إنتاج بروتين أحادي الخلية من مخلفات نبات الثيل *Cynodon dactylon* L. باستخدام بكتريا *Bacillus cereus* والفطر *Fusarium solani*

Production of Single Cell Protein from the Wastes of *Cynodon dactylon* L. Using Mixed Culture of *Bacillus cereus* and *Fusarium solani*

محمد فاضل عبود ظافر فخري الراوي حيدر موسى حمزة *

كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الانبار
* كلية العلوم/ جامعة السليمانية

Mohammed Fadhil Abood **Dhafer Fakri Al-Rawii** ***Haider Mousa Hamzah**

College of Education for Pure Sciences/ Anbar University
* College of Science/ University of Sulaimani

E-mail: haider.hamzah@univsul.edu.iq

الملخص

يشير مصطلح البروتين أحادي الخلية إلى البروتين المستخلص من المزارع الميكروبية. درس إنتاج البروتين أحادي الخلية باستعمال مخلفات نبات الثيل *Cynodon dactylon* L. وبأستخدام الفطر *Fusarium solani* والبكتريا *Bacillus cereus* كلقاح مختلط. أظهرت النتائج ان افضل إنتاج للكتلة الحيوية كان عند الاس الهيدروجيني 7.5 وبأستخدام حجم لقاح 0.5 مل/100 مل وسط بكثافة البكتريا 52× 10^8خلية/مل و عدد الفطر(10^5 كونيدة/مل)، فيما كان افضل تركيز للمصدر الكربوني هو 4% الذي أعطى اعلى كتلة حيوية بدلالة الوزن الجاف، وتم الحصول على افضل إنتاج للكتلة الحيوية بعد مدة حضن 8 أيام، وكان الإنتاج النهائي من البروتين أحادي الخلية بدلالة الوزن الجاف 81.5 غم/1000 مل كتلة حيوية. قدرت مكونات البروتين أحادي الخلية المنتج وكانت النسبة المئوية للبروتين (28%) ونسبة الكاربوهيدرات 17% والدهون 2.46% والرماد 31.66%، وكان تركيز العناصر الرئيسية هي للفسفور 42 ملغم/لتر، والصوديوم 29 ملغم/لتر وبلغ تركيز البوتاسيوم 35 ملغم/لتر، فيما كانت النسبة المئوية DNA 2% والـ RNA 1.64%، اما السمية فقد بينت الفحوصات خلو البروتين المنتج من سموم الافلاتوكسين Aflatoxin وكانت نسبة Ochratoxin و T-2 Toxin هي 10.6 و 122.9 جزء بالمليون على التوالي، وكان مجموع تراكيز الأحماض الأمينية الموجودة في المنتج 84.74 ملغم/100غم واحتوى البروتين الميكروبي على بعض الأحماض الأمينية الأساسية وهي Cysteine، Leucine، Lysine، Methionine، Phenylalanine، Tyrosine، Valine و Threonine. أشار البحث إلى إمكانية استعمال نظام المزارع المختلطة من الفطريات والبكتريا في إنتاج البروتين أحادي الخلية، بالإضافة لذلك أشار تحليل البروتين المنتج ان له قيمة غذائية وبالتالي فان بالإمكان استعماله كعلف حيواني وربما يتم اعتباره مادة اساس لتوليد الطاقة.

الكلمات الدالة: المزارع المختلطة، بروتين أحادي الخلية، *Fusarium, Bacillus*

Abstract

Single cell protein (SCP) is known to be the total protein extracted from microbial cultures. In the present study, SCP was produced from the wastes of *Cynodon dactylon* L. using a mixed culture of *Bacillus cereus* and filamentous fungus *Fusarium solani*. The results revealed that best productivity was at pH of 7.5 using 0.5/100 mL of inoculum size (52 x 10^8 cell/mL bacterial cells and 10^5 conidia/mL of the fungus). The incubation time and temperature were investigated; 8 days of incubation at 30 °C were the best conditions for the production of SCP. The highest productivity of SCP as a dry weight was at the level of 4% of carbon source, and the SCP production reached a maximum level 81.5 g/L. Protein 28%, carbohydrate 17%, lipid 2.46%, ash 31.66%, phosphorus 42 mg/L, sodium 29 mg/L, potassium 35 mg/L, DNA 2%, and RNA 1.64% were determined in the SCP. In the toxicity assay, no aflatoxin was detected in the produced SCP, and the percentage of Ochratoxin and T-2 Toxin was 10.6 and 122.9 ppm respectively. The total concentration of amino acids in the SCP was 84.74 mg/100 mL, and it contained the followings: Lysine, Leucine, Cysteine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine, Valine, and Threonine. This work suggests that mixed culture can be used for production of SCP. Additionally, analysis of the produced SCP indicated that it has nutritional value, and thus it can exploit in the animal feed and possibly, as a substrate for energy generation.

Key words: *Bacillus, Fusarium*, Mixed culture, Single cell protein.

المقدمة

أدت الزيادة في الإنتاج الزراعي في السنوات الأخيرة إلى تطوير تركيبة الغذاء الخاصة بالحيوانات والبحث عن بدائل لبعض الأعلاف التقليدية (مسحوق السمك، زيت السمك، فول الصويا) ببعض المنتجات النباتية والحيوانية وكان الاتجاه نحو إيجاد بدائل تتناسب مع تكوين علف ذو مصدر للطاقة الغذائية أحادي الخلية Single Cell Protein (SCP) من خلال تحسين القيمة الغذائية للمخلفات الزراعية والصناعية وتحويلها إلى منتجات غذائية علفية بعد ان كانت عبئا بيئيا، وذلك بتنمية الأحياء الدقيقة مثل البكتريا والفطريات التي تتميز بسرعة نموها وتكاثرها على المخلفات والمواد رخيصة الثمن والمتواجدة بكميات كبيرة في البلد المنتج مثل بقايا قصب السكر، الشرش، قشورالفواكه مثل البرتقال والموز والتفاح وجوز الهند ومخلفات صناعة التمور وكل النفايات الغذائية التي لا يستهلكها الفرد [1،2].

ادرج مصطلح بروتين أحادي الخلية (Single cell protein) ضمن توصيات المؤتمر العالمي المنعقد في معهد Massachusetts Institute of Technology (MIT) سنة 1966 بناء على مقترح قدمه الباحث Carol Wilson لإعطاء صورة افضل عن البروتين الميكروبي [3].

بدأت الدول تبحث عن وسائل استثمار ملائمة للتخلص من الفضلات التي نتجت من التطور الصناعي الحاصل في والتي أبرزت مشكلة تراكم

الفضلات في البيئة، مما دعا العديد من بلدان العالم إلى اتخاذ إجراءات ووضع قوانين للحد من التلوث، فامكن العالم تحويل 70% من هذه المواد إلى بروتينات أُحادية الخلية باستعمال الأحياء المجهرية المختلفة من خلال أنظمة التخمرات الصلبة والسائلة [4]، اذ وصل إنتاج بعض المصانع لبروتين أُحادي الخلية بقدر ما تنتجه مساحة 1618 كم مربع من الأرض المخصصة لتربية الماشية فضلا عن تقليل كلفة الطاقة اللازمة للإنتاج [5].
هدفت الدراسة الحالية إلى إنتاج البروتين أُحادي الخلية من خلال استعمال المزارع المختلطة لعزلات فطرية وبكتيرية معزولة من التربة وذلك بتنميتها على مخلفات نبات الثيل كمصدر كربوني وتحديد الظروف المثلى للإنتاج، بالإضافة إلى ذلك شمل البحث التحليل الكيميائي والسمي للكتلة الحيوية المنتجة من المزارع المختلطة.

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص

عزل الفطر *Fusarium solani* باستعمال وسط Potato Dextrose Broth (PDB) المحتوي على 3 ملغم/ مل من $ZnCl_2$، اذ تمت إضافة 1غم من عينة التربة (جمعت عينات التربة من مواقع مختلفة وشملت كلية الزراعة – جامعة بغداد و جامعة السليمانية). أخذت العينات في المدة من 2015/7/19 ولغاية 2015/7/24 مباشرة واضيفت إلى 50 مل من الوسط في دوارق مخروطية ومن ثم حضنت الدوارق المخروطية في حاضنة هزازة لمدة ثلاثة أيام بحرارة 28 °م و150 دورة/دقيقة، بعد الحضن استعملت طريقة التخافيف للنمو الناتج وزرع 0.1 مل من التخافيف المناسبة على وسط البطاطا دكستروز الصلب (PDA) بطريقة النشر ووضعت الأطباق في الحاضنة لمدة ثلاثة أيام عند حرارة 28°م وبعد ذلك تم إعادة تنقية العزلات النامية بإعادة زرعها (Sub-culturing) على نفس الوسط بوساطة إلابرة المعقمة. نميت المستعمرات الفطرية على وسط (PDA) والوسط Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) المحضر حسب طريقة [6] بعد مدة حضن تسعة أيام وعلى حرارة 28°م ولمدة 12 ساعة ضوء و12 ساعة ظلام وبعدها شخصت مجهريا من خلال دراسة شكل الكونيدات الكبرى Macro-conidia والحامل الكونيدي Conidiophores والسبورات الكلاميدية Chlamydospores على وسط (PDA) فيما درس شكل الكونيدات الصغرى Micro-conidia على الوسط (SNA) وشخصت الفطريات بالاعتماد على [8،7].

أما بكتريا *Bacillus cereus* فقد عزلت وشخصت بدراسة سابقة [9] وتم إعادة تنشيطها باستعمال وسط Nutrient broth بعد تعقيمه وتم ضبط الاس الهيدروجيني عند 7.2 و حضنت في حاضنة هزازة لمدة ثلاثة أيام عند سرعة 150 دورة/دقيقة وحرارة 28 °م.

حساب أعداد الخلايا المايكروبية (كونيديا الفطريات وخلايا البكتريا)

استعملت شريحة عد الخلايا Hemocytometer لحساب أعداد الكونيديا الموجودة في الوسط بعد تنمية العزلات على وسط البطاطس دكستروز السائل (PDB) في دوارق مخروطية حجم 100 مل لمدة 3 أيام في الحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة/دقيقة وحرارة 28°م، ومن ثم رشح الوسط بوساطة قمع وشاش معقمين للتخلص من المايسليم Mycelia وجزيئات النمو الكبيرة. فيما يخص البكتريا، نميت البكتريا على وسط المرق المغذي في دوارق مخروطية سعة 100 مل باستعمال الحاضنة الهزازة وبسرعة رج 150 دوره/دقيقة وحرارة 30°م ولمدة 24 ساعة ثم استعملت طريقة التخافيف وزرع 0.1 مل من التخافيف المناسبة على وسط الاكار المغذي بطريقة النشر وبثلاث مكررات وحضنت عند حرارة 30°م لمدة 24 ساعة ومن ثم حسبت أعداد المستعمرات النامية وقدرت أعداد الخلايا (CFU/mL).

الكشف عن تحلل السليلوز والنشا والبكتين في الوسط الصلب

اتبعت طريقة [10] في الكشف عن تحلل السليلوز وذلك بتلقيح وسط السليلوز المعقم والموزع في أطباق المحضر وفق طريقة [11] بالعزلات البكتيرية والفطرية كلا على حدة بطريقة Spot Assay وترك الوسط في الحاضنة لمدة 48 ساعة عند حرارة 30°م وبعد انتهاء مدة الحضن غمر سطح الطبق بمحلول اليود لمدة 30 ثانية وبعدها سكب محلول اليود وترك الطبق لمدة 2-3 دقيقة. دل ظهور المنطقة الشفافة حول منطقة النمو على تحلل السليلوز بوساطة أنزيم السليليز المنتج من قبل البكتريا والفطريات وسجل معدل اقطار منطقة التحلل (سم)، فيما نميت البكتريا والفطريات على وسط النشأ المحضر وفق طريقة [12] ووسط البكتين والمكون من نفس مكونات وسط السليلوز مع استبدال مادة Carboxymethyl cellulose بالبكتين (5غم) واستعملت نفس الطريقة في الكشف عن التحلل وعد تكون الهالة الشفافة حول المستعمرات فحصا موجبا.

إنتاج الكتلة الحيوية

جمعت مخلفات نبات الثيل *Cynodon dactylon* L. من حدائق جامعة السليمانية وغسلت النباتات وقطعت وجففت باستعمال فرن كهربائي على حرارة 65°م ولمدة 24 ساعة ثم طحنت بطاحونة كهربائية ومررت عبر منخل حجم (2 ملم) وحفظت بأكياس بولي اثيلين معقمة لحين البدء بالتجربة، استعملت مخلفات نبات الثيل كمصدر كربوني. لأجل الحصول على البروتين أُحادي الخلية، استعمل الوسط المستخدم في تحلل السليلوز مع استبدال مادة Carboxymethyl cellulose بنبات الثيل (4%)، اذ وضع الوسط في دورق حجم 2000 مل لغرض تحضير 1000 مل من الوسط وبعد مدة حضن ثمانية أيام وعلى حرارة 30°م وبسرعة رج 150 دورة/دقيقة وكان حجم اللقاح 0.5 مل/100 مل وسط والاس الهيدروجيني 7.5 وحسب الوزن الجاف الذي يمثل الإنتاج النهائي للبروتين أُحادي الخلية.

تحديد الظروف المثلى لإنتاج البروتين أُحادي الخلية

- **الاس الهيدروجيني pH**

لتحديد الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج البروتين أُحادي الخلية، استعملت دوارق مخروطية سعة 250 مل الحاوية على 100 مل من الوسط المبين تركيبه في الفقرة السابقة وضبط الاس الهيدروجيني على الأرقام (5.5، 6.5، 7.5، 8.5) وكلا على حده وعقم الوسط وبرد ولقح باللقاح المختلط واستعمل نبات الثيل كمصدر كاربوني وحيد، حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة على حرارة 30°م وبسرعة رج 150 دورة/دقيقة وكان حجم اللقاح 0.5 مل وتركيز المصدر الكربوني 1% ومدة حضن ستة ايام.

- **حجم اللقاح**

استخدمت حجوم لقاح (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5 مللتر/100مللتر) من كل من عزلة الفطر وعزلة البكتريا لأغراض تلقيح الوسط السائل لاختبار تأثير حجم اللقاح المضاف في إنتاج الكتلة الحيوية.

تركيز المصدر الكربوني

اختير نبات الثيل كمصدر كاربوني وهو متوفر كمخلفات نباتية والحصول عليه غير مكلف من الناحية الاقتصادية وأضيف للوسط بالتراكيز 1، 2، 3، 4% كل على حدة.

- **مدة الحضن**

اختبرت مدد حضن مختلفة هي 2، 4، 6و 8 يوم وحسبت الكتلة الحيوية لكل مدة حضن لمعرفة مدة الحضن الملائمة للحصول على افضل إنتاج للكتلة الحيوية.

تعيين الوزن الجاف للكتلة الحيوية

عين الوزن الجاف لبروتين أُحادي الخلية بنبذ مزرعة النمو بسرعة 5000 دورة/دقيقة وحرارة 5°م لمدة 15 دقيقة، غسل الراسب بإضافة 10 مل ماء مقطر بعدها جفف عند حرارة 65°م ولمدة 24 ساعة ومن ثم وزنت الكتلة الحيوية Biomass.

التحاليل والقياسات للبروتين أُحادي الخلية المنتج

قدّر البروتين بالاعتماد على طريقة [13] وباستعمال Kjeldahl method اما الدهون فقد قدرت بالاعتماد على طريقة [14]، قدر الرماد والعناصر في الرماد حسب طريقة [15]، فيما قدرت الأحماض الأمينية حسب طريقة [16] وباستعمال جهاز HPLC في Kings Laboratory في أربيل، واجري فحص السموم استنادا إلى Veratox kit المجهز من شركة (Neogen) وقدرت كمياتها باستعمال جهاز ELISA في مختبرات المستشفى البيطري في السليمانية، اما الأحماض النووية DNA و RNA في البروتين أُحادي الخلية فحسب اعتمادا على طريقة [17] وباستعمال جهاز Nano drop.

التحليل الاحصائي

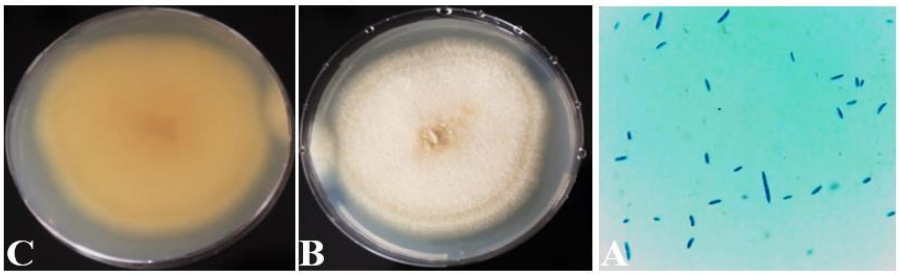
صممت التجارب باعتبارها تجارب ذات عامل واحد ذات تصميم عشوائي كامل وحللت احصائيا باستخدام البرنامج الاحصائي (SPSS) وقد تضمن التحليل الاحصائي حساب المتوسط الحسابي وجراء مقارنة بين متوسطين باستخدام اختبار اقل فرق معنوي بين متوسطين (Least Significance Difference.LSD) عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) وتم اختبار المعنوية (Siginificancy) للعوامل المدروسة.

النتائج والمناقشة

العزل والغربلة و التشخيص

تضمنت الدراسة استعمال 9 عزلات بكتيرية و7 عزلات فطرية كان مصدرها التربة. انتخبت عزلتين من العزلات البكتيرية بحسب قابليتها على تحليل السليلوز والنشأ والبكتين ومن ثم انتخب منها عزلة واحدة هي الأكفأ في التحليل بالإضافة إلى قدرتها على التآزر مع العزلة الفطرية المنتخبة. اما العزلات الفطرية فقد انتخبت اربعة عزلات اعتمادا على قابليتها على تحليل السليلوز والنشأ والبكتين وانتخب منها عزلة فطرية واحدة أظهرت قابليتها العالية على التحليل وكانت هناك علاقة تآزريه مع البكتريا المنتخبة. اجرى [18] دراسة لعزل البكتريا المحللة للسليلوز من التربة وحصل على 15 عزلة بكتيرية محللة للسليلوز بالاعتماد على قطر التحلل، 5 من العزلات تعود إلى الجنس *Bacillus*. بينما قام [19] ايضا بعزل 57 عزلة بكتيرية من التربة منها ثلاثة عزلات اظهرت قدرة عالية على إنتاج أنزيم السليليز واظهر التشخيص ان العزلات هي *B. cereus* و*B. subtilius* و *B. thuringiensis*. اختبرت قدرة العزلة *B. cereus* على إنتاج Biofilm بتنميتها على الوسط Congo red agar وأظهرت النتائج عدم قدرة العزلة البكتيرية على إنتاج Biofilm حيث أعطت فحصا سالبا (لم تعرض النتائج في هذا البحث) مما يعطي فكرة عن عدم امراضية البكتريا ويدعم جانب السلامة في استعمال البروتين أُحادي الخلية.

استخدم كلوريد الزنك $ZnCl_2$ في هذه الدراسة لأجل الحصول بسهولة على معظم أنواع الفيوزاريوم من العينات البيئية كالتربة مثلا، حيث ان الكميات الزائدة من كلوريد الزنك يمكن ان تثبط السلسلة التنفسية الهوائية في بدائية وحقيقية النواة على حد سواء عن طريق التسبب في اضطراب سلسلة نقل الإلكترونات في الميتوكوندريا وانحلال الغشاء وفتح المسامات [20]. أشار [21] ان انواع الفيوزاريوم يمكن لها ان تتحمل نسبة عالية من كلوريد الزنك تتجاوز(4) ملغم/مل وهناك حاجة ماسة إلى مزيد من البحوث لفهم افضل لتأثير كلوريد الزنك في تثبيط نمو العديد من الأحياء المجهرية. شخصت العزلة الفطرية التي تعود إلى الجنس *Fusarium* على انها *F. solani*، شكل (1) يبين الكونيدات العائدة للفطر *F. solani* اذ نلاحظ شكل الكونيدات التي تعتبر احدى طرق التشخيص للفطر بالإضافة إلى لون المستعمرات على الوسط PDA.



شكل (1): العزلة المحلية لفطر *Fusarium solani*. (A) الكونيدات العائدة للعزلة *F. solani* التي اعطيت الرمز F7A تحت المجهر بقوة تكبير 40x.
شكل المستعمرات الفطرية النامية على وسط PDA بدرجة حرارة 28°م لمدة 9 أيام (B) الجزء العلوي، (C) الجهة المعاكسة

قابلية العزلتين المحلية لبكتريا *B. cereus* وفطر *F. solani* على تحلل السليلوز والنشأ والبكتين

تم مقارنة نمو *B. cereus* والقدرة على تحلل السليلوز والنشا والبكتين ببكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المتوفرة لدينا في المختبر على أوساط مختلفة وكما مبين بالجدول (1)، اذ نميت على وسط السليلوز الحاوي على السليلوز كمصدر كاربوني وحيد لمقارنة كفاءة كل من العزلتين مع بعضهما على تحليل السليلوز على اساس قطر المنطقة الشفافة وباستعمال طريقة Spot Assay ومن ملاحظة النتائج في جدول (1) نجد ان العزلة البكتيرية *B. cereus* كانت الأفضل في تحليل السليلوز مقارنة مع العزلة *P. aeruginosa*، وظهرت النتيجة نفسها عند تنمية كل من العزلتين على وسط يحوي البكتين والنشا كمصدرين وحيدين للكربون وكلا على حدة و كان قطر التحلل افضل للعزلة *B. cereus* مما يدل على قدرة العزلة على إنتاج أنزيمات السليليز والبكتينيز والاميليز. استطاع [22] عزل سبع عزلات محللة للسليلوز من التربة اختلفت كفائتها في عملية التحلل .اما نتائج القابلية على تحليل النشا وإنتاج أنزيم الاميليز فقد اتفقت مع النتائج التي حصل عليها [23] والذي استطاع غربلة 60 عزلة بكتيرية من مصادر مختلفة كانت 25 عزلة منها محللة للنشا وان العزلة *B. stearothermophilius* كانت الأكفأ. اما [24] فقد تمكن من الحصول على 30 عزلة بكتيرية منتجة لأنزيم الاميليز وباستخدام كوالح الذرة كمصدر كربوني. اما فيما يتعلق بالقابلية على تحليل البكتين وإنتاج أنزيم البكتينيز فقد اتفقت هذه الدراسة مع ما جاء به [25] اذ قام بعزل البكتريا العائدة إلى جنس *Bacillus* sp. من التربة ووجد انها ذات كفاءه عالية في إنتاج أنزيم البكتينيز في وسط يحوي 0.4% سكروز باستعمال مخلفات قشور الفواكه.

جدول (1): قطر التحلل (سم) لبكتريا *B. cereus*.

وسط السليلوز				
التخافيف / اسم العزلة	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
B. cereus	1.5	1.3	1.2	1
P. aeruginosa	1.2	1.1	0.7	0.5
وسط النشأ				
التخافيف / اسم العزلة	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
B. cereus	1.4	1.3	1.1	1
P. aeruginosa	1.3	1.1	1	0.6
وسط البكتين				
التخافيف / اسم العزلة	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
B. cereus	1.3	1.2	1.1	1
P. aeruginosa	1.2	1	0.7	0.5

***تم الكشف بإضافة كاشف الايودين على وسط السليلوز، وسط النشأ، وسط البكتين مصدر كاربوني، بطريقة Spot assay.**
عدد البكتريا (52×10^{8}خلية/مل).

اما جدول (2) فيبين العزلة المحلية لفطر *F. solani* بالمقارنة مع بعض العزلات الفطرية العائدة لجنس *Fusarium* والتي اعطيت الرموز (F3A، F1MG، F7A، FQ) والمعزولة من ترب مختلفة والمتوفرة لدينا في المختبر، حيث نميت جميع العزلات على الوسط المبينة مكوناته سابقا وأضيف كل من السليلوز والنشأ والبكتين كمصدر كاربوني وحيد لمعرفة قدرة هذه الفطريات على تحليل السليلوز والنشأ والبكتين من خلال قياس قطر التحلل وأظهرت النتائج تفوق العزلة *F. solani* والتي تحمل الرمز F7A في قدرتها على تحليل السليلوز وكان معدل قطر التحلل 2 سم، اما قدرة الفطر على تحليل النشأ فأظهرت نفس العزلة F7A أنها الأكفأ اذ بلغ معدل قطر التحلل 1.63 سم، أما ما يتعلق بقابلية الفطر على تحليل البكتين فقد أظهرت العزلة نفسها F7A أنها الأكفأ من بين العزلات الأربعة في تحليل البكتين اذ بلغ معدل قطر منطقة التحلل 1.9 سم.

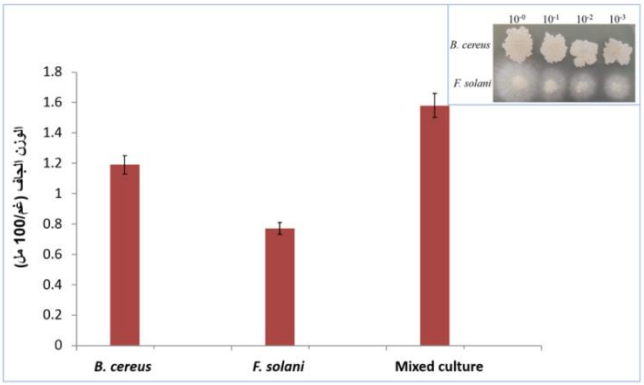
جدول (2): قطر التحلل (سم) لأربع أنواع من فطر *Fusarium*.

وسط السليلوز					
التخافيف / اسم العزلة	الرمز	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
F. culmorum	F3A	1.76	1	0.8	0.5
F. denticulatum	F1GMG	1.9	1.5	1	0.7
F. mangiferae	FQ	1.23	1	0.8	0.6
F. solani	F7A	2	1.6	1	0.6
وسط النشأ					
التخافيف / اسم العزلة	الرمز	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
F. culmorum	F3A	1.26	0.9	0.6	0.5
F. denticulatum	F1GMG	1.3	0.9	0.7	0.5
F. mangiferae	FQ	0.9	0.7	0.4	0.3
F. solani	F7A	1.63	1.13	0.63	0.4
وسط البكتين					
التخافيف / اسم العزلة	الرمز	10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
F. culmorum	F3A	1	0.8	0.6	0.5
F. denticulatum	F1GMG	1.4	1.1	0.7	0.5
F. mangiferae	FQ	0.96	0.8	0.6	0.4
F. solani	F7A	1.9	1.4	0.45	0.3

*** تم الكشف بإضافة كاشف الايودين على وسط السليلوز، وسط النشأ، وسط البكتين مصدر كاربوني، بطريقة Spot assay .عدد الفطريات 10^{5} كونيدة/مل.**

إنتاج الكتلة الحيوية

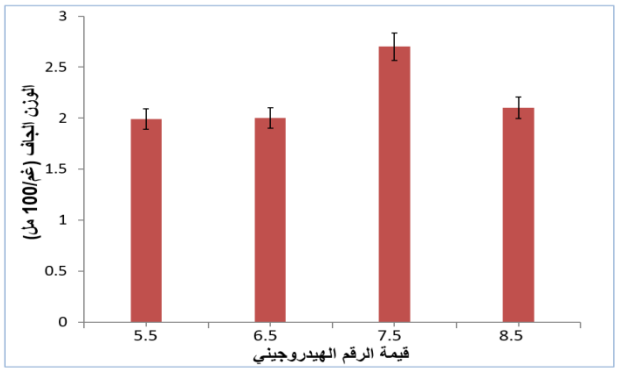
يبين شكل (2) إنتاج الكتلة الحيوية باستعمال العزلات المنتخبة، البكتريا *B. cereus* بمعاملة والفطر *F. solani* بمعاملة أخرى ومن ثم استعمال المزارع المختلطة بمعاملة ثالثة. أشارت النتائج إلى ارتفاع إنتاج الكتلة الحيوية بدلالة الوزن الجاف عند استعمال المزارع المختلطة (البكتريا والفطر) سويا، اذ بلغ الإنتاج 1.58غم/100 مل، وقد استعمل نظام المزارع المختلطة في العديد من الصناعات الحيوية الغذائية لكن يجب ان يكون هناك قدرة للعزلات المختلطة على التعايش مع بعضها وعدم وجود تنافس او تضاد [26]. ومن ملاحظة الصورة الملحقة بشكل (2) نجد ان هناك علاقة تآزريه بين العزلتين بتنميتهما على نفس الوسط وعلى مقربة الواحدة من الأخرى مما يدل على عدم وجود اي تضاد بين العزلتين وبالتالي إمكانية استعمال العزلتين معا في نظام المزارع المختلطة وفي هذا المجال ذكر[26] ان افضل إنتاج للبروتين أُحادي الخلية يتم باستعمال المزارع المختلطة مقارنة بالمزارع المفردة حيث تعطي تسكر افضل للمادة الأساس المستعملة وكفاءة في استهلاك المصدر الكربوني وتزيد من الكتلة الحيوية المنتجة وبالتالي أثراء البروتين أُحادي الخلية المنتج، إضافة إلى أنها تقلل من وقت التخمير وكلفة الإنتاج عن طريق تقليل معالجة المادة الأساس المستعملة في الإنتاج.



شكل (2): إنتاج الكتلة الحيوية باستعمال العزلات المختارة. الصورة الملحقة: العلاقة بين *B. cereus* و*F. solani* والمزروعة على وسط Luria- Bertani الصلب بأستخدام طريقةSpot dilution plate assay بدرجة حرارة 30°م لمدة 4 أيام، عدد الفطريات (10^5 كونيدة/مل)، عدد البكتريا (52 × 10^8خلية/مل).

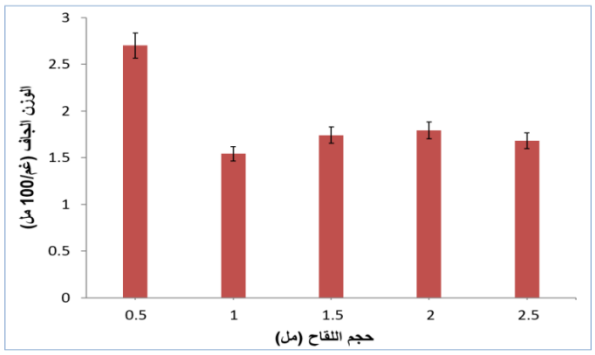
دراسة الظروف المثلى للإنتاج

أظهرت النتائج في شكل (3) ان اعلى معدل لإنتاج الكتلة الحيوية كانت عند الاس الهيدروجيني 7.5 اذ كان معدل وزن الكتلة الحيوية 2.70 غم/100 مل ومن ثم انخفض الإنتاج عند الاس الهيدروجيني 8.5 ليصبح 2.1 وهذه النتائج متطابقة مع ما توصل اليه [28] حيث كان هناك زيادة في معدل نمو الفطر وإنتاج البروتين مع الزيادة في تركيز الاس الهيدروجيني إلى حدود معينة ومن ثم يبدا الإنتاج بالانخفاض مع ارتفاع الاس الهيدروجيني. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين متوسطات الأسس الهيدروجينية مع الكتلة الحيوية المنتجة، فقد اظهر التحليل وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) بين تركيز ايون الهيدروجين 6.5 و7.5 وبين 7.5 و8.5، بينما لم تكن هناك فروق معنوية بين تركيز أيونالهيدروجين5.5و6.5. .



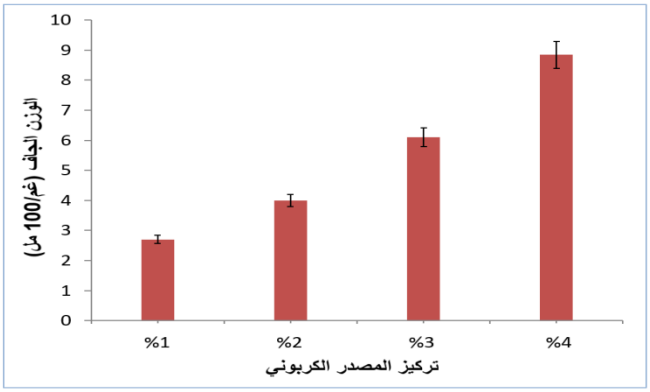
شكل (3): تأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاج الكتلة الحيوية.

يبين شكل (4) تأثير حجم اللقاح في إنتاج الكتلة الحيوية بدلالة معدل الوزن الجاف (غم/100 مل وسط)، اذ حصل اعلى إنتاج للكتلة الحيوية بدلالة معدل الوزن الجاف عند حجم لقاح 0.5 مل/100 مل وكان 2.7 ومن ثم انخفض الإنتاج مع زيادة حجم اللقاح، قد يعود السبب إلى ان تركيز كل من البكتريا والفطريات يزداد مع زيادة حجم اللقاح مما يزيد الطلب على المصدر الكربوني ومصدر النتروجين لذلك يبدأ السكر المتبقي والنتروجين بالتناقص. نقص المغذيات يؤدي إلى تباطؤ نمو البكتريا والفطريات وبالتالي انخفاض تركيزهما مما يؤثر على مستوى التخمر وبالتالي يؤثر على البروتين أحادي الخلية المنتج [29]. أوضحت نتائج الاختبارات الإحصائية وجود فروقا معنوية بين متوسطات حجم اللقاح المستخدم 0.5 و1 مل/100 مل وبين حجم لقاح 2 و2.5 مل فيما لم تكن هناك أي فروق معنوية تذكر بين حجم لقاح 1و 1.5 وبين 1.5و2 مل/100 مل.



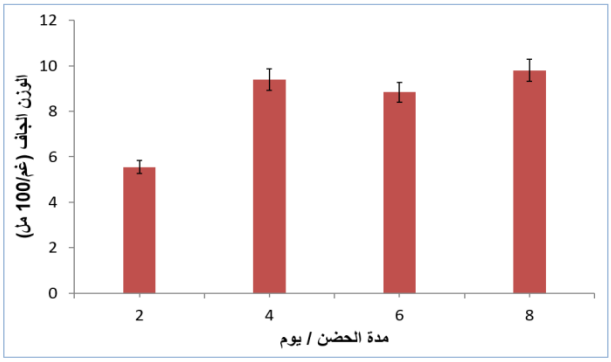
شكل (4): تأثير حجم اللقاح على إنتاج الكتلة الحيوية.

يبين شكل (5) تأثير المصدر الكربوني في إنتاج الكتلة الحيوية، اذ استعمل نبات الثيل كمصدر كربوني وحيد، ومن ملاحظة الشكل نجد ان هناك زيادة في الوزن الجاف للكتلة الحيوية بزيادة تركيز المصدر الكربوني حيث وصل اعلى معدل للوزن الجاف عند تركيز 4% وبوزن 8.84 غم/100 مل ، قام [29] بتنمية الفطر *F. moniliforme* على مصادر كربونية متعددة مثل الكلوكوز والفركتوز والمالتوز والسكروز وقد حصل على زيادة ملحوظة في الكتلة الحيوية بلغت 11.33 غم/لتر عند استعمال الكلوكوز بنسبة 0.5% كمصدر كربوني وحيد. اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان هناك فروقا معنوية عالية بين جميع تراكيز المصدر الكربوني مع الوزن الجاف وعند مستوى احتمالية ($P<0.05$).



شكل (5): تأثير تركيز المصدر الكربوني على إنتاج الكتلة الحيوية.

أما شكل (6) فيبين تأثير مدة الحضن في إنتاج الكتلة الحيوية، وكان افضل إنتاج للكتلة الحيوية بعد مدة حضن 8 أيام و كان معدل الوزن الجاف 9.8 غم/100 مل، وكان هناك زيادة في الكتلة الحيوية عند مدة حضن 4 أيام ومن ثم كان هناك انخفاض عند 6 أيام ومن ثم عاودت الكتلة الحيوية بالارتفاع بعد 8 أيام وقد يعود سبب هذا التباين لاستعمال البكتريا التي يصل اعلى كثافة لها في الطور اللوغارتمي وان تجاوز المزرعة الميكروبية لطور النمو اللوغارتمي سيؤثر سلبا في عدد الخلايا مما يسبب انخفاض كمية الكتلة الحيوية الناتجة ثم بعد ذلك نشطت عزلة الفطر فازداد الإنتاج [30]. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين جميع مدد الحضن وعند مستوى احتمالية ($P<0.05$) .



شكل (6): تأثير مدة الحضن على إنتاج الكتلة الحيوية.

التحاليل الكيميائية والفحص السمي للبروتين أُحادي الخلية المنتج

يوضح جدول (3) بعض صفات ومكونات البروتين الميكروبي المنتج، ومن ملاحظة الجدول نجد ان نسبة البروتين الخام في الكتلة الحيوية والتي تم إنتاجها باستعمال تخمرات الحالة السائلة كانت 28% فيما كانت نسبة الرطوبة 40%، و كانت نسبة الكربوهيدرات 17%، في حين كانت نسبة الدهون المستخلصة بالكلوروفورم 2.46%، واظهرت النتائج ارتفاع نسبة الرماد إلى 31.66%. وهذه النتائج جاءت مقاربة لما حصل عليه [31] والذي حصل على نسبة بروتين 32.12% باستعمال فطر *Aspergillus niger* فيما حصل على نسبة كربوهيدرات عالية بلغت 38.1% وهي اعلى مما تم الحصول عليه في هذا البحث، وكانت نسبة الدهون مطابقة لما جاء في هذا البحث. نستنتج ان نسبة البروتين الخام المنتج باستعمال المزارع السائلة المختلطة كانت مرتفعة وهذه تؤشر كمحاسن لمنتجات تخمرات الحالة السائلة وقد يعود السبب لجاهزية المواد الأولية والتي من ضمنها المصدر الكربوني في الوسط السائل مما يسمح بنمو اعلى للأحياء المجهرية واستهلاك اسهل للمصدر الكربوني [32،5] ، فيما يشير الجدول إلى ان نسبة DNA كانت 2% والنسبة المئوية RNA كانت 1.64% وهي ضمن الحدود المسموح بها (5-7%) لاستعمال البروتين أُحادي الخلية ولا يتطلب عملية إجراء إزالة لهذه الحوامض النووية [33].

جدول (3): تركيب ومكونات البروتين الميكروبي المنتج

المركب او المكون	النسبة المئوية
البروتين الخام قبل التخمر	10.95
البروتين الخام بعد التخمر	28.8
الكاربوهيدرات	17
الدهون	2.46
الرماد	31.66
الرطوبة	40
DNA	2
RNA	1.64
RNA + DNA	3.64

فحصت ثلاثة مجموعات من السموم الأولى هي مجموعة Aflatoxin وأظهرت النتائج خلو البروتين الميكروبي المنتج من أي نوع من أنواع الافلاتوكسينات اذ كان التركيز (0 جزء بالبليون)، فيما اظهر فحص المجموعة الثانية من السموم Ochratoxin ان التركيز كان (10.6 جزء بالبليون) وهو ضمن الحدود الطبيعية للأعلاف المستعملة في تغذية الحيوانات والدواجن ولكن يبقى مرتفعا بعض الشيء وربما يعود إلى دخول الفطر في طور الثبات بعد مرور 8 أيام من الحضن وإفراز هذا النوع من السموم كنواتج أيضية ثانوية، اما المجموعة الثالثة والتي يطلق عليها T-2 Toxin فكان التركيز (122.9 جزء بالبليون) وهو أيضا ضمن الحدود الطبيعية حيث تبلغ النسبة الطبيعية 150 جزء بالبليون، مما يدل على خلو البروتين أُحادي الخلية المنتج من النسب الحرجة للسموم التي ممكن ان تؤثر في الحيوانات ويؤكد جانب السلامة في استعمال البروتين كعلف حيواني.

جدول (4) يبين تركيز الأحماض الأمينية في البروتين أُحادي الخلية المنتج ومن ملاحظة الجدول نجد ان البروتين الميكروبي المنتج يحتوي على الكثير من الأحماض الأمينية الأساسية كما ويحتوي على 6 من الأحماض الأمينية الغير أساسية، وبلغ مجموع قيم الأحماض الأمينية 84.71 ملغم/100 غم، ونجد ان اعلى تركيز كان للحامض الأميني Phenylalanine وبتركيز 7.46 ملغم/100 غم وهو من الأحماض الأمينية الأساسية تلاه Threonine بتركيز 5.12 ملغم/100 غم والحامض الأميني Lysine وبتركيز5 ملغم/100 غم، فيما سجل ادنى تركيز للحامض الأميني Valine وبتركيز 1.2 ملغم/100غم، اما الأحماض الأمينية الغير أساسية فقد سجل اعلى تركيز للحامض الأميني Histidine وبتركيز 17 ملغم/100غم واقل تركيز للحامض الأميني Glycine والذي بلغ 1.3 ملغم/100 غم . وجد [34] ارتفاع نسبة الحامض الأميني Glutamine في البروتين أُحادي الخلية مقارنة بفول الصويا، وانخفاض الأحماض الأمينية Lysine، Methionine و Threonine في فول الصويا مما يدعم استعمال البروتين أُحادي الخلية كمصدر واعد في تغذية
الحيوانات. واستخدم [35] البروتين أُحادي الخلية المنتج باستعمال قش القمح كمصدر كاربوني وحيد وباستخدام عزلات محلية مختلفة في تغذية الأسماك ووجد انه يحتوي على كافة الأحماض الأمينية الأساسية.

أشار البحث إلى إمكانية استعمال نظام المزارع المختلطة من الفطريات والبكتريا في إنتاج البروتين أُحادي الخلية، بالإضافة لذلك أشار تحليل البروتين المنتج ان له قيمة غذائية عالية واحتوائه على اغلب الأحماض الأمينية الأساسية والمعادن الرئيسية وبالتالي فان بالإمكان استعماله كعلف حيواني وربما يتم اعتباره مادة أساس لتوليد الطاقة.

جدول (4): تركيز الأحماض الأمينية

الحامض الأميني	التركيز ملغم / 100غم
الأحماض الأمينية الأساسية Essential Amino acids	
Cysteine	**1.48**
Leucine	**4.54**
Lysine	**5**
Methionine	**2.81**
Phenylalanine	**7.46**
Tyrosine	**3.87**
Valine	**1.2**
Threonine	**5.12**
الأحماض الأمينية الغير أساسية Non-essential Amino acids	
Histidine	**17**
Tryptophan	**13**
Glycine	**1.3**
Proline	**8.32**
Glutamic	**8.31**
Aspartic	**5.3**
التركيز الكلي	**84.71**

المصادر

1. Torbatinejad, N., and Sherlock, R. G. (2012). Comparison of feeding value of a treated sea plant, *Posidonia australis*, with lucerne, pasture and wheat. *International Journal of Plant* Production. 2(1), 47-56.
2. Ugalde, U. O., and Castrillo, J. I. (2002). Single cell proteins from fungi and yeasts. Applied mycology and biotechnology, 2, 123-149.
3. Schultz, N., Chang, L., Hauck, A., Reuss, M., and Syldatk, C. (2006). Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. Applied microbiology and biotechnology, 69(5), 515-520.
4. Smith, J. E. (1985). Biotechnology Principles: Aspects of Microbiology 11. Rockwell.
5. الخفاجي، زهرة محمود. (1990). التقنية الحيوية. ط1. مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر.
6. Valls, J. S., Nacente, R. B. and Coll, M. S. (2001). Hand Book of Microbiological Culture Media, Sixth Edition, Scharlau Microbiology.
7. Summerell, B.A., Salleh, B. and Leslie, J.F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant disease, 87(2), 117-128.
8. Leslie, J. F. and Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Iowa, USA. 388 pp.
9. الدليمي، عدنان علي. (2015). دراسة كفاءة تحلل الهيدروكربونات للبكتريا المعزولة من الترب الملوثة بالمشتقات النفطية رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الانبار.
10. Yeoh, H.H., Khew, E., and Lim, G. (1985). A simple method for screening cellulolytic fungi. *Mycologia*, 77(1), 161-162.
11. Kauri, T., and Kushner, D. J. (1985). Role of contact in bacterial degradation of cellulose. FEMS Microbiology Ecology, 1(5), 301-306.

12. Williams, S. T. and Cross, T. (1971). Chapter XI Actinomycetes. Methods in microbiology, 4, 295-334.

13. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed. Washington, D. C: Association of official Analytical Chemists.

14. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J biol Chem, 226(1), 497-509.

15. AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of official Analytical Chemists, Washington D. C. 1018.

16. Çevikkalp, S. A., Löker, G. B., Yaman, M., & Amoutzopoulos, B. (2016). A simplified HPLC method for determination of tryptophan in some cereals and legumes. *Food chemistry*, *193*, 26-29.

17. González-Mendoza, D., Argumedo-Delira, R., Morales-Trejo, A., Pulido-Herrera, A., Cervantes-Díaz, L., Grimaldo-Juarez, O. and Alarcón, A. (2010). A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genet Mol Res, 9(1), 162-166..

18. Behera, B.C., Parida, 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. *American* Journal of Microbiological Research, 2(1), 41-46.

19. Patagundi, B. I., Shivasaran, C. T.and Kaliwal, B. (2014). Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from soil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(50), 59-69.

20. Santos, R., Dancis, A., David, E. I. D. E., Camadro, J. M., and Lesuisse, E. (2003). Zinc suppresses the iron-accumulation phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the yeast frataxin homologue (Yfh1). Biochemical Journal, 375(2), 247-254.

21. Hamzah, H. M. (2014). Identification and characterization of a highly variable region in mitochondrial genomes of *Fusarium* species and analysis of power generation from microbial fuel cells. Academic dissertation, Saint Louis University.

22. Irfan, M., Safdar, A., Syed, Q., and Nadeem, M. (2012). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. Turkish Journal of Biochemistry, 37(3), 287-293.

23. Ajayi, A. O.and Fagad, O. E. (2003). Utilization of corn starch as substrate for β-amylase by *Bacillus* spp. African J. Biomed. Res. 6(1):37-42.

24. الراوي، ظافر فخري. (2007). عزل وتشخيص البكتريا المنتجة لأنزيم الاميليز من ترب مدينة الرمادي وإنتاجه بأستعمال أوساط محلية. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، المجلد(1)، عدد(2).

25. Sivasakthivelan, P., Sujitha, D. and Sivasakthi, S. (2014). Effect of sucrose on microbial pectin esterase and pectate lyate activity. Inter. J. Adv. Multidisc. Res. 1(1): 09-13.

26. Gutierrez-Correa, M., Portal, L., Moreno, P., and Tengerdy, R. P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. Bioresource Technology, 68(2), 173-178.

27. Tesfaw, A., and Assefa, F. (2014). Co-culture: A great promising method in single cell protein production. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, *9*(2), 12-20.

28.ابوشعالة ، فرج علي، منى مختاروهادي محمد. (2006). إنتاج البروتين من ناتج التحلل القاعدي لتبن الشعير بواسطة الفطر *Aspergillus niger*. مجلة السائل ،كلية العلوم – جامعة 7 اكتوبر.

29. Stanly, F.P. and Pradeep, B.V. (2015). Optimization of pigment and biomass production from *Fusarium moniliforme* under submerged fermentation conditions. Inter. J. Pharm. Pharm. Sci. 5(3): 526-535.

30. ساجدي، عادل جورج و علاء، يحيى محمد علي. (1987). الميكروبيولوجي الصناعي. الجزء الأول (أساسيات التخمرات الصناعية). مطبعة جامعة البصرة.

31. لافي، احمد شهاب احمد، ظافر فخري الراوي، سمير سرحان خليل و العسافي، ادهام علي. (2008). إنتاج البروتين أحادي الخلية (SCP) بالتخمرات السائلة لمخلفات نبات الحمض واستخدام فطر *Aspergillus niger* واختباره حيويا. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، المجلد(2)، عدد(2).

32. الحيدري، نظام كاظم والمصلح، رشيد محجوب. (1989). الأحياء المجهرية الصناعية. بيت الحكمة، جامعة بغداد.

33. Ohta, S., Maul, S., Sinskey, A.J., and Tannenbaum, S.R. (1971). Characterization of a heat-shock process for reduction of the nucleic acid content of Candida utilis. Applied microbiology, 22(3), 415-421.

34. Gabriel, A. Y., Mahmoud, R. M., Goma, M., and Abou-Zeid, M. (1981). Production of single cell protein from cereal by-products. Agricultural Wastes, 3(3), 229-240.

35. Wang, J. P., Kim, J. D., Kim, J. E., and Kim, I. H. (2013). Amino acid digestibility of single cell protein from *Corynebacterium ammoniagenes* in growing pigs. Animal feed science and technology, 180 (1), 111-114.