دراسة بعض الظروف المثلى للفعالية البيولوجية لبكتريا *Bacillus subtilis* في تحلل السليلوز

سعاد عبدعلي عطية لبيب احمد كاظم سناء خواش مايد حسنة وضاح معيبد

شهلاء كاظم فرطوس

وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البيئة والمياه

بغداد– العراق

الخلاصة

تهدف الدراسة الى معالجة المخلفات السليلوزية الملوثة للبيئة بطرائق حيوية، باستخدام عزلة بكتيرية محلية من بكتريا *Bacillus subtilis* ذات كفاية في تفكيك السليلوز، وتحديد الظروف المثلى لفعالية عزلة البكتريا و المتمثلة بالدالة الحامضية وتركيز السليلوز ودرجة الحرارة ومعرفة تأثيرها على كفاية التحلل. اختبرت فعالية العزلة البكتيرية في تحلل السليلوز وذلك بانماء العزلة البكتيرية في مدى مختلف من الدالة الحامضية (6.0، 6.5، 7.0، 7.5 و8.0) وبتراكيز مختلفة للسليلوز (0.3، 0.6، 1.0، 1.5 و2.0%) وتحت تأثير درجات حرارية عديدة (37، 45 ، 55 و65 م°). حددت الظروف المثلى وذلك بقياس الكثافة الضوئية (الامتصاصية) على الطول الموجي 600 نانوميتر الذي يمثل النمو البكتيري، وقدر تركيز سكر الكلوكوز وحسبت نسبة استهلاك السليلوز في جميع النماذج فوجد ان امثل الظروف هي عند الدالة الحامضية 7.0 وتركيز للسليلوز 1.5% وعند درجة حرارة 37 م°.

الكلمات المفتاحية : الظروف المثلى، الفعالية البايولوجية و تحلل السليلوز.

Study of Some Optimum Condtions of *Bacillus subtilis* for Biological Activity of Cellulose Degradation

Soad AbdAli Atiya Labeeb Ahmad Kadhum Sanaa Koash Maibed

Hassena Wahdah Muaibed Shahlaa Kadhum Fartoos

Ministry of Science and Technology / Directorate Environment and Water

Baghdad - Iraq

E_mail: soadabdali@yahoo.com

Abstract

This study aimed to use biological treatment of cellulosic wastes, that cause environmental pollution, by using local bacterial isolate of *Bacillus subtilis* which is efficient for cellulolytic activity. Optimum conditions for detection of bacterial isolate activity, which represented by pH, cellulose concentration and temperature to show the effect of condtions on cellulolytic efficiency. The cellulolytic activity of bacterial isolate was tested by growing the bacterial isolate in a range of pH values 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, a range of cellulose concentrations 0.3,0.6,1.0,1.5 and 2.0% and under effect of different temperatures 37, 45, 55 and 65 C°. The optimum conditions were determined by measuring the bacterial growth by using optical density (absorbance) at wave length 600 nm, to know the bacterial growth, glucose concentration was estimated and the ratio of cellulose consumption in all samples was calcutaed. The optimum conditions were founded at pH 7.0, cellulose concentration 1.5 %, and at 37 C°.

Key Words: Optimum Conditions, Biological Activity and Cellulose Degradation.

المقـدمـــة

يعد السليلوز المعقد الحيوي الاكثر وفرة في الطبيعة والمنتج من عمليات البناء الضوئي في النبات، يوجد عادة في جدار الخلية النباتية ويمثل 50% من الوزن الجاف للكتلة الحيوية للنبات (Saini, *et al*., 2017). كما ويعتبر السليلوز من المصادر المهمة في انتاج الوقود والاغذية الحيوانية اضافة الى تصنيع العديد من المواد الكيمياوية المهمة والمنتج بكمية 10 مليار طن سنويا (Hamelinck, *et al*., 2005). يتألف السليلوز من وحدات سكر الكلوكوز مرتبطة مع بعضها بواسطة اصرة β-1-4-glucosidal linkage (Sari, *et al*., 2017).

تعد المخلفات الزراعية و مخلفات الماشية التي تركيبها الاساسي هو السليلوز في الدول المتطورة مصادر حيوية جيدة جدا للحصول على الطاقة اذ ينتج الوقود الحيوي بواسطة الفعالية البايولوجية للاحياء المجهرية كناتج لفعاليتها في تفكك الكتل الحيوية والمخلفات الزراعية والفضلات الصلبة (Elmenofy, *et al*., 2012).

توجد انواع من الاحياء المجهرية لها الفعالية على تفكيك المواد السليلوزية وانتاجها للانزيمات المفككة للسليلوز، وهذه الاحياء تتغذى على المواد الاولية التي تعاني عدد من العمليات المختلفة لتحويلها الى جزيئات وسطية تتضمن سكر وهيدروجين وحامض الخليك قبل الناتج النهائي الذي يتحول الى الايثانول الحيوي (Victor, *et al*., 2003)

ان تحويل كتلة السليلوز الحيوية الى وحدات بسيطة تتم بطرائق التخمير بمساعدة انزيمات التفكك السليلوزي المنتجة من الاحياء المجهرية التي لها القابلية على تحليل السليلوز وتخمير نواتج التحلل اضافة الى التخلص من التلوث البيئي السليلوزي (Lin, *et al*., 2012). يعتبر انزيم ال cellulase معقد انزيمي متكامل يعمل على تحليل السليلوز الى وحدات ابسط من سكريات مختزلة. فسرت العديد من النظريات الية عمل هذه الانزيمات أذ يقوم انزيم (Endoglucanase) بتبسيط السكر السليلوزي من خلال تفكيك الاواصر الداخلية للمعقد منتجا سلاسل ذات نهايات جديدة بينما تقوم انزيمات exoglucanase بالعمل على نهايات السلسلة محررة سكريات بسيطة (Dabkowska, *et al*.,2017).

يعد انتاج انزيم التفكك السليلوزي cellulase باستخدام المصادر الكربونية السليلوزية (المخلفات الزراعية والصناعية) من اهم الحلول للتخلص من التلوث السليلوزي والذي تتزايد كميته سنويا نتيجة لتراكم تلك المخلفات حيث يمكن انتاج الانزيم من مخلفات الورق ومخلفات الصناعات النسيجية والقطنية وبفعالية عالية وكذلك ممكن انتاجه من المخلفات الزراعية (Victor, *et al*., 2003)، ان التحلل المائي للسليلوز ينتج سكريات احادية بفعل انزيمي والتي تتحول بعد ذلك الى مواد مهمة اخرى بواسطة عملية التخمر لبعض الاحياء المجهرية (Saria, *et al*., 2017).

يمكن للعديد من الانواع البكتيرية انتاج تلك الانزيمات منها بكتريا *B. subtilis* ، *B.licheniformis* ، *B.pumilus* ، *B. circulan* ، *B.amyloliquefaciens* ، *Geobacillus* sp. و *Cellulolyticum* (Abdullah, *et al*.,2016). ان الانزيمات المفككة للسليلوز المنتجة من الاحياء المجهرية افضل من الانزيمات المنتجة من الحيوانات بسبب تكاليف الانتاج الواطئة وسهولة التعديلات الوراثية وعدم التأثر بالتغيرات المناخية (Behera, *et al*., 2014) . يعد تحديد الظروف المثلى لانماء الاحياء المجهرية ضرورية لزيادة انتاج وفعالية الانزيمات في نظام التخمر (Irfan, *et al*., 2017). لذا هدف البحث الحالي الى المعالجة الحيوية للمخلفات السليلوزية وتحديد الظروف المثلى لفعالية العزلة البكتيرية المحلية في تفكيك السليلوز .

المواد وطرائق العمل

العزلة البكتيرية المستخدمة

استخدمت العزلة البكتيرية المحلية *Bacillus subtilis* المعزولة والمشخصة في دراسة سابقة في مختبرات دائرة البيئة والمياه والتي لها فعالية بايولوجية في تفكيك السليلوز. نميت العزلة في وسط الاملاح المحتوي على المصدر الكربوني (عطية واخرون،2018) كما مبين في جدول (1).

جدول (1) مكونات وسط الاملاح

اسم المادة	الكمية (غم/لتر)
Na_2HPO_4	4.2
NH_4Cl	0.5
$(NH_4)_2SO_4$	0.5
$MgCl_2.6H_2O$	0.09
$CaCl_2$	0.03
$NaHCO_3$	0.5
yeast extract	2
CMC	10

قياس النمو البكتيري

قيس النمو البكتيري للعزلة البكتيرية بعد تلقيح الوسط الزرعي بالعزلة البكتيرية والحضن بدرجة حرارة 37 م° مدة حضن 2 ± 24 ساعة، بقياس الكثافة الضوئية(OD) الامتصاصية على طول موجي 600 نانوميتر لمعرفة النمو البكتيري، لجميع الظروف قيد الدراسة .

تقدير نسبة السليلوز المستهلك

جمع راسب المزرعة البكتيرية والوسط الزرعي بعد عملية الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة/ دقيقة مدة 20 دقيقة. عومل الراسب بحامض الفورميك Formic acid بتركيز 6.6% لتفكيك الخلايا البكتيرية مدة 10 دقائق وتم غسل السليلوز بالماء المقطر وجمع على ورقة ترشيح Miliporefilter 0.45 مايكروميتر باستخدام طريقة الترشيح تحت الضغط المخلخل وجفف بدرجة حرارة 85 م° مدة 48 ساعة وحسبت نسبة السليلوز المستهلك (Freier, *et al.*,1988)

قياس تركيز الكلوكوز

قيس تركيز الكلوكوز في راشح الزرع البكتيري الناتج بعد عملية الطرد المركزي باتباع طريقة (Irfan, *et al.*, 2017) المستخدمة في دراسة سابقة. أظهرت المتغيرات من خلال قياس النمو البكتيري ونسبة استهلاك السليلوز وتركيز الكلوكوز الناتج لجميع نماذج دراسة الظروف المثلى قيد الدراسة.

دراسة الظروف المثلى للفعالية البكتيرية

استخدم الوسط الزرعي المستخدم لتنمية العزلة البكتيرية لدراسة الظروف المثلى، ومدة حضن 2 ± 24 ساعة وحددت الظروف المثلى بقراءة الكثافة الضوئية على طول موجي 600 نانوميتر لقياس النمو البكتيري بالمقارنة مع وسط السيطرة (الوسط الزرعي بدون زرع بكتيري)، كما وقدر تركيز الكلوكوز الناتج وحسبت نسبة السليلوز المستهلك لجميع الظروف قيد الدراسة (Goyal, *et al.*, 2014).

دراسة تأثير الدالة الحامضية

درس تأثير الدالة الحامضية (الرقم الهيدروجيني) على فعالية العزلة البكتيرية في تحليل السليلوز بانمائها في الوسط الزرعي وتحت قيم مختلفة من الدالة الحامضية (6.0، 6.5، 7.0، 7.5 و 8.0) وحضنت الاوساط بدرجة حرارة 37 م° لمدة 2±24 ساعة، ثم قيس النمو البكتيري، وقدرت نسبة السليلوز المستهلك وقيس تركيز الكلوكوز لتحديد الدالة الحامضية المثلى (Goyal, *et al*., 2014).

دراسة تأثير تركيز السليلوز

درس تأثير تركيز السليلوز المستخدم على الفعالية البكتيرية من خلال عمل تراكيز مختلفة للسليلوز وكانت (0.3، 0.6، 1.0، 1.5 و2.0%) في الوسط الزرعي المستخدم لأنماء البكتريا، وذلك من خلال أنماء العزلة البكتيرية في الوسط الزرعي لجميع التراكيز قيد الدراسة وحضنت الاوساط بدرجة حرارة 37 م° لمدة 2 ± 24 ساعة، ثم قيس النمو

البكتيري، وقدرت نسبة السليلوز المستهلك وقيس تركيز الكلوكوز لتحديد التركيز الافضل للسليلوز.

دراسة تأثير درجة الحرارة

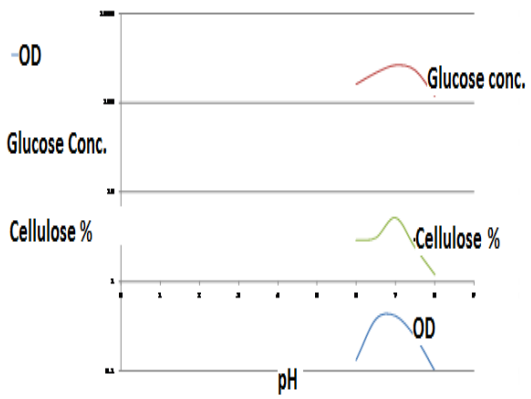
درس تأثير درجة حرارة الحضن في الفعالية البكتيرية وذلك بحضن الوسط الزرعي المستخدم بعد تلقيحه بالعزلة البكتيرية بدرجات حرارية مختلفة (37، 45، 55 و65 م°) لمدة 2 ± 24 ساعة .

النتائج والمناقشة

دراسة تأثير الظروف المثلى في فعالية تفكيك السليلوز للعزلة البكتيرية

تأثير الدالة الحامضية

بينت النتائج ان العزلة البكتيرية *B.subtilis* لها فعالية حيوية في تحلل السليلوز وانتاج سكر الكلوكوز في جميع قيم الدالة الحامضية واعطت قيم امتصاصية متفاوتة وكانت اعلى قيمة عند الدالة الحامضية 7.0. يدل ظهور النمو البكتيري في جميع القيم على فعالية العزلة البكتيرية في تحليل السليلوز بأستخدامه كمصدر غذائي وذلك بتحليله الى وحدات ابسط للقيام بنشاطاتها الحيوية من النمو والتكاثر. وكذلك بقياس تركيز الكلوكوز الناتج في وسط النمو وحساب نسبة استهلاك السليلوز وجد تفاوت في فعالية العزلة البكتيرية عند قيم الدالة الحامضية قيد الدراسة 6-8. وافضل فعالية للعزلة البكتيرية كانت عند الدالة الحامضية 7.0 اذ اعطت أعلى تركيز لسكر الكلوكوز ونسبة استهلاك للسليلوز كما مبين في شكل (1)، اذ عند الدالة الحامضية 7.0 تكون الاحياء المجهرية ذات فعالية فسلجية افضل فضلاً عن كفاءة عالية لفعالية الانزيمات المحللة للسليلوز (Cellulases). يعمل انزيم (Cellulose) على تحليل السليلوز الى وحدات ابسط من السكريات المختزلة (Hyung and lynd, 1996). ان وجود الكلوكوز الناتج يعبر عن الفعالية البايولوجية للعزلة البكترية *B.subtilis* في تحليل السليلوز بكميات متباينة وذلك بتباين الدالة الحامضية للوسط الزرعي. اتفقت الدراسة مع نتائج الباحثين (Deka, *et al*., 2013) بأن الدالة الحامضية المثلى لفعالية بكتريا *B.subtilis* المعزولة من المخلفات الزراعية في تفكيك السليلوز هي 7.0 في حين اوضح (Ray, *et al*., 2007) ان الدالة الحامضية المثلى لفعالية العزلتين *B.subtilis*, *B.circulans* في تفكيك السليلوز هي 7.0 الى 7.5 ، بينما (Ky and Ks, 1987) اشارة الى أن الدالة الحامضية المثلى لفعالية البكتريا *B.subtilis* هي6.0. وفي دراسة اخرى اوضح (Goyal, *et al*,. 2014) ان الدالة الحامضية المثلى هي 8.0.

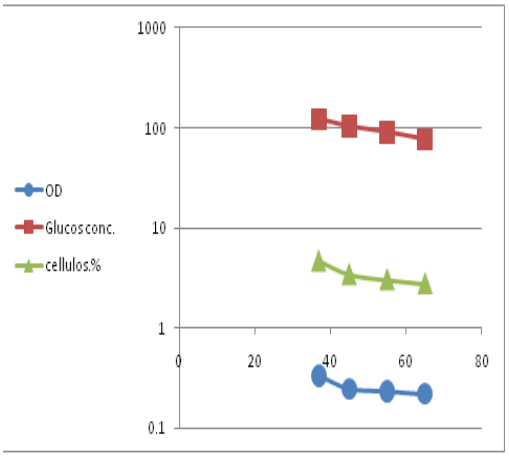


شكل (1) تأثير الدالة الحامضية في فعالية ونمو البكتريا.

تأثير تركيز السليلوز

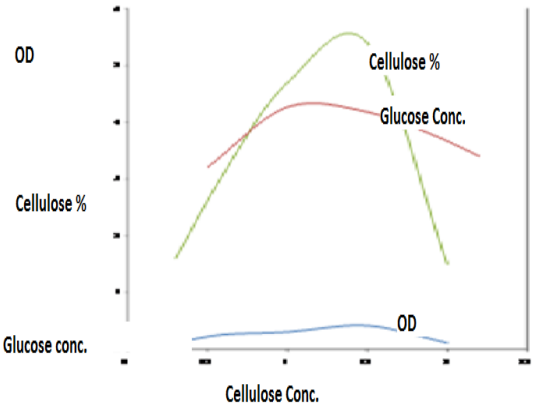
لوحظ بعد مدة حضانة 24±2 ساعة ظهور النمو البكتيري في جميع تراكيز السليلوز في الوسط الزرعي وعند قياس تركيز الكلوكوز لوحظ وجود السكر بتراكيز متفاوتة وكذلك عند حساب نسبة استهلاك السليلوز لوحظ وجود نسب متفاوتة من الاستهلاك وبملاحظة شكل (2) لوحظ ان افضل تركيز للسليلوز المستخدم هو 1.5% اذ اعطى اعلى قيم للامتصاصية التي تمثل النمو البكتيري واعلى تركيز لسكر الكلوكوز الناتج عن تفكك السليلوز وكذلك اعلى نسبة استهلاك للسليلوز عكست هذه النتائج المستحصلة فعالية العزلة البكتيرية المحلية *B.subtilis* في تفكك السليلوز عند جميع قيم تراكيز السليلوز قيد الدراسة 0.3–2%. وجد الباحثون (Goyal, *et al*., 2014) الى ان تركيز السليلوز

الامثل لفعالية البكتريا *Bacillus* sp. في انتاج الانزيمات المفككة للسليلوز هو1% و0.75 %. بينت النتائج ان فعالية الانزيمات المحللة للسليلوز في مدى التراكيز قيد الدراسة لم تثبط وذلك لعدم تشبعها بتراكيز مادة السليلوز. ففعالية الانزيمات عتمد على تركيز المادة السليلوزية وظروف النمو الخاصة (Lee and Blackburn, 1975)



شكل (2) تأثير تركيز السليلوز المستخدم في فعالية ونمو البكتريا تأثير درجة الحرارة

أظهرت النتائج أن العزلة البكتيرية *B.subtilis* لها القدرة على تفكيك السليلوز وانتاج سكر الكلوكوز في جميع درجات حرارة الحضن واعطت قيم امتصاصية متفاوتة وكانت اعلى قيمة عند درجة 37 م°، وكذلك عند تقدير تركيز الكلوكوز وعند حساب نسبة السليلوز المستهلك. لوحظ من النتائج أن للعزلة البكتيرية المحلية *B.subtilis* فعالية ضمن مدى درجات الحرارة قيد الدراسة وعدت درجة حرارة 37 م° هي المثلى للفعالية الانزيمية اذ اعطت اعلى قراءة للامتصاصية وكذلك اعلى تركيز لسكر الكلوكوز واعلى نسبة استهلاك للسليلوز كما موضح في شكل (3). توافقت النتائج في تفكيك السليلوز بواسطة النوع البكتيري المتقدم مع ما وجده الباحثون Deka, *et al.*, (2013) اذ وجدوا ان درجة الحرارة المثلى للفعالية الانزيمية لتحليل السليلوز للبكتريا *B.subtilis* 37 م° بينما توصل الباحثون (Ray, *et al.*, 2007) الى ان درجة الحرارة المثلى لفعالية العزلتين *B.circulans, B.subtilis* هي 40 م°، اما الباحثون (Goyal, *et al.*, 2014) بينوا ان درجة الحرارة المثلى لفعالية البكتريا *Bacillus* sp. هي 35 م° . لوحظ من النتائج ان الفعالية الحيوية في تفكيك السليلوز للعزلة البكتيرية أزدادت عند هذه الظروف وذلك من خلال زيادة النمو الذي استدل عليه بقراءة الامتصاصية الضوئية وكذلك زيادة نسبة استهلاك السليلوز كمصدر كربوني بالاضافة الى زيادة الفعالية في تحليل السليلوز وذلك بتقدير تركيز سكر الكلوكوز الناتج عن الفعالية



شكل (3) تأثير درجة الحرارة في فعالية ونمو البكتريا

الانزيمية للعزلة البكتيرية في تحلل السليلوز. ذلك لان ظروف الحضن للبكتريا تلعب دور مهما في زيادة نمو البكتريا وفعاليتها في انتاج الانزيمات اذ تؤثر ظروف لنمو اللأحياء المجهرية على تحفيزها لانتاج الانزيمات، كذلك تؤثر ظروف التخمر على الانزيمات المنتجة بتأثيرها على الجانب الفعال للانزيم فعند الظروف المثلى تزداد فعالية الانزيمات، فأنزيم ال (Cellulase) هو المسؤول عن تحلل السليلوز بتكسير الاصرة β-1-4- linkage glucosidal في السليلوز.

الاستنتاجات

– امكانية المعالجة البيولوجية للسليلوز باستخدام العزلة البكتيرية *B.subtilis*.

– تم تحديد الظروف المثلى لفعالية العزلة البكتيرية في تفكيك السليلوز ولوحظ وجود تفاوت للفعالية البكتيرية في مدى ظروف الحضن قيد الدراسة وكانت افضل فعالية عند الدالة الحامضية 7.0 وتركيز للسليلوز 1.5% وعند درجة حرارة 37 م°.

التوصيات

– دراسة تطبيق المعالجة البيولوجية للمخلفات الزراعية.

– تطوير عزلات بكتيرية محورة جينيا في انتاج مواد ذات جدوى اقتصادية بالاستفادة من المخلفات الزراعية كمصادر كاربونية للنمو.

المصادر

عطية، سعاد عبدعلي و فرطوس، شهلاء كاظم و معيبد، حسنة وضاح و كاظم، لبيب احمد(2018)، المعالجة الحيوية لقشور الرز وانتاج سكر الكلوكوز باستخدام بكتريا *Bacillus* sp. المجلة السورية للبحوث الزراعية، 2 (5), 96-104.

Abdullah, R.; Kaleem, A. and Naz, Sh. ,(2016) Partial Purification and Characterization of Cellulases Produced by *Bacillus subtilis* Strain, Roman. Biotechlol.Lett., 21 (1), 11103-11109.

Behera, B. C.; Pareda, S.; Dutta, S. K. and Thatoi, H. N., (2014) Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability, Scie.Res.Knowl., 2(1), 1-8.

Dabkowska, K.; Mech, M.; Kopek, k. and Pilarek, M., (2017) Enzymatic Activity of Some Industrial –applied Cellulytic Enzyme Preparations, J.Soci. Ecolog. Chem. Engin., 24(1), 9-18.

Deka, D.; Das, S. P.; Sahoo, N., Das, D. Jawed, M.; Goyal, D. and Goyal, A.(2013), Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizating Physical Parameters for Bioethanol Production , ISRN Biotechnology.

Elmenofy, E. K; Bassiouni, I.; Delal, E. B.; Gaafar, H. M. A.; Abdel-raouf, E. M. and Mahmoud, S. A., (2012) Improving the Nutritive Value of Ensiled Green Rice Straw 2- In Vitro Gas Production,J. Nature and **S**cien., 10 (12), 86-91.

Freier , D.; Mothershed, Ch. P. and Wiegel, J., (1988) Characterization of *clostridium thermocellum* J W2O.App.Environ.Microbiol., 54(1), 204-211.

Goyal, V.; Mittal, A.; Bhuwal, A. K.; Singh, G.; Yadav, A. and Aggarwal, N. K., (2014), Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulose Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus sp*. 3135:Under Stationary and Shaking Conditions, Biotechnol.Research International.

Hamelinck, C. N.; VanHooijdonk G. and Faaij, A. P. C. , (2005) Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology Performance in Short-middle- and Long – term, Biomass Bioenergy, 28, 384-410.

Hyung, J. A. and lynd, L. R., (1996) Cellulose Degradation and Ethanol Production by Thermophilic Bacteria Using Mineral Growth Medium, Appl. Biochem. Biotechnol., 57(58).

Irfan, M.; Mushtaq, Q.; Tabssum, F.; Shakir, H. A. and Qazi, J. I., (2017) Carboxymethyl Cellulase Production Optimization from Newly Isolated Thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for Saccharification Using Response Surface Methodology, AMB Express, 7,29, 1-9.

Ky, C. and Ks, A., (1987) Studies on Cellulose Production by a *Bacillus subtilis*, Antonie Van Leeuwenhoek, 53(2),125-136.

Lee, R. H. and Blackburn, T. H., (1975), Cellulase Production by a thermophilic *Closridium* Species, Appl.Microbiol., 30, 346-353.

Lin, L.; Kan, X. and Wang, D., (2012) Characterization of Extracellular Cellulose-degrading Enzymes from *Bacillus thuringiensis* Strains, Electron.J.Biotechnol., 15(3) 1-7.

Ray, A. K.; Bairagi, A.; Ghosh, K. S. and Sen, S. K., (2007) Optimization of Fermentation Conditions for Cellulase Production by *Bacillus subtilis*cys and *Bacillus circulans* TP3 Isolated from Fish Gut, Actalchthologicaet Piscatoria.

Saini, A.; KAggarwal, N.; Yadav, A. ,(2017), Isolation and Screening of Cellulose Hydrolyzing Bacteria from Different Ecological Niches , Bioeng.Biosci, 5(1) 7-13.

Sari, W.; Safika N.; Darmawi and Fahrimal,Y., (2017) Isolation and Identification of a Cellulolytic Enterobacter from Rumen of Aceh Cattle, 10, 1515-1520.

Victor , O. T.; Ogbe, S. B.; Eriola, B.; Kolawole, L. S. and Bamikole, A., (2003) Cellulase Production by Aspergillus Flavuslin Isolate NSRR 101 Fermented in Sawdust, Bagasse and Corncob, Afr.J.Biotechnol., 2(6), 150-152.