مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره اول (پیاپی ۱۸) بهار ۱۳۹۳
صفحات ۷۴-۶۶

Original Article

جداسازی، شناسایی و ارزیابی پتانسیل ضد قارچی باکتری های تجزیه کننده کیتین جدا شده از خاک ریزوسفر گیاهان

طاهره صلاحی نژاد*[۱]، زهیر حشمتی پور[۲]، مسعود هاشمی کروئی[۲]

[۱] کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: کیتیناز یکی از مهم ترین آنزیم‌های صنعتی می باشد که در سال های اخیر به دلیل کاربرد وسیع، به ویژه در کنترل زیستی قارچ های بیماری زا مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده کیتین از خاک ریزوسفر گیاهان و نیز بررسی میزان پتانسیل ضد قارچی آنها انجام شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۳۸ نمونه خاک از ریزوسفر بوته های چای، شعمدانی و شبدر به صورت تصادفی جمع آوری گردید. پس از تعیین رقت و کشت نمونه ها بر روی محیط کیتین کلوئیدال آگار (CCA)، جدایه های دارای هاله شفاف انتخاب شدند. سنجش آنزیم کیتیناز با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. پتانسیل ضد قارچی باکتری های جداسازی شده علیه قارچ *فوزاریوم سولانی* مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، تعیین هویت مولکولی سویه ها با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز و تعیین توالی ناحیه 16S rRNA انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه تنها یک سویه جدید به نام *سراشیا* سویه صلاحی با فعالیت تجزیه کنندگی کیتین جداسازی گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی این سویه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و پس از ۴ روز معادل ۴/۳۷ U/ml بود. همچنین فعالیت ضد قارچی این باکتری با هاله عدم رشد ۱/۵ سانتی متر به اثبات رسید.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که این سویه جدید پتانسیل کاربرد به عنوان یک آفت کش طبیعی محصولات زراعی، جایگزین آفت کش های سنتزی و سرطان زا را دارد.

کلمات کلیدی: کیتیناز، پتانسیل ضد قارچی، *فوزاریوم سولانی*، 16S rRNA

دریافت مقاله: تیرماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: مهرماه ۹۲

مقدمه

کیتین، پلی ساکارید خطی با پیوند بتا (۱ به ۴)، ترکیب اصلی دیواره سلولی قارچ ها و اسکلت های بی مهرگان مانند حشرات و سخت پوستان می باشد. کیتین از مونومرهای N–استیل گلوکز آمین تشکیل شده است (۱ و ۲). این ترکیب بسیار پایدار بوده و به عنوان بیشترین بیوپلیمر موجود در طبیعت پس از سلولز شناخته می شود (۳). آنزیم های کیتیناز نوعی گلیکوزیل هیدرولاز با قدرت کاتالیز هستند که با شکست پیوند گلیکوسیدی بتا (۱ به ۴) در بین واحدهای N–استیل گلوکز آمین می توانند پلیمر کیتین را به اولیگوساکاریدهای کیتینی، تجزیه نمایند (۴). کیتینازها یکی از مهم ترین آنزیم های صنعتی می باشند که در صنایع کشاورزی، صنایع غذایی، کنترل حشرات، داروسازی، پزشکی، بیوتکنولوژی، پاکسازی محیط زیست، تولید پروپلاست قارچی، تولید واحدهای پروتئین سلولی برای حیوانات و تغذیه موجودات آبزی (۵) و نیز در

* آدرس برای مکاتبه: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۱۱۹۶۱۵۹۳ پست الکترونیک: soheyla_salahi@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

کنترل قارچ های پاتوژن گیاهی و آفات کاربردهای بسیار مهمی دارند (۶). کیتینازها می توانند عامل مؤثری در مهار زیستی قارچ های بیماری زای گیاهی (فیتوپاتوژن) باشند (۷). در سال های اخیر کیتینازها به دلیل توانایی در از بین بردن کیتین دیواره سلولی قارچی و اسکلت خارجی حشرات، به عنوان عوامل ضد قارچی و حشرات شناخته شده اند (۸).

مطالعات نشان داده است که باکتری های مختلفی از قبیل *آئرومونا‌س، باسیلوس، سراشیا، ویبریو، انتروباکتر، سودوموناس* و *استرپتومایسز* قادر به تولید آنزیم کیتیناز می باشند (۱۸). امروزه محققین توانسته اند انواع مختلفی از این باکتری های هیدرولیز کننده کیتین را از منابعی مانند دریاچه های مختلف جهان (۹)، خاک ریزوسفر برنج (۱۰)، خاک ریزوسفر فلفل (۱۱)، استخر های پرورش میگو و خرچنگ (۱۲) جداسازی نمایند. از آنجایی که این باکتری ها با تولید آنزیم های لاکتیک و متابولیت های ثانویه بر علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری زای قارچی عمل می کنند می توان آنها را به عنوان یک آفت کش نیز به شمار آورد (۱۳). به عنوان مثال قارچ *فوزاریوم سولانی* (*Fosariom solani*) باعث پوسیدگی طوقه در گوجه فرنگی و سیب زمینی و بسیاری از گیاهان پروانه آسا می شود. این گونه را می توان از دماوند که منطقه مهم سیب زمینی کاری است ، به عنوان علل پوسیدگی خشکی سیب زمینی معدنی جدا کرد. ایجاد شانکر و مرگ سرشاخه ها در درختان نیز از این گونه گزارش شده است (۱۹). این باکتریها با داشتن فعالیت ضد قارچی خود مانع از انجام فعالیت این نوع قارچ می شوند. هدف از این مطالعه جداسازی و تشخیص باکتری های تجزیه کننده کیتین از خاک ریزوسفر گیاهان و پتانسیل ضد قارچی آنها در برابر قارچ بود.

مواد و روش ها

الف) جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم ها: در این مطالعه ۳۸ نمونه خاک از ریزوسفر بوته های چای، شعمدانی و شبدر در فصل بهار، سال ۱۳۹۲، از مناطق غربی استان مازندران شهر تنکابن جمع آوری گردید. پس از تهیه رقت، از رقت های 10^{-5}،10^{-6}،10^{-7} در محیط LB (Luria-Bertani) به صورت سفره ای کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس کلنی های رشد یافته بر روی محیط LB که از نظر اندازه و شکل متفاوت بودند انتخاب گردیدند (۱۴).

به منظور جداسازی باکتری های تجزیه کننده کیتین از محیط کشت CCA (chitin colloidal agar) حاوی ۰/۵ درصد کیتین کلوئیدال، ۰/۲ درصد Na_2HPO_4، ۰/۱ درصد KH_2PO_4، ۰/۱ گرم NH_4Cl، ۰/۰۵ درصد NaCl، ۰/۰۵ درصد $MgSO_4\ 7H_2O$، ۰/۰۵ درصد $CaCl_2\ 2H_2O$، ۰/۰۵ درصد عصاره مخمر و ۲ درصد آگار استفاده شد. نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز گرماگذاری گردیدند. در طول این مدت وجود یا عدم وجود هاله مبنی بر هیدرولیز کیتین در اطراف کلنی ها بررسی شد (۱۵).

کیتین کلوئیدال مطابق با روش هسو (Hsu) و همکاران از کیتین استخراج شده از پوسته خرچنگ (sigma USA) به دست آمد. (۱۶).

ب) بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز: به این منظور، در ابتدا باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط مایع کیتین کلوئیدی(CCB) کشت داده شد. سپس فعالیت آنزیمی باکتری در روزهای اول تا پنجم به صورت زیر سنجیده شد:

ابتدا نمونه باکتری به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ و محلول رویی آن برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی فعالیت کیتیناز با مقدار N استیل گلوکز آمین به دست آمده از کیتین کلوئیدی انجام شد (۱۷).

مخلوط واکنش شامل ۰/۰۵ میلی لیتر مایع روماند، ۰/۵ میلی لیتر کیتین کلوئیدی ۰/۵٪ و ۰/۴۵ میلی لیتر از بافر سدیم استات ۵۰ میلی مولار (pH ۵) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر NaOH یک درصد نرمال متوقف گردید. در ادامه

Archive of SID
www.SID.ir

سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. ۷۵۰ میکرولیتر از مایع روماند با یک میلی لیتر معرف Schales مخلوط و در حمام آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. جذب نوری توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۸۵ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از منحنی استاندارد غلظت های مختلف N استیل گلوکز آمین محاسبه شد. واحد آنزیمی، میزان آنزیمی است که بتواند یک میکرومول غلظت N استیل گلوکز آمین را در مدت زمان ۱ ساعت در محیط آزاد کند (۱۵).

ج) بررسی پتانسیل ضد قارچی: برای این منظور از قارچ *فوزاریوم سولانی*(*Fosariom solani*) خریداری شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران با PTCC 5284 : (UAMH 7419) استفاده گردید. قارچ یاد شده به صورت سفره ای بر روی محیط Potato Dextrose Agar (PDA) کشت داده شد. پس از گذشت ۳ تا ۵ روز از رشد کامل قارچ، یک قطعه ۱ سانتی متری از محیط قارچ به کمک تیغ کاملاً استریل برش و بر روی محیط جدید قرار داده شد. در ادامه باکتری مورد نظر در وسط محیط به صورت یک خط کشت داده شد تا میزان رشد، گسترش قارچ و فعالیت ضد قارچی باکتری پس از ۵ روز مشخص شود (۱۴). از پلیت فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد.

د) آزمون های های بیوشیمیایی: پس از رنگ آمیزی گرم و اطمینان از حضور باسیل گرم منفی، به منظور ارزیابی شیمیایی از کیت API شرکت biomeriux فرانسه استفاده گردید.

ه) شناسایی مولکولی: به منظور استخراج DNA باکتری از روش فنل-کلروفرم استفاده گردید. به منظور شناسایی جنس باکتری و تکثیر ناحیه 16S rRNA از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی این ژن شامل 27F (۵'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-۳') و 1492R(۵'-GGT TACCTTGTTACGACT-۳') استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ سی سی بافر ۱۰x، ۱۲ میکرولیتر Master mix شرکت تاکارا ژاپن، ۱ میکرومول از هر کدام از پرایمرها، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه شده و ۵ میکرولیتر از DNA انجام شد.

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16S rRNA*، شامل ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۵ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۱۵). محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند.

در نهایت به منظور شناسایی و تایید سویه های جدا شده، محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. نتایج تعیین توالی با استفاده از برنامه BLAST در سایت NCBI مورد ارزیابی قرار گرفت.

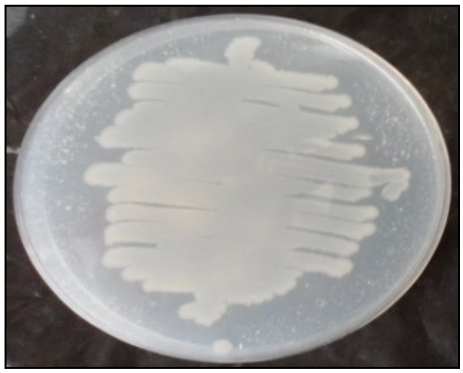
یافته ها

الف) جداسازی و غربالگری: در این مطالعه تنها یک باکتری قادر به استفاده از کیتین کلوئیدی موجود در محیط، به عنوان تنها منبع انرژی و کربن بود. این میکروارگانیسم توانست در محیط کشت CCA هاله ای به قطر ۸ میلی متر (مبنی بر تجزیه کیتین) را در اطراف کلنی خود به وجود آورد (شکل ۱).

ب) فعالیت آنزیم کیتیناز: در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از منحنی استاندارد غلظت های مختلف از N-استیل گلوکز آمین محاسبه شد (نمودار ۱). با توجه به مقادیر به دست آمده دامنه فعالیت آنزیمی سویه جداسازی شده بین ۱/۴۵ u/ml تا ۴/۳۷ u/ml بود. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیمی با ۴/۳۷ u/ml پس از ۴ روز مشاهده گردید.

ج) نتایج پتانسیل ضد قارچی: میزان رشد، گسترش قارچ و فعالیت ضد قارچی سویه جداسازی شده در طول ۵ روز مورد بررسی قرار گرفت. قطر عدم رشد قارچ در پلیت شاهد ۰/۵ سانتی متر (شکل ۲A) و در پلیت کشت هم زمان قارچ و باکتری ۱/۵ سانتی متر بود. بررسی های میکروسکوپی نشان داد که باکتری جداسازی شده توانسته از رشد هیف های قارچ

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: وجود هاله مبنی بر هیدرولیز کیتین در اطراف کلنی باکتری جداسازی شده در محیط CCA با ۰/۵ درصد کیتین کلوئیدال

جلوگیری کرده و موجب تغییر شکل و رنگ هیف های آن (از سفید به صورتی) شود (شکل ۲B).

د) تست های بیوشیمیایی: بر اساس مشاهدات میکروسکوپی و ریخت شناسی، جدایه به عنوان باسیل گرم منفی، با شرایط دمایی رشد ۲۵-۳۵°C و دمای بهینه رشد ۳۰°C شناخته شد. نتیجه تست های بیوشیمیایی با استفاده از کیت API در جدول ۱ آورده شده است.

ه) شناسایی مولکولی: پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی نمونه به وسیله نرم افزار Chromas مشاهده و بررسی شد. در زمان بررسی توالی سعی گردید چیدمان مختلفی از نقطه نظر مبدأ ردیف سازی در نظر گرفته شود تا بهترین دقت ممکن در شناسایی بر اساس توالی موجود و مقایسه آن با بانک ژنی NCBI به دست آید.

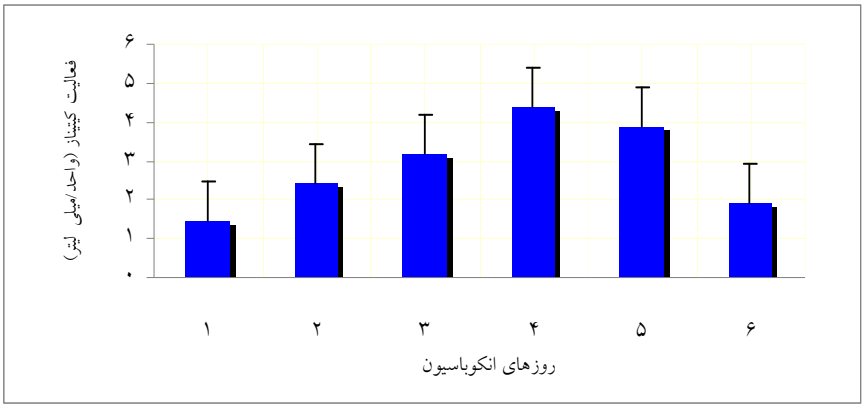
پس از بلاست کردن توالی به دست آمده و نیز رسم درخت فیلوژنی مشخص گردید که باکتری مورد نظر متعلق به جنس *سراشیا* می باشد. از آنجایی که این توالی شباهتی به توالی گونه های شناخته شده جنس *سراشیا* نداشت، جدایه باکتریایی به عنوان سویه جدید *سراشیا.س* پ. *صلاحی. زه.* (*Serratia sp.*salahi.zh) نام گذاری و با شماره دسترسی KF434590.1 ثبت گردید (شکل ۳).

بحث

در این مطالعه تنها یک باکتری با فعالیت تجزیه کنندگی کیتین از خاک های ریزوسفر گیاهان شناسایی گردید. این باکتری در محیط کشت کیتین کلوئیدال رشد کرد و پس از ۷ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد هاله ای به قطر ۸ میلی متر ایجاد نمود. پس از کشت هم زمان باکتری و قارچ

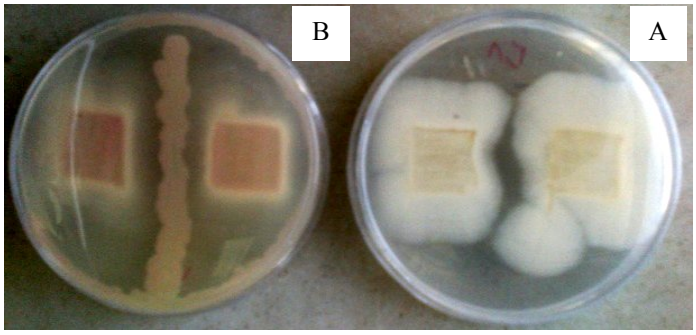
جدول ۱: نتایج تست های بیوشیمیایی باکتری جداسازی شده با استفاده از کیت API

تست ها	نتایج		تست ها	نتایج	
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
ONPG	+	+	[GEL]	+	+
ADH	+	+	CLU	+	-
LDC	+	+	MAN	+	+
ODC	+	+	INO	+	+
[CIT]	+	+	SOR	-	+
H_2S	-	-	RHA	-	-
URE	-	-	SAC	-	-
TDA	-	-	MEL	-	-
IND	-	-	AMY	-	-
[VP]	+	+	ARA	-	+



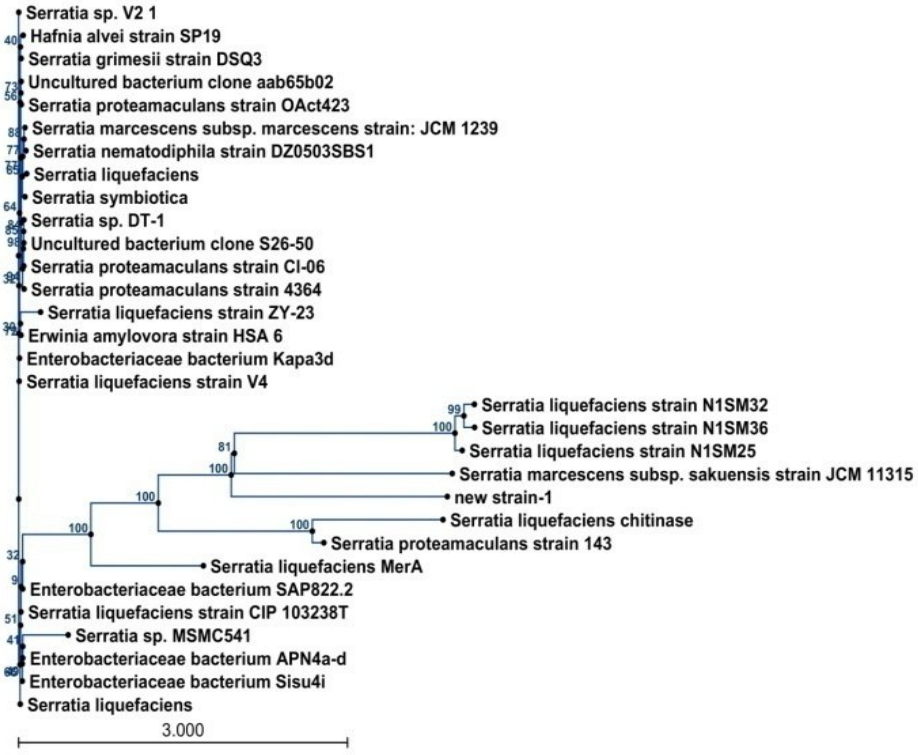
نمودار ۱: نتایج فعالیت آنزیمی باکتری تجزیه کننده کیتین در محیط کشت CCB، در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در مدت ۶ روز

www.SID.ir



شکل ۲: فعالیت ضد قارچی باکتری. A) رشد و گسترش قارچ *فوزاریوم سولانی* در محیط PDA، B) عدم گسترش قارچ *فوزاریوم سولانی* توسط باکتری تجزیه کننده کیتین

مورد نظر و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، مشخص گردید که باکتری جداسازی شده توانسته با میزان بازدارندگی ۱/۵ سانتی متر از فعالیت قارچ جلوگیری نماید. بررسی های میکروسکوپی نشان داد که باکتری *سراشیا.س پ.صلاحی.زه* علاوه بر توانایی در مهار رشد هیف های قارچ قادر به تغییر رنگ و شکل هیف های آن (از سفید به صورتی) نیز می باشد. این سویه جدید یک باکتری گرم منفی، متحرک، باسیلی شکل بوده و از نظر تاکسونومی به خانواده *انتروباکتریاسه* (*Enterobacteriaceae*) تعلق دارد. این باکتری در گستره دمایی ۳۵°C–۲۵ و pH (۸–۴) رشد می نماید. با توجه به اهمیت بیماری های گیاهی ایجاد شده توسط انواع قارچ های بیماری زا و بالا بودن خسارت اقتصادی وارد شده به محصولات زراعتی، بررسی راه های مقابله با این قارچ ها و اتخاذ راهکارهای مناسب در مدیریت و کنترل این بیماری ها ضروری می باشد. یکی از راهکارهای مهمی که امروز مورد توجه می باشد ممانعت از ایجاد بیماری، تخریب و یا مهار



شکل۳: رسم درخت فیلوژنی نشان دهنده قرابت ۸۱ درصدی سویه *سراشیا*.س پ.صلاحی.زه. با دو گونه *سراشیا لکوفشیئنس* و *سراشیا* است.

www.SID.ir

فعالیت عوامل مؤثر در بیماری زایی پاتوژن می باشد. این روش در مقایسه با قارچ کش ها و آفت کش های شیمیایی که استفاده زیاد از آنها سبب تجمع ترکیبات سمی خطرناک برای انسان و محیط زیست می شود، بسیار سودمند تر است. بدین منظور توجه به اثر تجزیه کنندگی آنزیم های کیتینازی بر روی دیواره قارچ های بیماری زا دارای اهمیت می باشد.

شناسایی باکتری های تجزیه کننده کیتین از منابع طبیعی مانند خاک ریزوسفر مفید است. زیرا این امر نقش بسزایی در تولید ترکیبات ضد قارچی دارد. مطالعات متعددی نقش مهم باکتری های تجزیه کننده کیتین را به عنوان عوامل کنترل کننده زیستی عوامل بیماری زای گیاهی نشان داده است. در مطالعه حاضر با شناسایی باکتری تجزیه کننده کیتین، ضمن بومی سازی و ذخیره سازی این نوع باکتری های با ارزش، می توان در مطالعات بعدی نیز از تولیدات آنها بهره مند گردید.

شانموگالا (Shanmugalah) و همکاران در سال ۲۰۰۸ در هند مطالعه مشابه ای را بر روی خاک های ریزوسفر برنج انجام دادند. قطر هاله هیدرولیز کننده کیتین در سویه های جدا شده اکثراً ۶ میلی متر بود (۱۰). در حالی که در مطالعه حاضر قطر هاله سویه جداسازی شده ۸ میلی متر گزارش گردید.

کمیل (Kamil) و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مصر توانستند از ریزوسفر خاک های مختلف، باکتری های تجزیه کننده کیتین از جنس *باسیلوس* (*Bacillus*) جداسازی نمایند. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی این سویه ها پس از ۴ روز معادل ۱/۲۷ µ/ml بود (۱۴). ولوسامی (Velusamy) و همکاران در سال ۲۰۱۱ از خاک های ساحلی کشور کره موفق به جداسازی باکتری *انتروباکتر* سویه KB۳ (*Enterobacter* sp. KB۳) شدند. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی این باکتری پس از ۴ روز ۱/۶ µ/ml بود (۱۵). این در حالی که در نمونه ما بیشترین میزان فعالیت آنزیمی باکتری *سراشیا سویه صلاحی* پس از ۴ روز معادل ۴/۳۷ µ/ml گزارش شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان پیشنهاداتی مبنی بر خالص سازی آنزیم کیتیناز در سویه جداسازی شده، بهینه سازی شرایط رشد این سویه از نظر محیط کشت، دما، pH، برای تولید بیشتر آنزیم کیتیناز، استفاده از این سویه در مطالعات مربوط به کنترل بیولوژیک قارچ های بیماری زای گیاهی، انتقال سویه جدا شده به گیاهان مختلف و بررسی میزان مقاومت آنها علیه عوامل بیماری زا، را ارائه نمود.

نتیجه گیری

در این مطالعه یک سویه جدید با فعالیت تجزیه کنندگی کیتین و خاصیت ضد قارچی جداسازی گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی این سویه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، پس از ۴ روز معادل ۴/۳۷ U/ml بود. با توجه به یافته های این مطالعه می توان چنین نتیجه گرفت که این سویه می تواند به عنوان یک آفت کش طبیعی محصولات زراعی، جایگزین آفت کش های سنتزی و سرطان زا گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر حشمتی پور، آقای صلاحی نژاد و سرکار خانم عصری به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Antranikian G, Vorgias CE, Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2005; 96: 219-262.
2. Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW, editors. Chitin in nature and technology. New York: Plenum Press; 1986: 435-442.
3. Keyhani NO, Roseman S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria.

Archive of SID
www.SID.ir

Biochim Biophys. 1999; 1473(1): 108-122.

4. Suzann ET, Smith M, Wilkinson MC, Peek K. Identification and characterization of saba chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 4001-4008.

5. Hashimoto M, Ikegami T, Seino SH, Ohuchi N, Fukada H, Sugiyama J, Shirakawa M ,Watanabe T. Expression and characterization of the chitin binding domain of chitinase a1 from *Bacillus circulans* WL- 12. J Bacteriol. 2000; 182(11): 3045-3054.

6. Viterbo A, Haran S, Friesem D, Ramot O, Chet I. Antigungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) form *Trichoderma harzianum* Rifai TM. FEMS Microbiol. 2001; 200(2): 169-174.

7. Gokul B, Lee JH, Rhee SK, Panda T. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum*: A review. Bioprocess Engineer. 2000; 23:691-694.

8. Karasuda S, Tanaka S, Kajihara H, Yamamoto Y, Koga D. Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. Biosci Biotechnol Biochem. 2003; 67: 221-224.

9. Donderski W, Swiontek-Brzezinska M. Occurrence of chitinolytic bacteria in water and district bottom sediment of eutrophic lakes in Ilawskielake. J Environ Studies. 2001; 1: 331-336.

10. Shanmugalah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, Manoharan PT. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MMl2270 isolated from rice rhizosphere soil. Biotechnol. 2008; 7(15): 2562-2565.

11. Mubarik N, Rachmania MI, Anindyaputri A, Santoso S, Rusmana I. Chitinolytonic bacteria from chili rhizosphere chitinase characterization and its application biocontrol for whitefly. J Agr Biological Sci. 2010; 5(4): 430-435.

12. Swiontek BM. Occurrence and activity of the chitinolytic bacteria of *Aeromonas* genus. J Environ Studies. 2001; 1: 27-31.

13. Ramyasmruthi S, Pallavi O, Pallavi S, Tilak K, Srividya S. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. J Plant Res. 2012; 2(1): 16-24.

14. Kamil Z, Rizk M, Saleh M , Moustafa S. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. J Mol Sci. 2008; 2(2): 57-66.

15. Velusamy P, Kim Y. Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp.KB3 antagonisticb to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. J Microbiol. 2011; 2(6): 206-214.

16. Hsu SC, Lockwood JL. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil. Appl Microbiol. 1975; 29: 422-426.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Lingappa Y, Lockwood JL. Chitin media for selective culture of *Actinomycetes*. Phytopathol. 1962; 52: 317-323.

18. Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J. 1993; 293: 781-788.

19. Nelson PE. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Fungol Wilt Diseases of Plants. 1981; 4: 51-80.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 1, April 2014

Original Article

Isolation and identification chitinolytic bacteria from plan rhizosphere soil and their potential in antifungal biocontrol

Tahereh Salahinezhad[1], Zoheir Heshmatipur[2], Masoud Hashemikaroui[2]

[1] MS.c., Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Chitinase is one of the most important industrial enzymes, which is recently employed especially in the biological control of pathogenic fungi. This study was aimed to isolate and to identify the chitin degrading bacteria obtained from the rhizosphere soil and also to evaluate their antifungal ability.

Materials and Methods: In this study, 38 soil samples from the rhizosphere of tea plants, Geranium and clover were collected randomly. After serial dilution and growth of the samples on colloidal chitin agar (CCA), the isolates with a clear zone were chosen for further studies. The presence of Chitinase enzyme was measured by a spectrophotometer. Next, we determined the antifungal activity of the isolates against *Fusarium solani*. Finally, the isolates were identified based on polymerase chain reaction and sequencing *16S rRNA* genes.

Results: In this study, only one new strain referred to as *Serratia* Salahi strains was isolated which showed the chitin degrading activity. The highest enzymatic activity (4.37 U/ml) of this strain was obtained at 30°C after 4 days. Furthermore, the antifungal activity of this bacterium could create 1.5 cm inhibition zone.

Conclusion: According to the findings, this new strain can be used as a natural pesticide and therefore, it is possible to replace the synthetic pesticides with this natural compounds.

Keywords: Chitinase, Potential anti-fungal, *Fusarium solani*, 16S rRNA.

Correspondence to: Tahereh Salahinejad

Tel: +989359393293

E-mail: soheyla_salahi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(1): 66-74.

Archive of SID

www.SID.ir