المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة باستخدام انزيم الكيتينيز المنقي والمعرف من البكتيريا

الطالب

عفراء محمد عبدالقادر عبدالوهاب بغدادي

المشرفين

أ.د. ماجدة محمد علي

أ.د.أمنه علي ناصر صديق

المستخلص العربي

تحتل الأنزيمات المحلله للكيتين أهمية كبيره في تطبيقات التقنية الحيوية الخاصة بها. فهي إنزيمات تؤدي إلى تحلل الكيتين وتساهم في توليد الكربون والنيتروجين في النظام البيئي. تنتج الكائنات الحية الدقيقة انزيم الكيتينيز، الذي يثبط نمو العديد من الأمراض الفطرية التي تشكل تهديدًا خطيرًا لإنتاج المحاصيل العالمية. تركز كثير من الابحاث علي دراسه الأنزيمات محلله للكيتن. الهدف من هذه الدراسة هو إنتاج وتوصيف انزيم الكيتينيز من البكتيريا و الاكتينومايسيتات المعزولة في المنطقة الغربية، المملكة العربية السعودية. تم تحضير الكيتين الغروي من قشور الروبيان واستخدمه كمصدر كربوني ونتروجيني لعزل البكتيريا المحلله للكيتين والموجوده في مصادر مختلفة. كانت العزلات الأكثر نشاطا هي AMM1 التي تم تعريفها على أنها *Alcaligenes aquatilis* والعزله AMB8 والتي تم تعريفها باسم *Kitasatosporia* sp. وتم التأكد من التعريف باستخدام 16S rRNA. بالنسبة لبكتيريا *Alcaligenes aquatilis*، كان أقصى إنتاج للأنزيم عند 35°م، باستخدام بيئة مرق الكيتين المعدني السائله B (pH7.0), يحتوي على مستخلص الخميرة (5 جرام / لتر) و جلكوز (2.5 جرام / لتر) مع 15 جرام / لتر من الكيتين وتم تلقيحة باستخدام $6x10^6$ CFU/ml. وبالمثل،

لبكتريا *Kitasatosporia* sp كان الإنتاج الأقصى من الإنزيم عند 30°م، باستخدام مرق الكيتين المعدني (pH7.0) B، المحتوي على مستخلص الخميرة (5 جرام / لتر) و جلكوز (2.5 جرام / لتر) مع 10 جرام / لتر كيتين وتم تلقيحة باستخدام $4x10^4$ CFU/ml.

تم استخلاص الانزيم وتنقيته وتعريفه. وكان أقصى نشاط لا نزيم البكتيريا النقية عند 35°م، ودرجة الحموضة 7 ، مع تركيز الانزيم 3 ٪ وتركيز مادة التفاعل 0.6 ٪. وجد أن الإنزيم النقي تأثر بوجود بعض الأيونات المعدنية. أما بالنسبة لـ *Kitasatosporia* sp.، كان أقصى نشاط للأنزيم هو 30°م، ودرجة الحموضة 7، وتركيز الأنزيم 3٪، و مادة التفاعل 0.6٪. وجد أن الإنزيم النقي تأثر بوجود بعض الأيونات المعدنية. تم تحديد الوزن الجزيئي للكيتينيز. استخدم انزيم الكيتينيز التي تم الحصول عليه من الكائنات المختارة في تثبيط انبات جراثيم ونمو 6 فطريات مختلفه لذلك يمكن استخدامه في عملية المكافحة البيولوجية.

Biocontrol of some fungal pathogens using purified and characterized bacterial Chitinase

By

Afraa Mohammed Abdel Qader Baghdadi

Supervised by

Prof. Dr. Magda Mohammed Aly

Prof. Dr. Amna Ali Nasser Saddiq

Abstract

Chitin and chitinolytic enzymes are gaining importance for their biotechnological applications. Chitinases are enzymes that degrade chitin and contribute to the generation of carbon and nitrogen in the ecosystem. Microorganisms are producing Chitinases, which can inhibit the growth of many fungal diseases that pose a serious threat to global crop production. Currently, efforts are being made to discover producers of chitinolytic enzymes that degrade chitin. The aim of this study was production and characterization of thermo-tolerant Chitinase from bacteria and actenomycets, isolated from western region, Saudi Arabia. Colloidal chitin from shrimp shells was prepared and used for isolation of chitinolytic bacteria on Mineral chitin agar medium from different sources. The most active isolates were AMM1 which was characterized and identified as *Alcaligenes aquatilis* and AMB8 which was identified as *Kitasatosporia* sp. The identification was confirmed using 16SrRNA. For *Alcaligenes aquatilis*, maximum enzyme production was carried out at 35°C, using Mineral chitin broth medium B (pH7.0), containing yeast extract (5 g/l), Glucose 2.5 (g/l), chitin (15 g/l) and inoculated with $6x10^6$ CFU/ml. For *Kitasatosporia* sp., maximum enzyme production was at 30°C, using Mineral chitin broth medium B (pH 7.0), containing yeast extract (5 g/l) and Glucose 2.5 (g/l), chitin (10 g/l) and inoculated with $4x10^4$ CFU/ml.

The enzyme was extracted, purified and characterized. Maximum activity of the pure bacterial enzyme was at 35ºC, pH 7, with enzyme concentration of 3% and substrate concentration of 0.6. For the enzyme of *Kitasatosporia* sp., maximum activity was at 30ºC, pH 7, enzyme concentration of 3% and substrate concentration of 0.6 %. It was found that the two tested enzymes were affected by the presence of metal ions. The molecular weight of the two tested Chitinases were determined. The obtained Chitinases were used to inhibit spore germiatiom and fugal growth of 6 tested fungi, thus it can be used in biocontrol process.