربونية والنايتروجينية على نمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase [21] [1] :

جرى استبدال المصدرين الكاربوني والنتروجيني للوسط الزرعي المستخدم قبل تلقيحه وبنفس الكمية الموجودة في الوسط وكلُ على حدا إذ تم تغيير المصدر الكاربوني للوسط (Xylan) بمصادر كاربونية أخرى (Starch، Cellulose، Xylose، Glucose، Sucrose، Maltose، Lactose) وتم استبدال المصدر النتروجيني للوسط (NH_4NO_3) بمصادر نتروجينية منها عضوية (Peptone، Beef extract، Yeast extract، Casien) وأخرى غير عضوية (KNO_3، $(NH_4)_2SO_4$، $NaNO_3$) وضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند (7)

واعتمد الوسط الزرعي نفسه قبل تغيير المصدرين الكاربوني والنتروجيني له كعينة سيطرة وبعد تلقيح الوسط (عمل ثلاث مكررات من كل مصدر) حضنت الأوساط عند أفضل الظروف التي أعطت أعلى نمو بكتيري وإنتاج لأنزيم Xylanase تحت تأثير بعض العوامل الفيزيائية قيد الدراسة (التحضين بدرجة حرارة (30) م° وبفترة تحضين (48) ساعة في الحاضنة الهزازة بسرعة (200) rpm).

هـ/ قياس النمو البكتيري :

استخدم جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer لقياس الكثافة الضوئية للنمو البكتيري وعند طول موجي (600) نانوميتر.

و/ قياس فعالية الأنزيم Xylanase :

– **تحضير الراشح البكتيري :** بعد انتهاء التجارب جرت عملية الفلترة لجميع الأوساط الزرعية السائلة المستخدمة باستخدام مرشحات غشائية وبعدها طردت مركزياً بسرعة (5000) rpm ولمدة (10) دقائق وفُصِل الراشح لغرض قياس فعالية الأنزيم Xylanase.

– **طريقة قياس الفعالية :** تمت بقياس كمية السكر المختزل المتحرر من (1)% من Xylan وبموجب طريقة [14]، جرت بمزج (0.1) مل من الراشح مع (0.9) مل من الماء المقطر و (1) مل من محلول Citrate buffer برقم هيدروجيني (5) (يحتوي على Xylan بتركيز (1)%) والتحضين بدرجة حرارة (50) م° ولفترة (20) دقيقة وبعد انتهاء فترة التحضين عُرِضَ المزيج للطرد المركزي بسرعة (5000) rpm ولمدة (10) دقائق وتم اخذ (0.5) مل من الراشح ومزجها مع (0.5) مل من محلول (DNS) وغُلِيَ المزيج لمدة (10) دقائق وبعد برودة المزيج قيست امتصاصية كمية السكر المختزل بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي (540) نانوميتر واستخدم المنحني القياسي لسكر الزايلوز النقي لتقدير كمية السكر المختزل المتحرر (المكافئ لسكر الزايلوز) وبعدها تم حساب فعالية الأنزيم بالاعتماد على القانون الذي ينص على أن وحدة واحدة One Unit من الأنزيم المفرز Xylanase من البكتريا تحدد بقيمة الأنزيم اللازمة لتحرير (1) مايكرومول من السكر المختزل لكل (1) مل ولكل (1) دقيقة تحت ظروف التفاعل [24].

النتائج والمناقشة

أ/ العزل والتشخيص :

أظهرت نتائج الدراسة إلى عزل وتشخيص (40) عزلة من بكتريا *Bacillus subtilis* من التربة واعتمدت الصفات الزرعية والصبغية وإنتاجها للسبور فضلاً عن الاختبارات الكيموحيوية في التشخيص وبحسب [22].

تعد البكتريا *B. subtilis* من الأحياء المجهرية الواسعة الانتشار في الطبيعة وخصوصاً في التربة وذلك لتحملها للظروف البيئية القاسية من خلال تكوينها للسبورات المقاومة للعوامل البيئة المختلفة وأشار العديد من الباحثين إلى وجود هذه البكتريا ايضاً في القناة الهضمية للإنسان وبشكل طبيعي [13].

ب/ تأثير بعض العوامل الفيزيائية على نمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase :

- فترة ودرجة الحرارة التحضين :

يوضح الجدول (2) الدور المؤثر لعاملي (فترة التحضين ودرجة الحرارة) على نمو العزلة البكتيرية *Bacillus subtilis* إذ بلغت الكثافة الضوئية للنمو البكتيري عند درجة حرارة التحضين (20) م° في الوسط السائل (0.04) و (0.082) و (0.073) باستخدام فترات التحضين (24) و (48) و (72) ساعة على التوالي وبلغت الكثافة الضوئية للنمو (0.1) و (0.23) و (0.19) على التوالي عند التحضين بدرجة الحرارة (30) م° وبنفس فترات التحضين وأما عند درجة الحرارة (40) م° بلغت الكثافة الضوئية للنمو وباستخدام نفس فترات التحضين السابقة (0.072) و (0.17) و (0.11) على التوالي، نستنتج من ذلك إن أفضل نمو بكتيري حصل عند التحضين بدرجة حرارة (30) م° وبفترة (48) ساعة إذ بلغت قيمة الكثافة الضوئية للنمو البكتيري (0.23).

أما من ناحية إنتاج العزلة البكتيرية *B. subtilis* لأنزيم Xylanase (الجدول 2) لوحظ إن قيم فعالية الأنزيم عند التحضين بدرجة الحرارة (20) م° بلغت (0.88) و (1.46) و (1.24) وحدة/مل باستخدام فترات التحضين (24) و (48) و (72) ساعة على التوالي وعند استخدام درجة الحرارة (30) م° في التحضين بلغت قيم الفعالية للانزيم (1) و (3.1) و (2.2) وحدة/مل على التوالي وبنفس فترات التحضين بينما بلغت الفعالية (0.93) و (2.04) و (1.54) وحدة/مل على التوالي وبنفس فترات التحضين عند استخدام درجة الحرارة (40) م°، نستنتج من ذلك إن أفضل قيمة لفعالية أنزيم Xylanase بلغت (3.1) وحدة/مل عند درجة الحرارة (30) م° وبفترة تحضين (48) ساعة.

الجدول (2) : تأثير فترة ودرجة حرارة التحضين على نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase.

فترة التحضين (ساعة)	درجة حرارة التحضين (م°)	الكثافة الضوئية للنمو	فعالية الانزيم (وحدة/مل)
24	20	0.04	0.88
	30	0.1	1
	40	0.072	0.93
48	20	0.082	1.46
	30	0.23	3.1
	40	0.17	2.04
72	20	0.073	1.24
	30	0.19	2.2
	40	0.11	1.54

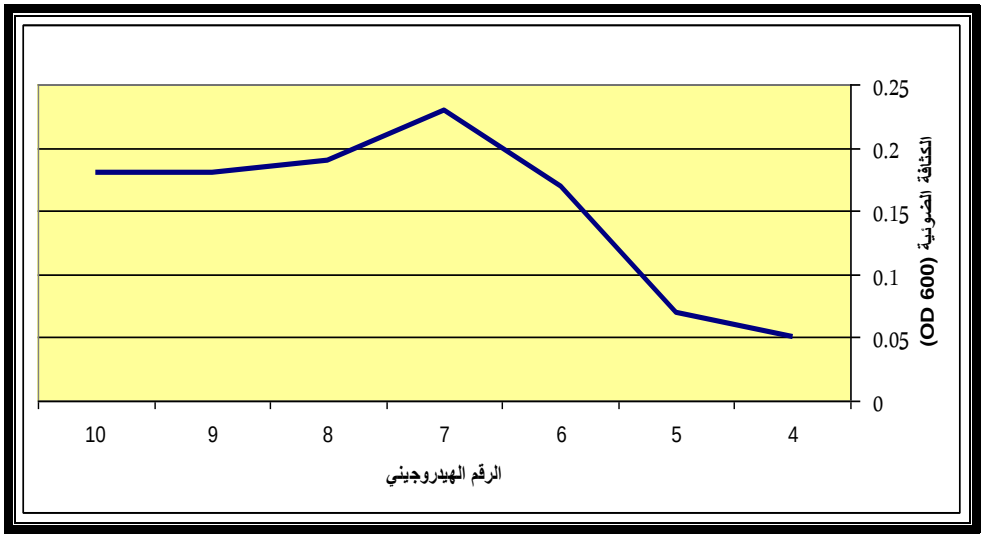
يتبين من النتائج الموضحة في الجدول (2) إن معدل النمو البكتيري والإنتاج لأنزيم Xylanase تزداد بزيادة فترة التحضين لتصل إلى أعلى حد عند (48) ساعة وبعدها تنخفض باستمرار فترة التحضين والسبب قد يعود إلى حدوث نمو متزايد عند فترات التحضين (24 و 48) ساعة وأما الانخفاض الذي حدث في النمو والإنتاج عند فترة التحضين (72) قد يعود سببه إلى حدوث تحلل بكتيري مما يؤدي بالنتيجة إلى حدوث انخفاض في انتاج الأنزيم وتتفق النتيجة مع العديد من الدراسات [3] [10] [25]، أما عامل درجة الحرارة يلعب دورا مهماً في النمو والإنتاج الأنزيمي والذي يعتمد على تكيفات البكتريا وطبيعة الغشاء البلازمي والجدار الخلوي وعند تأثير البكتريا بدرجة الحرارة سيؤثر بالنتيجة على فسلجيتها وإنتاجها للأنزيمات وبالأخص قدرتها على إنتاج الأنزيمات الخارجية كأنزيم Xylanase، إن نتيجة الدراسة الحالية تكون مقاربة لدراسة [11] في أن أفضل درجة حرارة متبعة في التحضين تكون (30) م°.

- الرقم الهيدروجيني للوسط :

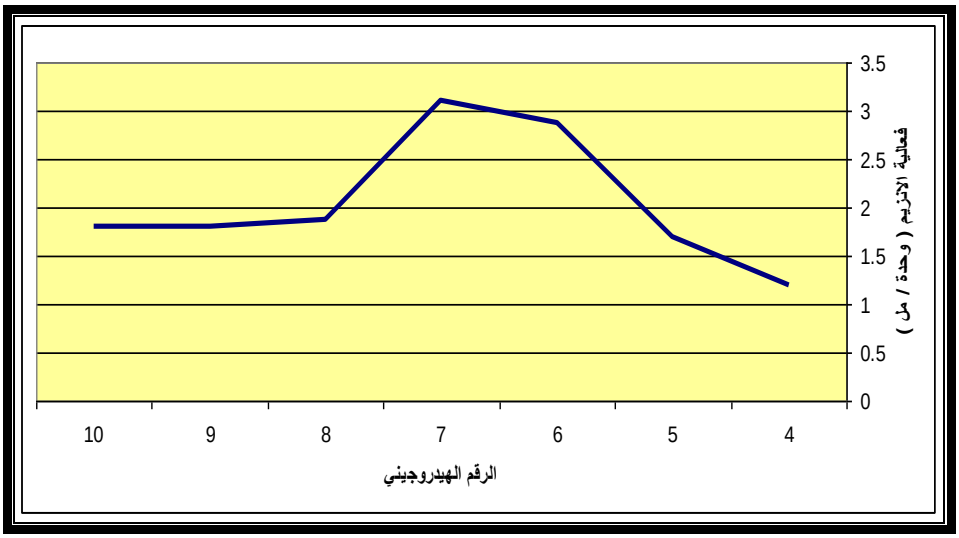
يشير الشكل (1) إلى دور الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي السائل في نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis* إذ يلاحظ أن النمو يزداد بزيادة قيمة الرقم الهيدروجيني ليصل إلى أعلى نمو عند الرقم الهيدروجيني المتعادل (pH=7) وبكثافة ضوئية للنمو تصل لـ (0.23) بينما يعد الوسط القاعدي أفضل من الوسط الحامضي في النمو، أما من ناحية إنتاج العزلة البكتيرية لأنزيم

Xylanase (الشكل 2) لوحظ إن الإنتاج مرتبط بنمو البكتريا إذ بلغت أفضل قيمة لفعالية الأنزيم (3.1) وحدة/مل عند رقم هيدروجيني (7) ويكون الإنتاج في الوسط القاعدي أفضل من الحامضي وهذا يشير إلى أن النمو البكتيري مرتبط بإنتاج الأنزيم Xylanase والسبب قد يعود إلى دور الأنزيم المهم في نمو البكتريا ونشاطاتها الايضية المتعددة [18].

إن الخلايا البكتيرية تمتلك ميكانيكيات متعددة والتي تسمح من خلالها بالسيطرة على الإفراز منها طبيعة الغلاف البكتيري وان التغيير فيه سيؤثر على إفراز الأنزيمات الخارجية وإطلاقها من الغلاف ويعد عاملي درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني من العوامل التي تحفز على إحداث تغيير في الغشاء الخلوي والجدار الخلوي، ففي البكتريا التابعة لعائلة Bacillaceae يشارك الغلاف البروتيني السطحي لها في إفراز الأنزيمات الخارجية الخلوية [17] [6].



الشكل (1) : تأثير التغير بالرقم الهيدروجيني على نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis*.



الشكل (2) : تأثير التغير بالرقم الهيدروجيني على إنتاج العزلة البكتيرية *B. subtilis* لأنزيم Xylanase.

- التهوية :

يبين الجدول (3) أن لعامل التهوية الدور المؤثر في نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase إذ بلغت قيمة الكثافة الضوئية للنمو (0.23) عند سرعة (150) rpm وأما عند سرعة (200) rpm بلغت الكثافة الضوئية للنمو (0.25) بينما بلغت قيم فعالية الأنزيم (3.1) و (3.41) وحدة / مل عند السرع (150) و (200) rpm على التوالي، نستنتج من ذلك أن التهوية أدت إلى زيادة النمو البكتيري وإنتاجها لأنزيم Xylanase والسبب قد يعود إلى أن التهوية تؤدي إلى زيادة الاوكسجين المتوفر في الوسط السائل والذي يعمل على تحفيز النمو البكتيري وبما أن البكتريا تحتاج أنزيم Xylanase لغرض النمو لذلك فان البكتريا ستؤدي إلى زيادة إنتاجها للأنزيم عند نموها [15].

الجدول (3) : تأثير عامل التهوية على نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase.

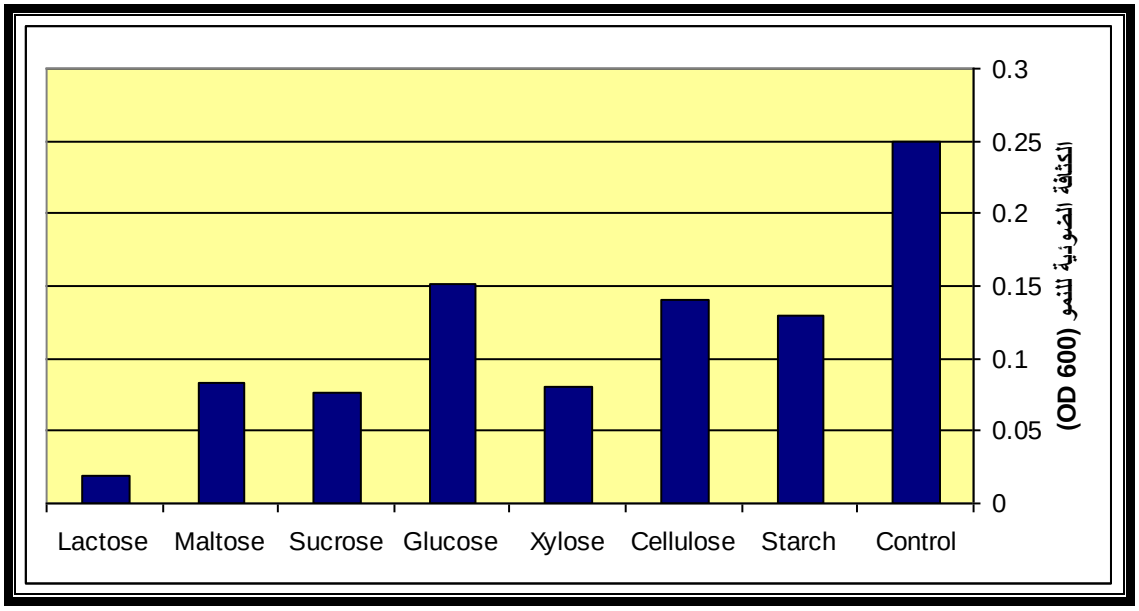
سرعة التحضين rpm	الكثافة الضوئية للنمو	فعالية الانزيم (وحدة/مل)
150	0.23	3.1
200	0.25	3.41

ج/ تأثير بعض المصادر الكاربونية والنايتروجينية على نمو البكتريا *Bacillus subtilis* وإنتاجها لأنزيم Xylanase :

- المصدر الكاربوني للوسط :

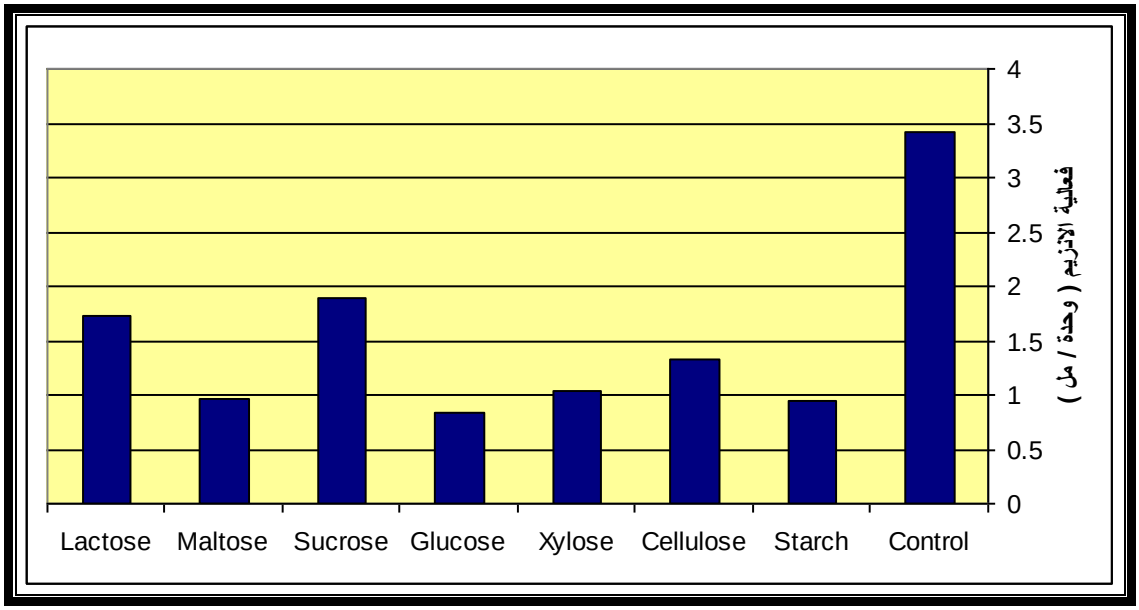
يوضح الشكل (3) إن نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis* يتأثر بنوع المصدر الكاربوني للوسط الزرعي المستخدم إذ بينت النتائج أن الكثافة الضوئية للنمو البكتيري بوجود المصادر الكاربونية (Starch، Cellulose، Xylose، Glucose، Sucrose، Maltose، Lactose) في الوسط بلغت (0.13، 0.14، 0.081، 0.152، 0.077، 0.083، 0.019) على التوالي إذ كانت بمستويات قليلة مقارنة بمستوى النمو في عينة السيطرة (الوسط الحاوي على Xylan) إذ بلغت قيمة الكثافة الضوئية للنمو فيها (0.25) وهذا يشير إلى دور المصدر الكاربوني (Xylan) في تحفيز النمو البكتيري للعزلة البكتيرية مقارنة ببقية المصادر الكاربونية الأخرى، كذا الحال عند مقارنة إنتاج العزلة البكتيرية *B. subtilis* لأنزيم Xylanase في عينة السيطرة (الوسط الحاوي على Xylan) مع ببقية المصادر الكاربونية الأخرى إذ تبين أن الإنتاج يكون أفضل عند وجود Xylan (عينة السيطرة) إذ أظهرت النتائج (الشكل 4) إن قيمة فعالية الأنزيم

في عينة السيطرة بلغت (3.41) وحدة/مل بينما قيم الفعالية عند استخدام المصادر الكاربونية الأخــرى (Starch، Cellulose، Xylose، Glucose، Sucrose، Maltose، Lactose) في الوسط بلغت(0.95، 1.33، 1.04، 0.84، 1.9، 0.96، 1.72) وحدة/مل على التوالي إذ كانت الفعالية الأنزيمية أفضل عند وجود Xylan(عينة السيطرة) مقارنة ببقية المصادر الكاربونية الأخرى.



الشكل (3) : تأثير المصادر الكاربونية المختلفة على نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis*.

أظهرت دراسة مقدمة من قبل [16] أن المصدر الكاربوني للوسط الزرعي يقوم بدور أساسي في تحفيز النمو البكتيري والايض الخلوية ويعد (Xylan) من أفضل المصادر الكاربونية لما له من تأثير على نمو البكتريا *Bacillus* spp. وإنتاجها للإنزيمات الخارج خلوية كأنزيم Xylanase وان استبداله بأي مصدر كاربوني آخر سيؤدي بالنتيجة إلى خفض النمو والإنتاج الأنزيمي والسبب قد يعود إلى دور المصادر الكاربونية الأخرى في تثبيط إنتاج الأنزيم Xylanase والذي سيؤثر سلباً على النمو البكتيري كما هو الحال عند وجود سكر Xylose الذي يؤدي إلى كبح الإنتاج الأنزيمي بتثبيط Feed back وذلك بسبب زيادة توافر السكر في الوسط بشكل كبير نتيجة فعل أنزيم Xylanase ايضاً [12].



الشكل (4) : تأثير المصادر الكاربونية المختلفة على إنتاج العزلة البكتيرية *B. subtilis* لأنزيم Xylanase.

بينت نتائج الدراسة إن وجود سكر الكلوكوز في الوسط الزرعي سيؤدي بالنتيجة إلى التقليل من إنتاج أنزيم Xylanase وزيادة النمو البكتيري مقارنة ببقية المصادر الكاربونية الأخرى عدا Xylan والسبب قد يعود إلى دور الكلوكوز في تحفيز النمو البكتيري من خلال رفع الفعاليات الإنزيمية لدورة كريبس بدلاً عن التحفيز على إنتاج أنزيم Xylanase [7].

- المصدر النايتروجيني للوسط :

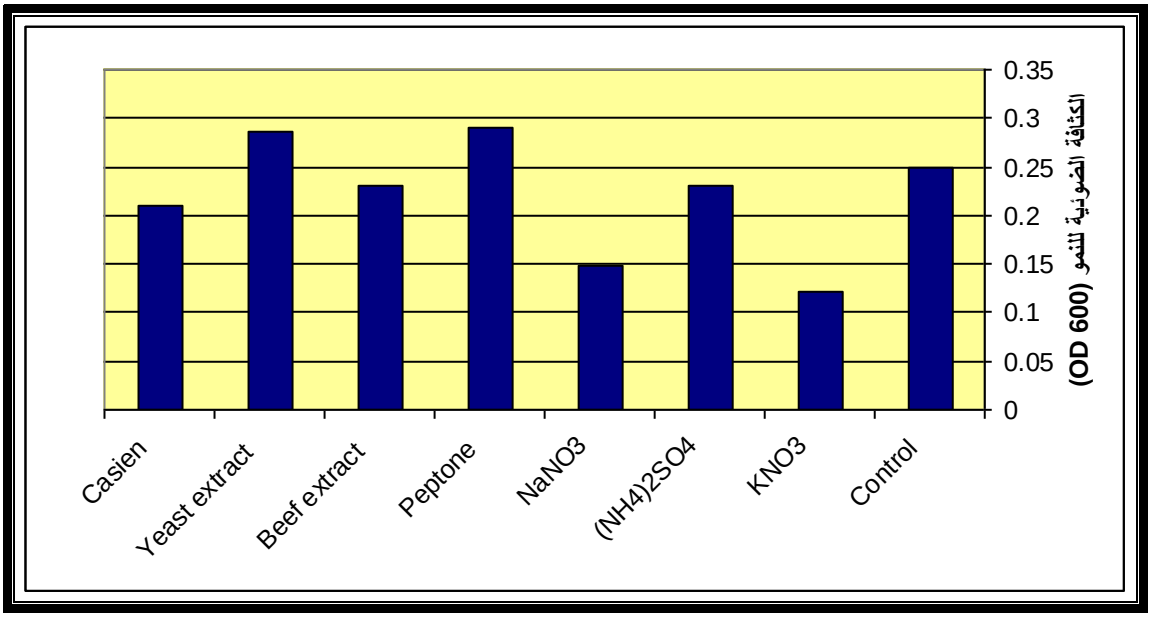
يوضح الشكل (5) الكثافة الضوئية للنمو البكتيري للعزلة *B. subtilis* إذ أوضحت النتائج أن قيم الكثافة الضوئية للنمو في الوسط الزرعي الذي يحتوي على المصادر النتروجينية العضوية (Peptone، Beef extract، Yeast extract، Casien) بلغت (0.29، 0.23، 0.286، 0.21) على التوالي ويعد Peptone و Yeast extract الأفضل في تحفيز النمو البكتيري بينما قيم الكثافة الضوئية للنمو في الوسط الذي يحتوي على المصادر النتروجينية الغير عضوية (KNO_3، $(NH_4)_2SO_4$، $NaNO_3$) بلغت (0.121، 0.23، 0.148) على التوالي وأما قيمة الكثافة الضوئية في عينة السيطرة (الوسط الذي يحتوي على المصدر النتروجيني الغير عضوي NH_4NO_3) بلغت (0.25) وبذلك يعد (NH_4NO_3) أفضل مصدر نتروجيني غير عضوي في تحفيز النمو البكتيري، عند مقارنة النمو في الأوساط الحاوية على المصدر النتروجيني العضوي والغير عضوي يتبين من ذلك أن المصدر العضوي يعد الأفضل في النمو وأعطى Peptone و Yeast extract أفضل النتائج.

أما بخصوص قدرة العزلة *B. subtilis* على إنتاج أنزيم Xylanase أظهرت النتائج (الشكل 6) أن قيم فعالية الأنزيم في الأوساط المحتوية على المصادر النتروجينية العضوية

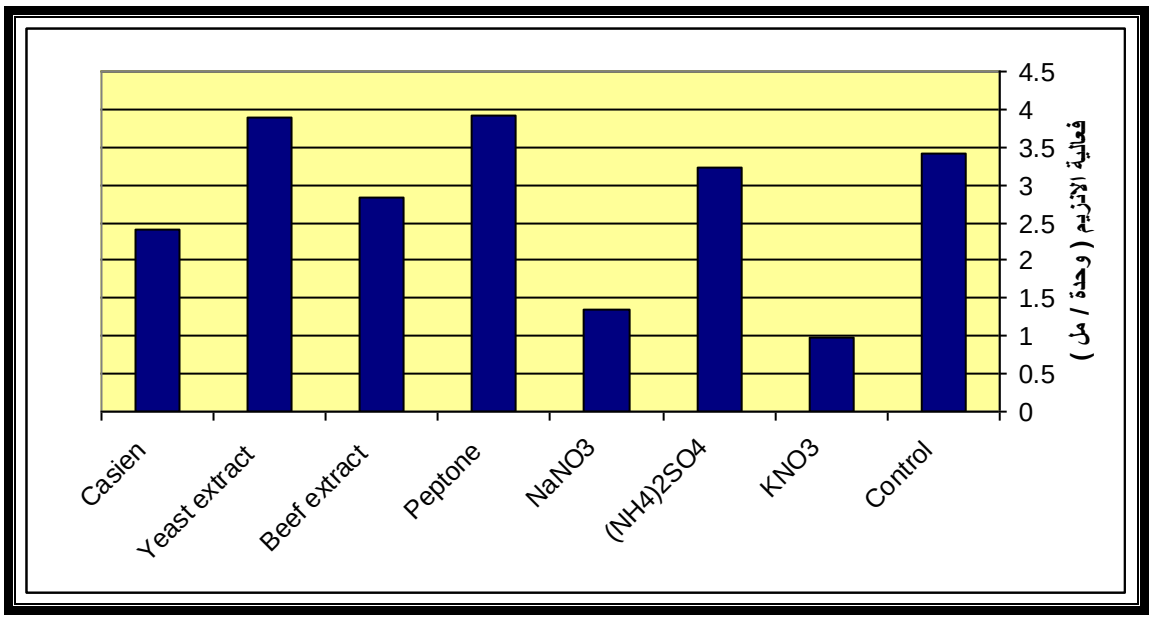
75

(Peptone، Beef extract، Yeast extract، Casien) بلغت (3.92، 2.83، 3.9، 2.4) وحدة/مل على التوالي وأما في الأوساط المحتوية على المصادر النتروجينية غير العضوية (KNO_3، $(NH_4)_2SO_4$، $NaNO_3$، NH_4NO_3(عينة السيطرة)) بلغت (0.98، 3.22، 1.36، 3.41) وحدة/مل على التوالي. يتبين من نتائج الدراسة الحالية أن الوسط المحتوي على المصادر النتروجينية العضوية أعطت أفضل إنتاج للأنزيم Xylanase أكثر من المصادر النتروجينية الغير عضوية. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة [21] التي أشارت إلى نفس الاستنتاج. يعد المصدر النتروجيني العضوي Peptone و Yeast extract الأفضل في الإنتاج الأنزيمي مقارنة ببقية المصادر النتروجينية (العضوية والغير عضوية) الأخرى قيد الدراسة الحالية إذ تتقارب النتيجة مع دراسة [4] التي أشارت إلى دور Peptone و Yeast extract في تحفيز إنتاج أفضل لأنزيم Xylanase من قبل بكتريا *Bacillus* spp.

إن للمصادر النتروجينية العضوية الدور المهم في تحفيز إنتاج أفضل لأنزيم Xylanase مقارنة بالمصادر النتروجينية الغير عضوية والسبب قد يعود إلى أن المصادر النتروجينية العضوية تحرر ايونات (NH_4^+) بشكل كبير مقارنة بالمصادر الغير عضوية والتي تعمل على زيادة التحفيز للنمو البكتيري نتيجة زيادة التحفيز لإنتاج لأنزيم Xylanase الضروري للنمو [23].



الشكل (5) : تأثير المصادر النتروجينية المختلفة على نمو العزلة البكتيرية *B. subtilis*.



الشكل (6) : تأثير المصادر النتروجينية المختلفة على إنتاج العزلة البكتيرية *B. subtilis* لأنزيم Xylanase.

المصادر

1. Abou-Dobara, M.I. ; El–Sayed, A.K. and El Fayoumy, R.A., J. Am. Sci., 7(12): 661-670 (2011).
2. Azeri, C. ; Tamer, A.U. and Oskay, M., Afr. J. Biotechnol., 9 (1): 063-072 (2010).
3. Bajpal, P. and Bajpai, P., Biotechnol. and Bioengin., 33: 72-78 (1989).
4. Battan, B. ; Sharma, J. ; Dhiman, S.S. and Kuhad, R.C., Enzyme Microb. Technol., 41: 733–739 (2007).
5. Ciprandi, G. ; Scordamaglia, A. ; Venuti, D. ; Caria, M. and Canonica, G.W., Chemioterapia., 5 (6): 404–412 (1986).
6. Dhillon, A. and Khanna, S., World J. Microbiol. Biotechnol., 16: 325–327 (2000).
7. Gupta, U. and Kar, R., Braz. Arch. Biol. Technol., 52(6): pp. 1363-1371 (2009).
8. Haltrich, D. ; Nidetzky, B. ; Kulbe, K.D. ; Steiner, W. and Zupancic, S., Bioresour. Technol., 58: 137-161 (1996).
9. Holt, J. ; Krieg, N. ; Sneath, P. ; Staley, J. and Williams, S., Group 18; Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore 9: 559-564 (1994).
10. Jansova, E. ; Scharzova, Z. and Chaloupka, J., Folia. Micro. Biologica., 38(1): 22-24 (1993).
11. Kuancha, C. and Apiraksakorn, J., KKU Res. J.,17(6):933-938 (2012)

12. Lemos, J.L.S. and Junior, N.P., Braz. Arch. Biol. and Technol., 45: 431-437 (2002).
13.Madigan, M. and Martinko, J., (editors), Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall (2005).
14. Miller, G.L., Anal. Chem., 31: 426-428 (1959).
15. Naga, S. ; Carg, N. ; Sanghi, A. ; Kuhad, R.C. and Gupta, V.K., Int. J. Microbes Environ. Management., 1(1): 1-9 (2010).
16. Nagar, S. ; Gupta, V.K. ; Kumar, D. ; Kumar, L. and Kuhad, R.Ch., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37: 71–83 (2010).
17. Prade, R.A., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 13: 101-131 (1996).
18. Richana, N. ; Irawadi, T.T. ; Nur, M.A. ; Sailah, I. and Syamsu, Kh., Microbiol Indones., 1(2): pp. 74-80 (2007).
19. Saito, S.; Kakeshita, H. and Nakamura, K., Gene,428(1–2):2–8 (2008)
20. Sakthiselvan, P. ; Naveena, B. and Partha, N., Afr. J. Biotechnol., 11(57): pp. 12067-12077 (2012).
21. Sanghi, A. ; Garg, N. ; Kuhar, K. ; Kuhad, R.C. and Gupta, V.K., Bio. Res., 4(3): 1109-1129 (2009).
22. Sneath, P.H.A., Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, Williams and Wilkins, Baltimore 2: 1104-1207 (1986).
23. Subramaniyan, S. ; Sandhia, G.S. and Prema, P., Biotechnol. Lett., 23: 369-371 (2001).
24. Tallapragada, P. and Venkatesh, K., J. Microbiol. Biotech. Res., 1 (4):137-147 (2011).
25. Younis, M.A.M. ; Hezayen, F.F. ; Nour-Eldein, M.A. and Shabab, M.S.A., Am-Euras. J. Agric. And Environ. Sci., 7(1): 31-37 (2010).