دراسة بعض العوامل والمضافات الغذائية المؤثرة في نمو العزلة المحلية لبكتريا *Bifidobacterium* (2)

بهاء نظام عيسى الموسوي* عامر خلف عزيز الدروش**

الملخص

أظهرت الدراسة الحالية على بكتريا ***Bifidobacterium*** أن اطالة مدة حضنها لمدة **72** ساعة في الحليب الملقح بها اعطت تأثيراً ايجابياً في نمو بكتريا العزلة المحلية (2) ***Bif.*** وزيادة الحموضة التي تنتجها إذ بلغت الحموضة التسحيحية **1.05** %، بينما لم تؤثر في نمو البكتريا القياسية ***Bif. longum*** **BB53** وبقيت الحموضة التسحيحية **0.66** % عند الحضن للمدة نفسها، بالوقت الذي ازدادت الحموضة التسحيحية المنتجة في الحليب عند استخدام خليط من كلا نوعي البكتريا.

وأظهرت عملية النقل اليومي (**Subculturing**) لغرض تنشيط هذه البكتريا تأثيرا متغايرا فكان سلبيا في الحليب الفرز الطازج إذ فقدت كل من البكتريا القياسية وبكتريا العزلة المحلية نشاطيهما عند النقلة الثانية و النقلة الثالثة لكل منهما على التوالي. في حين كان تأثيرها أيجابيا ومشجعاً عند أجرائها بالوسط الزرعي السائل **MRS-C** إذ ازدادت الحموضة التسحيحية من **0.90** و**0.95** بالنقلة الأولى إلى **1.28** و**1.50**% بالنقلة الرابعة لكلا نوعي البكتريا على التوالي.

كما شجع استخدام بعض المضافات الغذائية كخلاصة الخميرة وخلاصة اللحم على نمو هذه البكتريا في الحليب الفرز الطازج في حين لم تؤثر إضافة الحليب المجفف في البروتين، فازدادت قدرتها على إنتاج الحامض وخفض مدة تخثير الحليب الى **18** ساعة مقارنة بأوقات الحضن التي تراوحت بين **24** و**40** ساعة عند حضنها بالحليب على درجة حرارة **37**م بدون الإضافة.

المقدمة

أشارت مصادر عديدة الى الفوائد العلاجية الكثيرة لبكتريا ***Bifidobacterium*** لتحسين صحة الإنسان ونتيجة لذلك تم استخدامها في منتوجات ألبان مختلفة لأستطاعتها المساهمة في تحسين القيمة الغذائية نتيجة لعملية التخمر وزيادة قابلية هضم المنتج عند استهلاكه مع توافر بعض الفيتامينات والإنزيمات التي تنتجها بكتريا البادئ المستخدم عند وصولها للمستهلك بشكل حي (**Viable**) خلال المنتوجات الحاوية عليها. وفي ضوئه ازداد وبشكل كبير إنتاج المتخمرات اللبنية بفعل ***Bifidobacterium*** لا سيما بعد أن تم التعرف على فوائدها العلاجية للإنسان جيدا (**6**).

وتتصف بكتريا هذا الجنس بأنها موجبة لصبغة كرام ولا هوائية وغير متحركة ولا تكون أبواغاً وغير منتجة لغاز ثنائي أوكسيد الكربون وغير مسيلة للجيلاتين وغير مرضية وسالبة لفحص ألاندول، ومخثرة للحليب لأنتاجها كلا من حامضي اللاكتيك والخليك (بشكل ضعيف). وعند نموها على سطح الوسط الزرعي الصلب المحوّر **MRS** تكوّن مستعمرات بيضاء براقة مصفرة قليلا (كريمية اللون)، محدبة الشكل، ناعمة الملمس، ذات حافات كاملة وبقطر يتراوح بين **2-1** مليمتر (**13**، **16**).

تحتاج بكتريا ***Bifidobacterium*** الى متطلبات غذائية معقدة **Fastidious** وعوامل مشجعة لغرض النمو، فهي

جزء من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

* مركز بحوث السوق و حماية المستهلك – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

** كلية الزراعة – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

لا تنمو في لأوساط الزرعية البسيطة ما لم تدعم بالحامض الأميني Cysteine أو Cystine حصرا (الذين لا يمكن استبدالهما حتى بالمركبات القريبة مثل Methonine أو Homocystine) وتحتاج إلى بعض فيتامينات مجموعة B مثل Biotin و Calcium pantothenate، لوحظ أن إضافة حليب الام للأوساط الزرعية الصناعية قد شجع على نمو *Lb. bifidus* مقارنة بأضافة الحليب البقري وأعزي ذلك لامتلاكه عامل نمو Bifidus factor هو N-acetyl-D-glucoseamine مرتبطا بسكريات تحتاجه هذه البكتريا في تخليق جدارها الخلوي (11).

ونتيجة لضعف بكتريا *Bifidobacterium* بأنتاج الحامض في الحليب مقارنة ببكتريا حامض اللاكتيك الأخرى الأمر الذي دفع الباحثين لأيجاد مضافات أو وسائل تحسن من ظروف التنمية لتزيد انتاج الحامض وهو الهدف الضروري في مجال صناعة الألبان فضلا عن الفوائد العلاجية للبكتريا، وأظهرت دراسة لاحقة إمكانية هذه البكتريا على النمو في الحليب البقري المهضوم بنسبة 20% بوساطة الببسين إذ ازدادت أعداد بكتريا *Lb. bifidus* وإنتاجها للحامض مقارنة بنموها في الحليب غير المهضوم (17). وجد Ibrahim and Bezkorovainy (5) إن التأثير المشجع لتدعيم الوسط الزرعي المسمى Bacto B12 بخلاصة الخميرة أو Lactalbumine أو *B*-Lactoglobulin على نمو بكتريا *Bif. longum* ATCC 15708 كان افضل مقارنة بخلاصة اللحم أو خلاصة الشعير مع فقدان ذلك التأثير عند اختزال أواصر الكبريت الثنائية لتلك العوامل المشجعة. ويعد زمن الجيل لبكتريا *Bifidobacterium* أطول كثيرا عن باقي بكتريا حامض اللاكتيك التقليدية كما لوحظ تباين زمن الجيل لنوعين من هذه البكتريا هما *Bif. bifidum* و *Bif. longum* في وسطي الحليب الفرز والحليب المركز بالترشيح الفائق بمستويات مختلفة حيث كان في الحليب الفرز 66.2 و 30.3 دقيقة وفي الحليب المركز بالترشيح الفائق بمعامل تركيز 2:1 كان 134.4 و 27.4 دقيقة للنوعين كليهما على التوالي (16). وتتركز الجهود العلمية حاليا لأنتقاء سلالات من هذه البكتريا تتصف بسرعة النمو وتحميض الحليب لغرض استخدامها على النطاق التجاري لكي تساهم في اختزال وقت التصنيع وبالتالي تلافي المشاكل التصنيعية الناجمة عن إطالة مدة الحضن مع تقليل كلف الإنتاج. لذا هدفت هذه الدراسة لمعرفة تأثير بعض المضافات الغذائية والعوامل البيئية في نمو عزلتين من بكتريا *Bifidobacterium*. المنماة في الحليب والوسط الزرعي MRS-C.

ويعد الوسط الزرعي السائل MRS-C من اكثر الأوساط الزرعية استخداما في تنمية بكتريا *Bifidobacterium* والمتفق عليه من قبل كثير من الباحثين (1،2،3) و أن درجة الحرارة 37م مثلى لنمو أنواع هذه البكتريا ذات الأصل البشري وهي مماثلة لدرجة حرارة جسم الإنسان المضيف الرئيس لها (13،14).

المواد وطرائق البحث

استخدمت عزلتين من بكتريا *Bifidobacterium* أحداهما عزلة محلية كمزرعة بكتيرية نقية في الوسط الزرعي MRS-C السائل رمزت (2)*Bif.* وهي معزولة من براز أطفال أصحاء برضاعة طبيعية تراوحت أعمارهم ما بين 10–60 يوماً، والأخرى بكتريا قياسية *Bifidobacterium longum* BB536 مصدرها بادىء نقي بهيئة استنباتات بكتيرية في حليب فرز مجمد بدرجة –45م بعلب كارتونية احتوت على 500 غم والمخصصة لإدخالها بعملية الإنتاج مباشرة من النوع (Pellet dip) تم الحصول عليها بالمراسلة مع مختبرات Wisby الألمانية.

أستخدم الحليب الفرز الطازج المجهز من قبل معمل ألبان قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية في كلية الزراعة–جامعة بغداد والحليب المجفف عالي البروتين (60%) من نوع LACTEPI 60L المجهز من شركة EPI Ingredients الفرنسية وكل من المضافات خلاصة الخميرة وخلاصة لحم من مختبرات Oxoid لدراسة تأثيرها كثلاث مضافات للحليب الفرز لكل منها على انفراد.

واستخدمت الأوساط الزرعية كوسط أغار MRS المحضر وفق ما ذكره Harrigan and McCance (4) وبعد ضبط رقم الهيدروجين الى 6.5 في عد بكتريا *Bifidobacterium* بعد تنميتها بظروف لا هوائية ووسط MRS-C السائل الذي استخدم في عملية تنشيط عزلات بكتريا *Bifidobacterium* طيلة مدة الدراسة والمحضر وفق ما ذكر Lankaputhra وجماعته (8) بإضافة 0.05 % وزن/ حجم من L-Cysteine-HCl إلى مكونات الوسط أغار MRS مستبعدا منه ألاغار، وقد عقمت الأوساط الزرعية بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة وبضغط 1.5 جو ثم الحفظ لحين الاستعمال.

احتسب زمن الجيل Generation Times على وفق ما ذكره Ventling and Mistry (16) بتحضير لقاح نشط من العزلة المحلية والبكتريا القياسية كل منهما على انفراد من خلال تنميتها على الوسط MRS-C السائل والحليب الفرز (المجفف المعاد تركيبه بنسبة 12 % مواد صلبة) لثلاث مرات متتالية، ولقحت أنابيب اختبار 10 مل لكل من الوسط الزرعي والحليب (الموضوعة في حمام مائي بدرجة حرارة 37م قبل عملية التلقيح لاكتساب هذه الدرجة عند التلقيح) بنسبة 5 % من لقاح البكتريا المنشط الحاوي 10^{10} وحدة تكوين مستعمرة / مل. ثم حضنت الأنابيب الملقحة في حمام مائي بدرجة حرارة 37م وسحب نموذج عند وقت الصفر وبعد 16 ساعة لحساب الأعداد الحية من البكتريا.
وتم قياس زمن الجيل بالدقيقة وهو مقلوب قيمة (K) عن طريق استخدام القانون آلاتي:

$$\text{زمن الجيل} = \frac{0.303 \times \text{الوقت الذي استغرقه العدد الأولي للوصول إلى العدد النهائي (دقيقة)}}{\text{لوغاريتم العدد النهائي} - \text{لوغاريتم العدد الأولي}}$$

زرعت خلايا البكتريا بطريقة صب الأطباق وذلك لتعيين العدد البكتيري الحي(العيوشية) Viable Cell Count بوضع 1 مل من التخفيف العشري المناسب في أطباق معقمة ثم صب عليها الوسط الزرعي بكميات متجانسة (15–20 مل) مع التحريك الأفقي لمختلف الجهات، تركت الأطباق لكي تتصلب وحضنت بعدها في درجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة بظروف لا هوائية وحسب عدد المستعمرات المتكونة بالأطباق التي يتراوح فيها عدد المستعمرات ما بين 30 –300 وحساب عدد البكتريا في المليلتر الواحد بضرب معدل المستعمرات لطبقين مضروبا بمقلوب التخفيف للحصول على العدد البكتيري الحي.كما قدرت الحموضة التسحيحية حسب الطريقة التي ذكرها Marth (9) و Medina and Jordano (10) وعبر عن الحموضة المنتجة بفعل بكتريا *Bifidobacterium* بالحموضة المتطورة Developed acidity والتي مثلت الفرق بين الحموضة التسحيحية النهائية والحموضة التسحيحية الابتدائية، وتم قياس رقم الهيدروجين للنماذج باستخدام جهاز pH-meter المجهز من شركة Beckman بدرجة حرارة 25م. وأجريت التجارب في حمام مائي لضمان توزيع درجة الحرارة المثلى بشكل متجانس وسريع للنماذج المحضونة فيه بدلا من استخدام الحاضنة واستخدم لقاح البكتريا مسبق التنشيط لثلاث مرات متتالية في كل من الوسطين بشكل منفرد وذلك لتلافي المرور بطور التطبع لتوافر الوسط ودرجة حرارة التنمية نفسها (12). كما أعتمدت نسبة تلقيح البادىء 5 % لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة لنقلة سابقة ومحفوظة بالثلاجة بدرجة حرارة 7م لمدة 24 ساعة، و2.5 % من كل عزلة في حالة البادئ الخليط.

النتائج والمناقشة

يلاحظ من جدول (1) أن نوعي البكتريا أظهرا نموا اقل في وسط الحليب الفرز المجفف والمعاد تركيبه بنسبة 12% مقارنة بالوسط الزرعي السائل MRS-C وتتفق هذه مع ما ذكره Collins and Hall (2) و Desjardins and Roy (3) إذ استغرق زمن الجيل لتكاثر بكتريا العزلة المحلية (2) *Bif* والبكتريا القياسية *Bif. longum*BB536 86

و**94.1** دقيقة على التوالي في وسط الحليب بينما بلغ **77.1** و**83.9** دقيقة في الوسط الزرعي السائل **MRS-C** على التوالي، أن نمو ***Bifidobacterium*** كان اسرع في الوسط الزرعي نتيجة لأنخفاض زمن الجيل على الرغم من زيادة الأعداد البكتيرية الملقحة فيه عند وقت الصفر لكلا نوعي البكتريا قيد البحث (بمعنى محدودية توافر العناصر المغذية في الوسط ضمن وحدة الحجم تبعا لزيادة الأعداد) مما يدل على احتوائه عوامل النمو المطلوبة لهذه البكتريا و جاهزيتها مقارنة بالحليب.

إن طول زمن الجيل لبكتريا ***Bifidobacterium*** مقارنة بأغلب بكتريا حامض اللاكتيك ناتج عن نموها البطيء في الحليب وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره **Collins and Hall** (2) و **Desjardins and Roy** (3) لطبيعة الاحتياجات الغذائية المعقدة لبكتريا ***Bifidobacterium*** وضعف نموها في الحليب.

كما يلاحظ أن بكتريا العزلة المحلية (2) ***Bif*** أبدت سرعة نمو افضل، فقد بلغ عدد أجيالها المتكاثرة خلال مدة حضن **16** ساعة **11.16** و**12.44**، بينما بلغ عدد أجيال البكتريا القياسية ***Bif. longum*** **BB536** **10.2** و**11.44** في كلا الوسطين (الحليب و**MRS-C** على التوالي)، ومن ذلك يمكن القول أن عدد أجيال العزلة المحلية كان اكثر بحوالي **9.41**و **8.74** % من البكتريا القياسية المستخدمة للمقارنة في الوسطين كليهما على التوالي وذلك قد يعود إلى اختلاف الأنواع. وعلى الرغم من تباين الأوساط التي استخدمت في التنمية، إلا انه يمكن تحديد مدى لزمن الجيل لكل من بكتريا العزلة المحلية والقياسية يقع ما بين **77–94** دقيقة وهي تقع ضمن المديات نفسها التي درسها **Ventling and Mistry** (16) على أنواع مختلفة من بكتريا ***Bifidobacterium*** على الرغم من تغاير الأوساط الزرعية المستخدمة.

يبين جدول (**2**) حدوث تطور في الحموضة التسحيحية بشكل تصاعدي عند زيادة مدة حضن كل من بكتريا العزلة المحلية والبكتريا القياسية وخليطهما على حد سواء في الوسطين المذكورين. لقد بلغت حموضة الحليب التسحيحية **0.82** و**0.66** و**0.86** % بعد مدة حضن **48** ساعة للأنواع المذكورة على التوالي وتقع هذه القيم ضمن المديات التي حصل عليها **Ventling and Mistry** (16) بدراستهما على سلالات ***Bif. bifidum***.بمقدار **5.5** و**1.8** و**16.5** % خلال مدد الحضن المذكورة أعلاه على التوالي مقارنة بالحموضة أظهرت بكتريا العزلة المحلية (2) ***Bif*** قابلية افضل لتطوير الحموضة التسحيحية سواء في الحليب أو الوسط الزرعي السائل **MRS-C** خلال مدد الحضن الثلاث، فقد ارتفعت الحموضة التسحيحية للحليب و للوسط الزرعي الناتجة بفعل البكتريا القياسية ***Bif. longum*** **BB536** بمقدار **5** و**24.2** و**59** %. بالرغم من أن نمو بكتريا ***Bifidobacterium*** في الحليب يعد ضعيفا عند مقارنته بالوسط الزرعي السائل **MRS-C** (**14**) ألا انه يمكن القول أن العزلة المحلية (2) **Bif.** قد أبدت قابلية نمو جيدة في وسط الحليب ويؤهل استخدامها في تصنيع منتجات لبنية علاجية فضلا عن البكتريا القياسية المعيارية.

يلاحظ أيضا أن عملية خلط نوعي البكتريا بنسب تلقيح متساوية قد حسنت كثيرا من قابليتهما للنمو في الحليب لا سيما بعد مدة حضن **48** ساعة إذ بلغ مقدار الزيادة في الحموضة التسحيحية **4.8** و **30** % بينما بلغ **62** و **157** % بعد **72** ساعة مقارنة بالحموضة التسحيحية للنوعين المذكورين كل منها على انفراد وعلى التوالي مما يدل على وجود علاقات تعايشية بين السلالات المختلفة لهذه البكتريا. وتتفق هذه النتائج مع ما اقترحه **Kask** وجماعته (7) من ازدياد سرعة نمو بكتريا ***Bifidobacterium*** عند استخدامها بشكل مزارع متعددة السلالات.

جدول 1: تأثير وسط التنمية في زمن الجيل لبكتريا العزلة المحلية (2) *Bif.* والبكتريا القياسية *Bif. longum*BB536 عند الحضن 16 ساعة في درجة حرارة 37م

وسط التنمية	بكتريا العزلة المحلية (2) *Bif.*							البكتريا القياسية *Bif. longum*BB536						
	الأعداد الحية cfu/ml في وقت الصفر	لوغاريتم cfu/ml	الأعداد الحية cfu/ml بعد انتهاء مدة الحضن	لوغاريتم cfu/ml	عدد الأجيال (n)	زمن الجيل (دقيقة)	قيمة k	الأعداد الحية cfu/ml في وقت الصفر	لوغاريتم cfu/ml	الأعداد الحية cfu/ml بعد انتهاء مدة الحضن	لوغاريتم cfu/ml	عدد الأجيال (n)	زمن الجيل (دقيقة)	قيمة k
الحليب الفرز المجفف معاد تركيبه بنسبة 12 %	$^{6}10X62$	7.7924	$^{10}10X15$	11.7611	11.16	86	0.0116	$^{5}10X47$	6.6721	$^{8}10X58$	9.7634	10.2	94.1	0.0106
الوسط الزرعي السائل MRS-C	$^{7}10X12$	8.0792	$^{10}10X71$	11.8513	12.44	77.1	0.0129	$^{6}10X75$	7.8751	$^{10}10X22$	11.3424	11.44	83.9	0.0119

النتائج معدل لثلاثة تجارب بمكررين

جدول 2: تأثير مدد الحضن في تطور الحموضة التسحيحية لبكتريا العزلة (2) *Bif.* والبكتريا القياسية *Bif. longum* BB536 ومزيجهما في الوسط الزرعي السائل MRS-C والحليب الفرز الطازج*

مدة الحضن (ساعة)	الحموضة التسحيحية (محسوبة % حامض لاكتيك)					
	الوسط الزرعي السائل MRS-C*			الحليب الفرز الطازج**		
	بكتريا Bif. (2)	البكتريا القياسية	خليط من نوعي البكتريا	بكتريا Bif. (2)	البكتريا القياسية	خليط من نوعي البكتريا
24	0.95	0.90	0.95	0.62	0.59	0.61
48	1.10	1.08	1.11	0.82	0.66	0.86
72	1.34	1.15	1.34	1.05	0.66	1.7

بلغت الحموضة التسحيحية الابتدائية لكل من* 0.30 % و** 0.14 % .و النتائج معدل ثلاث تجارب بمكررين.

كما أجريت الدراسة لمعرفة تأثير عدد النقلات Subculturing في نشاط بكتريا العزلة المحلية (2)*Bif.* والبكتريا القياسية BB536 *Bif. longum* وانتاجهما للحامض في الحليب والوسط الزرعي السائلMRS-C، ويلاحظ من جدول (3) التأثير السلبي للنقل اليومي لكل من بكتريا العزلة المحلية والبكتريا القياسية وخليطهما في الحليب إذ انخفضت الحموضة التسحيحية بشكل كبير عند النقلة الثانية من 0.62 % إلى 0.32 % ومن 0.59 % إلى 0.28 % لنوعي البكتريا على التوالي، بينما انخفضت الحموضة التسحيحية عند النقلة الثالثة لتصل إلى 0.35 % في حالة البادئ الخليط من النوعين.

إن سبب فقدان البكتريا قدرتها على إنتاج الحامض في الحليب نتيجة المناقلة السريعة قد يعود إلى حدوث طفرات جينية أدت إلى تغيير قابليتها الايضية في مسار تمثيل الكربوهيدرات وبالتالي ضعف حيوية ونشاط تلك الخلايا في وسط الحليب، وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Desjardins and Roy (3) بتوقف إنتاج الحامض نهائيا عند إجراء النقلة الثالثة لأربعة أنواع من بكتريا *Bifidobacterium* في الحليب المعاد تركيبه بنسبة 10 و 12 % على حد سواء. بينما كانت الحالة على العكس تماما في الوسط الزرعي السائل MRS-C إذ أدت عملية النقل اليومي لمزارع البكتريا المفردة و المختلطة إلى زيادة مستمرة في نشاط الخلايا البكتيرية خلال النقلات الأربع بما انعكس إيجابيا على كمية الحموضة التسحيحية.

جدول 3: تأثير النقل اليومي في تطور الحموضة التسحيحية لبكتريا العزلة(2) *Bif.* والبكتريا القياسية *Bif. longum* BB536 ومزيجهما في الوسط الزرعي السائل MRS-C والحليب الفرز الطازج*

عدد النقلات	الحموضة التسحيحية (محسوبة % حامض لاكتيك)					
	الوسط الزرعي السائل MRS-C			الوسط الزرعي السائل MRS-C		
	بكتريا *Bif.* (2)	البكتريا القياسية	خليط من نوعي البكتريا	بكتريا *Bif.* (2)	البكتريا القياسية	خليط من نوعي البكتريا
الأولى	0.95	0.90	0.95	0.62	0.59	0.61
الثانية	1.25	0.90	1.20	0.32	0.28	0.65
الثالثة	1.37	0.98	1.36	0.30	0.17	0.35
الرابعة	1.50	1.28	1.43	0.32	0.15	0.30

النتائج معدل ثلاث تجارب بمكررين.

أجريت دراسة تأثير ثلاثة مضافات للحليب الفرز الطازج وهي خلاصة الخميرة وخلاصة اللحم والحليب المجفف العالي البروتين بنسبة 0.5 % (وزن\حجم) لكل منهم على انفراد، وهي النسبة نفسها التي استخدمها Stiles وجماعته (15) بدراستهم نمو بعض سلالات بكتريا Lactobacilli في الحليب المدعم بخلاصة الخميرة واللحم، وذلك لمعرفة قابلية كل من بكتريا العزلة المحلية (2) *Bif* والبكتريا القياسية *Bif. longum* BB536 على إنتاج الحامض وخفض رقم الهيدروجين ومدة تخثر الحليب.

يلاحظ من جدول (4) أن تدعيم الحليب الفرز الطازج بخلاصة الخميرة او خلاصة اللحم قد أدى إلى سرعة نمو نوعي البكتريا وإلى زيادة متباينة في إنتاج الحامض وخفض رقم الهيدروجين و تخثر الحليب بعد مدة حضن 18 ساعة على درجة حرارة 37م. فقد ازدادت الحموضة التسحيحية للحليب عند إضافة خلاصة الخميرة بفعل بكتريا (2) *Bif* من 0.37 إلى 0.82 % وبنسبة زيادة بلغت 121.6 % وانخفض رقم الهيدروجين من 5.6 إلى 4.64 ، فيما ازدادت الحموضة التسحيحية بفعل البكتريا القياسية *Bif. longum* BB536 من 0.30 إلى 0.80 % وبنسبة زيادة بلغت 166.6 % وانخفض رقم الهيدروجين من 5.65 إلى 4.61 في الحليب الفرز الطازج قبل الإضافة.

كما ازدادت الحموضة التسحيحية للحليب المدعم بخلاصة اللحم بفعل نمو نوعي البكتريا وانخفضت قيم رقم الهيدروجين بمستوى متقارب جدا مع تلك الزيادة الحاصلة بسرعة النمو عند إضافة خلاصة الخميرة، وقد حدث تخثر جيد لنماذج الحليب المدعم سواء بخلاصة الخميرة او خلاصة اللحم بعد مدة 18 ساعة من نمو نوعي البكتريا.

لقد كان تأثير إضافة الحليب المجفف العالي البروتين بسيطا على نمو الأنواع البكتيرية في الحليب فقد ازدادت الحموضة التسحيحية بفعل بكتريا (2) *Bif* من 0.37 إلى 0.42 % وبنسبة زيادة بلغت 13.5 % وانخفض رقم الهيدروجين من 5.6 إلى 5.5 فيما ازدادت الحموضة التسحيحية بفعل البكتريا القياسية *Bif. longum* BB536 من 0.30 إلى 0.38 % و بنسبة زيادة بلغت 26.6 % وانخفض رقم الهيدروجين من 5.65 إلى 5.58 كما وأبدت قابلية جيدة في تخثر الحليب الفرز الطازج مع او بدون المضافات بعد 18 ساعة من الحضن.لم يحدث تخثر للحليب الفرز الطازج او المدعم بالحليب المجفف العالي البروتين على حد سواء بفعل نمو كل من بكتريا العزلة المحلية (2) *Bif* والبكتريا القياسية *Bif. longum* BB536 بعد 18 ساعة من الحضن فلقد تم إطالة مدة الحضن لها ولحين حصول التخثر.

يستدل مما تقدم تفوق العزلة المحلية (2) *Bif* المستحصل عليها في الدراسة الحالية على البكتريا القياسية *Bif. longum* BB53 في قابلية نموها بالحليب ولقد قلل النقل اليومي المستمر لمزارع هذه البكتريا في الحليب قابليتها على إنتاج الحامض بينما شجع نموها في الوسط الزرعي السائل MRS-C،وأظهرت المضافات (خلاصة اللحم وخلاصة الخميرة) تأثيراً مشجعاً لنمو نوعي البكتريا في الحليب، كما أظهرت البكتريا وجود علاقات تعايشية بينها عند نموها المشترك بالحليب بشكل.

جدول 4: تأثير تدعيم الحليب الفرز بالمضافات على الحموضة التسحيحية و رقم الهيدروجين و حالة التخثر بفعل بكتريا *Bifidobacterium* عند الحضن لمدة 18 ساعة على درجة حرارة 37م وبنسبة لقاح 5 % (حجم\حجم)

نوع البكتريا	حليب فرز طازج			حليب فرز طازج + 0.5 % (V/W) خلاصة خميرة			حليب فرز طازج + 0.5 % (V/W) خلاصة لحم			حليب فرز طازج + 0.5 % (V/W) حليب مجفف عالي البروتين		
	الحموضة التسحيحية	رقم الهيدروجين	حالة التخثر	الحموضة التسحيحية	رقم الهيدروجين	حالة التخثر	الحموضة التسحيحية	رقم الهيدروجين	حالة التخثر	الحموضة التسحيحية	رقم الهيدروجين	حالة التخثر
	0.14	6.70		0.18	6.46		0.16	6.46		0.15	6.52	
بكتريا ***Bif.* (2)**	0.37	5.60	0	0.82	4.64	+++	0.83	4.72	+++	0.42	5.50	0
البكتريا القياسية	0.30	5.65	0	0.81	4.61	+++	0.80	4.72	+++	0.38	5.58	0

0 عدم حصول تخثر للحليب و +++ حصول تخثر جيد و متجانس للحليب

المصادر

1- **Chevalier, P.; D. Roy and P. Ward (1990). Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. J. Appl. Bacteriol., 68: 619-624.**

2- **Collins, E. B. and B. J. Hall (1984). Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* adjunct. J. Dairy Sci. 67: 1376-1380.**

3- **Desjardins, M. and D. Roy (1990). Growth of Bifidobacteria and their enzyme profiles. J. Dairy Sci., 73: 299-307.**

4- **Harrigan, W. F. and M. E. McCance (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press , London.**

5- **Ibrahim, S. A. and A. Bezkorovainy (1994). Growth promoting factors for *Bifidobacterium longum*. J. Food Sci., 59(1): 189-191.**

6- **Jiang, T.; A. Mustapha and D. A. Savaiano (1996). Improvement of lactose digestion in humams by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacteriun longum*.J. Dairy Sci., 79: 750-757.**

7- **Kask, S.; K Adamberg; T. M. Lath and T. Paalme (1999). Use of probiotic mixed cultures in dairy products. (Personal Communication).**

8- **Lankaputhra, W. E. V.; N. P. Shah and M. L. Britz (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. Food Australia, 48(3): 113-118**

9- **Marth, E. H. (1978). Standard methods for the examination of dairy products. Interdisciplinary books and periodicals for the professional and the layman.**

10- **Medina, L. M. and R. Jordano (1995). Population dynamics of constitutive microbiota in BAT type fermented milk products. J. Food Protect., 58(1): 70-76.**

11- **Poupard, J. A.; I. Husain and F. R. Norris (1973). Biology of the Bifidobacteria. Bacteriological Reviews, 37(2): 136-165.**

12- **Robinson, R. K. (1990). Dairy Microbiology Vol. 2. The microbiology of milk product. Elsevier Applied Sci. London & New York, USA.**

13- **Scardovi, V. (1986). Genus *Bifidobacterium* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2,ed.**

14- **Shah, N. P. (1997). Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products. Milchwissenschaft. , 52(1): 16-21.**

15- **Stiles, JM.; Plockova; V. Toth and J. Chumchalova (2000). Antifungal activity of *Latobacillus* sp. tested in complex Media and milk. (Personal Communication).**

16- **Ventling, B. L. and V. V. Mistry (1993). Growth characteristics of Bifidobacteria in ultrafiltered milk. J. Dairy Sci., 76 : 962-971.**

17- Ziajka, S.; J. Kiska and D. Roskosz (1974). Growth of *Lactobacillus bifidus* cultures in cow,s milk (Abs).In: Dairy Sci. Abstr., 36 (10) : 464.

STUDYING SOME OF THE FACTORS AND FOOD ADDITIVES AFFECTING THE ACTIVITY OF *Bifidobacterium*. (2) ISOLATE

B. N. E. Al-Mosawi* **A. K. A. Al-Darwash****

ABSTRACT

This study was aimed to enhance the growth of the weak growth character of *Bifidobacterium* bacteria in milk. It has been found that generation time for the local isolate 86 and 77.1 minute, for standard bacteria 94.1 and 83.9 in milk and MRS-C broth media, respectively. Such results proved that *Bif.* (2) was able to grow better than *Bif. longum* BB536.

***Bifidobacterium* is characterized by weak growth in milk, therefore the following trials have been conducted to improve bacterial growth in milk:**

The Prolong incubation period of *Bif.* (2) in milk to 72 hours improved acid production, when titratable acidity reached 1.05 %, after being 0.66 % for the standard bacteria. Mixture of both bacteria resulted in higher titratable acidity compared to use separate bacteria. This indicates that there may be is a synergistic effect is existed

Daily subculturing of the isolates in milk lowered the activity of standard bacteria in the second transfer. While for the locally isolate, this activity was lost in the third transfer. In MRS-C, the activity was so high for both bacteria, as titratable acidity were increased from 0.90 and 0.95 % in the first transfer to 1.28 and 1.50 % and in the fourth transfer for the two bacteria, respectively.

Adding certain additives (meat extract and yeast extract) to the fresh skim milk supports the growth of both kinds of bacteria where high protein milk powder had no effect. Milk clotting time was reduced to 18 hours instead of 24 to 40 hours at 37 ^{0}C without supplementation.

Part of PhD. Thesis of the first author.

* **Market Research and Consumer Protection Center, Baghdad, Iraq.**

** **College of Agric., -Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.**