



عزل وتشخيص البكتريا المنتجة لانزيم الاميليز

جاسم محمد عودة¹ علي حسين فياض^{2*}

¹ استاذ مساعد دكتور، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق. Dr.jasim.awda@coagri.uobaghdad.edu.iq
² قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق. engalialazzawi87@gmail.com

تاريخ قبول النشر: 2017/11/22

تاريخ استلام البحث: 2017/7/24

36 بكتريا من مصادر مختلفة (التربة والنشا والارز المطبوخ وبعض الاغذية الاخرى) من اختبارات الغربلة الأولية للحصول على العزلة الأكف في انتاج أنزيم الأميليز من خلال حجم الهالة المتكونة بكاشف () إذ اختيرت 7 عزلات للغربلة الثانوية من خلال قياس الفعالية الأنزيمية والفعالية النوعية للانزيم وتبين ان العزلة التي رمز لها A4 في انتاج انزيم الاميليز ثم جرى تشخيص هذه العزلة من خلال الفحوصات المجهرية والمزرعية وبتقنية جهاز Vitek 2 System عن التشخيص الجيني من خلال جين 16S القواعد النروجينية للجين باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) 1256 متوفر من معلومات في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI تبين ان العزلة تعود الى *Bacillus subtilis*.

الكلمات المفتاحية: عزل، تشخيص، الاميليز، جين 16S rRNA.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA THAT PRODUCE AMYLASE

Jasim . M. Awda¹, Ali . H. Fayyadh^{*2}

1. Assis. Prof. Dr. Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq. Dr. jasim.awda@coagri.uobaghdad.edu.iq

2. Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq. engalialazzawi87@gmail.com.

ABSTRACT

Thirty six bacteria were isolated from various sources (soil, starch, cooked rice and other foods) and subjected to a series of primary screening tests to obtain the optimal isolation to production of amylase. The volume of producing zone by logal indicator for (Seven) isolates of the secondary screening by measuring the enzymatic activity and specific enzymatic activity. The isolate A4 was found to be the most efficient for production of amylase. Then this isolate was diagnosed through microscopic, vitek 2 system technique. in addition by gentic diagnosis through gene 16s of the genes nitrogen bases by use the polymerase chain reaction (PCR) which reached 1256 bases. In comparison to the available information at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the isolation was found to be *Bacillus subtilis*

Keywords: Isolation, Diagnosis, 16S rRNA, Amylase.

:INTRODUCTION

تشكل الاميليزات (Amylases) مجموعة من الانزيمات التي تنتج الدكسترين والعديد من الوحدات الاساسية بواسطة التحلل المائي للاواصر الكلايكوسيدية 1,4-α لجزيئات النشا. انزيمات التحلل المائي (Amylolytic Enzymes) لها اهمية كبيرة في العديد من عمليات التكنولوجيا الحيوية بما في ذلك الدوائية والغذائية والالياف والنسيج والمنظفات والتخمير والتنقيب عن النفط وصناعة الورق (Adrio & Demain, 2014). يتواجد الاميليز في النباتات والحيوانات والاحياء المجهرية، اكتسب الاميليز (EC 3.2.1.1) المنتج من المصادر الميكروبية اهمية هائلة بين الباحثين وذلك بسبب القدرة الهائلة على الانتاج وسهولة التعامل مع الاحياء المجهرية والتي تنتج الانزيم بفعالية عالية وكلفة انتاج قليلة مقارنة بالمصادر الاخرى (Souza & Magalhaes, 2010). بلغ انتاج الاميليز الى ما يصل الى 65% من سوق الانزيمات

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.



ويزداد باستمرار، جنس *Bacillus* معروف جيداً بأنها منتجة للانزيمات الخارجية بشكل كبير ومتنوع والتي منها الاميليزات التي لها دور في مختلف الصناعات (John Ravindar & Elangovan, 2013 ; Abdullah et al., 2014). بالرغم من أن ظروف النمو متشابهة لمختلف أنواع جنس *Bacillus* إلا أنها تختلف في إنتاج الأميليزات وذلك يعتمد على مكونات الوسط والمعاملات المختلفة، نوع السلالة، حيث يمكن تعزيز إنتاج الانزيمات بواسطة تحسين مكونات الوسط جنباً الى جنب مع غيرها من المعاملات الاخرى، باستخدام تخمرات الحالة السائلة والتي تفضل على تخمرات الحالة الصلبة في تنمية البكتيريا لأنتاج الأنزيم وذلك نظراً لسهولة تنقية الأنزيم من المنتجات التي يتم الحصول عليها فضلاً عن سهولة ادارة العملية (Dash et al., 2015 ; Abd-Elhalem et al., 2015).

:MATERIALS AND METHODS

تمت عملية العزل من مصادر مختلفة شملت (التربة والنشا والارز المطبوخ وبعض الاغذية الاخرى) وأخضعت للتقنية من خلال نقلها عدة مرات على اطباق بتري وادخلت الى الغريلة الأولية للحصول على العزلة الأكفأ في إنتاج أنزيم الأميليز

العزل والغريلة الاولى :

استعمل وسط *Nutrient Agar* و *Nutrient Broth* والوسط الإنتاجي الذي حضر وفق ما ذكر في **Teodoro & Martins (2000)** للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية لإنتاج انزيم الاميليز وذلك بزراعة المستعمرة البكتيرية المنماة على وسط الاكار المغذي بعمر 18 ساعة في منتصف الطبق وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 ° م لمدة 24 ساعة. تم التحري عن قابلية العزلات البكتيرية لإنتاج انزيم الاميليز باستعمال محلول اليود المحضر سابقاً، وذلك عن طريق تغطية الطبق بمحلول اليود ثم قياس قطر المستعمرة البكتيرية (*Growth*) وقطر منطقة التحلل (*Zone*) لكل عزلة ومن خلالها تم احتساب قدرة العزلات على تحليل النشا من خلال إنتاج الأنزيم وكما يأتي:

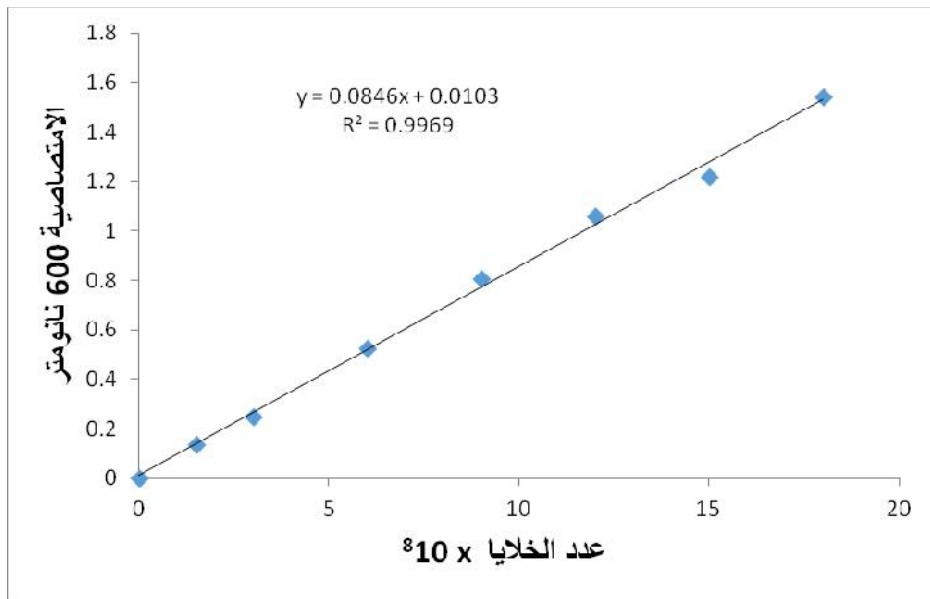
$$\text{كفاءة العزلات لإنتاج الأنزيمات المحللة للنشا} = \frac{\text{قطر منطقة التحلل (الهالة المتكونة)}}{\text{قطر المستعمرة البكتيرية (النمو البكتيري)}}$$

المنحنى القياسي لمكفرلاند MacFarland :

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل **Collee et al., (1996)** في إعداد المنحنى *MacFarland* القياسي، حيث أضيفت الحجوم المذكورة في (الجدول، 1) من كلوريد الباريوم المائي إلى أنابيب اختبار وأكمل الحجم الى 10 مل بحامض الكبريتيك الخزين وقيست الامتصاصية لجميع الانابيب وبمكررين في جهاز المطياف الضوئي *Spectrophotometer* على طول موجي 600 نانومتر، وحضر محلول السيطرة *Blank* من حامض الكبريتيك بتركيز 1 % فقط حيث استخدم في تصفير الجهاز وعلى نفس الطول الموجي، وأستخدمت معادلة الخط المستقيم من منحنى *MacFarland* القياسي كما في (الشكل، 1) وأستخدمت هذه المعادلة في حساب عدد الخلايا التقريبي/مل للمزارع المنشطة لتحديد حجم اللقاح المطلوب إضافته إلى وسط إنتاج الأنزيم خلال مدة الدراسة.

(1): تراكيز المنحنى القياسي *MacFarland* لأعداد منحنى القياسي.

عدد الخلايا التقريبية $10^8 \times$	الامتصاصية على طول 600	<i>MacFarland</i> الرقم القياسي	لكبريتيك ()	كلوريد الباريوم المائي ()	
0	0	0	10	0	1
1.5	0.135	0.5	9.95	0.05	2
3.0	0.248	1.0	9.90	0.10	3
6.0	0.527	2.0	9.80	0.20	4
9.0	0.809	3.0	9.70	0.30	5
12.0	1.058	4.0	9.60	0.40	6
15.0	1.218	5.0	9.50	0.50	7
18.0	1.543	6.0	9.40	0.60	8



(1): المنحنى القياسي MacFarland لحساب أعداد الخلايا البكتيرية/ مل.

تحضير اللقاح:

حضرت مزارع فتيحة بعمر لا يتجاوز 48 ساعة من العزلات التي وقع عليها الاختيار من مرحلة الغريلة الأولية التي تميزت بكفاءتها العالية في إنتاج الأنزيم حيث تم تحضير اللقاح وذلك بإخذ مسحة بواسطة أبرة التلقيح (Loop full) من مزارع العزلات إلى أنابيب اختبار حاوية على 10 مل من الوسط السائل المغذي Nutrient broth، ثم حضنت بدرجة حرارة 37م الأنابيب لمدة (24- 48) ساعة، بعد ذلك تم حساب عدد الخلايا/مل عن طريق قياس الامتصاصية الضوئية للمزارع المنشطة على طول موجي 600 نانومتر وبالاستعانة بمعادلة الخط المستقيم لمنحنى MacFarland القياسي، ثم أجري التخفيف اللازم للحصول على العدد المطلوب اضافته من الخلايا إلى وسط الإنتاج.

الغريلة الثانوية (الكمية):

استعمل نفس الوسط الانتاجي عدا اضافة الاكار وذلك باستعمال دوارق حجمية بسعة 300 ملتر تحتوي على 50 ملتر من الوسط إذ لقت هذه الدوارق بعد تعقيمها بعالق البكتيريا وبحجم مقداره 1×10^8 خلية حدد حجم اللقاح بالاستعانة بالمنحنى القياسي لمحلول MacFarland وحضنت في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/ الدقيقة بدرجة حرارة 37م لمدة 72 ساعة، بعد ذلك تم إجراء عملية النذب المركزي (لفصل الخلايا) بسرعة 6000 Xg لمدة 20 دقيقة واعتبر الراشح الذي تم الحصول عليه مستخلص خام للأنزيم، وقدرت الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين لحساب الفعالية النوعية للأنزيم في المستخلص الخام.

تقدير فعالية أنزيم الاميليز :

اتبعت طريقة Dinitro Salicylic acid (DNSA) - 3,5 التي اشار اليها كل من Whitaker & Bernard, (1972) ; Lin et al., (1997) رسم المنحنى القياسي للكلوكوز من خلال رسم العلاقة البيانية بين الامتصاصية الضوئية على طول موجي 540 نانومتر والتركيز المختلفة من الكلوكوز (ملغم / مل) واعتمد هذا المنحنى القياسي في تقدير الكلوكوز المتحرر بفعل الأنزيم كوحدة للتعبير عن الفعالية. تعرف وحدة الفعالية الأنزيمية (وحده/ مل) انها كمية الأنزيم التي تحرر (1) مايكرومول من السكريات المختزلة (الكلوكوز) في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير:

- محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ 0.05 الهيدروجيني 7.

- (1% (Stock substarte solution (1% soluble starch))

أذيب (1 غم) من النشأ في (25 مل) من المحلول الدارئ، ثم أضيف إلى الخليط (50 مل) من المحلول الدارئ المغلي مع الاستمرار بالغليان لمدة دقيقة واحدة، بعدها ترك ليبرد ثم أكمل الحجم إلى (100 مل) بالمحلول الدارئ نفسه واستخدم كمادة اساس لتقدير الفعالية.

تقدير تركيز البروتين :

قدر تركيز البروتين وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (1976) وكما يأتي:



نقل 0.1 مل من المحلول الانزيمي الى 1 مل من كاشف البروتين (Comassie brilliant blue G-250) ومزجت جيداً وتركت لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة وقيست الامتصاصية على طول موجي 595 نانومتر. قدر تركيز البروتين اعتماداً على المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري.

تشخيص البكتيريا (A4) :

تم تنمية البكتيريا التي اعطت اعلى فعالية انزيمية على وسط (Nutrient Agar) وبطريقة التلقيح السطحي، وحضنت الأطباق في درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة.

جرى بعدها تحديد الخصائص المزرعية والمجهرية من حيث شكل المستعمرة على الوسط الغذائي الصلب وحافاتها وسطحها ولونها وحجمها وشكل الخلايا وتصبيغها بصيغة كرام وتصبيغ السبور.

التشخيص باستعمال جهاز Vitek 2 compact system :

اجريت عملية التشخيص باستعمال نظام الفايك للتعزلة البكتيرية A4 والتي اشارت معظم الفحوصات المزرعية والمورفولوجية انتمائها الى جنس *Bacillus* (Anonymous, 2010).

: DNA

أستعمل Presto MinigDNA Bacteria Kit المجهز من شركة Geneaid في أستخلاص DNA من البكتيريا

: DNA تضخيم الحامض النو

توضح (الجدول، 2 و 3) أستعمال تقنية تفاعلات السلسلة البلمرة الانزيمية PCR لتضخيم 16S rRNA واستعمل PreMix PCR المجهزة من شركة Bioneer المجفدة في انابيب ابندروف للتأكد من نوع العزلة المنتخبة بالاعتماد على (Sacchi et al., 2002) باستخدام البادئ حسب (الجدول، 3):

(2): تمثيل القواعد النتروجينية في البادئ.

17	5' CGGGTGAGTAACACGTG 3'	الامامية 104F
17	5' CGGTGTGTACAAGGCC 3'	العكسية 1390R

(3): المواد المضافة في أنبوبة ابندروف الحاوية على PreMix PCR لأختبار 16S rRNA بتقنية PCR.

(مايكرو لتر)		
5	مستخلص DNA 35 نانو غرام / مايكرو لتر	1
2	Forward primer بتركيز 10 بيكومول / مايكرو لتر	2
2	Reverse primer بتركيز 10 بيكومول / مايكرو لتر	3
11	free nuclease water	4
20	الحجم الكلي	

مزجت المكونات اعلاه ونقلت إلى جهاز PCR thermal cycler تم برمجة الجهاز حسب (الجدول، 4).

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

	(دقيقة)	()		
1	5	94	Denaturation الدنترة	1
30	1	94	Denaturation الدنترة	2
	1	55	Annealing ارتباط البادئ	3
	1:40	72	Extension استطالة	4
	5	72	Final extension الاستطالة النهائية	5
1	∞	4	Cooling التبريد	6

بعد انتهاء وقت التفاعل سحب 5 مايكرو لتر من نواتج تضخيم 16S rRNA للترحيل الكهربائي.



الترجيل الكهربائي Electrophoresis تقنية PCR وتحضير هلام الأكاروز Agarose : حضر الهلام بتركيز 1% وذلك بإذابة 0.5 غم من الأكاروز في 50 مل من محلول 1X TBE، سخن بواسطة microwave oven لمدة 2 دقيقة ترك ليبرد لحرارة بحدود 55 م° وأضيف إليه 2 مايكرو لتر من صبغة Ethidium bromide. وصب الهلام بقالب الترحيل الكهربائي وترك ليتصلب وأضيف محلول الترحيل 1X TBE buffer ليغطي سطح الهلام، أضيفت العينات بمقدار 5 مايكرو لتر من ناتج PCR (Sambrook and Russell, 2001)، وأستعملت لدلائل حجمية Ladder والتي جهزت من شركة Promega، لتحديد حجموم الحزم.

:RESULTS AND DISCUSSION

عزل البكتريا المنتجة لأنزيمات الاميليز:

تم في هذه الدراسة انتقاء 36 مستعمرة من البكتريا المنتجة لأنزيمات الاميليز من التربة وبعض المواد الغذائية على الوسط الغذائي Nutrient Agar والحاوي على النشأ بنسبة 1% من بين عدد كبير من المستعمرات التي ظهرت على هذا الوسط عند حضنها في 37م°، وكان اساس انتقائها يعتمد على كونها تحلل النشأ وتكون هالة شفافة واضحة حول منطقة النمو. نقلت هذه المستعمرات على وسط (Nutrient Agar) وحضن في 37م°.

غربلة عزلات البكتريا على أساس كفاءتها لإنتاج انزيم الاميليز: الغربلة الاولى :

اخضعت العزلات البكتيرية التي تم انتقائها من الخطوة السابقة الى عملية غربلة اولية للتعرف على مقدرتها على تحليل النشأ كدليل لانتاج الانزيمات على الوسط المغذي للنشأ. وحضنت في 37م° مدة 24 ساعة ثم حسبت كل من قطر منطقة النمو (G) وقطر منطقة تحلل النشأ (Z) واستخرجت منها قيمة Z/G التي عدت دليلاً على قابلية العزلات على انتاج الانزيم ويوضح الجدول التالي كفاءة 36 عزلة على انتاج انزيمات الاميليز بدلالة قيمة Z/G. ويلاحظ من الجدول تباين هذه العزلات في تحليل النشأ تبايناً واضحاً مع تميز سبع عزلات منها وهي العزلات (AJ2,AJ8,AJ12,AJ18,AJ19,AJ27,AJ33) والتي تراوحت كفاءتها في تحليل النشأ ما بين 2.1 – 4.2 واخضعت لعملية الغربلة الثانوية لانتقاء الاكفاء منها في انتاج انزيم الاميليز. وجدير بالإشارة انه وبغية التأكد من منطقة تحلل النشأ وتقدير قطر هذه المنطقة على وجه الدقة اضيف كمية من محلول اليود المخفف الى سطح الوسط لإظهار هذه المنطقة التي تميزت عن المناطق الاخرى بلونها الشفاف بخلاف بقية اجزاء الوسط التي تلوئت باللون الازرق. وكما مبين في (الجدول، 5)

(5): كفاءة عدد من عزلات البكتريا في انتاج انزيمات الاميليز المقدره على اساس نسبة قطر منطقة تحلل النشأ (Z) الى قطر منطقة النمو (G)*

Z/G		Z/G		Z/G	
1.11	A25	1.13	A13	1.25	A1
1.32	A26	0.88	A14	2.85	A2
2.36	A27	1.47	A15	1.04	A3
1.12	A28	1.85	A16	1.10	A4
1.45	A29	1.10	A17	1.33	A5
1.32	A30	3.82	A18	1.32	A6
1.73	A31	2.25	A19	1.15	A7
0.44	A32	0.82	A20	2.10	A8
3.64	A33	1.11	A21	1.24	A9
1.14	A34	1.06	A22	1.05	A10
1.08	A35	1.21	A23	1.75	A11
1.03	A36	0.22	A24	4.2	A12

* تميزت جميع العزلات بأنها موجبة لصبغة كرام ، مكونة للابواغ وعصوية.

الغربلة الثانوية:

اجريت الغربلة الثانوية على العزلات السبعة التي رمز لها من A1 الى A7 والتي وقع عليها الاختيار من عملية الغربلة الاولى كعزلات مميزة في تحليل النشأ في المزارع المغمورة بإستعمال الوسط الغذائي، اذ حضنت الاوساط بعد تلقحها بالعزلات المذكورة في 37 م° مدة 24 ساعة قدرت الفعالية والفعالية النوعية لانزيم الاميليز في هذه العزلات،



ويوضح (الجدول، 6)، كفاءة العزلات السبعة على انتاج الانزيم اذ يلاحظ تفوق العزلة A4 على غيرها من العزلات فقد بلغت الفعالية 7.215 وحدة / مل وفعاليتها النوعية 425.23 وحدة/ ملغم. عليه فقد وقع الاختيار على هذه العزلة لإكمال الدراسة عليها بعد اخضاعها لمجموعة من فحوص التشخيص.

تميزت العزلة A4 انها اعطت اعلى نسبة تحلل اذ بلغت (4.2)، كما اعطت اعلى فعالية نوعية في المزارع المغمورة. تعد طريقة قياس فعالية الاميليز اعتماداً على قابليتها التحليلية للنشأ من اكثر الطرائق استخداماً لتحديد فعالية هذا الانزيم في طافي المزروع البكتيري والتي تعتمد على متابعه تحرر السكريات المختزلة والكشف عنها باستخدام كاشف 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNSA). وتعتمد شدة اللون فيها على كمية السكريات المختزلة المتحررة الناتجة من تحليل الاميليز لمواده الاساس (النشأ). (Igarashi et al., 1998; Lin et al. 1998). كما استخدمت طريقه (1976) Bradford لتقدير تركيز البروتين كونها من الطرائق الحساسة. واعتماداً على النتائج التي تم التوصل اليها اختيرت العزلة A4 لإنتاج الانزيم ودراسة خواصه في التجارب اللاحقة.

(6): كفاءة العزلات المنتخبة من الغريلة الاولى في انتاج انزيم الاميليز.

الفعالية النوعية	الفعالية الانزيمية	
369.776	5.916	A1
408.36	4.083	A2
189.29	4.97	A3
425.204	6.378	A4
296.195	5.627	A5
260.824	5.55	A6
207.792	3.116	A7

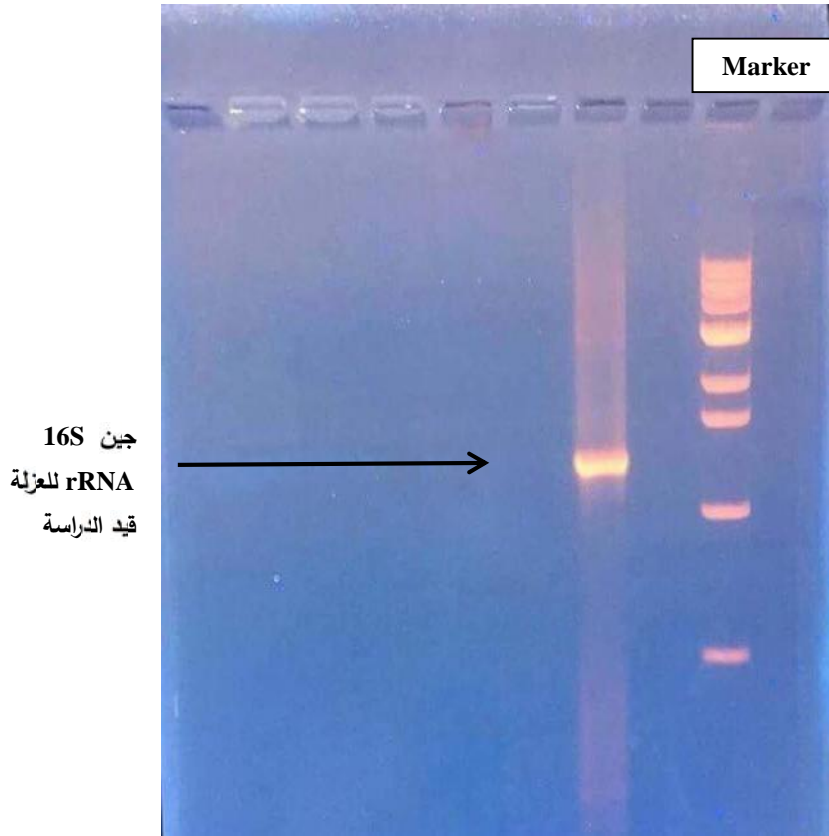
تشخيص العزلة بأستعمال جهاز الفايك Vitek2 :

اظهرت نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلة التي تم الحصول عليها من الغريلة الكمية كما مبين ادناه في الجدول وذلك بأستعمال جهاز Vitek2 Compact System والتي تبين من خلالها احتمالية ان تكون العزلة *Bacillus subtilis* بنسبة 96% وبذلك تم الاعتماد على هذا الفحص وبهذه النسبة في تشخيص النوع وللتاكيد تم اجراء التشخيص الجيني للعزلة للتأكد منها بشكل قطعي على انها تعود الى *Bacillus subtilis*.

التشخيص الجيني للعزلة قيد الدراسة :

اعتمد في هذا النوع من التشخيص على جين 16S rRNA حيث اجري في البداية استخلاص للمادة الوراثية للعزلة قيد الدراسة (*Bacillus subtilis* A4). وتم التأكد من نقاوتها بقياس نسبة امتصاصيتها في 260 الى 280 نانومتر ثم اجري التضخيم بتقنية PCR من خلال استخدام بوائى خاصة بالجين 16S rRNA. حيث اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الترحيل الكهربائي للجين المضخم وجود حزمة واحدة مما يدل على ارتباط البوائى بالجين المستهدف كما في (الشكل، 2) وهو جين 16S rRNA دون الاجزاء الاخرى من DNA المستخلص من العزلة قيد الدراسة، قدر الحجم الجزيئي لنتائج التضخيم حيث كان يبلغ 1256 قاعدة، ويذكر ان جين 16S rRNA يستخدم بشكل ناجح في التمييز بين الانواع المختلفة من البكتريا ويعطي نتائج حاسمة في التشخيص (Lakshmi et al., (2014).

ويذكر ان الباحث استعمل تضخيم جين 16S rRNA في تشخيص بكتريا *Bacillus sp* حيث اشار Hasan et al., (2017) الى ان حجم قطعة جين 16S rRNA بلغت 1082 زوج قاعدة، بينما اشار Rehman & Bukhari, (2015) الى ان طول قطعه جين 16S rRNA التي قام بتضخيمها من *B. subtilis* بلغت 500 زوج قاعدة.



(2): نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز والدليل الحجمي Marker الذي يتراوح بين 500-10000 كيلو قاعدة نروجينية.

اخذ ناتج PCR وارسل الى شركة Macrogen الكورية لمعرفة تسلسل القواعد النروجينية وتبين انه مكون من 1256 قاعدة وكما في (الجدول، 7)



(7): تتابع القواعد النروجينية لجين 16s RNA للعزلة A4.

ات القواعد النروجينية لجين 16S rRNA	
1256	<p>GCGGTCGTTTACTGGGCTACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGGT TGTTTGAACCGCAGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTAC AGATGGACCCGCGGCATAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG CAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG ACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG GACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGAT CGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGT ACCTTGACGGTACCTAACCAAGCAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG GGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG GGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGG ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAACACAGTGG CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTG CTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGTCAGCTAACGCATTAAG CACTCCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGA AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT CCCCTTCGGGGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAG TTGCCAGCATTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGG AGGAAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT ACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCACCGAAACCCCGAGGTTA ACCCATCCCAAAATCTGTTTTCAGTTCGGAACCCAATCTGAAAATCCAC CGGCGTAAAACCTGGAACCCCTTTAATCCCGGATAAACATGCCCGGTGA AAATTCGCTCTCCCTAG</p>

اظهرت النتائج بعد تحليلها ببرنامج BLAST في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI وبالمقارنة مع ما تتوفر به من معلومات، ان هناك تطابق وبنسبة 98% بين هذه العزلة وبين سلالات من بكتريا *B. subtilis* المسجلة في NCBI كما مبين في (الجدول، 8). وعليه عدت العزلة قيد الدراسة عائدة الى البكتريا *B. subtilis*، حيث جاءت هذه النتيجة مطابقة لاختبارات الفايكوك2، ان التشخيص على المستوى الجزيئي يعتبر من الطرائق الحديثة والتي استعملت من قبل العديد من الباحثين (Lakshmi et al., 2014; Khajuria et al., 2015; Shine et al., 2016).

(8): نسبة تطابق تتابعات القواعد النروجينية للعزلة A4 مع 10 سلالات بكتريا *B. subtilis* المسجلة في NCBI.

	Strain	% Identity	Accession
1	<i>Bacillus subtilis</i> MA-40	98	KX426640.1
2	<i>Bacillus subtilis</i> MA-19	98	KX426619.1
3	<i>Bacillus subtilis</i> M29(2016b)	98	KU877333.1
4	<i>Bacillus subtilis</i> St11	98	JN700073.1
5	<i>Bacillus subtilis</i> JAM1 1A	98	JN644507.1
6	<i>Bacillus subtilis</i> K19-29	98	JF460757.1
7	<i>Bacillus subtilis</i> BAB-5142	98	KR998247.1
8	<i>Bacillus subtilis</i> 132	98	JN646017.1
9	<i>Bacillus subtilis</i> TCCC1121	98	JF393297.1
10	<i>Bacillus subtilis</i> IICTSVMH13	98	FR849706.1



REFERENCES

- I. Abd-Elhalem, B. T., El-Sawy, M., Gamal, R. F., & Abou-Taleb, K. A. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro industrial by products. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 193-202.
- II. Abdullah, R., Shaheen, N. A. E. E. M. A., Iqtedar, M., Naz, S. H. A. G. U. F. T. A., & Iftikhar, T. (2014). Optimization of cultural conditions for the production of alpha amylase by *Aspergillus Niger* (BTM-26) in solid state fermentation. *Pak. J. Bot*, 46(3), 1071-1078.
- III. Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- IV. Anonymous. (2010). VITEK2 System Product Information. Durham, North Carolina 27704- 0969/ USA, 2- 22.
- V. Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2015). Purification and characterization of α -Amylase from *Bacillus subtilis* isolated from local environment. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(4), 905-911.
- VI. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein using the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- VII. Collee, G. J., Fraser, A. G., Marmion, B. P., & Simmons, A. (1996). *Practical and Microbiology* 14th ed., Vol. I, Churchill Livingstone.
- VIII. Dash, B. K., Rahman, M. M., & Sarker, P. K. (2015). Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. *BioMed Research International*, (1-9).
- IX. Halket, G., Dinsdale, A. E., & Logan, N. A. (2010). Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endosporeformers. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 120-126.
- X. Hasan, M. M., Marzan, L. W., Hosna, A., Hakim, A., & Azad, A. K. (2017). Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, (1-10).
- XI. Khajuria, V., Sharma, K., Slathia, P., Razdan, K., Singh, S., & Bijender K. B. (2015). Production of a detergent-compatible alkaline protease from *Bacillus cereus* K-3, *Journal Mater Environ Science*. 6(8), 2089-2096.
- XII. Lakshmi, B. K. M., Ratna, P. V., Devi, K. A., & Hemalatha, K. P. J. (2014). Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *International Journal of Research in Engineering and Technology*. 3(2), 435-443.
- XIII. Lin, L. L., Hsu, W. H., & Chu, W. S. (1997). A gene encoding for amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain Ts-23 and its expression in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.*, 82, 325-334.
- XIV. Lin, L. L., Hsu, W. H., & Chu, W. S. (1998). Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and al kaliphilic *Bacillus* sp. Ts-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28, 61-68.
- XV. Ravindar, D. J., & Elangovan, N. (2013). Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions. *Journal of Pharmacy Research*, 6(4), 426-430.



- XVI. Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Kobayashi, T., & Ito, S. (1998). Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleation and amino acid sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9), 3282-3289.
- XVII. Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S. & Tanja P. (2002). Sequencing of 16s rRNA gene a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 8(10), 1117-1123.
- XVIII. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York, USA.
- XIX. Shine, K., Kanimozhi, K., Panneerselvam, A., Muthukumar C., & Thajuddin, N. (2016). Production and optimization of alkaline protease by *Bacillus cereus* RS3 isolated from desert soil. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(7), 193-202.
- XX. Souza, P. M. D. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850-861.
- XXI. Teodoro, C. E. D. S., & Martins, M. L. L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 298-302.
- XXII. Whitaker, J. R., & Bernard, R. A. (1972). *Experiment For Introduction To Enzymology*. The Wiber Press Davis.