عزل وغربلة وتشخيص بكتريا *Bacillus* sp. المنتجة لأنزيم Alkaline protease

مصطفى محمد عمر*
باحث
كلية الزراعة–جامعة كركوك
mustco1988@gmail.com

حميد عبود جبر
أستاذ مساعد
قسم علوم الأغذية–كلية الزراعة–جامعة بغداد
dr_hameedm59@yahoo.com

المستخلص

أمكن الحصول على 25 عزلة من البكتريا المنتجة لأنزيم Alkaline Protease من أصل 50 عزلة والتي تعود إلى جنس *Bacillus* من نماذج من ترب مختلفة أخذت من حقول كلية الزراعة/جامعة بغداد ومن منطقة العامرية في بغداد وأخضعت هذه العزلات لعملية الغربلة الأولية إذ تميزت العزلة 2 و5 و6 و8 و11 و12 المعزولة بدرجة 37 مْ والعزلات 14 و17 و18 المعزولة بدرجة 55 مْ بإنتاجيتها العالية للأنزيم بدلالة أقطار الهالة المتكونه حول المستعمرات البكتيرية لهذه العزلات، ثم أخضعت تلك العزلات لغربلة ثانوية فتبين أن العزلة 12 والتي رمز لها MH12 هي أكفأ تلك العزلات إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 81.00 وحدة/مل. تم تشخيص العزلة من خلال دراسة الصفات المظهرية المزرعية والمجهرية والتشخيص بجهاز Vitek2 compact system كما تم تأكيد التشخيص على المستوى الجزيئي لتلك العزلة بالتحري عن جين16S rRNA بإستخدام تقنية PCR ودراسة تتابعات القواعد النتروجينية. وأظهرت النتائج أن العزلة تعود إلى بكتريا *Bacillus cereus*.

الكلمات المفتاحية: عزلات، البروتييز القاعدي، التشخيص الجيني، جهاز الفايتك2

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences –1493-1503: (6) 48/ 2017 Omar& Jabber

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF *Bacillus* sp. PRODUCING ALKALINE PROTEASE

M. M. Omar*
Researcher
Coll. Agric. -Univ. Kirkuk
mustco1988@gmail.com

H. A. Jabber
Assist. Prof.
Dep. of Food Sci., -Coll. Agric.-Univ. Baghdad
dr_hameedm59@yahoo.com

ABSTRACT

Twenty-five bacteria isolates (*Bacillus* sp.) were isolated from different local sources (soil of college of Agriculture/university of Baghdad and from Amiriya); the obtained isolates were screened for their capabilities for producing alkaline proteases. It has been noticed that isolates designated (2,5,6,8,11,12 at 37°C) and (14,17 and 18 at 55°C) were showed high capability for producing alkaline protease. All isolates subjected to secondary screening. The results revealed that isolate (12) coded MH12 was the highest producers with enzyme activity of (81.00U/ml). The Identification tests of this isolate were carried out by studying morphological, microscopic characteristic and using of Vitek2 compact system. These tests were conformed by identification of 16S rRNA gene using PCR and its nitrogen base sequencing and the results revealed that the isolate was belongs to *Bacillus cereus*.

Key Words: identification, 16S rRNA, *Bacillus cereus*, vitek2 compact system
***Part of M.Sc. Thesis of the first author**
***Received:21/5/2017, Accepted:14/6/2017**

المقدمة

تصنف أنزيمات البروتييز EC.3.4 ضمن أنزيمات التحلل المائي Hydrolases وتتألف من مجموعة كبيرة من الأنزيمات التي تقوم بتحليل البروتينات إلى ببتيدات وأحماض أمينية وهي من الأنزيمات واسعة الأنتشار في الطبيعة إذ توجد في الخلايا الحيوانية والنباتية والأحياء المجهرية (8). ونظراً لتخصصها الواسع حيال مواد التفاعل فقد تميزت هذه الإنزيمات بالعديد من التطبيقات خاصة في المجالات الغذائية والطبية والصيدلانية والصناعية الأخرى. إذ تحتل البروتييزات أهمية صناعية كبيرة وتشكل نسبة 60% من إجمالي مبيعات الأنزيمات المختلفة في قطاعات السوق العالمي للأنزيمات. وتبلغ أنتاج أنزيمات البروتييز التي مصادرها من الأحياء المجهرية مئات الأطنان خصوصاً تلك المستخلصة من بكتريا *Bacillus* (7). لأنزيمAlkaline Proteases الذي أكتشف لأول مرة عام 1963م تطبيقات واسعة في المجال الصناعي إذ يشكل حوالي 25% من الأنزيمات المسوقة تجارياً على المستوى العالمي إذ يستخدم مع المنظفات وكذلك في صناعة متحللات بروتينية ذات قيمة غذائية عالية من مخلفات المجازر والأسماك والمواد البروتينية الرخيصة وفي صناعة الجلود (5). تشير الدراسات إلى أن معظم أنزيمات التنظيف التجارية هو أنزيم Alkaline Proteases المنتج من .spp *Bacillus* لما يتميز به من تحملها لدرجات حرارة تصل إلى أكثر من 60 مْ. وله نشاط في مدى واسع من الأرقام الهيدروجينية والتي قد تصل احياناً إلى اكثر من 10.0 (10). يعد أنزيمAlkaline Proteases المنتج من معظم الأحياء المجهرية من الأنزيمات التي يتم إفرازها خارج الخلية البكتيرية بخطوة واحدة من الغشاء الداخلي إلى الغشاء الخارجي مباشرة (9). نظراً لأهمية أنزيم Alkaline Proteases الصناعية والتجارية وتعدد أستخداماتهُ في مجالات عدة فجاءت فكرة هذه الدراسة التي أستهدفت الحصول على عزلة ذات إنتاجية غزيرة من الأنزيم وتشخيصها ومن ثم أستخدامها في إنتاج الأنزيم في المراحل اللاحقة.

المواد وطرائق العمل

عزل وتنقية عزلات البكتريا: أشتملت مصادر العزل على نماذج من الترب التي جمعت من الحقول الزراعية التابعة لقسم البستنة وهندسة الحدائق وقسم المحاصيل الحقلية لكلية الزراعة/جامعة بغداد أضافة إلى منطقة العامرية ببغداد. أجريت تخافيف عشرية لنماذج التربة وزرعت في وسط المغذي الصلب Nutrient Agar. حضت الأطباق بدرجيتين حراريتين هما 37 مْ و 55 مْ ولمدة 48 ساعة. تم أنتقاء المستعمرات المنفردة والتي تنطبق عليها المواصفات المظهرية لبكتريا التابعة لجنس *Bacillus* وأعيد زراعتها بطريقة التخطيط على الوسط نفسه وبواقع مكررين للحصول على مستعمرات أكثر نقاوة، حضنت بدرجيتين حراريتين هما 37 مْ و 55 مْ ولمدة 48 ساعة.

الغربلة الأولية: أستخدم وسط حليب الفرز الصلب القاعدي بإضافة 1% من حليب الفرز إلى الآكار وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 10.0. لإجراء الغربلة الأولية للعزلات وذلك بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق على درجتين حراريتين 37 مْ و 55 مْ ولمدة 48 ساعة. وتم التعرف عن قابلية العزلات على إنتاج أنزيم Alkaline Protease من خلال قياس قطر منطقة التحلل وقطر منطقة النمو لكل عزلة على أنفراد (11)، حيث أعتبرت هذه النسبة مؤشراً أولياً على كفاءة العزلات على أنتاج أنزيم Alkaline Protease ضمن ظروف التجربة. وقدرت كفاءة إنتاج العزلات للأنزيم وفق المعادلة التالية:

$$\text{كفاءة إنتاج العزلات للأنزيم} = \frac{Z \text{ قطر منطقة التحلل (سم)}}{G \text{ قطر منطقة النمو (سم)}}$$

الغربلة الثانوية/ إنتاج الأنزيم: حُضرت مزارع فتية بعمر لايتجاوز 48 ساعة من العزلات قيد الدراسة والتي وقع عليها الأختيار من مرحلة الغربلة الأولية في وسط المغذي السائل. حسب عدد الخلايا/ مل بقياس أمتصاصية المزارع المنشطة عند طول موجي 600 نانومتر وبالأستعانة بمعادلة الخط المستقيم للمنحنى القياسي McFarlan. وأجري التخفيف اللازم للحصول على العدد المطلوب أضافتهُ من الخلايا إلى وسط الإنتاج الذي يتألف من 10 Glucose و5 Casein و5 Yeast extract و2 KH_2PO_4 و2 K_2HPO_4 و1 $MgSO_4.7H_2O$ غم/لتر وبرقم هيدروجيني 9.0. أستخدمت طريقة المزارع المغمورة Submerged Culture والموصوفة من قبل Nilgun وأخرون(9) وSharma واخرون(14). إذ نقل 50 مل من وسط الإنتاج إلى دوارق زجاجية مخروطية

سعة 300 مل، أضيف اليها اللقاح بحجم 2مل يحتوي على $1X10^7$خلية/مل، وحضنت في حاضنة هزازة Shaker incubator بسرعة 150دورة/دقيقة وبدرجتين حراريتين إما 37 مْ أو55 مْ ولمدة 72 ساعة.

أستخلاص الأنزيم

أستخلص الأنزيم من وسط الإنتاج بعد الأنتهاء من فترة الحضن بترسيب الخلايا بالنبذ المركزي 6700xg وبدرجة حرارة 4 مْ ولمدة 20 دقيقة. أهمل الراسب وأعتبر الراشح المستخلص الخام للأنزيم. قدرت فعالية الأنزيم وأختيرت العزلة الاكفأ في الأنتاج على أساس فعالية الأنزيم وحدة/مل، وأخضعت لفحوصات التشخيص.

تقدير فعالية الأنزيم: قدرت الفعالية حسب ماذكره Sharma وأخرون (15) وذلك بنقل 1.8 مل من المادة الخاضعة للكازين بتركيز 1% إلى أنبوبة أختبار، وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 10 دقائق وأضيف إليها 0.2 مل من محلول الأنزيم. حضنت الانابيب بنفس درجة الحرارة ولمدة 30 دقيقة. أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من Trichloro acetic acid بتركيز 5%. حضر محلول السيطرة Blank بالطريقة نفسها بإستثناء أضافة المحلول الأنزيمي بعد أضافة TCA. رشح محلول التفاعل عبر ورقة الترشيح Whatman No.1 للتخلص من الراسب وقيست امتصاصية الراشح على طول موجي 280 نانومتر في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer. عرفت وحدة الفعالية للأنزيم على أنها كمية الأنزيم بالملتر التي تعطي زيادة مقدارها 0.001 في الإمتصاصية عند طول موجي 280 نانومتر لكل دقيقة تحت ظروف التجربة. أحتسبت فعالية الأنزيم في هذه الدراسة من خلال المعادلة الآتية:

$$\text{الفعالية الأنزيمية (وحدة/مل)} = \frac{A}{0.001\times30\times0.2}$$

إذ تمثل:

A: الأمتصاصية على الطول الموجي 280 نانومتر

0.001: من تعريف وحدة الانزيم

30: مدة التفاعل (دقيقة)

0.2: حجم المحلول الأنزيمي (مل)

الفحوصات التشخيصية للعزلة المنتخبة MH12:

الفحوصات المجهرية: فُحصت العزلة المنتخبة مجهرياً بتصبيغها بصبغة كرام لتحديد أستجابتها لصبغة كرام والتعرف على شكل الخلية وتجمعها وشكل الأبواغ (السبورات).

الفحوصات المزرعية

طبيعة النمو على الوسط الصلب: درست خواص المستعمرات النامية على الوسط الزرعي Nutrient Agar والوسط الزرعي حليب الفرز الصلب القاعدي في درجة حرارة 37 مْ ولمدة 48 ساعة وقد تضمنت شكل المستعمرات وحجمها ولونها ومظهرها وحافتها وأرتفاعها.

طبيعة النمو على الوسط السائل: لقحت العزلة المنتخبة على الوسط الزرعي Nutrient Broth وحضنت على درجة حرارة 37 مْ ولمدة 48 ساعة وتم متابعة طبيعة النمو على الوسط المذكور.

تشخيص العزلة المنتخبة MH12 بنظام الفايتك 2: تم التشخيص بنظام Vitek 2 compact system بإستخدام العدة التشخيصية الخاصة لعائلة Bacillaceae والتي يرمز لها BCL والحاوية على 46 فحصاً من الفحوصات الكيميائية الحيوية وأتبعت طريقة العمل وفق تعليمات الشركة المصنعة BioMerieux.

التشخيص الجزيئي للعزلة المنتخبة: أعتمدت طريقة تضخيم جين 16S rRNA ودراسة تتابعاتها لغرض تأكيد تشخيص العزلة قيد الدراسة

أستخلاص الحامض النووي DNA: أستخدم Presto Mini gDNA Bacteria Kit المجهز من شركة Geneaid التايوانية في أستخلاص DNA من البكتريا. تم أحتساب نقاوة مستخلص DNA من خلال المعادلة التالية:

$$\frac{\text{الامتصاصية على الطول الموجي } \mathbf{260} \text{ نانومتر}}{\text{الامتصاصية على الطول الموجي } \mathbf{280} \text{ نانومتر}}$$

تضخيم DNA: أستخدمت تقنية التفاعل المتسلسل لأنزيم البوليميريز PCR لتضخيم جين 16S rRNA للتأكد من نوع العزلة المنتخبة، (12) بإستخدام البوادئ التالية:

جدول 1. البوادئ المستخدمة في تضخيم جين 16S Rrna

البادئ	التسلسل
الأمامي104F	5- CGGGTGAGTAACACGTG 3-
العكسي1390R	5- CGGTGTGTACAAGGCCC 3-

وأجري التضخيم بحجم 20 مايكروليتر من Master mix وأضيف اليها المواد المذكورة في جدول 2.

جدول 2. المواد المضافة في أنبوبة التفاعل لتضخيم جين 16S rRNA بتقنيةPCR

ت	المكونات	الحجم (مايكروليتر)
1	مستخلص DNA 100.5 نانوغرام/مايكروليتر	5
2	Forward primer بتركيز 10 بيكومول	2
3	Reverse primer بتركيز 10 بيكومول	2
4	free nuclease water	11
	الحجم الكلي	20

مزجت المكونات أعلاه ونقلت إلى جهاز PCR thermal cycler تم برمجة الجهاز حسب الجدول 3

جدول 3. الظروف المعتمدة في تفاعل تضخيم جين 16S rRNA والتي تم برمجتها في جهازPCR (16)

ت	الخطوات	درجة الحرارة(مْ)	الزمن(دقيقة)	عدد الدورات
1	Denaturation	94	5	1
2	Denaturation	94	1	30
3	Annealing	55	1	30
4	Extension	72	1:40	30
5	Final extension	72	5	1
6	Cooling	4	∞	1

بعد أنتهاء وقت التفاعل سحب 5 مايكروليتر من نواتج تضخيم جين 16S rRNA للترحيل الكهربائي.

الترحيل الكهربائي Electrophoresis لنواتج تقنية PCR

تحضير هلام الأكاروزAgarose : حضر الهلام بتركيز 1% وذلك بإذابة 0.5 غم من الأكاروز في 50 مل من محلول 1x TBE. وسخن بإستخدام microwave oven مدة دقيقة وأضيف إليه 2 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide.

تحضير قالب الهلام والعينة: وضع المشط في نهاية قالب الهلام وصب الهلام بعد أن سدت نهايتي القالب وترك لكي يتصلب ثم أزيل المشط وأضيف محلول الترحيل وهو 1X TBE buffer ليغطي سطح الهلام (13)، أضيفت العينات بمقدار 5 مايكروليتر والعينات هي ناتج PCR وأستخدمت دلائل حجمية Ladder والتي جهزت من شركة Promega، هي 10000 pb DNA لتحديد حجموم الحزم.

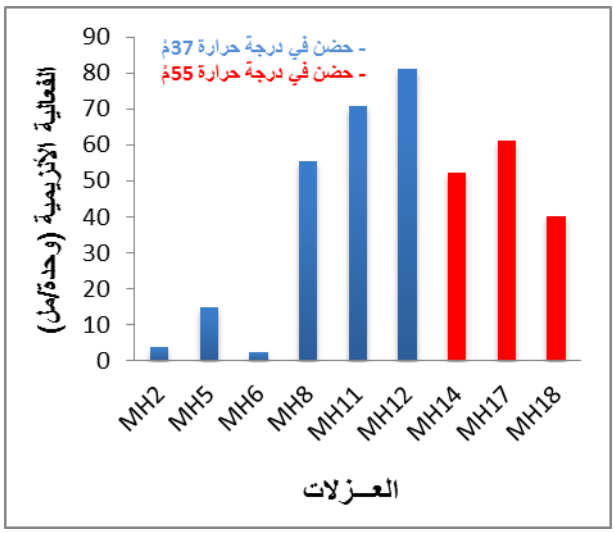
تشغيل الجهاز: ربطت الأقطاب وشغل جهاز الترحيل الكهربائي عند 60 ملي أمبير و90 فولت ولوحظ سريان الصبغة إلى الجهة الأخرى من الهلام، بعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي رفع قالب الهلام من الجهاز وعرضت إلى جهاز UV light transillminator على طول موجي 365 نانومتر للكشف عن مواقع الحزم. أرسلت نواتج الجين المضخم مع البوادئ الى شركة Macrogen الكورية ليتم تحديد تتابعات القواعد النتروجينية. وأعتمدت تلك التتابعات بمقارنتها مع مايتوفر فيها من المعلومات حول هذا الجين في بنك الجينات NCBI من خلال الموقع الالكتروني www.ncbi.nlm.nih.gov وحسب برنامج BLAST Nucleotide وذلك للتعرف على نوع العزلة المنتخبة. كما تم رسم شجرة التطور والعلاقات Phylogenetic tree للعزلة المحلية بعد مطابقتها لسلالات ذات الصلة القريبة منها في بنك الجينات NCBI وبالاعتماد على برنامج MEGA 6 (17).

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا المنتجة لأنزيم Alkaline Protease وغربلتها:

العزل والغربلة الأولية: أمكن في هذه الدراسة أنتقاء أكثر من 50 عزلة تم الحصول عليها من الترب من مواقع مختلفة، وتم عزلها على وسط المغذي الصلب على درجتي الحرارة 55 مْ و 37 مْ، وتنقيتها على الوسط نفسه عدة مرات ومن ثم تمنيتها على وسط حليب الفرز الصلب القاعدي كغربلة أولية. وأعتمد في أنتقاء العزلات على كفاءة تحليلها لحليب الفرز في الوسط المذكور بتقدير نسبة قطر منطقة التحلل إلى قطر النمو. ويوضح الجدول 4 نتائج غربلة 25 عزلة من أصل 50 أما 25 عزلة الأخرى فلم تكن منتجة للأنزيم لذلك اهملت، ويلاحظ أن العزلة 12 هي الأكفأ في التحليل بدرجة حرارة 37 مْ إذا بلغت كفاءتها 1.74 بعد 48 ساعة من الحضن تليها العزلات 8 و11 و5 و2 و6 إذ بلغت كفاءتها التحليلية 1.72 و1.58 و1.49 و1.43 و1.29 بعد 48 ساعة من الحضن وعلى التوالي. أما العزلات التي حضنت بدرجة حرارة 55 مْ فكانت العزلة 17 منها هي الأكفاء، إذ بلغت كفاءتها التحليلية 1.42 بعد 48 ساعة من الحضن تليها العزلات 18 و14 التي بلغت كفاءتها 1.40 و1.35 للفترة نفسها من الحضن وعلى الترتيب. أما بقية العزلات فقد تراوحت كفاءتها التحليلية مابين 0.8 إلى 1.21علية أختيرت العزلات المذكورة وأخضعت إلى الغربلة الثانوية بتقدير كفاءتها على إنتاج أنزيم Alkaline Protease بطريقة المزارع المغمورة Submerged Culture.

الغربلة الثانوية (الكمية): أجريت الغربلة الثانوية على العزلات التسعة المنتخبة من المرحلة السابقة والتي رمز لها MH مع الرقم الخاص بها بـ MH2، MH5، MH6، MH8، MH11، MH12، MH14، MH17، MH18 وذلك بتنميتها على وسط الأنتاج ومقارنة قدرتها على إنتاج الأنزيم بدلالة الفعالية الأنزيمية. فلوحظ تفوق العزلة MH12 بإنتاجيتها للأنزيم بلغت 81.00 وحدة/مل مقارنة ببقية العزلات التي تراوحت فعاليتها بين 2.50 وحدة/مل الى 70.67 وحدة/مل. عليه وقع عليها الاختيار عليها لأكمال الدراسة. ويبين الشكل 1 نتائج المستحصلة من مرحلة الغربلة الثانوية. ويبين الشكل 2 العزلة نفسها والنامية على وسط حليب الفرز الصلب القاعدي.



شكل 1. كفاءة إنتاجية أنزيم Alkaline protease من عزلات البكتريا المنتخبة في مرحلة الغربلة الثانوية بطريقة المزارع المغمورة مقدرة على أساس الفعالية الأنزيمية

جدول 4. كفاءة 25 عزلة على إنتاج أنزيم Alkaline Protease في وسط S.M.A المقدرة على أساس نسبة قطر منطقة التحلل Z الى قطر منطقة النمو G بعد 24 و48 ساعة من الحضن على درجة حرارة 37 مْ و 55 مْ

رقم العزلة	درجة حرارة الحضن (مْ)	موقع اخذ العينة	فترة الحضن (ساعة)	كفاءة التحليل* Z/G	فترة الحضن (ساعة)	كفاءة التحليل* Z/G
1	37	حقل البستنة	24	1.21	48	1.21
2	37	حقل البستنة	24	1.31	48	1.43
3	37	حقل البستنة	24	1.02	48	1.12
4	37	حقل البستنة	24	0.80	48	1.00
5	37	منطقة العامرية	24	1.35	48	1.49
6	37	منطقة العامرية	24	1.04	48	1.29
7	37	منطقة العامرية	24	0.81	48	0.90
8	37	حقل المحاصيل	24	1.72	48	1.72
9	37	حقل المحاصيل	24	1.00	48	1.00
10	37	حقل المحاصيل	24	0.90	48	1.20
11	37	حقل المحاصيل	24	1.35	48	1.58
12	37	حقل المحاصيل	24	1.70	48	1.74
13	37	حقل المحاصيل	24	1.11	48	1.21
14	55	منطقة العامرية	24	1.35	48	1.35
15	55	منطقة العامرية	24	0.90	48	0.90
16	55	منطقة العامرية	24	0.70	48	0.90
17	55	حقل البستنة	24	1.41	48	1.42
18	55	حقل البستنة	24	1.40	48	1.40
19	55	حقل البستنة	24	1.10	48	1.10
20	55	حقل البستنة	24	1.01	48	1.05
21	55	حقل المحاصيل	24	0.80	48	1.00
22	55	حقل المحاصيل	24	0.70	48	1.10
23	55	حقل المحاصيل	24	0.80	48	0.80
24	55	حقل المحاصيل	24	0.80	48	0.80
25	55	حقل المحاصيل	24	0.90	48	1.00

ويذكر أنه أجريت دراسات عديدة لعزل البكتريا المنتجة لأنزيم Alkaline Protease بإسلوب الغربلة الأولية والثانوية، إذ قام الباحث Ahmed وأخرون(2) بعزل 13 عزلة من بكتريا *Bacillus* sp. من التربة. فوجد أنها تحلل وسط حليب الفرز بدرجات متفاوتة تراوح قطر منطقة التحلل بين 5–22 ملم وأظهرت العزلة والتي شخصت فيما بعد على

انها *Bacillus cereus* ASM1 حيث تميزت بأعلى إنتاجية للأنزيم إذا بلغ قطر منطقة التحلل 22 ملم وبلغت فعاليتها الانزيمية 5.46 وحدة/مل في مرحلة الغربلة الثانوية. كما أشار Khajuria وأخرون(3) إلى أن العزلات K-3, Kv-15,M-1 من بين 30 عزلة من بكتريا *Bacillus* تمتلك قابلية عالية على إنتاج الأنزيم في وسط S.M.A في مرحلة الغربلة الأولية فيما بينت العزلة K-3 في مرحلة الغربلة الثانوية قدرة عالية على إنتاج الأنزيم من بين العزلات الثلاثة المنتخبة إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 120 وحدة/مل والتي شخصت فيما بعد على أنها *Bacillus cereus K-3*. وقام Lakshmi وأخرون(6) بإختبار كفاءة 17 عزلة من بكتريا *Bacillus* sp. عزلت من التربة لإنتاج أنزيم Alkaline Protease ولاحظوا أن العزلة المرقمة S8 لها كفاءة عالية على أنتاج الأنزيم فقد أعطت العزلة التي شخصت لاحقاً بإنها *Bacillus cereus* أعلى أنتاجية للأنزيم في مرحلة الغربلة الأولية إذ بلغ قطر منطقة التحلل 4.6 سم بينما بلغت الفعالية الانزيمية في مرحلة الغربلة الثانوية 165.0 وحدة/مل. وتمكن Abou-Elela وأخرون(1) من عزل 18 عزلة من بكتريا *Bacillus* sp. من ترب مصرية، أظهرت العزلة 6 والتي شخصت فيما بعد على أنها *Bacillus cereus* أعلى أنتاجية للأنزيم في مرحلة الغربلة الأولية إذ قدرت على أساس قطر منطقة التحلل والتي بلغت 20 ملم بينما بلغت الفعالية الأنزيمية في مرحلة الغربلة الثانوية 1549.24 وحدة/مل. كما تمكن Sharma وأخرون(14) من عزل 50 عزلة من التربة تعود الى جنس *Bacillus sp.* فوجد أن العزلة التي شخصت أنها تعود الى K3 *Bacillus aryabhattai* تميزت بأعلى إنتاجية من أنزيم Alkaline Protease مقارنة مع بقية العزلات إذ بلغت الفعاليته الأنزيمية 143.61 وحدة/مل. في حين تمكن الباحث Krishnaveni وأخرون(4) من عزل 26 عزلة بكتيرية فوجدوا أن 7 من هذه العزلات لها القدرة على أنتاج الأنزيم في وسط حليب الفزر الصلب القاعدي وتميزت العزلة RMK *Bacillus subtilis* بإنتاجيتها العالية للأنزيم وبفعالية تعادل 79.37 وحدة/مل عند تنميتها على وسط الأنتاج بطريقة تخمرات الحالة السائلة.

شكل 2. عزلة MH12 والنامية على وسط حليب الفرز الصلب القاعدي بعد 24ساعة من الحضن في درجة حرارة 37مْ

تشخيص العزلة بنظام الفايتك2

يوضح الجدول 5 نتائج الفحوصات للعزلة HM12 والتي أظهرت إنها تعود إلى *Bacillus cereus* وبنسبة إحتمالية 93%.

تأكيد تشخيص العزلة بطريقة PCR : أعتمد في هذا التشخيص على جين 16S rRNA إذ تم أولاً أستخلاص المادة الوراثية للبكتريا. وتم التأكد من نقاوتها بقياس نسبة أمتصاصيتها في 260 الى 280 نانومتر والتي بلغت 1.62 ثم جرى تضخيمها بطريقة PCR بإستخدام بوادئ خاصة بالجين المذكور. أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للجين المضخم وجود حزمة واحدة مما يدل على أرتباط البوادئ بالجين المستهدف وهو 16S rRNA دون الأجزاء الأخرى من DNA المستخلص من العزلة. قدر الحجم الجزيئي لناتج التضخيم وكان يتراوح ما بين 1000 الى 1500 زوج قاعدة تقريباً أعتماداً على الدليل الحجمي شكل 3 أرسلت نواتج التضخيم الى شركة Macrogen الكورية لدراسة تتابعاتها. ويبين الجدول 6 تتابعات القواعد النايتروجينية لجين 16S rRNA المضخم. عليه أعتبرت العزلة قيد الدراسة بإنها تعود إلى البكتريا *B. cecrus* وجاءت هذه النتائج مطابقة لأختبارات الفايتك2، ويذكر أن التشخيص على المستوى الجزيئي يعد من الطرق الحديثة إذ أستخدمت من قبل العديد من الباحثين (16) و(3) و(6). والشكل 4 يبين تطابق تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة المنتخبة مع تتابعات القواعد النتروجينية في بنك الجينات

لبكتريا *Bacillus cereus* BD2. ويذكر أن قيم Score وExpect والتي ظهرت في الشكل 4 يشير إلى بعض القيم الأحصائية في برنامج BLAST المستخدم في التحليل، إذ يلاحظ أن قيمة Score كانت مساوية إلى 2008، وقيمة Expect مساوية إلى الصفر، كما أن نسبة الفجوات Gaps كانت مساوية إلى 1%، إذ كلما زادت قيم Score عن 50 واقتربت قيمة Expect والـــ Gaps من الصفر فإنها تعطي مؤشرات أيجابية لزيادة التطابق بين العزلة قيد الدراسة Query مع العزلة القياسية القريبة منها في بنك الجينات Subject. وعند مقارنة تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة المحلية *Bacillus cereus* MH12 مع تتابعات القواعد النتروجينية لنفس الجين التابع لسلالات من بكتريا *Bacillus cereus* في بنك الجينات NCBI وبإستخدام برنامج BLAST تبين وجود تتطابق بنسبة 98% بين هذه العزلة وبين 10 سلالات من بكتريا *B. cereus* مسجلة في بنك الجينات كما في الجدول 7 وبإستخدام برنامج MEGA 6 رسمت شجرة التطور والعلاقات بين العزلات أعتماداً على تتابعات جين 16S rRNA إذ يعتمد هذا البرنامج عند أستخدام الأحتمالية القصوى لأيجاد الشجرة التطورية والعلاقات مع أختيار الشكل الأدق وأعطاء قيم لوغارتمية لأحتمالية درجة القرابة التطورية بين العزلات (17). ويبين الشكل 5 تقارباً واضحاً بين العزلة قيد الدراسة *Bacillus cereus* MH12 وبين السلالات القياسية في بنك الجينات.

جدول 5. نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلة HM12 بنظام الفايتك2

BioMerieux Customer | Laboratory Report | Printed Nov 10. 2016 12:25 CST
System #: | Printed by: lab admin

Isolate Group: 11-1
Card Type: BCL Testing Instrument 0000148FEEC5 (VITEK2C)

Bionumber: 2225101100456621
Organism Quantity

Comments:	

Identification Information	Card: BCL	Lot Number: 2390084203	Expires: Feb 18. 2018 12:00
	Completed: Nov 10. 2016 00:33 CST	State: Final	Analysis Time: 14:25 hours
Selected Organism	93% Probability Bionumber: 2225101100456621	Bacillus cereus	Confidence: Very good Identification
SRF Organism			

Analysis Organisms and Test to Separate

Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides	
Bacillus cereus	TOX. CRYST. (0). RHIZOIDcol(0)
Bacillus thuringiensis	TOX. CRYST. (0). RHIZOIDcol(0)
Bacillus mycoides	TOX. CRYST. (0). RHIZOIDcol(0)

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

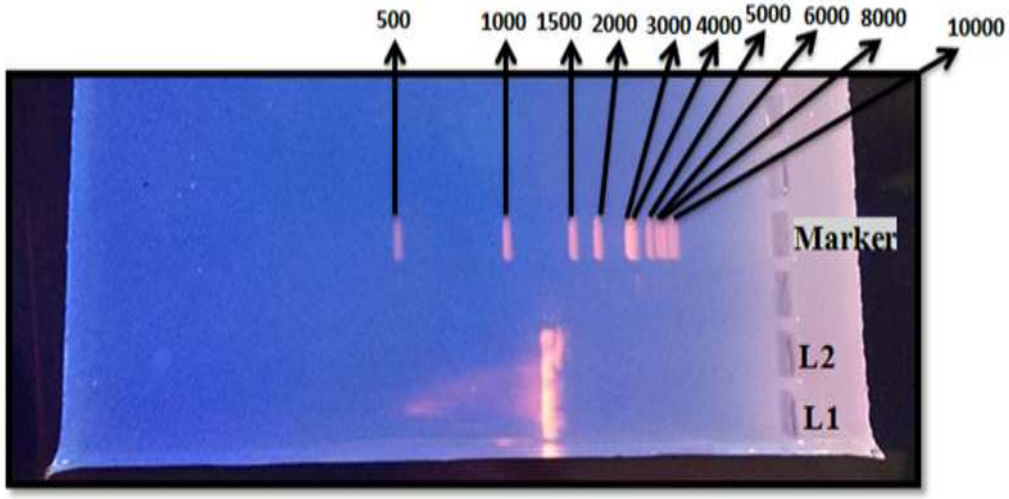
Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides	NAG(95). APPA(24). LysA(7). TyrA(88)

BioMerieux Customer Laboratory Report Printed Nov 10, 2016 12:25 CST
System #: Printed by: lab admin

Isolate Group: 11-1
Card Type: BCL Testing Instrument 0000148FEEC5 (VITEK2C)

Bionumber: 2225101100456621
Organism Quantity:

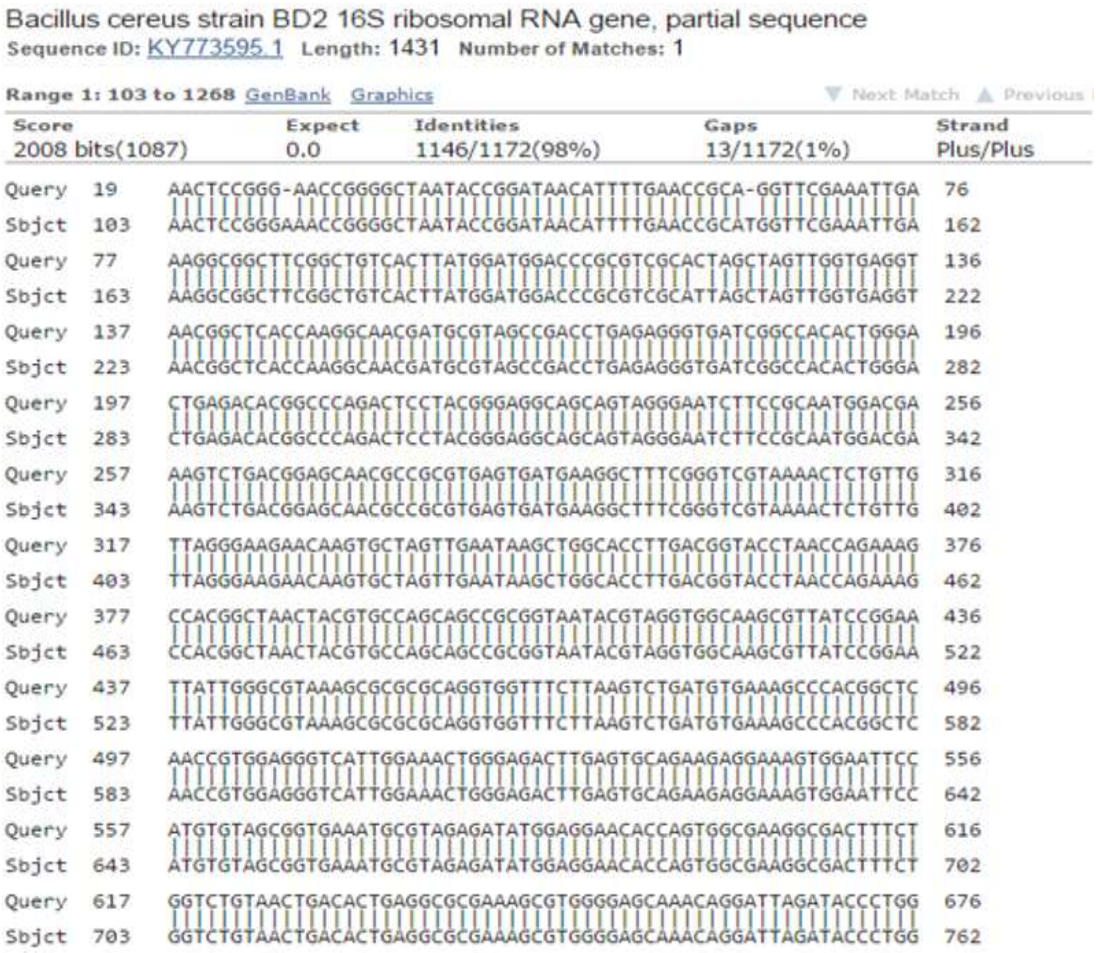
Biochemical Details																
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	-	8	ProA	-
9	BGAL	-	10	PyrA	+	11	AGAL	+	12	AlaA	-	13	TyrA	+	14	BNAG	+
15	APPA	+	18	APPA	-	19	CDEX	-	21	dGAL	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	+	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	+	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	+	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	-	53	dGLU	+	54	dRIB	+	56	PSCNa	-	58	NaCl6.5%	+	59	KAN	+
60	OLD	-	61	ESC	+	62	TTZ	-	63	POLYB_R	+						



شكل 3. نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز إذ يمثل L1,L2: الجين المضخم 16S rRNA للعزلة *Bacillus cereus* MH12 وMarker: دلائل الوزن الجزيئي من 500 الى 10000 كيلو قاعدة نتروجينية

جدول 6. تتابع القواعد النايتروجينية لجين 16S rRNA لبكتريا*B. cereus* MH12

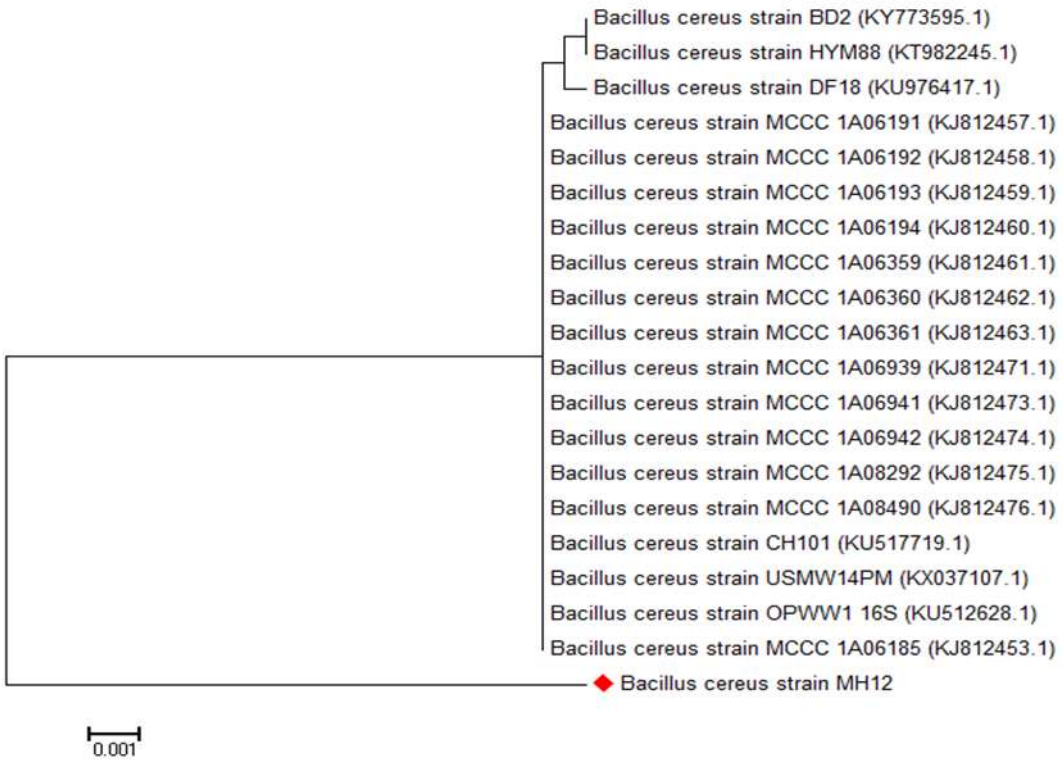
طول القاعدة	تتابعات القواعد الناتروجينية لجين 16S rRNA	جين
1183	AGAACATACGTGACTGCGAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACC GCAGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCACT AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCG GGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGA CGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGA TGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG AAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACC AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG GTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGACTACCCTAGAGATA GGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGTGGTGCATGGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTTGGTTAAGTCCCGCACGAGCGGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTCAA TTGGGCACTCTAACGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGAAAGTGGGGATGACGTCAAATC ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACATGGACGGTACAAAGAAGCTGCA GAACCCCTAGGTCGAGCCTAATCTCATAAACCGGTTCTACAGTTCCGGA	104F-16SrRNA



شكل 4. تطابق تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة المحلية *Bacillus cereus* MH12 مع تتابعات القواعد النتروجينية في بنك الجينات NCBI لبكتريا *Bacillus cereus* BD2 (KY773595.1)

جدول 7. نسبة تطابق تتابعات القواعد النيتروجينية للعزلة *Bacillus cereus* MH12 مع 10 من سلالات بكتريا *Bacillus cereus* المسجلة في بنك الجينات NCBI

	السلالة strain	نسبة التطابق % Identity	رمز الوصول Accession
1	*Bacillus cereus* BD2	98%	KY773595.1
2	*Bacillus cereus* OPWW1	98%	KU512628.1
3	*Bacillus cereus* USMW14PM	98%	KX037107.1
4	*Bacillus cereus* DF18	98%	KU976417.1
5	*Bacillus cereus* CH101	98%	KU517719.1
6	*Bacillus cereus* HYM88	98%	KT982245.1
7	*Bacillus cereus* MCCC 1A08490	98%	KJ812476.1
8	*Bacillus cereus* MCCC 1A08292	98%	KJ812475.1
9	*Bacillus cereus* MCCC 1A06942	98%	KJ812474.1
10	*Bacillus cereus* MCCC 1A06941	98%	KJ812473.1



شكل 5. شجرة العلاقات والتطور Phylogenetic tree للعزلة المحلية بعد مطابقتها بسلالات ذات الصلة القريبة في بنك الجينات NCBI وبالأعتماد على برنامج MEGA 6

REFERENCES

1.Abou-Elela, G. M.; A. H. Ibrahim,; W. S. Hassan,; H. Abd-Elnaby, and N. M. El-Toukhy. 2011. Alkaline protease production by alkaliphilic marine bacteria isolated from Marsa-Matrouh (Egypt) with special emphasis on *Bacillus cereus* purified protease. African Journal of Biot. 10(22):4631-4642.

2.Ahmed, M; R. Rehman; A. Siddique; F. Hasan; N. Ali, and Abdul Hameed. 2016. Production, purification and characterization of detergent stable, halotolerant alkaline protease for eco-friendly application in detergents industry. Int. J. of Bio. Sci. l8(2): 1-12.

3.Khajuria, V; K. Sharma; P. Slathia; K. Razdan; S. Singh, and B. K. Bijender. 2015. Production of a detergent-compatible alkaline protease from *Bacillus cereus* K-3. J. Mater Environ Sci. 6(8): 2089-2096.

4.Krishnaveni K; D. J. Mukesh kumar; M. D. Balakumaran; S. Ramesh and P. T. Kalaichelvan. 2012. Production and optimization of extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* isolated from dairy effluent. Scholars Research Library. 4(1): 98-109.

5.Kumar, D. and C. T. Bhalla. 2004. Purification and characterization of a small size protease from *Ba*cillus *sp.* APR-4. Ind. J. Exp. Biol. 42(5): 21-515.

6.Lakshmi, B. K. M; V. P. Ratna; A. K. Devi, and J. Hemalatha. 2014. Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* Sp. Int. J. of Research in Engin. and Techn. 3(2): 435-443.

7.Muthulakshmi, C; D. Gomathi; D. Kumar; G. Ravikumar; M. Kalaiselvi, and C. Uma. 2011. Production, purification, and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. Jordan J. Bio. Sci. 4(3): 137-148.

8.Nirmal, N; S. Shankar and R. Laxman. 2011. Fungal proteases an overview. Int. J. Biotech. and Biosci. 1(1): 1-40.

9.Nilgun, T; A. C. Coerl,; S. Z. Takac; C. T. Yagci; K. Tunc and C. Cokmus. 2012. Alkaline protease production of *Bacillus cohnii* APT5.TUBITAK. 36: 430-440.

10.Quinn, J. P. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* infections in intensive care unit. Seminare in Respiratory and Critical Care. Medicine. 24(1):61-68.

11.Rana, A. 2004.Purification and Characterization of α-amylase produced from a Local Isolate of *Bacilluus licheniformis* R5. M.S.c. Thesis. College of Agriculture-University of Baghdad.pp:37.

12.Sacchi, C. T; M. A. Whitney; W. L. Mayer; Morey,; R. A. Steigerwalt; A. Boras; S. R. Weyant, and P. Tanja. 2002. Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for identification of *Bacillus anthracis*. Emerging Infectious Diseases journal. 8(10): 1117-1123.

13.Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA. pp: 112.

14.Sharma, K. M.; R. Kumar,; S. Vats, and A. Gupta. 2014. Production, partial purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus aryabhattai* K3.IJAPBC. 3(2): 1-9.

15.Sharma, J.; A. Singh,; R. Kumar, and A. Mittal. 2006. Partial purification of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* AWT20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-alginate beads. Int. J. Microbiol. 2(2): 98-106.

16.Shine, K; K. Kanimozhi; A. Panneerselvam; C. Muthukumar and N. Thajuddin. 2016. Production and optimization of alkaline protease by *Bacillus cereus* RS3 isolated from desert soil. Int. J. of Advanced Research. 3(7): 193-202.

17.Tamura, K; G. stecher; D. Peterson, and S. Kumar. (2013). MEGA 6, Molecular evolutionary genetic analysis version 6. Molecular biology and Evolution.30(12):2725-2729.