



جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم التقانات الحيوية

استخدام تقنية PCR في تحديد مورثة البديوسين المنتج من بكتيريا *Pediococcus*
المعزولة من بعض المنتجات المتخمرة

Using PCR technique in order to identifying pediocin genes that
produced by *Pediococcus* bacteria isolated from some fermented
products

رسالة أعدت لاستكمال مستلزمات الحصول على درجة الماجستير في التقانات
الحيوية

اعداد:

م. نور لافي البردويل

بإشراف

د. عهد أبو يونس

كلية الزراعة جامعة دمشق

قسم علوم الأغذية

2019 م

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان:

" استخدام تقنية PCR في تحديد مورثة البديوسين المنتج من بكتيريا *Pediococcus*

المعزولة من بعض المنتجات المتخمرة "

لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأن كل العمل، والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرفين وجميع المراجع التي ذكرت في الرسالة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة

نور البردويل

Declaration

To whom it may concern: I declare that the present research work entitled:

" Using PCR technique in order to identifying pediocin genes that produced by *Pediococcus* bacteria isolated from some fermented products"

Is a new research work, and has neither been already accepted for any degree, nor has been submitted concurrently for any other degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides, All the referred literature are cited, and well-documented in the list of references.

Candidate

Nour Albardawel

شهادة

نشهد بأنّ هذا البحث الموصوف في هذه الرسالة:

" استخدام تقنية PCR في تحديد مورثة البديوسين المنتج من بكتيريا *Pediococcus* المعزولة من بعض المنتجات المتخمرة "

هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة المهندسة نور البردويل بإشراف الدكتورة عهد أبو يونس الأستاذ المساعد في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة دمشق ، وأن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المشرف

المرشحة

د. عهد أبو يونس

م. نور البردويل

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis;
" Using PCR technique in order to identifying pediocin genes that produced by *Pediococcus* bacteria isolated from some fermented products "

Is the result of scientific research done by candidate **Rasha Absi** under the supervision of **Dr. Ahed Abou- younes**, Food Science Department, Faculty of Agriculture, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Supervisor

Nour Albardawel

Ahed Abou- younes

قرار لجنة الحكم

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة دمشق، وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for Master Degree in Biotechnology Department, Faculty of Agriculture – Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نوقشت هذه الرسالة في جلسة علنية في كلية الزراعة بجامعة دمشق بتاريخ 2019/4/3

لجنة الحكم

الدكتور عبد الحكيم عزيزية

عضواً

الأستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة دمشق

الدكتور عبد الوهاب مرعي

عضواً

الأستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة دمشق

الدكتورة عهد أبو يونس

عضواً مشرفاً

الأستاذ المساعد في قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة دمشق

شكر وتقدير

أقدم أسمى آيات الشكر والتقدير للكادر التدريسي لكلية الهندسة الزراعية، وأخص بالذكر أساتذتي الكرام في قسم التقانات الحيوية وقسم علوم الأغذية الذين صاغوا لنا من علمهم حروفاً ومن فكرهم منارة تنير لنا سيرة العلم والنجاح .

ولا سيما لمن أسرنا بعظيم تعب وجهده، أخص محبتي وجليل احترامي لمن خصص لي من وقته وبذل معي جهداً كبيراً لإنجاح هذا البحث:

د.عهد أبو يونس

لكم مني جزيل الشكر وعظيم التقدير والاحترام.

أشكر كل من تعاون معنا لإتمام هذا البحث في مخبر التقانات في كلية العلوم . أسمى وأجلى عبارات الشكر لإدارة وكادر قسم تكنولوجيا الأغذية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية لتعاونهم الدائم .

الإهداء

الحمد والشكر الأول لله تعالى

أهدي نجاحي إلى من كلله الله بالهبة والوقار .. إلى من علمني أن الأعمال الكبيرة لا تتم إلا بالصبر والعزيمة والإصرار ..

إلى من أحمل اسمه بكل افتخار .. إلى والدي أطل الله بقاءه

إلى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أغلى الحبايب

أمي الحبيبة .. إلى ملاكي في الحياة .. إليك أمي .. قطرة في بحرك العظيم .. حباً وطاعة وبراً

إلى النجوم التي تضيء حياتي .. إلى سندي بهذه الحياة .. إلى من معهم حلوا الحياة ومرها

إلى من أتنمى أن يحققوا أفضل مما حققت .. إلى أخوتي نادر .. نزار

إلى من رافقتني منذ بداية المشوار معك سرت الدرب خطوة بخطوة وما تزال ترافقني حتى الآن .. إلى شمعة متقدة تنير

ظلمة حياتي .. بكل الحب .. إلى رفيقة دربي رشا

إلى من سرنا سوياً ونحن نشق الطريق نحو النجاح والحلم .. خطوة بخطوة بذرناه معاً .. وسنحصده معاً .. إلى من أرى

التفاؤل بعينها والسعادة في ضحكتها .. إلى من تطلعت لنجاحي بنظرات الأمل .. إليك ندى

إلى من يضيئوا لي الطريق .. يقفوا بجاني ويساندوني ويدعموني بكل استطاعتهم أصدقائي مروة .. مرام .. سالي ..

كريستين لكم محبتي

إلى كل من أضاء بعلمه عقل غيره أو هدى بالجواب الصحيح حيرة سائليه

إلى كل من يسعى جاهداً كي لا يتساوى الذين يعلمون مع الذين لا يعلمون

إلى الأمل والمستقبل في حياتي

جدول الرموز والمختصرات

ADO	D-adonitol	GUL	D-glucose	RAF	Raffinose
AMD	Amidon	GNT	Potassium gluconate	RIB	D-ribose
AMY	Amygdaline	INO	Inositol	RHA	L-rhamnose
ARB	Arbutine	MAN	D-mannitol	SAL	Salicine
CEL	D-ce liobiose	KOH	Potassium hydroxide	SAC	D-saccharose
ERY	Erythritol	INU	Inuline	SOR	D-sorbitol
DARA	D-arabinose	LAC	D-lactose(origine bovine)	SBE	L-sorbose
DARL	D-arabitol	LARA	L-arabinose	XLT	Xylitoi
DFUC	D-fucose	LXYL	L-xylose	TAG	D-tagatose
DXYL	D-xylose	LYX	D-lyxose	TE	Tris EDTA
DUL	Dulcitol	MAL	D-maltose	TRE	D-trehalose
ESC	Escoline Citrate of iron	MEL	D-melibiose	TUR	Turanose
FRU	D-fructose	MDM	Methyl- α D-Mannopyranoside	2KG	Potassium 2-CetoGuconate
GAL	D-galactose	MLZ	D-melezitose	5KG	Potassium 2-CetoGuconate
GEN	Gentiobiose	MDG	Methyl- α D-	LFUC	L-fucose

			Glucopyranoside		
GLY	Glycerol	MNE	Mannose		
GLYG	Glycogene	MDX	Methyl- β D-Xylopyranoside		

فهرس المحتويات

رقم الصفحة	العنوان
1	الملخص باللغة العربية
2	الملخص باللغة الانكليزية
4	المقدمة وهدف البحث
7	الدراسة المرجعية
7	1- بكتيريا <i>Pediococcus</i>
7	1-1- تسمية بكتيريا <i>Pediococcus</i>
7	1-2- تصنيف بكتريا الـ <i>Pediococcus</i>
10	2- عزل <i>Pediococcus</i>
10	2-1- عزل <i>Pediococcus</i> من الحليب ومنتجاته
12	2-2- عزل <i>Pediococcus</i> من اللحم ومنتجاته
13	3- البكتريوسينات
15	3-1- تسمية البكتريوسينات
16	3-2- تصنيف البكتريوسينات الناتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام
17	3-2-2-3- الصنف الثاني Class II
17	3-2-2-3-1- النوع A
18	3-2-2-3-2- النوع B و C
19	3-2-3- الصنف الثالث Class III
19	3-2-4- الصنف الرابع Class Lv
20	4- المقدرة التثبيطية لبكتيريا <i>Pediococcus</i> تجاه بعض الأنواع الممرضة
22	4-1- التحري عن النشاط المضاد للأحياء الدقيقة لسلالات <i>Pediococcus</i> وإنتاج البديوسين
23	4-2- استخدام PCR في تحديد مورثة البديوسين
25	4-3- دراسة تأثير العوامل البيئية في إنتاج البديوسين
25	4-3-1- تأثير درجات الحموضة pH المختلفة
25	4-3-2- تأثير درجات الحرارة المختلفة
26	4-3-3- تأثير تراكيز كلوريد الصوديوم المختلفة
26	4-3-4- تأثير توفر مصادر الكربون المختلفة في وسط النمو
27	4-4- تطبيقات البديوسين المنتج من بكتيريا <i>Pediococcus</i>
27	4-4-1- تطبيقات البديوسين في الأغذية المختلفة
27	4-4-2- في منتج الحليب

28	4-4-3- في منتج الخبز
29	4-4-4- في منتجات اللحوم والأسماك
31	مواد البحث وطرائقه
31	1- العينات Samples
31	2- مرحلة العزل
32	3- الاختبارات الكيميائية الحيوية
32	3-1- دراسة الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للسلالات المعزولة:
32	3-1-1- شكل الخلايا البكتيرية تحت المجهر.
32	3-1-2- صبغة الغرام.
32	3-1-3- اختبار الأوكسيداز
32	3-1-4- نمط تخمير الحليب.
32	3-1-5- انتاج الأسيتوئين (acetone) من الغلوكوز باستخدام اختبار Voges – Proskauer
33	3-1-6- تخمير الغلوكوز واللاكتوز والسكر على بيئة ثلاثي سكر الحديد (TSI)
33	3-1-7- دراسة النشاط المحلل للكازئين
34	3-2- تحديد بكتيريا Pediococcus:
34	3-2-1- تحديد بكتيريا Pediococcus باستخدام تقنية API 50CHL
34	3-2-2- تحديد بكتيريا Pediococcus باستخدام تقنية تفاعل التسلسل البوليمرازي PCR
35	4- دراسة الأثر التثبيطي
36	4-1- الكشف عن المورثة المسؤولة عن إنتاج البكتريوسين
37	5- الدراسة الاحصائية
37	5-1- الدراسة الاحصائية للأثر التثبيطي
39	النتائج والمناقشة
39	1- نتائج الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للسلالات المعزولة
41	2- نتائج تحديد بكتيريا الـ Pediococcus
41	2-1- نتائج نظام API 50 CHL
45	2-2- نتائج تفاعل PCR
46	3- نتائج دراسة الأثر التثبيطي للسلالات
50	الاستنتاجات والتوصيات
51	قائمة المراجع

فهرس الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول
36	الجدول (1) جدول بمرئسات البديوسين
39	الجدول (2) توزع العزلات على المواد الغذائية
40	الجدول (3) الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للسلاطات المعزولة
42	الجدول (4) نتائج اختبار API 50 CHL
44	الجدول (5) (توزع السلاطات على المواد الغذائية
47	الجدول (6) نتائج اختبار التضاد لعزلات <i>Pediococcus</i> ضد بكتيريا <i>L. monocytogenes</i>

فهرس الأشكال

رقم الصفحة	عنوان الشكل
20	الشكل (1) تصنيف البكتريوسينات المُنتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة الغرام
44	الشكل (2) توزيع السلالات على المواد الغذائية.
45	الشكل (3) M :الواسم الجزيئيMarkerpb100، المسارات 1 - 12 نتائج ترحيل تفاعل PCR لعزلات <i>Pediococcus</i> من المنتجات المتخمرة
46	الشكل (4) M :الواسم الجزيئيMarkerpb100، المسارات 13 - 20 نتائج ترحيل تفاعل PCR لعزلات <i>Pediococcus</i> من المنتجات المتخمرة
48	الشكل (5) M :الواسم الجزيئيMarkerpb100، المسارات 1 - 6 نتائج ترحيل تفاعل PCR للعزلات الستة التي أعطت شذفة بطول bp322.

المخلص

أُجريت هذه الدراسة في مخابر كلية الزراعة - قسم علوم الأغذية، ومخابر الميكروبيولوجيا في كلية العلوم - جامعة دمشق، بهدف عزل وتوصيف بكتيريا من الجنس (*Pediococcus*) من بعض الأطعمة السورية من مناطق مختلفة في القطر العربي السوري بطريقة معقمة، خلال الفترة الممتدة بين شهر تموز 2015 م و شهر تشرين الثاني 2016 م، ودراسة الأثر التثبيطي للسلاسل المعزولة في نمو بكتيريا من النوع (*Listeria monocytogenes*)، حيث تم عزل 119 عزلة من عينات مختلفة من الأغذية المحلية، جرى تعريفها استناداً لخصائص بكتيريا حمض اللبن. وتبين بالفحص المجهرى وجود 20 عزلة ببيضوية الشكل أُجري عليها مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية لتحديد العزلات التابعة لجنس (*Pediococcus*) وتم التأكد من ذلك باستخدام تقنية PCR، وصُنّفت العزلات بتقنية الـ (API 50CHL). حيث تبين أن 8 عزلات تنتمي لنوع (*P. acidilactici*) ، 10 عزلات تنتمي للنوع (*P. pentosaceus*) عزلتان للنوع (*P. damnosus*). تم التحري عن امتلاك هذه العزلات لأثر تثبيطي في نمو بكتيريا (*Listeria monocytogenes*)، وتبين أن جميع العزلات تمتلك فعالية حيوية مثبطة لنمو (*L. monocytogenes*). وأظهرت النتائج امتلاك العزلتين (12C و 16C) أكبر قطر لمنطقة التثبيط حيث بلغت (27 مم).

كما تم التأكد من قدرة هذه السلاسل على انتاج البديوسين باستخدام مرئسات خاصة قادرة على كشف مورثة البديوسين من خلال إعطاء حزمة بطول (bp322)، وتبين وجود ست سلاسل من أصل 20 سلالة حاوية على مورثة البديوسين.

الكلمات المفتاحية: عزل، *Pediococcus*، المنتجات المتخمرة، مورثة البديوسين، PCR.

Abstract

This study was conducted in the laboratories of the Agriculture Faculty - Department of Food Science, and the microbiology laboratories in the Science Faculty. To isolate and characterize the bacteria of the (*pediococcus*) genus species of some Syrian foods from different regions in the Syrian Arab Republic in a sterile manner, between July month 2015ad and November month 2016ad , and to study the inhibitory effect of the isolated strains in growth 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 belong to (*P. damnosus*). These isolates were investigated for their inhibitory effect in growth of (*Listeria monocytogenes*), all isolates have a potent inhibitory effect of (*L. monocytogenes*), The results showed that isolates (16C and 12C) have the largest inhibition zone of diameter where it reached (27mm).

It was also confirmed that these strains were able to produce the pediocin by using special primers capable of detecting the pediocin gene by giving a 322bp package and showing that there were six strains out of 20 strains containing the pediocin gene.

Keyword: isolate, *Pediococcus*, fermentation products, pediocin gene, PCR.

المقدمة والدراسة المرجعية

المقدمة Introduction:

تمتلك بكتيريا حمض اللبن (LAB) Lactic acid bacteria أهمية كبيرة كونها واسعة الانتشار في المواد الغذائية إضافة لاستخدامها في تصنيع الأغذية المخمرة المختلفة، والتي تُشكل جزءاً من الغذاء اليومي للمستهلك، حيث تُستخدم بكتيريا حمض اللبن كبائنات في تصنيع منتجات الألبان المخمرة، إضافة لاستخدامها في تصنيع بعض اللحوم المخمرة والأسماك (كاسلامي والنفاق والسلمون المدخن، وفي تصنيع بعض الخضار المخمرة (كمخللات الملفوف واللفت والشوندر الأحمر والجزر والكرفس)، كما تُستخدم في تصنيع الأعلاف المخمرة (السيلاج).

يمكن تقسيم بكتيريا حمض اللبن الى مجموعتين الأولى متجانسة التخمير (Homofermentative) والتي تنتج حمض اللبن فقط والثانية غير متجانسة التخمير (Heterofermentative) حيث تعطي خلال عملية التخمير حمض اللبن، وحمض الخل و بعض الأحماض الطيارة الأخرى التي تعطي الطعم والنكهة المميزة للمنتج، كما بينت الدراسات أن بعض أنواع بكتيريا حمض اللبن تمتلك نشاط مضاد للأكسدة، بالإضافة إلى قدرتها على رفع القيمة الغذائية والصحية للمنتجات المخمرة، وتُعتبر بكتيريا حمض اللبن بكتيريا مفيدة للجهاز الهضمي، لذلك بشكل عام تُصنف LAB كبكتيريا آمنة GRAS صحياً (generally regarded as safe).

سعت الدراسات الغذائية في السنوات الأخيرة إلى استبدال المواد الكيميائية المستخدمة في حفظ الأغذية بمواد أخرى طبيعية، لضمان سلامة حفظ الأغذية وتداولها بطريقة صحيحة وصحية من جهة، إضافة إلى السعي للحصول على منتجات محلية تتناسب مع متطلبات المستهلك الصحية

والذوقية من جهةٍ أخرى، وقد وجدت الأبحاث أن بكتيريا حمض اللبن تحتل المرتبة الأولى بين الكائنات الحية الدقيقة التي تُستعمل في الحفظ الحيوي، وتُشكل البكتيريوسينات (Bacteriocins) التي تُنتجها شكلاً من أشكال الحفظ الطبيعي للمواد الغذائية (Cotter *et al.*, 2005).

مبررات البحث:

حظيت الدراسات التي أُجريت بهدف تحديد الأثر التنشيطي لبكتيريا *Pediococcus* تجاه مجموعة البكتيريا الممرضة والبكتيريا المسببة للفساد في الغذاء أهمية كبيرة بسبب إمكانية استخدام هذه البكتيريا في تصنيع بعض منتجات الأغذية المتخمرة بجانب قدرتها على إنتاج مركبات النكهة، و بالتالي الاستفادة من المقدرة التنشيطية لهذه البكتيريا في عمليات حفظ الغذاء وإطالة فترة صلاحيته، إضافةً لإمكانية تواجد بكتيريا (*Pediococcus*) في الفلورا الطبيعية لبعض أنواع الأغذية مما يعزز أهميتها في عمليات التخلص من البكتيريا الممرضة.

أهداف البحث:

نظراً لقلة الدراسات المحلية على العزلات المحلية لبكتيريا (*Pediococcus*) ومعرفة تواجدها في الأغذية التقليدية السورية هدف هذا البحث إلى:

1_ عزل بكتيريا (*Pediococcus*) من بعض المنتجات المتخمرة طبيعياً كمخللات اللفت

وبعض منتجات الألبان المتخمرة كالسوركي والأجبان البيضاء.

2- التعرف على السلالات المعزولة بالاعتماد على تقنية (PCR).

3- تحديد بعض الخصائص الفيزيولوجية والبيوكيميائية لبكتيريا (*Pediococcus*) المعزولة

باستخدام نظام API 50CHL.

4- تحديد وجود أثر تثبيطي لسلالات (*Pediococcus*) المعزولة تجاه بعض الجراثيم الممرضة والمسببة لفساد الأغذية، وتحديد طبيعة الأثر التثبيطي الناتج تجاه بعض الأنواع الممرضة.

5- تحديد مورثة البديوسين الموجودة في السلالات المعزولة باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR).

الدراسة المرجعية Literature Review:

1- بكتيريا *Pediococcus* :

1-1- تسمية بكتيريا *Pediococcus* : (*Pediococcus* bacteria naming)

سُميت البكتيريا باسم *Pediococcus cerevisiae* عام (1884) من قبل العالم Palc ولكن هذه التسمية لم تكن واسعة الانتشار (Garvie، 1974). وفي عام (1988) عزلت Leandes أنواعاً من بكتيريا (*Pediococcus*) من البيرة، واستطاعت تحديد أنواع (*Pediococcus acidilactici*) و (*Pediococcus cerevisiae*)، بعد ذلك عام (1903) درس Clausen فلورا البيرة وقام بتعديل اسم (*P. cerevisiae*) لتصبح تحت مُسمى بكتيريا (*P. damnosus*)، ثم قامت Mais (1934) بإدخال رقم التعريف الشخصي لهذه البكتيريا.

تصنيف بكتيريا الـ *Pediococcus* : (Classification of *Pediococcus* bacteria)

تنتمي بكتيريا (*Pediococcus*) إلى مجموعة بكتيريا حمض اللبن، ويتبع جنس (*Pediococcus*) عائلة (Lactobacillacea)، ويُعتبر من البكتيريا البيضوية، موجبة الغرام تحت المجهر، سالبة الكاتلاز (Garvie، 1986)، لاهوائية اختيارية، ولا تمتلك القدرة على تكوين الغاز، كما تُعتبر بكتيريا (*Pediococcus*) غير متحركة وغير منتجة للنترات (Schlegel و Zaborosch، 1993)، تنمو هذه البكتيريا بشروط درجة حرارة (25° م إلى 40° م) (Holt وزملاؤه، 1994)، ودرجة pH (4.5-7.0) (Garvie، 1986)، تستطيع بعض الأنواع التابعة لجنس (*Pediococcus*) تحليل الأرجنين (Holt وزملاؤه، 1994)، كما تمتلك نظاماً مشابهاً للكاتلاز (non - henepseudocatalase) (Leisner وزملاؤه، 1999).

ويضم جنس (*Pediococcus*) بحسب اللجنة الدولية لتسمية البكتيريا (the international committee on systematic Bacteriology) الأنواع المتواجدة بنسب صغيرة في الأجبان ضمن الفلورا الطبيعية للجبن المصنَّع من حليب غير معاملة حرارياً منها: (*P. acidilactici*، *P. urinae*، *P. parvulus*، *P. halophiles*، *P. damnosus*، *P. Pentosaceus*، *P. cerevisiae* و *P. equi*) (Beresford، 2003؛ Tamime and Marshall، 1997).

كما يحتوي جنس *pediococcus* على عدة أنواع مهمة في الصناعة، منها:

1-*Pediococcus acidilactici*:

وُجدت البكتيريا التابعة لهذا النوع على أسطح النباتات وفي الحليب، درجة الحرارة المثلى لنموها (40 م°)، كما أنها قادرة على النمو بدرجة حرارة (50 م°). ويعتبر تعديل رقم pH العينة المستخدمة للزراعة والعزل الى الدرجة 6 يساعد على نمو وعزل النوع (*Pediococcus acidilactici*)، وقد وجد أنه و أثناء النمو تنخفض درجة الـ pH الى مستويات منخفضة قد تصل إلى 3.6 (Anastasiadou وزملاؤه، 2008)(b)، كما أن معظم السلالات التابعة للنوع (*Pediococcus acidilactici*) تُخمر الغلوكوز، الرايبوز، الكزايروز، الفركتوز، الغلاكتوز إلى (DL-lactate)، وبعض السلالات قادرة على تخمير اللاكتوز، السكروز والمالتوز (Ray، 1995)، وتملك بعض السلالات القدرة على إنتاج مركبات بروتينية مضادة لنمو البكتيريا تدعى البيديوسين، و تختلف شروط إنتاج هذه المركبات عن ظروف النمو المثلى المطلوبة، ويُستخدم (*P. acidilactici*) في جميع أنحاء العالم في تخمير الخضروات (كمخلل الملفوف ومنتجات اللحوم (كالنقانق الجافة) (Sire وزملاؤه، 1992).

***Pediococcus pentosaceus* -2**

يشارك هذا النوع مع النوع (*P. acidilactici*) في العديد من الخصائص، إلا أنه غير قادر على النمو بدرجة حرارة (50م°)، كما يقاوم تركيز الملح حتى (10 %)، ودرجة الحرارة المثلى للنمو تتراوح بين 28 و35م°، كما أن معظم السلالات التابعة لهذا النوع تخمر الجلوكوز، الأرابينوز، الرايبوز، الغالاكتوز، الفركتوز إلى (DL-lactate)، والقليل منها يخمر اللاكتوز والكزابلوز (Ray، 1995)، (Dobrogosz و Stone، 1962)، (Delwiche، 1961).

أُستخدِمت *P. pentosaceus* بشكل واسع في تحضير النفاثات المتخمرة، كما تلعب أيضاً دوراً هاماً في تخمير السيلاج، وأشارت الدراسات إلى وجودها في منتجات الألبان المتخمرة والمنتجات النباتية المتخمرة (Kimura وزملاؤه، 1997).

***Pediococcus damnosus* -3**

يوجد هذا النوع في منتجات النبيذ والخل، ويُعتبر الملوث الرئيسي في صناعة الخميرة، حيث يُعتبر من بين الكائنات الحية الدقيقة الأكثر انتشاراً المسببة للتلف في النبيذ (Campbell، 1996).

تبلغ درجة الحرارة المثلى لنموه (22م°)، ودرجة الحموضة المثلى (pH 5.5)، كما أنه لا ينمو بتركيز كلوريد الصوديوم (4%). وهو غير قادر على تحليل الأرجنين، الأرابينوز، الكزابلوز واللاكتوز، كما أن معظم السلالات التابعة لهذا النوع قادرة على تخمير الجلوكوز، السكروز والغالاكتوز تخمراً متجانساً، وبعض السلالات فقط قادرة على استقلاب المالتوز والسكروز، وحظيت باهتمام الباحثين كمسبب لفساد النبيذ والجعة (Suzuki وزملاؤه، 2004).

كما يُعتبر هذا النوع حساس لبكتريوسين النيسين التي تنتجها (*Lactococcus lactis*) (1990, Delves–Broughton)، و (pediocin AcH) المُنتَج من (*P. acidilactici*) (Green وزملاؤه، 1997) .

2- عزل *Pediococcus*:

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 المتخمّر وقاموا بتصنيفها بواسطة API50CHL فكانت 20 سلالة منها تنتمي الى *Pediococcus acidilactici* و *P. pentosaceus* و *P. lolii* وسلالة واحدة صُنفت على أنها تنتمي الى مجموعة *Lactobacillus pentosus-plantarum*.

2-1- عزل *Pediococcus* من الحليب ومنتجاته:

قام Tserovska وزملاؤه (2002) بعزل بكتيريا حمض اللبن من لبن وجبن الماعز في بلغاريا على بيئة (MRS Agar)، فتم عزل 18 سلالة من سلالات بكتيريا حمض لبن و توصيفها، فوجدوا أن 5.55% من العزلات كانت تتبع (*P. acidilactici*) و 5.55% من العزلات كانت تتبع (*P. pentosaceus*) .

كما درس Badis وزملاؤه (2004) 25 عينة من حليب الماعز الخام في الجزائر، عزل منها 725 عزلة على بيئة (MRS Agar) و (M17 Agar) فوجدوا أن 4.1% من العزلات وكانت

من جنس *Pediococcus* (1.65% من النوع *P.acidilactici*، 0.8% من النوع *p.damnous* و 0.41% من النوع *P.parvulus*).

درس Gurira و Buys (2005) العزلات المتحصل عليها من عينات مصنعة من حليب الأبقار مصنعة بالطريقة التقليدية والتي بلغت (606) عزلة، فوجدوا أن 18% من هذه العزلات قد أثبتت الخصائص الأولية لجنس (*Pediococcus*) من خواصها تحت المجهر وصبغة غرام، وبالأستعانة بالاختبارات البيوكيميائية عبر نظام (API 50CHL) وجدوا أن 49 عزلة من بكتيريا *Pediococcus* (8.08%) من مجموع العزلات تنتمي الى النوع *P.acidilactici* و 61 عزلة من جنس *Pediococcus* (10.06%) من مجموع العزلات تنتمي الى النوع *P.pentocaseus*.

كما قام Abbasilisi وزملاؤه عام (2012) بعزل بكتيريا حمض اللبن من منتجات الحليب التقليدية والمنتجة للمواد المثبطة للميكروبات فعزل ما مجموعه 222 سلالة من بكتيريا حمض اللبن وتم تحديد 11 عزلة بكتيريا حمض لبن التي أنتجت مواد مضادة للميكروبات وهي (*P. acidilactici*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactococcus lactis*) وامتلكت سلالات *P. acidilactici* أقوى قدرة تنبيلة لنمو بكتيريا (*L. monocytogenes*).

وقام Zuo وزملاؤه (2014) في الصين بعزل ثلاثين سلالة من بكتيريا حمض اللبن من منتجات الألبان التقليدية، حيث تم التعرف على الأنواع (*Lactobacillus* و *Lactococcus* و *Enterococcus* و *Pediococcus* و *Leuconostoc*)، وتم تقييم ومقارنة خصائص التخمر في السلالات بما في ذلك تخمير الحليب والبروتينات والنشاط المضاد للميكروبات وإنتاج الداي أسيتيل (*Dye acetyl*).

2-2- عزل *Pediococcus* من اللحم ومنتجاته:

جمع Osmanagaoglu وزملاؤه (2001) في دراستهم أربع منتجات تجارية مختلفة من السجق المتخمّر من السوق المحلية في أنقرة-تركيا، فكانت 10 عزلات من بكتيريا حمض اللبن، وتم التأكد من خلال الاختبارات البيوكيميائية أن عزلة واحدة (10%) تنتمي الى النوع *P.pentocaseus* وعزلتان (20%) تنتميان الى النوع *P.acidilactici*.

كما درس Mandal وزملاؤه (2011) عينات من منتجات اللحوم الجاهزة للأكل من السوق المحلية في الهند، ومن خلال الاختبارات البيوكيميائية تم التأكد أن عزلة واحدة (5%) تنتمي الى النوع *P.pentocaseus* و عزلتان (10%) تنتميان الى النوع *P.acidilactici*.

و قام كل من Naimi و Khaled (2014) بعزل 30 سلالة من بكتيريا حمض اللبن من اللحم في الجزائر بهدف استخدامها في الحفظ الحيوي، وجد أنّ 20% (6 عزلات) منها تنتمي الى جنس *Pediococcus* وتراوح قطر منطقة تثبيط نمو بكتيريا *Staphylococcus aureus* في 4 من سلالات *pediococcus* بين 0.5 و 5.16 ملم.

كما عزل Parente وزملاؤه (2001) بكتيريا حمض اللبن من السجق المتخمّر المنتج في جنوب إيطاليا لدراسة التنوع الظاهري فكانت 22% من العزلات تنتمي الى spp. *Pediococcus*.

وفي دراسة قام بها Olaoye وزملاؤه (2008) لتحسين ظروف نمو بكتيريا *Pediococcus* واختبار مدى ملائمتها لحفظ اللحوم، إذ اختبروا قدرة خمس سلالات والتي تمّ اختيارها من عدة سلالات معزولة من لحم العجل لانتاج حمض اللبن بوجود تراكيز مختلفة (2، 4، 6، 8 و 10

(% من مالتوز، غلوكوز، غالاکتوز، سوربيتول ومانيتول، وتم تحديد تراكيز حمض اللبن بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC)، حيث وُجد الإنتاج الأعلى من حمض اللبن بوجود الغلوكوز والغالاکتوز مقارنةً مع مصادر الكربون الأخرى، وتم تسجيل تراكيز (17.29 و 17.19) غ/ل لسلالة *P. acidilactici* FLE02 في أوساط تحوي 2% من كل نوع من السكريات، وكانت إنتاجية الحموض العضوية أقل من 10 غ/ل بوجود المانيتول، المالتوز والسوربيتول بغض النظر عن تركيزها، و استخدام *P. acidilactici* FLE02 و *P. acidilactici* FLE01 مع 2% و 4% من الغلوكوز أنتجت كميات محسنة من حمض اللبن وبالتالي يمكن أن تستخدم السلالات المذكورة كبدائنات للحفاظ على منتجات اللحوم.

3- البكتريوسينات: Bacteriocins

تُعرّف البكتريوسينات بأنها بروتينات معقدة فعالة بيولوجياً كمضادات ميكروبية ضد البكتيريا الأخرى، وبشكل رئيسي على الأنواع القريبة منها، وهي تُنتج من البكتيريا ولا تُستخدم عادة مع المضادات الحيوية لتجنب التضارب والتأثير السلبي في فعالية المضادات الحيوية العلاجية أو خفض فعاليتها، والتي من الممكن أن تكون محرمة صحياً وتسبب الحساسية للإنسان و تُسبب مشاكل صحية أخرى. (Deraz وزملاؤه، 2005)، وتختلف البكتريوسينات عن معظم المضادات الحيوية العلاجية بكونها عوامل بروتينية وبالتالي فهي تتفكك بأنزيم البروتياز في الجهاز الهضمي لدى الإنسان، ويتم اصطناعها رايبوزومياً مما يسمح بإمكانية تحسين صفاتها لزيادة فعاليتها ومجال تأثيرها وتصنيعها بأوزان جزيئية صغيرة (Saavedra وزملاؤه، 2004).

يُعتبر انتاج البكتريوسين ميزة مهمة لمنتجات الأغذية والأعلاف، حيث يمكن لهذه الببتيدات أن تقتل أو تثبط البكتيريا الممرضة في البيئة أو الوسط الغذائي عند استخدامها بكميات

مناسبة. بالإضافة إلى أن عدة بكتريوسينات لها مجال تأثير ضيق وغالباً يكون أكثر تأثير على البكتيريا القريبة من حيث المتطلبات الغذائية (Deegan وزملاؤه، 2006). يُؤخذ بعين الاعتبار الطيف المضاد للبكتيريا، الأنواع المنتجة، الوزن الجزيئي، الثباتية، الصفات الفيزيائية والكيميائية، وطبيعة تأثير البكتريوسينات، التي تشكل مجموعات غير متجانسة. يُوجد نمط تقليدي له طيف تأثير فقط ضد الأنواع المتماثلة. والنمط الثاني أقل شيوعاً، بحيث يُظهر طيف تأثير ضد أنواع عديدة من البكتيريا موجبة الغرام. أحد أمثلة النمط الثاني من البكتريوسينات هو النيزين، والذي يُنتج من سلالات محددة من *Lc. lactis subsp lactis* ، والثاني هو البديوسين المنتج من (*P. pentosaceus*) (Moreno وزملاؤه، 2000)، يُعدّ النيزين المنتج من (*Lc. lactis subsp lactis*) فعالاً ضد البكتيريا سالبة الغرام فقط عندما يُستخدم بتركيز عالية أو عندما تُعامل الخلية الهدف بـ EDTA، كون الغشاء الخارجي لهذه البكتيريا يعمل كحاجز حماية للخلية (Stevens وزملاؤه، 1991)، وأشارت بعض الدراسات إلى فعالية البكتريوسين على مجموعات من البكتيريا مثل (البلاننتاريسين 35d) المنتج من (*Lactobacillus plantarum*) وفعال ضد (*Aeromonas hydrophila*) (Torodov and Diks, 2004)، والبكتريوسين المنتج من (*Lb. paracasi subsp paracasi*) فعال ضد (*E. coli*) (Caridi، 2002)، وبكتريوسين ثيرموفيلين Thermophilin المنتج من (*Streptococcus thermophiles*) فعال ضد (*E. coli*، *Yersinia* *Pseudotuberculosis* و *S. typhimurium*) من بين الأنواع سالبة الغرام، وضد عدة أنواع من جنس (*Bacillus* و *L. monocytogenes*) من البكتيريا موجبة الغرام (Ivanova وزملاؤه، 1998)، البكتريوسين (ST26MS و ST28MS) المنتجين من (*Lb. plantarum*)

المعزولة من المولاس (Torodov and Dicks, 2005)، تثبط نمو (*E. coli*) و (*Acinetobacter baumanii*) والبكتيريا موجبة الغرام (Lade وزملاؤه، 2006).

عُزل نوعين من جنس (*Lactobacillus*) هما (*Lb. plantarum* و *Lb. lactis*) من مخلفات الخضروات والتي أنتجت بكتريوسين يثبط نمو (*E. coli*).

واكتسبت بكتيريا حمض اللبن أهمية خاصة بسبب إنتاجها للبكتريوسينات (Todorov, 2005)، ويمكن أن تطبق هذه المواد في صناعة المواد الغذائية والمواد الحافظة الطبيعية ويعتبر استخدام بكتيريا حمض اللبن ومنتجاتها في التمثيل الغذائي آمن (GRAS) بشكل عام، مما يجعلها آمنة للاستهلاك البشري، ودلت الدراسات إلى كفاءة استخدام البكتريوسينات في تحسين جودة الغذاء وخصائصه الحسية كزيادة معدل التحلل البروتيني أو منع تشكل الغازات التي تسبب آثاراً سلبية في الأجبان المصنعة (Ross وزملاؤه، 2002).

3-1- تسمية البكتريوسينات Bacteriocins Naming:

يُشتق اسم البكتريوسين من النوع أو جنس البكتيريا المنتجة له مع إضافة مقطع (in) أو (cin) في نهاية اسم البكتيريا مثل البديوسين المنتج من جنس *Pediococcus*، والكوليسين أخذ تسميته من النوع (*E. coli*) (Konisky, 1982).

تنتج بعض السلالات أكثر من نوع من البكتريوسينات مثل (*Lb. acidophilus*) إذ تُنتج ثلاثة أنواع من البكتريوسينات هي الاسيدوفيلين، والاكتوسين A، والاسيديسين، وتعتمد التسمية على أساس صفة أو ميزة معينة تمتلكها هذه البكتريوسينات (Gilliland, 1989)، أما النيزين (Nisin) فقد جاءت تسميته من المجموعة التصنيفية (Group N streptococci) التي تعود إليها بكتيريا (*Lc. Lactis*) فأُطلق عليه (Group N inhibitory substance) وأُختصرت إلى Nisin (Daeschel, 1989)، وقد يُطلق اسم السلالة على البكتريوسين

لتمييزه عن البكتريوسينات الأخرى المنتجة من النوع نفسه مثل (Bifilact Bb-12) والمنتج من بكتيريا (Bifidobacterium lactis Bb-12) (Abd El-Salam وزملاؤه، 2004).

2-3- تصنيف البكتريوسينات الناتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام

(Bacteriocins produced from positive gram bacteria classification):

اقترح Klaenhammer (1993) تصنيف البكتريوسينات المنتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام و من ضمنها بكتيريا حمض اللبن (LAB) إلى أربعة أصناف رئيسة اعتماداً على الوزن الجزيئي، الثبات الحراري، حساسيتها للإنزيمات و وجود الأحماض الأمينية المحورة.

1-2-3 - الصنف الأول (Class I):

يُسمى هذا الصنف (lantibiotic) ويشير هذا المصطلح إلى صنف متنوع من البكتريوسينات المحتوية على أحماض أمينية محورة مثل اللانثيونين ومثيلان ثيونين أو أحماض أمينية تحتوي روابط مزدوجة غير مشبعة مثل الديهايدرولانين، والديهايدروبيوترين. تُخلَق كل أنواع الـ lantibiotics تُخلَق داخل الرايبوسومات، إذ تمرّ بسلسلة تعديل للبروتينات بعد أن تترجم في الـ DNA، تُعدّ الأحماض الأمينية المحورة المكونات الأساسية للبيتيدات الفعالة بيولوجياً و تُنتج هذه المجموعة في البكتيريا الموجبة لصبغة غرام فقط، ويبلغ وزنها الجزيئي أقل من 5000 دالتون (Jung,1991).

يضم هذا الصنف عدة أنواع هي (A، B، C) النوع A يتواجد على شكل سلسلة مطولة و مستقيمة من الأحماض الأمينية تحمل الشحنة الموجبة، ويتكون من مجموعتين هما (AI و All) ومن أمثلة هذا النوع (Nisin A و Nisin U)، أما النوع B فهو بروتين كروي ذو وزن جزيئي صغير، ويرتبط إنتاج هذه البكتريوسينات بتنشيط بعض الإنزيمات الخاصة في الخلية، وتملك هذه البكتريوسينات شحنة سالبة أو متعادلة و تُعدّ منتجات *Bacillus spp.* أحد أنواع

هذه المجموعة (Altena وزملاؤه، 2000)، أما النوع C من البكتريوسينات فهي تحتوي على اثنين من الأحماض الأمينية المحورة، ويُعتبر نشاطها التثبيطي أقل من الأنواع الأخرى، ومثالها Yonezawa and (Smb) Streptococcus mutans bacteriocin (Kuramitsu, 2005).

Class II -2-2-3 الصنف الثاني

يشمل هذا الصنف كل البكتريوسينات ذات الوزن الجزيئي الأقل من 10 كيلو دالتون و تتميز بكونها ثابتة تجاه الحرارة و لا تحتوي على أحماض أمينية محورة أو كروية، حيث تحتوي على روابط ثنائية لأكثر من 40 حمض أميني، يضم هذا الصنف حوالي 50 نوع من البكتريوسينات، وعُزلت السلالات المنتجة لهذه البكتريوسينات من فم أمعاء في الإنسان، الحيوان، منتجات الألبان و الأغذية، و يضم هذا الصنف ثلاثة أنواع هي (a، b، c). (Eijsink وزملاؤه، 1998)

Class II -1-2-2-3 النوع A:

يحتوي هذا النوع على أكثر من 20 بكتريوسين يُطلق عليها (Pediocin-like bacteriocins)، وتتميز بفعاليتها في تثبيط (*L. monocytogenes*) الموجودة في الأغذية لذا تسمى (anti- listerial)، هذه الخاصية دفعت الباحثين إلى دراسة هذه المجموعة لاستعمالها كمواد حافظة للأغذية، يُعدّ البديوسين (Pediocin) المنتج من بكتيريا (*P. acidilactici*) نموذجاً لهذه المجموعة من البكتريوسينات وهو النوع الوحيد الموجود تجارياً تحت اسم (AltaTm2341 anti-listeria) والمستعمل في حفظ الأغذية (Rodriguez وزملاؤه، 2002).

تحمل السلسلة الببتيدية في هذه البكتريوسينات الشحنة الموجبة وتقع نقطة التعادل الكهربائي لها بين (8 و 10)، ويكون الطرف الأميني للسلسلة الببتيدية من النوع المحب للماء، ويكون تركيبه من نوع (β -sheet) ويكون هذا التركيب ثابتاً نتيجةً لوجود روابط ثنائية الكبريت أما الطرف الكربوكسيلي فيكون إما كارهاً للماء أو متغاير الألفة للماء و يتضمن 1 أو 2 من تركيب α -helices (Drider وزملاؤه، 2006).

تتكون السلسلة الببتيدية في هذه البكتريوسينات من (37-48) حمض أميني، و تحتوي النهاية الأمينية للسلسلة الببتيدية على الأحماض الامينية YGNGV فضلاً عن وجود روابط ثنائية الكبريت التي تربط بين جزيئات الحمض الأميني (Cysteine) ؛ لهذا تعطي البكتريوسينات طيف تثبيطي واسع تجاه الكائنات الحية الدقيقة الأخرى (Heng وزملاؤه، 2007).

3-2-2-2- النوع (B و C):

تتكون البكتريوسينات الموجودة في النوع (B) من سلسلتين ببتيديتين أو أكثر من أجل إحداث التأثير التثبيطي الأمثل، لهذا تقسم الببتيدات إلى قسمين، الأول أُطلق عليه (Synergistic) والثاني (Enhancing) مثل (Thermophilin 13) المنتج من بكتيريا (*Streptococcus thermophiles*)، إذ يتكون من سلسلة ببتيدية (ThmA) التي تبدأ عملية التثبيط ثم تعزز بسلسلة أخرى هي (ThmB) لإكمال عملية التثبيط (Marciset وزملاؤه، 1997).

تعرف (Cintas *et al.* 1998) على اثنين من البكتريوسينات الناتجة من بكتيريا (*Enteriococcus faecium* L50) هي (Enteriocin L50A) و (Enteriocin L50B)، حيث تمتلك صفات الصنف الثاني نفسها، وهي قادرة على تثبيط (Staphylococci) وصُنِفَت

ضمن نوع جديد أطلق عليه (IIC)، يحتوي هذا النوع بقية البكتريوسينات التي لا توجد ضمن (IIa و IIb) مثل (sakacin Q) الذي ينتج من بكتيريا (*Lb. sakei*) (Mathiesen) وزملاؤه، (1997)

3-2-3 - الصنف الثالث (Class III):

يضم هذا الصنف البكتريوسينات ذات الأوزان الجزيئية الأكثر من 10 كيلو دالتن، وهي غير ثابتة حرارياً عدا (Propionicin SM1) المنتج من (*Propionibacterium jensenii*) (Miescher) وزملاؤه، (2000)

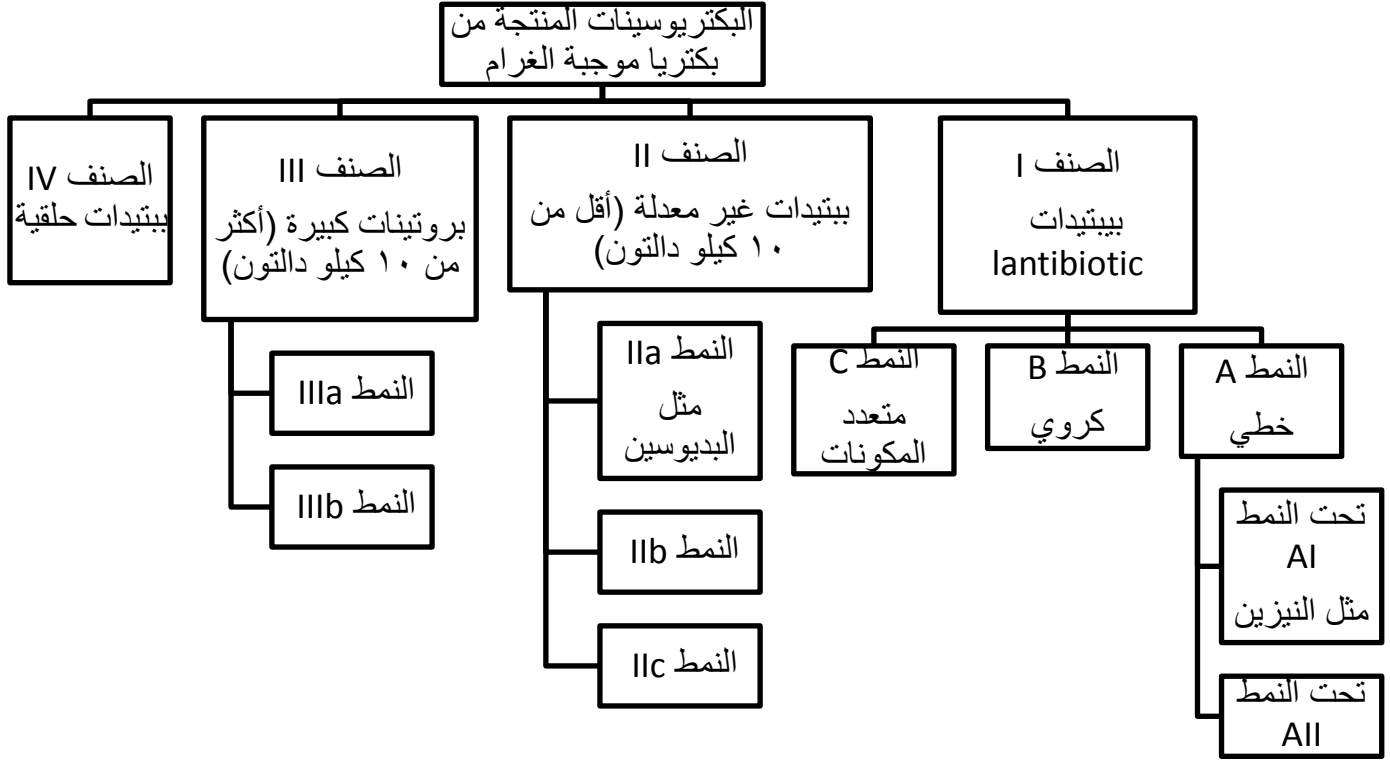
فُسِّم هذا الصنف إلى نوعين، البكتريوسينات التي تتواجد بصورة أنزيمات محللة للخلية مثل (Enterolysin A) المنتج من بكتيريا (*Enterococcus faecalis*) و يتميز بمدى تنشيط واسع، وتكمن آلية عمله من خلال الالتصاق بالخلية بواسطة الطرف الاميني لببتيد البكتريوسين وتحليل الخلية، لذا فهو يشابه عمل البكتريوفاج (Nilsen) وزملاؤه، (2003). أما النوع الثاني فإن آليته التنشيطية غير معروفة، ويمثل (Streptococcin A-M57) المنتج من (*Streptococcus pyogenes* M-types 57 and 69) أحد أفراد هذا النوع ويبلغ وزنه الجزيئي (17000) دالتون وهو يخلق في البلاسميد (Heng) وزملاؤه، (2004).

3-2-4 - الصنف الرابع (Class IV):

يشمل هذا الصنف البكتريوسينات الحلقية التي تخلق في الرايبوسومات، إذ تتكون الببتيدات بعد عملية الترجمة في (DNA)، حيث يرتبط الحمض الاميني الأول في السلسلة الببتيدية مع الأخير بواسطة رابطة تساهمية، و يحدث ما يسمى ربط الرأس بالذيل، ويضم هذا الصنف عدداً قليلاً من البكتريوسينات، مثل (Enterocin AS-48) الذي يُنتَج من بكتيريا (*Enterococcus faecalis*) (Maqueda) وزملاؤه، (2004).

ويُظهر الشكل (1) تصنيف البكتريوسينات المنتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة الغرام

من حيث الأصناف الأربعة، والأنماط التابعة لها (Cotter وزملاؤه، 2005).



شكل (1) تصنيف البكتريوسينات المنتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة الغرام.

4- المقدرة التثبيطية لبكتيريا *Pediococcus* تجاه بعض الأنواع الممرضة:

تنتج أنواع من جنس *Pediococcus* البكتريوسينات والتي تصنف ضمن الدرجة الثانية للبكتريوسينات (Cotter et al., 2013)، ويطلق عليها (pediocin) لأن الببتيد الأول المضاد للميكروبات الذي ينتمي إلى هذه الفئة يطلق عليه (pediocin PA-1) والذي تم الحصول عليه من (*Pediococcus*) (Pucci، 1988)، ولهذه الببتيدات حجم متغير يتراوح من (2.7-4.6) كيلو دالتون وهي ثابتة تجاه الحرارة وتنشط في مجال واسع من الرقم الهيدروجيني (pH) (Henderson وزملاؤه، 1992) (Ray and Miller، 2000)، مع تماثل عالي في التسلسل

(High Sequence Homology) والروابط ثنائية الكبريت والتسلسل المحفوظ (conserved)
et al.,2002) (N-terminal domain) YGNGVXC (motif في تسلسل النهاية الأمينية
(Rodriguez)، وعزل فيما بعد البديوسين pediocin من أنواع تابعة لأجناس أخرى مثل
(Papagianni and) (Bacillus و Enterococcus، و Lactobacillus)
(Anastasiadou,2009). من المعروف أن الـ (pediocin) يمنع نمو مسببات فساد الأغذية
ويملك نشاط عالي التخصص ضد الليستيريا المستوحدة (*Listeria monocytogenes*).
لذلك حظي باهتمام خاص من قبل الباحثين لتوصيف أفضل بكتريوسين بسبب معدلات الوفيات
والإصابات العالية المرتبطة بالليستيريات (Millette وزملاؤه، 2007) (Bachand,2006)
(Kostrzynska and).

وجد Marugg وزملاؤه (1992) أن الجينات اللازمة لإنتاج (pediocin PA-1) تنتظم في
أوبرون (operon) موجودة على البلازميد (pSRQ11(9.4kb)) في السلالة البكتيرية
(*P. acidilactici* PAC1.0) ويتكون الأوبرون ped من الجينات (pedA، pedB، pedC
و pedD).

قام الخزاعي وزملاؤه (2011) باختبار العزلات الأكثر إنتاجاً للبيديوسين من خلال قطر هالة
التثبيط و أشار إلى قدرة البيديوسين الناتج من (*P. pentosaceus* JCM2026) على إعطاء
هالة تثبيط قطرها (6 ملم) تجاه بكتيريا (*L. monocytogenes*)، في حين البيديوسين الناتج
من (*P. pentosaceus* JCM5890) أعطى تثبيطاً "ضعيفاً" (2 ملم).

كما درس Mandal وزملاؤه (2014) النشاط المضاد للبيديوسين pediocin المنتج من (*P.*
acidilactici NCIM 2292) ضد أنواع مختلفة من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام،

فكان له قدرة تثبيطية ضد (*Staphylococcus aureus* ، *Listeria monocytogenes*) و (*Bacillus subtilis*) ولم يثبط نمو (*Bacillus cereus*) وجميع أنواع بكتريا حمض اللبن والبكتريا سالبة الغرام، كما أظهر البيديوسين pediocin حساسية للإنزيمات المحللة للبروتين، وقاموا بتتقية البيديوسين المُنتَج وسُمِّي (pediocin 2292) وزنه الجزيئي (5.0) كيلو دالتون، وأشارت خصائصه لإمكانية استخدامه في الحفظ الحيوي للمنتجات الغذائية .

أشار Singh وزملاؤه (2014) إلى انخفاض الوزن الجزيئي للبيتيد المضاد للميكروبات الذي تم عزله وتنقيته من *P. pentosaceus* IE-3 (1.7 كيلو دالتون) وفقدان التسلسل المحفوظ YGNGVXC الموجود في باقي البكتريوسينات كالا pediocin ، كما أظهر هذا البيتيد زيادة في نشاطه التثبيطي ضد سلالات الاختبار الموجبة والسالبة لصبغة غرام بتطبيق شروط منخفضة لكنه لم يؤثر في غيرها من سلالات بكتريا حمض اللبن والفطور، بالتالي تنتشط هذه البيتيدات تحت شروط حفظ المنتجات المصنعة باللحوم، منتجات الألبان والأطعمة المعلبة حيث تسود ظروف مضادة للأكسدة.

4-1- التحري عن النشاط المضاد للأحياء الدقيقة لسلالات *Pediococcus* وإنتاج

البيديوسين:

درس كل من Sukumar و Ghosh (2010) النشاط المضاد للميكروبات لأنواع *Pediococcus* المعزولة من الأغذية المتخمرة في الهند بطريقة الانتشار المضاعف واستخدموا (*E.coli* ، *P.aeruginosa* و *L.monocytogenes*) كمؤشرات فكانت متوسطات أقطار التثبيط (25.3، 18.83 و 17.33) مم على التوالي.

درس Senthikumar وزملاؤه (2012) النشاط المضاد للميكروبات باستخدام البكتريوسين المنقى جزئياً من بكتيريا *Pediococcus* ضد البكتيريا الممرضة (*B.cereus* ، *V.cholerae*) ، *S.sonnei* و *S.aureus*) بطريقة الانتشار المضاعف فكان متوسط أقطار التثبيط (20 ، 18 ، 20 و 21) على التوالي.

4-1-1. استخدام تقنية الـ PCR في تحديد مورثة البديوسين:

أُستعملت تقنية الـ PCR للكشف عن الجينات المسؤولة عن إنتاج البكتريوسينات في سلالات البكتيريا، حيث تعتمد هذه التقنية على تضخيم تسلسل محدد من المادة الوراثية، وقد أستخدمت في منتصف الثمانينات من القرن الماضي، وهي قابلة للتطبيق على أنواع عديدة من البكتيريا، وتحتاج لفترة قصيرة لا تزيد عن 24 ساعة، إضافةً إلى أنها لا تحتاج لعملية إغناء مسبقة (Lazcka *et al.*, 2007)، وذلك باستخدام مرئسات (Primers) مختلفة (Touren *et al.*, 2005)، وقد تم تطوير هذه التقنية للحصول على نتائج دقيقة بأقل فترة ممكنة، إلا أنه لا يمكن استخدام تقنية الـ PCR سوى للكشف عن خلايا البكتيريا الحية فقط، وذلك لأنها تعتمد على المادة الوراثية (Yaron and Mathews, 2002).

كما استعملت تقنية الـ PCR للكشف عن المورثة المسؤولة عن إنتاج النيزين واللاكتيسين (481) المأخوذين من بكتيريا (*Lc. lactis subsp. Lactis*) المعزولة من الحليب الخام والجبن (Garde وزملاؤه، 2001)، وقد تم تشخيص مورثة (Ped A) باستعمال تقنية الـ PCR و هو أحد الجينات التي تنتج البديوسين في سلالات بكتيريا (*P. acidilactici* UVA1) المعزولة من براز الأطفال (Mathys وزملاؤه، 2007)، ودرست الجينات المسؤولة عن إنتاج mesenterocin Y105 و mesenterocin E131 الناتجان من بكتيريا

Xiraphi (Leuconostoc mesenteroides E131) المعزولة من السجق اليوناني المتخمّر (et al., 2008).

قام Albano وزملاؤه (2007) بتمييز المورثات المرمزة لإنتاج البديوسين مستخدمين براميرات (بادئات) (ped pro و ped 1041) والتي تضخم شدة بطول (bp1044)، كما طور Devi و Halami (2011) طريقة PCR لتحديد مورثة بديوسين PA-1 ومورثات البديوسين (Ped A و Ped AB) من خلال تضخيم مناطق الـ DNA بطول (bp362 و pb600).

كما كشف Aldujaili (2014) عن المادة الوراثية لبكتيريا حمض اللبن المنتجة للبكتريوسين المعزولة من الألبان، فحصل على 30 عزلة من بكتيريا حمض اللبن من اللبن المتخمّر والمعلب من مناطق متعددة من محافظة النجف وأجري غريلة سريعة لمعرفة قابلية العزلات على إنتاج البكتريوسين (pediocin، plantaricin و enterocin) من خلال الكشف عن مورثات هذه البكتريوسينات من خلال استعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل مع بادئات خاصة بها، فأبدت النتائج أن ثمانية عشر فقط من السلالات المعزولة أظهرت إحدى الحزم الخاصة فكانت 11 عزلة بنسبة (61.1%) أظهرت حزمة بطول bp428 زوج قاعدي والتي تشير إلى وجود مورثة الـ plantaricin وهي النسبة الأعلى و 5 (27.8%) عزلة منها أظهرت حزم بطول bp 332 والتي تشير إلى وجود جين الـ pediocin فيما كان 2 (11.1%) منها أظهرت حزم بطول 412 زوج قاعدي مما يشير إلى وجود مورثة الـ enterocin، كما استعمل طريقة الحفر بالأغار لتأكيد فعالية البكتريوسينات المنتجة من بكتيريا حمض اللبن ضد بكتيريا (*Pseudomonas aeruginosa*) الممرضة.

4-3- دراسة تأثير العوامل البيئية في إنتاج البديوسين:

درس Anastasiadou وزملاؤه (2008) (b) العوامل الغذائية المختلفة المؤثرة في إنتاج البديوسين متضمنة مصدر الكربون (الغلوكوز، السكروز، الفركتوز، الغالاكتوز والجليسيرول)، فكان الغلوكوز أفضل مصدر للكربون، كما تمت دراسة تأثير الأملاح المختلفة في إنتاج البديوسين فكان لإضافة (NH_4PO_4 ، CaCl_2 و KH_2PO_4) تأثير مثبط في إنتاج البديوسين بينما كان لإضافة ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) تأثير كبير في زيادة إنتاج البديوسين.

4-3-1- تأثير درجات الحموضة (pH) المختلفة:

درس Kaur و Tiwari (2017) تأثير درجة الحموضة (pH) في نمو بكتيريا (*P. pentosaceus*) وعلى نشاطها المضاد للميكروبات، حيث وصل نموها باستخدام عامل الكثافة (OD_{600} 1.2) الى (1.5) ونشاط المضاد للميكروبات الى (18مم) عند درجة pH (5-8)، وكان أفضل كثافة نمو في درجة الـ pH (6.8 - 8) ($\text{OD}_{600}=1.5$) وانخفض النمو إلى (1) مع انعدام الأثر التنشيطي عند درجة الـ pH المنخفضة (3 و 4) وعند درجات الـ pH المرتفعة (9 و 10).

4-3-2- تأثير درجات الحرارة المختلفة:

درس Kaur و Tiwari (2017) تأثير درجة الحرارة في نمو بكتيريا (*P. pentosaceus*) ونشاطها المضاد للميكروبات، حيث نمت البكتيريا على درجات الحرارة (30، 37 و 42°م) ولكن حصل أفضل نمو لها عند الدرجة (37°م) حيث بلغ (OD_{600} 1.2)، بينما كان النمو عند درجتي الحرارة (30 و 42°م) (OD_{600} 1.0 و 0.7) على التوالي، فكان النمو عند درجة الحرارة 42°م

(50%) تقريباً" مقارنة مع النمو عند درجة الحرارة (37°م).

4-3-3- تأثير تراكيز كلوريد الصوديوم المختلفة:

درس Kaur و Tiwari (2017) تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في نمو بكتيريا (*P. pentosaceus*) ونشاطها المضاد للميكروبات، حيث بلغ أفضل نمو للبكتيريا ($OD_{600} \sim 1.3$) وأفضل نشاط مضاد للميكروبات (قطر منطقة التثبيط ~ 21 مم) بعدم وجود كلوريد الصوديوم، بينما تناقص النمو كلما زاد تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط، كذلك تناقص الأثر التثبيطي كلما زاد التركيز واختفى عند تركيز (6% فمافوق)، بينما استمر النمو وإنتاج البكتريوسين حتى تركيز (4%) من كلوريد الصوديوم.

4-3-4- تأثير توفر مصادر الكربون المختلفة في وسط النمو:

يعدّ مصدر الكربون مهم لنمو البكتيريا، كما يؤثر في إنتاج البكتريوسين، حيث بلغ أعلى نمو لبكتيريا (*P. pentosaceus*) عند استخدام تراكيز مختلفة من مصدري الكربون الأكثر استخداماً، (الغلوكوز واللاكتوز) في وسط النمو ($OD_{600} \sim 1.6$) عند استخدام الغلوكوز بنسبة (10-40) غ/ل، وكان معدل إنتاج البديوسين متشابه (قطر منطقة التثبيط ~ 20 مم) عند استخدام الغلوكوز بنسبة من (20-40) غ/ل، لكن انخفض إلى (17 مم) عند استخدام الغلوكوز بنسبة 10%، بينما انخفض النمو إلى ($OD_{600} \sim 0.4$) عند استخدام (10 غ/ل) من اللاكتوز كمصدر للكربون و ($OD_{600} 1.4$) عند استخدام 20 غ/ل من اللاكتوز في الوسط بينما ارتفع إلى ($OD_{600} \sim 1.6$) عند استخدام نسبة (30-40) غ/ل، بالمقابل لم يلاحظ أي نشاط مضاد للميكروبات عند استخدام تركيز لاكتوز حتى (20) غ/ل وسجل نشاط منخفض (~ 9 مم) عند

استخدام نسبة (30) غ/ل ، ولوحظ أفضل نشاط (16م) عند استخدام نسبة (40) غ/ل من اللاكتوز في وسط النمو. (Kaur and Tiwari, 2017)

4-4- تطبيقات البيديوسين المنتج من بكتيريا *Pediococcus* :

حظي استخدام البكتريوسينات كمواد حافظة بيولوجية باهتمام متزايد في السنوات الماضية (Cotter et al, 2013; Deegan et al., 2006; Martinez et al., 2013) . يتم تسويق بكتيريا *Pediococcus* في الآونة الأخيرة كبكتيريا وقائية ضد البكتيريا المسببة لفساد الغذاء ومسببات الأمراض، وبالتالي فإن تطبيق هذه البكتيريا يؤدي إلى تحسينات في جودة الغذاء والصفات الحسية من خلال السيطرة على البكتيريا المسببة للتلف (Bhowmik and Marth,1990).

4-4-1- تطبيقات البيديوسين في الأغذية المختلفة:

أُستخدم *Pediocin* المنتج من الـ LAB في البادئ الطبيعي للمنتجات الغذائية، للتحكم بنمو البكتيريا الممرضة (*L. monocytogenes*)، حيث يتم الاحتفاظ بالخصائص الحسية المرغوبة للمنتجات الغذائية. وقد تم عزل *Pediocin* من اللحوم والنقانق والمخللات ومنتجات الألبان، بالإضافة إلى دوره المهم خلال العديد من عمليات التخمير، حيث تملك هذه السلالات القدرة على تثبيط الكائنات الدقيقة غير المرغوب فيها من خلال إنتاج *pediocin*.

4-4-2- في منتج الحليب:

تم تقييم إنتاج البيديوسين في السلالة *P. acidilactici* F (PAF) من خلال مشاركة السلالة بالتخمير مع (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus*

delbrueckii ssp. bulgaricus) في الحليب، حيث يتم استخدام النوعين الأخيرين نظراً لقدرتهما على تحليل اللاكتوز إلى الغلوكوز والغاللاكتوز.

عند تلقيح عينات من الحليب ببكتريا (*L. monocytogenes*) تركيزها 10^3 CFU / mL مع (*P. acidilactia*) وسلالتي LAB، لوحظ انخفاض نمو بكتيريا (*Listeriaceae*) إلى تركيز (10^2 CFU / mL) بالمقارنة مع التخمير بغياب خلايا (*P. acidilactia*)، وبقي التركيز (10^3 CFU / mL) بعد 16 يوماً من التخزين بدرجة حرارة (4م) (Somkuti and Stenberig, 2010).

4-3-4 - في منتج الخبز:

تم تقييم نشاط البكتريوسين المنتج من (*P. pentosaceus* KTU05-9) أثناء تخزين الخبز، حيث تعتبر بكتريا (*Bacillus subtilis*) مصدر تلوث أساسي، حيث تؤدي إلى تخطيط الخبز أو ما يعرف بـ (ropiness of bread). (Cizeikiene et al, 2013)

تمت إضافة أبواغ من بكتريا *B. subtilis* بنسبة 5.104 / غ بوجود بكتريا (*P. pentosaceus* KTU05-9) للتحقق من النشاط المضاد للميكروبات من سلالة *Pediococcus* في عينات خبز القمح، حيث تبين أنّ وجود 20% (*P. pentosaceus* KTU05-9) يؤخر ظاهرة (ropiness of bread) (6 أيام) مقارنة بعينات التي لم تُضف إليها (1.5 يوم)، وقتم الحفاظ على خصائص الخبز خلال التجربة. (Cizeikiene et al, 2013)

4-4-4 - في منتجات اللحوم والأسماك:

قام باحثون في إسبانيا بتحضير السجق المخمر مع البكتيريا (*L. monocytogenes* CECT4031) و السلالة المنتجة للبيديوسين (*P. acidilactici* MCH14) حيث وجدوا انخفاض عدد الليستيريا (بمقدار 2 log cycles) بعد 60 يوم مقارنةً بعينة الشاهد.

تم قياس النشاط المضاد للميكروبات في وحدات البكتريوسين (BU)، حيث تم تعريف الوحدة الواحدة بأنها كمية البكتريوسين التي تثبط نمو البكتيريا bioindicator بنسبة (50%)، كما أدت إضافة بيديوسين PA-1 المنقى (5000 وحدة / مل) إلى السجق فرانكفورتر إلى تثبيط (*L. monocytogenes* CECT4031 و *Clostridium* *perfringens* CECT 376) (حوالي 2 log cycles) أكثر من 60 يوماً من التخزين عند 10 درجة مئوية بالمقارنة مع عينات الشاهد المقابلة لها (Nieto-Lozano *et al*, 2010).

مواد البحث وطرائقه

مواد البحث وطرائقه :Materials and Methods

1- العينات Samples:

تم جمع 90 عينة من الأغذية المحلية (15 عينة شنكليش، 15 عينة جبنة بيضاء، 15 عينة مخلل خيار، 15 عينة مخلل لفت، 15 عينة مخلل زيتون و 15 عينة ذرة صفراء) من مناطق مختلفة (المنطقة الساحلية، منطقة الغاب والمنطقة الجنوبية) في القطر العربي السوري بطريقة معقمة، وبشكل عشوائي خلال الفترة الممتدة بين تموز 2015 وتشرين الثاني 2016م، حيث تم استعمال عبوات زجاجية معقمة، محكمة الإغلاق، وسُحبت العينات من ورشات تعمل بالطريقة التقليدية، ثم نقلت هذه العينات بطريقة مبردة إلى المختبر. تمت عملية الكشف عن تواجد بكتيريا *Pediococcus*، وعزلها وتحديد هويتها حسب (Abriouel وزملاؤه، 2008):

2- مرحلة العزل: تم العزل على وسط MRS Agar (Marthen- Rogosa- Sharpe) (Immerstrand وزملاؤه، 2010)، حيث تم وضع 1 غرام من عينة المادة الغذائية إلى 9 مل من محلول سترات الصوديوم 2%، ووضعت المزيج في أكياس بلاستيكية معقمة، ومن ثم تم مزجه باستخدام خلاط مخبري مدة 2 دقيقة، بعدها تم أخذ 0.1 مل من المزيج الناتج ووضعت في منتصف طبق بتري يحوي وسط MRS وتم نشره، وحُصّنت الأطباق بشكل مقلوب بدرجة حرارة 37 °م 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 أنبوب يحتوي على وسط أغار الـ MRS المائل، زُوّد كل أنبوب برقم، وحُصّنت هذه الأنابيب بدرجة حرارة 37 °م مدة 24 ساعة وبعد انتهاء فترة التحضين تم إجراء مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية.

3- الإختبارات الكيميائية الحيوية:

3-1- دراسة الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للسلاسل المعزولة:

أُجريت مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية لتحديد العزلات التابعة لجنس

Pediococcus (Garvie ، 1986)، حيث دُرس:

3-1-1- شكل الخلايا البكتيرية تحت المجهر.

3-1-2- صبغة الغرام.

3-1-3- اختبار الأوكسيداز.

3-1-4- نمط تخمير الحليب.

3-1-5- إنتاج الأسيتونين (acetoine):

يتم إنتاج الأسيتونين من الغلوكوز باستخدام اختبار Samelis) Voges – Proskauer وزملاؤه، (1994)، حيث نُميت البكتيريا المراد دراسة انتاجها للأسيتونين في 1 مل من مرق غلوكوز فوسفات (المكوّن من 5 غرام غلوكوز، 5 غرام فوسفات ثنائي البوتاسيوم، 7 غرام بيتون ويكمل الحجم إلى لتر ماء مقطر) في درجة حرارة 37°م، وبعد مرور 20 ساعة، أُضيف ½ مل من الكاشف الأول (محلول ألفانافتول α -Naphthol) (المحضر بإذابة 6 مل من ألفانافتول في 100 مل كحول اتيلي) و ½ مل من الكاشف الثاني (KOH) (المحضر بإذابة 16 مل من KOH في 100 مل ماء مقطر)، حيث يُشير ظهور تلون بالأحمر بعد 5 دقائق بشكل عام إلى وجود الأسيتونين وبالتالي نتيجة إيجابية، في حين بقاء الوسط باللون الأصفر يدل على نتيجة سلبية أي عدم إنتاج الأسيتونين.

3-1-6- تخمير الجلوكوز واللاكتوز والسكروز:

يتم تخمير الجلوكوز واللاكتوز والسكروز على بيئة ثلاثي سكر الحديد (TSI) (الحديثي والسيمني، 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 (لون البيئة أحمر قبل الزراعة)، عندها تكون البكتيريا مخمرة للسكريات الثلاثة (الجلوكوز، اللاكتوز والسكروز)، وفي حال تلون امتداد الأغار باللون الأصفر مع بقاء القاع أحمر فهذا يُفسّر قدرة البكتيريا قادرة على تخمير اللاكتوز وعدم قدرتها 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، إذ أن بكتيريا حمض اللبن تكون مخمرة حكماً لللاكتوز ومنتجة لحمض اللبن.

3-1-7- دراسة النشاط المحلل للكازئين:

تمّ باستخدام وسط الكازئين (Casein agar) والذي تم تحضيره باستخدام حليب خالي الدسم معاد التركيب: 1.3 غرام حليب بودرة، 9 مل ماء مقطر، و 1.5% أغار المضاف له 1 مل من التخفيفات العشرية المناسبة في طبق بتري والمحضن على درجة 37°م مدة 1-5 أيام، وبعد انتهاء فترة التحضين، أُعتبرت المستعمرات المُحللة للكازئين تلك المحاطة بهالة شفافة (Huggins و Sandine، 1984)؛ (Revol و Herbin، 1999).

3-2- تحديد بكتيريا *Pediococcus*:

3-2-1- تحديد بكتيريا *Pediococcus* باستخدام تقنية API 50CHL:

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 أُستخدم نظام (API 50CHL) لتمييز سلالات *Pediococcus* المعزولة على البيئة MRS، وذلك باستخدام الخطوات التالية:

- 1- حُلّت المستعمرات البكتيرية في محلول (API Suspension Medium) بحجم 10 مل للحصول على معلق كثيف للبكتيريا، وأُستخدم المعلق لملء حفر الصفيحة الـ API 50CHL.
- 2- وُضعت الصفيحة ضمن الحاوية البلاستيكية الخاصة بالنظام، ثم حُضنت مدة 24 ساعة عند درجة حرارة (37°م).
- 3- بعد انتهاء فترة التحضين، تمت قراءة النتيجة بمقارنة الصفيحة مع الجداول المناسبة في دليل Index.

- 4- تمت إعادة تحضين الصفيحة مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 30°م، ثم بعد انتهاء فترة التحضين تمت قراءة النتائج مرة أخرى للتأكد منها.

3-2-2- تحديد بكتيريا *Pediococcus* باستخدام تقنية تفاعل التسلسل البوليمرازي PCR:

يتم تحديد بكتيريا *Pediococcus* باستخدام تقنية تفاعل التسلسل البوليمرازي PCR (Ostlie وزملاؤه، 2004)، حيث أُجريت تقنية PCR على 20 عزلة أعطت النتائج الأولية على أنها تتبع الجنس *Pediococcus* التي ذكرها Garvie (1986)، إذ تمَّ استنبات مستعمرة بكتيرية

معزولة في وسط الاستتبات وحُضنت في الدرجة 37° س مدة 12 ساعة. واستخدم بروتوكول استخلاص الـ DNA من شركة (Vivantis) وبحسب تعليمات الشركة الصانعة.

4- دراسة الأثر التثبيطي للسلاطات:

تمت تنمية العزلات على مرق مغذي Nutrient broth والتحصين 48 ساعة بالدرجة 37° م)، بعدها تم إجراء عملية التثقيب (10000 دورة/د مدة 20 دقيقة في الدرجة 4° م)، وبعد الحصول على الرشاحة قُسمت إلى قسمين، الأول تم الحفاظ عليه، أما القسم الثاني عُدلت فيه درجة الـ pH إلى الدرجة (7) بإضافة (1N) NaOH (1نظامي) لاستبعاد التأثير التثبيطي الحمضي (Savadogo وزملاؤه، 2004)، بعدها تمت زراعة بكتيريا (*Listeria monocytogenes*) النمطة في قسم علوم الأغذية على PALCAM agar (Gasnov وزملاؤه، 2005)، بعمر 24 ساعة بمرق سائل، حيث تم إدخال قطنة معقمة داخل الأنبوب الحاوي على نموات البكتيريا الممرضة وتم تدويرها عدة مرات ثم رُفعت عن مستوى السائل وضُغط بها على حافة الأنبوب للتخلص من الكمية الزائدة ثم مُسح بها على السطح الجاف للبيئة الصلبة المناسبة لنمو بكتيريا (*Listeria monocytogenes*) ويُدار الطبق 60 درجة للتأكد من توزيع متساوي، وجرى العمل باستخدام مكررين، بعدها تم عمل حفر ضمن الأغار بقطر 6 مم بواسطة حافرة الأغار الخاصة، ووضع فيها ما مقداره (70 ميكروليتر) من رشاحة العزلات البكتيرية ذات درجة الحموضة المُعدلة وغير المُعدلة، وتم تحضين الأطباق في الدرجة 37° م مدة 24 ساعة، وتم قياس قطر منطقة المنع ب (مم) وهي مساحة دائرية تحيط بالحفر لا تنمو فيها البكتيريا الممرضة.

4-1- الكشف عن المورثة المسؤولة عن إنتاج البكتريوسين:

تم عزل مادة البلاسميد من بكتيريا *Pediococcus*، حيث أُستخدم الكيت المصغر الجاهز (Plasmid Midi Kit). إذ تمت تنمية البكتيريا على الدرجة 37°م مدة 24 ساعة في مرق MRS، وتم جمع البكتيريا بالثقل (10000 دورة / دقيقة، مدة 20 دقيقة، في درجة حرارة 4°م)، بعدها تم التخلص من الرشاحة، وتمت إضافة (250 ميكروليتر) من S1 وفق البروتوكول المرافق للكيت وتم حل الـ (pellet) ثم أُضيف (250 ميكروليتر) من S2، وتم المزج بالتقليب حتى ظهر سائل رائق والتحضين بالبراد مدة 5 دقائق، بعد ذلك أُضيف (400 ميكروليتر) من الموقى NB وتم المزج بلطف بالتقليب حتى تشكل ترسبات بيضاء، ثم التثليل 14000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وتم نقل (650 ميكروليتر) من السائل الطافي والتثليل 10000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة، وإضافة (650 ميكروليتر) من wash buffer والتثليل بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة والتخلص من السائل ونقل العمود الى أنبوب جديد 1.5 مل، ثم تمت إضافة (100 ميكروليتر) TE، ثم تم الطرد المركزي 10000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة والنقل الى المجمدة (-20°م). وأجري تفاعل PCR باستخدام المرئسات المذكورة في الجدول (1) (Suwanjinda وزملاؤه، 2007).

الجدول (1) مرئسات البديوسين

رمز المرئس	التتابع	طول الشدفة (bp)
PedF	5'-GGTAAGGCTACCACTTGCAT-3'	bp322
PedR	5'-CTACTAACGCTTGGCTGGCA-3'	

5- الدراسة الاحصائية:

5-1- الدراسة الاحصائية للأثر التثبيطي:

تمت دراسة الفروق المعنوية بين قطر منطقة المنع للسلاسل المعزولة باستخدام البرنامج

الاحصائي SPSS باستخدام اختبار ANOVA .

النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة : Results and discussions

1- نتائج الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للسلالات المعزولة:

تم عزل 119 عزلة على بيئة MRS (Man, Rogosa and Sharpe) (الخاصة بتنمية بكتيريا حمض اللبن) في الدرجة 37 °م، جميع العزلات كانت بشكل مستعمرات نموذجية (الدائرية كريمية اللون)، ويُظهر الجدول (2) توزيع العزلات على المواد الغذائية.

الجدول (2) توزيع 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

الجدول (3) الخصائص الشكلية والفيزيولوجية للسلاسل المعزولة

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

عند إجراء مجموعة الاختبارات البيوكيميائية الأولية على 119 عزلة لتحديد تبعيتها إلى الجنس *Pediococcus*، كانت 39 عزلة منها قادرة على تخمير الحليب، 22 عزلة متجانسة التخمر، 17 عزلة غير متجانسة التخمر، 30 عزلة موجبة الغرام، 20 عزلة ذات خلايا بيضوية الشكل تحت المجهر، 26 عزلة سالبة لاختبار الأوكسيداز، 28 عزلة غير قادرة على تحليل الكازئين، 3 عزلة قادرة على إنتاج الأسيتوين من الغلوكوز، 35 عزلة قادرة على تخمير الغلوكوز، 37 عزلة قادرة على تخمير السكروز و 30 عزلة قادرة على تخمير اللاكتوز.

نلاحظ وجود 20 سلالة فقط ظهرت بيضوية الشكل تحت المجهر، ثنائية التوضع، سالبة الكاتالاز (وهي الصفات الأساسية لجنس *Pediococcus* التي حددها Bajpai وزملاؤه، 2016)، وبالتالي أمكن حصر 20 سلالة فقط تتبع للجنس (*Pediococcus*) على بيئة MRS وهي تمثل مانسبته (17.8%) من مجموع العزلات وهذا يتوافق مع ما وجدته Bakheit في دراسة أجريت في السودان على مجموعة من الأغذية المخمرة (مخمّر مش، جبن ومخللات) (Bakheit، 2015).

2- نتائج تحديد بكتيريا الـ *Pediococcus*:

2-1- نتائج نظام API 50 CHL:

جرى استخدام نظام (API 50 CHL) على 20 عزلة وُجد أنها تتبع الجنس *Pediococcus* بحسب تقانة التفاعل التسلسل البوليميرازي (PCR) ويظهر الجدول (4) نتائج اختبار (API 50 CHL)

الجدول (4) نتائج اختبار (API 50 CHL)

-	-	-	Ctrl
-	-	-	Gly
-	-	-	Ery
-	-	-	Dara
+	-	+	Lara
+	+	+	Rib
+	-	+	Dxyl
-	-	-	Lxyl
-	-	-	Ado
-	-	-	Mdx
-	-	-	Gal
+	+	+	Glu
+	+	+	Fru
+	+	+	Mne
-	-	-	Sbe
+	-	+	Rha
-	-	-	Dul
-	-	-	Ino
+	+	+	Man
+	+	+	Sor
-	-	-	Mdm
-	-	-	Mdg
+	+	+	Nag
+	-	-	Amy
+	-	+	Arb
+	+	+	Esc
+	-	+	Sal
+	-	+	Cel
+	-	-	Mal
+	+	+	Lac
-	-	-	Mel
-	-	-	Sac
+	+	+	Tre
-	-	-	Inu
-	-	-	Mlz
+	-	+	Raf
-	-	-	Amd
-	-	-	Glyg
-	-	-	Xlt

+	-	+	Gen
-	-	-	Tur
-	-	-	Lyx
+	-	+	Tag
-	-	-	Dfuc
-	-	-	Lfuc
-	-	-	Darl
-	-	-	Larl
-	-	-	Gnt
-	-	-	2kg
-	-	-	5kg
%97	%98	%98	نسبة التطابق
<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. acidilactici</i>	نوع البكتيريا
10	2	8	عدد العزلات
50	10	40	نسبة العزلات (%)

مع العلم أن :+موجبة التخمر، -: سالبة التخمر، $\pm$ تخمر غير مكتمل.

أظهر نظام (API 50 CHL) السلالات البيضوية الشكل لتحديد أنواع السلالات المعزولة وجود

8 عزلات منها تنتمي لنوع *P. acidilactici* و 10 عزلات تنتمي للنوع *P. pentosaceus*

و عزلتان من نوع *P. damnosus* .

كما لوحظ أن *P. pentocaseus* قادرة على تخمير الـ D-maltose و Amygdaline،

بينما *P. acidilactici* غير قادرة على تخميرهما وهذا توافق مع ما وجدته (Deshen وزملاؤه،

2016).

كما وُجد أن *P. damnosus* غير قادرة على تخمير كل من (D-arabinose ، L-

، Raffinose ، D-celiobiose ، Salicine ، Arbutine ، D-xylose ، rhamnase

Gentiobiose و D-tagatose) بينما *P. pentocaseus* و *P. acidilactici* غير قادرتين

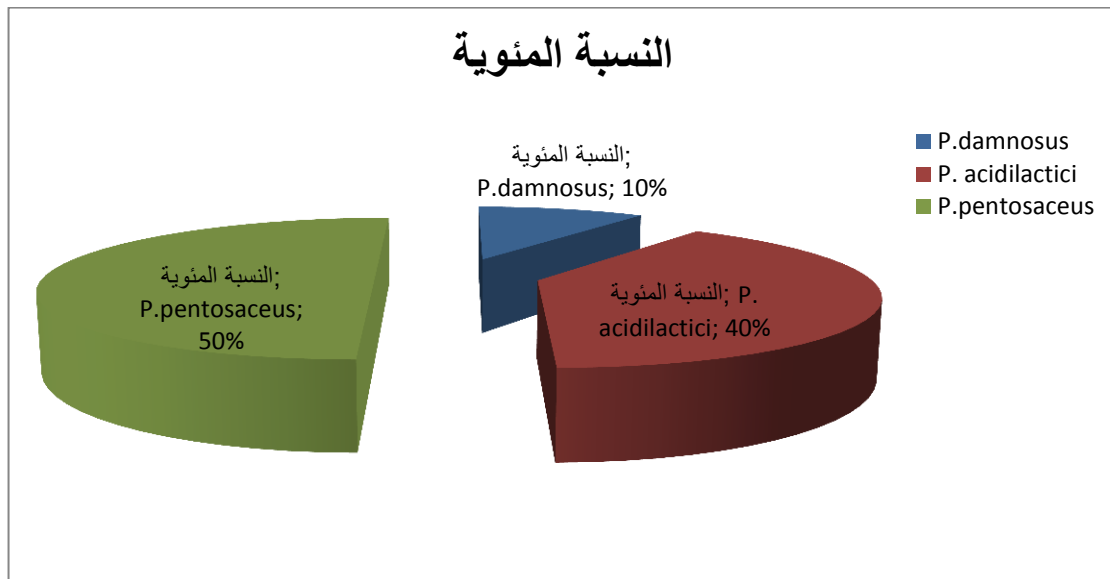
على تخميرهما، ويتوافق هذا مع ما وجدته (Ahn و زملاؤه، 2017).

يظهر الجدول (5) والشكل (2) توزيع السلالات على المواد الغذائية.

الجدول (5) توزيع السلالات على المواد الغذائية

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

نلاحظ من الجدول (5) أن السلالتان من النوع *P.damnossus* عزلت من الجبنة البيضاء، بينما عُولت السلالات من النوع *P.acidilactici* من الجبنة البيضاء والشنكليش ومخلل الخيار، كذلك السلالات من النوع *P.pentosaceus* عُولت من الجبنة البيضاء والشنكليش ومخلل الخيار، وتوافق هذا مع دراسة قام بها عبد الماجد وزملاؤه في السودان (Abdelmaged) وزملاؤه، (2016).

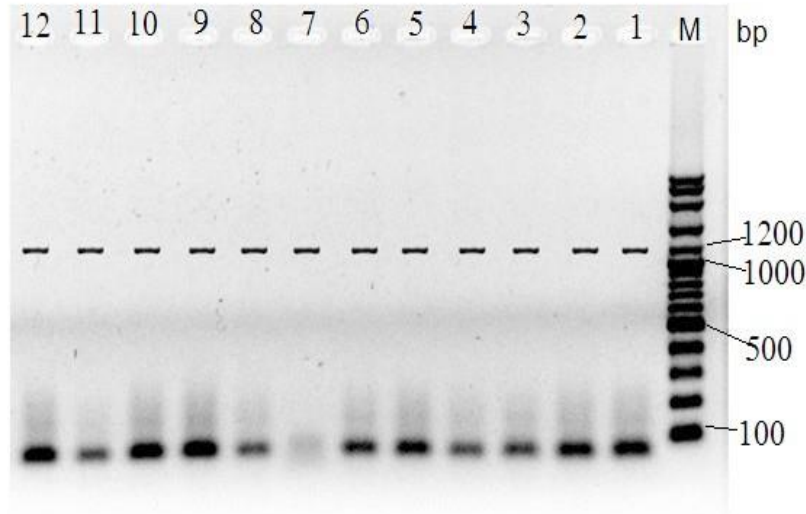


الشكل (2): توزيع السلالات على المواد الغذائية.

2-2- نتائج تفاعل PCR:

أظهرت نتائج تفاعل الـ PCR و فحص الهلامية بواسطة جهاز إظهار العصائب (geldocumentation) أن طول الحزم الناتجة بلغ 1200 bp مما يؤكد أن السلالات تنتمي للجنس *Pediococcus*.

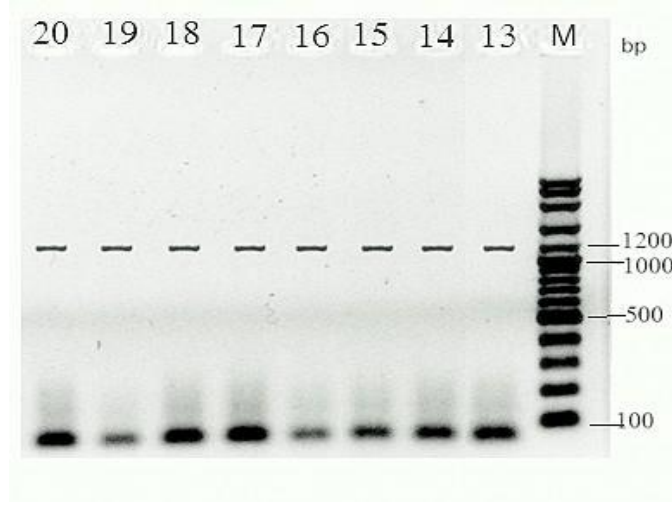
يظهر الشكل (3) الحزم الناتجة عن ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR للسلالات من 1-12.



الشكل (3): M: الواسم الجزيئي Markerpb100، المسارات 1 - 12 نتائج ترحيل تفاعل

PCR لعزلات *Pediococcus* من المنتجات المتخمرة.

كما يبيّن الشكل (4) الحزم الناتجة عن ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR للسلاسلات من 13-20.



الشكل (4): M: الواسم الجزيئي Markerpb100، المسارات 13 - 20 نتائج ترحيل تفاعل

PCR لعزلات *Pediococcus* من المنتجات المتخمرة

نلاحظ من خلال الشكلين السابقين أن السلاسلات الـ 20 كانت قادرة على إعطاء حزم بطول

1200 bp بالتالي هي تنتمي الى الجنس *Pediococcus*.

3- نتائج دراسة الأثر التثبيطي للسلاسلات:

يوضح الجدول (6) نتائج اختبار التضاد لعزلات *Pediococcus* ضد بكتيريا *L.monocytogenes* والتي يعبر عنها بقطر منطقة المنع بالـ (ملم) والفروق المعنوية بين السلاسلات.

الجدول رقم (6) نتائج اختبار التضاد لعزلات *Pediococcus* ضد بكتيريا

L. monocytogenes

رقم العزلة في تقنية PCR	رمز العزلة	التضاد مع <i>L. monocytogenes</i>	قطر الهالة مم
1	1G	+	17 ^C ±0.1
2	2G	+	17 ^C ±0.2
3	3G	+	19 ^B ±0.2
4	4G	+	17 ^C ±0.15
5	5G	+	19 ^B ±0.2
6	6S	+	15 ^D ±0.3
7	7S	+	19 ^B ±0.1
8	8S	+	13 ^E ±0.3
9	9S	+	19 ^B ±0.2
10	10S	+	19 ^B ±0.3
11	11C	+	13 ^E ±0.25
12	12C	+	27 ^A ±0.1
13	13G	+	19 ^B ±0.2
14	14G	+	17 ^C ±0.25
15	15G	+	19 ^B ±0.3
16	16C	+	27 ^A ±0.3
17	17S	+	15 ^D ±0.1
18	18S	+	19 ^B ±0.2
19	19S	+	13 ^E ±0.1
20	20C	+	13 ^E ±0.1

*تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية $p > 0.05$.

*حيث أن **G**: ترمز الى العزلات المأخوذة من الجبنة البيضاء، **C**: ترمز الى العزلات المأخوذة من مخلل الخيار، **S**: ترمز الى العينات المأخوذة من الشنكليش.

بينت نتائج قياس قطر منطقة المنع أن قطر هالة المنع بين 13 و 27 مم، هذا يتوافق مع ما وجدته (Venkateshwari وزملاؤه، 2010) حيث وصل قطر منطقة التثبيط لسلالات *Pediococcus* ضد *L. monocytogenes* الى 12مم بعد ساعتين من النمو فقط ووصل الى 16مم بعد 6 ساعات من النمو .

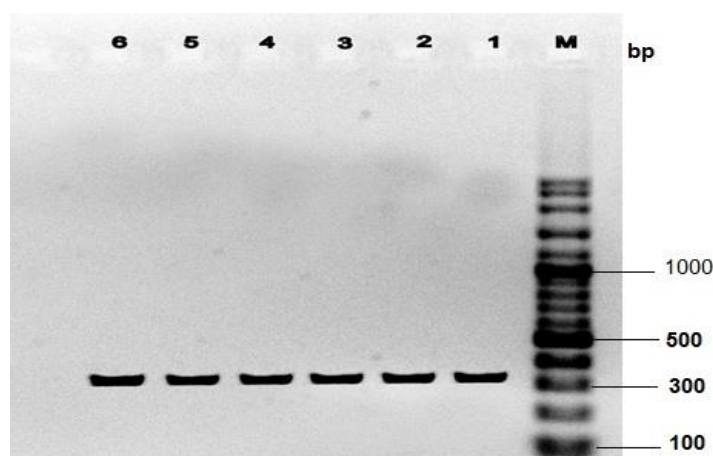
ويظهر التحليل الإحصائي LSD لإختبار ANOVA وجود فروق معنوية بين متوسط قطر منطقة المنع للسلالات المعزولة، حيث سجل أعلى قطر هالة وبوجود بفروق معنوية عن باقي العزلات لكل من العزلات 12C و 16C المأخوذة من الجبنة والتابعة للسلالة (*P. pentosaceus*).

3-1- نتائج الكشف عن المورثة المسؤولة عن إنتاج البديوسين:

تم الكشف عن مورثة البديوسين في 20 سلالة *Pediococcus* باستخدام تقانة PCR من خلال استخدام البرايمرات الموضحة في الجدول (1).

يوضح الشكل (5) نتائج ترحيل تفاعل الـ PCR للعزلات الستة التي أعطت شدة بطول

bp322



الشكل (5): M:الواسم الجزيئي Markerpb100، المسارات 1 - 6 نتائج ترحيل تفاعل

PCR للعزلات الستة التي أعطت شدة بطول 322bp.

تظهر النتائج أن 6 سلالات من أصل 20 أعطت حزم بطول bp322 ، وهذا يؤكد قدرة هذه السلالات الستة على إنتاج البديوسين، ويؤكد هذا وجود مورثة البديوسين في بلاسميد هذه السلالات، وقد يعود عدم ظهور الحزم في باقي السلالات الى عدم توافق مع البرايمرات المستخدمة لأسباب غير معروفة أو يكون الأثر التثبيطي الناتج في تلك السلالات ناتج عن عوامل أخرى في الوسط.

الاستنتاجات:

- 1- يوجد جنس بكتيريا *Pediococcus* في الأغذية المتخمرة المحلية مثل الجبن والشنكليش والمخلل ويتوزع بين ثلاثة أنواع (*P. acidilactici*، *P. pentosaceus* و *P. damnosus*).
2- تمتلك بكتيريا *Pediococcus* قدرة تثبيطية ضد أنواع بكتيريا ممرضة مثل *L. monocytogenes* المسببة لداء الليستيريات.
3- يمكن استعمال بكتيريا *Pediococcus* كمواد حافظة طبيعية في الأغذية بالإضافة الى دورها في تخمير الأغذية و كمحسن للنكهة.
4- تم الحصول على 20 سلالة بيضوية الشكل متجانسة التخمير سالبة الكاتلاز ولها أثر إيجابي في تثبيط بكتيريا *L. monocytogenes*.
5- ست سلالات تحتوي على مورثة البديوسين حيث أعطت حزم بطول bp322 عند ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR.

التوصيات:

- 1- استخدام السلالات المحلية من بكتيريا *Pediococcus* في الحفظ الحيوي.
- 2- متابعة دراستها لاستخدامها في عمليات تصنيع المنتجات الغذائية.

قائمة المراجع:

الخزاعي ،علاء كريم و الأسدي ،آمال والقيسي ،ابراهيم (2011) "استعمال تقنية pcr للكشف عن جين ped المسؤول عن إنتاج Pediocin في العزلات المحلية لبكتريا *Pediococcus acidilactici*" مجلة أبحاث البصرة :37.

Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Ibrahim, T.A.T., Ramanan, R.N., Vakhshiteh, F., Mustafa, S., Ling, T.C., Rahim, R.A. 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(1), p.260.

Abd El-Salam, M.H; Saleh,F.A; Kholif, A.M; El-Sayed, E.M; Abdou, S.M. and El-Shibiny, S. 2004. Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Bifidobacterium longum* BB-46 In: 9th Egyptian conference for dairy science and technology. Cairo. Egypt.

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. and 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), pp.200-208.

Ahn, H., Kim, J. and Kim, W.J., 2017. Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Control, 80, pp.59-66.

Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T. and Teixeira, P., 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from

“Alheiras”(traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. Meat science, 76(4), pp.796-800.

Aldujaili, N.H., 2014. Molecular detection of bacteriocin producing Lactic acid bacteria from fermented milk in Alnajaf. journal of kerbala university, 12(2), pp.56-61.

Altena, K; Guder, A; Cramer, C; Bierbaum, G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: rganization of a type B lantibiotic gene cluster. Applied and Environmental Microbiology, 66(6): 2565-2571.

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.

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiousis, G., Ambrosiadis, I. and Koidis, P., 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. Bioresource Technology, 99(13), pp.5384-5390.

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Ambrosiadis, I. and Koidis, P., 2008. Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. Bioresource technology, 99(14), pp.6646-6650.

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.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E. and Kihal, M., 2004. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. Food Microbiology, 21(3), pp.343-349.

- Bajpai, V.K., Han, J.H., Rather, I.A., Majumder, R., Nam, G.J., ChanSeo, P., Lim, J., Paek, W.K. and Park, Y.H., 2016. Characterization of lactic acid bacterium *Pediococcus pentosaceus* 4I1 from fresh water fish *Zacco koreanus* and its antibacterial mode of action. *PeerJ Preprints*, 4, p.e2121v1.
- Bakheit, H. A. ,2015. Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Different Fermented Foods (Doctoral dissertation, UOFK).
- Beresford, T.P. ,2003. Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality. *Dairy Process.: Improv. Qual.* 448–169.
- Bhowmik, T. and Marth, E.H., 1990. β -Galactosidase of *Pediococcus* species: induction, purification and partial characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, 33(3), pp.317-323.
- Campbell, I., 1996. Systematics of yeasts. In *Brewing Microbiology* (pp. 1-11). Springer, Boston, MA.
- Caridi, A., 2002. Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), pp.303-308.
- Cintas, L.M; Casaus, P; Holo, H; Hernández, P.E; Nes, I.F; Håvarstein, L.S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 are related to staphylococci hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180: 1988– 1994.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A. and Bartkiene, E., 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), pp.539-545.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P., 2005. Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), p.777.

- Cotter, P.D; Hill, C and Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777– 788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C., 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), p.95.
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 1: 164-167.
- Dashen, M.M., Edia-Asuke, U.A., Amapu, T.Y., Adesokan, D.M. and Olugbodi, F., 2016. Effect of Fermented Dough on the Organoleptic Quality and Shelf-Life of Bread.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9), pp.1058-1071.
- Deraz, S.F., Karlsson, E.N., Hedström, M., Andersson, M.M. and Mattiasson, B., 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of biotechnology*, 117(4), pp.343-354.
- Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, 44, pp.100-117.
- Delwiche, E.A., 1961. Catalase of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 81(3), p.416.
- Devi, S.M. and Halami, P.M., 2011. Detection and characterization of pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Current microbiology*, 63(2), pp.181-185.
- Dobrogosz, W.J. and Stone, R.W., 1962. OXIDATIVE METABOLISM IN *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* I., Role of Oxygen and Catalase. *Journal of bacteriology*, 84(4), pp.716-723.

- Drider, D; Fimland, G; He´chard, Y; McMullen, L.M; Pre´vost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 564– 582.
- Eijsink, V.G; Skeie, M; Middelhoven, P.H; Brurberg, M.B; Nes, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 3275-3281.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E. and Bonos, E., 2013. Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech.
- Garde, S., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M., 2001. PCR detection of the structural genes of nisin Z and lacticin 481 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415, a strain isolated from raw milk Manchego cheese. *Biotechnology letters*, 23(2), pp.85-89.
- Garvie, E.I., 1974. Nomenclatural problems of the pediococci. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(2), pp.301-306.
- Garvie, E.I., 1986. Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68[^]. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, pp.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), pp.851-875.
- Gilliland, S.E. 1989. *Acidophilus* milk products. a review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*, 72(10): 2483–2494.
- Green, G., Dicks, L.M.T., Bruggeman, G., Vandamme, E.J. and Chikindas, M.L., 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of applied microbiology*, 83(1), pp.127-132.

- Gurira, O.Z. and Buys, E.M., 2005. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food microbiology*, 22(2-3), pp.159-168.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L. and Van Wassenaar, P.D., 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of biochemistry and biophysics*, 295(1), pp.5-12.
- Heng, N.C.K; Wescombe, P. A; Burton, J. P; Jack, R. W; Tagg, J. R. 2007. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria In: *Bacteriocins: ecology and evolution*. Heidelberg, Germany, 150 p.
- Heng, N.C.K; Burtenshaw, G.A; Jack, R.W; Tagg, J.R. 2004. Sequence analysis of pDN571, a plasmid encoding novel bacteriocin production in M-type 57 *Streptococcus pyogenes*. *Plasmid*, 52:225–229.
- 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. and Sandine, W.E., 1984. Differentiation of Fast and Slow Milk-Coagulating Isolates in Strains of Lactic Streptococci1. *Journal of Dairy Science*, 67(8), pp.1674-1679.
- Immerstrand, T., Paul, C.J., Rosenquist, A., Deraz, S., Mårtensson, O.B., Ljungh, Å., Blücher, A., Öste, R., Holst, O. and Karlsson, E.N., 2010. Characterization of the properties of *Pediococcus parvulus* for probiotic or protective culture use. *Journal of food protection*, 73(5), pp.960-966.
- Ivanova, I; Miteva, V; Stefanova, T.S; Pantev, A; Budakov, I; Danova, S; Moncheva, P; Nikolova, I; Dousset, X; Boyaval, P. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* .81 *Int. J. Food microbiol*, 42: 147-158.
- Jung, G. 1991. Lantibiotics: a survey. In: *Nisin and novel lantibiotics*. ESCOM, Leiden, 1–34.

- Kaur, R. and Tiwari, S.K., 2017. Optimization of Culture Conditions for Bacteriocin Production by Soil Isolates *Pediococcus pentosaceus* LB44 and *Weissella confusa* LM85. *International Journal of Infection*, 4(3).
- Keles, G. and Demirci, U., 2011. The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale–Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*, 164(1-2), pp.21-28.
- Kimura, H., Nagano, R., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A., 1997. A strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from Nukadoko produces a novel bacteriocin. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 42(1-2), pp.121-129.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), pp.39-85.
- Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annual Review of Microbiology*, 36:125-144.
- Kostrzynska, M. and Bachand, A., 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(11), pp.1017-1026.
- Lade, H.S; Chitanand, M.P; Gyananath, G; Kadam, T.A. 2006. Studies on some properties of bacteriocins produced by *Lactobacillus* species isolated from agro-based waste. *The Internet J. Microbiol.* (2) 1.
- Leisner, J.J., Pot, B., Christensen, H., Rusul, G., Olsen, J.E., Wee, B.W., Muhamad, K. and Ghazali, H.M., 1999. Identification of lactic acid bacteria from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), pp.599-605.
- Lazcka, O., Del Campo, F.J. and Munoz, F.X., 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 22(7), pp.1205-1217.

- Mandal, V., Sen, S.K. and Mandal, N.C., 2011. Isolation and characterization of pediocin NV 5 producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from vacuum-packed fermented meat product. *Indian journal of microbiology*, 51(1), pp.22-29.
- Mandal, B.A.R.N.A.L.I., Chowdhury, R.A.N.J.A.N.A. and Jee, C.B., 2014. Purification and characterization of pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* NCIM 2292. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), pp.357-361.
- Maqueda, M; Gálvez, A; Bueno, M.M; Sanchez-Barrena, M.J; González, C; Albert, A; Rico, M; Valdivia, E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein and Peptide Science*, 5(5):399–416.
- Marciset, O; Jeronimus-Stratingh, M.C; Mollet, B; Poolman, B. 1997. Thermophilin 13, a non typical antilisterial portion complex bacteriocin, that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 14277–14284.
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Converti, A., Cotter, P.D. and de Souza Oliveira, R.P., 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology advances*, 31(4), pp.482-488.
- Marugg, Joey D., Carlos F. Gonzalez, Blair S. Kunka, Aat M. Ledebøer, Michael J. Pucci, Marjolein Y. Toonen, Shirley A. Walker, Leonie C. Zoetmulder, and Peter A. Vandenberg;1992. "Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1. 0." *Applied and environmental microbiology* 58, no. 8, 2360-2367.
- Mathiesen, G; Huehne, K; Kroeckel, L; Axelsson, L; Eijsink, V.G. 2005. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin-P producing *Lactobacillus sakei* showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7):3565–3574.

- Mathys, S., von 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*, 7(1), p.55.
- Miescher, S; Stierli, M.P; Teuber, M; Meile, L. 2000. Propionicin SM1, a bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1 isolation and characterization of the protein and its gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 23:174–184.
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D. and Lacroix, M., 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), pp.274-282.
- Moreno, I., Lerayer, A.L., Baldini, V.L. and Leitão, M.F.D.F., 2000. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(3), pp.183-191.
- Naimi, M. and Khaled, M.B., 2014. Isolation and Phenotypic Characterization of *Lactobacillus Sakei* and *Pediococcus* spp. Antagonists from Algerian Meat.
- Nilsen, T; Nes, I.F; Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell- wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5) :2975–2984.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M.D.C., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Gutiérrez-Fernández, Á.J. and de la Torre, A.H., 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, 21(5), pp.679-685.
- Olaoye, O.A., Onilude, A.A. and Dodd, C.E., 2008. Identification of *Pediococcus* spp. from beef and evaluation of their lactic acid production

in varying concentrations of different carbon sources. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2(3), pp.197-208.

Osmanağaoğlu, Ö., Beyatlı, Y. and Gündüz, U., 2001. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from vacuum-packed sausages. *Turkish Journal of Biology*, 25(2), pp.133-143.

Østlie, H.M., Eliassen, L., Florvaag, A. and Skeie, S., 2004. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. *International journal of food microbiology*, 94(3), pp.287-299.

Papagianni, M. and Anastasiadou, S., 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, 8(1), p.3.

Parente, E., Grieco, S. and Crudele, M.A., 2001. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), pp.943-952.

Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenberg, P.A., 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), pp.2349-2353.

Ray, B., 1995. *Pediococcus* in fermented foods. *Food Biotechnology: Microorganisms*, pp.745-795.

Ray, B. and Miller, K.W., 2000. Natural food antimicrobial systems". *Pediocins of *Pediococcus* species*, pp.525-566.

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

Rhee, I., Shin, M., Hong, S., Lee, K., Kim, S.J. and Chong, S., 2011. On the levy-walk nature of human mobility. *IEEE/ACM transactions on networking (TON)*, 19(3), pp.630-643.

- Rodriguez, J.M; Martínez, M.I; Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2):91–121.
- Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), pp.3-16.
- Saavedra, L; Minahk, C; Holgado, A.P; Sesma, F. 2004. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH₂-terminal sequence .*Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2778-2781.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. and Metaxopoulos, J., 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2), pp.179-196.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A., Bassole, I.H. and Traore, A.S., 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of nutrition*, 3(3), pp.174-179.
- Savergave, L.S., 2011. Microbial production of erythritol and mannitol: strain improvement and process optimization.
- Schlegel, H.G. and Zaborosch, C., 1993. *General microbiology*. Cambridge university press.
- Senthilkumar, P.K., Reetha, D., Ramya, N. and Stella, D., 2012. Antibacterial Potential of Lactic Acid Bacteria and Its Metabolites against Food Borne Pathogens. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(2):342-347.
- Singh, P.K., Sharma, S., Kumari, A. and Korpole, S., 2014. A non-pediocin low molecular weight antimicrobial peptide produced by *Pediococcus pentosaceus* strain IE-3 shows increased activity under reducing environment. *BMC microbiology*, 14(1), p.226.

- Sire, J.M., Donnio, P.Y., Mesnard, R., Pouedras, P. and Avril, J.L., 1992. Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(7), pp.623-625.
- Somkuti, G.A. and Steinberg, D.H., 2010. Pediocin production in milk by *Pediococcus acidilactici* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(1), pp.65-69.
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K., 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), pp.20-24.
- Stevens, K.A; Sheldon, B.W; Klapes, N; Arlene, N.A; Klaenhammer, T. R. 1991. Nisin Treatment for Inactivation of Salmonella Species and Other Gram-Negative Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 57(12) 3613-3615.
- 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.
- Sukumar, G. and Ghosh, A.R., 2010. *Pediococcus* spp. a potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *African Journal of Food Science*, 4(9), pp.597-602.
- Suwanjinda, D., Eames, C. and Panbangred, W., 2007. Screening of lactic acid bacteria for bacteriocins by microbiological and PCR methods. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35(5), pp.364-369.
- Suzuki, K., Ozaki, K. and Yamashita, H., 2004. Comparative analysis of conserved genetic markers and adjacent DNA regions identified in beer-

spoilage lactic acid bacteria. Letters in applied microbiology, 39(3), pp.240-245.

Tamime, A.Y. and Marshall, V.M.E., 1997. Microbiology and technology of fermented milks. In Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk (pp. 57-152). Springer, Boston, MA.

Torodov, S.D; Dicks, L.M.T. 2004. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. World J. Microbiol. Biotechnol, 20: 643-650.

Torodov, S.D; Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial. Technol, 36: 318-326.

Touron, A., Berthe, T., Pawlak, B. and Petit, F., 2005. Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay. Research in Microbiology, 156(4), pp.541-553.

Tserovska, L., Stefanova, S. and Yordanova, T., 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from kатыk, goat's milk and cheese.

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

Widyastuti, Y. and Febrisiantosa, A., 2014. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. Food and Nutrition Sciences, 5(04), p.435.

Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E. and Drosinos, E.H., 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. Meat science, 80(2), pp.194-203.

- Yaron, S. and Matthews, K.R., 2002. A reverse transcriptase- polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes. *Journal of applied microbiology*, 92(4), pp.633-640.
- Yonezawa, H; Kuramitsu, H.K. 2005. Genetic analysis of a unique bacteriocin Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:541–548.
- Zuo, F.L., Feng, X.J., Chen, L.L. and Chen, S.W., 2014. Identification and partial characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products produced by herders in the western Tianshan Mountains of China. *Letters in applied microbiology*, 59(5), pp.549-556.