التحري عن قابلية عزلات بكتريا *Leuconostoc* spp. المحلية على انتاج المستحلب الحيوي (Biosurfactant) وتحديد الظروف المثلى لانتاجه

جيهان عبد الستار سلمان و عدنان ياس خضير
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

Screening for ability of locally isolates *Leuconostoc* spp. to produce biosurfactant and determination of optimum condition for its production

Jehan A.S. Salman and Adnan Y. Khudair
Department of Biology /College of Science /Al-Mustansiriyah University

Abstract

Fifteen samples of raw milk and yogurt were used to isolate *Leuconostoc* spp. ,Twenty eight *Leuconostoc* spp.were isolated. All isolates were tested for biosurfactant production , Producer isolates were then subjected to the biochemical examination and Vitek 2 system for identification to the species . Eleven of biosurfactantproducer isolates were identified from 28 *Leuconostoc* isolates. They are distributed as *Leuconostoc mesenteroide s*sp *cremoris* .

Surface activity of *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremor is* supernatants were studied .The optimal conditions of biosurfactant production included growing at different temperatures; different pH, different incubation periods, aeration and inoculum ratio were also studied. The results showed that surface activity of supernatant was differed according to isolate, with oil displacement diameter 4-7 mm. Anaerobic and aerobic conditions for 24 hours at30^{o} C and pH 6 and 2% inoculum were fitting to biosurfactant production.

Key words: *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* ,*biosurfactant*

المستخلص

جمعت 15 عينة من الحليب الخام واللبن الرائب لغرض عزل بكتريا *Leuconostoc* spp. ،امكن الحصول من هذه العينات على 28 عزلة تعود لبكتريا *Leuconostoc* spp. اختبرت قابلية العزلات جميعها على انتاج المستحلب الحيوي (Biosurfactant) ، وشخصت بعدها العزلات المنتجة له حتى النوع باتباع الفحوصات الكيموحيوية الخاصة وبأستعمال نظام Vitek 2. امكن تشخيص 11 عزلة منتجة للمستحلب الحيوي من أصل 28 عزلة تعود الى الجنس*Leuconostoc*، كانت جميعها تعود للنوع *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*.

درست الفعالية السطحية لرواشح عزلات بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*.المنتجة للمستحلب الحيوي وحددت الظروف المثلى لانتاجه شملت التنمية في درجات حرارة مختلفة وارقام هيدروجينية مختلفة واوقات حضن وظروف تهوية مختلفةونسب لقاح مختلفة . بينت النتائج تباين الفعالية السطحية لرواشح تلك العزلات ، عندما تراوحت اقطار مناطق ازاحة الزيت

بين 4-7 مليمتر. وكان نمو البكتريا في الظروف الهوائية واللاهوائية لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 30م ورقم هيروجيني 6 وبنسبة لقاح 2%مناسبةلانتاج المستحلب الحيوي .

الكلمات المفتاحية : بكتريا .*Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* ، المستحلب الحيوي

المقدمة

ينتمي جنس *Leuconostoc* الى مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك ، والتي تتصف بكونها كروية بيضوية الشكل ، موجبة لصبغة كرام صغيرة منتظمة الشكل ، توجد بشكل ازواج او سلاسل ، تمتاز الخلايا بكونها غير متحركة وغير مكونة للسبورات ، درجة الحرارة المثلى لنموها ما بين (14-30) م° (1) ، تتميز بكونها غير ممرضة ومتحملة للحموضة ، جميع الأنواع ضمن هذا الجنس هي غير متجانسة التخمر وقادرة علىانتاج عديد السكرايد الدكستران عند نموها بوجود السكروز(2) ،تكون مقاومة للمضاد vancomycin وتعد صفة المقاومة صفة تشخيصية تفريقية لهذا الجنس عن بقية مكورات بكتريا حامض اللاكتيك (3) . تتواجد هذه البكتريا في النباتات واللحوم والحليب، ويستعمل البعض منها في تخمير الاغذية (4).

يتميز جنس*Leuconostoc* بقدرته على تثبيط الاحياء المجهرية من خلال انتاجه العديد من المواد المثبطة مثل الحوامض العضوية (حامض اللاكتيك وحامض الخليك) وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسين و الكحول الأثيلي والمستحلب الحيوي (5)، اذ يبدي الكحول الاثيلي المنتج من بكتريا *Leuconostoc* القدرة على تثبيط جنس Penicillium ، كذلك تنتج بعض السلالات بكتريوسينpediocin والذي يعتبر من انواع البكتريوسينات التي لها دور في سلامة الاغذية وحمايتها من التلف (6 و7) . وتتصف بكتريوسنات هذا الجنس بكونها ذات تأثير واسع تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام (4).

يعد المستحلب الحيوي (Biosurfactant) من المركبات الفعالة سطحياً تنتجها العديد من الاجناس البكتيرية و الخمائر والأعفان ، وتتكون تلك المركبات في الغالب على اسطح الخلايا المايكروبية او ربما تفرز خارج الخلايا (8) و (9) وتعد هذه المركبات Amphiphilic ، اي انها تحتوي على مجموعتين كيمائييتين : احدهما محبة للماء والاخرى كارهة للماء ، مما يعطيها القدرة على ان تتجمع بين الاطوار السائلة وبذلك فهي تستعمل لتقليل الشد السطحي والبيني (10).وينتج المستحلب الحيوي اما من خلال المسارات التخمرية للاحياء المجهرية ، او من خلال التفاعلات الانزيمية المحفزة في المختبر. ويصنف المستحلب الحيوي على اساس تركيبه الكيميائي ووزنه الجزيئي و اصله المايكروبي الى اصناف منهاGlycolipids وLipopeptides وPhospholipids (10و11)، وهناك اهتمام متزايد في دراسة الخصائص الكيموفيزيائية والحيوية للمستحلب الحيوي بسبب استعمالاته المتعددة (12) . اذ يمتلك المستحلب الحيوي العديد من الصفات التي تضاهي نظائره المصنعة كيميائياً ، بل تفوقها احياناً ، مما يجعلها أكثر اهمية وله العديد من التطبيقات مثل تطبيقاته في الانشطة البايولوجية والمجالات الصيدلانية بوصفه مادة مضادة للبكتريا والفايروسات والفطريات وكمنظمات مناعية ومن المواد المضادة للسرطان (13 و14)، كما يعمل كمادة مضادة لالتصاق العديد من الممرضات مما شجع على استخدامه كمادة وقائية لتغطية الادوات الطبية (12) ،فضلا عن استخدامه في مجال البيئة والزراعة والصناعة مثل صناعة الاغذية وصناعة المنظفات ومواد التجميل فضلا عن مجالات اخرى (12و13).

نظرا لندرة الدراسات ولاسيما المحلية حول انتاج المستحلب الحيوي(Biosurfactant) من بكتريا *Leuconostoc* جاءت هذه الدراسة لتهدف الى : عزل وتشخيص بكتريا .*Leuconostoc* spp والتحري عن قابليتها على انتاج المستحلب الحيوي و دراسة الظروف المثلى لانتاجه.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 15 عينة من الحليب البقري الخام و اللبن الرائب الريفي والمبستر ، وضعت العينات في حاويات خاصة معقمة ونقلت الى المختبر لأجراء الفحوصات اللازمة لعزل بكتريا *Leuconostoc*.

عزل بكتريا *Leuconostoc*

لقحت كل عينة من العينات في وسط MRS السائل بنسبة 1% وحضنت بدرجة حرارة 30 م لمدة 24 ساعة تحت ظروف لاهوائية ، اجريت سلسلة من التخافيف العشرية للعينات المزروعة باستعمال المحلول الملحي الفسلجي ، ثم نشر 0.1 مليلتر من التخفيف الثالث على سطح وسط MRS Vancomycin الصلب ، لتحضن بعدها بدرجة حرارة 30 م لمدة 24-48 ساعة تحت ظروف لاهوائية ، نقلت المستعمرات المعزولة الى وسط MRS الصلب لتنقيتها بطريقة التخطيط ، حضنت لاهوائيا بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة ، ثم نقلت المستعمراتالمفردة النامية الى وسط MRS السائل وحضنت تحت الظروف نفسها (15) .

تشخيص بكتريا *Leuconostoc*

أخضعت 28 عزلة للفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية (16) والتي شملت فحص الكاتاليز والاوكسيديز وفحص انتاج الحموضة والخثرة في وسط حليب اللتموس ومن ثم تشخيص العزلات المنتجة للمستحلب الحيوي حتى النوع باستعمال نظام Vitek 2.

التحري عن قابلية عزلات بكتريا *Leuconostoc* على انتاج المستحلب الحيوي

طريقة تحلل اكار الدم Blood Agar Screening Method

تم تلقيح وسط MRS السائل ببكتريا *Leuconostoc* بعمر24 ساعة وبنسبة لقاح 1% وحضنت بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 24 ساعة ، بعدها نقل 10 مايكروليتر من المزروع البكتيري السائل الى وسط اكار الدم وبعد تركها لتجف، حُضنت الأطباق بدرجة 30 مْ لمدة72-24 ساعة. وبعد انتهاء مدة الحضن تم قياس قطر منطقة التحلل حول المستعمرات وتم تمييز العزلات المنتجة للمستحلب الحيوي من خلال قابليتها على تحليل الدم من تلك غير المنتجة له (17).

أختبار انتشار الزيت Oil Spreading Test

تم اختبار الفعالية السطحية لعزلات بكتريا *Leuconostoc* المنتجة للمستحلب الحيوي والموجبة لفحص تحلل اكار الدم ،زرعت العزلات في وسط MRSالسائل بنسبة لقاح 2% ،حضنت بدرجة حرارة 30مْ لمدة 24 ساعة،نبذت مركزياً بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 4 مْ للحصول على راشح الخلايا الذي رُشح فيما بعد بالمرشحات الدقيقة Millipore filters حجم 0.22 مايكروميتر.أُختبرت الفعالية السطحية بطريقة انتشار الزيت (Oil spreading method)، وذلك بنقل 20 مايكروليتر من زيت المحركات على سطح 20 مليلتر من الماء المقطر في طبق بتري معقم مكوناً غشاء رقيق، وُضع 20 مايكروليتر من رواشح العزلات قيد الاختبار(كلاً على انفراد) في مركز الغشاءالزيتي في الطبق وبعد مرور 30 ثانية تم تقدير اقطار مناطق ازاحة الزيت بالمليمتر(18،19).

دراسة الظروف المثلى لأنتاج المستحلب الحيوي

درجة حرارة الحضن

لدراسة تأثير درجة الحرارة على انتاج المستحلب الحيوي تم تنمية العزلة المنتخبة التي اعطت اعلى فعالية سطحية في درجات حرارية مختلفة اذ نميت العزلة في وسط MRS السائل وبنسبة لقاح 2% وحضنت بدرجات حرارية مختلفة شملت30,25,20 مْ (كلاً على انفراد) في ظروف لاهوائية لمدة 24 ساعة. بعدها نُبذ المزروع البكتيري السائل مركزياً6000 دورة/دقيقة بدرجة 4مْ ولمدة 20 دقيقة وبعد الحصول على الراشح تم اختبار الفعالية السطحية له بطريقة انتشار الزيت ولدرجات الحرارة المذكورة

لإختيار الدرجة الحرارية المثلى للأنتاج(18،19).

الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي

بعد اختيار الدرجة الحرارية المثلى لأنتاج المستحلب الحيوي درس تأثير الرقم الهيدروجيني على انتاجه ، اذ تم تنمية العزلة المنتخبة التي اعطت اعلى فعالية سطحية في وسط MRS السائل وبنسبة لقاح 2% وفي الارقام الهيدروجينية 5 ، 6 ، 7 ، 8 كلا على انفراد ، وبدرجة حرارة 30 مْ بظروف لاهوائية ولمدة 24 ساعة ، بعدها نُبذ المزروع البكتيري السائل مركزياً6000 دورة/دقيقة بدرجة 4مْ ولمدة 20 دقيقة وبعد الحصول على الراشح تم اختبار الفعالية السطحية لها بطريقة انتشار الزيت لإختيار الرقم الهيدروجيني الامثل للأنتاج(18،19) .

ظروف التهوية واوقات الحضن

بعد اختيار الدرجة الحرارية والرقم الهيدروجيني الامثل لأنتاج المستحلب الحيوي درس تأثير ظروف التهوية واوقات الحضن على انتاجه ، اذ تم تنمية العزلة المنتخبة التي اعطت اعلى فعالية سطحية في وسط MRS السائل وبنسبة لقاح 2% لاهوائياً وهوائيا لأوقات حضن 24 و48 و72 ساعة وبدرجة حرارة 30 مْ كلا على انفراد . وبعد انتهاء كل مدة حضن لكلا المجموعتين،تم نبذ المزروع البكتيريالسائل مركزياً بسرعة6000 دورة/دقيقة بدرجة 4مْ لمدة 20 دقيقة. اختبرت الفعالية السطحية بطريقة انتشار الزيت لراشح العزلة المنتخبة ولأوقات الحضن 24 و48 و72 ساعة (18،19).

نسبة اللقاح

لدراسة تأثير نسبة اللقاح على انتاج المستحلب الحيوي تم تنمية العزلة المنتخبة التي اعطت اعلى فعالية سطحية في وسط MRS السائل وبنسبة لقاح 1 ، 2 ، 5 ، 10 % (10^8خلية / مل محسوبة بطريقة عد الاطباق) بظروف هوائية ودرجة حرارة 30 لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة حضن ،تم نبذ المزروع البكتيريالسائل مركزياً بسرعة 6000 دورة/دقيقة بدرجة 4مْ لمدة 20 دقيقة. اختبرت الفعالية السطحية بطريقة انتشار الزيت لراشح العزلة المنتخبة (18،19).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتريا *Leuconostoc*:

اظهرت نتائج الفحوصات الزرعية للمستعمرات النامية على وسط MRS vancomycin الصلب الحصول على مستعمرات دائرية بيضاء ذات حافات مسطحة ، ناعمة وبراقة ، محدبة شبه شفافة ، وتعود مثل هذه الصفات الى الانواع التابعة لجنس *Leuconostoc*،واظهر فحص الشريحة للخلايا التي اخذت من المستعمرات بان الخلايا كانت كروية ، موجبة لصبغة الكرام ، غير مكونة للسبورات ، تتواجد بشكل ازواج او سلاسل طويلة مما يدعم كونها تعود لجنس *Leuconostoc* كما اظهرت نتائج فحوصات الكيموحيوية ان جميع عزلات كانت سالبة لفحوصات الكاتاليز والاوكسيديز ، واعطت نتيجة موجبة لفحص اللتموس ولهذا فقد تشابهت صفاتها مع جنس *Leuconostoc*(16). اعتماداً على نتائج الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية امكن الحصول على 28 عزلة تعود الى جنس*Leuconostoc*.

التحري عن قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus*على أنتاج المستحلب الحيوي

طريقة تحلل اكار الدم Blood Agar Sceening Method

اختبرت قابلية28 عزلة تعود لجنس*Leuconostoc*على انتاج المستحلب الحيوي باستعمال وسط اكار الدم وملاحظة تحلل الدم على الوسط.استعملت هذه الطريقة للتحري الاولي عن فعالية المستحلب الحيوي والكشف عن العزلات المنتجة له(20). بينت النتائج ان 11 عزلة من اصل28 عزلة ، اظهرت تحللاً للدم على وسط اكار الدم ، التي عدت منتجة للمستحلب الحيوي بانتاجية متباينة تبعاً لقطر منطقة التحلل التي اعطتها وقد تراوحت اقطار مناطق التحلل من 6 ملم الى 18 ملم (جدول1). شخصت العزلات المنتجة للمستحلب الحيوي حتى النوع باستعمال نظام Vitek2 ، وبعد التشخيص بهذا النظام بينت النتائج عند استعمال البطاقة

الخاصة بالانواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام ، تشخيص 11 عزلة من البكتريا المنتجة للمستحلب الحيوي والمعزولة من الحليب البقري الخام و اللبن الرائب تعود جميعها للنوع *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*.

تشير المناطق الشفافة المتكونة على اكار الدم الى انتاج المستحلب الحيوي من الاحياء المجهرية المنتجة له(21)وتتناسب منطقة التحلل تناسباً طردياً مع كمية المستحلب الحيوي المنتج من قبل البكتريا او الكائن المجهري(22)، اشارRodrigues وجماعته (23) الى انه على الرغم من ان بكتريا حامض اللاكتيك معروفة بعدم انتاجها للهيمولايسين الا ان لها القدرة على تلزين(Agglutination) خلايا الدم، وان قدرتها على تحلل الدم تعود الى انتاجها للمستحلب الحيوي الذي يتميز بقدرته على تحليل الدم.

جدول (2) : قابلية عزلات بكتريا *Leuconostoc spp* على تحليل الدم على وسط اكار الدم

رقم ورمز العزلة	قطر منطقة تحلل الدم(ملم)	رقم ورمز العزلة	قطر منطقة تحلل الدم(ملم)
LY1	-	LM8	-
LY2	-	LM9	-
LY3	-	LM10	-
LY4	18	LM11	-
LY5	13	LM12	-
LY6	10	LM13	7
LY7	7	LM14	8
LY8	-	LM15	-
LM1	6	LM16	-
LM2	13	LM17	-
LM3	-	LM18	11
LM4	-	LM19	12
LM5	-	LM20	-
LM6	10		
LM7	-		

- Y : مصدر العزل اللبن الرائب ، M : مصدر العزل الحليب الخام، -: غير محللة

أختبار الفعالية السطحية بطريقة انتشار الزيت

اختبرت الفعالية السطحية ل 11 عزلة منتجة للمستحلب الحيوي والتي اظهرت تحلل في اوساط اكار الدم بطريقة انتشار الزيت، وتعد هذه طريقة جيدة ومعتمدة للكشف الاولي عن انتاج المستحلب الحيوي من المايكروبات ، اذ تتميز بكونها طريقة سهلة وسريعة وتحتاج حجوم قليلة من النماذج ولاتحتاج الى معدات واجهزة(24). أظهرت العزلات المنتجة للمستحلب الحيوي فعالية سطحية عندما اعطت مناطق ازاحة للزيت واضحة وبأقطار متباينة تبعاً للعزلة، ويتبين من جدول(2) ان اقطار ازاحة الزيت قد تراوحت من 4- 7 ملم تبعاً للعزلة المختبرة . يتضح مما سبق ان العزلات قد اظهرت تبايناً في فعاليتها السطحية ، وهذا يمكن ان يعزى الى

الاختلاف في تركيز المستحلب الحيوي المنتج من قبل تلك العزلات ، اذ ان هنالك علاقة طردية بين تركيز المستحلب الحيوي المنتج واقطار مناطق ازاحة الزيت وتمثل تلك الاقطار معظم الفعالية السطحية للنموذج قيد الاختبار(25،26). ووفقاً لهذه النتائج فقد اختيرت العزلة(LY_4) *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* لفعاليتها السطحية العالية في انتشار الزيت واعتمدت في تجارب تحديد الظروف المثلى.

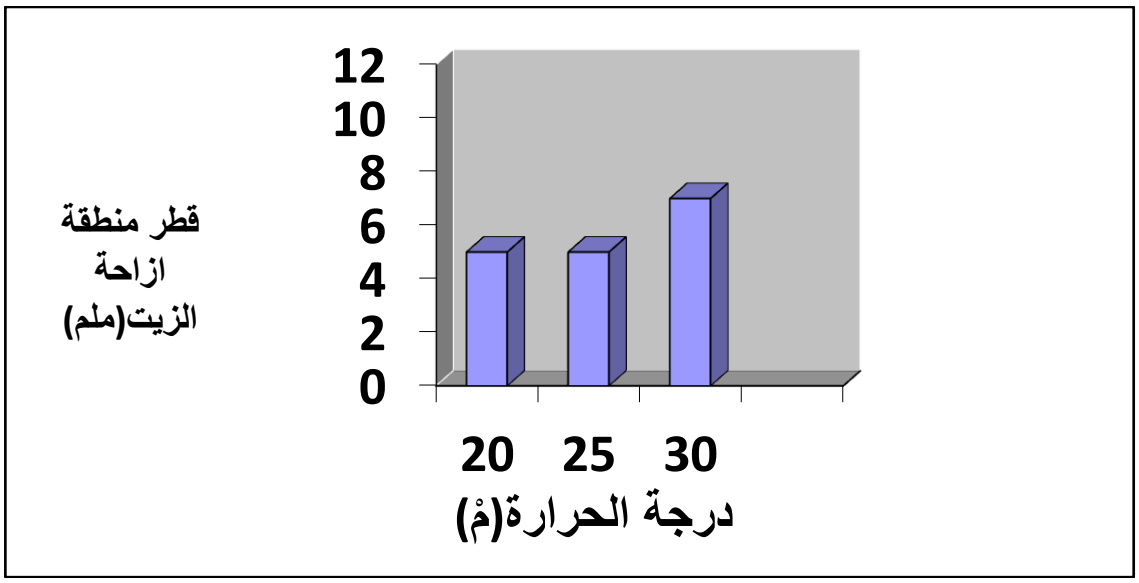
جدول (2) : اقطار مناطق ازاحة الزيت لعزلات بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* المنتجة للمستحلب الحيوي

رمز العزلة	مصدر العزل	قطر منطقة ازاحة الزيت(مليمتر)
LY4	لبن رائب	7
LY5		5
LY6		4
LY7		4
LM1	حليب خام	4
LM2		5
LM6		5
LM13		4
LM14		4
LM18		5
LM19		5

تحديد الظروف المثلى لانتاج المستحلب الحيوي

درجة الحرارة

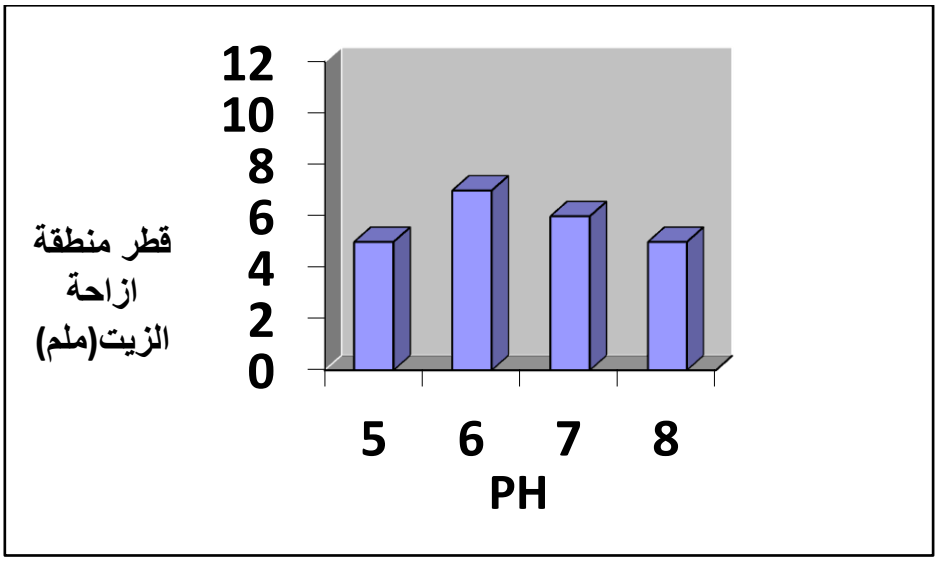
بينت النتائج ان درجات الحرارة 30مْ كانت المثلى لانتاج المستحلب الحيوي، عندما اعطت العزلة (LY_4) *Leuconostoc mesenteroides* ssp*cremoris* اعلى فعالية سطحية ، وبقطر ازاحة للزيت بلغت 7ملم . فيما بلغت 5 ملم في درجات الحرارة20 و 25 شكل (1). يمكن الاستنتاج من النتائج اعلاه ان درجة الحرارة المثلى للانتاج هي 30 م . تختلف درجة الحرارة الملائمة لانتاج المستحلب الحيوي تبعا للانواع البكتيرية المنتجة له ، وبهذا الخصوص اشار(27)الى ان درجة الحرارة 28 مْ كانت مناسبة لأنتاج المستحلب الحيوي من عزلات بكتريا *Lactobacillus spp* قيد دراسته. في حين تنتج بكتريا*L.pentosus* المستحلب الحيوي بدرجة حرارة31 مْ، فيما تنتجه الانواع الاخرى التي تعود لبكتريا *Lactobacillus* بدرجة حرارة37 م (28) لاحظ Abushady وجماعته(29) ان ارتفاع او انخفاض درجة الحرارة عن30 مْ قد ادى الى خفض انتاج المستحلب الحيوي من بكتريا *B.subtilis*.



شكل (1): الفعالية السطحية لراشح بكتريا (LY_4) *Leuconostoc mesenteroides* ssp*cremoris* بدرجات حرارة مختلفة

الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي

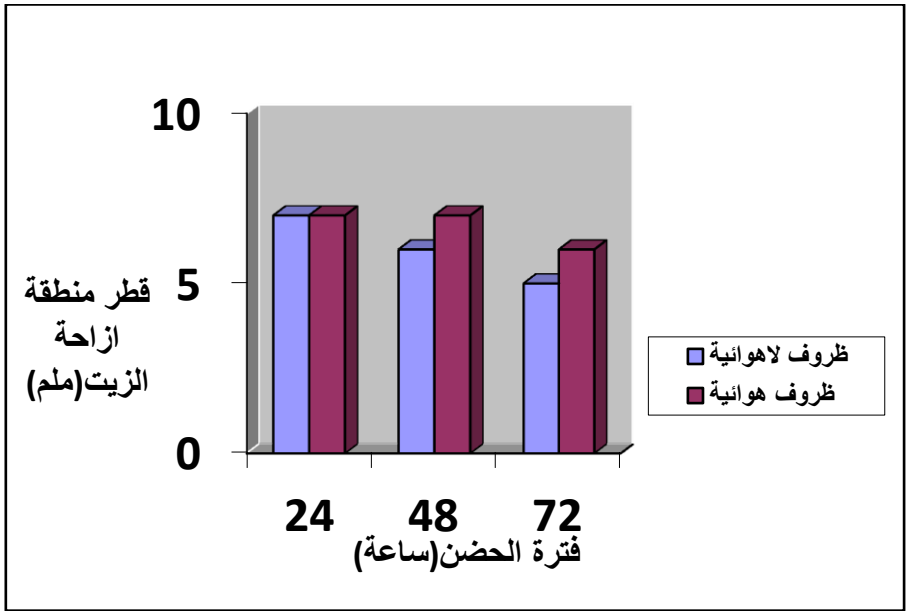
درس تأثير اربعة ارقام هيدروجينية شملت 5 و 6 و 7 و8 في انتاج المستحلب الحيوي ، بينت نتائج الفعالية السطحية ان اعلى قطر منطقة ازاحة للزيت بلغت 7ملم عند الرقم الهيدروجيني 6 فيما بلغت6 و5 ملم عند الرقمين الهيدروجيين 7و8 على التوالي وبلغ اقل قطر ازاحة 4ملم عند الرقم الهيدروجيني 5 (شكل 2) . لاحظ Khopade وجماعته (30) حدوث انخفاض في انتاجية المستحلب الحيوي عند رقم الهيدروجيني 5 وكذلك عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني اعلى من 7 ، ويكون افضل انتاج للمستحلب الحيوي باستعمال العزلات البكتيرية في الارقام الهيدروجينية المعتدلة (31) ، وامكن انتاج المستحلب الحيوي من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* لدى تنميتها في وسط الانتاج برقم هيدروجيني 6.2 (32).



شكل(2): الفعالية السطحية لراشح بكتريا (LY4) *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* بارقام هيدروجينية مختلفة

ظروف التهوية واوقات الحضن

بغية تحديد ظروف التهوية واوقات الحضن الملائمة لانتاج المستحلب الحيوي فقد نميت العزلة المنتخبة بوجود وعدم وجود الهواء وبأوقات حضن مختلفة شملت24 و48 و72 ساعة، وبعد الحصول على راشح الخلايا لكل وقت من اوقات الحضن وبظروف التهوية المختلفة تم تقدير الفعالية السطحية بطريقة انتشار الزيت. بينت النتائج ان الفعالية السطحية للعزلات قيد الدراسة قد بلغت 7ملم لدى التنمية بالظروف الهوائية واللاهوائية لفترة الحضن 24 ساعة ، وفي الوقت الذي اعطت فيه العزلة نفسها اقطار ازاحة للزيت بلغت6،7 ملم لوقت الحضن48 ساعة لدى التنمية تحت الظروف الهوائية واللاهوائية على التوالي فيما لوحظ انخفاض الفعالية السطحية لمدة الحضن 72 ساعة شكل(3).



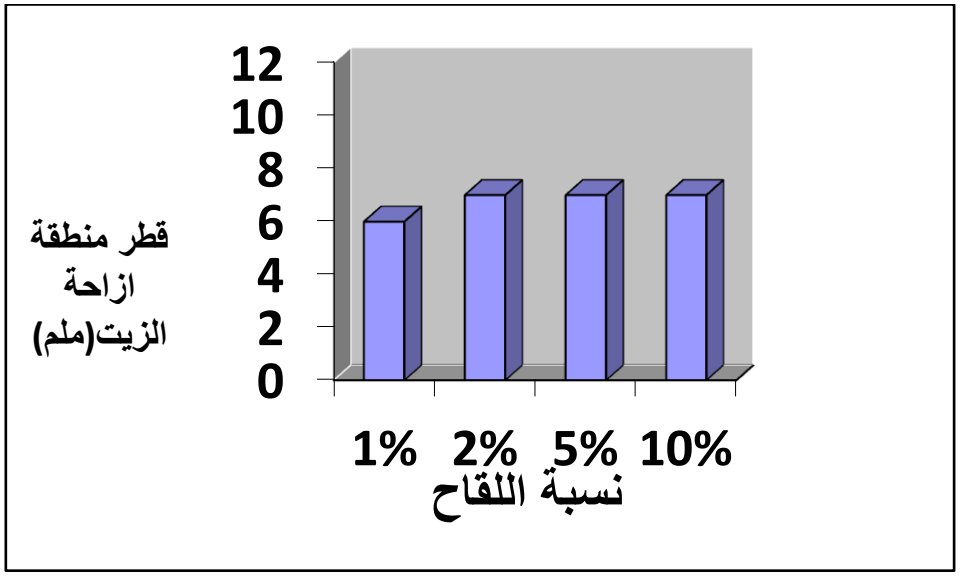
شكل 3 : الفعالية السطحية لراشح بكتريا (LY4) *Leuconostoc mesenteroides* sspcremoris بعد الحضن لفترات مختلفة وبظروف هوائية ولاهوائية

نستنتج من النتائج اعلاه ان التنمية تحت الظروف الهوائية و اللاهوائية ولوقت الحضن24 ساعة كانت مناسبة لأنتاج المستحلب الحيوي من قبل العزلة ، ان ظروف التهوية ووجود الاوكسجين يؤثر على انتاج المستحلب الحيوي من خلال تأثيره على الخلايا النامية (33). لاحظ Gudina وجماعته (32) قدرة بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* على انتاج المستحلب الحيوي تحت الظروف الهوائية.

لوحظ ان انتاج المستحلب الحيوي يبدأ منذ الساعات الاربع الاولى للتنمية ويستمر الى72 ساعة ولكن بأنتاجية أقل مع انخفاض الفعالية السطحية له في نهاية التنمية وتكون اعلى انتاجية له في طور السكون للخلايا (idiophase)(32،23). ويعزى سبب ذلك الانخفاض الى قدرة بكتريا حامض اللاكتيك الى انتاج كميات من حامض اللاكتيك خلال النمو مؤدياً الى خفض الرقم الهيدروجيني وبالتالي تثبيط انتاج المستحلب الحيوي (32)، وكذلك لوحظ ان زيادة مدة الحضن تؤدي الى انخفاض الانتاجية والفعالية للمستحلب الحيوي المنتج من الانواع البكتيرية الاخرى،اذ تعطي بكتريا*B.subtilis* افضل انتاجية له عند التنمية لمدة 24 ساعة (22). ولاحظ Raza وجماعته (34) ان فعالية الشد السطحي لراشح بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قد انخفضت بعد التنمية لمدة 3-4 ايام.

نسبة اللقاح

بغية تحديد نسبة اللقاح المثلى لانتاج المستحلب الحيوي تم تنمية العزلة(LY_4) *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*(10^8 خلية / مل)بنسب لقاح مختلفة شملت 1 و2 و5 و10 % كلا على انفراد. يوضح (شكل 4) ان اقطار مناطق ازاحة الزيت لنسب اللقاح 2 و5 و10 % كانت متشابهة عندما بلغت اقطار الازاحة 7 ملم لكل منها ، فيما بلغت 6 ملم لنسبة لقاح 1%، وهذا اشارة الى عدم وجود تأثير لزيادة نسبة اللقاح عن 2% على انتاج المستحلب الحيوي ووفقا لذلك فقد تم اختيار نسبة اللقاح 2% النسبة المثلى لانتاج المستحلب الحيوي. امكن انتاج المستحلب الحيوي من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* باستعمال لقاح 1% من قبل Gudina وجماعته(32) دون التطرق في دراستهم الى تاثير نسب لقاح مختلفة على الانتاج ، وقد لاحظ Ray (31) ان زيادة نسبة لقاح بكتريا Bacillus sp لا يؤدي الى زيادة المستحلب الحيوي الناتج منها . كما لوحظ ان كمية rhamnolipid الناتجة من *Pseudomonas aeruginosa* لا تزداد بزيادة كمية اللقاح(35).



شكل (4) : الفعالية السطحية لراشح بكتريا (LY4) *Leuconostoc mesenteroides* ssp*cremoris*بنسب لقاحمختلفة

يمكن الاستنتاج من نتائج الدراسة الحالية امتلاك عزلات بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*المحلية المعزولة من الحليب الخام واللبن الرائب القدرة على انتاج المستحلب الحيوي ، مع امتلاك المستحلب الحيوي المنتج منها فعالية سطحية جيدة ، وكانت التنمية لمدة 24 ساعة وتحت الظروف الهوائية واللاهوائية وبدرجة حرارة 30 مْ وبرقم هيدروجيني 6 وبنسبة لقاح 2% الاكثرملائمة لأنتاج المستحلب الحيوي .

المصادر

1- **Holzapfel , W.H. ;Bjorkroth and Dicks L.M.T .(2009).**Genus I Leuconostoc . In Bergeys Manual of systematic Bacteriology Vol .3, The Firmicutes , Eds . De Vos , P., Garrity , G.M., Jones ,D., Krieg, N.R., Ludwig ,W., Rainey , F.A., Schleifer , K.H. and Whitman ,W.B. ; pp . 624-635. Springer, New York.

2-**Chen ,K.H. ; Feeters R.F. and Fleming H.P.(1983).**Fermentation Characteristics of Heterolactic

Acid Bacteria in Green Bean Juice.Journal of Food Science. 48(3) : 962–96.

3- **Swenson, J .M. ;Facklam, R. R. andThornsberry** , **C .(1990).** Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant Leuconostoc, Pediococcus, and Lactobacillus species .Antimicrob Agents Chemother. 34(4): 543–549.

4- **سلمان،جيهان عبد الستار**.(2014). البكتريا في الأغذية. الطبعة الاولى. الذاكرة للنشر والتوزيع . العراق.بغداد .ص 23.

5-**Hemme, D., Foucaud-Scheunemann**, **C.,(2004)**. Leuconostoc, characteristics ,use in dairy technology and prospects in functional foods. InternationalDairy Journal 14, 467-494

6- **Sawa ,N.; Okamura, K.; Zendo, T.; Himeno ,K.; Nakayama, J. and Sonomoto, K**. **(2010)** Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by*Leuconostocpseudomesenteroides*QU 15. J ApplMicrobiol 109:282-291

7-**-Chang, J.Y. and Chang, H.C. (2010).** Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoccitreum*GJ7 as a starter. J Food Sci 75:M103-110.

8- **Sekhon, B. S**. **(2006).** Biosurfactants : An overview. Natl. Acad. Sci. Lett., 29(9-10)- 317-332.

9. **Xu, Q. ; Nakajima, M. ; Liu, Z. and Shiina, T. (2011).** Biosurfactants for microbubble preparation and application. Int. J. Mol. Sci., 12:462-475.

10- **Kalyani,R.; Bishwambhar,M. and Suneetha,V.(2011).** Recent usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena :Aperspective.International research journal of pharmacy., 2(8):11-15.

11- **Okoliegbe, I.N. and Agarry, O.O. (2012).** Application of microbial surfactant (a review).Scholarly. J. Biotechnol., 1(1) :15 -23.

12- **Rodrigues, L.R. ; Banat, I.M. ; Teixeira, J. and Oliveira, R**. **(2006).** Biosurfactants: potential applications in medicine. J AntimicrobChemother., 57:609–618.

13-**Sanchez, M. ;Aranda, F.J. ; Teruel, J.A. ; Espuny, M.J. ; Marqués, A. Manresa,A. and Ortiz, A. (2010).** Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Colloid Interface Sci., 341(2) : 240 –247.

14-**Gharaei-Fathabad, E. (2011).** Biosurfactants in pharmaceutical industry: A Mini-Review. American Journal of Drug Discovering and Development., 1: 58-69.

15- **Fatma , C . H. and Benmechernene , Z. (2013)** . Isolation and identification of Leuconostoc mesenteroides producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk .Afr .J .Microbiol. Res

16- **Garvie,E.I.(1986).**gram positive cocci. Genus Leuconostoc , in Bergeys Manual of Systematic Bacteriology Vol 2.Eds.P.H.Sneath,N.S.Mair and M.E.Sharpe,Williams-Wilkins,Baltimore.p.1071.

17- **Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A.; Van der Mei, H.C. and Oliveira, R.(2006)** . Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactococcuslactis. Colloids and Surfaces B, 49 (1): 79–86.

18- **Jaysree , R.C. ; Basu ,S. ; Singh , P.P. ; ghisal , T. ; Patra ,P.A. ; Keerthi , Y. and Rajendran , N. (2011).** Isolation of biosurfactant producing bacteria from environment sample .pharmacology online . 3: 1427-1433 .

19- **Fracchia , L. ; Cavallo , M. ; Allegrone , G. and Martinotti , M.G**. **(2010).** A lactobacillus – derived biosurfactant inhibition biofilm formation of human pathogenic candida albicans biofilm producers . current research , Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Mendez – Vilas (ED) . FORMA TEX, pp . 827-837.

20- **Carrillo ,P. ; Mardaraz , C. ; Pitta –Alvarez , S. and Giulietti , A. (1996).** Isolation and Selection of biosurfactant producing bacteria . World J. Microb.Biot. , 12 : 82-84.

21-**Anandaraj, B. and Thivakaran, P**.(2010). Isolation and Production ofBiosurfactant producing organism from oil spilled soil. J. Biosci .Tech., 1(3) 120-126.

22- **Ghribi,D. ; Abdelkefi-Mesrati,L. ; Mnif,I. ; Kammoun ,R. ; Ayadi,I. ; Saadaoui,I. ; Maktouf,S. and Chaabouni-Ellouze ,S .(2012).** Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation. Journal of Biomedicine and Biotechnology., : 12 .

23-**Rodrigues ,L. ; Moldes,A. ; Teixeira,J. and Oliveira,R**. **(2006).** Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains.Biochemical Engineering Journal., 28 :109–116.

24- **Techaoei,S. ; Leelapornpisid,P. ; Santiarwarn,D. and Lumyong,S**. **(2007).** Preliminary screening of biosurfactant producing microorganisms isolated from hot spring and garages in northenThaikand. KMITL Sci. Tech. J., 7(S1) : 38-43.

25- **Rodrigues,L.R. ; Teixeira, J.A. ; Van der Mei, H.C. and Oliveira, R. (2006).** Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcuslactis* 53. Colloids and Surfaces B :Biointerfaces., 49 : 78-85.

26- **Brzozowski,B. ; Bednarski ,W. and Gol´ek ,P.(2011).**The Adhesive Capability of Two *Lactobacillus* Strains and Physicochemical Properties of Their Synthesized Biosurfactants. Food Technol.Biotechnol., 49 (2): 177–186 .

27-**Fracchia,L. ; Cavallo,M. ; Allegrone,G. and Martinotti,M.G. (2010).** A *Lactobacillus* – derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans*biofilm producers. Current Research , Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Mendez – Vilas(Ed.).FORMA TEX,PP .827-837.

28-**Gudina,E.J. ; Rocha,V. ; Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R**. **(2010).** Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*A20. Letters in Applied Microbiology., 50 : 419–424.

29-**Abushady,H.M. ; Bashandy,A.S. ; Aziz,N.H. and Ibrahim,H.M.M**. **(2005).** Molecular Characterization of *Bacillus subtilis*Surfactin Producing strain and the Factors Affecting its Production. International Journal of Agriculture and Biology., 7(3) : 337-344.

30-**Khopade ,A. ; Ren ,B. and Liu ,X.Y.(2012).**Production and characterization of biosurfactant

from marine Streptomyces species B3.Journal of Colloid and Interface Science : 311–318.

31- **Ray ,S.(2012).**Producttion of biosurfactant using an isolated bacterial strain of *Bacillus sp*(m28) . J. Microbiol. Biotech. Res. 2 (3):402-415.

32-**Gudina,E.J. ; Teixeira,J.A. and Rodrigeus,L.R.(2011).** Biosurfactant- Producing Lactobacilli : Screening , Production Profiles, and Effect of Medium Composition. Applied and Enviromental Soil Science, 2011 : 9.

33-**Ghribi,D. and Ellouze-ChaabouniS.(2011).**Enhancement of *Bacillus subtilis* LipopeptideBiosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. Biotechnol. Res.Int., 2011: 1-6 .

34-**Raza,Z.A. ; Khan,M.S. ; Khalid,Z.M . and Rehman,A. (2006).** Production of Biosurfactant Using Different Hydrocarbons by *Pseudomonasaeroginosa* EBN-8 Mutant.Verlag der Zeitschrift fur Naturforsch.,61c : 87-94.

35- **Asif, S.; Habib, H.; Abbsai, M. H.; Akhtar, R. M. ; Waqas, M. ; Rana M.; Zafar, S.andAwais H.(2013).**Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* Strains on 1ml of Inoculum Size. Pakistan Journal of Medical and Health Sciences.,7(2):421-423.