بسم الله الرحمن الرحيم

# مسح لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة لإنزيم الكيتينيز

# Survey of Actinomycetes Chitinase Producer


إعداد الطلاب:

الفرزدق الحاج محمد أ/11/2009

محمد جمال أحمد أ/76/2010

محمد عبد الوهاب أحمد أ/77/2010

إشـــراف:

د. الهام شريف داؤد


بحث مقدم لقسم علوم الحياة ضمن متطلبات الحصول على درجة البكلاريوس في العلوم والتربية


جامعة وادي النيل

كلية التربية

العام الدراسي 2013- 2014

بسم الله الرحمن الرحيم

# الآيـــــة

## قال تعالي :

﴿ مَثَلُ الَّذِينَ اتَّخَذُوا مِن دُونِ اللَّهِ أَوْلِيَاء كَمَثَلِ الْعَنكَبُوتِ اتَّخَذَتْ بَيْتًا وَإِنَّ أَوْهَنَ الْبُيُوتِ لَبَيْتُ الْعَنكَبُوتِ لَوْ كَانُوا يَعْلَمُونَ ﴾

صدق الله العظيم

## سورة العنكبوت الآية (41)

# إهداء

إلى نبع الحنان الدفاق والبلسم الشافي لكل الجروح والآلام

**أمهاتنا**

إلى من علمونا الصبر على الصعاب والشدائد والمحن

**آبائنا**

إلى من علمونا وأشعلوا في قلوبنا جذوة حب العلم والمعرفة

**أساتذتنا الأجلاء**

إلى الذين سبقونا والذين معنا والذين من بعدنا إلى أخوتنا وأصدقائنا الذين قضينا معهم أجمل اللحظات التي لا تنسى وتظل في الوجدان راسخة لا تمحوها الأيام

# الشكر والعرفان

الشكر أولا لله تعالى من قبل ومن بعد أن هيأ لنا من أمرنا رشـــدا إنه نعم المـــولى ونعـــم النصـــير ،،،

الشكر كل الشكر لجامعة وادي النيل كلية التربية تلك الصرح الشـــامخ العـــريق الذي فتـــح لنـــا أبوابـــه من أجـــل العلـــم والمعرفة،،،

الشـــكر للأســـتاذ/ عمـــاد الـــدين أنـــور وللأســـتاذة/ أمنـــة محمـــد أحمـــد لمجهوداتهم المقدرة في إخراج هذا البحث

والشـــــكر أجـــــزله للـــــدكتورة الفاضـــــلة/ **إلهـــام شـــريف داؤد** الـــتي ســـاعدتنا بكـــل صـــبر وحكـــمة في هـــذا العـــمل ،،

والشـــكر موصـــول إلى كـــل الأســـاتذة الأجـــلاء: بقـــسم علوم الحياة الذين لم يبخلوا من تقـــديم كافـــة المعلومـــات وكـــان لهـــم القـــدح المعلي في نجاحنا ،،

وإلى كل من كان لنا سند وعون في إخراج هذا البحث ،،

فجزاهم الله خيراً الجزاء

## الفهـــرس


| الرقم | الموضـــــــوع | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| | الآية | I |
| | الإهداء | II |
| | الشكر والعرفان | III |
| | الفهرس | IV |
| | فهرس الأشكال | VI |
| | فهرس الجداول | VII |
| | ملخص البحث | VIII |
| | **الفصل الأول : المقدمة** | |
| 1-1 | مقدمة | 1 |
| 2-1 | الهدف من الدراسة | 3 |
| | **الفصل الثاني : الأبحاث السابقة** | |
| 1-2 | وصف عام | 4 |
| 2-2 | مصادر انزيم الكيتنيز | 5 |
| 1.2.2 | انزيم الكيتنيز في الحشرات | 5 |
| 2.2.2 | انزيم الكيتنيز في النباتات | 6 |
| 3.2.2 | انزيمات الكيتنيز في الكائنات الدقيقة | 6 |
| 4.2 | زيادة إنتاج انزيم الكيتنيز | 10 |
| 5.2 | تطبيقات انزيم الكيتنيز في المجالات المختلفة | 10 |
| | **الفصل الثالث : المواد والطرائق** | |
| 1.3 | المواد | 13 |
| 1.1.3 | بكتيريا الاكتينوميستات | 13 |
| 2.2.3 | مسح لمعزولات بكتريا الاكتينوميستات | 13 |

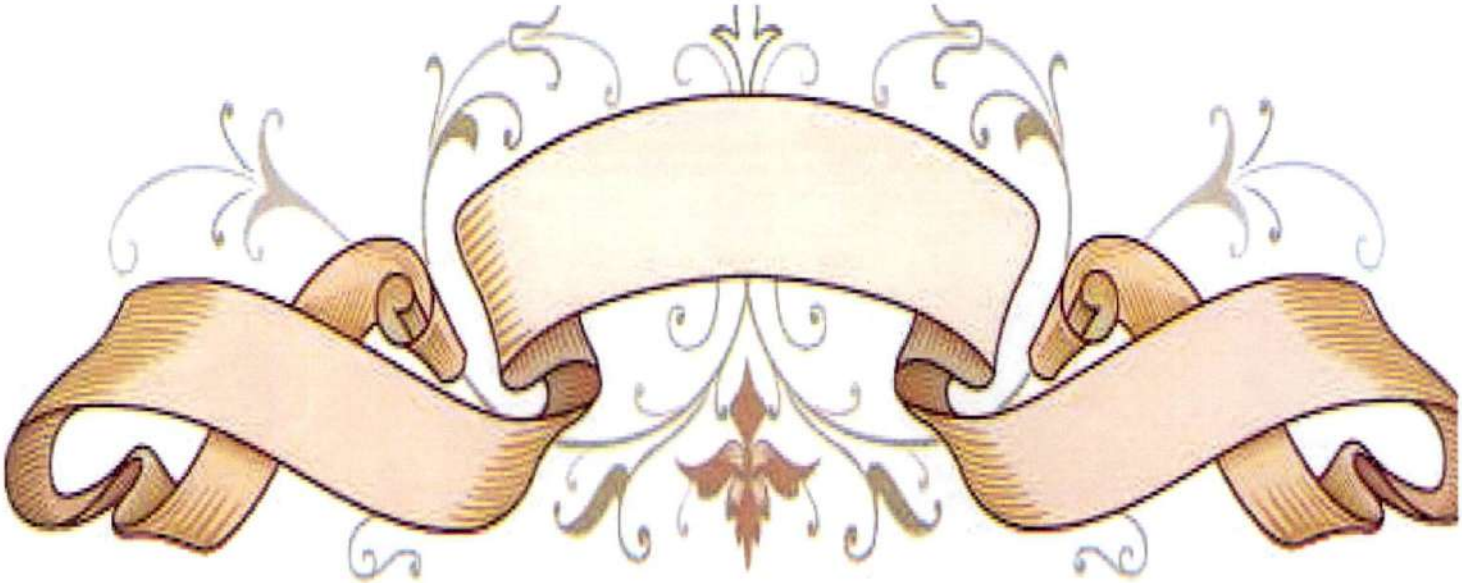
| | | |
|---|---|---|
| 3.2.3 | اختيار المعزولات البكتيرية المنتجة لانزيم الكيتنيز | 14 |
| 4.2.3 | الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية لمعزولات بكتيريا الاكتينوميستات | 15 |
| | **الفصل الرابع : النتائج** | |
| 1.4 | مسح لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات | 19 |
| 1.1.4 | اختيار المعزولات | 19 |
| 2.1.4 | تعريف المعزولات البكتيرية | 22 |
| 3.1.4 | تأثير درجة الحرارة على انتاج انزيم الكيتينيز | 27 |
| | **الفصل الخامس : المناقشة** | |
| 1.5 | المناقشة | 30 |
| 2.5 | الخلاصة | 32 |
| 3.5 | التوصيات | 33 |
| 4.5 | المراجع | 34 |

## فهـرس الجـــداول


| الجـــدول | رقم الصفحة |
|---|---|
| جدول (1): مسح لبكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة لانزيم الكيتينيز | 20 |
| جدول (2): معامل نشاط انزيم الكيتينيز باستخدام طريقة الاطباق المصبوبة | 20 |
| جدول (3): الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية للمعزولات البكتيرية المنتجة لانزيم الكيتينيز | 26 |
| جدول (4): تأثير درجات الحرارة المختلفة على معامل نشاط انزيم الكيتينيز | 28 |

## فهـــرس الأشكـــال


| الشكـــل | رقم الصفحة |
|---|---|
| لوحة رقم (1): معامل نشاط انزيم الكيتينيز بتكوين الهالة الرائقة حول النمو البكتيري | 21 |
| لوحة رقم (2): شكل مستعمرة SUDA1 في بيئة اجار النشأ والكازين المضاف إليها صبغة الروز بنغال | 23 |
| لوحة (3): مستعمرات للمعزولة SUDA5 | 24 |
| لوحة (4): شكل مستعمرة المعزولتان SUDA2 و SUDA6 | 25 |
| تأثير درجات الحرارة على معامل انزيم الكيتنيز | 29 |



# الفصل الأول

## المقدمـــــة

## Introduction

## ملخص البحث

أجري مسح لست عينات من شباك عنكبوت جمعت من أشجار بمواقع مختلفة بمحافظة الدامر وذلك لعزل معزولات من بكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجه لإنزيم الكيتينيز. تمَّ المسح بعزل بكتيريا الاكتينوميسيتات في بيئة 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 نشا والكازين المزود ب20%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 والبيوكيميائية.

اثبتت النتائج الأتي :

- كل المعزولات تنتمي لبكتيريا الاكتينوميسيتات Actinomycetes .
- كل الست معزولات أعطت نتائج إيجابية لإختبار إنتاج إنزيم الكيتينيز.
- صنفت المعزولات على أساس الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية فكانت أربعة عزلات مطابقه لبكتيريا ستربتوميسس *Streptomyce* sp. وهم SUDA1, SUDA3, SUDA4 and SUDA5 و المعزولتان الأخريتان تطابقت مع جنس نوكارديا.*Nocardia* sp ( SUDA2و SUDA6 ).
- نتائج تجربة تأثير درجة الحرارة أثبتت أن كل المعزولات سجلت أعلى معامل لنشاط إنزيم الكيتينيز عند درجة حرارة 45°C .

## 1-1 المقدمة : Introduction

إن قابلية بعض الأحياء المجهرية على إنتاج مواد ذات أهمية تطبيقية مثل الأنزيمات ومضادات حيوية والأحماض العضوية وغيرها 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 هذة القيمة الغذائيه 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 وايقاف ايضه. كذلك يمتاز الكيتين بإستخدامه في المجال الطبي ويعتبر عامل طبي حيوي يفيد في خفض تركيز الكوليسترول السئ ، 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 هذة الانزيمات على العائلة 18 و19 واعتمد في تقسيمها علي ترتيب الأحماض الامينية في السلسلة البروتينية لهذة الانزيمات (Lucas *et al.*,2004) . وجود هذة 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 هذة 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. 9 المنتجه لانزيم الكيتينيز النشط والذى استخدم في المكافحة الحيويه 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 هذة البكتيريا من قشور الجمبري والسرطانات والتي أظهرت نشاط عالي لإنزيم الكيتينيز.

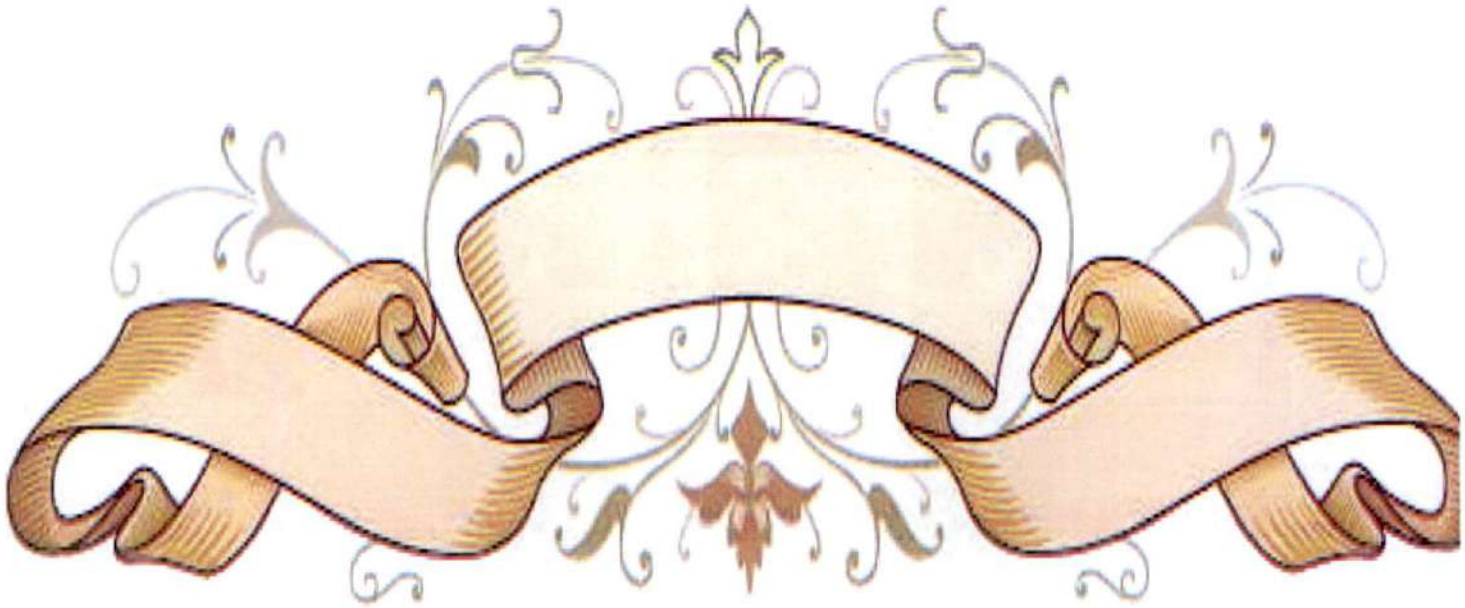
## 2-1 الهدف من الدراسة :

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

1- دراسة مسحية لبعض معزولات بكتيريا الاكتينوميسيات المنتجة لإنزيم الكيتينيز.

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

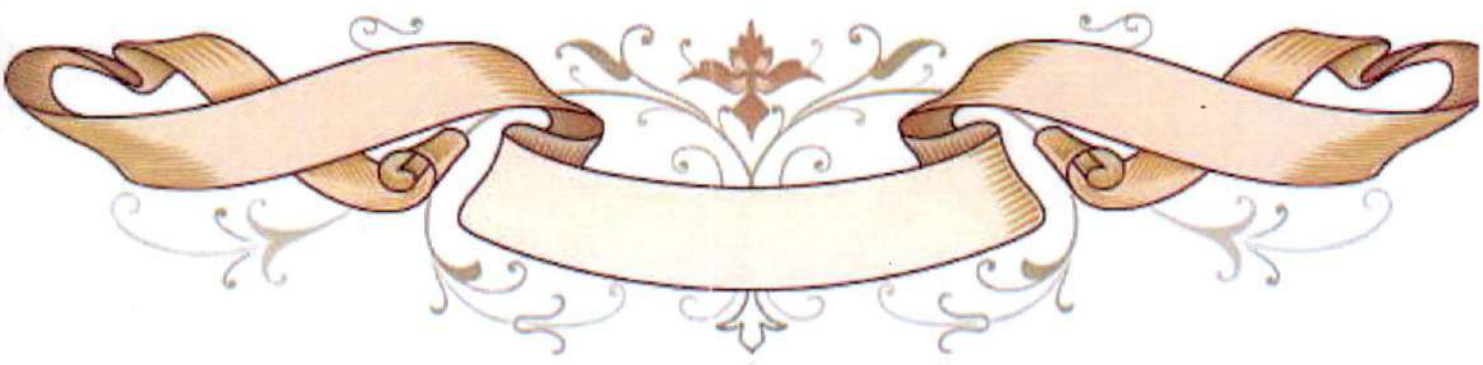
3- تعريف المعزولات المختارة بإستخدام الإختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية.



# الفصل الثاني

## الأبحــاث السابقــة

## Historical Reviews



## 1.2. وصف عام : General Description

يعتبر الكيتين أحد المواد الكربوهيدراتية العديدة و الهامه واسعة الإنتشار في العالم وهي بوليمرات وحدة بنائها N-acetyl glucosamine والتي ترتبط مع بعضها برابطة جليكوسيدية β – 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 بفص سلسلة قصيرة من وحدات بناء مركب الكيتين وهي N-acetylglucose amine وهذة 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 هذة 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 بكتيريا ال (Sasaki et.al.2002) . *Streptomyces*كذلك قسمت هذة الانزيمات إعتمادا على نظام التحليل الذي تتبعه فقسمت إلى 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 وكيتوتريوز 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 وكيتوتريوز 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 الإنتشار بين 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 هذة 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 الحين المسئول عن إنتاج انزيم الكيتينيز من فطر *Trichoderma* spp. إلى النباتات (Carsolio et.al,1999 ) .

عزلت هذة 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 التركيبى للجزيئات الغير متجانسة والتي منعت تحليله داخل الخلية لذلك تفرز الميكروبات هذة 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*, *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Conidiobolus*, *Metharhizium*, *Mucor*, *Beauveria*. 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 لهذة الانزيمات تحتوي الفطريات على إنزيمات أخرى تسمى إنزيمات غير كيتينية وظيفتها إزالة الجليكواسيل من البروتين ومن امثلتها إنزيم acetylglucosaminidases (Stals et al. 2010) endo-β-*N*-.

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*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Beneckea*, *Aeromonas* and *Streptomyces* (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 (2012).Balakrishnan etal. الكيتينيز بواسطة الباحثين

مائة وثلاث معزولة من بكتيريا الاكتينوميسيتات من عشر Prrasomsri et al (2013)

عشر عينات من التربة خمس منها مخلوطة بروث الحيوانات والخمس الأخرى من الحقول ، وتوصولوا إلى أن 97 معزولة تنتمي لبكتيريا ستربتوميسس وباقي المعزولات تنتمي لجنس ميكربيسبورا ومعظمها كانت منتجة لإنزيم لإنزيم Streptomyces الكيتينيز بكميات متفاوتة. هنالك أجناس أخرى غير جنس من التربة(2012) Eman 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 الاستربتوميسس: Genus Streptomyces

يمثل جنس الاستربتوميسس أكثر أجناس الاكتينوميستات عدد إذ يحتوي على أكثر من 500 نوع والتي تختلف عن بعضها في الخصائص المورفولوجية والفسيولوجية البيوكيميائية. يتبع هذا الجنس للعائلة *Streptomycetaceae*, 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 أومدمجة

كذلك تظهر المستعمرات مثل البودرة لها حواف منتظمة لونها ابيض أو كريمي .

وربما تظهر بلون أصفر ، برتقالي ،أحمر وأزرق مخضر تعتبر الستربتوميسس مصادر غنية بالمضادات الحيوية والإنزيمات والجزئيات الحيوية النشطة (Atta,2011).

### 3.2.3.2.2 بكتيريانوكارديا: Genus Nocardia

بكتيريا هوائيه موجبة لصبغة الجرام لها اشكال عصوية اوكروية وتظر بشكل الحرف Y وV تتكاثر بالتجزؤ تتميز مزرعة هذة البكتيريا بشكلها الشمعي ولونها الأبيض وهي بكتيريا خيطية غير متجرثمة للمزرعة شكل مقعر أو محدب ولها

هايفـات قائمـه أو هوائيـة ( Goodfellow,1989). يختلـف شـكل ولـون المستعمرات على حسب البيئة النامية عليها لذلك قد تظهر بلون بني أو أحمر, زهري ,أصفر, قرمزي , أو أسمر . يضم هذا الجنس حوالي 100 نوع ومن اشهر أنواعها Nocardia brasiliensis, Nocardia otitidiscaviarumو Nocardia transvalensis.

## 4.2 . زيادة إنتاج إنزيم الكيتينيز: Optimization of Chitinizem synthesis

كثير من الباحثين درسوا العوامل التي تزيد من إنتاج إنزيم الكيتينيز، فأختبرت عدد من البيئات مثل مرق بيئة الآجار المغذي المزوده ب3%كيتين غروي وبيئة مرق برتاني في هذة الدراسة أختبرت أجناس مختلفة من البكتيريا وأثبت أن الآجار الأخرى المغذي أعطي إنتاج مرتفع عند مقارنته (Anuradha et.al., 2014) بالبيئات كذلك اختلف الباحثون في تركيز مادة التفاعل فالباحثون 11Shanmugaiah et al ,2008 ; Kavi Karunya,20 التركيزالأمثل لإنتاج معدل مرتفع من الإنزيم أن التركيز 2% هو أثبت العوامل2012) Thiagarajan etalو(Balakrishnan etal (2012) درس الباحثون التي تؤثر على إنتاج إنزيم الكيتينيز وتوصل ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج الانزيم هى 30م° و7pH و4% كيتين غروي في بكتيريا ستربتوميسس 6.

## 5.2 . 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 .

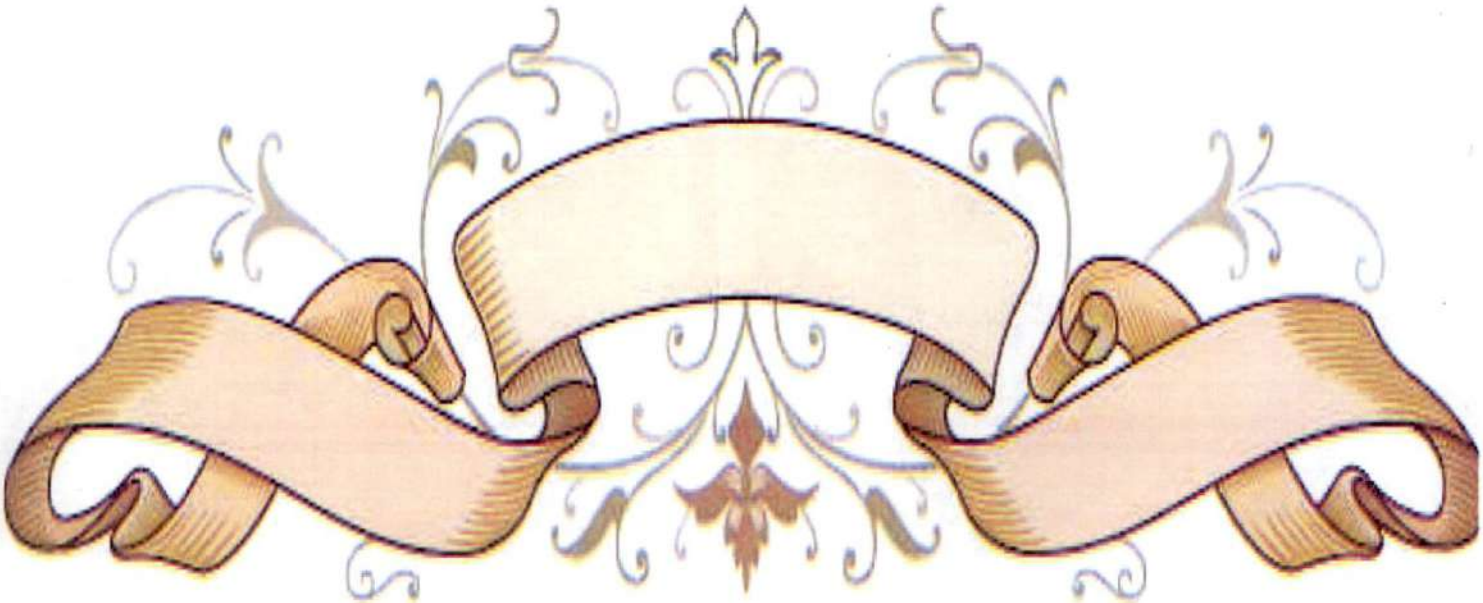
من الخصائص الهامة والمفيدة استخدام الإنزيمات المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة وذلك لأنها تنجز تفاعلاتها الكيميائية في درجات حرارة مرتفعة وبصورة سريعة. كما تساعد على ذوبان المواد المتفاعلة ،تقليل اللزوجه والتلوث الميكروبي .

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 ضرر لها ( Peyvand et al,2013). يعتبر نشاط إنزيم الكيتينيز مؤشر لوجود ونشاط الفطريات في التربة (Peyvand et al,2013) .

اما في مجال الطب فلهذة 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

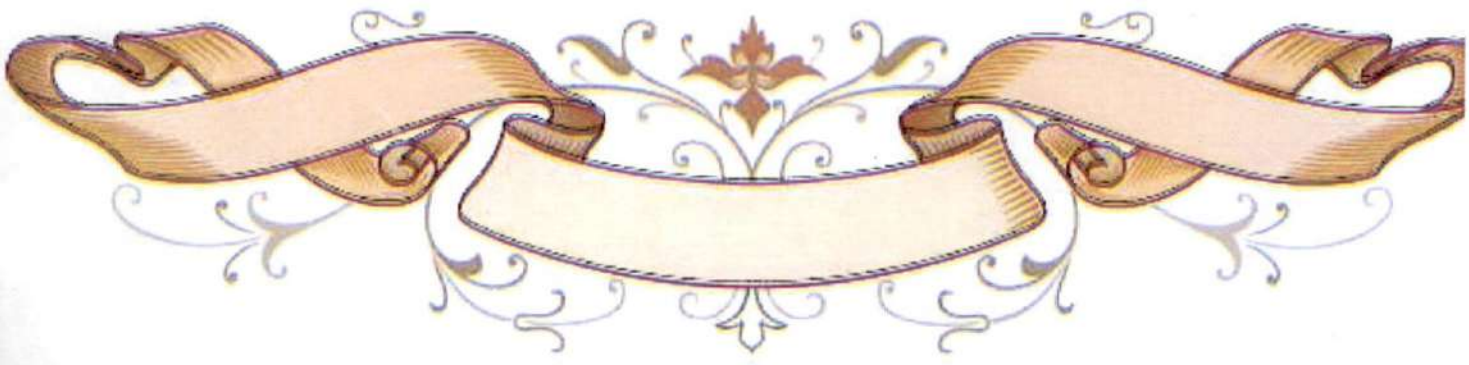
مياة الشرب( Anuradha et al,2013 ) كما يستخدم في مجال الصناعات الغذائية كمادة حافظة آمنة وكمادة مكسبه للطعم ، ويستخدم في صناعة الورق والنسيج كمادة صاقلة (Khor and Lim, 2003).



# الفصل الثالث

## المـــواد والطـــرائق

## Material & Methods



## 1.3. المواد : Materials

### 1.1.3. بكتيريا الاكتينوميستات : Actinomycetes Bacteria

عزلت 6 معزولات بكتيرية من شباك العنكبوت جمعت من مواقع مختلفة بمحافظة الدامر بولاية نهر النيل .

### 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. مسح لمعزولات بكتيريا الاكتينوميستات :

### Screening of Actinomycetes Isolates

جمعت ست عينات من شباك عنكبوت من مواقع مختلفةالدامر، شملت الدامر الحسناب، محطة مياه عطبرة،السكة حديد، الداخلة جنوب، الحصايا وخليوة. جمعت العينات من أشجار موجودة بالمواقع المذكورة أعلاه ووضعت في أكياس معقمه بجهاز الاوتوكلاف عند درجة حرارة 121°C تحت ضغط15 رطل/ بوصة$^2$ ، عقمت خيوط العنكبوت بكحول الإيثانول لمدة خمس دقائق للقضاء على الملوثات الأخرى ثم غسلت بماء مقطر معقم لإزالة أي رواسب من الكحول،بعد ذلك زرعت في بيئة آجار النشا والكازين بيئة خاصة بعزل الاكتينوميسيتات والمكونة من الأتي نشا 10 جرام، كازين 0.3 جرام ،2 جرام NaCl, $MgSO_4$, $K_2HPO_4$ 2, 2, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 0.02, $FeSO_4$, $7H_2O$ 0.01 وآجار18جرام

µ25 سيكلوهكسـلاميد وµ50 nyststin كمضـاد للأجنـاس البكتيريـة الأخـرى والفطريـات علـى التـوالي ولتـر مـاء مقطـر وضـبط ال pH 7.5 بإضـافة HCL أو NaOH، بعد ذلك عقمت البيئـة بواسطة جهاز الاوتوكلاف عند درجة حرارة C 121° و15 رطل / بوصة[2] لمدة 15 دقيقة. ثم وضعت خيوط العنكبوت في منتصف الطبـق وحضـنت الأطبـاق عنـد درجـة حـرارة 37°C فـي حضـانة مـن نـوع Gallenham NO. SCR645 تحـت نظـام إضـاءة: ظـلام ( 12: 12 سـاعة) باستخدام مصـباحي أشـعة فوق بنفسـجية (Philips TLD 18w/08) و أربعـة مصابيح نيون Philips . توبع نمو الستعمرات البكتيرية وأخذت مستعمرة نقية وتم تنقيتها فـي بيئـةآجار النشا والكـازين. بعد ذلـك فحصت الخلايـا البكتيريـة باسـتخدام المجهر الضوئي .

## 3.2.3 . إختيار المعزولات البكتيرية المنتجة لإنزيم الكيتينيز:

## Selection of Bacterial Chitinase Producers

نميت المعزولات البكتيرية في بيئـة اجار الكيتين والمكون من فوسفات الصـوديوم الهيـدروجيني 0.65 جـرام،فوسـفات البوتاسـيوم ثنائيـة الهيـدروجين 1.5 جـرام، كلوريد الصوديوم 0.5 جرام كلوريد الامونيوم 0.25 جرام، كبريتـات 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 الكيتينيزبقيـاس قطـر الهالـة الرائقـة التـي تكونـت حـول النمـو البكتيـري بطريقـة مستخدما العلاقة التالية:1975) (Hankin and Anagnostakis

معامل نشاط إنزيم الكيتينيز= قطر الهالة الرائقة - قطر المزرعة البكتيرية

قطر المزرعة البكتيرية

واستنادا إلى معامل نشاط الإنزيم أختيرت ست معزولات للبحث المتقدم . ونتيجة للفحص المجهري كل المعزولات كانت تنتمي لبكتيريا الاكتينيوميسيتات . وللعمل الروتيني لحفظ العينات المختارة جهزت بيئة مائلة من آجار النشا والكازين ولقحت بالمزارع المختلفة كل على حده وحضنت عند درجة حرارة 37°C. بعد نمو المزارع بالبيئة المائلة بانابيب الإختبار ، حفظت هذة الإنابيب في ثلاجة لحين إستخدامها .

### 4.2.3. الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات

### Morphological and Biochemical Characteristic ofActinomycetes.

درست الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية للمعزولات الست واستخدم كتيب Bergy لتصنيف البكتيريا (Claus and Berkeley,1986 ) .

### 1.4.2.3. الإختبارات المورفولوجية : Morphological Tests

زرعت معزولات الاكتينوميسيتات في بيئة آجار النشا والكازين كما وصفت في تجربة **2.2.3** . لمدة 7 ايام ، درست الصفات المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية ثم جهزت شرائح بكتيرية لدراسة صفاتها 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 علي 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 الانابيب 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 اليه 2% يوريا والدليل أحمر الميثيل ووضعت بانابيب 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. إختزال النترات إلى نتريت : Reduction of Nitrate to Nitrite

جهزت بيئة مرق النترات بإضافة 3 جرام مستخلص لحم ،1 جرام نترات البوتاسيوم، 5جرام ببتون في لتر ماء مقطر ، ضبطت ال pH إلى 7.0 ،ثم قسمت البيئة في انابيب إختبار محتوية على أنابيب درهام وعقمت بواسطة جهاز الاوتوكلاف لمدة 20 دقيقة . بردت الانابيب ثم لقحت بمعزولات بكتيريا الباسيلس وحضنت بحضانة عند درجة حرارة 37°C لمدة 7 – 3 يوم. بعد ذلك أختبرت المزرعة بورقة ترشيح غمست في محلول يوديد البوتاسيوم ، توبع بإضافة نقاط قليلة من 1N HCL. إنتاج لون قرمزي يدل على إنتاج النتريت مع ملاحظة تراكم النترات بانبوبة درهام كما وصفها Claus and Berkeley (1986).

### 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.HCL 25ml . لإنتاج لون زهري إلى أحمر في طبقة الكحول يدل على تكوين الإندول كما وصفها Claus and Berkeley (1986) .

**7.3.4.2.3. تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الكتينيز:**

**Effect of Different Temperatures on Production**

جهزت بيئة الآجار المغذي المحتوي على 0.2% بالكيتين وعقمت بجهاز الاوتوكلاف وصبت باطباق بتري ، ثم لقحت الاطباق بست معزولات من بكتيريا الباسيلس التي أختيرت على اساس نتيجة معامل نشاط إنزيم الكيتينيز، وحضنت الاطباق عند درجات حرارة مختلفة وهي 35°C، 40°C, 45°C، 50°C و55°C و60°C. لوحظ نمو المستعمرات وقيس قطر الهالة الرائقة عند درجات الحرارة المختلفة للمعزولات المختارة .

# الفصل الرابع

## النتائج

## Results

## 1.4. مسح لمعزولات بكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة لإنزيم الكيتينيز:

## Screening of Actinomycetes Isolates for Amylase Production

جمعت ست عينات من شباك العنكبوت الموجودة بمواقع مختلفة بمحافظة الدامر (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 الست أعطت نتائج إيجابية وذلك بتكوين هائلة رائقة حول المزرعة البكتيرية بعد 4 أيام من زراعتها للعينات SUDA1, SUDA2, SUD A3, SUDA 5اما العينتانSUDA4 و SUDA6اعطت هالة رائقة بعد 7 ايام كما وصفت في باب المواد والطرائق .

إستنادا على معامل نشاط إنزيم الكيتينيز أختيرت كل المعزولات البكتيرية للتجارب المتقدمة. كل المعزولات المختارة أعطت معامل نشاط إنزيم الكيتينيز في مدى تراوح بين سم 1.2-2.9 سم ( جدول 2 ولوحة 1). من الجدول واضح أن كل المعزولات منتجة لإنزيم الكيتينيز ، هي,SUDA1, SUDA2, SUD A3

.SUDA6 ، SUDA 5 SUDA4

جدول ( 1) : مسح لبكتيريا الاكتينوميسيتات المنتجة للإنزيم الكيتينيز

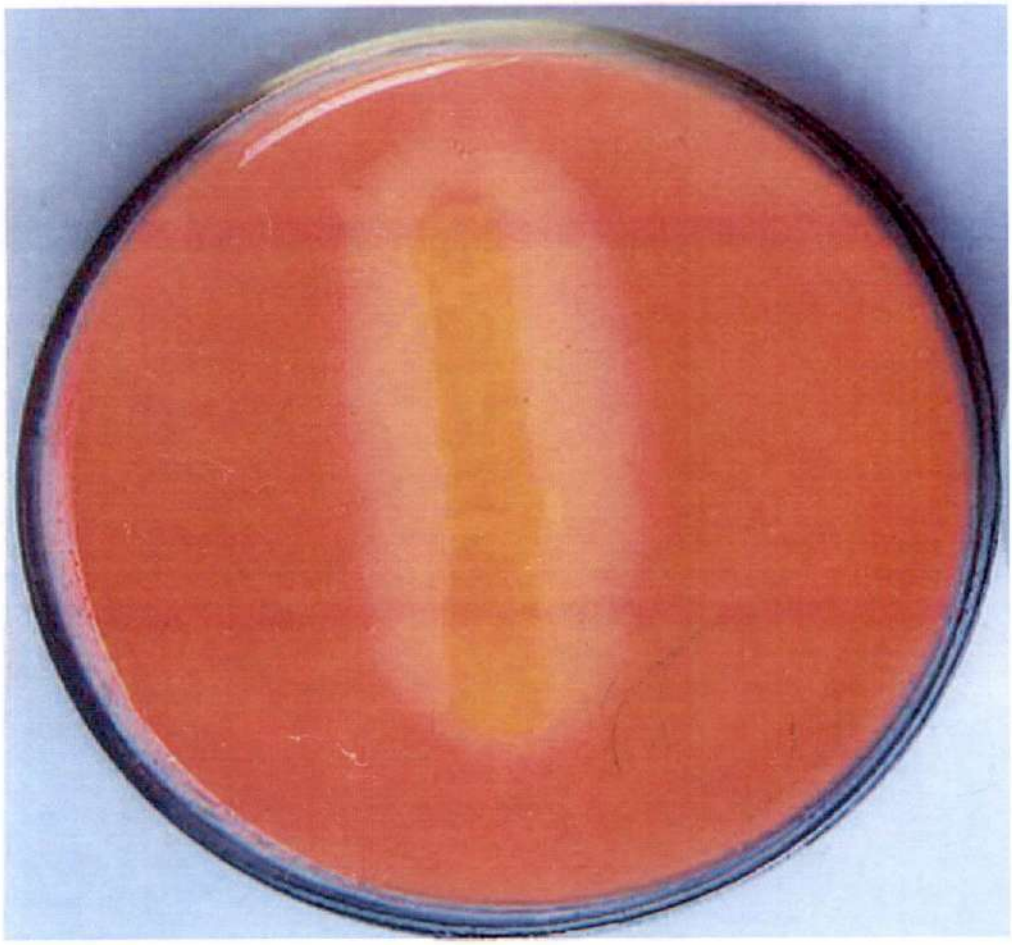
| الرقم المتسلسل | المعزولات البكتيرية | المصدر | إنتاج إنزيم الكيتينيز |
|---|---|---|---|
| 1 | SUDA 1 | الدامر | + |
| 2 | SUDA 2 | محطة مياه عطبرة | + |
| 3 | SUDA 3 | السكة حديد | + |
| 4 | SUDA 4 | الداخلة جنوب | + |
| 5 | SUDA 5 | الحصايا | + |
| 6 | SUDA 6 | خليوة | + |

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

| المتسلسل | المعزولات البكتيرية | معامل نشاط إنزيم الآميليز |
|---|---|---|
| 1 | SUDA1 | 2.3 |
| 2 | SUDA2 | 1.2 |
| 3 | SUDA3 | 2.5 |
| 4 | SUDA4 | 1.0 |
| 5 | SUDA5 | 2.9 |
| 6 | SUDA6 | 1.4 |

اعلي نشاط سجلته المعزولات

SUDA1 (2.3 سم ) ,SUDA3(2.5 سم ) , SUDA5 (2.9) وأقل نشاط سجلته المعزولتانSUDA2 و SUDA6 (1.2 و1.4سم) على التوالي جدول (2)



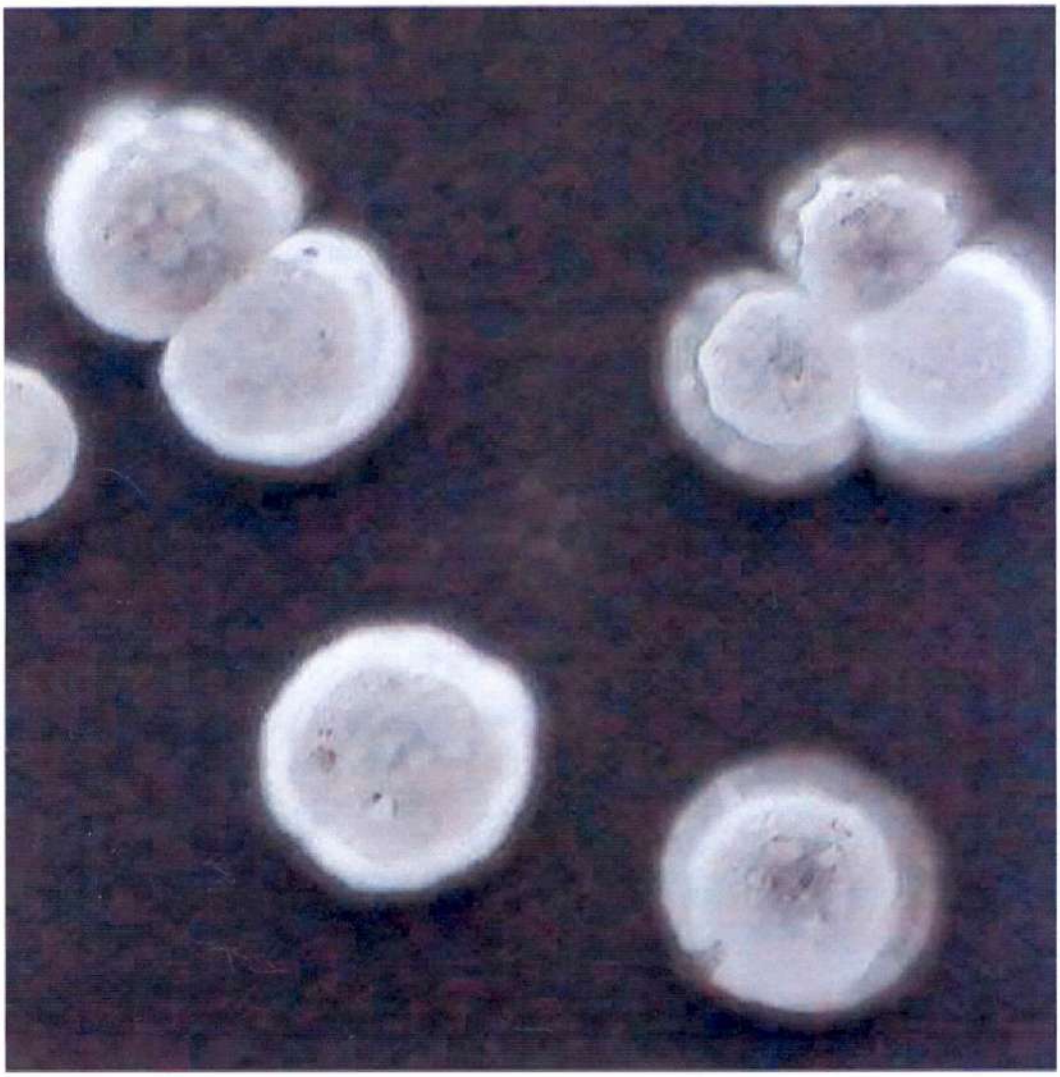
**لوحة (1) : معامل نشاط إنزيم الكيتينيز بتكوين الهاله الرائقة حول النمو البكتيري**

### 2.1.4. تعريف المعزولات البكتيرية : Identification of Bacterial Isolates

كل المعزولات البكتيرية أعطت نتائج إيجابية في تجربة (**1.1.4.** ) ، معزولات SUDA1, SUDA3,SUDA4 SUD5 كانت موجبة لصبغ الجرام ، خلاياها خيطية الشكل متجرثمة كونت كونيدات في سلسلة بيضاوية ما عدا SUDA5 جراثيمها حلزونية. المعزولة SUDA1 كونت مستعمرات صفراء اللون ثم تحولت إلي لون زهري في بيئة آجار النشا والكازين المضاف اليها صبغة ال Rose Bengal اما المعزولتان SUDA3,SUDA4 كونت مستعمرات لونها أخضر مزرق والمستعمرة SUDA5 كونت مستعمرة بيضاء شمعية أو لون زهري فاتح قطرها عدة سنيتمرات وحافتها متموجة .اما نتيجة الإختبارت البيوكيميائية فكل المعزولات المذكورة سابقا منتجة لإنزيم الكتاليز، اليوريزو الاندول وال $H_2S$ وموجبة لإختزال النترات وسالبة لإختبار فوكس .. جدول (3) وشكل (2) .

المعزولات البكتيرية SUDA2 و SUD A6 تشابه بعضها في معظم الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية . لها مستعمرات لونها بني كريمي، شكلها غير منتظم ،الحواف بعد 10 ايام من نموها اصبحت غامقة في لونها وعند فحصها بالمجهر الضوئي ظهرت ظهرت خيطية في شكل الحرف Y وV مجزئة إلي أشكال عصوية قصيرة وطويلة غير متجرثمة. هذة المعزولات موجبة لإختباري الكتاليزواليوريز والكازين وسالبة لإختبار الفوكس بروسكاور والاندول وال$H_2S$ جدول( 3) وشكل (4).

شكل (2) : شكل مستعمرة SUDA1 في بيئة آجار النشا والكازين المضاف اليها صبغة الروز بنغال



شكل (3): مستعمرات للمعزولة SUDA5

**شكل (4): شكل مستعمرة المعزولتان SUDA2 وSUDA6**

جدول (3) : الصفات المورفولوجية والبيوكيمائية للمعزولات البكتيرية المنتجة لإنزيم الكيتينيز

| الخواص | SUDA 1 | SUDA 2 | SUDA 3 | SUDA 4 | SUDA 5 | SUDA6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| وجود أوعدم وجود جراثيم | + | - | + | + | + | _ |
| شكل الجراثيم | + | - | + | + | * | - |
| إنتاج الكتاليز | + | + | + | + | + | + |
| إختبار فوكس بروسكاور | - | - | - | | - | - |
| إنتاج اليوريز | + | + | + | + | + | + |
| الكازين | - | + | - | - | - | + |
| إنتاج $H_2S$ | + | - | + | + | + | - |
| تكوين الإندول | + | - | + | + | + | - |
| إختزال النترات إلى نيتريت | + | - | + | + | + | - |

وجود الجراثيم : +
عدم وجود الجراثيم: -
شكل الجراثيم الداخلية : بيضاوية - حلزونية *

### 3.1.4. تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الكيتينيز

### Effect of Temperature on Chitinase Production

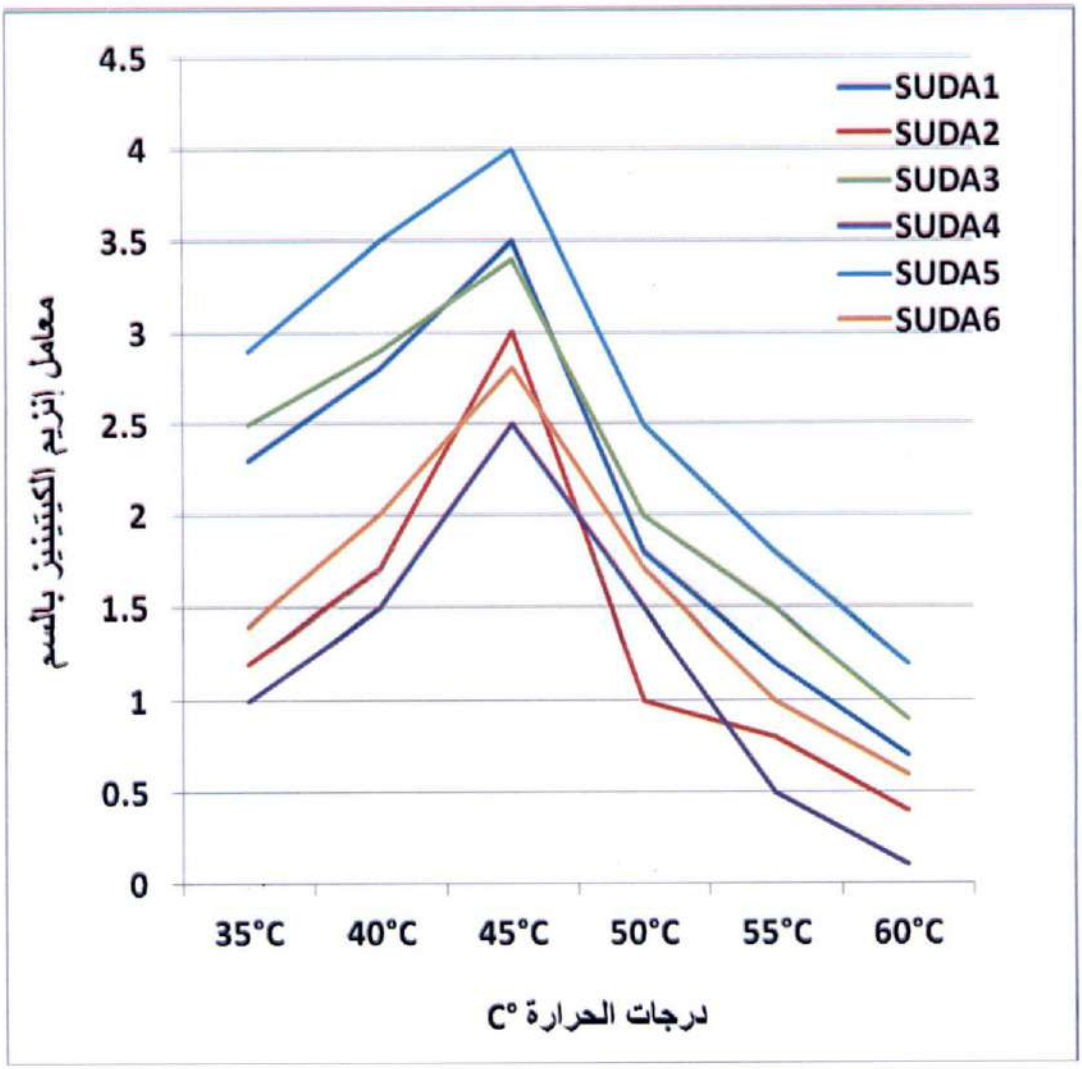
أختيرت أربع معزولات بكتيرية والتي سجلت أعلى معامل لإنزيم الكيتينيز لإجراء هذة التجربة عليها . أختبر نمو المعزولات وحسب درجة معامل نشاط إنزيم الكيتينيز عند درجات حرارة مختلفة شملت60°C و 55°C,50°C, 45°C, 40°C, 35° C .

زرعت المعزولات البكتيرية في بيئة آجار الكيتين المزود ب 0.2% كيتين غروي وقيس قطر الهاله الرائقه والتي تحدد معامل نشاط إنزيم الكيتينيز عند كل درجة من درجات الحرارة المختلفة ومثلت النتائج في جدول (4 ) وشكل (1) .

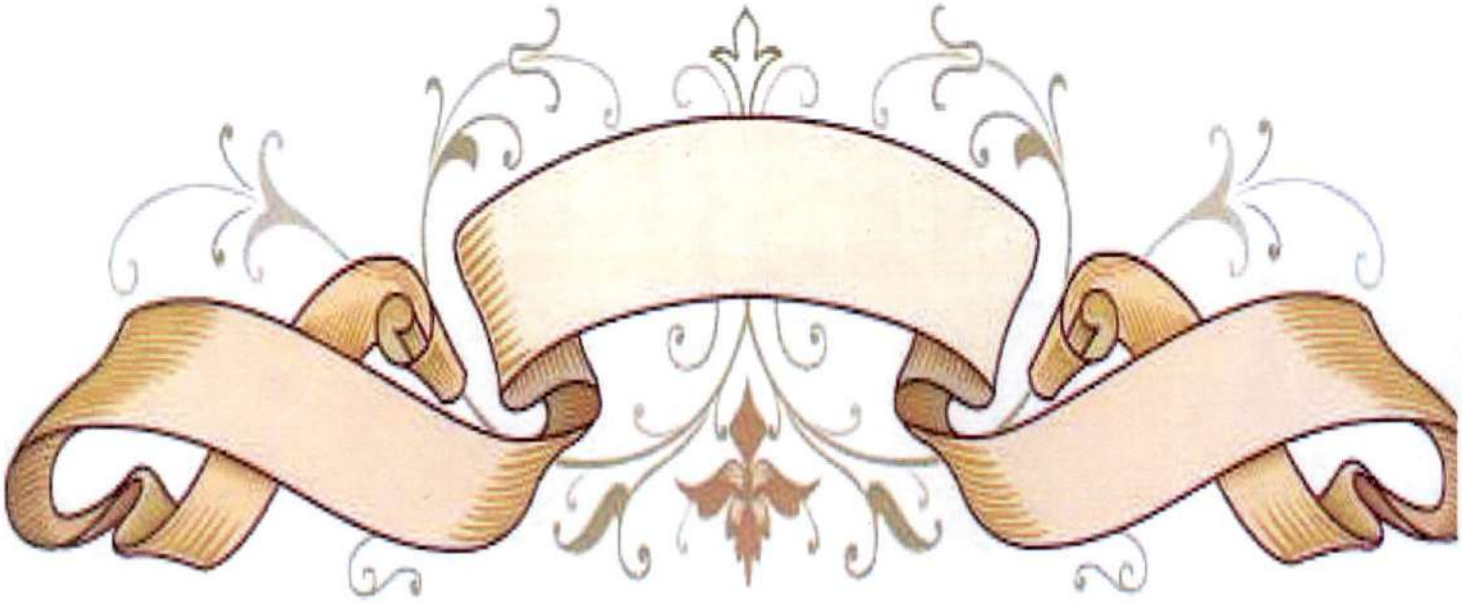
يوضح جدول (4) وشكل (1)أن كل المعزولات سجلت نشاط عالي لمعامل إنزيم الكيتينيز عند درجة حرارة 45°C وهى 2.8 ,3.0 4.03.5 ,2.5 ,3.4 , للمعزولات ابتداء من SUDA1-SUDA6على التوالي وأقل نشاط سجل عند درجة حرارة 60 °C للمعزولتين .SUDA4,SUDA2 (0.8و 0.5) على التوالي اما باقي المعزولات تراوحت فيها القراءات بين 1.0- 1.8سم جدول (4).

جدول (4) : تأثير درجات الحرارة المختلفة على معامل نشاط إنزيم الكيتينيز

| درجات الحرارة المختلفة °C | | | | | المعزولات البكتيرية |
|---|---|---|---|---|---|
| 55°C | 50°C | 45°C | 40°C | 35°C | |
| 1.2 | 1.8 | 3.5 | 2.8 | 2.3 | SUDA 1 |
| 0.8 | 1.0 | 3.0 | 1.7 | 1.2 | SUDA 2 |
| 1.5 | 2.0 | 3.4 | 2.9 | 2.5 | SUDA 3 |
| 0.5 | 1.5 | 2.5 | 1.5 | 1.0 | SUDA 4 |
| 1.8 | 2.5 | 4.0 | 3.5 | 2.9 | SUDA5 |
| 1.0 | 1.7 | 2.8 | 2.0 | 1.4 | SUDA6 |



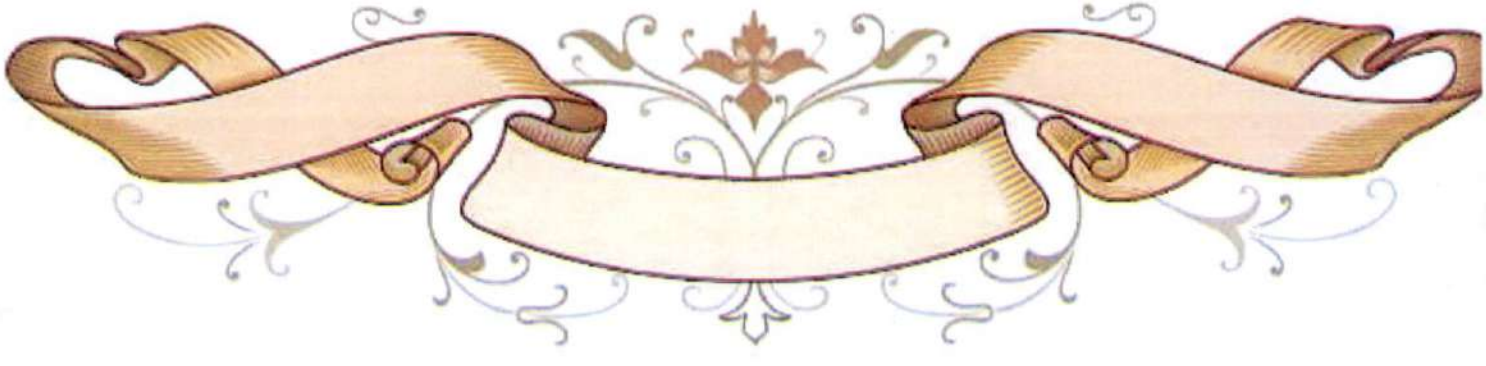

**شكل (1) : تأثير درجات الحرارة على معامل إنزيم الكيتينيز**



# الفصل الخامس

## المناقشة

## Discussion



## 1.5 المناقشة

## Discussion

جمعت عينات شباك عنكبوت من أشجار بمواقع مختلفة بمحافظة الدامر وذلك لعزل معزولات بكتيرية منتجة لإنزيم الكيتينيز .

نتائج هذة الدراسة اوضحت أن كل عينات المعزولات كانت إيجابية ،كونت هالة رائقة حول النمو البكتيري (جدول 1) . ثم قيس قطر الهالة الرائقة للمعزولات الإيجابية والتي تحدد معامل نشاط إنزيم الكيتينيز ، هذة النتائج تشابة تلك التي تحصلت عليها الباحثين Balakrishnan et al (2012) في الدراسة التي أجراها على معزولات مختلفة من بكتيريا الاستربتوميسس وتوصل إلى أن هذة المعزولات سجلت معدلات متقاربة لمعامل نشاط انزيم الكيتينيز والتي تراوحت بين 1.0 -2.9 سم معزولة عند درجة حرارة 37°C ، أعلى معدل لنشاط إنزيم الكيتينيز كان 4.0 والذي سجل بواسطة المعزولة SUDA5 عند درجة حرارة 45°C ثم المعزولتين SUDA1 و SUD3 ( 3.5 و 3.4) على التوالي .

كذلك درست الصفات المورفولوجية والبيوكيميائية للمعزولات الست كما وصفها الباحث Claus and Berkeley (1986). وبناء على هذة الخصائص تشابهت المعزولات SUDA1 ، SUDA3 ، SUDA4 وSUDA5 بنسبة أكثر من 90% لخواص بكتيريا ***Streptomyces* sp.** تقطن هذة البكتيريا بصورة رئيسية في التربه ، وهي هوائية التنفس موجبة لإختباري الكتاليز ,,اليوريبزومنتجة ل H2S وتختزل النترات وسالبة لإختبار الفوكس بروسكاور والجراثيم بيضاوية تنتظم في سلسلة وهي عبارة عن كونيدات ما عدا المعزولة SUDA5 فكانت كونيداتها حلزونية . كل هذة الصفات ادت إلى تصنيف هذة المعزولات إلى بكتيريا *Streptomyces* sp. هذة 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 Kavi et al (2011) نفس الخصائص وصنفت كبكتيريا Streptomyces sp. وهي من البكتيريا المنتجه لإنزيم الكيتينيز .

اما المعزولتان SUDA2 وSUDA6 تشابهت في خصائصهما المورفولوجية والبيوكيميائية وعند مقارنتهما بتصنيف Claus and Berkeley, (1986) سجلت أكثر من 85% من خواص بكتيريا *Nocarida* sp. والتي تتميز بمستعمراتها البنية الفاتحة ولها نمو يشبه البودرة،غير متجرثمة وخيطية لها شكل الحرف Y أو V تتكاثر بالتجزؤ منتجة وحدات عصوية ، موجبة لإختبار الكتاليز واليوريبزوسالبة لإختبار الفوكس بروسكاور لا تختزل النترات ولا تنتج ال H2S. عزلت معزولات لهذة البكتيريا في أماكن مختلفة من العالم فعزل الباحث Arifuzzaman et al (2010) معزولات تنتمي لبكتيريا الاكتينوميسيتات من التربة في البنغال وعرفت إحدى هذة المعزولات بالنوكارديا والتي تشابهت مع هذة المعزوله تحت الدراسة كما وصفها(Goodfellow, (1989 والتي تنتج إنزيم الكيتينيز والذي سجل أعلى نشاط عند درجة حرارة 50°C. اما بالنسبة لمعدل نشاط إنزيم الكيتينيز بطريقة الأطباق المصبوبة كل المعزولات سجلت أعلى معامل لنشاط إنزيم اكيتينيز عند درجة حرارة 45°C. هذة النتائج تشابه تلك التي سجلها عدد من الباحثين ،ففي كوريا عزل الباحثون Purwani et al.(2004) بكتيريا *Streptomyces* sp. والتي سجلت أعلى نشاط انزيم الكيتينيز عند درجة حرارة 50°C .

## 2.5 الخلاصة

## Conclusion

في هذة الدراسة عزلت ست معزولات بكتيرية ، وفحصت وعرفت بأنها تنتمي لمجموعة الاكتينوميسيتات. أختبرت لإنتاجها لإنزيم الكيتينيز فكانت كل المعزولات منتجة لهذا الإنزيم وأختبرت المعزولات لإجراء التجارب المتقدمة . عرفت الست معزولات فكان أربعة منها تنتمي لجنس *Steptomyces* sp. والمعزولتين الأخريتين *تنتمي لجنس* *Nocardia* sp. . أختبرت درجات الحرارة المختلفة لتحديد أعلى معامل لإنزيم الكيتينيز، فكل المعزولات سجلت أعلى نشاط عند درجة حرارة 45°C. و هذة النتائج أثبتت أن السبع معزولات تنتج معدل عالي لنشاط الإنزيم وهي محبة لدرجات الحرارة العالية وتعتبر معزولات واعدة لإستخلاص كميات وفيرة من الإنزيم.

## 3.5 التوصيات

## Recommendations

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

- 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 .

## 4.5 المراجع

## Reference


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 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., Minhaj A. , Mahboob A. , Malik M., Ahmad Malik Z., Abdin l 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 *Bacillus 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 from shrimp 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.