مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2016) المجلد (32) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 243-256

توصيف بكتيريا *Lactococcuslactis* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي السوري

ميس البيتموني[1] و عهد أبو يونس[2] وأيمن المريري[3]

الملخص

هدف البحث إلى تصنيف بكتيريا *lactisLactococcus* المعزولة من جبن الأبيض البلدي (الغنم،البقر)، لعينات جمعت خلال الفترة الممتدة ما بين شهري آذار/ مارش 2012 وآذار مارش2013، من مناطق مختلفة من القطر العربي السوري. حيث عُزل135عزلة من 58 عينة جبن أبيض بلدي المصنع من حليب الغنم والبقر(40 عينة جبن غنم، 18 عينة جبن بقر) ما مجموعه 71عزلة كروية موجبة الغرام، سالبة الكاتالاز، متجانسة التخمر. وقد استخدم في تحديد السلالات نظام **API 20 Strep** وتقنية **PCR**. ووجد أن تحت الأنواع السائدة: ***Lc lactis ssp. Lactis*****،*****Lc lactis ssp cremoris*****،** ***Lc lactis ssp lactis biovar diacetylactis***. وعند دراسة بعض خصائص السلالات المعزولة كانت 17 سلالة قادرة على تحليل الستراتوجميع السلالات كانت غير قادرة على النمو في درجة حرارة45سم، في حين استطاعت النمو في تركيز 6.5 % من **NaCl**.

الكلمات المفتاحية: *Lactococcus lactis*، التصنيف، العزل، الجبن الأبيض، API System، PCR.

[1] طالبة ماجستير، [2] قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

[3] مدير بحوث، هيئة الطاقة الذرية.

Classification of *Lactococcus lactis* bacteria isolated from white Syrian cheeses

Mays Al-Baitamouni(1), Ahed Abou Younes(2) and A. AlMariri (3)

Abstract

This research was aimed to classificate*Lactococcus lactis* bacteria isolated from white Syrian cheeses and ollected during March 2012 to Marsh 2013 from different areas in Syria. 135isolates of bacterial were isolated from 58 samples of white fresh cheese (40 sample from ewe milk cheese and 18 sample from cow milk cheese), 71 isolates of them were cocci, gram positive, negative catalase, homofermentation. Those bacterias were identified using API system and PCR technique. It was found: *Lc lactis ssp. Lactis, Lc lactisssp cremoris, Lc lactis ssp lactis biovar diacetylactis* were the predominant. When some characteristics of isolated strains were studied, It was found that only 17 strains were able to utilize citrates, and all strains werenot able to grow up at 45ºC, while all strains were able to grow up at 6.5% concentration of NaCl.

Keywords: *Lactococcus lactis*, Isolation, classification, White cheeses, API System, PCR.

(1)MCS., Student, (2) Assistant Prof. Dept. Food Sciences., Fac. Agric., Damascus Univ., Syria.
(3)Post Dr. Researcher, Atomic Energy Comission, Syria.

المقدمة

تعد منتجات الألبان المتخمرة بشكل عام من المكونات الأساسية للنظام الغذائي المتكامل للمستهلك في سورية، ومن أهم أنواع الأجبان المنتجة في سورية الجبنة البيضاء أو ما يسمى بـ (الجبن البلدي) وهذا النوع يستخدم إما طازجاً أو بعد حفظه في المحلول الملحي، وتنتج في بعض المناطق الريفية بشكل رئيسي من حليب الأغنام والأبقار، ويعود السبب الرئيسي للنكهة والقوام لمثل هذه الأنواع من الأجبان إلى ما يعرف ببكتيريا حمض اللبن الموجودة بشكل طبيعي غير البادئ(NSLAB) (Peterson وMarshall، 2001؛ Beresford وزملاؤه، 2001) وهي التي تحدد خصائص الجبن الفيزيائية والكيميائية ولها تأثير واسع في خصائص النكهة والقوام والرائحة (Beresford وزملاؤه،2001؛ Jany وBarbie، 2008؛ أبويونس وزملاؤه، 2007).

وتعد بكتيريا *Lactococcus lactis* المكون الأساسي للعديد من مزارع البادئ التقليدية والصناعية المستخدمة في تصنيع منتجات الألبان المتخمرة المحلية (Vlieg، 2006) وفي كثير من الدراسات تم التأكيد على أنها من البكتيريا السائدة في المنتجات المحلية التابعة لمجموعة بكتيريا حمض اللبن (Florez وزملاؤه، 2006؛ Bonetta وزملاؤه، 2008؛ Pogačić وزملاؤه، 2010؛ Fuka Mrkonjić وزملاؤه، 2010). بينما وجد آخرون أنها سائدة فقط في الفترة الأولى من إنضاج الأجبان (Vernile وزملاؤه، 2008؛ Dolci وزملاؤه، 2008). وتعدّ بكتيريا *Lc.lactis* بكتيريا موجبة الغرام، سالبة الكاتلاز، درجة الحرارة المثلى لنموها 30 ْم ويمكن أن تنمو على درجة حرارة 10 ْم ولكنها تتميز بغياب النمو في درجة الحرارة 45 ْم (Savadogo وزملاؤه، 2004). هذا الجنس يشمل خمسة أنواع: *Lc.lactis*، *Lc.garvieae*، *Lc. piscium*، *Lc.plantarum*، *Lc.raffinolacti* بالإضافة إلى أنواع جديدة سميت *L. chungangensis* (Cho وزملاؤه، 2008) وتوجد هذه الأنواع في بيئات مختلفة (Klijn وزملاؤه، 1995؛ Euzéb، 2007). إن التعرف على أهمية الفلورا الطبيعية في الأجبان المصنعة بالطرق التقليدية أمر احتل اهتمام الباحثين خلال فترات طويلة، إلا أن ذلك تطلب التمييز والتعرف على السلالات المختلفة المكونة وإجراء عمليات عزل وتوصيف للوصول إلى السلالات المنشودة لما لها من أهمية اقتصادية وتكنولوجية (Stiles وHolzapfel، 1997). إلا أن طرق التصنيف التقليدية مثل الاختبارات الفيزيولوجية والبيوكيميائية يمكن أن تكون غير فعالة في بعض الحالات للتمييز على مستوى الأنواع وتحت الأنواع، لذا تم تطوير الطرق الجزيئية في العقود الأخيرة والتي ساعدت في تشخيص وتحديد الأنواع البكتيرية (Pu وزملاؤه، 2002).

هدف البحث إلى عزل البكتيريا التابعة للنوع *Lc. lactis* المعزولة من الجبن الأبيض السوري المصنع بالطريقة التقليدية من حليب الأغنام الخام وحليب الأبقار الخام وتحديدها

باستخدام تقنية PCR ونظام API 20 Strep، ثم دراسة مجموعة من خصائص هذه السلالات لمعرفة مدى إمكانية استخدامها كبادئات.

مواد البحث وطرائقه

أجري الكشف عن وجود بكتيريا *Lc. lactis* في 58 عينة جبن أبيض بلدي (40 عينة جبن غنم، 18 عينة جبن بقر) المصنعة من حليب غير معامل حرارياً وغير مضاف إليه بادئ إضافة إلى أن هذا النوع لا يحفظ ضمن محلول ملحي، وقد جُمعت من مناطق مختلفة من القطر العربي السوري، وبشكل عشوائي، في الفترة الممتدة بين آذار2012 وآذار 2013، حيث اعتبر قالب الجبن الأبيض الصغير عينة واحدة بحسب (سليق وزملائه، 2011)، ونقلت العينات - باستخدام أوعية خاصة زجاجية محكمة الإغلاق ومعقمة بالصاد الموصد- إلى المخبر باستخدام مبرد حيث جرى التحليل في اليوم نفسه.

تم الكشف عن وجود بكتيريا *Lc. lactis* باستخدام بيئة M17 من شركة Fluka - ألمانيا والمضاف إليها الغلوكوز 5%. ومن أجل التخفيف تم وضع 10غرام من عينة الجبن الأبيض إلى 90مل من محلول سترات الصوديوم 2% للحصول على تخفيف 10^{-1}، ووضُع المزيج في أكياس معقمة بلاستيكية، وتم مزجها باستخدام مازج مخبري مدة 2 دقيقة، بعدها أخذ 0.1 مل من المزيج الناتج ووضع في منتصف طبق بيئة M17 ونشرها، وحضن الطبق بشكل مقلوب في الدرجة 30 ْم مدة 48 ساعة، وقد جرت جميع المراحل ضمن جو معقم. السلالات التي أعطت مستعمرات نموذجية، أجري عليها بعض من الاختبارات البيوكيميائية كالفحص المجهري وصبغة الغرام، واختبار الكاتالاز بحسب Bissonnette وزملائه (2000).

التقنيات المستخدمة في الكشف عن *Lc. lactis*:

تقنية التفاعل التسلسل البوليميرازي PCR (Polymerase chain Reaction):

هي تقنية تعتمد على تحديد شدفة (fragment) بالاستعانة بمورثتي الـ – 16SrRNA 23SrRNA لتمييز *Lc lactis*، حيث تم تصميم مرئسات primers لحصر شدفة Fragment بطول 685 bp لنوع *Lactococcus lactis*، والمبينة في الجدول (1) مع أطوال الشدفة التي تنتج عنهما مقدرة بالشفع الأساسي ((Base Pairs (bp))، وذلك باستخدام البرنامج الخاص بتصميم المرئسات (NTI Vector) (Singh وRamesh، 2007) وبالاعتماد على تسلسل مادة الدنا للسلالتين *Lc.lactis ssp.lactis* وفق *IL1403(NC – 008527)* (Rossetti وGiraffa، 2005) و *Lc.lactis ssp.cremoris* وفق *SK11(NC -00852)* (Makarova وKoonim، 2007). والمدروسة في الموقع www.ncbi .nlm.nih.gov .

استخدم بيئة مرق M17 (Bulut وزملائه، 2005) لتنمية بكتيريا *Lc. lactis* مدة 24 ساعة على الدرجة 31 ْم، بعدها جرت عملية التثفيل باستخدام مثفلة من نوع JOVUM (14000 دورة بالدقيقة/ 3 دقائق/ 4 ْم)، علق بعدها بـ 100 µl ماء مقطر معقم، ثم وضع المزيج بالتجميد بـ -80 ْم مدة 10 دقائق ونقلت مباشرة إلى حمام مائي 100 ْم مدة 10 دقائق، ليعاد التثفيل على 1400 دورة/ الدقيقة مدة 3 دقائق، ثم استخدم الطافي لإجراء تفاعل PCR (Singh وRamesh، 2007).

من أجل إجراء تفاعل PCR حضر مزيج بحجم 25 µl، احتوى على 2 µl من معلق DNA، بالإضافة إلى 2.5 µl من المحلول الموقي (Reaction Buffer 10X)، 3 µl من كلوريد المغنيزيوم MgCl2 (50 nM)، 0.5 µl من مزيج من النكليوتيدات (dNTP) (بتركيز نهائي في التفاعل 1 p.mol / µl) من شركة Eurobio - فرنسا، 1 µl من مزيج زوج المرئسات الموضح بالجدول (1)، و1 µl من أنزيم البوليمراز (DNA polymerase)، وأكمل الحجم باستخدام ماء مقطر.

الجدول (1) المرئسات المستخدمة وتسلسلها وأطوال الشدف

رمز المرئس	التتابع	المورثة	طول الشدفة
F1	5'-AGAGATGGATCCGCGGTGCA-'3	16SRNA-23SRNA	**729 bp**
R1	5'-TTACAAACTCCCATGGTGTG-'3		

اعتمد برنامج التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR باستخدام جهاز PCR من شركة GENE Amp. - PCR system 9700 - أمريكا، وقد تكون البرنامج من 30 دورة، حيث شمل البرنامج (مرحلة التمسخ Denaturation 94 ْم مدة 45 ثانية، مرحلة الالتحام Annealing 60 ْم مدة 45 ثانية، مرحلة الاستطالة Extension 72 ْم مدة 45 ثانية)، كما تضمن برنامج التحضين عند الدرجة 92 °م مدة 10 دقائق لدورة واحدة، وفي نهاية الدورات حضنت المحتويات عند الدرجة 72 ْم مدة 10 دقائق كمرحلة استطالة نهائية Final extension، وحُفظت نواتج التفاعل عند الدرجة 4 ْم.

رُحلت نواتج التفاعل على هلام آغاروز (Agarose gel) تركيزه 1.5% في محلول Tris – EDTA (TE) من شركة Eurobio - فرنسا، كما تمت الاستعانة بعياري الوزن الجزيئي للدنا (DNA Marker) من شركة Eurobio – فرنسا. وقد استخدم جهاز الرحلان الكهربائي (electrophorese) من شركة BIO RAD - أمريكا، بجهد (فرق كمون) 85 فولط، وشدة تيار 150 أمبير مدة ساعة، وبعد انتهاء المدة درست الحزم المتشكلة وحللت الصور باستخدام جهاز ماسح الهلامة من شركة UVITEC – أنكلترا.

نظام API 20 Strep: تم استخدام نظام API 20 Strep للتمييز بين تحت أنواع النوع *Lactococcus lactis* (من شركة BioMérieux – فرنسا)، وتتضمن التقنية مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية التي تسمح بدراسة استقلاب الكربوهيدرات المميزة والنتائج

التي يتم الحصول عليها من هذا النظام تطابق بمساعدة برنامج معلومات (دليل رقمي) للتعرف على البكتريا (Anon، 1993).

دراسة مجموعة من خصائص السلالات المعزولة: درس مقدرة السلالات المعزولة على إنتاج الغاز من تخمير الغلوكوز باستخدام بيئة ثلاثي سكر الحديد (TSI)، وقدُر استهلاك السترات باستخدام بيئة (Simon citrate agar) من شركة MERCK - ألمانيا (Kempler وMcKay، 2003) ودرس أيضاً نمو السلالات على درجتي الحرارة 10 ْم و45 ْم باستخدام مرق M17 حيث حضنت مدة 72 ساعة في الدرجة 31 ْم ثم درس نمو السلالات Savadogo وزملاؤه (2004)، ودرس النمو في تراكيز مختلفة لملح الطعام NaCl (4% و6.5 %) والتي جرت باستخدام مرق M17 المضاف له كلوريد الصوديوم NaCl بتراكيز مختلفة لدراسة تأثيرها على السلالات المعزولة مع الاحتفاظ بأنبوب للمقارنة لا يحتوي على تركيز ملحي، وتحضن الأنابيب بدرجة حرارة 31ْم مدة 48 ساعة، يدل وجود عكارة ضمن الأنبوب على مقدرة البكتيريا على النمو في التركيز الملحي للبيئة (Thomas وPritchard، 1997)، وتمت دراسة نمط تخمير السلالات المعزولة للحليب - لمعرفة نوع التخمر (متجانس أو غير متجانس)- حيث تم تنمية البكتيريا في 10 مل من الحليب المعقم كامل الدسم نسبة الجوامد الكلية فيه حوالي 11%، وحضنت الأنابيب على الدرجة 31 ْم مدة 24 ساعة، وتعد البكتيريا ذات تخمر متجانس في حال أعطت خثرة متماسكة مع عدم ظهور ظاهرة فصل المصل من الخثرة، أما في حال أعطت البكتيريا خثرة هشة مع وجود فقاعات وتكسر للخثرة فيمكن اعتبارها غير متجانسة التخمر (الحديثي والسيمري، 1993).

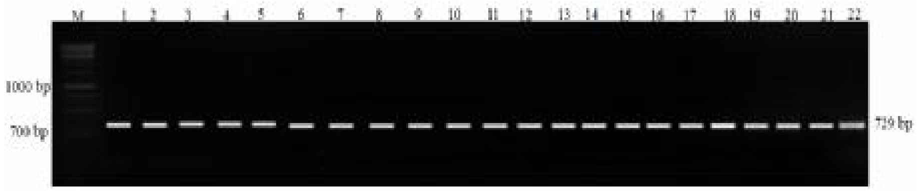
النتائج والمناقشة

تم عزل ما مجموعه 135 عزلة نامية على بيئة M17 منها 21 عزلة ذات أشكال مستعمرات نموذجية، كانت تحت المجهر كروية تتجمع بصورة أزواج أو سلاسل قصيرة موجبة الغرام، سالبة الكاتلاز وهي الصفات الأساسية لبكتيريا *Lc. lactis* بحسب Sharpe (1979)، أي بنسبة من السلالات المعزولة 15.55 %.

استخدمت تقنية PCR ونظام API 20 Strep على 21 سلالة فقط نتيجة إعطائها الصفات والخصائص الأولية التي ذكرها كل من Florez وزملائه (2006) منها عدم إنتاج الغاز إضافة لكونها كروية الشكل تحت المجهر وموجبة الغرام وسالبة الكاتلاز، والتي أظهرت الصفات الأساسية لبكتيريا *Lc. lactis*.

نتائج تقنية PCR: تظهر الصورة (1) عصابات بطول 729 bp ناتجة عن تفاعل الـ PCR باستخدام زوج المرئس F1 وR1 بعد إجراء الرحلان الكهربائي لنواتج التفاعل على هلام الأغاروز (1.5%) وباستخدام عياري الوزن الجزيئي للدنا (Ladder، 100bp).

حيث تظهر المسارات من 1 إلى 21 في الصورة (1) عصابات السلالات التي تم عزلها من بيئة M17 والنامية بالشروط المذكورة أعلاه، وفي المسار 22 سلالة *Lc.lactis* عيارية من شركة هانسن – الدنمارك. تبين النتيجة بأن جميع العصابات لها طول واحد يساوي 729 bp ويتناسب طول الشدفة مع ما أورده Kok وزملاؤه (2005) ويتناسب مع تسلسل مادة الــدنا المدروسة في الموقع www.ncbi.nlm.nih.gov حول النوع *Lc. lactis*. اعتمدت الدراســة الحالية على تقنية PCR لتحديد السلالات التي تتبع النــوع *Lc. lactis* باســتخدام الــزوج البرايمرات الموضح في الجدول (1) وبالاعتماد على المورثة 16s RNA.



الصورة (1) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الــ PCR باستخدام المرئسات F1 وR1 للشدفة بطول 729 bp.

حيث إنَّ M: عياري الوزن الجزيئي للدنا، 1-21: سلالات *Lc. lactis* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي.

نتائج نظام API 20 Strep: يظهر الجدول (2) بعض خــصائص الــسلالات عنــد استخدام نظام API 20 Strep. والذي ساعد في تحديد تحت الأنواع.

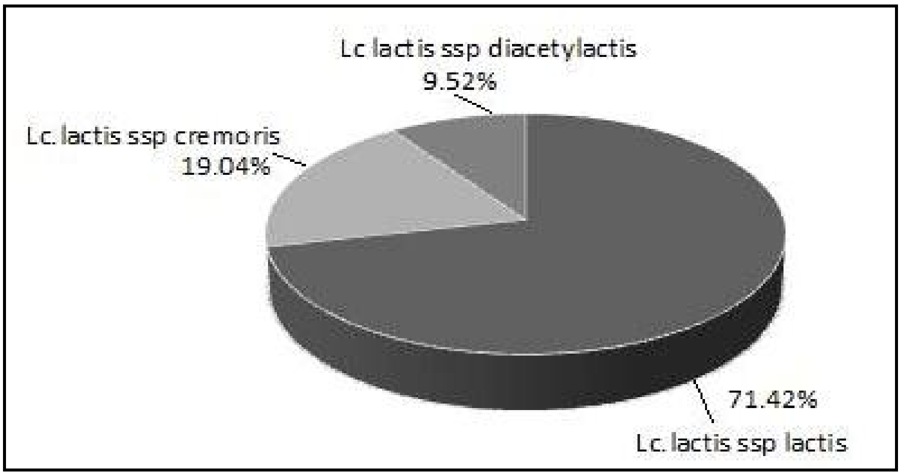
الجدول (2) جدول ببعض خصائص السلالات.

RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	عدد السلالات	النوع
+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	15	*Lc.lactis ssp lactis*
+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	4	*Lc.lactis ssp cremoris*
+	+	+	-	+	+	±	+	-	-	2	*Lc lactis ssp diacetylactis*
Vp	**Hip**	**Esc**	**PYRA**	**αGAL**	**GURβ**	**βGAL**	**PAL**	**LAP**	**ADH**	**عدد السلالات**	**النوع**
-	±	+	-	+	-	+	-	-	±	15	*Lc.lactis ssp lactis*
+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	4	*Lc.lactis ssp cremoris*
+	±	+	-	-	-	±	-	-	-	2	*Lc lactis ssp diacetylactis*

إذ: PAL: فوسفات النفتالين، LAP: الليوسين، ADH: آرجنين، SOR: سوربيتول، GURβ: ثنائي حمض نفتالين غليكونيك، PYRA: حمض بيروغلوتاميك، VP: فوسكابروسكاور، HIP: الهيبوليك، GLYG: غليكوجين، LAC: لاكتوز، TRE: تريهلوز، INU: اينولين، RAF: رافينوز، AMD: اميدون، ARA: آرابينوز، RIB: ريبوز، GAL: غالاكتوز، MAN: ثنائي المانتينول، ESC: اسكولين،

جميع السلالات التابعة للنوع *Lc. lactis* المذكورة في الجدول (2)، كانت غير قادرة على تخمير كل من الغليكوجين (GLYG)، الارجنين (ADH)، السوربيتول (SOR) وفوسفات النفتالين (PAL)، في حين أن جميع السلالات كانت قادرة على تخمير كل من تريهلوز (TRE)، اللاكتوز (LAC)، ثنائي المانتينول (MAN)، الارابينوز(ARA) والرايبوز (RIB). كانت قادرة على تخمير الغالاكتوز (GAL)، اللاكتوز (LAC)، والتريهالوز (TRE)، في حين أختلفت مقدرة السلالات المدروسة في تخمير باقي مجموعة الاختبارات المدروسة كالرافينوز (RAF)، الأنيولين (INU)، الاميدون (AMD) والاسكولين (ESC) وهذا يتوافق مع الصفات العامة التي ذكرها العالم Bissonnette وزملاؤه (2000).

عند دراسة السلالات 21 المعزولة على بيئة M17، وُجد أن 15 سلالة كانت تتبع لتحت النوع *Lc. lactis ssp lactis* (فكانت نسبة وجود هذا النوع من السلالات المدروسة 71.42%)، في حين تم تعين 4 سلالات تابعة لتحت النوع *Lc.lactis ssp cremoris* (أي نسبة وجودها في السلالات المدروسة 19.04%)، أما 2 سلالة المتبقية فقد اتبعت لتحت النوع *Lc. lactis ssp lactis biovar diacetylactis* (أي نسبة وجودها في السلالات المدروسة 9.52%) كما في الصورة (2):



الصورة (2) نسب توزع سلالات النوع *Lc. Lactis* في الجبن الأبيض البلدي المحلي

يظهر الجدول (3) ملخص بنتائج تحديد السلالات المعزولة للنــوع *Lc. Lactis* مــن الجبن الأبيض البلدي المحلي باستخدام نظام API 20 Strep بعد أن تــم التعــرف علــى هويتها باستخدام تقنية PCR:

الجدول (3) نسبة المئوية للتحديد باستخدام نظام API 20Step لسلالات النــوع *Lc. Lactis* في الجبن الأبيض البلدي المحلي

السلالة	البكتيريا	نسبة التحديد بنظام API 20STREP%
1	*Lc.lactis ssp lactis*	95
2	*Lc.lactis ssp lactis*	98
3	*Lc.lactis ssp lactis*	95
4	*Lc.lactis ssp lactis*	96
5	*Lc.lactis ssp lactis*	98
6	*Lc.lactis ssp lactis*	98
7	*Lc.lactis ssp lactis*	97
8	*Lc.lactis ssp lactis*	99
9	*Lc.lactis ssp lactis*	98
10	*Lc.lactis ssp lactis*	95
11	*Lc.lactis ssp lactis*	96
12	*Lc.lactis ssp lactis*	93
13	*Lc.lactis ssp lactis*	95
14	*Lc.lactis ssp lactis*	91
15	*Lc.lactis ssp lactis*	98
16	*Lc.lactis ssp cremoris*	95
17	*Lc.lactis ssp cremoris*	89
18	*Lc.lactis ssp cremoris*	98
19	*Lc.lactis ssp cremoris*	97
20	*Lc lactis ssp diacetylactis*	96
21	*Lc lactis ssp diacetylactis*	96

نلاحظ من الجدول أعلاه أن السلالات الواحد والعشرين للنوع *Lc. Lactis* المعزولــة من الجبن الأبيض البلدي المحلي والتي أعطت مستعمرات نموذجية على أطباق M17 تم التأكد من تحت أنواع هذه السلالات باستخدام نظام API 20STREP وقد تــم تحديــدها سابقاً باستخدام تقنية PCR. بالتالي حدث تطابق تام بنسبة 100% في تحديد السلالات بين نظام API 20STREP وتقنية PCR. كما لوحظ من الدراسة انخفاض في نــسبة وجــود تحت نوع *Lc. lactis ssp cremoris* بالمقارنة مع تحت نوع لنوع *Lc. lactis ssp lactis*

والتي تعد من الأنواع السائدة في الفلورا الطبيعية كونها أكثر استقراراً مع شروط البيئة بالمقارنة مع الأولى والتي تعد من الأنواع النادرة التي تعزل من الجبن لذا نجد أن نسبتها المئوية في منتجات الجبن أكبر بكثير من الأولى بحسب Klijn وزملائه (1995) وCorroler وزملائه (1998). وقد احتجنا للاستعانة بزوج من المرئسات من أجل تحديد بكتيريا *Lc. lactis* عن باقي أنواع بكتيريا حمض اللبن يتوافق مع Dutka-Malen وزملائه (1995) و Nishitani وزملائه (2004).

نتائج دراسة خصائص السلالات لمجموعة السلالات المنتقاة: يظهر الجدول (4) نتائج دراسة بعض من خصائص السلالات المعزولة.

الجدول (4) دراسة خصائص السلالات المعزولة

البكتيريا		*Lc.lactis ssp lactis*	*Lc.lactis ssp cremoris*	*Lc lactis ssp diacetylactis*	المجموع
عدد العزلات		15	4	2	21
صبغة الغرام		+	+	+	
الكاتلاز		-	-	-	
إنتاج غاز CO_2		-	-	-	
النمو في درجات الحرارة	**10 ْم**	+	+	+	
	45 ْم	-	-	-	
النمو بتركيز NaCl	**4%**	15	4	2	
	6.5%	15	4	2	
استهلاك السترات		-	-	+	
تخمير الحليب		**متجانس**	**متجانس**	**متجانس**	21

يظهر الجدول تعداد البكتيريا التي أعطت نتيجة إيجابية في الاختبار

لوحظ اختلاف خصائص السلالات فيما بينها تبين أنها تتبع للنوع *Lc. lactis* والتي بلغت 21 سلالة وجد أن جميع السلالات كانت متجانسة التخمر حيث لم تنتج السلالات التابعة للنوع *Lc.lactis* الغاز عند تخمير الغلوكوز وهذا يوافق عمل العالمين Al-Zoreky وSandine (1991)، وما ذكره العالم Mora وزملاؤه (2002).

15 سلالة كانت قادرة على تحليل السترات حيث تتميز بكتيريا *Lc. lactis* subsp. *diacetylact* من بين جنس *Lactococci* بقدرتها على تحليل السترات وإعطاء ثنائي الأستيل (Kempler وMcKay، 2003). جميع السلالات نمت في 10 ْم ولم تنمُ في الدرجة 45 ْم وبالتالي فإن درجة الحرارة لها تأثير كبير على نموها بحسب Guessas وKihal (2004)، وجميع السلالات كانت قادرة على النمو في تركيز 4% و6.5% من

NaCl، وربما يعود ذلك إلى وجود مورثة GadC، وهي المورثة المسؤولة عن تشفير مجموعة من الأحماض الأمينية لتكون بروتين ربما يضاف إلى بروتينات الجدار الخلوي (Cotter وHill، 2003) تحفز هذه المورثة على النشاط بوجود تركيز عالٍ من ملح كلوريد الصوديوم (Sanders وزملاؤه، 1998)؛ (kim وزملاؤه، 1999).

الاستنتاجات

- توجد بكتيريا *Lc.lactis* في فلورا الأجبان البيضاء البلدية المصنعة من حليب غير معامل حرارياً.
- من الممكن استخدام تقنية PCR في الكشف عن بكتيريا التابعة للنوع *Lc. lactis* وبالتالي يمكن عزلها واستخدامها كبادئ في تصنيع منتجات الألبان.
- إمكانية نمو السلالات المعزولة في تركيز NaCl يصل إلى 6.5% والدرجة يميز السلالات المحلية لتكيفها مع الظروف البيئية.

المراجع Reference

أبو يونس، عهد، وصياح أبو غرة، وسمير سليق. 2007. الكشف عن بكتيريا حمض اللبن المعزولة مـــن بعض منتجات الألبان السورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 23(2):317-334.

سليق، سمير، وعبد الحكيم عزيزية، وعهد أبو يونس، وندى شمبورش .2011. التصنيع الغذائي. جامعة دمشق. 105-113.

الحديثي، هديل، وإحسان السيمري. 1993. علم البكتيريا العملي. كلية العلوم جامعة البصرة: 97– 110.

Al-Zoreky, N. and W. E. Sandine. 1991. Lactococcus genus: a selective and differential agar medium” Journal of Food Sciences, 56:1729-1734.

Beresford, P.T., N.A. Fitzimons, N.L. Brennan,and T.M. Cogan, 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11: 259-274.

Bissonnette, F., S. Labrie, H. Deveau, M. Lamoureux, and S. Moineau. 2000. “Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese” Journal of Dairy Sciences, 83:620–627.

Bonetta, S., E. Carraro, K. Rantsiou,and L. Cocolin .2008. Microbiological characterisation of Robioladi Roccaverano using PCR-DGGE, Food Microbiology, 25: 786-792.

Cho, S. L., S. W. Nam, J. H. Yoon, J. S. Lee, A. Sukhoom and W. Kim. 2008. Lactococcus chungangensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. International journal of Systemtic Evolution Microbiology, 58: 1844-1849

Corroler, D., I. Mangin, N. Desmasures and M. Gueguen. 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. Applied environmental microbiolog, 64: 4729-4735.

Cotter P. D. and C. Hill, 2003. Surviving the acid test, responses of gram – positive bacteria to low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(3):429-453.

Dolci, P., V. Allessandria, K. Rantsiou, L. Rolle, G. Zeppa,and L.Cocolin. 2008. Microbial dynamic of Castelmango PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology, International Journal of Food Microbiology. 122: 302-311.

Dutka-Malen S., S. Evers,and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the specieslevel of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33:24-27.

Euzéby J. P., 2007. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Lactococcus*. Available at http://www.bacterio.cict.fr/index.html.

Florez, A. B., T. M. Lopez-Diaz, P. Alvarez-Martin, and B. Mayo. 2006. Microbial characterisation of the tradition Spanish blue veined carbrales cheese identification of dominant lactic acid bacteria. Food Technology, 233:503-508.

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

Jany, J.-L., and G. Barbier. 2008. Culture-independentmethods for identifying microbial communities incheese, Food Microbiology, 25: 839-848.

Kempler G. M. and L. L McKay. 2003. Improved medium for detection of citrate – fermenting *Streptococcuslactis* subsp diacetylactis. Journal of Applied and EnvironmentalMicrobiology, 39:956-927

Kim, W. S., J. Ren, and N. W. Dunn. 1999. "Differentiation of *Lactococcuslactis* subspecies lactis and subspecies cremoris strains by their adaptive response to stresses' FEMS Microbiology Letters, 171:57-65.

Klijn, N., A. H. Weerkamp, and W. M. de Vos. 1995. Detection and characterizationof lactose-utilizing Lactococcus spp. in natural ecosystems. Applied and Environmental Microbiolog, 61:788–792.

Kok, J., G. Buist, A. L. Zomer, S.F. T. Van Hijum, and O. P. Kuipers. 2005. "Comparative and functional genomics of lactococci.". FEMS Microbiology Reviews, 29 (3): 411-33.

Makarova, K. S. and E.V. Koonin. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology, 189(4):1199-208.

Mora D., M. G. Fortina, C. Parini, G. Ricci, M. Gatti, G. Giraffa and PL. Manachini. 2002. 'Genetic diversity and technological properties of Streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products' Journal of Applied Microbiology, 93(2):278-87.

Mrkonjić Fuka, M., M. Engel, A. Skelin, S. Redžepović, and M. Schloter. 2010. Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese, International Journal of Food Microbiology, 142: 19-24.

Nishitani Y., E. Sasaki, T. Fujisawa and R. Osawa. 2004. Genotypic analyses of lactobacilli with a range of tannase activities isolatedfrom human feces and fermented foods. Systemtic Applied Microbiology, 27:109–117.

Peterson, S. D. and R. T., Marshall. 2001. Peptidase profiling of lactobacilli associated with Cheddar cheese and its application to identification and selection of strains of cheese ripening studies. J. Dairy Sci., 73: 1454-1464

Pogačić, T., D. Samaržija, V. Corich, D. Maura, D-M. Kagkli, A. Giacomini, A. Čanžek Majhenič, and I. Rogelj, 2010. Microbiota of Karakačanski Skakutanac, anartisanal fresh sheep cheese studied by culture-independent PCR-ARDRA and PCR-DGGE, Dairy Science and Technology, 90: 461-468.

Pu, Z. Y., M. Dobos, G. K. Y. Limsowtin, and I. B. Powell. 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus Lactococcus. Journal of Applied Microbiology, 93: 353-361.

Rossetti L,and G., Giraffa. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. J. Microbiol Methods. 63(2):135-44.

Sanders, J. W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J. R. Brands, G. Venema and J. Kok, 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in Lactococcus lactis and its regulation. Molecular Microbiology, 27:299-310.

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

Sharpe, M. E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. In: Skinner, F. A. and D. W. (Eds). London: Academic Press. Pp:233-259.

Singh, A. K., and A. Ramesh. 2007. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: Insights from a PCR-based approach. Food Microbiology, 25: 278-287.

Thomas T. D. and G. C. Pritchard. 1997. Proteolytic enzymes of Dairy starter Cultures. FEMS Microbiol. Rev, 46:245-268

Vernile, A., G. Giammanco, G. Spano, T. P. Beresford, P. F. Fox, and S. Massa. 2008. Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano chees. Dairy Science & Technology, 88:619-629.

Vlieg, J. E. T., J. L. W. Rademarker, H. Bachmann, D. Molenaar, W. J. Kelly, and R. J. Siezen. 2006. Natural diversityand adaptive response of Lactococcus lactis. Current Opinion in Biotechnology, 17: 183-190.

Stiles M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria and their current taxonomy. International journal of food microbiology, 36:1-29.

Giraffa, G. and L. Rossetti. 2005. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters, 237:133–138

Bulut, C., H., Gunes, B., Okuklu, S., Harsa, S., Kilic, H. S., Coban, and A. F., Yenidunya. 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese Comlek peyniri from Cappadocia region. Journal of dairy research. 72:1-6.

Received	**2014/12/18**	إيداع البحث
Accepted for Publ.	**2015/03/23**	قبول البحث للنشر