الجمهورية العربية السورية
هيئة الطاقة الذريـة

هـ ط ذ س- ب ج / ت ن ب ع 416
تشرين الثاني 2008

تقرير نهائي عن بحث علمي
قسم البيولوجيا الجزئية و التقانة الحيوية

تنميط بعض سلالات بكتيريا حمض اللبن في سورية باستخدام تقانتي الـ PCR والـ FT-IR

الدكتور أيمن المريري
الأستاذ الدكتور نجم الدين شرابي

هـ ط ذ س- ب ج / ت ن ب ع 416

المشاركون فى الدراسة

ساهم في إنجاز هذا العمل كل من: د. عهد أبو يونس، والسيدة رند عكل، والسيد فواز الشولي، والسيد محمد سعيد، والسيد محمد صبرة، والسيد أنس اللحام، من خلال المشاركة في الأعمال المخبرية.

الفهرس

المصطلحات 4
مستخلص 5
Summary 6
1. المقدمة 7
1.1 تصنيف بكتيريا حمض اللبن 7
الطرائق التقليدية لتصنيف بكتيريا حمض اللبن 8
الطرائق الحديثة لتصنيف بكتيريا حمض اللبن 10
أجناس وأنواع بكتيريا حمض اللبن 11
4.1 بيئة بكتيريا حمض اللبن 12
4.2 تصنيع اللبن 13
2. الطرائق 16
1.2 الاعتيان 16
2.2 العزل البكتيري 16
3.2 الفحص المجهري 16
4.2 الاختبارات الكيميائية الحيوية 17
5.2 الاختبارات البيولوجية الجزيئية 17
1.5.2. عزل الـ DNA 17
2.5.2. تقنية الـ PCR 18
6.2 تقنية الـ FT-IR 19
3. النتائج 21
1.3 نتائج تحديد هوية بكتيريا حمض اللبن بتقنية الـ PCR 21
2.3 نتائج مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR) 24
4. المناقشة 36
كلمة شكر 39
6. المراجع 40

المصطلحات

أسيتوين	Acetoin
بكتيريا	Bacteria
كروي	Cocci
البكتيريا الزرقاء	*Cyanobacteria*
تحويل فوريه للأشعة تحت الحمراء	FT-IR
بكتيريا حمض اللبن	Lactic Acid Bacteria
حليب	Milk
عصوي	Rods
بادىء	Starter
سلالة	Strain
جنس	Genus
نوع	Species

مستخلص

تعتبر بكتيريا حمض اللبن من أكثر المتعضيات المجهرية فائدةً للإنسان، حيث يمكن الاستفادة منها في تحسين نكهة بعض الأطعمة، وفي تثبيط بعض العوامل الممرضة وربما قتلها في بعض هذه المنتجات. عُزلت سلالات من بكتيريا حمض اللبن من بعض منتجات الحليب التقليدية في سورية، والتي جُمعت عيناتها من مناطق مختلفة من سورية. دُرس الطابع الظاهري لهذه السلالات واسْتُخدمت تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR لتنميطها، حيث اختيرت مورثة محافظة للنوع لدى بكتيريا حمض اللبن. وُجِدَت الأنواع *E. faecium, E. faecalis* و *S. thermophilus* في الجبنة البلدية وفي اللبن الرائب. وقد أوضحت نتائجنا أنه يمكننا استخدام مطيافية تحويل فوريه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR) لتحديد أنواع بكتيريا حمض اللبن.

كلمات مفتاح:
بكتيريا حمض اللبن، تقنية الـ API، تفاعل التضخيم المورثي، الـ FT-IR.

Typing some of lactic acid bacteria in Syria using PCR and FT-IR techniques

Summary

Lactic Acid Bacteria (LAB) are considered to be the most useful microorganisms. They are beneficial in flavoring foods, inhibiting pathogenic as well as spoilage bacteria in food products. The isolates of LAB were obtained from traditional Syrain dairy products (white cheese and curdled yogurt) obtained from different regions in Syria. The isolates were subjected to phenotypic characterization analyses. The PCR technique of bacterial DNA was evaluated as an advanced tool for the identification of LAB. It was found that strains: *E. faecium*, *E. faeccalis* and *S. thermophilus* dominate in white cheese and in yogurt**.** Our resultes demonstred that we could identify LAB using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) patterns.

Key words:

Lactic acid bacteria, API technique, PCR, FT-IR.

1. المقدمة

تمتلك بكتيريا حمض اللبن Lactic Acid Bacteria (LAB) أهميةً كبيرة باعتبارها مفيدة وواسعة الانتشار في البيئة. وقد بُدِئ باستخدام هذه البكتيريا لإنتاج الحموضة أثناء تصنيع منتجات الألبان المتخمرة قبل التعرف عليها، حيث كان الحليب يُترك في درجة حرارة الغرفة عدة ساعات يتم خلالها تكاثر بكتيريا حمض اللبن الموجودة فيه عادة، ثم يستخدم في تصنيع الألبان والأجبان المتخمرة. استمر العمل على هذا النحو حتى أثبت العالمان Baily وHammer عام 1919 أن البادئ الواجب استخدامه في إنتاج مشتقات لبنية ذات طعم ونكهة مرغوبين يجب أن يحتوي على نوعين من البكتيريا: الأول ينتج حمض اللبن، في حين يكون الثاني قادراً على إنتاج الأحماض الطيارة التي تمنح الطعم المميز والنكهة (Ayad *et al*., 2003). بالإضافة إلى دور البادئات في إعطاء القوام المناسب لمنتجات الألبان المتخمرة فإنها ترفع القيمة الغذائية والصحية لهذه المنتجات (Aslim and Beyatli, 2004).

وحيث أن الغذاء المنتج بإضافة عصيات بكتيريا حمض اللبن يشكل جزءاً من الغذاء اليومي للمستهلك (مثل: الجبنة، الزبدة)، وهو يمتلك صفات غذائية إيجابية، فإن استخدام بكتيريا حمض اللبن لن يثير قلقاً عميقاً. ورغم ذلك فقد يستغرب المستهلك من الحقيقة التي تؤكد استخدام البكتيريا في المنتجات الغذائية وخاصة عند معرفة العدد الهائل من البكتيريا الحية الذي يتناوله مع كل لقمة!

تم التعرف على بكتيريا حمض اللبن في بداية القرن التاسع عشر واعتبرت بأنها "الكائنات الحية التي تؤدي إلى حموضة الحليب"، أما البكتيريا العصوية المسؤولة عن تخمر اللبن البلغاري فقد جرى اكتشافها في بداية القرن العشرين. وقد وجد العالم Henneberg عام 1904 أن البكتيريا التي تتسبب في حموضة اللبن تشبه أنواع بكتيريا حمض اللبن الموجودة في التربة. أما Grigoroff فقد عزل من الحليب، عام 1905، كائنات دقيقة تختلف بأشكالها المجهرية فمنها العصوي rods ومنها الكروي cocci (Gobbetti, 2001).

1.1 تصنيف بكتيريا حمض اللبن:

قام جوزيف ليستر في عام 1873 بأول الدراسات عن الـ *Lactococci* حيث حاول إثبات نظرية باستور ذات الصلة بالتغيرات التخمرية التي تسببها الأحياء الدقيقة. تمكن ليستر في

تجاربه التي استخدمت الحليب المغلي كوسط مغذٍ، من الحصول على أول زراعة بكتيرية نقية؛ ووصفها قائلاً:

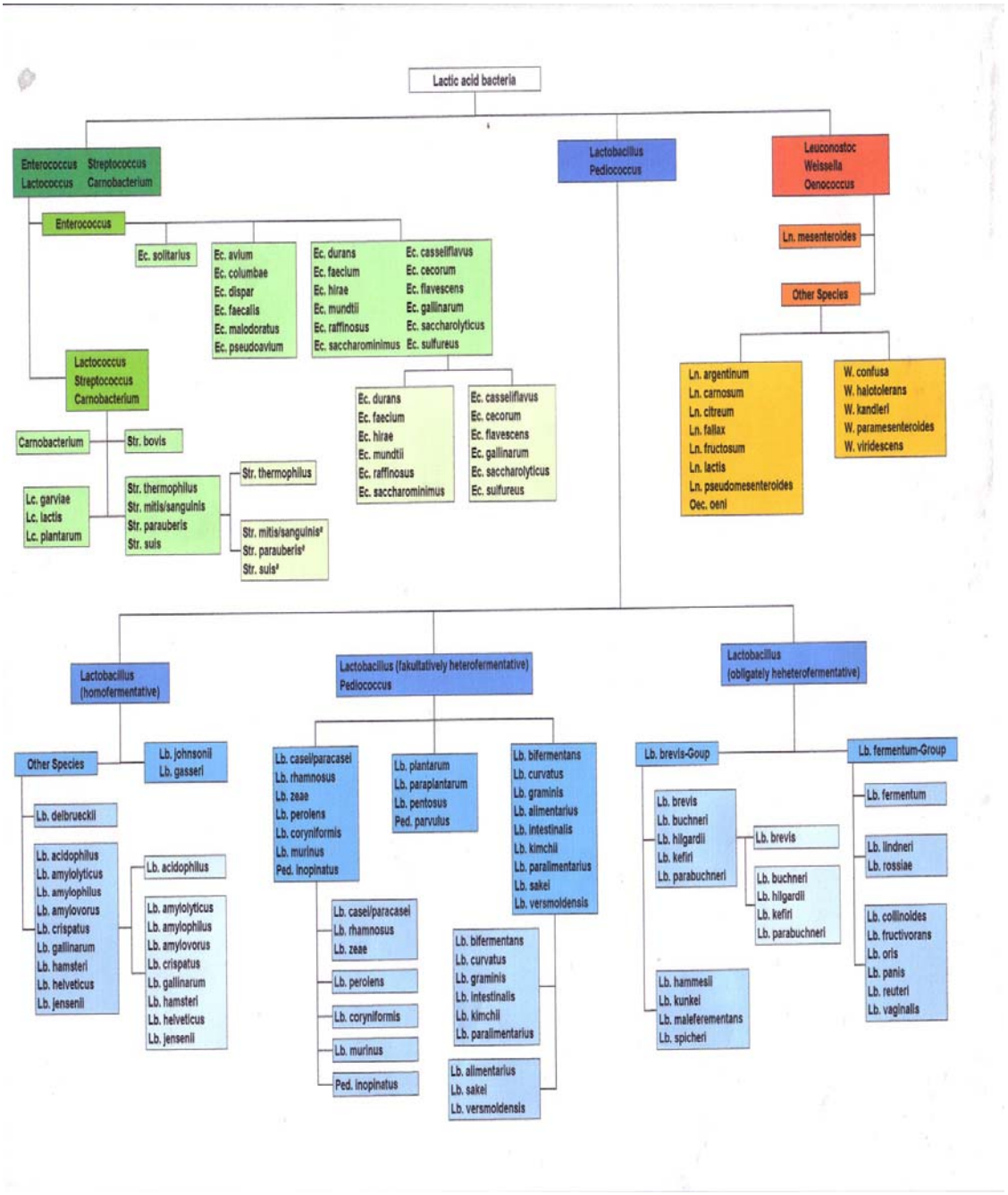
"علينا الاعتراف بأننا نتعامل هنا مع جنس بكتيري واحد فقط يُظْهِر خواصه الشكلية والفيزيولوجية، وأقترح تسميته *Bacterium lactis*. أقوم بهذا بتحفظ معتقداً أنه حتى هذا التاريخ، لم يتم اكتشاف بكتيريا تتمتع بنفس هذه المواصفات. كما أعتقد أنها ليست البكتيريا الوحيدة التي تقوم بعملية التخمر اللبني". وتجدر الإشارة إلى أن هذه البكتيريا سُمِّيَت لاحقاً *"Streptococcus lactis"*.

الطرائق التقليدية لتصنيف بكتيريا حمض اللبن:

قام Orla-Jensen (1919) بوضع أسس تصنيف بكتيريا حمض اللبن (التي تُسْتَخْدم حتى وقتنا الحالي، رغم إدخال بعض التعديلات)، معتمداً على الأساس الشكلي (كروي، عصوي) ونمط التجمع (مفرد، ثنائي، سلسلي)، ونمط تخمير سكر الغلوكوز (متجانس، غير متجانس)، إلى جانب دراسة نمو هذه البكتيريا في درجات حرارة مختلفة لاسيما 10°م و45°م (أبو يونس وزملاؤها، 2007). وبناءً على ذلك، قَسَّم Orla-Jensen بكتيريا حمض اللبن إلى أربعة أجناس هي:

Lactobacillus، *Leuconostoc*، *Pediococcus*، *Streptococcus*.

وعند إجراء إعادة تحقيق شاملة، اقترح Schleifer وزملاؤه (1985) فَصْل الـ *Enterococci* عن الـ *Streptococci* الحالة للدم، ومن ثم تمت تسميتها باسم جنس جديد هو *"Lactococcus"* (Naser *et al.*, 2005). ويوضح الشكل 1 شجرة التطور phylogenetic لبكتيريا حمض اللبن. من ناحية أخرى، ينبغي مراعاة وجود اختلافات في الحدود الفاصلة بين الأجناس (Williams and Coliins, 1990). وقد حدد Orla-Jensen الأنواع *Thermobacterium bulgaricum* المسماة حالياً *Lactobacillus bulgaricus* (Tharmaraj and Shah, 2003).



الشكل 1. مخطط توضيحي لتصنيف بكتيريا حمض اللبن

اعتماداً على الدراسة الهامة التي قام بها Patrick Tailliez عن بكتيريا حمض اللبن المتضمنة للـ *Lactococci*، فقد اقترح أن تكون بكتيريا حمض اللبن قد ظهرت قبل البكتيريا الزرقاء *Cyanobacteria* التي تقوم بعملية التركيب الضوئي. وبما أنها وُجِدت في رسوبيات عمرها 2.75 بليون سنة، فيُحْتَمَل أن تكون بكتيريا حمض اللبن قد ظهرت قبل 3 بليون سنة من احتواء الغلاف الجوي على الكمية الكافية من الأكسجين، وهذا يمكن أن يفسِّر تكيفها الضعيف مع البيئة الهوائية. بالمقابل، أشار Tailliez إلى أن الـ *Lactococci* في طريقها للتحول إلى التنفس بشكل واضح (2001).

الطرائق الحديثة لتصنيف بكتيريا حمض اللبن:

تعتمد الطرائق الحديثة لتصنيف بكتيريا حمض اللبن على محتوى هذه الأخيرة من المادة الوراثية والأحماض النووية DNA (Ehrmann and Vogel, 2005; Settanni *et al*., 2005). وتتمتع هذه الطرائق بدقة أكبر في تحديد الأنواع وتحت الأنواع التي تمتلك تنوعاً واختلافاً كبيريْن في المادة الوراثية يساعدان في تمييزها عن بعضها (Bae *et al*., 2005). وتقوم الطريقة الحديثة على ترحيل المادة الوراثية للبكتيريا على هلامة موضوعة ضمن حقل كهربائي (gel-electrophoresis) بعد القيام بعملية تضخيم مورثي لمورثة محافظة ضمن الجنس. ويمكن تطبيق هذه الطريقة على أنواع متعددة من بكتيريا حمض اللبن شريطة استخدام مُرَنِّسات مختلفة ومناسبة (Picozzi *et al*., 2006).

اسْتُخْدِمَت هذه الطريقة من أجل تصنيف *Lb. casei subsp. Casei* المعزولة من أنواع مختلفة من الأجبان الأوروبية، وكذلك لتصنيف *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus plantarum* المعزولتيْن من الحليب الخام المُسْتَخْدَم لإنتاج جبن الكاممبير الفرنسي (Mangin *et al*., 1999). تمكن الباحثون اعتماداً على طريقة الـ PCR من التمييز بين الأنواع *Lb. acidophilus* و*L. gasseri* و*L. johndonii* وهي جميعها أنواع عصوية الشكل ومفيدة، كانت قد صُنِّفَت قديماً على أنها منتمية إلى مجموعة acidophilus وذلك اعتماداً على التحليل البروتيني (Randazzo *et al*., 2005). وباستخدام الـ PCR، تم جمع النوعين *Lb. casei* و *Lb. paracasei subsp. paracasei* في نوع واحد سُمِي *Lb. casei* نظراً لتطابق محتويهما من الـ DNA (مادتهما الوراثية)، علماً أن التصنيف السابق الذي كان يعتمد على تحليل الجدار البروتيني للبكتيريا هو الذي فصلهما إلى نوعيْن (Corsetti *et al*., 2003).

ساهم التصنيف الجزيئي للـ *Lactococci* في اكتشاف وتمييز أنواع جديدة بالإضافة إلى *L. lactis* وهي: *L. graviae* و*L. raffinolactis* و*L. plantarum* و*L. piscium*. حيث شُخِصَت *Lactococcus graviae* على أنها العامل المسبب لالتهاب الضرع عند الأبقار.

وفي حالات نادرة، عُزِلَ النوع *L. lactis* من البشر عند إصابة الجهاز البولي والتهاب الجروح ومن مرضى الالتهاب الشغافي.

أجناس وأنواع بكتيريا حمض اللبن:

تدل عبارة بكتيريا حمض اللبن تصنيفياً، على مجموعة من البكتيريا التي تتمتع بالخصائص المشتركة التالية (Davidson *et al*., 1996):

موجبة الغرام، غير متبوغة، سالبة الكاتالاز، خالية من السيتوكرومات، إلا أنها ذات تحمل هوائي، وذات تحمل للحموضة، ويُعَد حمض اللبن الناتجَ الرئيسي النهائي لتخمر السكر الذي تقوم به هذه البكتيريا.

تتضمن بكتيريا حمض اللبن الناتجة عن تخمرات الأغذية الأجناس التالية:

Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Weissella, Vogococcus (Konstantinidis and Tiedje, 2005). وقد جمع دليل بيرجي Bergey's Manual، في طبعته السابعة لعام 1957، عائلتيْ بكتيريا حمض اللبن *Streptococceae* (ذات الشكل البيضوي أو الكروي) و*Lactobacilleae* (ذات الشكل العصوي) في عائلة واحدة سماها *Lactobacillaceae*. إلا أنه ما لبث أن عاد وفصلهما إلى عائلتيْن هما *Streptococcaceae* و*Lactobacillaceae* وذلك في طبعته الثامنة عام 1974 (أبو يونس وزملاؤها، 2007). وقد تبين في منتصف الثمانينات أن الـ *S. thermophilus* هو النوع الوحيد من الجنس *Streptococcus* الذي له علاقة بتخمر الغذاء، حيث ينتمي هذا الجنس إلى الـ LAB لاشتراكه معها ببعض الملامح النمطية؛ مثل الاستقلاب التخمري وإنتاج حمض اللبن، رغم أن هذه البكتيريا لا ترتبط مع الـ LAB من الناحية التطورية (التأريخ العرقي) phylogenetically وتستخدم طريقة وحيدة لاستقلاب السكر. كما تم ضم البكتيريا المسببة للتقيحات إلى هذا الجنس ذاته. وكذلك أظهر دليل بيرجي في طبعته التاسعة عام 1986 أجناساً أخرى غير الـ *Streptococcus* هي: *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*؛ ويضم

كل جنس تحت أجناس عديدة. إلا أن الطبعات الأحدث لدليل بيرجي قسمت هذه المجموعات إلى أجناس مستقلة فظهر جنس الـ *Enterococcus* وجنس الـ *Lactococcus* وجنس الـ *Vagococcus* (أبو يونس وزملاؤها، 2007). وبسبب بعض الأخطاء والمشاكل في التصنيف، أعيد تصنيف بعض أنواع الجنس *Enterococcus* فوُجِد مثلاً أن النوع *E. solitarius* كان أشد قرابةً إلى الجنس *Tetragenococcus* (Eaton and Gasson, 2001; Giraffa, 2002).

4.1 بيئة بكتيريا حمض اللبن:

تختلف منتجات الألبان المصنعة بشكل تقليدي عن تلك المصنعة تجارياً بالطعم والنكهة والقوام بسبب الفلورا الطبيعية لبكتيريا حمض اللبن المتواجدة فيها، وهو ما تطلق عليه الدراسات الحديثة اسم بكتيريا حمض اللبن بدون بادئ (Kieronczyk *et al*., 2003). وهي تتمتع بأهمية كبيرة نظراً لتواجدها في منتجات الألبان المُصنَّعة غالباً من حليب غير معامل حرارياً أو أنه معامل بشكل غير كافٍ (Beresford *et al*., 2001).

وفي جبن الشيدر، تعد بكتيريا حمض اللبن هي المسيطرة على الفلورا البكتيرية المتواجدة فيه بعد ثلاثة أشهر من تصنيعه. وتشمل هذه البكتيريا أنواعاً تعود إلى الأجناس التالية: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc, Pediococcus* (Ayad *et al*., 2001). تنتج هذه البكتيريا أحماضاً مختلفة مثل حمض اللبن وحمض الخل، كما تنتج مواد النكهة كالدي أسيتيل diacetyl والأسيت ألدهيد بحيث تمنح هذه الأخيرة النكهة المميزة لمنتجات الألبان التقليدية والتي توافق ذوق المستهلك. تقوم هذه البكتيريا أيضاً بإنتاج الأسيتوين (acetoin) من تخمر الغلوكوز معطيةً بذلك نكهةً مميزة لبعض المنتجات المتخمرة (علماً أن الأسيتوين هو مركب من مركبات النكهة وهو الذي يولد الدي أسيتيل).

إلى جانب الخصائص التكنولوجية التي تتميز بها الفلورا الطبيعية بالمقارنة مع البادئات التجارية، فإنها تتمتع بمقاومة أكبر للمضادات البكتيرية (Citak *et al*., 2004). هذا بالإضافة إلى إمكانية تحملها للمعاملات التصنيعية للأجبان (سواء الطازجة أو المُنَضَّجة)، فهي قادرة على النمو في نسبة رطوبة 39% وفي نسبة ملوحة متراوحة مابين 4 و 6% من كلوريد الصوديوم NaCl، ودرجة الـ pH تتراوح ما بين 4.9 و5.3 (أبو يونس وزملاؤها، 2007). كما أظهرت الدراسات أن الفلورا المحبة للحرارة المتوسطة (وهي تنتمي إلى الفلورا الطبيعية للحليب) من بكتيريا حمض اللبن تكون سائدةً في جبن الشيدر وذلك باعتبار أن معظم الأجبان

البلدية التقليدية تُصنَّع بدءاً من حليب غير معامل حرارياً، إضافة إلى هذه الفلورا المذكورة آنفاً قد نجد بكتيريا تنتمي إلى الجنس *Pediococcus* (Fitzimons *et al*., 1999).

4.2 تصنيع اللبن:

اللبن هو منتج حليبي متخمر متماسك القوام نشأت صناعته في بلغاريا ثم انتشر إنتاجه واستهلاكه إلى مختلف أنحاء العالم، حيث يختلف اللبن المنتج من منطقة إلى أخرى في العالم من حيث اللزوجة والنكهة والطعم. كما أنه من الممكن استخدام حليب الحيوانات المختلفة لإنتاج اللبن رغم أن حليب الأبقار هو الأكثر استخداماً. ويمكن إنتاج اللبن المتخمر من الحليب كامل الدسم أو الحليب منزوع الدسم جزئيا" أو الحليب الخالي من الدسم.

هناك عدة شروط يفترض توفرها في الحليب المستخدم لإنتاج اللبن المتخمر أهمها أن يكون المحتوى البكتيري للحليب متدنياً وأن يخلو الحليب من بقايا المضادات الحيوية الناجمة عن معالجة بعض الحيوانات المنتجة للحليب (حيث يجب عدم خلط حليب الحيوانات المعالجة بالمضادات الحيوية مع حليب الأبقار السليمة)، كما يفترض أن تكون الأبقار المنتجة للحليب غير مصابة بمرض التهاب الضرع، وأن يكون الحليب خالياً من اللبأ (السرسوب) الذي يُفْرَز بعد ولادة أنثى الحيوان مباشرة، ويكون مُعَداً لتغذية الوليد (Danielsen and Wind, 2003; Cintas *et al*., 1995). زد على ذلك، أنه يتوجب خلو الحليب المُعَد لإنتاج اللبن المتخمر من الطعوم غير المرغوبة مثل طعم التزنخ وكذلك خلوه من أي أثر للمنظفات الكيميائية المستخدمة في غسل أواني الحليب.

يمكن إضافة مكونات أخرى خلال تصنيع اللبن المتخمر بالإضافة للحليب والبادئ البكتيري (الروبة) مثل إضافة الحليب منزوع الدسم المركز أو الحليب خالي الدسم المجفف أو مصل الحليب أو سكر اللاكتوز، وغالباً ما تضاف تلك المكونات لزيادة محتوى المواد الصلبة في اللبن. ومن الممكن أيضاً إضافة بعض المُحَلِيات مثل سكر الغلوكوز أو السكروز أو المُحَلِيات الصناعية عالية الحلاوة كالأسبارتام، وقد تضاف بعض مثبتات القوام مثل الجيلاتين والكاربوكسي ميتيل سليلوز والكاراجينان وغيرها. أو تضاف أيضا قطع من الفاكهة أوالنكهات وغيرها.

يتكون البادئ البكتيري المستخدم في إنتاج اللبن عادةً، من خليط من بكتيريا حمض اللبن العصوية وتلك الكروية، كما يجوز استخدام إحداهما فقط لإنتاج اللبن. إلا أن معدل إنتاج حمض اللبن يكون أكبر عند استخدام الروبة المحتوية على نوعي البكتيريا معاً. إذ أنه من

المعروف أن البكتيريا الكروية تنمو بشكل أسرع وتنتج الحمض وثاني أكسيد الكربون اللذيْن يحفزان بدورهما نمو ونشاط البكتيريا العصوية، وتنتج هذه الأخيرة بعض الأحماض الأمينية والببتيدات التي تُستَخْدَم لاحقاً من قبل البكتيريا الكروية (Tserovska *et al.*, 2002).

ينتج عن نشاط البكتيريا المبينة أعلاه قوام ونكهة اللبن المستحبة. إذ يحتوي اللبن الرائب على مركبات ناتجة عن عملية التخمر تمنحه النكهة المميزة، مثل حمض اللبن والأسيت ألديهيد وحمض الأسيتيك والدي أستيل.

يتم تصنيع اللبن المتخمر (الرائب) بتصفية الحليب ثم تعديل محتواه من الدهون إذا لزم الأمر. بعد ذلك يُبَسْتَر الحليب بتسخينه لمدة 30 دقيقة إلى الدرجة 85°م أو لمدة 10 دقائق إلى الدرجة 95°م. حيث يلاحظ أن المعاملة الحرارية للحليب المعد لإنتاج اللبن المتخمر تكون باستخدام حرارة أدنى ولمدة أقصر منها في حالة إنتاج الحليب المبستر وذلك للوصول إلى بيئة مناسبة لعمل البادئ البكتيري، ولإعادة تشكيل وترسيب بروتينات مصل الحليب مما يساهم في إعطاء اللزوجة والقوام المناسبين للبن المتخثر. كما تترافق عملية البسترة مع مجانسة الحليب، حيث تهدف هذه العملية إلى منع تشكل طبقة كريمة (قشدة) على سطح اللبن الرائب (المتخمر) خلال عملية الحضن وخلال حفظ اللبن داخل الثلاجة، وكذلك لتحسين ثباتية وقوام اللبن. ثم يتم تبريد الحليب إلى درجة الحرارة المثلى لعمل البادئ البكتيري وهي 43°م وعندها يُضاف البادئ البكتيري الذي يتم تقييم كلٍ من نشاطه وكفاءته بما يحتويه من نسبٍ متساوية من بكتيريا حمض اللبن الكروية وتلك العصوية. بعد إضافة البادئ البكتيري يتم حضن الحليب لمدة تتراوح مابين 3 و5 ساعات بدون تحريك لتتم عملية التخمر. بعدها يُبَرَّد اللبن المتخمر إلى درجة الحرارة 5°م، وهنا قد تضاف الفواكه والنكهات إذا كان اللبن مُنَكَّهاً أو مُطَعَّماً (Revol and Herbin, 1999).

ويمكننا أن نضيف هنا أهمية دخول اللبن في صناعة المثلجات للحصول على آيس كريم خالٍ من العوامل الممرضة مثل الـ *Enterococcus*. إضافةً إلى ذلك، فإن استخدام اللبن في هذه الصناعة يقلل من احتمالات حدوث التسمم الذي تسببه التوكسينات أو البكتيريا الممرضة الموجودة في المنتج وذلك بفضل تفوق بكتيريا حمض اللبن على تلك العوامل الإمراضية.

ونظراً لأهمية بكتيريا حمض اللبن كبادئات تُستَخْدَم في إنتاج الألبان المتخمرة، وندرة الدراسات التصنيفية لهذه البكتيريا ولاسيما تلك التي تدرس المنتجات المحلية من ناحية، وعلى اعتبار أن معظم المنتجات اللبنية المحلية تُنْتَج بطريقة تقليدية باستعمال حليب غير معامل

حرارياً من ناحية أخرى، فقد هدفت دراستنا إلى عزل وتنميط بكتيريا حمض اللبن وذلك باستخدام طرائق التصنيف الحديثة (تطبيق تقنية الـ PCR ومطيافية تحويل فوريه للأشعة تحت الحمراء FT-IR) تمهيداً لاستخدام الأنواع الأفضل كبادئات في تصنيع بعض منتجات الحليب المحلية بطريقة صحية ومتوافقة مع ذوق المستهلك المحلي.

2. الطرائق

1.2 الاعتيان

تم إحضار 96 عينة جبنة بلدية ولبن رائب (من الأبقار والأغنام) مُصنَّعة بالطريقة التقليدية من مناطق مختلفة من القطر العربي السوري، أثناء مدة الدراسة.

تم عزل بكتيريا حمض اللبن من العينات، حيث حُضِّرَت سلسلة من التمديدات اعتباراً من المحلول الأم (ذي التركيز 1 غ/مل) لمنتجات الألبان المتخمرة المراد عزل بكتيريا حمض اللبن منها ومن ثم زُرِعَت هذه التمديدات على الوسط الملائم.

2.2 العزل البكتيري

حُضِّرَت بيئتيْ الاستنبات MRS وM17 لعزل العصيات (*Lactobacillus*) والمكورات (*Streptococcus*) اللبنية على التوالي. ثم حُضِنَت مجموعة من أطباق البتري في الدرجة 37ْ م لمدة 48 ساعة في ظروف لاهوائية لعزل العصيات اللبنية. بينما حُضِنَت المجموعة الأخرى في درجتيْ الحرارة 42ْ م و31ْ م لمدة 48 ساعة، وذلك من أجل التمييز بين الأنواع المحبة للحرارة المرتفعة والمحبة للحرارة المتوسطة من المكورات اللبنية.

3.2 الفحص المجهري:

جرى الفحص المجهري باتباع الخطوات التالية:

- وضع المُعَلَّق البكتيري على صفيحة زجاجية.
- تجفيف المُعَلَّق وتثبيته بواسطة اللهب.
- التلوين بالفيوشيسين زيل- نيلسن مدة 10 دقائق.
- غسل الصفيحة بالماء الجاري.
- تلوين الصفيحة بواسطة حمض السيترات 3% لمدة دقيقة.
- الغسيل بالماء الجاري مرة ثانية.
- إضافة محلول أخضر مالشيت Malachite 1% لمدة 20 ثانية.
- تجفيف الصفيحة، وإجراء الفحص المجهري.

4.2 الاختبارات الكيميائية الحيوية

أُجْرِيَت اختبارات الأوكسيداز والكاتالاز وتخمير السكاكر (السكروز والغلوكوز واللاكتوز) بواسطة بيئة حاوية على ثلاثي سكر الحديد. كما تم اختيار عدد من العزلات لاختبارها بتقنية الـ API 20 أو الـ API 50 (BioMérieux):

- حل المستعمرات البكتيرية بمحلول ملحي 0.85%.
- ملء حفر قاعدة صفيحة الـ API بالماء.
- وضع المحلول الملحي الحاوي على البكتيريا في صفيحة الـ API. ثم التحضين لمدة 24-48 ساعة في درجة الحرارة المناسبة.
- بعد انتهاء فترة الحضن، وُضِعَت الكواشف المناسبة وقُرِئَت النتيجة بمقارنة الصفيحة مع الجداول المناسبة.

5.2 الاختبارات البيولوجية الجزيئية

1.5.2. عزل الـ DNA:

- استُنْبِتَت مستعمرة بكتيرية معزولة في وسط الاستنبات، وحُضِنَت في الدرجة 37ْ م لمدة ليلة كاملة.
- أُخِذ 1.5 مل من المستنبت البكتيري ونُقِّل بسرعة 9000 دورة/د، لمدة 20 ثانية.
- وُضِع 500 ميكرولتر من موقي الـ TE فوق الراسب البكتيري، ثم أُضيف 50 ميكروليترمن الليزوزيم (10 ملغ/مل).
- جرى رج المزيج جيداً ثم تُرك لمدة ساعتيْن في حمام مائي درجة حرارته 37ْ م.
- تُرك المزيج ليلةً كاملةً في الدرجة 50ْ م.
- أُضيف 25 ميكروليتر من البروتيناز K (20 ملغ/مل)، وحُضِنَ المزيج في الدرجة 37ْ م لمدة ساعة.
- أُضيف 25 ميكروليتر SDS (25%) مع الحضن لمدة ساعة.
- أُضيف 200 ميكروليتر من كلوريد الصوديوم (5 مول).

- أضيف 750 ميكروليتر من مزيج فينول: كلوروفورم: إيزوأميل (25 :24: 1) مع المزج الجيد.
- ثُفّل المزيج بسرعة 13000 دورة/د، لمدة 6 دقائق.
- أضيف 450 ميكروليتر من الإيزوبربانول إلى الطافي وثُفّل المزيج بسرعة 13000 دورة/د لمدة 45 دقيقة.
- أضيف 1 مل من الإيتانول 70% إلى الراسب.
- ثُفّل المزيج بسرعة 13000 دورة/د لمدة 5 دقائق في الدرجة 4ْ م، ثم جُفّف الراسب باستخدام جهاز تركيز الحموض النووية (إيبندورف ألمانيا).
- أضيف 20 ميكروليتر من موقي الـ TE وحُفِظ المزيج في المجمدة (-20ْ م) لحين الاستخدام.

2.5.2. تقنية الـ PCR:

جرى تحضير مزيج حجمه الكلي 25 ميكروليتر يحتوي على: 2 ميكروليتر من معلق الـ DNA (500 نانو غرام)، بالإضافة إلى 1.5 ميكروليتر من موقي التفاعل، و 3 ميكروليتر من كلوريد المنغنزيوم (25 نانو مول)، و0.5 ميكروليتر من dNTPs (20 mM)، و1 ميكروليتر من المُرَنِّسات التي تناسب أجناس البكتيريا المدروسة (الجدول 1) و1 ميكروليتر من أنزيم الـ DNA polymerase (هيئة الطاقة الذرية السورية، قسم التقانة)، ثم أُكمِل الحجم باستخدام الماء المقطر. تم اختيار مورثة LacZ للتمييز بين النوعين:

Streptococcus thermophilus و*Enterococcus feacalis*.

الجدول (1). المرئسات المستخدمة في الدراسة

التسلسل	النوع البكتيري	المورثة	تتالي المرئسة
1	*Lactobacillus spp.*	16s RNA	5'- ATACGTTCCCGGGCCTTGTA -3'
			5'- GAACCATCGACCTCACGCTT -3'
2	*Lactococcus lactis*	16s RNA	5'- AACGGGTGAGTAACGCGTGG -3'
			5'- CCACGCTTTCGAGCCTCAGT -3'
3	*Lactococcus bulgaricus*	16s RNA	5'- AGACAAGCAAGTCTCGCGGA -3'
			5'- CGCCACTGGTGTTCTTCCA -3'
4	*Streptococcus thermophilus*	LacZ	5'- GTGTTGCATGGTGTCG -3'
			5'- CCACCACCAGAGTTACCCAT -3'
5	*Enterococcus feacalis*	LacZ	5'-ATTAATCGGTTGCCTGGACG-3'
			5'-GCCAATTTCCAGGAACAGTG-3'

اتُبعَت المراحل التالية في جهاز الـ PCR: مرحلة التمسخ 95 ْم لمدة 1 دقيقة، مرحلة الارتباط 50 ْم لمدة 1 دقيقة، مرحلة الاستطالة 72 ْم لمدة 1 دقيقة، كما تضمن البرنامج الحضن في الدرجة 72ْ م لمدة 5 دقائق، بعد الانتهاء وُضِعَت الأنابيب في الدرجة 72 ْم لمدة 10 دقائق كمرحلة استطالة نهائية. وفي النهاية تم التبريد في الدرجة 4 ْم بعد الدورة الأخيرة، وقد تكوّن البرنامج من 35 دورة.

3.5.2. الرحلان الكهربائي:

- جرى وزن 1 غ من الآغاروز وتم حله في 100 مل من الـ TAE، بحيث تكون درجة الـ pH = 7.
- جرت إذابة الآغاروز في الميكروويف حتى تمام الذوبان.
- أُضيف إلى الهلامة السائلة 3 ميكروليتر من الإيتيديوم بروميد لإظهار عصائب الترحيل وذلك بحذر شديد.
- وُضِعَت أمشاط الرحلان ومن ثم صُبَّت الهلامة، مع مراعاة عدم تشكل فقاعات والحفاظ على استقامة الهلامة بشكل تام، ثم تُركَت لتجف.
- نُقِلَت الهلامة بعد تحريرها إلى وعاء الرحلان، وأُضيف موقي الرحلان بشكل يغمر الآبار المتشكلة.
- حُضِّرَت عينات الـ DNA المُراد ترحيلها بحيث كان حجمها النهائي 15 ميكروليتر.
- وُضِع الواسم الجزيئي Marker (100 أساس آوزتي) والعينات في الآبار.
- غُطِّي جهاز الرحلان، وجُهِّزَت الإلكترودات بحيث تم تمرير التيار الكهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب. شُغِّل الجهاز بشدة 60 أمبير لمدة ساعتيْن تقريباً.
- فُحِصَت الهلامة بواسطة جهاز إظهار العصائب (gel documentation).

6.2 تقنية الـ FT-IR

جرى استنبات البكتيريا على أوساط صلبة ثم حُضِنَت في الدرجة 30ْ م. تم اختيار مستعمرات مفردة نقية للتلقيح (من الضروري أن يكون المستنبت صافياً).

تم تحضير العينة حسب الخطوات الآتية:

1. أُخِذَت مادة العينة مباشرة من مركز الاستنبات باستعمال غانة من البلاتينيوم قطرها 1 ملم. تعتمد كمية العينة الضرورية على الكائن و"اتساق" نمو مستعمراته، لكن

الشكل النموذجي يتمثل بأن تملأ العينة حلقةً كاملةً لغانةٍ واحدةٍ. يجب أن تكون مادة العينة مأخوذة حصراً من مناطق النمو المندمج في المستعمرات.

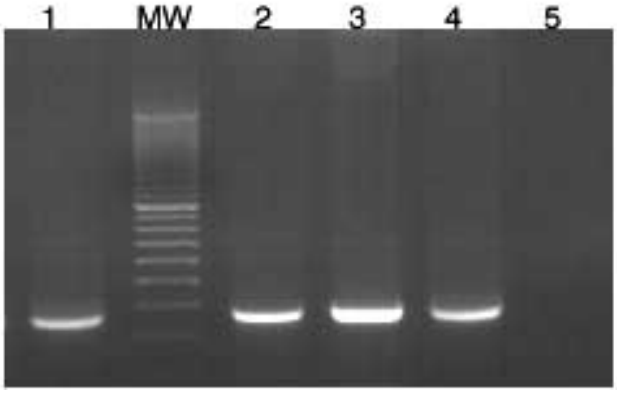
2. أُخِذَ 25 ميكروليتر من المُعَلَّق البكتيري إلى بئر (صفيحة 96).
3. جُفِّفَت العينات في الفرن الجاف في درجة الحرارة 40° م لمدة 30 دقيقة.
4. جرى تحليل العينات بفضل البرنامج الحاسوبي OPUS وتمت مقارنتها مع السلالات المرجعية التي يحويها البرنامج (مكتبة بكتيريا حمض اللبن).

3. النتائج

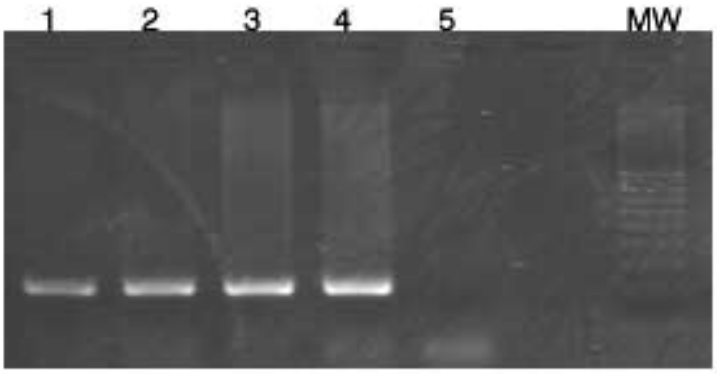
1.3 نتائج تحديد هوية بكتيريا حمض اللبن بتقنية الـ PCR:

دُرِس تنميط عدد من السلالات البكتيرية من الجبنة البلدية واللبن الرائب - حُدِّدَت بتقنية الـ API 20 Strep على أنها تابعة للنوع *Streptococcus thermophilus* (أبو يونس وزملاؤها)– باستخدام تقنية الـ PCR. وقد جرى عزل هذه السلالات من منتجات الألبان المتخمرة السورية (لبن رائب – جبنة بلدية) إثر نموها على بيئة الـ M17 بعد الحضن في درجة الحرارة 42°م لمدة 48 ساعة، حيث تم الاعتماد على تضخيم مورثة LacZ وهي المورثة المحافظة في سلالات بكتيريا *Streptococcus thermophilus* والتي تحصر شدفة طولها حوالي 242 أساس آزوتي في هذه السلالات.

ويظهر الشكل 2 (1.2 و 2.2)، في المسار (1) نواتج التفاعل مع سلالة *S. thermophilus* السلالة المُحضرة من شركة هانسن- الدانمارك والمستخدمة كشاهد إيجابي لهذا النوع، ويُلاحظ من المسارات 2 وحتى 4 توافق بالحجم الجزيئي للمورثة LacZ للنوع مع سلالة هانسن، مما يشير إلى أن هذه السلالات الثلاث هي للنوع *S. thermophilus*. وهذا ما يتوافق مع نتائج API 20 Strep والتي تؤكد أن السلالات المعزولة من اللبن الرائب والجبنة البلدية هي من النوع *S. thermophilus*.



الشكل (1.2). نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تقنية الـ PCR باستخدام مرئسات للمورثة LacZ:
1:*Streptcoccus thermophilus*(هانسن)الشاهد الايجابي، 2-4: *Streptococcus thermophilus* المعزولة من الجبنة البلدية من بعض المناطق السورية، 5: *Enterococcus fecalis*،الشاهد السلبي. Mw: الواسم الجزيئي.



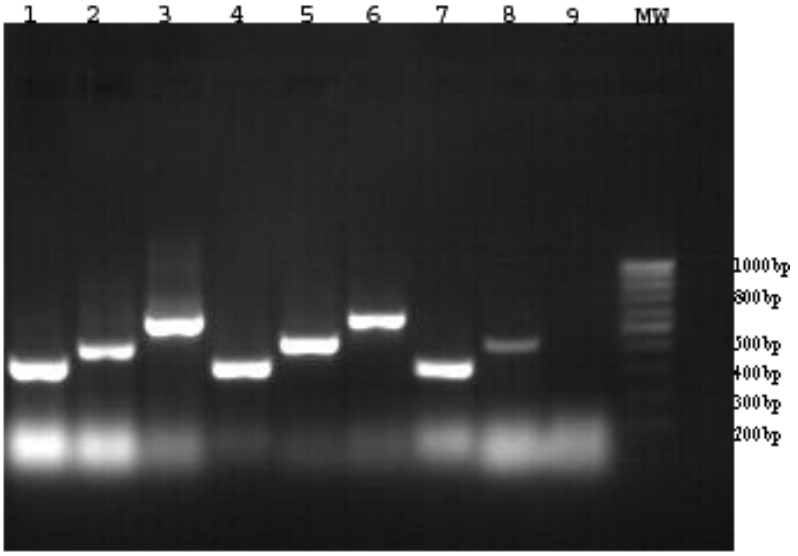
الشكل (2.2). نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تقنية الـ PCR باستخدام مرئسات للمورثة LacZ:
1: *Streptcoccus thermophilus*(هانسن)الشاهد الايجابي، 2-4: *Streptococcus thermophilus* المعزولة من اللبن من بعض المناطق السورية، 5: *Enterococcus fecalis*،الشاهد السلبي. Mw: الواسم الجزيئي.

إضافةً إلى ذلك، تم عزل عدد من السلالات البكتيرية (من اللبن الرائب ومن الجبنة البلدية)، حيث ظهرت تحت المجهر بأنها عصوية وموجبة الغرام وذلك بعد زراعتها على بيئة الـ ROGOSA وحضنها لمدة 48 ساعة في الدرجة 37° م. كانت جميع السلالات سالبة الكاتالاز، وذلك ضمن ظروف لا هوائية. حُدِّدَت هذه السلالات باستخدام تقنية الـ API على أنها تابعة للجنس *Lactobacillus*.

ومن أجل التنميط باستخدام تقنية الـ PCR، اسْتُخْدِمَ عدد من المُرَنِّسات للكشف عن المورثة 16sRNA وهي مورثة محافظة ضمن جنس *Lactobacillus* (الجدول 1)، حيث أن هذه المُرَنِّسات تحصر شدفة طولها 425 أساس آزوتي. كما اسْتُخْدِمَت هذه المُرَنِّسات للكشف عن المورثة 23SRNA وهي أيضاً مورثة محافظة ضمن الجنس؛ ومن أجل التمييز بين الأنواع تم استخدام المنطقة التي تلي المورثة 16SRNA لكونها تختلف من نوع إلى آخر (الجدول 1)، وخاصة لتحديد النوع *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* والتي حصرت شدفة بطول 565 أساس آزوتي.

ويوضح الشكل 3 أنه قد جرى عزل جنس *Lactobacillus* (العُصابتان 5 و 6 وطولهما 425 أساس آزوتي و565 أساس آزوتي على التوالي) ونوع *Lb. bulgaricus* (العصابة 4 بحجم 340 أساس آزوتي) من بعض منتجات الألبان السورية. وتتشابه هذه العصائب بالحجم الجزيئي مع العصائب 1 و2 و3 للجنس والنوع *Lactobacillus bulgaricus*

من شركة هانسن – الدانمارك المُسْتَخْدَمة كشاهد إيجابي. كما يلاحظ من الشكل نفسه أنه قد تم عزل الجنس *Lactobacillus* (العصابتان 7 و 8 وهما بحجم 425 bp و565 bp على التوالي) من منتجات الألبان السورية ولكنها لم تكن تابعة للنوع *Lb. bulgaricus* وذلك بغياب العصابة من المسار 9.

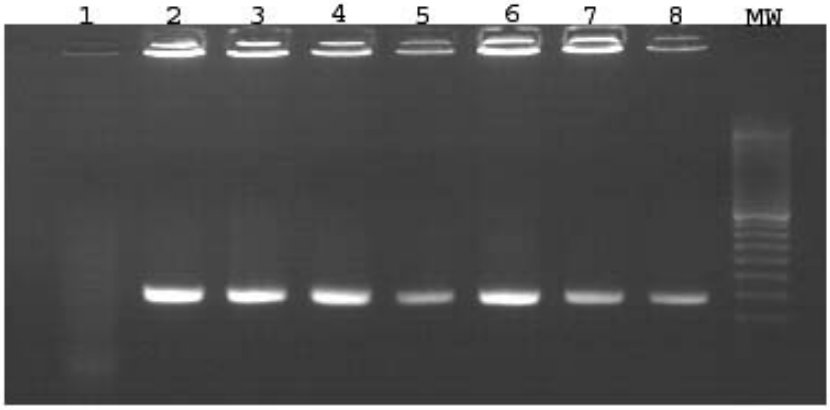


الشكل (3). نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تقنية الـ PCR باستخدام مرئسات مورثة 16sRNA والشدفة التي تليها: 1 و 2 و 3: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* من شركة هانسن – الدانمارك: شاهد إيجابي، 4 و 5 و 6: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* المعزولة من منتجات الألبان السورية، 7 و 8 و 9 : *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* المعزولة من منتجات الألبان السورية. MW: الواسم الجزيئي.

جرى اللجوء إلى تقنية الـ PCR لإجراء تنميط جزيئي للمكورات موجبة الغرام، سالبة الكاتالاز، النامية على بيئة الـ M17 بعد الحضن في الدرجة 25 ْم لمدة 48 ساعة، للمنطقة ما بين المورثتين 16SRNA و23SRNA بهدف تمييز السلالات التابعة للنوع *Lactococcus lactis* - لأنها مناطق محافظة في هذا النوع- هذه المُرَنِّسات تحصر شدفة بطول 680 أساس آزوتي.

يظهر الشكل 4 عصائب ذات حجم جزيئي 680 أساس آزوتي تقريباً، لنواتج تفاعل الـ PCR للسلالات المعزولة من المنتجات الألبان السورية وهذا الحجم يتوافق مع الشدفة المحصورة بين 16SRNA و 23SRNA. مما يشير إلى أن هذه السلالات هي من نوع *Lactococcus lactis*، وهذا يتوافق مع ما ذكر من نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية. لم يكن

لهذه التجربة شاهد إيجابي لصعوبة الحصول على سلالات نقية مفردة من أحد المخابر العالمية المُنَمِّطة لهذا النوع. وكانت نتيجة الرحلان الكهربائي سلبيةً عند استخدام هذه المُرَنِّسات مع النوع *S. thermophilus* (المسار 1).



الشكل (4). نتائج الرحلان الكهربائي لتقنية الـ PCR لسبع سلالات من نوع *Lactococcus lactis* معزولة من ألبان بعض المناطق السورية. MW: الواسم الجزيئي.

2.3 نتائج مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR):

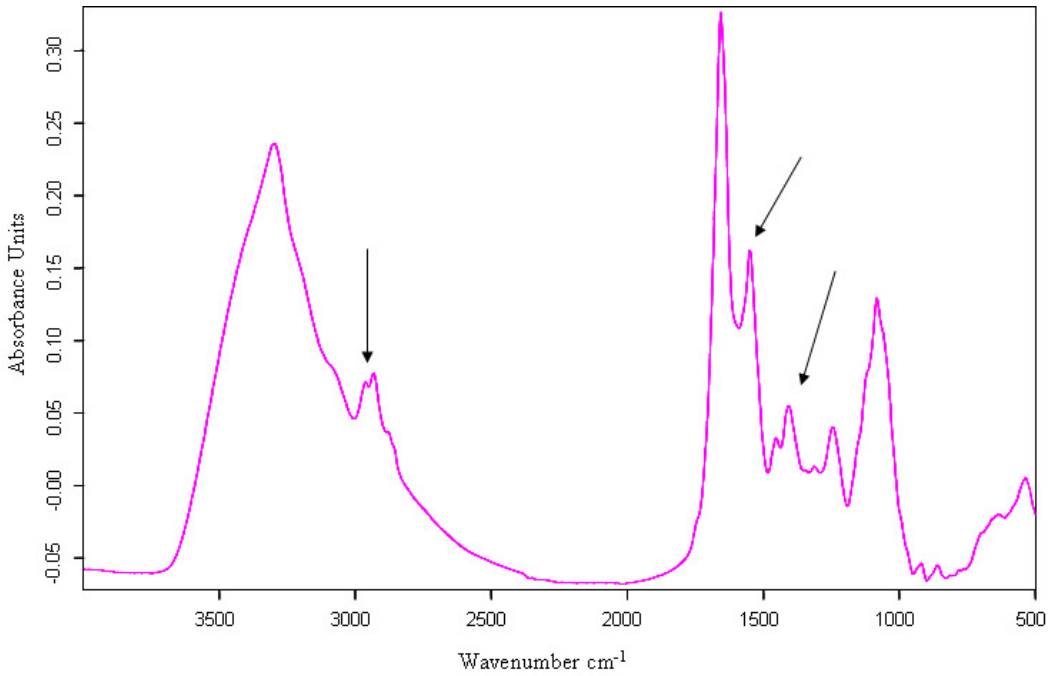
تم تنميط عزلات بكتيريا حمض اللبن المعزولة من الجبنة البلدية واللبن الرائب باستخدام هذه التقنية الحديثة، حيث تم بدايةً التعرف على الطيف النوعي لكل جنس من هذه البكتيريا. يُلاحظ ضمن الطيف ثلاث مناطق تميز جنساً بكتيرياً عن آخر:

1) 1500-1200 cm^{-1}: منطقة متنوعة: بروتينات – حموض دهنية – مركبات فوسفاتية.

2) 1800-1500 cm^{-1}: منطقة الأميد amide وخاصة روابط أميد I وأميد II للبروتينات والببتيدات.

3) 3000-2700 cm^{-1} : منطقة متعدد السكاريد الليبيدي.

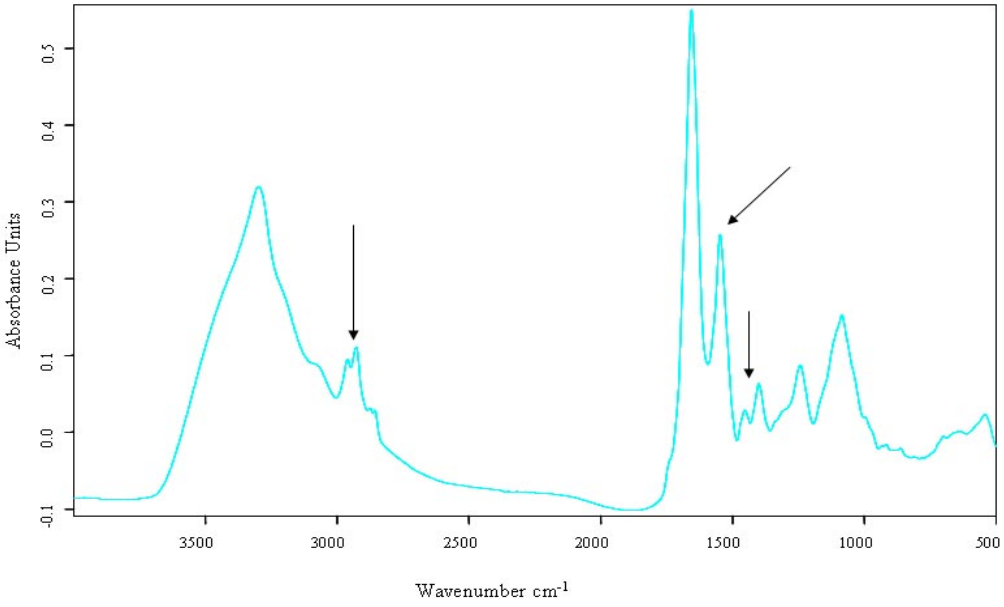
يوضح الشكل 5 الطيف النوعي لجنس *Weissella*.



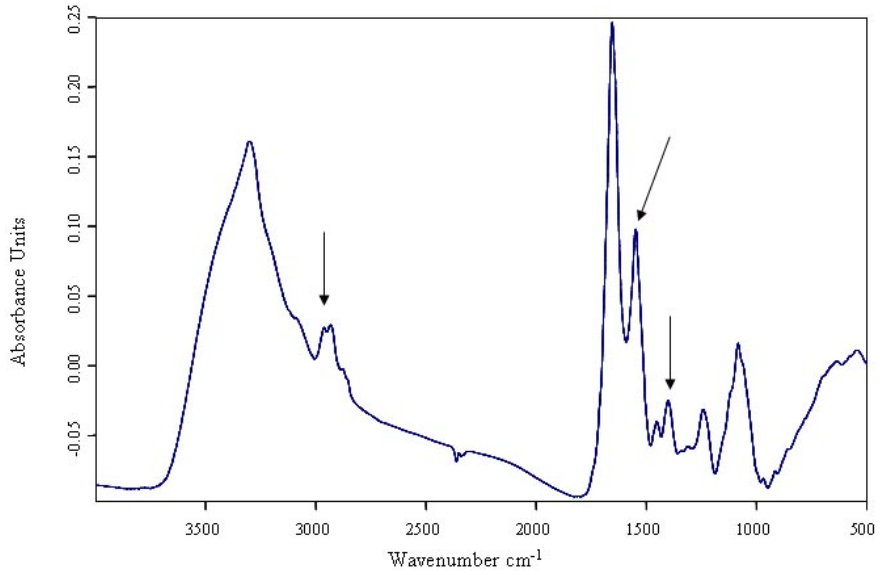
الشكل 5. طيف الـ FT-IR 500-3500 cm^{-1} لبكتيريا *Weissella*.

كمـا يوضـح الـشكلان 6 و7 الطيـف المميـز لبكتيريـا المكـورات اللبنيـة *Lactococcus* و*Streptococcus* على التوالي.

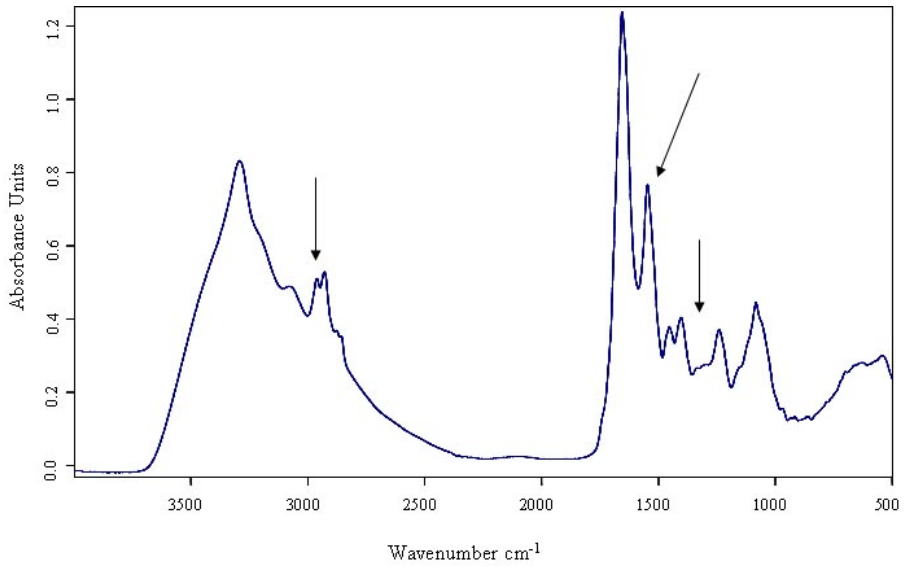
وتوضح الأشكال 8 و9 و10 طيف بكتيريا الـ *Enterococcus* وطيفي بكتيريا العصيات اللبنية *Leuconostoc* و*Lactobacillus* على التوالي.



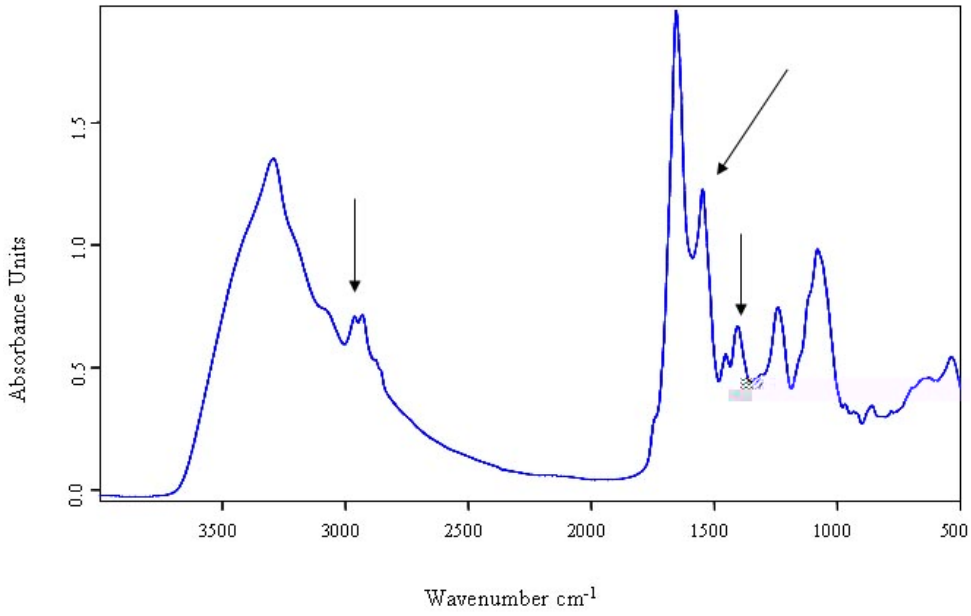
الشكل 6. طيف الـ FT-IR 500-3500 cm^{-1} لبكتيريا الـ *Lactococcus*.



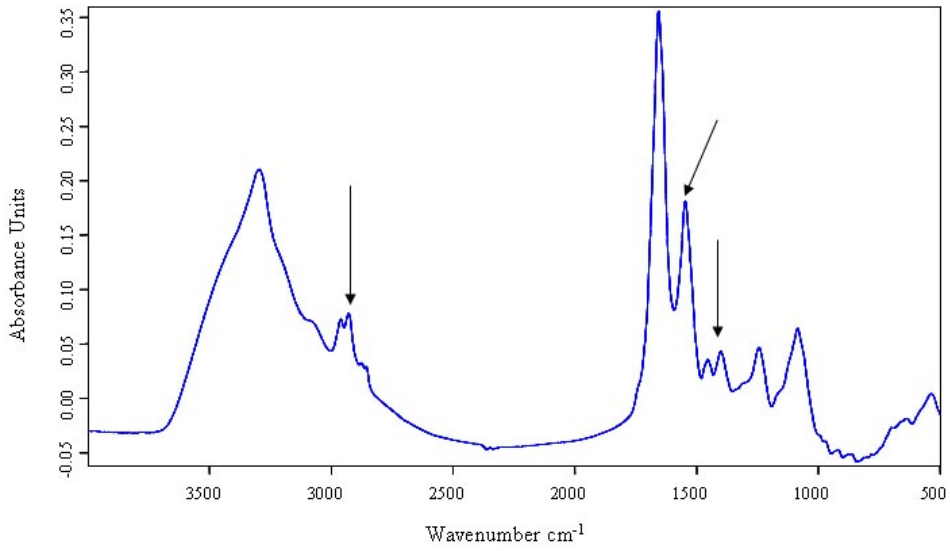
الشكل 7. طيف الـ FT-IR 3500-500 cm^{-1} لبكتيريا الـ *Streptococcus*.



الشكل 8. طيف الـ FT-IR 3500-500 cm^{-1} لبكتيريا الـ *Enterococcus*.



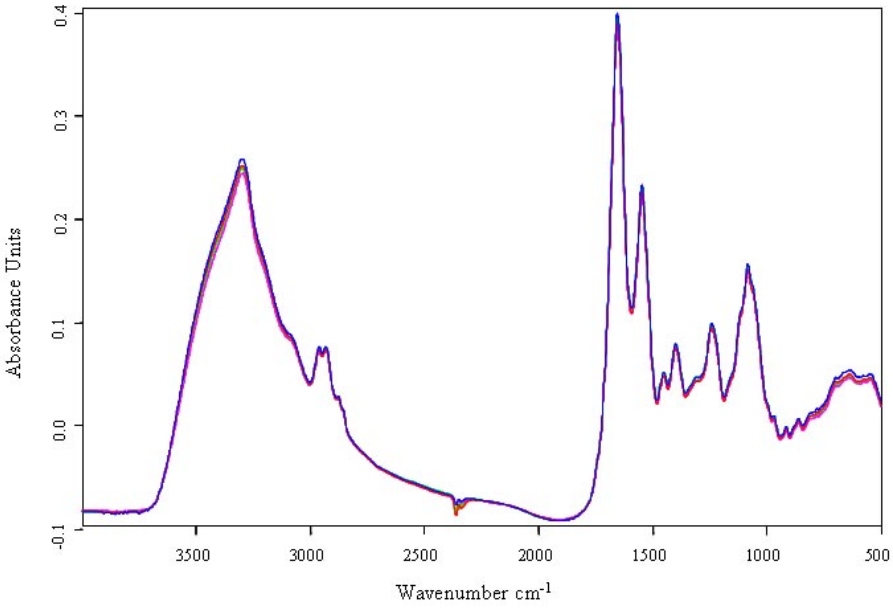
الشكل 9. طيف الـ FT-IR 3500-500 cm^{-1} لبكتيريا الـ *Leuconostoc*.



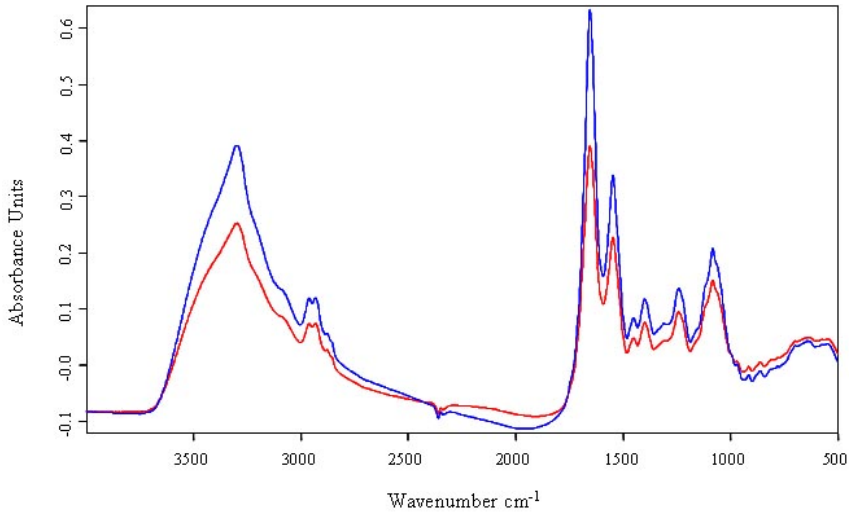
الشكل 10. طيف الـ FT-IR 3500-500 cm^{-1} لبكتيريا الـ *Lactobacillus*.

ومن الجدير بالذكر، أن هذه النتائج كانت متطابقة مع نتائج تنميط بكتيريا حمض اللبن باستخدام تقنية الـ PCR، كما أنها متطابقة مع نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية.

يوضح الشكل 11 تطابق أطياف عزلات الـ *Streptococcus* المعزولة من اللبن الرائب والجبنة البلدية. بينما يُظهر الشكل 12 اختلاف طيفيْ الـ *Streptococcus* المعزولة من اللبن الرائب السوري وتلك المعزولة من اللبن في ألمانيا (سلالة عيارية).

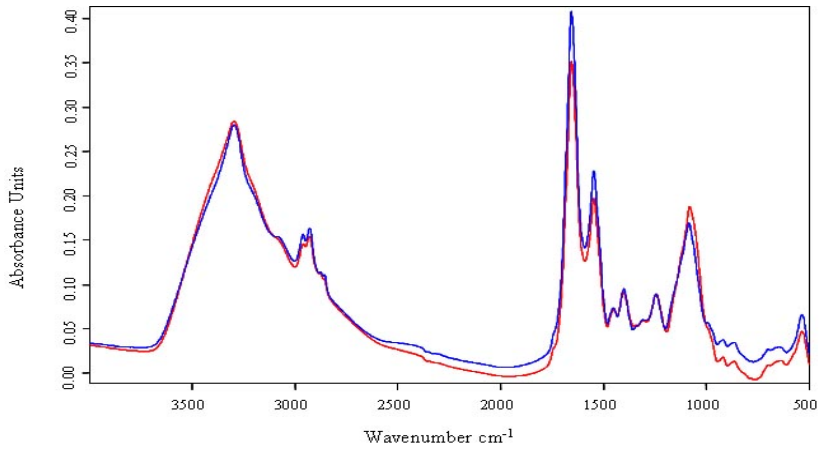


الشكل 11. تطابق أطياف عزلات الـ *Streptococcus* المعزولة من اللبن الرائب والجبنة البلدية.

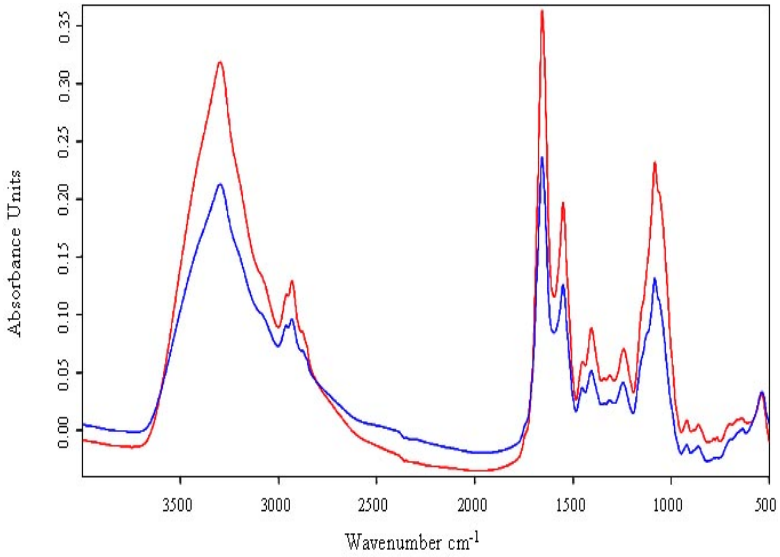


الشكل 12. اختلاف طيفي الـ *Streptococcus* السورية (الأحمر) والألمانية (الأزرق).

يُظهر الشكل 13 تطابق سلالة الـ *Lactococcus* المعزولة من اللبن الرائب السوري (الأحمر) مع السلالة العيارية الألمانية (الأزرق). أما الشكل 14 فيظهر اختلاف طيف السلالة السورية عن طيف السلالة ذاتها من ماركة هانسن الدانماركية (شاهد عياري).

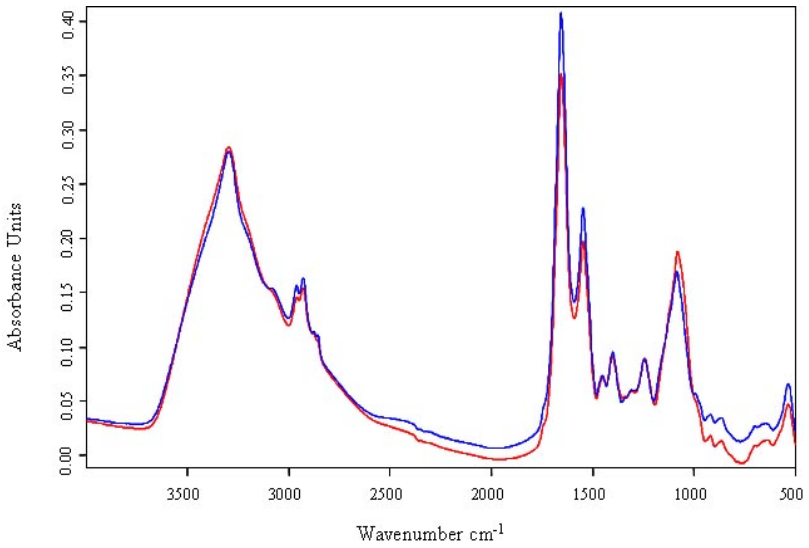


الشكل 13. تطابق طيفي الـ *Lactococcus* السورية (الأحمر) والألمانية (الأزرق).



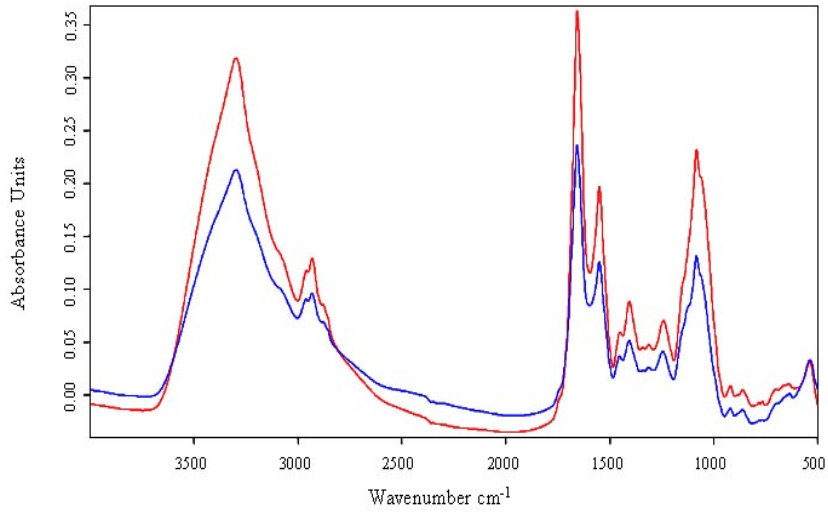
الشكل 14. اختلاف طيفي الـ *Lactococcus* السورية (الأحمر) وهانسن الدانماركية (الأزرق).

كما لوحظ تطابق جنس الـ *Enterococcus* السورية والألمانية (الشكل 15).



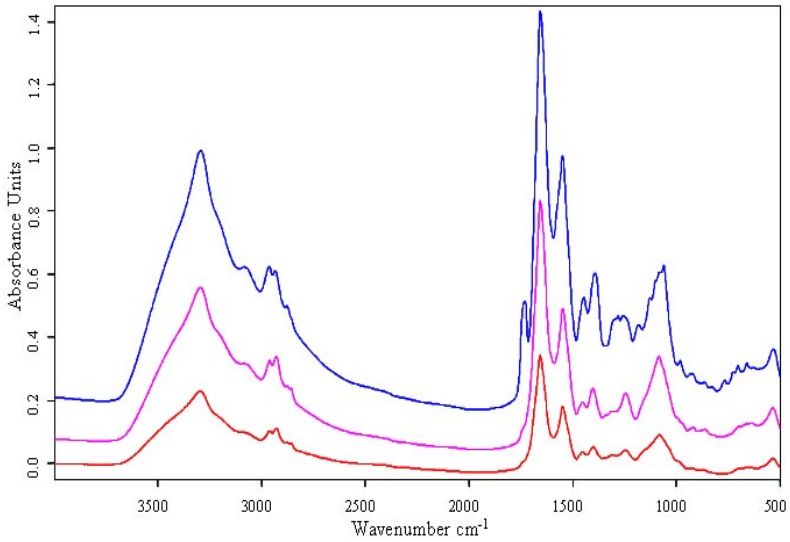
الشكل 15. تطابق طيفي الـ *Enterococcus* السورية (الأحمر) والألمانية (الأزرق).

يوضح الشكل 16 الاختلاف بين طيف جنس الـ *Lactobacillus* السورية وذلك العائد للجنس ذاته من الماركة الدانماركية هانسن.



الشكل 16. اختلاف طيفي الـ *Lactobacillus* السورية (الأحمر) وهانسن الدانماركية (الأزرق).

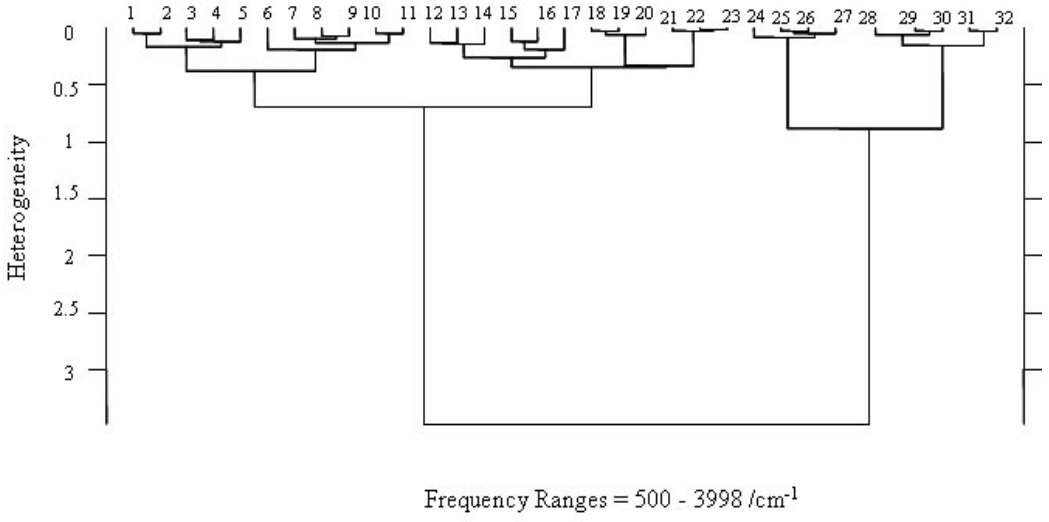
يُلاحظ من الشكل 17 اختلاف أطياف الـ *Leuconostoc* السورية والألمانية والدانماركية.



الشكل 17. اختلاف أطياف الـ *Leuconostoc* السورية (الأحمر)وهانسن الدانماركية (الزهر) والألمانية (الأزرق).

يُلاحظ مما سبق، أنه على الرغم من تطابق الأجناس والأنواع (السورية والعيارية) باستخدام الـ PCR والاختبارات الكيميائية الحيوية، إلا أن البصمة الوراثية التي يظهرها جهاز الـ FT-IR قد تتطابق (كما في الشكليْن 13، 15) وقد تختلف (كما في الأشكال 12، 14، 16، 17)، ونعتقد أن لكل من الاختلاف والتطابق أهمية كبيرة من الناحية التطبيقية في صناعة الألبان.

هناك معايرة أتوماتيكية ضمن البرنامج الحاسوبي OPUS تُسمى Quality Test تسمح بمقارنة الخصائص المختلفة للأطياف المدروسة: الامتصاصية، الإشارة/الضجيج، ...إلخ؛ وباستخدام Ward's algorthim يظهر الشكل العنقودي ليوضح تقارب أو تباعد السلالات البكتيرية المدروسة. يوضح الشكل 18، معطيات الـ 32 طيفاً مختلفاً لسلالات بكتيريا حمض اللبن التالية: *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Enterococcus*، *Streptococcus*، *Leuconostoc*، *Weissella*.



الشكل 18. تحليل الشكل العنقودي cluster لـ 32 طيف FT-IR تخص سلالات بكتيريا حمض اللبن (السورية والعيارية)التي تم استنباتها لمدة 48 ساعة، مجالات الطيف cm^{-1} 3000-2800 و-1800 cm^{-1} 1500 وcm^{-1} 1200-1500 و cm^{-1} 1200-900 و cm^{-1} 900-700. وضعت أطياف كل الأنواع معاً وتم تعريفها.

1-2: سلالتي *Lactobacillus* العياريتين.
3-5: سلالات *Lactobacillus* السورية.
6: سلالة *Lactococcus* العيارية.
7-11: سلالات *Lactococcus* السورية.
12-14: سلالات *Enterococcus* العيارية.
15-17: سلالات *Enterococcus* السورية.
18-20: سلالات *Streptococcus* العيارية.
21-23: سلالات *Streptococcus* السورية.
24: سلالة *Leuconostoc* العيارية.
25-27: سلالات *Leuconostoc* السورية.
28: سلالة *Weissella* العيارية.
29-32: سلالات *Weissella* السورية.

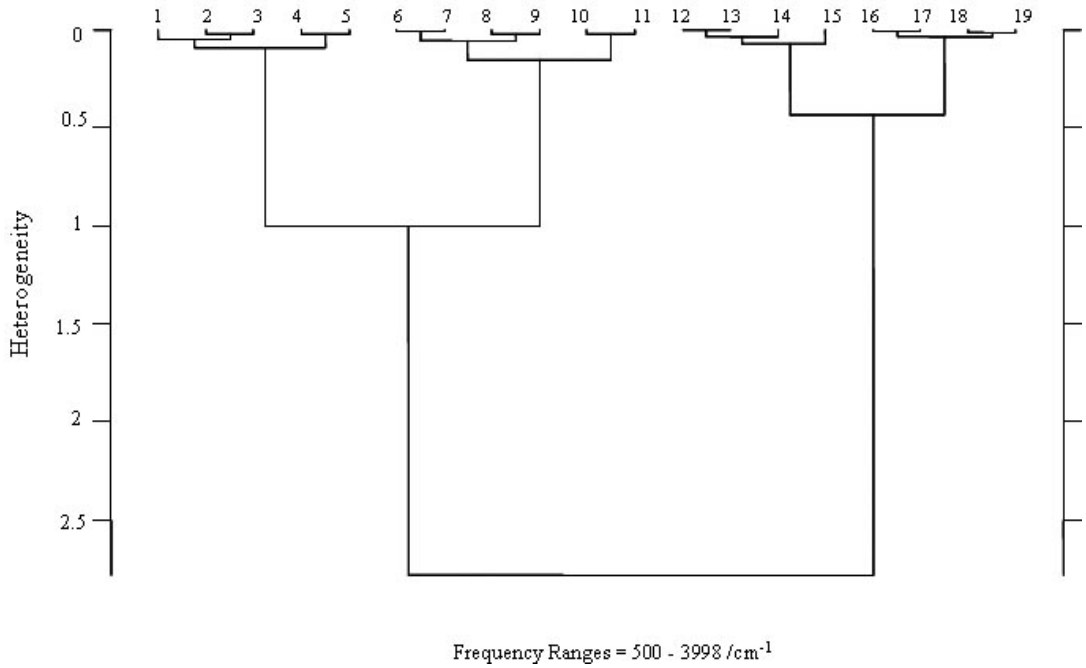
تم تحليل النتائج: معامل التحليل، الشكل العنقودي، الاشتقاق، الطريقة، باستخدام البرنامج الحاسوبي OPUS (Bruker ألمانيا).

نلاحظ أن الشكل تحت العنقودي يتفق مع اختلاف الأجناس، حيث يُلاحَظ وجود 23 مجموعة (من 1 إلى 23 في الشكل 18) أو نمط طيفي لكل من الـ *Lactobacillus* و*Lactococcus* و*Streptococcus* و*Enterococcus*، تُوَزَّع كما يلي: خمس سلالات هي *Lactobacillus*، قُسِّمَت بدورها إلى شعبتيْن هما: السلالة العيارية والعزلات السورية. كما يلاحظ وجود ستة أطياف للـ *Lactococcus* وستة أطياف للـ *Enterococcus* وستة أطياف للـ *Streptococcus* توجد في الفرع الثاني (من 6 إلى 23 في الشكل 18). بينما يحتوي الشكل تحت العنقودي الثاني (وإنما في فرع

منفصل) على عزلات الـ *Leuconostoc* (من 24 إلى27 في الشكل 18) وعزلات الـ *Weissella* (من 28 إلى 32 في الشكل 18).

يوضح الشكل 19 تحليل الشكل العنقودي لأطياف سلالات العصيات والمكورات اللبنية السورية (المعزولة من اللبن الرائب والجبنة البلدية) وتلك العيارية (هانسن الدانماركية والألمانية).

يُلاحظ من الشكل السابق تقارب سلالات المكورات اللبنية الألمانية وهانسن (1-5، الشكل 19) أكثر من العزلات السورية؛ حيث نجدها في فرع منفصل عن العزلات السورية، ونجد هذه الأخيرة في فرع آخر؛ المكورات اللبنية المعزولة من اللبن الرائب (6-9، الشكل 19)، وتلك المعزولة من الجبنة البلدية (10-11، الشكل 19).



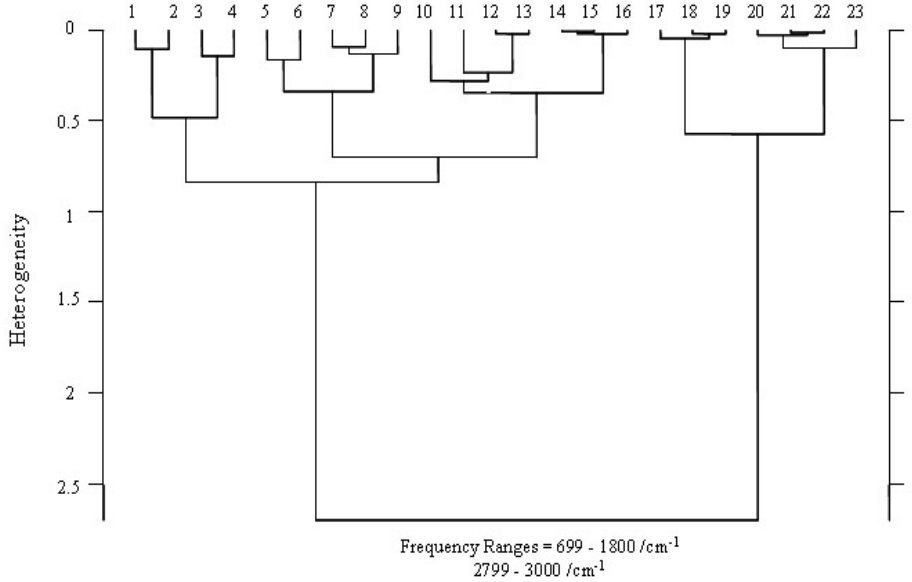
الشكل 19. تحليل الشكل العنقودي cluster لـ 19 طيف FT-IR تخص سلالات بكتيريا *Lactobacillus* و *Streptococcus* السورية والعياريةالتي تم استنباتها لمدة 48 ساعة، مجالات الطيف cm^{-1} 3000-2800 و cm^{-1} 1800-1500 و cm^{-1} 1200-1500 و cm^{-1} 1200-900 و cm^{-1} 900-700.

1-3: سلالات *Streptococcus* العيارية (هانسن).
4-5: سلالتي *Streptococcus* العياريتين (الألمانية).
6-9: سلالات *Streptococcus* السورية (لبن رائب).
10-11: سلالتي *Streptococcus* السورية (جبنة بيضاء).
12-13: سلالتي *Lactobacillus* العياريتين (هانسن).
14-15: سلالتي *Lactobacillus* العياريتين (الألمانية).
16-17: سلالتي *Lactobacillus* السورية (لبن رائب).
18-19: سلالتي *Lactobacillus* السورية (جبنة بيضاء).

تـم تحليـل النتـائج: معامـل التحليـل، الـشكل العنقـودي، الاشـتقاق، الطريقـة، باسـتخدام البرنـامج الحاسـوبي OPUS (Bruker ألمانيا).

كمـا يُلاحـظ أيضـاً تقـارب سـلالات العصـيات اللبنيـة العياريـة هانـسن والألمانيـة (12-15، الـشكل 19) أكثـر مـن تلـك الـسورية (16-19، الـشكل 19) المعزولـة مـن اللـبن الرائـب والجبنـة البلديـة علـى التوالي. يوضح الشكل (19) أن المكورات اللبنية (العيارية والسورية) تتواجد علـى فـرع مـن الـشكل العنقودي بينما نجد العصيات اللبنية على فرعٍ آخر.

يوضح الشكل 20 ثلاثاً وعشرين طيفاً لسلالات بكتيريا حمض اللبن المعزولة من اللبن الرائب والجبنة البلدية من بعض مناطق القطر العربي السوري.



الشكل 20. تحليل الشكل العنقودي cluster لـ 23 طيف FT-IR تخص سلالات بكتيريا حمض اللبن السورية (معزولـة مـن اللـبن الرائـب والجبنـة البلديـة) والعياريـة تـم اسـتنباتها لمـدة 48 سـاعة، مجـالات الطيـف -3000 2800cm^{-1} و1800-1500cm^{-1} و 1200-1500cm^{-1} و 1200-900cm^{-1} و 900-700^{-1}.

1-2: سلالتي *Enterococcus* السورية (الجبنة البلدية).
3-4: سلالتي *Enterococcus* السورية (اللبن الرائب).
5-6: سلالتي *Streptococcus* السورية (الجبنة البلدية).
7-8: سلالتي *Streptococcus* السورية (اللبن الرائب).
9: سلالة *Streptococcus* العيارية (الألمانية).
10: سلالة *Lactobacillus* العيارية (الألمانية).
11: سلالة *Lactobacillus* العيارية (هانسن الدانماركية).
12-13: سلالات *Lactobacillus* السورية (اللبن الرائب).
14-16: سلالات *Lactobacillus* السورية (اللبن الرائب).
17: سلالة *Leuconostoc* العيارية (ألمانيا).

18-19: سلالتي *Leuconostoc* السورية (اللبن الرائب).
20-21-22: سلالات *Leuconostoc* السورية (الجبنة البلدية).
23: سلالة *Leuconostoc* العيارية (هانسن الدانماركية).
تم تحليل النتائج: معامل التحليل، الشكل العنقودي، الاشتقاق، الطريقة، باستخدام البرنامج الحاسوبي OPUS (Bruker ألمانيا).

حيث يُلاحظ وجود عزلات الـ *Enterococcus* المعزولة من الجبنة البلدية (1-2) ومن اللبن الرائب (3-4) في فرعيْن منفصليْن عن بعضهما.

يُلاحظ من الشكل ذاته أن سلالة الـ *Streptococcus* الألمانية (9) بعيدة عن عزلات هذه السلالة المعزولة من الجبنة البلدية (5-6) أكثر من اللبن الرائب (7-8). ويبين الشكل (20) أيضاً أن عزلات العصيات اللبنية المعزولة من اللبن الرائب (12-13) أقرب إلى السلالتين العياريتين الألمانية والدانماركية (10-11) من تلك المعزولة من الجبنة البلدية (14-16). ويُظهر هذا الشكل أيضاً أن سلالة الـ *Leuconostoc* الألمانية كانت أقرب إلى الـ *Leuconostoc* المعزولة من اللبن الرائب (18-19)؛ بينما العزلات المعزولة من الجبنة البلدية (20-22) كانت أقرب إلى سلالة *Leuconostoc* العائدة لماركة هانسن الدانماركية (الشكل 20).

4. المناقشة

لوحظت أثناء الدراسة لعزلات بكتيريا حمض اللبن المعزولة من منتجاتنا المحلية النسب المئوية التالية: نسبة المكورات اللبنية في الجبنة البلدية 56% من مجموع العزلات حيث كانت نسبة الـ *Enterococcus* هي الأعلى (53%)؛ تليها نسبة الـ *Streptococcus* (26%) وأخيراً يأتي جنس الـ *Lactococcus* (21%). كما وُجِد أن نسبة الـ *E. faecium* بلغت 37% ووصلت نسبة الـ *E. faecalis* إلى 63%. بينما كانت نسبة العصيات اللبنية للجنس *Lactobacillus* 17% فقط.

أما نسبة المكورات اللبنية في اللبن الرائب فقد بلغت 61% من مجموع العزلات حيث كان جنس الـ *Enterococcus* هو السائد بنسبة (66%)؛ تلاه الجنس *Lactococcus* بنسبة (27%)؛ ثم الجنس *Streptococcus* بنسبة (7%). تبين أيضاً أن نسبة الـ *E. faecium* وصلت إلى 64% في حين بلغت نسبة الـ *E. faecalis* 36%. وكانت نسبة العصيات اللبنية للجنس *Lactobacillus* 12% (حيث استطعنا تنميط نوعين هما: *Lb. delbruecki bulgaricus* و *Lb. delbruecki lactis* بواسطة الـ PCR). كما حصلنا على عزلات بيضوية من الجنس *Pediococcus* والنوع *P. pentosaceus*.

لقد كانت العزلات السورية من الـ *Streptococcus* متحملةً للملوحة (بتركيز 6.5%) وهذا ما يتفق مع نتائج أبو يونس وزملائها؛ بينما لا يستطيع هذا الجنس عادةً النمو في تركيز من كلوريد الصوديوم أعلى من 4% (Geis *et al*., 2003).

استخدمنا جهاز المطيافية تحت الحمراء الـ FT-IR لتنميط بكتيريا حمض اللبن LAB وقمنا بمقارنة نتائج هذا التنميط مع تلك التي حصلنا عليها بتقنية الـ PCR. يتميز جهاز المطيافية هذا بإعطاء معلومات حول المحتوى الكلي للميكروب بشكل طيفي. تعبر هذه الأطياف عن بنى معقدة في الجدار الخلوي للبكتيريا ومن الصعب فصلها بسهولة. ولكن رغم ذلك، أظهرت تقارير علمية عديدة أنه يمكن لجهاز FT-IR أن يكون مفيداً لتمييز الجنس والنوع وحتى السلالة (Helm *et al*., 1991; Maquelin *et al*., 2003). حيث أن أطياف الـ FT-IR للميكروبات تعتمد نوعياً على الطابع الظاهري والمورثي للخلية البكتيرية. إن أطياف تحويل فوريه للأشعة تحت الحمراء للبكتيريا هي كالبصمة الوراثية_للجنس البكتيري. لذا يعتمد تنميط البكتيريا على المجال الطيفي كاملاً، مع الأخذ بعين الاعتبار أن هذا الطيف هو صُوَر معقدة لمجموع

المحتوى الكيميائي للخلية (بروتينات، أغشية، جدر خلوية، حموض نووية .... الخ). ويمكن لبعض العصائب أن تميز بين مجموعات وظيفية أو زمر كيميائية، كما أن بعض مجالات الأطياف محددة حسب فحوصات خاصة للخلية (Mariey *et al*., 2001). وعندما لا يوجد طيف نوعي لبكتيريا ما، فإنه يجب الاعتماد على الشكل العنقودي cluster لتحليل النتائج. وقد لوحظ تطابق بين تنميط بكتيريا حمض اللبن بطريقة الـ FT-IR مع تقنية الـ PCR، مما يشير إلى إمكانية استخدام الطريقة الأولى في هذا التنميط. وعند تحليل النتائج اعتماداً على الشكل العنقودي، لوحظ تقارب بين عزلات بكتيريا حمض اللبن المعزولة من اللبن الرائب السوري وبين السلالات العيارية (الألمانية والدانماركية) أكثر منه في حالة البكتيريا المعزولة من الجبنة البلدية (الأشكال 18-20)؛ وقد يكون سبب ذلك هو استخدام البادئات المستوردة في تصنيع اللبن المحلي. ولقد استخدمت تقنية الـ FT-IR في تنميط بعض أجناس بكتيريا حمض اللبن (Curk *et al*., 1994; Kirschner *et al*., 2001).

5. الاستنتاجات والتوصيات

- تتواجد في منتجات الألبان السورية التقليدية بعض أنواع بكتيريا حمض اللبن المهمة التي يمكن استخدامها كبادئات في تصنيع هذه المنتجات مثل *S. thermophilus*، *Lc. lactis*، *Lb. bulgaricus*، *Lb.* casei.
- تعتبر تقنية الـ PCR دقيقةً في تحديد هوية بكتيريا حمض اللبن المعزولة من منتجات الألبان المحلية. ويمكن استخدام تقنية الـ FT-IR في تنميط هذه البكتيريا.
- يجب دراسة أثر التضاد لبكتيريا حمض اللبن على البكتيريا الممرضة، وتحديد الصادات الحيوية التي تنتجها.
- يجب عزل وتنميط بكتيريا حمض اللبن من النوق والماعز الشامي، ودراسة دورها في تخمير الحليب.

كلمة شكر

يسرنا في نهاية هذا العمل، أن نتوجه بالشكر الجزيل إلى السيد الدكتور المدير العام للهيئة، لتشجيعه المستمر على إجراء مختلف الدراسات والبحوث، كما يسرنا أن نتوجه بالشكر الى: رئاسة قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، وإلى السيد الدكتور عبد القادر عبادي وإلى كافة العاملين في مخبر الميكروبيولوجيا والمناعيات الذين لم يتوانوا عن تقديم المساعدة حيث أمكنهم ذلك.

6. المراجع

عهد أبو يونس، د. صياح أبو غرة، د. سمير سليق. 2007. دراسة خصائص بكتيريا حمض اللبن المعزولة من بعض منتجات الألبان السورية. أطروحة دكتوراة، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

Aslim, B., Beyatli, Y., 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of Streptococcus thermophilus strains isolated from Turkish yoghurts. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28, 257– 263.

Ayad, E. H. E., Verheul, A., Wouters, J. T. M., & Smit, G. 2001. Population dynamics oflactococc i from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for Gouda-type cheese. International Dairy Journal, 11, 51–61.

Ayad, **E. H. E., Verheul, A., Bruinenberg, P., Wouters, J. T. M., & Smit, G**. 2003. Starter cultures development for improving the flavour of Proosdi j-type cheese. International Dairy Journal, 13, 159–168.

Bae, **J.-W., Rhee, S.-K., Park, J.R., Chung, W.-H., Nam, Y.-D., Lee, I‹. Kim, H., Park, Y.-H.,** 2005. Development and evaluation of genomeprobing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8825–8835.

Beresford, **T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11, 259–274.

Brunser, O., Gotteland, M., Cruchet, S., Figueroa, G., Garrido, D., Steenhout, P., 2006. Effect of a milk formula with prebiotics on the intestinal microbiota of infants after an antibiotic treatment. Pediatr. Res. 59, 451–456.

Carr, F. **J., Chill, D., & Maida, N**. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical Reviews in Microbiology, 28, 281–370.

Cintas, L.**M., Rodrı´guez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Herna´ndez, P.E., Holo, H.,** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from Pediococcus acidilactici with a broad inhibitory spectrum. Applied and Environmental Microbiology 61, 2643– 2648.

Citak, **S., Yucel, N., Orhan, S.,** 2004. Antibiotic resistance and incidence of Enterococcus species in Turkish white cheese. Int. J. Dairy Technol. 57, 27.

Curk, M.C., Peladan, F. and Hubert, J.C. 1994 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying Lactobacillus species. FEMS Microbiol Lett 123, 241–248.

Danielsen, **M., Wind, A.,** 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. 82, 1 –11.

Davidson, **B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A.J.,** 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 70, 161– 183.

de Angelis, **M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M. R., & Gobbetti, M.** 2001. Characterization ofnon-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. Applied and Environmental Microbiology, 67, 2011–2020.

Durlu-Ozkaya, **F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E.,** 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. Journal of Applied Microbiology 91, 861–870.

Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology 67, 1628–1635.

Ehrmann, **M.A., Vogel, R.F**., 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. Trends Food Sci. Technol. 16, 31–42.

Fitzsimons, **N. A., Cogan, T. M., Condon, S., & Beresford, T.** 1999. Phenotypic and genotypic characterisation on non-starter lactic acid bacteria in mature cheese. Applied and Environmental Microbiology, 65, 3418–3426.

Geis, A., Hassab, A.M., Demerdash, E., Heller, K.J., 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from Streptococcus thermophilus. Plasmid 50, 53–69.

Giraffa, **G**. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiology Review, 26, 163–171.

Gobbetti, **M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R.,** 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends Food Sci. Technol. 16, 57–69.

Guessas B., Kihal M. 2004 'Characterization of *lactic acid bacteria* isolated from Algerian arid zone raw goats' milk "African Journal of Biotechnology .3 (6): 339-342

Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. & Naumann, D. 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J Gen Microbiol 137, 69–79.

Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., & Yvon, M. 2003. Cooperation between Lactococcus lactis and non-starter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. Applied and Environmental Microbiology, 69, 734–739.

Kirschner, **C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F. & other authors** 2001. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. J Clin Microbiol 39, 1763–1770.

Konstantinidis, **K.T., Tiedje, J.M.,** 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. J. Bacteriol. 187, 6258–6264.

Mangin, I., D. Corroler, A. Reinhardt, and M. Gueguen. 1999. Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. *J. Appl. Microbiol*. **86**: 514-520.

Mariey, **L., Signolle, J.P., Amiel, C. and Travert, J.** 2001 Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vibration Spectrosc 26, 151–159.

Nakanishi, K., Tokuda, H., Ando, T., Yajima, M., Nakajima, T., Tanaka, O., & Ohmomo, S. 2002. Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin. Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 13, 37–45.

Naser, **S.M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L.A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B.,S˘ vec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., Swings, J.,** 2005. Enterococcus canintestini sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. Int. J. System. Evol. Microbiol. 55, 2177–2182.

Picozzi, C., D'Anchise, F., Foschino, R., 2006. PCR detection of Lactobacillus sanfranciscensis in sourdough and Panettone baked product. Eur. Food Res. Technol. 222, 330–335.

Randazzo, **C.L., Heilig, H., Restuccia, C., Giudici, P., Caggia, C**., 2005. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. J. Appl. Microbiol. 99, 251–258.

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

Tailliez OM, Quenee P, Cibik R., Opstal JV, Dessevre F., Firmesse O., Tailliez P. 2001. Detection and identifcation of lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. J of Lait. 81:2537-248.

Tserovska L., Stefanova S., Yordanova T. 2002 'Identification of *lactic acid bacteria* isolated from Katyk, goat's milk and cheese 'J. culture collections' 3:48 -52.

Wouters, J. **T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., & Smit, G**. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12, 91–109.

SYRIAN ARAB REBABLIC
ATOMIC ENERGY COMMISSION
DAMASCUS- P.O.BOX: 6091

Final Report on Scientific Research
Department of Molecular biology and Biotechnology

Typing some of lactic acid bacteria in Syria using PCR and FT-IR techniques

Dr. A. Al-mariri

Prof. N. D. Sharabi

AECS – PR \FRSR 416 November 2008