تقدير وجود حامض البنزويك في انواع العصائر في الاسواق العراقية وتحديد تأثيره في بعض المعايير الإنتاجية والكيموحيوية في الجرذان

محمد جميل محمد[1] وكركز محمد ثلج وامين سليمان بدوي

قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة / جامعة تكريت

الخلاصـــة

أجريت الدراسة لتقدير تركيز حامض البنزويك في عينات بعض العصائر في الاسواق العراقية وتحديد تاثير التراكيز عند معدلاتها 250 و 500 ملغم/ كغم/يوم في بعض معايير النمو والمعايير الكيموحيوية والأنزيمية بعد إضافتها مع ماء الشرب للجرذان لمدة 21 يوماً، كذلك بيان تأثيرها في التوازن الميكروبي للنبيت الطبيعي في أمعاء الحيوانات فضلاً عن تقدير نوعي بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* في التقليل من تأثير تلك المادة في المعايير المذكورة أعلاه.

أظهرت النتائج وجود حامض البزويك في تراكيز تراوحت بين 3.76 الى 877.4 ملغم / لتر في عينات العصائر علامة Raubi عراقي المنشأ وعلامة Sunquick دانماركي المنشا على التوالي. اما تأثير إضافة تراكيز من حامض البنزويك في ماء الشرب للحيوانات فانه سبب في إنخفاض معنوي ($P<0.05$) في وزن الجسم للحيوانات مع زيادة تركيز تلك المادة، كما إن المعايير الكيموحيوية لكل من البروتين الكلي و الألبومين و الكلوبيولين لم تختلف معنوياً. وقد حصل إرتفاع معنوي في قيم كل من حامض اليوريك والكرياتينين واليوريا مع زيادة تركيز تلك المادة. وإزدادت معنويا قيم كل من انزيم ALP ، ALT ، AST مع زيادة تركيز حامض البنزويك . كما تبين إن إضافة تلك المادة سببت في سيادة الأحياء المجهرية المرضية في كل من الأمعاء الغليظة والصائم والإثني عشري. وإن إضافة نوعي بكتريا حامض اللاكتيك *Lb. acidophilus* و *Lb. casei* قد أديا إلى إنخفاض معنوي في التأثير السلبي من حامض البنزويك على جميع المعايير المقاسة.

الكلمات المفتاحية:
حامض البنزويك، بكتريا حامض اللاكتيك، المعايير الكيموحيوية، الجرذان.

للمراسلة :
محمد جميل محمد
قسم علوم الاغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، العراق
البريد الالكتروني :
m_jamel68@yahoo.com

Assay of Benzoic Acid in Some Types of Juices in Iraqi Markets and Determine its Impact on Growth Rate, Biochemical Parameters inRats

Mohammed J. Mohammed , Karkaz M. Thalij and Amin S. Badawy
Food Science Department, College of Agriculture, Tikrit University, Tikrit, IRAQ.

ABSTRACT

Key words:
Benzoic acid, Lactic acid bacteria, Rats.

Correspondence:
M.J. Mohammed
Food Science Department, College of Agriculture, Tikrit University, Tikrit, IRAQ.
E-mail:
m_jamel68@yahoo.com

The study was conducted to estimate the concentration of benzoic acid in samples of some juices in Iraqi markets and determine the impact of concentrations at rates of 250 and 500 mg/kg/day in some growth and biochemical and enzymatic parameters after they are added with the drinking water for 21 days, as well as their impact on microbial balance in the intestines of animals, after adding the Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei, also attempted to determine their effect of two types of Lactic acid bacteria in decreasing the effect of Benzoic acid to the according to the above-mentioned criteria.

The results Showed The presence of benzoic acid at concentrations ranging from 3,76 to 877, 4 mg/l in samples of Iraqi origin Raubi brand juices and mark Sunquick Danish origin respectively. Also that the effect of concentrations of Benzoic acid in drinking water animals led to significant reduction in the body weight of animals with increasing the concentration of those materials, as the biochemical parameters for each of the Total protein, Albumin and Globulin did not vary significantly. A highly significant different has been got in the values

[1] البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

of each of the Uric acid, Creatinine and Urea with increase in the concentration of Benzoic acid. Values of each of the enzyme ALP, ALT and AST had been significantly increased with the increase concentration of benzoic acid. It also found that the effect of Benzoic acid in drinking water led to a balance in the numbers and types of microorganisms in the rat's intestines, the addition of this materials led to sovereignty of pathogenic in large intestinal, Jejunum and Duodenum. The addition of two types of lactic acid bacteria *Lb. casei* and *Lb. acidophilus* led to decreasing the negative effect of all additives and contaminants on the values of all the parameters determined.

المقدمة:

حامض البنزويك هو مركب عضوي بلوري أبيض، يستعمل كمادة حافظة لبعض الأعذية إذ إنه ملائم جداً للأغذية وعصائر الفاكهة والمشروبات الغازية والتي تكون بشكل طبيعي في مدى pH حامضي, ويدخل في تركيب مستحضرات التجميل ومستحضرات العناية بالأسنان ومحاليل غسيل الفم والمواد الصيدلانية، ويوجد في التفاح والفراولة والزبد الطبيعي (Khosrokhavar وآخرون، 2010). يستعمل حامض البنزويك بشكل مكثف كعامل حفظ للأطعمة والعصائر والمشروبات الغازية فهو يؤثر بشكل عام في السيطرة على الأعفان ويثبط نمو الخمائر وكذلك يمنع النمو لمدى واسع من البكتريا. وعلى الرغم من فعاليته تلك إلا أن المستويات فوق الحد المسموح به تكون ذات تأثيرات صحية سلبية في صحة المستهلك، وإن ميكانيكية الحفظ له تعتمد على تغير مستوى pH للغذاء أو المشروبات إلى المستوى الحامضي عند pH (5) او اقل (Shan وآخرون، 2007). ذكر العولقي، (2008) أن الحدود المسموح بها بحسب المواصفات القياسية اليمنية والعربية والإقليمية ومواصفات منظمة الصحة العالمية (WHO) والتي قدرت الحد الأعلى المسموح به من حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم في المشروبات الغازية والعصائر عند 1000 ملغرام/ لتر. وجد من خلال الدراسة التي قام بها كل من Abdel Aziz و Zabut، (2012) في حصول إرتفاع في قيم الكرياتنين وحامض اليوريك واليوريا والبروتين الكلي والألبومين والكلوبيولين وإنزيمات الكبد ALT و AST و ALT عند إضافة بنزوات الصوديوم بتركيز 500 ملغم / كغم وزن الجسم إلى عليقة الجرذان. كما ذكر Ibekweوآخرون، (2006) حصول إرتفاع في قيم إنزيمات الكبد AST و ALP عند إضافة بنزوات الصوديوم بتركيز 30 و 60 و 120 ملغم / كغم ولمدة 14 يوماً، وذكر Oyewole وآخرون، (2012) حصول إرتفاع في قيم اليوريا والكرياتنين وحامض اليوريك والألبومين وإنخفاض البروتين الكلي والكلوبيولين فضلاً عن إنخفاض نشاط إنزيم ALT و AST عند إضافة بنزوات الصوديوم إلى العليقة بتركيز 200 ملغم / كغم وزن الجسم.

تعد بكتريا حامض اللاكتيك بأن لها القدرة على تخمير مدى واسع من المصادر الكربوهيدراتية منتجةً حامض اللاكتيك، ويحتوي جدارها الخلوي على حامض التايكويك الذي يؤدي دوراً في إلتصاق الأحياء المجهرية بإنسجة الامعاء الطلائية (Reniero وآخرون، 1991). وتتميز بمقدرتها على مقاومة الحموضة وأملاح الصفراء وقابليتها على الإلتصاق بالأغشية المخاطية للأمعاء، وكذلك مقدرتها على الإستيطان في القناة الهضمية للإنسان (Ouwehand وآخرون، 1999). وذكر Pendone وآخرون، (2000) إن لبكتريا *Lb. casei* مقدرة على تقليل حالات الإسهال الحاد لدى الأطفال، وحفظ التوازن المايكروبي للأمعاء ومنع الإضطرابات المعوية. كما وجد كل من Goldin وآخرون، (1992) إن لهذه الأنواع من الأحياء تأثيرات ملحوظة في الأيض المايكروبي في القولون عن طريق تقليل فعالية إنزيمي (B-glucouronidase و Nitroreductase) اللذين لهما علاقة بتكوين وإطلاق المركبات السامة والمسرطنة في القولون. من جانب آخر أشار Carr وآخرون، (2002) إلى قدرة هذه الأحياء المجهرية على تثبيط نمو طيف واسع من البكتريا المرضية، ولها تأثير في زيادة إنتاج الكلوبيولينات المناعية IgA التي تؤدي دوراً مهماً في الإستجابة المناعية للأغشية المخاطية.

مواد وطرائق البحث:

جمع العينات :

شملت عينات العصائر علامات تجارية مثلت أكثر من عشرة مناشئ مختلفة عربية وأجنبية بواقع عشرة مكررات لكل علامة، تضمنت الأكثر إنتشاراً في الأسواق المحلية والمرغوبة من قبل المستهلكين. حفظت في درجة حرارة الغرفة (25±2 °م) في المختبر لمدة يومين لحين إجراء التقدير وتضمنت العصائر 15 عينة مع مراعاة أن تكون العلب سليمة من الأضرار وكذلك مثبت عليها العلامة التجارية وتاريخ الانتاج والنفاذ وتعريفه بالمحتوياتوكما ورد في (APHA، 1998).

تقدير حامض البنزويك في العصائر:

تم إتباع طريقة Stoica وآخرون، (2012) والمتضمنة أخذ 10 مل من العصير وخلطه جيداً مع 75 مل من محلول (60 جزء من خلات الأمونيوم وحامض الخليك مع 40 جزء من الميثانول) في دورق زجاجي حجم 100 مل. وضعت في حمام الأمواج فوق الصوتية عند 20 °م لمدة10 دقائق ثم أكمل الحجم الى 100 مل بإضافة محلول الإستخلاص. بعدها أضيف 1 مل من محلول Potassium hexacyanoferratetrihydrate ($k_4[Fe(CN)_6].3H_2O$) و 1 مل من محلول Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$) ورشح المحلول بإستخدام ورق الترشيح 0.45، الراشح المتحصل عليه سيكون جاهزاً لإجراء عملية التقدير. ولتقدير حامض البنزويك تم حقن 20 مايكروليتر من الراشح في جهاز الكروماتوغرافي السائل نوع Perkin Elmer series 200 UV Vis أمريكي المنشأ ، وبإستخدام عمود فصل نوع C18 والطور المتحرك يتكون من محلول حامض الخليك وخلات الصوديوم : الميثانول عند (60 : 40) ومعدل جريان 1 مل / دقيقة وطول موجي 235 نانوميتر. تم الحصول على تراكيز الحامض من خلال قرائتها في الجهاز والتي ظهرت على شكل قمم على الشاشة وتم تحويلها الى تراكيز.

تهيئة الحيوانات المختبرية :

تم الحصول على الحيوانات المختبرية من كلية الطب البيطري / جامعة الموصل وهي إناث جرذان Female Rats من النوع Albino Sprague- Dawleyweanling بالغة، قسمت الحيوانات البالغة عددها 72 حيوان عشوائياً إلى 9 مجاميع كل مجموعة تضمنت 8 حيوانات والتي تضمنت الآتي :-

1) مجموعة السيطرة 2) مجموعة الحيوانات المعطاة بكتريا *Lb. casei* 3) مجموعة الحيوانات المعطاة بكتريا *Lb. acidopillus* 4) مجموعة الحيوانات المعطاة حامض البنزويك بتركيز 250 ملغم/لتر حيوان/ يوم 5) مجموعة الحيوانات المعطاة حامض البنزويك بتركيز 500 ملغم/لتر حيوان/ يوم 6) مجموعة الحيوانات المعطاة حامض البنزويك بتركيز 250 ملغم/لتر + بكتريا *Lb. acidopillus* حيوان/ يوم 7) مجموعة الحيوانات المعطاة حامض البنزويك بتركيز 500 ملغم/لتر حيوان/ يوم + بكتريا *Lb. casei* حيوان/ يوم 8) مجموعة الحيوانات المعطاة حامض البنزويك بتركيز 250 ملغم/لتر + بكتريا *Lb. casei* حيوان/ يوم 9) مجموعة الحيوانات المعطاة حامض البنزويك بتركيز 500 ملغم/لتر + بكتريا *Lb. acidopillus* حيوان/ يوم .

تم إعطاء الحيوانات المواد المدروسة بعد خلطها مع الماء المعقم (Rantala، 1974) وبعد إذابتها بالتراكيز المشار إليها في المجاميع أعلاه، تم إضافة معلق بكتريا حامض اللاكتيك بنوعيها *Lb. casei* و *Lb. acidophillus* مع الماء وبأعداد عند 1.5×10^{8} / مل من وسط الحليب الفرز. وتم أخذ الوزن الإبتدائي بعد يوم من تغذية الحيوانات إنفراديا وكانت درجة الحرارة عند 20 – 25 °م ومدة الإضاءة لا تقل عن 12 ساعة في اليوم ، وكان تقديم الغذاء الذي تم إعداده إعتماداً على ماجاء في (NAS-NRS، 2002) خلال مدة التجربة التي استمرت لمدة 21 يوماً، وتم احتساب الزيادة الوزنية بحساب الفرق بين الوزن الابتدائي والوزن النهائي. الوزن النهائي – الوزن الابتدائي = الزيادة الوزنية (غم).

فحوصات الدم :

بعد انتهاء مدة التجربة ، جّوعت الحيوانات لمدة 12 ساعة، ثم خدرت بوساطة الكلوروفورم ، ثم شرحت حيوانات التجربة من منطقة الرقبة لغرض سحب الدم لإجراء الفحوصات اللازمة إذ تم سحب مايقارب 8 – 10 مل من الدم تم طردها مركزياً باستخدام جهاز النبذ المركزي (Centrifuge) عند سرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة للحصول على المصل الذي تم حفظه في درجة حرارة –20 مْ لحين إجراء التحاليل (Tietz، 2005).

إستخدمت طواقم محاليل قياسية (Kits) مجهزة من شركة BIOLABO (فرنسا) لقياس البروتين الكلي Total Protein (غم / ديسلتر) والألبومين Albumin (غم / ديسلتر) وحامض اليوريك Uric acid (ملغم/ ديسلتر) والكرياتنين Criatenin (ملغم/ ديسلتر)، بينما تم قياس اليوريا Urea (ملغم/ ديسلتر) بإستخدام طواقم محاليل قياسية مجهزة من قبل شركة Biomaghreb (تونس)، وأجريت التحاليل بواسطة المطياف الضوئي Spectrophotometer وفق تعليمات الشركات المجهزة لكل طاقم كما ذكر في (Tietz, 2005).

كما قدرت فعالية الإنزيمات التي شملت كلاً من Alanine amino transferase (ALT) و Aspartate (AST) amino transferase بإستخدام طواقم قياسية مجهزة من شركة RANDOX (بريطانيا)، أما تقدير فعالية إنزيم Alkaline phosphatase (ALP) فقد تم بإستخدام طواقم قياسية مجهزة من شركة ROCHE (ألمانيا) وتمت قراءة النتائج بإستخدام جهاز Reflotron وفق تعليمات الشركات المجهزة لها كما ذكر في (Titiz، 2005).

تقدير العدد الكلي لبكتريا القولون في الأمعاء :

جمع 10 غم من أمعاء الحيوانات وتم حفظها بإستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي بحجم 90 مل ، وأجريت التخافيف اللازمة لغاية التخفيف السابع وسحب 0.1 مل من التخفيف الاخير ونشر على وسط MacConkey Agar و Eosin Methylene blue وحضنت الأطباق مقلوبة عند 37 °م لمدة 24 ساعة بعدها عدت المستعمرات على الطبق لكل عينة (Harriganو MacCance، 1976) .

تقدير العدد الكلي لبكتريا حامض اللاكتيك :

من التخفيف المعد في المحلول الفسيولوجي في الخطوة السابقة تم أخذ 0.1 مل ونشرت على سطح وسط MRS-$CaCO_3$ الصلب وحضنت لاهوائيا عند 35 °م لمدة 24–48 ساعة. بعدها حسبت أعداد المستعمرات ذات الشكل الكريمي والممتلكة للمناطق الرائقة حولها(Harrigan و MacCance، 1976).

التحليل الإحصائي :

حللت نتائج التجارب بإستخدام النموذج الخطي العام ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS, 2001، 2001) لدراسة تأثير العوامل على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD كما أجري إختبار دنكن (Duncan، 1955) لتحديد معنوية الفروق مابين متوسطات العوامل المؤثرة على الصفات المدروسة عند مستوى (0.05).

النتائج والمناقشة:

تركيز حامض البنزويك في العصائر:

إن تركيز حامض البنزويك في عينات العصائر المختلفة وضحها الجدول 1. بينت النتائج إن جميع عينات العصائر قيد الدراسة إحتوت على حامض البنزويك بتراكيز تراوحت بين 3.76 الى 877.4 ملغم / لتر في عينات العصائر علامة Raubi (عراقي) وعلامة Sunquick (دانماركي) على التوالي. هذا المدى من التراكيز يقع ضمن الحدود المسموح بها من تراكيز

حامض البنزويك في المواصفات القياسية اليمنية والعربية والأقليمية ومواصفات منظمة الصحة العالمية (WHO) التي قدرت الحد الأعلى المسموح به من حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم في المشروبات الغازية والعصائر عند 1000 ملغم / لتر (العولقي، 2008).

اتفقت النتائج مع Tfouni و Toledo ، (2002) اللذان قاما بتقدير حامض البنزويك في 15 عينة من المشروبات الغازية و 18 عينة من عصائر الفاكهة وكانت التراكيز العالية 338 و 721 ملغم / لتر على التوالي. وكذلك اتفقت مع ماذكره Stoicaآخرون، (2012) من وجود حامض البنزويك في عينات العصائر بتراكيز تراوحت بين 63.7 – 70.7 ملغم / لتر.

جدول 1 : تركيز حامض البنزويك (ملغم/ لتر) في بعض عينات العصائر

تركيز حامض البنزويك (ملغم/ لتر) في بعض العصائر		
المنشأ	**المادة**	**تركيز حامض البنزويك ملغم/لتر**
السعودية	Vimto	102.5f
	Dandana	87.4h
	Orginal	12.05n
	Rani	9.60p
العراق	Tazech	156.3c
	Hadeer	76.49l
	Raihana	5.66q
	Raubi	3.76s
الدنمارك	Sunquick	877.4a
سوريا	Fantazia	229.8b
بلغاريا	Bulkan	125.4d
مصر	Rani	113.5e
لبنان	Chtaura	95.6g
تركيا	Tamek	33.7k
أوروبا	Faster clarkis	22.4i
الأمارات	Rani	18.99m

الأحرف المختلفة في العمود الواحد تشير إلى وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05

تأثير حامض البنزويك في معايير النمو

يوضح الجدول 2. تأثير حامض البنزويك بتركيز 250 و 500 ملغم / كغم على وزن الجسم لإناث الجرذان بعد إعطائها المادة لمدة 21 يوماً. بيّنت النتائج حصول انخفاض معنوي عند ($P<0.05$) في الوزن المكتسب لمجاميع الجرذان المعطاة فمويا من حامض البنزويك، إذ سببت زيادة التركيز في زيادة نسبة الانخفاض في الوزن المكتسب، حيث بينت النتائج إن التركيز 500 ملغم / كغم كان أكثر تأثيراً في انخفاض وزن الحيوانات وكان بمقدار 8.3 غم مقارنة مع مجموعة السيطرة التي كانت 36.4 غم ، أما إضافة نوعي بكتريا حامض اللاكتيك مع حامض البنزويك فقد سببت في حصول زيادة معنوية في وزن الحيوانات لتكون في حالة بكتريا *Lb. casei* وللتركيزين 250 و 500 ملغم / كغم عند زيادة مكتسبة 10.29 و 6.08 غم على التوالي ، وفي حالة بكتريا *Lb. acidophilus* عند 9.24 و 5.93 غم على التوالي.

اتفقت النتائج مع Kathrin وآخرون، (2007) الذين أكدوا إن إضافة حامض البنزويك لايؤدي إلى زيادة الوزن. أشار Ameachi و Anueyiagu، (2012) إلى إن مستويات حامض البنزويك السامة في العلف ربما تؤدي إلى انخفاض الوزن.

إن إضافة المعززات الحيوية إلى الغذاء قد سببت في زيادة تحفيز الشهية، وهذا يؤكد أهمية وجود الأنواع البكتيرية طبيعياً فضلاً عن دورها المهم في عملية امتصاص الغذاء الذي يتناوله المضيف إذ أنها تساهم في عملية أيض المواد الغذائية مثل النشويات ،البروتينات ،الدهون والمعادن كما أنها يمكن أن تدخل في عملية تصنيع الفيتامينات (Musa وآخرون، 2009). وذكر Stoica وآخرون، (2012) إن إضافة حامض البنزويك يؤدي إلى تأخير لنمو الحيوانات المختبرية، وإن التعرض الغذائي إلى حامض البنزويك لايعتمد فقط على نمط الإستهلاك بل يؤثر أيضاً على وزن الجسم.

جدول 2 تأثير تراكيز حامض البنزويك في معايير النمو في إناث الجرذان بعد فترة 21 يوماً

المعاملات	التركيز	الوزن الأبتدائي	الوزن النهائي	الزيادة الوزنية
	ملغم / كغم	غم		
السيطرة	0	155.54	191.94	36.4b
السيطرة + *Lb. casei*	2مل/ حيوان/يوم	144.30	185.5	41.5a
السيطرة + *Lb. acidophilus*	2مل/ حيوان/يوم	154.41	194.71	40.3a
حامض البنزويك	250	151.28	147.68	-3.6e
	500	153.94	145.64	-8.3f
حامض البنزويك+ *Lb. casei*	250	161.61	171.9	10.29c
	500	158.94	165.02	6.08d
حامض البنزويك+ *Lb. acidophilus*	250	162.25	171.49	9.24c
	500	155.86	161.79	5.93d

e-a : الأحرف المختلفة في العمود الواحد تشير إلى وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05

تأثير حامض البنزويك في المعايير الكيموحيوية :

يوضح الجدول 3 تأثير حامض البنزويك بتركيزين عند 250 و500 ملغم/ كغم في المعايير الكيموحيوية لإناث الجرذان عند إضافتها إلى ماء الشرب لمدة 21 يوماً.

بينت النتائج أن قيم البروتين الكلي لم تتأثر معنوياً عند ($P < 0.05$) في حالة الإعطاء من التركيزين 250 و500 ملغم/ كغم من حامض البنزويك، إذ كانت قيمها عند 6.12 و5.86 غم/ ديسيلتر على التوالي مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة التي بلغت 6.52 غم/ ديسيلتر، وعند إضافة بكتريا حامض اللاكتيك من النوعين *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* مع تركيزي حامض البنزويك إذ كانت (6.37 و6.13) و (6.39 و 6.18) غم/ ديسيلتر على التوالي. كذلك بينت النتائج إن قيم الألبومين والكلوبيولين لم تتأثر معنويا.

ولكن ارتفعت معنوياً قيم حامض اليوريك عند إضافة حامض البنزويك حيث سبب التركيز 250 ملغم/ كغم ارتفاع مستويات حامض اليوريك في مصل دم الجرذان إلى 2.61 ملغم/ ديسيلتر، أما التركيز 500 ملغم / كغم فقد ارتفعت قيمه إلى 2.95 ملغم / ديسيلتر مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت 2.02 ملغم / ديسيلتر. ولم تكن هناك تأثيرات معنوية لبكتريا حامض اللاكتيك بنوعيها في خفض تأثير حامض البنزويك عند التركيز 500 ملغم/ كغم على قيم حامض اليوريك، مع وجود

انخفاض معنوي ايجابي عند إضافة بكتريا حامض اللاكتيك بنوعيها *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* عند التركيز 250 ملغم/ كغم وكانت 2.28 و 2.25 ملغم / ديسيلتر.

كما بينت النتائج أيضاً ارتفاع قيم الكرياتنين معنويا عند إضافة حامض البنزويك، حيث سبب التركيز 250 ملغم/ كغم ارتفاع مستويات الكرياتنين في دم الجرذان إلى 1.53 ملغم/ ديسيلتر، أما التركيز500 ملغم/ كغم فقد ارتفعت معه قيمة الكرياتنين إلى2.16 ملغم / ديسيلتر مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة التي كانت 0.71 ملغم / ديسيلتر. ولم يكن هناك فروق معنوية لبكتريا حامض اللاكتيك بنوعيها في خفض تأثير حامض البنزويك عند التركيز 500 ملغم/ كغم على قيم الكرياتنين، مع وجود انخفاض معنوي ايجابي عند إضافة بكتريا حامض اللاكتيك بنوعيها ***Lb. casei*** و *Lb. acidophilus* عند التركيز 250 ملغم/ كغم وكانت 1.02 و 1.05 ملغم / ديسيلتر على التوالي.

أما معيار قيم اليوريا فقد إرتفع معنويا مع زيادة تركيز حامض البنزويك من 250 إلى 500 ملغم / كغم حيث كانت 29 و 33 ملغم / ديسيلتر على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة التي كانت عند 24 ملغم / ديسيلتر. وقد انخفضت معنوياً قيم اليوريا في مجموعتي السيطرة المضاف إليها بكتريا حامض اللاكتيك *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* حيث بلغت عند 21 و 22 ملغم / ديسيلتر على التوالي. وكان هناك تأثير ايجابي لبكتريا حامض اللاكتيك بنوعيها في خفض تأثير حامض البنزويك ولكلا التركيزين على قيم اليوريا.

جدول 3 تأثير تراكيز حامض البنزويك في بعض المعايير الكيموحيوية في إناث الجرذان بعد فترة 21 يوماً

Urea mg/dl	Criatenin Mg/dl	Uric acid Mg/dl	Glob g/dl	Alb g/dl	TP g/dl	التركيز (ملغم/كغم)	المعاملات
24d	0.71b	2.02b	2.8a	3.72a	6.52a	**0**	**السيطرة**
21e	0.43b	1.94b	2.91a	3.75a	6.66a	**2مل/حيوان/يوم**	**السيطرة + *Lb. casei***
22e	0.45b	1.93b	2.89a	3.74a	6.63a	**2مل/حيوان/يوم**	**السيطرة + *Lb. acidophilus***
29b	1.53a	2.61a	2.70a	3.42a	6.12a	**250**	**حامض البنزويك**
33a	2.16a	2.95a	2.76a	3.10a	5.86a	**500**	
26c	1.02ab	2.28ab	2.82a	3.55a	6.37a	**250**	**حامض البنزويك+ *Lb. casei***
30b	1.60a	2.60a	2.79a	3.34a	6.13a	**500**	
27c	1.05ab	2.25ab	2.86a	3.53a	6.39a	**250**	**حامض البنزويك+ *Lb. acidophilus***
31a	1.62a	2.59a	2.81a	3.37a	6.18a	**500**	

e-a : الأحرف المختلفة في العمود الواحد تشير إلى وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05

TP = Total Protien : Alb = Albumine : Glob = Globuline

اتفقت النتائج مع ما ذكره Abdel Aziz و Zabut، (2012) اللذين وجدا ارتفاع في قيم الكرياتنين وحامض اليوريك واليوريا مقارنة مع مجموعة السيطرة عند إضافة بنزوات الصوديوم بتركيز 500 ملغم / كغم وزن الجسم إلى عليقة الجرذان. وكذلك مع ماذكره Oyewole وآخرون، (2012) في حصول ارتفاع في اليوريا والكرياتنين وحامض اليوريك وانخفاض البروتين الكلي والكلوبيولين مقارنة مع مجموعة السيطرة عند إضافة بنزوات الصوديوم إلى العليقة بتركيز 200 ملغم / كغم وزن الجسم. كما اتفقت النتائج مع Abdel Gader وآخرون، (2009) اللذين وجدوا ارتفاع قيم اليوريا والكرياتنين عند إضافة حامض البنزويك عند 100 و 500 و 1000 ملغم/ كغم وزن الجسم.

إن إضافة بنزوات الصوديوم يؤثر على الوظائف والتمثيل الغذائي في الجسم، وإن الاختلاف المعنوي في قيم اليوريا والكرياتنين وحامض اليوريك دليل على تضرر وظائف الكلى (Cameron و Greger، 1998). وإن تراكم هذه المنتجات الأيضية في الدم دليل على عيوب في وظائف الكلية (Cotran وآخرون، 2005). وإن عدم حصول التغير المعنوي في قيم البروتين الكلي والألبومين والكلوبيولين في مصل الدم في الجرذان يشير إلى أن سمية هذه المركبات لم تكن كافية لتثبيط تخليق البروتين في الكبد (Smith و Lunn، 1984). تساعد بكتريا حامض اللاكتيك على توفير الحماية ضد التسمم الغذائي وتعمل على تعزيز امتصاص المعادن والفيتامينات فضلاً عن ذلك فإنها تعمل على تحطيم الكثير من السموم المضرة بالمضيف (Sungsoo و Finocchiaro، 2010).

تأثير حامض البنزويك في المعايير الإنزيمية :

الجدول 4 يبين تأثير التركيزين 250 و 500 ملغم / كغم من حامض البنزويك في فعالية الإنزيمات في إناث الجرذان. بينت النتائج حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في فعالية جميع قيم الإنزيمات ALT ، AST , ALP ولكل مجاميع الحيوانات، حيث بلغت قيم فعالية الإنزيم ALT 41 و 57 وحدة عالمية / لتر والإنزيم AST 48 و 62 وحدة عالمية / لتر والإنزيم ALP 145 و 155 وحدة عالمية / لتر ، كما بينت النتائج وجود انخفاض معنوي في قيم فعالية الإنزيمات الثلاثة لمجموعتي السيطرة المضاف إليها بكتريا حامض اللاكتيك *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة إذ بلغت قيم فعالية الإنزيمات ALT ، AST , ALP هي 25 ، 42 ، 138 وحدة عالمية / لتر على التوالي.

كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي حصول انخفاض معنوي في فعالية الإنزيمات عند إضافة حامض البنزويك بتركيزيه مع بكتريا حامض اللاكتيك إذ بلغت قيمة الإنزيم ALT 35 و 49 وحدة عالمية / لتر، وللإنزيم AST بلغ 43 و 55 وحدة عالمية / لتر، وللإنزيم ALP بلغ 142 و 149 وحدة عالمية / لتر بالنسبة لبكتريا *Lb. casei* وبلغت قيمة الإنزيم ALT 37 و 48 وحدة عالمية / لتر، وللإنزيم AST بلغ 41 و 54 وحدة عالمية / لتر، وللإنزيم ALP بلغ 142 و 152 وحدة عالمية / لتر بالنسبة لبكتريا *Lb. acidophilus* مقارنة مع مجموعة السيطرة.

اتفقت النتائج مع Abdel Aziz و Zabut، (2012) حيث ذكرا حصول ارتفاع قيم إنزيمات الكبد ALT و AST و ALT مقارنة مع مجموعة السيطرة عند إضافة بنزوات الصوديوم بتركيز 500 ملغم / كغم وزن الجسم إلى عليقة الجرذان. واختلفت النتائج مع Oyewole وآخرون، (2012) اللذين وجدوا انخفاض نشاط إنزيم ALT و AST مقارنةً مع مجموعة السيطرة عند إضافة بنزوات الصوديوم إلى العليقة بتركيز 200 ملغم / كغم وزن الجسم.

ذكر Wang و Srivastava، (2002) إن إضافة بنزوات الصوديوم تسبب اضطراب أو خلل في وظائف الكبد وهذا يكشف عنه من خلال ارتفاع انزيمات ALT , AST في مصل الدم، وإن تضرر الغشاء الكبدي يؤدي إلى اطلاق الإنزيمات إلى الدورة الدموية وإن ارتفاع مستوى هذه الانزيمات في المصل دليل على تلف الكبد (Moss و Rosalki، 1996). إن الزيادة في مستوى الإنزيمات يعود الى الأضرار المحتمل حدوثها في كبد حيوانات التجارب (Ibekwe وآخرون، 2007). إن التحسن في قيم الإنزيمات يمكن أن يعزى إلى أن بكتريا حامض اللاكتيك تعمل على تثبيط بعض المركبات المسؤولة عن حدوث عمليات الأكسدة بالجسم مثل (*t*-BHP) *tert*-butyl hydroperoxide والتي يكون التأثير عنها في تلف خلايا الكبد (Ou وآخرون، 2011). لذلك فأن استهلاك المنتجات الغذائية الحاوية على هذه البكتريا يمكن أن توفر حماية لخلايا الكبد من التأثيرات السلبية عليها (Mohammed، 2003).

جدول 4 تأثير تراكيز حامض البنزويك في المعايير الإنزيمية(IU/L) في إناث الجرذان بعد فترة 21 يوماً

المعاملات	التركيز	ALT	AST	ALP
السيطرة	0	25e	42d	138cd
السيطرة + *Lb. casei*	2مل/حيوان/يوم	19f	32e	119d
السيطرة +*Lb. acidophilus*	2مل/حيوان/يوم	21f	34e	117d
حامض البنزويك	250	41c	48c	145c
	500	57a	62a	155a
حامض البنزويك+ *Lb. casei*	250	35d	43d	142c
	500	49b	55b	149b
حامض البنزويك+ *Lb. acidophilus*	250	37d	41d	142c
	500	48b	54b	152b

e-a : الأحرف المختلفة في العمود الواحد تشير إلى وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05

ALP = Alkaline phosphatase AST = Aspartate amino transferase : ALT = Alanine amino transferase

تأثير حامض البنزويك في التوازن الميكروبي في الأمعاء :

إن تأثير حامض البنزويك بالتركيزين 250 و 500 ملغم / كغم في توازن المجتمع الميكروبي في أمعاء إناث الجرذان يوضحه الجدول 5. بينت النتائج حصول انخفاض معنوي في أعداد بكتريا حامض اللاكتيك في الأمعاء الغليظة والصائم والأثني عشري عند إعطاء حامض البنزويك مع ماء الشرب للحيوانات بالتركيزين منها مقارنة مع مجموعة السيطرة حيث بلغت الأعداد عند تركيز 250 ملغم / كغم هي (6.65 و 7.11 ، 7.98) في الأمعاء الغليظة و (6.77 و 7.24 و 7.75) في الصائم و (6.69 و 6.84 و 7.10) في الأثني عشري مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة، أما عند التركيز 500 ملغم / كغم فقد كانت الأعداد الميكروبية عند (6.11 و 7.65 ، 8.44) في الأمعاء الغليظة و (6.14 و 7.85 و 8.22) في الصائم و (6.07 و 7.44 و 7.77) في الأثني عشري على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة، ولم يحصل إختلاف معنوي عند التركيز 250 و 500 ملغم / كغم في أعداد بكتريا القولون في الصائم.

كذلك بينت النتائج حصول تأثير معنوي لنوعي لبكتريا حامض اللاكتيك *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* عند إضافتها مع حامض البنزويك بتركيز 500 ملغم / كغم في خفض أعداد البكتريا المرضية وزيادة أعداد بكتريا حامض اللاكتيك. أما عند التركيز 250 ملغم / كغم فلم يكن هناك إختلاف معنوي في حالة إضافة بكتريا *Lb. casei* الا في أعداد بكتريا حامض اللاكتيك والبكتريا المرضية في الأمعاء الغليظة والصائم مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة، أمافي حالة بكتريا *Lb. acidophilus* فلم يكن هناك إختلاف معنوي الا في أعداد بكتريا حامض اللاكتيك في الأمعاء الغليظة وأعداد البكتريا المرضية في الصائم.

اتفقت النتائج مع Abdalla وآخرون، (2013) اللذين وجدوا حصول زيادة معنوية في أعداد بكتريا القولون عند 0.2 % حامض البنزويك مع انخفاض معنوي في العدد الكلي لبكتريا حامض اللاكتيك مقارنة مع مجموعة السيطرة في الدجاج.

يحصل التوازن للأحياء المجهرية المتواجدة بصورة طبيعية في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان نتيجة التعرض اليومي لغزو العديد من الأحياء المجهرية المتواجدة في البيئة المحيطة وذلك من خلال شرب أو تناول المواد الغذائية أو استنشاق الهواء (Edens، 2003).

لقد برزت أهمية هذا النوع من البكتريا في استعماله كمعزز حيوي حيث تمتاز هذه البكتريا بقدرتها على خلق توازن في أعداد وأنواع بكتريا النبيت الطبيعي داخل القناة المعوية Intestinal tract في اللبائن (Corcoran وآخرون، 2005). وأشار Carrوآخرون، (2002) إلى قدرة أنواع هذه البكتريا في تثبيط نمو طيف واسع من أنواع البكتريا المرضية.

جدول 5 . تأثير تراكيز حامض البنزويك في توازن المجتمع الميكروبي(Log) في إناث الجرذان بعد فترة 21 يوماً

المعاملات	التركيز ملغم/ كغم	الأمعاء الغليظة			الصائم			الأثني عشري		
		MRS	EMB	M. agar	MRS	EMB	M. agar	MRS	EMB	M. agar
السيطرة	0	7.34 b	6.30 b	7.40 b	7.32 b	6.69 b	7.23 b	7.40 b	6.23 c	6.84 b
السيطرة + *Lb. casei*	2مل/ حيوان/يوم	8.85 a	5.41 c	6.69 c	8.49 a	6.07 c	6.60 c	8.02 a	5.44 d	6.14 c
السيطرة + *Lb. acidophilus*	2مل/ حيوان/يوم	8.77 a	5.27 c	6.57 c	8.58 a	5.95 c	6.64 c	7.94 a	5.37 d	6.17 c
حامض البنزويك	250	6.65 c	7.11 a	7.98 a	6.77 c	7.24 a	7.75 a	6.69 c	6.84 b	7.10 a
	500	6.11 d	7.65 a	8.44 a	6.14 d	7.85 a	8.22 a	6.07 d	7.44 a	7.77 a
حامض البنزويك+ *Lb. casei*	250	6.84 bc	6.77 b	7.55 b	7.16 b	6.73 b	7.32 b	6.90 b	6.17 c	6.72 b
	500	6.69 c	7.10 a	7.91 a	6.84 c	7.34 a	7.84 a	7.14 b	7.0 a	7.34 a
حامض البنزويك+ *Lb. acidophilus*	250	7.12 b	6.69 b	7.53 b	7.14 b	6.70 b	7.34 b	6.95 b	6.14 c	6.90 a
	500	6.72 c	7.15 a	7.88 a	6.91 c	7.38 a	7.82 a	7.04 b	6.95 a	7.44 a

e-a : الأحرف المختلفة في العمود الواحد تشير إلى وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05

M. agar = MacConkey agar : EMB = Eosine Methylene Blue : MRS = DeMan-Rogosa-Sharpe medium

المصادر:

العولقي، أحمد عوض صالح (2008). تقدير حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم في المشروبات الغازية في الأسواق اليمنية . رسالة ماجستير كلية التربية، جامعة عدن، اليمن.

Abdalla, O. A. M.; El-Boshy, M.E. .;Dalia, M. Hamed; and Haidy, G. Abdel-Rahman (2013). The effects of benzoic acid on immunomodulatory, some selective biochemical and growth performance parameters of broiler chicks. SCVMJ, XVIII (2)99-110

Abdel Aziz I. S. and Zabut B. M. H.(2012)Blood indices of sodium-benzoate-administrated albino rats: effect of olive oil and/or time-dependent recovery. Egyptian Journal of BiologyVol. 14, pp 50-56.

Abd-AlGadir M. I.; Ihaimer M. M.; Sabah El Khier M. K. and Idris O. E. (2009) Effect of benzic acid and combination of benzic acid with citric acid as food additives of the renal function of experimental rats. Asian Journal f Clinical Nutritin 1(2) :83-87

Amaechi N. and Anueyiagu C.F. (2012)The effect of dietary Benzoic acid supplementation on growth performance and intestinal wall morphology of broilers. Online Journal of Animal and Feed Research 1(5) 401-404.

APHA (American Public Health Association). (1998) .Standard methods for examination of water and wastewater.20th ed .American Public Health Association, U.S.A.appraisal" .cuff. Issues Intest. Micrbiol.,1(2):59-67.

Cameron J.S. and Greger, R. (1998) Renal function and testing of function. Oxford Textbook of Clin. Nephrol., pp.6-39.

Carr, F. J.; Chill, D. and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria. A literature survey. Critical Reviews in Microbiology, 28 (4): 281- 370.

Corcoran, B. M. ; Stanton, C. ; Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P.(2005) "Survival of probiotic Lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars"Journal of Applied Environmental Microbiology ,71(3):3060-3067.

Cotran R.S., Kumar, V., Fausto, N., Robbins, S.L. and Abbas, A.K. (2005) Robbins and Cotran pathologic basis of disease. St. Louis, Elsevier Saunders., pp 72-87.

Duncan , D.(1955).Multiple range and Multiple F-Test.Biometrics.11:1-42.

Edens, F.W. (2003). An alternative for antibiotic use in poultry: Probiotics. Rev. Bras. Sci. Avic., 5(2): 101-134.

Goldin , B. R. ; Gorbach , S. L.; Saxelin , M. ; Barakat , S; Gualtiere , L. and Salminen , S. (1992) . Survival of *Lactobacillus* Pecies (Strain GG) In human gastrointestinal tract . Dig . Dis . Sci., 37 :121 – 128

Harrigan,W.F. and MacCance,M.E. (1976). Laboratory Methods in Food and dairy Microbiology . Academic Press. London.

Ibekwe, S. E., Uwakwe, A. A. and Monanu, M. O.(2007) *In vivo* effects of sodium benzoate on plasma aspartate amino transferase and alkaline phosphatase of wistar albino rats. Scientific Research and Essay Vol. 2 (1), pp. 010-012

Kathrin B., Caspar W., Jiri B. and Stefan G. (2007) Influence of benzoic acid and dietary protein level on performance, nitrogen metabolism and urinary pH in growing-finishing pigs. Publishing models and article dates explained pages 382-389.

Khosrokhavar R , Sadeghzadeh N , Amini N , Ghazi-Khansari M , Hajhaghaee R, and Ejtemaei M.S.(2010) Simultaneous Determination of Preservatives (Sodium Bezoate and Potassium Sorbate) in Soft Drinks and Herbal Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).Journal of Medicinal Plants. vol.9,.35:80-87

Mohammed, A. K. (2003) "The effect of omega-3 fatty acids in early and advanced chronic liver diseases" M.Sc. thesis, El-Minia University.

Moss D.W. and Rosalki, S.B. (1996) Enzyme tests in diagnosis. Edward Arnold. London., pp 187-196

Musa, H.H.; Wu, S.L.; Zhu, C.H.; Seri, H.I. and Zhu, G.O. (2009). The potential benefits of probiotics in animal production and health. J. Anim. Vet. Adv., 8(2): 313-321.

National Research Council Recommended(NAS-NRC).(2002). Dietary Allowance. 15th ed. Washington, DC. National Academy. Press.

Ou, Ch. ; Chiu, Y. ; Lin, Sh. ; Chang, Y. ; Huang, H. and Lin, M. (2011) "Hepatoprotective effect of lactic acid bacteria in the attenuation of oxidative stress from *tert*-Butul-Hydroperoxide" Journal of Food and Drug Analysis ,20 (1):101-110.

Ouwehand, A.C.; Kirjavainen, P.V.; Gronlund, M.M.; Isolauri, E. and Salminen, S. (1999). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. Int. Dairy J., 9:623–630.

Oyewole O. I.; Dere F. A. and Okoro O. E. (2012) Sodium Benzoate Mediated Hepatorenal Toxicity in Wistar Rat: Modulatory Effects of Azadirachta indica (Neem) Leaf, European Journal of Medicinal Plants

Pendone, C.A.; Arnaud, C.C.; Postaire, E.R.; Bonley, C.F. and Reiner, L.P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by a *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhea. Int. J. Clin. Pract., 54(9): 568-571.

Rantala M. (1974). Nitrovin and tetracycline: a comparison of their effect on Salmonella in chicks. Br. Poultry. Sci., 15: 299 - 303.

Reniero, R.; Morelli, L.; Dettaen, C. and Bottazi, V. (1991). Detection of permanent *Lactobacillus casei* subsp. *casei* strain S in weaned infants gut. Lettes Appli. Microbiol., 13: 3-6.

SAS (2001). SAS User's guide: Statistical system, Inc. Cary, NC. USA.

Shan D, Fang Q, Zhue D and Xue H. (2007) Inhibitive detection of benzoic acid using a novel phenol biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. Talanta. 72, pp.1267-1272.

Smith J.E. and Lunn, P.G. (1984) Albumin-synthesizing capacity of hepatocytes isolated from rats fed diets differing in protein and energy content. Ann. Nutr. & Metab., 28, 281-287.

Stocia R.S.; Doncea S. ;Badescu V.;Senin R. and Lon R. (2012) Spectral identification and HPLC quantification of benzoic acid from natural juices. The Scientific Bulletin of Valahia University – materials and mechanics – Nr. 7 (year 10).

Sungsoo,S. and Finocchiaro, E. (2010) "Hand book of prebiotic and probiotic ingredients: health and benefits and food application" 3rd ed., Taylor and Francis group LLC., printed in U.S.A.

Tfouni S A. V. and Toledo M. C. F. (2002) Determination of Benzoic acid and Sorbic acid in Brazilian food. Food Control 13: 117-123.

Tietz, Y. ed (2005) "Clinical Biochemistry" 6 th ed., McGraw-Hill, New York , p. 825

Wang W. and Srivastava, S. (2002) Serological markers. In Breslow, Lester. Encyclopedia of Public Health. New York. Macmillan, USA, pp. 1088-1090.