جداسازی و بررسی تکامل نژادی گونه جدید باسیلوس مولد آمیلاز، از چشمه آبگرم قینرجه آذربایجان شرقی

سحرحسینی[۱]، مهدی ابراهیمی[۲]، معصومه مهدوی اورتاکند[۲]، خدیجه پورداداش[۳]، روزبه یلفانی[٤]

چکیده

"آمیلازها" در صنایع غذایی، تولید شوینده‌ها، تولید گلوکز، نساجی و کاغذسازی کاربرد گسترده‌ای دارند. "اسیلوس‌ها" از مهم‌ترین ریزموجودات تولیدکنندهٔ آمیلاز هستند. هدف از این پژوهش، جداسازی و بررسی تکامل نژادی باسیلوس گرما دوست مولد آنزیم آلفا-آمیلاز از چشمه آب گرم قینرجه، واقع در استان آذربایجان شرقی است. پس از نمونه‌گیری از چشمه آب گرم قینرجه، کشت بر محیط‌های شناخته شده اجرا شد. کلنی‌های به دست آمده، از لحاظ تولید آنزیم آمیلاز مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه مولد آمیلاز با استفاده از روش‌های مورفولوژیک و میکروسکوپی به عنوان یک باسیل گرم مثبت شناسایی شد. در ادامه، باسیل مورد نظر پس از استخراج DNAی ژنومی، تکثیر و تعیین توالی قطعه ١٦S rRNA از لحاظ فیلوژنیک با دو روش "ماکزیمم لایکلیود" و "ماکزیمم پارسیمونی" مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس نتایج، آنالیزهای مرفولوژیک و بیوشیمیایی، مشخص شد که جدایه به دست آمده، یک باسیل گرم مثبت با قابلیت تولید اندوسپور و مصرف گلوکز، فروکتوز و ساکارز است؛ اما به استفاده از گالاکتوز و لاکتوز توانمند نیست. تست سیرات، اندول و VP برای این باکتری مثبت بود؛ ولی تست کاتالاز و اکسیداز منفی به دست آمد. همچنین بر اساس نتایج مطالعه فیلوژنتیک با هر دو روش، نمونه باسیل آمیلاز مثبت جداشده از چشمه آب‌گرم قینرجه، یک سویه باسیل گرم مثبت جدید از گونه باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) است. در این مطالعه، سویه جدیدی از باسیلوس سوبتیلیس با موفقیت از چشمه آب گرم قینرجه جداسازی شد که توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارد.

واژگان کلیدی: ١٦S rRNA، آمیلاز، تکامل نژادی، قینرجه، باسیلوس سوبتیلیس.

۱ و ۲. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامي، واحد ورامین ـ پیشوا.

* مسئول مکاتبات: دکتر مهدي ابراهیمي، Ph.D ایمیل: ebrahimi@iauvaramin.ac.ir، تلفن: ٠٢١-٣٦٧٢٥٠١٤

۲. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامي، واحد ورامین-پیشوا.

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامي، واحد ورامین-پیشوا.

٤. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامي، واحد ورامین-پیشوا.

مقدمه

اغلب ریزموجودات، آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که این آنزیم‌ها واکنش‌های حیاتی آن‌ها را کاتالیز می‌کنند؛ اما مقدار آنزیم‌های تولید شده در موجودات مختلف، متفاوت است. هنگام شناسایی یک ریزموجود مولد یک آنزیم مطلوب برای تبدیل آن به سویهٔ مناسب در مقیاس تجاری؛ شناخت چند مرحله ضروری است. نخست آن‌که سویه صنعتی خوب، باید مقدار زیادی آنزیم با تراکم بالا تولید کند. عموماً سویه وحشی آنزیم مطلوب را در مقادیر کم‌تر از نیاز تجاری تولید می‌کنند. درمرحله بعد، باید مهار کاتالیتیکی را کاهش‌داد یا آن را رفع کرد که برای اجرای این کار می‌توان از تغییرات ژنتیکی یا بهینه‌سازی محیط استفاده کرد. آمیلازها، پروتئازها، لیپاز و سلولاز، از مهم‌ترین آنزیم‌های ارزشمند از نظر تجاری هستند (۱و ۲). آمیلازها، آنزیم‌هایی هستند که نشاسته را هیدرولیز می کنند. صنایع تبدیلی نشاسته به گلوکز، تولید الکل از منبع نشاسته‌ای، صنایع تولید کاغذ، صنایع نساجی، صنایع غذایی و صنایع تولید شوینده‌ها، مهم‌ترین زمینه کاربردی آمیلازها محسوب می‌شوند (۲-٤). آلفا-آمیلازها توسط تعداد فراوانی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها براساس میزان مایع‌سازی نشاسته (اثر ساکاروژنیک)، pH بهینه، محدوده دمایی ومیزان پایداری طبقه‌بندی می‌شوند. مهم‌ترین باکتری‌های تولیدکنندهٔ آلفا-آمیلاز عبارتند از: باسیلوس سوبتیلیس (Bacillus subtilis)، باسیلوس سرئوس(B. cereus)، باسیلوس آمیلولیکوفاشینس (B. amilolicophashins)، باسیلوس کوآگولانس (B. coagolance)، باسیلوس پلیمیکسا (B. polymicsa)، باسیلوس استئاروترموفیلوس (B. stearothermophilus)، باسیلوس کالدولیتیکوس (B. caldoliticous) و جنس‌هایی مانند میکروکوکوس (Micrococcus)، سودوموناس (Pseudomonas)، آرتروباکتر (Arthrobacter) ، اشریشیا(Escherichia) ، پروتئوس (Proteus)، ترمومنوسپور (Thermomonospora) و سراشیا (Serratia) (۵و ٦). از قارچ‌های مهم تولیدکننده، می‌توان پسیلومایسس *Paecillomyces* را نام برد که آلفا-آمیلاز مقاوم به حرارت و فعال در مجاورت کلسیم و کبالت تولید می‌کند (۷). در سال ۲۰۰۸، آمیلازی از باسیلوس سرئوس جداشد که با بقیه آمیلازهای باسیلوسی از نظر ترادف اسیدآمینه‌ای تفاوت زیادی داشت و به عنوان یک آمیلاز جدید معرفی گردید (۸). با پیشرفت روش‌های مولکولی، در طبقه‌بندی باکتری‌ها نیز تغییرات چشم‌گیری رخ داده است. انگیزه اصلی در ایجاد این تغییرات بر ماهیت و ویژگی‌های rDNA به عنوان یک زمان‌سنج مولکولی مبتنی است (۹). قسمت‌هایی از مولکول ١٦S rDNA در بین گونه‌های باکتریایی محافظت شده است و می‌تواند به منظور مقایسه و تطبیق ایزوله‌های مختلف به کار رود. تطبیق نواحی حفاظت‌شده، امکان مقایسه مابقی نواحی (V۹– V۱) را که در بسیاری از گونه‌ها متفاوت است، فراهم می‌آورد (۱۰). از دیدگاه عملی، به کارگیری نشانگرهای الیگونوکلئوتیدی ویژه توالی‌های ژن ١٦S rRNA ، یکی از بهترین

گزینه‌ها برای شناسایی باکتری‌ها، بر اساس خصوصیات فیلوژنتیکی است و به عنوان یک روش قابل اطمینان به منظور شناسایی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی توسط تکنیک‌های مبتنی بر روشPCR و یا نشانگرهای ویژه نوکلئوتیدی می‌تواند به کار گرفته شود (۱۱و ۱۲). از آن‌جا که باکتری‌های ترموفیل حاوی منابع با ارزشی از آنزیم‌های هیدرولیتیک مقاوم به گرما هستند و از طرفی آنزیم‌های مقاوم به حرارت، در صنعت دارای اهمیت بسیار می‌باشند و برای اهداف تجاری مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ در این تحقیق، چشمهٔ آب‌گرم قینرجه، به عنوان گرم‌ترین چشمه آبگرم ایران، برای جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی باکتری‌های مولد آمیلاز مورد بررسی قرار گرفته است. قابل ذکر است که تمامی مواد شیمیایی و مولکولی در این مطالعه، از محصولات شرکت Biobasic مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

نمونه‌برداری از چشمه و جداسازی باکتری‌های مولد آمیلاز

نمونه‌برداری از آب، با رعایت شرایط استریل، از عمق ۲۰ سانتی‌متری از سطح و از قسمت میانی چشمه قینرجه، واقع در ۱۵ کیلومتری جنوب غربی شهرستان مشگین شهر با موقعیت جغرافیایی ′۱۷ °۳۸ عرض شمالی و′۱٤ °٤۷ طول شرقی صورت گرفت. بلافاصله با رعایت شرایط استریل، کشت اولیه از نمونه‌های به دست آمده روی محیط کشت لوریابرتانی آگار، نوترینت آگار و ترپیتون‌یست اکسترکت آگار در کنار شعله و در محیط سربسته؛ صورت گرفت. علاوه بر این، مقداری نمونه آب با استفاده از ظروف عایق حرارتی، بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه با استفاده از صافی غشایی استات سلولز با قطر۰/۲۲ میکرون، نمونه‌های آبی فیلتر شده و صافی به روی محیط‌های کشت مشابه انتقال داده شد. هر دو نوع نمونه در دو دمای۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرماگذاری شدند. برای خالص‌سازی کلنی‌های به دست آمده، از روش رقت‌سازی استفاده شد. به این منظور کلنی‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت اولیه به وسیلهٔ آب مقطر تا 10^{-5} رقیق و سپس روی محیط کشت اولیه به صورت سفره‌ای کشت و طبق شرایط اولیه گرماگذاری شدند (۱۳-۱۵).

غربالگری کلنی‌های تولیدکننده آمیلاز

به منظور شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم آمیلاز، کلنی‌های به دست آمده به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت حاوی ۱% نشاسته کشت و در دمای مربوط به مدت ٤۸ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد کلنی‌ها، قابلیت تولید آمیلاز با اضافه‌کردن محلول لوگل به سطح پلیت به صورت غوطه‌ورسازی مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد ناحیه شفاف در اطراف کلنی، نشان‌دهنده تجزیه نشاسته توسط آمیلاز تولیدشده توسط باکتری خواهد بود. در غیر این صورت، نشاسته موجود در محیط کشت با معرف، رنگ بنفش تولید می‌کند (۱٦).

شناسایی باکتری‌های تولید کننده آمیلاز

خصوصیات مورفولوژیکی، مانند شکل، رنگ و اندازه کلنی‌های مولد آمیلاز با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، ویژگی‌های میکروسکوپی، مانند رنگ‌آمیزی گرم، رنگ آمیزی مالاشیت گرین و تست تحرک باکتری‌ها، بر اساس روش‌های استاندارد انجام شد (۱۷). برخی خصوصیات مهم بیوشیمیایی نیز، مانند قابلیت تولید اسید از قند (گلوکز، ساکارز، فروکتوز، گالاکتوز و لاکتوز)، تست اندول، سیترات، Voges Proskaur-test ، اکسیداز و کاتالاز؛ بر اساس روش‌های استاندارد ارائه شده توسط دفلان (Deflan) مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی مولکولی جدایه‌ها، از آنالیز توالی ۱٦S rDNA استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNAی ژنومی نمونه باسیل گرم مثبت با روش زیر استخراج شد:

ابتدا ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت ٤٨ ساعته از نمونه باسیل در لوله‌های اپندور ریخته و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی حذف و ٦۰۰ میکرولیتر بافر TE حاوی ۰/۲ % لیزوزیم به رسوب اضافه شد. سپس SDS (۱۰%) به مقدار ۳۰ میکرولیتر و پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) به میزان ۵ میکرولیتر به سوسپانسیون سلولی اضافه و به خوبی مخلوط گردید و مدت یک ساعت در بن ماری در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در ادامه، صد میکرولیتر Nacl (٤مولار) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرار داده شد تا با رسوب پروتئین‌ها، حالت ابری در محلول ایجاد شود. میکروتیوپ به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و سپس محلول شفاف رویی به میکروتیوپ جدید منتقل و معادل با یک حجم (ml ۰/۸-۰/۷) مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل به لوله‌ها اضافه شد. سپس با سرعت ۱۳۲۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژشدند. مایه رویی حاوی RNA و DNAی درون لوله‌ها به لوله‌های۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل گردید. میزان یک حجم مخلوط فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه شد و لوله‌ها با سرعت ۱۳۲۰۰ دور در دقیقه و مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مجدداً مایع رویی به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. مقدار ۰/٦ حجم ایزوپروپانول سرد شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد اضافه گردید و تا زمان تشکیل رسوب سفید رنگDNA ، نمونه‌ها به آرامی و به صورت دورانی تکان داده شدند. پس از آن، لوله‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار قرار گرفته و در دمای ٤ درجه سانتیگراد و سرعت ۱۳۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از تشکیل قرص سفید رنگ DNA، ایزوپروپانول موجود به طور کامل تخلیه گردید. سپس۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول۷۰% به منظور شست‌وشوی DNA به لوله‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۲۰۰ دور در دقیقه

سانتریفیوژ شد. اتانول از لوله‌ها خارج شده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خشک گردیدند. سپس ۵۰ میکرولیترآب دیونیزه به هرلوله اضافه شد و نمونه‌ها پس از حل شدن DNA، در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری بلند مدت قرار گرفتند و هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام و ترکیبات مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس جدول ۲ آماده شد. در ابتدا، ۱/۲۵ میکرولیتر DNA ی مربوط به هر نمونه در میکروتیوب‌های مخصوص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ریخته و به یخچال منتقل شد. بلافاصله محلول پایه تهیه شده و ۲۳/۷۵ میکرولیتر از آن به هرمیکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید. از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف، به منظور تکثیراستفاده گردید. مطابق برنامه داده شده به دستگاه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت پرایمر (۳′-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG- ۵′) ۱۴۹R و(۵′- CTA CGG CTA CCT TGT TAC -۳′) ۲۷F (۳′ -GA- ۵′) بر اساس شرایط جدول ذیل انجام شد (۱۳):

جدول ۱. ترکیبات مواد مصرفی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ماده	غلظت پایه	غلظت نهایی	میزان مواد در حجم۲۵µl
بافر PCR	۱۰X	۱X	۲/۵µl
کلرید منیزیم	۵۰mM	۲/۵mM	۲µl
آب دوبار تقطیراستریل	_	_	۱۲/۲۵µl
DNTPs	۱۰mM	۰/۲mM	۰/۵µl
پرایمرF	۱mM	۰/۱mM	۲/۵µl
پرایمرR	۱mM	۰/۱mM	۲/۵µl
Taq DNA Polymerase	۵Unit /µl	۲/۵Unit	۰/۲۵µl
حجم نهایی	_	_	۲۲/۵ µl

جدول۲. برنامه دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تعدادچرخه	مرحله انجام شده	زمان	درجه حرارت(C˚)
۱ چرخه	واسرشت اولیه	٤ دقیقه	۹٤
	واسرشت	۱ دقیقه	۹٤
۳۰ چرخه	اتصال	۱ دقیقه	۵۷
	گسترش	۱ دقیقه	۷۰
۱ چرخه	گسترش نهایی	۷دقیقه	۷۰

درآخرین چرخه حرارتی و پس از مرحله گسترش نهایی، دمای ترموسایکلردر ٤ درجه سلسیوس، برای مدت ۲٤ ساعت تنظیم گردید که این حالت، موجب حفظ و نگهداری محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌شود. همچنین محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای توالی‌یابی، به شرکت بیواکستریم ارسال شد.

ترسیم درخت فیلوژنتیک

برای شناسایی توالی‌های ژن ۱٦S rRNA ایزوله مورد مطالعه، از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST استفاده شد. توالی ژن های ۱٦S rRNA باکتری‌های رفرانس به کار رفته در بررسی‌های فیلوژنی پس از جستجو در بلاست نوکلئوتید بر مبنای حداکثر همخوانی (۹۹% - ۹۷%) با سکانس مورد مطالعه ما انتخاب شدند و در جدول ٤-۱ ارایه شده است. این باکتری‌ها جهت شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنتیکی با روش توالی‌یابی در این مطالعه انتخاب شدند. همردیفی یا تطبیق تمامی توالی‌های ۱٦S rRNA توسط نرم افزار مگا٦، انجام شد.درخت فیلوژنی با استفاده از آنالیز ماکزیمم لایکلیهود[1] و ماکزیمم پارسیمونی[2] توسط نرم افزار مگا٦ رسم شد بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از آنالیز Bootstrap با تکرار ۱۰۰۰ و ۵۰ =cut off صورت گرفت. باسیلوس سرئوس ۱۲\ *strain DS* به عنوان برون گروه استفاده شد.

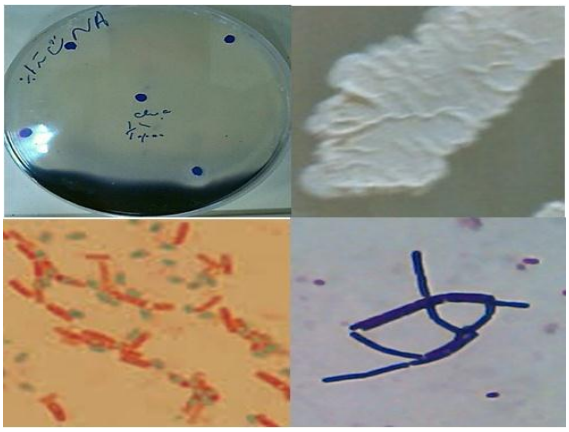
[1] Maximum likelihood

[2] Maximom parsimoni.

نتایج

بررسی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی

بر اساس نتیجه تست لوگل به منظور بررسی تولید آمیلاز، در کلنی‌های جدا شده از نمونه آب چشمه قینرجه؛ یک کلنی با ویژگی‌های ظاهری به صورت چروک، خشک، ابری شکل به عنوان تولید کننده آمیلاز شناسایی و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده در میکروسکوپ نوری؛ این کلنی به صورت باسیل گرم مثبت تعیین شد. به منظور بررسی تولید اسپور توسط نمونه باسیل جدا شده از روش رنگ‌آمیزی مالاشیت گرین استفاده شد که در نتیجه اسپورها به صورت سبز رنگ و بیضوی شکل مشاهده شدند (شکل-۱). درادامه، خصوصیات مهم بیوشیمیایی در باسیل جدا شده مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن در جدول۳ ارائه شده است. در بررسی قابلیت تولید اسید از قند با استفاده از محیط کشت فنل رد، مشاهده شد که نمونه باسیل مورد نظر برای استفاده از قندهای فروکتوز، گلوکز و ساکارز قابلیت دارد؛ ولی به استفاده از قندهای گالاکتوز و لاکتوز قادر نیست.



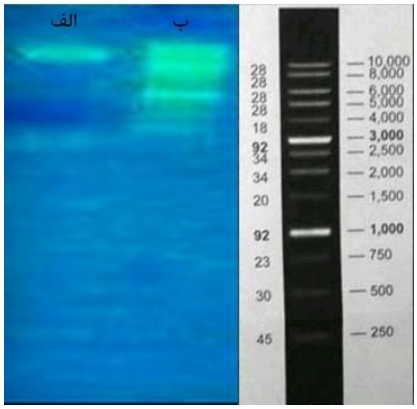
شکل۱. بالا راست: شکل کلنی‌های آمیلاز مثبت به دست آمده از نمونه آب چشمه قینرجه؛ بالاچپ: نتیجه تست لوگل محیط نوترینت آگار حاوی نشاسته (۱%)؛ پایین راست: تصویر میکروسکوپی از رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌ها و پائین چپ: نتیجه رنگ‌آمیزی مالاشیت گرین

جدول۳. نتیجه تست‌های بیوشیمیایی

	کاتالاز	اکسیداز	VP	سیترات	اندول
باسیل مولد آمیلاز	–	–	+	+	+

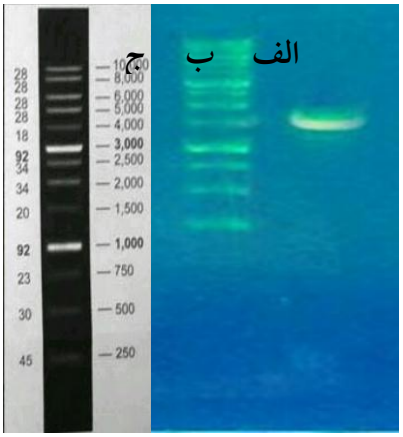
استخراج DNAی ژنومی و تکثیر قطعه ۱۶S rRNA

استخراج DNA در باکتری‌های گرمادوست تنها به کمک روش‌هایی امکان‌پذیر است که در آن‌ها از لیزوزیم برای شکستن لایه ضخیم پپتیدوگلیکان موجود در در دیواره به کار می‌رود. کیفیت DNAی ژنومی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۵% مورد بررسی قرار گرفت. وجود تک باند ضخیم با اندازه بالای ۱۰۰۰۰ جفت باز، نشان‌دهنده قابل قبول بودن DNAی ژنومی به دست آمده می‌باشد. غلظت DNA ، پس از اندازه گیری توسط دستگاه نانودراپ، در حدود ۱۰نانوگرم تعیین شد(تصویر-۲).



شکل۲. باند های حاصل از استخراج DNA ژنومی (الف)، اندازه‌نما (ب)

در نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ۱۴۹R و ۲۷F یک تک باند ۱۵۰۰bp با غلظت ۸۰-۵۰ نانوگرم بدون وجود پرایمر دو رشته‌ای به دست آمد که این، نشان‌دهنده عملکرد اختصاصی پرایمرها برای تکثیر قطعه مورد نظر است (شکل-۳).



شکل۳. نمایش محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از تکثیر ۱٦S rDNA در باسیل آمیلاز مثبت جداشده ستون الف) محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز؛ ستون ب) اندازه نما، ستون ج) راهنمای اندازه نما)

بررسی فیلوژنیک جدایه باسیلوس مولد آمیلاز

توالی ۱٦S rRNA باسیل جداسازی شده، دربانک اطلاعاتی NCBI، به وسیله نرم افزار بلاست نوکلوئید همتراز شد و توالی‌هایی با بیش‌ترین درجه شباهت نسبت به توالی مورد آزمایش تعیین گردیدند. پس از انجام توالی‌یابی، مقایسه هم‌ردیفی درپایگاه NCBI Blastn انجام و تا ۹۹ % تشابه با باسیلوس سوبتیلیس برای ایزوله مورد نظر حاصل شد که نتایج آن به طور خلاصه در جدول ٤ نمایش داده شده است.

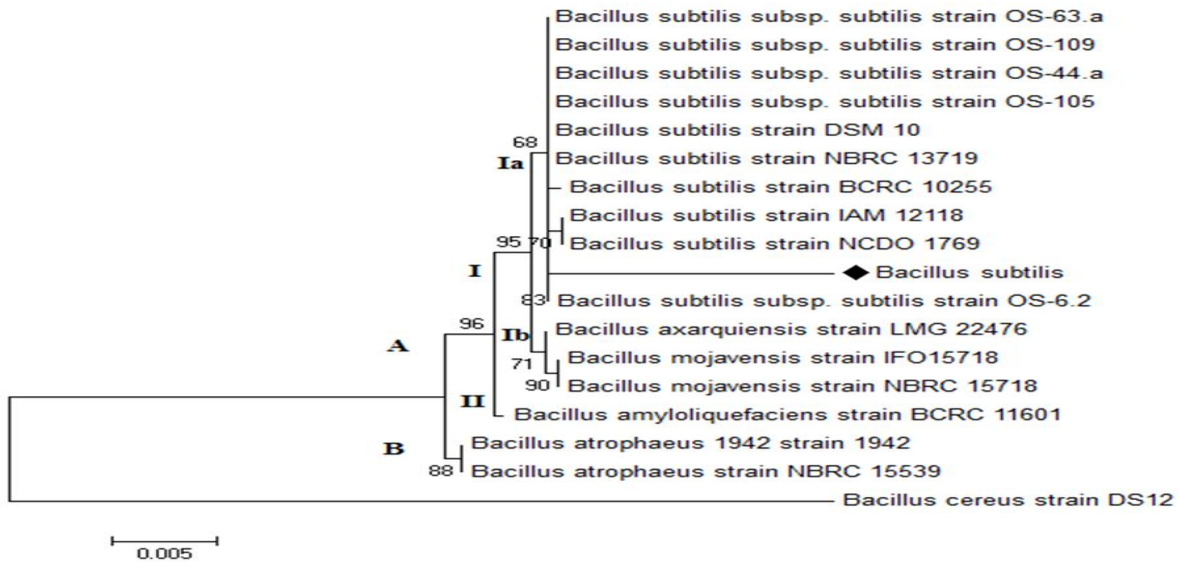
	Description	Identification	Accession Number
۱.	*Bacillus subtilis strain NCDO ۱۷۶۹*	۹۹٪	NR_۱۱۸۹۷۲.۱
۲.	*Bacillus subtilis strain NCDO ۱۷۶۹*	۹۹٪	NR_۱۱۸۹۷۲.۱
۳.	*Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-۶,۲*	۹۹٪	NR_۱۱۴۹۹۶.۱
۴.	*Bacillus subtilis strain IAM ۱۲۱۱۸*	۹۹٪	NR_۱۱۲۱۱۶.۱
۵.	*Bacillus subtilis strain NBRC ۱۳۷۱۹*	۹۸٪	NR_۱۱۲۶۲۹.۱
۶.	*Bacillus subtilis strain BCRC ۱۰۲۵۵*	۹۸٪	NR_۱۱۶۰۱۷.۱
۷.	*Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-۱۰۵*	۹۸٪	NR_۱۱۵۰۰۱.۱
۸.	*Bacillus subtilis strain DSM ۱۰*	۹۸٪	NR_۰۲۷۵۵۲.۱
۹.	*Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-۱۰۹*	۹۸٪	NR_۱۱۵۰۰۲.۱
۱۰.	*Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-۶۳.a*	۹۸٪	NR_۱۱۴۹۹۸.۱
۱۱.	*Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-۴۴.a*	۹۸٪	NR_۱۱۴۹۹۷.۱
۱۲.	*Bacillus axarquiensis strain LMG ۲۲۴۷۶*	۹۷٪	NR_۱۱۵۹۲۹.۱
۱۳.	*Bacillus mojavensis strain IFO ۱۵۷۱۸*	۹۷٪	NR_۰۲۴۶۹۳.۱
۱۴.	*Bacillus mojavensis strain NBRC ۱۵۷۱۸*	۹۷٪	NR_۱۱۲۷۲۵.۱
۱۵.	*Bacillus atrophaeus ۱۹۴۲ strain ۱۹۴۲*	۹۷٪	NR_۰۷۵۰۱۶.۱
۱۶.	*Bacillus atrophaeus strain NBRC ۱۵۵۳۹*	۹۷٪	NR_۱۱۲۷۲۳.۱
۱۷.	*Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC ۱۱۶۰۱*	۹۷٪	NR_۱۱۶۰۲۲.

آنالیز توالی‌های ژن 16S rRNA

گونه‌های مختلفی ازجنس باسیلوس برای تعیین موقعیت فیلوژنتیک باکتری مورد مطالعه دربین سایر گونه‌های این جنس، توسط نرم افزار مگا ٦، مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ١٨ گونه دراین آنالیز بررسی شد که باسیلوس سرئوس به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد. این باکتری‌ها جهت شناسایی مولکولی وبررسی فیلوژنتیکی با روش توالی یابی دراین مطالعه انتخاب شدند.

درخت فیلوژنی حاصل از ماکزیمم لایکلیهود

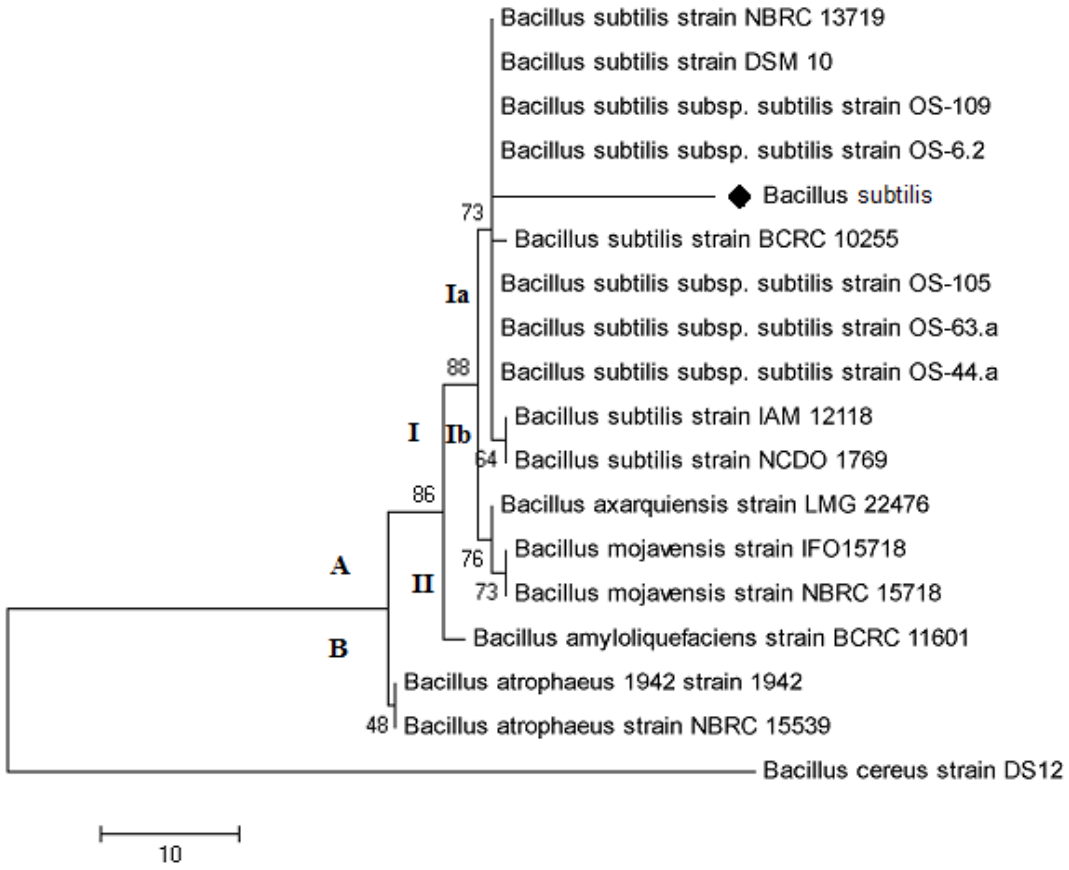
تصویر ٤ نشان دهنده ارتباط فیلوژنی ایزوله مورد مطالعه و باکتری‌های مرجع موجود در بانک ژنی می‌باشد که با استفاده از آنالیز ماکزیمم لایکلیهود انجام شده است. در درخت فیلوژنی به دست آمده، دوکلاد اصلی به چشم می‌خورند. اغلب گونه‌های مورد مطالعه در اولین کلاد اصلی (A)، با بوتستراپ ٩٦ دیده می‌شود. کلاد A خود شامل دو کلاد I و II است وکلاد I شامل دو گروه Ia و Ib می‌باشد. تمام سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس با بوتستراپ ٦٨، در گروه Ia قرار گرفته‌اند. ایزوله مورد مطالعه دراین تحقیق نیز در این گروه وبابوتستراپ ٨٣ در کنار سویه باسیلوس سوبتیلیس *subsp. strain OS*-٦/٢ قرار گرفته است. بقیه سویه‌های مرجع باسیلوس سوبتیلیس مورد استفاده، یک گروه جداگانه تشکیل دادند.



شکل ٤. درخت فیلوژنتیک حاصل از آنالیز توالی 16S rDNA به روش ماکزیمم لایکلیهود (اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده بوتستراپ است و باکتری مورد مطالعه با علامت ♦ مشخص شده است).

درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی

تصویر ۵ نشان دهنده ارتباط فیلوژنی ایزوله مورد مطالعه و باکتری‌های مرجع موجود در بانک ژنی می‌باشد که با استفاده از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی انجام شده است. در درخت اجماع قاطع به دست آمده، دو کلاد اصلی به چشم میخورد. اغلب گونه‌های مورد مطالعه در اولین کلاد اصلی (A) با بوتستراپ ۹۶ دیده می شود. کلاد A خود شامل دو کلاد I و II است و کلاد I شامل دو گروه Ia و Ib می باشد. تمام سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس با بوتستراپ ۷۳ در گروه Ia قرار گرفته‌اند، ایزوله مورد مطالعه در این تحقیق، در این گروه و در کنار باسیلوس سوبتیلیس *subsp. strain OS*-۶/۲ قرار گرفته است.



شکل۵. درخت اجماع قاطع حاصل از آنالیز توالی ۱۶S rDNA به روش ماکزیمم پارسیمونی(اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده بوتستراپ است و باکتری مورد مطالعه با علامت ♦ مشخص شده است).

بحث

هدف از این مطالعه، نمونه‌برداری از چشمهٔ آبگرم قینرجه و جداسازی باکتری‌های مولد آمیلاز است. خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های مولد آمیلاز توسط میکروسکوپ، بررسی شد. در ادامه، باسیل مورد نظر پس از استخراج DNAی ژنومی، تکثیر و تعیین توالی قطعه ١٦S rRNA از لحاظ فیلوژنیک با دو روش "ماکزیمم لایکلیود" و "ماکزیمم پارسیمونی" آنالیز گردید. نتیجه این آنالیز تا ۹۹ % تشابه با باسیلوس سوبتیلیس برای ایزوله مورد نظر را نشان می‌دهد. گونه‌های مختلفی از جنس باسیلوس، برای تعیین موقعیت فیلوژنتیک باکتری مورد مطالعه در بین سایر گونه‌های این جنس، توسط نرم‌افزار مگا٦، مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع، ۱۸ گونه در این آنالیز بررسی شدند که در نهایت، باسیلوس‌سرئوس به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد. بر این اساس، میزان تشابه حاصل شده در درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز ماکزیمم لایکلیهود و درخت اجماع قاطع به دست آمده از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی، نشان می‌دهد که ایزوله مولد آمیلاز جدا شده از چشمه آبگرم قینرچه، به یکسویه جدید از باسیلوس سوبتیلیس متعلق می‌باشد. سویه‌های مهم صنعتی تولیدکننده آمیلاز از منابع طبیعی به خصوص منابع گرم، مانند چشمه‌های آبگرم جدا شده‌اند. وجود تنش گرما در خاک و آب بر روی گونه‌های میکروبی، به انتخاب اختصاصی گونه‌های متحمل گرما منجر شده است. این موجودات برای زندگی در این شرایط سازگار شده‌اند. بعضی از اعضا باکتریایی گرم مثبت جنس باسیلوس، به واسطهٔ پتانسیل تولید آنزیم‌های جدید و صنعتی به خوبی شناخته شده‌اند. گونه باسیلوس سوبتیلیس، به عنوان یک باکتری متحمل دمای بالا در زیستگاه‌های متنوعی به صورت فعال و اندوسپور وجود دارد (۱۹-۲۱).

افتراق سویه‌های باکتریایی، با استفاده از آنالیز توالی اسیدهای نوکلئیک، به عنوان یکی از روش‌های قابل اعتماد و سریع محسوب می‌شود که اطلاعات به دست آمده از آن تکرارپذیر است. اطلاعات ژنوتیپی از چند نظر نسبت به اطلاعات فنوتیپی ارجحیت دارد: سهولت بیش‌تر، قابل اعتمادبودن بیش‌تر و تفسیر دقیق‌تر نتایج (۲۲). از آن‌جا که rRNAها درجه بالایی از ثبات عملکردی داشته و در تمام ارگانیزم‌ها وجود دارند؛ به عنوان مفیدترین و کاربردی-ترین نشانگر فیلوژنیک شناخته شده‌اند. علاوه بر این، به این علت که موقعیت‌های متفاوت و مختلف در توالی آن‌ها به میزان متفاوتی تغییر می‌کند و شرایطی را فراهم می‌سازد که بیش‌ترین ارتباط فیلوژنتیکی (بیش‌ترین فواصل ژنتیکی) قابل اندازه گیری باشد؛ دارای اهمیت هستند. در کنار این ویژگی‌ها، rRNAها سایز بزرگی داشته و دارای نواحی و دومین‌های فراوانی هستند. در حدود ۵۰ ساقهٔ مارپیچی در ساختار دوم ١٦S rRNA وجود دارد. شاید مهم‌ترین دلیل استفاده از ژن rRNA (به عنوان نشانگر فیلوژنیک مولکولی) این است که مستقیما می‌توانند توالی‌یابی شوند (۲۱و ۲۳). به همین دلیل، در این پژوهش برای شناسایی باکتری مورد نظر از مارکر ١٦S rRNA استفاده شد.

رسم درختچه‌های فیلوژنتیک به روش‌های مختلفی انجام می‌شود. یکی از مهم‌ترین این روش‌ها، "آنالیز ماکزیمم لایکلیهود" (بیشینه احتمال) است. احتمال دریک درخت فیلوژنی، احتمال مشاهده داده (توالی‌های نوکلئوتید) با توجه به درخت به دست آمده بر مبنای مدل انتخابی (الگوی جایگزینی‌ها)است که به صورت احتمال داده به شرط درخت نشان داده می‌شود: L=P(data/tree). هدف روش بیشینه احتمال، پیداکردن درختی (از میان همه درخت‌های ممکن) با حداکثر مقدار L است. با توجه به این روش، نوکلئوتیدها از تمام توالی‌ها در هر جایگاه به صورت مجزا بررسی می‌شوند و لگاریتم احتمال آن‌ها برای توپولوژی داده شده با استفاده از مدل‌ها محاسبه می‌شود. لگاریتم احتمال برای تمام جایگاه‌ها محاسبه شده و حاصل جمع آن‌ها برای محاسبه طول شاخه‌های درخت به حداکثر رسانده می‌شود. این روند برای تمام توپولوژی‌های ممکن تکرار می‌شود و آن توپولوژی که بالاترین احتمال را نشان می‌دهد، به عنوان درخت نهایی انتخاب می‌گردد.

یکی دیگر از روش‌های آنالیزفیلوژنتیک "روش ماکزیمم پارسیمونی" است. بر اساس این روش، مناسب‌ترین درخت، درختی است که به حداقل تعداد تغییرات برای توضیح داده‌ها (توالی‌های نوکلئوتیدی) نیاز داشته باشد. بنابراین، بهترین درخت، کم‌ترین تغییرات را در مسیر تکامل طی کرده و کم‌ترین میزان هموپلازی ناشی از همگرایی یا برگشت را دارد و کوتاه‌ترین درخت است. در آنالیز پارسیمونی ممکن است چند کوتاه‌ترین درخت به دست آید که در این صورت، درخت اجماع قاطع آن‌ها را نشان می‌دهند که در این درخت، کلادهای مشترک بین آن درختان نشان داده می‌شود؛ ولی روابط ناسازگار بین آن‌ها به صورت پلی تومی دیده می‌شود (۲٤).

لین (Lin) و همکاران، در سال ۲۰۰۷، برای تحلیل فیلوژنیک جدایه‌هایی از باکتری‌های آلیسیکلو باسیلوس (*Alicyclobacillus*)، با استفاده از روش ۱٦S rRNA ابزار مناسبی برای شناسایی و تمایز سریع و مطمئن این باکتری‌ها فراهم کردند (۱٦). وجود تنش گرما در خاک و آب برروی گونه‌های میکروبی، به انتخاب اختصاصی گونه‌های متحمل به گرما منجر شده است و این موجودات، برای زندگی در این شرایط سازگار شده‌اند (۲۰). بر همین اساس در این مطالعه نیز چشمه آبگرم قینرجه، به عنوان گرم‌ترین چشمه آب ایران برای جداسازی باکتری‌های مولد آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت.

باکتری باسیلوس سوبتیلیس به دست آمده در این پژوهش، (همان‌طور که زیر میکروسکوپ مشاهده شد) میله‌ای شکل، گرم مثبت، و دارای اندوسپور می‌باشد. واسکائو (Waschkau) و همکاران، در سال ۲۰۰٦ بعضی از اعضای باکتریایی گرم مثبت جنس باسیلوس را به عنوان منابع مولد آنزیم‌های جدید و صنعتی معرفی کردند (۱۹). گونه باسیلوس لیکنیفورمیس (*Bacillus licheniformis*)، به عنوان یک باکتری متحمل به دما در زیستگاه‌ها متنوعی به صورت فعال و اندوسپور وجود دارد. این باکتری توسط توهاریسمان (Toharisman) و

همکاران، در سال ۲۰۰۵ از چشمه آبگرم تومپاسو در کشور مصر و همچنین از چشمه آبگرم هاسانابدال جداسازی شد (۲۵). جنس آنوکسی باسیلوس (*Anoxibacillus*) نیز به عنوان باکتری گرمادوست، در مکان هایی با دمای بالا، مانند چشمه‌های آبگرم، کودهای حیوانی، فرآیندهای غذایی مانند ژلاتین‌سازی یافت می‌شود. این باکتری در چشمه‌های آبگرم به وسیلهٔ لوگان و همکاران، در سال ۲۰۰٤ از چشمه آبگرم دولنیبگر و کشور بلغارستان شناسایی و جداسازی گردید. تمامی جدایه‌ها میله‌ای شکل، گرم مثبت، دارای شکل اندوسپرم بودند و نسبت به آزمون آمیلاز که از آزمون‌های شناسایی باسیلوس بودند؛ جواب مثبت دادند (۲٦).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه یک باسیل گرم مثبت مولد آمیلاز متعلق به گونه باسیلوس سوبتیلیس با موفقیت از چشمه آب گرم قینرجه جدا سازی و با روش‌های مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن ۱٦S rRNA شناسایی شد. با توجه به مصرف بالای آمیلاز و تولید آن توسط سویه باکتریایی باسیلوس سوبتیلیس جدا شده در این پژوهش امید است پس از بررسی‌های بیوشیمیایی آنزیم آمیلاز تولیدشده، سویه مورد نظر به عنوان یک کاندید مناسب جهت تولید این آنزیم مورد استفاده قرارگیرد.

تشکروقدردانی

به این وسیله از تمامی اعضاء دانشکده علوم زیستی که در اجرای این مطالعه ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

۱. Boyer, E., Ingle, M. Extracellular alkaline amylase from a Bacillus species. Journal of bacteriology. ۱۹۷۲. ۱۱۰. ۹۹۲-۱۰۰۰.

۲. Ivanova, V.N., Dobreva, E.P., Emanuilova, E.I. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from Bacillus licheniformis. Journal of Biotechnology. ۱۹۹۳. ۲۸. ۲۷۷-۸۹.

۳. Azizi, H., Ebrahimi, M., Noorbakhsh, F. pH acts as an inducer in production of α-amylase by Bacillus alkalitelluris. Iranian journal of Biological Sciences. ۲۰۱۷. ۱۱. ۳۹-٤۷.

٤. Ebrahimi, M., Noorbakhsh, F. Optimization of α-amylase production by Bacillus alkalitelluris using Response surface methodology. Iranian journal of Biological Sciences. ۲۰۱۷. ۱۲. ۱-۸.

٥. Shafiei, M., Ziaee, A.-A., Amoozegar, M.A. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α-amylase from the moderately halophilic Nesterenkonia sp. strain F. Journal of industrial microbiology & biotechnology. ۲۰۱۱. ۳۸. ۲۷٥-۸۱.

٦. Van Der Maarel, M.J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of biotechnology. ۲۰۰۲. ۹٤. ۱۳۷-٥٥.

۷. Michelin, M., Silva, T.M., Benassi, V.M., Peixoto-Nogueira, S.C., Moraes, L.A.B., Leão, J.M., et al. Purification and characterization of a thermostable α-amylase produced by the fungus Paecilomyces variotii. Carbohydrate Research. ۲۰۱۰. ۳٤٥. ۲۳٤۸-٥۳.

۸. Liu, X.D., Xu, Y. A novel raw starch digesting α-amylase from a newly isolated Bacillus sp. YX-۱: purification and characterization. Bioresource Technology. ۲۰۰۸. ۹۹. ٤۳۱٥-۲۰.

۹. Wang, R.-F., Cao, W.-W., Cerniglia, C.E. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Applied and environmental microbiology. ۱۹۹٦. ٦۲. ۱۲٤۲-۷.

۱۰. Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Partial and complete ۱٦S rDNA sequences, their use in generation of ۱٦S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies, Springer, ۱۹۹٥, ۲٥۹-۷٥.

۱۱. Yang, B., Wang, Y., Qian, P.-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in ۱٦S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC bioinformatics. ۲۰۱٦. ۱۷. ۱۳٥.

۱۲. Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of ۱٦S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International journal of systematic and evolutionary microbiology. ۲۰۱۷. ٦۷. ۱٦۱۳-۷.

۱۳. Kullen, M., Sanozky-Dawes, R., Crowell, D., Klaenhammer, T. Use of the DNA sequence of variable regions of the ۱٦S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. Journal of applied microbiology. ۲۰۰۰. ۸۹. ٥۱۱-٦.

۱٤. Patil, M.M., Pal, A., Anand, T., Ramana, K. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. ۲۰۱۰.

۱٥. Wang, Y., Li, H., Jia, S., Wu, Z., Guo, B. Analysis of bacterial diversity of kefir grains by denaturing gradient gel electrophoresis and ۱٦S rDNA sequencing. Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica. ۲۰۰٦. ٤٦. ۳۱۰-۳.

۱٦. Lin, M., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Chang, S.-S., Kang, D.-H., Rodgers, B.D., et al. Phylogenetic and spectroscopic analysis of Alicyclobacillus isolates by ۱٦S rDNA

sequencing and mid-infrared spectroscopy. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety. ۲۰۰۷. ۱. ۱۱-۷.

۱۷. Sharmin, S., Hossain, M.T., Anwar, M. Isolation and characterization of a protease producing bacteria Bacillus amovivorus and optimization of some factors of culture condition for protease production. J Biol Sci. ۲۰۰۵. ۵. ۳۵۸-٦۲.

۱۸. DeFlaun, M.F., Fredrickson, J.K., Dong, H., Pfiffner, S.M., Onstott, T., Balkwill, D.L., et al. Isolation and characterization of a Geobacillus thermoleovorans strain from an ultra-deep South African gold mine. Systematic and applied microbiology. ۲۰۰۷. ۳۰. ۱۵۲-٦٤.

۱۹. Waschkau, B., Waldeck, J., Wieland, S., Eichstädt, R., Meinhardt, F. Generation of readily transformable Bacillus licheniformis mutants. Applied microbiology and biotechnology. ۲۰۰۸. ۷۸. ۱۸۱-۸.

۲۰. Vieille, C., Zeikus, G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and molecular biology reviews. ۲۰۰۱. ٦۵. ۱-٤۳.

۲۱. de Boer, A.S., Priest, F., Diderichsen, B. On the industrial use of Bacillus licheniformis: a review. Applied Microbiology and Biotechnology. ۱۹۹٤. ٤۰. ۵۹۵-۸.

۲۲. Welling, G., Elfferich, P., Raangs, G., Wildeboer-Veloo, A., Jansen, G., Degener, J. ١٦S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. Scandinavian journal of gastroenterology. ۱۹۹۷. ۳۲. ۱۷-۹.

۲۳. Rooney, A.P., Price, N.P., Ehrhardt, C., Swezey, J.L., Bannan, J.D. Phylogeny and molecular taxonomy of the Bacillus subtilis species complex and description of Bacillus subtilis subsp. inaquosorum subsp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. ۲۰۰۹. ۵۹. ۲٤۲۹-۳٦.

۲٤. Soltis, D.E., Soltis, P.S. The role of phylogenetics in comparative genetics. Plant Physiology. ۲۰۰۳. ۱۳۲. ۱۷۹۰-۸۰۰.

۲۵. Toharisman, A., Suhartono, M.T., Spindler-Barth, M., Hwang, J.-K., Pyun, Y.-R. Purification and characterization of a thermostable chitinase from Bacillus licheniformis Mb-۲. World Journal of Microbiology and Biotechnology. ۲۰۰۵. ۲۱. ۷۳۳-۸.

۲۶. Logan, N., Berkeley, R. Identification of Bacillus strains using the API system. Microbiology. ۱۹۸٤. ۱۳۰. ۱۸۷۱-۸۲.

Isolation and Phylogenetic study of new amylase producing Bacillus strain from Ghainarjeh hot spring in East Azarbaijan

Sahar Hosseini[۱], Mehdi Ebrahimi [۲,*], Maasoumeh Mahdavi Ourtakand [۳], Khadijeh Pourdadash[۴], Roozbeh Yalfani[۴]

۱ Department of Genetics, Faculty of Biological sciences, Varamin -Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

۲ Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Biological sciences, Varamin -Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

۳ Department of Biology, Faculty of Biological sciences, Varamin -Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

۴ Department of Microbiology, Faculty of Biological sciences, Varamin -Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Biological sciences, Varamin -Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Tel: ۰۲۱-۳۶۷۲۵۰۱۴

Email: mehd_ebrahimi@yahoo.com

Abstract

Background and objectives: Amylase is one of the important industrial enzymes, which is used in the food industry, detergent production, glucose, textile, and paper making. *Bacillus* spp. is considered as a major amylase producing microorganisms. The main objective of this study is isolation and phylogenic study of amylase producing thermophile *Bacillus spp.* from Ghainarjeh hot sprin in East Azarbaijan.

Materials and methods: Samples from water of Ghainarjeh hot spring were cultured on recommended mediums. The grown colonies were tested for amylase production and positive colony determined a gram positive *Bacillus* using morphological and microscopically characteristics. Selected colony was used for total genomic DNA extraction, ۱۶S rRNA fragment amplification and sequencing was done according to standard procedures. The sequence of ۱۶S rRNA was used for phylogenetic investigation using maximum likelihood and maximum parsimony methods.

Results: According to the results from morphological and biochemical investigations, the isolate is a gram positive, spore forming *Bacillus* with ability for use glucose, fructose and sucrose but not galactose and lactose. This isolate was positive for endol, citrate and VP but negative for catalase and oxidase.

Conclusion: The results of phylogenetic investigation from both method show that the amylase producing isolated *Bacillus* is a new member of *Bacillus Subtilis* spp. in this study a new member of *Bacillus subtilis* spp. with the ability in amylase production was successfully isolated.

Keywords: ۱۶S rRNA, α-amylase, phylogenetic, Ghainarjeh hot spring, *Bacillus subtillis*