دراسات وراثية وتقنيات حيوية على البكتيريا المنتجة لإنزيم الكيراتينيز فى محافظة الفيوم، مصر

رسالة مقدمة من

زينب النايض حماده علوانى

بكالوريوس العلوم الزراعية (برنامج الإنتاج الحيوانى)

كلية الزراعة – جامعة الفيوم

كجزء من متطلبات الحصول على درجة

الماجستير

فى

العلوم الزراعية

(تخصص الوراثة)

قسم الوراثة

كلية الزراعة

جامعة الفيوم

مصر

٢٠٢٢

الملخص العربى

يشكل تراكم الريش الذى ينتج بكمية كبيرة كل عام كمخلفات ونفايات الدواجن مشكلة كبيرة فى التخلص منه ويؤدى الى تلوث البيئة. ويعتبر التحليل المائي للريش هو الحل الواعد لحل هذه المشاكل. علاوة على ذلك، فهو مهم إقتصاديًا لأن ريش الدجاج يتكون من حوالي ٩٠٪ من الكيراتين الذي يمكن تحويله إلى منتجات ثانوية قيمة. حيث يتطلب التحلل البيولوجي للكيراتين إنزيم الكيراتينيز الذي يمكن أن تنتجه بكتيريا معينة كمنتج خارج الخلية. أجريت الدراسة الحالية بقسم الوراثة - بكلية الزراعة - جامعة الفيوم - مصر خلال الفترة من ٢٠١٧ - ٢٠٢١ بهدف:- (١) عزل البكتريا المحللة للريش من ريش الدجاج والتربه من مناطق مختلفة من بمحافظة الفيوم. (٢) إختيار العزلات البكتيرية ذات الكفاءة العالية فى تحليل الريش. (٣) التعريف لهذه العزلات بناء على الصفات المورفولوجيه والبيوكيميائيه. (٤) التعريف الجزيئى للعزلات بناء على تحليل الـ16S rDNA. (٥) التوصيف الجزيئى للسلالات بإستخدام تكنيك ال RAPD-PCR. (٦) عزل وإكثار جين الكيراتينيز.

ويمكن تلخيص اهم النتائج المتحصل عليها فى الاتى:-

١. تم الحصول على ٣٢ عزلة بكتيرية من فضلات الريش والتربة وفحص قدرتها على تحلل الكيراتين. كانت أفضل العزلات FAK13 وFAK25 وFAK18 وFAK16 وFAK27 بمناطق تحلل واضحة تبلغ ٢٨,٧ و٢٧,٥ و٢٧,٢ و٢٧,١ و٢٥,٤ mm على التوالي. وبمعدل تحلل للريش يبلغ ٥ لـFAK25 متبوعًا بالعزلات FAK13 و FAK16 و FAK27 و FAK18 حيث أعطت ٣,١٦ ، ٢,٣٤ ، ٢,١ ، و ٢ وحدة/مل على التوالي.
٢. أظهرت الإختبارات المورفولوجية أن جميع العزلات كانت عصويات طويلة، موجبة لجرام، متحركة ومكونة للجراثيم.
٣. أثبتت الإختبارات البيوكيميائية أن جميع العزلات كانت موجبة لإنتاج إنزيمات الكازينيز والكتاليز. كذلك، الجيلاتينيز. وجميع العزلات تحلل النشا (بإستثناء FAK18). ومع ذلك، لم تحلل جميع العزلات الدهن ماعدا FAK25. وجميع العزلات تخمر سكر الجلوكوز واللاكتوز والفركتوز والمانيتول (باستثناء FAK25) لم تخمر سكر المانيتول.
٤. تم تعريف العزلات الخمس بناءًا على خصائصها الجزيئية مقارنة بالسلالات الأخرى. وتم بناء شجرة القرابة الوراثية بناءًا على تسلسل النيوكليوتيدات لجين 16 S rDNA للعزلات. وتم تحديد العزلات FAK13 وFAK16 وFAK18 وFAK25 وFAK27 على أنها *Bacillus thuringiensis* و*Bacillus Velezensis* و*Bacillus Megaterium* و *Bacillus Subtilis* و*Bacillus licheniformis* على التوالي. وتم تسجيلهم في GenBank بأرقام الانضمام MK788291 وMK788292 وMK788293 وMK788294 وMK788295 على التوالي.

٥. تم عزل الحمض النووي الجينومي للسلالات الخمس وتم تحليلها بإستخدام تكنيك ال RAPD-PCR باستخدام ثمانية بادئات عشوائية. وأنتجت جميع البادئات تعدد أشكال مظهرية خاصة بأصل الأنواع والعلاقات بين السلالات. وتم تكوين ٥٨ حزمة متعددة الأشكال المظهرية وأحادية الشكل المظهرى. وأظهرت شجرة القرابة الوراثية أن السلالات FAK13 وFAK18 كانت مرتبطةإرتباطًاوثيقًا، بينما كانت السلالات FAK27 وFAK16 بعيدة جدًا.

٦. تم استخدام أزواج البادئات الخاصة بالكيراتينيز KerNma وKerAwt للكشف عن وعزل جين الكيراتينيز. حيث كشف التضخيم باستخدام البادئ KerNma أن سلالة FAK27 تمتلك جين Ker بوزن جزيئى يبلغ ١١٩٠ زوج من القواعد، بينما كشف التضخيم بإستخدام البادئ KerAwt أن سلالة FAK25 لها وزن جزيئى يبلغ ١٠٥٠ زوج من القواعد.

التوصيات:-

١. من المرجح أن يتم تطبيق التحلل البيولوجي لإعادة التدوير الفعال والاقتصادي لريش الدجاج.

٢. ولهذا الغرض ، يوصى بشدة بالعزلات الخمس الأصلية التالية (*Bacillus thuringiensis, Bacillus Velezensis, Bacillus Megaterium, Bacillus Subtilis and Bacillus licheniformis*) لأنها ذات نشاط عالى فى إنتاج الإنزيم

٣. تختلف إنزيمات الكيراتينيز من الناحية الوراثية عن بعضها البعضنظرًا لأنها مشفرة من قبل العديد من الجينات.

٤. تم عزل إثنين من جينات الكيراتينيز بإستخدام زوجين من البادئات وينصح فى المستقبل بعمل نقل لهذه الجينات فى أنواع اخرى لتحسين إنتاج الإنزيم وللإستفادة منها من الناحية التطبيقية.