



Production of a natural biodegradable polymer of Polyhydroxy alkanates from bacteria and its biodegradation compared to commercial product

By

Suha Abdullah Alharbi

**A thesis submitted for the Requirements of the Degree of
Doctor of Philosophy (Biology/Microbiology)**

Supervised By

Prof. Dr. Magda Mohammed Aly

Prof Dr. Fardos Marouf Bokhari

**FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH, SAUDI ARABIA**

H-2020 G ١٤٤١

انتاج بوليمر طبيعي قابل للتحلل بوليهدروكسي الكانبات من البكتريا ودراسه تكسيره بالمقارنة مع المنتج تجاريا

سها بنت عبدالله بن عابد الحربي

المستخلص

تم إنتاج البوليمرات الحيوية الطبيعية (PHA) (polyhydroxyalkonates) من قبل العديد من الكائنات بدائية النواة كمواد احتياطية تحت الظروف الغير مناسبة للنمو ، عندما يكون مصدر الكربون زائد والمغذيات الموجودة في الوسط محدودة. وبشكل عام فانه يمكن قبول فكرة استخدام هذا النوع من البلاستيك بدلا من البلاستيك المستخدم حاليا وذلك لمواجهة مشكلة من اهم المشاكل البيئية. من اكثر الانواع انتشارا التابعة PHAs هو Polyhydroxy butyrate (PHB). تم الحصول على ٥٣ عزلة مختلفة من البكتريا و التي تم جمعها من الحقول الزراعية في ٥ مدن مختلفة من المملكة العربية السعودية وفحصها بواسطة صبغة اسود سودان ب سواء بطريقة صبغ الاطباق الصلبة او بطريقة البيئة السائلة لتحديد كمية البلاستيك الحيوي على اجار المغذيات المعدلة (مصعد مع ١ ٪ الجلوكوز كمصدر للكربون) . نمت جميع العزلات في مرق المغذي المعدل لمدة يومين في ٣٠ درجة مئوية. تم حساب النمو و كمية البلاستيك الحيوي من وزن الخلية الجاف. تم تحديد كمية PHB بواسطة مقياس الطيف UV-VIS. من أصل ٥٣ عزلة حوالي ١٧ نوع من البكتريا انتجت البلاستيك الحيوي مع تراكم نسبة تراوحت بين ٦-٤٨ ٪ من وزن الخلية الجاف. تم اختيار اكثر انواع البكتريا انتاجا للبلاستيك الحيوي وعرفت العزله SM23 بناء على الصفات المظهرية والفيولوجية بالإضافة إلى استخدام تقنية تسلسل جين ١٦ rRNA S ، تم التعرف على العزلة SM23 باسم Bacillus subtilis SM23 مع نسبة تشابه ٩٥ ٪ مع B. subtilis strain X-01 و Bacillus sp. K7SC-9A و B. velezensis UUS-1. كانت العزله SM23 Bacillus subtilis أكثر العزلات نشاطاً في إنتاج وتراكم PHB. تم الحصول على التراكم الأقصى من ماده PHB في وسط مرق المغذيات المعدل الذي يحتوي على نسبة الجلوكوز ٢٪، تم تسجيل أفضل درجة حرارة حضانة عند ٣٠ درجة مئوية وأفضل درجة حموضة متوسطة كانت ٦,٥ درجة الحموضة. كما ان إضافة مستخلص الخميرة الى البيئه عند تركيز منخفض حسن عمليه التخزين . كما تمت دراسة إنتاج PHB بواسطة العزله SM36 والتعرف علي احسن ظروف لانتاج وتراكم تلك الماده. تم التعرف علي البكتريا عليها على أنها من جنس باسيلس. وقد تمت دراسه تحلل PHB بواسطة الفطريات المختلفة. تم التعرف على العزلة الفطرية الأكثر نشاطاً باستخدام التقنية الجزيئية علي انها من منتيمه الي Aspergillus fumigates MM 11. تمت دراسة نمو وتكسير PHB بواسطة العزله من

الفطريات المختاره. تم دراسه PHB بواسطه اطيافه. في الختام ، أظهرت عزلات Bacillus التي تم الحصول عليها من التربة منتجًا ممتازًا من PHB وتحسين ظروف النمو زاد نسبة تراكم PHB في الخلية كما تم تفسير تلك المادة بسهولة بواسطه احد فطريات التربه.



Production of a natural biodegradable polymer of Polyhydroxy alkanates from bacteria and its biodegradation compared to commercial product

By

Suha Abdullah Alharbi

**A thesis submitted for the Requirements of the Degree of
Doctor of Philosophy (Biology/Microbiology)**

Supervised By

Prof. Dr. Magda Mohammed Aly

Prof Dr. Fardos Marouf Bokhari

**FACULTY OF SCIENCE
KING ABDULAZIZ UNIVERSITY
JEDDAH, SAUDI ARABIA**

H-2020 G ١٤٤١

Production of a natural biodegradable polymer of Polyhydroxy alkanates from bacteria and its biodegradation compared to commercial product

Suha Abdullah Alharbi

Abstract

The natural biopolymers Polyhydroxy alkanates (PHAs) are produced by many prokaryotic organisms as reserve material, when excess carbon source and nutrient limitation are available in the medium. Polyhydroxy butyrate (PHB) is the most famous class from PHAs. Bacteria (42 isolates) from different soil samples, collected from agriculture fields in 5 cities were obtained and screened for PHB production on modified nutrient agar medium (with 1% glucose as carbon source). All isolates were grown in modified nutrient broth medium for 2 days at 30°C. Growth and % of PHB were calculated. The quantity of PHB was determined by UV-VIS spectrophotometer. Out of 42 isolates, 17 (31%) produced PHB with accumulation percentage ranged from 6-48 % of the cell dry weight. Excellent growth and high percentage of PHB was obtained by isolate SM23. Using morphological and physiological characters in addition to 16S rRNA, the isolate SM23 was identified as *Bacillus subtilis* SM23 with 95% similarity with *B. subtilis* strain X-01, *Bacillus* sp. K7SC-9A, *B. velezensis* UUS-1. *Bacillus Subtilis* SM23 was the most active isolate in PHB production and accumulation. Maximum PHB accumulation was obtained in modified nutrient broth medium containing 2% glucose. For the maximum PHB accumulation by the isolate *B. subtilis* SM23, the best incubation temperature was recorded to be 30°C and the best

medium pH was pH 6.5. Addition of any yeast extract to the medium decreased PHB accumulation. Production of PHB by the isolate SM36 was studied as described before. It was identified as *Bacillus velezensis*. The PHB sheet was degraded by different fungi. The most active fungal isolate was identified using molecular technique as *Aspergillus fumigatus* MM 11. The growth and PHB degradation of the selected fungal isolate MM11 were studied. The Spectra of PHB were determined. Effect of different factors on degradation process and depolymerase activity was studied. In conclusion, *Bacillus* isolates obtained from soil, showed excellent PHB production and improving growth conditions enhanced accumulation percentage. PHB was characterized and degraded easily.