

تصنيف بكتيريا *Leuconostoc* المعزولة من الجبن الأبيض باستخدام تقنية FTIR

رنا قصرملي⁽¹⁾ وعهد أبو يونس⁽²⁾

الملخص

هدفت الدراسة إلى بحث إمكانية التحديد السريع لبكتيريا *Leuconostoc* المعزولة من الأجبان البيضاء الطازجة السورية المصنعة من حليب البقر (6 عينات) وحليب الغنم (20 عينة) باستخدام تقنية تحويل فوريير للأشعة تحت الحمراء (FTIR). وبيّنت تقنية تفاعل التسلسل البوليمري (PCR) باستخدام مرئسات خاصة، أنها تتبع للجنس *Leuconostoc*. وتبين أن 12 عزلة منها تابعة للنوع *Ln.mesenteroides*. ثم اختبرت هذه العزلات باستخدام جهاز FT-IR، فتبين بالمقارنة مع مكتبة الجهاز، أن العزلات جميعها تتبع للجنس *Leuconostoc*. وأن 4 عزلات منها تابعة للنوع *Ln.citreum* في حين لم يمكن واعتماداً على تقنية PCR (ووفقاً للمرئسات المستخدمة) تحديدها، كما ساعدت في تحديد تحت الأنواع *Ln.mesenteroides subsp mesenteroides* و *Ln.mesenteroides subsp dextranicum*، التي اكتفت تقنية PCR بالإشارة إلى أنها تتبع للنوع *Ln.mesenteroides*. ومكنت تقنية FT-IR من تحديد البكتيريا خلال فترة لا تتعدى 25 ساعة. ومن الممكن استخدامها للكشف عن البكتيريا في الأغذية.

الكلمات المفتاحية: *Leuconostoc*، تصنيف، العزل، الجبن الأبيض، تقنية تحويل فوريير للأشعة تحت الحمراء، تقنية تفاعل التسلسل البوليمري.

⁽¹⁾ طالبة ماجستير، ⁽²⁾ مدرس، قسم العلوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق

Identification of *Leuconostoc* bacteria isolated from white cheese using FTIR technique

Kassermally, R.⁽¹⁾ and A. E. Abou Younes⁽²⁾

Abstract

This study aimed to investigate the possibility of rapid identification of isolated bacteria *Leuconostoc* from Syrian white fresh cheese made of cow and ewe milk using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). 20 isolates (14 from ewe milk cheese and 6 from cow milk cheese) were isolated. These isolates were pretasted with PCR technique using specific primers. Results indicated that these isolates are belonged to the genus *Leuconostoc* and 12 of them are belonged to *Ln. mesenteroides* species. The results of FTIR technique showed in comparison to device library that all isolates are belonged to genus *Leuconostoc*, and 4 of these isolates are belonged to *Ln. citreum* species which could not be identified using PCR method (with the used primers), and helped to identify the following subspecies: *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* and *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* while PCR technique described them belonging only to a *Ln. mesenteroides* species. Moreover, FTIR technique was able to give the results within 25 hours, thus it can be used in identification of food bacteria more quickly.

Keywords: *Leuconostoc*, Identification, Isolate, White cheese, FTIR, PCR.

⁽¹⁾ MSc student, ⁽²⁾ Assistant Prof. Dep. Food Sci., Fac. Agric. Damascus Univ. Syria.

المقدمة

تمتلك بكتيريا *Leuconostoc* أهمية اقتصادية و غذائية (Lefier وزملاؤه، 2000)؛ (Dziuba وزملاؤه، 2007)، وتعتبر من البكتيريا التي تعزز نكهة الجبن بشكل عام (Hemme و Foucaud-Scheunemann، 2004)، إضافة إلى دورها في الخصائص التكنولوجية للأجبان (Jovanovic و Pešic-Mikulec، 2005).

يتبع الجنس *Leuconostoc* عائلة *Leucostocaceae* (De Vos وزملاؤه، 2009)، وهي من البكتيريا الكروية التي تصبح أكثر تطوياً في الأوساط الحامضية (Kahala، 2005) وهي موجبة الغرام، سالبة الكاتلاز، غير متحركة (Garvie، 1986)، وغير متجانسة التخمر (Schillinger و Holzapfel، 1992). ويضم الجنس *Leuconostoc* حالياً الأنواع الآتية: *Ln. carnosum*، *Ln. gelidum*، *Ln. lactis*، *Ln. mesenteroids*، *Ln. citreum*، *Ln. pseudomesenteroides*، *Ln. fallax*، *Ln. Kimchi* و *Ln. Daba* (Daba وزملاؤه، 1991)، وبحسب Kim وزملاؤه (2000) فإن النوع *Ln. mesenteroides* يضم تحت الأنواع *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides* و *Ln. mesenteroides subsp Ln. mesenteroides subsp dextranicum* و *Ln. mesenteroides subsp cremoris*.

وتحدد بكتيريا *Leuconostoc* تقليدياً بناء على الاختبارات الشكلية والاختبارات البيوكيميائية. إلا أن مثل هذه الاختبارات تستغرق وقتاً طويلاً وتستخدم فيها مجموعة كبيرة من الطرق المتنوعة. وغالباً ما تكون النتائج على مستوى السلالة غير دقيقة وغير حاسمة (Lefier وزملاؤه، 2000). ومن أجل تحديد أكثر دقة يجب تطبيق طرائق تعتمد على التقنيات الوراثية (Stackebrandt وزملاؤه، 2002)، إذ اعتمد على المورثة 16sRNA (Cibik وزملاؤه، 2000). وقد ساهم الاعتماد على التقنيات الجزيئية في تغيير مفهوم تبعية بعض الأنواع والسلالات، ولا سيما أن هذه التقنية تعتمد على عمليات تضخيم مورثة 16S rDNA ومضاعفتها كلياً أو جزئياً، وهو ما اعتمده الكثير من الدراسات في تصنيف الأنواع التابعة لجنس *Leuconostoc* (Perez وزملاؤه، 2002؛ Randazzo وزملاؤه، 2002؛ Dal Bello وزملاؤه، 2003؛ Ennahar وزملاؤه، 2003؛ Jang وزملاؤه، 2003؛ Reeson وزملاؤه، 2003)، لكونها أكثر موثوقية من غيرها من الطرائق التي تعتمد على الخصائص البيوكيميائية في تحديد الأنواع التابعة لجنس *Leuconostoc* (Jang وزملاؤه، 2003).

وهذه الطرائق، على الرغم من دقتها، لا تستخدم بصورة مستمرة في الصناعة بسبب احتوائها على تقنيات معقدة (Dziuba وزملاؤه، 2007)، لذلك كان ضرورياً اعتماد طرائق بديلة، على أن تكون سريعة وموثوقة وعالية الدقة (Naumann وزملاؤه، 1991). واستخدم Coblen (1911) الأشعة تحت الحمراء في تحديد النوعية البيولوجية لمجموعة

من الأغذية (Naumanne وزملاؤه، 1991). وخلال الفترة بين عامي 1950 و1960 أجريت أبحاث كثيرة حول تطبيق استخدام الأشعة تحت الحمراء (Infrared spectroscopy) في تحديد الأحياء الدقيقة (Dziuba وزملاؤه، 2007)، وقد أطلق على هذه التقنية اسم (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) FT-IR، وهي تقنية تعتمد على إسقاط الأشعة تحت الحمراء على البكتيريا. وامتصاص البكتيريا هذه الأشعة يتعلق بنسبة الأحماض الأمينية والمواد الدهنية الموجودة في الجدار الخلوي. ويجري تحليل الأشعة المرتدة بواسطة جهاز حاسوب مزود ببرنامح إحصائي خاص يعبر عنه بخطوط بيانية. وتمكن هذه التقنية من إعطاء درجة قرابة بين السلالات المدروسة عبر شجرة القرابة، بعد أن يقوم جهاز الحاسوب بالمقارنة مع خطوط موجودة في مكتبة مزود بها (Elliott و Facklam، 1993؛ Barreau و Wagener، 1990؛ Villani وزملاؤه، 1997). ومنذ العام 2008 اعتمدت هذه التقنية لتعرف البكتيريا الموجودة في الأغذية بشكل عام؛ لأنها تقنية دقيقة وسهلة (Dziuba، 2011). وفي عام 2000 اعتمد Amiel وزملاؤه في تحديد بكتيريا *Leuconostoc* من الألبان المتخمرة، واستعان Dziuba وزملاؤه عام 2007 بتقنية FTIR لتحديد سلالات من البكتيريا التابعة لجنس *Leuconostoc*. وفي عام 2011 استخدم Dziuba هذه التقنية في تحديد بكتيريا *Leuconostoc* من الحليب الخام.

الأهداف

تحديد بكتيريا التابعة لجنس *Leuconostoc* المعزولة من الأجبان البيضاء الطازجة السورية (المصنعة من حليب بقر وغنم) باستخدام تقنية FTIR التي سبق أن حددت باستخدام تقنية PCR.

مواد البحث وطرقه

أجري الكشف عن وجود الأنواع التابعة لبكتيريا *Leuconostoc* في 32/ عينة جبن أبيض بلدي، مصنعة من حليب الأغنام و17/ عينة جبن أبيض بلدي، مصنعة من حليب الأبقار، وهذه الأنواع من الأجبان لم تعامل حرارياً ولم يصف لها بادئ ولم تحفظ ضمن محلول ملحي. وقد جمعت العينات من مناطق مختلفة من القطر العربي السوري (دمشق، ريف دمشق، درعا، منطقة الغاب)، عشوائياً، في الفترة الممتدة بين تموز 2011 وتموز 2012. وقد اعتبر قالب الجبن الأبيض الصغير عينة واحدة (Torkar و Teger، 2006)، ثم نقلت العينات إلى المخبر باستخدام مبرد، وجرى التحليل في اليوم نفسه.

وقد كُشف عن وجود بكتيريا *Leuconostoc* باستخدام بيئة MRS (Florez وزملائه، 2006)، المضاف لها فانكوميسين بتركيز 30 ملغ/مل، من شركة MERCK بألمانيا. واستخدم محلول سترات الصوديوم 2% باعتباره محلول تخفيف، وتم التحضين في الدرجة 30 م مدة 48 ساعة، وجرت جميع المراحل ضمن جو معقم.

والسلالات التي أعطت مستعمرات نموذجية، أُجري عليها بعض من الاختبارات البيوكيميائية، كالفحص المجهرى وصبغة الغرام، واختبار الكاتالاز (Harrigan و McCance، 1976).

واستعين بتقنية PCR، وهي تقنية تعتمد على تحديد شدة (fragment) بالاستعانة بمورثتي الـ 16sRNA لتمييز *Leuconostoc*، إذ صُممت مرئسات primers لحصر شدة Fragment بطول 729 bp لجنس *Leuconostoc*، ويطول 200 bp للنوع *Ln. mesenteroids*، والمبينتين في الجدول (1) مع أطوال الشدة التي تنتج عنهما مقدرة بالشفع الأساسي (Base Pairs (bp))، وذلك باستخدام البرنامج الخاص بتصميم المرئسات (NTI Vector) (Singh و Ramesh، 2007)، وبالاعتماد على تسلسل مادة الدنا (DNA) المدروسة في الموقع www.ncbi.nlm.nih.gov. واستخدمت بيئة MRS broth (Bulut، 2003) لتنمية بكتيريا *Leuconostoc* مدة 24 ساعة في الدرجة 30 °س. جرت بعدها عملية التثقيل على 14000 دورة في الدقيقة مدة 3 دقائق، علق بعدها بـ 100 µl ماء مقطر معقم، ثم وضع المزيج بالتجميد بـ -80 °س مدة 10 دقائق، ونقلت مباشرة إلى حمام مائي 100 °س مدة 10 دقائق، ليعاد التثقيل على 14000 دورة في الدقيقة مدة 3 دقائق، ثم استخدم الطافي لإجراء تفاعل PCR (Singh و Ramesh، 2007). ومن أجل إجراء تفاعل PCR حضر مزيج بحجم 25 µl، احتوى على 2 µl من معلق الدنا، بالإضافة إلى 2.5 µl من المحلول الموقى (Reaction Buffer 10X)، 3 µl من كلوريد المغنيزيوم (MgCl₂ 50nM)، 0.5 µl من مزيج من النكليوتيدات (dNTP) (بتركيز نهائي في التفاعل 1p.mol/µl) من شركة Eurobio - فرنسا، 1 µl من مزيج زوج المرئسات الموضح بالجدول (1)، و 1 µl من أنزيم البوليمراز (DNA polymerase)، وأكمل الحجم باستخدام ماء مقطر.

الجدول (1) المرئسات المستخدمة وتسلسلها وأطوال الشدات

البكتيريا	الرمز	التتابع	المورثة	طول الشدة
<i>Leuconostoc</i> ssp.	4F	AGAGATGGATCCGCGGTGCA	16S RNA	729 bp
	4R	TTACAAACTCCCATGGTGTG		
<i>Ln. mesenteroids</i>	IIF	ACCAAAATCCATTTCCACCA	16SRNA- 23SRNA	200 bp
	IIR	TCTGTGGAAGCATATCAGCAA		

وقد اعتمد برنامج التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR باستخدام جهاز PCR من شركة PCR system 9700 - GENE Amp. - أمريكا، وتكون البرنامج من 30 دورة، وشمل (مرحلة التسخين) (Denaturation) 94 °س مدة 45 ثانية، ومرحلة الالتحام (Annealing) 60 °س مدة 45 ثانية، ومرحلة الاستطالة (Extension) 72 °س مدة 45 ثانية، كما تضمن برنامج التحضين عند الدرجة 92 °س مدة 10 دقائق لدورة واحدة، وفي نهاية الدورات

حضنت المحتويات عند الدرجة 72 °س مدة 10 دقائق باعتبارها مرحلة استطالة نهائية (Final extension)، وحُفظت نواتج التفاعل عند الدرجة 4 °س. ثم رُحِّلت نواتج التفاعل على هلام آغاروز (Agarose gel) وتركيزه 1.5% في محلول Tris EDTA - (TE) من شركة Eurobio - فرنسا. كما استعين بعياري الوزن الجزيئي لل (DNA Marker) من شركة Eurobio - فرنسا. وقد استخدم جهاز الرحلان الكهربائي (electrophoresis) من شركة BIO RAD - أمريكا، بجهد (فرق كمون) 85 فولط، وشدة تيار 150 أمبير مدة ساعة. وبعد انتهاء المدة درست الحزم المتشكلة وحلت الصور باستخدام جهاز ماسح الهلامية من شركة UVITEC - أنكلترا.

استخدام تقنية FTIR:

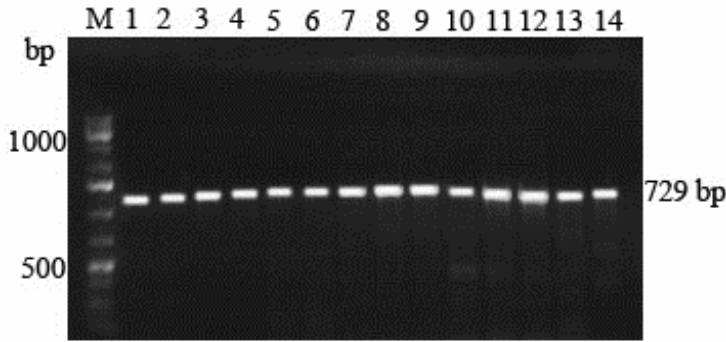
زرعت البكتيريا على بيئة APT الأغار - ألمانيا، ثم حضنت في الدرجة 30 °س مدة 24 ساعة. وبعد انتهاء فترة التحضين، أخذت كمية مناسبة وكافية من الزراعة بواسطة إبرة تلقیح بلاتينية خاصة قطرها 1 مم (بحسب توصيات العمل على الجهاز FT-IR)، ووضعت ضمن 100 ميكرو لتر من ماء مقطر معقم، ومزجت جيداً. ثم أخذ من المعلق مقدار 25 ميكرو لتر ووضع على صفيحة خاصة (وهي صفيحة مصنعة من الكوارتز وخاصة بجهاز FT-IR مقسمة إلى 96 حفرة) وضمن الحفرة المخصصة مع ملاحظة عدم تلوث خارج الحفرة. ووضعت الصفيحة ضمن مجفف على الدرجة 60 °س مدة 30 دقيقة. ثم وضعت الصفيحة في جهاز FT-IR (جهاز من شركة HTS - ألمانيا) - في مخبر الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية، وجرى تحليل العينات والأطياف باستخدام برنامج OPUS بالمقارنة مع مكتبة أطياف بكتيريا حمض اللبن الخاصة بالجهاز.

النتائج والمناقشة

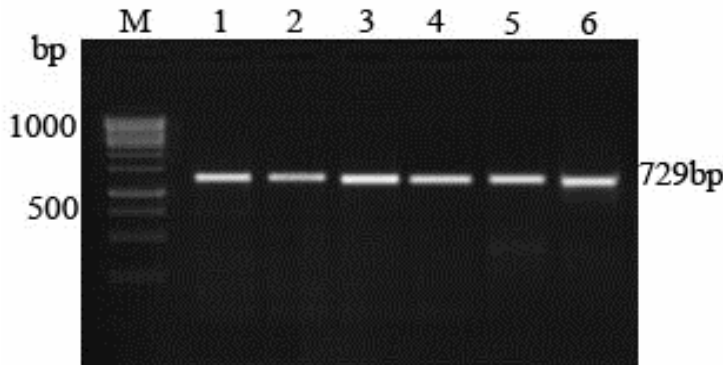
عزل ما مجموعه 90 عزلة من عينات جبن أبيض بلدي، مصنعة من حليب الأغنام و55 عزلة من عينات جبن أبيض بلدي، مصنعة من حليب الأبقار من العزلات النامية في بيئة MRS المضاف لها فانكوميسين بتركيز 30 ملغ/مل. وقد اختيرت العزلات التي أعطت مستعمرات تعتبر نموذجية، ظهرت كروية موجبة الغرام تحت المجهر وكانت سالبة الكاتالاز وغير متجانسة التخمر بحسب ما أوردت Sharpe (1979). وقد وجد أنها 14 عزلة من مجموع 90 عزلة اختيرت من عينات الجبن المصنع من حليب الغنم (شكلت نسبة 15.56%)، في حين وجدت 6 عزلات من مجموع 55 عزلة حُصل عليها من عينات الجبن المصنع من حليب البقر (شكلت نسبة 10.9%).

نتائج تقنية PCR: تظهر الصورتان (1 و 2) عصابات بطول 729 bp ناتجة عن تفاعل الـ PCR باستخدام زوج المرئس 4F و 4R- زوج المرئس الخاص بجنس

Leuconostoc - بعد اجراء الرحلان الكهربائي لنواتج التفاعل في هلام الأغاروز (1.5%)، وباستخدام عياري الوزن الجزيئي للدنا (100bp Ladder). والصورة (1) تظهر فيها المسارات من 1 إلى 14 عصابات العزلات المأخوذة من الجبن الأبيض المصنع من حليب الغنم، أما الصورة (2) فتظهر فيها المسارات من 1 إلى 6 عصابات العزلات المأخوذة من الجبن الأبيض المصنع من حليب البقر. وتبين النتيجة أن العصابات كلها لها طول واحد يساوي 729bp، ويتناسب طول الشدفة مع ما أورده Singh و Ramesh (2007) ويتناسب مع تسلسل مادة ال د. ن. ا. المدروسة في الموقع www.ncbi.nlm.nih.gov حول الجنس *Leuconostoc*.

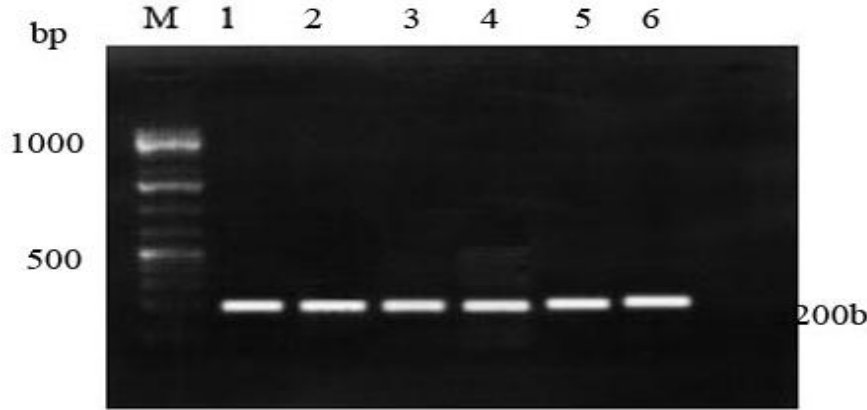


الصورة (1) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR حيث أن M: عياري الوزن الجزيئي للدنا، 1-14: سلالات *Leuconostoc* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي مصنع من حليب غنم.

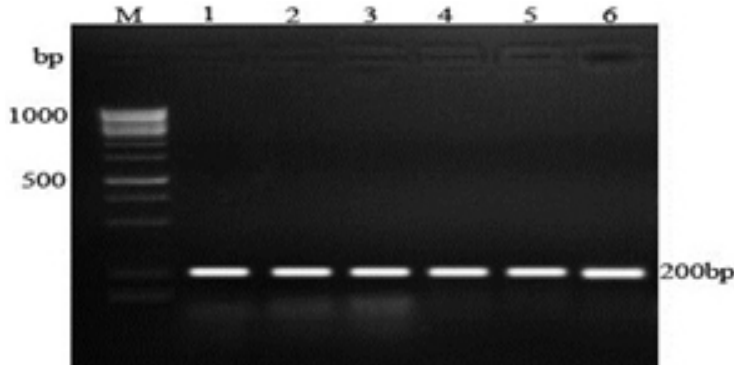


الصورة (2) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR حيث أن M: عياري الوزن الجزيئي للدنا، 1-6: سلالات *Leuconostoc* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي مصنع من حليب بقر.

وتظهر الصورة (3) والصورة (4) عصابات بطول 200 bp ناتجة عن تفاعل الـ PCR باستخدام زوج المرئس (IIR،IIF) بعد إجراء الرحلان الكهربائي لنواتج التفاعل في هلام الأغاروز (1.5%) وباستخدام عياري الوزن الجزيئي للـ D. N. A. (100bpLadder)، إذ تظهر المسارات من 1 إلى 6 عصابات السلالات التي كانت قد أعطت نتيجة إيجابية في الصورة (1) والصورة (2) (أي أنها بكتيريا تابعة للجنس *Leuconostoc*). وتبين النتيجة أن جميع العصابات لها طول واحد يساوي 200 bp ويتناسب طول الشدفة مع ما أورده Ramesh و Singh (2007)، أي أن هذه السلالات تابعة للنوع *Ln. mesenteroids*.



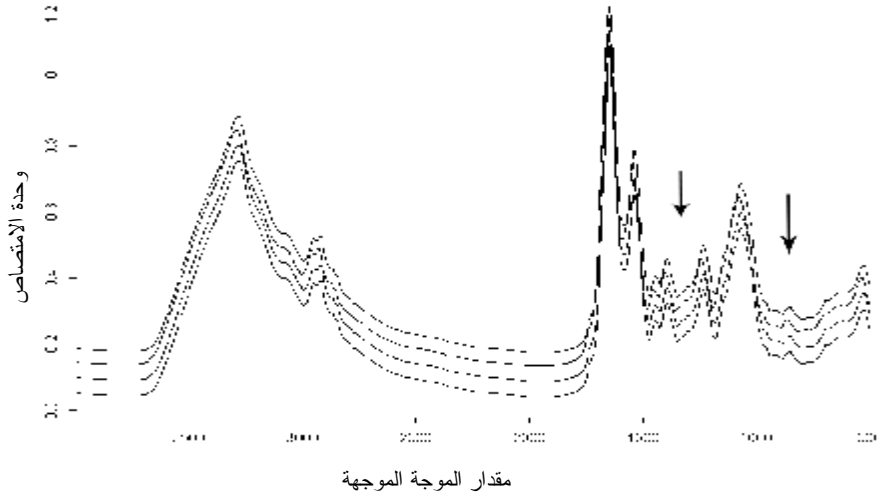
الصورة (3) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR، حيث أن M: عياري الوزن الجزيئي للدنا، 6-1: سلالات *Ln. mesenteroids* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي غنم



الصورة (4) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR حيث M: عياري الوزن الجزيئي للدنا، 6-1: سلالات *Ln. mesenteroids* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي المصنع من حليب البقر.

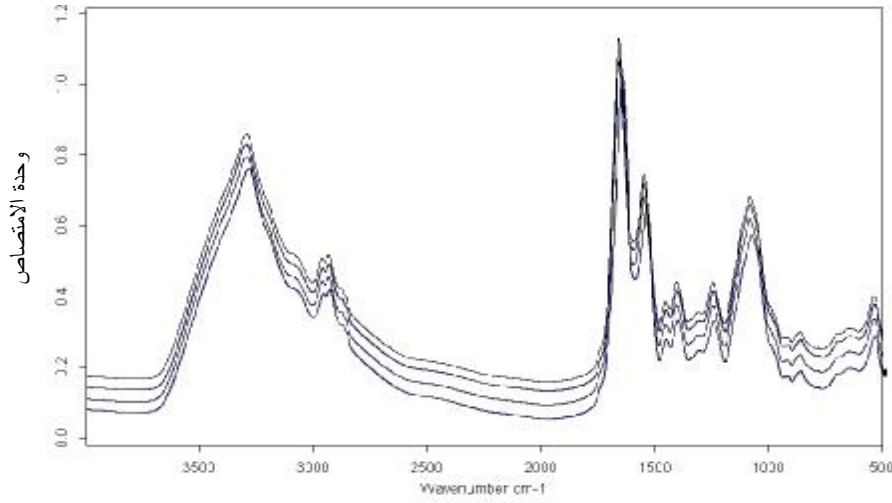
نتائج تقنية FT-IR

درست الأطياف باستخدام البرمجيات الإحصائية ومكتبة الأطياف المزود بها جهاز تقنية FTIR لتحديد السلالات المعزولة من الجبن الأبيض البلدي. لقد درست مجالات الطيف 3000-2800 سم⁻¹ و 1800-1500 سم⁻¹ و 1500-1200 سم⁻¹ و 1200-900 سم⁻¹ و 900-700 سم⁻¹ بحسب توجيه Amiel وزملائه (2000)، وتظهر الصور 5، 6، 7 و 8 نتائج الأطياف. في الصورة (5) وضحت أطياف السلالات الأربع (التي ظهرت بالصورة (1) وأخذت الأرقام 8-9-13-14) والتي تم التأكد من أنها تتبع للجنس *Leuconostoc*sp، وهي معزولة من الجبن المصنع من حليب الغنم.



الصورة (5) أطياف أربع سلالات تتبع لجنس *Leuconostoc*

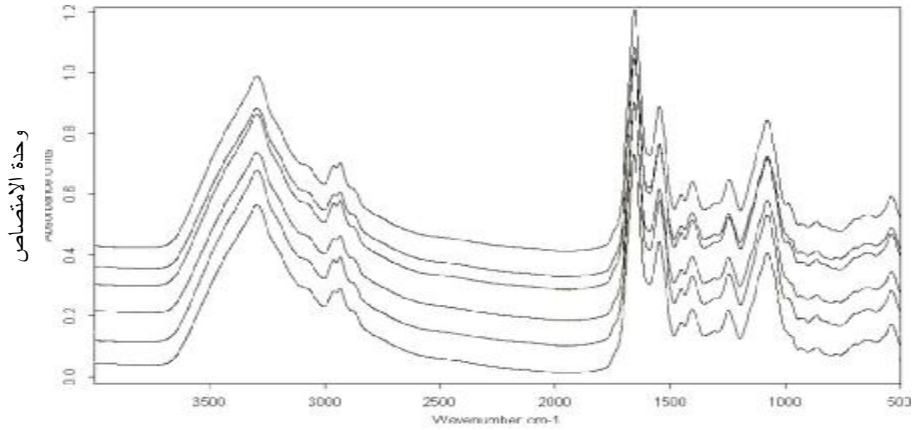
توضح الصورة (6) الأطياف متقاربة للسلالات التي ظهرت في الصورة (1) وأخذت الأرقام 7-10-11-12، المعزولة من الجبن الأبيض المصنع من حليب الغنم، والتي أظهرت المكتبة جهاز FTIR أنها تتبع النوع *Ln.citreum*.



مقدار الموجة الموجهة

الصورة (6) أطياف السلالات الأربع التابعة للنوع *Ln.citreum*

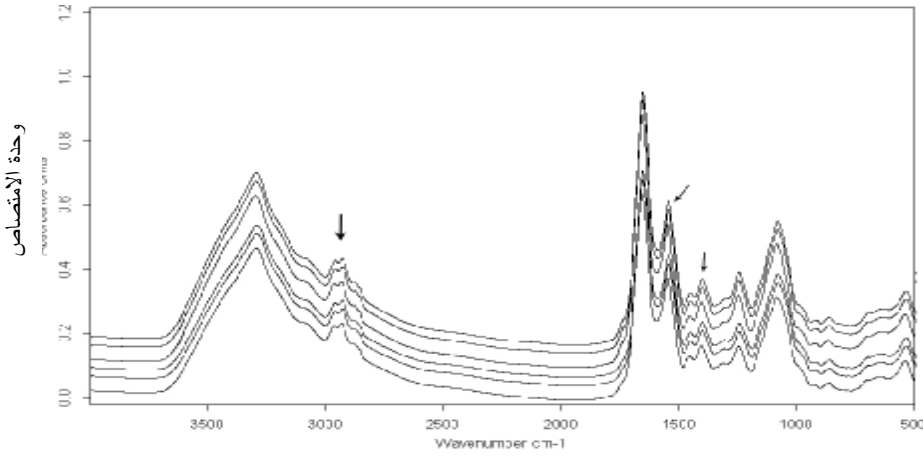
ويظهر في الصورة (7) أطياف ست سلالات أخذت الأرقام من 1 حتى 6 في الصورة 3، والأرقام 1 حتى 6 في الصورة (1). وقد عزلت هذه السلالات من الجبن الأبيض المصنع من حليب الغنم، وأكدت هذه الأطياف بالمقارنة مع مكتبة جهاز FT-IR أنها تتبع النوع *Ln. mesenteroids subsp mesenteroids*.



مقدار الموجة الموجهة

الصورة (7) أطياف السلالات الستة التابعة للنوع *Ln. mesenteroids subsp mesenteroids*

وتبين الصورة (8) أطياف السلالات الست المعزولة من الجبن الأبيض المصنع من حليب البقر والتي ظهرت في الصورة 2 والصورة 4. وقد وُجد بالمقارنة مع مكتبة الجهاز أنها تتبع للنوع *Ln. mesenteroids subsp dextranicum*.



مقدار الموجة الموجهة

الصورة (8) أطياف السلالات الستة التابعة للنوع *Ln. mesenteroids subsp dextranicum*

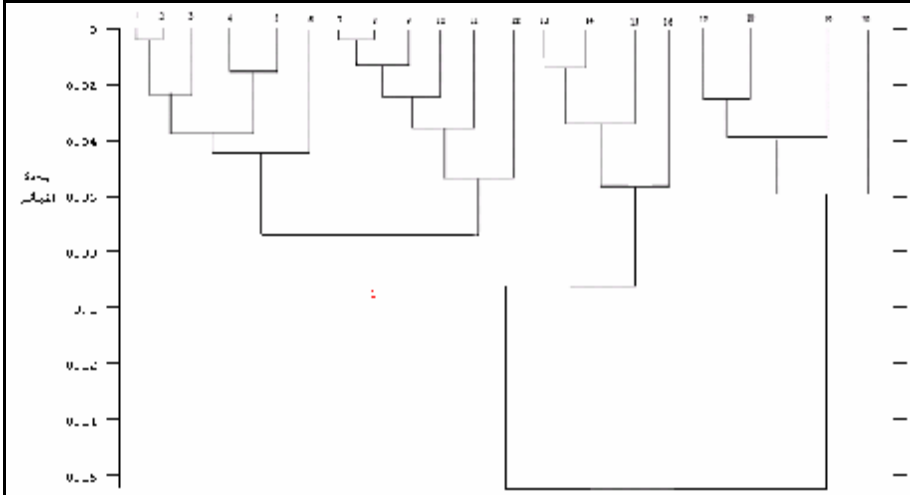
فالمنطقة الطيفية الواقعة بين 3000 و 2800 سم⁻¹ الظاهرة في الصورة (5، 6، 7، 8) هي المنطقة الخاصة بالأحماض الدهنية التي يسيطر عليها بحسب مكتبة الجهاز الجذر (CH_2 و $\text{CH}=\text{CH}$ و $-\text{CH}_3$). وتتناسب نسبة الامتصاص للأشعة تحت الحمراء مع النسب المشار إليها مع الجدار الخلوي الموافق للبكتيريا بحسب (Dziuba وزملائه، 2007)؛ (Pegram، 2007)؛ (Amiel وزملائه، 2000).

والمنطقة المحصورة بين 1800 و 1500 سم⁻¹ هي المنطقة الخاصة بالأמידات والبيبتيدات (وهي المنطقة المبينة في الصورة 5-6-7-8). ونسبة الامتصاص فيها تزيد عن 1 وحدة امتصاص، وهذه البكتيريا هي موجبة الغرام وذلك بحسب (Amiel وزملائه، 2000).

والمنطقة الواقعة بين 1500 و 1200 سم⁻¹ هي المنطقة الخاصة لمركبات الفوسفاتية هي المنطقة المتخصصة بتحديد الجنس. وعند مقارنة الأطياف الظاهرة في الصورة (5، 6، 7، 8) مع مكتبة الجهاز يلاحظ أنها تتوافق مع بعضها ومع جنس *Leuconostoc* بالاعتماد على ما أورده (Dziuba (2011).

المنطقة الواقعة بين 1200 و 900 سم⁻¹ هي المنطقة الخاصة بيولي سكريايد والكربوهيدرات الموجودة في الجدار الخلوي، وهي منطقة خاصة لتعزيز تعرف الجنس. وبالإستعانة بهذه المنطقة والمقارنة مع المكتبة المزود بها جهاز تبين أنها تتبع جنس *Leuconostoc* بالاعتماد على ما أورده (Dziuba (2011)). والمنطقة الواقعة بين 900-700 سم⁻¹ هي المنطقة الخاصة للتمييز بين الأنواع، التي اختلفت بحسب المكتبة المزود بها الجهاز. وقد اختلفت هذه المنطقة في الصورة (5، 6، 7، 8).

وبالاعتماد على (Shukla وزملائه، 2011) وبمراجعة المناطق الخاصة بامتصاص الدكستران 3000-2800 سم⁻¹ و 1800-1500 سم⁻¹ ومقارنتها مع مقدار امتصاص الدكستران في مكتبة الجهاز وجد أن الأطياف التي تعود إليها الأنواع هي *Ln. mesenteroids subsp dextranicum* وتظهر الصورة (9) التحليل العنقودي لـ 20 طيف FT-IR وهي تخص سلالات عزلت من الجبن الأبيض البلدي المصنع من حليب البقر والغنم، التي سبق أن تم التأكد من أنها تتبع للجنس *Leuconostoc* باستخدام تقنية PCR كما هو موضح سابقاً في الصورتين 1 و 2 باستخدام المرئسات 4F-4R الخاصة بالجنس (الجدول 1).



الصورة (9) التحليل العنقودي لـ 20 طيف FT-IR تابعة لجنس *Leuconostoc* المعزولة من الجبن الأبيض (بقر وغنم)، حيث 1-6: سلالات *subsp dextranicum*، 7-12: *Ln. mesenteroids*، 13-16: *mesenteroides*، 17-20: سلالات الجنس *Leuconostoc*.

لقد توزعت السلالات العشريون المدروسة والمعزولة من الجبن الأبيض البلدي (المصنعة من حليب البقر والغنم) ضمن مخطط التحليل العنقودي المبين في الصورة (9)، الذي أجري باستخدام البرنامج الحاسوبي OPUS، وبحسبه تجمعت السلالات ضمن فرعين رئيسيين حوى الأول منهما السلالات الأربع التي تم تأكيد أنها تتبع الجنس *Leuconostoc* (وهي السلالات 17، 18، 19 و 20 الموضحة بالصورة 5) دون تحديد نوعها، وهذا يتوافق مع النتائج المتوصل إليها من تقنية PCR (الصورة 1 وهي السلالات ذات الأرقام 8-9-13-14)، في حين ضم الفرع الثاني السلالات المتبقية التي توزعت بدورها إلى ثلاثة فروع. فهناك 4 سلالات تبين بحسب تقنية FT-IR أنها تتبع للنوع *Ln.citreum* (وهي ذات الأرقام 13-14-15-16)، وهي سلالات لم تحدد بتقنية PCR بل حدد فقط أنها تابعة لجنس *leuconostoc* (الصورة 1 السلالات ذات الأرقام 7-10-11-12) التي ظهرت في الصورة (6).

أما باقي السلالات التي أتت عند استخدام تقنية PCR وباستخدام المرئسات الخاصة بالنوع *Mesenteroids Ln.* (IIF-IIR) والتي بدورها انقسمت إلى مجموعتين الأولى ضمن الصورة (7) الخاصة بالسلالات المعزولة من الجبن الأبيض المصنع من حليب الغنم، والثانية ضمن الصورة (8) الخاصة بالسلالات المعزولة من الجبن الأبيض المصنع من حليب البقر، فقد تم التأكيد، ضمن تقنية FTIR، أنها تتبع النوع *Ln. mesenteroids*، إضافة إلى تحديد تحت النوع لهذه السلالات، فقد أوضحت تقنية الـ FTIR أن السلالات المعزولة من جبن مصنع من حليب الغنم (السلالات 7، 8، 9، 10، 11 و 12) هي سلالات تتبع تحت النوع *mesenteroids* (وهي التي ظهرت أطيافها في الصورة 7)، أما السلالات التي عزلت من جبن أبيض مصنع من حليب البقر (السلالات 1، 2، 3، 4، 5 و 6) فإنها تتبع تحت النوع *dextranicum* (وهي التي ظهرت أطيافها في الصورة 8). ويظهر الجدولان (2) و(3) ملخصاً لنتائج تحديد السلالات المعزولة من الجبن الأبيض البلدي (المصنع من حليب الغنم والبقر).

الجدول (2) مقارنة بين تقنيتي PCR و FT-IR للجبن المصنع من حليب الغنم

رقم السلالة	تقنية PCR	تقنية FT-IR
1	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>
2	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>
3	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroides subsp mesenteroides</i>
4	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidessubsp mesenteroides</i>
5	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidessubspmesenteroides</i>
6	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidessubspmesenteroides</i>
7	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Ln. citreum</i>
8	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Leuconostocssp</i>
9	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Leuconostocssp</i>
10	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Ln. citreum</i>
11	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Ln. citreum</i>
12	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Ln. citreum</i>
13	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Leuconostocssp</i>
14	<i>Leuconostocssp</i>	<i>Leuconostocssp</i>

الجدول (3) مقارنة بين تقنيتي PCR و FT-IR للجبن المصنع من حليب البقر

رقم السلالة	تقنية PCR	تقنية FT-IR
1	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidssubspdextransicum</i>
2	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidssubspdextransicum</i>
3	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidssubspdextransicum</i>
4	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidssubspdextransicum</i>
5	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidssubspdextransicum</i>
6	<i>Ln. mesenteroids</i>	<i>Ln. mesenteroidssubspdextransicum</i>

واستنتج أن السلالات العشرين المعزولة من الجبن البلدي، والتي أعطت مستعمرات نموذجية على أطباق MRS المضاف لها فانكوميسين تم التأكد من أنواعها باستخدام تقنية FT-IR التي أسهمت أيضاً في تحديد الأنواع وتحت الأنواع للسلالات المعزولة إضافة إلى تحديد درجة القرابة بين هذه السلالات المعزولة، علماً أن تقنية الـ FT-IR أقل كلفة وهي موثوقة وسريعة فلا يتجاوز الوقت التي يُحتاج في استعمالها ساعة (Pegram، 2007).

المراجع References

- Amiel C., L. Marley, M. C. Curk-Daubie and J. Travert, 2000. Potentiality of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy Lactic acid bacteria. *Le Lait*, 80: 445-459.
- Barreau C. and G. Wagener. 1990. Characterisation of *Leuconostoc* strains from human sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 28:1728-1733
- Bulut C., 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. *Biotechnology and Bioengineering*, İzmir Institute of Technology, Master of Science. Turkey.
- Cibik R., E. Lepage and P. Tailliez, 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 267-278.
- Daba H., S. Pandian, J. F. Gosselin, R. E. Simard, J. Huang and C. Lacroix. 1991. Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3450-3455
- Dal Bello, F., J. Walter, W. P. Hammes and C. Hertel. 2003. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microbial Ecology* 45: 455-463
- De Vos P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A Rainey, K. H. Schleifer and W.B. Whitman 2009. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology*. Second Edition-Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London. 624-635.
- Dziuba B., A. Babuchowski, D. Nalecz and M. Niklewicz, 2007. "Identification of Lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis" *International Dairy journal* 17:183-189.
- Dziuba B. 2011. Identification of selected *leuconostoc* species with the use of FTIR spectroscopy and artificial neural networks" *Technol. Aliment.* 10(3):275-285.
- Elliott J. A. and R. R. Facklam. 1993. Identification of *Leuconostoc* spp. by Analysis of Soluble Whole-Cell Protein Patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. 31 (5): 1030-1033.
- Ennahar S., Y. Cai and Y. Fujita, 2003. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 444-451.
- Florez, A. B., T. M. Lopez-Diaz, P. Alvarez-Martin and B. Mayo, 2006. Microbial characterization of the tradition Spanish blue veined carbrales cheese identification of dominant lactic acid bacteria. *Food Technology*, 233:503-508.
- Garvie, E.I. 1986. Genus *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.

- Harrigan, W. F. and M. E McCance, 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press.
- Hemme D. and C. Foucaud-Scheunemann. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods, Int. Dairy J.. 14: 467–494
- Holzappel, W. H. and U. Schillinger, 1992. The genus *Leuconostoc* In the Prokaryotes, pp. 1508- 1534. Edited by A. Balows, H.G..Truper, M. Dworkin ,W.Harder and K.H. Schleifer. New York. Springer.
- Kahala, M. 2005. *Leuconostoc* Strains Unable to Split a Lactose Analogue Revealed by Characterization of Mesophilic Dairy Starters. Food Technology. Biotechnol. 43 (2): 207–209
- Jang J., B. Kim, J. Lee and H. Han, 2003. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PRCRFLP analysis. Journal of Microbiological Methods. 55: 295–302
- Kim J., J. Chun and H. U. Han. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. Nov. a new species from kimchi. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50:1915-1919.
- Lefier D., H. Lamprell and G. Mazerolles. 2000. Evolution of *Lactococcus* strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. Le Lait 80, 247-254.
- Naumann, D., H. Labischinski and P. Giesbrecht, 1991. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy(FT-IR). In W. H. Nelson (Ed.), Modern techniques for rapid microbiological analysis (pp. 43–96). New York, USA: VCH Publishers.
- Pegram, S. 2007. Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Identification of Bacteria of Importance to the Food Industry. Master of Science Nutrition and Food Sciences-Utah State University.
- Perez, G., E. Cardell and V. Zarate, 2002 Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies isolated from Tenerife cheese. Letters in Applied Microbiology, 34, 82–85.
- Randazzo, C. L., S. Torriani, A. D. L. Akkermans, W. M de Vos and E. E. Vaughan, 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1882–1892.
- Reeson, A. F., T. Jankovic, M. L.Kasper, S. Rogers and A. D. Austin. 2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespa germanica*. Insect Molecular Biology, 12:85–91.
- Sharpe, M. E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. In: Skinner, F. A. and D. W. (Eds). pp.233-259. London: Academic Press.
- Shukla R, S. Shukla, V. Bivolarski and I. Iliev 2011. Structural characterization of insoluble dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the presence of maltose. Food Technology. Biotechnol., 49(3): 291-296.

- 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.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen and G.M. Garrity, 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1043–1052.
- Torkar K. G and Teger S. G. 2006. The presence of some pathogen micro organisms, yeasts and moulds in cheese samples produced at small dairy – processing plants. *Acta agriculture Slovenica*. 88(1):37-51.
- Villani, F., G. Moschetti, G. Blaiotta and S. Coppola, 1997. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 578–588.

Received	2013/05/15	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2013/10/10	قبول البحث للنشر