عزل وتشخيص سلالات محلية من جرثومة *Clostridium beijerinckii* ومقارنة قابليتها في إنتاج البيوتانول **Butanol** مع الجرثومة القياسية *Clostridium acetobutylicum* **ATCC824**

أسامة محمد سعيد مصطفى النعيمي
كلية العلوم– جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : 2010/4/8 ؛ تاريخ قبول النشر : 2010/9/1

ملخص البحث :

في هذه الدراسة شخصت (10) عزلات محلية من جرثومة *Clostridium beijerinckii*من (100) عينة تم عزلها من المخلفات الصلبة الناتجة من وحدة تصفية المياه الثقيلة لمستشفى ابن سينا في مدينة الموصل ، وحددت صفات العزلات العشرة اعتمادا على الاختبارات الكيمياحياتية التي أجريت عليها ووجدَ إن العزلتين (4 و 6) مطابقتين لصفات البكتريا القياسية *C.beijerinckii* المنتجة للمذيب العضوي البيوتانول ولغرض مقارنة قابلية أنتاج البيوتانول للعزلتين (4 و 6) مع العزلة القياسية *C. acetobutylicum*ATCC824 فقد عرضت البكتريا لعدة صدمات حرارية وحسب التسلسل (150,100,50,25) ،وعندما حللت المستخلصات بجهاز HPLC وجدَ أعلى إنتاج للبيوتانول (1450) للعزلة المحلية رقم (6) بعد (150) صدمة حرارية وبلغ (890) للعزلة المحلية رقم (4) في حين بلغ (1244) للعزلة القياسية *C. acetobutylicum*ATCC824 ، ولم تنتج العزلتين (4 و 6) البيوتانول إلا بعد تعريضهم للصدمات الحرارية في حين أنتجت السلالة القياسية البيوتانول قبل تعرضها للصدمات، في حين أنتجت السلالة القياسية البيوتانول قبل تعريضها للصدمات .

Isolation And Diagnosis of Local Isolates of *Clostridium beijerinckii* And A Comparison of It's Ability To Produce Butanol With The Standard *Clostridium acetobutylicum* ATCC824

Ausama, M S Al-Naemi
College of Science /University of Mosul

Abstract:

In this study (10) local isolates were identified *Clostridium beijerinckii* from (100) samples from hard residues of heavy water unit

filtration from Ibin Sina hospital in Mosul city, depending on biochemical tests . It has been found that two local isolates (4 & 6) are identical to standard *C. beijerinckii* in producing butanol. In order to compare the production ability of butanol of the two isolates (4 & 6) with standard isolate *Clostridium acetobutylicum*ATCC824 the bacteria were exposed heat shocks (25, 50, 100 and 150), and when the extracts were analyzed by HPLC we found the highest production of butanol was (1450) from local isolate number (6) after (150) heat shocks, and (1244) from standard isolate *C. acetobutylicum* ATCC824 and (890) from local isolate number (4). It was concluded that the two isolates (4 & 6) produce butanol after they have been exposed to the heat shocks.

المقدمة:

في بدايات القرن الماضي استخدمت العمليات التخمرية الصناعية في إنتاج المذيبات العضوية مثل الايثانول Ethanol والأسيتون Acetone والبيوتانول Butanol وباستخدام الكائنات المجهرية ، ولم تتوقف الدراسات في البحث عن طرق تحسين أداء الكائنات المجهرية وبعدة وسائل مثل استخدام التقنيات الفيزيائية و الكيميائية و الهندسة الوراثية (Gapes, *et al*.,1983) ، كذلك بحثت العديد من الدول المنتجة للمواد الغذائية الطرق السليمة في التخلص من المخلفات الغذائية مثل مخلفات البطاطا فاستخدمت طرق التحليل الإحيائي لها في إنتاج بعض المذيبات العضويه باستخدام أنواع من جنس Clostridium ألمنماة على أوساط مخلفات البطاطا مع الكلوكوز (Gapes, *et al*., 1996) .

فضلا عن ذلك توجهت انظار الباحثين الى استخدام طرق من شأنها زيادة إنتاج المذيبات العضوية من قبل جرثومة *Clostridium beijerinckii* عبر تلقيح أوساط تخمرية تحتوي قطع طينية مفخورة داخل المخمرات لتثبيت الجرثومة عليها ولغرض زيادة التركيز الخلوي ، مع إزالة المذيب العضوي البيوتانول من الوسط للتقليل من سميته في الوسط ألزرعي للمفاعل الحيوي وبالتالي الاستفادة القصوى من السكريات الموجودة في الوسط ألزرعي في زيادة نسبة إنتاج المذيبات (Jason ,*et al*., 2002) .

تمتاز جرثومة *C. beijerinckii* بكونها عصوية الشكل منحنية طولها 1.5-7.5 مايكرون مع نهايات محدبة وتتحرك بأسواط محيطية ، أبواغها بيضوية تحت نهائية ، موجبة لصبغة كرام، جدارها الخلوي يحتوي حامضDL-diaminopimelic كما يحتوي على الكلوكوز والكالاكتوز

أيضاً ، وتفضل النمو على الأوساط الزرعية الحاوية على الكاربوهيدرات ، مستعمراتها ذات سطح زجاجي غير منتظم دائري بقطر 2 ملم مرتفعة عن الوسط ألزرعي قليلاً مع حافات حادة شفافة مائلة للون الرمادي ، ومن أهم نواتجها التخمرية حامضي الخليك والبيوتريك ، تتواجد الجرثومة في التربة وبكميات كبيرة وقد تصيب الجروح وتسبب التهابات معقدة (Holt, *et al*., 1994) .

من سلالات *C. beijerinckii* السلاله NCIMB 8052 وهي من الطافرات ذات الأنتاجية العالية للبيوتانول والتي يصل إنتاجها 8.5غرام/لتر قياسا للإنتاج العالي للجرثومة القياسية *C.acetobutylicum* الذي يصل إنتاجها 9.5غرام/لتر تحت نفس الظروف التخمرية (Manish & Hans, 2004 ; George, *et al*., 1983) .

تباين سلالات *C. beijerinckii* في قابليتها لإنتاج البيوتانول لذا بدأ الباحثون بتحديد السلاله الأكثر إنتاجيه ، وقد وجد إن ألسلاله BA 101 الأعلى إنتاجاً حيث وصلت إلى 10غرام/لتر وقد اقترنت الزيادة في الإنتاج بزيادة أحجام الأوساط الزرعية للمخمرات الحيوية (Amer, 2001; Parekh, *et al*,.1999 ; Formanek, *et al*., 1997) .

وتعد الأوساط الزرعية الحاوية على خلاصة المولاس من أفضل الأوساط في إنتاج المذيبات العضوية لاحتوائه على سكريات عديدة ويصل مجموع السكريات إلى 746 غرام/لكل لتر من المولاس وبينت إن 434غرام من سكريات المولاس قابلة للتخمر من قبل جرثومة *C. beijerinckii* BA 101 في مزارع الدفعة ، كما وجد الباحثان إن لهذه السلالة قدره إنتاجية فائقة تصل إلى 22.8 غرام من المذيبات العضوية من 80 غرام مولاس ممزوجاً مع 25.3 غرام كلوكوز (Qureshi, *et al*.,2001; Chen,2001) .

هدف الدراسة هو عزل وتشخيص سلالات محلية من جرثومة *C. beijerinckii* ، و تحديد قابلية هذه السلالات في إنتاج المذيب العضوي البيوتانول و تطوير قدرتها الإنتاجية عبر تعريضها للصدمات الحرارية في تحسين إنتاجية الجرثومة للمذيب العضوي البيوتانول .

المواد وطرائق العمل

1. جمع العينات :

جمعت 100 عينة (10 غم لكل عينة) من المخلفات الصلبة الناتجة من وحدة تصفية المياه الثقيلة لمستشفى ابن سينا والتي تمر عبر وحدات تنقية وترسيب وتجفيف وتترك على شكل طبقات صلبة في أحواض جانبية .

2. الأوساط الزرعية :

أ–وسط مرق الدبس : حضر الوسط بإذابة 200 سم3 من الدبس تركيز 70% في 800سم3 أي نسبة 5:1 من الماء المقطر والمعقم للحصول على محلول سكري تركيز 14% ، ثم أضيف للوسط كاربونات الكالسيوم تركيز 6.1% وكبريتات الألمونيوم تركيز 1.2% وفوسفات الصوديوم تركيزه 0.2% وضبطت الدالة الحامضية للوسط عند 6.8 ثم وزع الوسط في قناني زجاجية بواقع 15سم3 ، عقمت هذه القناني بالماء المسخن الى درجة حرارة 60 °م ولمدة ساعة واحدة (النعيمي ، 2005) .

حضرت كافة الأوساط والمجهزة من قبل شركة Difco اعتمادا على Cruickshank وآخرون 1975 في تحضير وتهيئة الأوساط الزرعية (Cruickshank., *et al*.,1975) .

ب–وسط الاكار المغذي .

ج–وسط اختبار إنزيم تحلل اليوريا : حضر وسط Christensen's Urea ووزع على قناني زجاجية بواقع 15 سم3 .

د– وسط اختبار اللستنيز : حضر الوسط ووزع الوسط على قناني بواقع 15سم3 .

هـ– وسط اختبار إنزيم الليبيز :حضر الوسط ووزع على أطباق بتري واختبر تحلل الدهن فيه .

و– وسط اختبار تميع الجيلاتين : حضر وسط الجيلاتين المغذي ووزع في قناني بمقدار 20سم3 لكل قنينة .

ز– وسط اختبار التخمر العاصف : حضر الوسط ووزع على قناني واختبر التخمر العاصف.

ح– وسط اختبار تخمر الكاربوهيدرات : حضر الوسط المضاف له السكريات التالية لاختبارها .

Arabinose	Fructose	Glycerol	Melezitose	Ribose	Starch
Cellobiose	Galactose	Lactose	Melibiose	Salicin	Sucrose
Dulcitole	Glucose	Maltose	Rhamnose	Sorbitol	Xylose

3. اختيار العزلات المحلية المطابقة لصفات جرثومة *C. beijerinckii*

اختيرت العزلتين 4 و 6 من مجموع العينات العشرة لكونها مطابقة لصفات النوع *C. beijerinckii* من حيث الاختبارات الكيمياحياتية ، ولكي نحول الخلايا الخضرية إلى الشكل ألبوغي ، حضرت دوارق سعة 250سم3 وأضيف لها رمل مغربل ومعقم بمقدار 200 غم ورطب الرمل بالماء المقطر بمقدار 10سم3 ثم عقمت الدوارق بالموصدة لأربع مرات في درجة حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة لكل مرة ، وتم التخلص من ألرطوبة بوضع الدوارق في فرن بدرجة حرارة 200 °م لمدة 24 ساعة ، وأخيراً لقحت الدوارق بمقدار 2 سم3 من مزروع العزلات 4 و 6 المختارة وحضنت بالحاضنة في درجة حرارة 37 °م لمدة أسبوع لنحصل على الأبواغ البكتيرية (Peppler & Perlman, 1979) .

4. تهيئة الجراثيم القياسية :

تم الحصول على عزلة قياسية من جرثومة *C.acetobutylicum* ATCC824 وذلك من مختبرات جامعة Houston Rice في الولايات المتحدة الأمريكية وبرقم كتالوج -1615 5500 . ولتهيئة العزلة المجففة ، تم تحضير الوسط الخاص بها والمكون من محلولين :

المحلول الاول (A) المغذي ويتكون :

غرام	المادة	حجم	المادة
2	$(NH_4)SO_4$	1ml	$MgSO_4$-$7H_2O$ (0.1 g/ml)
1	K_2HpO_4	1.5ml	$FeSO_4$-$7H_2O$ (0.01 g/ml)
0.5	KH_2PO_4	0.01ml	CaCl2 (0.1 g/ml)
2	Tryptone	0.01ml	$MnSO_4$-H_2O (0.1 g/ml)
1	Yeast extract	0.02ml	$CoCl_2$ (0.1 g/ml)
		0.03ml	$ZnSO_4$-$7H_2O$ (0.1 g/ml)

ذوبت المكونات اعلاه في 0.5 لتر ماء مقطر ومعقم

المحلول الثاني (B) والمحضر :

من إذابة 50 غرام كلوكوز في 0.5 لتر من الماء المقطر المعقم .

تم مزج المحلول (A) مع المحلول (B) ووزع على قناني بواقع (15 سم^3) وعقمت قناني الوسط بالموصدة بدرجة حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة ، ثم لقحت القناني من العزلة القياسية المجففة وحضنت لاهوائياً على درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة .

5. جهاز التقطير التجزيئي :

استخدمت عملية التقطير ألتجزيئي باستخدام جهاز التقطير ألتجزيئي Fractional distillation الذي يتكون من عمود تقطير مائل مرتبط بعمود تجزئه زجاجي قائم في قمته محرار وفي أسفله دورق سعة 500سم3 يحتوي الوسط التخمري ، ويتم جمع الحاصل من نهاية عمود التقطير بدورق دائري حجمه 250سم3 .

6. الكشف عن البيوتانول :

استخدمت طريقة جونز و وود Jones and Wood في الكشف عن وجود البيوتانول، والطريقة تتضمن تهيئة الكاشف الذي يتكون من اذابة 2.67 غم من رابع كلوريد الكروم Chromium tetraoxide (CrO_3) مضاف اليه حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 بمقدار 2.3 سم3 ثم أضيف له 10سم3 من الماء المقطر ، ولأجراء الكشف عن البيوتانول في نواتج التقطير تم تسخين المزيج إلى درجة حرارة 80 °م للتخلص من المذيبات العضوية الأخرى

كالأسيتون الذي درجة غليانه 56.53 °م والايثانول درجة غليانه 78.2 °م في حين درجة غليان البيوتانول 99.5 °م ، تم إضافة 2 قطرة من الناتج إلى 1سم3 من الأسيتون النقي في أنبوبة اختبار بعدها أضيف قطرة صغيره من كاشف جونز ، وعدت النتيجة موجبه عند ظهور اللون الأخضر خلال 15 ثانية من الاختبار (Jones & Woods ., 1986) .

7. جهاز التحليل الكروماتوكرافي السائل (HPLC)

استخدم جهاز HPLC العائد للشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية / مدينة الموصل ، والجهاز فرنسي الصنع موديل CE. 1200 ، ويستخدم الجهاز في تحليل المذيبات العضوية وهو مرتبط بوحدة حاسوبيه مجهزة للرسومات البيانية .

تم تهيئة محلول قياسي من البيوتانول بتركيز 60% في الماء المقطر لمعايرة الجهاز قبل الاستخدام وتحديد قيمته في الرسم البياني ثم قورن مع قراءات العزلتين (4 و 6) والعزلة القياسية للجرثومة القياسية *C.acetobutylicum* ATCC 824 .(Sang, 2008)

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) نتائج الاختبارات الكيمياحياتية لمجموعة من السكريات وقابلية السلالات المعزولة على تخميرها ، ومن مجموع عشر سلالات من جرثومة الكلوستريديوم المعزولة محلياً تطابقت سلالاتين فقط من العزلات العشرة وهم العزلة رقم (4) والعزلة رقم (6) مع صفات السلالة القياسية لجرثومة *C. beijerinckii* من حيث قابليتها في تخمير السكريات المختارة ، في حين كانت سالبه لكل من السكريات (دولسيتول Dulcitole وسالسينٍ Salicin وسوربيتول Sorbitol و النشاٍ Starch) وهو ما يميز جرثومة *C. beijerinckii* عن جرثومة *C. acetobutylicum*ATCC 824 الموجبة الاختبار للسكريات الأربعة السابقة وهي صفة تشخيصية للتميز بين الجرثومتين (Yan, *et al*.,1988 ؛ Cato & Stackebrandt, 1989؛ (Johnson, *et al*., 1997 .

الجدول(1) نتائج الاختبارات الكيمياحياتية للعزلات المحلية لجرثومة*C. beijerinckii* والجرثومة القياسية *C. acetobutylicum* ATCC 824

الاختبارات	أرقام العينات المعزولة محلياً											نتيجة اختبار جرثومة *C. acetobutylicum* القياسية ATCC 824	صفات جرثومة *C.beijerinckii* القياسية
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Arabinose	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+		+	+
Cellobiose	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+		−	+
Dulcitole	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−		+	−
Fructose	−	−	+	+	−	+	−	+	−	+		+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Glycerol	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−		−	−
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Maltose	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−		+	+
Melibiose	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−		−	+
Melezitose	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−		−	+
Rhamnose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−		−	−
Ribose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−		−	−
Salicin	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+		+	−
Sorbitol	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+		+	−
Starch	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+		+	−
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Xylose	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−		+	+
تحلل اليوريا	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+		−	−
اللستنيز	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+		−	−
اللبيز	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−		−	−
تميع الجيلاتين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
تحلل الكازايين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+

والجدول (2) يبين نتائج اختبار (جونز و وود) في الكشف عن وجود البيوتانول و وتكوين اللون الأخضر خلال 15 ثانية من الاختبار ، حيث نلاحظ من الجدول ان العزلة رقم (4) ورقم (6) لم ينتجان المذيب العضوي البيوتانول في بداية نموهما ولكونهم من العزلات المحلية ولم يتم تعريضهم لأي مؤثر فيزيائي فكان إنتاجهم للمذيب العضوي صفر ولم نحصل على أي تغيير لوني لكاشف (جونز و وود) في حين كانت الجرثومة القياسية *C. acetobutylicum*ATCC 824 منتجه للبيوتانول وقد تغير لون الكاشف وهذا يعد دليلاً على وجود البيوتانول في نواتج التقطير النهائيه ، في حين أظهر الجدول نفسه أن العزلة رقم (4) لم

تنتج البيوتانول بعد 25 و 50 صدمة حرارية وإنما أنتجته بعد 100 صدمة حرارية وهذا الاختبار يتطابق مع نتائج التحليل الكروماتوكرافي السائل HPLC في الأشكال(2) و(5)و(8).

الشكل (2) يوضح إن العزلة المحلية رقم (4) لم تنتج المذيب العضوي البيوتانول بعد 25 صدمة حرارية وكذلك لم تنتجه بعد 50 صدمة حرارية في حين أنتجت العزلة نفسها البيوتانول بعد 100 صدمة حرارية وبلغ إنتاجها (457.8) في الشكل (5) ، وازداد إنتاجها من البيوتانول بعد 150 صدمة حرارية وبلغ إنتاجها (890) في الشكل (8) وهذه الزيادة في الإنتاج حصلت بعد زيادة عدد الصدمات الحرارية ، كما نلاحظ إن العزلة المحلية رقم (9) أنتجت المذيب العضوي البيوتانول بعد (25) صدمة حرارية وبلغت كمية إنتاجها (455.3) في الشكل (3) وازداد إنتاجها من المذيب العضوي بازدياد الصدمات الحرارية وبلغ إنتاجها (980.6) الشكل (6) بعد 100 صدمة حرارية ، كما بلغ أعلى إنتاج لها (1450) بعد 150 صدمة حرارية كما مبين في الشكل (9) في حين تطابقت نتائج تحليل HPLC للجرثومة القياسية *C. acetobutylicum*ATCC 824 وازداد إنتاجها للبيوتانول (877 و 1192 و 1244) بازدياد عدد الصدمات الحرارية (25 و 100 و 150) على التوالي ، فضلا عن ذلك نلاحظ إن إنتاج البيوتانول كان أعلى في العزلة رقم (6) *C. beijerinckii* عن *C. acetobutylicum*ATCC 824 القياسية وبهذا نكون قد حصلنا على عزله محليه لها قدرة إنتاجية معقولة من البيوتانول .

الجدول(2) الكشف عن إنتاج البيوتانول باختبار جونز للعزلات المحلية لجرثومة *C. beijerinckii* والجرثومة القياسية *C. acetobutylicum* ATCC 824

العزلات المختبرة	دون صدمة	بعد25 صدمة	بعد50 صدمة	بعد100 صدمة	بعد 150 صدمة
عزله رقم 4	-	-	-	+	+
عزله رقم 6	-	+	+	+	+
جرثومة القياسية *C.acetobutylicum* ATCC 824	+	+	+	+	+

(+) فحص موجب ودليل على وجود البيوتانول

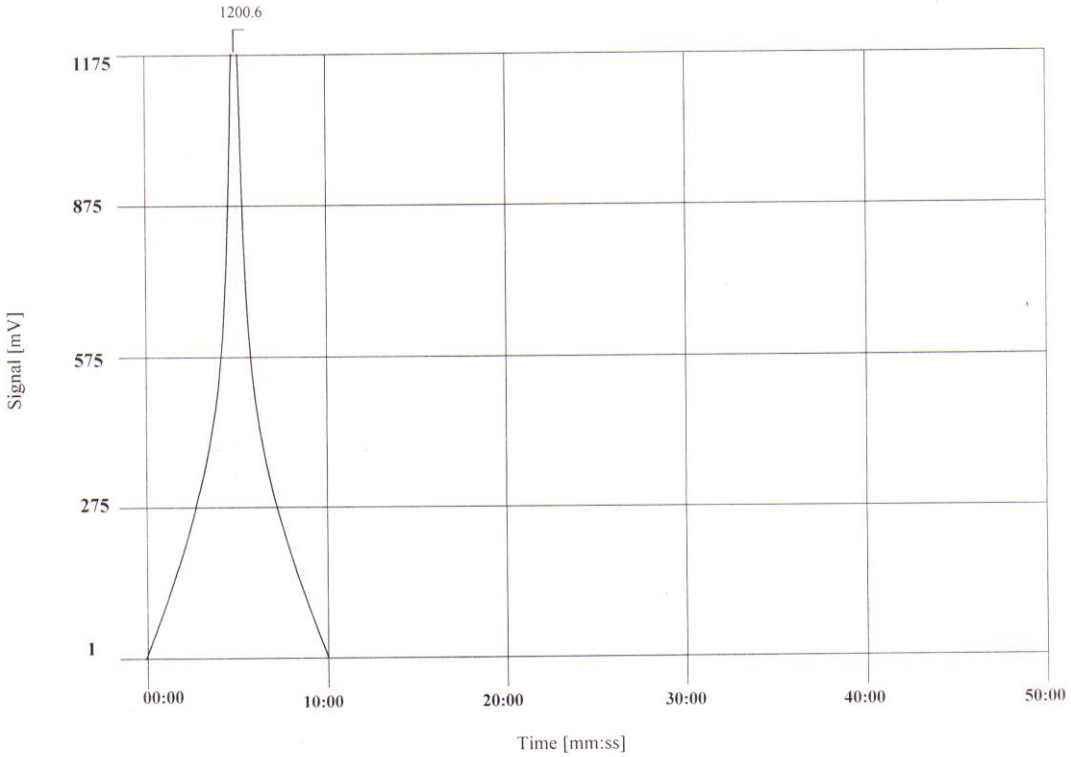
(−) فحص سالب والمستخلص خالي من الالديهايدات

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5440(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	5000
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	02:24.5	01:22.1	02:23.5	1200.6	N/A

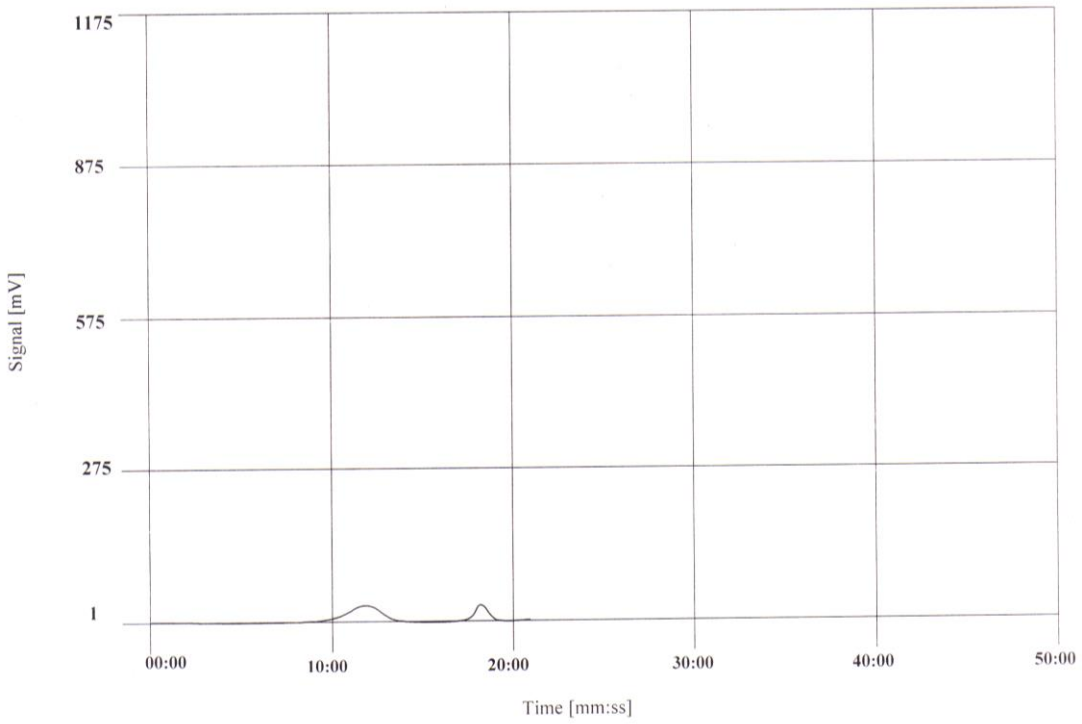
الشكل (1) قياس المذيب العضوي البيوتانول تركيز 60% (Control)

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5441(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	00:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6344
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:55.7	00:33.8	00:59.9	00.0	N/A

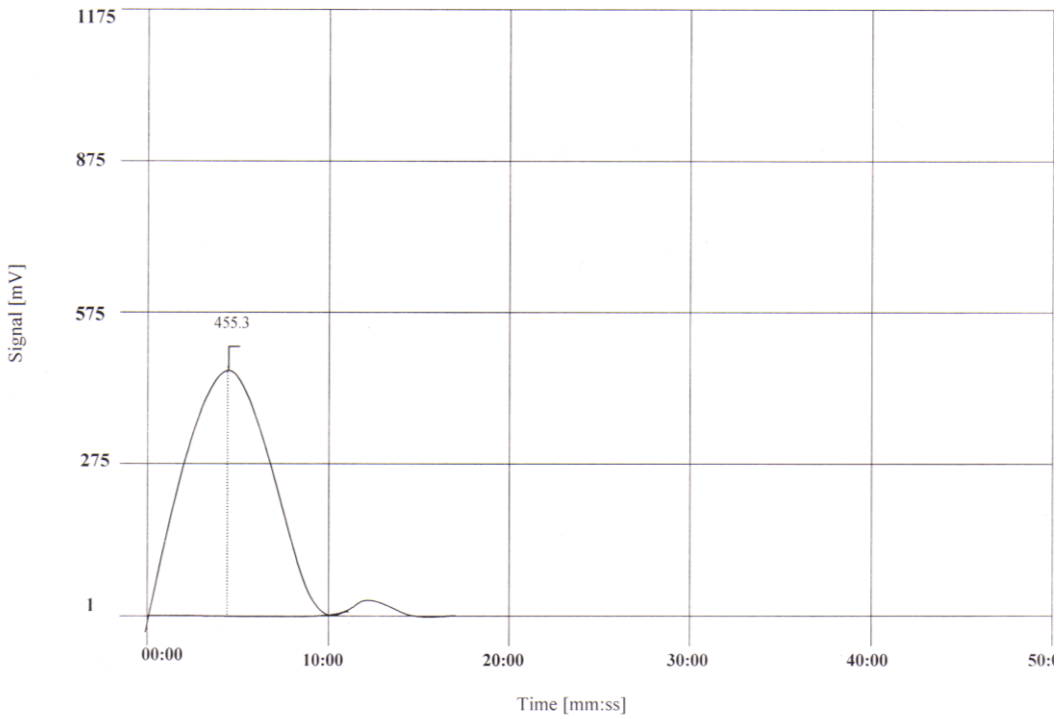
الشكل (2) قياسات العزلة (4) للمذيب العضوي البيوتانول بعد 25 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5442(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6350
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:22.5	02:35.7	02.52.3	455.3	N/A

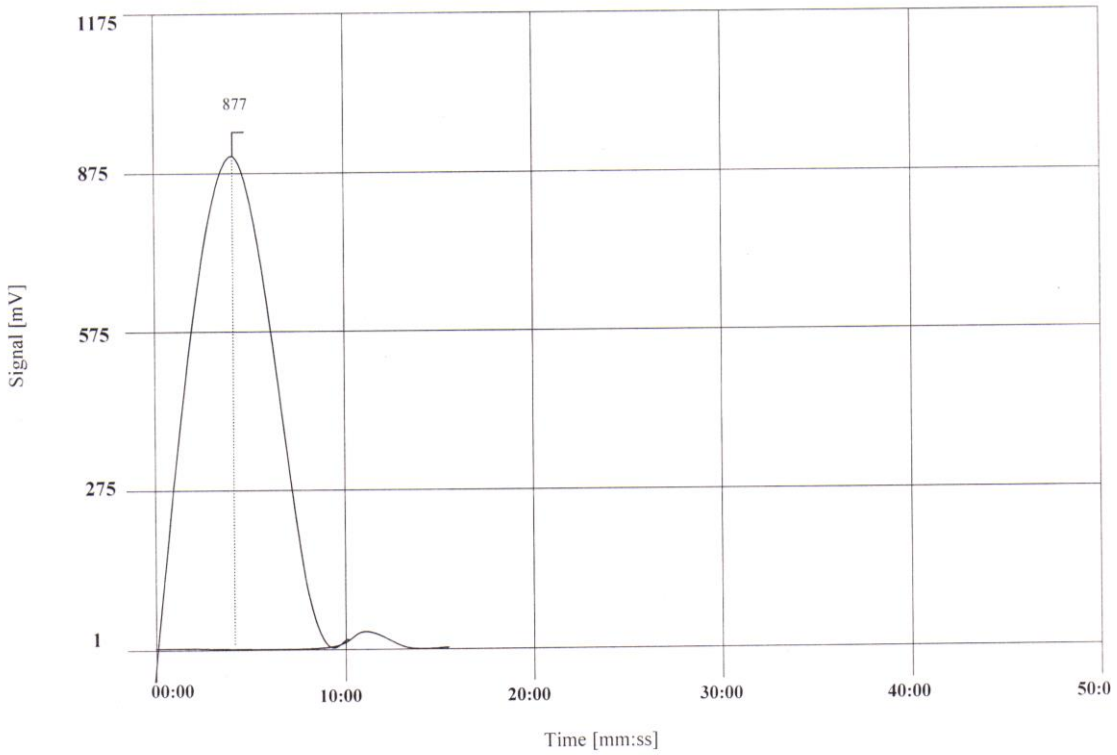
الشكل (3) قياسات العزلة (6) للمذيب العضوي البيوتانول بعد 25 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5443(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6367
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:43.7	00:25.0	00:59.2	877	N/A

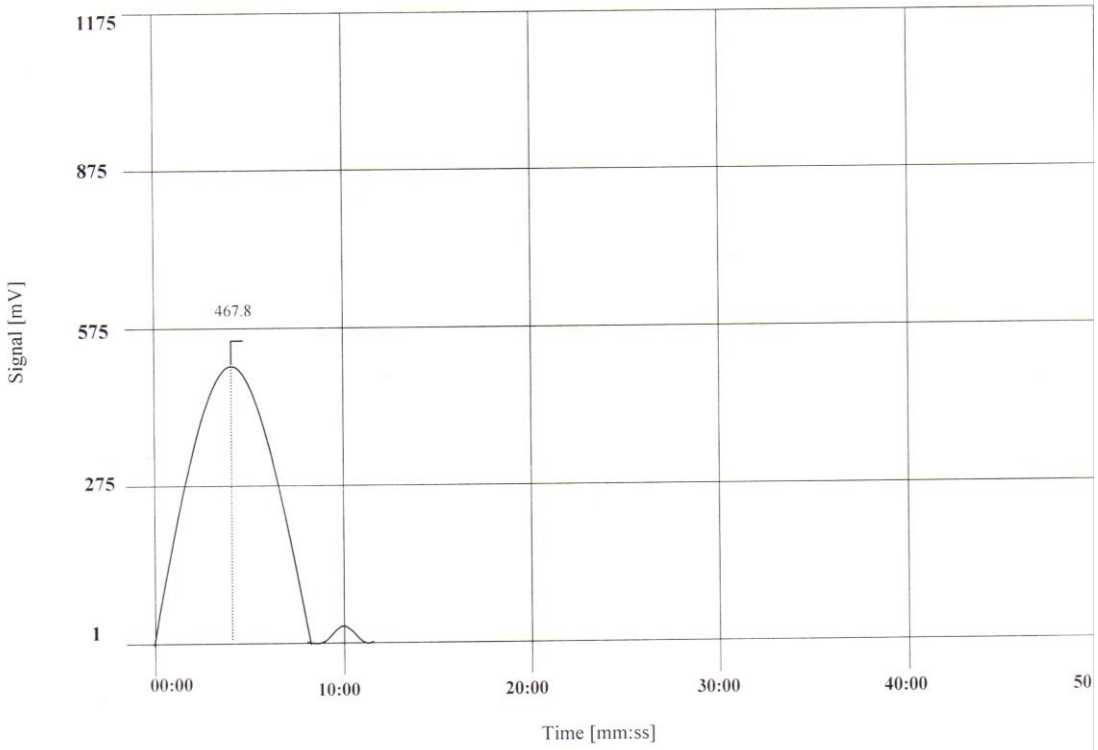
الشكل (4) قياسات الجرثومة القياسية *C.acetobutylicum* ATCC 824 للمذيب العضوي البيوتانول بعد 25 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5444(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6453
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:21.5	00:42.3	01:03.2	467.8	N/A

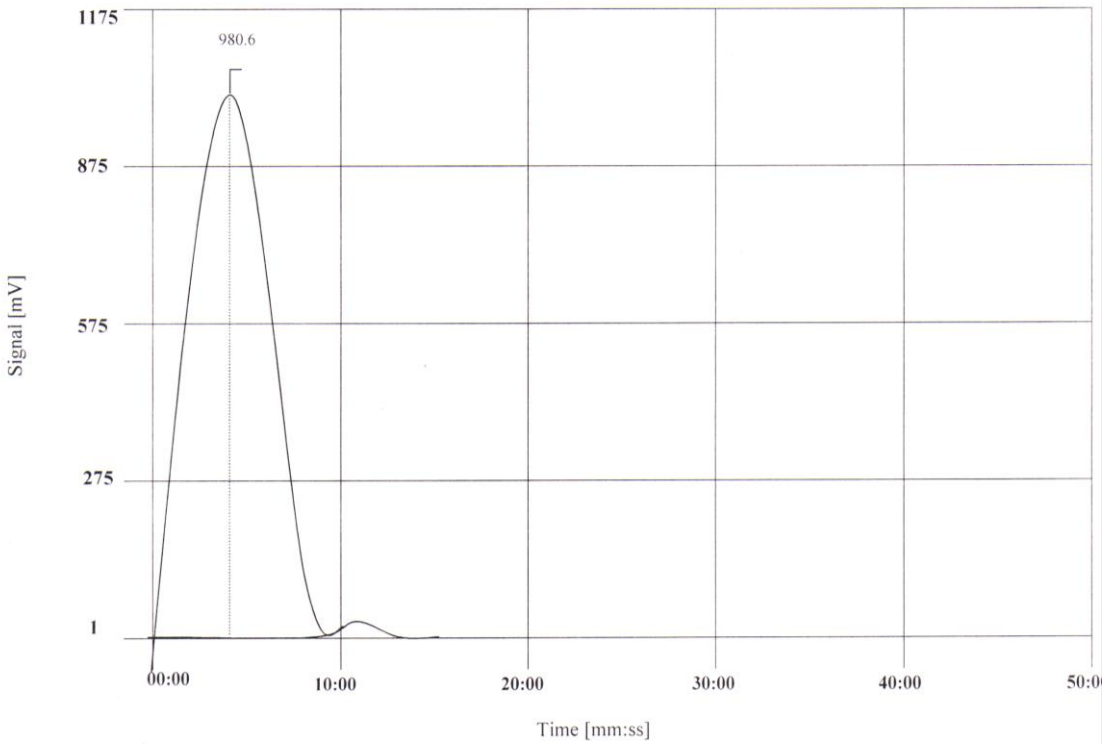
الشكل (5) قياسات العزلة (4) للمذيب العضوي البيوتانول بعد 100 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5445(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6550
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	02:03.3	00:44.9	01:16.5	980.6	N/A

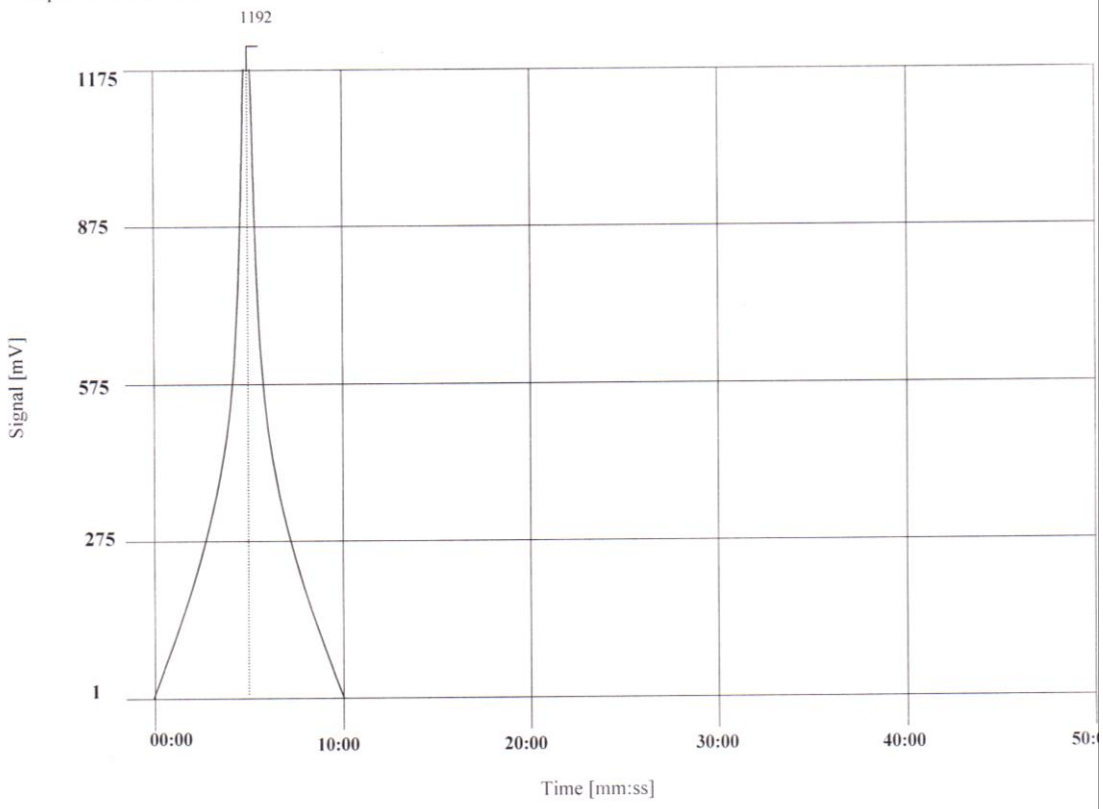
الشكل (6) قياسات العزلة (6) للمذيب العضوي البيوتانول بعد 100 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5446(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6766
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:53.3	00:55.4	01:03.3	1192	N/A

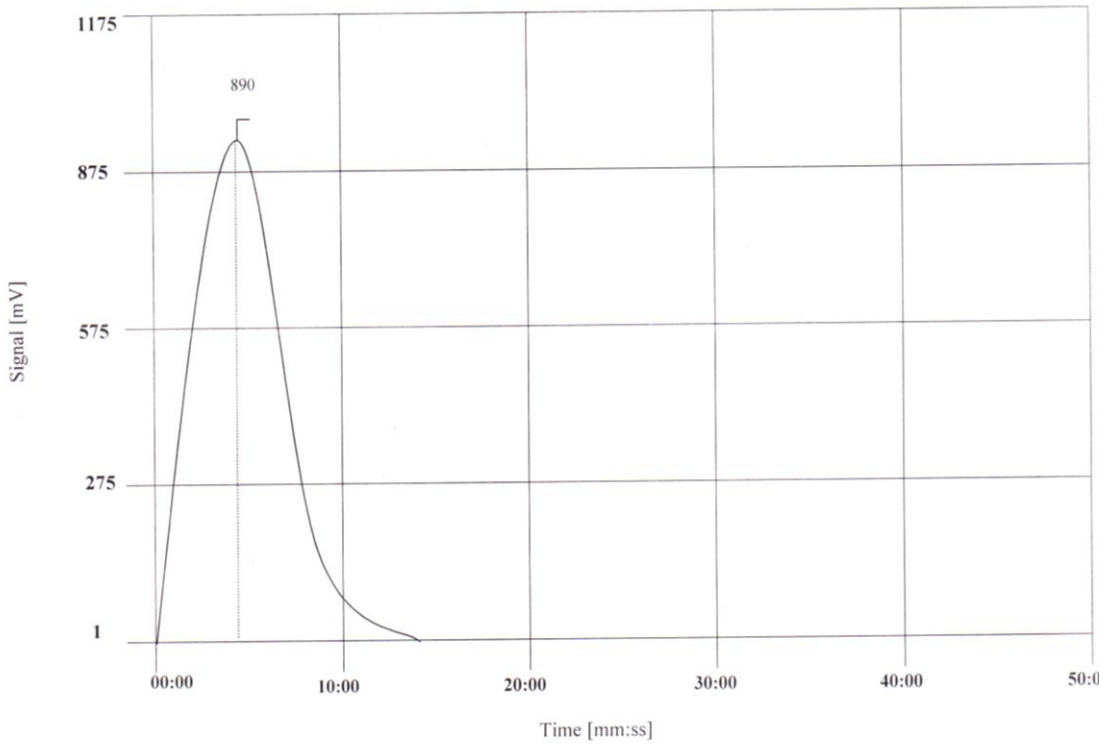
الشكل (7) قياسات جرثومة القياسية *C.acetobutylicum* ATCC 824 للمذيب العضوي البيوتانول بعد 100 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5447(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6775
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	02:53.1	03:30.3	03:56.3	890	N/A

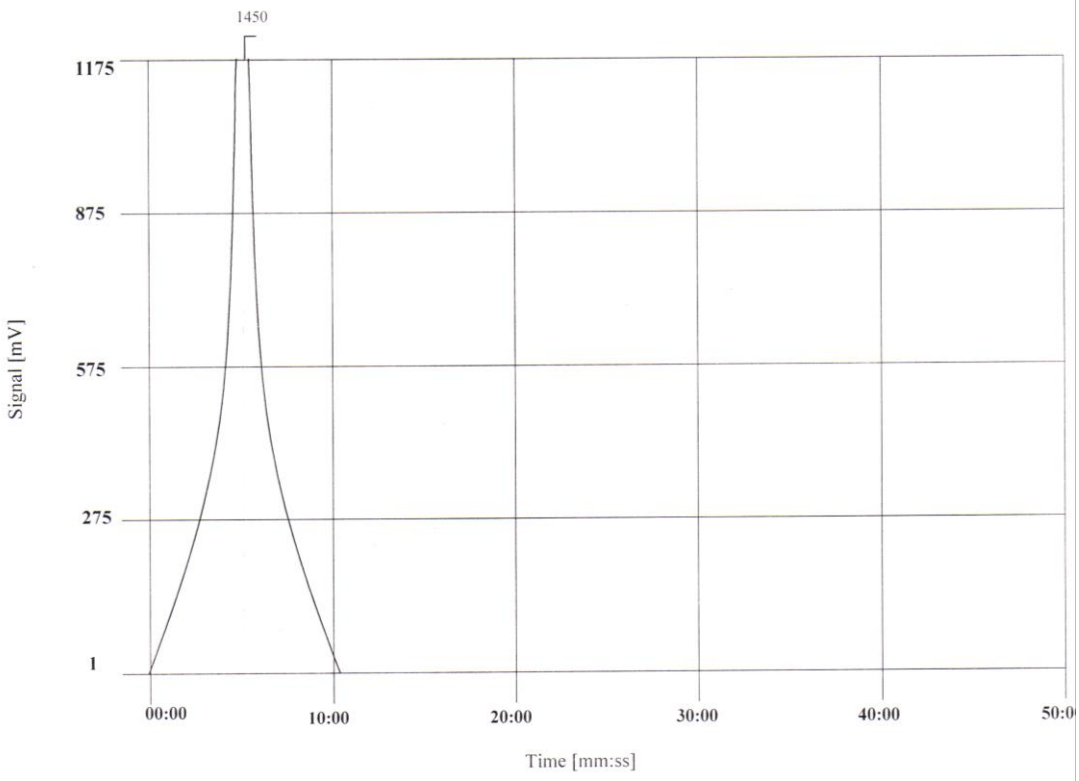
الشكل (8) قياسات العزلة (4) للمذيب العضوي البيوتانول
بعد 150 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5448(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6852
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:44.5	00:34.4	01:57.3	1450	N/A

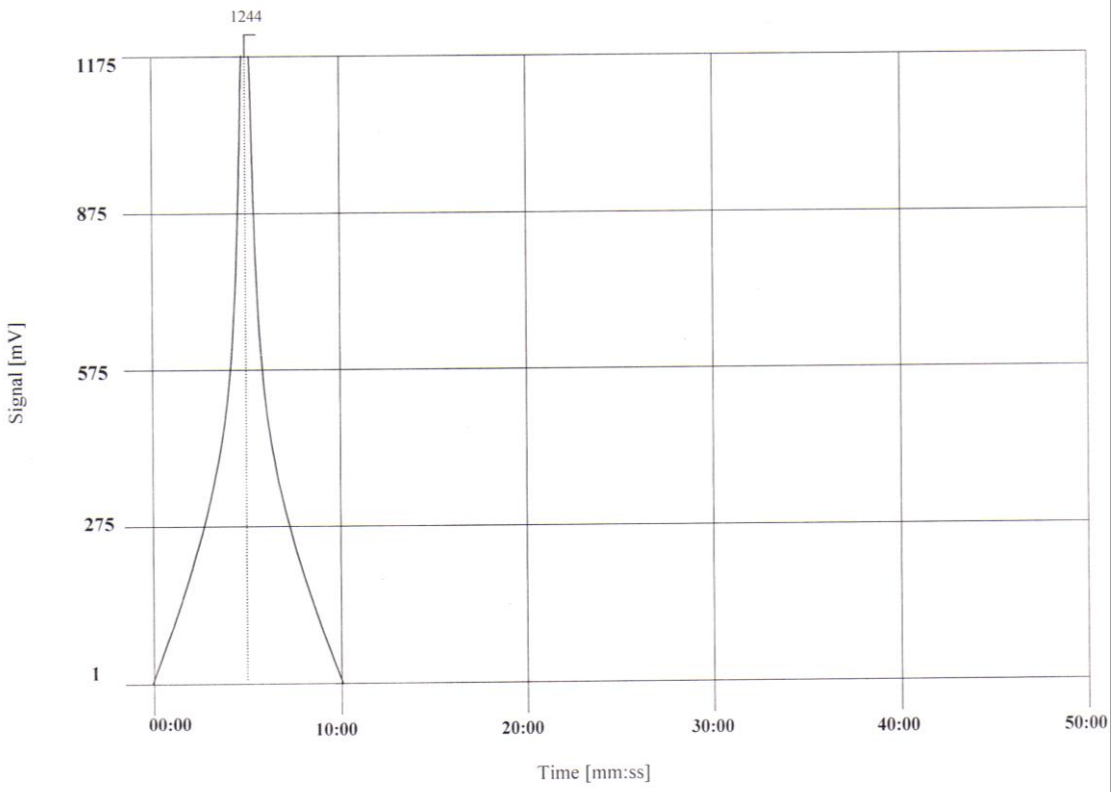
الشكل (9) قياسات العزلة (6) للمذيب العضوي البيوتانول
بعد 150 صدمه حرارية

Chromatogram Report

Cgm001 13-08-07 5449(\Case Study\saba\ )

Run Time [mm:ss]	50:00.0	Sample Rate[point/s]	12.500	Readings	6867
Sample Type	Unknown	Detector Unit	V(Volts)	Detector Range	1.000
Detector Offset	0.000	Sample Name	Sample001	Method Name	Method1
Method Location	\Case Study\	Conc. Factor	1.00	ISTD Conc.	1.000

<Acquired via Chanal 1>



No.	Peak Name	Ret. Time [mm:ss]	Start Time [mm:ss]	End Time [mm:ss]	Area [mV]	Quantity
001	* * *	01:22.6	01:54.3	01:59.3	1244	N/A

الشكل (10) قياسات جرثومة القياسية *C.acetobutylicum* ATCC 824 للمذيب العضوي البيوتانول بعد 150 صدمه حرارية

المصادر:

ألنعيمي، اسامة محمد سعيد (2005) عزل وتشخيص جرثومة *Clostridium acetobutylicum* وتطوير قابليتها في انتاج بعض المذيبات العضوية ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

Amer, S. (2001) Glucose uptake in *Clostridium beijerinckii* NcIMB 8052 and the solvent hyperproducing mutant BA 101, Applied and Environmental Microbiology, Vol.67, No(11), Pp: 5025-5031.

Cato, E. P. and Stackebrandt, E. (1989). Taxonomy and Phylogeny. Clostridia, Plenum Press, New York, Pp:1-26.

Chen, R. (2001) Examination of Physiological and Molecular factors involved in enhanced solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA 101, Applied and Environmental Microbiology , Vol. 65, No(5), Pp: 2269-2271.

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. and Swan, R. H. A. (1975). " Medical Microbiology" 12th ed., Longman Group Ltd., New York.

Formanek,J.; Mackic,R. and Blaschek, H.P.(1997) Enhanced Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA 101 growth in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or Glucose , Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No(6), Pp:2306-2310.

Gapes, J.R. ; Larsen, V.F. and Maddox, I.S. (1983) A note on procedures for inoculum development for the production of solvents by strain of *Clostridium beijerinckii*, Applied Bacteriology, Vol. 55, Pp: 363-365.

Gapes, J.R. ; Nimcevic, D. and Friedl, A. (1996) Long –term continuous cultivation of *Clostridium beijerinckii* in a two –stage chemostate with on –line product removal, Applied and Environmental Microbiology , Vol. 62, Pp: 3210-3219.

George, H.A. ; Johnson, J.L.; Moore, W.E.C. ; Holdeman,J. and Chen, J.S.(1983) Acetone, Isopropanol and Butanol production by *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium aurantibutyricum*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 45, No (3) , Pp:1160-1163.

Holt, J. G. ., Krieg, N. R ., Sneath, P. H. A. ., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of determinative Bacteriology. 9th. ed. Williams and Wilkans Comp. USA. Baltimore.

Jason, L. ; Justin,S. ; Nasib,Q. and Hans, P.B. (2002) Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA 101 in an immobilized cell biofilm reactor, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.(98-100), No(1-9), Pp: 591-598.

Johnson, J.L. ; Toth, J. ; Santiwanakul, S. and Chen, J. S. (1997). Cultures of *Clostridium acetobutylicum* from various collections comprise *Clostridium acetobutylicum* , *Clostridium beijerinckii*, and two other Distinct types based on DNA-DNA reassociation. International J. Systematic Bacteriol., 47, Pp:420-424.

Jones D.T. & Woods D.R. (1986) Acetone–butanol fermentation revisited.Microbiol Rev 50:484–524.

Manish,P. and Hans, P.B. (2004) Butanol production by hypersolvent-producing mutant *Clostridium beijerinckii* BA 101 in corn steep water medium containing maltodextrin, Biotechnology letters, Vol. 21, No(1), Pp:45-48 .

Parekh, M. ; Formanek, J. & Blaschek, H.P. (1999) Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 using alow –cost fermentation medium based on corn steep water, Applied Microbiology and Biotechnology , Vol. 51, No(2), Pp:152-157.

Peppler, H.J. and Perlman, D. (1979). Microbial Technology. Academic Press, Inc. London, 1, Pp:188-206.

Quresh,N. ; Lolas,A. and Biaschek, H.P. (2001) Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101, Industrial Microbiology and Biotechnology , Vol.26, No (5), Pp:290-295.

Sang, Y. L.; Jin, H.; She, H. J.; Lars, K. N. Jaehyun, K.K.(2008) Fermentative Butanol Production by Clostridia, Biotechnology and Bioengineering, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 101, No. 2, Pp:209-228

Yan, R.T. ; Zhu, X. ;Golemboski, C. and Chen, J.S. (1988). Expression of solvent-forming enzymes and onset of solvent production in batch cultures of *Clostridium beijerinckii* . Applied and Environmental Microbiology., 54, Pp: 642-648.