



عزل وتشخيص وتطهير

Pediococcus و *Lactobacillus plantarum*
acidilactici

و دراسة تأثيرهما على بعض المؤشرات
البايوكيميائية في منتج لبني متخمّر

أطروحة تقدم بها

سنان جودة عبد العباس

الى مجلس كلية الزراعة - جامعة بغداد
وهي جزء من متطلبات درجة دكتوراه فلسفة في العلوم
الزراعية / علوم الأغذية / تقنية حيوية

بإشراف

أ.م.د. أسوان حمد الله عبود أ.د. عدنان عيسى البدران

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	
1	المقدمة	1
3	استعراض المراجع	2
3	المعززات الحيوية Probiotic	1-2
3	نبذة تاريخية	1-1-2
4	أهمية المعززات الحيوية	2-1-2
5	بعض صفات المعززات الحيوية	3-1-2
7	الصفات الشكلية والفسلجية للمعززات الحيوية	2-2
7	الصفات الشكلية والفسلجية لجنس <i>Lactobacilli</i>	1-2-2
8	الصفات الشكلية والفسلجية لجنس <i>Pediococci</i>	2-2-2
9	خصائص المعززات الحيوية	3-2
9	بكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i>	1-3-2
10	الخصائص العلاجية لبكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i>	2-1-3-2
12	بكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i>	2-3-2
13	الخصائص العلاجية لبكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i>	1-2-3-2
14	مصادر العزل	4-2
14	مصادر عزل بكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i>	1-4-2
16	مصادر عزل بكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i>	2-4-2
16	أهمية المعززات الحيوية في خفض نسبة الكولسترول	5-2
18	أملاح الصفراء Bile Salt	6-2
19	العلاقة التضادية بين البكتريا العلاجية وبادئ اليوكورت	7-2

20	التركيب الجيني لبكتريا <i>L. plantarum</i>	8-2
23	الطفرات	9-2
24	أنواع الطفرات	1-9-2
25	الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet reduction	2-9-2
27	التضخيم العشوائي متعدد الاشكال	10-2
28	المعززات الحيوية ودورها في المنتجات اللبنية المتخمرة	11-2
31	المواد وطرائق العمل	3
31	المواد	1-3
31	الأجهزة والأدوات المستعملة	1-1-3
32	المواد الكيماوية المستعملة	2-1-3
34	المواد الحيوية المستعملة	3-1-3
35	مصادر العزل	4-1-3
35	مصدر تجهيز البكتريا القياسية	1-4-1-3
35	تحضير الكواشف والمحاليل	5-1-3
35	دليل الكلوروفينول الأحمر	1-5-1-3
35	كاشف نسلر	2-5-1-3
36	كاشف كوفاكس	3-5-1-3
36	دليل الفينولفثالين	4-5-1-3
36	محلول بيروكسيد الهيدروجين	5-5-1-3
36	دليل اختزال النترات	6-5-1-3
36	تحضير صبغة كرام	7-5-1-3
37	كحول الايثانول 70%	8-5-1-3

37	محلول الكشف عن الظروف اللاهوائية	9-5-1-3
37	تحضير Tris Borate-EDTA (TBE) 5X buffer	10-5-1-3
38	تحضير Tris EDTA (TE)	11-5-1-3
38	تحضير Phosphate buffer saline (PBS)	12-5-1-3
38	تحضير صبغة Ethidium Bromide	13-5-1-3
38	الاطواسط الزرعية	6-1-3
39	MRS Broth وسط	1-6-1-3
39	M17 الصلب وسط	2-6-1-3
40	Sodium azide الحاوي على 0.5% ازيد الصوديوم MRS وسط	3-6-1-3
40	MRS-L.Cysteine.HCl والصلب والسائل	4-6-1-3
40	وسط استهلاك السترات	5-6-1-3
40	وسط تكوين الامونيا من الارجنين	6-6-1-3
40	وسط تخمير الكاربوهيدرات	7-6-1-3
41	وسط إنتاج الاندول من التريوفان	8-6-1-3
41	وسط الجيلاتين	9-6-1-3
41	Tryptone soy broth وسط	10-6-1-3
42	الحليب الفرز	11-6-1-3
42	لحفظ العزلات NGYC وسط	12-6-1-3
42	طرائق العمل	2-3
42	طريقة العزل	1-2-3
42	الفحص المظهري	2-2-3
42	الفحص المجهرى	3-2-3
43	الفحوص الكيموحيوية	4-2-3
43	فحص الكاتليز	1-4-2-3

43	فحص اختزال النترات	2-4-2-3
43	فحص استهلاك السترات	3-4-2-3
43	فحص إنتاج الغاز	4-4-2-3
44	فحص تكوين الامونيا من الارجنين	5-4-2-3
44	فحص انتاج الاندول من التريبتوفان	6-4-2-3
44	فحص تحلل الجيلاتين	7-4-2-3
44	فحص تخمير الكاربوهدرات	8-4-2-3
45	طرق حفظ العزلات	5-2-3
45	الحفظ لمدة أسبوع	1-5-2-3
45	الحفظ بالتجميد طويل الأمد	2-5-2-3
45	النمو في الحليب وإنتاج الحموضة	6-2-3
45	مقاومة الحموضة	7-2-3
46	مقاومة أملاح الصفراء	8-2-3
46	تحضير راشح المزارع البكتيرية	9-2-3
46	فحص التضاد	1-9-2-3
47	تقدير الكولسترول	10-2-3
47	MRS-Egg yolk (MRS-EY) تحضير وسط	1-10-2-3
47	تحضير صفار البيض	2-10-2-3
47	السائل MRS-EY تحضير وسط	3-10-2-3
47	تقدير نسبة الكولسترول	4-10-2-3
49	النمو في درجات الحرارة المختلفة	11-2-3
49	MRS broth النمو في درجات الحرارة المختلفة في الوسط السائل	1-11-2-3
49	MRS Agar النمو في درجات الحرارة المختلفة في الوسط الصلب	2-11-2-3
49	إستخلاص الحامض النووي	12-2-3

49	البكتريا DNA استخلاص	1-12-2-3
50	DNA تحضير هلام جهاز الترحيل الكهربائي للكشف عن جزيئات	2-12-2-3
51	16S ribosomal DNA (16SrDNA) تشخيص البكتريا	13-2-3
54	التطهير	14-2-3
55	التضخيم العشوائي متعدد الأشكال	15-2-3
57	تصنيع منتجات الالبان المتخمرة	16-2-3
57	مصدر الحليب	1-16-2-3
57	إعداد البادئ	2-16-2-3
58	تحضير المتخمّر اللبني	3-16-2-3
58	حساب العدد الكلي للبكتريا	4-16-2-3
58	التقييم الحسي للمنتجات	17-2-3
60	التحليل الاحصائي	18-2-3
61	النتائج والمناقشة	4
61	عزل وتشخيص بكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i>	1-4
67	عزل وتشخيص بكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i>	2-4
70	تشخيص بكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i> IRQ12 و <i>Pediococcus acidilactici</i> SNN12 جينياً بواسطة 16S ribosomal DNA	3-4
70	تتابعات القواعد النتروجينية لجين 16SrDNA وتشخيص بكتريا <i>P. acidilactici</i> و <i>L. plantarum</i> IRQ12	4-4
74	تشخيص العزلة <i>L. plantarum</i> IRQ12 كسلالة عالمية جديدة	5-4
75	تشخيص العزلة <i>P. acidilactici</i> SNN12 كسلالة عالمية جديدة	6-4
77	تطهير بكتريا <i>L. plantarum</i> IRQ12 و <i>P. acidilactici</i>	7-4
78	تأثير مدد التطهير على خواص النمو لبكتريا <i>Lactobacillus</i>	1-7-4

	<i>plantarum</i> IRQ12	
80	تأثير مدد التطفير على خواص النمو لبكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i> SNN12	2-7-4
82	دراسة مدى التغيرات الجيني للعزلة <i>L.plantarum</i> IRQ12 قبل وبعد التطفير ولجميع مستويات التعرض للاشعاع (20s و 25s و 30s و 35s و 60s) باستخدام تقنية RAPD - PCR	8-4
85	غريلة العزلات المحلية لبكتريا <i>L.plantarum</i>	9-4
85	إنتاج الحموضة من الحليب بواسطة بكتريا <i>L.plantarum</i>	1-9-4
86	إنتاج الحموضة من الحليب بواسطة بكتريا <i>P.acidilactici</i>	2-9-4
87	مقاومة العزلات المحلية والقياسية والمطفرة لبكتريا <i>L.plantarum</i> لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني	10-4
95	مقاومة العزلة المحلية البرية والمطفرة لبكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i> SNN12 لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني	11-4
98	مقاومة العزلات المحلية والقياسية والمطفرة لبكتريا <i>L.plantarum</i> لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء	12-4
105	مقاومة العزلة المحلية البرية والمطفرة لبكتريا SNN12 <i>P.acidilactici</i> لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء	13-4
108	فحص التضاد بين العزلات البكتيرية <i>L.plantarum</i> المحلية وبكتريا باديئ اليوكرت	14-4
109	فحص التضاد بين العزلة البرية والمطفرة لبكتريا <i>P.acidilactici</i> وبكتريا باديئ اليوكرت	15-4
111	دراسة قدرة بكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i> قبل التطفير وبعدها على خفض مستويات الكولسترول	16-4
115	دراسة قدرة بكتريا <i>Pediococcus acidilactici</i> على خفض	17-4

	مستويات الكولسترول	
117	تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة العلاجية	18-4
117	التركيب الكيميائي وقيم الحموضة للحليب المستعمل في تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة العلاجية	1-18-4
118	تحديد زمن اكتمال التخثر ودراسة التغيرات الحاصلة في قيم الحموضة الكلية للمنتج اللبني المتخمر عند الخزن المبرد 4°م للعزلة IRQ12 قبل التطهير وبعدها	2-18-4
119	تحديد زمن اكتمال التخثر ودراسة التغيرات الحاصلة في قيم الحموضة الكلية للمنتج اللبني المتخمر عند الخزن المبرد 4°م للعزلة SNN12 قبل التطهير وبعدها	3-18-4
120	تأثير مدد الخزن في عيشية بكتريا <i>L.plantarum</i>	4-18-4
124	تأثير مدد الخزن في عيشية بكتريا <i>P.acidilactici</i>	5-18-4
125	التقييم الحسي للمنتجات اللبنية المتخمرة للعزلة IRQ12 قبل التطهير وبعدها	19-4
125	التقييم الحسي للنكهة	1-19-4
126	التقييم الحسي للقوام والنسجة	2-19-4
126	التقييم الحسي للحموضة	3-19-4
127	الأعداد الحية لبكتريا <i>L.plantarum</i>	4-19-4
129	التقييم الحسي للمنتجات اللبنية المتخمرة للعزلة SNN12 قبل التطهير وبعدها	20-4
129	التقييم الحسي للنكهة	1-20-4
129	التقييم الحسي للقوام والنسجة	2-20-4
129	التقييم الحسي للحموضة	3-20-4
129	الأعداد الحية لبكتريا <i>P.acidilactici</i>	4-20-4

132	الاستنتاجات والتوصيات	5
134	المصادر	6
170	الملاحق	7

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	الجدول
6	الفائدة الصحية للمعززات الحيوية وبعض الآليات المقترحة لفعالها الصحي	1-2
15	مصادر عزل بكتريا <i>Lactobacillus plantarum</i>	2-2
31	الأجهزة والمعدات المستعملة	1-3
32	المواد الكيماوية المستعملة	2-3
34	المواد الحيوية المستعملة	3-3
39	مكونات وسط MRS Broth	4-3
39	مكونات وسط M17 الصلب	5-3
40	مكونات وسط تكوين الامونيا من الارجنين	6-3
41	مكونات وسط Tryptone soy broth	7-3
51	للبكتريا قيد الدراسة <i>16SrDNA</i> برايمرات تشخيص جين	8-3
52	PCR في جهاز <i>16SrDNA</i> المواد وكمياتها اللازمة لتضخيم جين	9-3
52	PCR في جهاز <i>16SrDNA</i> ظروف برنامج تضخيم جين	10-3
55	RAPD-PCR برايمر تشخيص	11-3
55	RAPD المواد وكمياتها المستخدمة للتضخيم بطريقة	12-3
56	PCR في جهاز RAPD ظروف برنامج تضخيم	13-3
59	<i>L. plantarum</i> استمارة الاستبيانة للعزلات المحلية والقياسية لبكتريا <i>P. acidilactici</i> و	14-3
59	المطفرة <i>L. plantarum</i> و <i>P. acidilactici</i> استمارة الاستبيانة لبكتريا	15-3

	بالأشعة فوق البنفسجية	
60	استمارة الاستبيانة للأعداد الحية للعزلات المحلية والقياسية لبكتريا المطفرة بالأشعة <i>L.plantarum</i> و <i>P.acidilactici</i>	16-3
61	<i>Lactobacillus spp</i> مصادر عزل البكتريا وعدد عزلات	1-4
65	نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلات المحلية والسلالة القياسية لبكتريا <i>L.plantarum</i>	2-4
66	نتائج اختبارات تخمير الكربوهيدرات للعزلات المحلية والسلالة القياسية <i>L.plantarum</i> لبكتريا	3-4
68	<i>Pediococcus</i> نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلة المحلية <i>acidilactici</i> SNN12	4-4
69	نتائج اختبارات تخمير الكربوهيدرات للعزلة المحلية <i>Pediococcus acidilactici</i> SNN12	5-4
72	تتابعات جين <i>16SrDNA</i> ، مصدر العزل ومطابقة السلالة (%) للبكتريا المشخصة	6-4
84	تأثير الأوقات المختلفة لتعرض العزلة <i>L.plantarum</i> لأشعة UV	7-4
86	نتائج الحموضة الكلية للعزلات المحلية والسلالة القياسية لبكتريا <i>P.acidilactici</i> و <i>L.plantarum</i>	8-4
108	التأثير التضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت ضد العزلات المحلية والسلالة القياسية <i>L.plantarum</i> (إشارة اليمين) والتأثير التضادي للبكتريا العلاجية المعزولة ضد بادئ اليوكرت (إشارة اليسار)	9-4
108	التأثير التضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت ضد العزلات المحلية المطفرة <i>IRQ12</i> (إشارة اليمين) والتأثير التضادي للبكتريا العلاجية المعزولة المطفرة ضد بادئ اليوكرت (إشارة اليسار)	10-4
110	التأثير التضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت ضد العزلات المحلية البرية والمطفرة <i>SNN12</i> (إشارة اليمين) والتأثير التضادي للبكتريا العلاجية	11-4

	المعزولة المطفرة ضد بادئ اليوكريت (إشارة اليسار)	
117	التركيب الكيميائي وقيم الحموضة للحليب البقري المستعمل في تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة العلاجية	12-4
119	زمن اكتمال التخثر والتغيرات الحاصلة في قيم الحوضة الكلية للمنتج اللبني المتخمّر عند الخزن المبرد 4°م للعزلة IRQ12 قبل التطهير وبعدها	13-4
120	زمن اكتمال التخثر والتغيرات الحاصلة في قيم الحوضة الكلية للمنتج اللبني المتخمّر عند الخزن المبرد 4°م للعزلة SNN12 قبل التطهير وبعدها	15-4
121	لوغاريتم الأعداد الحية / مل لبكتريا <i>L.plantarum</i> للعزلات المحلية والقياسية في المنتج اللبني المتخمّر أثناء مراحل الخزن (1 و 7 و 14 و 21) يوم بدرجة حرارة 4°م	15-4
123	لوغاريتم الأعداد الحية / مل لبكتريا <i>L.plantarum</i> IRQ12 المطفرة في المنتج اللبني المتخمّر أثناء مراحل الخزن (1 و 7 و 14 و 21) يوم بدرجة حرارة 4°م	16-4
125	لوغاريتم الأعداد الحية / مل لبكتريا <i>P.acidilactici</i> للعزلة المحلية والمطفرة في المنتج اللبني المتخمّر أثناء مراحل الخزن (1 و 7 و 14 و 21) يوم بدرجة حرارة 4°م	17-4
127	التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمّر المصنوع من العزلة المحلية <i>L.plantarum</i> IRQ12 والمخزن بدرجة حرارة 4°م بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم	18-4
128	التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمّر المصنوع من العزلة المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية <i>L.plantarum</i> بمدد التطهير المختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60) ثانية والمخزن في 4 درجة مئوية بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم	19-4

130	التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمر المصنع من العزلة المحلية <i>P.acidilactici</i> SNN12 والمخزن بدرجة حرارة 4°م بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم	20-4
131	التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمر المصنع من العزلة المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية <i>P.acidilactici</i> بمدد التطهير المختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60) ثانية والمخزن في 4 درجة مئوية بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم	

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	الشكل
63	نماذج من العزلة المحلية لبكتريا <i>L.plantarum</i> (1) في وسط MRS Agar (2) تحت المجهر بقوة تكبير 1000x	1-4
71	الترحيل الكهربائي لـ DNA المعزول من البكتريا قيد الدراسة على هلام الأكاروز 0.8% وبفولتية 70 فولت لمدة ساعة واحدة	2-4
71	حزم نواتج الترحيل الكهربائي لجين <i>16SrDNA</i> للبكتريا المعزولة بجهاز PCR على هلام الأكاروز، Ladder: DNA 1K، 1: <i>L.plantarum</i> ، 2: <i>P.acidilactici</i> SNN12، 3: <i>L.plantarum</i> القياسية	3-4
74	مقارنة لتتابعات جين 16S rDNA للعزلة <i>L.plantarum</i> IRQ12 مع قمم سلالة أخرى <i>L.plantarum</i> S3، منطقة الطفرة حذفت فيها القاعدة النتروجينية (C) في الموقع 17	4-4
75	مقارنة لتتابعات جين 16S rDNA للعزلة <i>P.acidilactici</i> SNN12 مع قمم سلالة أخرى <i>P.acidilactici</i> BCH، منطقة الطفرة حذفت فيها القاعدة النتروجينية (C) في الموقع 1044	5-4
76	تسجيل بكتريا <i>L.plantarum</i> IRQ12 كسلالة عالمية جديدة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)	6-4
77	تسجيل بكتريا <i>P.acidilactici</i> SNN12 كسلالة عالمية جديدة في	7-4

	المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)	
80	نموذج من العزلة المحلية لبكتريا <i>L.plantarum</i> المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية والنامية في وسط MRS Agar	8-4
81	نمو بكتريا <i>P.acidilactici</i> SNN12 عند مستوى تطهير 20s	9-4
81	نمو بكتريا <i>P.acidilactici</i> SNN12 عند مستوى تطهير 30s	10-4
82	نمو بكتريا <i>P.acidilactici</i> SNN12 عند مستوى تطهير 60s	11-4
83	حزم الترحيل الكهربائي لنتائج PCR - RAPD على هلام الآكاروز 2% بفولتية 70 فولت للعزلة <i>L.plantarum</i> المعرضة لأشعة UV بمدد زمنية مختلفة	12-4
84	الشجرة الوراثية والبعد الوراثي لأوقات تعرض العزلة <i>L.plantarum</i> لـ IRQ12 لأشعة UV	13-4
131	مقاومة العزلات المحلية لـ IRQ12 و CM و KR و CT و BS والسلالة القياسية لبكتريا <i>L.plantarum</i> لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة	14-4
94	مقاومة العزلة المحلية المطفرة لبكتريا <i>L.plantarum</i> بمدد تطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة	15-4
97	مقاومة العزلة المحلية لـ SNN12 والمطفرة لبكتريا <i>P.acidilactici</i> بمدد التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة	16-4
100	مقاومة العزلات المحلية لـ IRQ12 و CM و KR و CT و BS والسلالة القياسية لبكتريا <i>L.plantarum</i> لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3% بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة	17-4
104	مقاومة العزلات المحلية المطفرة لبكتريا <i>L.plantarum</i> بمدد	18-4

	التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3% بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة	
107	مقاومة العزلة المحلية SNN12 والمطفرة لبكتريا <i>P.acidilactici</i> بمدد التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3% بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة	19-4
112	مقدرة العزلات المحلية والقياسية من بكتريا <i>L.plantarum</i> على خفض كمية الكولسترول ملغم / مل في وسط MRS Broth - EY	20-4
112	النسبة المئوية لانخفاض الكولسترول للعزلات المحلية والقياسية لبكتريا <i>L.plantarum</i> في وسط MRS Broth - EY	21-4
113	مقدرة السلالة المطفرة IRQ12 <i>L.plantarum</i> بمدد التطهير المختلفة على خفض كمية الكولسترول ملغم / مل في وسط MRS Broth - EY	22-4
114	النسبة المئوية لانخفاض الكولسترول للعزلة المطفرة IRQ12 <i>L.plantarum</i> بمدد التطهير المختلفة في MRS Broth - EY	23-4
116	مقدرة السلالة المحلية والمطفرة من بكتريا <i>P.acidilactici</i> SNN12 على خفض كمية الكولسترول ملغم / مل في وسط MRS Broth - EY	24-4
117	النسبة المئوية لانخفاض الكولسترول للسلالة المحلية لبكتريا <i>P.acidilactici</i> في وسط MRS Broth - EY	25-4

الخلاصة

عزلت 36 عزلة من المعززات الحيوية من مصادر نباتية مختلفة منها (خيار القثاء IRQ12 و الخيار CM و الباميا KR و الجزر CT و اللهانة BS) متخمرة في محلول ملحي. وباستعمال الطرائق الانتقائية تم الحصول على عزلات بكتريا *Lactobacillus plantarum* فيما تم الحصول على بكتريا *Pediococcus acidilactici* من مخلل (الباميا) وأخضعت هذه العزلات إلى ما يأتي:

1- أجريت غريلة للعزلات من خلال الفحوص التشخيصية والتي تضمنت الفحص المظهري والمجهري والفحوص الكيموحيوية باستعمال أوساط (MRS Agar و MRS Broth).

2- أجري فحص تأكيدي جيني لبكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* وتم تسجيلهما كسلالتين عالميتين جديدتين IRQ12 و SNN12 على التوالي بواسطة أستخلاص DNA وتضخيم

جين *16SrDNA* وتحديد تتابعات القواعد النتروجينية ومقارنتها مع سلالات عالمية معروفة سابقاً في بنك الجينات العالمي (GenBank).

3- أجريت عملية الغربلة للعزلات لاختيار العزلة الأكفأ والتي شملت :

أ- إنتاج الحموضة الكلية من الحليب والتي أظهرت العزلة القياسية و CM أعلى نسبة حموضة لكليهما إذ بلغت 0.72% بينما بلغت الحموضة الكلية للعزلة *P.acidilactici* SNN12 0.8%.

ب- تم قياس مدى مقاومة العزلات المحلية لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني وأظهرت العزلة *L.plantarum* IRQ12 أعلى مقاومة إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 5.05 عند الأس الهيدروجيني 1.5 بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض، فيما أظهرت العزلة CT أقل مقاومة للحموضة إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 1.67 في الظروف نفسها، في حين أظهرت العزلة المحلية *P.acidilactici* SNN12 مقاومة عالية للأس الهيدروجيني 1.5 إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 6.55 بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض.

ج- أظهرت العزلات المحلية (IRQ12 و القياسية و CM و BS) أعلى مقاومة لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 9.5 و 9.03 و 8.38 و 8.2 على التوالي عند تركيز 0.3% بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض، فيما أظهرت العزلة المحلية *P.acidilactici* SNN12 مقاومة عالية عند تركيز 0.3% إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 8.32 بعد ثلاث ساعات من التعرض.

د- أظهرت نتائج فحص التضاد عدم وجود أي علاقة تضادية بين العزلات المحلية لبكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* SNN12 وبين بكتريا بادئ اليوكرت *Streptococcus thermophiles* و *Lactobacillus bulgaricus* كما لم توجد أي علاقة تضادية بين بكتريا بادئ اليوكرت وبين العزلات المحلية.

هـ- أظهرت العزلات المحلية لبكتريا *L.plantarum* في وسط MRS broth – EY قدرة عالية على خفض الكولسترول إذ سجلت العزلة IRQ12 أقل كمية كوليسترول في وسط النمو بمقدار 0.52 ملغم كوليسترول / مل تلتها العزلات CM و BS و KR و القياسية و CT بمقدار 0.612 و 0.654 و 0.659 و 0.733 و 0.815 ملغم كوليسترول / مل على التوالي، أما النسب المئوية للانخفاض فقد بلغت 88.69% للعزلة IRQ12 بينما بلغت لباقي العزلات 86.69 و 85.78 و

85.60 و 84.06 و 82.28 % على التوالي بينما كانت كمية الكولسترول في وسط نمو العزلة SNN12 *P.acidilactici* 0.673 ملغم كولسترول / مل ونسبة انخفاض بلغت 85.3%.

و- أظهرت نتائج تأثير مدد الخزن المبرد بدرجة حرارة 4°م على عيشية بكتريا *L.plantarum* ثباتية عالية للمحافظة على الأعداد الحية إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل للعزلات KR و BS و 8.7 CM و 8.27 و 8.17 على التوالي بعد مرور 21 يوماً من الخزن تلتها العزلة IRQ12 و القياسية و CT والتي بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 8.5 و 8.07 و 7.95 على التوالي بعد 21 يوماً من الخزن، أما العزلة المحلية SNN12 *P.acidilactici* فقد بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 7.57 بعد مرور 21 يوماً من الخزن.

4- أختبرت العزلتان المحليتان IRQ12 و SNN12 كسلالتين واعدتين من خلال نتائج الاختبارات المذكورة آنفاً لإجراء عمليات التطهير عليها.

5- عُرضت العزلتان المحليتان IRQ12 *L.plantarum* و SNN12 *P.acidilactici* للتطهير بالأشعة فوق البنفسجية بتردد 254 nm وعلى مسافة 50 سم وبأوقات تعريض مختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60) ثانية.

6- أظهرت نتائج التطهير حدوث تغيرات كبيرة في طبيعة نمو البكتريا المعزولة المطفرة على وسط MRS agar.

7- درس مدى تأثير مدد التطهير المختلفة على الخواص العلاجية للعزلات المحلية وأظهرت نتائج الأختبارات ما يأتي:

أ- أظهرت بكتريا IRQ12 *L.plantarum* بجميع مدد التطهير المختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60s) ثباتية مقاومة عالية للأس الهيدروجيني المنخفض إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 ولجميع مدد التطهير المذكورة 9.46 و 9.25 و 9.23 و 9.2 و 8.36 على التوالي بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض، أما بالنسبة لمقاومة السلالة المطفرة SNN12 *P.acidilactici* للأس الهيدروجيني المنخفض (1.5) وبمدد التطهير المختلفة فقد بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل 6.14 و 6.3 و 5.2 و 3.61 و 1.77 على التوالي.

ب- أظهرت بكتريا IRQ12 *L.plantarum* بجميع مدد التطهير المختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60s) ثباتية تباين في لوغاريتم الأعداد الحية للبكتريا عند التعرض لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء، إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية/ مل عند تركيز 0.3% وبمدة تعرض ثلاث ساعات

9.04 و 9.32 و 9.07 و 8.65 و 8.79 على التوالي، أما بالنسبة لمقاومة السلالة المطفرة *P.acidilactici* SNN12 فكانت النتائج 9.57 و 6.2 و 5.78 و 4.85 و 4.14 على التوالي وبنفس الظروف.

ج- أظهرت نتائج فحص التضاد بين السلالة المطفرة *L.plantarum* IRQ12 بجميع مدد التطهير المختلفة وبين بكتريا بادئ اليوكرت *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* عدم وجود تضاد بين بكتريا بادئ اليوكرت والبكتريا المطفرة ، كذلك لم يظهر تضاد بين البكتريا المطفرة وبكتريا بادئ اليوكرت عدا مدة التطهير 60s والتي أظهرت تضاد مع كلا البادئين، أما فحص التضاد للسلالة المطفرة لبكتريا *P.acidilactici* SNN12 فقد ظهر تباين في فحص التضاد إذ بينت النتائج ظهور تضاد بين بكتريا *S.thermophilus* وبمدد التطهير 30s و 35s و 60s كما ظهر تضاد بين *L.bulgaricus* وبين مدد التطهير 35s و 60s، في حين ظهر تضاد بين مدد التطهير 35s و 60s وبكتريا *S.thermophilus* وكذلك ظهر تضاد بين المدة 30s و *L.bulgaricus*.

د- أظهرت نتائج انخفاض الكولسترول للسلالة المطفرة *L.plantarum* IRQ12 في وسط النمو MRS broth – EYE وبمدد التطهير المختلفة أن أقل كمية كولسترول كان في وسط العزلة المطفرة 25s إذ بلغ 0.35 ملغم كولسترول / مل وبنسبة انخفاض 92.3 % تلتها مدة التطهير 60s وبلغت 0.43 ملغم كولسترول / مل بنسبة انخفاض 90.6%، بينما أظهرت نتائج انخفاض الكولسترول للسلالة المطفرة *P.acidilactici* SNN12 أن أقل كمية كولسترول كانت عند مدة 20s بمقدار 0.622 ملغم كولسترول / مل وبنسبة انخفاض بلغت 86.4%.

ه- أظهرت نتائج تأثير مدد الخزن المبرد على عيوشية البكتريا المطفرة للسلالة *L.plantarum* IRQ12 بمدد التطهير المختلفة ارتفاعاً في الأعداد الحية إذ بلغ أعلى لوغاريتم للأعداد الحية للبكتريا/ مل بعد مرور 21 يوماً من الخزن بدرجة 4 °م 8.87 عند المدة 25s، بينما بلغ أعلى لوغاريتم للأعداد الحية/ مل للسلالة المطفرة *P.acidilactici* SNN12 8.81 عند المدة 25s بعد 21 يوماً من الخزن المبرد.

8- أظهرت نتائج مدى التطابق الجيني للسلالة *L.plantarum* IRQ12 قبل عملية التطهير وبعدها باستخدام تقنية PCR – RAPD أن التعرض لعملية التطهير أدت الى عدم وجود أي تطابق جيني بين جميع مدد التطهير للسلالة IRQ12 إذ أن كل زمن أظهر انفراداً بالتطهير الوراثي

وأن المدة 25s كانت أكثر الأوقات تأثيراً في شريط DNA وأدى الى حدوث طفرة كبيرة للعزلة بمقدار 2.52 بينما كان أقل تأثيراً للتطهير بالتشعيع (أقل بُعد وراثي) عند المدد 30s و 20s بمقدار 1.359.

9- أظهرت نتائج التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمر المصنع من السلالة *L.plantarum* IRQ12 قبل عملية التطهير ارتفاع قيم النكهة وحصلت على درجة 33 بعد 21 يوماً من الخزن المبرد بدرجة حرارة 4 °م كما أظهر التقييم الحسي للعزلة المطفرة المعتمد على الرائحة للمدة 25s حصولها على تقييم 33، بينما كان التقييم الحسي للمنتج المصنع من السلالة *P.acidilactici* SNN12 حصولها على درجة 30 بعد 21 يوماً من الخزن المبرد في حين حصلت مدد التطهير 20s و 25s و 30s على درجة 33 بعد 21 يوماً من الخزن المبرد.

10- أظهرت نتائج تقييم القوام والنسجة حصولها على تقييم مرتفع للسلالة *L.plantarum* IRQ12 قبل التطهير وبعدها ولجميع مدد التطهير باستثناء المدة 60s، أما بالنسبة للسلالة *P.acidilactici* SNN12 فقد حصلت على تقييم 21 بعد مرور 21 يوماً من الخزن المبرد وحصلت مدة التطهير 20s على أعلى تقييم وبلغ 25 بعد مرور 21 يوماً من الخزن.

11- أظهرت نتائج تقييم الحموضة للسلالة *L.plantarum* IRQ12 ارتفاع درجة تقييمها بعد مرور 14 و 21 يوماً من الخزن المبرد في حين ارتفعت نتائج تقييم الحموضة للسلالة *P.acidilactici* SNN12 بعد مرور 7 و 14 و 21 يوماً من الخزن.

12- أظهرت نتائج لوجاريتم الأعداد الحية/ مل للسلالة *L.plantarum* IRQ12 قبل عملية التطهير ارتفاعها بعد مرور 7 أيام من الخزن المبرد فيما حصلت على تقييم 12 بعد مرور 21 يوماً من الخزن وحصلت مدد التطهير 20s و 25s و 30s و 35s على تقييم 12 بعد مرور 21 يوماً من الخزن، بينما حصل تقييم السلالة *P.acidilactici* SNN12 قبل التطهير على درجة 9 بعد مرور 21 يوماً من الخزن فيما حصلت مدد التطهير 20s و 25s و 30s على درجة 12 بعد مرور 21 يوماً من الخزن.

13- حصل تقييم المظهر العام بدرجة تقييم (10) للمنتج اللبني المتخمر المصنع من البكتريا *L.plantarum* IRQ12 قبل التطهير على درجة تراوحت من 10 بعد يوم واحد الى 8 بعد مرور 21 يوماً من الخزن المبرد في حين كان أعلى تقييم للمظهر العام بدرجة (20) لمدة التطهير 20s و 30s وحصل على درجة 18 بعد 21 يوماً من الخزن، بينما حصل تقييم المظهر العام بدرجة تقييم (10) للسلالة *P.acidilactici* SNN12 قبل التطهير على درجة تراوحت بين 10 بعد يوم واحد

الى 7 بعد مرور 21 يوماً من الخزن فيما بلغ أعلى تقييم للمظهر العام بدرجة (20) لمدة التطفير 20s إذ حصل على درجة 17 بعد مرور 21 يوماً من الخزن.

1- المقدمة

تُعد المعززات الحيوية Probiotics من أقدم الكائنات الحية المجهرية التي تعامل معها الانسان وأستعملها لتحقيق غايات صحية وقد حظيت هذه البكتريا بمختلف أنواعها بدراسات متعددة للوقوف على أهميتها وتحسينها، وشهدت السنوات الأخيرة ارتفاعاً متزايداً في الطلب على البكتريا العلاجية من خلال ازدياد الطلب على استهلاك الأغذية الوظيفية وهذا يعود الى الوعي المتزايد من المستهلكين فيما يتعلق بفوائد البكتريا العلاجية على صحة الانسان (Jose *et al.*, 2015)، إذ أن مصطلح الأغذية الوظيفية ارتبط بصورة مباشرة ببكتريا حامض اللاكتيك العلاجية (Mitropoulou *et al.*, 2013)، فهي أغذية مكتملة تعتمد على البكتريا الحية مما تؤثر في صحة الانسان بنحو مفيد من خلال خلق حالة من التوازن المايكروبي في الأمعاء (Fuller, 1989). أعتمدت منتجات الألبان المتخمرة أساساً للحصول على البكتريا العلاجية لما لها من نكهة مميزة ومستساغة من المستهلكين فضلاً عن فوائدها الصحية نظراً لقيمتها الغذائية العالية إذ أن تناولها المنتظم يحسن من معدل النمو للفرد فهو غذاء متوازن يحتوي على العناصر الغذائية الموجودة في الحليب الى جانب محتواها من البكتريا العلاجية (Karagul *et al.*, 2004)، وهذا ما بينه الاستهلاك المنتظم لمنتجات الألبان المتخمرة المصنعة من بكتريا *Lactobacillus* من خلال قابليتها على إطالة العمر (Schrezenmeir and De Vrese, 2001)، تُعد بكتريا *Lactobacillus plantarum* واحدة من أهم أنواع المعززات الحيوية من الناحية الصحية فهي الى جانب أهميتها في تطبيقات الصناعات الغذائية كانتاج المنتجات اللبنية المتخمرة فلها دور مهم في الصناعات الدوائية من خلال المساهمة بشكل كبير في الطب البشري وبصورة آمنة ومن دون آثار جانبية، ومؤخراً تم استعمال بكتريا

L.plantarum في المجالات الطبية لعلاج العديد من الأمراض المزمنة والقلب والأوعية الدموية مثل مرض الزهايمر وباركيتسون ومرض السكري والسمنة والسرطان وارتفاع ضغط الدم واضطرابات الكبد وغيرها (Woo et al., 2014).

أما بكتريا *Pediococcus acidilactici* فهي واحدة من المعززات الحيوية والتي تستعمل على نطاق واسع في عمليات تخمير المنتجات الغذائية وبصورة محدودة في منتجات الألبان المتخمرة (Aydemir et al., 2015) فقد أشارت عدة دراسات الى أن بكتريا *Pediococcus* لم تأخذ دورها بصورة كبيرة في تصنيع منتجات الألبان المتخمرة ذلك أن عدداً من سلالات هذه البكتريا لايمكنها تخمير سكر اللاكتوز وبذلك فإن استعمالها محدود على مستوى تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة وأقتصر دورها في تصنيع الأجبان ولذلك ظهرت الحاجة الى ادخال الجانب الجيني لتمكين هذه البكتريا على تحليل سكر اللاكتوز وقد أجريت عدة دراسات لإخضاع هذه البكتريا في عمليات التحول البايولوجي لغرض إدخالها بشكل أوسع في الصناعات الغذائية (Kaur et al., 2014)، ويعود استخدام معظم سلالات البكتريا العلاجية في عمليات التصنيع الغذائي لقدرتها الفريدة لإضافة فوائد صحية محددة، وعليه يمكن الجمع بين الجانب البايولوجي الجزيئي على المستوى الجيني وبين الفحوص المختبرية البايوكيميائية لاختيار السلالة الأنسب أو تحسينها (Ahasan et al., 2015).

ولغرض الحصول على عزلات من البكتريا العلاجية *L.plantarum* و *P.acidilactici* قادرة على مقاومة الظروف القاسية للجهاز الهضمي وتحسين الحالة الصحية للجسم من ناحية العدد الحي للبكتريا وقابليتها في خفض الكوليسترول جاءت هذه الدراسة والتي هدفت الى:

1- عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus* من المخلل العراقي المحلي واجراء عمليات

الغريبة.

2- استعمال الجانب الجيني تشخيصاً تأكيدياً.

3- دراسة قابلية بكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* قيد الدراسة على مقاومة الأس

الهيدروجيني المنخفض وتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء وفحص التضاد مع بكتريا بادئ اللبن الرائب وقدرتها في خفض الكوليسترول قبل وبعد التطهير.

4- غرلة العزلات البكتيرية لإختيار العزلة الأكفأ كسلالة واعدة من حيث مقاومة الحموضة

ومقاومة التراكيز المختلفة لاملاح الصفراء وفحص التضاد وقدرتها على خفض الكوليسترول.

- 5- إجراء عملية التطهير بالأشعة فوق البنفسجية وعلى مدد تطهير مختلفة لمحاولة تحسين صفاتها والكشف عن مدى تأثير الأشعة بمدد مختلفة على التركيب الجيني والإنتاجية لبكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* قبل عملية التطهير وبعدها.
- 6- دراسة تأثير مدد الخزن المختلفة على عيوشية البكتريا قبل عملية التطهير وبعدها.
- 7- تصنيع منتج لبني متخمّر من البكتريا المعزولة *L.plantarum* و *P.acidilactici* وإجراء التقييم الحسي قبل عملية التطهير وبعدها.

2- استعراض المراجع

1-2 المعززات الحيوية Probiotics

1-1-2 نبذه تاريخية

مصطلح Probiotic مشتق من اللغة اليونانية والذي يعني من أجل الحياة، وبالفعل استخدمت منذ العصور القديمة من خلال ملاحظة الآثار الإيجابية للأطعمة المتخمرة في صحة الانسان، على الرغم من عدم معرفتهم آلية عمل هذا النوع من المنتجات (Neish,2009). المعززات الحيوية كائنات حية توجد في المكملات الغذائية تؤثر في صحة الفرد من خلال تحسين الخصائص المعوية بوساطة تكوين حالة من التوازن الميكروبي (Dixit et al., 2013). وقد تنتج مركبات مختلفة تشمل

الاحماض العضوية (اللاكتيك والخليك) والبكتيريوسينات فتخفض درجة الحموضة مؤثرة بذلك على البكتيريا المرضية التي تكون سامة (Tambekar and Bhutada, 2010).

وكانت المعززات الحيوية Probiotics يشار إليها في المؤلفات العلمية Lactic acid bacteria (LAB) وهي مجموعة من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام، غير مكونة للأبواغ، على شكل مكورات أو عصيات تنتج حامض اللاكتيك كنتاجاً نهائياً من تخمر الكربوهيدرات (Hutt et al., 2006)، المعززات الحيوية المتضمنة *Leuconostoc, Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Lactococcus* و *Bifidobacterium* موجودة في جميع أنحاء الجهاز الهضمي وتعد بكتيريا *Lactobacillus* وهي من الفلورا المعوية البارزة ولها دور مهم في خفض مرض عدم تحمل سكر اللاكتوز والتخفيف من الإسهال وخفض نسبة الكوليسترول الكلي في الدم والاستجابة المناعية والوقاية من السرطان (Pundir et al., 2013).

المعززات الحيوية لأتعد من المفاهيم الجديدة إذ ان مفهومها يعود منذ القدم والتي تحل فيها البكتيريا المفيدة محل البكتيريا الضارة (Ashraf, 2011)، إذ كان الناس في العادة يتناولون كميات كبيرة من المنتجات اللبنية المخمرة من دون أن يعرفوا العلاقة بين الصحة الجيدة ومعدل استهلاكهم للحليب المتخمر، في عام 1907 أجرى العالم ميتشنيكوف دراسة بعد ان لاحظ أن سكان منطقة القوقاز يستهلكون الالبان المتخمرة بكميات كبيرة مما يؤثر بصورة مباشرة على طول عمر الفرد وحينها لاحظ أن الحليب المتخمر يحتوي على بكتيريا أطلق عليها اسم *Lactobacillus bulgaricus* (Lilly and Stillwell, 1965). إن تناول الأغذية المخمرة الحاوية على بكتيريا المعززات الحيوية تزيد من مناعة الجسم وزيادة مقاومة الأورام الخبيثة والأمراض المعدية (Socol et al., 2010).

في السنوات الأخيرة وصف عدد من التقارير الآثار المفيدة وفي مختلف الجوانب لتأثير بكتيريا المعززات الحيوية على الأمراض مثل التهابات المعوية والتهاب الأمعاء ومرض مايسمي بـ (IBD) Inflammatory Bowel Disease والحساسية من خلال إضافة سلالات مختارة على بعض المنتجات الغذائية (Ljungh and Wadström, 2012).

2-1-2 أهمية المعززات الحيوية

تتضمن معايير اختيار المعززات الحيوية مراعاة مقاومتها للأحماض وأملاح الصفراء ومدى قدرتها على الالتصاق بجدار الأمعاء، وإنتاج المواد المضادة للميكروبات وتحفيز مناعة العائل

للاستجابة والقدرة على التأثير على الأنشطة الأيضية مثل إنتاج الفيتامينات وخفض الكوليسترول والتمثيل الغذائي والقدرة على تحمل سكر اللاكتوز ولذلك جرت عدة محاولات لعزل المعززات الحيوية من مصادر غذائية مختلفة وتقييم امكانياتها كمصدر للمعززات الحيوية (Savadago *et al.*, 2006).

ويقسم الجهاز الهضمي البشري عادة الى مناطق تشريحية وهي الفم والمريء والمعدة والأمعاء الدقيقة التي تتألف من الاثني عشر والصائم واللفائفي والأمعاء الغليظة التي تتكون من الاعور والقولون والمستقيم، وتعزى قدرة المعززات الحيوية في البقاء على قيد الحياة إلى قدرتها على مقاومة حموضة المعدة والأملاح الصفراوية في الاثني عشر ومن العوامل الرئيسية التي تؤثر على بقاء المعززات الحيوية في الجهاز الهضمي هي انخفاض pH المعدة واملاح الصفراء وتمعج الأمعاء و الانزيمات الهاضمة المختلفة الموجودة في كل أجزاء الجهاز الهضمي (Hoier, 1992; Jakubczyk *et al.*, 2000; Elli *et al.*, 2006) وتتعرض المعززات الحيوية في الجهاز الهضمي الى عدد من الانزيمات منها Glucoamylase, Protease, Oligo-1,6- Saccharases, Maltases, Lactases, Lipases, Glucosidase والاملاح الصفراوية التي يفرزها الكبد (Gawęcki *et al.*, 1998; Michajlik and Ramotowski, 2003)،

يتفق العلماء ان سلالات بكتريا المعززات الحيوية يجب أن تكون قادرة على البقاء حية عبر مرورها في الوسط الحامضي في المعدة ومقاومة املاح الصفراء في الأمعاء الدقيقة لتكون قادرة على ممارسة أثرها المفيد في الأمعاء الدقيقة والقولون السفلي (Mottet and Michetti, 2005). ويتم تحقيق أفضل النتائج إذا كانت الكائنات المجهرية تستعمر الطبقة المخاطية في الأمعاء لأنها يمكن أن تؤثر على جهاز المناعة في الأمعاء، وإزالة البكتريا المعوية المسببة للأمراض وتوفير المواد المضادة للأكسدة والعوامل التي تقلل من التداخلات أثناء التطهير antimutagens (Di Caro *et al.*, 2005).

2-1-3 بعض صفات المعززات الحيوية

من الصفات الواجب توافرها في المعززات الحيوية أنها غير سامة أو الممرضة وهي من السلالات المستقرة وراثياً ولها جدوى اقتصادية عالية كما أن خصائصها الحسية جيدة ومقاومة للبكتريوفاج ويمكن انتاجها على نطاق واسع، أما بالنسبة لخصائصها الفسيولوجية فلها القدرة على

مقاومة حامض المعدة والعصارة الصفراوية والالتصاق بالغشاء المخاطي للأمعاء، أما الخصائص الوظيفية لها فهي تزيد من مناعة الجسم وزيادة النشاط التضادي المعوي للجهاز الهضمي والتقليل من البكتريا المسببة للأمراض مثل بكتريا *Helicobacter pylori*، *Candida albicans*، وخفض مستوى الكولسترول والقدرة على تحلل اللاكتوز ومقاومة للطفرات الوراثية ومضادة للسرطان (Vasiljevic and Shah, 2008). ويوضح الجدول (1-2) الفائدة الصحية لبكتريا المعززات الحيوية والآليات المقترحة لعملها داخل الجسم.

جدول (1-2) الفوائد الصحية للمعززات الحيوية وبعض الآليات المقترحة لفعالها الصحي

ت	الفائدة الصحية	الميكانيكية المقترحة
-1	الوقاية من السرطان	تنشيط المواد المشجعة على نمو الخلايا السرطانية، وتنشيط المركبات المسببة للطفرات الوراثية، ومنع إنتاج procarcinogens من البكتريا
-2	التهابات الأمعاء (Crohn's disease)، التهاب القولون التقرحي، التهابات الأمعاء المزمنة	تحسين الاستجابة المناعية وإعادة تشكيل المحتوى البكتيري للأمعاء

<p>تمثيل الكولسترول بواسطة الخلايا البكتيرية وإعادة ربط أملاح الصفراء بالأحماض المتحللة الناتجة من البكتريا ويؤثر في ارتباط الكولسترول بجدران الخلايا البكتيرية وانخفاض تخليق الكولسترول الكبدي</p>	<p>الوقاية من أمراض القلب والتأثير في مستويات الكولسترول بالدم</p>	<p>-3</p>
<p>إعادة تشكيل المحتوى الميكروبي للأمعاء وإنتاج المواد المضادة للميكروبات والتنافس على مواقع الالتصاق وتحفيز افراز المواد المخاطية</p>	<p>الوقاية / التخفيف من حدة الاسهال</p>	<p>-4</p>

(Leroy *et al.*, 2008)

2-2 الصفات الشكلية والفسلجية للمعززات الحيوية

2-2-1 الصفات الشكلية والفسلجية لجنس *Lactobacilli*:

يُعد جنس *Lactobacillus* موجب التفاعل لصبغة كرام، عسوية الى شبه كروية منتظمة الشكل، مفردة أو ثنائية أو بشكل سلاسل قصيرة، غير متحركة، غير مكونة للأبواغ، تبلغ أبعادها 0.5 $\times 10^{-1}$ مايكرومتر مستعمراتها محدبة الشكل لاهوائية اختياريًا أو متحملة لوجود كميات قليلة من الهواء (Microaerophilic) ويشجع نموها وجود غاز CO₂. غير مختزلة للنترات وغير مسيلة للجيلاتين وغير منتجة لإنزيم الكاتليز وتتراوح درجة الحرارة المثلى لنموها ما بين 30 - 40 °م، واسعة الانتشار في الطبيعة ولأسيماً في الحيوانات والخضراوات ومنتجاتها، كما توجد في القناة الهضمية للإنسان والطيور والحيوانات اللبونة وفي مهبل هذه الحيوانات، وقلما تكون ممرضة، تحتوي على نسب منخفضة من القواعد النيتروجينية الكوانين Guanine والساييتوسين Cytosine في الجينوم الخاص بها، تصنيفياً جنس *Lactobacillus* يضم مجموعة متنوعة من بكتريا المعززات الحيوية إذ يوجد منه أكثر من 150 نوعاً (Felis and Dellaglio, 2007; Holt and Krieg 1986).

بين **Holt and Krieg (1986)** أن بكتريا جنس *Lactobacilli* قسمت إلى ثلاث مجاميع رئيسية، المجموعة الأولى البكتريا المتجانسة التخمر إجباراً *Obligately homofermentative* والتي تخمر السكريات السداسية لتنتج حامض اللاكتيك بواسطة المسار الأيضي *Embden-meyerhof*، المجموعة الثانية هي البكتريا غير متجانسة التخمر اختياريًا *Facultatively heterofermentative* والتي تخمر السكريات الخماسية بواسطة *Phosphoketolase* لتنتج حامضي اللاكتيك والخليك، المجموعة الثالثة هي البكتريا غير متجانسة التخمر إجباراً *Obligately heterofermentative* والتي تخمر السكريات السداسية لتنتج حامضي اللاكتيك والخليك وغاز ثاني أكسيد الكربون عن طريق المسار الأيضي *Phosphoketolase*. تحتاج بكتريا *Lactobacillus* إلى متطلبات غذائية معقدة لنموها إذ تحتاج إلى مدى واسع من المركبات العضوية واللاعضوية وتتمثل هذه المتطلبات بالأحماض الامينية والأحماض الدهنية والكربوهيدرات والبيبتيدات والفيتامينات والأملاح والنيوكلووتيدات (**Narendranath et al. 1997 ; Stiles and Holzapfel, 1997**) .

وسط *De-Man Rogosa and Sharpe (MRS)* الذي يُعد وسطاً أساسياً لنمو المعززات الحيوية يحتوي على مستخلص لحوم الأبقار ومستخلص الخميرة مصدراً للنيتروجين والفيتامينات لتوفير متطلبات النمو وسكر العنب مصدراً للكربون وسترات الامونيوم عاملاً انتقائياً وخلات الصوديوم عاملاً مثبّطاً وانتقائياً فضلاً عن كونها مصدراً للطاقة وفوسفات البوتاسيوم محلولاً منظماً وتوفر كبريتات المغنيسيوم وكبريتات المنغنيز الكاتيونات *Cations* المستخدمة في التمثيل الغذائي، وتسهل *Polysorbate 80* إمتصاص المواد الغذائية للعصيات اللبنية (**deMan et al., 1960,) (Vanderzant and Splittstoesser, 1992; Murry et al., 1995**

وذكر **Jousimies et al (2002)** ان وسط بكتريا المعززات الحيوية يحتوي على معقد *sorbitan monooleate* مصدراً للأحماض الدهنية كما ان احتواء الوسط على خلات الصوديوم وسترات الامونيوم يمنع نمو الفلورا الطبيعية مثل البكتريا السالبة لصبغة كرام والفلورا الفموية والفطريات.

2-2-2 الصفات الشكلية والفسلجية لجنس *Pediococci*

بكتريا *Pediococcus* كروية الشكل موجبة لصبغة كرام، توجد بصورة مزدوجة غالباً أو على شكل تجمعات (Simpson *et al.*, 2002; Klaenhammer, 1993)، أبعادها 22 µm (Balgir *et al.*, 2013) وغير مكونة للسبورات (Tserovska *et al.*, 2002) وغير متحركة (Facklam and Elliott, 1995) لاهوائية اختيارية (Lin, 2006) من نوع معتدلة الحرارة و من النوع التي تحتاج للمتطلبات الدنيا من الاوكسجين، سالبة لفحص الكاتليز (Mandal *et al.*, 2008) وعلى الرغم من أنها لاهوائية فهي تنمو في الظروف الهوائية (Ray, 1995)، تنمو في الوسط الزرعي MRS (Barreau *et al.*, 2012) مستعمراتها أكبر من 0.1 ملليمتر، دائرية الشكل ذات لون أبيض حليبي وسطحية الشكل وقوامها مخاطي لماع Abbasiliasi *et al.*, 2012 تنتج حامض اللاكتيك وغير مسيلة للجيلاتين (Ribeiro *et al.*, 2014)، غير مرضية (Mastro *et al.*, 1990)، تنتمي لعائلة Lactobacillaceae فيما ترتبط ارتباطاً وثيقاً بجنس *Lactobacillus* (Haakensen *et al.*, 2009)، تسلك مسار Embden-meyerhof لتحويل الكلوكوز الى حامض البايروفك (Collins *et al.*, 1990; Garvie, 1986) يشمل جنس *Pediococcus* ثمانية أنواع من أهمها *P.acidilactici* و *P.pentosaceus* (Knorr, 1998)، كما ان لها القابلية على انتاج pediocin كـبكتريوسين مضاد تجاه البكتريا المرضية في اثناء التصنيع الغذائي (Dina, 2013) وتتدخل في عملية انضاج الجبن (Bhowmik and Marth, 1990) وتحسين صفات جبن الشيدر والموزريلا (Bhowmik *et al.*, 1990) وعندما تملك بعض السلالات القدرة على تحليل اللاكتوز فانها تساهم في اعطاء الصفات الجيدة في منتجات الألبان المتخمرة (Caldwell *et al.*, 1996).

2-3 خصائص المعززات الحيوية

2-3-1 بكتريا *Lactobacillus plantarum*:

بكتريا *L.plantarum* واحدة من أهم الأنواع البكتيرية من المعززات الحيوية والتي تعيش بصورة طبيعية في لعاب الانسان والجهاز الهضمي، لها دور في تخمر المادة الغذائية، تستعمل بشكل متزايد في التطبيقات الغذائية العلاجية. تمتاز بانها اختيارية التهوية، فعند وجود الاوكسجين يمكنها تحويله الى بيروكسيد الهيدروجين وتعتمد على المنغنيز بذلك، أما في غياب الاوكسجين فتكون قادرة

على تخمير السكريات الى حامض اللاكتيك أو الكحول (غير متجانسة التخمر) (Nissen et al., 2009).

2-1-3-2 أهم ميزات بكتريا *Lactobacillus plantarum* :

• بكتريا *L. plantarum* لديها جينوم Genome كبير نسبياً بالمقارنة مع غيرها من المعززات الحيوية الأخرى وهذا يدل على امتلاكها قدرة عالية على التكيف مع ظروف بيئية مختلفة (Kleerebezem et al. 2003).

• ذات معدلات نمو مرتفعة بشرط توفر المغنيز في الوسط، والذي عادة ما يكون متراكماً بمستويات عالية بين الخلايا (Archibald and Fridovich, 1981b)، إذ يوفر المغنيز الحماية لبكتريا *L. plantarum* ضد سمية الاوكسجين للحد من الجذور الحرة للأوكسجين والتي مصدرها بيروكسيد الهيدروجين (Archibald and Fridovich, 1981a)، الذي يتحول بدوره الى ماء من خلال pseudocatalase بوساطة المغنيز عاملاً مساعداً (Kono and Fridovich, 1983a,b).

• لديها قدرة عالية على تحمل انخفاض الأس الهيدروجيني وكثيراً ما تهيمن بصورة تلقائية في الأغذية اللبنية المتخمرة إذ تكون درجة الحموضة النهائية عادة أقل من 4، فضلاً عن قدرتها على تجاوز الظروف الحامضية للمعدة (Johansson et al., 1993).

• قدرة *L. plantarum* العالية على التمثيل الغذائي وجعلها جديرة الاهتمام في التطبيقات الصناعية ويتم تسويق بعض السلالات بادناً أو معززات حيوية صيدلانية (Luxanani, 2009; Molin, 2003; Weinberg et al., 2003).

2-1-3-2 الخصائص العلاجية لبكتريا *Lactobacillus plantarum*

درس (Van Baarlen et al., 2009) تأثير تحفيز بكتريا *L. plantarum* WCFS1 على الجهاز المناعي للبالغين عن طريق تناول جرعتين منها يومياً، ثم أخذت وخزات من الغشاء المخاطي المعوي للأنتي عشر وتم تحليلها جينياً لبيان مدى مقاومتها المناعية ومقارنتها قبل تناول الجرعات وقد ظهر وجود علاقة بين بكتريا *L. plantarum* وعلم وظائف الأعضاء المناعي للإنسان.

كما أظهرت بكتريا *L. plantarum* DSM 6595 مقاومة كبيرة للظروف القاسية للجهاز الهضمي (Johansson et al., 1993) إذ ثبت أن لها نشاطاً كبيراً ضد البكتريا المرضية أو المسببة

لأمراض الانتهازية مثل *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* (Jacobsen et al., 1999).

ذكر **Pathmakanthan et al., (1999)** إن سلالة بكتريا *L.plantarum* 299 لها القدرة على الحد من إنتاج cytokines (السايوتوكين: بروتين أو بيتيد متعدد شبيهه بالنواقل العصبية له قابلية الاتصال بين الخلايا) عند التعرض للإصابة بالأمراض المعوية. اذ لوحظ في عينة عشوائية لعدد من المرضى المصابين بالتهاب البنكرياس الحاد انخفاض في أعراض الالتهاب والحد من تسمم البنكرياس فضلاً تقليل العلاج بالتدخل الجراحي بعد تناول مكملات غذائية مدعمة ببكتريا *L.plantarum* 299 (Olah et al., 2002)، كما أشار **Raves et al., (2002)** الى إختزال الوقت اللازم لعلاج المرضى الذين استخدموا المضادات الحيوية بعد اجراء عملية جراحية لزراعة الكبد فضلاً عن إنخفاض في شدة الالتهاب نتيجة تناولهم غذاءاً مدعماً ببكتريا *L.plantarum* 299.

تتميز بكتريا *L.plantarum* بانها يمكن أن تعيش في pH المعدة المنخفض والاثني عشري القاعدي ومقاومة أملاح الصفراء في الجزء العلوي للأمعاء الدقيقة، كما ان لها القابلية على الالتصاق في الأغشية المخاطية للأمعاء الدقيقة والقولون، ولها دور كبير في علاج حالات القولون العصبي وأشارت الدراسات الى قابليتها في الحد من ألم إنتفاخ البطن (Bixquert, 2009) فضلاً عن ذلك ذكر **Nissen et al., (2009)** أن وجود *L.plantarum* ممكن أن تزيد من العمليات الهضمية ونشاط الفعاليات الأيضية للخلايا المعوية وزيادة الاستجابة المناعية، وبين **Lee et al., (2008)** أن بكتريا *L.plantarum* قامت بتنشيط نمو البكتريا المرضية في القناة الهضمية كبكتريا القولون و *Staphylococcus aureus* و *Salmonella* بنسبة 69.3، 75.9، 93.4% على التوالي، وفي اختبار قام به **Rhee and Park (2000)** لمعرفة قدرة بكتريا *L.plantarum* على الوقاية من الامراض السرطانية باجراء طفرة Ames و SOS Chrome، لعزلة مصدرها الملفوف المنقع بالماء المملح والذي لاحظا فيه تأثيرها المضاد للطفرات السرطانية والاورام الصلبة ضد الافلاتوكسين كما أظهرت تأثيرها القوي ضد N-methyl-N- nitrosoguanidine و 4-Nitroquinoline-1-oxide، وتعود فعالية *L.plantarum* الى وجود سلاسل من السكريات المتعددة من حامض الميوراميك في الخلية البكتيرية.

بين **Naruszewicz et al., (2002)** أن بكتريا *L.plantarum* تؤدي الى انخفاض خطر الإصابة بأمراض القلب والاعوية الدموية، كما يمكن أن تكون عاملاً واقياً من الإصابة بمرض تصلب الشرايين، ففي دراسة قام بها لإنتاج مكملات غذائية تحتوي على بكتريا *L.plantarum* لاحظ انخفاض تركيزات الفيبيرينوجين وكوليسترول الـ (LDL) Low Density Lipoprotein لدى شريحة من المدخنين وتوصل الى أن زيادة نسبة البكتريا العلاجية أدت الى انخفاض تركيزات الفيبيرينوجين وكوليسترول الـ LDL بنسبة وصلت الى 21% مقارنة مع دراسة سابقة سجلت نسبة 13%.

أقترح **Grill et al., (2000)** أن بكتريا المعززات الحيوية لها القدرة على إمتصاص الكوليسترول وبذلك يمنع امتصاصه من قبل الدوران المعدي الكبدي. من الممكن لبكتريا *L.plantarum* أن يكون لها دور مهم في الحد من افرازات الاوكزالات البولية والتي تشكل اوكزالات الكالسيوم CaC_2O_4 (المكون الرئيس لحصى الكلى 75% منها) والتي تسبب تكوين الحصى بالنسبة للأشخاص الذين يعانون من فرط اوكزالات البول، ويتم ذلك من خلال قيام بكتريا *L.plantarum* المهندسة وراثياً بإنتاج مركب Oxalate decarboxylase الذي يعمل على خفض نسبة امتصاص الاوكزالات في الامعاء فضلاً عن إنتاج الاوكزالات بشكل مغاير **(Sasikumar et al., 2014)**.

أما تأثير بكتريا *L.plantarum* على الاسهال فقد قام **Rahayu et al., (2013)** بتقدير فعالية سلالتين من المعززات الحيوية *L.plantarum* 2C12 و *L.fermentum* 2B4 تجاه فئران مصابة بإسهال شديد سببه اصابتها ببكتريا القولون وبالتحديد Enterpathgenic *E.coli* (EPEC) إذ تمت تغذيتها على متخمّر لبني يحتوي على البكتريا المذكورة آنفاً، ولوحظ بعد مدة من تغذيتها شفاءها التام من الاسهال وكان البراز طبيعياً.

2-3-2 بكتريا *Pediococcus acidilactici*

مستعمراتها بيضاء أو رمادية، قطرها 1-2 ملليمتر، تنتج الأمونيا من الأرجنين، تتحمل درجات حرارة 50°م في حين وجد أن بإمكانها أن تبقى حية عند حرارة تصل حتى 65°م، تتحمل ملوحة من 6.5 - 10% (Lin 2006., Tserovska et al., 2002; Riebel and Washington, 1990)، تنمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني والضغط الازموزي (Mizutani et al., 2007) إذ بين **(Daeschel and Klaenhaemmer, 1985)** أنها ممكن أن تعيش في درجات

حموضة منخفضة جداً وتخمّر مجموعة واسعة من الكربوهيدرات كالكلوكوز و الكالاكتوز و الفركتوز بينما لايمكنها تخمير اللاكتوز (Abbasiliasi et al., 2012).

ذكر (Ray 1995) أنها تخمّر سكر الكلوكوز و الرايبوز و الزايلوز و الفركتوز و الكالاكتوز وعدد قليل من السلالات غير قادرة على تخمير اللاكتوز والسكروز و المالتوز إذ أن هناك تبايناً في مقدرتها على تخمير الكربوهيدرات ولتحقيق أفضل النتائج فقد قام باحثون يابانيون بنقل جين *lacI* عن طريق الاقتران بين بكتريا *Lactococcus lactis* و *P.acidilactici* (Morita et al., 1991) وهي تُعد من الأنواع الآمنة (Knorr, 1998) غير سامة وغير مرضية (Guerra et al., 2006) وقد استعملت على نطاق واسع في تخمير الخضروات واللحوم والعجين وعصائر الفاكهة ومنتجات الألبان والسيالج (Fitzsimons et al., 1999; Cai et al., 1999; Nigatu et al., 1998; Sandholm et al., 1993)

2-3-2-1 الخصائص العلاجية لبكتريا *Pediococcus acidilactici*

وذكر Mathys et al., 2007 أن *P.acidilactici* تستعمل على نطاق واسع في تخمير المنتجات الغذائية مثل الخضار اللحم من خلال انتاج الأحماض العضوية ولها خصائص مثيرة للاهتمام من خلال قدرتها على انتاج الببتيدات ومضادات البكتريا Pediocin ضد antilisterial ومضادات المايكروبيات (Papagianni and Anastasiadou, 2009) فضلاً عن نشاطها التثبيطي للمسببات المرضية من خلال الحموضة وبيروكسيد الهيدروجين (Ribeiro et al., 2014)، فهي من الأنواع العلاجية الواعدة للحيوان والانسان على الرغم من الدراسات المحدودة عليها (Barros et al., 2001).

بين Lin, (2006) أن بكتريا *P.acidilactici* لديها مجموعة واسعة من الفوائد الصحية المحتملة في صحة الانسان التي لاتزال قيد الدراسة على الرغم من استعمالها بشكل مرافق مع البكتريا العلاجية كحالات الإمساك والاسهال والتخفيف من الاجهاد وتعزيز الاستجابة المناعية كما أظهرت الدراسات أن بكتريا *P.acidilactici* تمنع نمو الأحياء المجهرية المرضية في الأمعاء الدقيقة مثل *Shigella spp* و *Salmonella spp* و *Clostridium difficile* و *E.coli*.

كما نكر **Dalloul et al., (2006) ; Ennahar and Deschamps,(2000)** ;
Lee et al., (2007) أن من ضمن الفوائد العلاجية المحتملة لبكتريا *P.acidilactici* استعمالها
كأدوية علاجية بديلة ضد مسببات الأمراض الطفيلية المعدية في الدواجن. كما بين **Mättö et al.,**
2006 أن معدل بقاء المعززات الحيوية خلال العبور المعوي يتراوح بين 10 – 40% وعليه فإن بقاء
بكتريا *P.acidilactici* سواء بمفردها أو بصورة مختلطة مع *L.acidophilus* كان أعلى من الحد
الطبيعي **(Ribeiro et al., 2014)**، كما أن وجودها في بعض منتجات النقائق بوصفها بادئ
لإضافة النكهة والملح وتزيد من القيمة الغذائية للمنتج ويحسن من قابلية هضم المواد الغذائية
(Mizutani et al., 2007).

وبين **Devlieghere et al., (2004) ; Cotter et al., (2005) ; Drider et al.,**
(2006) أن بكتريا *P.acidilactici* بمثابة أوساط وقائية تمنع نمو المسببات المرضية التي تنقلها
الأغذية مثل *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* لذلك فوجودها يعزز
من إطالة مدة حفظ المنتج وتعزيز سلامة المنتجات الغذائية.

وبشكل عام فقد ذكر **Papagianni and Anastasiadou, (2009)** أن الدراسات على
بكتريا *P.acidilactici* لاتزال قليلة ومع ذلك تبدو الفائدة في تزايد مستمر سواء في الأوساط العلمية أو
الصناعية.

2-4 مصادر العزل

2-4-1 مصادر عزل بكتريا *Lactobacillus plantarum*:

تم عزلها لأول مرة من لعاب الانسان، كما وجدت في بعض النباتات والجهاز الهضمي
للإنسان والحيوان **(Frias, 2008 ; Drassar and Barrow, 1985)**، وخليط من الفواكه
والخضروات المتخمرة **(Huang et al., 2013a)**، وبراز الانسان **(Bujalance et al., 2006)**،
ويوضح جدول (2-2) بعض مصادر عزل بكتريا *L.plantarum*.

جدول (2-2) يوضح بعض مصادر عزل بكتريا *Lactobacillus plantarum*

المنتج	مصدر العزل
زيتون	منتجات نباتية
حبوب الكاكاو	
الكاسافا	
مخلل الלהانة	
النبيد	
جبين السيلتون	منتجات لبنية
جين الفتا	

جبن الريكوتا	منتجات لحوم
الصوصج المتخمّر المجفف	
الصوصج الإيطالي المتخمّر	

(De Vries *et al.*, 2005)

2-4-2 مصادر عزل بكتريا *Pediococcus acidilactici*

تم عزلها من الخضار ومنتجات الألبان المتخمرة واللحوم (Barros *et al.*, 2001) والقناة الهضمية بما في ذلك تجويف الفم والجهاز الهضمي (Danielsen *et al.*, 2007)، كما عزلت من براز الأطفال الرضع ومن براز الانسان لذلك فمن غير المعروف الى أي مدى تمتد هذه السلالات في البيئة المعوية للإنسان ومدى مساهمتها في التوازن البيئي الميكروبي للقناة الهضمية (Mathys *et al.*, 2007)، وعثر عليها في الحليب واللحمة ومنتجات اللحوم كالتفانق الجافة (Anastasiadou *et al.*, 2008; Sire *et al.*, 1992).

2-5 أهمية المعززات الحيوية في خفض نسبة الكوليسترول

تتوقع منظمة الصحة العالمية (WHO) بحلول عام 2020 أن 40% من وفيات سكان العالم ستكون بسبب أمراض تتعلق بالقلب والأوعية الدموية (Aboderin *et al.*, 2002).
 قد أظهرت الدراسات أن الكوليسترول يُعد السبب الرئيس لأمراض القلب وتصلب الشرايين واستناداً لدراسات سابقة فقد أكد (Tomaro *et al.*, 2014) وجود ارتباط بين الكوليسترول وأمراض القلب والأوعية الدموية، وعادة ما يكون العلاج باستخدام المستحضرات الدوائية له أعراض جانبية أثناء تقليل الضرر الذي يسببه الكوليسترول على الجسم، ولذلك اتجهت الحاجة الى طرائق علاجية باعتماد المعززات الحيوية لخفض مستويات الكوليسترول في الدم والحد من الدهون (Ooi, 2010).
 وعد عدد من الباحثين ومنهم الزهيري (1992) إن الكوليسترول هو السبب الرئيس لمرض تصلب الشرايين لما يسببه هذا المركب من أمراض القلب التاجية Coronary Heart Disease

(CHD) ولاحظ وجود نسبة كبيرة من الكوليسترول ضمن المواد المترسبة على جدران الشرايين ولا سيما في الخثرة إذ يشكل الكوليسترول 70% من مكونات الخلايا المبطنة للجدار الشرياني فضلا عن الكالسيوم والكاربوهيدرات.

أكد **Kan-Zhi et al., (2002)** أن تقليل مستوى الكوليسترول في الدم بنسبة 1% يؤدي الى تقليل مرض الإصابة بأمراض القلب وبنسبة 2-3%. وأشارت عدة دراسات الى أن أنواع البكتريا الملبنة لها القدرة على خفض الكوليسترول عن طريق عدة آليات منها deconjugation **(Liong and Shah, 2005a)**، ويتم ذلك من خلال قدرة المعززات الحيوية على امتصاص الكوليسترول وخفض مستواه فضلاً عن قدرتها على إنتاج حامض الفريوليك **(Tomaro et al., 2012a 2012b)** والذي يمكن ان يمنع تكوين HMG-CoA في الكبد وتعزيز إنتاج الستيرويدات الحامضية **(Kim et al, 2003)**، فقد وجد **Tomaro et al., (2014)** أن بكتريا *L.plantarum* لها القدرة على تمثيل 28.3% من الكوليسترول عند وجوده في الوسط بمقدار 100 مايكروغرام 1 مل خلال 24 ساعة، أما في وسط من MRS يحتوي على السوائل المعوية بمقدار 100 مايكروغرام 1 مل من الكوليسترول فقد كان معدل التمثيل 20.5%.

في دراسة أجراها **Liong and Shah (2005a)** للتحري عن مقدرة 11 سلالة من جنس *Lactobacillus* في تقليل الكوليسترول في الوسط الزراعي، وجد أن لهذه السلالات القدرة على تقليل الكوليسترول بمستويات تراوحت بين 12.03 – 32.25 ملغم/سم³.

وأوضحت **إبراهيم (2009)** أن التجريب الفموي للجرذان المختبرية بالمنتج المتخمر والحاوي على الخلايا cfu/ml من العزلة المحلية (*L.salivarius* (LP5) وبواقع 10⁹ كان له تأثير ايجابي في خفض النسبة المئوية للكوليسترول الكلي وقيم البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL) والكليسيريدات الثلاثية مع ارتفاع معنوي في قيم البروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL).

ذكر **Ataie et al., (2009)** أن المعززات الحيوية لها دور في خفض نسبة الكوليسترول بشكل غير مباشر في الدم من خلال عملية Deconjugation من الكوليسترول الى أحماض الصفراء، إذ بين أن اللبن المتخمر الحاوي على سلالتين من المعززات الحيوية كان لها دور في خفض نسبة الكوليسترول بمقدار 32% وخفض 35% من LDL بسبب تثبيط إنتاج HMG-CoA reductase، وفي دراسة اجراها **Mitchell et al., (2004)** لإنتاج كبسولة

(microencapsulated) تحتوي على بكتريا *L.plantarum* 80 PCBH1 المهندسة وراثياً أثبتت كفاءتها في كسر وإزالة الاحماض الصفراوية وقد ثبتت كأساس لاستخدامها في خفض الكولسترول في مصل الدم إذ بينت النتائج أن المغلف Lp80 قادر على تثبيط فعالية الحامض المرافق للأحماض الصفراوية Glycodeoxycholic Acid (GDCA) و Taurodeoxycholic Acid (TDCA) المنشط لتكوين الاحماض الصفراوية، مما خفض الكولسترول وحسب كمية الجرعة المتناولة، وبين **De Smet et al., (1994)** اعتماداً على البيانات الفسيولوجية للترابط بين تمثيل الكولسترول واملاح الصفراء إذ حسبت فيها الكميات على أساس معدل التخليق اليومي الواقعي لكمية أملاح الصفراء ومدى مقاومة بكتريا *L.plantarum* الموجودة في منتج الزبادي، ولوحظ خلالها انخفاض كبير في نسبة الكولسترول موضعاً إمكانية اعتماد المنتج علاجاً بيولوجياً بديلاً للمرضى الذين يعانون من فرط كولسترول الدم الحاد.

أما بالنسبة لبكتريا *Pediococcus* فقد ذكر **Moon et al., (2014)** تأثير سلالتين من بكتريا *P.acidilactici* M76, DSM20284 على مستوى الكولسترول إذ بلغ الانخفاض في كولسترول مصل الدم 12 و 2.4% على التوالي، أما انخفاض مستوى الكولسترول في الكبد فقد بلغ 30.5 و 14.9% على التوالي.

2-6 أملاح الصفراء Bile Salt:

تُفرز املاح الصفراء عادة في الاثني عشر (والصفراء أو عُصارة المرارة (bile) أحد السوائل التي تفرز داخل الجسم، وهو سائل قاعدي سميك مر الطعم أصفر اللون يتم تحضيره في الكبد ويجمع في قناة المرارة ويخزن في كيس المرارة التي تفرغ هذا السائل في الإثني عشر في أثناء دخول الطعام إليه ويسهم في هضم المأكولات الدهنية، كما انها بمثابة المنظفات التي تطري وتساعد على جعل الدهون كمستحلب وتزويد الجسم بالفيتامينات الذائبة بالدهون). وعند مرورها مع الغذاء عبر الصائم في الأمعاء الدقيقة فإن معظم املاح الصفراء يتم امتصاصها عبر الوريد البابي الى الكبد، أما الكمية التي لم تمتص فإنها تطرح الى خارج الجسم عن طريق البراز **(Vlahcevic et al., 1990; Lambert et al., 2008)**.

ووضح **Begley et al., (2006)** الى قابلية المعززات الحيوية على تحلل أملاح الصفراء بواسطة افراز انزيم Bile Salt Hydrolase (BSH) وبالتالي يؤدي الى طرح من جزء من أملاح

الصفراء خارج الجسم عن طريق البراز، وبما أن الكولسترول هو المادة الأساسية المكونة لأملاح الصفراء فسوف تحدث زيادة في الطلب على الكولسترول لتخليق الاحماض الصفراوية تعويضاً عن الجزء المطروح خارج الجسم وبذلك تؤدي هذه العملية الى خفض مستوى الكولسترول في الدم (Liong and Shah, 2005b; Klaver and Van der Meer, 1993).

إن نشاط انزيم BSH تم الكشف عنه فقط في المعززات الحيوية (Guo et al., 2011) ولاسيما في عدة أجناس من البكتريا العلاجية *Bacteroides spp*، *Begley et al.*،) *Lactobacillus spp*، *Bifidobacterium spp*، *Enterococcus spp* (Kumar et al., 2007، 2005)، وكثيراً ما وجد نشاط انزيم BSH في بعض السلالات المعزولة من الأمعاء أو براز الثدييات والتي تُعد البيئة الطبيعية الغنية بها (Kim Tanaka et la ., 1999) (Yildiz et al., 2011 ; and Lee, 2005; الانزيم في الكائنات الدقيقة المعزولة من بعض الحبوب والمخللات وينابيع المياه الساخنة والحليب المتخمّر (Vizoso et al., 2006; Sridevi et al., 2009; Dong et al., 2012; Huang et al., 2013b).

وقد أجريت دراسة موسعة حول نشاط BSH في المعززات الحيوية والتي اشتملت على أكثر من 300 نوع من المعززات الحيوية وسلالات من *Lactobacillus Spp* (Tanaka et la ., 1999) كما وجد ان البكتريا العصوية *Lactobacilli* لها دوراً رئيس في التحلل المائي لأملاح الصفراء في الفئران، وبلغ نشاطها 74 و 86% من إجمالي نشاط BSH في الأعور واللفائفي Cecum and Ileum على التوالي (Tannock et al., 1989).

وقد ذكر (Argyri et al ., (2013) قدرة سلالات بكتريا *L. plantarum* B282, E45, (E10, E73, E79) على مقاومة أملاح الصفراء لمدة 4 ساعات أو أكثر مع الاحتفاظ بحيويتها مقارنة مع الانخفاض الضئيل في العدد الحيوي لها.

في حين تمتاز بكتريا *P.acidilactici* بقدرتها على مقاومة أملاح الصفراء عند معاملتها في ظروف مشابهة للأمعاء لمدة 3 – 6 دقيقة (Gowri and Ghosh, 2010). كما أن مقاومة بكتريا *P.acidilactici* لأملاح الصفراء ترتبط بقوة بوجود انزيم BSH وهذا الانزيم يمتاز بتأثيره المثبط من خلال تشجيع تحلل Glycine و Taurine المرافق لأملاح الصفراء (Yin et al., 2011).

2-7 العلاقة التضادية بين البكتريا العلاجية وبكتريا بادئ اليوكرت

إن استخدام خليط مكون من عدة سلالات من المعززات الحيوية في صناعة منتجات لبنية متخمرة يؤدي الى حدوث عدد من العمليات والتي قد تؤثر سلباً أو ايجاباً على بكتريا المنتج، ان استعمال هكذا خليط يؤدي الى اختلافات فسيولوجية كالنمو وإنتاج الحامض والنشاط الايضي والبروتينات وحساسيتها تجاه البكتريوسينات والتفاعلات الميكروبية المحتملة، وهذه التغيرات إما أن تكون مآزره لبكتريا المنتج أو قد تكون مثبطة لها والتي لايمكن السيطرة عليها في عمليات تخمر الحليب (Ve damuthu, 1994; Hugenholtz, 1986; Meers, 1973).

في حين بين Lindgren and Dobrogosz, (1990) ان المعززات الحيوية تنتج في اثناء عمليات التخمر في الوسط مجموعة من المركبات كالأحماض العضوية وثنائي الأستيل وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسينات، والبكتريوسينات "هي مركبات قد تعمل على تثبيط نمو أنواع أخرى من البكتريا ترتبط ارتباطاً وثيقاً مع سلالة المنتج نفسه" (De Vugst and Vandamme, 1994).

أشار Ogunbanwo et al., (2003) الى أن بكتريا *L.plantarum* تنتج بكتريوسينات تُظهر فاعلية ضد أكثر من نوع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. أما بالنسبة لبكتريا *Pediococcus* فتنتج مركبات مضادة للبكتريا مثل الأحماض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسينات والتي تسمى pediocin (Eijsink et al., 2002)، وبين Bennik et al., (1997); Gonzalez and Kunka, (1987) أن بكتريا *P.acidilactici* و *L.plantarum* تشترك في تخليق مركب pediocin الذي وصف بداية تخليقه من بكتريا *P.acidilactici* إلا أن الدراسات اللاحقة اثبتت إمكانية انتاجه من بكتريا *L.plantarum* .WHE92

2-8 التركيب الجيني لبكتريا *L.plantarum*

تمتلك بكتريا *L.plantarum* تركيباً جينياً يُعد من أكبر التراكييب الوراثية من بين المعززات الحيوية المعروفة (Chevallier et al., 1994) إذ تم التعرف وراثياً على عدة سلالات من هذه البكتريا بما فيها التعرف على نظم التعبير الجيني لها (Bringel et al., ، Pavan et al., 2000)

(1989)، فقد ذكر **Kleerebezem et al., (2003)** أن جينوم بكتريا *L.plantarum* WCFS1 يبلغ حجمه 2.308.271 bp في الكروموسوم والتي تم عزلها من لعاب الانسان وتحتوي على 2051 بروتيناً مشفراً إذ ان الوظائف البايولوجية يمكن اسنادها الى 2120 جيناً أي 70% من البروتينات، إن جينوم *L.plantarum* يشفر كل الانزيمات اللازمة لعمليات تحلل المسارات المهمة منها مسار الفوسفوتيز ومسار تحلل الكلوكوز وبدرجة كبيرة مما يؤدي الى أن تكون نواتج التخمر النهائية مختلفة، وبسبب كبر حجم جينومها فهي قادرة على تحليل عدد كبير من المواد السكرية والتي تقدر بـ 25 نوعاً من خلال نظام Phosphotransferase (PTS) (Siezen and van Hylckama, 2011).

إن دراسة تتابعات القواعد النتروجينية لجين *16SrDNA* توفر أساساً دقيقاً لتحديد النشوء أو التطور والهوية للمعزلات الحيوية (Vandamme et al., 1996) إن هذه التتابعات التي يتم الحصول عليها من خلال التحليل يمكن مقارنتها بعزلات اخرى لتلك الانواع من المعزلات الحيوية والموجودة فيما يسمى ببنك الجينات (المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية) National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Stackebrandt and Goebel, 1994)، وهذا يعني أن مايقدر بـ 1.5 kbp من الحامض النووي تكون تتابعاته من القواعد النيتروجينية معروفة، إذ أن تسلسل الحامض النووي من *16SrDNA* هو في الغالب طريقة لتحديد الانواع البكتيرية اعتماداً على البرايمرات المناسبة لتضخيم *16SrDNA* (Fox et al., 1992)، إذ يتميز عدد قليل من الجينات بدرجة عالية من الاستقرار كجين *16SrDNA*، لذا فإنه يُعد دليلاً على مدى التطور الوراثي ودرجة القرابة بين الكائنات الحية (Harmsen and Karch, 2004).

كان ولازال استخدام تتابعات جينات *16SrDNA* في دراسة علم تطور السلالات البكتيرية والتصنيفية دلالة وراثية للجينات المستقرة الاكثر شيوعاً لعدد من الأسباب أبرزها:-
(Clarridge, 2004; Patel, 2001; Janda and Abbott, 2007).

- 1- وجودها في كل البكتريا تقريباً.
- 2- لم تتغير وظيفة جينات *16SrDNA* مع مرور الزمن.
- 3- جين *16SrDNA* يحتوي على (1500bp) وهو كبير بما فيه الكفاية للأغراض المعلوماتية.

4- من المفترض المحافظة على جين *16SrDNA* كونه عنصراً مهماً في وظيفة الخلية وهو على النقيض من الجينات الأخرى التي تعبر عن الانزيمات تحتوي بكتريا *L.plantarum* على البلازميدات التي تمتلك بعض الجينات التي تشفر لبعض الصفات المهمة كمقاومة الفاجات، والمضادات الحيوية، وهدم اللاكتوز، وإنتاج الانزيمات المحللة للبروتين والبكتريوسين وغيرها (Kranenburg et al., 2005)، ويُعد جينوم *L.plantarum* WCFS1 أول جينوم تم التعرف على تتابعاته من القواعد النيتروجينية (Kleerebezem et al., 2003). وقد وفر هذا الجينوم كل المعلومات المتعلقة بالخارطة الوراثية التفصيلية للمسارات الأيضية لبكتريا *L.plantarum* (Kerkhoven et al., 2004; Smid et al., 2005; Teusink et al., 2005)، تم تحديد الخرائط البروتينية لبكتريا *L.plantarum* عن طريق (Zhu et al., 2011) إذ درس عدد من الباحثين مؤخراً تغيرات البروتيوم نتيجة التكيف الحراري (De Angelis et al., 2004)، والمعاملة بأملاح الصفراء (Hamon et al., 2011)، أو تكيفها للأوساط القلوية (Lee et al., 2011). وأستناداً إلى تتابعات الحامض النووي لبكتريا *L.plantarum* WCFS1 تم تشخيص التتابعات الجينية التي تتحكم في تحديد مدى التكيف لهذه البكتريا للبيئات المختلفة (Oozeer et al., 2005)، فبكتريا *L.plantarum* قادرة على مقاومة الظروف القاسية للبقاء سليمة في بيئة النمو، كالرقم الهيدروجيني المنخفض والتراكيز العالية لأمحاض الصفراء وزيادة الأزموزية كل ذلك يتم التحكم به من خلال جينات خاصة لهذه البكتريا (Marco et al., 2006).

إن عدد كبير من الطرائق المستخدمة في المعرفة الجينية زادت بشكل كبير خلال الـ 20 سنة الماضية والتي يمكن من خلالها تحليل العوامل الوراثية لعدد من سلالات البكتريا العلاجية المعروفة منها *L.plantarum* WCFS1 (Kleerebezem et al., 2003)، *L.acidophilus* (Altermann et al., 2005)، *L.johnsoni* NCC533 (Denou et al., 2008; Pridmore et al., 2004).

تحتوي المعززات الحيوية على نسب متباينة من المحتوى G+C مع جينومات صغيرة يتراوح حجمها بين 1.8-3.3 ميكاقاعدة (Klaenhammer et al., 2005) وكانت نسبة بكتريا *L.plantarum* تقدر 3.3 ميكاقاعدة وبمحتوى G+C 44.5% (Kleerebezem et al., 2003).

وقد أستخدم تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymersae Chain Reaction للكشف عن التحليل الجيني لعدد من السلالات البكتيرية للمعزلات الحيوية مثل *L.plantarum* (Kleerebezem *et al.*, 2003) و *L.acidophilus* (Altermann *et al.*, 2005) و *L.johnsonii* (Denou *et al.*, 2008; Pridmore *et al.*, 2004) كما تم تحليل بعض الجزيئات لتحديد الطفرات المؤثرة في بعض الخصائص العلاجية. وعلى الرغم من توافر المعلومات عن تسلسل الجينوم فقد وضعت آليات مختلفة لمقارنة واسعة النطاق من الفرق في نتائج التعبير الجيني لسلالة نمت في المختبر بظروف قياسية مقابل تلك السلالة التي تزرع في الجسم الحي (Lebeer *et al.*, 2008).

9-2 الطفرات Mutations:

تعني الطفرة أي تغيير في تتابعات القواعد النروجينية (النيوكليوتيدات) المكونة لـ DNA الكائنات الحية سواء إنعكس هذا التعبير على الطراز المظهري (Phenotype) أو يبقى كامناً في الطراز الوراثي (Genotype)، فهي قد تغير من ترتيب تتابعات النيوكليوتيدات، أو من عددها عن طريق الحذف أو الإضافة أو الطفرات التي تتجم عن الفايروسات والتي تسمى الينولات أو (الجين القافز Transposon) (سلاسل من DNA يمكنها التحرك الى مواقع مختلفة داخل الجينوم لخلية بعينها ويمكن خلال انتقالها أن تحدث طفرة ما أو قد تغير جزءاً من الجينوم)، (Aminetzach *et al.*, 2004; Bertram, 2000; Burrus and Waldor, 2005). تحدث الطفرة نتيجة الكيمياءات المطفرة والتعرض للأشعة والأخطاء التي تحدث خلال تضاعف DNA أو يمكن أن يحدثها الكائن الحي نفسه تلقائياً بعمليات خلوية مثل فرط التطهير (آلية خلوية تحدث للجهاز المناعي بحيث تتكيف مع عناصر غريبة كالميكروبات حتى يحدث تكيف وأستجابة) (Montelone, 1998).

بين Drake *et al.*, (1998) أن معدل حدوث الطفرات التلقائية يختلف حسب حجم الجين، فالجين الأكبر يميل لأن يُطفر أكثر ، وبشكل عام يصل معدل التطهير في حقيقيات النوى والبكتريا الأحادية الى حوالي 0.003 طفرة لكل جينوم في كل جيل، أما المعدل لدى الانسان فيتراوح بين 1×10^{-6} - 1×10^{-5} طفرة لكل نيوكليوتيد يتم إستنساخه.

ذكر **Montelone, (1998)** أن الطفرة التلقائية تحدث نتيجة لعمليات طبيعية في الخلايا،
فالتطفير على المستوى الجزيئي قد يحدث بسبب:

التاتومير (الصنوانية) Tautomerism: تغيير قاعدة معينة مما يؤدي إلى ازدواج نيوكليوتيد
خاطئ في أثناء التضاعف.

نزع البيورينات Depurination: فقدان بيورين لتكوين موقع منزوع البيورين.

نزع الامينات Deamination: يؤدي الى تبديل قاعدة عادية بقاعدة شاذة.

الازدواج المتضارب للشريط Slipped strand mispairing: تمسخ الشريط في أثناء

استنساخه وإعادةه الى طبيعته في موقع آخر وهذا يؤدي الى حدوث حذف وإضافة.

فضلاً عن ذلك هناك عوامل خارجية أو عوامل مطفرة وهي:

نظائر القواعد: كيميائيات مشابهة للقواعد النيتروجينية البيورين والبيريميدين وقد تأخذ مكان

القواعد العادية في DNA في أثناء التضاعف.

كيميائيات تغير من تركيب القواعد النيتروجينية وخصائص ازدواجها مثل النتروز، والضوء،

والشمس، والأشعة، والتدخين.

عوامل داخلية: أخطاء عند تكرار الحامض النووي يمكن أن تؤدي الى تغيرات وراثية كما يمكن

أن تكون منتجات أفضية سامة.

2-9-1 أنواع الطفرات

يمكن توضيح أنواع الطفرات حسب ما ذكره **Lister Hill, (2016)**

Deletion mutation: إزالة المادة الوراثية أو حذفها، هناك عدد قليل من القواعد يمكن

حذفها أو يمكن أن يكون حذف كامل أو جزء من الكروموسوم.

Frameshift mutation: إدراج أو حذف عدد من القواعد والتي هي ليست من مضاعفات

العدد 3، هذا يغير من قراءة الجين كثيراً مما يؤدي الى وقف الكودون والبروتين.

Insertion mutation: عندما يتم وضع المادة الوراثية في منطقة أخرى من الحامض

النووي، قد يكون هذا الإدراج من أكثر من قاعدة، أو يمكن أن يكون جزءاً من كروموسوم واحد يجرى

إدراجها في كروموسوم آخر غير متماثل.

Missense mutation: أي تغيير في تتابعات الحامض النووي يغير من تشفير الاحماض الامينية المختلفة. ليست كل الطفرات الخاطئة ضارة، إذ ان بعض هذه الطفرات يمكن أن يكون لها تأثير إيجابي على الرغم من غموضها، فغالباً مايكون من الصعب تفسير النتائج المترتبة على هذه الطفرات في التسبب بالمرض.

Nonsense mutation: أي تغيير في الشفرة الوراثية يؤدي الى التشفير لشفرة التوقف بدلاً من الاحماض الامينية والبروتين الناتج يكون قصيراً وغير مهم (عديم الفائدة).

Point mutation: تغيير قاعدة واحدة في تتابعات الحامض النووي، قد يكون طفرة صامتة خاطئة (nonsense).

Silent mutation: أي تغيير في التسلسل الجيني الذي يحدث في حدود الاكسونات والانترونات، قد يحدث قطع في الانترونات وإنضمام الاكسونات في RNA، أي تغيير في هذه التتابعات يمكن أن يؤدي الى حدوث قطع في تلك المواقع والذي سيغير من حالة القراءة وتركيب البروتين.

Translocation mutation: خلل في هيكل الكروموسوم إذ يتم تبادل المادة الوراثية بين اثنين أو أكثر من الكروموسومات غير المتجانسة.

ويُعد التطفير أحد الطرائق المستخدمة على نطاق واسع لتحسين السلالات البكتيرية والتي تستخدم في علم الاحياء المجهرية الصناعية (Akanksha et al., 2012) ، فقد ذكر *Shah et al.*, (1986) ان السلالات البرية عادة ماتنتج كميات محدودة من الانزيم المرغوب وعليه يمكن اعتماد أساليب بسيطة لأختيار بعض المستعمرات لتحسينها بالتطفير المناسب وبتقنيات خاصة للحصول على طفرات نافعة.

2-9-2 الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet radiation

الاشعة فوق البنفسجية (UV) ضوء له تأثيرات قوية على جينات الحامض النووي، وحدث الطفرات، وفي أسوأ الأحوال في نمو الأورام. تُعد الشمس هي المصدر الرئيس للأشعة فوق البنفسجية (Setlow, 1974; Brash, 1991).

بين *Khattab and Mohamed, (2012)* أن استخدام الاشعة فوق البنفسجية أكثر سلامة من ناحية التلوث البيئي، الاشعة فوق البنفسجية لها تأثيرات على مجموعة واسعة من العوامل

البايولوجية بما في ذلك تغير من بنية البروتين، DNA وعدد من الجزيئات الأخرى المهمة بايولوجياً والعمليات الفسيولوجية الأساسية وحتى الاجهاد الفسيولوجي الحاد مما يؤدي الى إنخفاض في نمو وإنقسام الخلايا وإنتاج الطاقة (**Llabres et al., 2010; Sinha et al., 2008; Zeeshan and Prasad 2009**). الطفرات العشوائية بوساطة الأشعة فوق البنفسجية تستخدم لتحسين خواص معينة في سلالة ما، إذ أن كفاءة الطفرات المستحدثة تعتمد على نوع الضرر (استبدال زوج ما من القواعد، الحذف والادراج، . الخ) والذي يسبب تغيير معين على DNA وآلية إصلاح هذا الضرر، تكون الطفرات الناتجة من استخدام UVlight أكثر استقراراً على المدى الطويل للجيل (**Catherine et al., 1992; Michael et al., 2006**).

وقد درس **Fiocco et al., (2009), Capozzi et al., (2011)** تأثير الطفرات العشوائية على ثلاثة جينات من بكتريا *L.plantarum* تشفر لبروتينات متعلقة بالاجهاد وأشارت الدراسات الى أن هذه الطفرات يمكنها من إحداث تغيرات مميزة أمكن ملاحظتها على سطح الخلية عند نموها وبذلك تؤثر في قدرتها على العيش التكافلي (**Fiocco et al., 2010, Bove et al., 2012a, Capozzi et al., 2011**).

أثبتت الدراسات التي قام بها **Gawel et al., (2002)** أن جميع العينات تتأثر بجرعات الأشعة فوق البنفسجية مع احتمال بقاء 10-30% من القواعد غير قابلة للتغيير أو الاستبدال. بين **Morgan, (1989)** أن مدى تأثير الأشعة فوق البنفسجية في الحامض النووي يعتمد على جرعة الأشعة من حيث شدتها ومدة التعرض لها والمسافة بين العينة والمصدر. وتؤثر الأشعة فوق البنفسجية في النمو البكتيري نتيجة التعرض لها، فقد ذكر **Sheelendra and Srivastava, (2012)** أن تعريض المعززات الحيوية للأشعة فوق البنفسجية بمقدار 254nm ولمسافة 20cm وبمدد 5 و 7 و 8 و 10 و 12 دقيقة أدت الى إنخفاض النمو البكتيري بنسبة كبيرة وموت الخلايا، في حين أن البكتريا المتبقية أمكنها النمو بعد نقلها مرتين الا أنها فقدت قدرتها على النمو عند النقل الثالث، وتميل البكتريا الموجبة لصبغة كرام الى أن تكون أكثر مقاومة للأشعة فوق البنفسجية (**Chang et al., 1985**)

ان طفرات الأشعة فوق البنفسجية تحدث بشكل عام في تتابعات الحامض النووي إذ يمكنها تشكيل Dimer و adducts للبيريميدين، وقد أدى هذا الى إدراك أن طبيعية القواعد المتاخمة لزوج

من البيريميديئات مهمة جداً في تحديد أي من الأزواج البيريميدينية المجاورة سوف تتعرض للتطفير بالأشعة فوق البنفسجية (Drobetsky *et al.*, 1987). إن استخدام جرعة عالية من الأشعة فوق البنفسجية لمدة معينة وبصورة مستقرة قد يؤدي الى حدوث طفرات مقاومة لهذه الأشعة، كما يمكن أن يؤدي تراكم الطفرات الى تعطيل الجينوم مما يتسبب بالحد من نموها (Shibai *et al.*, 2014) وبين (Oxoid, (2004); Togo, (2002) أن قدرة العزلات المطفرة بالأشعة على النمو في وسط MRS الصلب لم تتأثر، وهي إشارة الى أن العزلات المطفرة مازالت تحتفظ بالانشطة البايولوجية لنوع السلالة البرية. تسبب الأشعة فوق البنفسجية ضرراً للحامض النووي يؤدي الى تلف محدد من نوع Cyclebutane Pyrimidine Dimers (CPD) و Pyrimidine (6-4PP) إذ يكون إثنين من Pyrimidine photoproducts (6-4PPs) جنباً الى جنب مع تتابعات القواعد النيتروجينية للحامض النووي (Markovitsi *et al.*, 2010).

10-2 التضخيم العشوائي متعدد الاشكال (RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA

يُعد هذا النوع من الفحوص آلية لتمييز السلالات التي تنتمي الى النوع نفسه وهو تحويل لعمل PCR والذي ممكن أن يحتوي على بادئ بطول 10bp قادرة على الارتباط في مواقع متعددة في جميع أنحاء الجينوم وبذلك تنتج مجموعة من الحزم التي تم تضخيمها والتي تمتلك خصائص الشريط القالب نفسه (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Olorunfemi *et al.*, 2005) ، إذ أستخدمت على نطاق واسع للتمييز بين سلالات وبائية كبيرة من المكورات العنقودية (Pereira *et al.*, 2002; Ozbey *et al.*, 2004)، ويستخدم عادة RAPD-DNA للتعرف على تعدد الاشكال الجينومية (Huber *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2005)، فتحليل RAPD يمكن أن يكشف عن وجود درجة عالية من تعدد الأشكال التي لا تتطلب معلومات مسبقة عن تسلسل الحامض النووي (Lu *et al.*, 2010) كما استخدمت هذه التقنية لغرض التشخيص السريع لعدد كبير من الموروثات لدراسة مدى التنوع الوراثي والعلاقات التنظيمية (Williams *et al.* 1990, Welsh & McClelland 1990, Caetano *et al.*, 1991) هذه التقنية تستخدم برايمرات بحدود (6-10bp) تنتج مختبرياً لا تتطلب معلومات محددة لتصميم البرايمر، ذلك لأن عدد البرايمرات المحتملة التي يمكن استخدامها كبير جداً، وأستخدمت هذه التقنية للكشف عن جنس معين، وأنواع

محددة أو تشخيص سلالة ما أو كشف هوية بصمات الأصابع واجراء دراسات التنوع الوراثي ورسم الخرائط الجينية لتطوير وسائل التشخيص (Abad et al., 1998; Ransom et al., 1998; Bazzicalupo and Fani 1996; Sijapati et al., 2008) إن مجمل الاختبارات البايوكيميائية يمكن أن تعطي تشخيصاً ظاهرياً للمعزلات الحيوية، مع ذلك فإن توصيف بكتريا *L.plantarum* يكون عادة صعباً، ذلك لأن النمط الوراثي لها (التكوين الوراثي للخلية) يرتبط ارتباطاً وثيقاً ويتشابه مع *L.pentosus*، *L.paraplantarum* (Curk et al., 1996).

في السنوات الأخيرة ومع تقدم البحوث في علم الاحياء الجزيئي للمعزلات الحيوية أصبح التمييز بشكل أفضل من خلال آلية RAPD – PCR (Zapparoli et al., 2000). ذكر (Torriani et al., 2001) أن هذه الآلية تعتمد على جهاز PCR الذي يعمل في ظروف محددة لتضخيم أجزاء من النيوكليوتيدات، وهذه الأجزاء قد تكون للنوع نفسه من البكتريا أو السلالة، فعلى سبيل المثال كشف تسلسل جينات *recA* القصيرة انها من الممكن أن تستخدم للتمييز بين *L.pentonus* و *L.paraplantarum* وقد صمم مجموعة من الباحثين بربايمرات خاصة على أساس تعدد النيوكليوتيدات المتغيرة في جين *recA* (Spano et al., 2002) إذ اعطى تضخيماً للحامض النووي لبكتريا *L.plantarum* حزمة واحدة بمقدار (318 bp) وهي تختلف عن تلك المتعلقة ببكتريا *L.pentonus* (218 bp) و *L.paraplantarum* (107 bp).

وذكر (Welsh and McClland, 1990) أن آلية RAPD أصبحت نمطاً مقبولاً يستخدم على نطاق واسع لتصنيف مجموعة كبيرة من الكائنات الحية، وتم تطوير هذه الطريقة لتشمل اثنين من البرايمرات في تفاعل RAPD واحد (Welsh and McClland, 1991)، إذ بين (Neilan, 1995) إن استخدام RAPD متعدد يُعد طريقة مفضلة لانها تعطي علامات وراثية أكثر لتمييز السلالات.

2-11 المعزلات الحيوية ودورها في المنتجات اللبنية المتخمرة

اليوكرت والألبان اللبنية المتخمرة ذات الصلة هي منتجات فريدة من حيث المذاق والقيمة الغذائية وربما تكون الأولى من ناحية الأغذية الوظيفية التي تجري الدراسات عليها (Yildis, 2010). فهو منتج لبني متخثر ينتج من ارتفاع حامض اللاكتيك في الحليب بوساطة *L.bulgaricus* و

S.thermophilus وهي البكتريا المستعملة لانتاج اليوكرت على المستوى التجاري (Bourlioux and Robinson and Tamime, 1988; Almena et al., 2005) فقد وضع (1986) ان الألبان المتخمرة تنتج عادة من خلال إضافة سلالات محددة من المعززات الحيوية الى الحليب وتحدث عملية التخمير تحت ظروف محددة من الوقت ودرجة الحرارة الملائمة لنمو البكتريا المستعملة وخلال استهلاك البكتريا لسكر الحليب ينتج حامض اللاكتيك كنتاج نهائي والذي يسبب انخفاضاً في حموضة الحليب وتكوين الخثرة. وعادة جودة المنتج وتقبل المستهلك مهمة لتقييم المنتج (Dibbie et al., 1991)، يشمل التقييم عادة الجودة والمواصفات وطريقة اخذ العينات وإجراء الاختبارات والتقارير وعادة ما يتم تحديد مواصفات معينة لكل شركة مصنعة (Hussain et al., 2009)، ويعتمد انتاج الالبان المتخمرة على نوع ومصدر الحليب كالحليب الكامل أو منزوع الدسم والحليب المجفف إضافة الى تأثير ظروف التصنيع مثل درجة الحرارة ومدة التخمير (Blance, 1986). فقد ذكر (Hussain et al., 2009) ان تصنيع منتج لبني متخمّر مختبرياً بأعداد بكتيرية 4.04×10^8 cfu/ml أدى الى تقييم المنتج حسب النكهة واللون والرائحة بفارق معنوي كبير مع الالبان المتخمرة الموجود في الأسواق. وهذا ماوضحه كل من (Pardo et al., 2008) و (Daniell, 2008) ان الأعداد الحية للسلالة البكتيرية *L.plantarum* B28 المستعملة في انتاج اللبن المتخمّر المدعم بالشوفان بلغت 7×10^{10} cfu/ml بعد فترة خزن 21 يوم بدرجة حرارة 4 م°، ووجدوا ايضاً ان انتاج منتج لبني متخمّر بوساطة السلالة *L.plantarum* A6 وبنسبة لقاح 8% ومدعم بطحين نبات الكسافا بلغت الأعداد الحية فيه 2.3×10^9 cfu/ml عند الحضان بدرجة 35 م° لمدة 16 ساعة وبمدة تخزين بلغت 28 - 30 يوماً. إذ تساعد منتجات الالبان المتخمرة الحاوية على أعداد كافية من المعززات الحيوية على خلق حالة من التوازن الميكروبي على نحو مفيد مقابل البكتريا المرضية غير المرغوبة في الأمعاء إضافة لدورها في تحسين النظام المناعي في الجسم (Yildiz, 2010). ان إضافة المعززات الحيوية لانتاج الالبان المتخمرة تزيد من القيمة الغذائية للحليب إضافة الى الخواص العلاجية التي تتميز بها تلك المعززات (de Vrese and Schrezenmeir, 2008). فقد ذكر (Irvine and Hekmat, 2011) ان انتاج الالبان المتخمرة تطيل من العمر الافتراضي للمنتج وتسمح بالمحافظة على سلامة الأغذية من دون تخزين مبرد ولمدة أطول بكثير مقارنة مع الحليب السائل.

أما من الناحية الصحية فقد أثبتت الدراسات السابقة ان استهلاك الالبان المتخمرة يؤدي الى انخفاض في حالات الاسهال وزيادة الوظائف المناعية وخصوصاً بالنسبة للأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة المكتسبة (Irvine et al., 2010). فقد ذكر (Nobaek et al., 2000) من خلال

دراسه اجراها على 60 مصاباً ان تناول منتج لبني متخمر بواسطة المعزز الحيوي *L.plantarum* ولمدة أربع أسابيع أدى الى التقليل من الالام الأمعاء والانتفاخ مقارنة مع مجموعة أخرى من المعززات الحيوية.

وفي دراسة سريرية أخرى اجراها **Nishimura et al., (2015)** على 171 شخصاً من ذكور واناث تراوحت أعمارهم بين 31-69 عاماً يعانون من انخفاض بنسبة 50% في نشاط الخلايا المناعية المقاومة للأورام، إذ تم تغذيتهم على منتج لبني متخمر مصنع من السلالة *L.plantarum* HOKKAIDO المعزولة من مخلل الخضروات الياباني لمدة 4-8 أسابيع فقد أظهرت النتائج ان الأشخاص الأصغر سناً من 50 عاماً قد ازداد نشاط الخلايا المناعية المقاومة للأورام إضافة الى زيادة أعداد الخلايا للمفاوية مقارنة مع الاشخاص الذين تناولوا اليوكرت الخالي من بكتريا *L.plantarum*. كما بين **Guo et al., (2011)** في دراسة اجراها على نوع من المنتجات اللبنية المتخمرة الغنية بنسبة الدهن وجد ان السلالة البكتيرية *L.plantarum* KLDS قد أدت الى انخفاض نسبة الكولسترول في المنتج الى 54.08% في حين عجلت من تحويل 18.57% من الكولسترول الى الحالة الذائبة. وتستخدم عادة مزارع مختلطة من المعززات الحيوية لتلافي ماتظهر من نكهة غير مستساغة وضعف تطور الحموضة وطول مدة التخمر التي تتميز بها المعززات الحيوية عند استعمالها بصورة منفردة لوحدها في تصنيع منتجات الالبان المتخمرة (**Vuyst, 2000**) وهذا مايبينه ايضاً **Aydemir et al., (2015)** ان بكتريا *L.plantarum* تنمو بشكل أفضل في منتجات الالبان المتخمرة عند وجود سلالات مختلفة من المعززات الحيوية، كما ان عملية الخلط توفر منتجات صفاتها العلاجية افضل بكثير بسبب اختلاف الخواص العلاجية ما بين المعززات الحيوية المختلفة المستعملة (**Golian and Pavelka, 2001**).

أما بالنسبة للمعزز الحيوي *Pediococci* والتي تكون عادة غير قادرة على تخمير سكر اللاكتوز (**Garvie, 1986**) وهذا مايقيد من تطبيقاتها في منتجات الالبان المتخمرة ومع ذلك فان عمليات نقل جين *lac* أو الحصول على بعض السلالات النادرة والقادرة على استهلاك اللاكتوز فانها تعطي صفات جيدة للمنتجات اللبنية المتخمرة إذ تستعمل كبديل مناسب عن بكتريا *S.thermophilus* والتي طبقت في بعض الالبان المتخمرة الإيطالية لقدرتها على النمو في درجات حرارة تصل الى 45°م (**Bhowmik and Marth. 1990; Bhowmik et al., 1990; Oberg and Broadbent, 1993**)

3- المواد وطرائق العمل

1-3 المواد

1-1-3 الأجهزة والمعدات المستعملة

الأجهزة والمعدات التي إستعملت في هذه الدراسة مدونة في الجدول 1-3 .
جدول (1-3) الأجهزة والمعدات المستعملة

المنشأ	الشركة المصنعة	أسم الجهاز	التسلسل
USA	Fisher scientific	Anaerobic jar	1
Taiwan	Gemmy	Autoclave	2
Korea	BIONEER	Automated Nucleic Acid Extraction System	3
Korea	BIONEER	Cooling Centrifuge	4
Germany	--	Colony counter	5
Germany	Eppendorf	Concentrator Eppendorf	6
Japan	--	Deep freeze	7
Switzerland	Mettler Toledo	Digital balance	8
Korea	Samsung	Digital camera	9
USA	Fisher scientific	Electrophoresis system (Horizontal)	10
Germany	Eppendorff	Eppendorf centrifuge	11
USA	Fisher scientific	Hood	12
Korea	BIONEER	Hood Gen. UV light (254 nm)	13
USA	Binder	Incubator	14
Germany	Human	Light Microscopy	15
China	Bio Le Kon	Low Speed Centrifuge	16
USA	Fisher scientific	Micropipette 10 µl, µl100	17
Italy	Kartell	Micropipette 1000 µl	18
USA	Fisher scientific	Mini vortex	19
Korea	OPTZEN	Nanodrop Spectrophotometer	20
Germany	Sartorius	pH-meter	21
Korea	BIONEER	Spectrophotometer	22
USA	Corning	Stirrer hot plate	23
Korea	BIONEER	Thermal cycler (PCR)	24
Korea	Wise ATTA	UV light transilluminator	25

3-1-2 المواد الكيميائية المستعملة

المواد الكيميائية المستعملة مدونة حسب الجدول (2-3)

جدول (2-3) المواد الكيميائية المستعملة

المنشأ	الشركة المصنعة	أسم المادة	التسلسل
UK	Scharlau	Absolute ethanol	1

USA	Fisher scientific	Agarose	2
UK	BDH	Ammonium citrate	3
UK	BHD	Amygdalin	4
UK	BHD	Arabinose	5
UK	Oxoid	Arginine monohydrochloride	6
Germany	Merck	Bromophenol blue	7
UK	BHD	Cellobiose	8
Spain	Scharlau	Chlorophynol Red Indicator	9
Spain	Sharloo	Conc. H₂SO₄	10
Sweden	Pharmacia	CuSO₄ Copper(II) Sulfate	11
UK	BHD	D- Glucose	12
UK	BHD	Dextrose	13
UK	BHD	Esculin	14
spin	Scharlau	Ethanol 95%	15
Germany	Merck	Ethidium bromide	16
Germany	Sigma	FeSO₄.7H₂O Iron(II) Sulfate Heptahydrate	17
UK	BHD	Fructose	18
UK	BHD	Galactose	19
UK	BDH	Glacial acetic acid	20
Sweden	Pharmacia	HgCl₂ Mercuric Chloride	21
Germany	Fluka	Hydrogen Peroxide	22
UK	BHD	Inositol	23
Sweden	Pharmacia	K₂SO₄ Potassium Sulfate	24
UK	BDH	KH₂PO₄ Monopotassium phosphate	25

USA	Difco	Kovacs reagent	26
UK	BHD	Lactose	27
UK	BHD	L-cysteine-Hcl	28
Canada	Biotech	Lysozyme	29
UK	BHD	Maltose	30
UK	BHD	Mannitol	31
UK	BHD	Mannose	32
UK	BHD	Melibiose	33
Germany	Fluka	Methylene blue	34
UK	BDH	MgSO₄. 7H₂O Magnesium Sulfate Heptahydrate	35
UK	BDH	MnSO₄. H₂O Manganese(II) Sulfate Monohydrate	36
UK	BHD	α -naphthylamine	37
Korea	BIONEER	Nuclease free water	38
USA	Difco	Oxgall	39
UK	BDH	phenolphthalein Ind	40
UK	Oxoid	Phosphate buffer saline	41
USA	Fisher scientific	Polyethylene glycol	42
UK	BDH	Potassium Hydroxide	43
UK	BHD	potassium iodide	44
Germany	Fluka	Potassium nitrate	45
UK	BHD	Raffinose	46
UK	BHD	Rhmnose	47
UK	BHD	Ribose	48
UK	BHD	Salicin	49
USA	Difco	Simmons citrate agar	50
France	Regilait	Skim milk powder	51
UK	BHD	Sodium acetate	52
Sweden	Pharmacia	Sodium chloride (pure)	53
UK	BHD	Sodium hydroxide	54
UK	BHD	Sorbitol	55
UK	BHD	Sucrose	56

UK	BDH	Sulphanilic acid	57
Canada	Biotech	TBE buffer	58
Sweden	Pharmacia	Thymol blue Indicator	59
UK	BHD	Trehalose	60
Sweden	Pharmacia	Triammonium citrate	61
USA	Fisher scientific	Tris base EDTA	62
UK	BDH	Tween – 80	63
UK	BHD	Xylose	64

3-1-3 المواد الحيوية المستعملة

تم ادراجها حسب الجدول (3-3)

جدول (3-3) المواد الحيوية المستعملة

المنشأ	الشركة المصنعة	أسم المادة	التسلسل
Korea	BIONEER	16SrDNA Primers (F+R)	1
UK	Oxiod	Agar	2
Korea	BIONEER	Bacterial Genomic DNA Kit	3
UK	Oxiod	De man-Rogosa-Sharp Agar (MRS)	4
UK	Oxiod	De man-Rogosa-Sharp Broth (MRS)	5
Korea	BIONEER	DNA ladder (100 bp,1kb)	6
UK	Oxiod	Gelatin	7
UK	Quest GINKGO	<i>L.plantarum</i> standard	8
Korea	BIONEER	Mastermix (20 µl, 50 µl)	9
Germany	Fluka	Meat extract	10
UK	LAB	Nutrient broth	11
India	Himedia	Peptone	12
Korea	BIONEER	RAPD Primer	13
India	Himedia	Tryptone	14
Germany	Fluka	Yeast extract	15

3-1-4 مصادر العزل

أستخدمت الطريقة المحلية لإنتاج المخلل العراقي مصدراً لعزل البكتريا قيد الدراسة، إذ تم تجهيز خضار طازجة محلية من الأسواق شملت خيار القثاء والخيار والباميا والجزر واللهانة فضلاً عن العينة القياسية، غسلت الخضار بصورة جيدة للتخلص من الاتربة والاوساخ وعرضت الى الهواء الجوي لمدة ساعتين مع التقليب كل 30 دقيقة، تم عمل محلول ملحي (5%) وعقم بالمؤصدة على حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة، قطعت الخضار الى قطع صغير 2 سم ووضعت في عبوات بلاستيكية محكمة الغلق معقمة مسبقاً بالأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 254 nm لمدة 15 دقيقة على ارتفاع 60 سم داخل حجرة التعقيم (Hood) حسب تعليمات الشركة، أضيف المحلول الملحي مع الحرص على ملئ العبوة الى النهاية، وضعت العبوات في جو المختبر بعيداً عن أشعة الشمس لمدة أسبوع.

3-1-4-1 مصدر تجهيز البكتريا القياسية

أستعملت السلالة القياسية المجهزة من شركة Quest GINKGO / UK للحصول على بكتريا *Lactobacillus plantarum* على شكل كبسولات.

3-1-5-1 تحضير الكواشف والمحاليل

3-1-5-1 دليل الكلوروفينول الأحمر Chlorophenol Red

حضر بإذابة 0.2 غم من الدليل في 10 مل ماء مقطر، وأضيف الدليل بعد التحضير بنسبة 2% الى وسط التخمر للكشف عن قابلية البكتريا لتخمير السكريات (Andrews, 1997).

3-1-5-2 كاشف نسلر Nessler's Indicator

استعمل لاختبار انتاج الأمونيا من الأرجنين وحضر اعتماداً على Cowan and Steel (1975) وذلك بإذابة 8 غم يوديد البوتاسيوم، 11.5 غم كلوريد الزئبق في 20 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 50 مل . أضيف 50 مل من هيدروكسيد الصوديوم 6 عياري مزج المحلول جيداً وترك لمدة 24 ساعة قبل الاستعمال.

3-5-1-3 كاشف كوفاكس Kovacs reagent (Difco) استعمال في فحص انتاج الاندول من التريبتوفان .

4-5-1-3 دليل الفينولفثالين Phenolphthalein Indicator

حضر بإذابة 0.1 غم من الصبغة في 100 مل من الكحول الايثيلي بتركيز 50% كدليل لتقدير الحموضة الكلية للحليب اثناء التسحيح (AOAC, 1970).

3-5-1-3 محلول بيروكسيد الهيدروجين: حضر أنياً بتركيز 3% للكشف عن إنزيم الكاتليز.

6-5-1-3 دليل اختزال النترات Nitrate Reductase

حُضر من محلولين:

محلول A: حضر بإذابة 8 غم من حامض السلفانيك في لتر من حامض الخليك 5 عياري.

محلول B: حضر بإذابة 5 غم من الفانغثايل أمين (α -Naphthyl amin) في لتر من حامض الخليك 5 عياري (Andrews, 1997).

7-5-1-3 تحضير صبغة كرام Gram stain

حضرت الصبغة حسب الطريقة المذكورة في (Andrews, 1997) وكالاتي

1- الصبغة البنفسجية البلورية Crystal violet

محلول A: حضر بخلط 2 غم من صبغة الكريستال البنفسجية مع 20 مل ماء مقطر.

محلول B: حضر بخلط 0.8 غم من اوكزالات الامونيوم مع 80 مل ماء مقطر.

خلط محلول A مع محلول B وخرن لمدة 24 ساعة ثم رشح قبل الاستعمال.

2- اليود Iodine

استعمل 1 غم من اليود و 2 غم من يوديد البوتاسيوم و 300 مل ماء مقطر، حضر بسحق اليود مع يوديد البوتاسيوم في هاون لمدة 5 - 10 ثانية واضيف اليه 1 مل ماء مقطر ثم اضيف 5 مل ماء مقطر مع السحق بعدها اضيف 10 مل ماء مقطر مع السحق ثم اكمل الحجم الى 300 مل ماء مقطر.

3- كحول الايثانول 95%.

4- صبغة السفرائين Safranin

حضرت بخلط 2.5 غم من صبغة السفرائين مع 100 مل من الكحول الايثيلي 95%، عند الاستعمال الآني يخلط 10 مل من الصبغة المحضرة مع 90 مل ماء مقطر.

3-1-5-8 كحول الايثانول 70%

حضر حسب الطريقة التي ذكرها (Andrwes(1997) بخلط 700 مل كحول الايثانول تركيز 95% مع 250 مل ماء مقطر.

3-1-5-9 محلول الكشف عن الظروف اللاهوائية:

حضر حسب الخطوات التالية

- 1- يضاف 6 مل من 0.1 عياري هيدروكسيد الصوديوم الى 100 مل ماء مقطر.
- 2- يضاف 5 مل من 0.5% محلول المثلين الأزرق الى 100 مل ماء مقطر.
- 3- يضاف 6 غم من الكلوكوز الى 100 مل ماء مقطر وتضاف اليه بلورة صغيرة من

.Thymol Blue

بعد مزج هذه المواد يسخن المزيج في أنبوبة اختبار الى درجة الغليان حتى يختزل المحلول ويصبح عديم اللون، توضع الانبوبة داخل الحافظة اللاهوائية، فإذا كانت الظروف لاهوائية بصورة تامة يبقى المحلول عديم اللون، أما عند وجود خلل في الحافظة فإن ذلك يؤدي الى دخول الأوكسجين ويستعيد المثلين الأزرق لونه (الحديثي والسيمري، 1993).

3-1-5-10 تحضير Tris Borate-EDTA (TBE) 5x buffer

حضرت حسب الطريقة التي ذكرها (Sambrook and Russell, 2001)

1- يذوب EDTA في 20 مل ماء مقطر pH=8.

2- Tris Base 54 غم.

3- Bromic acid 275 غم.

يذوب المزيج بالماء المقطر، ويعدل الأس الهيدروجيني الى 8، يكمل الحجم الى 1 لتر، يعقم بالمؤصدة 121 °م لمدة 15 دقيقة ويحفظ بدرجة 4 °م.

3-1-5-11 تحضير Tris EDTA (TE) buffer

حضرت حسب الطريقة التي ذكرها (Sambrook and Russell, 2001)

A- يذوب 1.214 غم من Tris-HCl في 10 مل ماء مقطر للحصول على محلول 0.77 عياري ويحفظ.

B- يذوب 1.861 غم من EDTA في 10 مل ماء مقطر للحصول على محلول 0.5 عياري ويحفظ، ويحل بالتسخين.

يحضر TE دارئ بمزج 1 مل من المحلول A و 0.2 مل من المحلول B يعدل الأس الهيدروجيني الى 8 ويكمل الحجم بالماء المقطر الى 100 مل، ويعقم بدرجة 121 °م لمدة 15 دقيقة ويحفظ بدرجة 5 °م لحين الأستعمال.

3-1-5-12 تحضير Phosphate buffer saline (PBS)

حضرت حسب الطريقة التي ذكرها (Sambrook and Russell, 2001)

يحضر من إذابة قرص من مادة phosphate في (100) مل ماء مقطر، يعقم بالمؤصدة على حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة ويحفظ بدرجة (2-8) °م.

3-1-5-13 تحضير صبغة Ethidium Bromide

حضرت حسب الطريقة التي ذكرها (Sambrook and Russell, 2001)

يذوب 0.05 غم من Ethidium Bromide في 10 مل ماء مقطر (يمزج حتى الذوبان) للحصول على محلول تركيزه 0.5%، يحفظ في الظلام بزجاجة معتمة بدرجة 4 °م.

Cultures Media

3-1-6 الأوساط الزرعية

حضرت جميع الأوساط الزرعية حسب طريقة عمل الشركة المجهزة ثم عقت جميع الأوساط
الزرعية المستعملة في المؤسدة Autoclave بدرجة حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط 15
باوند / انج².

MRS Broth وسط 1-6-1-3

حضر حسب الطريقة المذكورة في (Anonymous (2014)

جدول (3-4) مكونات وسط MRS Broth

المكونات	غم / لتر
Peptone	10.0
Lab-Lemco powder	8.0
Yeast extract	4.0
Glucose	20.0
Sorbitan mono-oleat (Tween 80)	1ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate	0.2
Manganese sulphate	0.05
pH	6.2±0.2 25 °C

M 17 الصلب وسط 2-6-1-3

استعمل في عد بكتريا *S.thermophilus* في الجدول (3-5) وحسب (Anonymous (2014)

جدول (3-5) مكونات وسط M17 الصلب

المكونات	غم / لتر
----------	----------

5	Trypton
5	Soya pepton
5	Lab Lemco powder
2.5	Yeast extract
0.5	Ascorbic acid
0.25	magnesium sulphate
19	Di-sodium glycerophosphate
11	Agar
6.9	pH

لكل (1) لتر يؤخذ 950 مل من الوسط ويضاف له 50 مل من محلول اللاكتوز المعقم 10% وزن/حجم.

3-6-1-3 وسط MRS الحاوي على 0.5% ازيد الصوديوم Sodium azide

حضر بإضافة 0.5% (وزن/ حجم) من أزيد الصوديوم الى وسط MRS لضمان منع نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام (Harrigan and McCance , 1976) .

3-6-1-4 وسط MRS-L.Cysteine.HCl السائل والصلب

حضر بإضافة مادة L.Cysteine.HCl بنسبة 0.5% الى وسط MRS لضمان خلوه من الاوكسجين، واضيف الى الوسط 1.5% (وزن/ حجم) اكار عند الحاجة الى وسط صلب (Schaafsma, 1995) .

3-6-1-5 وسط استهلاك السترات Citrate utilization media

أستعمل الوسط Simmons citrate agar المجهد من شركة (Difco).

3-6-1-6 وسط تكوين الامونيا من الارجنين Ammonia from Arginine

حضر الوسط حسب الطريقة المذكورة في (Anonymous (2014) ويتكون كل 1 لتر من المواد المذكورة في الجدول (6-3)

جدول (6-3) مكونات وسط تكوين الامونيا من الارجنين

المكونات	غم
----------	----

5.0	Tryptone
2.5	Yeast extract
0.5	Glucose
2.0	Dipotassium hydrogen phosphate
3.0	Arginine monohydrochloride
7	pH

3-1-6-7 وسط تخمير الكربوهيدرات Carbohydrate Fermentation Media

حضر حسب الوسط المذكور في جدول (3-4) مع إزالة الكلوكون من الوسط وإضافة تركيز 2% كاشف كلوروفينول الأحمر، أضيفت بعدها المركبات الكربوهيدراتية (كلا على انفراد) وبتركيز 2% الى الوسط المذكور والتي شملت (الاميكالين والارابينوز والسيليبايوز والدكستروز والاسكيولين والفركتوز والكالكتوز والكلوكوز والكلوكونيت واللاكثوز والايونستول والمانتول والمليبايوز والرافينوز والرامينوز والرايبوز والسالسين والسوربتول والسكروز والتريهاوز والزايوز). بعد ان ضبط الاس الهيدروجيني بحدود 6.2 عقم الوسط بالمؤصدة على درجة حرارة 100 م°، ويذكر ان سكر (الزايوز) عقم بالترشيح باستخدام مرشحات Millipore قطر فتحاتها 0.22 مايكرومتر قبل اضافته الى الوسط المعقم مسبقا بالمؤصدة (Cowan, 1974).

3-1-6-8 وسط إنتاج الاندول من التربتوفان

حضر ماء الببتون الحاوي على 2% Tryptone و0.5% NaCl وبعد ان ضبط الأس الهيدروجيني على 7.2 وزع على انابيب اختبار بحجوم 10 مل وعقمت بالمؤصدة (Harrigan and McCance, 1976).

3-1-6-9 وسط الجيلاتين Gelatin Media

حضر الوسط بإضافة 10 غم من الجيلاتين الى 100 مل من Nutrient broth، ثم ضبط الاس الهيدروجيني الى 7.2 ووزع في أنابيب اختبار بحجم 10 مل لكل منها وعقم بالمؤصدة في حرارة 115 م° لمدة عشرين دقيقة (Atlas et al., 1995).

10-6-1-3 Tryptone soy broth وسط

استعمل الوسط المذكور في (Anonymous (2014) لتنمية البكتريا المطفرة يتكون كل 1 لتر من المواد المذكورة في الجدول (7-3)

جدول (7-3) مكونات وسط Tryptone soy broth

المكونات	غم
Pancreatic digest of casein	17
Enzymatic digest of soybean	3
Sodium chloride	2.5
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5
Glucose	2.5
pH	7.3 ± 0.2 at 25 °C

11-6-1-3 الحليب الفرز Skim Milk

تم الحصول عليه من الاسواق المحلية من انتاج شركة (Regilait/France) واستعمل كوسط لتنشيط المزارع البكتيرية وحضر بنسبة استرجاع 12%، تم تعقيمه عند درجة 121م ولمدة 5 دقائق .
Nonfat dry milk Glucose –Yeast extract لحفظ العزلات (12-6-1-3NGYC) وسط
cysteine (

حضر الوسط من حليب فرز معاد تركيبه بنسبة 12% مواد صلبة واضيف له Glucose بنسبة 2% و Yeast extract 1% و L-cysteine hydrochloride 0.05% وعقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121م لمدة 5 دقائق (Lankaputhra and Shah, 1995).

2-3 طرائق العمل

1-2-3 طريقة العزل

عزلت بكتريا *L.plantarum* من المخلل المذكور في الفقرة (4-1-3) بينما عزلت بكتريا *P.acidilactici* من مخلل الباميا، سحب 3 مل من المحلول الملحي مع قطع جزء رقيق من الخضار

ووضعه في طبق بتري معقم، هرس الخليط ونقل 1 مل منه الى وسط MRS broth وحضن في درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة، نقل 1 مل من النمو الى أنابيب تحتوي على الوسط MRS broth بحجم 9 مل، كررت هذه الخطوة ثلاث مرات، عمل تخافيف من ماء الببتون 10⁻¹، سحب 1 مل من التخافيف وزرع في وسط MRS agar تحت ظروف لاهوائية محكمة بأستعمال anaerobic jar مع توفير مصدر كربوني (بيكاربونات الصوديوم بشكل سائل في أكياس مفتوحة) وحضن في درجة حرارة 37 °م لمدة 72 ساعة.

3-2-2 الفحص المظهري

أنتختب المستعمرات النامية سطحياً على طبق MRS agar ذات الصفات المظهرية التي امتازت بكونها (محدبة، بيضاء اللون، لماعة، غير لزجة، ذات حافات متساوية).

3-2-3 الفحص المجهرى

صبع جزء من المستعمرات النامية (المفردة والمتلاصقة) بطريقة كرام وفحصت البكتريا تحت المجهر (المفردة والمزدوجة وذات السلاسل القصيرة) وكانت البكتريا موجبة لصبغة لكرام، متساوية في الحجم وبنهايات دائرية متساوية، نقل جزء من المستعمرات النامية وحفظ في أنابيب تحتوي على الوسط MRS agar بشكل (Slant) تمهيداً لاجراء الفحوص الكيموحيوية.

3-2-4 الفحوص الكيموحيوية Biochemical tests

3-2-4-1 فحص الكاتليز Catalase Test

زرعت العزلات قيد الدراسة كلا على انفراد على وسط MRS agar في ظروف لاهوائية بدرجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة، نقلت بعدها مسحة من مستعمرات البكتريا المتكونة بوساطة الناقل الجرثومي إلى شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة، واضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين المحضر كما في الفقرة (3-5-1-5) مزج جيداً ولوحظ ظهور الفقاعة الغازية يُعد دليلاً على إيجابية الفحص (Andrews, 1997).

3-2-4-2 فحص اختزال النترات Nitrate Reduction

لقت الأنابيب الحاوية على وسط Nitrate peptone المعقم والمحضر بإذابة 0.2 غم نترات البوتاسيوم KNO₃ في 100 مل ماء الببتون 0.1% بعزلات البكتريا كلا على انفراد وحضنت

الأنابيب في درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة. أضيف 1 مل من محلول A و 1 مل من محلول B المحضران بالفقرة (3-1-5-6) لكل أنبوبة اختبار واستدل على سلبية التفاعل من عدم تلون الأنابيب بلون أحمر كدليل على عدم قابلية العزلات على اختزال النترات إلى نترات (Andrews, 1997).

3-4-2-3 فحص استهلاك السترات Citrate Utilization test

لقت العزلات ذات عمر 24 ساعة على وسط استهلاك السترات المذكور بالفقرة (3-1-6-5) ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 °م لمدة 7 أيام. تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق يعد نتيجة موجبة (Harrigan and McCance, 1976).

3-4-2-3 فحص إنتاج الغاز Gas production

زرعت أنابيب اختبار سعة 10 مل والحاوية على الوسط الزرعي MRS السائل والموضوع في كل منها أنبوبة درهام Durham tube بالمزارع البكتيرية للعزلات بعمر 24 ساعة بنسبة 1% وحضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة وملاحظة تكون فقاعات غازية محتجزة دلالة على إيجابية الفحص (Andrews, 1997).

3-4-2-3 فحص تكوين الامونيا من الارجنين Ammonia from arginine test

لقت الأنابيب الحاوية على الوسط المحضر بالفقرة (3-1-6-6) بالعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة وحضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة. أخذ 1 مل من الوسط الملقح ووضع في أنبوبة اختبار وأضيف إليه 1 مل من كاشف نسلر المحضر بالفقرة (3-1-5-2)، ثبات اللون البرتقالي وعدم تغيره الى اللون الأحمر دليل على عدم قابلية العزلات على إنتاج الأمونيا من الأرجنين (Harrigan and McCance, 1976).

3-4-2-3 فحص انتاج الاندول من التريبتوفان

لقت الأنابيب الحاوية على وسط التريبتون المحضر بالفقرة (3-1-6-8) بالعزلات قيد الدراسة باستعمال الناقل الجرثومي وحضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة 3 أيام، بعد انتهاء مدة الحضانة اضيف 0.5 مل من كاشف كوفاكس الى الانابيب ورجت برفق ثم تركت بشكل مستقيم لملاحظة تكون حلقة حمراء دلالة على ايجابية الفحص (Harrigan and McCance , 1976).

3-2-4-7 فحص تحلل الجيلاتين

لقت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين المحضر بالفقرة (3-1-6-9) بالعزلات المنشطة لمدة 24 ساعة وبنسبة لقاح 1% وحضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة 7 أيام، وضعت بعدها في الثلاجة لمدة 30 دقيقة وتمت ملاحظة قدرة العزلات على اسالة الجيلاتين دليل على قدرة العزلات على إنتاج انزيم الجيلاتينيز (Atlas et al , 1995) .

3-2-4-8 فحص تخمير الكاربوهيدرات

لقت الأنابيب الحاوية على وسط التخمير المذكور في الفقرة (3-1-6-7) بمزروع البكتريا المنشطة بعمر 24 ساعة وبنسبة 1%، وحضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة (3-5) أيام في ظروف لاهوائية، أخذت القراءات من خلال تغير لون الدليل من الارجواني الى اللون الاصفر وهذا ناتج عن إنخفاض الرقم الهيدروجيني الذي يُعد دليلاً على إيجابية التفاعل (Cowan , 1974).

3-2-5 طرق حفظ العزلات

3-2-5-1 الحفظ لمدة أسبوع

واستخدمت الطريقة التي ذكرها (Lankaputhra & Shah (1995) والتي شملت تلقيح العزلات على وسط NGYC المحضر في الفقرة (3-1-6-12) بنسبة 2% والحضن في درجة حرارة 37°م لمدة 18-24 ساعة، ويتم التنشيط أسبوعياً بعد الحفظ في درجة حرارة الثلاجة.

3-2-5-2 الحفظ بالتجميد طويل الأمد

لقت وسط الحليب الفرز المجفف والمعاد تركيبه بنسبة 12% ثم الحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة ثم اضافة 10% كليسروول معقم والحفظ بالتجميد.

3-2-6 النمو في الحليب وإنتاج الحموضة

درست قابلية العزلات على النمو في الحليب وانتاج الحامض وذلك بتلقيح الانابيب الحاوية على الحليب الفرز المعاد تركيبه بنسبة 12% بالعزلات البكتيرية المنشطة على درجة حرارة 37 °م

لمدة 18 ساعة وبنسبة لقااح 1% كلاً على انفراد، قدرت الحموضة الكلية في نماذج الحليب بعد الحضان باستخدام الطريقة المذكورة من قبل (Desjardins *et al.*, 1990) وذلك بالتسحيح مقابل القاعدة NaOH بتركيز 0.1 عياري بوجود كاشف الفينولفثالين لحين الوصول إلى نقطة التعادل للكاشف وظهور اللون الوردي، قدرت النسبة المئوية للحموضة الكلية على أساس حامض اللاكتيك.

$$\text{الحموضة الكلية (\%)} = \frac{\text{مل قاعدة } \times \text{ع } \times \text{الوزن المكافئ للحامض}}{\text{وزن العينة (غم)}} \times 100$$

7-2-3 مقاومة الحموضة Acid Tolerance

تم تنشيط العزلات البكتيرية قيد الدراسة في وسط MRS Broth بدرجة حرارة 37 °م لمدة (24) ساعة، تم نقل 1 مل منها باستخدام Micropipette الى أنابيب تحتوي على الوسط الزرعى MRS Broth (9 مل) في pH 4 و 3 و 2 و 1.5 (تم تعديل الـ pH بواسطة 0.1 عياري HCl أو NaOH) وحضنت بمدد 0 و 1 و 2 و 3 ساعة بدرجة حرارة 37 °م، نقل 0.1 مل من كل أنبوبة الى وسط MRS Agar وزرعت بواسطة L-shape، حضنت في ظروف لاهوائية على درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة، وتم عد البكتريا الحية (Erkkila and Petaja, 2000).

8-2-3 مقاومة أملاح الصفراء Bile salt Tolerance

لتقدير مدى قدرة البكتريا على مقاومة أملاح الصفراء تمت تنمية العزلات قيد الدراسة في وسط MRS Broth على حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة من دون إضافة أملاح الصفراء، ثم نقل 1 مل منها ولقحت في وسط MRS Broth يحتوي على 0.1 و 0.2 و 0.3 % وزن/ حجم من أملاح الصفراء (Oxgall (Difco, USA)، نقل 0.1 مل من هذه التراكيز الحاوية على أملاح الصفراء الى طبق بتري يحتوي على الوسط الزرعى MRS Agar بعد مرور 0 و 1 و 2 و 3 ساعة، حضنت في ظروف لاهوائية بدرجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة وتم عد البكتريا الحية (Succi *et al.*, 2005).

9-2-3 تحضير راشح المزارع البكتيرية: Cell Free supernatants (CFS)

أُتبعَت الطريقة التي ذكرها حسين (2004) إذ تمت تنمية العزلات والسلالة القياسية البكتيرية كلا على انفراد في وسط الحليب الفرز المعاد تركيبه بنسبة 10% مواد صلبة كلية وحضنت في درجة حرارة 37° م لمدة 24 ساعة، أُجريت بعدها عملية الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة 1 دقيقة لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 4° م ثم فصل الراشح وعقم بالترشيح باستخدام المرشح البكتيري ذو فتحات 0.45 مايكروميتر.

3-2-9-1 فحص التضاد

تم تقدير الفعالية التضادية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة بطريقة الحفرة Well assay المذكورة من قبل حسين (2004) إذ نقل 20 مل من كل من الوسطين الزرعيين MRS الصلب و الوسط M17 الصلب (الخاص ببكتريا *Streptococcus thermophilus*) إلى أطباق بتري بدرجة حرارة 45° م ثم اضيف 0.2 مل بمقدار (10^8 خلية 1 مل) من المزارع النشطة للبكتريا قيد الدراسة كلا على انفراد وخلطت جيداً وتركت لتتصلب لمدة ساعة ثم ثقبت باستخدام آلة تثقيب الفلين وكان قطر الحفرة 5 ملم، نقل 0.05 مل من راشح المزرعة البكتيرية (CFS) كلا على انفراد إلى هذه الحفر ووضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 37° م لمدة 18 ساعة تحت الظروف اللاهوائية لبكتريا *Lactobacillus* وظروف هوائية لبكتريا *S. thermophilus*، كررت الخطوات ثلاث مرات وبمعدل أربع حفر لكل معاملة وكانت الأطباق المعدة بمعدل مكررين.

3-2-10 تقدير الكولستروول

3-2-10-1 تحضير وسط (MRS-EY) MRS-Egg yolk

حضر الوسط حسب الطريقة المذكورة من قبل Francey and Elias (1968) والشيخ ظاهر (1999).

3-2-10-2 تحضير صفار البيض

A- استعمل بيض طازج بعمر 12-24 ساعة.

B- غسلت قشرة البيض بالكحول ونشفت ، ثم كسرت قشرة البيض بقضيب زجاجي معقم وتم استبعاد اغلب بياض البيض واهمل .

C- نقل صفار البيض على ورقة ترشيح معقمة ودور على الورق للتخلص من بقايا البياض

البيض.

- D- ثقب الصفار باستعمال إبرة معقمة وانزل الصفار في وعاء معقم .
- E- تم تقدير العدد الكلي للحياء المجهرية في صفار البيض وذلك بزرع أنموذج له في وسط الاكار المغذي بهدف التأكد من خلوه من الاحياء المجهرية .

3-10-2-3 تحضير وسط MRS-EY السائل

- A- حضر وسط MRS السائل وعقم في انابيب وبججم ثابت معروف .
- B- أضيف إلى وسط MRS السائل حجم مكافي من صفار البيض بعد نقله بحقنة معقمة .
- C- لقمح وسط MRS-EY بججم 1% من مزروع بكتريا *Lactobacillus* وحضنت الانابيب في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، استعمل فضلاً عن احدها من دون لقاح وعد كأنبوب سيطرة.
- D- قدرت نسبة الكولسترول في انبوب السيطرة والانابيب الملقحة.

3-10-2-4 تقدير نسبة الكولسترول

- قدرت نسبة الكولسترول في جميع الاوساط التي استعملت لفحص قدرة بكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* في تقليل نسبة الكولسترول على وفق الطريقة التي ذكرها (Francey and Elias 1968) وعلى النحو الاتي :

- A- أضيف 0.1 مل من كل مزرعة الى 1.9 مل من الكحول الايثيلي 95% مع الرج لمدة 15 ثانية .
- B- أخضع الخليط الى النبذ المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .
- C- أخذ 0.5 مل من الرائق واطيف اليه 2 مل من كلوريد الحديدك المحضر باضافة 100 ملغم من كلوريد الحديدك في 100 مل من خلاص الاثيل، حفظ بعدها المحلول في قنينة معقمة .
- D- أضيف لكل أنبوية 2 مل من حامض الكبريتيك المركز على شكل قطرات بحيث اضيفت ببطئ على جدار الانبوية مع استمرار الرج لمدة 5 ثواني .
- E- قدرت الكثافة الضوئية في جهاز التحليل الطيفي (Spectrophotometer) بعد تبريد الانابيب الى درجة حرارة الغرفة وعلى طول موجي 580 نانومتر .
- F- حضر محلول المقارنة بأخذ 0.1 مل من الماء المقطر بدلا من المزرعة مع اجراء الاضافات نفسها المذكورة آنفاً.

G- حضر محلول الكولسترول القياسي باذابة 200 ملغم من الكولسترول النقي في 100 مل من الكحول الايثيلي 95%، ثم اخذ 1 مل من الحلول القياسي واكمل الحجم الى 20 مل بالكحول نفسه، ثم اخذ 0.5 مل من المحلول الاخير واضيف له الاضافات السابقة ابتداء من الخطوة B .

H- قدرت نسبة الكولسترول في الوسط المستخدم (ملغم / مل) باستخدام المعادلة الاتية:

$$2 \times \frac{\text{قراءة الأتموذج} - \text{قراءة محلول المقارنة}}{\text{قراءة المحلول القياسي} - \text{قراءة محلول المقارنة}} = \text{كولسترول ملغم / 1 مل}$$

النسبة المئوية لانخفاض الكولسترول في وسط النمو =

$$100 \times \frac{\text{كمية الكولسترول في الوسط قبل نمو البكتريا} - \text{كمية الكولسترول في الوسط بعد نمو البكتريا}}{\text{كمية الكولسترول في الوسط قبل نمو البكتريا}}$$

3-2-11 النمو في درجات الحرارة المختلفة

3-2-11-1 النمو في درجات الحرارة المختلفة في الوسط السائل MRS Broth

لقتح الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي MRS Broth بالمزارع البكتيرية قيد الدراسة والمنشطة، حضنت في درجتي حرارة 15 و 45 °م لمدة 3-5 أيام في ظروف لاهوائية مع متابعة تكون العكارة أو الراسب (Andrews, 1997).

3-2-11-2 النمو في درجات الحرارة المختلفة في الوسط الصلب MRS Agar

أخذ 100 مايكرو لتر من المزارع البكتيرية المنشطة وزرعت في أطباق بتري تحوي على الوسط الزرعي MRS Agar، حضنت في درجة حرارة 15 و 45 °م لمدة 3-5 أيام في ظروف لاهوائية مع متابعة النمو في الاطباق (Andrews, 1997).

3-2-12 إستخلاص الحامض النووي DNA Extraction

3-2-12-1 أستخلاص DNA البكتريا قيد الدراسة

أستخلص DNA العزلات البكتيرية بواسطة عدة Bacteria Genomic DNA Kit
Automted Nucleic Acid Extraction بجهاز Exi prep™ (BIONEER, Korea)
system

- تم تنشيط البكتريا على وسط MRS Broth على درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.
- عوملت خلايا بكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* بـ (TE buffer، PBS 1x، Lysozyme، Bacterial genomic kit) كونها موجبة لصبغة كرام.
- نقل 1 مل من البكتريا المنشطة الى أنبوية Eppendorf.
- أضيفت مادة PBS الى الأنبوية لغسل الخلايا البكتيرية، ثم مزج بجهاز Vortex لمدة 10 ثواني، عرضت الى الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 18748.9 g، تم التخلص من الجزء العلوي وأعيدت العملية 3 مرات وملاحظة تجمع الخلايا اسفل الأنبوية.
- أضيف الى الأنبوية 200 µل من البفر المحضر بالفقرة (3-1-5-11).
- أضيف 20 µل لايسوزايم 50 mg/ml، ثم الحضان في درجة 37 °م لمدة ساعة واحدة.
- عرضت المكونات الى الطرد المركزي لمدة 5 دقائق على سرعة 18748.9 g.
- تمت إزالة الجزء العلوي وأضيف 200 µل من البفر TE وعرض الى المزج بجهاز Vortex.
- استخدمت أداة لعمل عدد من الثقوب في (Kit) الاستخلاص وحسب عدد النماذج.
- تم نقل 200 µل من العينة الى المكان المخصص لوضعها.
- تم وضع Buffer 1، Buffer 2، محلول الغسل، مرشحات التصفية جميعها في المكان المخصص لهم في جهاز الاستخلاص.
- وضع وعاء خاص لجمع فضلات السوائل الناتجة عن عمليات الغسل والاستخلاص في المكان المخصص لها.
- بعد التأكد من وضع جميع المحتويات، تمت برمجة عمل الجهاز حسب التعليمات المحددة من الشركة المجهزة والخاصة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام حسب الشفرة (108).

- بعد أتمام عملية الاستخلاص وحسب الوقت المحدد تم حفظ النماذج بدرجة حرارة 20 °م لحين الأستعمال.

3-2-12-2 تحضير هلام جهاز الترحيل الكهربائي للكشف عن جزيئات الحامض النووي:
 أستخدمت حسب الطريقة المذكورة من قبل (Sambrook and Russell, 2001)
 المواد المستعملة

- **Tris-Borate-EDTA buffer (TBE), Agarose, Ethidium bromide, Bromophenol blue**
 تحضير الهلام

- يوضع 25 مل من TBE buffer في دورق.
- يضاف له 0.2 غم من الاكاروز بنسبة 0.8%.
- يسخن الدورق حتى الغليان.
- تبرد المحتويات الى حرارة 50-60 °م، ثم تضاف 0.1 مايكرو لتر من مادة Ethidium bromide المحضر بالفقرة (3-1-5-13).

الصب الافقي لهلام الاكاروز

- تم تحضير جهاز الترحيل الكهربائي تمهيداً لعملية الصب ثم وضعت الامشاط في احدى نهايتي وعاء الصب.
- يتم صب هلام الاكاروز ويترك ليبرد لدرجة حرارة الغرفة.
- تزال الامشاط بحذر ويدار موضع وعاء الترحيل تمهيداً لربط الأقطاب الكهربائية.
- يربط القطب السالب في جهة المشط والقطب الموجب الى الجهة الأخرى.
- يملأ وعاء الترحيل المعزول بمادة 1x TBE حتى يصل ارتفاعه (3-5) ملم فوق سطح الهلام.

حقن أنموذج DNA والترحيل

- يخلط 9 µل من DNA مع 3 µل من Bromophenol blue.
- يحقن الأنموذج في الموضع المخصص له للترحيل.
- يضبط التيار الكهربائي على 60 فولت حتى يتم ترحيل الصبغة الى نهاية الهلام.

- يكشف عن حزم DNA عن طريق نقل الهلام الى جهاز الاشعة فوق البنفسجية ويتم تصوير الحزم الظاهرة بصورة مباشرة.

13-2-3 تشخيص البكتريا (*16SrDNA*)

تم تشخيص البكتريا قيد الدراسة باستخدام تقنية (PCR) polymerase chain reaction لتضخيم *16SrDNA* الخاصة بالبكتريا وحسب البرايمرات المصممة في شركة (BIONEER - Korea) اللازمة (Miyoshi et al., 2005) وكما في الجدول (8-3)

جدول (8-3) برايمرات تشخيص جين *16SrDNA* للبكتريا قيد الدراسة

Primers		Sequence	Length	Optimizing TA ^{^^}
27	Forward	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA- 3'	19	51.8°C
1492	Reverse	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'	19	51.8°C

تحضير العينة

أستخدمت المواد حسب المشار اليها في الجدول (9-3) لتضخيم *16SrDNA* في تقنية

PCR

جدول (9-3) المواد وكمياتها اللازمة لتضخيم جين *16SrDNA* (50 مايكرو لتر) في تقنية PCR

No	Reagent	Volume
1	DNA template	10 µl (30 ng)
2	Forward primer	2 µl (20 pmol)
3	Reverse primer	2 µl (20 pmol)
4	Go Taq Green Master Mix. 2x	25 µl

5	Nuclease-free water	11 µl
Total volumes		50 µl

برنامج تضخيم الجين *16SrDNA*

حددت ظروف البرنامج المعد للتضخيم حسب الجدول (10-3)

جدول (10-3) ظروف برنامج تضخيم جين *16SrDNA* في تقنية PCR

Steps	Temperature	Time	No. of cycles
Initial denaturation	95°C	2min	1
Denaturation	95°C	30 Sec	30
Annealing	51.8°C	45 Sec	
Extension	72°C	1.5 min	
Final extension	72°C	5 min	1
Cooling	4 °C	∞	-

تحضير هلام الترحيل الكهربائي للكشف عن جين *16SrDNA*

المواد المستعملة

TBE buffer (1x) , Agarose , Ethidium bromide, DNA ladder 1K

تحضير الهلام

- اتبعت الخطوات نفسها المذكورة بالفقرة (2-12-2-3) تحضير هلام الكشف عن DNA،

باستثناء استخدام أكاروز 0.5 غم تركيز 2%.

الصب الافقي لهلام الاكاروز

- نفس خطوات الفقرة (2-12-2-3)

حقن ناتج PCR والترحيل

- يحقن 6μ من DNA ladder (100) bp الى الموقع الأول في مكان حقن العينة.

- يضاف 5μ من ناتج PCR.

- يضبط التيار الكهربائي على 60 فولت لمدة 1.5 ساعة حتى يتم ترحيل الصبغة الى نهاية

الهلام.

- يكشف عن حزم جين bp (1500) *16SrDNA* عن طريق نقل الهلام الى جهاز الاشعة

فوق البنفسجية ويتم تصوير الحزم الظاهرة بصورة مباشرة.

قراءة نتاجات القواعد النيتروجينية

تحضر العينة تمهيداً لارسالها الى شركة Macrogen الكورية وحسب الطريقة التي ذكرها

(Barker *et al.*, 2005)

المواد المستعملة

Polyethylene glycol , Chilled ethanol (70%) , Nuclease free water

- تجرى عملية تنقية نواتج PCR بمادة PEG لإزالة المواد التي لم ترتبط و / أو بقايا

(Embley, 1991) Nucleoside triphosphate (dNTPs).

تحضير العينة

- ينقل 30μ من ناتج PCR (*16SrDNA*) الى أنبوبة ابندروف أخرى سعة 1.5 مل.

- يضاف 60 مل من (PEG 30%) الى الانبوبة وتعرض الى المزج بجهاز vortex.

- تحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 3-4 ساعات أو 4 °م لمدة 24 ساعة.

- تعرض الأنبوبة الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 18748.9 g لمدة 20 دقيقة.

- تزال الطبقة العليا بوساطة micropipette والتي تحوي على أجزاء من DNA على شكل

هلامي.

- يضاف 500μ من الايثانول 70% وتعرض مرة أخرى الى الطرد المركزي بسرعة

18748.9 g لمدة 10 دقائق.

- يزال الجزء العلوي وتكرر الخطوة مرة أخرى بأضافة الايثانول 70% وتعرض للطرد المركزي بسرعة 18748.9 g لمدة 10 دقائق.

- يزال الجزء العلوي ويعرض المتبقي الى التجفيف بسحب الهواء لمدة 30 دقيقة.

- يضاف الى انبوبة أبندروف 30μ من Nuclease free water ويحفظ في درجة حرارة 4° لمدة 24 ساعة.

الترحيل الكهربائي للعينة بعد التنقية

- يحضر الهلام بالخطوات نفسها المذكورة في الفقرة (2-12-2-3) مع ملاحظة ظهور حزمة واحدة في اثناء الكشف بالاشعة فوق البنفسجية نتيجة تنقية العينة.

التشخيص

- تم معالجة التتابعات و تم تشخيصها بواسطة برنامج Blast.

3-2-14 التطهير

جرت عملية التطهير للبكتريا قيد الدراسة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية وحسب الطريقة والمحورة من *Sudi et al., (2008)* والتي تم تحويلها

تحضير العينة

- نشطت البكتريا على وسط MRS broth بدرجة حرارة 37° لمدة 24 ساعة.

- أعيدت عملية التنشيط في 100 مل من وسط Tryptone Soy Broth (TSB) على

درجة حرارة 37° لمدة 24 ساعة بحيث تكون الكثافة الضوئية بمقدار Optical Density (O.D (600).

- أجريت عملية الطرد المركزي للعينة بسرعة 2766.6 g لمدة 15 دقيقة.

- غسل الراسب البكتيري لمرتين في 100 مل من محلول بارد ومعقم لكوريد الصوديوم النقي بتركيز 0.9%.

- نقل 8 مل من الراسب البكتيري الى طبق بتري في ظروف معقمة.

- عرض الطبق وهو مفتوح الى الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 254 nm على مسافة 50 سم وبأوقات مختلفة 20 و 25 و 30 و 35 و 60 ثانية.

- عرضت العينة للطرء المركزي مباشرة بسرعة 2766.6 g لمدة 15 دقيقة، سحب الجزء العلوي للسائل.

- وضعت العينة في أنابيب معتمدة، أضيف الى كل عينة 10 مل من الوسط (TSB) وحضن في درجة حرارة 37 °م على التوالي لمدة 18 ساعة.

- نقل 1 مل من النمو الى 9 مل من محلول كلوريد الصوديوم النقي تركيز 0.9%، نقل 0.1 مل منها الى وسط MRS Agar وزرعت بالنشر بوساطة (L-shape)، حضنت في درجة حرارة 37 °م على التوالي لمدة 24 ساعة وعزلت البكتريا المطفرة.

3-2-15 التضميم العشوائي متعدد الاشكال RAPD بتقنية PCR

استخدم برايمر RAPD – PCR جدول (3-11) على وفق الطريقة المتبعة من *Spano et al.*, (2002)

جدول (3-11) برايمر تشخيص RAPD-PCR

Primers	Sequence	Length	Optimizing TA
1283	5'-GCGATCCCCA-3'	10	36°C

تحضير العينة

أستخدمت المواد حسب المشار اليها في الجدول (3-12) لتضميم RAPD في جهاز PCR إذ استخدم البرايمر بتركيز (30 pmol) والذي حضر من إضافة (7µl) من Nuclease free water الى (3mg) من البرايمر PCR

جدول (3-12) المواد وكمياتها المستخدمة للتضميم بطريقة RAPD (20µl) في جهاز PCR

Reagent	Volume
primer	1.5 (30 pmol)
Go Taq Green Master Mix. 2x	5 µl
DNA template	2.5 µl
Free nuclease water	11 µl
Total volume	20 µl

ظروف جهاز PCR اللازم لتضميم RAPD

استخدمت الطريقة التي اتبعتها (Akopyanz *et al.*, 1992) المذكورة في الجدول (3-3)

(13).

جدول (3-13) ظروف برنامج تضخيم RAPD في جهاز PCR

Steps	Temperature	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95°C	3 min.	1
Denaturation	94°C	1 min.	45
Annealing	36°C	1 min.	
Extension	72°C	2 min.	
Final extension	72°C	5 min.	1

الترحيل الكهربائي للعينة بعد التنقية

يحضر الهلام بالخطوات نفسها المذكورة في الفقرة (3-2-12-2) مع ملاحظة ظهور مجموعة من الحزم عند استخدام الأشعة فوق البنفسجية للاظهار.

تحليل البيانات

- حددت أعداد ومواقع الحزم الناتجة من الترحيل عند كل مدة تطهير (20 و 25 و 30 و 35 و 60) ثانية مع العزلة قبل التطهير على أساس مقارنة المسافات مع بعضها وأستناداً الى حزم Ladder القياسي المستخدم.

- استخدمت الطريقة الحسابية لقراءة الحزم الناتجة من الترحيل Unweighted Pair Group

Method with Arithmetic mean (UPGMA) بواسطة خوارزمية مقترحة ومعدلة من Garcia-

Vallu and Puigo (1999;2009).

- تمت مقارنة حزم نتائج RAPD لكل عينة (Chansiripornchai *et al.*, 2000)

وحسبت الحزم المتشابهة بطريقة رياضية من خلال المسافة بين الحزم بدءاً من مكان وضع العينة "0.00" وتم عمل Dendrogram من خلال القيم الناتجة لدراسة التباين الوراثي بين النماذج المختلفة أو المرتبطة ارتباطاً وثيقاً.

3-2-16 تصنيح منتجات الالبان المتخمرة

3-2-16-1 مصدر الحليب

أستعمل حليب بقري محلي خام كامل الدسم من حقل ابقار في محافظة البصرة.

- تقدير نسبة المواد الصلبة الكلية: اتبعت الطريقة الواردة في **A.O.A.C.(1970)** .
- تقدير نسبة الدهن الكلية: اتبعت طريقة بابكوك وكما وردت في **Newlander and Atherton (1964)**
- تقدير نسبة البروتين الكلية: اتبعت طريقة كدال وكما وردت في **A.O.A.C.(1970)** .
- تقدير الحموضة الكلية للحليب، أجري فحص الحموضة الكلية على وفق الطريقة التي ذكرها **Desjardins et al. (1990)** والمذكورة في الفقرة (3-2-6).
- تقدير الأس الهيدروجيني للحليب باستخدام جهاز pH-meter
- تقدير نسبة الكولسترول

قدرت نسبة الكولسترول في الحليب كما يأتي:

أ- استخلص الدهن من الحليب باتباع طريقة ماجونير وكما ذكرها **Joslyn (1970)** .

ب- اجريت عملية الصوبنة حسب الخطوات الاتية :

- وزن (2) غم من الدهن المستخلص في دورق مخروطي جاف .
- اضيف (50) مل من KOH الكحولي (0.5) عياري الى الدورق المخروطي .
- سخنت محتويات الدورق الى درجة حرارة الغليان ولمدة ساعة .
- بردت محتويات الدورق وخفف مزيج التفاعل بالماء .
- استخلص الخليط عدة مرات مع المذيب العضوي اثير ايثر .
- استخلصت الستيروولات بوساطة المذيب العضوي اثير ايثر وفصلت عن المزيج .

ثم استخدمت الطريقة اللونية التي ذكرها (**1968**) **Francey and Elias** لتقدير

الكولسترول المذكورة في الفقرة (3-2-10-4) .

3-2-16-2 إعداد البادئ:

أستعملت طريقة تحضير البادئ قبل عملية التطفير وبعد لكل من عزلات البكتريا

L.plantarum و *P.acidilactici* وحسب الطريقة التي ذكرها الراوي (2005)، إذ أستخدم حليب

فرز مجفف ماركة ريجيلية معاد تركيبة بنسبة استرجاع 12%، عقم بدرجة حرارة 121 °م لمدة 5 دقائق، وأستخدمت نسبة لقاح 5%، حضن في درجة 37 °م وأعيدت عملية التنشيط 3 مرات.

3-16-2-3 تحضير المتخمّر اللبني

وضع الحليب البقري في عبوات بلاستيكية بحجم 50 مل وأغلقت بإحكام وعقمت بالمؤصدة على درجة حرارة 121 °م لمدة 5 دقائق وحسب الطريقة التي ذكرها الراوي (2005)، بردت العبوات الى درجة حرارة 37 °م وأضيف البادئ المحضّر بالفقرة (3-16-2-2) بنسبة 5% (حجم / حجم) ثم حضنت العبوات في درجة 37 °م حتى التخثر، ثم حفظت العبوات الحاوية على اللبن المتخمّر لمدة 21 يوماً بدرجة 4 °م وأجريت الفحوص الآتية:

- تقدير الحموضة والاس الهيدروجيني حسب المذكور بالفقر (3-16-2-1)
- تقدير نسبة الكولسترول وللمدد الزمنية 1 و 7 و 14 و 21 يوم حسب المذكور بالفقرة (3-16-2-1)

3-16-2-4 حساب العدد الكلي للبكتريا

حسب العدد الكلي لكل من البكتريا الحية *L.plantarum* و *P.acidilactici* في المنتج اللبني المتخمّر وذلك باخذ 1 مل من المنتج المحضّر الحاوي على العزلات المطفرة وغير المطفرة وعمل تخافيف عشرية متسلسلة منها، واتبعت طريقة الصب بالاطباق (Pour-Plate) المذكورة من (Dave and Shah (1996) باستعمال الوسط الزرعّي MRS agar، حضنت الاطباق في ظروف لاهوائية بدرجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة، وبعد انتهاء مدة الحضن تم حساب اعداد المستعمرات النامية باستعمال جهاز عد المستعمرات (Colony counter) للمدد الزمنية 1 و 7 و 14 و 21 يوماً، وتم حساب العدد البكتيري بالضرب بمقلوب التخفيف العشري .

3-17-2-3 التقييم الحسي للمنتجات

جرى التقييم الحسي للمنتجات المصنعة من العزلات قيد الدراسة الحالية استناداً الى الطريقة التي ذكرها (Nelson and Trout (1951) المحورة من قبل الشيخ ظاهر (1999) بعد اجراء بعض التحويرات عليها لتقييم المنتج المصنع من البكتريا المطفرة بالتشجيع وجرت الاستبانة من أساتذة

متخصصين في علوم الأغذية والتقانات الاحيائية وفق الاستمارات المذكورة في جدول (3-14) و (3-15) و (3-16).

جدول (3-14) استمارة الاستبيانة للعزلات المحلية والقياسية لبكتريا *L.plantarum* و

P.acidilactici

الملاحظات	الدرجة الممنوحة	الدرجة العليا	الصفة
		35	الطعم والنكهة
		30	القوام والنسجة
		15	أعداد البكتريا الحية
		10	الحموضة
		10	المظهر
		100	المجموع

جدول (3-15) استمارة الاستبيانة لبكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* المطفرة بالأشعة

فوق البنفسجية

الملاحظات	الدرجة الممنوحة	الدرجة العليا	الصفة
		35	الرائحة
		30	القوام والنسجة
		15	أعداد البكتريا
		20	المظهر
		100	المجموع

جدول (16-3) استمارة الاستبيانة لأعداد الحية للعضلات المحلية والقياسية لبكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* المطفرة بالأشعة

الدرجة	أعداد البكتريا الحية cfu/ml
0	$10^5 - 0$
3	$10^6 - 10^5$
6	$10^7 - 10^6$
9	$10^8 - 10^7$
12	$10^9 - 10^8$
15	$10^{10} - 10^9$

3-2-18 التحليل الاحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي الجاهز (SPSS,1998) في تحليل البيانات باستعمال الحاسبة الالكترونية

باستعمال أقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى معنوية 0.01.

4- النتائج والمناقشة

1-4 عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus plantarum*

يمكن عزل المعززات الحيوية من عدة مصادر (إنسان أو حيوان أو مصدر غذائي) وتكون ذات عمليات معقدة بسبب وجود أنواع من الاحياء المجهرية ذات الأعداد المتباينة والتي لا تكون متساوية من الناحية الكمية والنوعية بسبب الظروف المحيطة أو ظروف العزل أو نتيجة لأسباب متعلقة بالكائن الحي نفسه.

تم تصنيع أنواع مختلفة من المخلاتات بالطريقة العراقية المحلية ومن مصادر نباتية محلية مختلفة طازجة شملت (خيار القثاء والخيار واللهانة والجزر والباميا)، وجرت عملية التخمير تحت ظروف لاهوائية ولمدة أسبوع وفق ما ذكره (Con and Karasu, 2009) عند عزل بكتريا *L.plantarum* من مخلات نباتية مختلفة إذ تم الحصول على 36 عزلة من المعززات الحيوية بعد اجراء الفحوصات التشخيصية المظهرية فضلاً عن بعض الفحوصات المميزة لهذه البكتريا جدول (1-4) ونتيجة لعملية الغرلة تم اختيار عزلة من بكتريا *L.plantarum* لكل من مخلل (خيار القثاء والخيار والباميا والجزر واللهانة) فضلاً عن العينة القياسية.

جدول (1-4) مصادر عزل البكتريا وعدد عزلات *Lactobacillus spp*

عدد العزلات الملتقطة من وسط	رمز العزلة	مصدر العزل
LBS		

6	IRQ12	خيار القثاء
6	CM	الخيار
11	KR	الباميا
4	CT	الجزر
9	BS	اللهانة
مجموع العزلات 36 عزلة		

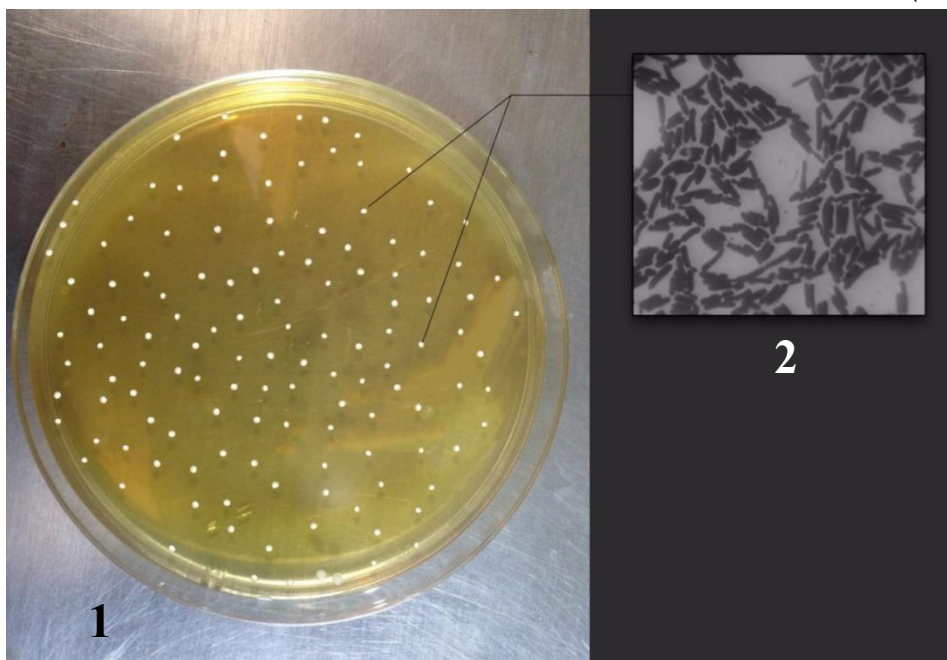
وقد استخدم المصدر النباتي لعزل البكتريا قيد الدراسة بسبب:

1- إحتواء المصدر النباتي تحت ظروف التخمر في اثناء تصنيع المخلل على أعداد محدودة من البكتريا العلاجية مقارنة بالمصدر البرازي وبذلك فأنها تقلل من اجراء عمليات العزل والغزيلة.

2- قدرة المعززات الحيوية على التكيف بسهولة مع المواد الخام المستخدمة في صناعة المخلل وزيادة مدة صلاحية المنتج فضلاً عن اختزال الوقت اللازم لنموها وتنشيطها للأنواع الأخرى من البكتريا المسببة للأمراض الغذائية، وتُعد بكتريا *L.plantarum* المهيمنة في اثناء عملية التخمر لكونها أكثر الكائنات الحية الدقيقة مقاومة للحموضة مقارنة بالأنواع الأخرى (*Daeschel et al.* 1988).

أُستخدمت في اثناء عملية العزل والتنشيط أوساط زرعية مثل MRS Agar و MRS Broth ملائمة لنمو بكتريا *L.plantarum* لاحتوائها على العناصر اللازمة لها (*Holt et al., 1994*; *De man et al., 1960*; *Sharpe et al., 1966*) ونميت بدرجة حرارة 37 °م في ظروف لاهوائية مع توفير مصدر كاربوني في جو الحضان كبيكاربونات الصوديوم، ووجود مادة الصوديوم آزاييد في الوسط لمنع نمو البكتريا السالبة، وإضافة مادة L.Cysteine.HCl لضمان خلو الوسط من الاوكسجين ووجود مادة خلات الصوديوم كعامل انتقاء فضلاً عن الرقم الهيدروجيني المنخفض 5.4 وكل هذه العوامل شجعت من نمو وانتقاء المعززات الحيوية استناداً الى الدراسات السابقة لعزل البكتريا قيد الدراسة الحالية واستعداداً لاجراء الفحوص الكيموحيوية عليها (*De Vos et al., 2009*; *Santos et al., 2003*; *Sanchez et al., 2000*; *Harrigan and McCane, 1976*).

أظهرت الفحوص التشخيصية المجهرية أن البكتريا عصوية الشكل طويلة أو قصيرة، مفردة أو مزدوجة وعلى شكل سلاسل قصيرة، غير متحركة وغير مكونة للأبواغ، موجبة لصبغة كرام وكما في الشكل (1-4)



شكل (1-4) مستعمرات العزلة المحلية لبكتريا *L.plantarum* في وسط (1) MRS Agar (2) تحت المجهر بقوة تكبير 1000x

أما الفحوص الكيموحيوية فقد أظهرت النتائج المذكورة في الجدول (2-4) انها سالبة لفحص الكاتليز نتيجة عدم قدرتها على إنتاج انزيم البيروكسيداز والذي يعمل على تحلل الهيدروجين بيروكساييد الى أوكسجين وماء (Kandler and Weiss, 1986b)، سالبة لفحص اختزال النترات ويعزى ذلك الى عدم توفر انزيم Nitrate reductase والذي يعمل على تحويل النترات الى الامونيا وعليه لا يوفر النترات في الوسط لتفاعلها مع حامض السلفانريك (الكعبي ، 2015 ; De Vos *et al.*, 2009)، غير قادرة على استهلاك السترات، وغير منتجة للغاز، ولاتنتج الأمونيا من الأرجنين، وغير قادرة على إنتاج الأندول من التربتوفان، وغير مسيلة للجيلاتين نتيجة عدم قدرتها على إنتاج انزيم الجلاتينيز، كما أظهرت قدرتها على النمو في درجة حرارة (15) °م وعدم قدرتها على النمو في درجة حرارة (45) °م كونها تقع ضمن مجموعة بكتريا Mesophilic (Kandler and Weiss, 1986b) وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره (الكعبي ، 2015 ; Vasiee *et al.*, 2012, Huidrom *et al.*, 2014 ;

ويوضح الجدول (3-4) نتائج فحص تخمر الكربوهيدرات في وسط MRS broth لأنواع مختلفة من السكريات والتي أظهرت فيها البكتريا قيد الدراسة قابليتها على تخمير سكريات (الكلوكوز، السكروز، الرافينوز، سوربتول، فركتوز، سالتين، إسكولين، رايبوز، كلوكوز مونوهيدريت، رامينوز، ميليبايوز، لاکتوز، دكستروز، مانيتول، سيليبايوز، أميكدولين، تريهالوز)، فيما فشلت هذه البكتريا من تخمير سكر (اينوسيتول، أرابينوز، والزايلوز) عدا بكتريا *L.plantarum* CT, CM التي تمكنت من تخمير سكر الزايلوز والارابينوز على التوالي.

جدول (2-4) نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلات المحلية والسلالة القياسية لبكتريا *L.plantarum*

<i>L.plantarum</i> القياسية	<i>L.plantarum</i> BS	<i>L.plantarum</i> CT	<i>L.plantarum</i> KR	<i>L.plantarum</i> CM	<i>L.plantarum</i> IRQ12	الفحص	التسلسل
+	+	+	+	+	+	صبغة كرام	1
-	-	-	-	-	-	الكاتليز	2
-	-	-	-	-	-	اختزال النترات	3
-	-	-	-	-	-	استهلاك السترات	4
-	-	-	-	-	-	انتاج الغاز	5
-	-	-	-	-	-	انتاج الأمونيا من الارجنين	6
-	-	-	-	-	-	انتاج الأندول من التربتوفان	7
-	-	-	-	-	-	سيولة الجيلاتين	8
-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	النمو في درجات الحرارة 15°/45°م	9

جدول (3-4) نتائج اختبارات تخمير الكربوهيدرات للعزلات المحلية والسلالة القياسية لبكتريا

L. plantarum

<i>L. plantarum</i> القياسية	<i>L. plantarum</i> BS	<i>L. plantarum</i> CT	<i>L. plantarum</i> KR	<i>L. plantarum</i> CM	<i>L. plantarum</i> IRQ12	السكريات	التسلسل
+	+	+	+	+	+	Amygdaline	1
-	+	-	-	+	-	Arabinose	2
+	+	+	+	+	+	Cellibiose	3
+	+	+	+	+	+	Esculine	4
+	+	+	+	+	+	Fructose	5
+	+	+	+	+	+	Galactose	6
+	+	+	+	+	+	Glucose	7
+	+	+	+	+	+	Gluconate	8
-	-	-	-	-	-	Inositol	9
+	+	+	+	+	+	Lactose	10
+	+	+	+	+	+	Mannitol	11
+	+	+	+	+	+	Melibiose	12
+	+	+	+	+	+	Raffinose	13
+	+	+	+	+	+	Rhmnose	14
+	+	+	+	+	+	Ribose	15
+	+	+	+	+	+	Salicine	16
+	+	+	+	+	+	Sorbitol	17
+	+	+	+	+	+	Sucrose	18
+	+	+	+	+	+	Trehalose	19
-	-	+	-	-	-	Xylose	20

وقد جاءت هذه النتائج كطريقة للتعرف على العزلات البكتيرية متفقة مع بينه

; Guetouache and Guessas, 2015; Chowdhury *et al.*, 2012; 2105،(الكعبى)

.(Danova *et al.*, 2005)

4-2 عزل وتشخيص بكتريا *Pediococcus acidilactici*

ظهرت العزلة البكتيرية *P.acidilactici* بصورة مرافقة لوسط نمو بكتريا *L.plantarum* في المخلل العراقي المصنع من الباميا والخيار واللهانة في محلول ملحي تحت ظروف لاهوائية بطريقة تتفق مع **Perez-Diaz et al., (2013); Tamang et al., (2005); Raccach, (1987)**، واختيرت العزلة من وسط مخلل الباميا بعد أن أظهرت قابليتها على تخمير الحليب وإنتاج منتج لبني متخمر، أتبعته طريقة العزل نفسها المتبعة للحصول على بكتريا *L.plantarum* من خلال استخدام أوساط انتقائية من MRS Agar و MRS Broth **(Tamang et al., 2005)**، نمت البكتريا في ظروف لاهوائية على درجة حرارة 37 °م لمدة 48 - 72 ساعة مع توفير مصدر كاربوني في جو الحضان الحاوي على بيكاربونات الصوديوم كما أضيفت مادة صوديوم آزيد لمنع نمو البكتريا السالبة **(Perez-Diaz et al., 2013)**.

الفحوص المظهرية بينت أن البكتريا على شكل مستعمرات دائرية، مسطحة، ذات تجمعات ملتصقة مع بعضها أقطارها كبيرة تتراوح بين 1 - 3 ملم تنمو بكثافة عالية وهذا يتفق مع ما ذكره **Patel and Goyal, (2009)**. أما الفحوص التشخيصية المجهرية أظهرت أن البكتريا كروية الشكل ذات تجمعات عنقودية أو مزدوجة غير متحركة وغير مكونة للأبواغ، في حين أظهرت الفحوص الكيموحيوية جدول (4-4) انها موجبة لصبغة كرام، سالبة لفحص الكاتليز، سالبة لفحص اختزال النترات، غير قادرة على استهلاك السترات، غير منتجة للغاز، تنتج الأمونيا من الأرجنين **(Barros et al., 2001; Tamang et al., 2005)**، غير قادرة على إنتاج الأندول من التريتوفان، غير مسيلة للجيلاتين نتيجة عدم قدرتها على إنتاج انزيم الجلاتينيز، كما أظهرت قدرتها على النمو في درجة حرارة 15 °م وقدرتها على النمو في درجة حرارة 45 °م عند مقارنتها مع بكتريا *L.plantarum* التي لايمكنها النمو بهذه الدرجة، متحملة للملوحة حتى تركيز 10% وجاءت هذه النتائج متوافقة مع مآدرسه **(Mandal et al., 2008); Riebel and Washington, (1990)**.

يوضح الجدول (4-5) قابلية العزلة المحلية *P.acidilactici* على تخمير مجموعة واسعة من السكريات والتي شملت (الكلوكوز، السكروز، الرافينوز، سوربتول، فركتوز، سالتين، إسكولين، رايبوز، كلوكوز مونوهيدريت، رامينوز، ميليبايوز، لاكتوز، دكستروز، مانيتول، سيليبايوز، أميكولين، تريهالوز، ارابينوز، كالاكتوز) في حين لم تتمكن من تخمير سكر الالينوسيتول، وعند مقارنة هذه النتائج مع دراسات سابقة نجد أن هذه العزلة تمكنت من تخمير بعض السكريات التي فشلت فيها بكتريا *P.acidilactici* KP8, KP10 من تخميرها مثل اللاكتوز و الرافينوز و سوربتول و اميكولين و تريهالز و السكروز **(Abbasiliasi et al., 2012)** في حين جاءت متوافقة في كثير من السكريات

مع ما بينه (2005) Tamang *et al.*, في حين اختلف عنه بسكر سكروز و رافينوز و ميليبايوز و سوربتول و اللاكتوز.

جدول (4-4) نتائج الاختبارات البايوكيميائية للعزلة المحلية *Pediococcus acidilactici*

التسلسل	الفحص	<i>Pediococcus acidilactici</i>
1	صبغة كرام	+
2	الكاتليز	-
3	اختزال النترات	-
4	استهلاك السترات	-
5	انتاج الغاز	-
6	انتاج الأمونيا من الارجنين	+
7	انتاج الأندول من التريبتوفان	-
8	سيولة الجيلاتين	-
9	النمو في درجات الحرارة 15°/45°م	+/+

جدول (4-5) نتائج اختبارات تخمير الكربوهيدرات للعزلة المحلية

Pediococcus acidilactici

<i>Pediococcus acidilactici</i>	السكريات	التسلسل
+	Amygdaline	1
+	Arabinose	2
+	Cellibiose	3
+	Esculine	4
+	Fructose	5
+	Galactose	6
+	Glucose	7
+	Gluconate	8
-	Inositol	9
+	Lactose	10
+	Mannitol	11
+	Melibiose	12
+	Raffinose	13
+	Rhmnose	14
+	Ribose	15
+	Salicine	16
+	Sorbitol	17
+	Sucrose	18
+	Trehalose	19
+	Xylose	20

3-4 تشخيص بكتريا *Lactobacillus plantarum* IRQ12 و *Pediococcus*

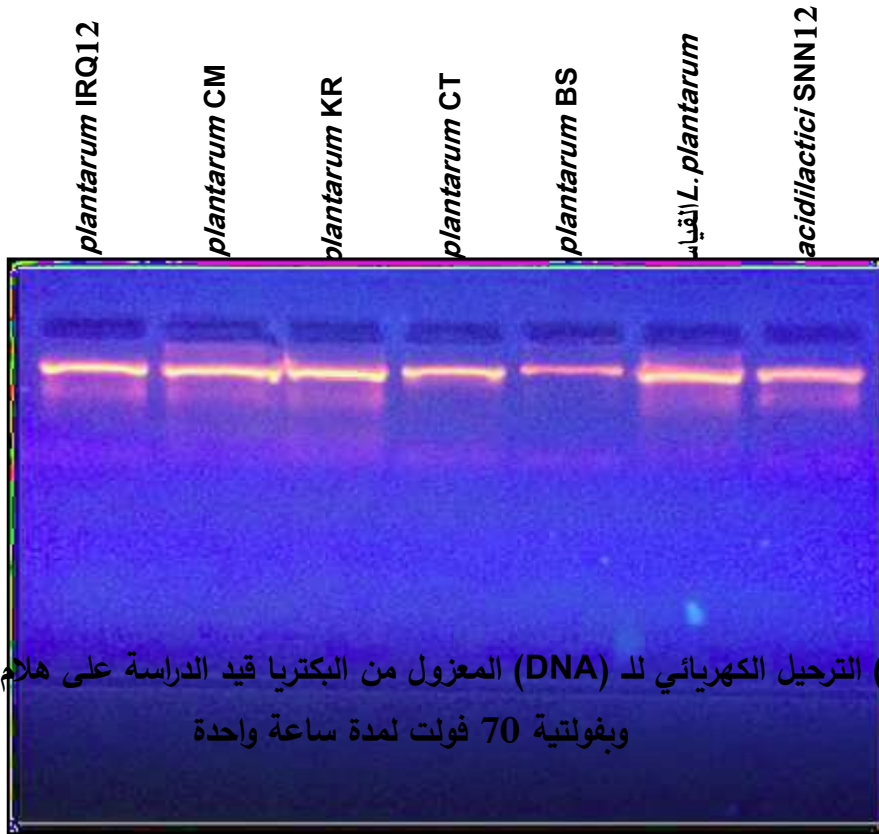
acidilactici SNN12 جينياً بواسطة 16S ribosomal DNA

يظهر الشكل (2-4) الحامض النووي DNA المستخلص من عزلات *L.plantarum* الخمسة مع القياسية و *P.acidilactici*، إذ تم تضخيم جين *16SrDNA* بجهاز PCR الشكل (3-4). وقد ظهرت حزم الجينات على 1500 bp بالمقارنة مع DNA Ladder (1KB) القياسي.

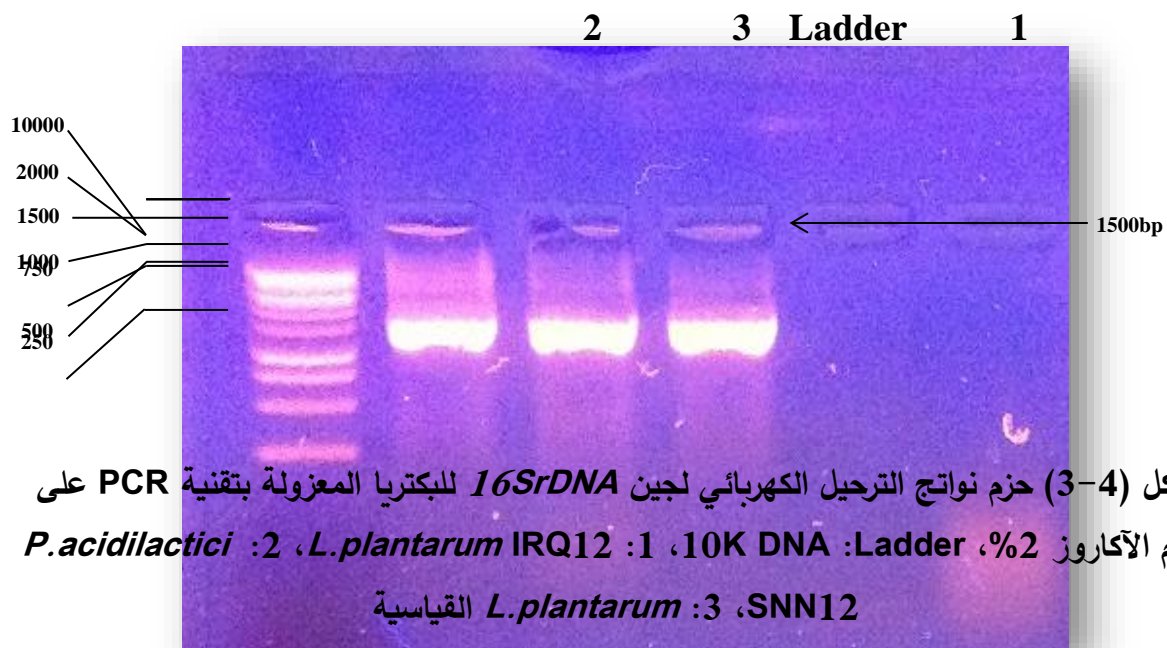
4-4 تتابعات القواعد النروجينية لجين *16SrDNA* وتشخيص بكتريا *L.plantarum*

P.acidilactici SNN12 و IRQ12

يُظهر الجدول (4-6) تتابعات القواعد النروجينية للعزلة *L.plantarum* IRQ12 و *P.acidilactici* SNN12 والتي تم الحصول عليهما من مخلل خيار القثاء والباميا على التوالي المحليين بالمقارنة مع السلالات القياسية العالمية إذ كان تحديد التشابه = 99%.



شكل (2-4) الترحيل الكهربائي لـ (DNA) المعزول من البكتريا قيد الدراسة على هلام الآكاروز 0.8% وبفولتية 70 فولت لمدة ساعة واحدة



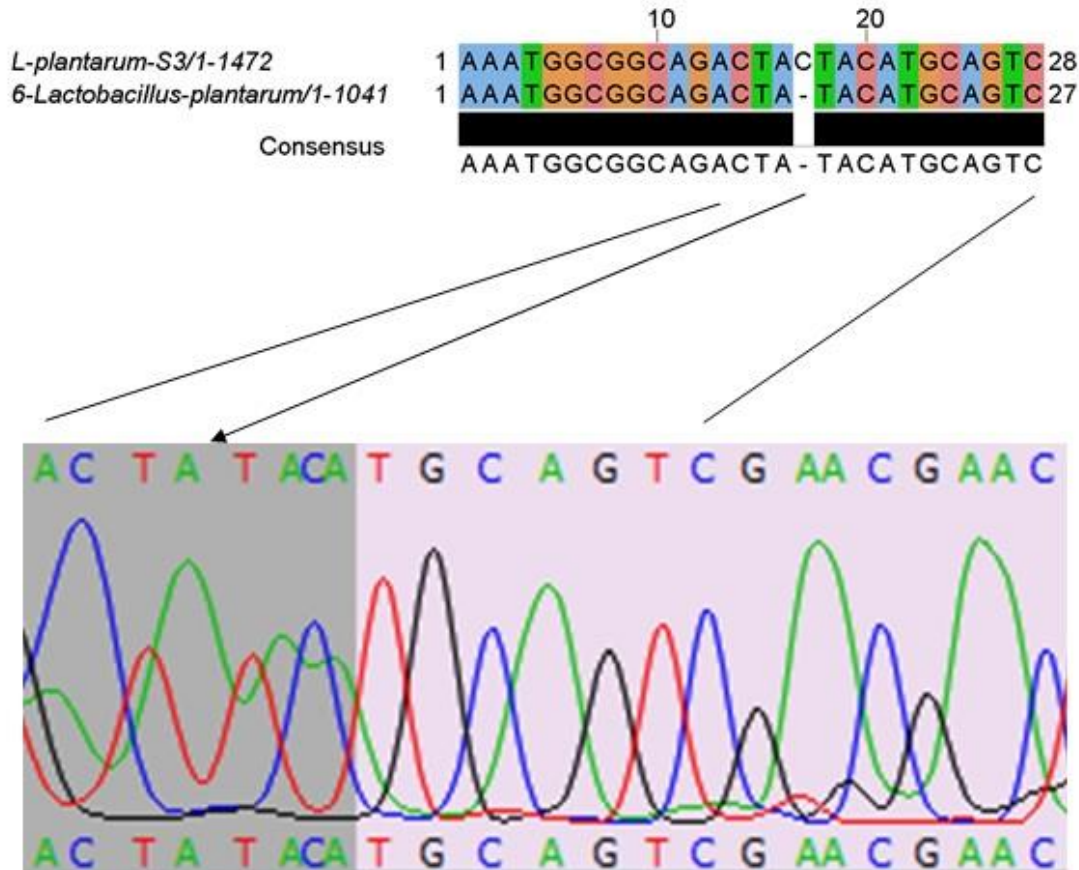
جدول (4-6) تتابعات جين *16SrDNA*، مصدر العزل ومطابقة العزلة (%) للبكتريا المشخصة

التسلسل	العزلة البكتيرية	تتابعات القواعد النروجينية	المصدر	طول قطعة DNA المضمخة	% للتطابق عند التشخيص
1	<i>Lactobacillus plantarum IRQ12</i>	AAATGGCGGCAGACTATACATGCAGTCGA ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCA TCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAA CTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCC AGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAG ATGCTAATAACGCATAACAACCTTGGACCG CATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGG CTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTA TTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCAT GGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAG AAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTA ACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT ACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG AGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCA ACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAG AGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT ATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGA GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTC	مخلل خيار القضاء المحلي	1041 bp	99

التسلسل	العزلة البكتيرية	تتابعات القواعد النروجينية	المصدر	طول قطعة DNA المضمخة	% للتطابق عند التشخيص
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> SNN12	GCTCCTAAAaGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTC ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCA CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGt AGGCGAGTTGCAGCCTaCAGTCCGAAGTGAATGGTTTTAAGA GATTAGCTaAACCTCGCGGtTTCGCAACTCGTTGTACCaTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGAC GTCGTCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCaCTAGA GTGCCAACTGAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCG TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA ACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGCCtAAT CTCTTA _g GTiGGCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC GTAGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC CCGTCAATTCTTTTGAAGTTTCAACCTTGCAGTCTACTCCCAGG CGGATTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAAC CCTCCAACACTTAGTAATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGG GTATCTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCA GTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATA TATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTT CTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTGAGC CGAAGGCTTTCACATiAGACTTAAAAGACCGCTGCGCTCGCTTT ACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG CGGCTGCTGGCACGTAgTTAGCCGTGGcTTTCTGGTTAAATACCG TCACTGGgTGAACAGTTACTCTACCCACGTTCTTCTTTAACAAC AGAGCTTTACGAgCCGAAACCTTCTTCAcTCACGCGGCGTTGCTC CaTCAGACTTGCCTCCATTGCGGAAGATiCCCTACTGCTGCCTCC CGTAGGAGTcTGGGCCG	مخلل الباميا المحلي	1129 bp	99

5-4 تشخيص العزلة *L.plantarum* IRQ12 كسلالة عالمية جديدة

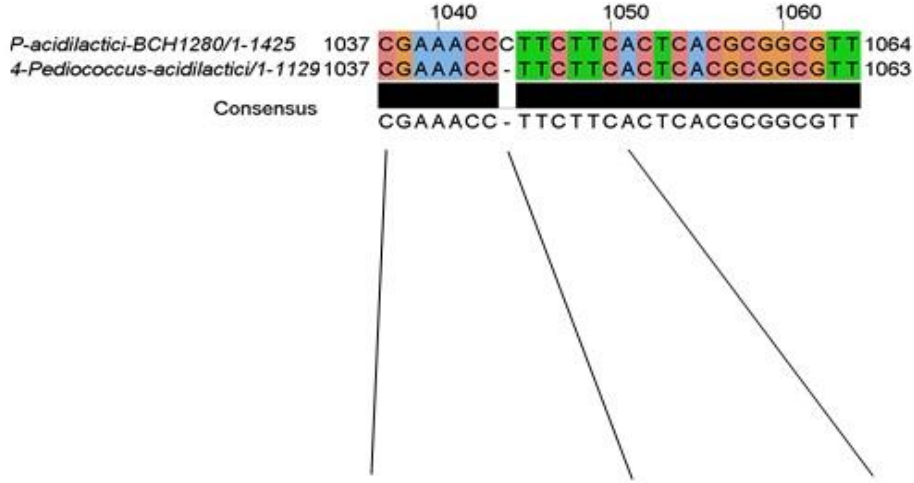
أظهرت العزلة IRQ12 اختلافاً عن السلالات القياسية المرجعية في أحد مواقع تتابعات القواعد النروجينية، أرسلت العزلة الى الأرشيف الأوروبي للنيوكليوتيدات The European Nucleotide Archive (ENA) والمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) وهو جزء من المكتبة الوطنية الأمريكية للطب وسُجّلت قواعد بيانات هذه العزلة في بنك الجينات لتسلسل الحوامض النووية، سُجّلت العزلة (*L.plantarum* IRQ12) في (بنك الجينات LN871447) شكل (4-6) وكانت ذات صلة وثيقة (99%) مع السلالة *L.plantarum* S3 وتختلف عنها في طفرة حذف للقاعدة النروجينية (C) عند الموقع 17 الشكل (4-4)



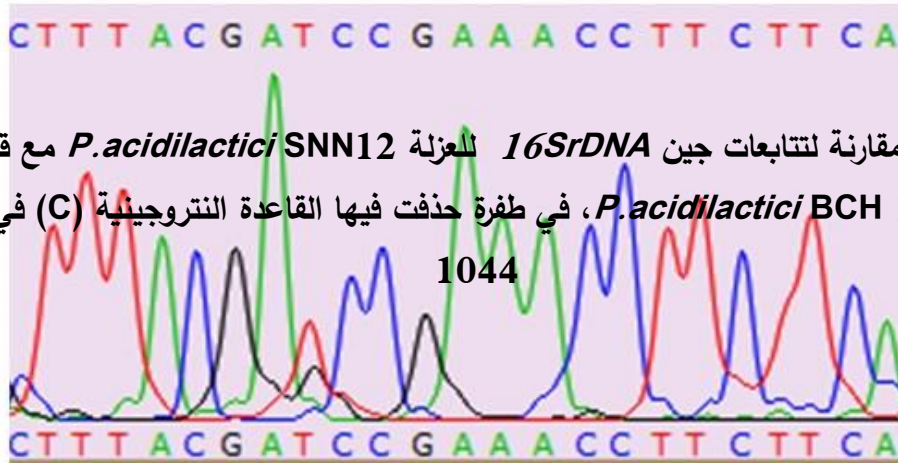
شكل (4-4) مقارنة لتتابعات جين *16SrDNA* للعزلة *L.plantarum* IRQ12 مع قمم سلالة أخرى *L.plantarum* S3، منطقة الطفرة حذفت فيها القاعدة النروجينية (C) في الموقع 17

6-4 تشخيص العزلة *P.acidilactici* SNN12 كسلالة عالمية جديدة

سُجلت العزلة SNN12 في بنك الجينات كسلالة جديدة (LN871448.1) شكل (4-7) وكانت ذات صلة وثيقة (99%) مع السلالة *P.acidilactici*-BCH1280 وتختلف عنها في طفرة حذف للقاعدة النروجينية (C) عند الموقع 1044 الشكل (4-5).



شكل (4-5) مقارنة لتتابعات جين *16SrDNA* للعزلة *P.acidilactici* SNN12 مع قمم سلالة أخرى *P.acidilactici* BCH 1280، في طفرة حذفت فيها القاعدة النروجينية (C) في الموقع



Nucleotide

Nucleotide

Search

Advanced

Help

GenBank

Send

Change region shown

Customize view

Lactobacillus plantarum partial 16S rRNA gene, strain IRQ12

GenBank: LN871447.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to

LOCUS LN871447 261 bp DNA linear BCT 28-JUL-2015

DEFINITION Lactobacillus plantarum partial 16S rRNA gene, strain IRQ12.

ACCESSION LN871447

VERSION LN871447.1 GI:906846774

KEYWORDS .

SOURCE Lactobacillus plantarum

ORGANISM Lactobacillus plantarum
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
Lactobacillus.

REFERENCE 1

AUTHORS Abdul Abbas,S.J., Aboud,A.H. and Al-Badran,A.I.

TITLE Isolation and identification of bacteria from Cucumis sativus and
Abelmoschus esculentus pickles

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 261)

AUTHORS Abd Al-Abbas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-JUL-2015) University of Basrah, Biology Department,
61004, IRAQ

FEATURES Location/Qualifiers

source
1..261
/organism="Lactobacillus plantarum"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="IRQ12"
/host="Cucumis sativus"
/db_xref="taxon:1590"
/country="Iraq"
/PCR_primers="fwd_name: 27, fwd_seq: agagtttgatocctggctca,
rev_name: 1492, rev_seq: ggttaccttgttacgactt"

gene
<1..>261
/gene="16S rRNA"

rRNA
<1..>261

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Taxonomy

Recent activity

Turn Off Clear

Lactobacillus plantarum partial 16S rRNA
gene, strain IRQ12 Nucleotide

IRQ12 (1) PMC

Antitumor effect of heat-killed
Lactobacillus plantarum L-137 throu PubMedCholesterol-lowering efficacy of
Lactobacillus plantarum CECT 7527 PubMedThe functional ccpA gene is required for
carbon catabolite repression in Lact PubMed

See more...

شكل (4-6) تسجيل بكتريا *L. plantarum* IRQ12 كسلالة عالمية جديدة في المركز الوطني
لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Help

Advanced

GenBank Send: Change region shown Customize view Analyze this sequence Run BLAST Pick Primers Highlight Sequence Features Find in this Sequence

Pediococcus acidilactici partial 16S rRNA gene, strain SNN12

GenBank: LN871448.1
FASTA Graphics

Go to: 1

LOCUS LN871448 1129 bp DNA linear BCI 28-JUL-2015
DEFINITION *Pediococcus acidilactici* partial 16S rRNA gene, strain SNN12.
ACCESSION LN871448
VERSION LN871448.1 GI:906846775
KEYWORDS .
SOURCE *Pediococcus acidilactici*
ORGANISM *Pediococcus acidilactici*
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
Pediococcus; *Pediococcus acidilactici* group.

REFERENCE 1
AUTHORS Abdul Abbas,S.J., Aboud,A.H. and Al-Badran,A.I.
TITLE Isolation and identification of bacteria from *Cucumis sativus* and *Abelmoschus esculentus* pickles
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1129)
AUTHORS Abd Al-Abbas,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-JUL-2015) University of Basrah, Biology Department, 61004, IRAQ

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1129
/organism="Pediococcus acidilactici"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="SNN12"
/host="Abelmoschus esculentus"
/db_xref="taxon:1254"
/country="Iraq"
/PCR_primers="fwd_name: 27, fwd_seq: agagtttgatcctggctca, rev_name: 1492, rev_seq: ggttaccttggttacgactt"
gene <1..>1129
/gene="16S rRNA"
rRNA <1..>1129

Recent activity Turn Off Clear
Pediococcus acidilactici partial 16S rRNA gene, strain SNN12 Nucleotide
In vivo deamination of cytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimers in *E. coli* PubMed
Determination of the chemical composition of the nutritionally valuable *Pediococcus acidilactici* PubMed
How Much In Vitro Cholesterol Reducing Activity of Lactobacilli Predicts Their In Vitro Cholesterol Reducing Activity PubMed
Changes in some thylakoid membrane proteins and pigments upon desiccation in *Pediococcus acidilactici* PubMed
See more...

شكل (7-4) تسجيل بكتريا *P. acidilactici* SNN12 كسلالة عالمية جديدة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)

7-4 تطهير بكتريا *L. plantarum* IRQ12 و *P. acidilactici* SNN12

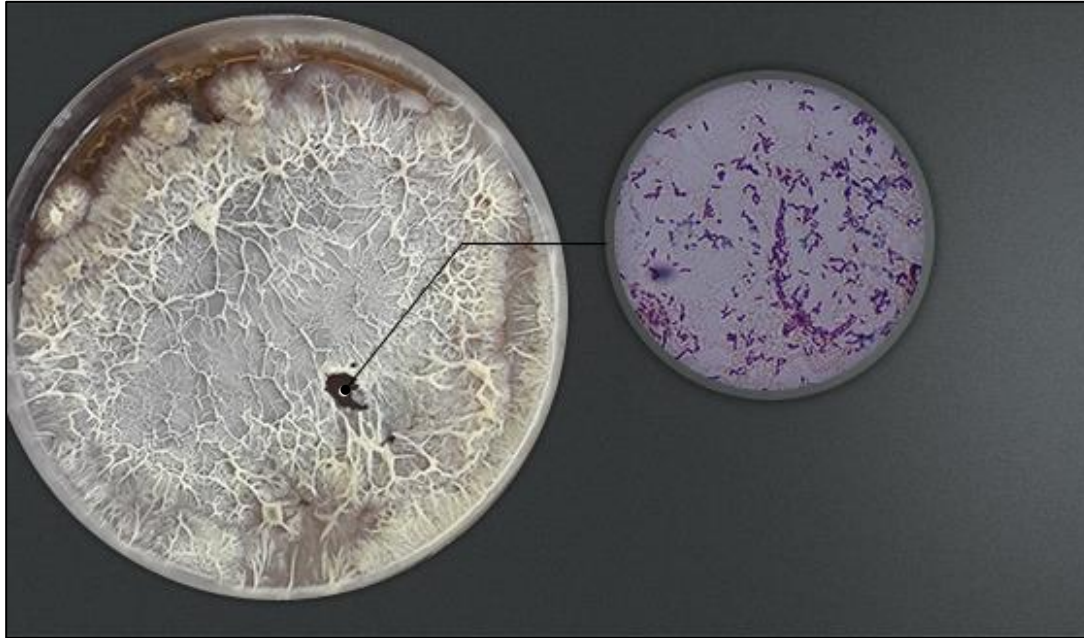
هنالك عدة طرائق تستخدم لغرض إحداث طفرة ما في شريط الحامض النووي للبكتريا، وقد طبقت الطريقة الحالية بالتعرض للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي (254nm) ولمسافة 50 سم وعلى أوقات زمنية متقاربة 20s و 25s و 30s و 35s و 60s وهذه الطريقة متوافقة مع الطرائق المستخدمة في دراسات سابقة مع ضرورة إجراء بعض التحويرات عليها، فقد استخدم **Lin and Wang, (2001)** موجات من الأشعة فوق البنفسجية لتطهير بكتريا *E. coli* وعلى تردد (254nm) وبمسافة تعرض تراوحت بين 30 - 60 سم وبأوقات تعرض 0 و 10 و 30 و 60 ثانية والتي ذكر فيها أن تعريض البكتريا لهذه الموجات ولمسافة 60 سم قد أعطى أفضل النتائج وكانت أكثر موثوقية بسبب طبيعة نمو البكتريا والاعداد الحية المتبقية.

7-4-1 تأثير مدد التطهير على خواص النمو لبكتريا *Lactobacillus plantarum* IRQ12

أظهرت نتائج عزل بكتريا *L.plantarum* قبل التطهير شكل (4-2) أن المستعمرات المنتخبة النامية على الوسط MRS Agar تكون محدبة، بيضاء اللون ولماعة غير لزجة ذات نهايات متساوية ذات حافة ملساء كما انها متساوية في الحجم وعند الفحص تحت المجهر تظهر بشكل عصيات طويلة مفردة أو بهيئة أزواج أو سلاسل قصيرة وتتفق هذه الصفات مع ما ذكره **الكعبي، (2015)** من أن بكتريا *L.plantarum* على شكل خلايا دائرية لماعة ذات نهايات متساوية، كما ذكر **Thiruneelakandan et al., (2014)** أن بكتريا *L.plantarum* تكون تحت المجهر قضيبية الشكل، ذات نهايات مدورة، طولها 0.9 – 1.2 مايكرومتر، مفردة أو بشكل أزواج أو سلاسل قصيرة، تنمو المستعمرات على السطح بعرض 3 ملليمتر.

ويبين الشكل (4-8) أنموذجاً من نتائج نمو بكتريا *L.plantarum* IRQ12 المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية بتردد (254 nm) وعلى مدد التطهير (بالثانية) (20s و 25s و 30s و 35s و 60s) إذ تبين من الفحص الظاهري للطبق أن نمو الخلايا كان بصورة كبيرة وعلى كل مساحة الطبق الزراعي وبشكل متلاصق إذ لم يكن بالإمكان تمييز المستعمرات ولاشكلها فيما لو كانت مفردة أو مزدوجة كما أظهرت البكتريا قابلية عالية لنموها للأعلى بشكل عمودي مرتفعة عن الطبق بمقدار 3 – 4 ملليمتر مع احتفاظ لون المستعمرات باللون الأبيض المائل الى الكريمي، كما تبين ان محتواها الرطوبي عالي وغير لزجة، أما عند اجراء الفحص المجهرى حسب الجزء المقشوط من الطبق فقد أظهر أن شكل الخلايا لم يتغير عنها قبل التطهير، ومن خلال ملاحظة طبيعة نمو البكتريا المطفرة فقد ذكر **Bove et al., (2012b); Capozzi et al., (2011); Fiocco et al., (2010)** أن عمليات التطهير تؤثر على خصائص سطح بكتريا *L.plantarum* بما في ذلك التغيير في شكل الخلية وسيولة الغشاء وخاصة الجزء الكاره للماء، ويمكن الاستدلال على ما تعرضت له بكتريا *L.plantarum* من متابعة الدراسات السابقة، إذ بين **Bove et al., (2012b)** ان قدرة بكتريا *L.plantarum* على النمو في ظروف مختلفة ومتنوعة من البيئات تأتي من خلال قدرتها على التكيف مع مختلف النظم البيئية وهذا واضح من خلال تعرضها للظروف الاجهادية والتي تُظهر فيها قدرة عالية على التكيف فمثلاً تعريض هذه البكتريا الى الاجهاد بالاكسدة أدى الى حدوث زيادة في نموها وهذا ما بينه **Fiocco et al., (2009)** من أن تعريض بكتريا *L.plantarum* للتطهير أدى الى زيادة قدرة البكتريا على النمو بمقدار خمسة أضعاف، أن أول جزء يتعرض لظروف الاجهاد في الخلية البكتيرية هو غلاف الخلية ذلك أن غشاء الخلية يؤدي دوراً مهماً في مقاومة الاجهاد بسبب تركيبه الذي يمكن أن يتغير تبعاً للظروف إضافة الى أجهزة الاستشعار في الغشاء الخلوي والتي تعمل بالسيطرة على عمليات النقل **(Van De Guchte et al., 2002)**. كما أثبت **Fiocco et al.,**

(2009) ان آليات الاجهاد وبعض الطفرات التي تتعرض لها بكتريا *L.plantarum* تؤدي الى اشراك جين يسمى *ftSH* كنوع من آليات الاستجابة. ذلك أن عمليات التطهير تؤثر على العديد من الخواص البايوكيميائية لسطح الخلية لبكتريا *L.plantarum* فضلاً عن التغير الجيني (*Meijerink et al., 2010*). ويُعد جين *ftSH* احد الجينات التي تتأثر بعمليات التطهير والذي يؤثر على الغشاء الخلوي والبروتينات وفي تركيب الدهون الموجودة في الاغشية (*Katz and Ron, 2008; Ogura et al., 1999*). وآلية عمل جين *ftSH* انه يؤدي دوراً اساسياً داخل غشاء الخلية من خلال تنظيم أنشطة البروتينات وتخلص الخلية من البروتينات المتضررة عن طريق التحكم في تحللها أو توفيرها (*Akiyama, 2009; Gottesman, 2003*), وعليه فإن نمو العزلة المطفرة بشكل كبير قد يعود نتيجة لتعرض بكتريا *L.plantarum* لظروف الاجهاد بالتطهير والذي أدى الى تشجيع حدوث طفرات في جين *ftSH* محدثاً خلافاً في نمو البكتريا في الوسط عند مقارنة البكتريا مع العزلة البرية أو قد يحدث خلافاً في الكابح لتستمر عملية التعبير عن جين *ftSH* وهذا يتوافق مع ما ذكره (*Fiocco et al., 2009*).



شكل (4-8) أنموذج من العزلة المحلية لبكتريا *L.plantarum* المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية بمدة تطهير 25s وعلى مسافة 50 سم والنامية في وسط MRS Agar، قوة التكبير 1000x 4-7-2 تأثير مدد التطهير على خواص النمو لبكتريا *Pediococcus acidilactici* SNN12 تبين الأشكال 4-9 و 4-10 و 4-11 أنموذجاً من نمو بكتريا *P.acidilactici* SNN12 بعد اجراء عملية التطهير عليها بطول موجي (254nm) على أوقات 20s و 30s و 60s إذ لم يتغير شكل البكتريا عند الفحص المجهرى في حين طراً تغير في شكل المستعمرات البكتيرية النامية

والتي كانت منتشرة على كل الطبقة، وتباين شكل المستعمرات بين الصغيرة المحدبة ذات النهايات المستديرة وبين المستعمرات المسطحة ذات أقطار كبيرة يتراوح قطرها بين 4 - 8 ملم، ويلاحظ من خلال التعرض لأوقات التطهير أن هذه الأوقات قد أثرت بدرجة كبيرة على النمو الظاهري لبكتريا *P.acidilactici* على الطبقة وظهر النمو أكثر وضوحاً عند الأوقات 20s و 30s بينما أخذ النمو بالانخفاض عند زيادة جرعة الأشعاع.



شكل (4-9) نمو بكتريا *P.acidilactici* SNN12 المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية عند مدة تطهير 20s وعلى مسافة 50 سم والنامية في وسط MRS Agar



شكل (4-10) نمو بكتريا *P.acidilactici* SNN12 المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية عند مدة تطهير 30s وعلى مسافة 50 سم والنامية في وسط MRS Agar



شكل (11-4) نمو بكتريا *P.acidilactici* SNN12 المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية عند مدة تطهير 60s

وعلى مسافة 50 سم والنامية في وسط MRS Agar

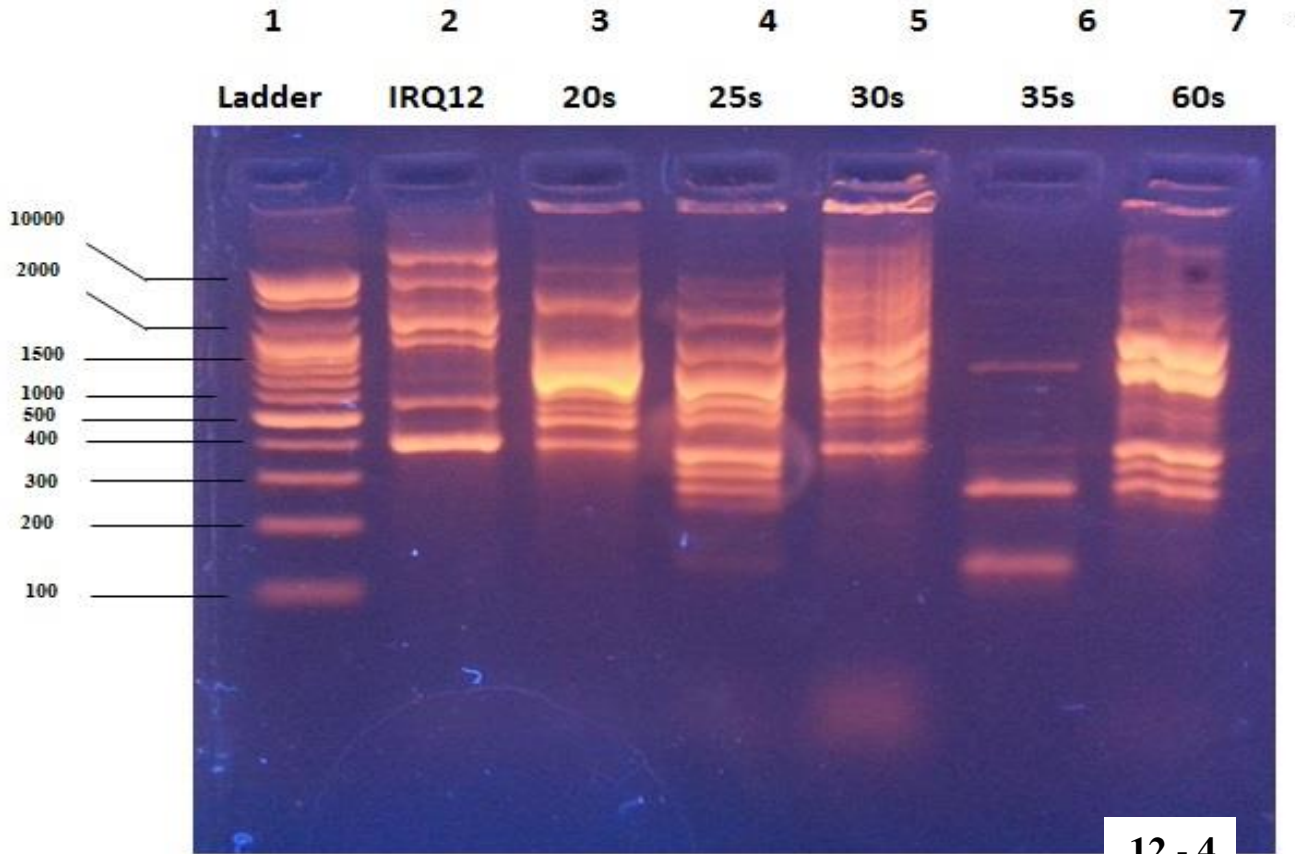
وقد جاءت هذه النتائج متفقة مع ما ذكره Patel and Goyal, (2009) عند تعريض بكتريا *Pediococci* للأشعة فوق البنفسجية وعلى أوقات مختلفة (15s و 30s و 60s و 90s) لوسط يحتوي على أعداد بكتيرية تراوحت بين 10^{-4} - 10^{-6} والتي أدت عملية التطهير الى انخفاض كبير في الأعداد الحية حتى بلغت نسبة هذه الأعداد 1% عند مدة تطهير 60s في حين لم تتمكن البكتريا من النمو عند مدة تطهير 90s.

4-8 دراسة مدى التغيرات الجينية للعزلة *L.plantarum* IRQ12 قبل التطهير وبعده

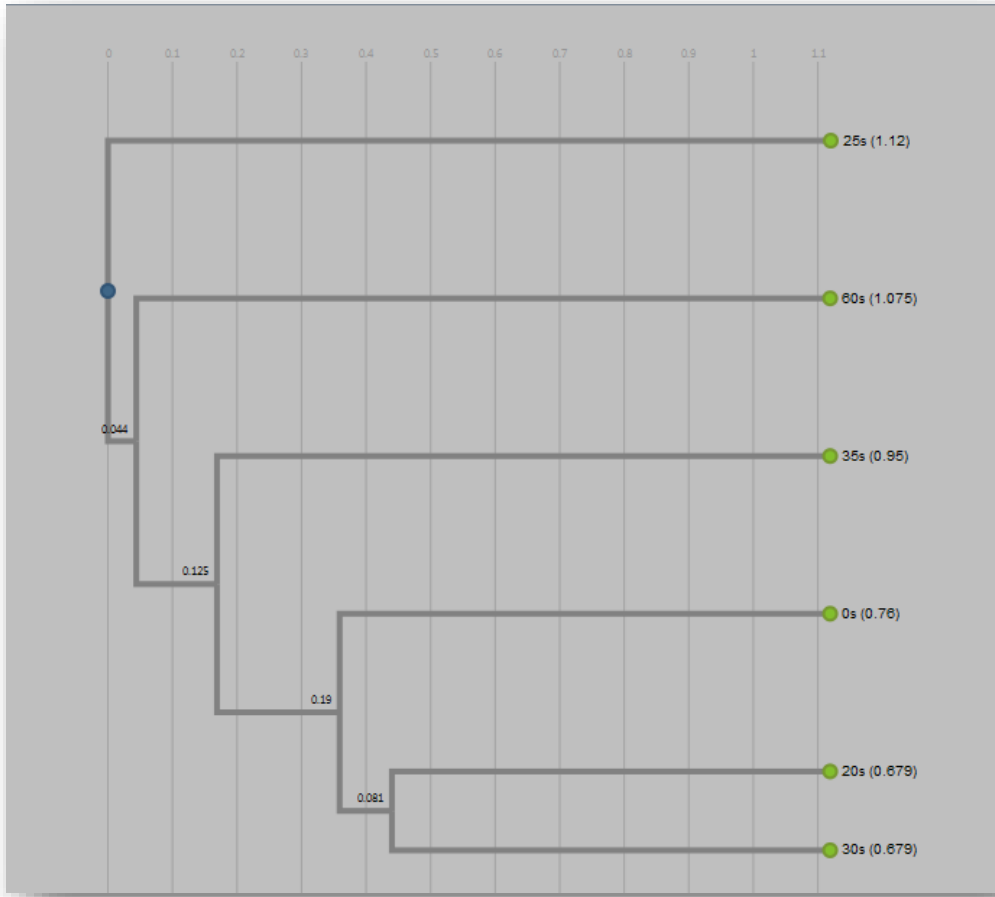
ولجميع مدد التعرض للإشعاع (20s و 25s و 30s و 35s و 60s) باستخدام تقنية - RAPD PCR

أظهرت نتائج استخدام تقنية PCR - RAPD الشكل (4-12) بين السلالة غير المطفرة في الموقع (2) والسلالة المطفرة بمدد التطهير (20s و 25s و 30s و 35s و 60s) في المواقع (3 و 4 و 5 و 6 و 7) على التوالي اختلافاً واضحاً وعدم وجود تطابق بين الحزم، كما أظهرت الشجرة الوراثية Dendogram الشكل (4-13) أن أوقات التعرض للإشعاع أدت الى حدوث طفرات متفاوتة في الأوقات جميعها وهذا يدل على ان عملية التشعيع أحدثت طفرة وراثية، كما لوحظ عدم وجود تطابق وراثي بين جميع مدد التطهير للعزلة IRQ12، إذ ان كل زمن أظهر انفراداً بالتطهير الوراثي.

فيما أظهر الجدول (4-7) أن تعرض السلالة *L. plantarum* IRQ12 الى تشعيع لمدة 25s كان أكثر الأوقات تأثيراً على DNA البكتريا وذلك بسبب حدوث طفرات كبيرة للعزلة بمقدار 2.52 بينما كان أقل تأثير للتطهير بالتشعيع (أقل بُعد وراثي) عند الزمن 30s و 20s إذ كان تأثير التشعيع بمقدار 1.359.



شكل (4-14) حزم الترحيل الكهربائي لنتائج RAPD - PCR على هلام الآكاروز 2% بفولتية 70 فولت للعزلة *L. plantarum* المعرضة لأشعة UV على طول موجي 254nm على مسافة 50 سم بمدد زمنية مختلفة



شكل (4-13) الشجرة الوراثية والبعد الوراثي لأوقات تعرض السلالة *L. plantarum* IRQ12 لأشعة UV

جدول (4-7) تأثير الأوقات المختلفة لتعرض السلالة *L. plantarum* لأشعة UV

العزلة	0s	20s	25s	30s	35s	60s
0s	0	1.509	2.526	1.532	1.986	2.186
20s		0	2.423	1.359	1.886	1.930
25s			0	2.384	1.933	2.280
30s				0	1.742	2.049
35s					0	2.213
60s						0

9-4 غريلة العزلات المحلية المنتخبة لبكتريا *L. plantarum*

يمكن اعتماد آليات مختلفة لاختيار العزلة الملائمة من المعزلات الحيوية لإجراء العمليات اللاحقة لها، وعملية الغرلة تشمل مجموعة من الفحوص منها قدرة البكتريا على إنتاج الحموضة في الحليب والحموضة الكلية، ومدى مقاومة البكتريا لتراكيز مختلفة من الحامض، وقدرة البكتريا على مقاومة تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء وفي أوقات مختلفة وإمكانية العزلات على خفض مستويات الكولسترول.

4-9-1 إنتاج الحموضة الكلية من الحليب بواسطة بكتريا *L.plantarum*

يبين الجدول (4-8) مقدار الحموضة الكلية لنماذج العزلات البكتيرية والذي يرتبط بقابلية هذه البكتريا على إنتاج الحامض من الحليب وتكوين الخثرة، إذ يلاحظ من الجدول أن قيم الحموضة الكلية كانت متقاربة فيما بين العزلات القياسية و CM و BS و KR و IRQ12 إذ بلغت 0.72 و 0.72 و 0.7 و 0.69% على التوالي، أما العزلة CT فقد سجلت أقل نسبة حموضة بمقدار 0.60 والتي كانت متوافقة مع ما ذكره (Arena et al., 2015) والذي كانت قيمة الحموضة فيه 0.61%.

ذكر (Danova et al., 2005) أن إنتاج الحموضة في بكتريا *L.plantarum* كان بمقدار 0.59% بعد مدة حضن (9-12) ساعة إذ تختلف بكتريا *L.plantarum* عن الأنواع الأخرى من المعزلات الحيوية بسرعة نموها وإنتاجها للحامض فقد كانت سرعة تحول الكاربوهيدرات الى حامض بمقدار 79% مقارنة مع العزلات الأخرى من المعزلات الحيوية.

جدول (4-8) نتائج الحموضة الكلية للعزلات المحلية والسلالة القياسية لبكتريا *L.plantarum* و

P.acidilactici

العزلة	الحموضة الكلية % (محسوبة كحامض اللاكتيك)
--------	---

0.69	<i>L.plantarum</i> IRQ12
0.72	<i>L.plantarum</i> CM
0.70	<i>L.plantarum</i> KR
0.60	<i>L.plantarum</i> CT
0.70	<i>L.plantarum</i> BS
0.72	<i>L.plantarum</i> القياسية
0.8	<i>P.acidilactcic</i> SNN12

4-9-2 إنتاج الحموضة الكلية من الحليب بواسطة بكتريا *P.acidilactici*

أظهرت السلالة المحلية لبكتريا *P.acidiactici* SNN12 قابليتها على إنتاج الحموضة، إذ أن قيمة الحموضة الكلية في وسط الحليب المتخمر كانت مرتفعة وبلغت 0.8% جدول (4-8) وهي بذلك أعلى من قيم الحموضة لجميع عزلات بكتريا *L.plantarum* المحلية. وقد جاءت هذه النتائج مقارنة للنتائج التي ذكرها (EFSA, 2012) عند دراسته لعزلتين من بكتريا *P.acidiactici* والتي بين فيها أن نسبة الحموضة الكلية في وسط التخمير 1% للعزلة الأولى وأقل من الحموضة الكلية للعزلة الثانية البالغة 1.3%. كما ذكر أيضاً أن قدرة بكتريا *Pediococcus* على خفض الحموضة بدرجة كبيرة لا يمكن أن تتم إلا عندما تستعمل بالاشتراك مع بكتريا *L.plantarum* NCIMB بنسبة 2:8.

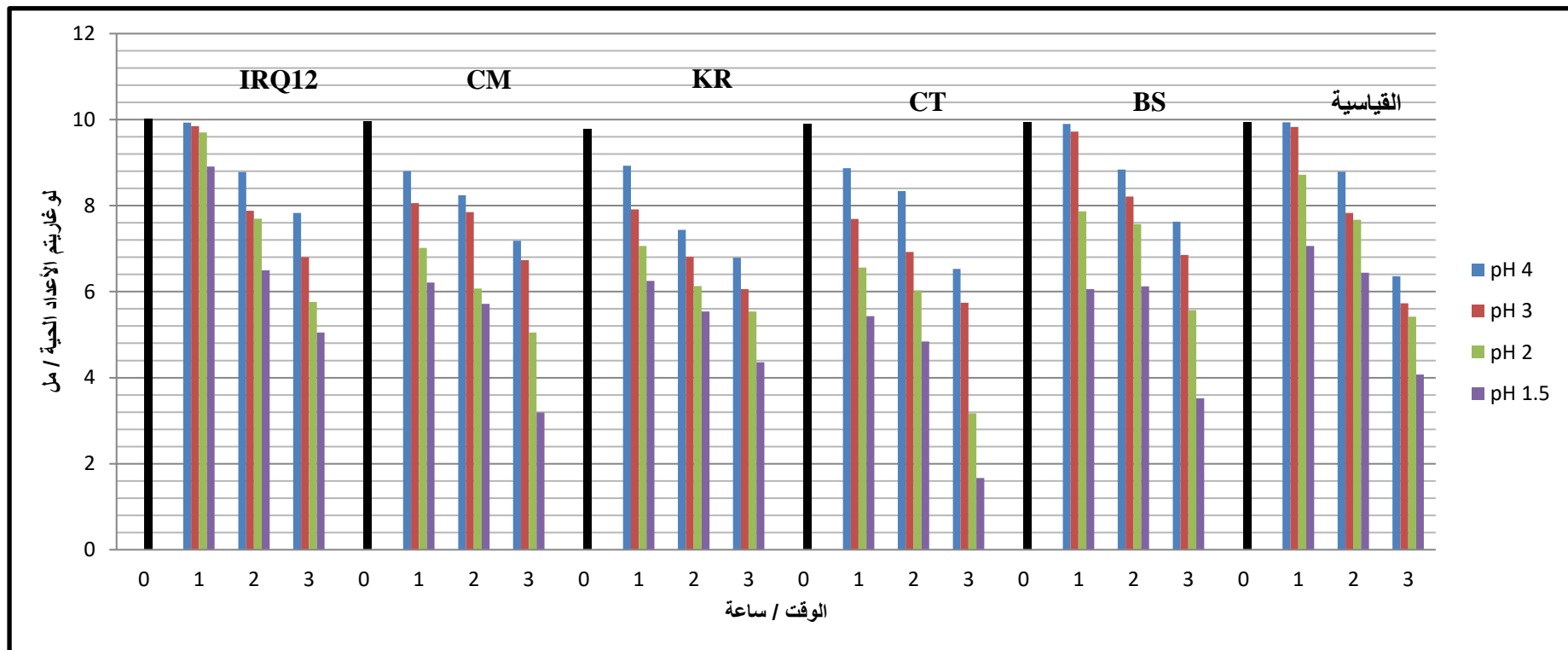
4-10 مقاومة العزلات المحلية والقياسية والمطفرة لبكتريا *L.plantarum* لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني

يلاحظ أن وسط تخمر الخضار يفسح المجال لنمو بعض أنواع البكتريا متحملة الحموضة أكثر من الأنواع الأخرى وهذا يدل على التباين الكبير بين الأنواع البكتيرية نتيجة الاجهاد الناجم عن الظروف المحيطة، ويُعد تقدير مقاومة المعزلات الحيوية للحموضة مختبرياً إحدى الطرائق المستخدمة لتقييم إمكانات المعزلات الحيوية (Schillinger et al., 2005).

تمت تنمية العزلات البكتيرية في أوساط حامضية ذات أس هيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 ولمدد زمنية مختلفة (صفر و ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) إذ يوضح الشكل (4-14) والملحق (1) مقاومة العزلات المحلية (IRQ12 و CM و KR و CT و BS و القياسية) على التوالي التابعة لبكتريا *L. plantarum* للأوساط الحامضية والتي أظهرت النتائج أن السلالة IRQ12 قد سجلت أعلى مقاومة للظروف الحامضية من العزلات البكتيرية الأخرى إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 من 10.02 عند المدة صفر من المعاملة الى 9.93 و 8.78 و 7.83 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، أما عند خفض الأس الهيدروجيني الى 3 فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 10.02 عند المدة صفر الى 9.85 و 7.88 و 6.8 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، وعند خفض الأس الهيدروجيني الى 2 انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل الى 9.7 و 7.7 و 5.76 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، وظهر الانخفاض بدرجة واضحة عند الأس الهيدروجيني 1.5 إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل الى 8.91 و 6.5 و 5.05 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، بينما بلغت النسب المئوية لمعدلات الانخفاض اللوغاريتمي لقيم الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 للعزلة IRQ12 بعد مرور ثلاث ساعات من المعاملة قبل الزرع (32.13، 21.85، 42.51 و 49.6%) على التوالي، أما العزلة التي أظهرت أقل مقاومة للظروف الحامضية فقد بينت النتائج أن العزلة CT كانت أقل تحملاً لهذه الظروف ولاسيما عند الساعة الثالثة مقارنة ببقية النتائج، إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 وبالمدة صفر من 9.9 الى 8.87 و 8.34 و 6.53 عند المدد (ساعة، ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي ، أما عند خفض الأس الهيدروجيني الى 3 فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.9 عند المدة صفر الى 7.69 و 6.92 و 5.74 عند المدد (ساعة، ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، ولوحظ انخفاض كبير في لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند خفض الأس الهيدروجيني الى 2 إذ انخفضت الى 6.56 و 6.03 و 3.17 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، أما عند الأس الهيدروجيني 1.5 فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل الى 5.43 و 4.84 و 1.67 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، فيما بلغت النسب المئوية للانخفاض اللوغاريتمي للعزلة CT بعد مرور ثلاث ساعات من المعاملة قبل الزرع للأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 (34.04، 42.02، 67.97 و 83.13%) على التوالي، أما العزلتان BS و CM فقد كانتا متقاربتين في مقاومة البكتريا للظروف الحامضية إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل للعزلة BS عند الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 من 9.94 عند المدة صفر الى 7.63 و 6.85 و 5.57 و 3.52 على التوالي بعد

ثلاث ساعات من التعرض فيما بلغت النسبة المئوية للانخفاض اللوغاريتمي (23.23، 31.08، 43.96 و 64.58%) على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض، أما العزلة CM فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 من 9.96 عند المدة صفر الى 7.18 و 6.73 و 5.05 و 3.19 على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض فيما بلغت النسبة المئوية للانخفاض اللوغاريتمي (27.91، 32.42، 49.29 و 67.97%) على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض، أما العزلة القياسية فقد كانت مقاومتها للحموضة متباينة إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 من 9.95 عند المدة صفر الى 9.94 و 8.79 و 6.36 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي أما عند خفض الأس الهيدروجيني الى 3 فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.95 عند المدة صفر الى 9.83 و 7.83 و 5.73 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، بينما انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 2 الى 8.72 و 7.67 و 5.42 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي، فيما انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 الى 7.06 و 6.44 و 4.07 عند المدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) على التوالي فيما بلغت النسب المئوية للانخفاض اللوغاريتمي بعد مرور ثلاث ساعات من المعاملة لقيم الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 (36.08، 42.41، 45.52 و 59.09%) على التوالي.

ومن خلال النتائج يمكن ملاحظة أن جميع العزلات المحلية بما فيها القياسية سجلت مقاومة للحموضة بصورة متباينة وبمدد زمنية مختلفة ولم تبد أي عزلة عدم مقدرتها على مقاومة هذه الظروف. وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين الأس الهيدروجيني المختلف لكل فترة معاملة ولكل عزلة عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$.



شكل (4-14) مقاومة العزلات المحلية IRQ12 و CM و KR و CT و BS والسلالة القياسية لبكتريا *Lactobacillus plantarum* لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة

أما بالنسبة لمقاومة العزلة المطفرة *L.plantarum* IRQ12 للأس الهيدروجيني المنخفض والمطفرة باستخدام أشعة UV light على تردد (254 nm) وبمدد التطهير 20 و 25 و 30 و 35 و 60 ثانية فقد أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4-15) أن جميع مدد التطهير سجلت مقاومة عالية للأس الهيدروجيني المنخفض وبمدد زمنية مختلفة عند مقارنتها مع العزلة IRQ12 قبل التطهير وعلى الرغم من تباين النتائج إلا أنها مرتفعة في مقاومتها للحموضة مع حدوث انخفاض طفيف خلال مدد التعرض للحموضة، فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل بنسبة طفيفة عند مدة التطهير (20s) وعند الأس الهيدروجيني 4 وبالمدة صفر من 9.96 الى 9.89 بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض في حين انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 من 9.96 بالمدة صفر الى 8.46 بعد مرور ثلاث ساعات فيما بلغت النسبة المئوية للانخفاض اللوغاريتمي 15.06% لمدة التعرض نفسها ، أما عند مدة التطهير (25s) فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 من 9.96 عند المدة صفر الى 9.55 بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض في حين انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 بالمدة صفر من 9.96 الى 9.25 بعد مدة تعرض ثلاث ساعات، وعند مدة التطهير (30s) انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل وعند الأس الهيدروجيني 4 من 9.94 عند المدة صفر الى 9.43 بعد ثلاث ساعات من التعرض بينما انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 بالمدة صفر من 9.94 الى 9.23 بعد مدة تعرض ثلاث ساعات، في حين سجلت عند مدة التطهير (35s) انخفاضاً لوغاريتمياً في الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 من 9.96 عند المدة صفر الى 9.39 بعد ثلاث ساعات من التعرض وبلغ الانخفاض في لوغاريتم الأعداد / مل الحية عند الأس الهيدروجيني 1.5 الى 9.2 فيما بلغت النسبة المئوية للانخفاض اللوغاريتمي لمدد التطهير (25s و 30s و 35s) عند الأس الهيدروجيني 1.5 ولمدة تعرض ثلاث ساعات 7.12 و 7.14 و 7.63% على التوالي، في حين لوحظ عند مدة التطهير (60s) ان الأعداد الحية للبكتريا كانت متباينة في الانخفاض عند الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 والذي انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند المدة صفر من 9.94 الى 9.76 و 8.91 و 8.71 بعد ثلاث ساعات من التعرض وسجلت تبايناً أكثر وضوحاً في لوغاريتم الاعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 وبالمدد (ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) إذ بلغت 9.04 و 8.56 و 8.36 على التوالي وبنسبة مئوية للانخفاض اللوغاريتمي للأعداد الحية بلغت 15.89% بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض.

وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين الأس الهيدروجيني المختلف لكل فترة معاملة ولكل عزلة

عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$.

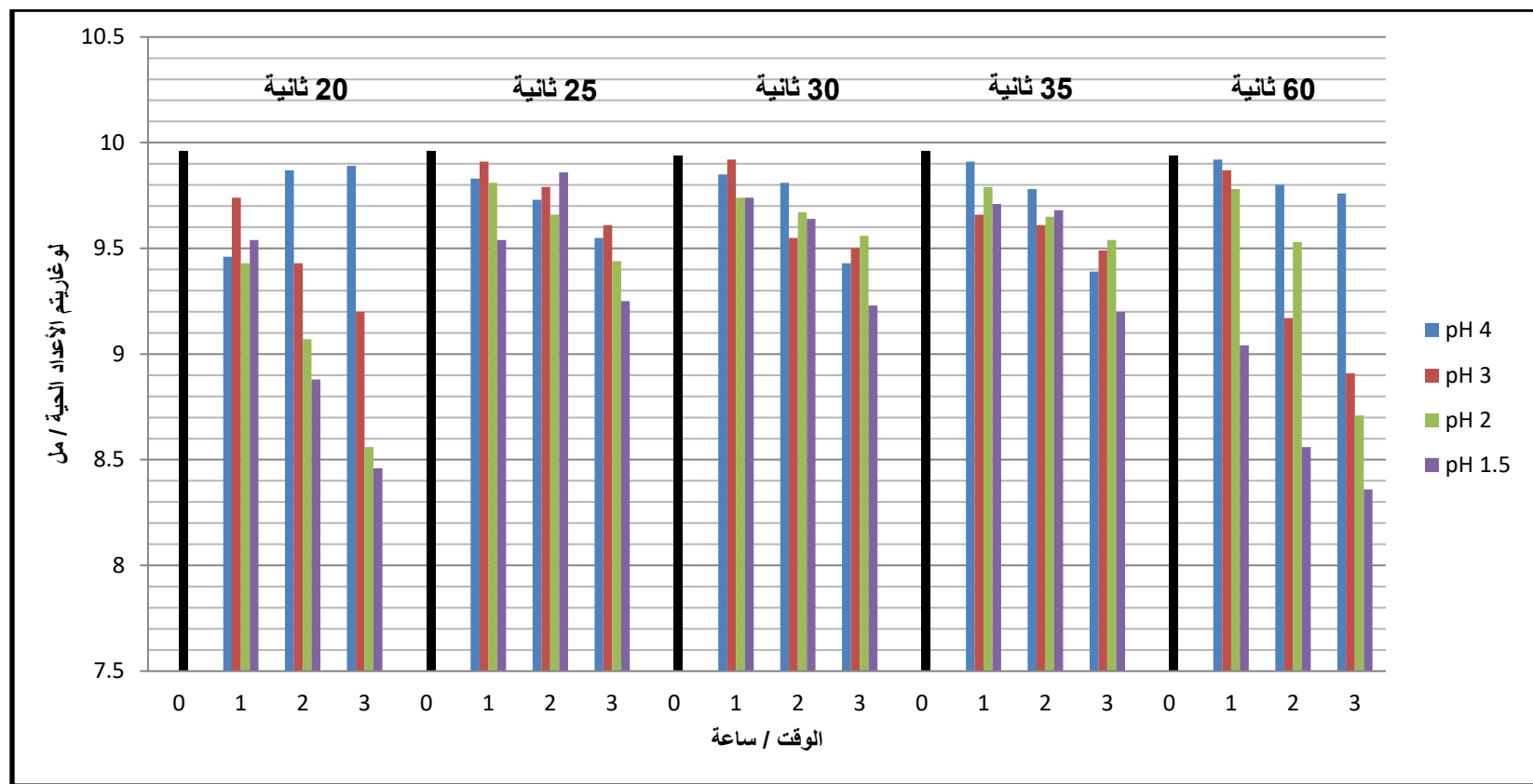
وبناءً على ماجاء من النتائج فقد ذكر كل من (Champague *et al.*, 2005) ، (O'May *et al.*, 2005) ، (Succi *et al.*, 2005) ، (Berrada *et al.*, 1991) أن تعريض المعززات الحيوية الى قيم منخفضة من الأس الهيدروجيني 2 و 1.5 ولمدة (3) ساعات تُعد من الظروف ذات الأجهاد العالي كون هذه الظروف أعلى من البيئة الطبيعية للمعدة اذ أن مدة بقاء البكتريا في المعدة تقدر بحوالي 60-90 دقيقة فيما تُعد مقاومة البكتريا لهذه الظروف مؤشراً لتصنيع منتج لبني متخمّر علاجي يحتوي على أعداد حية من البكتريا كافية للمرور من المعدة ووصولها الى الأمعاء الدقيقة والغليظة.

وعند مراجعة دراسات سابقة لمدى مقاومة بكتريا *Lactobacillus ssp.* للحموضة تبين أن الأعداد الحية كانت متقاربة وبالتحديد عند التعرض لمدة (3) ساعات وبالأس هيدروجيني 2 و 1.5 إذ سجلت الأعداد الحية 95×10^3 و 42×10^2 على التوالي (حسين، 2004).

كما أن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما درسه (Cho *et al.*, 2013) لعزلتين من بكتريا *L. plantarum* (DKL109, DKL119) عند الأس الهيدروجيني 2 وللمدتين (ساعة وساعتان) إذ كان لوغاريتم الأعداد الحية / مل للعزلة DKL109 (5.96 و 5.98) على التوالي و (8.46 و 8.26) على التوالي للعزلة DKL119، كما جاءت متوافقة مع ما ذكره (Kalui *et al.*, 2009) عند دراسته لمقاومة 19 عزلة من بكتريا *L. plantarum* للأس الهيدروجيني 2.5 و 2 ولمدد (صفر و ساعة و ساعتان وثلاث ساعات) ولم تسجل أي عزلة عدم قدرتها على مقاومة الظروف الحامضية، كما انها مقاربة للنتائج التي حصل عليها (Al-Shawi, 2010) عند دراسته لتحمل بكتريا *L. plantarum* للأس الهيدروجيني 2 و 3 و 4 وبمدد (صفر، ساعة، ساعتان و ثلاث ساعات) والتي انخفض فيها لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 10 و 10.2 و 10.01 الى 5.38 و 6.08 و 6.31 على التوالي ولم تتم الإشارة الى عدم قدرة أي عزلة على مقاومة الظروف الحامضية، ومتوافقة ايضاً مع ما ذكره (Harutoshi *et al.*, 2007) من قدرة بكتريا *L. acidophilus* و *L. casei* و *L. plantarum* على النمو في وسط من عصير شبيه المعدة المحضر صناعياً وبأس هيدروجيني 2 و 3 و 4 ولمدد (ساعة و ساعتان وثلاث ساعات).

ويمكن أن يعزى سبب مقاومة المعززات الحيوية الى المستويات المنخفضة من الحموضة نتيجة للحالة الفسيولوجية لساييتوبلازم الخلية والذي ينظم نسبة الحموضة بين (pH الخارج) و (pH داخل) الخلية (McDonald *et al.*, 1990)، إذ فسر (Guchte *et al.*, 2002) أن (pH الداخل) عند انخفاضه في بعض أنواع البكتريا قد يؤدي الى توقف في نشاط الانزيمات أو قد يلحق أضرار في البروتينات والاحماض النووية ، في حين بين (Lebeer *et al.*, 2008) أن التباين في تحمل

المعززات الحيوية للظروف الحامضية القاسية يعود الى مايسمى (البروتون الدافع) والذي يستخدم كمصدر للطاقة في عمليات النقل عبر الغشاء الساييتوبلازمي، لذا من الممكن أن يعزى سبب زيادة مقاومة البكتريا المطفرة IRQ12 وعند مدد التطهير المختلفة الى ان عملية التطهير ساعدت في حدوث تغيرات في الطبيعة الفسيولوجية لساييتوبلازم الخلية أو بسبب تنشيط طاقة البروتون الدافع.



شكل (4-15) مقاومة العزلات المحلية المطفرة لبكتريا *Lactobacillus plantarum* بمدد التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة

11-4 مقاومة العزلة المحلية البرية والمطفرة لبكتريا *Pediococcus acidilactici* SNN12

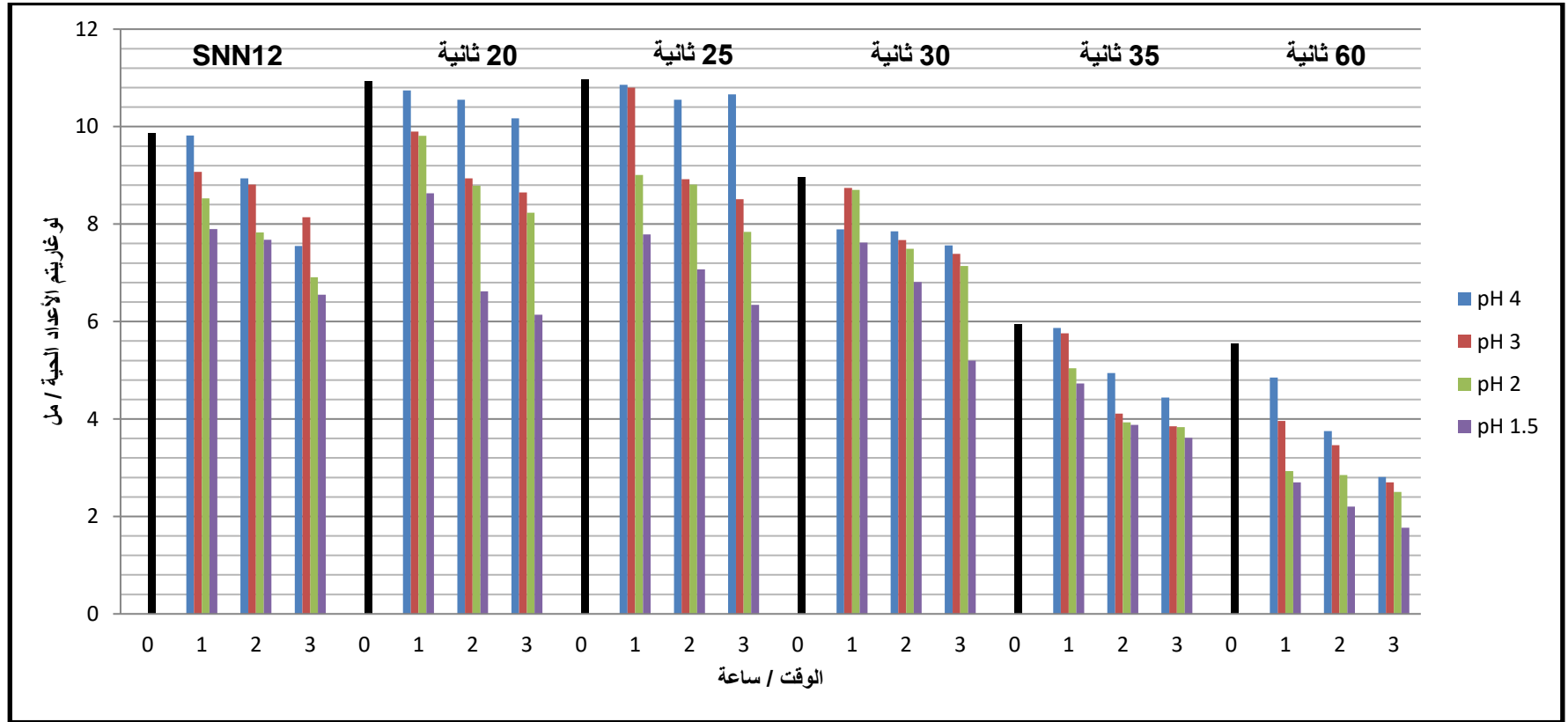
لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني

يبين الشكل (4-16) مقاومة الحموضة للعزلة البرية لبكتريا *P. acidilactici* SNN12 والتي أظهرت مقاومة عالية للأس الهيدروجيني 4 إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند المدة صفر من التعرض 9.86 ثم انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل بعد مرور 3 ساعات من التعرض الى 7.55، أما عند الأس الهيدروجيني 1.5 فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.86 عند الوقت صفر ساعة الى 6.55 بعد ثلاث ساعات من التعرض، فيما بلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 الى 23.42 و 17.44 و 29.91 و 33.56 % على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض.

في حين أظهرت نتائج تطهير العزلة المحلية لبكتريا *P. acidilactici* SNN12 وبمدد التطهير المختلفة الشكل (4-16) والملحق (2) تبايناً في الأعداد الحية على الرغم من ارتفاع أعدادها عند مدة التطهير 20s و 25s والذي كان متقارباً إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 وبالمدد صفر ساعة 10.94 و 10.96 على التوالي وأستمر مرتقعا حتى عند التعرض لمدة 3 ساعات بأعداد وصلت الى 10.17 و 10.66 على التوالي في حين انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 1.5 الى 6.14 و 6.34 على التوالي، أما عند مدة التطهير 30s فقد بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند الأس الهيدروجيني 4 ولمدة 3 ساعات من التعرض والذي انخفض الى 5.2 عند الأس الهيدروجيني 1.5 بعد 3 ساعات التعرض، بينما لوحظ الانخفاض الكبير في الأعداد الحية عند مدة التطهير 35s و 60s والذي يعكس مدى تأثر هذه البكتريا بمدد التعرض للأشعة إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل لمدة التطهير 35s وعند المدة صفر ساعة من 5.95 الى 3.61 عند الأس الهيدروجيني 1.5 بعد 3 ساعات من التعرض فيما انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل بدرجة كبيرة عند المدة 60s وللأس الهيدروجيني 1.5 من 5.55 عند المدة صفر الى 1.77 بعد 3 ساعات من التعرض، أما النسب المئوية للوغاريتم الانخفاض في الأعداد الحية لمدد التطهير 20s و 25s و 30s و 35s و 60s عند الأس الهيدروجيني 1.5 فقد بلغت 43.87 و 42.15 و 42.02 و 39.32 و 68.1% بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض. وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين الأس الهيدروجيني المختلف لكل فترة معاملة ولكل عزلة عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$.

إن نتائج مقاومة الأس الهيدروجيني للعزلة المحلية البرية جاءت متوافقة مع ماذكره **Ribeiro et al., (2014)** عند دراسته لبكتريا *P. acidilactici* والتي أشار فيها الى أن لوغاريتم الأعداد

الحية / مل لهذه البكتريا عند الأس الهيدروجيني 4 وبالمدة صفر ساعة من التعرض بلغ 12.3 وأستمرت البكتريا في المحافظة على هذه الأعداد الحية حتى عند الأس الهيدروجيني 2.5 و 1.3، ولوحظ الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية بعد مرور 3 ساعات من التعرض إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 7 الى 2.6 و 3.8 عند الأس الهيدروجيني 2.5 و 1.3 على التوالي، كما جاءت متوافقة مع ما ذكره (Millette *et al.*, 2008) عند دراسته لنوعين من بكتريا *P.acidilactici* MM33, MM33A إذ لاحظ ان لوغاريتم الأعداد الحية / مل لهذه البكتريا كان مرتفعا عند الأس الهيدروجيني 6.5 بمقدار 9.62 وأستمر حتى عند الأس الهيدروجيني 3 ليصل الى 9.54 في حين لاحظ الانخفاض في الأعداد الحية / مل بعد مدة من التعرض ليصل الى 4.7 عند الأس الهيدروجيني 2، عند تعرض الكائنات الحية الدقيقة الى الظروف الحامضية فإنه يتم المحافظة على توازن الحموضة عن طريق التخلص من H^+ من الخلية وهذا يتوقف على نشاط انزيم $H^+ - ATPase$ وهو الانزيم المسؤول عن الحفاظ على تركيز H^+ بين الخلية ووسط النمو وعليه فإن مقاومة بكتريا *P.acidilactia* ترتبط مع كفاءة انزيم $H^+ - ATPase$ وهذا ما يفسر مقاومة البكتريا للأوساط الحامضية عند التعرض الى أس هيدروجيني 3 و 2 لمدة 3 ساعات (Guo *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2006).



شكل (4-16) مقاومة العزلة المحلية SNN12 والمطفرة لبكتريا *Pediococcus acidilactici* بمدد التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني 4 و 3 و 2 و 1.5 بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة

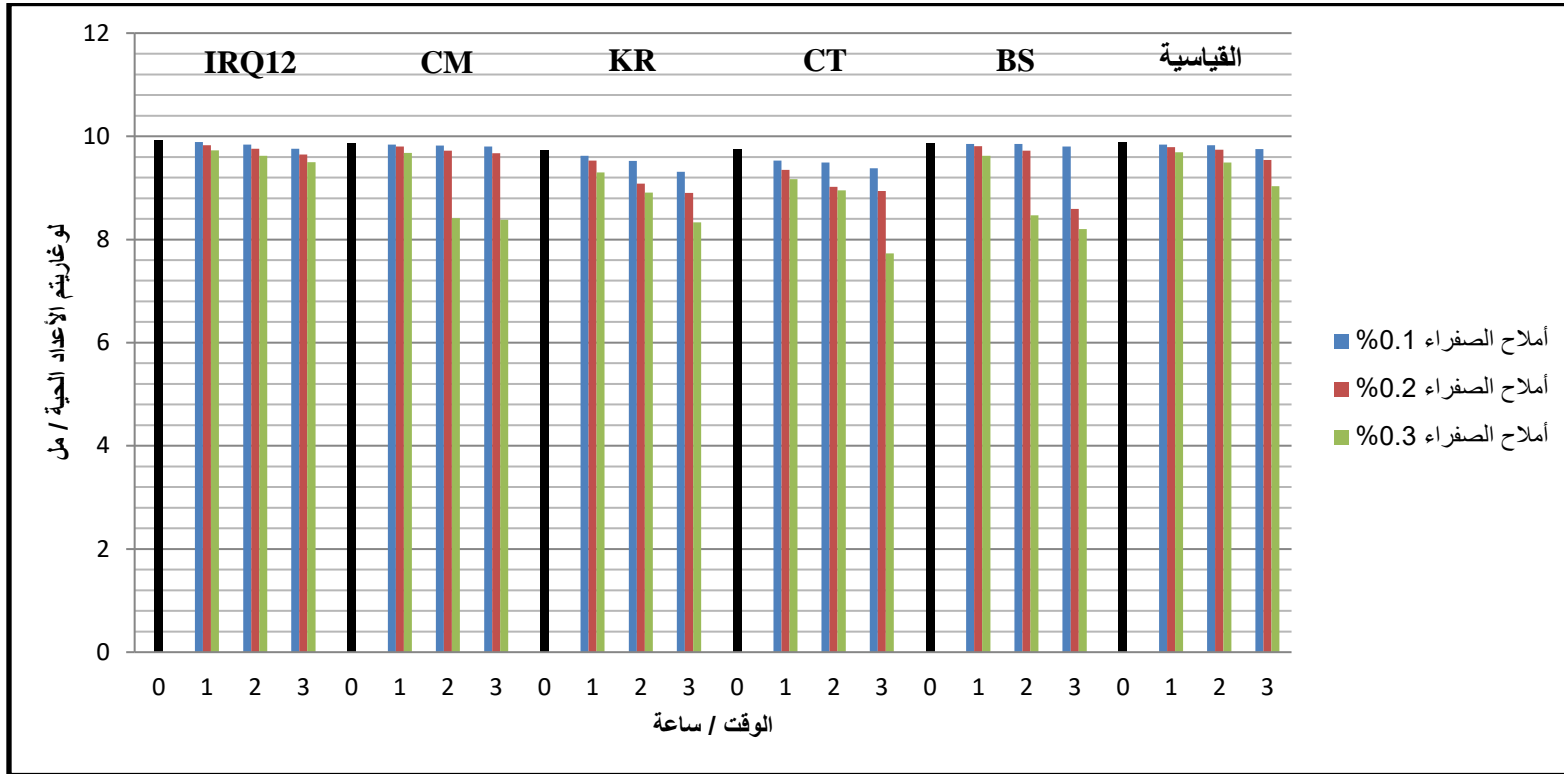
4-12 مقاومة العزلات المحلية والقياسية والمطفرة لبكتريا *L.plantarum* لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء

من الواجب عند اختيار سلالات من المعزلات الحيوية كمصادر علاجية تستخدم في تصنيع منتجات غذائية أن تكون البكتريا الحية بأعداد كافية في المنتج من خلال ما تتميز به هذه البكتريا من مقاومة لأملاح الصفراء لتبقيا حية بأعداد كافية (*Gerez et al., 2012; Succì et al., 2005*).

إذ يبين الشكل (4-17) والملحق (3) نتائج مقاومة العزلات المحلية والبكتريا القياسية لتراكيز 0.1 و 0.2 و 0.3% من أملاح الصفراء وبمدد زمنية (صفر و ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) ويلاحظ فيه وجود مقاومة عالية لهذه التراكيز مع تباين بسيط في الأعداد الحية بين العزلات، إذ تُظهر النتائج أن العزلات (IRQ12، CM، BS و القياسية) أعطت أعلى مقاومة مقارنة ببقية العزلات إذ انخفض فيها لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.1% وبالوقت صفر من 9.92 و 9.87 و 9.86 و 9.88 الى 9.76 و 9.80 و 9.80 و 9.75 على التوالي بعد مرور ثلاث ساعات من المعاملة فيما بلغت النسبة المئوية للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية 1.61 و 0.71 و 0.6 و 1.31% على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض، وعند تركيز 0.2% انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.92 و 9.87 و 9.86 و 9.88 في الوقت صفر الى 9.65 و 9.67 و 8.59 و 9.54 على التوالي بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض. وبلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية 2.72 و 2.02 و 12.88 و 3.44% على التوالي بعد التعرض لمدة ثلاث ساعات، أما عند تركيز 0.3% وبالوقت صفر فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.92 و 9.87 و 9.86 و 9.88 الى 9.50 و 8.38 و 8.20 و 9.03 على التوالي بعد مرور ثلاث ساعات من المعاملة وبلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية 4.23 و 15.09 و 16.83 و 8.60% على التوالي بعد التعرض لمدة ثلاث ساعات.

فيما تقاربت نتائج مقاومة العزلتين KR و CT لأملاح الصفراء إذ بلغت النسبة المئوية للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية لهما عند تركيز 0.1% الى 4.31 و 3.69% على التوالي بعد التعرض لمدة ثلاث ساعات فيما انخفضت عند تركيز 0.2% الى 8.53 و 7.80% على التوالي بعد التعرض لمدة ثلاث ساعات وكان الانخفاض واضحاً عند تركيز 0.3% وبعد التعرض لثلاث ساعات والذي بلغ 14.38 و 20.63% على التوالي عندما كانت نسبة الانخفاض في الأعداد الحية عند الساعة الاولى من التعرض للتركيز نفسه 4.41 و 5.85% على التوالي. وقد لوحظ وجود

فروق معنوية بين تراكيز أملاح الصفراء المختلفة لكل فترة معاملة ولكل عزلة عند مستوى احتمالي
 $P \leq 0.01$.



شكل (4-17) مقاومة العزلات المحلية IRQ12 و CM و KR و CT و BS والسلالة القياسية لبكتريا *Lactobacillus plantarum* لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3 % بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة

وبالنسبة لمقاومة العزلة المطفرة *L.plantarum* IRQ12 لأملاح الصفراء والتي أستخدمت أشعة UV light للتطهير على طول موجي (254 nm) وبمدد 20 و 25 و 30 و 35 و 60 ثانية يمكن الملاحظة من الشكل (4-18) أن عملية التطهير كانت متباينة في الحفاظ على مستوياتها من الأعداد الحية للبكتريا ففي مدة التطهير (20s) انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.1 و 0.2 و 0.3% وفي المدة صفر من التعرض لأملاح الصفراء من 9.8 الى 9.66 و 9.20 و 9.04 على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض إذ كان الانخفاض أكثر وضوحاً عند التركيز 0.3% بعد ثلاث ساعات من التعرض، فيما بلغت النسبة المئوية للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض 1.42 و 6.12 و 7.75% عند التركيز 0.1 و 0.2 و 0.3% على التوالي.

أما عند مدة التطهير (25s) والذي يُعد الأمثل في مقاومة العزلة لأملاح الصفراء فقد سجل فيها انخفاضاً بسيطاً في لوغاريتم الأعداد الحية مقارنة مع المدد الأخرى من التطهير (صفر و ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) وبتركيز 0.1 و 0.2 و 0.3% إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند المدة صفر من التعرض من 9.86 الى 9.55 و 9.43 و 9.32 على التوالي ويلاحظ مدى الانخفاض الطفيف في لوغاريتم الأعداد الحية عند تركيز 0.3% وفي مدة التعرض ثلاث ساعات، فيما بلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية 3.14 و 4.36 و 5.47% عند تركيز 0.1 و 0.2 و 0.3% على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض،

وعند مدة التطهير (30s) فقد أظهرت العزلة انخفاضاً طفيفاً في لوغاريتم الأعداد الحية / مل والذي انخفض عند تركيز 0.1% من 9.85 عند المدة صفر الى 9.83 بعد مرور ساعة واحدة فيما انخفض عند تركيز 0.2% من 9.85 عند المدة صفر الى 9.77 بعد مرور ساعة واحدة بينما كان الانخفاض أكثر وضوحاً عند التركيز 0.3% إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند المدة صفر من التعرض من 9.85 الى 9.46 بعد مرور ساعة واحدة، وبلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل بعد مرور ثلاث ساعات من التعرض عند تركيز 0.1 و 0.2 و 0.3% الى 9.61 و 9.27 و 9.07 على التوالي وبنسبة مئوية للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية بلغت 2.43 و 5.88 و 7.91% على التوالي ، ويمكن ملاحظة أن مقاومة العزلة المطفرة لأملاح الصفراء عند مدة (35s) كانت متباينة في الأعداد الحية بتغير التركيز ووقت التعرض للمعاملة إذ شهدت أعلى مقاومة لأملاح الصفراء عند التركيز 0.3% في المدة صفر إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل 9.88 فيما بلغ أدنى انخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند التركيز 0.3% بعد مرور ثلاث ساعات التعرض 8.65 وبنسبة انخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية بلغ 12.44% ، أما النسبة المئوية للانخفاض في

الاعداد الحية عند تركيز 0.1 و 0.2% بعد ثلاث ساعات من التعرض فقد بلغت 6.88 و 9.51% على التوالي.

ويلاحظ استمرار مقاومة العزلة المطفرة لأملاح الصفراء عند المدة (60s) إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.1% ويمدد (صفر و ساعة و ساعتان و ثلاث ساعات) من 9.65 الى 9.39 و 9.30 و 9.04 على التوالي وبلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية 2.69% بعد مرور ساعة واحدة و 3.62% بعد ساعتان و 6.32% بعد ثلاث ساعات من التعرض، أما عند تركيز 0.2% فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.65 عند صفر ساعة الى 9.34 و 9.11 و 8.94 بعد ساعة وساعتان وثلاث ساعات من التعرض وبنسبة انخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية بلغت 7.35% بعد ثلاث ساعات من التعرض، أما عند تركيز 0.3% فقد انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 9.65 عند المدة صفر الى 8.79 بعد مرور ثلاث ساعات فيما كانت النسب المئوية للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية 5.59 و 8.08 و 8.91% عند المدة (ساعة وساعتان وثلاث ساعات) على التوالي من التعرض لنفس التركيز. وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين تراكيز أملاح الصفراء المختلفة لكل فترة معاملة ولكل عزلة عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$.

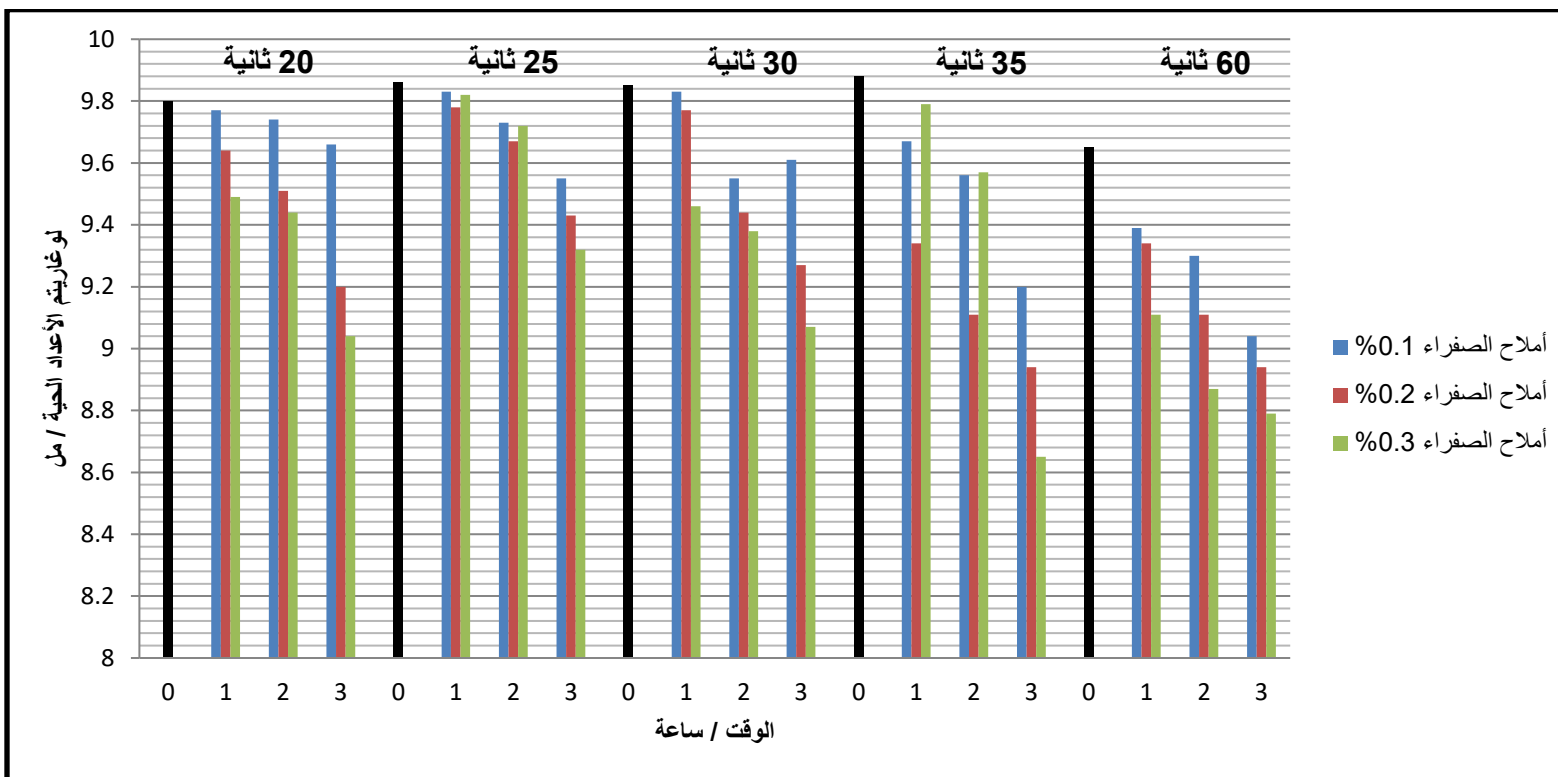
ويمكن أن يعلل سبب مقاومة بكتريا *L.plantarum* لأملاح الصفراء الى قابليتها على تحليل هذه الاملاح في الوسط من خلال افراز انزيم (Bile salt hydrolase (BSH) ويصاحب ذلك عوامل أخرى كنظام الاستجابة للظروف الاجهادية ووجود بعض العناصر في الجدار الخلوي والتي تحافظ على سلامته وزيادة نشاط العمليات الايضية وزيادة كفاءة نقل الاحماض الامينية والتخليق البيولوجي للأحماض الدهنية (Taranto *et al.*, 2006; Papamanoli *et al.*, 2003). وقد بين Du *et al.*, (1998) أن مقاومة البكتريا لأملاح الصفراء ترتبط بنشاط الانزيم المحلل لأملاح الصفراء وبالتالي يقلل من تأثيره السام فوجود أملاح الصفراء في الوسط يُعد أكثر ضرراً للبكتريا من انخفاض الرقم الهيدروجيني (Khalil *et al.*, 2012). نكر (Duary *et al.*, 2012) ازدياد نشاط التعبير عن جينات انزيم BSH في بكتريا *L.plantarum* بارتفاع درجة تركيز املاح الصفراء في الوسط ووصوله الى ستة أضعاف عند تركيز 2% أملاح صفراء.

إن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما ذكره Huang *et al.*, (2013a) عند دراسته لثلاث عزلات من بكتريا *L.plantarum* والتي تميزت بمقاومة عالية للتركيز المرتفعة من أملاح الصفراء والتي تصل الى 1% بعد مدة تعرض 3 ساعات، كما جاءت متوافقة مع ما ذكره Idoui *et al.*, (2013) من أن تعريض مجموعة واسعة من المعزلات الحيوية ومن ضمنها بكتريا *L.plantarum*

لتراكيز من أملاح الصفراء قد أظهرت مقاومة عالية لتركيز 0.3% إذ بلغت أعلى نسبة للبكتريا الحية 75.89% بعد أربع ساعات من التعرض، وهذا ما بينه أيضاً **Cho et al., (2013)** أن الأعداد الحية من بكتريا *L.plantarum* كانت مرتفعة عند تركيز 1% أملاح صفراء بعد مرور ساعتين من التعرض وأستمرت الأعداد الحية بهذا الارتفاع حتى عند تركيز 3% بمدة تعرض أربع ساعات.

إن هذا التباين في الأعداد الحية لبكتريا *L.plantarum* باختلاف التركيز ومدة التعرض يعود الى مدى التكيف والاستجابة للظروف الأجهادية والذي يختلف بين الأنواع البكتيرية وبين السلالات نفسها **(Tannock et al.,1989)**.

ولابد من الإشارة الى أن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمواد الغذائية الحاوية على البكتريا العلاجية يكون لها تأثير كبير في اثناء الخزن المؤقت والذي ينعكس على إمكانية تحمل المعززات الحيوية للأملاح الصفراء **(Patel et al., 2004)**، فقد بين **Khalil et al., (2012)** في دراسته لإحدى وعشرين عزلة لبكتريا *L.plantarum* المعزولة من الزبادي المصري المخزن بالتبريد، انها تمكنت من مقاومة أملاح الصفراء بتركيز 0.1 و 0.2 و 0.3 و 0.5% إذ تباينت الأعداد الحية للبكتريا في المدة من صفر الى 3 ساعات وسجلت ارتفاعاً في الأعداد الحية / مل من 8.07 الى 8.09 عند تركيز 0.1% بعد 3 ساعات من التعرض.



شكل (4-18) مقاومة العزلات المحلية المطفرة لبكتريا *Lactobacillus plantarum* بمدد التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3% بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة

4-13 مقاومة العزلة المحلية البرية والمطفرة لبكتريا *P.acidilactici* SNN12 لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء

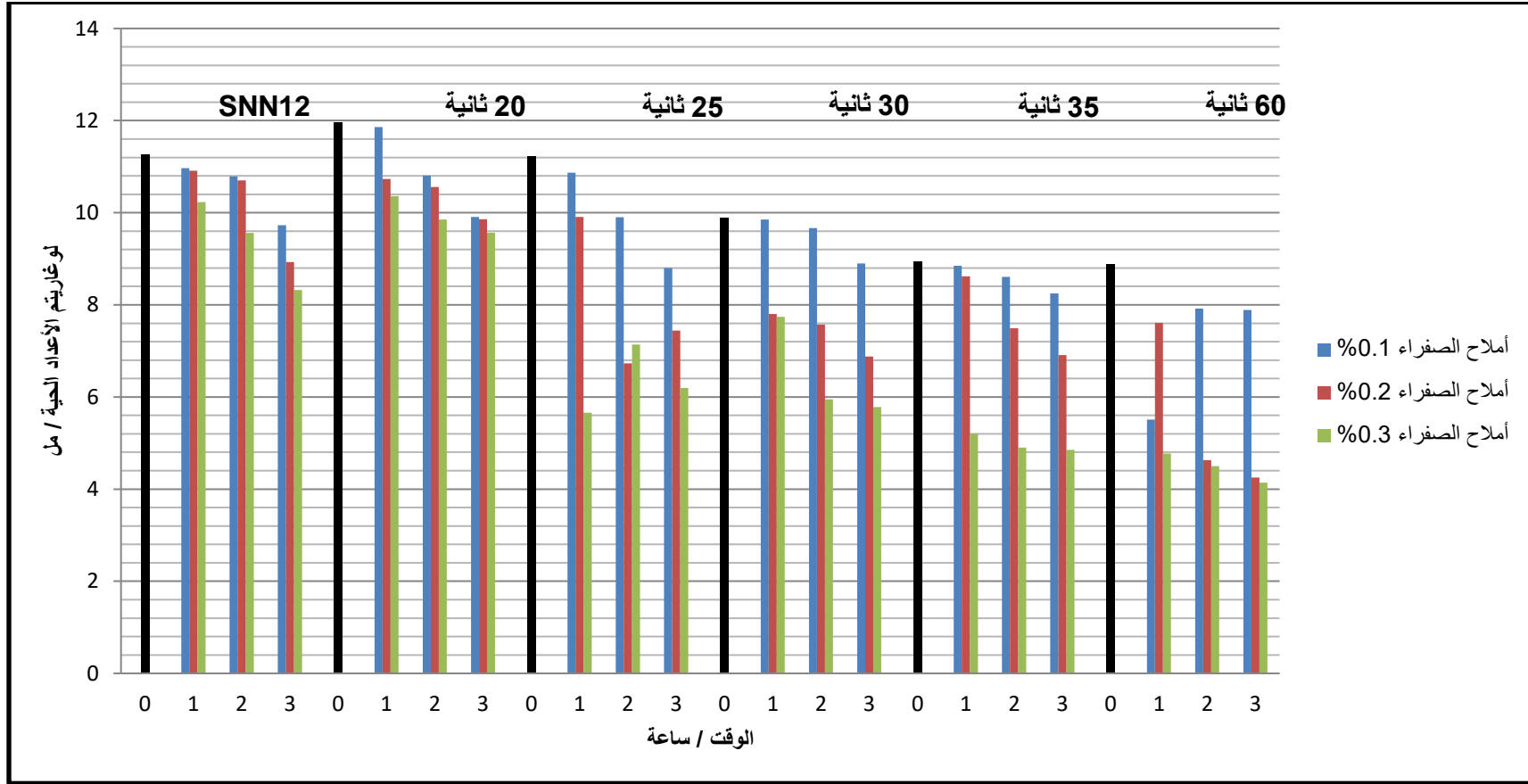
أظهرت نتائج مقاومة العزلة البرية لبكتريا *p.acidilactici* SNN12 الشكل (4-19) ارتفاع الأعداد الحية للبكتريا قيد الدراسة الحالية عند التراكيز المختلفة للأملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3% إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.1% وفي المدة صفر ساعة 11.25 والذي انخفض بصورة طفيفة بعد 3 ساعات من التعرض الى 9.73، كما أظهرت العزلة مقاومة عالية حتى عند ارتفاع التركيز الى 0.3% إذ انخفض الى 8.32 بعد مرور 3 ساعات من التعرض، فيما بلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية عند تركيز 0.1 و 0.2 و 0.3% بعد مدة تعرض ثلاث ساعات 13.51 و 20.62 و 26.04% على التوالي الملحق (4).

في حين بينت نتائج تعريض العزلة المحلية الى مدد مختلفة من التطهير كما في الشكل (4-19) أن العزلة أظهرت مقاومة عند مدة التطهير 20s والتي كانت نتائجها مقارنة لمقاومة العزلة البرية لتراكيز أملاح الصفراء، فقد بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.3% الى 11.96 عند المدة صفر ساعة ثم انخفض بعد مرور 3 ساعات من التعرض الى 9.57، بينما كانت نتائج مقاومة البكتريا للأملاح الصفراء عند مدد التطهير 25s و 30s و 35s متقاربة فيما بينها إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.1% وفي المدة صفر ساعة من 11.23 و 9.88 و 8.94 الى 8.80 و 8.90 و 8.25 على التوالي بعد 3 ساعات من التعرض، فيما كان الانخفاض أكثر وضوحاً عند تركيز 0.3% إذ انخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل الى 6.2 و 5.78 و 4.85 بعد 3 ساعات من التعرض، باستثناء الانخفاض الكبير عند المدة 25s في وقت التعرض لساعة واحدة وعند تركيز 0.3% والذي انخفض فيه لوغاريتم الأعداد الحية / مل الى 5.66، أما مدة التطهير 60s فقد كان الأكثر تبايناً وعشوائية في تقدير لوغاريتم الأعداد الحية / مل من خلال ملاحظة الانخفاضات الشاذة عند تركيز 0.1% بعد ساعة واحدة من التعرض بأعداد حية بلغت 5.51، وعند تركيز 0.2% بلغت الأعداد الحية 4.63 و 4.25 بعد مرور 2 و 3 ساعات على التوالي من التعرض فيما كان الأكثر انخفاضاً في لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.3% إذ بلغ 4.14 بعد 3 ساعات من التعرض. فيما بلغت نسبة الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية عند مدد التطهير (20s و 25s و 30s و 35s و 60s) وبتركيز 0.3% أملاح الصفراء الى 19.98 و 44.79 و 41.49 و 45.74 و 53.37% على التوالي بعد ثلاث ساعات من التعرض.

وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين تراكيز أملاح الصفراء المختلفة لكل فترة معاملة ولكل عزلة

عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$. وقد جاءت هذه النتائج منققة مع ماذكره *Riberio et al.*,

(2014) ودراسته التي بين فيها قدرة بكتريا *P.acidilactici* على مقاومة التراكيز المرتفعة لأملح الصفراء عندما لاحظ ان لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند تركيز 0.3 و 1% بلغ 9.8 في حين انخفض بعد مرور 3 - 6 ساعات من التعرض لتصل الأعداد الحية الى 7 و 6.9 على التوالي. ويعود التباين في مقاومة بكتريا *P.acidilactici* لأملح الصفراء لعدة أسباب منها تفاعل أغشية الخلايا البكتيرية الحاوية على الدهون مع أملاح الصفراء وبذلك تعيق من عملية النمو وتقضي على عدد من البكتريا، كما تسبب في تحطم جدار الخلية وخفض القوة الدافعة للبروتون والذي يمنع بدوره نقل المواد المغذية الى داخل الخلية (Prasad *et al.*, 1998).



شكل (4-19) مقاومة العزلة المحلية SNN12 والمطفرة لبكتريا *Pediococcus acidilactici* بمدد التطهير 20 ثانية و 25 ثانية و 30 ثانية و 35 ثانية و 60 ثانية لتراكيز مختلفة من أملاح الصفراء 0.1 و 0.2 و 0.3% بمدد معاملة صفر و 1 و 2 و 3 ساعة

4-14 فحص التضاد بين العزلات البكتيرية *L. plantarum* المحلية وبكتريا بادئ اليوكرت

إن دراسة العلاقة التضادية بين الأنواع البكتيرية للعزلات المحلية المدروسة وبين الأنواع الأخرى من المعززات الحيوية تُعد ضرورية قبل عملية إعداد أي منتج لبني متخمّر علاجي من المعززات الحيوية، ذلك أن عملية التثبيط تختلف باختلاف النوع والسلالة (*Vinderola et al., 2002*) وبذلك فمن الممكن أن تؤثر بصورة مباشرة على كفاءة المنتج النهائي، وقد شملت هذه الدراسة كل أنواع العزلات المحلية والقياسية المدروسة بضمنها المطفرة لاعطاء صورة واضحة عن طبيعة البكتريا المعزولة ومقارنتها مع السلالة الواعدة التي تم اختيارها ومدى تأثير عمليات التطفير على الفعل التضادي. إذ يبين الجدول (4-9) عدم وجود أي تأثير تضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* وبين العزلات المحلية والسلالة القياسية المتمثلة بالعزلات IRQ12 و CM و KR و CT و BS و القياسية. كما لم يظهر أي فعل تضادي بين العزلات المحلية والسلالة القياسية مع بكتريا بادئ اليوكرت.

جدول (4-9) التأثير التضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت ضد العزلات المحلية والسلالة القياسية *L. plantarum* (إشارة اليمين) والتأثير التضادي للبكتريا العلاجية المعزولة ضد بادئ اليوكرت (إشارة اليسار)

التسلسل	بكتريا بادئ اليوكرت	IRQ12	CM	KR	CT	BS	القياسية
1	<i>S. thermophilus</i>	--	--	--	--	--	--
جدول (4-10) التأثير التضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت ضد السلالة المحلية المطفرة IRQ12 (إشارة اليمين)	<i>L. bulgaricus</i>						

الإشارة السالبة (إشارة اليمين) وعدم وجود تضاد للبكتريا العلاجية المعزولة ضد بادئ اليوكرت (إشارة اليسار)

التسلسل	بكتريا بادئ اليوكرت	IRQ12 20s	IRQ12 25s	IRQ12 30s	IRQ12 35s	IRQ12 60s
1	<i>S. thermophilus</i>	--	--	--	--	+-
2	<i>L. bulgaricus</i>	رارة (IRQ12)	الجدول (4-10) فلم يظهر أي تأثير تضادي بين بكتريا			

بادئ اليوكرت *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* (إشارة اليمين) وعدم وجود تضاد (إشارة اليسار) بين بكتريا بادئ اليوكرت IRQ12 20s و IRQ12 25s و IRQ12 30s و IRQ12 35s و IRQ12 60s كما لم يظهر أي تأثير تضادي بين العزلات المطفرة وبكتريا بادئ اليوكرت باستثناء العزلة المطفرة IRQ12 60s والتي أظهرت تأثيراً تضادياً مع كلا بكتريا بادئ اليوكرت ويمكن أن يعود سبب ذلك الى زيادة جرعة الاشعاع الموجهة التي

قد أدت الى حدوث طفرة زادت من قابلية البكتريا لإنتاج حامضي اللاكتيك والليزان سببا انخفاضاً في درجة حموضة الوسط لم تتمكن على أثرها بكتريا بادئ اليوكرت *S.thermophilus* و *L.bulgaricus* على النمو (Cetin, 1983)، فقد ذكر (Al-Shawi, 2010) ان إنتاج الاحماض العضوية في الوسط من بعض الأنواع البكتيرية يؤدي الى انخفاض الرقم الهيدروجيني مما يعمل على تثبيط نمو أنواع أخرى من البكتريا، كما يمكن أن يعزى سبب التثبيط الى ان حامض اللاكتيك المنتج من المعززات الحيوية يتفكك ويحرر أيون الهيدروجين والذي يخترق الغشاء الساييتوبلازمي للخلايا ويؤدي الى تثبيط الوظيفة الحيوية للخلية فضلاً عن زيادة نسبة بيروكسيد الهيدروجين المنتج من بعض سلالات المعززات الحيوية والذي يساعد على تحطيم النشاط الانزيمي للبكتريا (Collins and Aramaki, 1980; Corleh and Brown, 1980)، ومن الممكن أن تسبب الطفرة أيضاً زيادة في فعالية البكتريوسينات التي تنتجها بكتريا *L.plantarum* ضد الأنواع الأخرى من البكتريا (Ogunbanwo *et al.*, 2003).

وقد جاءت النتائج المذكورة متوافقة ما مذكوره (Arena *et al.*, 2015) عند تصنيع منتج لبني متخمّر يحتوي على خليط من بكتريا *L.plantarum* و *L.bulgaricus* ونوع آخر احتوى على بكتريا *L.plantarum* و *S.thermophilus* إذ لوحظ عند خزن المنتج بمدد 0 و 1 و 7 و 14 و 21 و 28 يوماً أن الأعداد البكتيرية الحية للمنتج تتخفّف بعد 1 و 7 و 14 يوماً بنسبة ضئيلة ولم يجد الباحث أن هناك فروقاً معنوية لهذا الانخفاض.

4-15 فحص التضاد بين العزلة البرية والمطفرة لبكتريا *P.acidilactici* SNN12 وبكتريا بادئ اليوكرت

أظهرت نتائج الجدول (4-11) وجود أكثر من علاقة تضادية بين بكتريا بادئ اليوكرت وبين بكتريا *P.acidilactici* إذ يلاحظ أن بكتريا *S.thermophilus* لم يكن لها تأثير مثبط على نمو السلالة قبل التطفير بينما ظهر التثبيط واضحاً عند مدة تطفير 30s و 35s و 60s كما أظهرت بكتريا *P.acidilactici* تأثيراً تضادياً على بكتريا *S.thermophilus* عند مدة تطفير 35s و 60s، في حين لم يكن هناك تأثير تضادي بين مدد التطفير 20s و 25s وبكتريا *S.thermophilus*، أما بالنسبة للتأثير التضادي بين بادئ بكتريا *L.bulgaricus* والعزلة المحلية فقد ظهر تأثيرها عند مدة تطفير 35s و 60s في حين لم يكن هناك تأثير تضادي بين العزلة المحلية البرية ومدد التطفير المختلفة على بكتريا *L. bulgaricus* عدا مدة تطفير 30s.

جدول (4-11) التأثير التضادي بين بكتريا بادئ اليوكرت ضد السلالة المحلية البرية والمطفرة SNN12

(إشارة اليمين) والتأثير التضادي للبكتريا العلاجية المعزولة المطفرة ضد بادئ اليوكرت (إشارة اليسار)

SNN12 60s	SNN12 35s	SNN12 30s	SNN12 25s	SNN12 20s	SNN12 البرية	بكتريا بادئ اليوكرت	التسلسل
++	++	--+	--	--	--	<i>S.thermophilus</i>	1
--+	--+	+--	--	--	--	<i>L.bulgaricus</i>	2

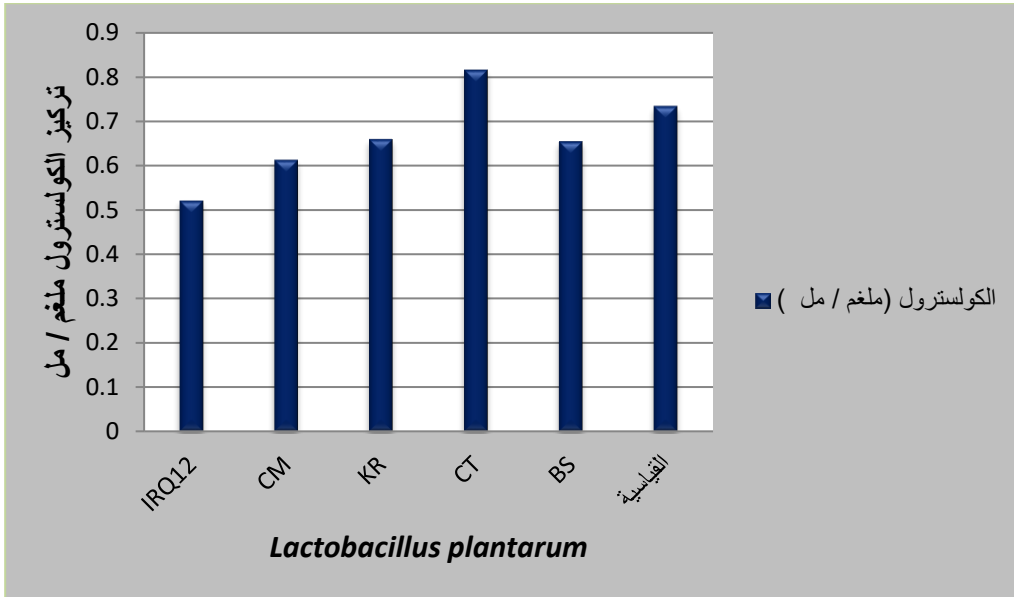
ويمكن أن يعزى سبب الفعل التضادي بين بكتريا *S.thermophilus* و العزلة المحلية المطفرة الى أن عملية التطهير قد أدت الى ضعف مقاومة البكتريا للبكتريوسينات المثبطة التي تنتجها هذه البكتريا ضد أنواع عديدة من البكتريا فقد ذكر (Renee and Somkuti, 2013) أن بكتريا *S.thermophilus* تنتج البكتريوسين كمثبط للبكتريا من خلال نظام استشعاري جيني، كما بين (Gilbreth and Somkuti, (2005) قدرة بكتريا *S.thermophilus* على تثبيط البكتريا من خلال انتاج مركب الثرموفلين المشابه لعمل البكتريوسين.

بينما يمكن أن يعزى سبب مقاومة البكتريا المطفرة للتأثيرات المثبطة الى حدوث طفرة في الجدار الخلوي للبكتريا ساعدت على مقاومتها، أما سبب التأثير التضادي لبكتريا *L.bulgaricus* على البكتريا المطفرة (35s و 60s) فيمكن أن يعود الى أن عملية التطهير قد خفضت من مقاومة البكتريا للظروف الحامضية الناتجة من نمو بكتريا *L.bulgaricus* إذ بين (Allende et al., 2007) أن الفعل التضادي في خفض حموضة الوسط عند نمو بعض أنواع المعززات الحيوية يكون تأثيرها التثبيطي مماثلاً لتأثير وجود البكتريوسينات في الوسط.

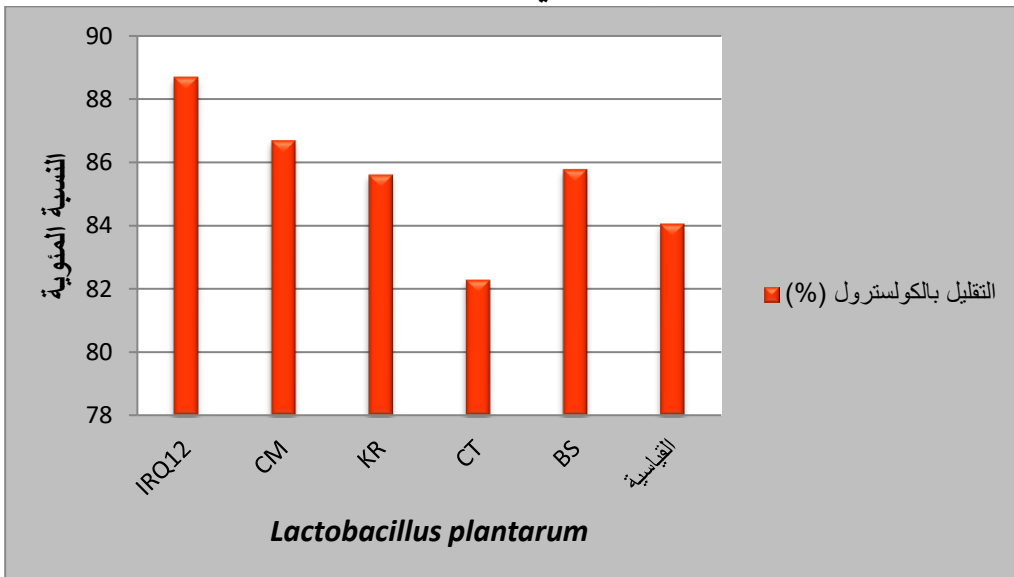
4-16 دراسة قدرة بكتريا *Lactobacillus plantarum* قبل التطهير وبعدها على خفض مستويات الكولسترول

عند اختيار المعززات الحيوية اللازمة لتصنيع منتج لبني متخمّر علاجي لابد لها أن تتميز بقدرة عالية على خفض الكولسترول الى جانب ما تُبديه من مقاومة لظروف الجهاز الهضمي القاسية كالرقم الهيدروجيني المنخفض ومقاومة أملاح الصفراء (Lye et al., 2010; De-Vries et al., 2006)، وعلى الرغم من اختلاف الطرائق المستخدمة لتشخيص قابلية البكتريا على خفض الكولسترول إلا أن الأساس واحد وهو مدى إمكانية بكتريا *Lactobacillus plantarum* على خفض الكولسترول في وسط النمو، إذ يبين الشكل (4-20) قدرة العزلات المحلية على تقليل كمية الكولسترول (4.6 ملغم / مل) بعد نموها في وسط MRS broth – EY بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة إذ كانت كمية الكولسترول في وسط النمو للعزلة IRQ12 بمقدار 0.52 ملغم كولسترول/ مل تلتها العزلات CM و BS و KR و القياسية و CT بمقدار 0.612 و 0.654 و 0.659 و 0.733 و 0.815 ملغم كولسترول/ مل على التوالي، ويلاحظ أن العزلة IRQ12 سجلت أقل نسبة

من الكولستروال الشكل (4-21) في الوسط وبنسبة انخفاض بلغت 88.69% في حين جاءت العزلات CM و BS و KR متقاربة في نسبة الكولستروال وبنسبة انخفاض بلغت 86.69 و 85.78 و 85.6% على التوالي بينما سجلت العزلتان القياسية و CT أقل نسبة انخفاض إذ بلغت 84.06 و 82.28% على التوالي.

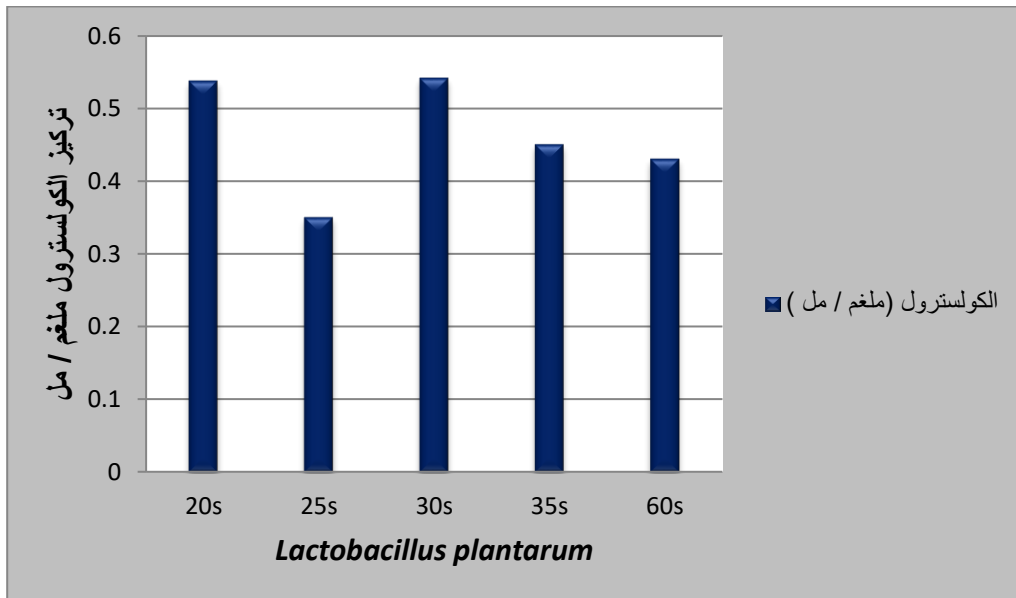


شكل (4-20) مقدرة العزلات المحلية والقياسية من بكتريا *L. plantarum* على خفض كمية الكولستروال ملغم / مل في وسط MRS Broth - EY

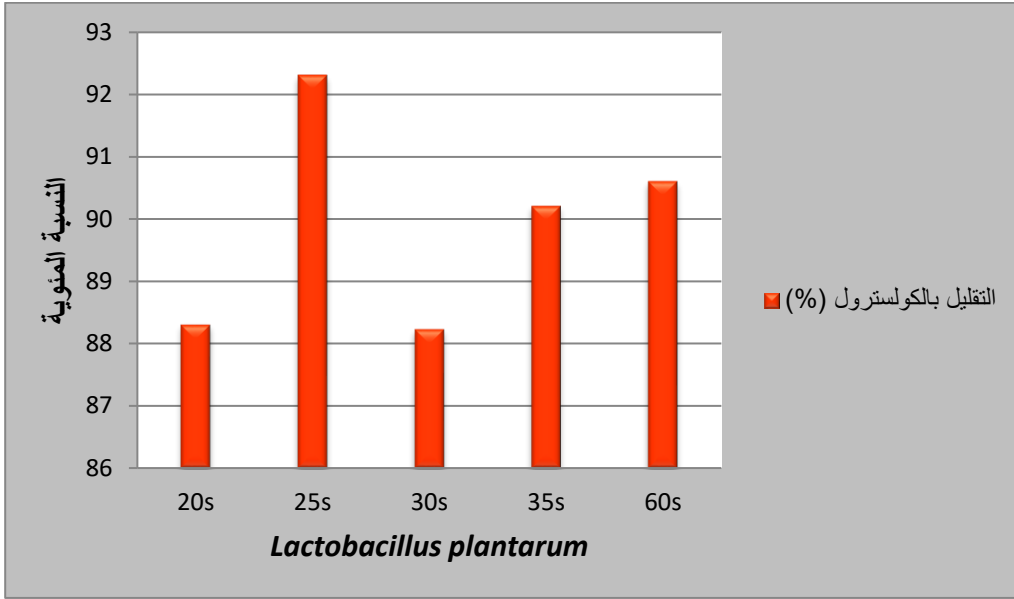


شكل (4-21) النسبة المئوية لانخفاض الكولستروال للعزلات المحلية والقياسية لبكتريا *L. plantarum* في وسط MRS Broth - EY

أما بالنسبة للسلالة المطفرة IRQ12 الشكل (4-22) و (4-23) فقد أظهرت نتائج التطهير للعضلات المحلية بعد نموها في وسط EY – MRS broth بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ان كمية الكولسترول قد تفاوتت حسب نوع الجرعة الاشعاعية المستخدمة إذ كانت أقل كمية كولسترول في الوسط للعزلة المطفرة بمدة 25s والتي بلغت 0.35 ملغم كولسترول / مل وبنسبة انخفاض عالية بلغت 92.3% تلتها العزلة 60s بكمية 0.43 ملغم كولسترول / مل وبنسبة انخفاض بلغت 90.6% ثم العزلة المطفرة بمدة 35s بكمية 0.45 ملغم كولسترول / مل وبنسبة انخفاض 90.2%، أما العزلة المطفرة بالمدة 30s و 20s فقد كانت كمية الكولسترول في الوسط مقارنة لسلالة IRQ12 قبل التطهير إذ بلغت 0.541 و 0.537 ملغم كولسترول / مل وبنسبة انخفاض بلغت 88.23 و 88.3% على التوالي، ويلاحظ من خلال النتائج المذكورة أنفاً نجد ان قدرة بكتريا *L.plantarum* على خفض مستويات الكولسترول كانت عالية نوعاً ما عند مقارنتها مع نتائج أخرى لدراسات سابقة إذ جاءت النتائج متوافقة مع ما ذكره **Sieladie et al., (2011)** في دراسة شملت 15 عزلة لبكتريا *L.plantarum* من مصادر مختلفة ان قدرة البكتريا على امتصاص وخفض الكولسترول تراوحت بين 56.52 – 95.65%.



شكل (4-22) مقدرة للسلالة المطفرة IRQ12 *L.plantarum* بمدد التطهير المختلفة على خفض كمية الكولسترول ملغم / مل في وسط EY – MRS Broth



شكل (4-23) النسبة المئوية لانخفاض الكولسترول للسلالة المطفرة *L. plantarum* IRQ12
بمدد التطهير المختلفة في وسط EY - MRS Broth

في حين جاءت النتائج اعلى مما ذكره (Sirilun *et al.*, 2010) والتي أشار فيها الى ان جميع بكتريا *L. plantarum* المعزولة من الطعام كانت فعاليتها عالية في خفض الكولسترول بنسبة تراوحت بين 25.41 - 81.46% في وسط النمو بعد مرور 24 ساعة.

ومتوافقة مع ما ذكره Ramasamy *et al.*, 2009 عندما تمكنت بكتريا *L. plantarum* من خفض نسبة الكولسترول بنسبة تراوحت بين 26.74 - 85.41% في وسط النمو بعد 20 ساعة من وضعها في الحاضنة، أما بالنسبة للعزلة المطفرة IRQ12 والتي أظهرت ارتفاعاً ملحوظاً في النسب المئوية لانخفاض الكولسترول عند المدد 25s و 35s و 60s فقد جاءت مقارنة مع ما بينه الراوي، 2005 عند دراسته لمقدرة بكتريا *L. caesi* في خفض الكولسترول عند تنميتها في وسط MRS broth - EY إذ بلغت النسبة المئوية للانخفاض 92.5%.

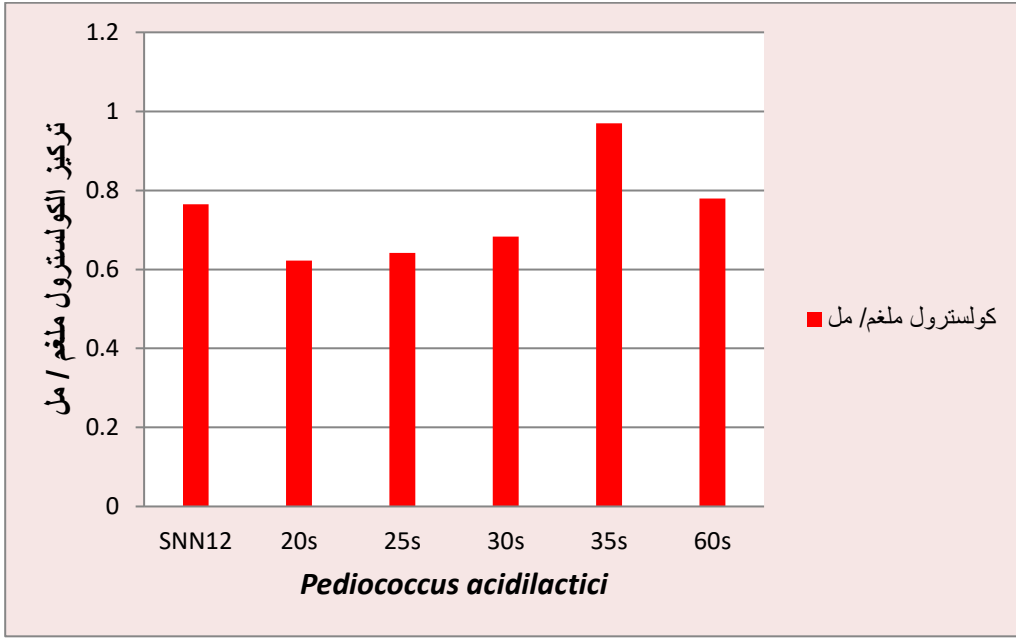
إن الزيادة في نسبة انخفاض الكولسترول في العزلات المطفرة يمكن أن تعود الى زيادة قابلية الغشاء الخلوي للبكتريا على امتصاص كمية أكبر من كولسترول الوسط (Liong and Shah, 2005b)، ولابد من الإشارة الى أن قدرة البكتريا على امتصاص الكولسترول تتأثر وفقاً لمعدل نموها في الوسط (Dora and Glenn, 2002).

إذ بين (Noh, 1997) ان الآلية المقترحة للحد من الكولسترول في المعززات الحيوية تتضمن إزالة بعض الكولسترول من خلال الغشاء الخلوي في اثناء النمو لذا تعود فائدة وجود نسبة عالية من البكتريا الحية الى زيادة قابليتها على امتصاص كمية أكبر من الكولسترول وبذلك تقلل من

نسبة امتصاص الكولسترول في الأمعاء وانتقالها الى الدم (Liong, 2006) إذ تقدر نسبة الكولسترول التي تمتص عن طريق الغشاء الخلوي 20% (Dambekodi and Gilliland, 1998)، إلا أن الكولسترول كله لا يتم امتصاصه عن طريق الغشاء الخلوي إذ يرى بعض الباحثين أن الكولسترول الحر ممكن ان يرتبط مع الخلايا وبذلك ممكن أن يطرح الى الخارج مع الخلايا الميتة وممكن ان تزداد هذه الخاصية بسبب حدوث بعض التغيرات التي ربما تؤدي الى زيادة قوة الشد للأغشية الخارجية للبكتريا مما تزيد من معامل الارتباط (Liong, 2006)، كما ان كفاءة عملية الربط بين جزيئات الكولسترول والجدار الخارجي للبكتريا تكون بقوة بحيث لا يمكن فصلها حتى عند الغسل مرات عديدة (Tahri et al., 1995) وعلى ضوء النتائج السابقة يمكن الإشارة الى أن زيادة قابلية المعززات الحيوية على امتصاص الكولسترول ترتبط الى حد كبير مع زيادة تركيز املاح الصفراء بالوسط وهذا ما أكده (Pereira and Gibson, 2002); Rasic et al., (1992); Gilliland et al., (1985).

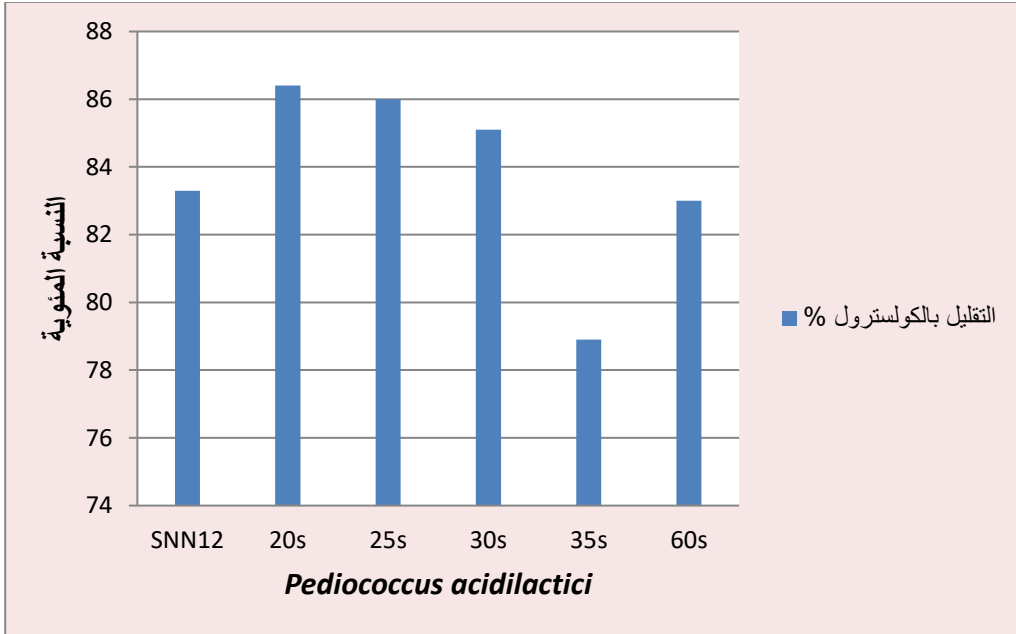
17-4 دراسة قدرة بكتريا *Pediococcus acidilactici* SNN12 على خفض مستويات الكولسترول

يبين الشكل (4-24) و (4-25) قدرة العزلة المحلية على تقليل كمية الكولسترول (4.6 ملغم / مل) بعد نموها في وسط MRS broth – EY بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة إذ يلاحظ أن كمية الكولسترول لوسط نمو العزلة SNN12 بلغ 0.765 ملغم كولسترول / مل في حين بلغت النسبة المئوية لتقليل الكولسترول 83.3%، أما بالنسبة لنتائج العزلة المطفرة بمدد 20s و 25s و 30s و 35s و 60s فقد كانت أقل من نتائج العزلة قبل التطهير إذ بلغت عند مدة 30s بمقدار 0.683 ملغم كولسترول / مل وبنسبة تقليل 85.1% بينما سجلت ارتفاعاً بسيطاً عند مدة 20s و 25s والتي بلغت كمية الكولسترول في وسط نموها 0.622 و 0.642 ملغم كولسترول / مل على التوالي، وبلغت نسبة التقليل بالكولسترول 86.4 و 86% على التوالي، في حين أعطت مدة التطهير 35s أقل انخفاض في نسبة الكولسترول إذ بلغت 78.9% وبكمية كولسترول بلغت 0.97 ملغم كولسترول / مل. وعند مقارنة هذه النتائج مع دراسات سابقة، نجد أن (Mikulski et al., 2012) ذكر عند دراسته لتأثير سلالتين من بكتريا *P.acidilactici* على كمية الكولسترول في صفار البيض والتي انخفضت من 12.94 – 9.86 ملغم كولسترول / غم كما وضح أن سبب الانخفاض يعود الى قدرة المعززات الحيوية على تمثيل الدهون وتحليلها، كما ذكر (Alkhalf et al., 2010) أن المعززات الحيوية تعمل على تثبيط انزيم Hydroxy – methyl – glutaryl – coenzyme A وهذا الانزيم يشارك في بناء الكولسترول وبذلك يقلل من نسبته.



شكل (4-24) مقدرة السلالة المحلية والمطفرة من بكتريا *P.acidilactici* SNN12 على خفض

كمية الكولسترون ملغم / مل في وسط MRS Broth – EY



شكل (4-25) النسبة المئوية لانخفاض الكولسترون للسلالة المحلية والمطفرة لبكتريا

P.acidilactici في وسط MRS Broth – EY

18-4 تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة العلاجية

1-18-4 التركيب الكيميائي وقيم الحموضة للحليب المستعمل في تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة

العلاجية

يبين الجدول (4-12) نتائج التركيب الكيميائي لمكونات الحليب البقري الطازج المستعمل لتصنيع المنتج اللبني المتخمر إذ يلاحظ فيه أن نسبة الدهن بلغت 3.4% و البروتين 3.5% والمواد الصلبة الكلية 10.7% في حين بلغت الحموضة التسحيحية 0.16% والأس الهيدروجيني 6.4 وعادة ما يختلف التركيب الكيميائي للحليب حسب العوامل المؤثرة في الحليب كعدد مرات الحلب و عمر الحيوان وحجمه ومدة الحمل والظروف البيئية كالحرارة والرطوبة ونوع العليقة و العوامل الوراثية ومرحلة الحلب وغيرها (محمد، 2013).

جدول (4-12) التركيب الكيميائي وقيم الحموضة للحليب البقري المستعمل في تصنيع المنتجات

اللبنية المتخمرة العلاجية

الدهن %	بروتين %	مواد صلبة كلية %	الحموضة التسحيحية %	الأس الهيدروجيني
3.4	3.5	12.5	0.16	6.4

4-18-2 تحديد زمن اكتمال التخثر ودراسة التغيرات الحاصلة في قيم الحموضة الكلية للمنتج

اللبني المتخمر عند الخزن المبرد (4م°) للعزلة IRQ12 قبل التطهير وبعده

تبين نتائج الجدول (4-13) أن زمن اكتمال التخثر للسلسلة IRQ12 قبل التطهير كان أعلى من جميع مدد التطهير للعزلة IRQ12 المطفرة إذ بلغ 9.30 ساعة فيما بلغ زمن التخثر لكل من مدة التطهير 20s و 30s و 8.15 ساعة على التوالي، وبلغ 8.30 ساعة للمدة 25s و 60s على التوالي، أما عند المدة 35s فقد كان متقارباً من العزلة قبل التطهير وبلغ 9 ساعة، ويبين الجدول نتائج الحموضة التسحيحية للمنتج اللبني المتخمر بعد مرور 1 - 21 يوماً من الخزن المبرد بدرجة حرارة 4م°، إذ كانت العزلة IRQ12 المطفرة أعلى في قيم الحموضة التسحيحية والتي ارتفعت من 0.73 و 0.74 و 0.77 و 0.77 % الى 0.76 و 0.76 و 0.79 و 0.80 % للمدة 25s و 60s و 20s و 35s على التوالي بعد مدة 1 - 21 يوماً باستثناء مدة التطهير 30s والذي بلغت الحموضة فيه 0.66 % والتي ارتفعت الى 0.70 % بعد 1-21 يوماً، في حين بلغت للعزلة قبل التطهير 0.72% بعد 1 - 21 يوماً، ويلاحظ من النتائج المذكورة أن درجة حرارة الخزن المبرد 4م° قد أدت الى توقف نشاط وتطور الحموضة للمنتج اللبني المتخمر نتيجة لتثبيط نمو بكتريا *L.plantarum* بهذه الدرجة وهذا يتفق مع ما ذكره (Daneshi et al., 2013) من أن عدد بكتريا *L.plantarum* القابلة للنمو في درجة حرارة 4م° يكون ضئيلاً جداً ولذلك فهي غير قادرة على رفع حموضة الوسط بدرجة كبيرة، ومتفقة مع ما بينه (Filannino et al., 2014) من عدم انخفاض الحموضة لمنتج عصير الفواكه

المتخمرة ببكتريا *L.plantarum* في اثناء الخزن بالتبريد مقارنة بتطور الحموضة في وسط من .MRS Broth

جدول (4-13) زمن اكمال التخثر والتغيرات الحاصلة في قيم الحموضة الكلية للمنتوج اللبني

المتخمرة عند الخزن المبرد 4°م للعزلة IRQ12 قبل التطهير وبعده

الحموضة الكلية %		زمن اكمال التخثر/ ساعة	نوع العزلة	التسلسل
21 يوم	1 يوم			
0.72	0.72	9.30	IRQ12 قبل التطهير	1
0.79	0.77	8.15	20s	2
0.76	0.74	8.30	25s	3
0.70	0.66	8.15	30s	4
0.80	0.77	9	35s	5
0.76	0.73	8.30	60s	6

4-18-3 تحديد زمن اكمال التخثر ودراسة التغيرات الحاصلة في قيم الحموضة الكلية للمنتوج

اللبني المتخمرة عند الخزن المبرد (4°م) للعزلة SNN12 قبل التطهير وبعده

أظهرت نتائج زمن اكمال تخثر الحليب بالعزلة المحلية لبكتريا *P.acidilactici* SNN12

جدول (4-14) أختزال الوقت اللازم لتخثر الحليب لسلالة البرية والمطفرة لمدة 6 ساعات باستثناء

مدة التطهير 35s و 60s والذي لزم 7 و 7.5 ساعة على التوالي للتخثر، أما بالنسبة لنتائج الحموضة

الكلية للمنتوج اللبني المتخمرة فيلاحظ أن نسبة تطور الحموضة لجميع النماذج كانت متقاربة عند

الخبز بدرجة حرارة 4 °م إذ بلغت نسبة الحموضة للعزلة البرية 0.77% بعد يوم واحد من الخبز ثم ارتفعت الى 0.83% بعد 21 يوماً من الخبز المبرد، أما بالنسبة للعزلة المطفرة بمدد التطفير المختلفة فقد كانت متقاربة إذ تراوحت بين 0.80-0.82 في اليوم الأول من الخبز المبرد ثم ارتفعت بصورة تدريجية بعد مرور 21 يوماً من الخبز والتي تراوحت قيمها بين 0.82% عند مدد التطفير 35s و 60s الى 0.83% عند مدة التطفير 20s و 25s بينما بلغت 0.84% عند مدة التطفير 30s.

جدول (4-14) زمن اكتمال التخثر والتغيرات الحاصلة في قيم الأس الهيدروجيني والحوضة الكلية

للمنتج اللبني المتخمّر عند الخبز المبرد 4°م للعزلة SNN12 قبل التطفير وبعده

التسلسل	نوع العزلة	زمن اكتمال التخثر/ ساعة	الحموضة الكلية %	
			1 يوم	21 يوم
1	SNN12 قبل التطفير	6	0.77	0.83
2	20s	6	0.82	0.83
3	25s	6	0.8	0.83
4	30s	6	0.82	0.84
5	35s	7	0.8	0.82
6	60s	7.5	0.8	0.82

4-18-4 تأثير مدد الخبز في عيشية بكتريا *L.plantarum*

تبين نتائج الجدول (4-15) مدى التغير في لوغاريتم الأعداد الحية لبكتريا *L.plantarum* للعزلات المحلية والعزلة القياسية والتي أبدت العزلات ثابتية عالية في المحافظة على النسب المرتفعة من الأعداد الحية عند تصنيع منتج لبني متخمّر وخبزه في درجة حرارة 4°م لمدة 1 و 7 و 14 و 21 يوماً وهي المدة الافتراضية لعمر المنتج اللبني المتخمّر، إذ يلاحظ أن العزلات KR و BS و CM بلغت الأعداد الحية لها أعلى من العزلات الأخرى بعد مرور يوم واحد فقط إذ بلغ لوغاريتم الأعداد

جدول (4-15) لوغاريتم الأعداد الحية / مل لبكتريا *L.plantarum* للعزلات المحلية والقياسية في المنتج اللبني المتخمر أثناء مراحل الخزن (1 و 7 و 14 و 21) يوماً بدرجة حرارة 4°م

التسلسل	المدة (يوم)	IRQ12	CM	KR	CT	BS	القياسية
1	1	^a 8.99	^a 9.05	^a 9.09	^a 8.94	^a 9.07	^a 8.96
2	7	^a 8.91	^a 8.98	^a 9.04	^b 8.87	^a 8.96	^a 8.9
3	14	^a 8.72	^a 8.74	^a 8.86	^b 8.5	^b 8.61	^b 8.55
4	21	^b 8.5	^b 8.17	^a 8.7	^b 7.95	^b 8.27	^b 8.07

الاحرف الصغيرة تشير الى وجود أو عدم وجود فروق معنوية بين مراحل الخزن المختلفة $P \leq 0.01$

الحية / مل 9.09 و 9.07 و 9.05 على التوالي والذي انخفض بصورة تدريجية مع المحافظة على النسبة المرتفعة من الأعداد الحية الى 9.04 و 8.86 و 8.7 للعزلة KR و 8.96 و 8.61 و 8.27 للعزلة BS و 8.98 و 8.74 و 8.17 للعزلة CM بعد مرور 7 و 14 و 21 يوماً على التوالي، تلتها العزلة IRQ12 و القياسية و CT إذ بلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل بعد مرور يوم واحد 8.99 و 8.96 و 8.94 انخفض بعدها لوغاريتم الأعداد الحية الى 8.91 و 8.72 و 8.5 للعزلة IRQ12 و 8.9 و 8.55 و 8.07 للعزلة القياسية و 8.87 و 8.5 و 7.95 للعزلة CT بعد مرور 7 و 14 و 21 يوم، كما لوحظ وجود فروق معنوية بين مدد الخزن المختلفة ولكل عزلة عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$. وتعود أهمية العيوشية للبكتريا العلاجية الى وصول أعداد كافية من البكتريا الحية الى الجهاز الهضمي لتجهيز الجسم بالمنفعة اللازمة واختزال الوقت لتخفيف حدة الاسهال وزيادة الاستجابة المناعية وخفض النسب المرتفعة من الكولسترول والتضاد الميكروبي وغيرها، فقد ذكر (الراوي)، 2005 ان العيوشية مهمة لايصال البكتريا بأعداد كافية ولمدد طويلة الى داخل الجهاز الهضمي لتقلل من الكولسترول ويتم ذلك من خلال انباتها وزراعتها في الجسم، فمن المهم جداً أن تحتفظ البكتريا العلاجية بحيويتها ونشاطها الوظيفي طوال مدة حفظ المنتج، إذ بين **Daneshi et al., (2013)** إن بكتريا *L.plantarum* المستخدمة في تصنيع المنتجات اللبنية المتخمرة العلاجية يمكنها أن تبقى لأعداد حية تصل الى 88% إذ تراوح الانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية / مل بين 6.66 – 5.86 عند خزنها في درجة حرارة 4 °م لمدة 20 يوماً.

ومن الممكن أن يعزى سبب بقاء الأعداد الحية لبكتريا *L.plantarum* الى أن هذه البكتريا تظهر استقراراً أكثر في الأوساط الحامضية في أثناء الخزن المبرد مقارنة مع غيرها من الأنواع الأخرى من البكتريا العلاجية (Oliveira et al., 2012)، كما أن لديها القدرة على تحليل العديد من السكريات المختلفة فضلاً عن سكري الكلوكوز واللاكتوز مصدراً للكربون والاستفادة منها للحصول على الطاقة لنموها واستهلاك البيبتيدات وتشكيل الاحماض الامينية (Georgieva et al., 2009)، وعليه تُعد بكتريا *L.plantarum* من الأنواع المهمة من البكتريا العلاجية في تخمير مختلف المنتجات النباتية والحيوانية فضلاً عن انتاجها المواد المضادة للبكتريا مثل plantaricin (Cebeci and Machielsen et al., De Vries et al., 2006)، فقد بين كل من (Gürakam, 2003؛ 2010؛ أن بكتريا *L.plantarum* تتميز بقدرتها على التكيف مع الظروف المختلفة من البيئة وبقابليتها العالية على النمو والتحمل وبذلك فهي احدى العوامل الرئيسية التي تحدد خصائص المنتجات النهائية، كما يجب الأخذ بنظر الاعتبار الى ان الانخفاض في الاعداد الحية للبكتريا في أثناء الخزن يعود الى جملة من العوامل من ضمنها مستويات الاوكسجين المذاب في المنتج والنشاط المنخفض لإنزيم β -galactosidase وقلّة توفر المواد المغذية كأستخدام الحليب الفرز (Martinez-Villalueng et al., 2006; Ostlie et al., 2003; Shimamura et al., 1992)، كما أن وجود الأعداد الكافية من المعززات الحيوية بصورة عامة لاتعمل فقط على تحسين الصحة عند تناولها كمنتوج لبني ولكنها تؤدي دوراً وقائياً ضد مسببات الامراض في المنتج نفسه في اثناء التخزين من خلال التنافس مع مسببات الامراض على المواد الغذائية ونتاج البكتريوسينات (Rodgers, 2001; Alegre et al., 2011)

إن نتائج الأعداد الحية للبكتريا في المنتج جاءت ضمن المدى الموصى به والذي يجب أن لا يقل لوغاريتم الأعداد الحية / مل عن 6 في حين يجب أن لا يقل لوغاريتم الأعداد الحية / مل للحمل البكتيري لتحقيق غايات علاجية عن 7-8 في نهاية مدة الخزن (Daneshi et al., 2013).

وتبين النتائج المعروضة في الجدول (4-16) التغير في لوغاريتم الأعداد الحية للعزلة IRQ12 المطفرة بمدد التطفير 20 و 25 و 30 و 35 و 60 ثانية والتي أظهرت ارتفاعاً في الاعداد الحية عن العزلة غير المطفرة عند تصنيع منتج لبني متخمّر وخزنه بدرجة حرارة 4°م لمدة 1 و 7 و 14 و 21 يوم إذ كان لوغاريتم الأعداد الحية / مل لمدد التطفير 20 و 25 و 30 و 35 و 60 ثانية لليوم الأول 9.32 و 9.54 و 9.43 و 9.34 و 9 على التوالي ثم انخفضت الاعداد تدريجياً وبنسبة طفيفة الى 8.86 و 8.87 و 8.81 و 8.65 و 8.72 على التوالي بعد مرور 21 يوماً مع الإشارة الى أن الأعداد الحية كانت مرتفعة عند مدد التطفير 20s و 25s، وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين مدد

الخبز المختلفة ولكل مدة تطهير عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$. أن الارتفاع الحاصل في الأعداد الحية للعزلة المطفرة يمكن أن يعزى إلى أن عملية التطهير ممكن أن تؤدي إلى أحداث عدد من التغيرات في الخواص الفسلجية لبكتريا *L.plantarum* والتي يحدث لها تكيف أفضل للبقاء بأعداد حية في ظل ظروف عالية من الاجهاد (Bjedov et al., 2003; De Visser et al., 2004) Hastings et al., 2004)

جدول (4-16) لوغاريتم الأعداد الحية / مل لبكتريا *L.plantarum* IRQ12 المطفرة في المنتج اللبني المتخمّر أثناء مراحل الخبز (1 و 7 و 14 و 21) يوم بدرجة حرارة 4°م

		المدة (يوم)					
	21	14	7	1	IRQ12 المطفرة	التسلسل	
	^b 8.86	^b 8.88	^b 8.95	^a 9.32	20s	1	
	^b 8.87	^b 8.92	^b 8.99	^a 9.54	25s	2	
	^b 8.81	^b 8.91	^b 8.96	^a 9.43	30s	3	
الصغيرة	^c 8.65	^b 8.85	^b 8.94	^a 9.34	35s	4	
وجود أو	^a 8.72	^a 8.83	^a 8.93	^a 9	60s	5	

الأحرف
تشير إلى

عدم وجود فروق معنوية بين مراحل الخبز المختلفة $P \leq 0.01$

كما يمكن أن تحدث الطفرات حالة من عدم الاستقرار لشريط DNA بحيث تؤدي إلى ما يسمى بطفرات النمط الظاهري mutator phenotype والتي ترتفع فيها معدلات الطفرات التلقائية ومن ثم تعزز من قدرة السلالات على التكيف مع التغيرات البيئية (Yang et al., 2004; Giraud et al., 2001a; Giraud et al., 2001b).

4-18-5 تأثير مدة الخبز في عيشية بكتريا *P.acidilactici*

يمثل الجدول (4-17) لوغاريتم الأعداد الحية للعزلة المحلية لبكتريا *P.acidilactici* والمطفرة بمدد 20s و 25s و 30s و 35s و 60s إذ يلاحظ ارتفاع الأعداد الحية بعد مرور يوم واحد من الخبز المبرد بدرجة حرارة 4°م ليبلغ لوغاريتم الأعداد الحية / مل 11.89 لتتخفص بصورة تدريجية حتى تصل إلى 7.57 بعد 21 يوما من الخبز، في حين أظهرت نتائج الخبز المبرد للسلالة المطفرة

ارتفاع لوغاريتم الأعداد الحية / مل عند مدة التطفير 20s و 25s و 30s لتبلغ 12.53 و 11.23 و 9.78 على التوالي عند اليوم الأول من الخزن لتتخفض الى 8.07 و 8.81 و 6.72 على التوالي بعد 21 يوماً من الخزن، فيما يلاحظ انخفاض الأعداد الحية بعد يوم واحد من الخزن المبرد لمدة التطفير 35s و 60s لينخفض لوغاريتم الأعداد الحية / مل من 8.79 و 6.61 على التوالي عند اليوم الأول الى 5.91 و 3.27 على التوالي بعد 21 يوماً. كما لوحظ وجود فروق معنوية بين مدد الخزن المختلفة للسلالة SNN12، وايضاً بين النماذج المطفرة عند مستوى احتمالي $P \leq 0.01$.

إن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما ذكره **Dina et al., 2013** عند دراسته لتأثير الخزن المبرد على بكتريا *P.acidilactici* مبيئاً المحافظة على لوغاريتم الأعداد الحية / مل مرتفعة لتتراوح بين 9.66 – 8.33 بعد مرور 29 يوماً من الخزن المبرد، في حين بين **Fadahunsi et al., (2015)** أن نسبة بكتريا *P.acidilactici* عند الخزن المبرد كانت الأعلى بين الأعداد الحية لأنواع أخرى من البكتريا العلاجية إذ بلغت 47.2% تلتها بكتريا *L.plantarum* بنسبة 35.9% ثم *L.curvatus* 7.4%.

ويمكن أن يعود سبب الانخفاض في الأعداد الحية عند مدة التطفير 35s و 60s مقارنة بالمدد الأخرى الى حدوث خلل في نظامها الإنزيمي أضعف قدرتها على مقاومة درجات الحرارة المنخفضة وهذا ما أكده **Fadahunsi et al., (2015)** والذي بدا واضحاً من خلال ملاحظة طبيعة نمو البكتريا بعد تعرضها للأشعاع.

جدول (4-17) لوغاريتم الأعداد الحية / مل لبكتريا *P.acidilactici* للعزلة المحلية والمطفرة في المنتج اللبن المتخمّر أثناء مراحل الخزن (1 و 7 و 14 و 21) يوم بدرجة حرارة 4°م

60s	35s	30s	25s	20s	SNN12	المدة (يوم)	التسلسل
6.61 ^a	8.79 ^a	9.78 ^a	11.23 ^a	12.53 ^a	11.89 ^a	1	1
4.5 ^b	7.63 ^b	7.89 ^b	9.64 ^b	11.8 ^a	9.62 ^b	7	2
3.34 ^c	6.77 ^b	7.17 ^b	9.38 ^b	10.5 ^b	9.2 ^b	14	3
3.27 ^c	5.91 ^c	6.72 ^c	8.81 ^b	8.07 ^{cd}	7.57 ^c	21	4

الاحرف الصغيرة تشير الى وجود أو عدم وجود فروق معنوية بين مراحل الخزن المختلفة $P \leq 0.01$

4-19 التقييم الحسي للمنتجات اللبنية المتخمرة للعزلة IRQ12 قبل التطفير وبعده

4-19-1 التقييم الحسي للنكهة

تبين نتائج الجدول (4-18) التقييم الحسي للمنتجات اللبنية المتخمرة والمخزنة بدرجة حرارة 4°م للمدد 1 و 7 و 14 و 21 يوماً إذ يلاحظ أن قيم النكهة كانت مرتفعة للسلسلة IRQ12 قبل التطفير إذ حصلت على درجة 34 بعد مرور يوم واحد وانخفض التقييم بدرجة بسيطة بعد مرور 21 يوماً ليحصل على 33، ويعزى سبب ظهور مركبات النكهة للمنتجات اللبنية المتخمرة الى المسارات الايضية التي تسلكها المعززات الحيوية والتي تكون فيها النواتج النهائية على شكل أحماض مختلفة كحامض اللاكتيك والخليك والاسيتالديهيد والايثانول وثنائي الاستيل والاسيتون (Hickey *et al.*, 1983; Kandler, 1983).

أما نتائج تقييم النكهة للمنتج اللبني المتخمّر المصنوع من العزلة المطفرة IRQ12 والمخزن بالتبريد على درجة حرارة 4°م ولجميع المدد (20s و 25s و 30s و 35s و 60s)، فيلاحظ من الجدول (4-19) أن تقييم النكهة تم على أساس الرائحة فقط من دون تحسس الذوق وقد حققت نتائج مرتفعة تراوحت بين 34 درجة بعد مرور يوم واحد و 32 بعد مرور 21 يوماً ويمكن أن يعود سبب ظهور مركبات النكهة في العزلة المطفرة الى أن عملية التطفير المتبعة لم تؤثر على قابلية بكتريا *L.plantarum* على خواص انتاج نكهة الالبان المتخمرة فقد ذكر (Chaves *et al.*, 2002) أن مركب الاستالديهيد المنتج من المعززات الحيوية يتكون بوساطة جين يسمى *glyA* والذي يشفر لإنتاج انزيم Serine hydroxymethyl transferase (SHMT) وهو المسؤول عن إنتاج الاستالديهيد والكلايسين، لذلك فإن سلامة هذا الجين تعني أمكانية البكتريا على الاستمرار في إنتاج الاستالديهيدات في وسط المنتج المتخمّر.

4-19-2 التقييم الحسي للقوام والنسجة

توضح الجداول (4-18) و (4-19) أن نتائج القوام والنسجة حصلت على نسب مرتفعة للعزلة قبل التطفير وللنماذج المطفرة بمدد التطفير (20s، 25s، 30s، 35s) باستثناء المدة 60s والذي انخفض تقييمها بعد مرور 21 يوماً وممكن أن يعود ذلك الى انفصال جزء من الشرش باستمرار عملية الحفظ الطويلة، وهناك عدد من المواد التي تؤثر على قوام المنتج اللبني فقد ذكر كل Hassan *et al.*, 1996; Cerning *et al.*, 1992 أن المعززات الحيوية لها القابلية على إنتاج مواد لزجة الى وسط النمو، فضلاً عن أن المنتج اللبني المتخمّر يكون غنياً عادة بمادة exopolysaccharides وهي مركبات ذات وزن جزيئي عالي تفرز من البكتريا الى البيئة التي تنمو

فيها" والتي تعمل على تحسين قوام المنتج (Broadbent *et al.*, 2003)، كما بين **Zambou** *et al.*, (2004) أن زيادة وجود بكتريا *L.plantarum* بأعداد كبيرة في المنتج اللبني المتخمر تساعد على تحسين المظهر والملمس ومن ثم تحسن من نعومة وقوام ولزوجة وثباتية المنتج.

3-19-4 التقييم الحسي للحموضة

يلاحظ من الجدول (4-18) نتائج التقييم الحسي للمنتج اللبني المصنع من العزلة IRQ12 غير المطفرة إذ يلاحظ أن نتائج التقييم الحسي للحموضة قد ارتفعت وحصلت على تقييم أكثر قبولاً بعد مرور 14 و 21 يوماً ويمكن أن يعزى الى الارتفاع النسبي للحموضة والذي نال استحسان المقيمين.

4-19-4 الأعداد الحية لبكتريا *L.plantarum*

تبين نتائج الجدول (4-18) أن الأعداد الحية لبكتريا IRQ12 قبل التظهير كانت مرتفعة وتراوحت أعدادها بين $10^9 - 10^{10}$ خلية / مل بعد مرور 1 و 7 أيام ثم انخفضت بعد مرور 14 و 21 يوماً الى $10^8 - 10^9$ ، أما الأعداد الحية للعزلة IRQ12 بعد التظهير فيلاحظ من الجدول (4-19) أن الأعداد الحية للبكتريا كان ضمن المدى $10^9 - 10^{10}$ خلية / مل عند مدة التظهير (20s، 25s، 30s، 35s) بعد مرور يوم واحد وحصل على تقييم 15 من 15 باستثناء مدة التظهير (20s، 60s والذي حصل على 12 بعد مرور يوم واحد، كما يلاحظ من الجداول ان مدد التظهير (20s، 25s، 30s، 35s) قد احتفظت بالأعداد المرتفعة للبكتريا بعد مرور 7 و 14 و 21 يوماً والتي تراوحت أعدادها الحية بين $10^8 - 10^9$ خلية / مل في حين يلاحظ انخفاض أعدادها الحية عند المدة 60s والذي حصل على تقييم 9 بعد مرور 7 و 14 و 21 يوماً وتتفق النتائج مع ما ذكره الراوي (2005)؛ الشيخ ظاهر، (1999) من أن المنتجات اللبنية التي تصنع لأغراض علاجية لاتحقق هدفها الا بوجود أعداد مرتفعة من البكتريا وقت الاستهلاك.

جدول (4-18) التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمر المصنع من العزلة المحلية

L.plantarum IRQ12 والمخزن بدرجة حرارة 4°م بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم

المدة الخزنية للمنتج (يوم)				الدرجة العليا	الصفة
21	14	7	1		
33	33	33	34	35	النكهة
26	26	27	28	30	القوام والنسجة
12	12	15	15	15	أعداد البكتريا

9	9	8	8	10	الحموضة
8	9	10	10	10	المظهر
88	89	93	95	100	المجموع

جدول (19-4) التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمر المصنع من العزلة المحلية المطهرة بالأشعة فوق البنفسجية *L.plantarum* IRQ12 بمدد التطفير المختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60) ثانية والمخزن بدرجة حرارة 4م° بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم

وقت التطفير (ثانية)																				الدرجة	الصفة
60				35				30				25				20					
المدة (يوم)				المدة (يوم)				المدة (يوم)				المدة (يوم)				المدة (يوم)					
21	14	7	1	21	14	7	1	21	14	7	1	21	14	7	1	21	14	7	1		
32	33	33	34	32	32	33	33	32	33	34	34	33	33	33	33	32	32	33	34	35	الرائحة
23	25	25	27	24	26	26	28	27	27	27	28	27	27	28	28	26	26	28	28	30	القوام والنسجة
9	9	9	12	12	12	12	15	12	12	12	15	12	12	12	15	12	12	12	15	15	أعداد البكتريا
16	17	17	19	17	17	18	19	18	18	19	19	17	18	18	20	18	19	20	20	20	المظهر
80	84	84	92	85	87	89	95	89	90	92	96	89	90	91	96	88	89	93	97	100	المجموع

20-4 التقييم الحسي للمنتجات اللبنية المتخمرة للسلالة *P.acidilactici* SNN12 قبل التطهير

وبعد

1-20-4 التقييم الحسي للنكهة

يبين الجدول (20-4) التقييم الحسي للسلالة SNN12 قبل التطهير إذ يلاحظ ارتفاع تقييم النكهة بعد اليوم الأول للخن المبرد ليحصل على درجة 30 بعد 7 و 14 و 21 يوماً، أما بالنسبة لمدد التطهير المختلفة فيلاحظ أن التقييم الحسي للرائحة جدول (21-4) حصل على تقييم أعلى إذ بلغ 33 درجة بعد مرور 7 أيام لمدة 20s و 25s و 30s فيما انخفض الى أقل تقييم 28 عند المدة 35s و 60s بعد مرور 14 و 21 يوماً على التوالي.

2-20-4 التقييم الحسي للقوام والنسجة

يبين الجدول (20-4) نتائج تقييم العزلة SNN12 قبل التطهير والتي يلاحظ حصولها على تقييم 27 بعد مرور يوم واحد من الخزن، فيما انخفض التقييم باستمرار عملية الحفظ ليحصل على 21 بعد مرور 21 يوماً، في حين أظهر الجدول (21-4) نتائج التقييم الحسي للقوام والنسجة لمدد التطهير المختلفة إذ بلغت أعلى درجة لتقييم القوام عند مدة التطهير 20s و 25s بعد مرور 7 أيام ليحصل على 30 ثم انخفض بعد مرور 21 يوماً ليحصل على 22 عند مدة 30s و 60s، ومن خلال عرض النتائج يمكن أن يعزى سبب انخفاض التقييم الى انفصال نسبة مرتفعة من الشرش باستمرار الخزن الطويل والذي قلل من نسبة تقبله.

3-20-4 التقييم الحسي للحموضة

تبين نتائج الجدول (20-4) أن الحموضة حصلت على تقييم 9 بعد يوم واحد من الخزن ثم ارتفع التقييم الى 10 بعد مرور 7 و 14 و 21 يوماً.

4-20-4 الأعداد الحية لبكتريا *P.acidilactici*

يوضح الجدول (20-4) الأعداد الحية للسلالة SNN12 قبل التطهير إذ بلغت الأعداد الحية $10^9 - 10^{10}$ خلية / مل بعد 1 و 7 أيام من الخزن ثم انخفضت الى $10^7 - 10^8$ خلية / مل بعد مرور 21 يوماً وعند مقارنة الأعداد الحية للسلالة قبل التطهير مع النتائج عند مدد التطهير المختلفة الجدول (21-4) نجد أن المدة 20s بلغت الأعداد الحية $10^9 - 10^{10}$ خلية / مل بعد مرور 1 و 7 و 14 يوماً، أما عند المدة 25s و 30s فقد بلغت الأعداد الحية $10^9 - 10^{10}$ خلية / مل بعد 1 و 7 أيام ثم انخفضت الأعداد الحية الى $10^8 - 10^9$ خلية / مل بعد مرور 21 يوماً، بينما انخفضت الأعداد الحية عند المدة 35s و 60s لتصل الى $10^6 - 10^7$ و $10^5 - 10^6$ على التوالي بعد مرور 21 يوماً من

الخبز، ويمكن أن يعزى سبب الارتفاع في الأعداد الحية للبكتريا المطفرة الى تحفيز نموها جراء التعرض للأشعة.

جدول (4-20) التقييم الحسي للمنتج اللبني المتخمّر المصنوع من العزلة المحلية *P.acidilactici* SNN12 والمخزن بدرجة حرارة 4م بمدد (1 و 7 و 14 و 21) يوم

المدة الخزنانية للمنتج (يوم)				الدرجة العليا	الصفة
21	14	7	1		
30	30	30	28	35	النكهة
21	22	22	27	30	القوام والنسجة
9	12	15	15	15	أعداد البكتريا
10	10	10	9	10	الحموضة
7	7	9	9	10	المظهر
77	81	86	88	100	المجموع

جدول (21-4) التقييم الحسي للمنتوج اللبني المتخمر المصنع من العزلة المحلية المطفرة بالأشعة فوق البنفسجية *P.acidilactici* SNN12 بمدد التطهير المختلفة (20 و 25 و 30 و 35 و 60) ثانية والمخزن بدرجة حرارة 4م بمدد (1 و 7 و 14 و 21)

وقت التطهير (ثانية)																				الدرجة	الصفة
60				35				30				25				20					
المدة (يوم)				المدة (يوم)				المدة (يوم)				المدة (يوم)				المدة (يوم)					
21	14	7	1	21	14	7	1	21	14	7	1	21	14	7	1	21	14	7	1		
28	32	32	31	28	28	31	33	31	32	33	34	30	30	33	31	30	30	33	32	35	الرائحة
22	22	24	26	23	24	24	27	22	22	25	28	24	26	28	30	25	25	25	30	30	القوام والنسجة
3	6	12	15	6	9	12	15	12	12	15	15	12	12	15	15	12	15	15	15	15	أعداد البكتريا
13	14	14	17	14	14	16	18	16	17	20	19	16	18	18	19	17	17	18	18	20	المظهر
66	74	82	89	71	75	83	93	81	83	93	96	82	86	94	95	84	87	91	95	100	المجموع

6- المصادر

المصادر العربية

- إبراهيم، وسن (2009). دراسة تأثير استهلاك منتج علاجي متخمّر مصنع من عزلة من بكتريا *Lactobacillus salivarius* في بعض المعايير الفسلجية للجرذان المختبرية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة.
- الحديثي، هديل توفيق و السيمري، احسان عيدان (1993). علم البكتريا العملي. جامعة البصرة. كلية العلوم.
- الراوي، زيد أكرم (2005). عزل وتشخيص بعض أنواع بكتريا *Lactobacillus* القادرة على تقليل الكولسترول وإدخالها في المتخمّرات اللبنية العلاجية. أطروحة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- الزهيري، عبد الله محمد ذنون (1992). تغذية إنسان، دار الكتب للطباعة والنشر، بغداد، العراق.
- الشيخ ظاهر، عامر عبد الرحمن (1999). دراسة مقارنة للصفات الكيموحيوية لعزلة محلية وسلالة مستوردة من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* واستخدامها في تصنيع منتجات علاجية، أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد.
- الكعبي، علي عبد الأمير (2015). تحديد الظروف المثلى لإنتاج حامض اللينوليك المقترن باستخدام بعض عزلات *Lactobacillus spp.* المحلية واستخدامها في منتجات الألبان.
- حسين، نوفل عبد الأمير (2004). تشخيص وانتقاء عزلات محلية من probiotic bacteria لاستخدامها في تصنيع منتجات حليب متخمّرة ودراسة تأثيرها على مستويات مصل دم الأرانب. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة البصرة.
- محمد. إبراهيم بشارة (2013). تصنيع الألبان - كلية الموارد الطبيعية والدراسات البيئية - جامعة كرفان.

References

A

- **Abbasiliasi, S.; Tan, J. S.; Ibrahim, T. A.; Ramanan, R. N.; Vakhshiteh, F.; Mustafa, S.; Ling, T. C.; Abdul Rahim, R. and Ariff, A. B. (2012).** Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry. *BMC Microbiology*.12:260.
- **Aboderin, I.; Kalache, A. and Ben-Shlomo, Y. (2002).** Life Course Perspectives on Coronary Heart Disease, Stroke and Diabetes: Key Issues and Implications for Policy and Research. Geneva: World Health Organisation.
- **Ahasan, A.; Agazzi, A.; Invernizzi, G.; Bontempo, V. and Savoini, G. (2015).** The Beneficial Role of Probiotics in Monogastric Animal Nutrition and Health. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. Vol. 2 Issue 4.
- **Akankasha, M. S.; Talkad, S. M.; Raheshwari, P.; Sagarika, G. and Aamir, J. (2012).** Characterization of Mutational Studies to Enhance the Curdling Activities in *Lactobacillus sp.* *International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online): 2319-7064.*
- **Akiyama, Y. (2009).** Quality control of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. *J Biochem*; 146:449–54.
- **Akopyanz, N.; Bukanov, N.O.; Westblom, T.U.; Kresovich, S. and Berg, D.E. (1992).** DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 20, 5137–5142.
- **Alegre, I.; Vinas, I.; Usall, J.; Anguera, M. and Abadias, M. (2011).** Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology*, vol. 28, no. 1, p. 59-66.
- **Alkhalaf, A.; Alhaj, M. and Al-homidan, I. (2010).** Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(3), 219–225.
- **Allende, A.; Martinez, B.; Selma, V.; Gil, M.I.; Suárez, J.E. and Rodríguez, A. (2007).** Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.*, 24(7-8), 759-766.
- **Almena, M.; McEvoy, K.; Yonand, B. and Howand, A. (2005).** University of Vermont, Burlington.
- **Al-Shawi S. G. (2010).** Prebiotic and Synbiotic Effects of locally Isolated Probiotic Bacteria on Intestinal Tract Microflora. A Thesis Submitted to the College of Agriculture-University of Basrah, DOCTORATE OF PHILOSOPHY.
- **Altermann, E.; Russell, W. M.; Azcarate-Peril, M. A.; Barrangou, B. L.; Buck, R.; McAuliffe, O.; Souther, N.; Dobson, A.; Duong, T.; Callanan, M.; Lick, S.; Hamrick, A.; Cano, R. and Klaenhammer. T. R. (2005).** Complete

genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:3906–3912.

- **Aminetzach, Y.T.; Macpherson, J.M. and Petrov, D.A. (2005).** "Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*". Science 309 (5735): 764–770.
- **Anastasiadou, S.; Papagianni, M.; Filiouis, G.; Ambrosiadis, I. and Koidis, P. (2008)** Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Biores Technol*, 99(13):5384-5390.
- **Andrews, W. (1997).** Manuals of food quality control, 4. Microbiological analysis. *FAO Food and Drug administration*, Washington, DC, USA.
- **Anonymous (2014).** Oxoid Microbiology Product www.oxoid.com. Code: CM0359.
- **A.O.A.C. Association of official Analytical chemists. (1970).** 11ed. Washington D.C. USA.
- **A.O.A.C. International. (2000).** Official methods of analysis of AOAC international, 17th ed. Official method 994.10. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD.
- **Archibald, F. and Fridovich, I. (1981a).** Manganese and defence against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol. 145(1): 442-451.
- **Archibald, F. and Fridovich, I. (1981b).** Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. J. Bacteriol. 146(3): 928-936.
- **Arena, M. P.; Graziano Caggianiello, G.; Pasquale Russo, P.; Marzia Albenzio, M.; Salvatore Massa, S.; Daniela Fiocco, D.; Vittorio Capozzi, V. and Giuseppe Spano, G. (2015).** Functional Starters for Functional Yogurt. *Foods* 4(1), 15-33; doi:10.3390/foods4010015. www.mdpi.com/journal/foods
- **Argyri A. A.; Zoumpopoulou, G.; Andreas, K.; Karatzas C.; Effie Tsakalidou, E. B.; John, G. E.; Nychas, D.; Efstathios Z.; Panagou, E.Z.; Chrysoula, C. and Tassou. (2013).** Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology* 33(2). 282-291.
- **Ashraf, M (2011).** Evaluation of locally isolated *Lactobacillus* sp as probiotics in broiler chicken. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Institute of microbiology. University of Agriculture, Faisalabad.
- **Ataie, J. A.; Larijani, B.; Majd, A. H. and Tahbaz, F. (2009).** Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann Nutr Metab.* 54(1):22-27.
- **Atlas, R. M.; Brown, A. E. and Parks, L. C. (1995).** Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1st Edition. Mosby year book, Inc. (USA).

- **Aydemir, O.; Harth, H.; Weckx, S.; Dervisoglu, M. and de Vuyst, L. (2015).** Microbial communities involved in Kasar cheese ripening. *Food Microbiol.* 46(16), 587–595.

B

- **Balgir, P. P.; Kaur, B.; Kaur, T.; Daroch, N. and Kaur, G. (2013).** In Vitro and In Vivo Survival and Colonic Adhesion of *Pediococcus acidilactici* MTCC5101 in Human Gu. *BioMed Research International*. Vol. 2013, Article ID 583850, 9 p.
- **Barak, Y.; Cohen-Fix, O. and Livneh, Z. (1995).** Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. *J Biol Chem* 13- 270 (41): 24174–24179.
- **Barker M.; Thakkar B. and Priest F. G. (2005).** Multilocus sequence typing reveals that *Bacillus cereus* strains isolated from clinical infections have distinct phylogenetic origins. *FEMS. Microbiol. Lett.* Vol. 245, Issue 1: 179-184.
- **Barreau, G.; Thomas, A.; Tompkins, A. and Carvalhoa, V. G. (2012).** Draft Genome Sequence of Probiotic Strain *Pediococcus acidilactici* MA18/5M. *Journal of Bacteriology* 194(4): p. 901.
- **Barros, R. R.; Da Gloria, M.; Carvalho, S.; Peralta, J. Richard, R., Facklam, M. and Teixeira, L. (2001).** Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 2001, p. 1241–1246.
- **Bazzicalupo, M. and Fani. R. (1996).** The use of RAPD for generating specific DNA probes for microorganisms in methods in molecular biology .In: *Species diagnostics protocols PCR and other nucleic acid methods* (Eds J. P. Clapp). Humana Press Totowa, New Jersey. pp. 1-411.
- **Begley. M.; Gahan. C.M. and Hill, C. (2005).** The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(2005): 625–651.
- **Begley, M.; Hill, C. and Gahan. C. G. (2006).** Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1729-1738.
- **Bennik, M.; Smid, E. J. and Gorris, L. (1997).** Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 63, No. 5:2074–2076.
- **Berrada, N.; Lemeland, J. F.; Laroche, G.; Thouvenot, P. and Piaia, M. (1991).** *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74(2): 409-413.
- **Bertram, J. (2000).** "The molecular biology of cancer". *Mol. Aspects Med.* 21 (6): 167–223.
- **Bhowmik, T. and Marth, E. H. (1990).** Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* Vol. 73, Issue 4, P. 859–866.

- **Bhowmik, T.; R. Riesterer, M. A.; Van Boekel, J. S. and Marth, E. H. (1990).** Characteristics of low-fat cheddar cheese made with added *Micrococcus* or *Pediococcus* species. *Milchwissenschaft* 45(4):230–235.
- **Bixquert J. M. (2009).** Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. *Rev Esp Enferm Dig.* 101(8): 553-564.
- **Bjedov, I. O.; Tenailon, B.; Gerard, V.; Souza, E.; Denamur, M.; Radman, F.; Taddei, H. and I. Matic. (2003).** Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* Vol. 300, Issue 5624, pp. 1404-1409
- **Blance, B. (1986).** The nutritional value of yogurt. *Int. J. Immunotherapy.* Vol.(6). pp: 25-47.
- **Bourlioux, P. and Pochart, P (1988).** Nutritional and health properties of yogurt. *World Rev. Nutr. Diet,* 56:217-58.
- **Bove, P.; Capozzi, V.; Garofalo, C.; Rieu, A.; Spano, G. and Fiocco, D. (2012a).** Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiol Res* 167(4):187–193.
- **Bove, P.; Gallone, A.; Pasquale Russo, P.; Capozzi, V.; Albenzio, M.; Spano, G. and Fiocco, D. (2012b).** Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. *Appl Microbiol Biotechnolgy* 96(2):431–441.
- **Brash, D. E. (1991).** A role for sunlight in skin cancer: UV-induced *p53* mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22): 10124–10128.
- **Bredholt, S.; Nesbakken, T. and Holck, A. (1999).** Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 in cooked, sliced vacuum- and gas-packaged meat. *Int. J. Food Microbiol.* 53(1):43-52.
- **Bringel, F.; Frey, L. and Hubert, J. C. (1989).** Characterization, cloning, curing, and distribution in lactic acid bacteria of pLP1, a plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM 1904 and its use in shuttle vector construction. *22(3)*, 193–202.
- **Bringel, F.; Quenee, P. and Tailliez, P. (2001).** Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Syst Appl Microbiol.* 24(4):561-571.
- **Briugidi, P.; Bolognati, F.; Rossi, M.; Cerre, C. and Matteuzzi, D. (1993).** Cloning of the gene for cholesterol oxidase in *Bacillus* spp., *Lactobacillus reuteri* and its expression in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, Vol.17 Issue 2,p: 61-64.
- **Broadbent, J. R.; Mc Mahon, D. J.; Welker, D. L.; Oberg, C. J. and Moineau, S. (2003).** Biochemistry genetics and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*: A review, *J. Dairy Sci.* 86 (2):407-423.

- **Bujalance, C.; Valera, M. J.; Moreno, E. and Bravo, A. R. (2006).** A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum* Journal of Microbiological Methods 66(2006): 572–575.
- **Burger, A.; Fix, D.; Hays, J. and Bockrath, R. (2003).** *In vivo* deamination of cytosine-containing cyclobutane dimers in *E. coli*: a feasible part of UV-mutagenesis. Mutat Res 522: 145–156.
- **Burrus, V. and Waldor, M. (2004).** "Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements". Res. Microbiol. 155 (5): 376–386.

C

- **Caetano, A. G.; Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. (1991).** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/ Technol. 9: 553-557. Campbell, M., Mahenthiralingam, E. and Speert, D. P. (2000). Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 38: 4614-4615.
- **Cai, Y.; Kumai, S.; Ogawa, M.; Benno, Y. and Nakase, T., (1999).** Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2901–2906.
- **Caldwell, S. L.; McMahon, D. J.; Oberg, C. J. and Broadbent, J. R. (1996).** Development and Characterization of Lactose-Positive *Pediococcus* Species for Milk Fermentation APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Vol. 62, No. 3. p. 936–941.
- **Capozzi, V.; Weidmann, S.; Fiocco, D.; Rieu, A.; Hols, P.; Guzzo, J. and Spano, G. (2011).** Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Res Microbiol 162:419–425.
- **Catherine, B.; Bernard, J.; Jozef, V.; Marie G.J. and Marie, F. J. (1992).** Point mutations of two arginine residues in the *Streptomyces* R61 DD-peptidase. Biochem. J., 283: 123-128.
- **Chassy, B. M. and Flickinger, J. L. (1987).** Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 44,173-177.
- **Cebeci, A. and GÜrakam, C. (2003).** Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, vol. 20, no. 5, p. 511-518.
- **Cerning, J.; Bouillanne, C.; Landon, M. and Desmazeaud, M.J. (1992).** Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime forming mesophilic lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 75:692-699.
- **Cetin, E.T., (1983).** Industrial Microbiology. In: Foundation of Uni.of Istanbul, Faculty of Medicine, 418.
- **Champagne, C. P.; Gardner, N. J. and Roy, D. (2005).** Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:61–84.

- **Chang, J.C.H.; Ossoff, S.F.; Lobe, D.C.; Dorfman, M.H.; Dumais, C.M.; Qualls, R.G. and Johnson. J.D.(1985).** UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(6): 1361-1365.
- **Chansiripornchai, N.; Ramasoota, P.; Bangtrakulnonth, A.; Sasipreeyajany, J. and Svenson, S. B., (2000).** "Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian Salmonella enteric subs", enteric. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 29: 221- 225.
- **Chaves, C.; Fernandez, M.; Lerayer, S.; Mierau, I.; Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. (2002).** Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Env. Microbiol.*, 68(11): 5656-5662.
- **Chevallier, B.; Hubert, J. C. and Kammerer, B. (1994).** *FEMS Microbiol. Lett.* 120,51–56.
- **Cho, Y. H.; Hong, S. M. and Kim, C. H. (2013).** Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Kimchi, Korean Traditional Fermented Food to Apply into Fermented Dairy Products. *Korean J. Food Sci. An.* Vol. 33, No. 1, pp. 75-82.
- **Chowdhury, A.; Hossain, M.; Mostazir, N. J.; Fakruddin, M.; BBillah, M. M. and Ahmd, M. M. (2012).** Screening of Lactobacillus spp. from Buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial Activity *Bacteriology & Parasitology Parasitol* Vol. 3 .Issue 8 . 1000156.
- **Clarridge, J. E, (2004).** Impact of *16S rRNA* gene sequence analysis For Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4): 840-462.
- **Collins, E.B. and Aramaki, K. (1980).** Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy sci.*, 63: 352-357.
- **Collins, M. D.; Williams, A. M. and Wallbanks. S. (1990).** The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 70:255–262.
- **Çon, A. H. and Karasu, N. (2009).** Determination of Antagonistic Starter Cultures for Pickle and Olive Fermentation Processes, *Czech J. Food Sci.* 27(3): 185-193.
- **Conway, P.L. (1995)** Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson GR, Macfarlane GT, eds. *Human colonic bacteria*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1–24.
- **Corleh, D. A. and Brown, M. H. (1980).** pH and Activity is Silkie, J. H. (col) *Microbial Ecology of Foods* (Academic press NewYork).
- **Cotter, P. D.; Hill, C. and Ross, R. P. (2005).** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3(10):777-788.
- **Cowan, S. T. (1974).** *Manual for Identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, U.K.

- **Cowan, S. T. and Steel, K. J. (1975).** Manual Identification of Medical bacteria. 2nd ed., Cambridge Univ. Press. Cambridge, London, PP: 39-146.
- **Curk, M.C.; Hubert, J.C. and Bringel, F. (1996).** *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Systematic Bacteriology 46, 595–598.

D

- **Daeschel M.A.; Flemming H.P. and McFetters R.F. (1988).** Mixed cultures fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. Journal of Food Science, **53**: 862–868.
- **Daeschel, M.A. and Klaenhammer T.R. (1985).** Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1538S-1541S.
- **Dalloul, R.A.; Lillehoj, H.S.; Lee, J.S.; Lee, S.H. and Chung, K.S. (2006).** Immunopotentiating effect of a Fomitella fraxinea – derived lectin on chicken immunity and resistance to coccidiosis. Poult. Sci. 85: 446S-451S.
- **Dambekodi, P. C. and Gilliland, S. E. (1998).** Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. J Dairy Sci 81: 1818-1824.
- **Daneshi, M.; Ehsani, M. R.; Razavi, S. H. and Labbafi, M. (2013).** Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. Electronic Journal of Biotechnology. DOI: 10.2225/vol16-issue5-fulltext-2.
- **Daniells, S. V. (2008).** Continues research into probiotic fruit juices. Nutraingredients, available at www.nutraingredients.com.
- **Danielsen, M.; Simpson, P.J.; O'Connor, E.B.; Ross, R.P. and Stanton, C. (2007).** Susceptibility of *Pediococcus* spp. To antimicrobial agents. Journal of Applied Microbiology 102: 384–389.
- **Danova, S.; Petrov, K.; Pavlov, P. and Petrova, P. (2005).** Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. International Journal of Dairy Technology Vol 58, No2.
- **Dave, R. I, and Shah, N. P. (1996).** Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrekii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. J. Dairy Sci.79: 1529-1536.
- **De Angelis, M.; di Cagno, R.; Huet, C.; Crecchio, C.; Fox, P.F. and Gobbetti, M. (2004).** Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol., 70, 1336–1346.
- **Debbie, B.; Steven, L.; Harper, J.; Floyl, W.; Bodyfelt, S. and McDaniel, M. R. (1991).** Prediction of consumer acceptability of yogurt by sensory and analytical measures of sweetness and sourness. Dairy Sci., 74: 3746-3754.

- **DeMan, J. K.; Rogosa, M. and Sharp, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of *Lactobacillus* . *Appl. Bacteriol.*, 23: 130 – 135.
- **De Martinis, E.C.P. and Franco, D.G.M. (1998).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a ponk product by a *Lactobacillus sakei* strain. *Int. J. Food Microbiol.* 42:119-126.
- **Denou, E.; Pridmore, R. D.; Berger, B.; Panoff, J. M.; Arigoni, F. and Brussow. H. (2008).** Identification of genes associated with the long gut persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 190:3161–3168.
- **Desjardins M.; Roy, D. and Goulet, J. (1990).** Growth of Bifidobacterium and their enzyme profile. *J. Dairy Sci.* 73: 299.
- **De Smet, L.; Van Hoorde, N.; De Saeyer, M.; Woestyne, V. and VersTRAete, W. (1994).** In Vitro Study of Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity of BSH Isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 Strains and EstirnatiGn of Cholesterol Liwering through Enhanced BSH Activity *MICROBIAL ECOLOGY IN HEALTH AND DISEASE VOL. 7: 3 15-329.*
- **De Visser, J. A.; Akkermans, A. D.; Hoekstra, R. F. and de Vos, W. M. (2004).** Insertion-sequence-mediated mutations isolated during adaptation to growth and starvation in *Lactococcus lactis*. *Genetics* 168:1145–1157.
- **Devlieghere, F.; Vermeiren, L. and Debevere, J. (2004).** New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int Dairy J*, 14(4):273-285.
- **De Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K. and Whitman, W. (2009).** Bergeys manual of systematic bacteriology 2ed Vol. 3 , Springer .
- **De Vrese, M. C. and Schrezenmeir, J. (2008).** Probiotics. Prebiotics and Synbiotics, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Vol III, pp. 1-66.
- **De Vries, M. C.; Elaine, E.; Uunan, V.; Kleerebezem, M. and De Vos, M. (2005).** *Lactobacillus plantarum* survival, Functional and potential probiotic properties in the human Intestinal, Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands-with summary in Dutch 160P.
- **De Vries M.C.; Vaughan E.E.; Kleerebezem M.; de Vos, W.M. (2006).** *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018–1028.
- **De Vugst, L. and Vandamme, E.J. (1994).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria; Microbiology, Genetics and Applications. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-75140174-9.
- **Di Caro, S.; Tao, H.; Grillo, A.; Elia, C.; Gasbarrini, G.; Sepulveda, A.R. and Gasbarrini, A. (2005).** Effects of *Lactobacillus GG* on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Dig. Liver Dis.* 37: 320–329.

- **Dina, A.; Mohamed, E.; Ibrahim, M.; Adham, M.; Abdou, H. and Mohammed, A. (2013).** Efect of *Pediococcus acidilactici* and its bacteriocine on soft cheese quaility and validity benha veterinary medical Journal, Vol. 25, No. 1:64-76.
- **Dixit, G.; Samarth, D.; Tale, V. and Bhadekar, R. (2013).** Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains EurAsian. Journal of BioSciences Eurasia J Biosci 7, 1-9.
- **Dong, Z.; Zhang, J.; Lee, B.; Li, H.; Du, G. and Chen, J. (2012).** A bile salt hydrolase gene of *Lactobacillus plantarum* BBE7. Eur. Food Res.Technol. 235: 419-427.
- **Dora, I.A.P. and Glenn R.G. (2002).** Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4689-4693.
- **Drake, J. W.; Charlesworth, B.; Charlesworth, D. and Crow, J. F. (1998).** Rates of Spontaneous Mutation Genetics 148: 1667–1686 .
- **Drider, D.; Fimland, G.; Hechard, Y.; McMullen, L. M. and Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* , 70(2):564-582.
- **Drobetsky, E.A.; Grosovsky A.J. and Glickman B.W. (1987).** The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9103-9107.
- **Duary, R. K.; Batish,V. K. and Grover,S. (2012).** Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under invitro gut conditions. Mol. Biol. Rep. 39, 2541–2552. doi: 10.1007/s11033-011-1006-9.
- **Du Toit, M.; Franz, C.; Schillinger, U.; Warles, B. and Holzappfel, W. (1998).** Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary mini pig-feeding trail and their effect on serum cholesterol level, faeces pH and faeces moisture contents. International Journal of Food Microbiology, 40: 93-104.

E

- **EFSA European Food Safety Authority (2012). Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).** Scientific Opinion on the safety and efficacy of *Pediococcus acidilactici* (CNCM I-3237, CNCM MA 18/5M—DSM 11673) and *Pediococcus pentosaceus* (DSM 23376, NCIMB 12455, NCIMB 30237 and NCIMB 30168) as silage additives for all species1. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy EFSA Journal;10(6):2733.
- **Eijsink, V.G.; Axelsson, L.; Diep, D. B.; Håvarstein, L. S.; Holo, H. and Nes, I.F. (2002).** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an

example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, 81:639–654.

- **Elli, M.; Callegari, M.L.; Ferrari, S.; Bessi, E.; Cattivelli, D.; Soldi, S.; Morelli, L.; Goupil, Feullerat, N. and Antoine, J.M. (2006).** Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5113-5117.
- **Embley. T. M. (1991).** The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing *rRNA* genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 171- 174.
- **Ennahar, S. and Deschamps, N. (2000).** Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J.Appl. Microbiol.* 88:449S-457S.
- **Erkkila S, and Petaja E. (2000).** Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. *J. Meat Science*, 55: 297-300.

F

- **Facklam, R. and Elliott, J. A. (1995).** Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:479–495.
- **Fadahunsi, I. F.; Adejoh, O. P. and Onilude, A. A. (2015).** Effect of inoculation of *Pediococcus acidilactici* metabolites on the microbiol profile of Turkey meat stored at different low temperature range. *Trakia Journal of Sciences*, No 1, pp 59-65.
- **Felis G. E. and Dellaglio, F. (2007).** Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 8: 44–61.
- **Filannino, P.; Cardinali,V.; Rizzello, G.; Buchin, S.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. and Di Cagno, R. (2014).** Metabolic Responses of actobacillus plantarum Strains during Fermentation and Storage of Vegetable and Fruit Juices. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 80 No 7. P: 2206–2215.
- **Fiocco, D.; Capozzi, V.; Collins, M.; Gallone, A.; Hols, P.; Guzzo, J.; Weidmann, S.; Rieu, A.; Msadek, T. and Spano, G. (2010).** Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 192, 896–900.
- **Fiocco, D.; Collins, M.; Muscariello, L.; Hols, P.; Kleerebezem, M.; Msadek, T. and Spano, G. (2009).** The *Lactobacillus plantarum* *ftsH* gene is a novel member of the CtsR stress response regulon. *J. Bacteriol.*, 191, 1688–1694.
- **Fitzsimons, N. A.; Cogan, T. M. Condon, S. and T. Beresford. (1999).** Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3218–3426.
- **Fox, G. E.; Wisotzkey, J. D. and Jurtshuk, P. (1992).** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 166-170.

- **Francey, R. J. and Elias, A. (1968).** Serum Cholesterol measurement based on ethanol and Ferric chloride, Sulfuric acid. *Clin-Chim. Acta*, Vol. 21 p: 255 – 263.
- **Francois, Z. N.; Victor, S. D. and Florence, F. A. (2008).** Moundipa Fewou Paul, Tchouanguép Mbiapo Felicite and Morsi El Soda. Phenotypic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cow`s Raw Milk of Bororo Cattle Breeders in Western Highland Region of Cameroon. *Research Journal of Microbiology*, 3: 447-456.
- **Frias, J. (2008).** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Overcoming Allergic Reactions to Soy.
- **Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W.; Wood, R. D. and Schultz, R. A. (2006).** DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.
- **Fuller, R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66(5): 365-378.

G

- **Garcia-Vallve S. and Puigbo P. (1999-2009).** "Dendo UPGMA: A dendrogram construction utility", Universal Rovira i Virgili (URV). Tarragona. Spain.
- **Garvie, E. I. (1986).** Genus *Pediococcus*, p. 1075–1079. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, (ed.), *Bergey`s manual of systematic bacteriology*, vol 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- **Gawęcki, J.; Hryniewiecki, L. and Żywienie, c. (1998).** Podstawy nauki o żywności. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa (in Polish).
- **Gawel, D.; Tkaczyk, M. M.; Jonczyk, P.; Schaaper, R. M. and Fijalkowska, I. J. (2002).** Lack of Strand Bias in UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* Vol. 184, No. 16 p. 4449–4454.
- **Georgieva, R.; Iliev, I.; Haertle, T.; Chobert, J. M.; Ivanova, I. and Danova, S. (2009).** Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Dairy Journal*, vol. 19, no. 11, p. 696-702.
- **Gerez, C. L.; Font de Valdez, G.; Gigante, M. L., and Grosso, C. R. F. (2012).** Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 552-556.
- **Gibson, G. R. and Fuller, R. (2000).** Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed towards identifying probiotics and probiotics for human use. *J. Nutr.* 130: 391-395.
- **Gilbreth, S. E., S. and Somkuti, G. A. (2005).** Thermophilin 110: A Bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *CURRENT MICROBIOLOGY* Vol. 51, pp. 175–182.

- **Gilliland, S.E.; Nelson, C. R. and Maxwell, C. (1985).** Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49: 377-381.
- **Giraud, A.; Matic, I.; Tenailon, O.; Clara, A.; Radman, M.; Fons, M. and Taddei, F. (2001a).** Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* 291:2606–2608.
- **Giraud, A.; Radman, M.; Matic, I. and Taddei, F. (2001b).** The rise and fall of mutator bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:582–585.
- **Golian, J. and Pavelka (2001).** Perspective on the role of the probiotics in the human nutrition. *Acta Fytotechnicaet Zootechnica* 4: 207-209.
- **Gonzalez, C. F. and Kunka, B. S. (1987).** Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl Environ Microbiol* 1987, 53:2534–2538.
- **Gottesman, S. (2003).** Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* ;19:565–87.
- **Gowri, S. and Ghosh, A. R. (2010).** *Pediococcus spp.* – a potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequences analysis. *Afr J Food Sci.* 2010; 4: 597-602.
- **Grill, J. P.; Cayuela, C.; Antoine, J. M. and Schneider, F. (2000).** Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 154-156.
- **Guchte, M.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.D. and Maguin, E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;82: 187–216.
- **Guerra, N. P.; Berná rdez, P. F.; Me´ndez, J.; Cachaldora, P. and Castro, L. P. (2006).** Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci. 2006.05.010 (In press).
- **Guetouache, M. and Guessas, B. (2015).** Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cow’s milk. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 9(2), pp. 71 – 77.
- **Guo C. F.; Zhang, L. W.; Han, X.; Li, J.Y.; Du, M.; Yi, H.X.; Feng, Z.; Zhang, Y.C. and Xu, X.R. (2011).** Short communication: A sensitive method for qualitative screening of bile salt hydrolase-active lactobacilli based on thin-layer chromatography. *J. Dairy Sci.* 94: 1732-1737.
- **Guo, L. D.; Yang, L. and Huo, G. C. (2011).** Cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* isolated from homemade fermented cream in Inner Mongolia of China. *Czech J. Food Sci.* Vol. 29 No. 3: 219-225.
- **Guo, Z.; Wang, J.; Yan, L.; Chen, W.; Liu, X.M. and Zhang, H.P. (2009).** *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang a potential

new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT- Food Sci Technol.* 2009; 42: 1640-1646.

H

- **Haakensen. M.; Dobson, C. M.; Hill, J. E. and Ziola. B. (2009).** Reclassification of *pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. Nov and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*.59(pt3): 615-612.
- **Hamon, E.; Horvatovich, P.; Izquierdo, E.; Bringel, F.; Marchioni, E.; Aoudé-erner, D. and Ennahar, S. (2011).** Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol.*, 11, 63.
- **Harmsen, D., and Karch, H. (2004).** 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* 70:19-24.
- **Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic press*, London, UK .
- **Harutoshi, T.; Kazushi H. and Taku M. (2007).** High bile- and low pH-resistant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented dairy products in Inner Mongolia, China. *Milk Science*, 55: 3.
- **Hassan, A. N.; Franck, J. F.; Farmer, M. A.; Schmidt, K. A. and Shalabi, S. I. (1996).** Rheological properties of yoghurt made using encapsulated nonropy lactic cultures. *J. Dairy Sci.* 79:2091-2097.
- **Hastings, P. J.; A. Slack, J. F.; Petrosino, and S. M. Rosenberg. (2004).** Adaptive amplification and point mutation are independent mechanisms: evidence for various stress-inducible mutation mechanisms. *PLoS Biol.* 2:e399.
- **Hickey, M. W.; Hiller, A. J. and Jago, G. R. (1983).** Metabolism of pyruvate and citrate in *lactobacilli*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36: 487-496.
- **Hoier, E. (1992).** Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia*. 44: 418-420.
- **Holt, J.C. and Krieg, N.R. (1986).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2, Williams and Wilkins Company. Baltimore Maryland, U.S.A.
- **Holt, J. C. and Krieg, N. R. ; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Ed., Williams and Wilkins. Baltimore Maryland, USA .
- **Horsfall, M.J. and Lawrence, C.W. (1994).** Accuracy of Replication past the T-C (6-4) adduct. *J Mol Biol* 235: 465–471.
- **Huang, H. Y.; Korivi, M.; Chun-Han Tsai, C.; H., Yang, J. H. and Tsai, Y. C. (2013a).** Supplementation of *Lactobacillus plantarum* K68 and Fruit-Vegetable Ferment along with High Fat-Fructose Diet Attenuates Metabolic

Syndrome in Rats with Insulin Resistance Volume 2013, Article ID 943020, 12 pages.

- **Huang, Y.; Wang, X.; Wang, J.; Wu, F.; Sui, Y.; Yang, L. and Wang, Z. (2013b).** *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *J. Dairy Sci.* Vol. 96 No. 5:2746–2753.
- **Huber, B. S.; Allred, D. V.; Carmen, J. C.; Frame, D. D.; Whiting, D. G.; Cryan, J. R.; Olson, T. R.; Jackson, P. J.; Hill, K.; Laker, M. T. and Robinson, R. A. (2002).** Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism analyses of *Pasteurella multocida* isolates from fatal fowl cholera infections. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2163-2168.
- **Hugenholtz, J. (1986).** Population dynamics of mixed starter cultures. *Neth. Milk Dairy J.* 40:129.
- **Huidrom, S.; Deka, M. and Deblakshmi, R. (2012).** Identification of lactic acid bacteria from the faeces of infant Recent Research in Science and Technology, 4(6): 54-56.
- **Hussain, I.; Rahman, A. and Alkinson, N. (2009).** Quality comparison of probiotic and natural yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition.* 8(1): 9-12.
- **Hutt, P.; Shchepetova, J.; Loivukene, K.; Kullisaar, T. and Mikelsaar, M. (2006).** Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. appl. Microbiol.* 100: 1324–1332.

I

- **Idoui, T. (2013).** Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from gizzard of local poultry. *Iranian Journal of Microbiology* Volume 6 Number 2.
- **Irvine, S. L. and Hekmat, S. (2011).** Evaluation of sensory properties of probiotic yogurt containing food products with prebiotic fibers in Mwanza, Tanzania. *Food and nutrition science*, 2, 434-439.
- **Irvine, S. L.; Hummelen, R.; Hekmat, S.; Looman, C. W.; Habbena, D. F. and Reid, G. (2010).** Probiotic yogurt consumption is associated with an increase of CD4 count among people living with HIV/AIDS. *Journal of Clinical Gastroenterology* Vol. 44, No. 9, pp 201-205.

J

- **Jacobsen, C.N.; Rosenfeldt, N. V.; Hayford, A. E.; Møller, P.L.; Michaelsen, K. F.; Poerregaard, A.; Sandström, B.; Tvede, M. and Jakobsen, M. (1999).** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.
- **Jakubczyk, E.; Kosikowska, M. and Zastosowanie. (2000).** bakterii probiotycznych w przetwórstwie mleczarskim. *Przegl. Mlecz.* 10: 334-337.

- **Janda J. M. and Abbott S. L. (2007).** *16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls.* J. OF CLINI. MICROBIOL. 45(9): 2761–2764.
- **Johansson, M. L.; Molin, G.; Jeppsson, B.; Nobaek, S.; Ahrné, S. and Bengmark, S. (1993).** Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 15-20.
- **Jose, N. M.; Craig, R.; Bunt, C. R. and Malik Altaf Hussain, M. A. (2015).** Comparison of Microbiological and Probiotic Characteristics of *Lactobacilli* Isolates from Dairy Food Products and Animal Rumen Contents. *Microorganisms.* 3, 198-212.
- **Joslyn, M. A. (1970)** Methods in food analysis. Academic Press New York.
- **Jousimies-Somer, H. R.; Summanen, P.; Citron, D. M.; Baron, E. J.; Wexler, H. M. and Finegold. S. M. (2002).** Wadsworth – KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing Co., Belmont, CA 94002.

K

- **Kalui, C. M.; Mathara, J. M.; Kutima, P. M.; Kiiyukia, C. and Wongo, L. E. (2009).** Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (18), pp. 4363-4373.
- **Kandler (1983).** Carbohydrate metabolism in *lactic acid bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, (49): 209-224.
- **Kandler, O. and Weiss, N. (1986).** Regular, nonsporing Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, vol. 2, pp. 1208-1234.
- **Kan-Zhi, L.; Shaw, A. R.; Man, A.; Thomas C.; Dembinski. and Henry, H. H. (2002).** Reagent-free, Simultaneous Determination of Serum Cholesterol in HDL and LDL by Infrared Spectroscopy *Clinical Chemistry* 48:3 499–506.
- **Karagul, Y.; Wilson, C. and White, H. (2004).** Formulation and processing of yoghurt. *J. Dairy Sci.*, 87: 543-550.
- **Katz, C. and Ron, E.Z. (2008).** Dual role of FtsH in regulating lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* ;190:7117–22.
- **Kaur, B.; Chakraborty, D. and Kumar, B. (2014).** Metabolic engineering of *Pediococcus acidilactici* BD16 for production of vanillin through ferulic acid catabolic pathway and process optimization using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8539–8551.
- **Kerkhoven, R., F. H.; van Enckevort, J.; Boekhorst, D.; Molenaar, H. and R. J. Siezen. (2004).** Visualization for genomics: the Microbial Genome Viewer. *Bioinformatics* 20:1812–1814.
- **Khalil, A.A.; Shehata, M. G.; El-Banna, A. A.; Sahar, F.; Malak, D. and El-Sahn, A. (2012).** Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Zabady Alex. *J. Fd. Sci. & Technol* Vol. 9, No. 1, pp. 17-31.

- **Khamis, A.; Raoult, D. and LaScola, B. (2005).** Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbio.* 43: 1934- 1936.
- **Khattab, A.A. and Mohamed, S.A. (2012).** Mutation induction and protoplast fusion of *Streptomyces* spp. for enhanced alkaline protease production. *J Appl Sci Res.* 8:807–814.
- **Kim, G.B. and Lee, B.H. (2005).** Biochemical and molecular insights into bile salt hydrolase in the gastrointestinal microflora- A review-. *Asian-Australas. J. Anim Sci.* 18: 1505-1512.
- **Kim, H. K.; Jeong, T.S.; Lee, M. K.; Park, Y. B. and Choi, M.-S. (2003).**“Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in highcholesterol fed rats,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 327, no. 1-2, pp. 129–137.
- **Klaenhammer, T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by [lactic acid bacteria](#). *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39S-85S.
- **Klaenhammer, T. R. R.; Barrangou, B. L.; Buck, M. Azcarate-Peril, A. and Altermann, E. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:393–409.
- **Klaver, F. A. M. and Van der Meer. R. (1993).** The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1120–1124.
- **Kleerebezem, M.; Boekhorst, J.; van Kranenburg, R.; Molenaar, D.; Kuipers, O.P.; Leer, R.; Tarchini, R.; Peters, S. A.; Sandbrink, H.M.; Fiers, M. J.; Stiekema, W.; Lankhorst, R. K.; Bron, P.A.; Hoffer, S.M.; Groot, M. N.; Kerkhoven, R.; de Vries, M.; Ursing, B.; de Vos, W. M. and Siezen, R.J. (2003).** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1990-1995.
- **Knorr, D. (1998).**Technological aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* 9:295–306.
- **Kono, Y. and Fridovich, I. (1983a).** Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*: A new manganese containing enzyme. *J. Biol. Chem.* 258: 6015-6019.
- **Kono, Y. and Fridovich, I. (1983b).** Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 155: 742-746.
- **Kranenburg, R. V.; Golic, N.; Baners, R.; Leer, R. J.; de vos, W. M.; Siezen, R. J. and Kleerebezem, M. (2005).** Functional Analysis of Three Plasmids from *Lactobacillus plantarum*, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1223–1230.
- **Kumar, R. S.; Suresh, C.G.; Brannigan, J.A.; Dodson, G.G. and Gaikwad, S.M. (2007).** Bile salt hydrolase, the member of Ntn-hydrolase family;

Differential modes of structural and functional transition during denaturation. IUBMB Life. 59: 118-125.

ℒ

- **Lankaputhra, W. E. V. and Shah, N. P. (1995).** Survival of presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products J.*30:2-7.
- **Lambert, J. M.; Bongers, R. S.; de Vos, W. M. and Kleerebezem, M. (2008).** Functional Analysis of Four Bile Salt Hydrolase and Penicillin Acylase Family Members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1_ APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Vol. 74, No. 15 p. 4719–4726.
- **Lebeer, S.; Vanderleyden, J. and Sigrid De Keersmaecker. C. J. (2008).** Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS Vol. 72, No. 4 p. 728–764.
- **Lee, I. H.; Lee, S. H.; Lee, I. S.; Park, Y. K.; Chung, D. K.; Chou, R. W. (2008).** Effects of probiotic extracts of kimchi on immune function in NC/Ngamice. *Korean J Food Sci Technol.* 40:82-7.
- **Lee, K.; Rho, B. S.; Pi, K.; Kim, H. J. and Choi, Y. J. (2011).** Proteomic analysis of protein expression in *Lactobacillus plantarum* in response to alkaline stress. *J. Biotechnol.*, 153, 1–7.
- **Lee, S. H.; Lillehoj, H. S.; Dalloul, R. A.; Park, D. W.; Hong, Y. H. and Lin, J. J. (2007).** Influence of *Pediococcus* –based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 86:63-66.
- **Leroy, F.; Falony, G. and de Vuyst, L. (2008).** Latest Developments in Probiotics. In Toldrà F. (ed.), *Meat Biotechnology*, Springer Science Business Media, LLC. 217-229 pp.
- **Ljungh, A. and Wadström, T. (2012).** Lactic Acid Bacteria as Probiotics Department of Medical Microbiology, Dermatology and Infection, Lund University, Sölvegatan 23, SE-223 62 Lund, Sweden *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 7: 73–90.
- **Lilly, D.M. and Stillwell. R. J. (1965).** Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748.
- **Lindgren, S.W. and Dobrogosz, W.J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- **Lin, J.J. (2006).** Probiotics as alternative Biomedicines for pets with digestive disorders.
- **Lin K. and Wang A. (2001).** UV mutagenesis in *Escherichia coli* K-12: Cell survival and mutation frequency of the chromosomal genes lacZ, rpoB, ompF, and ampA. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol. 1:32-46.

- **Liong, M. T. (2006).** In vivo and In vitro cholesterol removal by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. School of Molecular Sciences Victoria University, Werribee Campus, VIC, Australia.
- **Liong, M.T. and Shah N.P. (2005a).** Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55–66.
- **Liong, M. T. and Shah N.P. (2005b).** Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int. Dairy J.* 15:391–398.
- **Lister Hill National Center for Biomedical Communications (2016).** Handbook, Mutations and Health Reprinted from Genetics Home Reference (<http://ghr.nlm.nih.gov/>).
- **Llabrés, M.; Agustí, S.; Laita, P. A.; Gerhard J. and Hernd, G. J. (2010).** *Synechococcus* and *Prochlorococcus* cell death induced by UV radiation and the penetration of lethal UVR in the Mediterranean Sea Inter-Research . MEPS. v399. p27-37.
- **Lu, G.; Zhang, W.; Peng, X.; Gu, G.; Chen, M. and Tang, Z. (2010).** Development of Randomly Amplified Polymorphic DNA-Sequence Characterized Amplified Region Marker for Identification of *Apocynum venetum* LINN. from *A. pictum* SCHRENK. *Biol. Pharm. Bull.* 33(3) 522-526.
- **Luxananil, P. (2009).** Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of Nham, a traditional Thai pork sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 129:312–315.
- **Lye, H. S.; Rahmat, Ali.; G. R. and Liong, M. T. (2010).** “Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract,” *International Dairy Journal*, vol. 20, no. 3, pp. 169–175.

M

- **Machielsen, R.; Ingrid, J.; Boerrigter, A.; Koole, L. A.; Bongers, R. S.; Kleerebezem, M. and Hylckama, J. E. (2010).** Indigenous and Environmental Modulation of Frequencies of Mutation in *Lactobacillus plantarum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Vol. 76, No. 5. p. 1587–1595.
- **Mandal, V.; Sen, S. K. and Mandal, N. C. (2008).** Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB5 and its characterization. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 45, pp 106 – 110.
- **Marco, M. L.; Pavan, S. and Kleerebezem. M. (2006).** Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:204–210.
- **Markovitsi, D.; Gustavsson, T. and Banyasz, A. (2010).** Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. *Mutat Res* 704: 21–28.
- **MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GÓMEZ, R. and VIDAL-VALVERDE, C. (2006).** Influence of addition of raffinose family

oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, vol. 16, no. 7, p. 768-774.

- **Mastro, T. D.; Spika, J. S.; Lozano, P.; Appel, J. and Facklam, R. R. (1990).** Vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*: nine cases of bacteremia. *J. Infect. Dis.* 161:956–960.
- **Mathys, S.; Ah, U.; Lacroix, C.; Staub, E.; Mini, R.; Cereghetti, T. and Meile, L. (2007).** Detection of the pediocin gene *pedA* in strains from human faeces by real-time PCR and characterization of *Pediococcus acidilactici* UVA1. *BMC Biotechnology* 2007, 7:55.
- **Mättö, J.; Alakomi, H. L.; Virkajärvi, A.I. and Saarela, M. (2006).** Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int Dairy J.* 16: 1029-1037.
- **McCulloch, S.D. (2004).** Preferential *cis-syn* thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity. *Nature* 428: 97–100.
- **McDonald, L. C.; Fleming, H. P. and Hassan, H. M. (1990).** Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 7. p. 2120-2124.
- **Meers, J. L. (1973).** Growth of bacteria in mixed cultures. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1:139.
- **Meijerink, M.; van Hemert, S.; Taverne, N.; Wels, M.; de Vos, P.; Bron, P.A.; Savelkoul, H.F.; van Bilsen, J.; Kleerebezem, M. and Wells, J.M. (2010).** Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS One* 5:e10632.
- **Michael, E. B.; Susana, I. S.; Chiraphan, K.; Hongjuan, Z.; Keith, F. C.; Michael, J. B.; Andrzej, M. K. and Claudio, A.A. (2006).** The use of genome scale metabolic flux variability analysis for process feed formulation based on an investigation of the effects of the *zwf* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Enzyme Microbial. Technol.*, 39: 1347-1353.
- **Michajlik, A. and Ramotowski, W. (2003).** Anatomia i fizjologia człowieka., Wyd. Nauk. PWN, Warszawa (in Polish).
- **Mikulski, D.; Jankowski, J.; Naczmanski, J.; Mikulska, M. and Demey, V. (2012).** Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poultry Science* 91:2691–2700.
- **Millette, M.; Cornut, G.; Dupont, C.; Shareck, F.; Archambault, D. and Lacroix, M. (2008).** Capacity of Human Nisin- and Pediocin-Producing Lactic Acid Bacteria To Reduce Intestinal Colonization by Vancomycin-Resistant Enterococci. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 74, No. 7. p. 1997–2003.

- **Mitchell, L. J.; Chen, H.; Ouyang, W.; Metz, T. and Prakash, S. (2004).** Microencapsulated Genetically Engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for Bile Acid Deconjugation and Its Implication in Lowering Cholesterol Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1: 61–69.
- **Mitropoulou, G.; Nedovic, V.; Goyal, A. and Kourkoutas, Y. (2013).** Immobilization technologies in probiotic food production. J Nutr Metab.
- **Miyoshi K.; Tsukumo H.; Nagami T.; Siomi H. and Siomi M.C. (2005).** Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes & Dev.* 19: 2837–2848.
- **Mizutani, W.; Yamasaki, R.; Lin, J.J.; Kuki, M. and Kato, G. (2007).** *Pediococcus* an unique probiotics we use as a novel GI supplement. Annual Meeting of JBVP. 3-269-3-272.
- **Molin G. (2003).** The role of *Lactobacillus plantarum* in foods and in human health, p 305–342. In Farnworth E (ed), Handbook of fermented functional foods. CRC Press, Boca Raton, FL.
- **Montelone, Beth., A. Ph. D., Division of Biology, Kansas state University, (1998).**
- **Moon, Y. J.; Baik, S. H. and Cha, Y.S (2014).** Lipid-lowering effects of *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from Korean traditional makgeolli in high fat diet- induced obesemice. *Nutrients* 6,1016–1028.doi:10.3390/nu6031016.
- **Morgan, R. (1989).** UV: .green. light disinfection. *Dairy Industry. Int.*, 54(11): 33.35.
- **Morita, H.; Miyamoto, T. and Kataoka, K. (1991).** Intergeneric transfer of lactose-fermenting ability to *Pediococcus acidilactici* by conjugation. *Agric. Biol. Chem.* 55:2871–2873.
- **Mottet, C. and Michetti, P. (2005).** Probiotics: wanted dead or alive. *Dig. Liver Dis.* 37: 3–6.
- **Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Tenover R. H. (eds.). (1995).** Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

N

- **Narendranath, N.V.; Hynes, S.H.; Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. (1997).** Effect of Lactobacilli and yeast .Catalyzed ethanol fermentations. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11): 4158 – 4163.
- **Naruszewicz, M.; Johansson, M. Louise, A.; Downar, D. Z. and Bukowska, H. (2002).** Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers *Am J Clin Nutr* 2002;76:1249–55.
- **Neilan, B. A. (1995).** Identification and Phylogenetic Analysis of Toxigenic Cyanobacteria by Multiplex Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 2286–2291.

- **Neish, A. S. (2009).** Microbes in gastrointestinal health and disease. *Rev Bas Clin Gastroenterol.* 136: 65-80.
- **Nelson, j. A. and Trout, G. M. (1951).** Judging of dairy product. 3ed The Olsen publishing Com. USA.
- **Newlander, J. A. and Atherton, H. V. (1964).** Testing and chem. of dairy products. The Olsen publishing Com. USA.
- **Nigatu, A.; Ahrne, S.; Gashe, B. A. and Molin, G. (1998).** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:412–416.
- **Nishimmura, M.; Ohkawara, T.; Tetsuk, K.; Kawasaki, Y.; Nakagawa, R.; Satoh, H.; Sato, Y. and Nishihira, J. (2015).** Effect of yogurt containing *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO on immune function and stress markers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* 1-6.
- **Nissen, L.; Chingwaru, C. and W., Sgorbati, B. (2009).** Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. Strains: a functional study in the small intestinal cell model. *Int J Food Microbiol.* 135(3):288-94. Epub.
- **Nobaek, S.; Johansson, M. L.; Molin, G.; Ahrne, S. and Jeppsson, B. (2000).** Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with Irritable Bowel Syndrome, *Am. J. Gastroenterol.*, 95, 1231-1238.
- **Noh, D. O.; Kim, S. H. and Gilliland, S. E. (1997).** Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci* 80: 3107-3113.

O

- **Oberg, C. J., and J. R. Broadbent. (1993).** Thermophilic starter cultures: another set of problems. *J. Dairy Sci.* 76:2392–2406.
- **Ogunbanwo, S.T.; Sanni, A.I. and Onilude, A. A. (2003).** haracterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1 *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (8), pp. 219-227.
- **Ogura. T.; Inoue, K.; Tatsuta, T.; Suzaki, T.; Karata, K. and Young, K. (1999).** Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*;31:833–44.
- **Olah, A.; Belagyi, T.; Issekutz, A.; Gamal, M. E. and Bengmark, S. (2002).** Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *British Journal of Surgery* 89:1103-1107.

- **Oliveira, R. P. S.; Perego, P.; De Oliveira, M. N. and Converti, A. (2012).** Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 47, no. 2, p. 358-363.
- **Olorunfemi, O. B.; Onasanya, A. A. and Adetuyi, F. C. (2005).** Genetic variation and relationship is *Staphylococcus aureus* isolates from human and food samples using random amplified polymorphic DNAs. *Afri. J. Biotechnol.* 4(7): 611-614.
- **O'May, G. A.; Reynolds, A. R.; Smith, A.; Kennedy, J. and Macfarlane, G. T. (2005).** Effect of pH and antibiotics on microbial overgrowth in the stomachs and duodena of patients undergoing percutaneous endoscopic gastrostomy feeding. *J. Clin. Microbiol.* 43:3059–3065.
- **Ooi, L. G.; Ahmad, R.; Yuen, K. H. and Liong, M. T. (2010).** “*Lactobacillus acidophilus* CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters,” *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp. 5048– 5058.
- **Oozer, R. J. P.; Furet, N.; Goupil-Feuillerat, J.; Anba, J. Mengaud, N. and Corthier, G. (2005).** Differential activities of four *Lactobacillus casei* promoters during bacterial transit through the gastrointestinal tracts of human-microbiota-associated mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1356–1363.
- **Ostlie, H. M.; Helland, M. H. and Narvhus, J. A. (2003).** Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 87, no. 1-2, p. 17-27.
- **Oxoid (2004).** MRS AGAR (De Mann, Ragosa, Sharpe).
www.Oxoid.Com .
- **Ozbey, G.; Kilic, A.; Ertas, H. B. and Muz, A. (2004).** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* and *Manheimia haemolytica* strains isolated from catte, sheepand goats. *Vet. Med-Czech.* 49(3): 65-69.

P

- **Papagianni, M. and Anastasiadou, S. (2009).** Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions. *Enzyme Microb Tech.* 2009; 45: 514-522.
- **Papamanoli, E.; Tzanetakis, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. (2003).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* ;65:859-867.
- **Park, S. C.; Hwang, M. H.; Kim, Y. H.; Kim, J. C.; Song, J. C. and Lee, K. W. (2006).** Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus*

strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World J Microb Biot.*; 22: 35-37.

- **Patel, H. M.; Pandiella, S. S.; Wang, R. H. and Webb, C. (2004).** Influence of malt, wheat and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of *Lactobacilli*. *Food Microbiol.* 21: 83-89.
- **Patel, J. B. (2001).** *16S rRNA* gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* 6:313-321.
- **Patel, S. and Goyal, A. (2009).** Isolation, characterization and mutagenesis of exopolysaccharide synthesizing new strains of lactic acid bacteria *The Internet Journal of Microbiology Volume 8 Number1*.
- **Pathmakanthan, S.; Li, C. K. F. and Hawkey, C.J. (1999).** The protective effect of *Lactobacillus plantarum* 299 in human intestinal cells against invasive bacteria. *Gut* 44 (Suppl. 1): A65.
- **Pavan, S.; Hols, P.; Delcour, J.; Geoffroy, M. C.; Grangette, C.; Kleerebezem, M. & Mercenier, A. (2000).** *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4427–4432.
- **Pereira, D. A. and Gibson, G. R. (2002).** Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4689–4693.
- **Pereira, M. S. V.; Leal, N. C.; Leal, T. C. A.; Soberia, M.; de Almeida, A. M. P.; Siqueira-Junior, J. P. and Campos-Takaki, G. M. (2002).** Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *J. Appl. Microbiol.* 35: 32-36.
- **Perez-Diaz, I. M.; Breidt, F.; Buescher, R. W.; Arroyo-Lopez, F. N.; Jimenez-Diaz, R.; Fernandez, A.; Gallego, J.; Yoon, F. and Johanningsmeier, S. D. (2013).** *Fermented and Acidified Vegetables Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*
- **Pinto, B.; Chenoll, E. and Aznar, R. (2005).** Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 340-352.
- **Prado, F.; Parada, J. L.; Pandey, A. and Soccol, C. R. (2008).** Trends in non-dairy probiotic beverages, *Food Res. Int.*, 41, 111-123.
- **Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J. and Gopal, P.K. (1998).** Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int Dairy J* 1998, 8:993–1002.
- **Pridmore, R. D.; Berger, B.; Desiere, F.; Vilanova, D.; Barretto, C.; Pittet, A. C.; Zwahlen, M. C.; Rouvet, M.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Mollet, B.; Mercenier, A.; Klaenhammer, T.; Arigoni, F. and Schell, M. A. (2004).** The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:2512–2517.

- **Pundir, R. K.; Rana, S.; Kashyap, N. and Kaur, A. (2013).** Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (03), pp. 085-093.

R

- **Raccach, M. (1987).** *Pediococci* and biotechnology. *Crit. Rev. Microbiol.* 14: 291–309.
- **Rahayu, W.P.; Astawan, M.; Wresdiyati, T. and Mariska, S. (2013).** Antidiarrheal and antioxidative capability of synbiotic yogurt to the rats. *Int. Food Res. J.* 20:703–709.
- **Ramasamy, K.,; Abdullah, N.; Wong, M.C.V.L. Karuthand C. and Hob, Y. W. (2009).** Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. *Journal Science of Food Agriculture*, 90, 65–69.
- **Ransom, C.V.; Douches D.S. and Kells J. J. (1998).** Isozyme and RAPD variation among and within hemp dogbane (*Apocynum cannabinus*) population. *Weed Science.* 46:408-413.
- **Rasic, J. L.; Vujicic, I. F.; Skrinjar, M. and Vulic, M. (1992).** Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol Lett* 14: 39-44.
- **Ray, B. (1995).** *Pediococcus* in Fermented Foods. In *Food Biotechnology : Microorganisms* Edited by: Hui YH , Khachatourians G. Wiley-VCH,USA; 1995:745-795.
- **Rayes, N.; Hansen, S.; Seehofer, D.; Muller, A.R.; Serke, S.; Bengmark, S. and Neuhaus, P. (2002).** Early enteral supply of fiber and *Lactobacilli* versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* 18: 609-615.
- **Renye, J.A. and Somkuti, G. A. (2013).** BlpC-regulated bacteriocin production in *Streptococcus thermophilus*. 35(3):407-12. doi: 10.1007/s10529-012-1095-0. Epub.
- **Reynolds, R. J. (1987).** Induction and repair of closely opposed pyrimidine dimers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 184: 197–207.
- **Rhee C, Park H. (2000).** Culture conditions on the mutagenic effects of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from kimchi against Nmethyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitroquinoline- 1-oxide. *Korean J Food Sci Technol.* 150:417-23.
- **Ribeiro, M. C.; Vandenberghe, L. P.; Spier, M. R.; Paludo, K. S.; Soccol, C. R. and Soccol, V. T. (2014).** Evaluation of Probiotic Properties of *Pediococcus acidilactici* B14 in Association with *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 for Application in a Soy Based Aerated Symbiotic Dessert. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY* Vol.57, n.5: pp. 755-765.

- **Riebel, W. J. and Washington, J. A. (1990).** Clinical and Microbiologic Characteristics of *Pediococci* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. p. 1348-1355.
- **Robinson, R.K. and Tamime, A.Y. (1986).** Recent developments in yoghurt manufacture, in Modern Dairy Technology, B.J.F. Hudson, Ed., Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 1-36
- **Rodgers, S. (2001).** Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 12, no. 8, p. 276-284.

S

- **Sambrook J. and Russell D. W. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.
- **Sanchez I.; Palop L. and Ballesteros C. (2000).** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of ‘Alamgro’ Eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 9–17.
- **Sandholm, M.T.; Haikara, A. and Skyttae, E. (1993).** The effect of *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus* on the growth of pathogens in minced meat. *Int. J. Food Microbiol.* 13:87–94.
- **Santos A.; San Mauro M.; Sanchez A.; Torres J.M. and Marquina D. (2003).** The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 434–437.
- **Sasikumar, P.; Gomathi, S.; Anbazhagan, K.; Abhishek A.; Paul, E.; Vasudevan, V.; Sasikumar, S. and Selvam, G. S. (2014).** Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats *Journal of Biomedical Science* 21:86 <http://www.jbiomedsci.com/content/21/1/86>.
- **Savadago, A.; Ouattara C. A. T.; Bassole I. H. N. and Traore, S. A. (2006).** Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African journal of biotechnology*. 5(9): 678-683.
- **Schaafsma, S. (1995).** State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr. News Lett.* (5): 23-24.
- **Schillinger. U.; Guigas. C. and Holzapfel, W.H. (2005).** In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yogurt-like products. *Int. Dairy J.* 15: 1289-1297.
- **Schrezenmier, J. and de Vrese M. (2001).** Probiotics, Prebiotics, and synbiotics approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 361-364.
- **Setlow, R. B. (1974).** The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 3363–3366.

- **Shah, D.N.; Shah, V.D.; Nehete P.N. and Kothari, R.M. (1986).** Isolation of *Bacillus licheniformis* mutants for stable production profiles of alkaline protease. *Biotechnol. Lett.*, 8: 103-106.
- **Sharpe, M. E.; Fryer, T. F. and Smith, D. G. (1966).** 'Identification of the Lactic Acid Bacteria' in 'Identification Method for Microbiologists Part A' (Gibbs B. M. and Skinner F. A. eds.) London and New York, Academic Press. Pages 65-79.
- **Sheelendra, M. B. and Srivastava, S. K. (2012).** High yield of Lactic acid production by Mutant Strain of *L. delbrueckii* U12-1 and Parameter Optimization by Taguchi methodology *Annals of Biological Research*, 3 (6):2579-2592.
- **Shibai, A.; Tsuru, S.; Ying, B. W.; Motooka, D.; Gotoh, K.; Nakamura, S. and Yomo, T. (2014).** Mutation accumulation in bacteria exposed to UV radiation DOI: <http://dx.doi.org/10.7551/978-0-262-32621-6-ch121>.
- **Shimamura, S.; Abe, F.; Ishibashi, N.; Miyakawa, H.; Yaeshima, T.; Araya, T. and Tomita, M. (1992).** Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium species. *Journal of Dairy Science*, vol. 75, no. 12, p. 3296-3306.
- **Sieladie, D. V.; Zambou, N. F.; Kaktcham, P. M.; Cresci, A. and Fonteh, F. (2011).** Probiotic properties of *Lactobacilli* strain isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. Vol. 9, p 12-28.
- **Siezen, R. J. and Van Hylckama, E.T. (2011).** Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1):S3.
- **Sijapati J.; Rana N.; Rana P. and Shrestha S. (2008).** Optimization of RAPD-PCR Conditions for the Study of Genetic Diversity in Nepalese Isolates of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Nepal Journal of Science and Technology* 9: 91-97.
- **Simpson, P. J.; Stanton, C.; Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. (2002).** Genomic Diversity within the Genus *Pediococcus* as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Applied and Environment Microbiology*. Vol. 68, No. 2. p. 765–771.
- **Sinha, R. P.; Rastogi, R. P.; Ambasht, N. K. and H, D.-P. (2008).** "ader, "Life of wetland cyanobacteria under enhancing solar UV-B radiation," *Proceedings of the National Academy of Sciences, India B*, vol. 78, pp. 53–65.
- **Sire, J. M.; Donnio, P. Y.; Mesnard, R.; Pouëdras, P.; Avril, J. L. (1992).** Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11:623-625.
- **Sirilun, S.; Chaiyasut, C.; Kantachote, D. and Luxananil, P. (2010).** Characterization of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 994-1000.

- **Smid, E. J.; van Enckevort, A.; Wegkamp, J.; Boekhorst, D.; Molenaar, J.; Hugenholtz, R. J.; Siezen, C. and B. Teusink. (2005).** Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories. *J. Appl. Microbiol.* 98:1326–1331.
- **Socol, C. R.; de Souza Vandenberghe, L. P.; Spier, M. R.; Pedroni, A. B.; Medeiros, C. T.; Yamaguishi, J.; Lindner, De. D.; Pandey, A. and Thomaz-Socol, V. (2010).** The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (4): 413–434.
- **Spano G.; Beneduce L.; Tarantino D.; Zapparoli G. and Massa S. (2002).** Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR Letters in Applied Microbiology 2002, 35, 370–374.
- **Sridevi, N.; Vishwe, P. and Prabhune, A. A. (2009).** Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Res. Int.* 42: 516-520.
- **Stackebrandt, E. and Goebel. B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846–849.
- **Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbil.* (39):1-29.
- **Succi, M.; Tremote, P.; Reale, A.; Sorrentino, E.; Grazia, L.; Pacifico, S. and Coppola, R. (2005).** Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese *FEMS Microbiology Letters* 244, 29–137.
- **Sudi I. Y.; Nanditta D. and Ali - Dunkrah U. (2008).** Mutagenesis and Selection of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* for Potential use as Starter Culture *The Journal of American Science*, 4(3). ISSN 1545-1003.

T

- **Tahri, K.; Crociani, J.; Ballongue, J. and Schneider, F. (1995).** Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Lett Appl Microbiol* 21: 149-151.
- **Tamang, J. P.; Tamang, B.; Schillinger, U.; Franz, A. P.; Gores, M. and Holzapfel, W. H. (2005).** “Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, no. 3, pp. 347–356.
- **Tambekar, D. H. and Bhutada, S. A. (2010).** Studies on antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by *Lactobacillus* strains isolated from milk of domestic animals. *TheInternet J Microbiol.* 8:1-6.

- **Tanaka, H.; Doesburg, K.; Iwasaki, T. and Mierau, I. (1999).** Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.* 82: 2530–2535.
- **Tannock, G.W.; Dashkevitz, M. P. and Feighner, S. D. (1989).** *Lactobacilli* and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1848-1851.
- **Taranto, M. P.; Perez-Martinez, P. G. and Valdez, G. F. (2006).** Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology* ;157:720-725.
- **Teusink, B.; van Enckevort, F. H. J.; Francke, C.; Wiersma, A.; Wegkamp, A.; Smid, E. J. and Siezen. R. J. (2005).** In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7253–7262.
- **Thiruneelakandan, G.; Vidya, S.; Jenifer, S. V.; Babu, V.; Shanthi, V. and Kathiresan, K. (2014).** Identification of *Lactobacilli* Isolated from Mangrove Biotopes of East Coast of India. *Global Educational Research Journal: ISSN-2360-7963 Vol. 2(2)* pp 033-037.
- **Togo, C.A.; Feresu S.B. and Mutukumira, A.N. (2002).** Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Opaque Beer (Chibuku) for Potential use as a Starter Culture. *J.Food Tech. Africa* 7 (3): 93-97.
- **Tomaro, C. D.; Jones, M. L.; Shah, D.; Jain, P.; Saha, S. and Prakash, S. (2014).** Cholesterol Assimilation by *Lactobacillus* Probiotic Bacteria: An inVitro Investigation Vol. 2014, Article ID 380316, 9 pages.
- **Tomaro, C. D.; Saha, S. and Malhotra, M. (2012a).** “*Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 has a greater ferulic acid production compared to other ferulic acid esterase producing *Lactobacilli*,” *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, vol. 7, pp. 23–32.
- **Tomaro, C. D.; Saha, S. and Malhotra, M. (2012b).** “Probiotic ferulic acid esterase active *Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 APA microcapsules for oral delivery: Preparation and in vitro characterization,” *Pharmaceuticals*, Vol. No. 2, PP. 236-248.
- **Torriani, S.; Clementi, F.; Vancanneyt, M.; Hoste, B.; Dellaglio, F. and Kersters, K. (2001).** Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst Appl Microbiol*, 24(4):554-560.
- **Tserovska, L.; Stefanova, S. and Yordanova, T. (2002).** Identification of lactic acid bacteria isolated from Katyk, goat’s milk and cheese *Journal of Culture Collections Vol.3*, pp: 48-52.

V

- **Van Baarlen, P.; Troosta, F.J.; van Hemerta, S.; van der Meera, C.; de Vose, W.M.; de Groota, P.J.; Hooivelda, G.J.; Brummera, J.M. and Kleerebezema, M. (2009).** Differential NF-kappaB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *PNAS* 106: 2371–2376.
- **Van de Guchte, M.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.D. and Maguin, E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 187–216.
- **Vandamme, P.; Pot, M.; Gillis, P.; De Vos, K.; Kersters, L. and Swings. J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407–438.
- **Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. (1992).** Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- **Vasiee, A. R.; Tabatabaei Yazdi, F.; Mortazavi, A. and Edalatian, M. R. (2014).** Isolation, identification and characterization of probiotic *Lactobacilli* spp. from Tarkhineh International Food Research Journal 21(6): 2487-2492.
- **Vasiljevic and Shah, N.P. (2008)** Review: probiotics — from etchnik off to bioactives, *International Dairy Journal* 18: pp. 714–728.
- **Ve Damuthu, E. R. (1994).** The dairy Leuconostoc: use in dairy products. *J. Dairy Sci.* 77:2725.
- **Vinderola, C. G.; Mocchiutti, P. and Reinheimer, J. A. (2002).** Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products American Dairy Science Association *J. Dairy Sci.* 85:721–729.
- **Vizoso, M.G.; Franz, C. M.; Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (2006).** *Lactobacillus* spp. within vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 205–214.
- **Vlahcevic, Z. R.; Heuman, D. M. and Hylemon, P.B. (1990).** Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In: Zakim D, Boyer TD (eds) *Hepatology. A textbook of liver disease*, vol 1. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 341-377.
- **Vuyst, D. L. (2000).** Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 105-112.

W

- **Weinberg, Z. G.; Muck, R. E. and Weimer, P. J. (2003).** The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *J. Appl. Microbiol.* 94:1066–1071.
- **Welsh J. and McClelland M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.

- **Welsh, J. and McClelland, M. (1991).** Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combination of primers. *Nucleic Acids Res.* 19: 5275-5279.
- **Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. and Tinger, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22): 6531-6535.
- **Woo, J. Y.; Gu, W.; Kim, K. A.; Jang, S. E.; Han, M.J. and Kim, D. H., (2014).** *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a D-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe* 27, 22–26.

Υ

- **Yang, H.; Wolff, E.; Kim, M.; Diep, A. and Miller, J. H. (2004).** Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach. *Mol. Microbiol.* 53:283–295.
- **Yildiz, F. (2010).** Development and Manufacture of yogurt and Functional Dairy Products, Book printed in the United States of America, Tylor and Francis group.
- **Yildiz, G.G.; Öztürk, M. and Aslim, B. (2011).** Identification of *Lactobacillus* strains from breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects. *World J. MicrobiolBiotechnol.* 27: 2397-2406.
- **Yin, S.; Zhai, Z.; Wang, G.; Na, H.; Luo, Y. and Hao, Y., (2011).** A novel vector for lactic acid bacteria that uses a bile salt hydrolase gene as a potential food-grade selection marker. *J Biotechnol.* 2011; 152: 49-53.

Z

- **Zambou, N. F.; Ahmed, N. N.; Mbiapo, T. F. and Soda, M. (2004).** Effect of ropy and capsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (10), pp. 512-518.
- **Zapparoli, G.; Reguant, C.; Bordons, A.; Torriani, S. and Dellaglio, F. (2000).** Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology* 40, 351–355.
- **Zeeshan, M. and Prasad, S. M. (2009).** “Differential response of growth, photosynthesis, antioxidant enzymes and lipid peroxidation to UV-B radiation in three cyanobacteria,” *South African Journal of Botany*, vol. 75, no. 3, pp. 466–474.

- **Zhu, L.; Hu, W.; Liu, D.; Tian, W.; Yu, G.; Liu, X.; Wang, J.; Feng, E.; Zhang, X. and Chen, B.; (2011).** A reference proteomic database of *Lactobacillus plantarum* CMCC-P0002. *PLoS One*, 6, e25596.

7- الملاحق

ملحق (1) النسب المئوية لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل على الوسط MRS السائل لسلاسل بكتريا *L.plantarum* البرية والمطفرة عند نموها في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني وعلى فترات زمنية مختلفة

الأس الهيدروجيني 1.5		الأس الهيدروجيني 2		الأس الهيدروجيني 3		الأس الهيدروجيني 4		وقت التعرض للمعاملة / ساعة	<i>Lactobacillus plantarum</i>
% لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل	لوغاريتم الأعداد الحية / مل		
0	^a 10.02	0	^a 10.02	0	^a 10.02	0	^a 10.02	0	IRQ12
11.07	^b 8.91	3.19	^a 9.7	.691	^a 9.85	0.89	^a 9.93	1	
35.12	^{bc} 6.5	23.15	^b 7.7	21.35	^b 7.88	12.37	^a 8.78	2	
49.6	^d 5.05	42.51	^{bc} 5.76	32.13	^b 6.8	21.85	^a 7.83	3	
0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	CM
37.65	^d 6.21	29.51	^{bc} 7.02	19.07	^b 8.06	11.64	^a 8.8	1	
42.57	^{bc} 5.72	39.05	^b 6.07	21.18	^a 7.85	17.26	^a 8.24	2	
67.97	^d 3.19	49.29	^{bc} 5.05	32.42	^a 6.73	27.91	^a 7.18	3	
0	^a 9.79	0	^a 9.79	0	^a 9.79	0	^a 9.79	0	KR
36.15	^d 6.25	27.88	^{bc} 7.06	19.2	^b 7.91	8.78	^a 8.93	1	
43.41	^d 5.54	37.38	^{bc} 6.13	30.43	^b 6.81	24	^a 7.44	2	
55.46	^d 4.36	44.63	^{bc} 5.42	38.1	^b 6.06	30.64	^a 6.79	3	
0	^a 9.9	0	^a 9.9	0	^a 9.9	0	^a 9.9	0	CT
33.61	^d 5.43	33.73	^{bc} 6.56	22.32	^b 7.69	10.40	^a 8.87	1	

40.83	^d 4.84	39.09	^{b c} 6.03	30.1	^b 6.92	15.75	^a 8.34	2	BS
83.13	^d 1.67	67.97	^{b c} 3.17	42.02	^b 5.74	34.04	^a 6.53	3	
0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	
39.03	^{b c} 6.06	20.82	^b 7.87	2.21	^a 9.72	0.40	^a 9.9	1	
38.43	^d 6.12	23.84	^{b c} 7.57	17.4	^b 8.21	11.06	^a 8.84	2	
64.58	^d 3.52	43.96	^{b c} 5.57	31.08	^b 6.85	23.23	^a 7.63	3	
0	^a 9.95	0	^a 9.95	0	^a 9.95	0	^a 9.95	0	القياسية
29.04	^d 7.06	12.36	^{b c} 8.72	1.2	^a 9.83	0.1	^a 9.94	1	
35.27	^{b c} 6.44	22.91	^b 7.67	21.3	^b 7.83	11.65	^a 8.79	2	
59.09	^{b c} 4.07	45.52	^b 5.42	42.41	^b 5.73	36.08	^a 6.36	3	
0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	IRQ12 20s
4.21	^a 9.54	5.32	^a 9.43	2.2	^a 9.74	5.02	^a 9.46	1	
10.84	^{b c} 8.88	8.93	^b 9.07	5.32	^a 9.43	0.9	^a 9.87	2	
15.06	^{b c} 8.46	14.05	^{b c} 8.56	7.63	^b 9.2	0.7	^a 9.89	3	
0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	^a 9.96	0	25s
4.21	^a 9.54	1.5	^a 9.81	0.50	^a 9.91	1.3	^a 9.83	1	
1	^a 9.86	3.01	^a 9.66	1.70	^a 9.79	2.3	^a 9.73	2	IRQ12
7.12	^a 9.25	5.22	^a 9.44	3.51	^a 9.61	4.11	^a 9.55	3	
0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	IRQ

2.01	^a 9.74	2.01	^a 9.74	0.2	^a 9.92	0.9	^a 9.85	1	
3.01	^a 9.64	2.71	^a 9.67	3.92	^a 9.55	1.3	^a 9.81	2	
7.14	^a 9.23	3.82	^a 9.56	4.42	^a 9.5	5.1	^a 9.43	3	
								0	
الأس الهيدروجيني 1.5		الأس الهيدروجيني 2		الأس الهيدروجيني 3		الأس الهيدروجيني 4		وقت التعرض للمعاملة / ساعة	<i>Pediococcus acidilactici</i>
% لانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% لانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% لانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% لانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل		
0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	^a 9.94	0	IRQ12 60s
9.05	^{b c d} 9.04	1.6	^a 9.78	0.7	^a 9.87	0.2	^a 9.92	1	
13.88	^{b c d} 8.56	4.12	^a 9.53	7.74	^b 9.17	1.4	^a 9.8	2	
15.89	^{b c} 8.36	12.37	^b 8.71	10.36	^b 8.91	1.81	^a 9.76	3	

الاحرف الصغيرة تشير الى وجود أو عدم وجود فروق معنوية بين مقاومة الارقام الهيدروجينية المختلفة $P \leq 0.01$

ملحق (2) النسب المئوية لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل على الوسط MRS السائل لبكتريا *P. acidilactici* البرية والمطفرة عند نموها في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني وعلى فترات زمنية مختلفة

0	^a 9.86	0	^a 9.86	0	^a 9.86	0	^a 9.86	0	SNN12
19.87	^d 7.9	13.48	^{b c} 8.53	8.01	^b 9.07	0.40	^a 9.82	1	
22.1	^b 7.68	20.58	^b 7.83	10.64	^a 8.81	9.33	^a 8.94	2	
33.56	^{b c} 6.55	29.91	^{b c} 6.91	17.44	^a 8.14	23.42	^b 7.55	3	
0	^a 10.94	0	^a 10.94	0	^a 10.94	0	^a 10.94	0	SNN12 20s
21.11	^{b c d} 8.63	10.32	^b 9.81	9.5	^b 9.9	1.82	^a 10.74	1	
39.48	^{b c d} 6.62	19.65	^b 8.79	18.28	^b 8.94	3.56	^a 10.55	2	
43.87	^{b c d} 6.14	24.77	^b 8.23	20.93	^b 8.65	7.03	^a 10.17	3	
0	^a 10.96	0	^a 10.96	0	^a 10.96	0	^a 10.96	0	SNN12 25s
28.92	^d 7.79	17.79	^{b c} 9.01	1.45	^a 10.8	0.91	^a 10.86	1	
35.49	^{b c d} 7.07	19.61	^b 8.81	18.61	^b 8.92	3.74	^a 10.55	2	
42.15	^d 6.34	28.46	^{b c} 7.84	22.35	^b 8.51	2.73	^a 10.66	3	
0	^a 8.97	0	^a 8.97	0	^a 8.97	0	^a 8.97	0	SNN12 30s
15.05	^{b c} 7.62	3.01	^a 8.7	2.56	^a 8.74	12.04	^b 7.89	1	
24.08	^{b c d} 6.81	16.49	^a 7.49	14.49	^a 7.67	12.48	^a 7.85	2	
42.02	^{b c d} 5.2	20.4	^a 7.14	17.61	^a 7.39	15.71	^a 7.56	3	
0	^a 5.95	0	^a 5.95	0	^a 5.95	0	^a 5.95	0	SNN12 35s
20.5	^{b c} 4.73	15.29	^b 5.04	3.19	^a 5.76	1.34	^a 5.87	1	
34.78	^b 3.88	33.94	^b 3.93	30.92	^b 4.11	16.97	^a 4.94	2	

39.32	^b 3.61	35.63	^b 3.83	35.29	^b 3.85	25.37	^a 4.44	3	SNN12 60s	
0	^a 5.55	0	^a 5.55	0	^a 5.55	0	^a 5.55	0		
51.35	^{b c} 2.7	47.2	^{b c} 2.93	28.64	^b 3.96	12.61	^a 4.85	1		
60.36	أملاح صفراء %0.3		أملاح صفراء %0.2		أملاح صفراء %0.1		الحيوية	Lacto		2
68.1	^{b c d} 1.77	54.95	^a 2.5	51.35	^a 2.7	49.36	^a 2.81	3		

الصغيرة
الى
عدم
فروق
بين
الارقام

الاحرف
تشير
وجود أو
وجود
معنوية
مقاومة

الهيدروجينية المختلفة $P \leq 0.01$

ملحق (3) النسب المئوية لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل على الوسط MRS السائل لسلاسل بكتريا *L. plantarum* البرية والمطفرة بوجود تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على فترات زمنية مختلفة

لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية		
0	0	^a 9.92	0	^a 9.92	0	0	IRQ12
1.91	0.9	^a 9.73	0.9	^a 9.83	0.30	1	
3.02	1.61	^b 9.62	1.61	^a 9.76	0.80	2	
4.23	2.72	^b 9.5	2.72	^a 9.65	1.61	3	
0	0	^a 9.87	0	^a 9.87	0	0	CM
1.92	0.71	^a 9.68	0.71	^a 9.8	0.30	1	
14.79	1.51	^b 8.41	1.51	^a 9.72	0.50	2	
15.09	2.02	^{b c} 8.38	2.02	^a 9.67	0.71	3	
0	0	^a 9.73	0	^a 9.73	0	0	KR
4.41	2.05	^{b c} 9.3	2.05	^a 9.53	1.13	1	
8.42	6.68	^b 8.91	6.68	^b 9.08	2.15	2	
14.38	8.53	^{b c} 8.33	8.53	^b 8.9	4.31	3	
0	0	^a 9.74	0	^a 9.74	0	0	CT
5.85	4	^b 9.17	4	^a 9.35	2.15	1	
8.11	7.39	^b 8.95	7.39	^b 9.02	2.56	2	
20.63	7.8	^{b c} 7.73	7.8	^b 8.94	3.69	3	
0	0	^a 9.86	0	^a 9.86	0	0	BS

2.43	^b 9.62	0.5	^a 9.81	0.1	^a 9.85	1	
14.09	^{b c} 8.47	1.41	^a 9.72	0.1	^a 9.85	2	
16.83	^{b c} 8.2	12.88	^b 8.59	0.6	^a 9.8	3	
0	^a 9.88	0	^a 9.88	0	^a 9.88	0	القياسية
1.92	^a 9.69	0.91	^a 9.79	0.4	^a 9.84	1	
3.16	^{b c} 9.49	1.41	^a 9.74	0.5	^a 9.83	2	
8.6	^{b c} 9.03	3.44	^a 9.54	1.31	^a 9.75	3	
0	^a 9.8	0	^a 9.8	0	^a 9.8	0	IRQ12 20s
3.16	^b 9.49	1.63	^a 9.64	0.3	^a 9.77	1	
3.67	^b 9.44	2.95	^b 9.51	0.61	^a 9.74	2	
7.75	^b 9.04	6.12	^b 9.2	1.42	^a 9.66	3	
0	^a 9.86	0	^a 9.86	0	^a 9.86	0	25s
0.4	^a 9.82	0.81	^a 9.78	0.3	^a 9.83	1	
1.41	^a 9.72	1.92	^a 9.67	1.31	^a 9.73	2	IRQ12
5.47	^{32^b} 9.	4.36	^a 9.43	3.14	^a 9.55	3	
0	^a 9.85	0	^a 9.85	0	^a 9.85	0	IRQ12 30s
3.95	^{b c} 9.46	0.81	^a 9.77	0.2	^a 9.83	1	
4.77	^a 9.38	4.16	^a 9.44	3.04	^a 9.55	2	
7.91	^b 9.07	5.88	^b 9.27	2.43	^a 9.61	3	

P ≤	أملح صفراء 0.3%		أملح صفراء 0.2%		أملح صفراء 0.1%		وقت التعرض للمعاملة / ساعة	<i>Pediococcus acidilactici</i>	الاحرف تشير وجود أو وجود معنوية مقاومة أملاح المختلفة 0.01
	% للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية / مل	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل	% للانخفاض في لوغاريتم الأعداد الحية	لوغاريتم الأعداد الحية / مل			
(4)	0	^a 9.88	0	^a 9.88	0	^a 9.88	0	IRQ12 35s	الاحرف تشير وجود أو وجود معنوية مقاومة أملاح المختلفة 0.01
	0.91	^a 9.79	4.55	^{b c} 9.34	2.12	^a 9.67	1		
	3.13	^a 9.57	7.79	^{b c} 9.11	3.23	^a 9.56	2		
	8.08	^a 8.87	3.39	^a 9.11	3.02	^a 9.3	0		
0	^a 11.25	0	^a 11.25	0	^a 11.25	0	SNN12	ملحق النسب	
8.91	^b 8.79	7.35	^a 8.94	6.32	^a 9.04	1			
9.06	^{b c} 10.23	3.02	^a 10.91	2.48	^a 10.97				

المئوية لانخفاض لوغاريتم الأعداد الحية / مل على الوسط MRS السائل لبكتريا *P.acidilactici* البرية والمطفرة بوجود تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء على فترات زمنية مختلفة

15.02	^{bc} 9.56	4.88	^a 10.7	4.08	^a 10.79	2	
26.04	^{bc} 8.32	20.62	^b 8.93	13.51	^a 9.73	3	
0	^a 11.96	0	^a 11.96	0	^a 11.96	0	
13.37	^{bc} 10.36	10.28	^b 10.73	0.83	^a 11.86	1	SNN12 20s
17.64	^{bc} 9.85	11.7	^b 10.56	9.61	^a 10.81	2	
19.98	^{bc} 9.57	17.55	^a 9.86	17.14	^a 9.91	3	
0	^a 11.23	0	^a 11.23	0	^a 11.23	0	SNN12 25s
49.59	^{bc} 5.66	16.91	^b 9.91	3.20	^a 10.87	1	
36.42	^b 7.14	40.07	^{bc} 6.73	11.84	^a 9.9	2	
44.79	^{bc} 6.2	33.74	^b 7.44	21.63	^a 8.8	3	
0	^a 9.88	0	^a 9.88	0	^a 9.88	0	SNN12 30s
21.65	^b 7.74	21.05	^b 7.8	0.30	^a 9.85	1	
39.77	^{bc} 5.95	23.38	^b 7.57	2.12	^a 9.67	2	
41.49	^{bc} 5.78	30.36	^b 6.88	9.91	^a 8.9	3	
0	^a 8.94	0	^a 8.94	0	^a 8.94	0	SNN12 35s
41.83	^{bc} 5.2	3.57	^b 8.62	1	^a 8.85	1	
45.19	^{bc} 4.9	16.21	^b 7.49	3.69	^a 8.61	2	
45.74	^{bc} 4.85	22.7	^b 6.91	7.71	^a 8.25	3	
0	^a 8.88	0	^a 8.88	0	^a 8.88	0	SN

الصغيرة الى عدم فروق بين تراكيز	46.28	^{b c} 4.77	14.3	^a 7.61	37.95	^b 5.51	1	الاحرف تشير وجود أو وجود معنوية مقاومة
	49.32	^b 4.5	47.86	^b 4.63	10.81	^a 7.92	2	
	53.37	^b 4.14	52.13	^b 4.25	11.14	^a 7.89	3	

أملاح الصفراء المختلفة $P \leq 0.01$



اللبنني لبكتريا
SNN12 المعزولة



ملحق (5) أنموذج من التخمر
Pediococcus acidilactici
من مخلل الباميا

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: NUMBER

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1294.315 ^a	95	13.624	1042.789	.000
Intercept	21442.835	1	21442.835	1641202.499	.000
pH	398.341	3	132.780	10162.813	.000
Time	644.385	3	214.795	16440.075	.000
species	120.035	5	24.007	1837.465	.000
pH * Time	13.998	9	1.555	119.042	.000
pH * species	40.465	15	2.698	206.475	.000
Time * species	50.802	15	3.387	259.219	.000
pH * Time * species	26.290	45	.584	44.715	.000
Error	3.763	288	.013		
Total	22740.913	384			
Corrected Total	1298.078	383			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: LPLANTARUM					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.638 ^a	23	.332	9.714	.000
Intercept	5483.837	1	5483.837	160411.266	.000
TIME	6.068	3	2.023	59.167	.000
TYPE	.953	5	.191	5.574	.000
TIME * TYPE	.618	15	.041	1.204	.301
Error	1.641	48	.034		
Total	5493.117	72			
Corrected Total	9.279	71			

a. R Squared = .823 (Adjusted R Squared = .738)

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: AA					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.586 ^a	10	.759	13.683	.000
Intercept	7380.430	1	7380.430	133132.015	.000
TYPE	1.627	4	.407	7.339	.000
TIME	4.054	3	1.351	24.374	.000

pH	1.904	3	.635	11.451	.000
Error	3.825	69	.055		
Total	7391.840	80			
Corrected Total	11.411	79			

a. R Squared = .665 (Adjusted R Squared = .616)

5- الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

- 1- أمكن عزل سلالتان محليتان من بكتريا حامض اللاكتيك *L.plantarum* و *P.acidilactici* من المخلل المصنع مختبرياً وسجلت كسلالتين عالميتين جديدتين.
- 2- أثبتت طريقة التطهير بالأشعة فوق البنفسجية كفاءتها في تطهير العزلات البكتيرية بمدد زمنية قصيرة مختلفة بما يتلاءم والمحافظة على بقائها حية.
- 3- أحدثت عملية التطهير تغيرات في التركيب الجيني للعزلات البكتيرية ولكل مستوى من مستويات التطهير وحسب مدة التعرض للأشعاع.
- 4- أثبتت العزلات البرية والمطفرة لبكتريا *L.plantarum* و *P.acidilactici* مقاومة عالية للظروف القاسية كانهخفاض الحموضة والتراكيز المرتفعة لأملاح الصفراء وقابلية عالية على خفض مستويات الكولسترول في وسط النمو.
- 5- لم يظهر أي تضاد بين العزلات البرية والمطفرة وبين بكتريا بادئ اليوكرت عدا تأثير بعض مستويات التطهير لبكتريا *P.acidilactici*.
- 6- حافظت العزلات البرية والمطفرة على عيوشيتها في المنتجات اللبنية المتخمرة حتى بعد 21 يوماً من الخزن المبرد.

التوصيات

- 1- استعمال آليات أخرى في التطهير لهاتين العزلتين مثل عمليات التطهير الكيميائي.

- 2- اجراء عمليات التطهير على أنواع أخرى من بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة في هذه الدراسة.
- 3- استعمال المنتجات اللبنية المتخمرة الحاوية على البكتريا المطفرة في تغذية حيوانات التجارب لتحديد مدى صلاحيتها للاستهلاك البشري.
- 4- تحديد تتابعات الجين الخاص للكولسترول والصفراء من العزلات المطفرة بواسطة sequence ومقارنته مع نفس تتابعات الجينين قبل التطهير لتحديد مكان الطفرة المسببة لزيادة الإنتاج.
- 5- استعمال البكتريا المحلية المعزولة في تصنيع منتجات اللحوم المتخمرة.
- 6- استعمال طرائق الهندسة الوراثية في عزل جينات مقاومة البكتريا المحلية للحموضة وتحمل أملاح الصفراء وقابليتها في خفض مستويات الكولسترول.
- 7- دراسة تأثير العزلات البرية والمطفرة في البكتريا المسببة لبعض أمراض الجهاز الهضمي.

Summary

Thirty six lactic acid bacteria isolates were isolated from Lactic acid bacteria isolation isolated from different plant sources (Cucumbers cucumber IRQ12, Cucumber CM, Okra KR, Carrot CT and Barrots BS) which were fermented in salt solution. By using selective methods *Lactobacillus plantarum* bacteria was obtained and *Pediococcus acidilactici* was obtained from Okra pickles these isolates were submitted to:

1- Identification tests were investigated which included appearance and microscopic Biochemical tests using (MRS Agar, MRS Broth) media.

2- A genetic assurance test was conducted for *L.plantarm*, *P.acidilactici* bacteria and they were registered as new international strains. IRQ12, SNN12 respectively by DNA extraction and amplified *16SrDNA* gene and determined the clusters of Nucleotide comparing with international strains which were previously known in (GenBank).

3- Screening process was conducted for strains to select the most efficient which included:

A- Production of total acidity from milk, the standard and CM strains for *L.plantarum* showed the higher acid value for both which were 0.72%, while as the total acidity for *P.acidilactici* SNN12 was 0.8%.

B- The local strains tolerance for different pH were determinate, *L.plantarum* IRQ12 showed the highest tolerance which Log cfu\ ml was 5.05 at pH 1.5 after 3 hours of treatment whereas CT strain showed the lowest pH tolerance log cfu\ml was 1.67 in same conditions. While the local *p.acidilactici* SNN12 strain showed high tolerance for pH 1.5 which were log cfu\ml was 6.55 after 3 hours of treatment.

C- Local strains (IRQ12, Standard, CM and BS) showed the highest tolerance for different bile salts concentrations which were 9.5, 9.03, 8.38 and 8.2 log cfu\ml

respectively at 0.3% after 3 hours, while as the local strain *P.acidilactici* SNN12 showed high tolerance at 0.3% was 8.32 log cfu/ml after 3 hours.

D- The *L.plantarum*, *P.acidilactici* SNN12 showed that there is no antibiosis relation with the yogurt starter *S.thermophilus* and *L.bulgaricus* and there is no antibiosis relation between the yogurt starter and the local strains.

E- The local strain *L.plantarum* in MRS broth – EYE media presented high capability for cholesterol decreasing, the IRQ12 conducted the lowest cholesterol amount in growth media with value 0.52 mg/ml followed by CM, BS, KR, Standard and CT 0.612, 0.654, 0.649, 0733 and 0.815 mg/ml respectively, as the decreasing percentage was 88.69% for IRQ12 strain while for the rest strains 86.69, 85.78, 85.60, 84.06 and 82.26% respectively, while the amount of cholesterol in *P.acidilactici* SNN12 strain growth media was 0.673 mg/ml with a decreasing ratio 85.3%.

F- The results of effectiveness of cold storage period at 4°C on the viability of *L. plantarum* showed high stability for keeping the survival account of KR, BS and CM strains at 8.7, 8.27 and 8.17 log cfu/ml respectively, after 21 storage days followed by IRQ12, standards and CT strains which were 8.5, 8.07 and 7.95 log cfu/ml respectively after 21 days of storage, while the log cfu/ml of local *P.acidilactici* SNN12 strain was 7.57 after 21 days of storage.

4- The local IRQ12 and SNN12 strains were chosen as favourable strains throw the tests results which illustrated previously to make the mutation process.

5- The local *L.plantarum* IRQ12 and *P.acidilactici* SNN12 exposed to mutation using UV light at 254 nm with 50cm distant at different time (20, 25, 30, 35 and 60) sec.

6- The mutation results indicated high changes in the growth of mutation bacteria using MRS agar media.

7- The Effectiveness of different mutation period on probiotic properties for local strains was studied and the results showed as following:

A- *L.plantarum* IRQ12 strain in a different mutation periods (20s, 25s, 30s, 35s and 60s) showed high tolerant for a low pH 1.5 which were 9.46, 9.25, 9.23, 9.20 and 8.36 after 3 hours treatment. The *P.acidilactici* SNN12 mutation strain showed tolerances at pH 1.5 with a different mutation period were 6.14, 6.30, 5.20, 3.61 and 1.77 log cfu/ml.

B- In a different mutation periods (20s, 25s, 30s, 35s and 60s), *L.plantarum* IRQ12 showed variation in log of number of survival bacteria treated with different concentrations of bile salts, the log/ml at 0.3% were 9.04, 9.32, 9.07, 8.65 and 8.79 respectively with 3 hours treated, *P.acidilactici* SNN12 mutation strain tolerance the results were 9.75, 6.20, 5.78, 4.85 and 4.14 respectively at the same conditions.

C- The antibiosis tests between the *L.plantarum* IRQ12 mutation strain and starter yogurt *S.thermophilus* and *L.bulgaricus* in a different mutation periods showed there is no antibiosis between the starter yogurt and the mutation strain except the period 60s which showed antibiosis with both starter whereas the antibiosis test for the mutation starter for *P.acidilactici* SNN12 bacteria showed variation in antibiosis test , the results indicate appearance of antibiosis between *S.thermophilus* and periods of mutation 20s, 35s and 60s, also antibiosis was appear between *L.bulgaricus* and the period of mutation 30s, 60s while antibiosis was appeared between mutations periods 35s, 60s, and *S.thermophilus* bacteria also antibiosis was appeared between 30s and *L.bulgaricus*.

D- Cholesterol decreasing results for *L.plantarum* IRQ12 mutation strain in MRS broth –EYE media and with different mutation periods indicated that the less amount of cholesterol was in the media of mutation strain 25s which was 0.34 mg/ml with decreasing rate 92.3%, followed by the mutation period 60s which was 0.43 mg/ml with decreasing rate 90.6%. While the results for *P.acidilactici* SNN12 mutation strain showed that the less amount of cholesterol was at the period 20s in amount 0.622 mg/ml in decreasing rate was 86.4%.

E- The results of cold storage period effectiveness upon the survival of mutation bacteria of *L.plantarum* IRQ12 with different mutation periods illustrated increasing in a total number. The highest log cfu/ml was 8.87 after 21 days of storage at 4°C at 25s, while the highest log cfu/ml for *P.acidilactici* SNN12 mutation strain was 8.81 at 25s after 21 days cold storage.

8- The results showed the genetic congruence for *L.plantarum* IRQ12 before and after the mutation process using RAPD-PCR technology. The exposure to the mutation process led to the absence of any genetic congruence between all the mutation periods for IRQ12 strain. Every period showed a different genetic mutation and the period 25s was the most effective time for DNA and led to make a mutation for strain 2.52. While the less effective of mutation was by irradiation at the periods 30s, 20s which was 1.359.

9- Sensory evaluation results of the yogurt using *L.plantarum* IRQ12 before mutation showed increasing flavor value which was 33 degree after 21 days of cold storage, sensory evaluation for the mutation strain depending on odor for the period 25s which had 33 degree, while the sensory evaluation for *P.acidilactici* SNN12 strain had 33 degree after 21 days of cold storage.

10- Structure and texture evaluation results showed that *L.plantarum* IRQ12 before and after mutation gave high evaluation for all mutation periods except period 60s, while for the strain *P.acidilactici* SNN12 was 21 degree after 21 days of cold storage, and the mutation period 20s gained the highest evaluation which was 25 degree after 21 days of storage.

11- Acidity evaluation results showed that *L.plantarum* IRQ12 had high evaluation degree after 14 and 21 days of cold storage, while acidity results for *P.acidilactici* SNN12 was raised after 7, 14 and 21 days of storage.

12- The results of log cfu \ml for *L.plantarum* IRQ12 before mutation showed increasing after 7 days of cold storage which had 12 after 21 days of storage, the periods of mutation 20s, 25s, 30s, 35s had evaluation 12 degree after 21 days of storage while the *P.acidilactici* SNN12 strain before mutation had 9 degree after 21 days of storage while the mutation periods 20s, 25s, 30s had 12 degree after 21 days of storage.

13- The general appearance for *L.plantarum* IRQ12 before mutation had evaluation 8 degree after 21 days of cold storage, while the highest degree of general appearance was 18 degree for 20s, 30s, after 21 days of storage, while the general appearance of *P.acidilactici* SNN12 before mutation was 7 and the highest evaluation was for 20s mutation 17 degree after 21 days of storage.



**Isolation, Identification and mutation of
Lactobacillus plantarum and *Pediococcus
acidilactici* and study their effect on some
biochemical parameters in fermented dairy
product**

A thesis Submitted by
SINAN JAWDAT ABDUL-ABBAS

**To the College of Agriculture-University of Baghdad in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctorate of Philosophy in Agricultural Sciences/ Food
Science / Biotechnology**

SUPERVISED BY
Assit.Prof.Dr. Aswan H. Al-Ani
Prof.Dr. Adnan E. Al-Badran

2016 AD