اختبار قدرةعزلات *Lactobacillus* على تحليل المواد العضوية

Testing the ability of *Lactobacillus spp* for Organic material degradation

ولاء شاكر محمود
كلية العلوم / جامعة بغداد
Walaa Shakir Mahmood
College of Science/ University of Baghdad

المستخلص

تم الحصول على اثنتا عشرة عزلة من بكتريا *Lactobacillus spp* من مجموع اربع وعشرين عينة اخذت من مصادر مختلفة توزعت كالاتي :- اربع عينات من التربةS ، عشرين عينة من الاغذية المتنوعة شملت :- الخضروات اربع عينات V ، الفواكه (عينتان) F ، الاطعمة المطبوخة التالفة عينتانF0 ، الالبان وشملت :- اللبن اربع عينات Y ، الجبن اربع عينات CH ، القشطة عينة واحدة C وعينة واحدة لكل من السمك FM1 لحم الضاءن SHM1 ولحم الدجاج CHM1. اجريت لهذه العزلات اختبارات مظهرية ، مجهرية وبايوكيمياوية عديدة ، كما اختبرت قدرتها على النمو وتحليل العديد من المواد العضويةمثل :- حامض التانيك الفينول ، الكلوروفورم والهبتان وبمقدار 2 مليلتر من التراكيز (10, 8, 6)% من مادة اساس سابقة الذكر وباستخدام اوساط مختلفة منها NA,MRSA,BHIA. تم اختبار قدرة البكتريا على تحليل حامض التانيك ، امتازت العزلة LC1 بقدرتها على التحليل و بتراكيز عالية في حين امتازت العزلات LY3, LCh1, LV1, LV2, LF1, LF01 بقدرتها على التحليل بتراكيز متوسطة وواطئة ، استطاعت العزلتين Chm1, LFm1, من تحليل حامض التانيك فقط عند وجوده بتراكيز قليلة ، تفوق الوسط MRSA في دعمه لنمو البكتريا وتحليل حامض التانيك . تبين ان العزلات LY2, LCh2, LC1, LF1, LF01 اظهرت قدرة على النمو في جميع الاوساط عند استخدام الفينول كمادة اساس ، في حين العزلات LY2, LCh2, LC1 هي الاكفاء في التحليل من بين جميع العزلات ، تبين ان وسط MRSA هوافضل الاوساط للتحليل . تم استخدام الكلوروفورم كمادة اساس لاختبار قدرة البكتريا على النمو اذ تبين ان العزلات LY2, LY3, LCh2, LC1, LV2, LFm, LF1هي الاكفاءللنمو في حين العزلات LY2, LY3, LChmاظهرت افضل قدرة على التحليل ، كان وسط N.A هو الافضل ، ا ما عند ا ستخدام الهبتان تبين ان العزلات LY2, LY3, LCh2, LV2, LF1, LChm1 اعطت افضل نمو عند التراكيز الثلاث ، اما العزلات LY1, LV2, LF1, LF01 اعطت افضل تحليل و تبين ان وسطN. A هو الافضل .

Abstract

Twelve isolates of *Lactobacillus* sp from twenty four samples were collected from different sources:- four samples from soil (S), twenty samples from different foods includs Vegetable four (V), fruit tow (F), spoilage cooking food tow (F0), Dairy product like Youghart four (Y), cheese four (Ch), Cream one (C) and one sample from fish (Fm1), sheep meat(Shm1), Chicken meat (Chm1). These samples were tested shaply, microscopicaly, biochemicaly and their ability to grow and analyzed different organic material such material like tannic acid, phenol, chloroform, heptan with different concentrations(6,8,10)% by using different type of media likeN.A, MRSA, BHIA.The *Lactobacillus* spp organic material degradation ability were tested and shown the following results, isolates LY3, LCh1, LV1, LV, LF1, LF01were analyzed intermediate and minimum concentrations while two isolates LFM1, LChm1were able to analyzed of tannic acid when found with minimum concentration. The best media MRSA in grow and analyzed of tannic acid. The isolates LY2, LCh2, LC1, LF1, LF01showen ability to grow in all media when phenol were used, while the isolates LY2, LCh2, LC1are the best in analyzed from all isolates , media MRSA is the best

media for analyzed The chloroform were used as substrate to testing ability of bacteria to grow the isolates LY2, LY3, Lch2, Lc1, LV2, LFm, LF1 are the best for grow, while isolates LY2, LY3, LChm showen best ability to analyzed. The media nutrient agar is the best. when heptan are used the isolates LY2, LY3, Lch2, LV2, LF1, LChm1 give best grow in 3 concentrations, while isolates LY1, LV2, LF1, Lf01 give best analyzed.The media nutrient agar is the best.

المقدمة

تعتبر بكتريا *Lactobacillus* عصيات منتظمة تتراوح خلاياها من عصيات طويلة منحنية احيانا الى عصيات قصيرة , غير مكونة للسبورات ، موجبة لملون كرام ، حركتها غير شائعة وان وجدت فتتم بوساطة اسواط محيطية ، تنمو البكتريا على الاوساط الصلبة مكونة مستعمرات صغيرة 3-5mm محدبة وناعمة كما تكون بعض الانواع مستعمرات خشنة عديمة اللون وفي حالات نادرة تكون صفراء او حمراء . ليس للبكتريا رائحة مميزة عند نموها في الاوساط الزرعية الا ان نموها في الاغذية يجعل نكهتها متخمرة نتيجة انتاجها مركبات متطايرة متنوعة مثل الاستيل الثنائي ومشتقاته ، H2S والامينات في الاجبان . تعد بكتريا *Lactobacillus* احياء قادرة على التكيف والنمو الى اقصى حد ومكيفة للنمو على مواد اساس عضوية معقدة ، اذ فضلا عن الكربوهيدرات كمصدر طاقة وكربون تحتاج الى النيوكليوتيدات ، الاحماض الامينية والفيتامينات ، تعد بكتريا *Lactobacillus* من البكتريا المفيدة probiotic التي تستوطن القناة المعوية الدقيقة مثل *L. acidophilus* في بداية القرن العشرين اجريت محاولات لزراعة البكتريا بنجاح دعما للتنمية بكميات كبيرة ، لقد تبين ان ال probiotic الموجودة في المصادر بعضها غير معروف واكثر حساسية لل حامض المعدي مثل الموجودة في اللبن[1,2] . عرفت بكتريا *Lactobacillus* بوصفها بكتريا مفيدة في صناعة الالبان وقسمت الى ثلاث مجاميع:- الاولى تدعى متجانسة التخمر مجبرة Obligate Homofermentation اذ تنتج حامض اللاكتيك من سكر الكلوكوز ، الثانية متباينة التخمر اختيار ية Facultatively Heterofermentation تنتج من حامض اللاكتيك عن طريق تخمير السكريات الخماسية والسداسية اما المجموعة الثالثة فتدعى متباينة التخمر مجبرة Obligate Heterofermentation تنتج حامض اللاكتيك ، الايثانول ، حامض الخليك وثاني اوكسيد الكربون[3] .عرف لبكتريا *Lactobacillus* دورها في تحليل المواد العضوية والفينولية المختلفة وكمثال لها التانين اذ يعرف على انه نواتج فينولية ذائبة في الماء اذ ان هناك صنفين للتانين :- الاول متحلل مائيا مشتق من حامض الكاليك ومن حامض الالجيك ، اما الثاني فهو تانين مكثف يعتبر بعد السليلوز ، الهيمي سليلوز واللكنين ، وعلى العموم يتجمع التانين كمادة ايضية ثانوية في قشور وقلب الخشب للنبات رغم انه مهم للنموفانه يلعب دور عظيم في المناعة مقارنة مع التانين المتحلل مائيا [4]. مما سبق هدف هذا البحث الى 1 – عزل بكتريا *Lacobacillus* من مصادر مختلفة وتشخيصها 2 – اجراء اختبار النمو لبكتريا *Lactobacillus* على اوساط مختلفة ومواد اساس مختلفة وبتراكيز مختلفة 3 – اجراء اختبار التحليل لبكتريا *Lactobacillus* لاوساط مختلفة حاوية مواد اساس مختلفة وبتراكيز مختلفة .

المواد وطرائق العمل

- **عزل بكتريا *Lactobacillus*** جمعت عينات مختلفة من تربة واغذية تالفة (منتجات الالبان , لحوم حمراء وبيضاء , فواكه وخضر تالفة) زرعت بالوسط المغذي MRSB الخاص ببكتريا *Lactobacillus* , حضنت العينات بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة بتوفير 5-3 % ثاني اوكسيد الكربون , نقيت بتخطيط النمو على MRSA وحضنت بنفس الظروف اعلاه .

-**حفظ العزلات :** نميت بتخطيطها على وسط MRSA ، حضنت بدرجة حرارة 37م وبتوفير 5-3 % ثاني اوكسيد الكربون لمدة 48 ساعة ، ثم وضعت بدرجة حرارة 4 م لمدة شهر كامل .

-**تشخيص العزلات:** شخصت العزلات البكتيرية باجراء الاختبارات الكيموحيوية والمظهرية الخاصة بها .

الفحص المجهري : صبغت مسحة خفيفة من مستعمرة مفردة بصبغة كرام ، فحصت تحت العدسة الزيتية لملاحظة استجابتها للصبغة ، كما لوحظ شكل الخلايا وتجمعاتها .

الفحص المظهري: درست صفات المستعمرة على الوسط الصلب من ناحية الشكل ، القوام ، اللون والحجم .
اختبار انتاج انزيم الاوكسديز : اضيفت قطرة من محلول Tetramehyl-*p*-phenylene-diamine الى المستعمرة المنقولة الى ورقة ترشيح داخل طبق زجاجي ، تلون المستعمرة باللون البنفسجي الغامق دليل على انتاج العزلة لانزيم الاوكسديز .
اختبار انزيم الكاتليز: تم نقل النموالبكتيري الى سطح شريحة زجاجية ، اضيفت اليه قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3 % .
اختبار النمو بدرجة حرارة 45-15م: حضنت الانابيب الحاوية على وسط MRSB والملقحة بالعزلات البكتيرية بدرجات حرارة 45-15 م وبوجود 5-3 % ثاني اوكسيد الكربون لمدة ثلاثة ايام .
اختبار تخمير السكريات : حضن وسط تخمر السكريات (ماء البيبتون) ولكن بمضاعفة الحجوم وباستعمال مصادر كربون مختلفة وهي الكلوكوز ، الفركتوز والزايلوز، لقحت الانابيب بعزلات بكتريا *Lactobacillus* حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 5-3 ايام وبوجود 5-3 % ثاني اوكسيد الكربون ، يعد تغير لون الكاشف بروموثايمول بلو من الاخضر الى الاصفر نتيجة موجبة .
اختبار النموبوجود تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم :
لقحت الانابيب الحاوية على وسط MRSB الحاوي على تراكيز 3.5,4.55.5 % من كلوريد الصوديوم بعزلات بكتريا *Lactobacillus* , ثم حضنت بدرجة حرارة 30 م لمدة 5-3 يوم بوجود 5-3 %ثاني اوكسيد الكربون .
اختبار تحلبل المواد العضوية :
اضيفت المواد العضوية للاوساط الاكار المغذي N.A ، وسط نقيع الدماغ القلب BHIA وMRSA بحجم 20 مليلتر /لتر من التراكيز 6,8,10% ، ثم خططت عليه عزلات بكتريا *Lactobacillus* ، حضنت لمدة ثلاثة ايام بدرجة 37 م وبوجود 5-3% ثاني اوكسيد الكربون .
النتائج والمناقشة
العزل
تم الحصول على اثنتا عشرة عزلة من بكتريا *Lactobacillus* spp من عينات مختلفة كانت كالاتي :-
اللبن Y ثلاث عزلات LY1, LY2, LY3 ، الجبن Ch عزلتين LCh2, LCh1 , القشطةLC1 عزلة واحدة ، الخضروات V عزلتينLV1, LV2 ، فواكه F عزلة واحدة LF1 ، اطعمة مطبوخة تالفة (F0) عزلة واحدة LF01 ، اللحوم المتعفنة بانواعها عزلتين LFm1, LChm1 ، في حين لم نحصل على أي عزلة لبكتريا *Lactobacillus* من التربة وكما موضح في جدول (1) . تبين ان اعلى عدد من العزلات كان ثلاثة ، بالرجوع الى مصادر العزل وجد[1,5] ان البروبايوتك توجد باشكال مختلفة في الاغذية مثل اللبن ، حليب متخمر وغير متخمر ، عصائر ، ع سل ، بصل ، حبوب اللقاح . لقد وجد ان بكترياحامض اللاكتيك *Lactobacillus* هي تحول اللاكتوز الى حامض بينما عتر اخرى غير قادرة على ذلك لان لها فعالية واطئة للاكتيز وخصوصا في اللبن الطبيعي ، لقد وجد ان البروبايوتك الموجودة في التربة تملك تحوير وراثي وهي غير اصلية .

جدول (1): عزل بكتريا *Lactobacillus spp*

منطقة العزل	رمز العينة	رمز العزلة	عدد العينات	عدد العزلات	نسبة عدد العزلات الى مجموع العزلات الكلية	نسبة عدد العزلات الى مجموع عدد العينات الكلية
اللبن	Y1	LY1	4	3	23.077	15
	Y2	LY2				
	Y3	LY3				
	Y4	LY4				
الجبن	Ch1	LCh1	4	2	15.38	10
	Ch2	LCh2				
	Ch3	LCh3				
	Ch4	LCh4				
القشطة	C1	LC1	1	1	7.69	5
خضروات	V1	LV1	4	2	15.38	10
	V2	LV2				
	V3	LV3				
	V4	LV4				
فواكه	F1	LF1	2	1	7.69	5
	F2	LF2				
اطعمة مطبوخة تالفة			2		7.69	5
	F01	LF01		1		
	F02	LF02		1		
اللحوم المتعفنة بانواعها						
لحم سمك	Fm1	LFm1	1	1	7.69	5
لحم ضاءن	Shm1	LShm1	1	-		
لحم دجاج	Chm1	LChm1	1	1	8.33	5
التربة	S1		4			
	S2					
	S3					
	S4					
			24	12	99.97	60

التشخيص

نمت جميع عزلات بكتريا حامض الاكتيك *Lactobacillus* spp على الوسط الزرعي التفريقي للعزل وامتازت بوصفها ذات مستعمرات صغيرة الحجم 4 مليمتر ، محدبة السطح ، غير ملونة ، غير شفافة اذ اخذت لون الوسط الزرعي لعدم احتوائها على صبغاته . اتضح من فحص بعض الصفات المجهرية والموضحة في الجدول(2) بان جميع العزلات التي تم الحصول عليها كانت ذات اشكال عصوية مترتبة بشكل سلاسل قصيرة او طويلة ، كانت جميع العزلات موجبة لملون كرام وغير متحركة. كما اظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية ان جميع هذه العزلات كانت سالبة لاختبار الاوكسديز والكاتليز ، تمكنت معظم العزلات من النمو بدرجة حرارة 15 م باستثناء اربع عزلات وبدرجة 45م اشتثناء ثلاث عزلات ، كما استطاعت بعض العزلات النمو بوجود تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم Nacl ، ففي التركيز 3.5 % تمكنت 5 عزلات من النمو وهي (LY2, LC1, LF1, LF01, LChm1) في حين نمت ثلاثة عزلات في التركيز (4.5%) LChm1, LF1, LC1 وعزلتين فقط في التركيز (5.5 %) (LC1, LF1) .اظهر ت نتائج اختبار استعمال المصادر الكربونية على وسط ماء البيبتون مقدرة جميع العزلات على النمو باستعمال الكلوكوز ، في حين تباينت مقدرة هذه العزلات في استعمال الفركتوز ، الزايلوز ، المانيتول ، السكروز ، اللاكتوز والارابينوز حسب الجدول (2)

جدول (2) :تشخيص بكتريا *Lactobacillus spp*

العزلة *Lactobacillus*	الفحص المجهري	الفحص المظهري	فحص الكاتليز	فحص الاوكسيديز	تخمير السكريات			تحمل تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم			درجات حرارة مختلفة		
					الزايلوز	الفركتوز	الكلوكوز	3..5	4..5	5..5	15 م	45 م
LY1	قصيرة عريضة ومفردة	مستعمرات محببة ضعيفة	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
LY2	قصيرة ضعيفة	مستعمرات ضعيفة جدا	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
LY3	متطاولة سلسلة	مستعمرات محببة قوية النمو	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
LCh1	متطاولة سلسلة	مستعمرات محببة قوية النمو	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
LCh2	قصيرة او ضعيفة	مستعمرات ضعيفة النمو	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
L C1	قصيرة سلسلة او مفردة	مستعمرات محببة ضعيفة النمو	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
L V1	قصيرة عريضة	مستعمرات محببة جيدة النمو	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
LV2	قصيرة عريضة	مستعمرات محببة قوية النمو	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
L F1	قصيرة عريضة	مستعمرات محببة جيدة النمو	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
L F01	قصيرة عريضة	مستعمرات محببة قوية النمو	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
L Fm1	قصيرة عريضة	مستعمرات جيدة النمو	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
L Chm1	قصيرة عريضة	مستعمرات محببة قوية النمو	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+

لقد وجد [6] ان بكتريا *Lactobacillus* لها انواع عديدة تعتبر مستوطن صديق مثل *L .acidophilus* اذ وجد انها بكتريا مفيدة مهمة في الحفاظ على الصحة ، تعتبر فلورا متوازنة في الامعاء الدقيقة تحث هضم سكر الحليب ، تساعد في انتاج الفيتامين والانزيمات . وجد ان منتجات حامض اللاكتيك تخمد الميكروبات المضرة في الامعاء وتساعد في السيطرة على النمو المختبري مثل كانديد ، اما *L. plantarum* وجد انها لها قدرة هضم عالية نسبيا لتحطيم البروتين من مخلفات الامعاء قبل دخوله المجرى الدموي ، اذ وجد انها تلتصق بغشاء المعي منتجة حامض اللاكتيك وتعمل كمضادات طبيعية acidophililin وكذلك تبين ان كل من ظروف وسط النمو وطور النمو البكتيري له الاثرفي تركيب الجدارالخلوي لبكتريا *Lactobacillus* ، كما له اثر في قدرتها على الالتصاق ، ووجد ان التغيرات في الوسط التي تتم بوساطة وفرة المغذيات قد تفسر بصورة جزيئية سبب الاختلاف بين الاجناس لهذه البكتريا والاختلاف بين المصنفين لهذه البكتريا في استيطانها للقناة المعوية .

اختبار قدرة بكتريا *Lactobacillus* على النمو وتحليل المواد العضوية

أ. **حامض التانيك :-** استطاعت بكتريا *Lactobacillus* من النمو بوجود تركيز 6% من حامض التانيك في الاوساط N.A, MRS, BHI باستثناء العزلتين LY2, LC1. لقد اظهرت العزلات LF01, LY3 نموا كثيفا في جميع الاوساط مقارنة بالعزلات الاخرى ، كما يعد وسط MRS الحاوي تركيز 6 % حامض التنيك الوسط الاكثر ملائمة لنمو جميع العزلات باستثناءالعزلتين LY3, LCh1 حسب الجدول (3) .

نمت عزلات Lactobacilli بوجود تركيز 8 % من حامض التانيك على جميع الاوساط وبكثافات مختلفة كانت اكثرها على وسط MRS واقلها في BHI ، وتميزت العزلة L Y3 ثم تلتها LV2 بكثافة نمو عالية على جميع الاوساط في حبن لم تتمكن العزلة LY2 من النمو في أي وسط من الاوساط الثلاثة . ان زيادة تركيز حامض التانيك في الاوساط الى 10 % ثبطت كثافة نمو بعض العزلات خاصة على الوسطين MRS, BHI بشكل واضح مثل العزلات LY3, LFM1, LChm1 ومن ناحية اخرى ساعدت في نمو العزلة Y3 على الوسطين MRS, BHI وزادت من كثافة نمو العزلات LCh2,LC1,LV1 بشكل واضح , يلاحظ ان الوسطين MRS, BHI الحاويان على تركيز 10% من حامض التانيك اظهرا ملائمة عالية لنمو عزلات بكتريا *Lactobacillus*.

جدول (3) : مقدرة وكثافة نمو عزلات بكتريا *Lactobacillus* spp في عدة اوساط حاوية على تراكيز مختلفة من حامض التانيك

العزلة	النمو عند			النمو عند			النمو عند		
Lactobacillus spp	% 6			% 8			% 10		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	+	+	++	-	+	+	-	+	+
L Y2	-	-	-	-	-	-	-	+	+
L Y3	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	+
L Ch1	++	+	++	++	+	+	+	++	++
L Ch2	+	-	-	++	+	-	-	++	++
L C1	-	-	-	+	+	-	+++	++	++
L V1	-	+	++	+	+	-	++	++	++
L V2	+	+++	++	++	+++	+++	+	++	++
L F1	++	+++	++	++	+++	-	-	++	++
L F01	+++	+++	++	++	+	-	++	++	++
L Fm1	+	+++	++	+	+	+	+	+	+
L Chm1	+	+++	++	+	+++	+++	+	+	+

- = لايوجد نمو + = نمو عادي ++ = نمو متوسط +++ = نمو كثيف

لقد وجد [7] ان بعض عتر البكتريا التي لا تملك فعالية انزيم التانيز تكون هالة غير واضحة حول المستعمرات على وسط معامل بالتانين تلك الهالة ترجع او تعود الى عدم ارتباط قاعدي للتانين مع البروتين خلال النمو البكتيري . وضح [8]وجود تفاوت في نمو العزلات على وسط الهيدروكربون الصلب اذ كانت 76 عزلة بكتيرية وبنسبة 74.5% كانت قادرة على استهلاك الزيت الثقيل مصدرا للكربون من مجموع 102 عزلة في حين 26 عزلة بكتيرية 25.49 % فشلت في استهلاكه اذ بداء النمو في منطقة التخطيط باتجاه المناطق البعيدة وتركزت حول الاطراف كذلك اظهرت النتائج نمو المستعمرات بشكل واضح وازداد النمو مع مرور الزمن مع ظهور مناطق شفافة.

كذلك وضح[9,10] ان التانين أي حامض التانيك يوجد بالفواكه والخضر وعادة ما يعتبر غير مرغوب فيه تغذويا بسبب تكوينه المعقدات مع البروتينات ، النشاء و الانزيمات الهاضمة مما يسبب تقليل القيمة الغذائية. تباينت قدرة عزلات *Lactobacillus* على تفكيك حامض التانيك وكانت عموما اكثر كفاءة في التراكيز الواطئة منها في العالية وعلى وسط MRS اكثر من الاوساط الاخرى . ان قدرة العزلات على التفكيك كانت اعلى عند استعمال تركيز 6 % من حامض التانيك ، وانسب وسط استعمل عند هذا التركيز هو BHI . ان معدل قدرة العزلات على التفكيك انخفضت عند زيادة تركيز حامض التانيك الى 8 % اذ نلاحظ بانها انعدمت تماما عند استعمال الوسط BHI ، في حين اصبح لبعض العزلات قدرة على تفكيك حامض التانيك عند استعما ل وسط N.A وبنفس التركيز التي كان ت غير موجودة عند استعمال التركيز 6 % من حامض التانيك . ان وجود حامض التانيك بتركيز 10% في الاوساط N.A, MRS, BHI ادى الى تثبيط كلي في قدرة هذه العزلات البكتيرية على تحليل حامض التانيك باستثناء العزلة LC1 المزروعة على وسط N. A .

جدول (4): قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus* على استهلاك وتفكيك حامض التانيك

العزلة	التحلل			التحلل			التحلل عند		
Lactobacillus spp	عند 6 %			عند 8 %			10 %		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L Y2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L Y3	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L Ch1	-	-	+*	+	+	-	-	-	-
L Ch2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L C1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L V1	-	+	+	+	+	-	-	-	-
L V2	-	+	+	+	+	-	-	-	-
L F1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L F01	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L Fm1	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L Chm1	-	+	+	-	-	-	-	-	-

- = لايوجد تحلل + = يوجد تحلل * = عكورة

وحسب ما مذكور في الجدول (4) فقد اشار [11,12] ان هناك 16 عزلة من بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من الغذاء المتخمر cassava هي *L.plantarum*8, *L.pentosus3*, *Weissella*2, *paramensteroides* 1 *L.fermentum2*, *Leuconostoc mesenteroides* واختبرت على اساس صفاتها الكيموحيوية مع الاخذ بالاعتبار الاوساط البادئة المناسبة خلال التخمر عند البادىءوقدرتها على تحمل عمليات الانجماد – الجفاف عن طريق فقدان الماء dehydration في محلول الكليسرول للتراكيز المتزايدة التي تتبع التصبيغ بمؤشرات متفلورة fluorescent marker . تم استخدام وسط الاملاح المعدنية السائل لعزل البكتريا المفككة للهيدروكربونات يتكون الوسط من حسب [13] املاح البوتاسيوم ، الكالسيوم ، المغنيسيوم ، النترات ، الحديد، الزنك و النحاس بالاضافة الى مستخلص الخميرة وعناصر نادرة و EDTA وبنسب مختلفة .بالاضافة الى ذكر اوساط العزل توجد طرق مختلفة للبكتريا القادرة على تحليل حامض التانيك لتحديد فعاليته ومن ابرزها الطرق اللونيةحسب [14] المعتمدة على قياس محتوى حامض التانيك المتبقي بعد الفعالية الانزيمية ثم قياس الفعالية على 530 نانومتر حيث ان فعالية الانزيم تعرف بانها وحدة واحدة من فعالية تانيز متحلل والمعروفة بانها كمية حامض التانيك المتحلل بواسطة 1مليلتر من الانزيم لكل دقيقة من التفاعل .

ب. الفينول

تم اختبار قدرة البكتريا على النمو بوجود تركيز 10% فينول حسب جدول (6). تبين ان ست عزلات كان نموها بين القوي والم توسط وهي LY2, LCh2, LC1, LV2, LF1, L F01, LChm1 ، في حين ان العزلة LCh1 لم تظهر أي نمو يذكر . تبين ان وسط MRSA هو افضل الاوساط ، اما عند استعمال تركيز 8 % فينول تبين ان ثماني عزلات اظهرت نمو متباين وكانت LY1, LY2, LY3, LCh2, LC1, LF1, LF01, LChm1 في حين ان العزلة L V1 لم تظهر أي نمو يذكر ,كانت افضل الاوساط حسب التسلسل MRS. في حين عند استعمال تركيز 6% من الفينول تبين ان تسع عزلات اظهرت نمو جيد هي LY1, LY2, LY3, LCh2, LC1, LV2, LF1, LF01, LFm1 عند استعمال N.A كما في جدول (5) .

جدول (5): قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus spp* على النمو على اوساط حاوية مادة الفينول بتراكيز مختلفة

العزلة	النمو عند			النمو عند			النمو عند		
Lactobacillus spp	% 6			% 8			% 10		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	++	++	++	+++	+++	+++	++	-	+++
L Y2	+	++	++	+++	+++	++	++	+++	+
L Y3	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++	-
L Ch1	++	-	-	++	-	-	-	-	-
L Ch2	+	++	++	+++	+++	++	++	+++	+
L C1	++	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++
L V1	-	++	-	-	-	-	+++	-	+++
L V2	++	++	+++	++	++	-	++	+++	++
L F1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
L F01	+++	++	+++	++	++	++	++	++	+++
L Fm1	+++	+++	++	+++	+++	-	++	+++	-
L Chm1	+++	+++	-	+++	+++	++	++	+++	++

- = لايوجد نمو + = نمو عادي ++ = نمو متوسط +++= نمو قوي

اختبرت قابلية العزلات على تحليل الفينول فكانت العزلة LC1 هي الاكفاء في حين لم تظهر العزلتين LF01, LFm1 لم تظهرا أي قدرة على التحليل ، في حين كانت افضل الاوساط التي اعطت اعلى نتائج التحليل N. A وذلك عند استعمال تركيز 10% فينول . اما لتركيز 8 % كانت سبع عزلات محللة هي LY1, LY2, LY3, LCh2, LC1, LF1, LF01 في حين لم تظهر العزلة L V1 أي تحليل يذكروكان افضل الاوساط للتحليل هو N. A .

استعمل تركيز 6 % فينول لاختبار قدرة العزلات على التحليل تبين ان العزلات L Y2,LCh2,LF1 هي الاكفاء في حين العزلتين LCh1, LChm لم تظهرا أي قدرة على التحليل ، كان وسط BHI هو افضل الاوساط حسب جدول (6).

جدول (6): قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus spp* على تحليل اوساط حاوية الفينول بتراكيز مختلفة

العزلة *Lactobacillus spp*	التحليل عند % 6			التحليل عند 8 %			التحليل عند %10		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	+	-	-	+	+	+	+	-	-
L Y2	+	-	+	+	+	+	-	+	-
L Y3	-	-	+	+	+	+	+	-	-
L Ch1	-	-	-	+	-	-	-	+	-
L Ch2	+	-	+	+	+	+	-	+	-
L C1	-	-	+	+	+	+	+	-	+
L V1	-	+	-	-	-	-	+	-	-
L V2	-	-	-	+	+	+	-	-	+
L F1	-	+	+	+	+	+	+	-	-
L F01	-	-	+	+	+	+	-	-	-
L Fm1	+	-	-	-	-	+	+	-	-
L Chm1	-	-	-	+	-	-	+	+	-

- = عدم وجود تحلل + = وجود تحلل

وضح [15] ان الفينول في الماء والتربة يتحطم بواسطة تفاعلات غير حيوية الى ثنائي اوكسيد الكربون وميثان اجزاء التحطم الحيوي لتحطيم الفينول محددة بواسطة عوامل عديدة مثل التراكيز المتجمعة ، حرارة ، ووجود بقية المكونات . ووضح [16] انه استطاع من عزل 40 سلالة بكتيرية لها القدرة على استهلاك الفينانثرين الصلب بعد ان اذيب في محلول اثيل الايثر ورش على سطوح الاطباق الصلبة .

ج. الكلوروفورم

تم اختبار قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus* على النمو بوجود تركيز 10% كلوروفورم تبين ان سبع عزلات قادرة على النمو هي LY3, LCh2, LC1, LV2, LF1, LFm1, LY2 في حين العزلة LV1 لم تستطع النمو ، اما افضل الاوساط للنموفكان وسط BHI . اعطت العزلات V2, LF1, LF01, LFm, LChmL Y1, LY2, LY3, LCh2, LC1 افضل نمو عندتركيز 8% في حين العزلتين L Ch1, LV1 لم تظهرأي نمو ، فقد لوحظ ان وسط MRS هو الافضل للنمو . اختبرت قابلية العزلات على النمو بوجود تركيز 6 % كلوروفورم تبين ان عشر عزلات اعطت نمو هي LY1, LY2, LY3, LCh2, LC1, LV2, LF1, LF01, LFm1, LChm1 وافضل وسط هو N.A . حسب جدول (7) .

جدول (7) :قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus spp* على النمو على وسط حاوي كلوروفورم بتراكيز مختلفة

العزلة *Lactobacillus spp*	التحلل عند %6			التحلل عند % 8			التحلل عند % 10		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	++	++	++	++	+++	++	-	++	+++
L Y2	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
L Y3	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
L Ch1	++	-	-	-	-	-	-	-	+++
L Ch2	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
L C1	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
L V1	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
L V2	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
L F1	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
L F01	+++	++	++	+++	++	++	++	-	+++
L Fm1	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
L Chm1	++	++	++	++	++	++	-	+++	+++

- = لايوجد نمو + = نمو عادي ++= نمو متوسط +++ = نمو قوي

اظهرت النتائج المذكورة في جدول (8) ان استعمال الكلوروفورم بتركيز 10 % قاد الى اظهار مقدرة اربع عزلات على تحليله وهي LY2, LY3, LCh2, LC1 في حين 6 عزلات لم تظهر أي تحليل هي LY1, LCh1, LV1, LF01, LFm, LChm, يعتبر الوسط N. A هو الافضل . اما عند تركيز 8 % كلوروفورم لوحظ ان العزلات LY2, LY3, LChm1 اعطت نمو افي حين العزلة LCh1 لم تظهر أي قدرة على النمو ،

تبين ان وسط N.A هو الافضل .لقد لوحظ انه عند استعمال كلوروفورم بتركيز 6 % تمكنت ثماني عزلات من التحليل وهي LY1, LY2, LY3, LCh2, LC1, LF1, LFm, LChm وافضل وسط هو N. A

جدول(8): قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus* spp على استهلاك وتفكيك الكلوروفورم بتراكيز مختلفة

العزلة *Lactobacillus spp*	التحلل عند 6 %			التحلل عند 8 %			التحلل عند 10%		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N. A	MRSA	BHIA
L Y1	+	+	+	+	-	+	-	-	-
L Y2	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L Y3	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L Ch1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L Ch2	+	+	-	+	+	+	+	-	+
L C1	+	+	-	+	+	+	+	-	+
L V1	+	-	-	+	+	+	-	-	-
L V2	+	+	+	+	-	-	+	-	-
L F1	+	+	-	+	+	+	-	-	-
L F01	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L Fm1	+	+	+	+	-	+	-	-	-
L Chm1	+	+	+	+	+	+	-	-	-

- = عدم وجود تحلل + = وجود تحلل

لقد بين [17] انه في احيان كثيرة المستعمرات لا تنمو على الوسط نتيجة لعدم امتلاكها القابلية على تفكيك هذه المركبات نتيجة لعدم وجود نظام انزيمي متخصص او انها تستهلك نواتج اكسدة بسيطة للبكتريا لها قابلية على اكسدة مركبات هيدروكربونية استنادا لذلك تم انتقاء العزلات الكفوءة في التفكك لاجراء دراسات لاحقة.

د.الهبتان

ان سبع عزلات وحسب جدول (9) هي LY2, LY3, LCh2, LC1, LV2, LF1, LChm1 كانت لها قدرة على النمو على وسط حاوي تركيز 10% هبتان ، فقد لوحظ ان افضل الاوساط هو N.A. في حين استعمال تركيز 8 % هبتان اعطى نمو لعشر عزلات ،LY1, LY2, LY3, LCh2, LV2, LF1, LF01, LFm1 LChm1 ، لم تعطي العزلة LV1 أي نمو ، تبين ان وسط BHI هوالافضل .تبين انه عند استعمال تركيز 6 % هبتان اعطت العزلات Y1, LY2 LY3, LCh2, LV2, LF1, LF01, LFm1, LCh Lm1 افضل نمو في حين العزلة Lv1 لم تظهر أي نمو يذكر .

جدول (9): قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus spp* على النمو على وسط حاوي الهبتان بتراكيز مختلفة

العزلة *Lactobacillus spp*	النمو عند 6 %			النمو عند 8 %			النمو عند 10 %		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	++	++	++	++	++	+++	+++	-	++
L Y2	++	++	++	+++	+++	++	++	+++	++
L Y3	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
L CH1	-	-	++	++	++	++	-	++	+++
L CH2	++	++	++	+++	++	+++	++	+++	++
L C1	-	-	++	++	-	-	++	+++	++
L V1	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
L V2	+++	+	++	++	+++	+++	++	+++	++
L F1	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
L F01	+++	++	++	++	+++	+++	-	+++	-
L Fm1	+++	+++	+++	++	++	+++	++	-	+++
L Chm1	-	++	++	++	++	++	+++	++	+++

- =لايوجد نمو + =نمو عادي ++ = نمو متوسط +++= نمو قوي

تبين ان وسط N. A اعطى افضل نمو . ان باستعمال الهبتان بتركيز 10% استطاعت العزلات LY1, LFm1, LChm1 على التحليل بينما العزلات LV1, LF1, LF01 لم تستطع التحليل وظهران وسط N. A هو الافضل . تبين ان تركيز 8 % اعطى تحليل للعزلات L Y1, LV2, LF1, LF01 في حين العزلة LV1 لم تظهر أي تحلل ، تبين ان وسط MRSA هو الافضل . اذ اعطت العزلات LY2, LY3, LV2, LF1, LF01 افضل تحلل في حين العزلة LV1 لم تظهر أي تحليل واعطى الوسط BHI اعلى نسبة تحلل وذلك حسب جدول (10) .

جدول (10) :قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus spp* على التحليل على وسط حاوي الهبتان بتراكيز مختلفة

العزلة *Lactobacillus spp*	التحلل عند 6 %			التحلل عند 8 %			التحلل عند 10%		
	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA	N.A	MRSA	BHIA
L Y1	-	-	+	+	+	+	+	-	+
L Y2	+	+	+	+	+	-	+	-	-
L Y3	+	+	+	-	+	-	+	-	-
L Ch1	-	-	+	-	+	-	-	-	+
L Ch2	-	-	+	+	+	-	+	-	-
L C1	-	-	+	-	+	-	+	-	-
L V1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L V2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L F1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L F01	+	+	-	+	+	+	-	-	-
L Fm1	+	-	+	-	+	-	+	-	+
L Chm1	-	-	+	-	+	-	+	-	+

- = عدم وجود تحلل + = وجود تحلل

بين[18] انه تم استعمال وسط الاملاح المعدنية الصلب يتكون من المكونات سابقة الذكرفي [18] مع اضافة الاكار 2 % وزن / حجم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7 عقم بالمؤصدة .

تلعب تراكيز الملوثات دورا مهما في عمليات الازالة الحياتية وان التراكيز العالية جدا والواطئة جدا لها تا ثيرات سلبية على عملية المعالجة وان التراكيز العالية من الملوثات ذات تاثيرات سمية على الكائنات اما عند وجود الملوثات بتراكيز واطئة فا ن الانزيمات التي تشترك في عملية التفكيك الحياتي لا يمكن ان تستحث حسب [19] ومن ناحية اخرى فقد وجد [20] بان التفكيك الحياتي للنفط الخام يمكن ان يحدث حتى في مستوى التراكيز العالية من الملوثات التي تزيد عن 8 % وزن /وزن مما سبق تبين ان بكتريا *Lactobacillus* لها القدرة على تحليل حامض التانيك ، الهبتان ، الكلوروفورم والفينول وبنسب مختلفة . ان الكلوروفورم هو افضل المواد العضوية التي استطاعت بكتريا *Lactobacillus* ان تحللها وخصوصا بنسبة 6 % اذ تمكنت 8 عزلات من التحليل ، لقد تبين ان وسط الاكار المغذي هو الافضل من بين كل الاوساط لاعطائه نسبةتحلل عالية اما وسط MRSA هو الافضل لنمو بكتريا *Lactobacillus* وان نسبة 8 % هي الافضل لجميع المواد الع ضوية التي استخدمت اذ اعطت اعلى عدد لنمو البكتريا.

Reference

1. Massaoudi, D.F.; Berger, C.N.; Polter, M.H.C.; Lemoal, V.L. and Servin, A.L. (2005). PH Lactic acid and non-lactic acid dependend activities of probiotic lactobacilli against Salmonella enterica serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol .71(10): 6008-6013.
2. Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelbergs medical Microbiology (22 edition). Mc Graw. Hill. Newyork. P197-202.
3. Holt, J.G.; Sneath, P.H.A.; Mair, N.S. and Sarpe, M.E.(1986). Bergeys Mannual of systemaic bacteriology .2.Williams and Wilkins.
4. Banerjee, R.; Mukhrjee, G.and Patra, K.C. (2005). Microbial transformation of tannin-nich substrte to gallic acid through Co-culture method. Biores technol.,96,949-954.
5. Baron, E. I.; Peterson, I.R. and Fingold, S.M. (1990). Baileg and Scotts Diagnostic Microbiology 9 edition.The C.V. Mosby company, U.S.A.
6. Osawa, R.; Kuroiso, K.; Goto, S.and Shimizu, A. (2000). Isolation of Tannin degradation Lactobacilli from Human and fermented foods. Applied and Environmental microbiology, 66, 7: 3093-3097.
7. Yosuke, N and Ro, O. (2005). Deceptive Halo formation by Tannase Defective bacteria on Tannin – T reated plate media .Microbes and Environment 20(2), 117-119.

8. جمعة ، ناظم حسن حيدر . معالجة الملوثات النفطية لعزلات محلية لبكتريا المنتجة للمستحلبات الحياتية Pseudomonas aeruginosa .اطروحة دكتوراة . كلية العلوم . جامعة بغداد .2007

9. Aguilar, C.N.and Sanches, G. (2001). Review: source, properties, application and potential use of tannin acyl hydrolase. Food Sci. technol. Int., 7,373-382.

10. Chung, K.T.; Wong, T.Y.; Wei, C.I.; Huang, Y. W. and Lin, Y. (1998). Tannins and human health : a review.CRC crit.Rev.Food Sci Nutr.,38,4241-4264.

11. Mondal, K.C.; Samanta, S.; Giri, S. and Pati, B.R. (2001). Distribution of tannic acid degrading microorganism in the soil and comparative study of tannase from two fungal strains. Acta micrpbial. pol.50:75-82.

12. Rodriguez, H.; Rivas, B.D.; Gomez-cordoves, Cand Munoz, R. (2008). Degradation of tannic acid by cell- free extract of *Lactobacillus plantarum.* Food chemistry .107,2-153.664-670.

13. Patel, R.N. and Desai, A.J. (1997). Surface active properties of amino lipids from Pseudomonas aeruginosa GS3.J.Basic Microbiol.32:518-520.

14. Mondal, K.C.; Banerjee, D., Jana, M.and Pati, B.R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC3.1.1.20) activity. Analytical Biochemistry, 2001.Vol 295.no:2, p: 168-171.

15. Prado, J.; Arantegui, J.; Chamarro, E. and Esplugas, S. (1994). Degradation of 2,4-D by ozone and light ,ozone Sci. Engn.16,235-245.

16. Grosser, R.J.; Friedrich, M.; Ward, D.M. and Inskeep, W.P. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation different enrichment condition influence bio availability and selection of phenanthrene – degrading isolates .Appl. Environ-Microbiol. 66(7): 2695-2702.

17. Sakai, Y.; Maeng, J.H.;Tani ,Y. and Kato, N. (1994). Use of long –chain n-alkanes (C13-C44) by an isolate, Acinetobacter sp.M-1.Biosci.Biotech.Biochem.58:2128-2130.

18. Johnsen, A.R., Wick, L.Y. and Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. Env. Pollution.133:71-84.

19. Busweel, J.A. (1994). Potential of spent mushroom substrate for bioremendation purpose. comost science and utilization. 2(3):31-36.

20. Al-Awadhi, N.; Al-Daher, R. and Balba, M,T. (1996). Bioremediation of oil contaminated soil in Kuwait –land forming to remediate oil – contanated soil –journal of soil contamination. 5(3):243-260.