عزل وغربلة وتشخيص العزلات المحلية لبكتريا *Bacillus* sp. المنتجة لأنزيم اللاكيز (Laccase)

زينة اديب حسن * حميد عبود جبر ** رباح نجاح جبار***

الملخص

أمكن الحصول على **50** عزلة من البكتريا المنتجة لأنزيم **Laccase** من أصل **200** عزلة والتي تعود إلى جنس ***Bacillus*** من نماذج ترب مختلفة من حي الخضراء ، الإسكان و أبو غريب في محافظة بغداد وأخضعت هذه العزلات لعملية الغربلة الأولية إذ تميزت **10**عزلات بإنتاجيتها العالية للأنزيم وتمثلت بالعزلات (**38**، **41**، **45**، **49**، **60**، **104**، **123**، **133**، **136** و**143**) بدرجة حرارة **37** مْ بدلالة الوقت المستهلك للتفاعل مع كاشف السرنكلدايزين (**SGZ**)، ثم اخضعت تلك العزلات لغربلة ثانوية فتبين ان العزلة **136** هي الاكفأ من حيث قياس الفعالية الانزيمية التي بلغت **47.0** وحدة/مل.تم تشخيص العزلة من خلال دراسة الصفات المظهرية والمزرعية والمجهرية والتشخيص بجهاز **Vitek2 compact system** وكذلك التشخيص على المستوى الجزيئي بإستخدام تقنية **PCR** للتحري عن جين **16S rRNA** للعزلة المنتخبة واظهرت نتائج دراسة تتابعات القواعد النتروجينية مقارنة ببن تلك الجينات تعود العزلة إلى بكتريا ***Bacillus subtilis*** .

المقدمة

اللاكيزات **Laccases** (**benzenediol: oxygen oxidoreductase**، **EC 1.10.3.2**) مجموعة من الانزيمات التي تنتمي لعائلة الانزيمات المؤكسدة متعددة النحاس **Multicopper Oxidase** (**MCO**) تتميز بقدرتها على تحفيز اكسدة مدى واسع من المركبات الاروماتية الفينولية وغير الفينولية فضلا عن قدرتها على اختزال الاوكسجين الجزيئي الى ماء (**10**)، تمتلك اللاكيزات في الغالب **4** ذرات نحاس التي تشمل نحاس النوع الاول **T1cu** (النحاس الازرق) الذي يمثل الموقع احادي النوية **mononuclear** في الانزيم وهو موقع اكسدة المادة الاساس، نحاس النوع الثاني **T2 cu** وزوج من نحاس النوع الثالث **T3cu** اللذان يمثلان الموقع ثلاثي الانوية في الانزيم **Trinuclear site** الذي يحصل فيه اختزال لجزيئة الاوكسجين الى ماء (**18**).

تُنتج اللاكيزات على نطاق واسع في الطبيعة من قبل عدد من الكائنات كالفطريات والنباتات والحشرات والبكتيريا (**3**)، وان من اكثر اللاكيزات المدروسة هي اللاكيزات الفطرية اما تجاريا فيُعد اللاكيز الفطري الوحيد المستخدم في التطبيقات الصناعية في وقتنا الحاضر (**15**) ومع ذلك فقد وجد ان اللاكيزات الفطرية وعلى الرغم من قدرتها التأكسدية العالية الا انها واجهت عدد من المحددات المتمثلة بطول مدة التخمير و الانتاجية المنخفضة فضلا عن امكان تطبيقه فقط في الظروف الحامضية وافتقار هذه الانزيمات للثباتية بارتفاع درجات الحرارة على العكس من التطبيقات الصناعية التي تتطلب ظروف قاسية من خلال تغيير درجات الحرارة والرقم الهيدروجيني والتراكيز المرتفعة من الاملاح التي بمجملها تمثل ظروف غير ملائمة لمثل هذا النوع من اللاكيز لاسيما في مجال معالجة المياه الملوثة (**6**). وعلى الرغم من ان اللاكيز البكتيري يمتلك قدرة تأكسدية اقل ولم يُدرس بشكل موسع كاللاكيز الفطري الا انه يتميز بثباتيته تجاه ارتفاع درجات الحرارة واختلاف ظروف الوسط من خلال الرقم الهيدروجيني ووجود المثبطات والايونات

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الأول

* دائرة البحوث الزراعية، وزارة الزراعة، بغداد، العراق.

** كلية الزراعة، جامعة بغداد ، بغداد، العراق.

*** مركز بحوث التقانات الاحيائية ، جامعة النهرين ، بغداد، العراق.

المعدنية فضلاً عن قدرته على العمل بمدى واسع من المواد الاساس و انتاج الانزيم بمدة قصيرة مع انخفاض كلفة الانتاج (9). فضلا عن الامكانات الواعدة في استخدام اللاكيزات البكتيرية في مختلف التطبيقات الصناعية (7) ويمكن استحداث سلالات ذات انتاج عالي من الانزيم وبثباتية وقدرة تحفيزية اعلى من خلال الهندسة الوراثية ونقل الجين لكائنات مجهرية اخرى او استخدام عوامل مطفرة بشكل اسهل مقارنة بالفطريات (2).

اكتشف اللاكيز البكتيري لأول مرة عام 1993 في بكتريا *Azospirulum lipoferum* ومن ثم اكتشف في عدد من اجناس البكتريا (4) الا ان معظم اللاكيزات البكتيرية هي من نوع CotA laccases ويعد بروتين CotA من المكونات الموجودة بوفرة في الطبقة الاخيرة من غلاف الابواغ الداخلية لبكتريا جنس *Bacillus* الذي يشارك في تخليق الصبغة البنية لغلاف البوغ التي تعد من المركبات الشبيهة بالميلانين (5) كما انه يعزى اليه مقاومة الابواغ للأشعة فوق البنفسجية وبيروكسيد الهيدروجين (11)، امتلكت اللاكيزات ادوار مختلفة في النباتات، الحشرات، الفطريات والبكتريا مما جعلها الخيار الامثل لعدد من تطبيقات التقنية الحيوية والصناعية كالقصر الحيوي في الصناعات الورقية وازالة الصبغات في الصناعات النسيجية واستخدامها كمتحسسات حيوية للتلوث بالمواد الفينولية وفي الصناعات الغذائية كترويق العصائر والمشروبات وكمحسنات للمخبوزات وفي التطبيقات الصيدلانية والتجميلية فضلاً عن أهميتها في المعالجة الحيوية وازالة الملوثات السامة من مياه الصرف والترب الملوثة بالمخلفات الصناعية فضلاً عن عدد من التطبيقات الاخرى (12).

المواد وطرائق البحث

عزل وتنقية عزلات البكتريا

اشتملت مصادر العزل على نماذج من الترب التي جمعت من أماكن مختلفة من مدينة بغداد (حي الخضراء، الإسكان وأبو غريب) ووضعت في قناني معقمة و نقلت إلى المختبر لأجراء عملية العزل لجنس .*Bacillus* sp المنتج لإنزيم اللاكيز. اجريت تخافيف عشرية لنماذج التربة و نقلت إلى حمام مائي بدرجة حرارة 80 م لمدة 15 دقيقة للتخلص من الخلايا الخضرية و الإبقاء على الخلايا المكونة للسبورات (الابواغ) وزرعت في الوسط المغذي الصلب Nutrient Agar المضاف إليه المضاد الفطري cycloheximide (0.001%) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م مدة 48ساعة،تم انتقاء عدد من المستعمرات النامية في هذه الأطباق والتي أظهرت خصائص مظهرية لجنس *Bacillus* sp. واعيد زراعتها بطريقة التخطيط على الوسط والظروف انفسهما للحصول على مستعمرات اكثر نقاوة.

الغربلة الأولية

انتخبت عدد من العزلات التي أظهرت كثافة النمو على الوسط المغذي الصلب Luria-Bertani المضاف اليه 0.2 ملي مول/لتر من $CuSO_4$ وذلك بمراقبة النمو لمدة 5 أيام بدرجة 37م ليتم الكشف عن قدرتها في أنتاج أنزيم اللاكيز وذلك بإضافة كاشف السرنكلدايزين (SGZ) بالتنقيط على المستعمرات المنماة فضلاً عن بتسجيل الوقت المستهلك لحدوث التفاعل والمتمثل بظهور اللون الوردي الناتج من أكسدة كاشف السرنكلدايزين بفعل الانزيم الذي يعكس الاختلاف في قدرة هذه العزلات على أنتاج أنزيم اللاكيز (20).

الغربلة الثانوية /إنتاج الأنزيم

تمت تنمية العزلات المنقاة والمنتخبة والتي سجلت اقل مدة زمنية لحصول التفاعل مع كاشف السرنكلدايزين في مرحلة الغربلة الأولية على الوسط المغذي الصلب المضاف إليه 0.2 ملي مول/لتر من CuSO4 لمدة 5 أيام بدرجة حرارة 37م . غسلت الخلايا النامية على الوسط الصلب بإضافة 5مل من محلول KCl 1 مولر/لتر وجمعت في أنبوبة

وتم نبذها مركزيا بسرعة **10000** دورة/دقيقة لمدة **5** دقائق تم التخلص من الراشح واعيد غسل راسب الخلايا بمحلول **NaCl 0.5** مولر/لتر ثم التخلص من الراشح واعيد تذويب راسب الخلايا في **1** مل من محلول فوسفات البوتاسيوم **0.5** ملي مول و برقم هيدروجيني **7** وقدرت الفعالية الأنزيمية لإنزيم اللاكيز للعينات جميعها لانتخاب الأكفأ منها في أنتاج الأنزيم (**20**).

تقدير فعالية الأنزيم

قدرت الفعالية حسب ما ذكره **Wang** وجماعته (**20**) باستخدام المادة الأساس السرنكلدايزين و ذلك بمزج **0.1** مل من المستخلص الناتج من الغربلة الثانوية مع **2.4** مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ في أنبوبة جديدة وأضيف أليها **0.5** مل من محلول المادة الأساس السرنكلدايزين وسجل التغير في الامتصاصية عند طول موجي **520** نانوميتراً لمدة **3** دقائق وتم تقدير فعالية الأنزيم باستخدام المعادلة التالية :

$$\text{Lactase activity (U/ml)} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t \varepsilon \rfloor} \times \frac{Total\ assay\ volume}{Enzyme\ sample\ volume}$$

إذ ان **Abs** هو التغيير بالامتصاصية؛ **T** وقت الحضن وهو **3** دقائق

ε معامل **extinction coefficient** للسرنكلدايزين و(**ε 525 = 65000 (SGZ) in units of L/ M-1 cm-1**)

$\rfloor$ يمثل قطر خلية المطياف الضوئي (**1** سم)

تعرف وحدة الفعالية الأنزيمية **(Enzyme activity)** (وحده/ مللتر) إنها كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة (**1**) مايكرومول من المادة الاساس في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير أو القياس .

الفحوص التشخيصية للعزلة المنتخبة **136**

الفحوص المجهرية والمزرعية

لقح الوسط المغذي الصلب بالعزلة النقية للبكتريا التي تميزت بكفائتها العالية لانتاج انزيم اللاكيز وحضنت في درجة حرارة **37**م و تمت متابعة النمو في اثناء **48** ساعة، درست طبيعة النمو على الوسط الصلب من حيث شكل المستعمرات و ولونها ومظهرها وحافتها وارتفاعها وحجمها فضلاً عن فحصها مجهريا لتصبيغها بصبغه كرام وصبغة المالاكايت الخضراء للتعرف على شكل الخلية وتجمعها ومواقع الابواغ.

تشخيص العزلة المنتخبة **136** بنظام الفايتك **2**

تم التشخيص بنظام **Vitek 2 compact system** بأستخدام العدة التشخيصية الخاصة بعائلة **Bacillaceae** ذات الرمز **BCL** والحاوية على **46** فحصاً من الفحوص الكيميائية الحيوية واتبعت طريقة العمل وفق تعليمات الشركة المجهزة **Biomerieux**.

التشخيص الجزيئي للعزلة المنتخبة

اعتمدت طريقة تضخيم جين **16S rRNA** باستخدام تقنية **PCR** ودراسة تتابعاته لغرض تشخيص العزلة جزيئياً.

استخلاص الحامض النووي DNA : استخدمت عدة الاستخلاص SHINEamp Genomic DNA Kit المجهزة من شركة Shine Gene في استخلاصDNA من البكتريا. ثم حسبت نقاوة مستخلص DNA عن طريق النسبة بين قراءة الامتصاصية على طول موجي 260/280 نانومتراُ.

تضخيم جين 16S rRNA

استخدمت تقنية PCR لتضخيم الجين وتشخيص العزلة المنتخبة، باستخدام البوادئ (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) كبادئ امامي و(ACGGTTACCTTGTTACGACTT) كبادئ عكسي (8) واجري التضخيم بحجم 20 مايكروليتراً من Master mix واضيف اليه المواد المذكورة في جدول 1.

جدول 1 : المكونات الداخلة في تفاعل تضخيم جين 16S rRNA بتقنية PCR

المكونات	الحجم (مايكروليتر)
البادئ الأمامي Forward	2 بتركيز (10pmol)
البادئ العكسي Reverse	2 بتركيز (10pmol)
مستخلص DNA	5
ماء خالي من الايونات	11
الحجم الكلي	20

نقلت انبوبة التفاعل بعد مزجها الى جهازPCR thermal cycler إذ تم برمجة الجهاز حسب جدول 2.
بعد انتهاء وقت التفاعل اخذت 5 مايكروليترات من ناتج التضخيم للترحيل الكهربائي .

جدول 2 : البرنامج المستخدم لتضخيم جين 16S rRNA

الخطوات	الظروف	عدد الدورات
Pre Denaturation	95 C لمدة 5 دقائق	1
Denaturation	94 C لمدة 30 ثانية	35
Annealing	55 C لمدة 1.5 دقيقة	
Extension	72 C لمدة 45 ثانية	
Final Extension	72 C لمدة 5 دقائق	1
Cooling	∞	-

الترحيل الكهربائي Electrophoresis لنواتج التضخيم لتقنية PCR

تحضير هلام الاكاروز Agarose

حضر الهلام بتركيز 1% و ذلك باذابة 0.5 غم من الاكاروز في 50 مل من محلول TBE 1x وسخن في المايكروويف لمدة دقيقة واضيف اليه 5 مايكروليترات من صبغة Goldview .

تحضير قالب الهلام والعينة

صب المزيج السابق في قالب الصب بعد وضع المشط الخاصة بالترحيل في مكانها المحدد و ترك ليتصلب بالكامل. نقل قالب الصب بعد اكتمال التصلب وازالة المشط إلى حوض الترحيل و اضيف إليه محلول الترحيل TBE

1x ليغطي سطح الهلام (17). اضيف 5 مايكروليتر من عينة التضخيم بالإضافة للدليل الحجمي 1Kb plus Ladder المجهز من شركة Solarbio لتحديد حجوم الحزم الظاهرة .

تشغيل الجهاز

وضعت الأقطاب الخاصة بجهاز الترحيل وتم تشغيل مجهز الطاقة power supply بعد برمجته عند 60 ملي أمبير و100 فولت، لمدة ساعة. بعد انتهاء مدة الترحيل نقل قالب الهلام إلى جهاز UV- transilluminator Light ليتم الكشف عن مواقع الحزم. ارسلت نواتج الجين المضخم مع البوادئ الى شركة Macrogen الكورية لتحديد تتابعات القواعد النتروجينية. وقورنت تلك التتابعات مع مايتوفر من معلومات حول هذا الجين في بنك الجينات NCBI وحسب برنامج BLAST Nucleotide وذلك لتشخيص نوع العزلة المنتخبة وتسجيلها في بنك الجينات . كما تم رسم شجرة التطورPhylogenetic tree للعزلة المحلية بعد مقارنتها مع سلالات ذات الصلة القريبة منها في بنك الجينات باستخدام برنامج MEGA6 (19).

النتائج والمناقشة

عزل وغربلة البكتريا المنتجة لانزيم اللاكيز

العزل والغربلة الاولية

اختبرت القدرة على التفاعل مع السرنكلدايزين لـ 200 عزلة محلية مأخوذة من ترب مناطق مختلفة من محافظة بغداد. نميت العزلات على الوسط المغذي الصلب N.A و بدرجة حرارة 37م لمدة 5 أيام، سجل زمن حدوث التفاعل والمتمثل بظهور اللون الوردي الناتج من أكسدة السرنكلدايزين المضاف بطريقة التنقيط الى العزلات المنتخبة الذي يدل على قدرة هذه العزلات على أنتاج أنزيم اللاكيز.

يوضح جدول 3 قدرة العزلات المنتخبة في المرحلة الاولية و البالغ عددها 50 عزلة على أنتاج انزيم اللاكيز بدلالة الوقت. أخضعت افضل العزلات المنتخبة البالغ عددها 10 عزلات إلى عدد من الفحوص الأولية المتمثلة بالتصبيغ بصبغة كرام، التشخيص ألمجهري فضلاً عن فحص تكوين الابواغ فتبين أن معظم هذه العزلات كانت موجبة لصبغة كرام عصوية شكل ومكونة للابواغ مع اختلاف مواقع الابواغ. كما يلاحظ من جدول وجود تباين شديد بين العزلات المدروسة في سرعة التفاعل مع كاشف السرنكلدايزين آذ سجلت بعض العزلات (41،38، 45، 49، 60، 104، 123، 136،133 و143) ظهور اللون بوقت قصير يصل إلى 20 – 40 ثانية في حين سجلت عزلات اخرى (2، 15، 87، 99، 163،118 و170) تغيير بأوقات طويلة لحصول التفاعل مع السرنكلدايزين يتراوح ما بين 60– 80 ثانية أما العزلات غير المسجلة في الجدول فلم يحدث فيها أي تفاعل مع كاشف السرنكلدايزين مما يدل على عدم قدرتها على أنتاج أنزيم اللاكيز.

اجريت الغربلة الثانوية بتنمية 10 عزلات منتخبة من أصل 50 عزلة أعطت أفضل النتائج من حيث اقل وقتاً لحصول التفاعل مع السرنكلدايزين على الوسط المغذي الصلب Luria-Bertani المضاف اليه 0.2 ملي مول/لتر من CuSO4 وقدرت الفعالية الأنزيمية لها . أظهرت النتائج المستحصل عليها بان العزلة رقم 136 جدول 4 تتميز بإنتاجها العالي لأنزيم اللاكيز مقارنة مع العزلات الأخرى (38، 41، 45 ،49، 60 ،107، 123،133، 136 و143) آذ سجلت العزلة 136 فعالية أنزيمية بلغت 47 وحدة/مل في حين تراوحت الفعالية الأنزيمية للعزلات الأخرى بين 21– 40 وحدة/مل وبناءً على ما ذكر فقد تم انتخاب العزلة 136 لإكمال الدراسة عليها.

جدول 3: المدة الزمنية لحصول التفاعل وظهور اللون الوردي للعزلات المنتخبة

رقم العزلة	الوقت (ثانية)	رقم العزلة	الوقت (ثانية)	رقم العزلة	الوقت (ثانية)	رقم العزلة	الوقت (ثانية)
2	71	41	33	104	34	143	32
3	53	45	34	110	57	144	51
4	61	49	35	113	36	158	64
8	42	59	50	114	41	163	71
15	74	60	35	118	75	168	49
16	47	66	55	121	39	170	83
17	45	74	45	122	36	177	75
19	61	80	51	123	35	185	62
21	65	87	71	129	44	187	36
25	56	92	52	133	34	192	40
29	59	98	60	136	22	197	47
35	57	99	81	138	64		
38	30	103	52	142	39		

اشارت العديد من الدراسات الى نجاح استخدام طريقة الكواشف في الغربلة الاولية لعزل الانواع المايكروبية المنتجة لانزيم اللاكيز. اذ اشار كل من Mishra وSrivastava (13) الى قدرة بكتيريا *Bacillus subtilis* MTCC 1039 على أنتاج أنزيم اللاكيز من خلال تنميتها على وسط غذائي صلب مضاف أليه الكوايكول Guaiacol كمادة أساس، أذ ذكر الباحث حصول أكسدة للكوايكول وتكوين منطقة ذات لون بني محمر reddish brown حول العزلة المنتخبة وفي دراسة اخرى قام بها كل من Bhuvaneswari وRajeswari (14) للكشف عن قدرة 22 عزلة على أنتاج أنزيم اللاكيز من خلال تنميتها على وسط غذائي صلب حاوي على مادة الكوايكول وجد أن 6 عزلات أظهرت اللون البني المحمر حول المستعمرة النامية. كما تتفق هذه النتائج مع ما ذكرته Allos وHussein (1) من أن 17 عزلة تابعة لجنس *Bacillus* كانت منتجة لأنزيم اللاكيزمن أصل 39 عزلة نميت على وسط LB الصلب و أظهرت لوناً ورديا عند تقطير محلول السرنكلدايزين عليها. كما قام Singh و جماعته (16) بعزل 204 عزلة بكتيرية من عينات التربة ووجد بأن 30 عزلة منها أظهرت فعالية إنتاجية لأنزيم اللاكيز عند تنميتها على الوسط M162 المضاف أليه الكوايكول كمادة كاشفة لمدة 96ساعة بدرجة37م وكانت بكتريا *B.lichniform* و*B.pumilus* من أكفأ العزلات،كذلك ذكر Wang وجماعته (20) أن استخدام مادة السرنكلدايزين للكشف الأولي عن العزلات المنتجة للاكيز اظهر قدرة 46 عزلة من أصل 400 عزلة منماة على وسط M9 والتي أظهرت قدرات مختلفة للتفاعل مع السرنكلدايزين وأن عزلة واحدة فقط *B.subtilis* WD23 تميزت بقدرة عالية على انتاج انزيم اللاكيز.

جدول 4 : الفعالية الانزيمية للعزلات البكتيرية المنتخبة لانتاج انزيم اللاكيز

رقم العزلة	الفعالية الانزيمية وحدة/مل	رقم العزلة	الفعالية الانزيمية وحدة/مل
38	41	107	29
41	33	123	37
45	25	133	42
49	39	136	47
60	21	143	35

تشخيص العزلة بنظام الفايتك 2

يوضح جدول (5) نتائج فحوصات العزلة 136 والتي اظهرت انها بكتريا *B.subtilis* وبنسبة احتمالية 97%.

جدول 5 :نتائج الفحوص التشخيصية للعزلة 136 باستخدام نظام الفايتك 2

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Dec 24, 2017 15:15 CST

Patient Name: 2Z, . Patient ID: REYGERG
Location: Physician:
Lab ID: 2 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Bacillus subtilis

Source: Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	13.87 hours	Status:	Final
Selected Organism	97% Probability	**Bacillus subtilis**		
	Bionumber:	1373070715457660		
ID Analysis Messages				

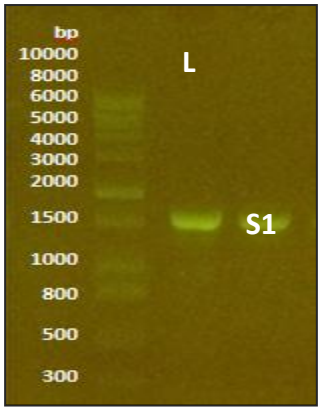
Biochemical Details

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	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	+	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	NaCl 6.5%	+	59	KAN	+
60	OLD	-	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB_R	-						

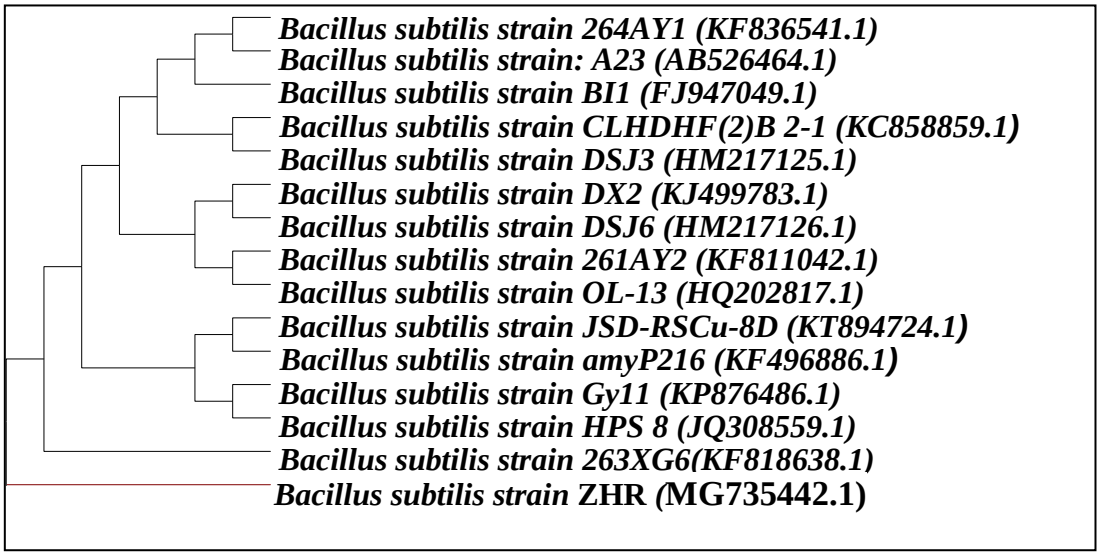
التشخيص الجزيئي للعزلة المنتخبة

اعتمدت طريقة تضخيم جين 16S rRNA بإستخدام تقنية PCR، اذ تم استخلاص المادة الوراثية للبكتريا اولا. وتم التأكد من نقاوتها بقياس نيبة امتصاصيتها من 250 الى 280نانومتراً التي بلغت 1.82. ثم استخدمت البوادئ الخاصة لتضخيم جين 16S rRNA بإستخدام تقنية PCR. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز لجين 16S rRNA والموضحة في شكل 1 بوجود حزمة واحدة ناتجة من تفاعل PCR التي يقدر حجمها تقريبا 1450 زوجاً قاعدة مقارنة بالدليل الحجمي المستخدم. ارسلت نواتج الجين المضخم مع البوادئ الى شركة Macrogen الكورية لتحديد تتابعات القواعد النتروجينية جدول 6 قورن التتابع الخاص بالجين وباستخدام برنامج BLAST تطابق تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة المنتخبة مع تتابعات القواعد النتروجينية في بنك الجينات بدرجة تماثل 99 % جدول 7. عليه عدت العزلة قيد الدراسة بانها بكتريا *Bacillus subtilis* وقد تمت تسمية وتسجيل هذه العزلة المحلية في بنك الجينات *Bacillus subtilis* ZHR وبرقم تعريفي MG735442.1. وباستخدام برنامج MEGA6

رسمت شجرة التطور والعلاقات بين العزلات اعتمادا على تتابعات جين 16S rRNA لإعطاء درجة القرابة التطورية بين العزلات ويبين شكل 2 تقاربا واضحا بين العزلة قيد الدراسة وبين السلالات من بنك الجينات.



شكل 1: ناتج التضخيم بتقنية PCR لجين 16S rRNAعلى هلام الاكاروز (1%). S1، S2 مكررات العينة، الدليل الحجمي (Ladder) 1 kb plus، 300 – 10000 قاعدة نتروجينية.



شكل 2: شجرة العلاقات والتطورPhylogenetic tree للعزلة المحلية ZHR *Bacillus subtilis* بعد مطابقتها بسلالات ذات الصلة القريبة في بنك الجينات اعتمادا على برنامج MEGA6 .

جدول 6: تتابع القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة ZHR *Bacillus subtilis* المسجلة بالرقم التعريفي MG735442.1 في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI

عدد القواعد	تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA
1150	GCGCCAACCTGTACACCATTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACC GACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC CCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCA GCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGT GGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGC ACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCAC CTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTG GCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGG GGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTC TTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCT TAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCAC TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCAC GCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTG GTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCT CCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCC GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCA ATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG TAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCAA ACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACGAAACTTTACAATCCAAAAACCTTCAT CACTCCCGCCGGCGGTGCTCCGTCGGACTTTCGTCCAATTGCGGAAAGATT CCCTACGGGTGGCTTTCCGG

جدول 7:نسبة تطابق تتابعات القواعد النتروجينية للسلالات المسجلة في NCBI مع تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16S rRNA للعزلة ZHR *Bacillus subtilis* المسجلة بالرقم التعريفي MG735442.1 في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI

	Strain السلالة	Identity (%) نسبة التطابق	Accession رمز الوصول
1	*Bacillus subtilis* 263XG6	99	KF818638.1
2	*Bacillus subtilis* JSD-RSCu-8D	99	KT894724.1
3	*Bacillus subtilis* Gy11	99	KP876486.1
4	*Bacillus subtilis* 264AY1	99	KF836541.1
5	*Bacillus subtilis* 261AY2	99	KF811042.1
6	*Bacillus subtilis* DX2	99	KJ499783.1
7	*Bacillus subtilis* amyP216	99	KF496886.1
8	*Bacillus mojavensis* A131	99	KC519426.1
9	*Bacillus subtilis* HPS 8	99	JQ308559.1
10	*Bacillus subtilis* OL-13	99	HQ202817.1

المصادر

1-Allos, M. M. and A. A. Hussein (2015). Optimum Conditions for Laccase Production by Local Isolate of *Bacillus Cereus* B5.Journal of Al-Nahrain Univ.,18 (2):133-140

2-Brissos, V. N.; L. Pereira; F. D. Munteanu; A. Cavaco Paulo and L. G. O. Martins (2009). Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. Bio. J.,4(4): 558-563.

3-Chandra, R. and P. Chowdhary (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. Environmental Science. Processes and Impacts, 17(2): 326-342.

4-Dhiman, K. and P. Shirkot (2015). Bioprospecting and molecular characterization of laccase producing bacteria from paper mills of Himachal Pradesh. Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences, 85(4):1095-1103.

5-Driks, A. (1999). *Bacillus subtilis* Spore Coat. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(1): 1-20.

6-Du, W.; C. Sun; J. Liang; Y. Han; J. Yu. and Z. Liang (2015). Improvement of Laccase Production and its Characterization by Mutagenesis. Journal of Food Biochemistry, 39(1): 101-108.

7-Dubé, E.; F. O. Shareck; Y. Hurtubise; M. Beauregard and C. Daneault (2008). Decolourization of recalcitrant dyes with a laccase from Streptomyces coelicolor under alkaline conditions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(10): 1123-1129.

8-Guan, Z. B.; N. Zhang; C. M. Song; W. Zhou; L. X. Zhou; H. Zhao and X. R. Liao (2014). Molecular cloning, characterization, and dye-decolorizing ability of a temperature-and pH-stable laccase from *Bacillus subtilis* X1. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172(3):1147-1157.

9-Guan, Z. B.; Y. Shui; C. M. Song; N. Zhang; Y. J. Cai and X. R. Liao (2015). Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. Environmental Science and Pollution Research, 22(12): 9515-9523.

10-Hakulinen, N. and J. Rouvinen (2015). Three-dimensional structures of laccases.Cellular and Molecular Life Sciences, 72(5): 857-868.

11- Martins, L. O.; C. M. Soares; M. M. Pereira; M. Teixeira; T. Costa ; G. H. Jones and A. O. Henriques (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. Journal of Biological Chemistry, 277: 18849-18859.

12- Menaka, S.; T. A. Lone and R. A. Lone (2015). Cloning of laccase gene from a newly isolated 2, 4-dichlorophenol degrading *Bacillus subtilis* from dyeing industry sites. Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci. 1: 1602-1608.

13-Mishra, S. K. and S. K. Srivastava (2016). Production of Extracellular laccase from Bacterial Strain *Bacillus subtilis* MTCC 1039 using different Parameter. Biosciences Biotechnology Research Asia, 13(3): 1645-1650.

14-Rajeswari, M. and V. Bhuvaneswari (2016). Production of extracellular laccase from the newly isolated *Bacillus* sp. PK4. African Journal of Biotechnology, 15(34): 1813-1826.

15-Rodríguez Couto, S. and J. L. Toca Herrera (2006).Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology Advances, 24(5): 500–513.

16- Singh, D.; E. Narang; P. Chutani; A. Kumar; K. K. Sharma; M. Dhar and J. S. Virdi (2014). Isolation, Characterization and Production of Bacterial Laccase from *Bacillus* sp. Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. Springer India, 39: 439-450.

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

18- Solomon, E. I.; A. J. Augustine and J. Yoon (2008). O2 reduction to H2O by the multicopper oxidases. Dalton transactions, 30:3921-3932.

19-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.

20- Wang, C. ; M. Zhao; D. Li ; D. Cui; H. Yang and L. E. Lu (2010). Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil. African Journal of Biotechnology, 9(34):5496-5502.

ISOLATION, SCREENING AND IDENTIFICATION OF LOCAL *Bacillus* sp. BACTERIA PRODUCING LACCASE ENZYME

Z. A. Hassan* **H. A. Jabur**** **R. N. Jabbar*****

ABSTRACT

Fifty bacteria isolates that produce Laccase enzyme were obtained from 200 isolate and seems to belongs to (*Bacillus* sp.) were isolated from different local sources (soil samples from Al-Khadra, Al-Iskan and Abu Ghraib areas) in baghdad; the obtained isolates were screened for their capabilities for producing Laccase enzyme . It has been noticed that isolates designated (38, 41, 45, 49, 60, 104, 123, 133, 136 and 143) were showed high capability for producing Laccase enzyme at 37° C in terms of the time consumed to interact with the SGZ reagent. All isolates subjected to secondary screening. The results revealed that isolate (136) was the highest producers with enzyme activity of (47.0 U/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 technique and its nitrogen base sequencing and the results revealed that the isolate was belongs to *Bacillus subtilis* bacteria.

Part of Ph.D. Thesis of the first author

* **Office Of Agric. Res., Ministry of Agric., Baghdad, Iraq.**

** **College of Agric., Baghdad Univ., Baghdad, Iraq**

*** **Biotech. Research Center, Al-Nahrain Univ., Baghdad, Iraq.**