مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (5) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (5) 2010

دراسة تأثير حامض النتروز والأشعة السينية على قابلية الجراثيم *Bacillus subtilis* في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي.

الدكتورة زينة وجيه الجادر *

(تاريخ الإيداع 13 / 1 / 2010. قبل للنشر في 18 / 10 / 2010)

□ ملخّص □

تضمنت الدراسة استخدام المطفر الكيميائي حامض النتروز (HNO_2) بتركيزين (0.05 ،0.1 M) ولمدد (10،15، 17.5، 20، 40، 80 دقيقة) والمطفر الفيزيائي المتمثل بالأشعة السينية X-ray عند طول موجي 14.6 nm ولمدد (10، 20، 30، 60 ثانية) للحصول على أعلى إنتاجية من السكر المتعدد الخارج خلوي المنتج من العزلة المحلية *Bacillus subtilis* بعد 7 أيام من التحضين. تم أولاً دراسة تأثير المطفر الكيميائي حامض النتروز (HNO_2) وتبين أن أعلى إنتاجية من السكر المتعدد كانت (5.53 غم/لتر) عند التعريض لحامض النتروز بتركيز (M0.05) لمدة (40 دقيقة) فيما تحققت أقل إنتاجية للسكر المتعدد (2.53 غم/لتر) عند التعريض للتركيز نفسه من حامض النتروز لمدة (15 دقيقة). في حين أظهرت نتائج التعريض لحامض النتروز بتركيز (M0.1) أن أعلى إنتاجية من السكر المتعدد كانت (4.03 غم/لتر) عند التعريض للمطفر لمدة (40 دقيقة) فيما انخفضت إنتاجية السكر المتعدد عند مدة التعريض الأقل للتركيز نفسه إذ بلغت(1.83 غم/لتر) عند التعريض لمدة 10 دقائق. تم دراسة تأثير المطفر الفيزيائي بالأشعة السينية (X-ray) وتبين أن أقصى إنتاجية للسكر المتعدد كانت (7.12 غم/لتر) عند التعريض للأشعة السينية لمدة 60 ثانية في حين انخفضت إنتاجية السكر المتعدد عند التشعيع لمدد أقل.

الكلمات المفتاحية: حامض النتروز ، الأشعة السينية، *Bacillus subtilis* ، انتاج السكر المتعدد الخارج خلوي

* **مدرس مساعد– قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة الموصل – العراق.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (32) العدد (5) 2010
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (32) No. (5) 2010

A Study of the Effect of Nitrous Acid and X-Ray on the Ability of Bacteria *Bacillus subtilis* for Extracellular Polysaccharide Production.

Dr. Zena Wajeeh AL-Gader*

(Received 13 / 1 / 2010. Accepted 18 / 10 /2010)

□ ABSTRACT □

This study includes using nitrous acid (HNO_2) in two concentrations (0.05, 0.1M) for (10, 15, 17.5, 20, 40, 80) minutes as a chemical mutagen and a physical mutagen represented by x- ray at 14.6 nm for (10, 20, 30, 60) seconds to achieve the highest productivity of extracellular polysaccharide from the local strain of *Bacillus subtilis* after (7) days of incubation. The study has shown that the highest productivity of polysaccharide was (5.53 g/L) when exposing to 0.05 M of HNO_2 for 40 minutes, whereas the lowest productivity was (2.53g/L) in the same concentration of HNO_2 but at 15 min. exposing period. The results show that exposing the bacteria to 0.1 M of HNO_2 for 40 min gave the highest productivity which was (4.03 g/L), while this productivity decreases to (1.83 g/L) at 10 minutes exposure period. Interestingly, exposing the bacteria to X-ray at 14.6 nm gave the best result for polysaccharide productivity which was (7.12 g/l) at 60 seconds, whereas this productivity decreases at shorter radiation periods.

Key words: Nitrous acid, X-ray , *Bacillus subtilis* , Extracellular polysaccharide production

*Dept. of Biology, College of Education, Univ. of Mosul, Mosul, Iraq.

مقدمة:

تعد السكريات المتعددة إحدى نواتج التصنيع الحيوي الجديد الذي يتطلب تقانة جديدة في إنتاج المركبات من خلال الهندسة الوراثية للحصول على أحياء مجهرية محورة وراثياً تتمتع بإنتاجية عالية من المركبات.تم اكتشاف السكريات المتعددة المايكروبية خلال النصف الثاني من القرن العشرين وهي بوليمرات حيوية ناتجة من عمليات التخمر المايكروبي Microbial fermentation للبكتريا والفطريات التي لها القابلية على إنتاج العديد من الجزيئات الحاوية للسكريات ، إذ تتمكن هذه الأحياء من إنتاج السكريات تحت ظروف يمكن السيطرة عليها باستخدام السلالات المنقاة من تلك الأحياء [1]. ويمكن تصنيفها اعتماداً على موقعها بما يخص خلايا الجراثيم فهي إما أن تدخل في تركيب خلايا الجراثيم أو أن تكون موجودة داخل و خارج خلايا هذه الجراثيم على شكل غمد أو علبة Capsule ومما لاشك فيه أن الأحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة خارج خلاياها هي أفضل تلك الأنواع وذلك لسهولة عزلها بأقل تكلفة ممكنة [2]. فضلاً عن تطبيقاتها الواسعة في مجال الصناعات الغذائية بوصفها مثخنات ومواد للنكهة [3]. وكذلك في الصناعات الدوائية كمستحضرات التجميل ومراهم ومعاجين الأسنان[4]. وأيضاً في التطبيقات الصناعية كما في صناعة الأصباغ وصناعة الورق والأحبار [5].

تخزن المعلومات الوراثية Genetic information على جزيئة الـDNA للخلية وهذه المعلومات تحدد الطبيعة التركيبية والأيضية لهذا الكائن، والمحتوى الوراثي للجراثيم مقسم إلى قطع تسمى المورثات Genes وهي تسلسل من النيوكليوتيدات تمتلك وظائف متخصصة بعضها يشفر بناء جزيئة الـRNA وبروتين والتي تسمى مورثات تركيبية Structural genes وبعضها الآخر له وظائف تنظيمية في السيطرة على الفعاليات الخلوية تسمى المورثات المنظمة Regulatory genes [6].

استخدمت العديد من المواد الكيميائية لإحداث الطفرات في الأحياء المجهرية مسببة تحطم الكروموسوم للخلايا الحقيقية والبدائية النواة، يمكن تقسيم هذه المواد إلى ثلاثة مجاميع رئيسية وهي مشابهات القواعد النيتروجينية Base analogues مثل 5-bromouracil و2-aminopurine، المركبات التي تغير في التركيب الكيمياوي للـDNA مثل Nitrous acid، Hydroxylamine وعوامل الألكلة Intercalating agents والتي تعد أكبر هذه المجاميع ومنها MNNG, EMS, EES [7]. حيث يقوم حامض النتروز HNO_2 بالتطفير عن طريق التحويل الكيميائي لجزيئة الـDNA والتي تشمل تفاعلين الأول أكسدة Oxidation والثاني إزالة مجموعة الأمين Deamination مسببة تحول السايتوسين والغوانين والادنين إلى يوراسيل (U) وزانثين (X) وهايبوزانثين (H) على التوالي منتجة طفرات إنتقالية من G.C ← A.T ومن A.T ← G.C [8].

كما أظهر العديد من العوامل الفيزيائية قدرته على التطفير ومنها الأشعة فوق البنفسجية والأشعة المؤينة وتضم أشعة X (X-rays) وأشعة جاما (γ-rays). عند تفاعل الأشعة المؤينة مع الماء تتكون أيونات تفاعلية ذات طاقة عالية تعرف بالجذور الحرة Free redical وهي التي تسبب التأثير المطفر. والأشعة المؤينة لها قوة اختراق عالية إذ تتمكن من اختراق السطوح الصلبة والسوائل كما أنها لا تنتج حرارة في أثناء التشعيع وهي أشعة مطفرة بسبب قدرتها على جعل الذرات والجزيئات متأينة وعندما تخترق هذه الأشعة تسبب مغادرة الإلكترونات من مداراتها وهذه الإلكترونات المنطلقة تهاجم الجزيئات الأخرى مسببة تحطمها وهي شديدة التفاعل مع الـDNA إذ يمكن أن تتحدد مع القواعد النيتروجينية المكونة له نتيجة أخطاء خلال تضاعف الـDNA وعند إصلاح هذه الأخطاء تتكون الطفرات الوراثية [9، 10، 11].

أهمية البحث وأهدافه:

يعد البحث من الأبحاث الهامة في مجال العلوم التطبيقية وخصوصاً في مجال الصناعات الغذائية والصيدلانية والطبية والزراعية لما للأحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة من أهمية في هذه العلوم وتعد الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية من أهم الطرق لإنتاج الأحياء المجهرية المحورة وراثياً لذلك فإن هدف البحث استخدام حامض النتروز HNO_2 والأشعة السينية X-rays لزيادة الإنتاجية للسلالة المحلية لجراثيم *Bacillus subtilis* واختبار قابلية العزلة على إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي.

طرائق البحث ومواده:

تم إجراء البحث في مختبرات قسم علوم الحياة/ كلية التربية /جامعة الموصل خلال عام 2009 ، والذي تضمن:

***عزل الجراثيم من التربة:**

تم عزل جراثيم *Bacillus subtilis* من التربة باستخدام طريقة التخفيف المتسلسلة وذلك بأخذ 1 غم من التربة ووضعت في أنابيب اختبار معقمة حاوية على 10 مل من الماء المقطر والمعقم وتم تخفيفه لغاية 10^{-6} لقحت قطرة من كل تخفيف في أطباق بتري حاوية وسط الأغار المغذي (Nutrient agar) وحضنت في درجة حرارة 28 ±1°م لمدة 24 ساعة ونقلت بعدها المستعمرات المنفردة التي تميزت بقوامها اللزج إلى أطباق حاوية على وسط الأغار المغذي وحضنت تحت درجة الحرارة نفسها مدة 3 أيام للحصول على عدة عزلات جرثومية نقية [12].

***حفظ الجراثيم:**

لقحت الجراثيم على وسط الأغار المغذي المائل (Slant) وحضنت مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 28 ±1°م ثم حفظت في الثلاجة عند درجة 4°م ونشطت بإعادة زرعها كل أسبوعين وحفظت في الثلاجة إلى حين استخدامها[13].

***الفحوصات التشخيصية :**

تم تشخيص الجراثيم بإجراء فحوصات تشخيصية على العزلة وشملت الاختبارات المذكورة من (Hot، Krieg)[14]. وهي صبغة غرام وصفات المستعمرات على وسط الأغار المغذي والحاوي 5% غلوكوز واختبارات الحركة واختزال النترات والاوكسيديز (Oxidase test) والكتاليز (Gatalase test) وتحلل النشا والجيلاتين وتخمر السكريات وشملت السكريات المانوز والسكروز واللاكتوز وأجريت هذه الفحوصات استناداً إلى ما جاء في [12].

***الأوساط الزراعية :**

- وسط مستخلص البطاطا والسكروز والأغار:

استخدم هذا الوسط لحفظ وتنشيط الجراثيم *Bacillus subtilis* ويتكون هذا الوسط من (غم/لتر): بطاطا طازجة مقطعة 200،ومضاف إليها 500 مل من الماء المقطر ، تم غلي المزيج حتى النضج بعد ذلك رشح المزيج بواسطة الشاش وأخذ الراشح وأضيف إليه السكروز 20 غم، والأغار20 غم، وأكمل الحجم إلى واحد لتر [15]. وزع في أنابيب اختبار أو أطباق بتري حسب الحاجة وعقم بجهاز الموصدة عند الضغط 1 كغم/سم^2 ودرجة حرارة 121°م لمدة (20 دقيقة).

- الوسط القياسي:

استخدم الوسط القياسي الذي يتكون من (غم/لتر): غلوكوز 20، فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين 5، كبريتات المغنيسيوم المائية 0.1، مستخلص الخميرة 0.5، اليوريا 0.4 حضر هذا الوسط من إذابة المواد كافة في لتر من الماء المقطر وضبط درجة الحموضة عند 7.0 [16]. وذلك لمتابعة نمو الجراثيم وتقدير إنتاجها من السكر المتعدد وتغيرات الرقم الهيدروجيني خلال مدة التحضين في هذا الوسط .

حضر اللقاح بنقل الجراثيم *Bacillus subtilis* المنماة على وسط الأغار المغذي (Nutrient agar) إلى دورق مخروطي سعة 250 مل يحتوي على 45 مل من الوسط القياسي المعقم ووضع الدورق في الحاضنة الهزازة في درجة حرارة 28 ±1°م عند سرعة (150 دورة /دقيقة) ولمدة 48 ساعة. ولغرض إنتاج السكر المتعدد لقح الوسط القياسي الموزع في دوارق سعتها 250 مل بمعدل (45 مل/دورق) وبـ5 مل من المعلق البكتيري حضنت بعدها في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 28 ±1°م وبمعدل 150 دورة/دقيقة ولمدة 7 أيام من التحضين بحسب طريقة الصميدعي [17].

– التطفير الكيميائي:

اتبعت طريقة Miller [18] في تطفير جراثيم *Bacillus subtilis* باستخدام المطفر الكيميائي حامض النتروز Nitrous acid حيث تم استخدام تركيزيين لهذا المطفر (0.05، 0.1) M ولكل تركيز تم ترسيب 5 مل من مزرعة الجراثيم باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق غسل بعدها الراسب بـ5 مل من دارئ الأسيتات Acetate buffer والمحضر بحسب [19] بعد الترسيب علق الراسب ب(0.3)" مل من حامض النتروز وحضن المزيج بدرجة حرارة 28 ±1°م وبمدد (10، 15، 17.5، 20، 40، 80) دقيقة. أوقف التفاعل في كل حالة بإضافة 5 مل من وسط المرق المغذي المعقم إلى المزيج ثم اجري طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، علق الراسب في 10 مل من وسط المرق المغذي المعقم ثم حضن بدرجة 28 ±1°م لمدة 18–24 ساعة بعدها تم تحضير تخافيف عشرية من المزرعة التي تحوي العزلات المطفرة ثم اخذ 0.1 مل من التخافيف الثلاثة الأخيرة وفرشت على وسط الأغار المغذي وحضنت الأطباق عند 28 ±1°م ولمدة 24 ساعة، نقلت 100 مستعمرة إلى أطباق الأغار المغذي لتكون الطبق الرئيسي Master plate ثم حفظت في الثلاجة لحين استخدامها.

– التطفير الفيزيائي:

أجريت عملية التطفير الفيزيائي لجراثيم *Bacillus subtilis* بالأشعة السينية واعتمدت الطريقة المستخدمة من قبل الباحثين [20] حيث حضرت تخافيف متسلسلة (10 $^{-1}$، 10^{-2}، .....10^{-6}) وأخذت بعد ذلك 0.1 مللتر من التخفيف الأخير من المعلق الجرثومي ونشرت على أطباق الأغار المغذي الصلب المعقم (Nutrient agar) وبعد اكتمال نموها عرضت للأشعة السينية مباشرةً واستخدم لهذا الغرض مصدر للأشعة السينية X-rays apparatus (Lybold- Herus) تنبعث منه الأشعة بطول موجي مقداره (14.6 nm) نانوميتر لمدد زمنية (10، 20، 30، 60) ثانية مع إعداد طبق سيطرة لكل تخفيف. غلقت الأطباق بعد تعريضها للأشعة السينية بورق ألمنيوم وذلك لتجنب حدوث إعادة تنشيط ضوئي Photoreactivation [21]. بعدها حضنت النموات بدرجة 28 ±1°م لمدة 18 ساعة. ثم زرعت السلالة المطفرة لكل معاملة في أنابيب اختبار تحوي الوسط المغذي الصلب المعقم المائل وحضنت عند 28 ±1°م لمدة أسبوع وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام.

*** طرائق التحليل**

بعد انتهاء مدة الحضانة سحبت الدوارق من الحاضنة الهزازة ثم أجريت عليها عملية بسترة Pesteurization بالحمام المائي في درجة حرارة 60°م ومدة 5 دقائق لغرض قتل خلايا الجراثيم والحفاظ على البيئة المحلية من التلوث بهذه الجراثيم. تركت الدوارق بعد ذلك لكي تبرد وضبط قيمة الرقم الهيدروجيني النهائي لكل دورق وأجريت عملية نبذ مركزي عند(9000 دورة/دقيقة) لمحتوى كل دورق ولمدة 30 دقيقة لغرض حساب الكتلة الحيوية للخلايا المترسبة التي جمعت بعد ذلك في أطباق زجاجية صغيرة وموزونة مسبقاً وجففت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 60°م ولمدة 24 ساعة ولغرض تقدير السكر المتعدد في طبق الراشح الجرثومي فقد اخذ 10 مل منه وأضيف إليه 30 مل من الاسيتون [13] ثم طرد مركزي عند سرعة (9000 دورة/ دقيقة) لمدة 30 دقيقة ونقل السكر المتعدد المترسب في أطباق زجاجية معلومة الوزن وجففت محتوياتها في الفرن الكهربائي عند 60°م ولمدة 24 ساعة وتم احتساب وزن الكتلة الحيوية والسكر المتعدد بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس.

استخدم اختبار دنكن [22] المتعدد المدى لمقارنة المتوسطات وميزت المتوسطات التي تختلف معنوياً عن بعضها بعضاً تحت مستوى احتمال 5% بحروف مختلفة .

النتائج والمناقشة:

*** عزل جراثيم *Bacillus subtilis* :**

عند عزل الجراثيم ظهرت مستعمراتها ناعمة Smoth ولزجة Mucoid بيضاء اللون على وسط الأغار المغذي وعند صبغها بصبغة غرام ظهرت عصوية موجبة لصبغة غرام. وأجريت عليها مجموعة من الاختبارات البيوكيميائية وكما مبين في الجدول رقم (1) وأوضحت النتائج أن الجراثيم تعود إلى جنس *Bacillus* بحسب الطريقة المذكورة في [14].

جدول رقم (1): الاختبارات البيوكيميائية لجراثيم *Bacillus subtilis*

الاختبارات	النتيجة	الاختبارات	النتيجة	الاختبارات	النتيجة
الاوكسيديز	+	الفركتوز	+	انتاج الاندول	−
الستريت	+	المانوز	−	فوكس بروسكر	−
اليوريز	−	سيليوبايوز	−	تحليل النشأ	+
الكتاليز	+	سكروز	+	تحليل الجيلاتين	+
المثيل الاحمر	−	لاكتوز	−		

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

*** تأثير المطفر الكيميائي حامض النتروز (HNO_2) في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي ونمو الجراثيم.**

أظهرت نتائج التطفير باستخدام المطفر الكيميائي حامض النتروز بتركيز M(0.05) وبحسب الطريقة المذكورة في مواد البحث وطرائقه وعلى المدد (10، 15، 17.5، 20، 40، 80) دقيقة زيادة في إنتاج السكر المتعدد مع زيادة مدد التعرض للمطفر الكيميائي حيث تبين في الجدول رقم (2) أن أعلى إنتاجية من السكر المتعدد كانت (5.53 غم/لتر) عند استخدام المطفر الكيميائي حامض النتروز لمدة (40 دقيقة). وربما يعود السبب في ذلك إلى أن حامض

النتروز يؤثر بشكل إيجابي في عمل الجينات التنظيمية التي تنظم عمل الأنزيمات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد. في حين تراجعت إنتاجية السكر المتعدد عند استخدام المطفر بالتركيز نفسه ولمدد زمنية قليلة إذ تم الحصول على أقل إنتاجية من السكر المتعدد (2.53 غم/لتر) عند التعريض للمطفر لمدة (15 دقيقة). وهذا يتفق مع ما توصل إليه فيصل[23] إذ لاحظ عند تطفير جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام حامض النتروز زادت نسبة التطفير مع زيادة فترة التعريض. كذلك أدى التعريض للمطفر بالتركيز نفسه للمدد (10،17.5) دقيقة إلى الحصول على إنتاجية قليلة من السكر المتعدد إذ بلغت (2.75، 2.89 غم/لتر) على التوالي حيث لم تظهر أي فروق معنوية بين كمية السكر المنتجة عند التعريض للمطفر للمدد (10، 15، 17.5) دقيقة في حين كانت الفروق معنوية بين أعلى إنتاجية وأقل إنتاجية تم الحصول عليها من السكر المتعدد مما يشير إلى إمكانية حدوث الطفرات الوراثية التي تعطل عمل الجينات التنظيمية التي تنظم ايجابياً عمل الأنزيمات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد. وقد كان تأثير المطفر واضحاً جداً فيما يتعلق بإنتاج الكتلة الحيوية إذ إن التعريض للمطفر لمدد قليلة أدى بشكل كبير إلى تثبيط إنتاج الكتلة الحيوية حيث تحققت أقل إنتاجية للكتلة الحيوية (1.21 غم/لتر) عند التعريض للمطفر لمدة (10 دقائق) ويزداد إنتاج الكتلة الحيوية تدريجياً مع زيادة مدد التعريض للوصول إلى أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية (3.38 غم/لتر) عند التعريض لمدة 40 دقيقة إذ لم تظهر أي فروق معنوية بين كمية الكتلة الحيوية المنتجة خلال مدد التعريض (10، 15، 17.5، 20) دقيقة حيث بلغت (1.21، 1.80، 1.83 ، 2.12 غم/لتر) على التوالي بينما كانت الفروق معنوية بين أعلى إنتاجية وأقل إنتاجية تم الحصول عليها من الكتلة الحيوية.أما مدة التعريض (80 دقيقة) فقد أعطت إنتاجية قليلة من السكر المتعدد والكتلة الحيوية وربما يعود ذلك إلى حدوث طفرات وراثية تعطل نظام الإفراز الخارجي للأنزيم المسؤول عن إنتاج السكر المتعدد وكذلك تراكم هذه السكريات بالسايتوبلازم او الفسحة البيربلازمية. من خلال النتائج التي حصلنا عليها لوحظ أنه كلما زادت إنتاجية السكر المتعدد زادت إنتاجية الكتلة الحيوية مع زيادة مدد التعريض للمطفر الكيميائي حامض النتروز للوصول إلى أقصى إنتاجية من السكر المتعدد والكتلة الحيوية عند مدة التعريض (40 دقيقة) بسبب تأثير حامض النتروز بشكل ايجابي على المسارات الأيضية والأنزيمات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد وعلى هذا الأساس تم اختيار العزلة المعرضة للمطفر لمدة (40 دقيقة) بوصفها أفضل عزلة لأنها أعطت أقصى إنتاجية من السكر المتعدد والكتلة الحيوية. وهذا يتوافق مع ما توصل إليه القصاب [24] من زيادة إنتاج السكر المتعدد الزانثان من البكتريا *Xanthomonas campestris* باستخدام المطفرات الكيمياوية. انخفض الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي بسبب الفعاليات الأيضية وتراكم الأحماض العضوية التي تنتجها الجراثيم خلال مدة التحضين وكانت الفروق غير معنوية بين قيم الpH النهائي.

كذلك أظهرت نتائج استخدام المطفر الكيميائي حامض النتروز بتركيز M(0.1) وكما هو مبين في الجدول رقم (3) أن أقصى إنتاجية من السكر المتعدد كانت (4.03 غم/لتر) عند التعريض للمطفر لمدة (40 دقيقة) مما يشير أيضا إلى التأثير الايجابي لحامض النتروز في موقع الجين المشفر للأنزيمات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد وكذلك حدوث زيادة في إنتاج السكر المتعدد وإفرازه خارج الخلايا، في حين انخفضت الإنتاجية عند مدد التعريض القليلة للمطفر إذ تم الحصول على أقل إنتاجية من السكر المتعدد (1.83 غم/لتر) عند استخدام المطفر لمدة (10 دقائق) وللتركيز نفسه حيث ظهرت فروق معنوية بين كمية السكر المنتجة خلال مدد التعريض (10، 40) دقيقة في حين لم تظهر أي فروق معنوية بين كمية السكر المنتجة خلال مدد التعريض القليلة (15، 17.5، 20) دقيقة حيث أعطت إنتاجية قليلة من السكر المتعدد إذ بلغت (2.10، 2.12، 1.86 غم/لتر) على

التوالي، مما يدل على إمكانية حدوث طفرات وراثية تعطل عمل الجينات التنظيمية التي تنظم ايجابياً عمل الأنزيم المسؤول عن إنتاج السكر المتعدد وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه القصاب [24] من أن التطفير الكيميائي ساهم في زيادة إنتاج السكر المتعدد (الزانثان) بوساطة البكتريا *Xanthomonas campestris* . كذلك كان التأثير بما يخص إنتاج الكتلة الحيوية إذ تحققت أعلى إنتاجية من الكتلة الحيوية (2.98 غم /لتر) عند استخدام المطفر لمدة (40 دقيقة) فيما أقل إنتاجية من الكتلة الحيوية (0.87 غم/لتر) تحققت عند التعريض للمطفر لمدة 10 دقائق ويعود ذلك إلى التأثير الايجابي لحامض النتروز في الجينات التنظيمية التي تسيطر على الفعاليات الخلوية. كما أعطت مدد التعريض القليلة للمطفر إنتاجية قليلة من الكتلة الحيوية حيث لم تظهر فروق معنوية بين كمية الكتلة الحيوية المنتجة خلال مدد التعريض (15، 17.5، 20) دقيقة إذ بلغت (1.09، 1.53، 1.62 غم/لتر) على التوالي في حين ظهرت فروق معنوية بين كمية الكتلة الحيوية عند مدد التعريض (40، 10) دقيقة التي أعطت أقصى وأقل إنتاجية من الكتلة الحيوية. يلحظ من النتائج أنه كلما زادت مدة التعريض للمطفر حامض النتروز زادت إنتاجية السكر المتعدد والكتلة الحيوية وأن أفضل مدة زمنية للتطفير كانت (40 دقيقة) وهذا يتفق مع ما ذكره فيصل [23] من أن نسبة التطفير زادت مع زيادة مدة التعريض للمطفر الكيميائي حامض النتروز. أما مدة التعريض (80 دقيقة) لحامض النتروز فقد أدت إلى انخفاض في إنتاج السكر المتعدد وكذلك الكتلة الحيوية مما يشير إلى إمكانية حدوث طفرات وراثية معطلة لنظام الإفراز الخارجي للأنزيم المسؤول عن إنتاج السكر المتعدد أو حدوث طفرات معطلة لعمل الجينات التنظيمية التي تنظم المسارات الأيضية وعمل الأنزيمات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد. انخفض الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي بسبب الفعاليات الأيضية وتراكم الأحماض العضوية التي تنتجها الجراثيم خلال مدة التحضين وكانت الفروق غير معنوية بين قيم الـpH النهائي.

ومن خلال النتائج المبينة في الجدولين (1) و(2) يلحظ أن التطفير الكيميائي باستخدام حامض النتروز بتركيز (M 0.05) يعد أفضل من التركيز (M0.1) في تطوير قابلية الجراثيم *Bacillus subtilis* على إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي إذ يلحظ أن أقصى إنتاجية للسكر المتعدد تم الحصول عليها (5.53 غم/لتر) عند التعريض للمطفر حامض النتروز بتركيز (M 0.05) لمدة 40 دقيقة مقارنة بأقصى إنتاجية تم الحصول عليها من السكر المتعدد (4.03 غم/لتر) عند التعريض للمطفر حامض النتروز بتركيز (M0.1) لمدة التعريض نفسها. كذلك الحال بالنسبة للكتلة الحيوية إذ أن أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية كانت (3.38 غم/لتر) عند التعريض للمطفر حامض النتروز بتركيز (M0.05) لمدة 40 دقيقة مقارنة بأقصى إنتاجية تم الحصول عليها من الكتلة الحيوية (2.98 غم/لتر) عند التعريض للمطفر بتركيز (M 0.1) لمدة التعريض نفسها. كما أظهرت النتائج ظهور علاقة معنوية عالية تحت مستوى احتمالية $P \leq 0.001$ بين السكر المتعدد والكتلة الحيوية عند استخدام المطفر بتركيز (M 0.05) إذ بلغ معامل الارتباط 0.9129 بينما كانت العلاقة المعنوية للسكر المتعدد والكتلة الحيوية عند استخدام المطفر بالتركيز (M 0.1) أقل إذ بلغ معامل الارتباط 0.8706 ولمستوى الاحتمالية نفسه مما يدل على أن التركيز (M 0.05) من حامض النتروز يعد أفضل في زيادة قابلية الجراثيم *Bacillus subtilis* على إنتاج السكر المتعدد والكتلة الحيوية وكما هو موصوف من قبل Miller [18] ومشابه لما ذكره فيصل [23] من أن التطفير باستخدام حامض النتروز كان أفضل عند التركيز (M0.05).

جدول رقم (2): تأثير المطفر الكيميائي حامض النتروز بتركيز (M(0.05 في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي ونمو الجراثيم.

زمن التعرض للمطفر	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	الـpH النهائي

بتركيز M(0.05)	(غم/لتر)	(غم/لتر)	
10	2.75 ± 0.07 ج د	1.21 ± 0.02 ج	6.12 ± 0.30 أب
15	2.53 ± 0.12 د	1.80 ± 0.01 ب	6.43 ± 0.12 أب
17.5	2.89 ± 0.01 ج	1.83 ± 0.13 ب	6.01 ± 0.62 أب
20	3.80 ± 0.02 ب	2.12 ± 0.08 ب	5.78 ± 0.13 أب
40	5.53 ± 0.14 أ	3.38 ± 0.04 أ	5.62 ±0.01 ب
80	3.71 ± 0.01 ب	1.97 ± 0.28 ب	6.35 ± 0.49 أب
control	3.60 ± 0.01 ب	2.11 ± 0.03 ب	6.94 ± 0.01 أ

القيم الواردة أعلاه تمثل معدل مكررين، القيم التي تشترك بالأحرف نفسها ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً عند مستوى احتمال 0.05.

جدول رقم (3): تأثير المطفر الكيميائي حامض النتروز بتركيز (M(0.1 في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي ونمو الجراثيم.

زمن التعرض للمطفر بتركيز M(0.1)	السكر المتعدد (غم/لتر)	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الـpH النهائي
10	1.83 ±0.01 ج	0.87 ± 0.49 ج	6.50 ± 0.85 أ
15	2.10 ± 0.40 ج	1.09 ± 0.14 ج	5.07 ± 0.64 ب
17.5	2.12 ± 0.30 ج	1.53 ± 0.01 ب ج	5.63 ± 0.01 أ ب
20	1.86 ± 0.03 ج	1.02 ± 0.01 ج	6.98 ± 0.04 أ
40	4.03 ± 0.01 أ	2.98± 0.00 أ	5.78 ± 0.01 أ ب
80	3.12 ± 0.04 ب	2.60± 0.56 أ	6.90 ± 0.00 أ
control	3.71 ± 0.01 أب	2.18 ± 0.06 أب	6.82 ± 0.03 أ

القيم الواردة أعلاه تمثل معدل مكررين، القيم التي تشترك بالأحرف نفسها ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً عند مستوى احتمال 0.05.

*** تأثير الأشعة السينية X-ray في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي ونمو الجراثيم.**

أظهرت نتائج التطفير الفيزيائي باستخدام الأشعة السينية وكما مبين في الجدول رقم (4) أن لهذه الأشعة تأثيراً واضحاً على إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي إذ تم الحصول على أقصى إنتاجية للسكر المتعدد (7.12 غم/لتر) عند تعريض الجراثيم لمدة 60 ثانية للأشعة السينية وسبب ذلك ربما يعود إلى حدوث طفرات وراثية عن طريق تغيير في ترتيب القواعد النيتروجينية وكذلك فإنه يؤثر بشكل ايجابي في الجينات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد. فيما تراجعت إنتاجية السكر المتعدد عند تعريض الجراثيم لمدد قليلة من التشعيع إذ تحققت أقل إنتاجية من السكر المتعدد (3.11 غم/لتر) عند تعريض الجراثيم للأشعة السينية لمدة (10 ثواني) حيث كانت الفروق معنوية بين كمية السكر المتعدد المنتجة خلال مدد التعريض (10، 60)ثانية في حين لم تظهر أي فروق معنوية بين كمية السكر المنتجة خلال مدد التعريض القليلة (20، 30) ثانية حيث أعطت إنتاجية قليلة من السكر المتعدد بلغت (5.08،

5.61 غم/لتر) على التوالي مما يشير إلى إمكانية حدوث طفرات وراثية مثبطة لعمل الجينات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد أو حدوث طفرات وراثية تعطل نظام الإفراز الخارجي للأنزيم المسؤول عن إنتاج السكر المتعدد وكذلك تراكم هذا السكر في الفسحة البيربلازمية. أما فيما يتعلق بإنتاج الكتلة الحيوية فلم يلحظ وجود فروق معنوية بين كمية الكتلة الحيوية المنتجة خلال مدد التعريض المدروسة وإنما كانت الفروق ظاهرية حيث أدى التعريض للأشعة السينية لمدد زمنية قليلة إلى انخفاض إنتاجية الكتلة الحيوية إذ بلغت أقل إنتاجية من الكتلة الحيوية (3.00 غم/لتر) عند التعريض للأشعة لمدة (10 ثواني) في حين ازدادت إنتاجية الكتلة الحيوية تدريجياً مع زيادة مدد التعريض للأشعة السينية حيث بلغت إنتاجية الكتلة الحيوية (3.18، 3.02 غم/لتر) عند مدد التعريض (20، 30) ثانية على التوالي وصولاً إلى أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية (4.09 غم/لتر) عند التعريض للأشعة السينية لمدة (60 ثانية). من خلال النتائج التي حصلنا عليها لوحظ انه كلما زادت مدة التعريض للأشعة السينية ازدادت إنتاجية السكر المتعدد والكتلة الحيوية وصولاً إلى أقصى إنتاجية من السكر المتعدد والكتلة الحيوية عند مدة التعريض (60 ثانية) وعلى هذا الأساس تم اختيار العزلة المعرضة لمدة 60 ثانية من التشعيع بوصفها أفضل عزلة لأنها أعطت أقصى إنتاجية من السكر المتعدد والكتلة الحيوية. وهذه النتائج كانت مشابهة تقريباً لنتائج AL-delaimi [25] وقريبة لنتائج كثير من الباحثين من حيث الحصول على إنتاجية عالية من السكر المتعدد الخارج خلوي باستخدام التشعيع [26,21]. إن الأشعة السينية هي أشعة مؤينة وعند تفاعل الأشعة المؤينة مع الماء تتكون ايونات تفاعلية ذات طاقة عالية تعرف بالجذور الحرة وهي التي تسبب التأثير المطفر وهذا التأثير في الأصل ينتج عن كسر الـDNA أو حدوث تغيرات في قواعد النيوكليوتيدات وبالتالي يؤثر في الجينات المسؤولة عن إنتاج السكر المتعدد [27]. انخفض الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي وهذا يعود إلى تراكم الأحماض العضوي ونواتج الأيض خلال مدة التحضين وكانت الفروق غير معنوية بين قيم الـpH النهائي.

جدول رقم (4): تأثير الأشعة السينية X- ray عند الطول الموجي (14.6 nm) في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي ونمو الجراثيم.

زمن التعرض ثانية	السكر المتعدد (غم/لتر)	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	الـpH النهائي
10 Sec	3.11± 0.00 ج	3.00 ± 0.01 أب	6.14 ± 0.12 أب
20 Sec	5.08 ± 0.01 ب	3.18 ± 0.30 أب	5.92 ±0.02 أ ب
30 Sec	5.61± 0.57 ب	3.62 ± 0.04 أ	5.99 ± 0.57 أب
60(1min)	7.12 ± 0.54 أ	4.09 ±0.51 أ	4.58 ± 0.71 ب
Control	3.54 ± 0.01 ج	2.21 ± 0.56 ب	6.89 ± 0.54 أ

القيم الواردة أعلاه تمثل معدل مكررين، القيم التي تشترك بالأحرف نفسها ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً عند مستوى احتمال 0.05.

من خلال النتائج المبينة في الجداول [4,3,2] يلحظ أن التطفير الفيزيائي باستخدام الأشعة السينية يعد أفضل من التطفير الكيميائي باستخدام حامض النتروز في تطوير قابلية الجراثيم *Bacillus subtilis* في إنتاج السكر المتعدد الخارج خلوي إذ يلحظ أن أقصى إنتاجية من السكر المتعدد تم الحصول عليها (7.12 غم/لتر) عند تعريضها للأشعة السينية لمدة 60 ثانية مقارنة بأقصى إنتاجية تم الحصول عليها من السكر المتعدد عند استخدام المطفر الكيميائي حامض النتروز بالتركيزين (0.05، 0.1 M) حيث بلغت (5.53، 4.03 غم/لتر)على التوالي لمدة تعريض

40 دقيقة كذلك الحال بالنسبة للكتلة الحيوية حيث إن أقصى إنتاجية تم الحصول عليها كانت (4.09 غم/لتر) عند تعريضها للأشعة السينية لمدة 60 ثانية مقارنة بأقصى إنتاجية تم الحصول عليها عند التعريض للمطفر حامض النتروز باستخدام التركيزيين (0.05، M0.1) إذ بلغت (3.30، 2.98 غم/لتر) على التوالي لمدة 40 دقيقة. حيث يلحظ أن التطفير الفيزيائي ساهم في الحصول على جراثيم تميزت بكفاءة إنتاجها العالية للسكر المتعدد الخارج خلوي مما يشير إلى أرجحيه التطفير الفيزيائي وهذه النتائج جاءت مقاربة لما توصل إليه الباحثون [26 ,28] من أن التطفير الفيزيائي بالتشعيع يعمل على تحفيز إنتاج الأحياء المجهرية لمختلف المركبات كالسكريات المتعدد المايكروبية وحامض الستريك.

الاستنتاجات والتوصيات:

حقق التطفير الفيزيائي للبكتريا ***Bacillus subtilis*** باستخدام الأشعة السينية أقصى إنتاج من السكر المتعدد ولاسيما عند التعريض لمدة 60 ثانية لهذا يمكن اعتبارها أفضل طريقة للحصول على أعلى إنتاجية من السكر المتعدد مقارنة بالمطفر الكيميائي حامض النتروز.

بناء على ما سبق نوصي بمحاولة اختبار مطفرات كيميائية أخرى ومقارنة تأثيراتها في إنتاج السكر المتعدد مع المطفر حامض النتروز، وكذلك نقترح محاولة دراسة عدد من المطفرات الجزيئية والفيزيائية الأخرى المؤثرة في نمو البكتريا وإنتاج السكر المتعدد.

عدا عن ذلك فإنه من الممكن عند توافر الإمكانات، إجراء تحاليل كيميائية وفيزيائية دقيقة ومفصلة للسكر المتعدد المنتج ومقارنة البيانات بما هو موجود في الأدبيات العلمية.

المراجع:

1- BECKER, A. *Microbial polysaccharide production*. 2004.10 May, 2009. http://www.genetik. uni-bie/efelf.de/genetik/exopol.

2- HAZEL, M. A.; WILKINSON, S. G. and PITT, T. L. *Identification of Capsular antigens in Serratia marcescens*, Journal of Clinical Microbiology. Vol. 35, N^{o}. 1, Jan 1997, 59-63

3- COTTRELL, I.W.; KANG, K.S. *Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications*. Developments in Industrial Microbiology, Vol.19, 117-131, 1978.

4- DE VUYST L, DEGEEST B. *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria.* FEMS Microbiol Rev. Vol. 23,1999, 153-177.

5- SANDFORD, P. A. *Exocellular microbial polysaccharides*. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry . N^{o}. 36, 1979 , 265-313.

6- ATLAS, R. M., L. C. PARKS, and A. E. BROWN. *Laboratory Manual of Experimental Microbiology*. St. Louis, MO: Mosby-Year Book, Inc. 1995.

7- GLASS, R. E. *Gene function E. coli and it's Heritable Elements*. Croom Helm Ltd., London, England. 1982, 127-130.

8- FREIFELDER, D. Molecular Biology, *A comprehesive introduction to prokaryotes and eukaryote*. Science Books international, Inc. Newyork,1983, 414-425,392.

9- SCHMIDT, J. and BROG, D. C. Free *Radicals Purine nucleosides after hydroxyl radical attack.* Radiat. Rec. Vol. 65, N^{o}. 3, 1976, 220-237.

10- TORTORA, G. J.;FUNKE, B. R. and CASE, C. L. *Microbiology. An Introduction*. 6th ed., Benjamin/Cummings Publishing Comp. Inc, U.S.A. 1998, 145-146.

11- TALARO, K.P. and TALARO, *A. Foundations In Microbiology*. 3rd ed., The Mc Grow-Hill Comp., Inc., U.S.A. 1999, 394-395.

12- BRADSHAW, L. J. *Laboratory Microbiology*.3rd ed. Ed. W.B. Saunders company Philadelphia. London, 1979, 145-146.

13- TAIT, M.I.; SUTHERLAND, I. W. and STURMAN, A.J.C. *Effect of growth conditions on the roduction. Composition and viscosity of Xanthomonas campestris exopolysaccharide*. J. Gen. Microbiol. 132, 1986, 1483-1492.

14- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.A.; STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T. BERGEYS. *Manual of Determinative Bacteriology*.9th ed. Lippincott Williams of Wilkins Comp., Baltimore, U.S.A. 1994, 787.

15- BOOTH, C. *Fungal culture media. In Methods In Microbiology* Edited by Booth, Academic Prees Newyork, U.S.A. Vol. 4, 1971, 49-94.

16- HAYENS W.C.; WICKERHAM L. J. and HESSELTINE C.W. *Maintenance of culture of industrially important microorganisms*, Appl. Microbiol. Vol. 3, 1955, 361-368.

17- الصميدعي، طه عبد الوهاب خميس. *إنتاج الزانثان بوساطة البكتريا Xanthomonas campestris من الشرش*، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق ، 2001.

18- MILLER, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972, 466

19-PERRIN, D. D. and DEMPSY, B. *Buffers for pH and metal ion control*, John Willey and sons. Vol.50, N°.4, 1975, 443.

20- MOVITZ, J.; MASUDA , S. and SJOQUIST, J. *Physico and Immunochemical Properties of Staphylococcal Protein A extracellularly Produced by a set of mutants from Staphylococcus aureus.* Cowan 1. Microb. Immun.Vol. 23, 1979, 51-60.

21- الراوجي، عصام داؤود سليمان. *إنتاج وفعالية السكر المتعدد والسم لفطر Alternaria alternate المعزول محلياً*. أطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق، 2005.

22- DUNCAN, D. B. *Multiple range and multiple F-tests.* Biometrics, Vol. 11, N°. 1, 1955, 1-42.

23- فيصل، ريان مازن. *تعيين صفة القفز في المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في جرثومة Pseudomonas aeruginosa وتأثير بعض المطفرات الكيميائية على مورثات المقاومة داخل جسم الكائن الحي Invivo وخارجه Invitro* . رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق، 2003.

24- القصاب، عبد الجبار عمر قوجة. *إنتاج السكر المكوثر (الزانثان) من عزلات محلية برية ومطفرة لبكتريا Xanthomonas campestris ودراسة أهم الظروف المثالية للإنتاج*. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة صلاح الدين. العراق، 2004.

25-AL- DELAIMI, H.M. *Effect of Molecular and physical mutagens on the ability of Xanthomonas campestris H6 in production of amylase and endoglucanase*. Iraqi Journal of Biotechnology. Vol. N°. 1, 2001, 52-71.

26- الشاهري، يوسف جبار إسماعيل. *تحسين إنتاجية العزلة المحلية من الفطر Aureobasidium pullulans 1(AP1) من السكر المتعدد (البوليولان) باستخدام الأشعة فوق البنفسجية*.رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق، 1999.

27-HARLT, D. L. *Basic of Genetics*. 2nd ed., Jones and Bartlett Publishers, Inc., Boston, U.S.A.1991, 509.

28- الحمداني، إنعام جاسم محمد. *إنتاج حامض الستريك بواسطة عزلات محلية للفطر Aspergillus niger* . رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق، 2006.