P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2007 ,(1), (2) :53-63

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

عزل وتشخيص البكتريا المنتجة لأنزيم الاميليز من ترب مدينة الرمادي وانتاجه بأستعمال أوساط محلية

ظافر فخري عبد القادر الراوي

قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة الانبار

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠٠٦/١٢/٣٠
تاريخ القبول: ٢٠٠٧/٣/١
تاريخ النشر: ١٤/ ٠٦ / ٢٠١٢

DOI: 10.37652/juaps.2007.15369

الكلمات المفتاحية:

بكتريا *Bacillus Subtilis*،
أنزيم الاميليز،
كوالح الذرة،
تبن البرسيم،
نبات الشمبلان.

الخلاصة:

تهدف الدراسة إلى عزل البكتريا المحللة للنشا والمنتجة لأنزيم الاميليز من ترب مدينة الرمادي والحصول على عزلات محلية كفوءة منتجة للأنزيم. حصل على ٣٠ عزلة بكتيرية منتجة للأنزيم انتخبت منها أكفأ عشر عزلات استعملت أوساط زرعية تحتوي على مخلفات نباتية منتشرة في البيئة المحلية بكثرة من اجل إنتاج الأنزيم وهي كوالح الذرة، تبن البرسيم ونبات الشمبلان وذلك لأجل الحصول على الأنزيم بتكلفة واطئة. أظهرت نتائج الدراسة أن أفضل إنتاج للأنزيم باستخدام وسط أكار النشا كانت عند pH= ٧ ودرجة حرارة ٣٥ْ م وبعد ٢٤ ساعة حضن وباستخدام كوالح الذرة ثم نبات الشمبلان كمصدر كربوني حيث بلغ قطر المنطقة الشفافة ٨ سم.

أظهرت العزلة المحلية PR10 قدرة عالية على إنتاج أنزيم الاميليز باستعمال المزارع المغمورة حيث كان أفضل إنتاج عند الرقم الهيدروجيني ٧ ودرجة حرارة ٤٠ْ م وباستعمال كوالح الذرة بتركيز ٢% وعند الحضن باستعمال الحاضنة الهزازة بعدد دورات ١٥٠ دورة / دقيقة وحجم لقاح بكتيري ١,٥ مللتر / ١٠٠ مللتر وسط وباستعمال الببتون كمصدر نتروجيني وبمدة حضن ٢٤ ساعة كانت الفعالية الأنزيمية ٢٤,٧٣١ وحدة / مللتر. أظهرت نتائج تشخيص العزلة PR11 أنها بكتريا من نوع B.subtillis.

المقدمة

إن قابلية بعض الأحياء المجهرية على إنتاج مواد ذات أهمية تطبيقية مثل الأنزيمات ومضادات حيوية والأحماض العضوية وغيرها مازالت تجذب اهتمام العديد من الباحثين لعزل واكتشاف من سلالات من الأحياء المجهرية ذات الكفاءة العالية في الإنتاج والمستقرة وراثيا، ويعد أنتاج أنزيمات الاميليز من الأحياء المجهرية ذات أهمية كبيرة نظرا لاستخدامها الواسع في مجالات الصناعات الغذائية والتخميرية والدوائية وفي صناعة الورق والتبغ.

وتعرف أنزيمات الاميليز Amylases بالأنزيمات المحللة للنشا التي تقوم بتحليل الأواصر الكلايكوسيدية في النشا والكلايكوجين والسكريات المتعددة المشتقة منها ومن أنواعها أيضا الفا اميليز والبيتا اميليز والكلوكو اميليزوالأنزيمات المزيلة للتفرعات Debranching enzymes. وتنتشر هذه الأنزيمات بصورة واسعة بين أفراد المملكة الحيوانية والنباتية ومملكة الأحياء المجهرية (1).

وتقسم هذه الأنزيمات الى أنواع رئيسية هي ألفا اميليز والذي يوجد في النباتات والأنسجة الحيوانية وفي الأحياء المجهرية ويعد من أنزيمات الأحياء المجهرية المحللة للنشا الأكثر شيوعا وتنتجه مجموعة كبيرة من الأحياء المجهرية وبخاصة بعض أنواع Bacillus، Streptomyces،

* Corresponding author at: Department of Life Sciences - College of Education - University of Anbar, Iraq;
E-mail address:

Aspergillus، وهو من أنزيمات التكسير الداخلي ويهاجم الأواصر الكلايكوسيدية من نوع $(\alpha 1-4)$ في الاميلوز والاميلوبكتين من الداخل ويكون تأثيره عشوائي وغير منتظم منتجا الدكسترينات والمالتوز والكلوكوز، والنوع الأخر من أنزيمات الاميليز في النباتات وبخاصة الحبوب المنبتة (مثل الشعير والحنطة وفول الصويا والبطاطا الحلوة) (Howling 1989 ,Nadiriaz et.al., (2003)، كما عزل عدد من الأحياء المجهرية مثل Clostridium SPP., B.megaterium، ويعد هذا الأنزيم من أنزيمات الاميليز ذات التكسير الخارجي إذ يهاجم الأواصر الكلايكوسيدية من نوع $(\alpha 1-4)$ بالتناوب من النهايات غير المختزلة لسلسلة الاميلوز والاميلوبكتين منتجا البيتامالتوز، (2).

أما أنزيم الكلوكواميلوز فتعد الفطريات من ابرز مصادرانتاجه وبخاصة فطر Aspergillus spp. و Rhizopus spp. (٣) ويقوم هذا الأنزيم بتحرير ألبيتا – كلوكوز من النهايات غير المختزلة لسلسلة الاميلوز والاميلوبكتين وذلك عن طريق مهاجمة الأواصر الكلايكوسيدية من نوع $(\alpha 1-4)$ وبصورة متعاقبة، ويهاجم أيضا الأواصر الكلايكوسيدية من نوع $(\alpha 1-6)$ ولكن بسرع اوطا من سرعة تكسير الآصرة $(\alpha 1-4)$ (٢).

اضافة الى الأنزيمات المزيلة للتفرعات والتي تقوم بمهاجمة الأواصر الكلايكوسيدية من نوع $(\alpha 1-6)$ في الاميلوبكتين والبليلان وتضم نوعين رئيسيين من الأنزيمات هما الايزواميليز Isoamylase والبليولانيز Pullulanase حيث يعمل الأنزيم الأول على الاميلوبكتين أما الثاني فيعمل على البليولان والاميلوبكتين (٢). وعزلت هذه الأنزيمات من بكتريا Klebsiella prienmonias. Pseudomonas SP.

وتشير الدراسات حول وجود العديد من الأحياء المجهرية التي لها القدرة على تخليق أنزيمات محللة للنشا خصوصا أنزيم الالفا اميليز ومن الناحية الاقتصادية تعتبر بكتريا Bacillus subtilis من أكثر البكتريا استخداما في إنتاج أنزيم الالفا اميليز يليها الفطريات، ومن الأمور المشجعة على استعمال هذا النوع من البكتريا في إنتاج الأنزيم هي قدرة هذه البكتريا على تحمل درجات الحرارة العالية الأمر الذي له أهمية بالغة في التقانة الحيوية وإنتاج الأنزيمات(٣).

ولقد درس جنس الـ Bacillus من قبل الكثير من الباحثين وخاصة البكتريا من هذا الجنس المحبة للحرارة وكذلك درست الظروف المثلى لنمو هذه البكتريا وإنتاج أنزيم الاميليز بوساطتها وكيفية تحسين هذه الظروف وبالتالي زيادة إنتاج وفعالية الأنزيم.

فقد حصل (٤) على أفضل إنتاج للأنزيم باستخدام بكتريا Bacillus SP. عند درجة حرارة ٥٥°م ورقم هيدروجيني ٦ واستخدام نشا الذرة والشعير كمصدر كربوني في حين حصل على إنتاج اقل باستخدام نشا الحنطة.

في حين حصل (٥) أفضل إنتاج للأنزيم بوساطة نفس البكتريا السابقة باستخدام نترات الصوديوم كمصدر نتروجيني وعند رقم هيدروجيني ٧,٥ وان إنتاجية الأنزيم ازدادت بزيادة كمية النترات المستعمله وبإضافة ايونات الكالسيوم وبصيغة $CaCl_2$ إلى وسط التخمر.

أما (٦) فقد حصل على أفضل إنتاج للأنزيم بوساطة بكتريا Bacillus SP. وذلك باستعمال نشا الذرة كمصدر كربوني وكثافة حجم لقاح 11.58×10^2.

حصل (٧) على أفضل إنتاج لأنزيم α amylas بوساطة بكتريا B.subtilis عند pH ٧,٥ ودرجة حرارة ٤٠°م وحجم لقاح نسبته ٤% من حجم الوسط البالغ ٢٥ مللتر ومدة حضن مقدارها ٤٨ ساعة.

حصل (٨) على أفضل إنتاج لأنزيم ألفا اميليز B.licheniformi باستعمال الببتون كمصدر نتروجيني عضوي أو فوسفات الامونيوم كمصدر غير عضوي للنتروجين وان أفضل مدة للحضن كانت ٢٤ ساعة وعند رقم هيدروجيني ٩ ودرجة حرارة ٣٧ْ م.

في حين حصل (٩) على أفضل إنتاج لأنزيم الاميليز بوساطة فطر Aspergillum niger وبكثافة لقاح قدرها 2×10^6 سبور/ ١٠٠ مللتر وسط باستخدام نشا الرز وفول الصويا وبتركيز ٣% وعند رقم هيدروجيني ٤ ودرجة حرارة ٣٠ْ م وبعد ٧٢ ساعة حضن وباستخدام كبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني.

كما أن الباحثين انفسهم درسوا فعالية الأنزيم باستخدام الأوساط الصلبة وقياس قطر المنطقة الشفافة والناتجة من تحليل الاميليز للنشا ووجدوا ان أعلى قطر للمنطقة الشفافة حول النمو الحاصل في الأطباق كان ٧ ملم.

وفي دراسة(١٠) حول أنتاج أنزيم الاميليز بوساطة الخميرة فقد حصلوا على أفضل أنتاج للأنزيم عند رقم هيدروجيني ٤,٥ ودرجة حرارة ٣٠ْ م وباستخدام الحنطة كمصدر كربوني وبتركيز ٨% وبعد مدة حضن ٤٨ ساعة.

وأخيرا حصل (٨) على أفضل إنتاج لأنزيم الاميليز بوساطة Bacillus sp.K.12 بعد ٦٠ ساعة حضن وباستخدام النشا بتركيز ١% والببتون كمصدر نتروجيني وبتركيز ٠,٥% وعند درجة حرارة ٤٢ْ م ورقم هيدروجيني ٧,٥ وسرعة رج قدرها ١٠٠ دورة / دقيقة.

المواد وطرائق العمل

١- عزل البكتريا :

جلب ٤٥ نموذج تربة من مناطق مختلفة من قضاء الرمادي (ريف القضاء) وحصل على ٣٠ عزلة بكتيرية محللة للنشا وبكفاءات مختلفة.استعمل وسط مكون من الاكار المغذي مع ١% نشا لغرض عزل البكتريا.انتخبت أكفأ عشرة عزلات بكتيرية لغرض معرفة قابليتها على تحليل النشا وإنتاج أنزيم الاميليز.

٢- تحديد العوامل المؤثرة في أنتاج أنزيم الاميليز في وسط النشا الصلب.

اتبعت طريقة (٨) في الكشف عن تحلل النشا وذلك بتلقيح وسط أكار النشا بالعزلات البكتيرية في دائرة قطرها ١ سم في مركز الطبق وبعد انتهاء مدة الحضن غمر سطح الوسط بمحلول اليود لمدة ٣٠ ثانية وبعدها سكب محلول اليود وترك الطبق لمدة ٢-٣ دقيقة، ظهور المنطقة الشفافة حول منطقة النمو دل على تحلل النشا بوساطة أنزيم الاميليز المنتج من البكتريا.

لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو البكتريا وإنتاج الأنزيم بوساطة العزلات العشرة المنتخبة ضبط الوسط على الأرقام الهيدروجينية ٥، ٦، ٧، ٨، ٩ كلا على حدة.

كما اختبرت درجات حرارة مختلفة وهي ٢٥،٣٠،٣٥،٤٠،٤٥ لتحديد درجة الحرارة المثلى لنمو العزلات المنتخبة وإنتاجها لأنزيم الاميليز.

ولغرض تحديد نوع المصدر الكربوني الملائم للنمو وإنتاج الأنزيم فقد استخدمت أربعة مصادر كربونية مختلفة هي النشا وكوالح الذرة وتبن والبرسيم Trifolium alexandrinum L. ونبات الشمبلان المائي Ceratophyllum demersum L وحضرت الأوساط الثلاثة الأخيرة بعد تجفيفها على درجة حرارة ٧٠ْ م لمدة ٤٨ ساعة في الفرن ثم طحنت ونخلت بمنخل سعة تقوية ٤٠ مش واستعملت لتحضير الوسط الغذائي.وحددت مدة الحضن المثلى بدراستها على وسط أكار النشا لمدة حضن مختلفة هي ٢٤، ٤٨، ٧٢ ساعة لمعرفة مدة الحضن الامثل لنمو البكتريا وإنتاجها للأنزيم.

٣- تقدير فعالية أنزيم الاميليز في الوسط السائل.

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (٦) في تقدير فعالية الأنزيم ثم قدرت السكريات المختزلة حسب طريقة (١١) وباستعمال جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي ٥٤٠ نانوميتر.

٤- تحديد الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الاميليز في وسط النشا السائل.

استعمل وسط النشا السائل في تحديد العوامل المؤثرة في إنتاج الأنزيم إذ استخدمت دوارق مخروطية سعة ٢٥٠ مللتر وضع في كل منها ١٠٠ مللتر من الوسط وعقمت الدوارق في المؤصدة.

ولقحت الأوساط في الدوارق بالعزلتين البكتيريتين المطلوب اختبار كفاءتهما وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة ١٢٥ دورة / دقيقة وباستعمال لقاح بكتيري بحجم ١% وبكثافة ٦ × ١٠٦ من وسط الإنتاج ونترات الامونيوم كمصدر نتروجيني وبتركيز ٠,٢% من الوسط. ضبط الوسط على الأرقام الهيدروجينية ٥، ٦، ٧، ٨، ٩ لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الأنزيم في الوسط السائل. كما اختبرت درجات حرارة مختلفة هي، ٣٠، ٤٠، ٤٥، ٥٠ْم لتحديد درجة الحرارةالمثلى لإنتاج الأنزيم.

في حين استعملت ثلاثة مصادر كربونية تحوي النشا في تركيبها هي كوالح الذرة، تبن البرسيم ونبات الشمبلان إضافة الى مسحوق النشا لغرض تحديد نوع المصدر الكربوني الملائم للنمو وإنتاج الأنزيم في الوسط السائل.

ومن ثم اختبر تأثير تركيز المصدر الكربوني على إنتاج الأنزيم باستعمال التراكيز ١، ١,٥، ٢، ٢,٥، ٣% من المصدر الكربوني الامثل للإنتاج، كما اختبر تأثير التهوية على نمو كل من العزلتين تحت الاختبار وإنتاج الأنزيم في الوسط السائل فقد استخدم عدد دورات ١٠٠، ١٢٥، ١٥٠، ٢٠٠، ٢٥٠ دورة / دقيقة. واستعملت حجوم لقاح مختلفة لأغراض تلقيح الوسط السائل من كل من العزلتين تحت الدراسة لاختبار تأثير حجم اللقاح المضاف على إنتاج الأنزيم وكانت نسب حجوم اللقاح المضافة هي ١، ١,٥، ٢، ٢,٥% من وسط الإنتاج، ثم اختبر تأثير نوع المصدر النتروجيني على نمو كل من العزلتين تحت الاختبار وانتاجهما للأنزيم وكانت المصادر النتروجينية المدروسة على نوعين العضوي وغير العضوي وهي الببتون، مستخلص الخميرة، اليوريا، نترات الامونيوم وكبريتات الامونيوم.

النتائج والمناقشة

١- عزل البكتريا :

أظهرت نتائج عملية عزل البكتريا الحصول على ٣٠ عزلة بكتيرية محللة للنشا من مجموع عينات التربة التي جلبت الى المختبر. انتخبت منها أكفأ عشرة عزلات على أساس قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرة النامية على وسط النشا الصلب ذو الرقم الهيدروجيني ٧ وعند درجة حرارة ٣٠ْم.

أظهرت النتائج أن العزلتين اللتين تحملان الرمزين PR9, PR10 كانت لها القابلية الأعلى في تحليل النشا، إذ بلغ معدل قطر المنطقة الشفافة حول مستعمرة العزلة وبعد حضن لمدة ٤٨ ساعة ٦,٥، ٨ سم على التوالي.

٢- تحديد العوامل المؤثرة في إنتاج أنزيم الاميليز في وسط النشا الصلب.

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (١) أن العزلة المحلية رقم PR10 أعطت أعلى معدل لقطر المنطقة الشفافة عند رقم هيدروجيني ٧ حيث كان قطر المنطقة الشفافة ٧,٥ سم، في حين أعطت عزلات أخرى أقطار منطقة شفافة متباينة وحسب الأرقام الهيدروجينية وكان اقل قطر للمنطقة الشفافة هو ١,٥ سم.

أما تأثير درجة الحرارة فيوضح الجدول (1) أن العزلة المحلية PR10 أعطت أعلى قطر للمنطقة الشفافة عند درجة حرارة ٣٥ْم ورقم هيدروجيني ٧ وكان قطر المنطقة الشفافة ٨ سم.تلتها العزلة PR9 وعند نفس الظروف وكان قطر المنطقة الشفافة لها ٧ سم. وكان لمدة الحضن تأثير على قطر المنطقة الشفافة ويظهر الجدول (1) أن العزلة PR10 أعطت أعلى قطر وكان ٨ سم وبعد ٢٤ ساعة حضن.واظهر الجدول (2) أن لنوع المصدر الكربوني تأثير على قطر المنطقة الشفافة وفعالية أنزيم الاميليز حيث أعطت كوالح الذرة أفضل فعالية للأنزيم حيث كان قطر المنطقة الشفافة ٨ سم تلاها نبات الشمبلان ٧ سم ثم تبن البرسيم ٦ سم.

٣- الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الاميليز في المزارع السائلة :

أشارت النتائج الموضحة في الشكل (١) أن أفضل إنتاج لأنزيم الاميليز حصلت عند الرقم الهيدروجيني ٧ بوساطة العزلة PR10 واستعمال كوالح الذرة كمصدر كربوني وحيد اذ بلغت الفعالية الأنزيمية ١٩,٣٣ وحدة / مللتر، في حين أعطت العزلة PR9 وعند نفس الظروف فعالية أنزيمية مقدارها ١٨,٥١ وحدة / مللتر وتتطابق هذه النتائج مع ما توصل إليه (٩) الذي حصل على أفضل إنتاج للأنزيم عند رقم هيدروجيني ٧,٥. وتشير معظم الدراسات الى إن للرقم الهيدروجيني تأثير واضح على إنتاج الأنزيمات ميكروبيا وذلك من خلال تأثيره على صفات الوسط الغذائي وذائبية المغذيات وجاهزيتها للكائن الحي ويأتي تأثيره من خلال الأثر الواضح للرقم الهيدروجيني على سير عمليات الايض وتخليق وإنتاج الأنزيمات (١٤).

وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٢) تأثير درجات الحرارة المختلفة على إنتاج الأنزيم حيث كانت أعلى فعالية للأنزيم بوساطة العزلة المحلية PR10 وباستعمال كوالح الذرة عند درجة حرارة ٤٠ْم إذ بلغت الفعالية الأنزيمية ٢٠,١٣ وحدة / مللتر.في حين أعطت العزلة PR9 أعلى فعالية أنزيمية وباستعمال نفس المصدر الكربوني عند درجة حرارة ٤٥ْم وكانت الفعالية الأنزيمية ١٩,٩٤ وحدة / مللتر. تتفق النتيجة الخاصة بالعزلة PR10 مع ما توصل إليه (١٢) إذ حصل على أفضل إنتاج للأنزيم عند درجة حرارة ٤٠ْم، كما أن (١٠) حصل أفضل إنتاج للأنزيم عند درجة حرارة ٤٢ْم ويأتي تأثير درجات الحرارة على إنتاجية الأحياء المجهرية للأنزيمات من خلال تأثيرها في سرعة التفاعلات الأنزيمية داخل الخلية اوتاثيرها على بعض العوامل المساعدة لنمو العزلة مثل انخفاض الأوكسجين الذائب وتثبيط البروتينات، في حين أن درجات الحرارة المنخفضة تسبب بطأ نمو الكائن ألمجهري.

يوضح الشكل (٣) تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج الأنزيم، حيث أعطت العزلة PR10 أعلى إنتاج للأنزيم باستعمال كوالح الذرة كمصدر كربوني وحيد ورخيص ومتوفر في البيئة المحلية مقارنة بالأوساط الحاوية على مصدر كربوني جاهز ومكلف اقتصاديا، بلغت الفعالية الأنزيمية تحت هذه الظروف ٢٠,١٣ وحدة / مللتر في حين أن العزلة PR9 أعطت فعالية أنزيمية مقدارها ١٩,٩٤ وحدة / مللتر تحت نفس الظروف.

أما اما بخصوص تركيز المصدر الكربوني وتاثيره فيوضح الشكل(٤) ان أعلى إنتاجية للأنزيم بوساطة العزلة PR10 باستعمال كوالح الذرة كمصدر كربوني وبتركيز ٢% حيث بلغت الفعالية الأنزيمية ٢١,١٧٦ وحدة / مللتر.في حين أعطت العزلة PR9 أعلى فعالية للأنزيم وتحت الظروف نفسها وكانت ٢٠,٩٨٣ وحدة / مللتر، ويكمن تأثير نوع وتركيز المصدر الكربوني على إنتاج الأنزيم من خلال أن البكتريا تميل الى استعمال أسهل المصادر الكربونية الموجودة في الوسط، كما أن البكتريا تحتاج الى المصدر الكربوني عند تركيز محدد وعندما يزداد التركيز تبدأ فعالية البكتريا بالانخفاض وقد يكون السبب هو حدوث عملية تثبيط لنمو البكتريا من خلال زيادة تركيز الناتج النهائي في الوسط.النتائج أعلاه

تتفق مع ما حصل عليه (١٠) الذي حصل على أفضل إنتاج لأنزيم الاميليز باستعمال مصدر كربوني تركيزه ٢%.

واوضح الشكل (٥) أن أعلى إنتاج للأنزيم كان باستخدام الحاضنة الهزازة وبعدد دورات ١٥٠ دورة / دقيقة، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية ٢٢,١٩٦ وحدة / مللتر وبوساطة العزلة PR10. في حين أعطت العزلة PR9 أعلى إنتاج للأنزيم عند عدد دورات حاضنة ١٥٠ دورة / دقيقة أيضا لكن بفعالية أنزيمية قدرها ٢١,٥٦٣ وحدة / مللتر

النتائج المبينة في الشكل (٦) توضح تأثير حجم اللقاح في إنتاج الأنزيم،تم الحصول على أعلى إنتاج للأنزيم باستعمال لقاح بنسبة ١,٥% حيث بلغت الفعالية الأنزيمية ٢٣,٤ وحدة / مللتر بوساطة العزلة PR10 وتبين النتائج الأخرى أن الفعالية الأنزيمية بدأت بالانخفاض عند استعمال حجم لقاح اكبر من ١,٥% ويمكن أن يعزى سبب ذلك الى التنافس بين البكتريا لاستغلال المغذيات في الوسط ألزرعي (١٥).أما العزلة PR9 فأعطت أفضل إنتاج للأنزيم عند حجم لقاح نسبة ٢% وبلغت الفعالية الأنزيمية ٢٢,٥٤٦ وحدة / مللتر.

وبالنسبة لتأثير نوع المصدر النتروجيني اوضحت النتائج في الشكل (٧) أن أفضل إنتاج للأنزيم بوساطة العزلة PR10 كانت عند استعمال البيتون كمصدر نتروجيني عضوي اذ بلغت الفعالية الأنزيمية ٢٤,٧٣٠ وحدة / مللتر وهذا يتفق مع ما حصل عليه (٧) الذي حصل على أفضل إنتاج للأنزيم باستعمال البيتون كمصدر نتروجيني عضوي وبتركيز قدره ٠,٥% من الوسط.

في حين أعطت العزلة PR9 أفضل إنتاج باستعمال نفس المصدر ولكن بلغت الفعالية الأنزيمية ٢٣,٧٧٣ وحدة / مللتر، ويوضح نفس الشكل أن نترات الامونيوم كانت المصدر النتروجيني غير العضوي الأفضل بالنسبة للعزلة PR10 وكانت الفعالية الأنزيمية ٢٣,٤ وحدة / مللتر وهي مخالفة للنتيجة الخاصة بالعزلة PR9 حيث كانت كبريتات الامونيوم هي المصدر النتروجيني غير العضوي الأفضل وبفعالية أنزيمية قدرها ٢٢,٦٧٠ وحدة / مللتر.

تشخيص العزلة PR10

نظرا لان العزلة PR10 قد برهنت من التجارب السابقة على أنها أكفأ العزلات في إنتاج أنزيم الاميليز فقد تم تشخيصها تبعا لما ورد في كتاب Bergey's manual of determinative bacteriology (1994) ولقد أوضحت نتائج الفحص ألمجهري المبينة في الجدول ادناه على أن العزلة هذه عبارة عن خلايا عصوية موجبة لصبغة كرام توجد على شكل سلاسل وأزواج مكونة سبورات، في حين أوضحت نتائج الاختبارات الزرعية أنها بكتريا هوائية إجبارية، أما ما يتعلق بالاختبارات الكيموحيوية فأظهرت أن هذه البكتريا سالبة لاختبار فوكس بروسكاور لها القابلية على تحليل النشا والجيلاتين، وموجبة لاختبار الكتاليز وسالبة لاختبار الاندول وتختزل النترات الى نتريت، منتجة للحامض ومكونة لغاز H2S ولها القدرة على النمو في الاكار المغذي تحت الظروف اللاهوائية.وبمقارنة النتائج مع ما ورد في المصدر المذكور أعلاه يتضح أن العزلة تتبع لبكتريا Bacillus subtilis.

REFERENCES

[1] Ajayi A.O and Fagade OE. (2003). Utilization of cornstarch as substrate for $\beta-Amylase$ by Bacillus subtilis. African J. of Biomedical Research, Vol. 6 (1); 37-42.

[2] Betrand Tatsinkou Fossi, Frederic Tavea, Robert Ndjouenkeu (2005). Production and Partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy Soils. African J. of Biotech. Vol. 4 (1), PP. 14-18.

[11] NADiRiAZ, Ikram-Ul-Hag and M.A.Qader. (2003) Characterization of $\alpha-Amylase$ by Bacillus subtilis. International Journal of Agriculture Biology. 1560-8530-3-249-252.

[12] Omemu, A.M.; Akpan, l; Bankole, M.O. and Teniola, O.D. (2005). Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of Aspergillus niger AMO7 isolated from the soil African J. of Biotech Vol. 4 (1), PP. 19-25.

[13] Ozlem kiran, Ugur Comlekcloglu, Burhan Arikan. (2005). Effects of carbon sources and various chemicals on the production of Novel Amylase from a Thermophilic Bacillus sp. K-12, Turk J Biol. (29): 92-103.

[14] Priest, F.G. (1992). Enzymes, Extracellulare. IN. Encyclopedia of microbiology. Academic press. Inc. Vol. 2pp. 81-93.

[15] Purohit, S.S. and Mothur, S.K. (1996). Enzymes bioacceleractors In: Biotechnology, Fundamentals, and application publisher, India.

[16] Takasaki, Y. (1989). Novel maltose-Producing amylase from Bacillus megaterium G-2, Agric. Bio. Chem. 59 (2): 341-347.

جدول (١) تأثير الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة ومدة الحضن في قطر المنطقة الشفافة (سم).

$LSD_{0.05}$ pH= 0.3206, Tem. = 0.3016, Time=0.3056

المعاملات		العزلات									
		PR_1	PR_2	PR_3	PR_4	PR_5	PR_6	PR_7	PR_8	PR_9	PR_{10}
الرقم الهيدروجيني	٥	١,٥	٢,٥	٣	٣,٥	٢,٥	٣	٣,٥	٢,٥	١,٥	٣,٥

[3] Dharani P.V.Aiyer (2004). Effect of C: N ratio on alpha amylase production by Bacillus licheniformis SPT 27. African J. of Biomedical. Vol. 3 (10), PP. 519-522.

[4] Holt, J.O., Kring, N.R., Senath, P.H..A.., Staly, J.J. and Williams, S.T. (1994). Beregey's Manual of Determinateion Bacteriology, 9th. U.S.A.

[5] Howling, D. (1989). Mechanism of starch hydrolysis. International Bio.deterioration, 25: 15-19.

[6] Ikram-Ul-Hag, Safia Rani, Hamad Ashraf and M.A.Qadeer. (2002). Biosynthesis of Alpha Amylase by chemically treated mutant of Bacillus subtilis. Online J. of Bio. Sci. 2 (2): 73-75.

[7] Liliana N.Ceci and Jorg E.Lozano. (2002). Amylase for Apple Juice processing: Effect of pH, Heat, and Ca^{+2} Ions. Biotechnol. 40 (1) 33-38.

[8] Mamo, G., Gashe, B.A., Gessess, A. (1999). A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic Bacillus sp. W11. Journal of Applied microbiology 86.

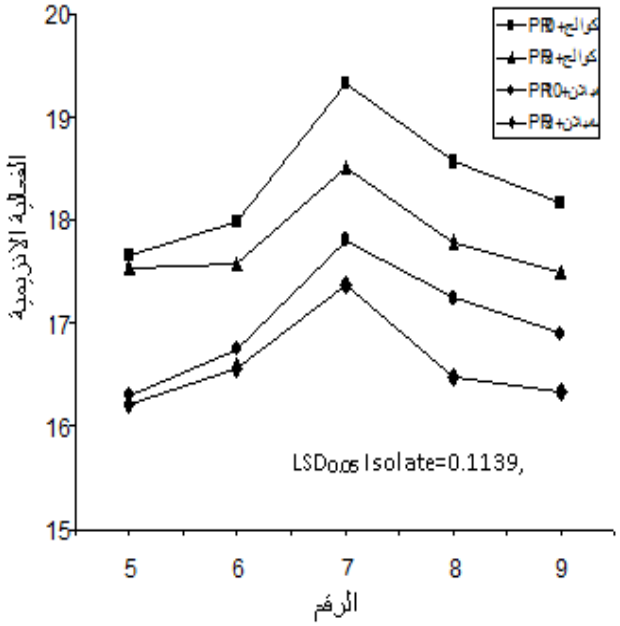
[9] Mc Carthy, A.J. (1987). Lignocellulose – degrading by actinomycetes , FEMS. Microbial. Rev. 46: 145-163.

[10] Miller, G.L. (1995). Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Anallyt. Chem. 31: 426-428.

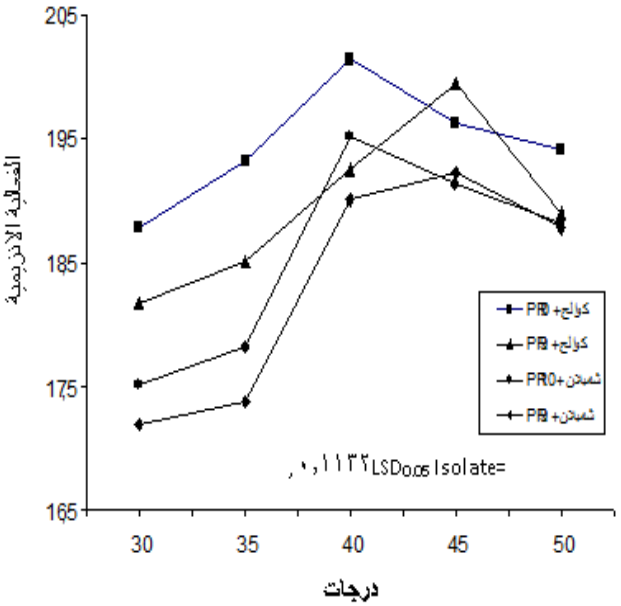
				المعدل	درجة الحرارة (مئوية)					المعدل	مدة الحضن (ساعة)			المعدل
٦	٧	٨	٩		٢٥	٣٠	٣٥	٤٠	٤٥		٢٤	٤٨	٧٢	
٤,٥	٧,٥	٥,٥	٥,٥	5.3	٣	٧,٥	٨	٧	٧	6.5	٨	٨	٨	8
٢	٦,٥	٣,٥	٣	3.3	١,٥	٦,٥	٧	٦,٥	٦	5.5	٦,٥	٦,٥	٧	6.6
٣	٤	٣	٣,٥	3.9	٢	٤	٤,٥	٥	٥	4.1	٤	٤	٤	4
٤	٦	٤,٥	٥	4.6	٣,٥	٦	٦	٢	٤,٥	4.4	٦	٦	٦	6
٤,٥	٣,٥	٤,٥	٥	4.1	٣	٣,٥	٤	٣,٥	٣	3.4	٣,٥	٤	٤	3.8
٣,٥	٤	٤,٥	٣,٥	3.6	٢,٥	٤	٤	٤	٤	4.6	٤	٤,٥	٤,٥	4.3
٤	٧	٤	٤,٥	4.6	٣	٧	٧	٦,٥	٦	5.9	٧	٧	٧	7
٤	٦,٥	٤	٤,٥	4.4	٢	٦,٥	٦,٥	٦	٦,٥	5.5	٦,٥	٦,٥	٦,٥	6.5
٣,٥	٤,٥	٤	٤	3.7	٢	٤,٥	٥	٥	٤,٥	4.2	٤,٥	٤,٥	٤,٥	4.5
١,٥	٤	٢	٢	2.2	١,٥	٤	٤,٥	٥	٥,٥	4.1	٤	٤	٤	4

جدول رقم (2) تأثير نوع المصدر الكربوني في قطر المنطقة الشفافة (سم) $LSD_{0.05}$=0.2786

نوع المصدر	النشا	كوالح الذرة
PR_{10}	٨	٨
PR_9	٦,٥	٦
PR_8	٤	٣,٥
PR_7	٦	٥,٥
PR_6	٣,٥	٣
PR_5	٤	٤
PR_4	٧	٦,٥
PR_3	٦,٥	٦
PR_2	٥.٤	٤,٥
PR_1	٤	٣,٥



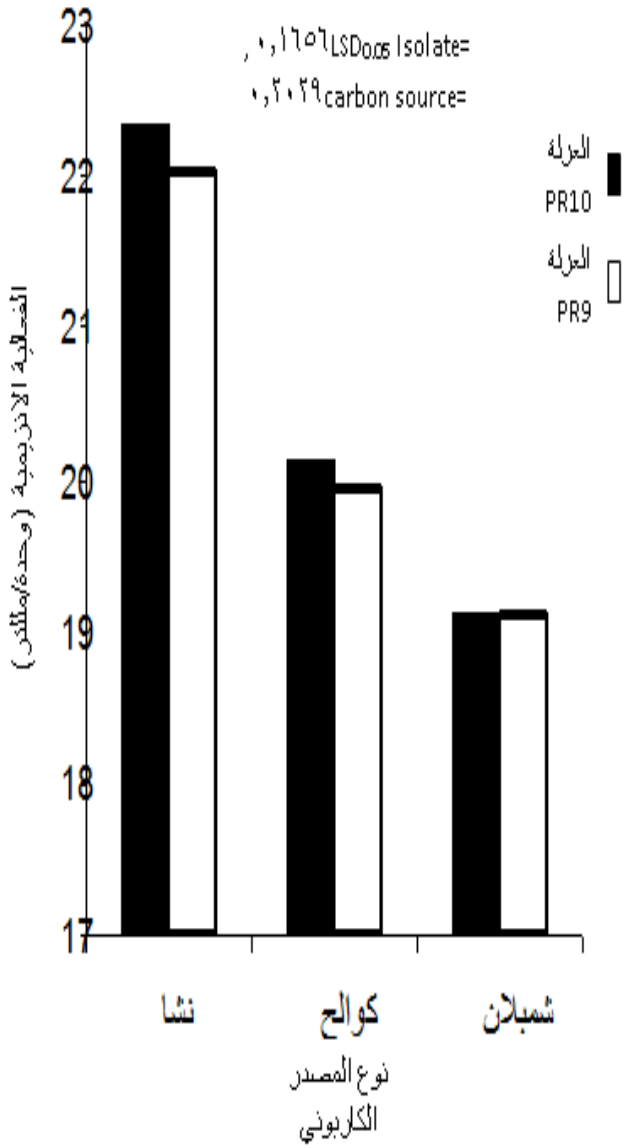
تبن البرسيم	الشمبلان	المعدل
٦	٧	7.25
٥	٥,٥	5.75
٢,٥	٣	3.25
٤,٥	٥	5.25
٢	٢,٥	2.75
٣,٥	٤	3.87
٣,٥	٦	5.75
٢	٢,٥	4.25
٣,٥	٣,٥	4.25
٢,٥	٢,٥	3.1



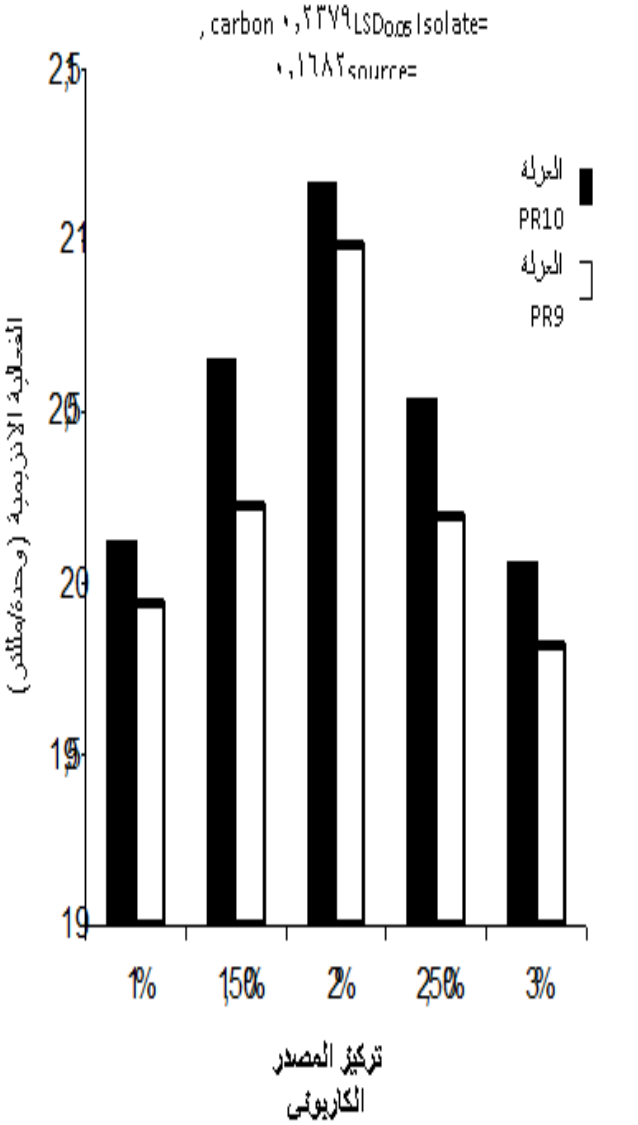
شكل ١. تاثير الرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم الاميليز من العزلتين PR9 و PR10 وباستعمال كوالح الذرة ونبات الشمبلان.

شكل ٢. تاثير درجات الحرارة في انتاج انزيم الاميليز من العزلتين PR9 و PR10 وباستعمال كوالح الذرة ونبات الشمبلان.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2007 ,(1), (2) :53-63

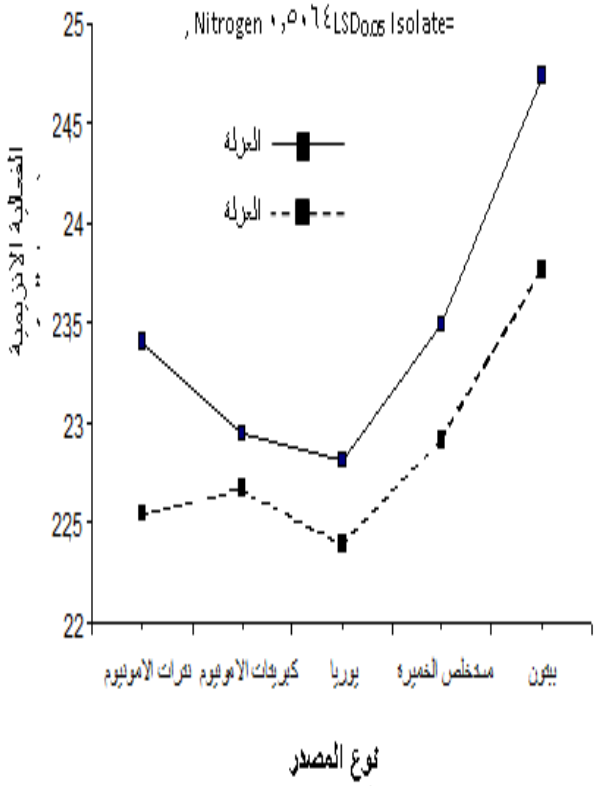


شكل ٣. تاثير نوع المصدر الكاربوني في الانتاج انزيم الاميليز من العزلتين PR9 و PR10 .

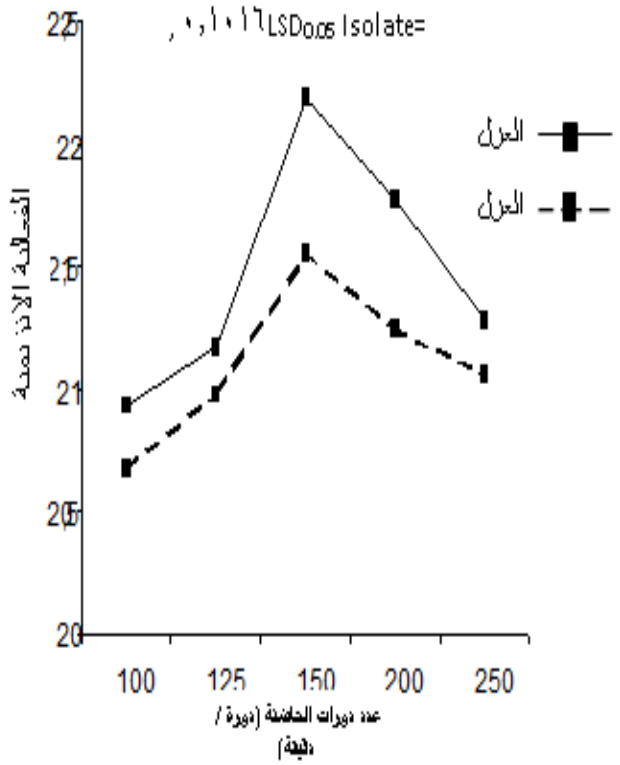


شكل ٤. تاثير تركيز المصدر الكاربوني في انتاج انزيم الاميليز من العزلتين PR9 و PR10 وباستعمال الكوالح الذرة كمصدر كاربوني .

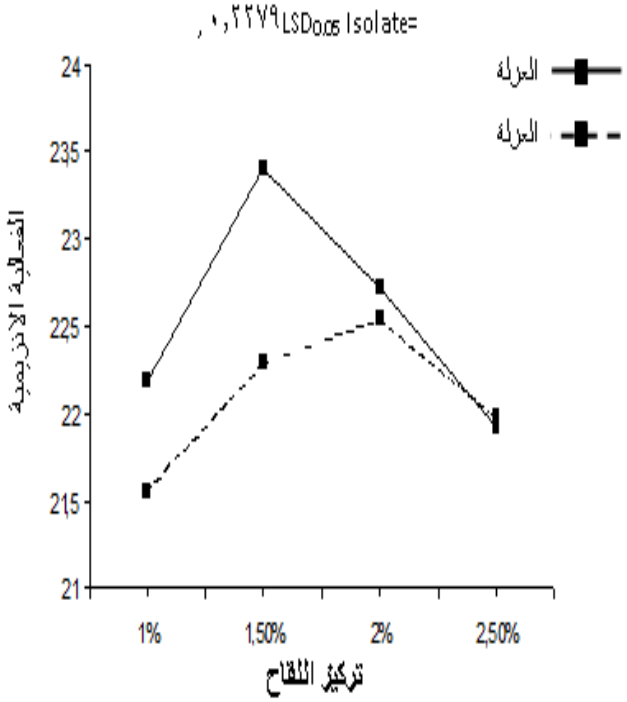
P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (2) :53-63



شكل ٧. تاثير نوع المصدر النايتروجيني في انتاج انزيم الاميليز من العزلتين PR9 و PR10.



شكل ٥. تاثير عدد دورات الحاضنة في الانتاج انزيم الاميليز من العزلتين PR9 و PR10.



شكل ٦. تاثير تركيز اللقاح في انتاج انزيم الاميليز العزلتين PR9 و PR10.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (2) :53-63

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AMYLASE RODUCING BACTERIA FROM SOILS USING LOCAL MEDIA

DHAFER F. ABDUL KADER AL –RAWI

ABSTRACT:

The study aimed at isolation starch hydrolyses bacteria and amylase-producing bacteria from Ramadi soils to get efficient local isolates that produce the enzyme.30 bacteria isolates that produce the enzyme could be obtained; the (10) most efficient of which were selected. Cultural media containing plant wastes prevailing in the local environment were used. There are considered pollutants that are very cheap in the production of the enzyme. They are corn cap, clover hay Trifolium alexandrinum L., and shamblan Ceratophyllum demersum L.. The results have shown that the best production of the enzyme using starch agar was at pH7 and 35c temperature after 24 hours of incubation with the use of corn cap then shamblan as a source of carbon where the diameter of the clear zone area was 8cm from the local isolate (PR10). The local isolate (PR10) showed high ability to produce amylase enzyme using liquid cultures. The best production was at pH7 and 40c temperature using corn cap of2% concentration and incubation with the shaking incubator at 150 rpm and 1.5% inoculums concentration. The activity of the enzyme was 24.731 unit/ml using peptone as a source of nitrogen after incubation for 24 hours. Identification results of (PR10) isolate showed that it is B.subtilis bacteria.