المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك
المجلد (11) العدد (2)
لسنة 2019

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc11.2.2019.(4)

عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas* sp. المنتجة لأنزيم اللايبيز المحلل للدهون

مصطفى إبراهيم خليفة[*] [1]، *جاسم محمد عودة* [2]
[1]قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق mustafa.11m11@gmail.com
[2]أستاذ مساعد دكتور، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق Dr.jasim.awda@coagri.uobaghdad.edu.iq

الاستلام 2/ 7/ 2018، القبول 12/ 8/ 2018، النشر 31/ 12/ 2019

هذا العمل تحت سياسية ترخيص من نوع CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

الخلاصة

تم الحصول على 15 عزلة محلية من بكتريا *Pseudomonas* من 35 عينة من عدة مصادر مثل التربة والمياه وبعض الأغذية الغنية بالدهون، وقد اختبرت قابلية العزلات على إنتاج أنزيم اللايبيز lipase عن طريق حجم الهالة المتكونة على وسط إنتاج اللايبيز وكذلك من خلال قياس الفعالية الأنزيمية والنوعية للأنزيم، وقد تبين أن العزلة التي رمز لها M3 كانت الأكفأ في إنتاج الأنزيم، واجري تشخيص هذه العزلة من خلال الفحوص المجهرية والمزرعية وبعض الفحوصات الكيميائية وكذلك من خلال التشخيص الجيني لتتابعات القواعد النتروجينية في جين 16S rRNA باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وبعد مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع موقع المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI، تبين أن العزلة M3 تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وبنسبة تطابق بلغت 99%.

الكلمات المفتاحية: بكتريا *Pseudomonas* sp.، عزل وتشخيص، لايبيز، جين 16S rRNA.

DOI: http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc11.2.2019.(4)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *PSEUDOMONAS* SP THAT PRODUCE LIPASE

Mustafa I. Khalifa[1], *Jasim M. Awda*[2]
[1]Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Baghdad, Bagdad, Iraq. mustafa.11m11@gmail.com
[2]Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Baghdad, Bagdad, Iraq. Dr.jasim.awda@coagri.uobaghdad.edu.iq

Received 2/ 7/ 2018, Accepted 12/ 8/ 2018, Published 31/ 12/ 2019

This work is licensed under a CCBY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

ABSTRACT

15 local isolates of *Pseudomonas* were obtained from 35 samples from several sources such as soil, water and some high-fat foods. The ability of isolates to produce lipase was measured by the size of the clarification zone formed around the colonies on the lipase production medium and by measuring the enzymatic activity and specific enzymatic activity, the isolate M3 was found to be the most efficient for production of the enzyme, This isolate was identified by microscopic, morphological, some biochemical tests and genetic diagnosis of 16S gene sequences by using the (PCR) technique, and then comparing the results obtained with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website, M3 isolates were found to be *Pseudomonas aeruginosa* .

Keywords: Isolation, diagnosis, 16S rRNA gene, Lipase.

[*] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

المقدمة INTRODUCTION

تعد اللايبيزات (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) من انزيمات التحلل المائي للدهون والتي تعمل على تحطيم الروابط الاسترية للمجاميع الكربوكسيلية في الدهون الثلاثية وتنتج دهون ثنائية واحادية واحماض دهنية حرة وكليسيرول **(Veerapagu *et al.*, 2013)**، وتعد اللايبيزات واحدة من اكبر مجموعات الانزيمات الصناعية التي تستخدم في صناعات عديدة، مثل الصناعات الغذائية والدوائية وصناعة المنظفات ومستحضرات التجميل وفي انتاج الوقود الحيوي **(Uppada *et al.*, 2017)**، وفي مجال الصناعات الغذائية، استعملت اللايبيزات بشكل واسع في تحسين النكهة من خلال انتاج استرات لحوامض دهنية قصيرة السلسلة مع الكحولات، إذ استعملت لتطوير النكهة في صناعة منتجات الالبان مثل الاجبان والزبدة والمرجرين وغيرها وكذلك استعملت اللايبيزات في صناعة منتجات اللحوم القليلة المحتوى الدهني او ما يعرف بـ Lean meat **(Andualema & Gessesse, 2012)**، وكذلك تستعمل اللايبيزات في صناعة المعجنات، إذ تؤدي دوراً هاماً في تحسين النكهة و الخواص الريولوجية للعجين وزيادة قوة العجينة وثبوتيتها وزيادة الحجم **(Miguel *et al.*, 2013)**، ووفقا لدراسات استقصائية فأنه يقدر ان يصل سوق اللايبيزات الى 590.5 مليون دولار بحلول عام 2020 **(Oliveira *et al.*, 2017)**، ويتم انتاج اللايبيزات من قبل العديد من الكائنات الحية مثل النباتات والحيوانات والاحياء المجهرية **(Treichel *et al.*, 2010)**، وتعد الاحياء المجهرية افضل مصدر لإنتاجها مقارنة بالمصادر النباتية والحيوانية وذلك لسهولة التعامل معها ولصغر المساحة التي تشغلها وكذلك تنوع اللايبيزات المنتجة منها وسهولة اجراء التعديلات الوراثية عليها لجعلها اكثر إنتاجية للإنزيم واكثر ملائمة للتطبيقات المختلفة **(Andualema & Gessesse, 2012)**، وقد حظيت اللايبيزات البكتيرية بأهمية كبيرة في صناعة منتجات الالبان بسبب علاقتها المباشرة في ظهور النكهة المتزنخة في الحليب والتي تم الاستفادة منها في صناعة بعض أنواع الاجبان المنضجة مثل التشدر وغيرها **(Acikel *et al.*, 2011)**، وتتميز اللايبيزات المنتجة من قبل بكتريا *Pseudomonas* بخصائص تختلف عن تلك المنتجة من قبل بقية الكائنات المجهرية مثل ثباتيتها الحرارية العالية وفعاليتها في الأوساط القاعدية **(Prasad *et al.*, 2014)**، و تكون هذه البكتريا عصوية هوائية سالبة لصبغة كرام **(Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2013)**، و يعد جنسها واحداً من اكثر مجاميع البكتيريا تعقيدًا وتعددًا من الناحية البيئية على كوكب الأرض، فهي توجد في مختلف البيئات مثل التربة والمياه العذبة والمالحة وعلى النباتات والحيوانات، وهذا الانتشار الواسع يدل على القدرة العالية لهذه البكتيريا على التكيف **(Sah, *et al.*, 2016)**، وتتميز بأنها تنتج العديد من المركبات خارج الخلية مثل السكريات المتعددة والبروتينات والانزيمات والدنا الخارجي وغيرها **(Luczkiewicz, *et al.*, 2015)**، وهي قادرة على استهلاك مجموعة كبيرة من المركبات العضوية البسيطة منها والمعقدة **(Fendri, *et al.*, 2013)**، وقد حظيت هذه البكتريا بإهتمام الباحثين المتزايد وذلك بسبب أهميتها الكبيرة في مجالات الطب وتكنولوجيا الغذاء والميكروبيولوجيا البيئية وعلم الأمراض النباتية **(Dabboussi, *et al.*, 2002)**، وهي معروفة بكونها تساهم في التحلل الحيوي للمركبات الكيميائية السامة الطبيعية او التي هي من صنع الانسان وكذلك يتميز جنسها بغزارة انتاجه للأنزيمات الخارجية واهمها الأميليزات و اللايبيزات **(Liu *et al.*, 2011)**، ونظرا للأهمية المذكورة لهذا الإنزيم فإن هذا البحث يهدف الى ايجاد عزلة محلية من بكتريا *Pseudomonas* sp منتجة لإنزيم اللايبيز وقياس فعاليته وتشخيص العزلة الاكفأ في انتاج الإنزيم على المستوى الجيني.

المواد وطرائق العمل MATERIALS AND METHOD

مصادر العزلات Source of isolates

عزلت العينات من مصادر مختلفة مثل التربة و المياه وبعض الأغذية الدهنية (لحوم، ثمار الزيتون، ثمار جوز الهند وغيرها) وثم وضعت في انابيب بلاستيكية معقمة وبعد اجراء التخافيف العشرية تم زرعها على اطباق بتري والحاوية على الوسط الانتخابي لبكتريا *Pseudomonas* (Pseudomonas Agar).

الغربلة الاولية للعزلات المنتجة للايبيز Primary screening for lipase producing isolates

تم اختبار قابلية العزلات البكتيرية لانتاج انزيم اللايبيز بزراعة المستعمرات البكتيرية المنماة على وسط Pseudomonas Agar بعمر 24 ساعة في اطباق بتري حاوية على وسط الـ Tween 20 agar حيث استعمل Tween 20 في الوسط كمصدر وحيد للكاربون **(Lanka *et al.*, 2015)**، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 35 م و لمدة 24 ساعة، وتم التحري عن قابلية العزلات البكتيرية لانتاج انزيم اللايبيز من خلال ملاحظة الهالة المتكونة حول المستعمرات النامية والتي تعد دليل على تحلل الزيت في تلك المنطقة بواسطة انزيم اللايبيز المنتج من قبل البكتيريا **(Cardenas *et al.*, 2001)**، ثم قياس قطر المستعمرة البكتيرية وقطر منطقة التحلل لكل عزلة ومن خلالها تم احتساب قدرة العزلات على انتاج الانزيم.

المنحنى القياسي لماكفرلاند McFarland standard curve

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل **Martineau *et al.* (1998)** في إعداد المنحنى القياسي، إذ اضيفت الحجوم المذكورة في (الجدول،1) من كلوريد الباريوم المائي بتركيز 1% إلى أنابيب اختبار وأكمل الحجم الى 10 مللتر بحامض

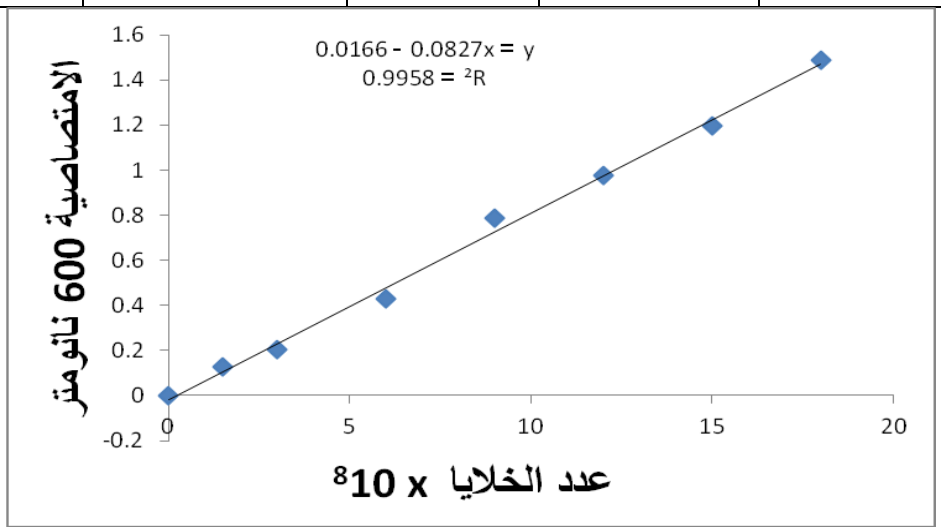
الكبريتيك بتركيز 1% وتم قياس الامتصاصية لجميع الانابيب وبمكررين في جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 600 نانومتر، وتم تحضير محلول السيطرة Blank من حامض الكبريتيك بتركيز 1% والذي استعمل في تصفير الجهاز، واستعملت معادلة الخط المستقيم من المنحنى القياسي لـ McFarland كما في (الشكل، 1) في حساب العدد التقريبي للخلايا/ مللتر لتحديد حجم اللقاح المطلوب إضافته إلى وسط إنتاج الأنزيم خلال مدة الدراسة.

تحضير اللقاح Inoculum preparing

حضر اللقاح بأخذ مسحة بوساطة ابرة التلقيح الـ loop من المستعمرات المنماة في وسط pseudomonas agar وبعمر 24 ساعة من العزلات التي أعطت اعلى قابلية لانتاج الانزيم من الغربلة الأولية و لقحت انابيب اختبار حاوية على 10 مللتر من الوسط السائل المغذي Nutrient broth، وثم حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، ثم تم حساب عدد الخلايا لكل 1 مللتر بوساطة قياس الأمتصاصية الضوئية للمزارع المنشطة على طول موجي 600 نانومتر وبالاستعانة بمعادلة الخط المستقيم لمنحنى McFarland القياسي، ثم أجري التخفيف اللازم للحصول على العدد المطلوب اضافته من الخلايا الى وسط الأنتاج.

جدول (1): تراكيز المنحنى القياسي McFarland لأعداد منحنى القياسي.

رقم الانبوبة	كلوريد الباريوم المائي (مللتر)	حامض الكبريتيك (مللتر)	McFarland الرقم القياسي	الامتصاصية على طول موجي 600 نانومتر	عدد الخلايا التقريبية $\times 10^8$/ مللتر
1	0	10	0	0	0
2	0.05	9.95	0.5	0.127	1.5
3	0.10	9.90	1.0	0.203	3.0
4	0.20	9.80	2.0	0.428	6.0
5	0.30	9.70	3.0	0.786	9.0
6	0.40	9.60	4.0	0.975	12.0
7	0.50	9.50	5.0	1.195	15.0
8	0.60	9.40	6.0	1.489	18.0



شكل (1): المنحنى القياسي McFarland لحساب إعداد الخلايا البكتيرية/ مللتر.

تقدير فعالية اللاييز (الغربلة الثانوية) Lipase assay (Secondary screening) :

استعمل الوسط الإنتاجي المتكون من (صمغ عربي 1% وزيت زيتون 1% وكلوريد الصوديوم 0.5% وبيبتون 1%) والذي أشار له **Borkar *et al.* (2009)**، وعدل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج الى 7 باستعمال دارئ الفوسفات ذي تركيز 0.1 مولار، اذ اضيف 100 مللتر من الوسط الى دوارق حجمية سعة 250 مللتر وتم تلقيح هذه الدوارق بعد تعقيمها بالعالق البكتيري للمزارع المنماة وبحجم مقداره 1×10^8 خلية وتم تحديد حجم اللقاح بالاستعانة بالمنحنى القياسي McFarland ثم حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة 200 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة، وبعد انتهاء مدة الحضن تم اجراء عملية النبذ المركزي لأجل فصل الخلايا بسرعة 6000×g لمدة 20 دقيقة واعتبر الراشح الذي تم الحصول عليه مستخلص خام للانزيم، وقدرت الفعالية الأنزيمية باستعمال الطريقة التسحيحية وكما أشار لها **Borkar *et***

***al.* (2009)**، والتي تتضمن تسحيح خليط التفاعل المتكون من إضافة حجم معين من المستخلص الانزيمي الخام الى محلول المادة الأساس مع قاعدة هيدروكسيد الصوديوم 0.1 مولار ومقارنته مع انموذج السيطرة والذي يضاف فيه الماء بدلا من المستخلص الخام، وعرفت وحدة الفعالية الانزيمية على انها كمية الانزيم التي تحرر واحد مايكرومول من الاحماض الدهنية الحرة في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير.

تقدير تركيز البروتين Protein determination

تم تقدير تركيز البروتين حسب طريقة برادفورد **Bradford (1976)** وذلك بنقل 0.1 مللتر من المستخلص الانزيمي الخام الى 1 مللتر من كاشف برادفورد (Comassie brilliant blue G-250) ومزجت جيدا وتركت لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة وبعدها تم قياس الامتصاصية على طول موجي 595 نانومتر، ثم تم تقدير تركيز البروتين بالاعتماد على المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري .

تشخيص العزلة Characterization of M3 Isolate M3

نميت البكتريا التي اعطت اعلى فعالية انزيمية على وسط الآكار المغذي بطريقة التلقيح السطحي، وحضنت الأطباق في درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ثم تم بعدها تحديد الخصائص المزرعية والمجهرية من حيث شكل المستعمرة على الوسط الغذائي الصلب وحافاتها وسطحها ولونها وحجمها وشكل الخلايا واستجابتها لصبغة كرام، كما تم اجراء بعض الاختبارات الكيميوحيوية فضلا عن التشخيص الجيني لجين 16S RNA.

الفحوصات الكيميوحيوية Biochemical tests

أجريت بعض الفحوصات الكيميوحيوية التشخيصية التي اشار لها **Kiska & Gilligan (1999)** والتي شملت:

اختبار أنتاج أنزيم الكاتليز Catalase test.

اختبار أنتاج أنزيم الاوكسديز Oxidase test.

اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test.

اختبار الحركة Motility test.

التشخيص الجيني للعزلة Genetic characterization of M3 Isolate M3

استخلاص الدنا DNA isolation

أستعملت عدة استخلاص الدنا (GBB100) المجهزة من شركة Geneaid.

تضخيم الدنا DNA amplification

أستعملت تقنية تفاعلات البلمرة المتسلسلة الـ PCR لتضخيم 16S rRNA باستعمال بادئ خاص (الجدول، 2) ببكتريا *Pseudomonas spp* الذي ذكره **Jose Maschio (2015)**، و الـ PreMix PCR المجفد المجهز من شركة Bioneer، اذ اضيف خليط التفاعل (الجدول، 3) الى انبوبة ابندروف لاجراء عملية التضخيم بجهاز PCR thermocycler والذي تمت برمجته كما موضح في (الجدول، 4).

جدول (2): تتابعات القواعد النتروجينية في البادئ.

البادئ	التسلسل	العدد
الامامية Forward	5′- GACGGGTGAGTAATGCCTA-3′	19
العكسية Reverse	5′-CACTGGTGTTCCTTCCTATA-3′	20

جدول (3): المواد المضافة في أنبوبة ابندروف الحاوية على PreMix PCR لأجراء عملية التضخيم بتقنية PCR.

ت	المكونات	الحجم (مايكرولتر)
1	مستخلص DNA 83 نانوغرام/ مايكرولتر	4
2	Forward primer بتركيز 10 بيكومول/ مايكرولتر	2
3	Reverse primer بتركيز 10 بيكومول/ مايكرولتر	2
4	free nuclease water	12
	الحجم الكلي	20

جدول (4): الظروف المعتمدة في تضخيم 16S rRNA والتي تم برمجتها في جهاز PCR.

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة (م)	الزمن (دقيقة)	عدد الدورات
1	Denaturation الدنترة	94	5	1
2	Denaturation الدنترة	94	0:45	35
3	Annealing ارتباط البادئ	50	0:45	
4	Extension استطالة	72	0:45	
5	Final extension الاستطالة النهائية	72	5	
6	Cooling التبريد	4	∞	1

الترحيل الكهربائي لناتج عملية التضخيم Gel Electrophoresis for PCR product

بعد انتهاء عملية التضخيم اجري الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز بتركيز 1% والذي تم تحضيره كما في الطريقة التي ذكرها **Gautom (1997)** وذلك بإذابة 0.5 غم من الأكاروز في 50 مللتر من محلول 1X TBE، ثم سخن بوساطة Microwave oven لمدة 2 دقيقة وترك ليبرد الى حين وصول درجة حرارته الى 55 م تقريبا، ثم أضيف إليه 2 مايكرولتر من صبغة Ethidium bromide، وبعد ذلك تم صب الهلام بقالب الترحيل الكهربائي وترك ليتصلب وأضيف محلول الترحيل 1X TBE buffer الى حوض جهاز الترحيل الى ان تم تغطية سطح الهلام، ثم أضيفت العينات بمقدار 5 مايكرولتر من ناتج الـ PCR، واستعمل دليل حجي معلوم Ladder من شركة Promega، لتحديد حجوم الحزم الناتجة.

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

غربلة العزلات على أساس كفاءتها لإنتاج انزيم الايبيز Detection of Lipase production Isolates

اظهرت النتائج تفوق العزلات (M1 وM3 وM5 وM6 وM9) على باقي العزلات الاخرى، اذ تراوحت اقطار الهالات الشفافة على الوسط الصلب بين 1-8 ملمتر كما في (الجدول، 5)، اذ تم اختيار هذه العزلات لأجراء الغربلة الثانوية عليها لإنتقاء الأكفأ منها في إنتاج إنزيم اللايبيز، وقد اظهرت النتائج كما في (الجدول، 6) تفوق العزلة M3 على باقي العزلات، اذ بلغت الفعالية الانزيمية لها 56.6 وحدة/ مللتر، وعليه تم اختيار العزلة M3 لإكمال بقية الدراسة، ويذكر ان هناك العديد من الدراسات التي تناولت موضوع عزل البكتريا المنتجة لإنزيم اللايبيز بالاعتماد على الهالة المتكونة حول المستعمرات في الاوساط الصلبة والتي تعود الى فعل انزيم اللايبيز وكذلك باستعمال طريقة الغربلة الكمية، اذ اشار **Zouaoui & Bouzaine (2012)** الى انه تمكن من الحصول على 6 عزلات من بكتيريا *Pseudomonas* sp منتجة لإنزيم اللايبيز باستخدام وسط التوين 80 الصلب و وسط زيت الزيتون الصلب حيث اعطت العزلة Ps5 اكبر قطر لمنطقة التحلل مع منطقة النمو حيث بلغت 22 ملم على وسط زيت الزيتون و18 ملم على وسط التوين 80 وكذلك اعطت اعلى فعالية انزيمية في الغربلة الثانوية حيث بلغت 37 وحدة/ مللتر وبينت نتائج التشخيص ان العزلة تعود الى *Pseudomonas aeruginosa*، وتمكن **Patel *et al.* (2016)** من الحصول على 4 عزلات منتجة للايبيز بطريقة الغربلة الاولية على وسط الـ Tributyrin الصلب وكذلك باستعمال الغربلة الثانوية، اذ اعطت العزلة B4 اعلى فعالية على الوسط الصلب، حيث بلغ قطر منطقة التحلل 1.6 ملمتر، وكذلك اعطت اعلى فعالية في الغربلة الثانوية، اذ بلغت الفعالية الانزيمية 13.2 وحدة/ مللتر، وقد اظهرت نتائج التشخيص ان العزلة تعود الى جنس *Bacillus*.

جدول(5): كفاءة عدد من عزلات البكتريا في انتاج انزيمات اللايبيز المقدرة على اساس قطر الهالة الشفافة المتكونة على وسط Tween 20 agar.

رقم العزلة	قطر الهالة (ملمتر)	رقم العزلة	قطر الهالة (ملمتر)
M1	5	M9	6.5
M2	1.5	M10	1
M3	8	M11	0.5
M4	2	M12	1.8
M5	4	M13	2.8
M6	5.5	M14	2
M7	2.4	M15	3
M8	0	….	....

جدول (6): كفاءة العزلات المنتخبة من الغربلة الاولية في انتاج انزيم اللايبيز.

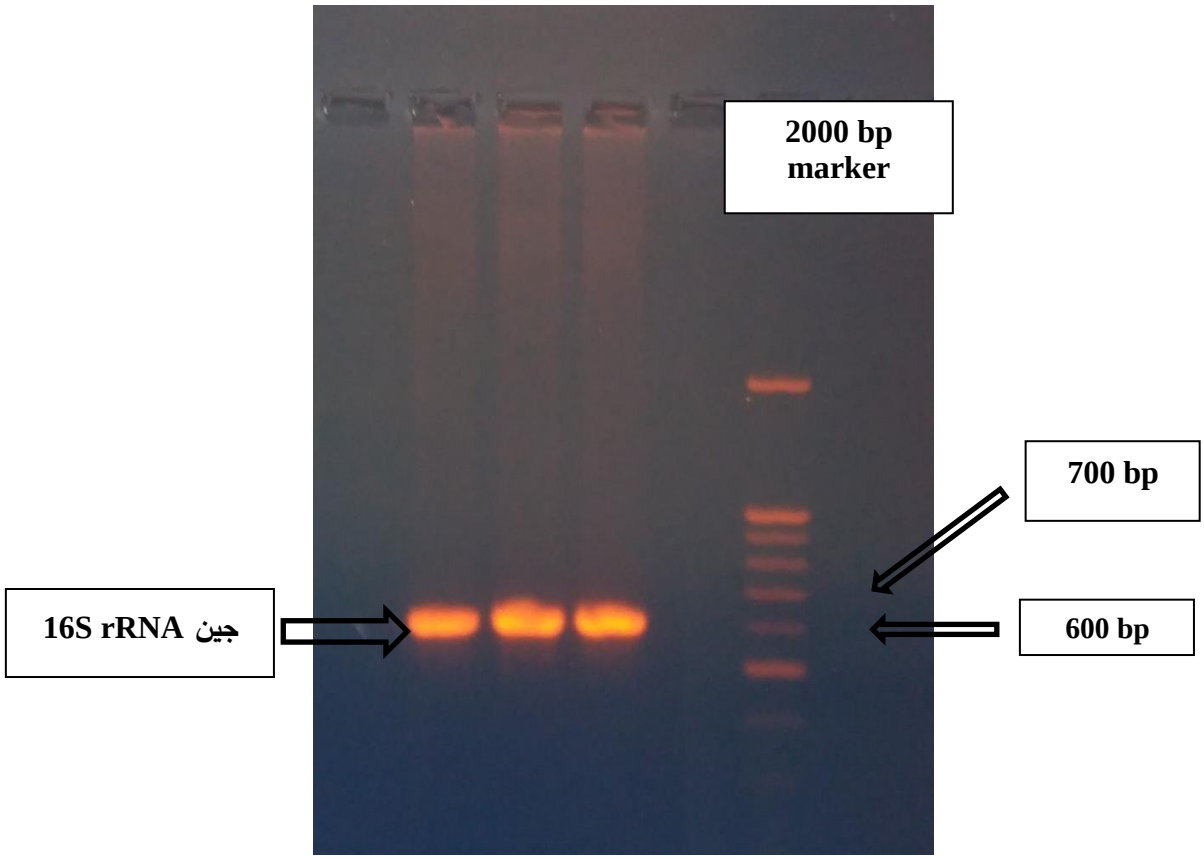
العزلة	الفعالية الانزيمية (وحدة/مللتر)	تركيز البروتين (ملغم/مللتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)
M1	33.3	0.194	171.64
M3	56.6	0.185	305.94
M6	36.6	0.175	209.14
M5	30	0.197	152.28
M9	43.3	0.182	237.91

تشخيص العزلة M3 Characterization of M3 Isolate

اظهرت نتائج الفحوصات التشخيصية المورفولوجية والكيميوحيوية التي تم اجرائها على العزلة (M3) وكما في (الجدول، 7)، انها تنطبق على اهم الصفات لبكتريا جنس الـ *Pseudomonas* والتي ذكرها **Kiska & Gilligan (1999)**، وللتأكيد بشكل نهائي تم اجراء التشخيص الجيني للعزلة المذكورة، اذ اعتمد في هذا النوع من التشخيص على جين 16S Rrna، اذ اجري في البداية استخلاص للمادة الوراثية للعزلة قيد الدراسة (M3)، وتم التأكد من نقاوتها بقياس نسبة امتصاصيتها في 260 الى 280 نانومتر بوساطة جهاز القطرة النانوية Nanodrop وقد اظهر ان النسبة هي 1.7 ثم اجري التضخيم بتقنية PCR من خلال استعمال بوادئ خاصة بالجين 16S rRNA، اذ اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الترحيل الكهربائي للجين المضخم وجود حزمة واحدة مما يدل على ارتباط البوادئ بالجين المستهدف كما في (الشكل، 2) وهو جين 16S rRNA دون الاجزاء الاخرى من DNA المستخلص من العزلة قيد الدراسة.

جدول (7): بعض الفحوصات الكيميوحيوية والتشخيصية الأخرى.

الاختبار	النتيجة
تصبيغ كرام	-
انتاج الكاتاليز	+
انتاج الأوكسديز	+
استهلاك السترات	+
انتاج اللاييز	+
قابلية الحركة	+
انتاج الصبغة	+



شكل (2): نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لجين 16S rRNA من العزلة M3 والدليل الحجمي Marker الذي يتراوح بين 100-2000 كيلوقاعدة نتروجينية.

بعدها اخذ ناتج الـ PCR وارسل الى شركة Macrogen الكورية لمعرفة تسلسل القواعد النتروجينية وتبين انه مكون من 637 زوج قاعدة وكما في (الجدول، 8)، ويذكر ان الباحث **Meng *et al.* (2017)** قد قدر حجم القطعة الناتجة

618 زوج قاعدة نيتروجينية عند تضخيم جين 16S rRNA في تشخيص بكتيريا الـ *Pseudomonas*، وقد ذكر الباحث **Amutha & Kokila (2014)** ان حجم القطعة الناتجة كان 1451 زوج قاعدة من ناتج تضخيم جين 16S rRNA الـ *Pseudomonas*، في حين أشار **Baghal Asghari *et al.* (2013)** ان حجم القطعة الناتجة من تضخيم جين 16S rRNA كان 956 زوج قاعدة.

جدول (8): تتابع القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة M3.

عدد القواعد	تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA
637	CGTTTTCACAGCTCTCATCAGTCGTCCGGAACGGGCGCTAATACCGCATA CGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGA GCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACG ATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTG ACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCG TAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCC TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCCAGTGAGGTAA AGACCGGAGAGTGTAGGAAACTGTTCCAATCATCTTG

اظهرت النتائج بعد تحليلها ببرنامج BLAST في موقع المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI ان هناك تطابق وبنسبة 99% بين هذه العزلة وبين سلالات من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المسجلة في NCBI وكما مبين في (الجدول، 9)، وعليه عدت العزلة قيد الدراسة عائدة الى البكتريا *P. aeruginosa*، ويذكر ان التشخيص الجيني بوساطة جين 16S rRNA يستعمل بشكل ناجح في التمييز بين الانواع المختلفة من البكتريا ويعطي نتائج حاسمة في التشخيص **(Lakshmi *et al*. 2014)**.

جدول (9): نسبة تطابق تتابعات القواعد النتروجينية للعزلة M3 مع 7 سلالات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المسجلة في NCBI.

السلالة	نسبة التطابق (%)	رمز الوصول
P. aeruginosa FQR12	99	MF144446.1
P. aeruginosa RSB3	99	LN589738.1
P. aeruginosa DUVASU/Hs-1	99	KY930659.1
P. aeruginosa DUVASU/F6	99	KY930655.1
P. aeruginosa P6D102-476	99	EF510037.1
P. aeruginosa HS9	99	MH000683.1
P. aeruginosa BTTDD3	99	MG648420.1

REFERENCES

i. Açikel, Ü., Erşan, M. & Açikel, Y. S. (2011). The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. *Turkish Journal of Biology*, 35(1), 35-44.

ii. Amutha, K. & Kokila, V. (2014). PCR amplification, sequencing of 16S rRNA genes with universal primers and phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Sci. Res.*, 3, 257-261.

iii. Andualema, B. & Gessesse, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications. *Biotechnology*, 11(3), 100-118.

iv. Baghal Asghari, F., Nikaeen, M. & Mirhendi, H. (2013). Rapid monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: a key priority in prevention of nosocomial infection. *FEMS Microbiology Letters*, 343(1), 77-81.

v. Benattouche, Z. & Abbouni, B. (2012). Production, optimization and characterization of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 17(2), 7187-7193.
vi. Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., Elson, S. W. & Sinisterra, J. V. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14(4-6), 111-123.
vii. Dabboussi, F., Hamze, M., Singer, E., Geoffroy, V., Meyer, J. M. & Izard, D. (2002). *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 363-376.
viii. Fendri, I., Chamkha, M., Bouaziz, M., Labat, M., Sayadi, S. & Abdelkafi, S. (2013). Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization. *Environmental Technology*, 34(2), 181-193.
ix. Gautom, R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157: H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2977-2980.
x. Ikeda-Ohtsubo, W., Miyahara, M., Kim, S. W., Yamada, T., Matsuoka, M., Watanabe, A. & Endo, G. (2013). Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1), 37-42.
xi. José Maschio, V., Corção, G. & Rott, M. B. (2015). Identification of *Pseudomonas spp.* as amoeba resistant microorganisms in isolates of Acanthamoeba. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(1), 81-83.
xii. Lanka, S. & Latha, J. N. L. (2015). A short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: lipases-the present and future enzymes of biotech industry. *Int. J. Biol. Chem.*, 9, 207-219.
xiii. Liu, N., Jiang, J. L., Cai, L. L. & Li, W. (2011). Characterization and optimization of Fe (II) Cit-NO reduction by *Pseudomonas sp*. *Environmental Technology*, 32(16), 1947-1953.
xiv. Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K. & Fudala-Ksiazek, S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* isolated from wastewater and wastewater impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19823-19834.
xv. Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M. & Bergeron, M. G. (1998). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 618-623.
xvi. Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J. & Zheng, N. (2017). Characterization of *Pseudomonas spp.* and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. *Frontiers in Microbiology*, 8, 21-58.
xvii. Miguel, Â. S. M., Martins-Meyer, T. S., da Costa Figueiredo, É. V., Lobo, B. W. P. & Dellamora-Ortiz, G. M. (2013). Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. In Food Industry. In Tech.
xviii. Oliveira, F., Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Pérez-Rodríguez, N., Domínguez, J. M., Venâncio, A. & Belo, I. (2017). Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace: from flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(7), 1123-1132.

xix. Patel, M., Mistry, J., Desai, S., Patel, S. & Desai, S. (2016). Isolation and characterization of lipase producing bacteria from vegetable oil spillage site. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(8), 214-232.

xx. Prasad, M. P. (2014). Production of lipase enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lipid rich soil. *Int. J. Pure Appl. Biosci.*, 2, 77-81.

xxi. Sah, S. & Singh, R. (2016). Phylogenetical coherence of Pseudomonas in unexplored soils of Himalayan region. *3 Biotech*, 6(2), 170-179.

xxii. Shaini, V. P. & Jayasree, S. (2016). Isolation and characterization of lipase producing bacteria from windrow compost. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(5), 926-933.

xxiii. Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M. & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182-196.

xxiv. Uppada, S. R., Akula, M., Bhattacharya, A. & Dutta, J. R. (2017). Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 331-334.

xxv. Veerapagu, M., Narayanan, A. S., Ponmurugan, K. & Jeya, K. R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 6(3), 62-67.