عزل وتشخيص جرثومة *Bacillus sp.* ودراسة الظروف الملائمة لإنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي على وسط مولاس البنجر السكري .

ولاء حمدون شكر

قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة الموصل/ الموصل/ جمهورية العراق

الملخص:

شملت الدراسة عزل وتشخيص جرثومة *Bacillus sp.* من التربة ومقارنة إنتاجها للسكر المتعدد الخارج خلوي باستخدام مولاس البنجر السكري كوسط غذائي مع احد الاوساط القياسية . فاق انتاج السكر على وسط مولاس البنجر ماتم انتاجه على الوسط القياسي حيث بلغت أعلى انتاجية للسكر على وسط مولاس البنجر وبعد 7 ايام 3.53 غم/ لتر وتم دراسة تاثير تراكيز مختلفة على مولاس البنجر السكري ومصادر نتروجينية على النمو وانتاجية السكر المتعدد وقد تحققت اعلى انتاجية للسكر المتعدد وبلغت 3.80 ، 4.10 غم / لتر عند تركيز سكر 12% من مولاس البنجر السكري وكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني على التوالي.

المقدمة:

ان السكريات المتعددة المايكروبية هى إحدى المواد الطبيعية التي تنتجها خلايا الجراثيم قد تكون إحدى المكونات التركيبية الأساسية المكونة لخلايا الجراثيم او قد تكون موجودة داخل او خارج خلايا هذه الجراثيم كما موقع هذه السكريات بالنسبة لخلايا الجراثيم يعتمد كأساس لتصنيف هذه السكريات ومما لاشك فيه ان الاحياء المجهريه المنتجه للسكريات المتعدد خارج خلاياها هي افضل تلك الانواع وذلك لسهولة عزلها وباقل كلفة ممكنة [1] ومن تلك السكريات التي تنتج وبشكل تجاري الزانثان والدكسترات المنتجين من قبل البكتريا *Xanthomonas campestris* *Leuconostoc mesenteroides*[٣،٢] والبوليولان *Pullulan* الذي ينتج من الفطر *Aureobasidium pullulans* [٤]. وقد اخذت اهمية السكريات المتعددة المايكروبية تزداد بشكل كبير جدا في السنوات الاخيرة وذلك للموصفات الكيميائية المتجانسة والمسيطر عليها والصفات الفيزياوية الفريدة والخواص الوظيفة الجيدة فضلا عن تطبيقاتها الواسعة في الصناعات الغذائية بوصفها مثخنات وموادا للنكهه [٥] ، وأما في الصناعات الدوائية فتستخدم في تحضير مستحضرات التجميل والمراهم والمنظفات واما في التطبيقات الصناعية فهي مثبتات في صناعة الاصباغ فضلا عن دورها في صناعة الورق والأحبار والسيراميك[٦].

استهدفت الدراسة عزل جرثومة *Bacillus sp* من التربة وتشخيصها واختبار قابليتها على انتاج السكر المتعدد الخارج خلوي ومعرفة الظروف المثالية لانتاجه من خلال دراسة تاثير ظروف زرعية مختلفة وباستخدام وسط مولاس البنجر السكري وهو احد المخلفات الصناعية الرخيصة مقارنة مع الوسط القياسي لتحديد الوسط الامثل للنمو والإنتاجية.

المواد وطرائق البحث:

1- عزل الجرثومة من التربة

تم عزل الجرثومة *Bacillus sp* من االتربة في مختبرات بحوث كلية التربية / قسم علوم الحياة / جامعة الموصل. باستخدام طريقة التخافيف المتسلسلة وذالك بوزن 1 غم من التربة ووضع في انابيب اختيبار معقمة حاوية على 10 مل من الماء المقطر والمعقم وتم تخفيفه لغاية 10^{-6} ثم لقحت قطرة من كل تخفيف في اطباق بتري حاوية لوسط الاكار المغذي (Nutrient agar) وحضنت بدرجة حرارة 28±1 ^{o}م مدة 24 ساعة . ونقلت المستعمرات المنفردة التي تميزت بقوامها اللزج الى اطباق حاوية على وسط الاكار المغذي وحضنت تحت نفس درجة الحرارة مدة 3-4 ايام للحصول على عدة عزلات جرثومية نقية [٧].

2- حفظ الجرثومة:

لقحت الجرثومة على موائل الاكار المغذي وحضنت مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 28±1 ^{o}م ثم حفظت في الثلاجة عند درجة ٤ ^{o}م ونشطت باعادة زرعها كل اسبوعين وحفظت بالثلاجة الى حين استخدامها [٨].

3- الفحوصات التشخيصة :

اجريت عدة فحوصات تشخيصة على عزلة الجرثومة وشملت الاختبارات المذكورة من قبل (Krieg, Hot) [٩]. وهي : صبغة كرام وصفات المستعمرات على وسط الاكار المغذي والحاوي ٥% كلوكوز واختبارا ت الحركة واختزا ل النترات والاوكسيديز (Oxidase test) والكتاليز(Catalase test) وتحلل النشا والجلابتين وتخمر ا لسكريات وشملت ا لسكريات المانوز السكروز واللاكتوز وأجريت هذه الفحوصات استنادا الى ماجاء في [٧].

الأوساط وظروف الزرع:

١- الوسط القياسي :

استخدم هذا الوسط بكونه وسطا انتاجيا وفي الوقت نفسه وسط مقارنة مع وسط مولاس البنجر السكري والذي يتكون من 20 غم كلوكوز ،5 غم فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين،0.1 غم كبريتات المغنيسيوم المائية، 0.5 غم مستخلص الخميرة، 0.4 غم يوريا. أذيبت في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني عند ٧,٠. وزع الوسط على دوارق زجاجية سعة 250 مل وبواقع 50 مل لكل دورق وعقم الوسط بجهاز.

٢- وسط مولاس البنجر السكري:

تم الحصول عليه من الشركة العامة للسكر في الموصل وحضر هذا الوسط على النحو الاتي تم اخذ ٥٠ غم من المولاس (يبلغ تركيز السكر فيه ٢٦) واذيب في لتر من الماء المقطر وتم تسخينه في حمام مائي عند درجة حرارة ٥٠-٧٠ ^{o}م ولمدة ٥ ساعات ثم اجري للوسط نبذ مركزي عند ٦٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٠ دقائق وعقم الوسط بجهاز المعقام.

٣- وسط مولاس البنجر والاكار:

حضر الوسط باذابة ٤,٠ غم من مولاس البنجر في ١٠٠ مل من الماء المقطر ثم اضيف له الاكار بمقدار ٢,٠ غم وضبط الرقم الهيدروجيني عند ٧,٠ وعقم الوسط بجهاز المعقام كما تم اقلمة الجرثومة على وسط مولاس

البنجر والاكار وذلك باعادة زرعها على هذا اوسط بما لايقل عن خمسة مرات بتقنية النقل المتعدد Multiple-transfer [١٠].

٤- وسط مستخلص الخميرة ومستخلص الشعير والاكار:

حضر الوسط من المواد الاتية: مستخلص الخميرة ٣ غم، خلاصة الشعير ٣ غم ببتون ٥ غم، كلوكوز ١٠-٢٠ غم والاكار ٢٠ غم ثم ضبط الرقم الهيدروجيني عند ٧,٠ ووزع في انابيب اختبار وعقم بجهاز المعقام[١١].

٥- وسط اللقاح:

يتكون هذا الوسط من مكونات الوسط في الفقرة ٤ باستثناء الاكار. أما وسط المولاس السائل المستخدم لتحضير اللقاح فتم اذابة ٥,٠ غم من المولاس في ٢٥٠ مل من الماء المقطر. وثم ضبطالوسطين عند الرقم الهيدروجيني ٧,٠ ثم وزع الوسطين في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ غم وبواقع ٥٠ مل لكل دورق وتم تعقيمها بجهاز المعقام.

٦- تحضير لقاح البكتريا:

بعد تعقيم وسطا المولاس والشعير تركا ليبرد بعدها تم نقل جزء من مستعمرة البكتريا المؤقلمة على المولاس ووسط الشعير ومستخلص الخميرة بوساطة عروة التلقيح (Loop) الى دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل يحتوي ٥٠ مل من الوسط ووضع الدورقان في حاضنة هزازة عند درجة 28±1 °م وبمعدل هز ١٥٠ دورة/دقيقة ولمدة ٤٨ ساعة.

ولغرض إنتاج السكر المتعدد لقح الوسط القياسي ووسط مولاس البنجر السكري والمحضرين من الخطوة (٤-١ ، ٤-٢) بحوالي ٥ مل من المعلق الجرثومي من الخطوة (٤-٦) وحضنت الدوارق بعد ذلك في الحاضنة الهزازة وبسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة. وبمعدل دورقين لكل معاملة (لكلا الوسطين) ولكل يوم.

طرائق التحليل:

بعد انتهاء مدة الحضانة سحبت الدوارق من الحضانة الهزازة وبشكل عشوائي لكل من (النمط القياسي والمولاس) ثم اجريت عليها البسترة pasterurization بالحمام المائي بدرجة حرارة 60 °م ولمدة 10 دقائق لغرض قتل الخلايا الجرثومة. تركت الدوارق بعد ذلك لكي تبرد وضبط الرقم الهيدروجيني النهائي لكل دورق واجريت عملية نبذ مركزي 9000 دورة/دقيقة لمحتوى كل دورق ومدة 30 دقيقة ولغرض حساب الكتلة الحيوية للخلايا المترسبة التي جمعت بعد ذلك في اطباق زجاجية صغيرة جافة وموزونة مسبقا وجففت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 60 °م ومدة 24 ساعة ولغرض تقدير السكر المتعدد في طبق الراشح الجرثومي فقد اخذ 10 مل منه واضيف اليه 30 مل من الاسيتون [١٢] ثم طرد مركزيا عند سرعة 9000 دورة/دقيقة ولمدة 30 دقيقة ونقل السكر المتعدد المترسب في اطباق زجاجية معلومة الوزن وجفف محتوياتها في الفرن الكهربائي عند 60 °م ولمدة 24 ساعة وحسب وزن الكتلة الحيوية والسكر المتعدد بفارق الوزنين، باستخدام ميزان حساس.

التجارب:

١- مقارنة الوسط القياسي مع وسط مولاس البنجر في دعم انتاج السكر المتعدد والكتلة الحيوية لجرثومة *Baillus sp.* :

تم الاعتماد في هذه التجربة على الوسط القياسي المستخدم في غالبية بحوث انتاج السكر المتعدد وذلك لغرض المقارنة مع وسط مولاس البنجر لدعم انتاج السكر المتعدد والكتلة الحيوية للبكتريا وانتخبت فترات حضانة مختلفة (9,8,7,6,5,4,3,2,1) ايام .

٢- تاثير تراكيز مختلفة من المصدر الكاربوني (السكروز):

اسخدمت في هذه التجربة 11 تركيز من السكروز وهي على التوالي (16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6)% وباستخدام الاوزان التالية من البنجر السكري (22.8,20.9,19,17.1,14.7,13.3,12.1,10.8) غم/100 مل وعلى التوالي لبيان افضل تركيز من السكروز بحيث يعطي اعلى كمية من الكتلة الحيوية وافضل انتاجية للسكرالمتعدد.

3- تأثير وإضافة مصادر نترو جينية مختلفة على نمو الجرثومة وإنتاج السكر المتعدد :

صممت هذه التجربة لمقارنة استجابة الجرثومة *Baillus sp.* للنمو في اوساط غذائية حاوية على مصادر نتروجينية مختلفة وعليه فقد تم استخدام المصادر النتروجينية الاتية (كبريتات الامونيوم ، كلوريد الامونيوم ،اليوريا ، نترايت الصوديوم، فوسفات الامونيوم الاحادية) (اعتمادا على المحتوى النتروجيني لفوسفات الامونيوم 0.018 غم نتروجين/لتر من الوسط) [١٣] .

النتائج والمناقشة :

1- عزل جرثومة *Bacillus sp.*: عند عزل الجرثوم ظهرت مستعمراتها ناعمة smooth ولزجة Mucoid بيضاء اللون على وسط الاكار المغذي وعند صبغها بصبغة كرام ظهرت عصوية موجبة لصبغة كرام. عزلت الجرثومة لاول مرة عام 1940 من التربة والنبات وجلد الإنسان [11,10] وقد أجريت عليها مجموعة من الاختبارات الكيمو حيوية وكما مبين في الجدول (1) وأوضحت النتائج ان الجرثومة تعود إلى جنس *Bacillus* وذلك بالاعتماد على الطريقة التي وضعها [٩] .

عند عزل الجرثوم ظهرت مستعمراتها ناعمة smooth ولزجة Mucoid بيضاء اللون على وسط الاكار المغذي وعند صبغها بصبغة كرام ظهرت عصوية موجبة لصبغة كرام. عزلت الجرثومة لاول مرة عام 1940 من التربة والنبات وجلد الإنسان [11,10] وقد أجريت عليها مجموعة من الاختبارات الكيمو حيوية وكما مبين في الجدول (1) وأوضحت النتائج ان الجرثومة تعود إلى جنس *Bacillus* وذلك بالاعتماد على الطريقة التي وضعها [٩] .

الجدول (1) الاختبارات الكيميوحيوية لجرثومة *Bacillus sp.*

الاختبارات	النتيجة	الاختبارات	النتيجة	الاختبارات	النتيجة
اليوريز	_	المثيل الاحمر	_	الفركتوز	+
الاوكسديز	+	الستريت	+	سليلوبايوز	_
الكتاليز	+	المانوز	_	فوكس بروسكر	_
تحليل النشأ	+	لاكتوز	_	انتاج الاندول	_
تحليل الجلاتين	+	سكروز	+		

الاشارة(-) تعني سا لبة Negative و(+) تعني موجبة Positive .

2- مقارنة انتاج السكر المتعدد بين الوسط القياسي ووسط مولاس البنجر السكري باستخدام فترات حضانة مختلفة:

أظهرت نتائج المقارنة بين الوسطين المدونة في الجدول (3,2) ان انتاج السكر المتعدد في وسط مولاس فاق ماتم الحصول عليه من الوسط القياسي حيث تم الحصول على اقصى انتاجية للسكر المتعدد في وسط مولاس البنجر وبلغت 3.53 غم/لتر بعد 7 ايام من التحضين بينما كانت الانتاجية في الوسط القياسي 2.40 غم/لتر بعد 6 ايام من التحضين اما بالنسبة الى انتاج الكتلة الحيوية فقد كان متباينا بشكل كبير لكلا الوسطين، حيث تم الحصول على اعلى انتاجية للكتلة الحيوية من وسط مولاس البنجر السكري 2.00 غم /لتر بعد 7 أيام من التحضين في حين ان بلغت اقصى انتاجية للكتلة الحيوية من الوسط القياسي 1.23 غم/لتر بعد 6 أيام من التحضين (نفسها اعطت اعلى انتاجية للسكر المتعدد). اعطى وسط مولاس البنجر اعلى انتاجية للكتلة الحيوية لجميع فترات الحضانة مقارنة مع الوسط القياسي ويمكن ان يعزى هذا الاختلاف في الكتلة الحيوية بين الوسيطين الى ان وسط المولاس يحتوي على مركبات متنوعة كثيرة داعمة للنمو اما فيما يتعلق بالرقم الهيدوجيني النهائي للوسط القياسي انخفض بشكل واضح عن الرقم الهيدروجيني الاولي 7.0 حيث وصل الى 3.25 بعد 7 ايام من التحضين ويمكن ان يعزى هذا الانخفاض الى انتاج الجرثومة بعض الحوامض العضوية وتراكمها اثناء فترة التخمر، وعلى النقيض من ذلك كان هناك ارتفاعا طفيفا في الرقم الهيدروجيني النهائي في وسط المولاس حيث وصل الى 7.35 بعد 5 ايام من التحضين وهذه النتائج تتفق مع ما توصل الية [14] عندما استخدمه وسط مولاس البنجر لانتاج البوليولان فقد ارتفع الرقم الهيدوجيني الى 7.87 عند اليوم الخامس للتحضين بينما كان هناك انخفاضا في الرقم الهيدروجيني النهائي في الوسط لقياس فقد وصل إلى ٢,٥٤ بعد عشرة أيام من التحضين وتتفق الدراسة أيضا مع ما توصل اليه [15]عند استخدامها لوسط مولاس ا لبنجر ا يضا فقد ارتفع الرقم الهيدروجيني النهائي ووصل الى 7.54 عند اليوم الخامس من الحضانة وتبدوا الدراسة متفقة ايضا مع النتائج التي توصل اليها [16] عند استخدامه لسلالة من جرثومة *Bacillus sp.* KCTC 0377 لإنتاج إحدى الإنزيمات .وعليه فقد تم الاعتماد على اليوم السابع للحضانة في التجارب اللاحقة .

الجدول (2): تاثير فترات الحضانة في نمو الجرثومة وانتاج السكر المتعدد باستخدام الوسط القياسي.

فترة التحضين يوم	الكتلة الحيوية غم / لتر	السكر المتعدد غم / لتر	ال pH النهائي
2	0.70(0.213)	1.13(0.010)	7.121(0.03)
3	0.92 (0.101)	1.42(0.121)	7.35(0.00)
4	1.21(0.131)	1.75(0.080)	7.01(0.02)
5	1.80(0.230)	2.35(0.013)	7.35(0.00)
6	1.83(0.012)	2.60(0.021)	6.80(0.12)
7	2.00(0.03)	3.53(0.00)	7.31(0.03)
8	1.38(0.240)	1.92(0.02)	7.20(0.01)
9	1.09 (0.00)	1.52(0.16)	6.80(1.30)

كل قيمة هي معدل لمكررين اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف العياري (S.D)

الجدول (3): تاثير فترات حضانة مختلفة في نمو الجرثومة وانتاج السكر المتعدد باستخدام وسط مولاس البنجر السكري .

فترة التحضين يوم	الكتلة الحيوية غم/ لتر	السكر المتعدد غم/لتر	ال pH النهائي
2	0.53(0.010)	0.30(0.010)	5.92(0.000)
3	0.72(0.821)	0.90(0.000)	5.00(0.530)
4	0.95(0.201)	1.20(0.021)	4.31(0.210)
5	1.00(0.013)	1.90(0.211)	4.00(0.160)
6	1.23(0.130)	2.40(0.012)	3.60(0.317)
7	0.90(0.241)	2.10(0.210)	3.25(0.021)
8	1.10(0.101)	1.80(0.005)	3.60(0.215)
9	1.20(0.321)	1.00(0.000)	3.10(0.213)

كل قيمة هي معدل لمكررين اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري (S.D) .

3- تاثير تراكيز مختلفة من وسط مولاس ا لبنجر ا لسكري على نمو الجرثومة وانتاج السكر المتعدد بعد سبعة ايام من التحضين.

في هذه التجربة تم زرع جرثومة *Bacillus sp.* في تراكيزمختلفة من مولاس البنجر السكري على اساس تركيز السكر وكما مبين في الجدول (4) ان اعلى انتاج للسكر المتعدد 3.80 غم /لتر عند تركيز المولاس 12% فيما كان هناك انخفاض للسكر المتعدد المنتج في التراكيز العالية، وقد تم الحصول على اقل انتاجية للسكر ٠,٦ غم/لتر عند تركيز المولاس 6% . اما بالنسبة للكتلة الحيوية فقد تم الحصول على اقصى كتلة 3.82 غم/ لتر عند تركيز المولاس 16% واقل انتاجية كانت 0.9 غم/لتر عند التركيز السكري 6% فيما ارتفع الرقم الهيدروجيني النهائي كالعادة عن الرقم الهيدروجيني الأولي وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره [15,14] من ان التراكيز العالية من مولاس البنجر السكري كانت مثبطة لإنتاج البوليولان بوساطة الفطر *Aurebasidium pullulans* وبكتيريا *Xanthomonas Campestris* على التولي . وعليه فقد تم اختيار تركيز المولاس 12% كأفضل تركيز لانتاج السكر والذي اعتمد عليه في التجربة اللاحقة .

الجدول (4): تاثير تراكيز مختلفة من مولاس البنجر السكري في نمو وانتاج السكر المتعدد بعد 7 ايام من التحضين .

تركيز مولاس % (وزن: حجم)	الكتلة الحيوية غم / لتر	السكر المتعدد غم / لتر	الـ pH النهائي
6	0.90(0.000)	0.6(0.131)	7.52(0.000)
7	1.15(0.120)	1.0(0.251)	7.42(0.001)
8	1.32(0.135)	1.8(0.030)	7.06(0.213)
9	1.81(0.021)	2.6(0.010)	6.95(0.121)
10	2.10(0.131)	3.1(0.000)	7.21(0.032)
11	2.30(0.000)	3.5(0.212)	7.51(0.019)
12	2.52(0.251)	3.80(0.132)	7.30(0.121)
13	2.72(0.132)	3.10(0.100)	6.95(0.130)
14	2.89(0.100)	2.60(0.132)	7.31(0.091)
15	3.2(0.032)	1.82(0.002)	7.08(0.102)
16	3.82(0.123)	1.09(0.120)	7.52(0.131)

كل قيمة هي معدل لمكررين اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحرا ف المعياري (S.D.)

4- تأثير المصدر النتروجيني في نمو الجرثومة وانتاج السكر المتعدد في وسط مولاس البنجر السكري .

بينت النتائج في جدول (4) ان أعلى انتاجية للسكر المتعدد بلغت 4.1 غم /لتر عند استخدام كبريتات الامونيوم كمصدر نتروجين بينما تم الحصول على اقل إنتاجية للسكر المتعدد 1.01 غم/لترعند استخدام نترايت الصوديوم كمصدر نتروجيني وبصورة عامة كانت الانتاجية جيدة عند استخدام المصادر النتروجينية الاخرى ويعد اضافة المصدر النتروجيني الى الوسط الغذائي مهما جدا لتنمية الاحياء المجهرية عليه لما له من دور مهم حيث يدخل في تركيب الاحماض الامينية والبروتين للخلية [17] . ان تحفيز كبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني لانتاج السكر المتعدد جاء مقاربا مع نتائج [18] حيث اعطت كبريتات الامونيوم انتاجية عالية من البوليولان عند استخدامه كمصدر نتروجيني لتنمية *A.pullulans* كما كانت الانتاجية ضعيفة جدا للبوليولان عند استخدام نترايت الصوديوم وقد يعود السبب ان هذه المادة سامة للعديد من الاحياء [19] اما فيما يتعلق بنمو الجرثومة فقد تم الحصول على اعلى كتلة لها عند استخدام كلوريد الامونيوم وادنى انتاجية للكتلة الحيوية 0.98 غم / لتر تم الحصول عليها عند استخدام نترايت الصوديوم كمصدر نتروجيني ان الانتاج العالي من الكتلة الحيوية ليس من الضروري ان يقابله انتاجية عالية من السكر المتعدد حيث قد يكون المصدر النتروجيني المعين محفزا لانقسام الخلايا الجرثومية وبالتالي الحصول على كتلة حيوية عالية ولكن قد تفتقر هذه الخلايا لانتاج عالي من السكر المتعدد كما ان الرقم الهيدروجيني النهائي ارتفع عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه [16,15,14] وتبدو النتائج متقاربة ايضا مع ماتوصل اليه [20] عند انتاجه للسكر المتعدد الزانثان باستخدام بكتريا *Xanthomonas campestris* .

الجدول (5): تاثير اضافة مصادر نتروجينية مختلفةعلى نمو وانتاج السكر المتعدد عند 7 ايام من التحضين.

المصدرالنتروجيني 0.018 %	الكتلة الحيوية غم/ لتر	السكر المتعدد غم/ لتر	الـ pH النهائي
كبريتات الامونيوم	2.12(0.000)	4.10(0.021)	7.21(0.121)
كلوريد الامونيوم	2.98(0.202)	3.03(0.125)	7.09(0.301)
اليوريا	1.83(0.132)	2.91(0.350)	6.98(0.100)
نترات الصوديوم	0.98(0.091)	1.01(0.000)	7.32(0.312)
فوسفات الامونيوم الاحادية	1.98(0.210)	2.23(0.135)	7.18(0.200)

كل قيمة هي معدل لمكررين اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري (S.D.) .

References

1- Cotterll , L.W.(1980) . Industerial potential of fungal and bacterial polysaccharide in fungal saccharides poly. Industrial Microbiol Vol.126. pp 251-265.

2- Sandfrd P.A.Advances(1979). Exocellular, microbiol poly saccharides Advances in carbohydrate chemistry and Biochemistry 36 pp.266-312.

3- Stauffer , K.R. and J.G. Leeder .(1978).Extracellular micrrobial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey .J. Food . sci. 43 pp.756-758 .

4- Boa , J.M. and A.Leduy . (1984) . Peat hydroly sate medium optimization for pullulan production . App. Environ . Microbiol . 48 pp.26-30 .

5- Giavasis I.;L.M .Harrvey and B.McNeil(2000). Gellan gum Critie Rev . Biotechnol. pp.1-83 .

6- De Vuyst L. and Degeest , (1999). Hetero polysaccharides from lactic acid bacteria . FEMS .microbid . Rev . 23:153-177 .

7- Bradshaw,L.J. (1979). Laboratory microbiology (3rd ed.) W.B.Saunders company philadelphia. U.S.A.

8- Tait, M.I.;I.W.suther land . A.J.C. Sturman ,(1986). Effect of growth conditions on the roduction. composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide .J. Gen. Microbiol 132: 1483-1492 .

9- Holt, J. G.,N.R. Krieg ,P.A. Sneath ,J.T . Staley and S.t. Williams . (1994). Bergeys Manual of Determintive bacteriology . William of wilkins U.S.A.

10- Hayens,W.C., L.J. Wickerham, and C.W. Hesseltine (1955). Maintenance of culture of industrially important microorganisms Appl. Microbiol. 3 pp.361-368.

11- Sedeg H.W., P.J.Van Demark and J.J.Lee.(1997). "Selected Expricises from Microbes in Action": A Laboratory Manual of Microbiology "4th ed." W.H.Freeman and comp.

12- Grimont F. and Grimont , PA.D. (1992) " The genus Bacillus In the prokaryotes . A H and book on the biology of bacteria " : Ecophysiology , Isolation Identification , Appl . :2822-2848 .

13- Dlamini,A.M. and P.S.Peiris, (1997). Production of exopolysaccharide by Pseudomonas sp. Atcc 31461 using Whey as fermentation substrate. Appl. Microbiol Biotechnol. 47 pp.52-57.

14- علاوي، رعد حساني سلطان (1996) دارسة انتاج السكر المتعدد(البوليولان) من مولاس البنجر بوساطة الفطر *Aureobasidium pullulans* مع تشخيص جزئي للمنتوج رسالة ماجستير ،كلية التربية جامعة الموصل ، العراق

15- الجرجري ، ندوة محمد خضر . (2003). انتاج وتوصيف الزانثان بواسطة البكتريا *Xanthomonas campestris* باستخدام مولاس البنجر السكري . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، العراق .

16- Yeon , C.J;K.J. Eune, and Y.C.Yun.(2003) purification and charactererization of chitosanase from *Bacillus sp.* Strain KCTC 0377 Bp and its Application for the production of chitosan oligosaccharides App . Envi . microbiology. V.S.A.

١٧- السعد، مها روؤى (١٩٩٠). مبادي فسلجة الاحياء المجهرية. مطابع التعليم العالي في الموصل–العراق.

18- الشاهري، يوسف جبار اسماعيل (1999) تحسين انتاجية العزلة المحلية من الفطر *Aureobasidium Pullulans* 1(API) من السكر المتعدد (البوليولان) باستخدام الاشعة فوق البنفسجية . رسالة ماجستير/كلية التربية/جامعة الموصل/الموصل/العراق.

19- دنحا، رياض فرانسيس الخزرجي، طالب عويد،(1990) تغذية وعلم وظائف الفطريات، مطابع التعليم العالي في الموصل/العراق.

20- الصميدعي، طه عبد الوهاب خميس، (2001). انتاج الزانثان بوساطة البكتريا *Xauthomonas campestris* من الشرش. رسالة ماجستير/كلية التربية/جامعة الموصل/الموصل/العراق.

Isolation and Identification of *Bacillus sp*. and study of the optimat conditions for the production to extracellar polysaccharide on sugar Beet Molasses Medium.

Wala Hamdon Shuker

Dept. of Biology,Colle. of Education, Univ. of Mosul, Mosul, Iraq.

Abstract

This study included the isolation and identification of *Bacillus sp.* from the soil, production of polysaccharide from sugar beet molasses as a nutrient medium and from a standard medium was compared. Production of polysaccharide from molasses medium exceeded that produced from the standard medium, since the highest production from molasses was 3.53 g/l after 7 days . The effect of different molasses concentration and nitrogen sources on the growth and the production of extra cellular polysacchaide the highest production was 3.80 and 4.10 g/l which achived in molasses concentration 12% and in ammonium sulphate as a carbon and nitrgen source, respectively.