دراسة كفاءة بعض انواع البكتريا على انتاج الوقود الحيوي

عدنان نعمة عبد الرضا * أنيس عبدالله كاظم ** عبدالستار عبدالجبار ابراهيم *

* قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة ديالى.
** قسم الهندسة الكيمياوية, كلية الهندسة, جامعة ديالى.

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل بعض انواع البكتريا اللاهوائية والهوائية القادرة على تحطيم وتخمير السليلوز وتشخيصها , تم عزل البكتريا *Clostridium phytofermentous* وتشخيصها من 10عينات تربة زراعية ,كانت نسبتها 50% من مجموع 50 مستعمرة , وعزل البكتريا *Eschrichia coli* من 15 عينة مياه آسنه وكانت نسبتها 40% من مجموع 75 مستعمرة وعزلت البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من 15عينة تربة اعتيادية ,وكانت نسبتها 53% من مجموع 75 مستعمرة .تم قياس قدرة البكتريا قيد الدراسة على انتاجها للانزيمات المحللة للسليلوز باستخدام طريقة تقدير الامتصاصية فكانت اعلى فعالية انزيمية للبكتريا *Clostridium phytofermentous* التي بلغت 2.52 وحدة دولية /مليلتر ,و *Pseudomonas aeruginosa* بلغت 2.21 وحدة دولية /مليلتر و *Eschrichia coli* بلغت 2.09 وحدة دولية /مليلتر .أظهرت نتائج تأثير بعض الظروف البيئية على فعالية انتاج انزيم السليليز, أن افضل درجة حرارة كانت 35-40مº وpH يتراوح مابين 7-9 . تم قياس تركيز الكحول الاثيلي المنتج من قبل العزلات الثلاث المشخصة تحت الدراسة باستخدام طريقة التسحيح Titration , ان اعلى تركيز للكحول المنتج كان من البكتريا *Eschrichia coli* الذي بلغ 8.28غم/لتر , اما البكتريا*Pseudomonas aeruginosa* بلغ 7.86غم/لتر , و *Clostridium phytofermentous* بلغ 6.62 غم/لتر .

الكلمات الدالة :- انزيم السليليز, الفعالية الانزيمية , الوقود الحيوي

Study the Efficiency of Some Types of Bacteria on Producing of Biofuels

Adnan Neama Al Azawy*, Anees A. Khadom, Abdul Sattar Abdul Jabbar***

* Department of Biology, College of Education Pure Sciences, Diyala University
** Department of Chemical Engineering, College of engineering, Diyala University

Received 15 February 2014 ; Accepted 21 January 2015

Abstract

The study included isolative and diagnose of some types of anaerobic and aerobic bacteria capable of decomposing and fermentation of cellulose. Isolation and diagnose the bacteria *Clostridium phytofermentous* from 10 agricultural soil samples, was 50 percent of the total 50 colony, the isolation of bacteria *Eschrichia coli* from 15 waste water samples which represented 40% of the total 75 colony and isolated the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* from 15 normal soil samples, and was 53% of the total 75 colony. The ability of studied bacteria on the production of cellulose decomposing enzymes was evaluated using absorbance method. Higher activity obtained via *Clostridium phytofermentous* bacteria with maximum value of 2.52 IU / mL, while *Pseudomonas aeruginosa* gives 2.21 IU / mL and *Eschrichia coli* unit gives 2.09 IU / mL. The results show the effect of some environmental conditions on the effectiveness of the production of the enzyme cellulose. Optimum temperature range was 35-40 ^{0}C and pH ranges of 7-9. The concentration of ethyl Alcohol was measured using Titration method. Maximum concentration of alcohol produced by bacteria *Eschrichia coli*, which reached 8.28 g/liter, while the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* reached 7.86 g/liter, and *Clostridium phytofermentous* reached 6.62 g/L.

Key words :- Cellulose, enzyme , Enzyme activity , Biofuel.

المقدمـــــــــة

للاحياء المجهرية أثر مهم في تدوير المركبات العضوية وغير العضوية في البيئة وهذا التدوير يشتمل على المركبات المتراكمة مثل الكاربوهيدرات , الدهون , البروتينات , المعادن لذا فأن كثيراً من العلماء بذلوا جهداً علمياً من اجل تشخيص تلك الاحياء والافادة منها مختبرياً وحقلياً واصبحت تلك تقنية شائعة على النطاقين المحلي والعالمي اذ لايمكن البت او الموافقة على انشاء مدن حديثة الا بتصميم نظام تدوير لتلك المخلفات والافادة منها بعد ان كانت تشكل ضرراً بيئياً , من الاحياء المجهرية المستخدمة في تدوير المركبات في البيئة والحصول على نواتج مختلفة يمكن الافادة منها هي, *Pseudomonas aeruginosa , Eschrichia coli* *التي* تستطيع النمو تحت الظروف اللاهوائية للتخمر منتجة النواتج الاتية acetate وsuccinate وlactate وethanol (1). انتج الوقود الحيوي في البرازيل والولايات المتحده وبلدان اخرى من مصادر سليلوزية مختلفه مثل الذره والقصب السكر باستخدام *Sacchromysis cervisia* و Micro algae (2) , وانتج في دمشق من المخلفات الزراعية والصناعية باستخدام البكتيريا *Xanthomonas, Erwinia* , *Bacillus* (3) ان الوقود الحيوي هو الوقود السائل او الصلب او الغازي الذي ينتج يصوره رئيسية من الكتلة الحيويةbiomass المتجددة والمستديمة, ويعتبر الوقود الحيوي من اهم انواع الوقود في المستقبل , لانه بديل عن الوقود الاحفوري (الخام) ويختلف عنه بوصفه غير ملوث ومتوافر محلياً اذ يمكن انتاجه بسرعة وكذلك يمكن استخدامة في النقل وانتاج الكهرباء وتوليدها (4). اما الايثانول الحيوي bioethanol هو وقود ينتج من مصادر حيوية مختلفة وخصوصاً النباتات مثل الحنطة , والذرة , الخشب و انتاجة من الكتلة الحيوية الغنية بالسليلوز يكون احدى الطرائق التي من خلالها يمكن تقليل من استهلاك الوقود الخام وتلوث البيئة وانبعاث غازات البيت الاخضر(الاحتباس الحراري) مثل غاز ثاني اوكسيد الكاربون واكاسيد النتروجينية الاحادية والثنائية (5) . ان تغير المناخ وندرة مصادر الطاقة التقليدية في بعض مناطق العالم دعت الباحثين الى ايجاد وسائل بديلة, جميع تلك العوامل ادت الى زيادة النتاج العلمي الخاص بالبحث عن انتاج الوقود الحيوي. في نهاية عام 1990 كان انتاج الايثانول العالمي بتزايد من خلال تطور ابحاث التطفير الخاصه بجينات الكائنات الحية , كما ان تزايده ادى الى التركيز على استخدام انزيمات السليليز في عملية التدوير الحيوي للمركبات العضوية وغير العضوية اضافة الى استخداماتها المهمة في المجالات الصناعية, الغذائية , الدوائية, اذ ظهر الوقود الحيوي باجيال عدة 1- الجيل الاول يتضمن انتاج الايثانول من تخمير السكريات والنشويات من المحاصيل الغذائية النباتية بوساطة الخمائر 2- الجيل الثاني يتضمن انتاج الوقود الحيوي من المواد الاولية غير الغذائية Lignocellulose biomass من خلال التحلل الانزيمي او الكيميائي في عمليات مختلفة 3- الجيل الثالث يتضمن توظيف الكائنات الدقيقة المنتجة للانزيمات الى تحلل البوليمرات النباتية كالسليلوز وتخمر السكريات الناتجة (2) . هدفت الدراسة الحالية الى دراسة كفاءة بعض انواع البكتريا على انتاج الوقود الحيوي من خلال

1- عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا الهوائية واللاهوائية من بيئات مختلفة ذات علاقة بتحليل المواد العضوية مثل السليلوز
2- مقارنة قدرتها او كفائتها على انتاج الوقود الحيوي باستخدام نظام محدد النمو
3- مقارنة قدرتها على انتاج انزيم السليليز وايجادالفعالية الانزيمية الامثل
4- انتاج الكحول الاثيلي وتحديد التركيز الامثل المنتج من البكتريا تحت الدراسة .

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص

تم جمع 40عينة (10 عينات تربة زراعية,15عينة تربة اعتيادية , 15عينة مياه آسنة) واجريت لكل عينة سلسلة من التخافيف العشرية من 10^{-1} الى 10^{-5} في مختبر الأحياء المجهرية التابع لكلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى للمدة من (2013/11/10 – 2014/4/28) , بعد زرعها تم اختيار 200 مستعمرة وشخصت تلك المستعمرات بحسب(6) , إذ شخصت المستعمرات مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات ولونها وقوامها ورائحتها وحجمها وأخضعت العزلات الى الفحص المجهري بإستخدام صبغة غرام وصبغة الملكايت للتعرف على شكل البكتريا والسبورات وترتيبها وتفاعلها مع صبغة غرام واستخدمت لتشخيص العزلات ايضا الفحوصات الكيموحيوية المختلفة كأختبار أنزيم الكاتاليز, وأنزيم الاوكسيديز , والاندول , وأحمر المثيل , و الفوكس بروسكاور , وأستهلاك السترات , والحركة , واليوريا, تحلل النشأ , وصبغة البايوسين والنمو على الوسط PE السليلوزي والوسط الماكونكي السائل والوسط الملكي Kings medium.

تحضير انزيم السليليز Prepration of cellulase enzyme

ان العزلات الثلاث *Clostridium phytofermentous ,Pseudomonas aeruginosa ,* *Eschrichia coli* التي تم تنقيتها وتشخيصها زرعت على الوسط المغذي اللسليلوزي PE وحضنت لمدة 1-3 ايام و درجة حرارة 37 م^{o} وبعد ظهور النمو(اللون الاسود) تم استخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 5000g ولمدة 15 دقيقه(7)

تقدير فعالية انزيم السليليز

بعد ظهور النمو وحصول عملية التخمر فصل الرائق (المستخلص الانزيمي) بواسطة استخدام جهاز الطرد المركزي المبرد فائق السرعة High speed cooling centerfuege وبسرعة 5000xg ولمدة 15 دقيقه وبدرجة 4 م , تم تحديد فعالية انزيم السليليز الكلية لكل عزلة من العزلات قيد الدراسه بواسطة قياس كمية السكريات المختزلة الناتجه من تحطم اللسليلوز طبقاً لطريقة (8) وذلك بوضع 1.8 مل من محلول مادة الاساس في انبوبه اختبار وتركت في الحمام المائي بدرجة حرارة 35م لمدة 5 دقائق قبل اضافة 0.2 مل من محلول الانزيم ثم حضنت الانابيب بدرجة حراره 37م لمدة 30 دقيقه واوقف التفاعل باضافة 1مل من

DInitro salicylic acid(DNSA) ثم قيست درجة الامتصاص على الطول الموجي 540nm باستخدام جهاز المطياف الموجيSpectrophotometer

انتاج الكحول الاثيلي

ان العزلات الثلاث *Clostridium phytofermentous ,Pseudomonas aeruginosa ,* *Eschrichia coli* التي تم تنقيتها وتشخيصها زرعت على الوسط المغذي اللسليلوزي PE وبعد ظهور النمو (اللون الاسود) اخذ 1مل من كل عينة بواسطة ماصة معقمة وزرعت في قناني زجاجية معقمة سعتها 10مل ,علقت القناني في دوارق زجاجية ذات حجم 250مل الموضوع فيها 10 مل من الدايكرومات المحمضه ثم غلقت بغطاء مطاطي محكم (Rubber stoper) وغلفت بشمع البرافين لضمان توفر الظروف اللاهوائية بعدها حضنت الدوارق في الحاضنة على درجة حرارة 37م^{o} ولمدة 1-3 ايام وبعدها استخرجت الدوارق وتركت بدرجة حرارة المختبر , استخرج حامل العينة واضيف 100مل من الماء المقطر الى الدورق الذي يحتوي على الدايكرومات المحمضه , ثم1مل من محلول يوديد البوتاسيوم ورج المحلول لغرض المزج , (9)

قياس كمية الكحول الاثيلي في المحلول

تم قياس كمية الايثانول في الوسط المغذي اللسليلوزي للعزلات الثلاث *Eschrichia.coli,Pseudomonas aeruginosa , Clostridum phytofermntou* باستخدام طريقة التسحيح Titration والذي استخدم فيها دايكرومات البوتاسيوم المحمضه حيث تعتبر هذه الطريقه من طرق التسحيح من خلال عملية اكسده والاختزال لغرض تقدير تركيز الكحول في المحاليل المائية وذلك بتأكسد الكحول الى حامض الخليك بتفاعلة مع زيادة من دايكرومات البوتاسيوم وكما موضح في التفاعل الاتي

$$2Cr_2O_7 + 16H + 3C_2H_5OH \longrightarrow 4Cr + 11H_2O + 3CH_3COOH$$

وسحب مقدار الدايكرومات المتبقي باضافة محلول يوديد البوتاسيوم وهذا يتأكسد بدوره محرراً اليود وكما موضح في المعادلة

$$Cr_2O_7 + 14H + 6I \longrightarrow 2Cr + 3I + 7H_2O$$

ثم سحت كمية اليود المتحرر باستخدام محلول قياسي من ثايوسلفات الصوديوم بعدها استخدمت نتائج التسحيح لحساب كمية المحتوى الكحولي في المحلول الاصلي وبمان المحلول المستخلص من الخليط قد يحتوي على مواد قابلة للتأكسد

وهذه المواد قد تتداخل مع محلول الدايكرومات لذى توجب وضع العينة المراد قياس تركيز الايثانول فيها في بيكر صغير وتعلق فوق محلول الدايكرومات وفي دورق مخروطي مغلق بسداده مطاطية وفي هذه الحالة فان الكحول سوف يتبخر ويتفاعل الكحول مع الدايكرومات ,ان هذه الطريقه بطيئه تتطلب وقتآ لذلك يجب وضع الدورق المخروطي في الحاضنة وعلى درجة حراره معينة ولمدة 1-3 ايام من اجل ضمان انتقال جميع الكحول من العينة الى الدايكرومات , في نفس الوقت حضرت 3محاليل بلانك وذلك باضافة 10مل من الدايكرومات المحمضه في دورق مخروطي واضيف لها 100مل ماء مقطر ,ثم اضيف 1مل من محلول يوديد البوتاسيوم بعدها مليئت السحاحه بمحلول ثايوسلفات الصوديوم ثم سححت دوارق البلانك اولآ وعندما بدأ اللون البني بالتحول الى اللون الاصفر اضيف 1مل من دليل النشأ ثم استمر بالتسحيح حتى يزول اللون الازرق واخذت الحجوم المتعادلة لها ثم سححت العينات التي جيء بيها , ان تسحيح البلانك هو لاجل معرفة كمية الدايكرومات المحمضة قبل بدء التفاعل وهنا سوف نحصل على نفس الكمية عند التسحيح لان لم يضاف لها اي كحول ثم تم مقارنة نتائج التسحيح للعينات مع تلك للبلانك , تم حساب كمية الايثانول الناتجه للعينات كألاتي حسب حجم الثايوسلفات النازل من السحاحه المستهلك لتعادل العينة و حسب حجم الثايوسلفات المستخدم لتعادل البلانك بعدها طرح حجم الثايوسلفات المستهلك لمعادلة العينة من حجم الثايوسلفات المستهلك لمعادلة البلانك والحجم الناتج هنا هو حجم الثايوسلفات المستهلك اللازم لحساب تركيز الكحول (10)

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج ان البكتريا *Clostridum phytofermntous* كانت نسبتها 50% من مجموع 50 مستعمره, التي تميزت بانها موجبه لصبغة كرام ومنتجه للسبورات وموجبه لليوريز وتحلل النشأ والمثيل الاحمر وتحلل الجيلاتين والنشأ وهذه النتيجه تتطابق مع (11) الذي ذكر ان البكتريا *Clostridum phytofermntous* موجبه لصبغة كرام ومتحركه ومكونه للسبورات التي تكون طرفية الموقع توجد بالقرب من الترب الزراعية الغنية بالسليلوز ,تنمو في درجة حراره تتراوح مابين 35-37م وpH يتراوح مابين 6-9 ,قليلة التواجد في الترب غير الزراعية , قادره على تحطيم المواد الكاربوهيدراتية المختلفه مثل السليلوز ومنتجه للايثانول وانزيم السليليز, أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان البكتريا *Clostridium phytofermntous* التي تم عزلها وتنقيتها لها القدره العالية على النمو على السليلوز و انتاج انزيم السليليز اي ظهور نمو تام أثناء زرع البكتريا على الوسط PE الذي يحتوي على السليلوز والمغذيات بعدما اضيفت له المواد المختزله والغازات ثم حضنت النماذج في الحاضنه لمدة 1-3 ايام وهذه النتيجه تتطابق مع (2)حيث وجد ان الوسط

الذي يحتوي على السليلوز يبدأ لونه بالتغير عندما تنمو علية البكتريا المحلله لسليلوز اللاهوائية *Clostridium phytofermntous* حتى يصبح اكثر عكوره أي يكون ذات لون اسود وهذه العكوره تدل على الزياده في النمو ووجد بعض البكتريا مثل *Clostridium thermocellum* تنتج لون برتقالي مصفر عندما تنمو على الوسط السليلوزي وهذه الصفة تتميز بها الانواع *Clostridium* المحبة للحرارة العالية وهذه الميزة تعتبر صفة تفريقية بين البكتريا المشخصة والانواع الاخرى . وتتطابق مع(12) الذي ذكر ان البكتريا *Clostridium phytofermntous* هي بكتيريا سليلوزية تنتج انزيمات سليلوزية خارج خلوية لترتبط مع السليلوز لذلك توجد بالترب الغابات الغنية بالسليلوز . تتطابق ايضآ مع (11) الذين وجدو ان البكتريا *Clostridium phytfermntou* هي بكتيريا لاهوائية تستطيع النمو على المواد النباتية الغنية بالسليلوز والمواد الكاربوهيدراتية الاخرى , اظهرت النتائج خلال الفحص المجهري للمزرعه السائله بعد عملية التصبيغ وجود سلاسل طويله من البكتريا *Clostridium phytofermntou* في عدد من العينات وخلاياها تبدو على شكل عصيات مستقيمه والسبورات تبدو طرفية الموقع وهذه النتيجه تتطابق مع (11) .اظهرت النتائج ان البكتريا *Eschrichia coli* كانت نسبتها 40% من مجموع 75 مستعمرة , , وبينت النتائج الخاصه بالدراسه الحالية ان البكتريا *Eschrichia coli* لها القدره العالية على النمو على وسط السليلوزي PE شبه الصلب وانتاج انزيم السليليز هذه النتيجه تتطابق مع (13) الذي ذكر ان البكتريا *E.coli* هي بكتيريا لاهوائية اختيارية تستطيع النمو تحت ظروف التخمرمستخدمة السليلوز كمصدر للطاقه , مخمره للاكتوز وغير مكونه للسبورات , وبينت النتائج ان البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت نسبتها 53% من مجموع 75 مستعمره , تكون سالبه لصبغة كرام والسبورات واختبار احمر المثيل والنشأ والاندول وموجبه لانتاج صبغة البايوسين والاوكسيديز والكتاليز والجيلاتين والحركه وهذه النتيجه تتطابق مع (14) الذي ذكر ان البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تكون سالبه لصبغة كرام , موجبة للاوكسيديز والكتاليز واللاييز غير مخمره للاكتوز غير مكونه للسبورات لكن تستطيع النمو تحت الظروف اللاهوائية بتوفر النترات كمستقبل نهائي للا لكترونات .

تقدير فعالية البكتريا

1 - انتاج انزيم السليليز

تم في هذه الدراسة استخدام ثلاث انواع من البكتريا *Eschrichia coli, Clostridium phytofermentous , Pseudomonas aeruginosa)* لغرض مقارنة فعاليتها في انتاج انزيم السليليز , على اعتبار ان مادة التفاعل او المادة الاساس لجميعها هو السليلوز, اظهرت النتائج الدراسه ان فعالية انزيم السليليز المقدرة كامتصاصية تزداد كلما زاد تركيز المادة الاساس والوقت وتستمر حتى اليوم الثالث ,اي عندما يصل طور البكتيري مرحلة الاستقرار ثم تبدأ بالانخفاض اذ كانت اعلى فعالية انزيمية لانزيم السليليز عند البكتريا *Clostridium phytofermentous* والتي سجلت هي2,52U/ mL في اليوم الثالث اما *Pseudomonas aeruginosa* فكانت الفعالية الانزيمية لها2.21 U /mL , *Eschrichia coli* 2.09 U/mL يدل هذا على ان العزلات تمتلك القدره على انتاج انزيم السليليز وبامكانها ان تحرر السكريات المختزله التي تتحول الى الايثانول والنواتج الاخرى بعملية التخمر Fermentation process (15) , كما وجدا ايضاً ان الفعالية الانزيمية لل *Clostridium cellobioparum* تساوي 3.17U / ml وللل *Pseudomonase aeruginosa* تساوي 3.16U /ml . اما (16) وجدو ان الفعالية الانزيمية الامثل هي 2,56U/mL بينما (2) لاحظ ان الفعالية الانزيمية تساوي 2,54 U/mL للبكتيريا *Clostridium phytofermntous* . كذلك بينت النتائج ان الفعالية الانزيمية الامثل عند1 غم كانت باستخدام السليلوز كمادة اساس وبوزن 1 غم / لتر 2,52U /mL وهذا يتفق مع (17) الذين وجدو ان الفعالية الامثل لانزيم السليليز تكون عند التركيز1g هي 2.58U /ML , تتفق نتائج الدراسه الحالية مع (18) الذين وجدو ان فعالية انزيم السليليز تعتمد على طبيعة وتركيز المصدر السليلوزي المستعمل حيث كانت اعلى فعالية للانزيم في الاوساط الزرعية المستخدم فيها مسحوق السليلوز النقي و ان الزياده في مقدار السكريات المختزله Reducing Sugar تتناسب مع زيادة السليلوز في وسط الزرعي, ويعزى انخفاض الفعالية الانزيمية بعد اليوم الثالث الى عدة اسباب منها وصول مرحلة النمو الى الطور النهائي Death phase اونفاذ المادة الغذائية اوتراكم النواتج الايضية المتكونه مع استمرار نمو البكتريا التي تؤثر سلباً على عملية الانتاج (19).

الفعالية الانزيمية للبكتريا تحت الدراسة مع تراكيز المادة الاساس(السليلوز)

البكتريا	تركيز مادة الاساس	الامتصاصية
Clostridum phytofermntous	**0.1غم**	**0.99**
	0.4غم	**1.90**
	1غم	**2.52**
Eschrichia coli	**0.1غم**	**0.52**
	0.4غم	**1.45**
	1غم	**2.09**
Pseudomonas aeruginosa	**0.1غم**	**0.78**
	0.4غم	**1.84**
	1غم	**2.21**

2 - انتاج الكحول الاثيلي

اضهرت نتائج الدراسة الحالية ان العزلات الثلاث

Clostridum phytofermntous Pseudomonas aeruginosa ,Eschrichia.coli تمتلك القدره العالية على تحطيم مسحوق السليلوز وتخمير السكريات وتحويلها الى الايثانول اثناء نموها على الوسط المغذي PE شبه الصلب وحضنها على درجة حراره 37م ولمدة 1-3 ايام ,كما لوحظ ان البكتريا *Eschrichia.coli* انتجت اعلى تركيز للكحول الذي بلغ 8.28 غرام /لتر ويعزى ذلك ان البكتريا *Eschrichia.coli* هي من البكتريا المعوية enteric bacteria والتي تستطيع النمو على مدى واسع من السكريات تتضمن السكريات الاتية

(hexose, pentose, cellobiose,cellotriose) وهذه الميزه او الخاصية تجعلها مهمه في تخمير السليلوز وانتاج الكحول وكذلك لامتلاكها جين pet operon الذي يكون مسؤول على انتاج الايثانول من نواتج التخمر(20).تعتبر *Eschrichia coli* القوه المحركه للتقنية الحيوية Biotechnology نتيجة استخدامها في التجارب الصناعية وذلك لامتلاكها التركيب الجيني المتكامل وقدرتها على تحمل الظروف البيئية المختلفه(21) . وهذه النتائج تتفق مع كثير من الباحثين (13,22,23) .اما بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* , , انتجت الكحول بتركيز بلغ 7.86غم/لتر وتستطيع النمو على السليلوز وتخمير السكريات الناتجه وتحويلها الى الايثانول اي بامكانها التكيف مع البيئه التي تحتوي على مصادر كاربوهيدراتية مختلفه وافراز الانزيمات الخاصه بالتحطيم وخاصة انزيم السليليز هذه النتيجه تتفق مع (14) الذي ذكر ان البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تستطيع النمو تحت الظروف اللاهوائية وتخمير المواد الكاربوهيدراتية المختلفه وتتكيف بسرعه للظروف المتغيرة . تتطابق النتيجه مع (7) الذين ذكرو ان البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* اكدت انتباه الباحثين في السنوات الاخيره بما يخص التحول البايلوجي او الحيوي للمواد السليلوزية اللكنينية Lignocellulose materials الى مصادر الطاقه المتجددة مثل انتاج الايثانول الذي يكون انتاجه الحيوي مرتبطآ بانزيم السليليز Cellulase enzyme. اما بكتيريا *Clostridum phytofermntous* انتجت الكحول الاثيلي بتركيز 6.62 غم /لتر, هذا يدل على ان تلك البكتريا لها القدره على النمو على المواد السليلوزية (الورق) وتخمير السكريات وتحويلها الى الايثانول , هذه النتيجة تتطابق مع (11) الذي وجد ان البكتريا *Clostridum phytofermntous* تمتلك القدره العالية على تحطيم المواد النباتية السليلوزية المختلفه (السليلوز ,الفركتوز , الكالكتوز , المانوز , البكتين , الكلوكوز , ,الارابينوز) منتجة الايثانول والاسيتيت وغاز ثنائي اوكسيد الكاربون والهيدروجين كنواتج رئيسية اما النواتج الثانوية فتشمل format وLactat , ان قدرة البكتريا *Clostridium phytofermntous* العالية على تحطيم المواد السليلوزية وتخمير السكريات الناتجه منها يعود الى امتلاك تلك البكتريا على انظمة نقل خاصه للطاقه اغلبها مصمم لنقل الكابوهيدرات الى داخل الخلية (24). ان جميع النتائج الدراسه الحالية تتفق مع (25) الذي ذكر ان البكتريا المحلله للسليلوز بامكانها تحطيم المواد الكاربوهيدراتية المختلفه وتخمير تلك السكريات الناتجه وتحويلها الى نواتج عديده مثل (الايثانول وCO2)

اي انها تحفز عملية Saccharification and Fermentation في آن واحد .

تراكيز الايثانول المختلفه للبلانك والعزلات تحت الدراسة

التسلسل	العينه	حجم الثايوسلفات النازل اللازم للتعادل	تركيز الكحول g/l
1	Blank (1)	0.35	0.002
2	Blank (2)	0.35	0.002
3	Blank (3)	0.34	0.002
4	*Clostridium phytofermntous*	5.20	6.62
5	*Pseudomonas aeruginosa*	6.05	7.86
6	*E.coli*	6.10	8.28

المصادر

1. **Raghavulu**,S.V.;Sarma,P.N.and Mohan,S.V.(2010).comparative bioelectrochemical analysis of psedomonse aerogenosa and Escherichia coli with anaerobic consortia as anodic biocatalyst for biofuel cell application.J. Appl. Microbio.110:666-674.
2. **Percy**,B.(2007). The performance of Clostridium phytofermentans for bio fuels production from lignocellulosic biomass.. Enviro. Appl.Scie. .Managment.1-114.
3. غانم ,ردينة ; ابوغرة , محمود ومحمد فواز العظمة.(2011).استخدام انواع بكتيريه منتخبة لانتاج طاقة الكتلة الحيوية من مخلفات الزراعة والصناعات الغذائية . قسم وقاية النبات -كلية الزراعة -جامعة دمشق.
4. ***Demirbas**, M.F.(2009).Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. Appl. Energy;86: 151-161.*
5. ***Balat**,M.;Balat,H.and OZ,C. (2008). Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science 34 :551–573.*
6. ***Cowan**,S.andSteel.(2004).Manual for identification of medical bacteria 3rdEdition.Combridge University press.Combridge-London*
7. ***Bakar**,M.K.;Adewale,I.O.;Ajayi,A.and Shonukan,O.O.(2005).Purification and characterization of cellulose from wild typeand tow improved mutants of pseudomonas fluorescens*
8. **Miller**, G.L.(1972**).**Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Biotech. Bioeng. Symp.* 5: 193-219
9. **Archer** ,M.;Devos,B.J.and Visser ,M.S.(2007).The prepration, asseyand certification of aqueous ethanol refrence solution s.Accr. Qual Assure.12:188-193.
10. **Andrews**, B.S.A. and Nagendra, K. A.V.D.(2011). Titrimetric Determination of Ascorbic Acid and Isonicotinic Acid Hydrazide in Pharmaceutical Formulations with Dichromate as Oxidant. RJPBCS.P 937-946.
11. **Warnick**,T.A.; Methe,B.A. and Leschine,S.B.(2002). *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *Int. J. Systematic. Evolution. M*icrobiol. 52, 1155–1160
12. **Leschine**, S. (2007) Testimony Before the Select Committee on Energy Independence and Global Warming. Hearing on *The Gas is Greener: The Futur. Biofuel.* October 24.
13. **Mahon**, C.R., Lehman, D.C.and Manuselis, G. (2007). *Textbook of Diagnostic .3rd Ed.*, St. Louis: Saunder. 215-216.
14. **Bevec**, D. (2010). Use Of Band 3 Protein And/Or Melanocyte-Stimulating Hormone Release-Inhibiting Factor As A Therapeutic Agent In The Treatment Of *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. Free.Patentsonline.com.824-829.
15. **Otajevwo**,F.D.and Aluyi,H.S.A.(2011). Cultural condition necessary for optimal cellulose yield by cellulolytic bacterial organisms as they relat to residual sugars released in broth medium .Modren. Appl. Scienc.Vol5,No3.141-151.
16. **Gupta,**P; Samant,K. and Sahu,A **.(**2012).Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential **.**Inter. J. Micro . P:5 .
17. **Sethi**,S;Datta, A;Gupta,B.L and Gupta,S.(2013). Optimization of cellulose production from bacteria isolated from soil "ISRN. Biotech. 1-7.
18. **Vance**,I;Topham,C.M;Blayden,S.L.andTampion,J.(1980).Extracellular cellulose production by sporocytophaga myxococcoid NCIB8 639.J.Gen.Microbial.117:235-241.
19. **Lazazzera**,B.A.(2000).Quorum sensing and starvation signals for entry into the stationary phase .Current. Opinion. Microbio.3:177-182.

20. **Kumar**,S. M; Chandra,S. M; Sumanth, A; Vishnupriya, B; Reddy,R and Choi, Y. L. (2009) .Cellulolytic enzymes from submerged fermentation of different substrates by newly isolated Bacillus Spp. FME.," J. Korean.Society. Appl. Biol. Chemi, vol. 52, p. 17– 21
21. **Ingram**,L.O;Aldrich,H.C;Borges,C.C;Saleh,A;Underwood,S.A;Yomano,L.P.and Zhou,S.(1999).Enteric Bacterial catalysts for fuel ethanol production. Biotech.Prog.Vol.15,No5.855-866.
22. **Ryu**,S.(2010).Production of bioethanol and biobutanol using genetically engineered Eschrechia coli .Texas. Tech. Univer.1-153.

23. ***Beristain**,G.H;Utrilla,J;Charez,G.H;Bolivar,F;Gosset,Gand Martinaz,A.(2008).Specific ethanol production rat in ethanologenic Eschrichia coli strain ko11 is limited by pyruvat. decarboxylase.JMMB.15:55-64.*
24. **Siezen**, R. J. and Wilson, G. (2008). microbial genomes with biotechnological relevance. *Microbial. Biotech*, 1(3):202-207.
25. **Kumar**,V.S .and Karan,P.G.(2005).Bioethanol production from cellulosic substrates :Engineered bacteria and process integration challenges.J. Scien. Indust. Research.Vol.64,p.845-853