عزل بكتيريا من الجنس *Pediococcus* المثبطة لبكتيريا *Listeria monocytogenes* من بعض الأغذية المحلية

نور البردويل [1] د. عهد أبو يونس [2]

الملخص: أجريت هذه الدراسة في مخابر كلية الزراعة – قسم علوم الأغذية ومخابر ميكروبيولوجيا في كلية العلوم – جامعة دمشق، لعزل وتوصيف بكتيريا من الجنس *Pediococcus* من بعض الأطعمة السورية من مناطق مختلفة في القطر العربي السوري بطريقة معقمة، خلال الفترة الممتدة بين تموز 2015 وتشرين الثاني 2016 ودراسة الأثر التثبيطي للسلالات المعزولة ضد نمو بكتيريا من النوع *Listeria monocytogenes* تم عزل 119 عزلة من عينات مختلفة من الأغذية المحلية، جرى تعريفها استناداً لخصائص بكتريا حمض اللبن. وتبين بالفحص المجهري وجود 20 عزلة بيضوية الشكل أجري عليها مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية لتحديد العزلات التابعة لجنس *Pediococcus* وتم التأكد من ذلك باستخدام تقنية PCR. وصنفت العزلات بتقنية الـ API 50CHL. والتي تبين أن 8

[1]مهندسة، ماجستير قسم التقانة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
[2]أستاذ مساعد قسم علوم الأغذية –كلية الزراعة–جامعة دمشق.

عزلات تنتمي لنوع *P. acidilactici* و 10 عزلات تنتمي للنوع *P.pentosaceus* و عزلتان للنوع *P. damnosus*.

تم التحري عن امتلاك هذه العزلات لأثر تثبيطي ضد بكتيريا *Listeria monocytogenes*. وتبين أن جميع العزلات تمتلك فعالية حيوية مثبطة لنمو *L. monocytogenes*. وأظهرت النتائج امتلاك العزلة 12C والعزلة 16C أكبر قطر منطقة تثبيط 27 مم.

الكلمات المفتاحية: عزل، *Pediococcus*، الأغذية المتخمرة، API، PCR.

Isolation of bacteria *Pediococcus* that has Inhibitory effect on *Listeria monocytogenes* bacteria from some local food

Nour Albardawel [1] Dr. Ahed Abou younes [2]

Abstract: This study was carried out in order to isolate and characterize *Pediococcus* bacteria from some Syrian foods and study the growth inhibitory effect of the isolated strains against of the bacteria Listeria monocytogenes. 119 isolates were isolated from different samples of local fermented food and defined based on the characteristics of lactic acid bacteria.

The microscopic examinations show presence of 20 oval-shaped isolate Conducted by biochemical tests to determine which isolates follow the Pediococcus genus. The isolates were classified using PCR technique and the isolates were classified as API / 50CHL. The result shows that 8 isolates belong to P. acidilactici and 10 isolates belong P.pentosaceus and 2 isolates of P.

damnosus. These isolates were investigated for their inhibitory effect against Listeria monocytogenes. All isolates have a potent inhibitory effect of L. monocytogenes. The results showed that isolates 16 and 12 have the largest inhibition zone of diameter 27mm.

Keyword: Isolate, Pediococcus, Fermentation Food, API, PCR.

1Master dept. of biotechnology, Faculty of Agriculture, Damascus University

2Dept. of food science, Faculty of Agriculture, Damascus University

أولا"_ المقدمة

ينتمي جنس Pediococcus إلى مجموعة بكتيريا حمض اللبن، وهو من البكتيريا البيضوية الشكل، موجبة الغرام، سالبة الكاتلاز (Garvie ,1986)، وتعدّ من البكتيريا اللاهوائية الاختيارية، ولا تمتلك المقدرة على تكوين الغاز (Schlegel و Zaborosch ،1993)، تنمو في درجات الحرارة بين 25ْ م إلى 40ْ م (Holt وزملاؤه،1994)، وتنمو في درجات pH تتراوح ما بين (4.5–7.0) (Leisner وزملاؤه، 1999). ويضم جنس Pediococcus بحسب اللجنة الدولية لتسمية البكتيريا (The international committee on systematic Bacteriology) الأنواع Pediococcus aciditactici، P. Pentosaceus، P. damnosus، P.halophiles، P.urinaee–equi و P.cerevisiae الموجودة بنسب صغيرة في الأجبان ضمن الفلورا الطبيعية للجبن المصنع من حليب غير معامل حرارياً (Beresford، 2003). ويوجد النوع P. acidilactici بشكل شائع في الخضار المتخمرة ومنتجات الألبان المتخمرة واللحوم(Barros وزملاؤه،2001)، وتستخدم عدة سلالات من جنس Pediococcus في صناعة النقانق المخمرة لمساهمتها في تعزيز النكهة واللون (Hastings وزملاؤه،1991)، وأكثر الأنواع استخداماً في تصنيع منتجات اللحوم والخضار P. Acidilactici و P.pentosaceus (Drider وزملاؤه، 2006)، كما تستخدم P. acidilactici المنتجة للمضاد البكتيري المسمى pediocin في عملية التخمير لإنتاج السجق الجاف لتحسين سلامة وحفظ الغذاء (Kostrzynska و Bachand، 2006)، كما تم عزل P. damnosus من النبيذ والخل (Priest، 2003)، وسعى الكثير من الباحثين إلى عزل بكتيريا

التابعة للجنس Pediococcus من الأجبان سواء أكانت منضجة أم ناتجة عن حليب غير معامل حرارياً وكانت أول دراسة منشورة عن أنواع Pediococcus قام بهاDacre (1958) في جبن الشيدر فوجد أن تعدادها يصل ما بين 10^{7}– 10^{8} CFU/غ بعد مرور 6 أشهر في الإنضاج. وتثبط العديد من أنواع جنس Pediococcus نمو العديد من أنواع البكتريا الموجبة الغرام الملوثة والمسببة لفساد الأغذية (Bhunia وزملاؤه، 1988)، كما ثبت فعالية عدة سلالات من P. acidilactici و P. pentosaceous ضد بعض مسببات الأمراض التي تنقلها الأغذية مثل *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* (Klaenhammer، 1988)، حيث تعدّ *L. monocytogenes* أحد مسببات الأمراض المرتبطة بالأغذية وخاصة المنتجات الحيوانية مثل اللحوم والحليب والخضروات وهي عامل مسبب لداء الليستيريات الذي يصيب النساء الحوامل والأطفال حديثي الولادة والذين يملكون نظام مناعي ضعيف(Callewaert وزملاؤه، 2000).

نظرا" لأهمية البكتيريا التابعة للجنس *Pediococcus* في تصنيع الأغذية المتخمرة وقلة الدراسات المحلية عن عزلها ودراسة تضادها، هدف هذا البحث إلى عزل وتحديد خصائص البكتيريا التابعة للجنس *Pediococcus* الموجودة في بعض المنتجات المتخمرة طبيعيا" كمخللات اللفت وبعض منتجات الألبان المتخمرة كالسوركي والأجبان البيضاء، و إلى إجراء دراسة أولية للأثر التثبيطي للسلالات المعزولة تجاه بعض البكتيريا الممرضة أو المسببة لفساد الأغذية.

ثانياً– مواد البحث وطرائقه: جمع العينات: جرى جمع 90 عينة من الأغذية المحلية (15عينة شنكليش،15عينة جبنة بيضاء، 15عينة مخلل خيار، 15عينة مخلل لفت، 15عينة مخلل زيتون،15عينة ذرة صفراء) من مناطق مختلفة (المنطقة الساحلية ومنطقة الغاب والمنطقة الجنوبية) في القطر العربي السوري بطريقة معقمة، وبشكل عشوائي خلال الفترة الممتدة بين تموز 2015 وتشرين الثاني2016، حيث تم استعمال عبوات زجاجية معقمة، محكمة الإغلاق، وسحبت العينات من ورشات تعمل بالطريقة التقليدية، ثم نقلت هذه العينات بطريقة مبردة إلى المخبر (مخبر ميكروبيولوجيا الأغذية– قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة). تمت عملية الكشف عن تواجد البكتيريا التابعة لجنس Pediococcus، بحسب Abriouel وزملاؤه (2008) وفق الخطوات التالية:

1 – مرحلة العزل: تم العزل على وسط MRS Agar (Marthen– Rogosa– Sharpe) (Immerstrand وزملاؤه، 2010) في مخبر الميكروبيولوجيا في قسم علوم الأغذية. حيث تم وضع 1 غرام من عينة المادة الغذائية إلى 9 مل من محلول سترات الصوديوم 2% ، و وضع المزيج في أكياس بلاستيكية معقمة، ومن ثم تم مزجها باستخدام مازج مخبري مدة 2 دقيقة، بعدها تم أخذ 0.1 مل من المزيج الناتج ووضع في منتصف طبق بتري يحوي وسط MRS وتم نشرها، وحضنت الأطباق بشكل مقلوب على الدرجة37 ْس مدة 48 ساعة، وتمت جميع المراحل ضمن جو معقم، وبعد انتهاء فترة التحضين تم اعتبار المستعمرات الدائرية كريمية اللون والنامية على وسط MRS مستعمرات نموذجية (Bajpai وزملاؤه، 2016)، ثم تم عزل كل مستعمرة على حدة في انبوب يحتوي على وسط أغار الـ MRS المائل، زود كل أنبوب برقم، وحضنت

هذه الأنابيب على الدرجة 37ْس مدة 24 ساعة وبعد انتهاء فترة التحضين تم اجراء مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية .

2 – تحديد هوية العزلات بالاعتماد على مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية: (Garvie، 1986) وتمت هذه الاختبارات في مخبر ميكروبيولوجيا الأغذية– قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة، حيث درس شكل الخلايا البكتيرية تحت المجهر، إضافة إلى صبغة الغرام، و اختبار الأوكسيداز ونمط تخمير الحليب. اضافة لإجراء مجموعة من الاختبارات التالية:

أ– انتاج الأسيتوئين (acetoine) من الغلوكوز باستخدام اختبار Voges – Proskauer (Samelis وزملاؤه، 1994): نميت البكتيريا المراد دراسة انتاجها للأسيتوئين في 1 مل من مرق غلوكوز فوسفات (المكوَّن من 5 غرام غلوكوز، 5 غرام فوسفات ثنائي البوتاسيوم، 7 غرام ببتون ويكمل الحجم إلى لتر ماء مقطر) في درجة حرارة 37ْم، وبعد مرور 20 ساعة، أضيف ½ مل من الكاشف الأول (محلول ألفانافتول α– Naphthol) (المحضر بإذابة 6 مل من ألفانافتول في 100 مل كحول اتيلي) و½ مل من الكاشف الثاني (KOH) (المحضر بإذابة 16 مل من KOH في 100 مل ماء مقطر)، يشير ظهور تلون بالأحمر بعد 5 دقائق بشكل عام إلى وجود الأسيتوئين وبالتالي نتيجة إيجابية، في حين بقاء الوسط باللون الأصفر يدّل على نتيجة سلبية أي عدم انتاج الأسيتوئين.

ب– تخمير الغلوكوز واللاكتوز والسكروز على بيئة ثلاثي سكر الحديد (TSI) (الحديثي والسيمري، 1993): حيث زرعت السلالة المراد دراستها ضمن أنبوب يحتوي على بيئة ثلاثي سكر الحديد (بمقدار 5 مل: 2 مل منها بشكل قائم، وترك 3 مل من البيئة بشكل مائل مما يسمح بزراعة البكتيريا بطريقة الوخز في الجزء

القائم والمد على الجزء المائل)، وحضنت مدة 18– 20 ساعة، ليتحول لون البيئة بعد مرور زمن التحضين إلى اللون الأصفر (حيث تكون البيئة باللون الأحمر قبل الزراعة)، عندها تكون البكتيريا مخمرة للسكريات الثلاثة، وفي حال تلون امتداد الأغار باللون الأصفر مع بقاء القاع أحمر فهذا يفسر على أن البكتيريا قادرة على تخمير اللاكتوز ولكنها غير قادرة على تخمير السكروز، أما في حال بقاء لون البيئة أحمر فهذا يعني أنها غير مخمرة لأي من السكريات الثلاثة، وهي بالتالي ليست من بكتيريا حمض اللبن، حيث أن بكتيريا حمض اللبن تكون مخمرة حكماً للاكتوز ومنتجة لحمض اللبن.

ت–دراسة النشاط المحلل للكازئين:(Huggins وSandine، 1984)؛ (Revon وHerbin 1999)، تم باستخدام وسط الكازئين (Casein agar) والتي تم تحضيرها باستخدام حليب خالي الدسم معاد التركيب: 1.3غرام حليب بودرة، 9 مل ماء مقطر، و1.5% أغار المضاف لها 1 مل من التخفيفات العشرية المناسبة في طبق بتري والمحضن على درجة 37ْ م مدة 1– 5 أيام، وبعد انتهاء فترة التحضين، اعتبرت المستعمرات المحللة للكازئين تلك المحاطة بهالة شفافة.

ث–تحديد بكتيريا Pediococcus باستخدام تقنية API 50CHL من شركة BioMérieux – فرنسا، والتي تتضمن مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية التي تسمح بدراسة استقلاب الكربوهيدرات المميزة لأنواع بكتيريا حمض اللبن بشكل عام ومنها بكتيريا Pediococcus (Ayo – Olalusi، 2017). حيث استخدم نظام API 50CHL لتمييز سلالات Pediococcus المعزولة على البيئة MRS، وذلك باستخدام الخطوات التالية:

أ– حُلت المستعمرات البكتيرية في محلول API Suspension Medium بحجم 10 مل للحصول على معلق كثيف للبكتيريا، واستخدم المعلق لمُلئ حفر الصفيحة الـ API 50CHL.

ب– وُضع الصفيحة ضمن الحاوية البلاستيكية الخاصة بالنظام، ثم حُضنت مدة 24 ساعة عند درجة حرارة37ْم.

ت– بعد انتهاء فترة التحضين، قرأت النتيجة بمقارنة الصفيحة مع الجداول المناسبة في دليل Index.

ث– تم إعادة تحضين الصفيحة مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 30ْم، حيث قرأت النتائج مرة أخرى للتأكد منها.

ج– تحديد بكتيريا Pediococcus باستخدام تقنية تفاعل التسلسل البوليمرازي PCR (Ostlie وزملاؤه، 2004)، أجريت تقنية PCR في مخبر الميكروبيولوجيا في كلية العلوم على 20 عزلة أعطت النتائج الأولية على أنها تتبع الجنس Pediococcus التي ذكرها Garvie (1986)، حيث تم استنبات مستعمرة بكتيرية معزولة في وسط الاستنبات وحضنت في الدرجة 37ْ س مدة ليلة كاملة. واستخدم بروتوكول استخلاص الـ DNA من شركة (Vivantis) وبحسب تعليمات الشركة الصانعة.

تقنية الـ PCR:

تم تحضير مزيج حجمه الكلي 25 ميكروليتر يحتوي على:

الجدول(1) المواد المستخدمة في تفاعل الـ PCR وكمياتها.

المادة	الكمية
معلق الـ DNA (500نانو غرام)	2 ميكروليتر
Master Mix من شركة (Vivantis) والحاوي على موقي التفاعل، وكلوريد المغنزيوم (25نانو مول) و 20 mM dNTPs و أنزيم الـ DNA polymerase	12.5ميكروليتر
المرئسات التي تناسب جنس البكتيريا المدروسة	1 ميكروليتر
ماء مقطر	لاكمال الحجم

ملاحظة: تم قياس تركيز الـ DNA باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer (Secomam prim -France) في مخبر الميكروبيولوجيا في كلية العلوم (حسب تركيز الدنا من المعادلة الاتية 1 (OD260 unit = 50 µg/ml) (1ميكروغرام 1000 = نانوجرام)

الجدول (2) المرئسات المستخدمة في الدراسة (صمم للبحث)

رمز المرئس	التتابع	طول الشدفة
3F	5-CTGAATGAGATTTTAACACG-3	bp1200
3R	5-GGTTTTAAGAGATTAGCT-3	

تمت عملية المضاعفة في الـ PCR (Cleaver) في مخبر الميكروبيوجيا في كلية العلوم باستخدام حجم نهائي 25 µl من مزيج التفاعل الحاوية 500 نانوغرام من الـ DNA حسب المراحل التالية: التمسخ الأولي(Initial denaturation) لمدة 1 دقيقة على درجة حرارة 95 تلاها 30 دورة (PCR cycles) تضمنت: مرحلة الارتباط 50ْس لمدة 1 دقيقة، مرحلة الاستطالة 72ْس لمدة 1 دقيقة، كما وتضمن البرنامج الحضن في الدرجة 72ْس لمدة 5 دقائق، بعد الانتهاء تبقى الأنابيب في الدرجة 72ْس لمدة 10 دقائق كمرحلة استطالة نهائية. وفي النهاية الحفظ على الدرجة 4ْس بعد الدورة الأخيرة.

تم تحضير 1غ من الآغاروز وتم حله في 100مل من الـ TEA، حيث أذيب الآغاروز في الميكروويف حتى تمام الذوبان، ليضاف (وبحذر شديد) إلى الهلامة السائلة 3 ميكروليتر من الإيثيديوم بروميد لإظهار عصائب الترحيل. بعدها تُم وضَع أمشاط الرحلان ومن ثم تم صَب الهلامة، مع الانتباه إلى عدم تشكل فقاعات وإلى الحفاظ على استقامة الهلامة بشكل تام، ثم تُركت لتبرد. نقلت الهلامة بعد تحريرها إلى وعاء الرحلان، وأضيف موقي الرحلان بشكل يغمر الآبار المتشكلة. وحضرت نواتج الـ PCR المُراد ترحيلها بحيث يكون حجمها النهائي 10ميكروليتر. ثم وضع الواسم الجزيئي pb100 Marker أساس آوزتي والعينات في الآبار. ليتم تغطية جهاز الرحلان، وجهزت الإلكترودات بحيث تم تمرير التيار الكهربائي من

القطب السالب إلى القطب الموجب. تم تشغيل الجهاز بشدة 100 أمبير لمدة 45دقيقة تقريباً.

•تم فحص الهلامة بواسطة جهاز إظهار العصائب (gel documentation).

3 – دراسة الأثر التثبيطي: (أجريت الدراسة في مخبر ميكروبيولوجيا الأغذية – قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة) تمت تنمية العزلات على مرق مغذي Nutrient broth والتحضين 48 ساعة بالدرجة 37° س، بعدها تم إجراء عملية التثقيل (10000rpm مدة 20 دقيقة في الدرجة 4 °م)، والحصول على الرشاحة والتي قسمت الرشاحة إلى قسمين الأول بقي على حاله أما القسم الثاني عدلت فيه درجة الـpH إلى الدرجة(7) بإضافة (NaOH (1N لاستبعاد التأثير التثبيطي الحمضي (Savadogo وزملاؤه، 2004)، بعدها تم زراعة بكتيريا Listeria monocytogenes المنمطة في قسم علوم الأغذية على PALCAM agar (Gasanov وزملاؤه، 2005)، بعمر 24 ساعة بمرق سائل، حيث تم إدخال قطنة معقمة إلى داخل الأنبوب الحاوي على نموات البكتيريا الممرضة وتدار فيه عدة مرات ثم رفعت عن مستوى السائل ويضغط بها على حافة الأنبوب للتخلص من الكمية الزائدة ثم مسح بها على السطح الجاف للبيئة الصلبة المناسبة لنمو بكتيريا Listeria monocytogenes ويدار الطبق 60 درجة للتأكد من توزع سوي، وجرى العمل باستخدام مكررين. بعدها تم عمل حفر ضمن الأغار بواسطة حافرة الأغار الخاصة المعقمة لإنتاج حفر

بقطر 6 مم، ووضع فيها ما مقداره 70µl من رشاحة العزلات البكتيرية سواء أكانت معدلة الحموضة أم لا. وتم تحضين الأطباق في الدرجة 37 ْس مدة 24 ساعة، وتم قياس قطر منطقة المنع بالميلي متر وهي مساحة دائرية تحيط بالحفر لا تنمو فيها البكتيريا الممرضة.

ثالثاً– النتائج والمناقشة:

تم عزل 119 عزلة نامية على بيئة MRS (Man, Rogosa and Sharpe) (الخاصة بتنمية بكتيريا حمض اللبن) في الدرجة 37 ْس، ويظهر الجدول (3) توزع العزلات على المواد الغذائية.

الجدول (3) توزع العزلات على المواد الغذائية.

المادة الغذائية	عدد العينات	عدد العزلات
شنكليش	15	21
جبنة بيضاء	15	23
مخلل زيتون	15	22
مخلل خيار	15	24
مخلل لفت	15	13
ذرة صفراء	15	16
المجموع	90	119

يوضح الجدول (1) عدد العينات من المواد الغذائية التي شملتها هذه الدراسة والتي سحبت من الأسواق السورية وعدد العزلات التي تم الحصول عليها على بيئة MRS والتي كانت جميع مستعمراتها ذات أشكال نموذجية (الدائرية كريمية اللون).

الجدول(4) الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للبكتيريا المعزولة

الخصائص		عدد العزلات
عدد العزلات الكلي		119
تخمير الحليب		39
تخمير	متجانس	22
	غير متجانس	17
صبغة الغرام	موجبة	30
	سالبة	9
شكل الخلايا تحت المجهر	بيضوي	20
الأوكسيداز	سالبة	26
	موجبة	13
تحليل الكازئين	سالبة	28
	موجبة	11
انتاج الأستيوين من الفلوكوز vp	موجب	30
	سالب	9
TSIتخميرها السكاكر	الغلوكوز	35
	السكروز	37
	اللاكتوز	30

وعند إجراء مجموعة الاختبارات البيوكيميائية الأولية لتحديد تبعيتها إلى الجنس *Pediococcus*، فكانت 39 عزلة منها قادرة على تخمير الحليب البقري والمبستر وكان منها 22 عزلة متجانسة التخمر و17عزلة غير متجانسة التخمر،30عزلة موجبة الغرام،20عزلة كانت خلاياها بيضوية الشكل تحت المجهر، 26 عزلة سالبة الأوكسيداز، 28 عزلة غير قادرة على تحليل الكازئين ،و3عزلة قادرة على انتاج الأسيتوين من الغلوكوز، 35عزلة قادرة على تخمير الغلوكوز، 37عزلة قادرة على تخمير السكروز و30 عزلة قادرة على تخمير اللاكتوز.

نلاحظ وجود 20 سلالة فقط ظهرت بيضوية الشكل تحت المجهر، ثنائية التوضع، سالبة الكاتلاز، (وهي الصفات الأساسية لجنس Pediococcus التي حددها (Bajpai وزملاؤه، 2016) وبالتالي أمكن حصر 20 سلالة فقط تتبع للجنس Pediococcus على بيئة MRS (17.8%) (حيث سيتم الاعتماد لاحقا" على نظام الـ API 50CHL لتحديد النوع) وهذا يتوافق مع ما وجده Bakheit (2015) في دراسة أجريت في السودان على مجموعة من الأغذية المخمرة (مخمر، مش، جبن، مخللات).

نتائج نظام API 50 CHL: أظهر اختبار API 50 CHL على السلالات البيضوية الشكل لتحديد أنواع السلالات المعزولة وجود 8 عزلات منها تنتمي لنوع *P. acidilactici* و 10 عزلات تنتمي للنوع *P.pentosaceus* وعزلتان من نوع *P. damnosus* .

الجدول (5) نتائج اختبار API 50 CHL

عدد العزلات	8 (%40)	2(%10)	10(50%)
البكتيريا	P.acidilactici	P. damnosus	P pentosaceus
نسبة التطابق	98%	98%	97%
ctrl	-	-	-
Gly	-	-	-
ery	-	-	-
dara	-	-	-
lara	+	-	+
rib	+	+	+
dxyl	+	-	±
lxyl	-	-	-
ado	-	-	-
mdx	-	-	-
Gal	-	-	-
Glu	+	+	+
Amy	-	-	+
mel	-	-	-
sac	-	-	-
tre	+	+	+
Inu	-	-	-
mlz	-	-	-
raf	+	-	+
amd	-	-	-
glyg	-	-	-
xlt	-	-	-
gen	+	-	+
tur	-	-	-
Lyx	-	-	-
tag	+	-	±
dfuc	-	-	-
Lfuc	-	-	-
darl	-	-	-
larl	-	-	-
gnt	-	-	-
2kg	-	-	-
5kg	-	-	-

مع العلم أن :+موجبة التخمر، :- سالبة التخمر، :± تخمر غير مكتمل.

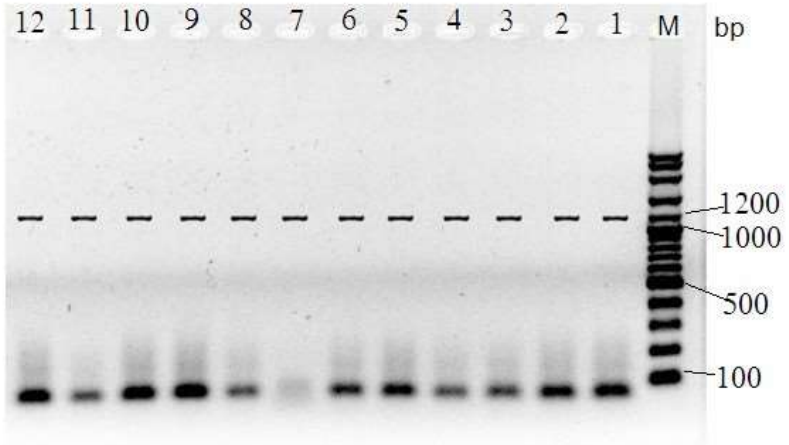
الجدول (6) توزع السلالات على المواد الغذائية

المادة الغذائية	رمز العزلة	السلالات	عدد العزلات	النسبة المئوية
جبنة بيضاء	5G, 15G	*P.damnosus*	2	%10
جبنة بيضاء	1G, 2G, 4G, 13G	*P. acidilactici*	4	%40
شنكليش	6S, 7S, 17S		3	
مخلل خيار	16C		1	
جبنة بيضاء	3G, 14G	*P.pentosaceus*	2	%50
شنكليش	8S, 9S, 10S, 18S, 19S		5	
مخلل خيار	11C, 12C, 20C		3	

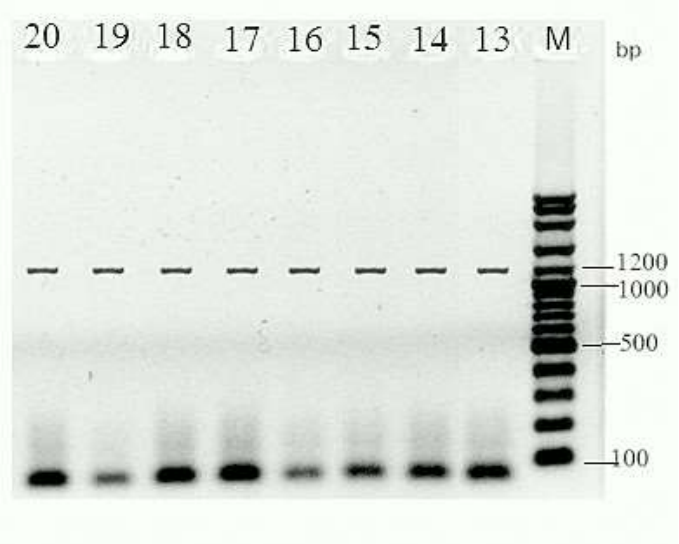
وتوافق هذا مع دراسة قام بها Abdelmaged وزملاؤه في السودان (2016) حيث تم عزل بكتريا حمض اللبن من خمس أنواع من الأغذية المتخمرة (عجين الذرة ،الميش ، اللبن الرائب ،الجبن ،مخلل الخيار ،سجق اللحم) فكانت نسبة جنس Pediococcus (16%) 3 عزلات من الجبن (75%) وعزلة واحدة من اللبن الرائب(25%). كما درس Suhartatik وزملاؤه في أندونيسيا (2014) مجموعة من السلالات المعزولة من الخضار واللحوم المتخمرة والأرز التقليدي المتخمر وقاموا بتصنيفها بواسطة API 50CHL فكانت 20 سلالة منها تنتمي الى *Pediococcus acidilactici* و *P. pontosaceus* و *P. lolii* وسلالة واحدة صنفت على أنها تنتمي الى مجموعة –*Lactobacillus pentosus plantarum*.

نتائج تفاعل PCR:

أظهرت نتائج الـ PCR و فحص الهلامة بواسطة جهاز إظهار العصائب (geldocumentation) أن الحزم الناتجة بطول bp1200 مما يؤكد أن العزلات تنتمي للجنس Pediococcus.



الشكل (1): M:الواسم الجزيئيMarkerpb100، المسارات 1 – 12 نتائج ترحيل تفاعل PCR لعزلات Pediococcus من المنتجات المتخمرة



الشكل (2): M:الواسم الجزيئيMarkerpb100، المسارات 13 – 20 نتائج ترحيل تفاعل PCR لعزلات *Pediococcus* من المنتجات المتخمرة

نتائج دراسة المقدرة التثبيطية للسلالات:

بينت نتائج قياس قطر منطقة المنع أن قطر هالة المنع تتراوح بين 13الى 27 مم. ويوضح الجدول(7) نتائج اختبار التضاد والفروق المعنوية بين السلالات.

الجدول رقم (7) نتائج اختبار التضاد لعزلات *Pediococcus* ضد بكتيريا *L. monocytogenes*

رقم العزلة في تقنية PCR	رمز العزلة	التضاد مع *L. monocytogenes*	قطر الهالة مم
1	1G	+	17^{C}
2	2G	+	17^{C}
3	3G	+	19^{B}
4	4G	+	17^{C}

19^{B}	+	5G	**5**
15^{D}	+	6S	**6**
19^{B}	+	7S	**7**
13^{E}	+	8S	**8**
19^{B}	+	9S	**9**
19^{B}	+	10S	**10**
13^{E}	+	11C	**11**
27^{A}	+	12C	**12**
19^{B}	+	13G	**13**
17^{C}	+	14G	**14**
19^{B}	+	15G	**15**
27^{A}	+	16C	**16**
15^{D}	+	17S	**17**
19^{B}	+	18S	**18**
13^{E}	+	19S	**19**
13^{E}	+	20C	**20**

*** القيم في العمود الواحد التي تحمل الأحرف نفسها لا تختلف معنوياً عند مستوى معنوية (0.05).**

هذا يتوافق مع ما وجده (Venkateshwari وزملاؤه، 2010) حيث وصل قطر منطقة التثبيط لسلالات *Pediococcus* ضد *L. monocytogenes* الى 12 مم بعد ساعتين من النمو فقط ووصل الى 16مم بعد 6 ساعات من النمو. وفي دراسة أخرى قام بها (Altuntas وزملاؤه، 2012) وجدوا أن سلالات *L. monocytogenes* تم تثبيطها بواسطة البكتريوسينات المنتجة من 13 *Pediococcus acidilactici* وتراوح قطر منطقة التثبيط من 16 الى 24.5 ملم.

ويظهر التحليل الإحصائي LSD لإختبار ANOVA وجود فروق معنوية بين متوسط قطر منطقة المنع للسلالات المعزولة، حيث سجل أعلى قطر هالة وبوجود بفروق معنوية عن باقي العزلات لكل من العزلات 12C و16C المأخوذة من الجبنة والتابعة للسلالة (*P.pentosaceus*).

رابعا"_ الاستنتاجات:

1- امكن عزل جنس بكتيريا *Pediococcus* من الأغذية المتخمرة المحلية مثل الجبن والشنكليش والمخلل.

2- وجد ان أنواع *P.acidilactici* و *P.pentosaceus* و*P.damnosus* الثلاثة هي المتواجدة في الأغذية المحلية.

3- امتلكت 20 عزلة من بكتيريا *Pediococcus* قدرة تثبيطية ضد بكتيريا *L. monocytogenes*.

4- يمكن استخدام بعض عزلات بكتيريا *Pediococcus* كمواد حافظة طبيعية في الأغذية.

خامسا"_ المراجع:

الحديثي، هديل – السيمري، إحسان.1993 علم البكتيريا العملي .كلية العلوم جامعة البصرة 7-1109.

Abdelmaged, H. A., Elyas, Y. Y., Yousif, N. M., & Ahmed, I. A. M. ,2016. Technological Properties of Lactic Acid Bacteria (LAB) Isolated From Various Sudanese Fermented Foods.

Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. ,2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish

farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. International journal of food microbiology, 127(3), 200-208.

Altuntas,E.G., Kocan,D., Cosansu,S., Ayhan,K., Juneja,V.K., Materon,L. ,2012. Antibiotic and Bacteriocin Sensitivity of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Different Foods. Food and Nutrition Sciences, 3, 363-368.

Ayo – Olalusi C. I. 2017. Isolation and Identification of Probiotics Pediococcus pentosaceus and Pediococcus pentosaceus from the Gut of Tilapia Guineensis for Use in Aquaculture Production. International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology (IJRSMB). 3 (1) :15 – 20

Bajpai, V.K., Han, J.H.,Rather, I. R., Majumder,R., Nam G.N., ChanSeo, P., Lim, J., Paek, K.L. and Park, Y.H. . 2016. Characterization of lactic acid bacterium Pediococcus pentosaceus from fresh water fish Zacco koreanus and its antibacterial mode of action. PeerJ Preprints. 61 – 80.

Bakheit, H. A. ,2015. Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Different Fermented Foods (Doctoral dissertation, UOFK).

Barros R.R., Carvalho G.S., Peralta J.M., Facklam R.R., Teixeira L.M. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of Pediococcus strains isolated from human clinical sources. J. Clin Microbiol. April;39(4): 1241-1246.

Beresford, T.P. ,2003. Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality. Dairy Process.: Improv. Qual. 448-169.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C., & Ray, B. ,1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by

Pediococcus acidilactici. Journal of Applied Bacteriology, 65(4), 261-268.

Callewaert, R., Hugas, M., & De Vuyst, L. ,2000. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 57(1), 33-42.

Dacre, J. C. ,1958. 730. A note on the pediococci in New Zealand Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, 25(03), 414-417.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. ,2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiology and molecular biology reviews, 70(2), 564-582.

Garvie, E. I. 1986. Genus Pediococcus Claussen 1903, 68^. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2, 1075-1079.

Gasanov, U., Hughes, D., and Hansbro P.M., 2005. Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review. FEMS Microbiology Reviews, 29 (5): 851–875.

Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., & Stiles, M. E. ,1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from Leuconostoc gelidum. Journal of Bacteriology, 173(23), 7491-7500.

Holt ,J.G., Krieg, N.R., Sneath P.H.A. and Staley, J.T. 1994. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th. Williams and Wilkins – Baltimore.418_543.

Huggins, A.R. & Sandine, W.E. 1984 Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. Journal of Dairy Science, 67 , 1674–1679.

Immerstrand T., Paul, C.J., Rosenquist, A., Deraz, S., Bo, O., Rtensson, K., Ljungh, S., Blu, H., Rickard, O.C. and Karlsson, E.N. 2010. Characterization of the Properties of Pediococcus parvulus forProbioticor Protective Culture Use. Journal of Food Protection, 73 (5): 960–966.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie, 70, 337-349.

Kostrzynska, M., & Bachand, A. 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. Canadian journal of microbiology, 52(11), 1017-1026.

Leisner, J. J., Pot, B., Christensen, H., Rusul, G., Olsen, J. E., Wee, B. W., ... & Ghazali, H. M. ,1999. Identification of lactic acid bacteria from chili bo, a Malaysian food ingredient. Applied and environmental microbiology, 65(2), 599-605.

Ostlie. H.M., Eliassem L., Florvaag A., and Skeie S. 2004. Phenotypic and PCR – based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. Int. J. food microbigy. 94: 287-299.

Priest, F. G. ,2003. Gram-positive brewery bacteria. In Brewing Microbiology (pp. 181-217). Springer US.

Revol AM. and Herbin S., 1999. Taxonomie des principaux gener de bacteries Lactiques. 3eme annẻe IA, Lait et produits Laitiers. 78-92.

Samelis, J., Maurogenakis, F., & Metaxopoulos, J. 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. International Journal of Food Microbiology, 23(2), 179-196.

Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., & Traore, A. S. ,2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition, 3(3): 174-179.

Schlegel, H. G., & Zaborosch, C. 1993. General microbiology. Cambridge university press.

Suhartatik, N., Cahyanto, M. N., Rahardjo, S., Miyashita, M. and Rahayu, E. S,2014. Isolation and identification of lactic acid bacteria producing β glucosidase from Indonesian fermented foods. International Food Research Journal, 21(3): 973-978.

Venkateshwari, S., Halami, P., & Vijayendra, S. ,2010. Characterisation of the heat-stable bacteriocin-producing and vancomycin-sensitive Pediococcus pentosaceus CFR B19 isolated from beans. Beneficial microbes, 1(2), 159-164.