

استعمال اللقاح البادئ ST1 - *Gluconobacter* مع الفطر *Aspergillus niger* لإنتاج

حامض الاوكزاليك من عصير مخلفات التمور

عمر محمد حسن العجيلي* ، ادهام علي عبد العسافي** و حمدي عبد الجليل الحديثي*

* كلية العلوم / جامعة الانبار

** كلية الزراعة / جامعة الانبار

الخلاصة

أجري هذا البحث لإنتاج حامض الاوكزاليك من عصير مخلفات التمور باستعمال تقنية الدوارق المهزوزة وبوساطة عزلات محلية بكتيرية وفطرية ، إذ تضمن هذا البحث عزل الأحياء المجهرية المنتجة للأحماض من مصادر بيئية مختلفة في مدينة الرمادي شملت التربة ، مياه المجاري، الألبان ، والهواء ، واختيار العزلة الأكفأ في إنتاج حامض الاوكزاليك ، واستعمال العزلة *Gluconobacter spp.* المتحصل عليها من عصير مخلفات التمور لقاحاً بادئاً مع العزلة *Aspergillus niger* لزيادة الإنتاج .

حُصل على 32 عزلة منتجة للأحماض ، تباينت في كفاءتها لإنتاج الأحماض ، وقد اختيرت العزلات التي تجاوز قطر منطقة الحامض لها 15 ملليمتر على وسط الاختبار والبالغة 22 عزلة ، نجحت 9 عزلات منها في إنتاج حامض الاوكزاليك من وسط عصير التمر (الديس) ، وتفوقت من بينها العزلة *A. niger* بأعلى إنتاج من الحامض بلغ 2.10 غم \ لتر وبفارق معنوي عن باقي العزلات، بينما أعطى عصير مخلفات التمور - المستعمل مصدراً كربونياً - إنتاجية عالية من حامض الاوكزاليك بلغت 15.35 غم \ لتر .

أظهرت عزلة ST1 العائدة للجنس *Gluconobacter* قدرتها على زيادة إنتاج الحامض معنوياً عند استعمالها لقاحاً بادئاً، إذ أعطت إنتاجاً من الحامض بلغ 15.74 غم \ لتر مقارنة بالسيطرة التي بلغ الإنتاج فيها 7.98 غم \ لتر .

Use of Initial Inoculum of *Gluconobacter* - ST1 with *Aspergillus niger* to Produce Oxalic Acid from Date Mail Syrup

A. M. H. Al-Ageli* , A. A. A. Al-Assaffii** and H. A. Al-Hadith*

* Colege of Science Al-Anbar Unv.

** Colege of Agriculture Al-Anbar Unv.

Abstract

This research has been carried out to produce Oxalic acid from Date Mail Syrup by shaken flask technique using local bacterial and fungal isolate. It was included isolation of acid-producing microorganisms from different environmental sources in Ramadi including soil, sewage, diary products and air. Among these isolates, the best one has been chosen to produce Oxalic acid. The isolate of *Gluconobacter* - ST1, which has been isolated from from Date was used with *Aspergillus niger* as Initial Inoculum to increase the acid produced.

Thirty-two acid producing isolates has been obtained with variable ability to produce acids. Twenty-two isolates has been chosen as they produced an acid zone on test medium that exceeded 15 mm diameter. Nine of them succeeded in producing for Oxalic acid from Date juice. The highest productivity was achieved by *A. niger* with significant differences with other isolates.

Date Mail Syrup ,when used as carbon source give a high productivity of oxalic acid which was 15.35 g / l .

The isolate of ST1 , which has been proved to belong to the Genus *Gluconobacter*. Showed an ability to increase acid production when using it as initial inoculum. It achieved 15.74 g / l of oxalic acid comparing with the control 7.98 g / l .

المقدمة

استعملت الأنظمة الحيوية ومنها الأنظمة الميكروبية لإنتاج العديد من المواد ذات الاستعمالات المختلفة ، وذلك لقدرة هذه الأنظمة على القيام بمجموعة كبيرة من التفاعلات الكيموحيوية ، وتعد تنمية الكائنات المجهرية على المواد الأولية رخيصة الثمن خطوة هامة باتجاه الاستفادة من تلك المصادر في إنتاج مركبات ذات قيمة اقتصادية، ولتزايد الطلب على المنتجات الحيوية كونها الأكثر أماناً صار توفير هذه المنتجات أمراً ضرورياً مع إن العديد من المواد ومنها حامض الاوكزاليك ما زال إنتاجها مقتصرراً على الطرق الكيماوية (1) .

تشكل الفطريات أهم الأنظمة الميكروبية التي تنتج حامض الاوكزاليك بكميات مرتفعة ، إن تراكم كميات كبيرة من الاوكزالات بواسطة الفطريات الناقصة خصوصاً الأجناس *Aspergillus* ، *Mucor* ، *Penicillium* جعل بالإمكان استعمالها في التخمرات الصناعية لإنتاج حامض الاوكزاليك (2) .

من جانب آخر كان للبكتريا دور في إنتاج حامض الاوكزاليك ، إذ استعمل Hamel et.al (3) بكتريا *Pseudomonas fluorescens* المتحملة للألمنيوم في إنتاج حامض الاوكزاليك ، يمكن استعمال بكتريا *Bacillus licheniformis* المتحملة للمعادن بشكل ناجح في إنتاج حامض الاوكزاليك (4) .

استعملت أوساط غذائية مختلفة في إنتاج حامض الاوكزاليك ، باختلاف وتوافر المصادر وكلفتها ، بالإضافة إلى نوع وطبيعة العزلة المستعملة ، فقد استعمل شرش الحليب لإنتاج حامض الاوكزاليك بواسطة العفن *A. niger* وباستخدام تقنية الدوارق المهزوزة ومخمر مختبري سعة 25 لترأ، فوجد أن أعلى إنتاجية للحامض بلغت 41.4 غم لكل لتر من الشرش عند الرقم الهيدروجيني 6 وفي حرارة 30 م° وسرعة رج قدرها 400 دورة \ دقيقة (5) . فيما أجريت مقارنة بين أوساط مختلفة تضمنت وسط السكروز ، المولاس ، كوالح الذرة ومخلفات مصانع الجعة لإنتاج حامض الاوكزاليك ، ووجد أن وسط السكروز هو الأفضل في إنتاج الحامض (6) . ولم يكن مولاس القصب ملائماً لإنتاج حامض الاوكزاليك (1) . بينما إضافة الخلوات إلى أوساط الفطر *A. niger* قد أعطت كفاءة إنتاج عالية من حامض الاوكزاليك بلغت 97% على أساس الخلوات المستهلكة (7) .

تعد التمور ومخلفات مصانعها من المصادر الأولية الرخيصة والمتوفرة في العراق والتي ما تزال رغم بعض الدراسات بعيدة عن الاستغلال الصناعي ، لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى إنتاج حامض الاوكزاليك وذلك من خلال استعمال عصير التمر أو مخلفاته واستعمال اللقاح البادئ لغرض تحول كمية من المصدر الكربوني إلى خلوات لزيادة إنتاج

حامض الاوكزاليك بالإضافة إلى الحصول على عزلات محلية ذات كفاءة عالية في إنتاج الحامض .

طرائق العمل

حصل على عزلة *A. niger* المنتجة لحامض الاوكزاليك من عملية العزل و الغريلة التي أفرزت 32 عزلة منتجة للأحماض عزلت من 45 عينة جمعت من مناطق مختلفة في مدينة الرمادي توزعت بين 20 عينة تربة و 10 عينات مياه مجاري و 9 عينات مخلفات الاجبان (الشرش) لمعمل ألبان الطائف الأهلي و 6 عينات من الهواء في أجواء مختبرات كلية العلوم ، وذلك بتلقيح وسط الجلوكوز البيتون الصلب بطريقة صبّ الأطباق ، والحضن بدرجة حرارة 28 م لمدة 48 ساعة، ودل نمو المستعمرات المكونة لهالة صفراء على الخلفية الزرقاء للطبق على إنتاج الحامض (8) . واعتمد قطر الهالة المتكونة وكفاءة العزلات في إنتاج حامض الاوكزاليك من عصير التمر بعملية التخمر في انتخاب عزلة *A. niger* ، التي شخّصت اعتماداً على المفاتيح التصنيفية الواردة في (9) .

فيما حصل على عزلة *Gluconobacter spp.* التي استعملت لقاحاً بادئاً في إنتاج الحامض مع *A. niger* من مخلفات معامل الدبس وذلك من خلال عزل الأحياء المجهرية النامية في عصير المخلفات على وسط الاكار المغذي ، وأجريت الغريلة من خلال انتخاب العزلة التي أدى استعمالها مع *A.niger* إلى زيادة إنتاج الحامض. وشخّصت عزلة *Gluconobacter spp.* المستعملة لقاحاً بادئاً لزيادة الإنتاج اعتماداً على (10) .

حضّر عصير مخلفات التمور وذلك بنقع مخلفات التمور بالماء المقطر لمدة 24 ساعة بعدها عصر النقيع وأعيد ترشيحه لحين الحصول على محلول رائق ، والموضحة مواصفاته في جدول (1) .

جدول (1) بعض مكونات وسط عصير مخلفات التمور المستعمل في الدراسة

المكونات	عصير التمر	عصير مخلفات التمور
السكر %	66.66	2.75
النيتروجين PPM	840.00	73.00
الفسفور PPM	720.00	60.00
الرقم الهيدروجيني	4.50	5.70

ولدراسة إمكانية استعمال مخلفات التمور في إنتاج حامض الاوكزاليك، حضرت أوساط من عصير التمر (الدبس) وعصير مخلفات التمور بتركيز سكر 20 غم ، نترات الأمونيوم 0.5غم وفوسفات الصوديوم 2.5 غم لكل لتر من الوسط ، وزعت الأوساط في دوارق سعة 250 سم³ وبمقدار 50 سم³ لكل دوارق ، عَقمت الدوارق وضبط الرقم الهيدروجيني على 6.0 ، ثم لَقحت بحوالي 5 × 10⁶ سبور 1 سم³ ، وحضنت بدرجة حرارة 30 م وسرعة رج 450 دورة 1 دقيقة وبعد مدة حضن 48 ساعة ، أجريت التحاليل ثم سُجّلت النتائج (11) .

فيما تمت دراسة دور العزلات المتحصل عليها من مخلفات التمور في زيادة إنتاج الحامض وذلك بتحضير أوساط من عصيرالتمر ومخلفات التمور بتركيز سكر 20 غم 1 لتر ، ووزعت في دوارق وعَقمت، ثم قسّمت إلى ثلاث مجاميع عدت إحدى المجموعات معاملة سيطرة ، إذ لَقحت بالعزلة *A. niger* فقط ، فيما لَقحت باقي الدوارق بحوالي 2 × 10⁵ خلية 1 سم³ من العزلتين ST1 و ST2 المتحصل عليهما من مخلفات التمور وحضنت بدرجة حرارة 28 م ، وبعد مدة حضن 48 ساعة سحبت الدوارق، وأضيف لها 0.5 غم نترات الأمونيوم و 2.5 غم فوسفات الصوديوم وعَقمت ثم ضبط

الرقم الهيدروجيني على 6.0 ، ثم لَقَّحت بحوالي 5×10^6 سبور 1 سم^3 من لقاح العزلة *A. niger* ، وحضنت بدرجة حرارة 30 م وسرعة رج 450 دورة دقيقة وبعد مدة حضن 48 ساعة ، أُجريت التحاليل ثم سُجِّلت النتائج (11) .

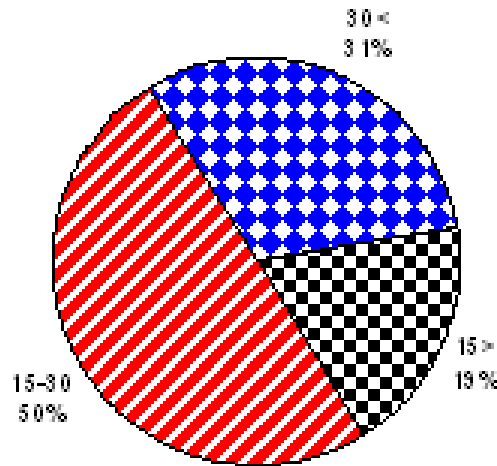
التحاليل الكيميائية والقياسات

- *- قُدِّرَت السكريات الكلية أو المتبقية بإتباع طريقة الفينول وحامض الكبريتيك (12) .
 - *- قُدِّرَ حامض الاوكزاليك المنتج حسب ما ورد في (13) .
 - *- تم تعيين الوزن الجاف للكتلة الحية للفطر كما ورد في (14) .
 - *- قدر النتروجين الكلي بإتباع طريقة كلدال الواردة في (15) .
 - *- قدر الفسفور الكلي بإتباع طريقة حامض الاسكوريك الواردة في (16) .
 - *- حُسِبَت كفاءات التحويل والاستهلاك والنمو لكل لتر من الوسط وفق المعادلات الآتية :
- كفاءة النمو = (وزن الكتلة الحيوية الجافة ا وزن السكر الكلي) $\times 100$
- كفاءة الاستهلاك للمصدر الكربوني = (وزن السكر المستهلك ا وزن السكر الكلي) $\times 100$
- كفاءة التحويل إلى الحامض = (كمية الحامض المنتجة ا وزن السكر الكلي) $\times 100$
- *- استعمل التصميم العشوائي الكامل CRD وأُجريت التحاليل الإحصائية بالاعتماد على (17) .

النتائج والمناقشة

اختيار العزلات المنتجة للأحماض

بلغ عدد العزلات المنتجة للأحماض 32 عزلة تباينت في قابليتها الإنتاجية، إذ تراوح قطر منطقة الحامض ما بين 9 و 45 ملم ، ولوحظ أن 31% من العزلات تنتج الأحماض بكفاءة واطنة وبقطر اقل من 15 ملم ، بينما كانت 50% من العزلات تنتج الأحماض بكفاءة متوسطة، إذ تراوح قطر المنطقة لها من 15-30 ملم، في حين بلغت نسبة العزلات الكفوءة 19% ، إذ بلغ قطر المنطقة 30 مليمتراً فأكثر، وحققت عزلة *A. niger* قطر بلغ 45 ملم شكل(1) .



شكل (1) توزيع العزلات حسب كفاءتها في إنتاج الأحماض

انتخاب أكفا عزلة منتجة لحمض الاوكزاليك بعملية التخمر

يظهر من الجدول (2) أن 9 عزلات أنتجت حامض الاوكزاليك بكميات متفاوتة ، تراوحت بين 0.29 إلى 2.10غم / لتر ، وتميزت عزلة *A. niger* بأعلى إنتاجية معنوية بلغت 2.10غم / لتر ، فيما فشلت 13 عزلة في إنتاج الحامض ، ويلاحظ أن العزلات الخمس ذات الإنتاجية العالية كانت تعود إلى فئة العزلات المنتجة للأحماض بكفاءة عالية (قطر الهالة أكثر من 30 ملم) ، ويعزى هذا الاختلاف في إنتاج حامض الاوكزاليك من قبل العزلات المختلفة إلى الاختلاف في خصائصها الفسلجية وفعاليتها الايضية (7) .

تأثير عصير مخلفات التمور في إنتاج الحامض

استعمل عصير مخلفات التمور مصدراً كربونياً لإنتاج الحامض بوساطة عزلة *A. niger* ، إذ أعطى إنتاجية عالية من حامض الاوكزاليك، بلغت 15.35غم / لتر وكفاءة تحويل 76.75 % ، اقترن مع استهلاك مصدر الكربون بكفاءة 100% ، فيما بلغت كفاءة نمو الكتلة الجافة 14.65% ، وان 8.60% من المصدر الكربوني تحول إلى غاز ثاني أكسيد الكربون ومنتجات ايضية أخرى ، فيما أعطى عصير التمر (الدبس) كمية اقل من حامض الاوكزاليك ، بلغت 7.82 غم / لتر وكفاءة تحويل 39.10% .

جدول (2) إنتاج حامض الاوكزاليك بوساطة العزلات المنتخبة المنماة على عصير التمر

رمز العزلة	pH النهائي	الاوكرالات غم / لتر	كفاءة التحويل %	رمز العزلة	pH النهائي	الاوكرالات غم / لتر	كفاءة التحويل %
SA1	3.62	0.00	0.00	SS14	3.00	0.36	1.80
SA2	3.13	0.00	0.00	SS15	2.48	1.73	8.65
SA3	2.34	2.10	10.50	SW1	3.15	0.29	1.45
SS1	2.85	0.42	2.10	SW2	3.60	0.00	0.00
SS2	3.40	0.00	0.00	SW4	2.98	0.00	0.00
SS3	2.59	1.58	7.90	SW5	2.67	1.48	7.40
SS6	3.32	0.00	0.00	SW6	3.43	0.00	0.00
SS9	2.96	0.00	0.00	SY1	3.09	0.00	0.00
SS11	2.61	0.55	2.75	SY4	2.86	0.00	0.00
SS12	2.87	0.00	0.00	SY5	2.54	0.00	0.00
SS13	2.53	1.62	8.10	SY6	3.21	0.00	0.00

LSD $P_{\leq 0.05}$ Oxalic acid = 0.27, pH = .46

مواصفات عزلة *Gluconobacter* spp.

وجد إنها عصيات متطاولة سالبة لملون غرام، تبدو مستعمراتها النامية على الوسط المغذي الصلب مستديرة الشكل، ذات حافات لمساء ، مرتفعة وذات لون ابيض إلى رمادي ، هوائية إجبارية، غير متحركة ، مذيبة للهلام ، سالبة للاوكسيديز ، تنتج الحامض من الجلوكوز ، وتنمو في الرقم الهيدروجيني 4.5 لتؤكسد الايثانول إلى حامض الخليك، كما أنها لا تستهلك الخلات واللبنات . ومن أهم أنواعها *Gluconobacter oxydans* وهي ذات أهمية اقتصادية في إنتاج حامض الخليك (10) .

دور اللقاح البادئ في إنتاج الحامض

تبين النتائج الموضحة في الجدول (3) أن للعزلة ST1 تأثيراً كبيراً على زيادة إنتاج حامض الاوكزاليك ، وفارق معنوي عن العزلة ST2 ومعاملة السيطرة ، إذ تسببت العزلة ST1 في زيادة إنتاجية حامض الاوكزاليك من وسطي عصير التمر وعصير مخلفات التمور وكفاءة تحويل 77.25 % و 78.70 % على التوالي ، فيما لم تظهر العزلة ST2 تأثيراً معنوياً عن معاملة السيطرة في إنتاج حامض الاوكزاليك ، كما كان للعزلتين تأثيراً واضحاً في المؤشرات المزرعية الأخرى ، إذ أدت العزلتان إلى زيادة معنوية للرقم الهيدروجيني للمزرعة عن معاملة السيطرة ، بلغت أعلى زيادة لها عند استعمال العزلة ST1 ، إذ وصل الرقم الهيدروجيني إلى 3.42 ، فيما تسببت العزلتان في انخفاض معنوي في الكتلة الحيوية الجافة ، أن تأثير العزلة ST1 يعزى إلى إنتاجها للأحماض العضوية ، ومنها حامض الخليك الذي يتأكسد بصورة مباشرة من قبل عزلة الفطر *A. niger* إلى حامض الاوكزاليك ، وان التغيرات الحاصلة في مكونات الوسط بفعل العزلة ST1 تسبب في تثبيط إنتاج الأحماض العضوية الأخرى ، أهمها حامض الستريك الذي ينتج سوية مع حامض الاوكزاليك .

إن هذه النتائج تؤكد ضرورة تهيئة الوسط باستعمال اللقاح البادئ من عزلة *Gluconobacter spp.* قبل استعماله في إنتاج الحامض بوساطة العزلة *A. niger* .

جدول (3) تأثير العزلتين ST1 و ST2 على إنتاج حامض الاوكزاليك

الوسط	المعاملة	pH النهائي	الكتلة الجافة غم / لتر	السكر المتبقي غم / لتر	الحامض المنتج غم / لتر	كفاءة التحويل %
عصير التمر	السيطرة	1.58	2.94	0.20	7.76	38.8
	ST1	3.35	2.70	0.00	15.45	77.25
	ST2	2.88	2.46	0.24	8.63	43.15
مخلفات التمور	السيطرة	1.65	3.06	0.59	7.98	39.90
	ST1	3.42	2.85	0.00	15.74	78.70
	ST2	2.57	2.63	0.38	7.69	38.45
للعزلات		0.87	0.19	0.06	2.48	LSD $P_{\leq 0.05}$

المصادر

- 1- Podgorski, W. and Lesniak, W. (2003). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*, Tatranske Matliare, Slovak republic (Abstract).
- 2- Sahin, N. (2004). Decomposition of oxalate by Microorganisms, 6th update, from site www.geocities.com (Internet).
- 3- Hamel, R.; Levasseur, R. and Appanna, V.D. (1999). Oxalic acid production and aluminum tolerance in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Inorganic Biochemistry, 76 (2): 99-104.

- 4- Clausen, C.A. (2000). CCA removal from treated wood using adual remediation process. *Wast Management and Research*, 18: 485-488.
- 5- Bohlmann, J.T.; Cameselle, C.; Nunez, M.J. and Lema, J.M. (1998). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: part II. Optimization of fermentation with milk whey as carbon source. *Bioprocess Engineering*, 19 (5): 337-342.
- 6- Mulligan, C.N. (2003). Bioremediation of metal contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*. 84: 45-60.
- 7- Foster, J.W. (1952) *Chemical activities of fungi*. 2nd Ed., Academic press inc., New York.
- 8- عبد الحافظ ، عبد الوهاب محمد ؛ محمد الصاوي محمد مبارك . (1989) . الكائنات الدقيقة عمليا (مترجم) . الطبعة الأولى ، الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة .
- 9- Ruper, K.B. and Fennel, D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. The Williams and Wilkins company, Baltimore, USA.
- 10- Holt, G.J.; Kreig, N.R.; Sneeth, P.H.A.; Staley, J.T. and williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of Determinative bacteriology*, 9th Ed., Williams and Wilkins, USA.
- 11- العجيلي ، عمر محمد حسن . (2005) . استعمال تقنية ميكروبية في إنتاج حامض الاوكزاليك من عصير التمر . رسالة ماجستير كلية العلوم . جامعة الانبار .
- 12- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Annual Biochem*. 28 (3): 350-356.
- 13- Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, E.J. and Crouch, S.R. (2000). *Analytical Chemistry*. 7th Ed. Saundress Collage publishing, Harcourt inc., USA, P 17 .
- 14- السامرائي ، سوسن مصطفى عبدالرحمن . (1995) . إنتاج حامض الستريك من النشا بوساطة الفطر *Aspergillus niger* . رسالة ماجستير كلية الزراعة . جامعة بغداد .
- 15- Sawhney, S.K. and Singh, R. (2000). *Introductory practical biochemistry*. Narosa publishing House, New Delhi, India, P 120 .
- 16- Murphy, J. and Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*, 27: 31-36.
- 17- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. 4th Ed., prentice Hall international, Inc., USA.