Journal of Nature, Life and Applied Sciences
Volume (6), Issue (1): 30 Mar 2022
P: 75 - 84

AJSRP
ISSN: 2522- 3356

مجلة العلوم الطبيعية والحياتية والتطبيقية
المجلد (6)، العدد (1): 30 مارس 2022م
ص: 75 - 84

# Detection of some Bacteriocin Genes in Lactobacillus plantarum Isolated from some Food Products

**Alia Sabia Alebrahim**
**Walid Alsaid**
**Abir Alramo**
Faculty of Science || Aleppo University || Syria

**Abstract:** The study aims to detect of the genes (*plnA, plnEF, plnA5p/S7*) responsible for the production of bacteriocins in *L. plantarum*, after conducting an Antibacterial Activity test against *Listeria monocytogenes*. The Antibacterial Activity of isolates were in a cell- free extract using the Agar Well Diffusion Assay., then isolating the DNA of the isolates that gave Antibacterial Activity and checking their quality by electrophoresis technology. The PCR reaction was used to amplify the genes using specific primers to detection of three genes for bacteriocins (*plnA, plnEF, plnA5p/S7*) Where this research was conducted in the laboratories of microbiology and molecular genetics at the Faculty of Science, University of Aleppo, Aleppo, Syria. The results of the study showed that 3 isolates of (Lb35- Lb45- Lb55) showed Antibacterial Activity against *Listeria monocytogenes* with average inhibition halo diameter of 24 mm, 22 mm and 26 mm, respectively, and the electrophoresis results showed the presence of the three genes (*plnA, plnEF, plnA5p/S7)* in the isolates. The three are for *L. plantarum* with size bp516, bp579, bp450, respectively.

**Keywords:** Bacteriocins, L.plantarum, Listeria monocytogenes, plnA, plnEF, plnA5p/S7..

# الكشف عن بعض المورثات المنتجة للبكتريوسين في البكتريا *Lactobacillus plantarum* المعزولة من بعض المنتجات الغذائية

**عليه صابيع الإبراهيم**
**وليد السعيد**
**عبير الرمو**
كلية العلوم || جامعة حلب || سوريا

**المستخلص:** هدفت هذه الدراسة إلى التحري عن المورثات(plnA، plnEF، plnA5p/S7 ) المسؤولة عن إنتاج البكتريوسينات في البكتريا *L.plantarum* وذلك بعد إجراء اختبار الفعالية المضادة تجاه الليستريا المستوحدة، باستخدام طريقة الإنتشار في الحفر ضمن الأغار Agar Well Diffusion Assay، ثم استخلاص الـ DNA للعزلات التي أعطت فعالية والتحقق من جودته بتقانة الرحلان الكهربائي تم إجراء تفاعل الـ PCR لتضخيم المورثات باستخدام بادئات متخصصة للكشف عن ثلاث مورثات للبكتريوسينات وهي (plnA،plnEF ، plnA5p/S7) حيث أجري هذا البحث في مختبري الأحياء الدقيقة والوراثة النباتية والتقانة الحيوية في كلية العلوم بجامعة حلب/ حلب/ سورية. أظهرت نتائج الدراسة أن ثلاثة عزلات (Lb35- Lb45- Lb55) أعطت الفعالية المضادة ضد الليستريا المستوحدة بمتوسط قطر هالة تثبيط 24ملم، 22ملم، 26ملم على التوالي، وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي وجود المورثات المختبرة (plnA،plnEF، plnA5p/S7 ) في العزلات الثلاث للبكتريا *L.plantarum* بحجم 516،579، 450 زوج قاعدي على التوالي .

**الكلمات المفتاحية:** البكتريوسينات،*L.plantarum* ، الليستريا المستوحدة،*plnA، plnEF، plnA5p/S7.*

## 1- المقدمة.

تشكل الأمراض المنقولة بالغذاء مصدر قلق عالمي بالرغم من استخدام التقنيات الحديثة في حفظ الأغذية فإن معدل الأمراض المرتبطة بالأغذية لا يزال في ازدياد ويشكل سبب رئيس للوفاة خاصة في البلدان التي تفتقر إلى أنظمة مناسبة لمراقبة سلامة الأغذية، حيث يعاني ثلث سكان العالم من الأمراض بسبب استهلاك المواد الملوثة للطعام لذلك زاد الاهتمام في السنوات الأخيرة بعمليات حفظ الغذاء وتركزت الأبحاث على طرائق الحفظ الحيوي للأغذية الذي يستخدم الأحياء الدقيقة أو منتجاتها في الحفظ للحد من استخدام المواد الكيميائية لتثبيط نمو الجراثيم وزيادة العمر الافتراضي للمنتجات الغذائية ومن أهم هذه المنتجات البكتريوسينات. Bacteriocin (Hassan *etal.*, 2020)

البكتريوسينات Bacteriocinsعبارة عن بروتينات أو ببتيدات صغيرة يتم تصنيعها في الريبوسوم تنتج من قبل العديد من الجراثيم(Hegarty *et al.*, 2016)، ذات تأثير مثبط أو قاتل لنمو بعض الجراثيم الأخرى ( Cleveland *et al.*, 2001) تنتج البكتريوسينات بشكل أساسي من قبل جراثيم حمض اللبن Lactic Acid Bacteria (LAB)وهي ذات تأثير مضاد للأنواع القريبة الصلة (Ogunbanwo *et al.*, 2003) كما تُظهر نشاطًا مضاداً نحو مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء وخاصة الجراثيم الموجبة لصبغة غرام التي تسبب فساد الأغذية (Henning *et al.*, 2015).

تصنف البكتريوسينات التي تنتجها جراثيم حمض اللبن إلى أربعة صفوف اعتماداً على وزنها الجزيئي وتحملها للحرارة، الصف الأول عبارة عن ببتيدات صغيرة تحوي على الحمض الأميني اللانثيونين lanthionine، مستقرة بالحرارة وزنها أقل من 5دالتون، أما الصف الثاني فهي ببتيدات صغيرة لا تحوي على الانثيونين، مستقرة بالحرارة وزنها أقل من10 دالتون، في حين أن بكتريوسينات الصف الثالث فهي ببتيدات كبيرة وزنها أكثر من 30دالتون غير مستقرة بالحرارة، والصف الرابع هي بروتينات معقدة تربط معها واحد أو أكثر من المشتقات الكيميائية والتي ترتبط مع الليبيدات أو مع السكريات .(hu *et al.*, 2013)

تعد بكتريا *L.plantarum* من أهم أنواع جراثيم العصيات اللبنية لما له العديد من الاستخدامات في تخمر اللحوم والمخللات ومواد غذائية أخرى (Reenen, 1998)، إضافة إلى أهميته في إنتاج البكتريوسينات مثل البكتريوسين plantaricin 35d الذي يملك تأثير واسع الطيف تأثير ضد العديد من الجراثيم المرضة (Parada *et al.*, 2007) حيث أظهرت دراسة صينية عام 2011 فعالية راشح السلالة *Lactobacillus plantarum* LB- B1 ضد *Listeria monocytogenes* والناتج عن إفرازها للبكتريوسين(XIE *et al.*, 2011)

يتحكم في إنتاج البكتريوسينات العديد من المورثات الخاصة بكل نوع والتي تكون غالبيتها محمولة على الصبغي أو البلازميد أو كليهما، وقد يُنتج النوع الواحد أكثر من نمط من البكتريوسينات (Todorov, 2009).

تنتج بكتريا *L.plantarum* العديد من البكتريوسينات والتي تسمى بشكل عام plantaricin يوجود العديد من المورثات المسؤولة عن إنتاج البكتريوسينات مثال المورثة *plw* مسؤولة عن تشفر الصف الأول ثنائي الببتيد لإنتاج plantaricin W، والمورثة *plS* الذي يشفر الصف الثاني plantaricin S الإنتاجIIb، والمورثة المورثة *plnEF* التي توجد على نطاق واسع في بكتريا *L.plantarum* (Tai *et al.*, 2015)

**مبررات البحث وأهدافه:**

ازداد الاهتمام في الأبحاث الأخيرة بالبكتريوسينات التي تتصف غالباً بامتلاكها لطيف واسع من التأثير المثبط أو القاتل للجراثيم المرضة، الأمر الذي يسمح بإمكانية استخدامها في مجال الحفظ الحيوي للأغذية كبدائل عن

المواد الحافظة الكيميائية المعروفة بتأثيراتها السلبية على صحة الإنسان، ونظراً لأهمية البكتريا *L.plantarum* في إنتاج أنواع مختلفة من البكتريوسينات ذات الفعالية المضادة لكثير من الجراثيم الممرضة وخاصة ضد البكتريا الممرضة *Listeria monocytogenes* التي تعد من أهم مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء والمسببة لفساد الأغذية، من هنا تأتي أهمية هذه الدراسة في الحصول على سلالات منتجة للبكتريوسينات لذا هدف هذا البحث إلى:

1- دراسة الفعالية التضادية لعزلات البكتريا *L.plantarum* ضد جراثيم *Listeria monocytogenes*

2- الكشف الجزيئي عن بعض مورثات البكتريوسين في البكتريا *L.plantarum*

## 2- مواد البحث وطرائقه.

**مادة البحث:**

أجريت الدراسة على ستة عزلات من بكتريا *L.plantarum* المعزولة من عينات اللبن والمخلل بالاعتماد على تنميتها على وسط MRS ثم حضنت لاهوائياً حسب طريقة الإبراهيم وأخرون (2021) وكما موضح في الجدول (1)، وتم الحصولة على عزلة الليستريا المستوحدة سلالة *Listeria monocytogenes* NCTC11994 (من مركز هيئة الطاقة الذرية بدمشق).

**جدول (1) أرقام عزلات بكتريا *L.plantarum* مع مصدر العزل**

| مصدر العزلة | مخلل لفت | اللبن | مخلل خيار |
|---|---|---|---|
| **رمز العزلة** | Lb62- Lb55 | Lb72- Lb45- Lb35 | Lb22 |

**طرائق البحث:**

**1- الفعالية المضادة لعزلات العصيات اللبنية تجاه جراثيم الليستريا المستوحدة بطريقة الانتشار ضمن الاكار:**

اختبرت فعالية العزلات المدروسة للبكتريا *L.plantarum* تجاه بكتريا الليستريا المستوحدة، حيث استخدم وسط MRSالمعدل (5غ /1ل غلوكوز)حسب المراحل التالية: نشطت عزلات بكتريا *L.plantarum* في الوسط الغذائي السائل MRSوزرعت الليستريا المستوحدة في وسط منقوع القلب والدماغ السائل (BHI) وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وضبط تركيز المعلق الجرثومي(Mcfarland0.5 )

تم زراعة عزلات *L.plantarum* في 50 مل من الوسط السائل MRSوحضنت على درجة حرارة 37 مئوية ضمن الظروف اللاهوائية لمدة 24 ساعة، ثم أخضعت كل عينة للطرد المركزي عند سرعة 6800 دورة لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 4 مئوية، تم تحييد المواد الطافية التي تم الحصول عليها وضبط الـ pH بين7 -6.5) ) باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOHبتركيز1 مول/لتر(لكبح التأثير المثبط بسبب انتاج الحمض) تم تعقيمها بترشيحها باستخدام فلتر جرثومي قياس 0.22 ميكرومتر، لقح وسط Mueller Hinton Agar (MHA) بجراثيم الليستريا المستوحدة، صنعت حفر بقطر 8 ملم بواسطه أسطوانة عقيمة، (4 حفر في كل طبق)، تم إضافة 100 ميكرولتر من رشاحة العزلة، استخدم الوسط السائل MRS كشاهد سلبي، واعتمد ثلاثة مكررات لكل عزلة، تركت الاطباق لكي تجف على الدرجة 4 مئوية، ثم حضنت على الدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة، إن تشكيل منطقة خالية من النمو حول الحفرة بقطر1 ملم أو أكبر دليل على إيجابية العزلة (Haghshenas *et al.*, 2015; Askoul *et al.*, 2014) ثم أُخذت قياسات أقطار الهالات وحسب المتوسط الحسابي للتكرارات.

## 2- الكشف عن بعض مورثات البكتريوسينات في بكتريا *L.plantarum*

### 2-1- استخلاص الـ DNA لعزلات بكتريا *L.plantarum*

تم استخلاص الـ DNA للعزلات المدروسة للنوع *L.plantarum* من أجل متابعة الكشف عن مورثات البكتريوسين وتم تنميط هذه البكتريا في دراسة سابقة تمت في مختبر الوراثة النباتية والتقانة الحيوية في جامعة حلب حيث تم استخدام تقانة PCR Multiplex باستخدام بوادئ خاصة (الإبراهيم وزملائه، 2021) والعزلات التي أعطت فعالية أولية ضد الليستريا المستوحدة، تم تنميتها في الوسط السائل MRS بظروف لاهوائية وبعد 24 ساعة تم استخلاص الـ DNA للعزلات وفق التعليمات الشركة المصنعة لكيت استخلاص الـ DNA صنع شركة (Genomic DNA isolation kit) (Blood/Cultured cell/Fungus) GeneDirex رقم NO:NA 023- 0100.

تم التأكد من نجاح عملية الاستخلاص والتعرف على جودة الـ DNAالمستخلص باستخدام تقانة الرحلان الكهربائي على هلامة آغاروز Agarose صنع شركة Vivantis بنسبة 1% في محلول منظم TBE(1X) (Tris- base- Boric acid- EDTA) للترحيل.

### 2-2- البوادئ المستخدمة:

تم استخدام ستة بوادئ في تفاعل الخاص بالـ PCR لثلاث مورثات مسؤولة عن إنتاج البكتريوسينات وهي (plnA5p/S7، plnEF،plnA) والجدول (2) يوضح البوادئ الخاصة بكل مورثة.

**جدول (2) البوادئ المستخدمة للتحري عن مورثات البكتريوسين**

| المورثة | التسلسل النكليوتيدي (5´____3´) | حجم قطعة DNA (bp) | المرجع |
|---|---|---|---|
| *plnEF* | F: TATGAATTGAAAGGGTCCGT | 579 | (Azizi *et al.*, 2017) |
| | R: GTTCCAAATAACATCATACAAGG | | |
| *PlnA* | F- TAGAAATAATTCCTCCGTACTTC | 516 | (Azizi *et al.*, 2017) |
| | R- ATTAGCGATGTAGTGTCATCCA | | |
| *plnA5p/S7* | plnA5p- GTA CAG TAC TAA TGG GAG | 450 | (Remiger *et al.*, 1996) |
| | S7- CTT ACG CCA TCT ATA CG | | |

### 2-3- تحضير مزيج تفاعل الـ PCR ووضع البرنامج الخاص بالبوادئ:

تم إضافة مزيج التفاعل الخاص بالـ PCR لكل مورثة على حدا إلى أنزيم البوليميراز وسلسلة الDNA القالب من أجل التحري عن وجود المورثات (plnA5p/S7، plnEF،plnA) المسؤولة عن إنتاج البكتريوسينات باستخدام بادئين لـ كل مورثة بإضافة البادئ الأمامي F والبادئ العكسيR للمورثة وإكمال الحجم بالماء ثنائي التقطير خالي النكلياز الجدول (3) للوصول لحجم مجموع كلي للمكونات 20 ميكرولتر وفق ما ورد في البحث (Barbosa *et al.*, 2016)

**جدول (3) تركيب مزيج تفاعل الPCR**

| اسم المادة | | التركيز الكميةML | |
|---|---|---|---|
| مزيج PCR | PCR Mix | X2 | 4 |
| أنزيم البوليميراز | Taq polymerase | pM 500 | 0.2 |
| البادئ الأمامي | Primer1 | 10 pM | 2 |

| اسم المادة | | التركيز الكمية ML | |
|---|---|---|---|
| البادئ العكسي | Primer2 | 10 pM | 2 |
| ماء ثنائي التقطير | ddH2O | - | 9.8 |
| الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين | DNA | - | 2 |
| الحجم الكلي | 20ML | | |

نقلت العينات إلى جهاز المدور الحراري الذي تم تثبيت البرنامج الخاص بالبوادئ الخاصة بتضخيم قطعة الـ DNA الهدف بالاعتماد على ما ورد في دراسة الباحث Azizi وزملائه عام 2017 كما هو مبين في الجدولين ( 4و5) للمورثة *plnEF* والمورثة *PlnA* (Azizi *et al.*, 2017) والبرنامج الخاص بالمورثة *plnA5p/S7* الجدول (6) وفق ما ورد في البحث ((Remiger *et al.*, 1996

**جدول (4) برنامج الـ *PCR* الخاص بالبوادئ للمورثة *plnEF***

| الخطوات | درجة الحرارة | الزمن | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| مرحلة التمسخ الأولي Denaturation1 | 95 | 5 min | 1 |
| مرحلة التمسخ Denaturation | 94 | sec30 | 30 |
| مرحلة ارتباط البادئ Annealing | 54 | 1min | |
| مرحلة الاستطالة Extension | 72 | 1min | |
| مرحلة الاستطالة النهائية Extension final | 72 | 10 min | 1 |

**جدول (5) برنامج الـ PCR الخاص بالبوادئ للمورثة *plnA***

| الخطوات | درجة الحرارة | الزمن | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| مرحلة التمسخ الأولي Denaturation1 | 95 | 5 min | 1 |
| مرحلة التمسخ Denaturation | 94 | sec30 | 30 |
| مرحلة ارتباط البادئ Annealing | 55 | 1min | |
| مرحلة الاستطالة Extension | 72 | 1min | |
| مرحلة الاستطالة النهائية Extension final | 72 | 10 min | 1 |

**جدول (6) برنامج الـ PCR الخاص بالبوادئ للمورثة *plnA5p/S7***

| الخطوات | درجة الحرارة | الزمن | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| مرحلة التمسخ الأولي Denaturation1 | 94 | 3 min | 1 |
| مرحلة التمسخ Denaturation | 94 | sec30 | 30 |
| مرحلة ارتباط البادئ Annealing | 53 | 1min | |
| مرحلة الاستطالة Extension | 72 | 1min | |
| مرحلة الاستطالة النهائية Extension final | 72 | 7 min | 1 |

3- رحلان الكهربائي Gel Electrophoresis

حللت نتائج الـ PCR بتقانة الترحيل الكهربائي الأفقي على هلامة الآغاروز بتركيز 1.5%غ ضمن محلول وقائي TBE (Tris- acetate- EDTA buffer)، فبعد حل الآغاروز بمحلول منظم الـTBE وذوبان الآغاروز بالتسخين، بُرد حتى

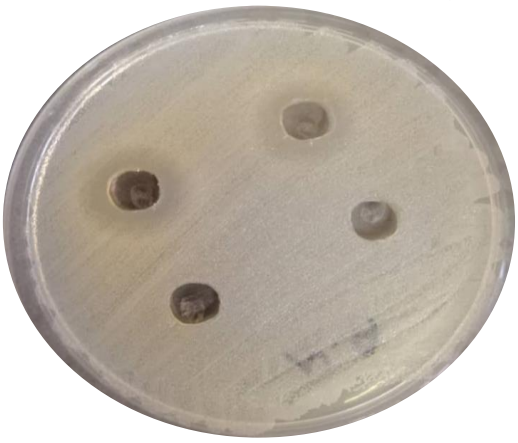
الدرجة 50° تقريباً وأُضيف له 5 ميكرولتر من صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide (EtBr)(تركيز 0.5 ميكروغرام/مل)

ثم صُب ضمن قالب صب الآغاروز والذي وضع فيه المشط الخاص لتشكيل الحفر داخل هلام الآغاروز، رُفع المشط بعد تصلب الهلام ووضعه ضمن حوض الرحلان الحاوي على المحلول المنظم الترحيل. تم تحميل 5 ميكرولتر من ناتج تفاعل الـ PCR لكل عينة في حفرة الآغاروز، وضع في الحفرة الأولى 5 ميكرولتر من المؤشر الجزيئي 100- 3000 bp Marker DNA (M) صنع شركة GeneDirex، واستخدام الماء المقطر كشاهد سلبي، ثم تم تشغيل جهاز الرحلان الكهربائي بتوتر 80 فولت لمدة ساعة (Remiger *et al.*, 1996; Barbosa *et al.*, 2016) أخيراً تم قراءة النتائج بتصوير الهلامة بجهاز باعث الأشعة فوق البنفسجية.

## 3- النتائج ومناقشتها.

**نتائج الفعالية المضادة لعزلات بكتريا L.plantarum تجاه بكتريا الليستريا المستوحدة:**

بينت نتائج اختبار الفعالية لـ 6 عزلات تابعة للنوع *L.plantarum* ضد جراثيم الليسيتريا المستوحدة، وباستخدام وسطMRS بطريقة الانتشار في الاكارAgar Well Diffusion، أن ثلاث عزلات فقط أبدت فعالية ضد الليستريا المستوحدة شكل (1)، وذلك من خلال ظهور مناطق تثبيط حول الحفر المختبرة، واختلفت أقطارها من عزلة لأخرى، في حين أن العزلات الثلاث المتبقية لم تعطِ أية فعالية جدول (7)





**الشكل 1: الفعالية المضادة للعزلة Lb35 تجاه الليستريا المستوحدة**

**جدول (7) متوسط أقطار مناطق التثبيط للعزلات المدروسة ضد الليستريا المستوحدة**

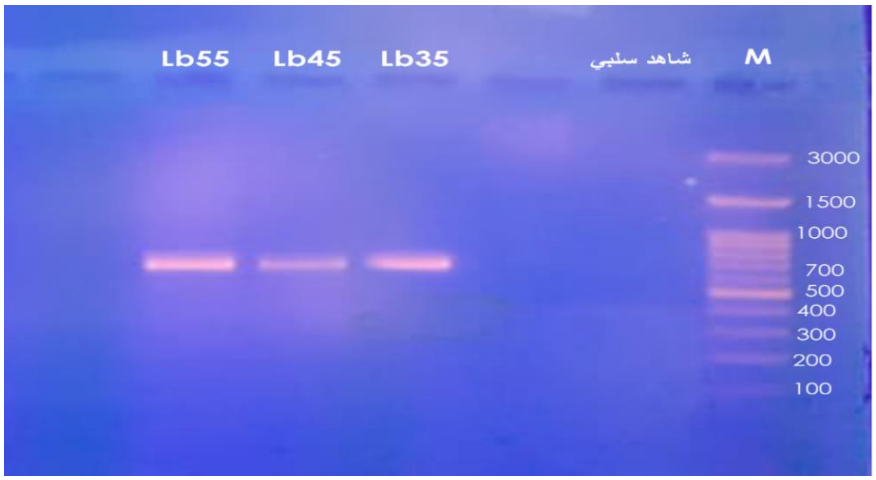
| مصدر العزلة | رقم العزلة | قطر هالة التثبيط (mm) | مصدر العزلة | رقم العزلة | قطر هالة التثبيط (mm) |
|---|---|---|---|---|---|
| مخلل خيار | Lb22 | 0 | لبن | Lb35 | 22 |
| مخلل لفت | Lb62 | 0 | لبن | Lb45 | 26 |
| مخلل لفت | Lb55 | 26 | لبن | Lb72 | 0 |

تعود فعالية جراثيم العصيات اللبنية إلى إفراز نواتج استقلابية مثل الأحماض العضوية (حمض اللبن، حمض الخل) والماء الأكسجيني والبكتريوسينات( Haghshenas 2015 *et al.*) )، بما أن شروط التجربة كانت ضمن تركيز منخفض من الجلوكوز مما أدى إلى خفض إنتاج حمض اللبن، وأيضاً إن ضبط pH الوسط قد يساعد إلى حدٍ ما في منع التأثيرات المضادة للأحماض العضوية (Hwanhlem *et al.*, 2017) وعلى اعتبار أن التحضين كان ضمن شروط

لاهوائية مما ساعد في التقليل من إنتاج الماء الأكسجيني (Niederhäusern *et al.*, 2020; Morae *et al.*, 2010) بالتالي يمكن القول أن الفعالية التضادية للعزلات المختبرة غالباً ناتجة عن إفرازها البكتريوسينات، ويتوافق ذلك مع العديد من الدراسات التي بينت فعالية البكتريوسينات العصيات اللبنية ضد الليستريا المستوحدة، ففي دراسة إيرانية أظهرت فعالية بكتريوسينات بكتريا *L. plantarum* المعزول من منتجات الألبان (Haghshenas *et al.*, 2015) ودراسة للباحث عام 2018 لبكتريوسين السلالة *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum SK119*، (Botthoulath *et al.*, 2018)

**نتائج الكشف عن بعض مورثات البكتريوسينات باستخدام تفاعل الـ PCR**

بينت نتائج تفاعل الـ PCR باستخدام البادئتين للمورثة *plnEF* المطبقة على الـ DNA المستخلص من بكتريا *L.plantarum* أن الثلاث عزلات كانت حاوية على المورثة *plnEF* بنسبة 100%، وأظهرت نتائج الرحلان الكهربائي أن حجم القطعة المضخمة كان 579 زوج قاعدي الشكل (2) وهذا يتفق مع الدراسة (Azizi *et al.*, 2017)

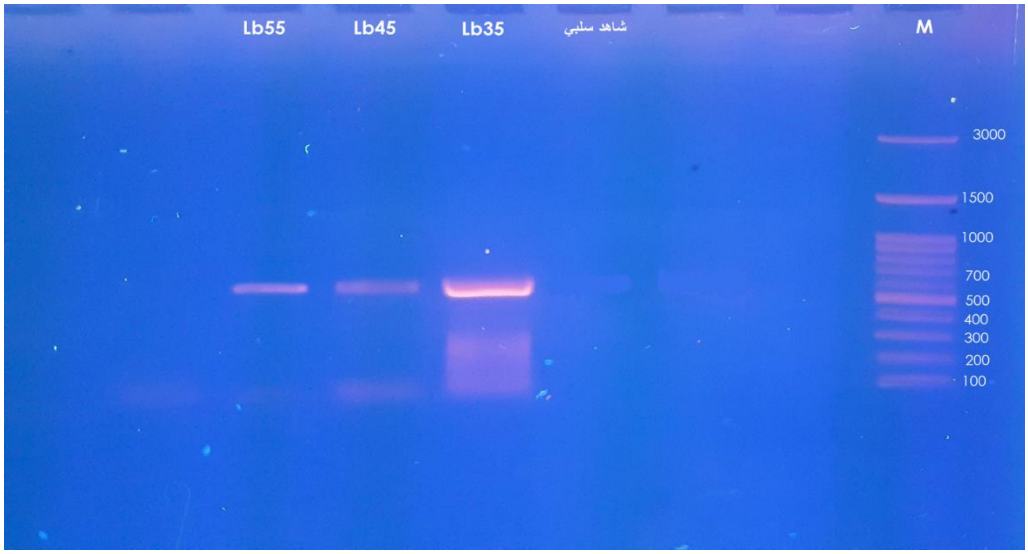



**الشكل (2): نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات الـ PCR**

ظهور المورثة *plnEF* في العزلات (Lb35- Lb45- Lb55)

حيث M علام 100، شاهد سلبي: ماء ثنائي التقطير

أظهرت نتائج الـ PCR باستخدام البادئتين المطبقتين على DNA العزلات *L.plantarum* امتلاك ثلاث عزلات لمورثة *plnA* بنسبة 100% يوضح الشكل (3) ظهور منتج الـ PCR للمورثة *plnA* في العزلات (Lb55، Lb 45، Lb35 ) بحجم 516 زوج قاعدي لدى مقارنته مع المؤشر الجزيئي وهذا يتفق مع الدراسة (Azizi *et al.*, 2017)

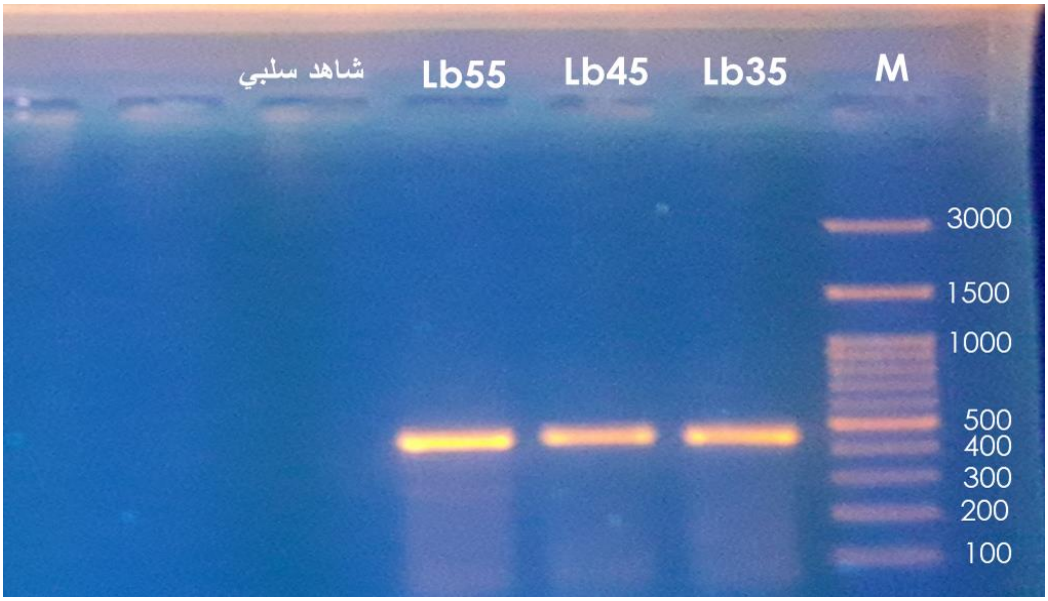



**الشكل (3): نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات الـ PCR**

ظهور المورثة *plnA* بحجم bp 516 في العزلات ((Lb35- Lb45- Lb55

حيث Mعلام 100، شاهد سلبي: ماء ثنائي التقطير

وباستخدام البادئتين(plnA5p،S7 ) في تفاعل الـ PCR للكشف عن مورثة البكتريوسين *plnA5p/S7* ذات الطول 450 زوج قاعدي، فقد أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي وجود هذه المورثة في العزلات الثلاث بنسبة 100%، وهذا يتفق مع (Remiger *et al.*, 1996)




**الشكل (4): نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات الـ PCR**

ظهور المورثة plnA5p/S7 بحجم 450 bp في العزلات (Lb35- Lb45- Lb55)

حيث Mعلام 100، شاهد سلبي: ماء ثنائي التقطير

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن وجود المورثات الثلاث (plnA5p/S7، plnEF،plnA ) في الثلاث عزلات للنوع L.plantarum وهي العزلات (Lb35- Lb45- Lb55) التي أبدت فعالية تضادية (منتجة للبكتريوسين) ضد الليستريا المستوحدة، وتوصي الدراسة باستخلاص البكتريوسينات في العزلات التي أبدت فعالية ضد جراثيم الليستريا

المستوحدة والتي أعطت إيجابية لوجود المورثات المسؤولة عن إنتاج البكتريوسينات وتنقيتها كلياً أو جزئياً مع محاولة توصيف البكتريوسين المنتج ودراسة خصائصها الفيزيائية والكيميائية لإمكانية استخدامها في الحفظ الحيوي.

## قائمة المراجع.


**أولاً- المراجع بالعربية:**

- الإبراهيم، صابيع عليه؛ السعيد، وليد؛ الرمو، عبير(2021). عزل جراثيم جنس العصيات اللبنية من بعض المنتجات الغذائية واختبار فعاليتها المضادة لجراثيم الليستريا المستوحدة، **مجلة بحوث جامعة حلب**- سلسلة العلوم الأساسية، العدد/ 150/.
- الإبراهيم، صابيع عليه؛ السعيد، وليد؛ الرمو، عبير (2021). التوصيف الجزيئي لبعض أنواع جراثيم العصيات اللبنية باستخدام تقانة التفاعل السلسلي البوليميرازي المتعدد، **مجلة بحوث جامعة حلب**- سلسلة العلوم الأساسية، العدد/ قيد النشر/.

**ثانياً- المراجع بالإنجليزية:**

- ASKOUL I., GORRAH S. A., & AL- AMIR L. (2014)- Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from some Syrian fermented foods. International Journal of ChemTech Research, 6(4), 2507- 2520
- Azizi, F., Najafi, M. B. H., & Dovom, M. R. E. (2017). The biodiversity of Lactobacillus spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin- encoding genes. Amb Express, 7(1), 1- 10.
- Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Ivanova, I. V., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., ... & Franco, B. D. G. M. (2016). Characterization of a two- peptide plantaricin produced by Lactobacillus plantarum MBSa4 isolated from Brazilian salami. Food Control, 60, 103- 112.
- Botthoulath, V., Upaichit, A., & Thumarat, U. (2018). Characterization of Listeria- active bacteriocin produced by a new strain Lactobacillus plantarum subsp. plantarum SKI19 isolated from" sai krok e-san mu". International Food Research Journal, 25(6), 2362- 2371.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International journal of food microbiology, 71(1), 1- 20.
- HAGHSHENAS B., NAMI Y., HAGHSHENAS M., ABDULLAH N., ROSLI R., RADIAH D., & YARI Khosroushahi A. (2015) Bioactivity characterization of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Microbiologyopen, 4(5), 803- 813.
- Hassan, M. U., Nayab, H., Rehman, T. U., Williamson, M. P., Haq, K. U., Shafi, N., & Shafique, F. (2020). Characterisation of bacteriocins produced by Lactobacillus spp. isolated from the traditional Pakistani yoghurt and their antimicrobial activity against common foodborne pathogens. BioMed research international, 2020.

- Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?. F1000Research, 5:1- 9.
- Henning, C., Vijayakumar, P., Adhikari, R., Jagannathan, B., Gautam, D., & Muriana, P. M. (2015). Isolation and taxonomic identity of bacteriocin- producing lactic acid bacteria from retail foods and animal sources. Microorganisms, 3(1), 80- 93.
- Hu, M., Zhao, H., Zhang, C., Yu, J., & Lu, Z. (2013). Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables. Journal of agricultural and food chemistry, 61(47), 11676- 11682.
- Hwanhlem, N., Ivanova, T., Haertlé, T., Jaffrès, E., & Dousset, X. (2017). Inhibition of food- spoilage and foodborne pathogenic bacteria by a nisin Z- producing Lactococcus lactis subsp. lactis KT2W2L. LWT-Food Science and Technology, 82, 170- 175.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. LWT-Food Science and Technology, 43(9), 1320- 1324.
- Niederhäusern, S. D., Camellini, S., Sabia, C., Iseppi, R., Bondi, M., & Messi, P. (2020). Antilisterial Activity of Bacteriocins Produced by Lactic Bacteria Isolated from Dairy Products. Foods, 9(12), 1757.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., & Onilude, A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1. African Journal of Biotechnology, 2(8), 219-227.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Brazilian archives of Biology and Technology, 50, 512- 542.
- Reenen, V. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum. Journal of Applied Microbiology, 84(6), 1131- 1137.
- Remiger, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (1996). Identification of bacteriocin- encoding genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). Systematic and Applied Microbiology, 19(1), 28- 34.
- Tai, H. F., Foo, H. L., Rahim, R. A., Loh, T. C., Abdullah, M. P., & Yoshinobu, K. (2015). Molecular characterisation of new organisation of plnEF and plw loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in Lactobacillus plantarum I- UL4. Microbial cell factories, 14(1), 1- 13.
- Todorov, S. D. (2009). Bacteriocins from Lactobacillus plantarum production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. Brazilian journal of microbiology, 40, 209- 221.
- XIE Y., AN, H., HAO Y., QIN, Q., HUANG Y., LUO, Y., & ZHANG, L. (2011) Characterization of an anti-Listeria bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LB- B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. Food Control, 22(7), 1027- 1031