جامعة وادي النيل

كلية التربية

قسم علوم الأحياء والدراسات اليئية

بحث تكميلي لنيل درجة البكالريوس مرتبة الشرف

بعنوان:

إختيار البيئات الملائمة لعزل بكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة لإنزيم الكيتينيز

Selection of Suitable Media for Chitinolytic Actinomycetes Producers

إعداد الطلاب :

نمارق عد الرحمن إبراهيم أح / ٢٠١٢ / ١٠٢

نهي عادل مكي نافع أح / ٢٠١٣ / ٩٣

عفيف عربي بركة آدم أح / ٢٠١٣ / ٦٤

إشراف الدكتورة:

إلهام شريف داؤود

١٤٣٨هـ - ٢٠١٧م

بسم الله الرحمن الرحيم

الاستهلال

قال تعالى:

بسم الله الرحمن الرحيم

(لَهُ مَا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ وَمَا بَيْنَهُمَا وَمَا تَحْتَ

الثَّرَى (*))

صدق الله العظيم

سورة طه (6)

بسم الله الرحمن الرحيم

إهداء

إلى من أحب إلى نفسي (محمد صلى الله عليه وسلم)

إلى من أرضعتني الصبر وفطمتني بحب الخير وتعلمت في مدرستها أبجدية الوفاء

ومناهج التضحية

أمي الغالية

إلى أبي زاد الله في أيامه . . . كافح وجاهد حتى وفر لي كل ما أحببت

إلى نبراسي في الحياة

أبي العزيز

إلى من علموني كيف يجئ العلم دوماً في صدور العلماء إليهم جميعاً أهدي هذا

الجهد المتواضع إلى تلك الوجوه النيرة الذين كانوا أنواراً تضئ الطريق .

إلى رفقاء دربي أخواني وأخواتي

إلى من علموني حروفاً من ذهب وكلمات من درر عارات أسمى وأجلى عبارات في

العلم إلى من صاغوا لنا علمهم حرواً ومن فكرهم منارة تنير لنا سرة العمل والنجاح

أساتذتي الكرام

بسم الله الرحمن الرحيم

الشكر والعرفان

قال ﷺ " من لا يشكر الناس لا يشكر الله "

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خاتم الأنبياء سيدنا محمد الصادق الأمين

يسرني أن أتقدم بخالص الحمد والشكر لله سبحانه وتعالى ومن بعده الذين قضوا حوائجنا قضى الله حوائجهم في الدنيا والأخرة وهم كل من لهم حق علينا اساتذتي الأجلاء ووالدي الجليلان

لكم مني جزيل الشكر وعظيم التجلة

وأخص بالشكر والثناء الدكتور البروف

الهام شريف داؤود

التي زودتنا بالنصح والإرشاد والتوجيه في مراحل هذا البحث الشيء الذي ساعدني على تذليل الصعاب وجعله الله دوماً نوراً يهدي به ظلام العلم فله مني التقدير والإجلال.

كما نخص بالشكر الاستاذ / عماد أنور والأستاذة رفيدة

والشكر كل الشكر إلى جامعة وادي النيل كلية التربية وأخص الشكر قسم علوم الحياء والدراسات البيئية

فهرس الموضوعات

الترقيم	الموضوع	الصفحة
	الآية	i
	الإهداء	ii
	الشكر والعرفان	iii
	فهرس الموضوعات	iv
	فهرس الجداول	v
	فهرس الأشكال	vi
	ملخص البحث	vii
	الفصل الأول : المقدمة	
1.1	المقدمة	1
1.2	الهدف من الدراسة	3
	الفصل الثاني : الأبحاث السابقة Historical Reviews	
1.2	وصف عام	4
2.2	مصادر إنزيم الكيتينيز	5
3.2	زيادة انتاج إنزيم الكيتينيز	9
4.2	تطبيقات إنزيم الكيتينيز في المجالات المختلفة	10
	الفصل الثالث : المواد والطرائق Materials and Methods	
1.3	المواد	12
	الفصل الرابع : النتائج Results	
1.4	اختبار البيئات الملائمة لعزل بكتريا الاكتيوميستات المنتجة لإنزيم الكيتينيز	18
	الفصل الخامس : المناقشة Discussion	
1.5	المناقشة	27
2.5	الخلاصة	29
3.5	التوصيات	30
	المراجع	31

فهرس الجداول

الصفحة	الجدول
19	جدول (1) : مسح لبكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة للإنزيم الكيتينيز
20	جدول (2) : معامل نشاط إنزيم الكيتينيز بإستخدام طريقة الاطباق المصبوبة
22	جدول (3) : الصفات المورفولوجية المجهرية وصفات مزارع المستعمرات للمعزولات البكتيرية المنتجة لإنزيم الكيتينيز
25	جدول (4): الخصائص البيوكيميائية لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات

فهرس الأشكال

الصفحة	الجدول
21	لوحة (1) : معامل نشاط إنزيم الكيتينيز بتكوين الهاله الرائقة حول النمو البكتيري
24	لوحة (2) : شكل مستعمرة SUDA21 في بيئة آجار النشا والكازين المضاف اليها صبغة أحمر الكونغو.
25	لوحة (3): مستعمرات للمعزولة SUDA11

ملخص البحث

أجري مسح لإحدى وعشرون عينة من التربة جمعت من مواقع مختلفة بمحلية عطبرة وذلك لعزل معزولات من بكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة لإنزيم الكيتينيز.

تمّ المسح بعزل بكتيريا الاكتينوميسيتات في بيئة سابورد وبيئة آجار النشا والكازين الخاصة بعزل مستعمرات الاكتينوميسيتات، ثم نقيت المعزولات في بيئة جديدة لآجار النشا والكازين .

بعد ذلك أجريت تجربة لأختيار المعزولات البكتيرية المنتجة لإنزيم الكيتينيز وذلك بتنميتها في بيئة آجار الكازين المزود ب2 %كيتين وقدر معامل نشاط إنزيم الكيتينيز بقياس الهالة الرائقة التي تكونت حول المزرعة البكتيرية. عرفت المعزولات البكتيرية الإيجابية وذات الإنتاج المرتفع لإنزيم الكيتينيزعلى أساس الخصائص المورفولوجية باستخدام بيئة الآجار المغذي وبيئة SP1 كما اجريت بعض الإختبارات البيوكيميائية.

اثبتت النتائج الاتي :

- كل المعزولات تنتمي لبكتيريا الاكتينوميسيتات Actinomycetes .
- كل المعزولات أعطت نتائج إيجابية لإختبار إنتاج إنزيم الكيتينيز.
- صنفت المعزولات على أساس الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية فكانت كل العزلات المختاره مطابقه لجنس بكتيريا ستربتوميسس *Streptomyce* sp. .

اثبتت بيئة سابورد وبيئة النشا والكازين كفائتها العاية في عزل ونمو بكتيريا الاكتينوميسيتات وكذلك في قياس نشاط معامل إنزيم الكيتينيز. اما لتعريف العزلات مورفولوجيا اثبتت كل من البيئات SP1 وبيئة الآجار المغذي بالإضافة لبيئة آجار النشا والكازين كفائتها في وصف المستعمرات.

الفصل الأول

المقدمة

1.1 المقدمة Introduction

بعض الأحياء الدقيقة المجهرية لها القدرة على إنتاج مواد ذات أهمية حيوية تطبيقية مثل الأنزيمات والمضادات حيوية والأحماض العضوية وغيرها والتي مازالت تجذب اهتمام العديد من الباحثين لعزل واكتشاف سلالات من الأحياء المجهرية ذات الكفاءة العالية في الإنتاج والمستقرة وراثيا ، ويعد إنتاج أنزيمات الكيتينيز من الأحياء المجهرية ذات أهمية كبيرة نظرا لاستخدامها الواسع في مجالات الصناعات الغذائية والتخميرية والدوائية وفي صناعة الورق والتبغ وفي المكافحة الحيوية. وتعرف إنزيمات الكيتينيز Chitinases بالأنزيمات المحللة للكيتين الغروي التي تقوم بتحليل الأواصر الجلايكوسيدية في الكيتين إلى وحدات بنائها.

الكيتين عبارة عن كربوهيدرات عديد وحدة بنائه جلوكوز امين والتي ترتبط مع بعضها بالرابطة الجليكوسيديه B-1,4. يعتبر الكيتين من المصادر الكربوهيدراتيه المهمه والمتجدده من حيث الاستخدام ،حيث يحتل المركز الثاني بعد السيليلوز وهو واسع الإنتشار في الطبيعه كمركب تركيبي حيث يدخل في تركيب العديد من الكائنات مثل القشريات ، الحشرات، الحيوانات الأولية والفطريات.

يتراوح الإنتاج العالمي للكيتين بين 1-100 بليون طن متري وهو إنتاج مرتفع مما جعله يحتل المركز الثاني من بين المواد الكربوهيدراتية استخداما على الارض. لمركبات الكيتين والكيتوسان استخدامات عديدة واسعة المدى وله قيمة غذائية قيمه وتختلف هذه القيمة الغذائية باختلاف التركيب الكيميائي ، لذلك له استخدامات غذائية مختلفة فيعتبر مصدر للألياف، مكسب وماده حافظة للطعم، تصنيع اللاكتوز المحتمل الحموضة ، مادة مغذية ، عامل يساعد على تحسين القوام (Khor and (Lim;2003 . ايضا يستخدم مركب الكيتين في الحميات الغذائية والتي تساعد على فقدان الوزن وذلك لمقدرتها على إمتصاص الدهون من الغذاء وإيقاف ايضه. كذلك

يمتاز الكيتين بإستخدامه في المجال الطبي ويعتبر عامل طبي حيوي يفيد في خفض تركيز الكوليسترول السيئ ، كما يعتبر مضاد للقرحه ومضاد للحموضه ، وهو من المواد التي تساعد على التئام الجروح وكسور العظام . ايضا له استخدامات مفيده في مجال طب العيون والأسنان (Ohshima *et al.*, 1987). كما يستخدم في مجال التجميل فيدخل في إنتاج كريمات مرطبه للجلد وأخرى مفيده للشعر (Kumar, 2009). اما في مجال صحة البيئه والزراعة له أثر فعال في تنقية المياه ومعاملات البذور والأهم من ذلك يلعب دور فعال في المكافحة الحيوية للحشرات مثل البعوض وللفطريات التي تدمر المحاصيل الاقتصادية (Liu *et al.*, 2002) . في مجال الصناعة يدخل كمادة صاقله للورق والمنسوجات وكمادة ترويق للمشروبات في الصناعات الغذائيه (Khor and Lim, 2003) .

انزيمات الكيتينيز واسعة الإنتشار بين الكائنات المختلفة فتوجد في **الحيوانات** ،الحشرات ،النباتات ، الفطريات والبكتيريا . قسمت هذه الانزيمات على العائلة 18 و19 واعتمد في تقسيمها علي ترتيب الأحماض الامينية في السلسلة البروتينية لهذه الانزيماتً (Lucas *et al.*,2004) . وجود هذه الانزيمات في الكائنات المختلفة له دورفسيولوجي وبيئي مهم ففي الحيوانات تحلل الهيكل الخارجي لها جزئيا (Ruiz-Herrera, and Martinez-Espionza, 1999) وفي النباتات لها آلية دفاع ضد الفطريات المتطفلة التي تصيبها وتدمرها (Wang et al., 2009). توجد ثلاث أنواع منفصلة من إنزيمات الكيتينز وهي الكيتينيز الخارجي ، الكيتينيز الداخلي والكيتوبييز والتي في مجملها تسمى معقد الكيتينيز . انتجت هذه الانزيمات بواسطة العديد من العزلات البكتيرية وكل مصدر له استخدام خاص في المصادر التي ذكرت سابقا ففي بلغاريا عزل الباحثون Srividya etal(2013) بكتيريا *Streptomyces* sp. 9p المنتجة لانزيم الكيتينيز النشط والذى استخدم في المكافحة الحيوية ضد أربعة معزولات فطرية وهي

Collectotrichum gleosporioides OGC1 , Rhizoctonia solanii و *Phytophthora capsici* Alternaria brassiceae . وفي الهند عزل العديد من الباحثين عزلات من الاكتينوميسيتات المنتجة لانزيم الكيتينيز منهم الباحثون Suberamianam et.al. (2012) الذين قاموا بعزل هذه البكتيريا من قشور الجمبري والسرطانات والتي أظهرت نشاط عالي لإنزيم الكيتينيز.

1.2 الهدف من الدراسة:

تلعب إنزيمات الكيتينيز دور هام في حياة الإنسان في المجالات المختلفة مثل الصناعات الغذائية والدوائية والبيئية لذلك تهدف هذه الدراسة إلى الاتي:

1- عزل بكتيريا الاكتينوميسيات المنتجة لإنزيم الكيتينيز من التربة.

2- إختيار البيئات الملائمة لزيادة إنتاج إنزيم الكيتينيز.

3- إختيار المعزولات الأكثر إنتاجا لهذا الإنزيم وذلك بحساب معامل نشاط إنزيم الكيتينيز.

4- تعريف المعزولات المختارة بإستخدام الإختبارات الموروفولوجية والبيوكيميائية.

الفصل الثاني

الأبحاث السابقة

Historical Reviews

1.2. وصف عام : General Description

يعتبر الكيتين أحد المواد الكربوهيدراتية العديدة و الهامه واسعة الإنتشار في العالم وهى بوليمرات وحدة بنائها N-acetyl glucosamine والتي ترتبط مع بعضها برابطة جليكوسيدية $\beta-1,$ 4 وهي المكون الرئيسي للجدار الخلوي للفطريات وكذلك للهيكل الخارجي للحشرات وقشور القشريات . تستخدم نواتج تحلل الكيتين كمصدر للطاقة والكربون لإنتاج البروتين أحادي الخلية (Park *et al.*, 2000) . يوجد نوعان من انزيمات الكيتينيز والتي تحفز تحليل الكيتين داخليا وخارجيا. تبدأ إنزيمات الكيتينيز الداخلية (EC3.2.1.14) عملية التحليل بفصل سلسلة قصيرة من وحدات بناء مركب الكيتين وهى N-acetylglucose amine وهذه السلسلة القصيرة تتعرض للتحليل بواسطة نوعين من الانزيمات والتي تحللها للوحدات الاحادية من N-acetylglucoseamine . اما الانزيم الثاني فيعمل على قطع *N*-acetyl-β glucosaminidase من الاطراف وكذلك من السلسلة القصيرة للكيتين(Lucas *et al.*,2004).

تتبع انزيمات الكيتينيز للعائلة 18 و19 كما صنفها الباحثون (Lucas et.al..,2004) . تحتوي إنزيمات الكيتينيز التابعة للعائلة 18 والتي يدخل في تركيبها بروتينات حلزونية من نوع α عددها ثمانية بالإضافة إلى ثمانية خيوط من النوع β. إنزيمات هذه العائلة واسعة الإنتشار بين الكائنات فتوجد في الحيوانات، النباتات، الحشرات، الفطريات، الفيروسات والبكتريا.اما إنزيمات العائلة 19 تشبه الليسوزيم والكيتوسينيز ويسود في تركيبها الشكل الحلزوني للبروتين –α وتنتشر في النباتات وبعض سلالات بكتيرياالستربتوميسس (Sasaki et.al.2002) كذلك قسمت هذه الانزيمات إعتمادا على نظام التحليل الذي تتبعه فقسمت إلي الكيتينيز الداخلي (EC 3.2.1.1.4) والكيتينيز الخارجي (EC 3.2.1.1.4) وانزيم كيتوبييز (EC 3.2.1.30) وانزيم (βN-acetyl hexosaminidases EC3.2.1.52).

انزيمات الكيتينيز الداخلية تقص مركب الكيتين عشوائيا على طول السلسلة الداخلية منتجه سلسلة قصيره لها وزن جزيئي منخفض من N-acetyl glucosamine مثل مركبات كيتوتتروز وكيتوترايوز وبصورة رئيسية مركب كيتوبيوز ثنائي الاستيل، ومن جهة أخرى ينتج الكيتينيز الخارجي مركب كيتوبيوز ثنائي الاستيل فقط ، اما إنزيم hexosaminidases (EC 3.2.1.52) فيعمل على شق مركب كيتوبيوز ثنائي الاستيل وكذلك كيتوتتروز وكيتوترايوز إلى N-acetyl glucosamine ويسمى هذا الإنزيم يسمى ايضا كيتوبيوز (Sahai and Manocha, 1993).

2.2. مصادر إنزيم الكيتينيز: Sources of Chitinases

إنزيمات الكيتينيز واسعة الإنتشاربين الحشرات والنباتات والكائنات الدقيقة (Lucas *et al.*,2004).

1.2.2. انزيم الكيتينيز في الحشرات: Amylases in Insects

استخلص إنزيم الكيتينيز من بعض أجناس الحشرات مثل *Bombyx mori* و *Manduca sexta* . تلعب هذه الانزيمات دور مهم أثنا مرحلة إنسلاخ الحشرات إذ تقوم إنزيمات الكيتينيز الداخلية بتحليل طبقة الكيوتكل بطريقة عشوائية منتجه كيتواوليجات والتي يكمل تحليلها بالكيتينيز الخارجي إلى جلوكوزامين وهذا الجزئ يستخدم مرة أخرى في بناء طبقة كيوتكل جديدة . ايضا تلعب إنزيمات الكيتينيز في الحشرات دور دفاعي ضد الطفيليات التي تهاجمها . يتم إنتاج إنزيم الكيتينيز في الحشرات أثناء مرحلة تنظيم الهورمونات وهي مرحلة تحول الحشرات (Koga,1997).

ايضا تحتوي القشريات على إنزيمات الكيتينيز مثل الجمبري والقشريات الصغيرة والسرطانات والتي تلعب دور هام أثناء عملية طرح وتبديل القشور.

2.2.2. انزيم الكيتينيز في النباتات: Chitinases in Plants

إنزيمات الكيتينيز لها دور تركيبي في النباتات فتوجد في البذور ،السوق، الدرنات والزهور ولها دور خاص مثل الإختصاص النسيجي فضلا عن التنظيم التطوري للنبات . قدمت البيوتكنولوجيا الزراعية تقنيات حديثة وأنتجت نباتات عبر جينيه مقاومه للطفيليات النباتية وذلك بنقل الجين المسئول عن إنتاج انزيم الكيتينيز من فطر *Trichoderma* spp. إلى النباتات (. Carsolio et.al,1999)

عزلت هذه الانزيمات بتركيز مرتفع أثناء المرحلة الأولي من نمو النبات و أثناء مرحلة تطور النبات . الانزيمات الموجودة في النباتات هى من نوع الكيتينيز الداخلي والذي يتميز بوزن جزئ أقل من ذلك الموجود في الحشرات (Mayer et.al.,1996) . تمنع الكيتينيزات النباتيه نمو الفطريات المرضية بالتعاون مع إنزيمات أخرى مثل β-1,3-glucanases والتي عزلت من البطاطس ،الدخان، الحمضيات ،الفاصوليا ،الطماطم ونبات اليام(Mayer *et.al.*,1996)

3.2.2 انزيمات الكيتينيز في الكائنات الدقيقة : Microbial Chitinases

الميكروبات التي لها القدرة على تحليل الكيتين واسعة الإنتشار في الطبيعة Wang et al., .(2009)

يتميز الكيتين بخصائص عديدة مثل عدم القابلية للاذابة ،وكذلك الاختلاف في الحجم والتعقيد التركيبي للجزيئات الغير متجانسة والتي منعت تحليله داخل الخلية لذلك تفرز الميكروبات هذه الإنزيمات خارجيا وكل نوع منها مختص بتحليل الكيتين وتحويل نواتجه بصورة تختلف عن الآخر (Gkargkas,et.al.,2004) . تنتج الميكروبات كميات كبيرة من إنزيمات الكيتينيز الخارجية والداخلية إذا قورنت بالحيوانات والنباتات (.Anuradha and Revathi, 2013).

1.3.2.2 انزيم الكيتينيز في الفطريات : Chitinases in Fungi

تحتوي الفطريات على أنواع مختلفة من إنزيمات الكيتينيز مثل الكيتينيز الداخلي والذى عزل من *Trichoderma, Penicillium, Lecanicillium, Neurospora, Lycoperdon, Conidiobolus, Mucor, Beauveria, Aspergillus, Myrothecium, Metharhizium*.

تحتوي الفطريات الخيطية على أنواع مختلفة من إنزيمات الكيتينيز تتبع للعائلة GH 18 (Seidl,2008). لا تدخل الكيتينيزات الفطرية في تحليل الكيتين الخارجي فقط بل تدخل في تحليل كيتين الجدار الخلوي للفطريات وكذلك في إعادة ترتيبها مرة أخرى (Seidl,2008).

بالإضافة لهذه الانزيمات تحتوي الفطريات على إنزيمات أخرى تسمى إنزيمات غير كيتينية وظيفتها إزالة الجليكواسيل من البروتين ومن امثلتها إنزيم acetylglucosaminidases endo-β-*N*-. (Stals et al. 2010).

تحتوي الفطريات على إنزيمات تحلل مركب الكيتوسان تسمى كيتوسينيز (EC 3.2.1.132) الفطرية وتتبع للعائلة GH75 (Rodriguez-Martin et al. 2010) وكذلك إنزيم glucosaminidases (3.2.1.165) والتي تتبع للعائلة GH2 والتي عزلت من فطر *Trichoderma reesei*. يرجع الإختلاف في انواع الكيتينزز الفطري إلى نوع الكيتين ووضعه في الخليه وتركيزة فالفطريات الخيطية نسبة تركيز الكيتين فيها أعلى من الفطريات غير الخيطية .(Seidl 2008).

2.3.2.2 انزيم الكيتينز في البكتيريا: Chitinases in Bacteria

العديد من اجناس وانواع البكتيريا لها القدرة على إنتاج إنزيمات الكيتينيز مثل *Serratia, Chromobacterium, Klebsiella, Pseudomonas, Clostridium,* and *Streptomyces Vibrio, Arthrobacter, Beneckea, Aeromonas* .(Shanmugaiah et. al.,2008)

إنزيم الكيتينيز البكتيري واسع الإنتشار بين بكتيريا الاكتينوميستات تم عزل 17 معزولة من بكتيريا الاكتينوميستات والتي تتميز بقدرتها الهائله على إنتاج إنزيم . وفي تايلاند عزل الباحثين Balakrishnan etal.(2012). الكيتينيز بواسطة الباحثين مائة وثلاث معزولة من بكتيريا الاكتينوميسيتات Prrasomsri et al (2013) من عشر عينات من التربة خمس منها مخلوطة بروث الحيوانات والخمس الأخرى من الحقول ، وتوصلوا إلى أن 97 معزولة تنتمي لبكتيريا ستربتومبسس وباقي المعزولات تنتمي لجنس ميكريبسبورا ومعظمها كانت منتجة لإنزيم Streptomyces الكيتينيز بكميات متفاوتة. هنالك أجناس أخرى غير جنس من التربة Eman (2012) منتجة لانزيم الكيتينيز كما في مصر عزلت الباحثة بكتيريا باسيلس لاكينيفورميس وباسيلس ثريوجنسس والمنتجة لإنزيم الكيتينيز بكميات وفيرة عند درجة حرارة 30م° ودرجة تركيز ايون هيدروجين 7 .

1.2.3.2.2 بكتيريا الاكتينوميسيتات: Actinomycetes

بكتيريا خيطية موجبة لصبغة الجرام، هوائية وقد تكون خيوطها غير متفرعة أومتفرعة على شكل الحرف Y أو V وبعضها يكون كونيدات لاجنسية وتشبة الفطريات إلى درجة كبيرة من حيث الشكل الظاهري وتتميز بدورات حياتها المعقدة وتنتمي لشعبة الاكتينوباكتروالتي تمثل واحدة من أكبر المجموعات البكتيرية بين الثمانية عشر مجموعة وهي واسعة الإنتشار فتوجد في البيئات المائية وفي التربة.

تظهر الاكتينوميسيتات اشكال مورفولوجية عديدة فبعضها كروية دقيقة تنتمي للاكتينوبكتيريا وبعضها عصوية عديده التشكل والبعض الآخر معقد التركيب(Ventura et al. 2007)

2.2.3.2.2 بكتيريا الاستربتومييسس: Genus Streptomyces

يمثل جنس الاستريتوميسس أكثر أجناس الاكتينوميستات عدد إذ يحتوي على أكثر من 500 نوع والتي تختلف عن بعضها في الخصائص المورفولوجية *Streptomycetaceae,* والفسيولوجية البيوكيميائية. يتبع هذا الجنس للعائلة وتشمل عدة أجناس *Actinobacteria* والشعبة *Actinomycetales,* الرتبة مثل ، *S. achromogenes, S. ambofaciens, S. aureofaciens, S. avermitilis, S. clavuligerus, S. coelicolor, S. felleus, S. ferralitis, S. filamentosus, S. griseus , S. hygroscopicus, S. iysosuperficus, S. lividans, S. noursei, S. scabies, S. somaliensis, S. thermoviolaceus, S. toxytricini, S. tsukubaensis, S. venezuelae, S. violaceoruber* plus (Kampfer, 2006)

اما بالنسبة للخصائص المورفولوجية فتشمل صفات الهيفات القائمة والتي تظهر بلون رمادي أو أبيض، أحمر ، أصفر ،أخضر وأزرق (Locci, 1989) اما الهيفات المنبطحة فلونها بيج وبني، زيتوني ،برتقالي ،قرمزي وزهري. تحتوي على غدة الميلونيد. اما الجراثيم فتتخذ اشكال مختلفة قد تكون مستقيمة ،عصوية أو كروية وقد تنتظم في سلسلة أو قد تظهر في هيئة حلزونيات معقدة مفتوحة أو مدمجة كذلك تظهر المستعمرات مثل البودرة لها حواف منتظمة لونها أبيض أو كريمي وربما تظهر بلون أصفر ، برتقالي ،أحمر وأزرق مخضر تعتبر الستربتوميسس مصادر غنية بالمضادات الحيوية والإنزيمات والجزئيات الحيوية النشطة .(Atta,2011).

3.2. زيادة إنتاج إنزيم الكيتينيز: Optimization of Chitinizem synthesis

كثير من الباحثين درسوا العوامل التي تزيد من إنتاج إنزيم الكيتينيز ، فاختبرت عدد من البيئات مثل مرق بيئة الآجار المغذي المزودة ب3% كيتين غروي وبيئة مرق برتاني في هذه الدراسة اختبرت أجناس مختلفة من البكتيريا وأثبت أن الآجار (Anuradha et.al., 2014) الأخرى المغذي أعطي إنتاج مرتفع عند مقارنته بالبيئات كذلك اختلف الباحثون في تركيز مادة التفاعل

فالباحثون 11Shanmugaiah et al ,2008 ; Kavi Karunya,20 التركيز الأمثل لإنتاج معدل مرتفع من الإنزيم أن التركيز 2% هو أثبت العوامل Thiagarajan etal 2012)و(Balakrishnan etal (2012) درس الباحثون التي تؤثر على إنتاج إنزيم الكيتينيز وتوصل ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانزيم هي 30م° وpH7 و4% كيتين غروي في بكتيريا ستربتوميسس 6.

4.2 . تطبيقات إنزيم الكيتينيز في المجالات المختلفة : Application of Chitinases in different Fields

يوجد عدد هائل من الإنزيمات المنتجة تجاريا والتي تختلف في مصادرها البيولوجية وخصائصها الفسيولوجية مثل درجة الحرارة وتركيز ايون الهيدروجين .

من الخصائص الهامة والمفيدة استخدام الإنزيمات المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة وذلك لأنها تنجز تفاعلاتها الكيميائية في درجات حرارة مرتفعة وبصورة سريعة. كما تساعد على ذوبان المواد المتفاعلة ،تقليل اللزوجه والتلوث الميكروبي .

تتميز الميكروبات المناسبة لإنتاج الإنزيمات بسهولة وسرعة نموها في المخمر وقلة تكاليفها من حيث إحتياجها للاملاح مع عدم الحوجة لإضافة أي مدعمات خارجية . ايضا يجب أن تكون طريقة استخلاص الإنزيم سهلة وبسيطة وتعطي إنتاج وفير خالي من مخلفات الايض السامه. كما يجب أن يكون الكائن الدقيق المستخدم ثابت في خصائصه الفسيولوجيه ومقبول عند إضافته للاطعمة والصناعات الدوائية وخاضع للمقاييس والسلطات الدوائية (Paula et. al. 2010).

لمركب الكيتين والكيتوسان خصائص ومميزات ساعدت على استخدامهما في مجالات عديدة . تستخدم إنزيمات الكيتينيز في تحويل مركب الكيتين في الكتلة الحية إلى مركبات مفيدة (Paula et. al. 2010). كذلك يستخدم في المكافحة الحيوية للفطريات المتطفلة على النباتات والحشرات

كبديل للمبيدات الكيميائية الملوثة للبيئة. تعتبر انزيمات الكيتينيز صديقة للبيئة لاتسبب أي ضـرر لها (Peyvand et al,2013). يعتبر نشاط إنزيم الكيتينيز مؤشر لوجود ونشاط الفطريات في التربة (Peyvand et al,2013) .

اما في مجال الطب فلهذه الانزيمات استخدامات عديدة ، فيعتبر مركب هكسواوليجوسكرات وهيبتو اوليجو مضادة للاورام ومركب الكيتوسان تنتجة بكتيريا *Streptomyces* sp. والذي يستخدم كعلاج مضاد لإلتهابات المعدة والامعاء وكذلك لتقرحات القولون (.Rifat et.al,2013) وكذلك تستخدم لعلاج ضد الازمة وتقوي جهاز المناعة ضدالامراض المختلفة Rifat et.al,(2013). معظم الإنزيمات المنتجة تجاريا مستخلصة من كائنات دقيقة مثل فطر *Aspergillus oryzae* ، وبكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* وأنواع عديدة من جنس *Streptomyces* ايضا يستخدم في مجال صحة البيئة في معالجة مياه الشرب(Anuradha et al,2013) كما يستخدم في مجال الصناعات الغذائية كمادة حافظة آمنة وكمادة مكسبه للطعم ، ويستخدم في صناعة الورق والنسيج كمادة صاقله (Khor and Lim, 2003).

الفصل الثالث

المواد والطرائق

Materials and Methods

1.3. المواد: Materials

1.1.3. بكتيريا الاكتينوميستات: Actinomycetes Bacteria

عزلت 18 معزولة بكتيرية من عينات تربة مختلفة جمعت من مواقع مختلفة بمحلية عطبرة .

2.1.3. المواد الكيميائية: Chemicals

كل المواد الكيميائية المستخدمة من نوع (Analar grade) أو ما يعادله، وكل البيئات من شركة اوكسيد الكيميائية (Oxoid Chemical Company) بالمملكة المتحدة. بعض البيئات تم تحضيرها بالاستعانة بمرجع (Harrigan and McCance, 1966).

2.2.3. عزل بكتيريا الاكتينوميستات: :Isolation of Actinomycetes

جمعت 21عينة من التربة من سبع مواقع مختلفة بمدينة عطبرة، شملت عطبرة الداخلة،السكة حديد،امبكول ،حي الريان ، السيالة، الموردة و المقرن. جمعت عينات التربة بالمواقع المذكورة أعلاه ووضعت في أكياس عقمت بجهاز الاوتوكلاف عند درجة حرارة 121°C تحت ضغط 15 رطل/ بوصة^2 جففت عينات التربة وتركت لمدة اسبوع للحد من نمو البكتيريا السالبة لصبغة الجرام. جهز معلق مائي من العينات المختلفة كل على حده وذلك باضافة اجرام من التربة إلى 100 مل من الماء المقطر المعقم كما وصفها الباحث (2004) Oskay *et al.* بعد ذلك رجت العينة لخلط التربة مع الماء جيدا ثم أخذ امل من المعلق واضيف لبيئتين الأولى بيئة آجار النشا والكازين الخاصة بعزل الاكتينوميسيتات والمكونة من الأتي نشا 10 جرام، كازين 0.3 جرام، 2 جرام NaCl 0.05, $MgSO_4$ $7H_2O$ 2, K_2HPO_4 2, $MgSO_4$, $CaCO_3$ 0.02, $FeSO_4$, $7H_2O$ 0.01 وآجار18جرام ثم اضيف 25µ سيكلوهكسلاميد و50µ nyststin كمضاد للأجناس البكتيرية الأخرى والفطريات على التوالي ولتر ماء مقطر وضبط ال pH 7.5 بإضافة HCL أو NaOH والثانية بيئة سابورد المكونة من 10 جرام ببتون، 40 جرام

دكستروز، 15جرام آجار ولتر ماء ،بعد ذلك عقمت البيئتان بواسطة جهاز الاوتوكلاف عند درجة حرارة 121° C و15 رطل / بوصة^2 لمدة 15 دقيقة. وضع 1 مل من معلق التربة مع الماء المقطر لكل عينة من عينات التربة كل على حدة في منتصف طبق بتري ثم اضيفت الية 20مل من بيئة العزل وهي دافئة في درجة حرارة 45 ° C وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 30°C في حضانة من نوع Gallenham NO. SCR645 تحت نظام إضاءة: ظلام (12: 12 ساعة) باستخدام مصباحي أشعة فوق بنفسجية (Philips TLD 18w/08) و أربعة مصابيح نيون Philips . توبع نمو الستعمرات البكتيرية وأخذت مستعمرة نقية وتم تنقيتها في بيئةآجار النشا والكازين وبيئة سابورد . بعد ذلك فحصت الخلايا البكتيرية باستخدام المجهر الضوئي .

3.2.3. إختيار المعزولات البكتيرية المنتجة لانزيم الكيتينيز:

Selection of Bacterial Chitinase Producers

نميت المعزولات البكتيرية في بيئة اجار الكيتين والمكون من فوسفات الصوديوم الهيدروجيني 0.65 جرام،فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 1.5 جرام، كلوريد الصوديوم 0.5 جرام كلوريد الامونيوم 0.25 جرام، كبريتات المغنسيوم سباعية الهيدروجين 0.12 جرام كلوريد الكالسيوم 0.005 جرام 5.0 جرام آجار 20 جرام ولتر ماء مقطر مضافا إليه20.0 جرام كيتين كمصدر للكربون ولتر ماء مقطر ، حضنت الاطباق البكتيرية عند درجة حرارة 37 م° ثم حسب نشاط إنزيم الكيتينيزبقياس قطر الهالة الرائقة التي تكونت حول النمو البكتيري بطريقة مستخدما العلاقة التالية: Hankin and Anagnostakis (1975)

$$\text{معامل نشاط إنزيم الكيتينيز} = \frac{\text{قطر الهالة الرائقة} - \text{قطر المزرعة البكتيرية}}{\text{قطر المزرعة البكتيرية}}$$

واستنادا إلى معامل نشاط الإنزيم أختيرت عشرمعزولات للبحث المتقدم . ونتيجة للفحص المجهري كل المعزولات كانت تنتمي لبكتيريا الاكتينوميسيتات . وللعمل الروتيني لحفظ العينات المختارة جهزت بيئة مائلة من آجار النشا والكازين ولقحت بالمزارع المختلفة كل على حده وحضنت عند درجة حرارة 30°C. بعد نمو المزارع بالبيئة المائلة بانابيب الإختبار ، حفظت هذه الإنابيب في ثلاجة لحين إستخدامها .

4.2.3. الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات

Morphological and Biochemical Characteristics of Actinomycetes.

درست الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية للمعزولات العشر واستخدم كتيب Bergy لتصنيف البكتيريا (Claus and Berkeley,1992) .

1.4.2.3. الإختبارات المورفولوجية : Morphological Tests

زرعت معزولات الاكتينوميسيتات في بيئتين الأولى بيئة مرق الآجار المغذي والمكونة من 1 جرام مستخلص اللحم، 2جرام مستخلص الخميرة، 5 جرام ببتون، 5جرام كلوريد الصوديوم، 15 جرام آجار ولتر ماء مقطر اما البيئة الثانية فكانت بيئة مرق التريتون ومستخلص الخميرة (ISP) والمكونة من 5 جرام كازين، 3جرام مستخلص الخميرة ولتر ماء مقطر عقمت البيئات كما في التجربة **2.2.3.** لقحت البيئات بالمعزولات المختلفة وحضنت في حضانة عند درجة حرارة 30 ° C درست الصفات المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية و جهزت شرائح بكتيرية لدراسة الصفات المورفولوجية كما وصفها Claus and Berkeley,1986.

2.4.2.3. صبغة جرام: Gram stain

اتبعت طريقة الباحثان Bartholomew and Mitters (1950). جهزت مسحة بكتيرية رقيقة ونشرت على سطح على الشريحة الزجاجية ،ثم ثبتت بواسطة اللهب باستخدام موقد بنزن . ثم غمرت الشريحة بصبغة الكريستال البنفسجي (تركيزة 5%)لمدة 30 ثانية ،غسلت بالماء واضيف

اليها محلول اليود للتثبيت ثم غسل محلول اليود وأضيف اليها كحول الإيثانول لازالة اللون لمدة 30 ثانية ثم غمر الغشاء البكتيري بصبغ السفرانين (0.25%) لمدة 30 ثانية . غسلت الشريحة مرة أخرى بماء الصنبور وجففت الشريحة بورق ترشيح أو بواسطة الهواء ، فحصت الشريحة ولوحظ لون الخلايا باستخدام المجهر الضوئي لتحديد إذا كانت موجبه أو سالبه لصبغة الجرام .

3.4.2.3. الإختبارات البيوكيميائية : Biochemical Tests

1.3.4.2.3. إنتاج الكتاليز : Production of Catalase

زرعت مزارع بكتيرية في بيئة الآجار المائل بانابيب الإختبار كما في التجربة (1.2.3) لمدة4 ايام. بعد ذلك غمرت المزرعة البكتيرية ب.5ml من مركب فوق اكسيد الهيدروجين تركيزة 10% . ظهور فقاعات هوائية تعني إختبار موجب كما وصفهاالباحث .Whittenburry (1964) .

2.3.4.2.3. إختبار فوكس بروسكاور : Voges Proskauer Tests

أجري هذا الإختبار كما وصفه الباحث Levin (1916) . جهزت بيئة مرق فوكس بروسكاور إضافة 10 جرام تربتون ، 5 جرام فوسفات الهيدروجين ثنائي الصوديوم ، فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين ، 0.1 جرام كبريتات المغنسيوم المائية ،2 جرام جلوكوز مذوبة في لتر ماء مقطر . ضبط الpH إلى 6.5 ، قسمت البيئة في انابيب إختبار بواقع 5 ml. بكل انبوبة ،ثم عقمت البيئات بواسطة جهاز الاوتوكلاف عند درجة حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة . بردت الأنابيب ولقحت بمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات بتكرارثلاث أنابيب لكل معزولة . حضنت الاانابيب في حضانة عند درجة حرارة 37°C لمدة, 3 ،5 و7 ايام . اضيف للمزرعة البكتيرية 3ml. هيدروكسيد صوديوم تركيزه 40% وواحد مل كرياتين . إنتاج لون أحمر بعد 30- 60 دقيقة يدل على نتيجة إيجابية .

3.3.4.2.3. إنتاج كبرتيد الهيدروجين: Producation of H_2S:

جهزت بيئة آجار الحديد ثلاثي السكريات المائل بأنابيب إختباروعقمت بالاتوكلاف . ثم لقحت البيئات بمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات بتكرار انبوبتين لكل معزولة . حضنت الانابيب عند درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة، ثم لوحظ تكوين لون اسود والذي يدل على إنتاج H_2S نتيجة لتفاعل الكبريت مع الحديد ليكون مركب FeS

4.3.4.2.3. إنتاج اليوريز: Production of Urease:

جهزت بيئة Christiansen's urea وهي عبارة عن مرق آجار مغذي مضافا الية 2% يوريا والدليل أحمر الميثيل ووضعت باانابيب إختبار ثم عقمت بجهاز الاوتوكلاف . لقحت البيئات بمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات بتكرار طبقين لكل معزولة . حضنت الانابيب عند درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة ولوحظ تغيير لون الدليل والذي يكون أحمر في PH7 وأصفر في أقل من 7 وزهري غامق في PH8.4 .

5.3.4.2.3 الإستفادة من بعض السكريات على نمو المعزولات البكتيرية : Utilization of Carbohydrates

جهزت بيئة ISP9 المحتوية على 2.64 جرام كبريتات الامونيوم، 2.38 جرام KH_2PO_4، 4.31 جرام K_2HPO_4، 1 جرام $MgSO_4$ x 7 H_2O، 1مل من العناصر الصغر الصغرى والمكونة من (CuSO4 x 5H2O 0,64 g/l, FeSO4 x 7H2O 0,15 g/l, MnCl2 x 4 H2O) – قسمت البيئة في انابيب إختبار ثم عقمت البيئة بواسطة جهاز الاوتوكلاف. لحقت الانابيب بالمعزولات المختارة تذلك لقياس معدل النمو ومقارنتها مع نمو المعزولات في بيئة آجار النشا و الكازينوالتي تعتبر كانبوبة ضابطة كما وصفها الباحثان Shirling and Gottlieb (1966).

.6.3.4.2.3 إنتاج الإندول : Production of Indole:

جهزت بيئة إنتاج الإندول بإذابة 1جرام مرق التربتون التجاري في .100 ml ماء مقطر (جهز مرق التربتون بإذابة 10 جرام تربتون و5 جرام كلوريد صوديوم في 1 لتر ماء مقطر). ضبط الpH إلي 7.5 وقسمت البيئة بانابيب إختبار بواقع .5 ml بكل انبوبة ، عقمت البيئات بواسطة جهاز الاوتوكلاف لمدة 20دقيقة. لقحت الانابيب بمعزولات بكتيريا الباسيلس وحضنت في حضانة عند درجة حرارة 37°C لمدة 14 يوم . إختبرت المزارع البكتيرية بإضافة .2ml من محلول الإختبار الذي يتكون من 5 جرام امينو بنزالداهيد بارا ثنائي الميثيل ، و .75 ml كحول الايزوايميل و.25ml HCL . لإنتاج لون زهري إلى أحمر في طبقة الكحول يدل على تكوين الإندول كما وصفها Claus and Berkeley (1986) .

.4.2.3 .7.3 إسالة الجيلاتين :Liquefaction of Gelatin:

جهزت بيئة الآجار المغذي وزودت بجيلاتين 4% ثم عقمتبواسطة جهاز الاوتوكلاف كما في التجارب السابقة ثم قسمت باطباق بتري. لقحت الأطباق بالمزارع المختلفة لبكتيريا ال *Streptomyces* عند درجة حرارة 37 ° C لمدة 5-7 ايام. بعد ذلك غمرت المزارع بحمض الكبرتيك تركيزة 1N ومشبع بكبريتات الصوديوم. يحدد تحليل الجيلاتين بتكوين هالة رائقة حول المزارع البكتيرية كما وصفها

1.4.اختيار البيئات الملائمة لعزل بكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة لإنزيم الكيتينيز:

Selection a suitable media for Isolation Chitinolytic Actinomycetes

جمعت 21عينة من التربة الموجودة بمواقع مختلفة بمحلية عطبرة (جدول 1) .

.1.1.4 إختيار المعزولات : Selection of Isolates

نتيجة المعزولات البكتيرية التي زرعت في بيئة آجار الكيتين المزودة ب2.0% بودرة كيتين كمصدر اساسي للكربون أن كل المعزولات الاحدى وعشرون أعطت نتائج إيجابية وذلك بتكوين هائلة رائقة حول المزرعة البكتيرية بعد 4 أيام من زراعتها كما وصفت في باب المواد والطرائق .

إستنادا على معامل نشاط إنزيم الكيتينيز أختيرت7معزولات بكتيرية للتجارب المتقدمة. كل المعزولات المختارة أعطت معامل نشاط إنزيم الكيتينيز في مدى تراوح بين سم 1.2- 4 سم (جدول 2 ولوحة 1). من الجدول واضح أن المعزولات الأعلى إنتاجا لإنزيم الكيتينيز هي:

SUDA2, SUD A3, SUDA4, SUDA 12, SUDA19,SUD20, SUDA21

الفصل الرابع

النتائج

Results

جدول (1) : مسح لبكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة للإنزيم الكيتينيز

الرقم المتسلسل	المعزولات البكتيرية	المصدر	إنتاج إنزيم الكيتينيز
1	SUDA 1	الداخلة شمال	+
2	SUDA 2	الداخلة جنوب	+
3	SUDA 3	الداخلة غرب	+
4	SUDA 4	الداخلة شرق	+
5	SUDA 5	السكة حديد شمال	+
6	SUDA 6	السكة حديد جنوب	+
7	SUDA7	السكة حديد غرب	+
8	SUDA8	السكة حديد شرق	+
9	SUDA9	السيالة شمال	+
10	SUDA10	السيالة جنوب	+
11	SUDA11	السيالة غرب	+
12	SUDA12	السيالة شرق	+
13	SUDA13	المقرن شمال	+
14	SUDA14	المقرن جنوب	+
15	SUDA15	المقرن غرب	+
16	SUDA16	المقرن شرق	+
17	SUDA17	الريان شمال	+
18	SUDA18	الريان جنوب	+
19	SUDA19	امبكول شمال	+
20	SUDA20	امبكول جنوب	+
21	SUDA21	الموردة شمال	+

جدول (2) : معامل نشاط إنزيم الكيتينيز بإستخدام طريقة الاطباق المصبوبة

المتسلسل	المعزولات البكتيرية	معامل نشاط إنزيم الآميليز
1	SUDA1	0.28
2	SUDA2	2.0*
3	SUDA3	1.5*
4	SUDA4	1.6*
5	SUDA5	1.0
6	SUDA6	0.33
7	SUDA7	0.33
8	SUDA8	1.0
9	SUDA9	0.2
10	SUDA10	0.5
11	SUDA11	4.0*
12	SUDA12	1.0
13	SUDA13	0.42
14	SUDA14	0.33
15	SUDA15	0.5
16	SUDA16	0.3
17	SUDA17	1.0
18	SUDA18	0.7
19	SUDA19	1.6*
20	SUDA20	1.2*
21	SUDA21	3.0*

اعلي نشاط سجلته المعزولات

SUDA2 (2.0سم) ,SUDA21(3.0سم) , SUDA11 (4 سم) المعزولتان SUDA4 و SUDA19 (1.6 سم) وأقل نشاط سجلته المعزولتان SUDA20 و SUDA3 (1.5 و1.2 سم) على التوالي جدول (2).

لوحة (1) : معامل نشاط إنزيم الكيتينيز بتكوين الهاله الرائقة حول النمو البكتيري

2.1.4. تعريف المعزولات البكتيرية : Identification of Bacterial Isolatesكل

رصدت الخصائص المورفولوجية الجهرية وصفات الخصائص المزرعية بجدول ٣ والذي يوضح أن كل المعزولات البكتيرية أعطت نتائج إيجابية في تجربة (**1.1.4.**) ،وتم المعزولات إختيارالتي سجلت أعلى نشاط لمعامل إنزيم الكيتينيزوشملت المعزولات SUDA2, SUDA3,SUDA4, SUDA11,SUDA19,SUDA20 و SUDA21 جميعها كانت موجبة لصبغة الجرام ، خلاياها خيطية الشكل متجرثمة كونت كونيدات في سلسلة بيضاوية. المعزولة SUDA2وSUDA11 و SUDA21 كونت مستعمرات لها قوام قطني بيضاء اللون للميسيليوم الهوائي اما الميسيليوم الارضي فكان لونه بني بالنسبة للمعزولة SUDA2 اما المعزولة SUDA21 فكان لون الميسيليوم الهوائي أصفر والميسيليوم الارضي بني وذلك في بيئة SP1 اما في بيئة الآجار المغذي فكان اللون ابيض وأصفر للمعزولتان على التوالي. المعزولتان SUDA3,SUDA٢٠ كونت مستعمرات دائرية الشكل, مرتفعة لها حافة ملساء

والسطح خشن وحبيبي لونها كريمي في البيئتين (SP1الأجار المغذي). اما المعزولتان SUDA4 وSUDA19 فكانت مستعمرتاهما غير منتظمة الشكل، مسطحة، الحافة ملساء والسطح خشن والقوام خيطي قطرها عدة سنيتمرات وحافتها متموجة. .اما نتيجة الإختبارت البيوكيميائية رصدت بالجدول4 والذي يوضح أن كل المعزولات المذكورة سابقا منتجةموجبة لتحليل الكازين وسالبة لإختبار كبرتيد الهيدروجين وإختبار فوكس بروسكاور، بينما الإختبارات الأخرى اختلفت التفاعلات فكل المعزولات كانت سالبةلإختباري اليوريزو الاندول ماعدا المعزولتان . SUDA4وSUDA19 كذلك كانت كل المعزولات موجبة لأحمر الميثيل ما عدا المعزولتان SUDA2 و SUDA3. اما بالنسبة لإثر الكربوهيدرات على النمو فاختلف تفاعل المعزولات المختلفة مع السكريات (جدول4).

جدول (3) : الصفات المورفولوجية المجهرية وصفات مزارع المستعمرات للمعزولات البكتيرية المنتجة لإنزيم الكيتينيز

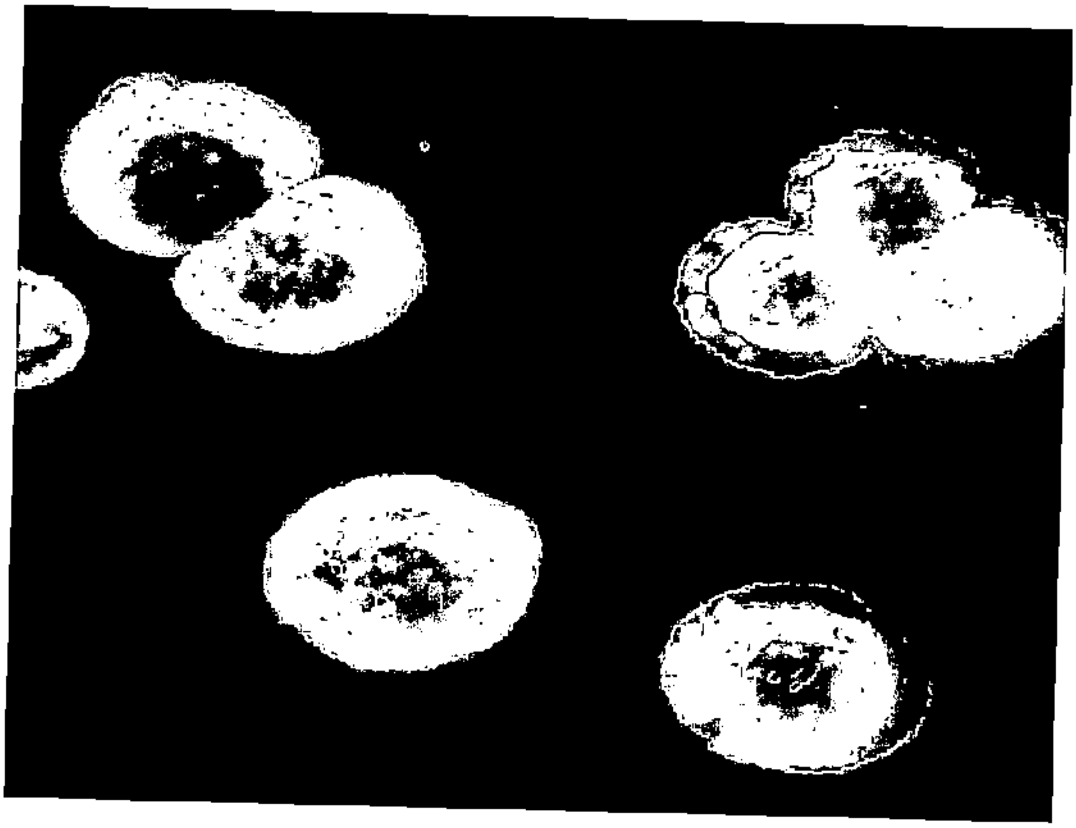
المعزولات البكتيرية	البيئات	النمو الخضري	النمو: المدى	النمو: خواص المستعمرات	الميسليوم الهوائي	لون الميسلسوم الأرضي
SUDA2	بيئة SP1	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	غزيرومنتشرفي البيئة	الشكل غير منتظم، والقوام قطني	ابيض اللون	بني اللون
	بيئة الآجار المغذي	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	متوسط والنمو غير منتشر	الشكل غير منتظم، والقوام قطني	ابيض اللون	ابيض اللون
SUDA3	بيئة SP1	الميسيليوم غير متفرع ومدمج خلوي	متوسط والنمو غير منتشر	الشكل دائري الإرتفاع مرتفعة، الحافة ملساء	كريمي اللون	كريمي اللون
	بيئة الآجار المغذي	الميسيليوم غير متفرع ومدمج خلوي	متوسط والنمو غير منتشر	والسطح خشن حبيبي	كريمي اللون	كريمي اللون

				الشكل دائري الإرتفاع مرتفعة؛ الحافة ملساء والسطح خشن حبيبي		
SUDA4	بيئة SP1	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	غزير ومنتشر	غيرمنتظم المستعمرة محدبة، الحافة متموجة، السطح خشن معتم والقوام خيطي	بني	بيجي
	بيئة الآجار المغذي	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	غزير			
SUDA11	بيئة SP1	الميسيليوم غير متفرع ومدمج خلوي	متوسط	الشكل غير منتظم، والقوام قطني	أبيض	أبيض
	بيئة الآجار المغذي	الميسيليوم غير متفرع ومدمج خلوي	ضعيف	الشكل غير منتظم، والقوام قطني	أبيض	أبيض
SUDA19	بيئة SP1	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	متوسط	الشكل غير منتظم، مسطح، الحافة ملساءوالسطح خشن والقوام خيطي	كريمي	كريمي
	بيئة الآجار المغذي	الشكل غير منتظم، مسطح، الحافة ملساءوالسطح خشن	متوسط	الشكل غير منتظم، مسطح، الحافة ملساءوالسطح خشن	أبيض	كريمي
SUD20	بيئة SP1	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	متوسط	الشكل دائري، مرتفع،الحافة ملساء المسح خشن وحبيبي	كريمي	كريمي
	بيئة الآجار المغذي	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	ضعيف	الشكل دائري،،مرتفع، الحافة ملساء		

SUDA21	بيئة SP1	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	غزير	الشكل غير منتظم، المستعمرة محدبة، الحافة مموجة، السطح خشن والقوام قطني	أصفر اللون	بني اللون
	بيئة الآجار المغذي	الميسيليوم متفرع ومدمج خلوي	متوسط	الشكل غير منتظم، المستعمرة محدبة، الحافة مموجة، السطح خشن والقوام قطني	أصفر اللون	أصفر اللون

لوحة (٢) : شكل مستعمرة SUDA21 في بيئة آجار النشا والكازين المضاف اليها صبغة أحمر الكونغو.

لوحة (٣): مستعمرات للمعزولة SUDA11



جدول (٤): الخصائص البيوكيميائية لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات

الإختبارات البيوكيميائية	المعزولات البكتيرية						
	SUDA2	SUDA3	SUDA 4	SUDA11	SUDA19	SUDA20	SUDA21
إنتاج الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+
فوكس بروسكاور	-	-	-	-	-	-	-
إنتاج اليوريز	+	+	-	+	-	+	+
إختبار الاندول	-	-	+	-	+	-	-
أحمر الميثيل	-	-	+	+	+	+	+

إختبار الكازين	+	+	+	+	+	+	+
كبريتيد الهيدرجين	−	−	−	−	−	−	−
أثر السكريات							
جلوكوز	+++	++	−	+	−	++	+
سكروز	++	++	++	+	+++	−	++
فركتوز	+	+++	−	+	−	+++	+
مانيتول	−	−	−	−	−	++	−
زايلوز	−	+	+++	+++	+	++	+++

لا يوجد نمو: −　　نمو ضعيف: +　　نمو متوسط: ++　　نمو غزير: +++

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

1.5 المناقشة

جمعت عينات تربة من بمواقع مختلفة بمحلية عطبره وذلك لعزل معزولات بكتيرية منتجة لإنزيم الكيتينيز .

نتائج هذه الدراسة اوضحت أن كل عينات المعزولات كانت إيجابية ،كونت هائلة رائقة حول النمو البكتيري (جدول 1) . ثم قيس قطر الهالة الرائقة للمعزولات الإيجابية والتي تحدد معامل نشاط إنزيم الكيتينيز ، هذه النتائج تشابة تلك التي تحصلت عليها الباحثين (2012) et al Balakrishnanفي الدراسة التي أجراها على معزولات مختلفة من بكتيريا الاستريتوميسس وتوصل إلى أن هذه المعزولات سجلت معدلات متقاربة لمعامل نشاط انزيم الكيتينيز والتي تراوحت بين 1.2 – 4.0 سم عند درجة حرارة 37°C ، أعلى معدل لنشاط إنزيم الكيتينيز كان 4.0 والذي سجل بواسطة المعزولة SUDA11 عند درجة حرار°C 37 ثم المعزولتين SUDA21 و SUD2 (3.0 و 2.0)على التوالي . أقل نسبة سجلتها المعزولة SUDA20 ثم المعزولتان SUDA3وSUDA19 (1.5 و1.6 سم) على التوالي.

كذلك درست الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية للمعزولات السبع كما وصفها الباحث Claus and Berkeley (1986). وبناء على هذه الخصائص تشابهت كل المعزولات بنسبة أكثر من 90% لخواص بكتيريا ***Streptomyces* sp.** تقطن هذه البكتيريا بصورة رئيسية في التربه ، وهى هوائية التنفس موجبة لإختباري الكتاليز ,وسالبة لإختبار الفوكس بروسكاور وكبريتيد الهيدرجين والجراثيم بيضاوية تنتظم في سلسلة وهي عبارة عن كونيدات كل هذه الصفات ادت إلى تصنيف هذه المعزولات إلى بكتيريا *Streptomyces* sp. هذه الخصائص تماثل تلك التي تحصل عليها عدد من الباحثين في المعزولات البكتيرية التي عزلوها من مياة البحر ففي البنغال سجل الباحث Reddy et al ,(2010) نفس الخصائص في المعزولة التي

عزلها من المياه بالبنغال ووجد أن هنالك تشابه لبكتيريا الاستربتوميسس بنسبة % 91 وفي الهند سجل الباحث (2011) Kavi et al نفس الخصائص وصنفت كبكتيريا Streptomyces sp. وهي من البكتيريا المنتجه لإنزيم الكيتينيز .

2.5 الخلاصة Conclusion

في هذه الدراسة عزلت سبع معزولات بكتيرية ، وفحصت وعرفت بأنها تنتمي لمجموعة الاكتينوميسيتات. أختبرت لإنتاجها لإنزيم الكيتينيز فكانت كل المعزولات منتجة لهذا الإنزيم وأختبرت المعزولات لإجراء التجارب المتقدمة . عرفت السبع معزولات فكانت منها تنتمي لجنس *Steptomyces* sp.

3.5 التوصيات Recommendations

نسبة للنتائج المشجعة التي تحصلنا عليها من المسح البكتيري للمعزولات المنتجة لإنزيم الكيتينيز عليه نوصي بالأتي :

- إكمال الإختبارات لإستخلاص إنزيم الكيتينيز.
- دراسة الظروف البيئية التي تساعد على إنتاج أعلى معدل من الإنزيم مثل درجات الحرارة ، تركيز أيون الهيدروجين ، تركيز مادة التفاعل ، مصادر الكربون والنيتروجين التي تساعد على زيادة الإنتاج .
- تنقية الإنزيم ودراسة الخصائص المختلفة له.
- تطبيق الإنزيم في مجال المكافحة الحيوية للفطريات المتطفلة على النباتات وكذلك مكافحة الحشرات التي تسبب الامراض والعديد من الأضرار مثل البعوض .

: References المراجع

1.Anuradha V. and K. Revathi (2013). Purification and characterization of chitinase from two *Bacillus sp* isolated from crustacean shells. *J. Micro.l. Biotech. Res.* 3 (3):160-167.

2.Anuradha V, Syed A., Yogananth N Kalitha P. Peer M. (2014). Optimization of Culture Conditions for Production OF Bacterial Chitinize Isolated from Marine Crustacean Microbiol Biotech *Food Sci* / Venkatraman et al. : 3 (4) 319-321.

3. Arifuzzaman, M. Khatun and Rahman H.(2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity , African Journal of Biotechnology 9(29): 4615-4619

4. Atta, H.M., Bahobail, A.S., and El-Sehrawi, M.H. (2011). Microbial Studies on Physiological Cultural Characteristics and Antimicrobical Activities of Streptomyces cyaneus 13 Zc. New York Science Journal 3: 40-53.

5.Balakrishnan S., Duraisamy G., Manokaran K., Ganesan R., Chinthamani A. and Chandrasekar U.(2012). Production and Purification of Chitinase *Streptomyces* sp. from Soil *J Adv Sci Res, 3(3): 25-29*

6.Bartholomew B.M. and Mitters, S. (1950). A Simplified

Spore.Stain Technology,25: 153.

7. Carsolio, C. N. Benhamou, S. Haran, C. Cortes, A. Gutiérrez, I. Chet and A. Herrera-Estrella. 1999. *Appl Environ Microb,* 65(3):929-935.

8.Claus D. and Berkeley P.C.W. (1986) . Genus Bacillus In : " Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol.2 : Sneath, P. H.A., Bair, N. S.

Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) pp. 1115 – 1123. Williams and Wikins, Baltimore.

9. Eman Z.(2012). Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol, *Microbial Ecology* 50 (1) 103-111. 10.Gkargkas K., Mamma D., Nedev G., Topakas E., Christakopoulos P., Kekos D. and BJ. Macris (2004). *Process Biochem.*, 39, 1599-1605.

11. Goodfellow M, Lechevalier MP (1989). Genus *Nocardia.* Trevisan. 9AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by ST Williams ME, Sharpe JG. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. 2: 1458-1471.

12.Harrigan and McCance, (1966) .)" Laboratory Methods in

Microbiology". Pp.3-316. Academic Press London.

13.Hankin, L., R.P. Poincelot and S.L. Anagnostakis. 1975. Microorganisms from composting leaves: ability to produce extracellular degradative enzymes. *Microbial Ecology,* 2(4): 296-308.

14. Kämpfer P., (2006). "The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy". The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria (Dworkin, M et al, eds.). Berlin: Springer. pp. 538– 604. ISBN 0-387-25493-5.

15.Kavi Karunya S., Reetha D., Saranraj P. and John D.(2011). Optimization and Purification of Chitinase Produced by *Bacillus subtilis* and Its Antifungal Activity against Plant Pathogens , *Inter. J. Pharma. Biol. Arch.* ,2(6):1680-1685

16.Koga D, Sasaki Y, Uchiumi Y, Hirai N, Arakane Y, Nagamatsu Y. 1997. Insect.

17.Khor E.and Lim I. (2003).Implantable Application of Chitin and Chiosan.Biomet.,24(13):2339-2349.

18.Kumar RS, Singh SA, Rao AG (2009) Conformational Stability of alpha-Amylase from Malted Sorghum (Sorghum bicolor): Reversible Unfolding by Benaturants. *Biochimie.* 91(4): 548- 557.

19.Liu M;Cai Q.; Zhang P. And Yang Z.(2002). Chitinolytic Activities in Bacillus thuringiensis and their Synergitic Effects on Larvicidal Activity,*J. Appl.Micro.*,93 (3): 374- 379.

20.Lucas-Garcia, J.A., A. Probanza, B. Ramos, J.J.Colón-Flores and F.J. Gutierrez-Mañero, (2004).Effects of Plant Growth Promoting Rhizobateria (PGPRs) on the biological nitrogen fixation,nodulation and growth of *Lupinus albus* I.cv.Multolupa. Eng. *Life Sci.*, 4: 71-77.

21.Levin, M. (1916). The Voges Proskauer Reaction. *Journal of Bacteriology* 1:153-164.

22.Locci R (1989). *Streptomyces* and related Genera. Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 4:2451-2508.

23.Mayer KH, Hopkins JD, Gilleece ES, Chao L, O' Brien TF (1986). "Molecular evolution, species distribution, and clinical consequences of an endemic aminoglycoside resistance plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 628- 633.

24.Ohshima Y., Nichino K.,Yonekura Y.,Kishimoto S.and Wakabayashi s., (1987).Clinical Application of Chitin Non –woven Fabric as wound Dressing.10: 30-41.

25.Park, J.O.; Tarabily-EL, K.A.; Ghisalberti, E.L.; Sivasithamparam, K. (2000). Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Lett. Appl.Microbiol.*, 35, 361-365.

26.Paula Monteiro de Souza; Pérola de Oliveira e Magalhães (2010). Application of Microbial –Amylases inIndustry – A Rewiew . *Braz J. Micro.* .41: 850-861.

27. Peyvand Samimifar1, Alireza Dehnad2,Mohammad Ali 27. Ebrahimi3,Bakhshi Khaniki4 and Behnam Tahmasebpour5 (2013). chitinases as the most secondary metabolites of Streptomyces bacteria , *Int. Sci. Inv. today* 2(6), 579-589.

28.Prrasomsria D., Upprachana S. , Malisorn K. (2013). Isolation of Actinomycetes for Chitinase Production. *Proc. – Sci. Eng.* 40–45.

29.Purwani. E ,Yuli A, Maggy T, Suhartono, Yaya R,Jae Kwan ,Yu Ryang P (2013). Characteristics of thermostable chitinase enzymesfrom the indonesian *Bacillus* sp.13.26. *Sci.Dir.*,53:123-128.

30. Reddy N, Ramakrishna D. and Raja S.(2011). A Morphological, Physiological and Biochemical Studies of Marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) Showing Antagonistic Activity Against Selective Human Pathogenic Microorganisms. *Asian J. Biol.l Sci.,* 4: 1-14.

31.Rifat H.31. Minhaj A. , Mahboob A. , Malik M., Ahmad Malik Z., Abdin I Javed M and Saleem J. (2013). Chitinases: An update, J. Pharm Bioallied Sci. 5(1): 21–29

32.Ruiz H., and Martinez E., (1999).Chitinase biosynthesis and

Structural Organization in Vivo.In: Julles,P.R.A.A.,Muzzarelli (Eds.). Chitin and Chitinase, Birkhauser,Basel,pp:39- 53.

33.Sahai, A.S. and Manocha, M.S. (1993). *FEMS Microbiol.*

Rev., 11:317-338

34.Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T. and Fukamizo, T. (2002). Substrate-binding subsites demonstrated by kinetic and molecular modeling studies..;52:43–52 *J Biochem* 131, 557-564.

35.Seidl V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev.* 22:36–42.

36.ShanmugaiahV., N. MathivananN. ,Balasubramanian P., and Manoharan P.T.(2011). Alkaline Chitinase from *Bacillu firmus* SBPL-05 Isolated from Alkaline-Saline Environment of Lonar Lake. *Ind. J. Fund. and App. Life Sci.*, 1 (3): 161-165.

37.Srividya S ,Adarshana Thapa, Deepika V Bhat, Kajingailu Golmei and Nilanjan Dey (2012). *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens , *Euro. J. Exp. Biol.*, 2 (1):163-173.

38.Subramanian K., Balaraman D., Uttara V., Sadaiappan B., and Manikkam S.(2012).Evaluation of Chitinase producing and

antimicrobial properties of streptomyces isolated fromshrimp shell disposable area, *Asian Paci J. of Trop.*5:45-50.

39. Thiagarajan V., Revathia R., Aparanjinib K., Sivamanic P., Girilala M.,. Priyad C., and Kalaichelvana P. (2011). Extra cellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporum* PTK2 cell wall . INT J CURR SCI 2011, 1: 30-44.

40.Ventura, M.; Canchaya, C.; Tauch, A.; Chandra, G.;Fitzgerald, G.F.; Chater, K.F.; van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: Tracing theevolutionary history of an ancient phylum.*Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *71*, 495-548.

41.Wang SL, Lin TY, Yen YH, Liao HF, Chen YJ(2006).Bioconversion of shellfish chitin wastes for the productionof ***Bacillus subtilis*** W-118chitinase. *Carbo. Res*. 341: 2507- 2515.

42.Whittenburry, R. (1964).Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in The Lactic Acid Bacteria. *J. Gen.Bact.*. 35: 1.