المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (7) العدد (1)
لسنة 2015

عزل وتشخيص بكتريا Bacillus stearothermophilus ودراسة التأثير التثبيطي لمستخلص مخلفات العنب المعصور في نموها.

نضال محمد صالح اشراق منير محمد اكرم ثابت الراوي بيداء حاتم
قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة – جامعة بغداد

تأريخ استلام البحث: 2014/9/17 تأريخ قبول النشر: 2015/2/1

المستخلص

هدفت الدراسة الى معرفة التأثير التثبيطي لمستخلص مخلفات العنب المعصورفي تثبيط نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus مع استعمال ثلاث درجات حرارية 40 و60 و80 مْ من اجل تقليل الوقت الذي يتعرض له الغذاء حراريا للحفاظ على نوعية الغذاء. تضمنت الدراسة محورين المحور الاول: عزل وتشخيص بكتريا Bacillus stearothermophilus من التربة، اذ تم جمع خمس عينات من تربة كلية الزراعة/ جامعة بغداد. زرعت العينات على الوسط المغذي الصلب Nutreint Agar واجريت الفحوصات المجهرية والزرعية وعدد من الفحوصات الكيموحيوية، ونميت العزلات بدرجة 55م^0 فضلاً عن استعمال 65مْ للتفريق بين بكتريا Bacillus stearothermophilus و Bacillus coagulans اذ ان الاخيرة لاتنمو بهذه الدرجة، وامكن عزل وتشخيص عزلة تعود لبكتريا B. stearothermophilus عصوية مكونة للسبور وموجبة لصبغة كرام ومتحركة وبأبعاد 0.71– 3 ميكروميتر. المحور الثاني: دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص مخلفات العنب المعصور مختبرياً (In vitro) ضد البكتريا المعزولة، تم التطبيق باستعمال الدرجات الحرارية الثلاث المذكورة اعلاه للاوقات 0 و10 و30 و40 و50 دقيقة مع وجود المستخلص بتركيز 500 جزء بالمليون ، لوحظ ان عدد الخلايا بلغ 4×10^{2}cfu لمعاملة السيطرة عند الدرجة 40 مْ بعد خمسين دقيقة في حين انخفض عدد

الخلايا بوجود المستخلص اذ بلغ العدد الابتدائي 2.88× $cfu10^2$. ولوحظ الانخفاض في عدد الخلايا مع تقدم الوقت للدرجات الحرارية الثلاث المختبرة. وتبين ان اكثر انخفاض حصل في عدد الخلايا عند 60مْ دون الدرجتين الحرارية المختبرة، اذ بلغ 4× 10 cfu لمعاملة المستخلص و3 × $cfu10^2$ لمعاملة السيطرة عند الوقت 50 دقيقة. اما عند 80 مْ فكانت القراءات لعدد الخلايا اعلى بقليل مما لوحظ عند 60مْ، بلغ عدد الخلايا 5× cfu10 لمعاملة المستخلص و 2.1× $cfu10^2$ لمعاملة السيطرة عند نهايه التجربة.

الكلمات المفتاحية: Bacillus stearothermophilus، التأثير التثبيطي، مخلفات العنب المعصور.

المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك
المجلد (7) العدد (1)
لسنة 2015

Isolation and identification of *Bacillus stearothermophilus* and study the inhibition effect of squeezed grape waste extract on it.

Nidhal M. Salih **Ashraq. M. Mohamed** **Akram.Th. Alrawi** **Bidaa .Hatem**

Department of Food Sciences and Biotechnology
College of Agriculture- University of Baghdad

Abstract

The aim of this study was to know the inhibition activity of squeezed grape waste extract on *Bacillus stearpthermophilus* by using three different tempretures degree 40, 60 and 80c, in order to reduce the time exposure of food for preservation. This study include two branchs: First: isolation and identification of *Bacillus stearothermophilus* from soil, 5 sample were collected from the soil of the college agriculture/Baghdad university. Samples were cultured on nutrient agar, microscopic and culturing tests were conducted and many biochemical tests were done. The isolates were cultivated at 55 c and 65 c for differentiate it from *Bacillus coagulans* which is can't grow at 65 c^o. The choosed isolate was identified as *B. stearothermophilus* which is bacilli, spore forming, g+ve ,motile and with 0.71-3 µm diameter. Second studying the inhibition activity of squeezed grape waste extract against isolated bacteria *(in vitro*) by using different temp mentioned above at differenttimes(0, 10, 30, 40 and 50) min with 500 ppm conc. Of the extract. The number of cells at 40 c for control were 4 x 10^2 cfu after 50 min, the number was decreased to 2.88 x 10^2 cfu with the extract. This decreasion was increased as the time progress for three temp. The best decreasing was 4 x 10 cfu at 60 c with extract and 3 x 10^2 cfu for control after 50 min. At 80 c^o it was higher a little bit at 60 c, it was 5 x 10^1 cfu with grape waste extract and 2.1 x 10^2 cfu for control.

Keywords: *Bacillus stearothermophilus*, inhibition effect of squeezed grape waste extract.

المقدمة

بكتريا Bacillus stearothermophilus او Geobacillusstearothermophilus وصفت لاول مرة عام 1920 بالاسم الاول ثم اعيد تصنيفها عام 2001 بأنها احد افراد جنس Geobacillus (16؛ 17). وهي عصيات موجبة لصبغة كرام نوع Thermophile توجد بشكل واسع في التربة والينابيع الحارة ورواسب المحيطات(11). متحركة ومكونة للسبور الذي اما يكون طرفيا(Terminal) او شبه طرفي(Sub–terninal) وتمتاز بان 11–89% منها منتجة لانزيم الكاتليز، درجة الحرارة المثلى لنموها 55مْ ,الرقم الهيدروجيني الامثل 7–7.2 (14). تتسبب في تلف المنتجات الغذائية، تنمو عند درجة 30–70مْ. تستخدم كدليل للتحقق من كفاءة التعقيم خــلال العمليات التصنيعية التجارية (18). تحتاج البكتريا للكاربون كمصدر للطاقة والى النترات والامونيا وبعض الاحماض الامينية في العمليات الايضية المختلفة,وبعض الفيتامينات وعوامل النمو مع توفر درجات حرارة عالية لتتمكن من النمو (9) كما انها تستطيع النمو في الحدود الدنيا للوسط الغذائي(15) . للبكتريا القدرة على تخمر سكر اللاكتوز وهو السكر الرئيسي في الحليب (9؛ 19). السبورات البكتيرية هي الاكثر ثباتاُ تجاه الحرارة من الاحياء المجهرية الاخرى ولذا فلها دور كبير في المنتجات الغذائية، مثل الحليب الذي من المعروف انه يتعرض لمعاملات حرارية عالية لاطالة العمر الخزني له، يختلف عدد السبورات في الحليب عالميا مابين 0– واعلى من $22x10^4$، وحده مكونه للمستعمره في المليتر الواحد الذي يعتمد على مناخ المنطقة(7؛ 8). ابواغ بكتريا Bacillus stearothermophilus من بين اكثر الابواغ البكتيرية المقاومة للحرارة (12)، وتتواجد باعداد كبيرة في التربة والمياه. بقاء الابواغ الملوثة في المنتجات الغذائية المعرضة الى تسخين مفرط ومن ثم انباتها ونموها في المنتجات المخزنة (اعتماداً على درجة حرارة الخزن) يعتبر مشكله للعاملين في مجال تصنيع الاغذية (15).ان المخلفات الناتجة من عصير الفاكهة مثل القشور والبذور وبما تحويه من مركبات طبيعية ذات فعل مضاد للاكسدة(3) والاحياء المجهرية(2) والتي تكون كابحة للجذور الحرة ومفيدة بنفس الوقت كعوامل مانعه ضد السرطان وامراض القلب وعوامل التقدم بالعمر(23). لذا في الدراسة الحالية نحاول الحصول على عامل مساعد مع الحرارة باستعمال اقل عدد ممكن من السبورات الحية Viable spore counts لبكتريا Bacillus **s**tearothermophilu**s**

بأضافة مستخلص مخلفات العنب المعصور الذي يحتوي على القشور والبذور والتحري عن قابلية المستخلص في تثبيط نمو بكتريا الدراسة.

المواد وطرائق البحث

الاوساط الزرعية: استعمل الوسط الزرعي المغذي السائل والصلب Nutrient Broth and Nutrient Agar لغرض تنمية وتنشيط البكتريا وحفظها وتقدير الفعل التثبيطي للمستخلص ضد البكتريا. حضرت الاوساط الزرعيه Skim Milk Agar و Glucose Phosphate Broth و Nitrate Peptine Water و Sabouraud Dextrose Agar و Kouser Citrate Medium و Huhg&Liefsons Medium Modified و Trypton Water وفق ماجاء في Harrigan و McCanca (11)، كما حضر الوسط Tyrosine Water بأعتماد طريقة تحضير الوسط Tryptone Water مع التحوير باستبدال الحامض الاميني Trypton بالحامض الاميني Tyrosine.

المحاليل والكواشف الكيميائية: ماء الببتون Peptone Water(PW) استعمل لاجراء التخافيف العشرية(1 غم/100مل ماء مقطر) وعقم في المؤصدة (121 مْ لمدة 15 دقيقة)، كاشف Griess–Hosvay وكاشف Methyl Red وكاشف Kovac'sIndole Reagent حضرت حسب ماذكور في (11). حضرت صبغة كرام حسب ماورد في (21). تم الحصول على انزيم اللايسوزايم (Lysozyme) من شركة Sigma.

مخلفات العنب المعصور: تم الحصول عليها من احد محلات اعداد شربت الزبيب في مدينة بغداد– حي الجامعة .تم غسل العينة بالماء الجاري عدة مرات ثم جففت بالفرن الكهربائي عند درجة 40 مْ وحفظت في علب معتمة داخل الثلاجة لحين الاستعمال.

عزل وتشخيص بكتريا Bacillus stearothermophilus: اخذت عينات مختلفة من التربة (كلية الزراعة/ جامعة بغداد) واجريت لها سلسلة من التخافيف العشرية وزرعت في اطباق على الوسطالزرعي Nutrient Agar(N.A)، ثم التقطت المستعمرات النامية,وحددت الخصائص الزرعية المظهرية (Cultural Charactiristics) لها، واخضعت للفحص المجهري للتعرف على شكل الخلايا وترتيبها مع بعضها وتفاعلها مع صبغة كرام وتكوينها للابواغ، تم اختيار العزلة وفق هذا التحديد الاولي على انها من النوع المكون للابواغ واجريت

على العزلة المختارة سلسلة من الفحوصات البايوكيميائية على ضوء المفاتيح التصنيفية الواردة في المرجع المختص(6) بهدف تشخيصها على مستوى الجنس والنوع.

الفحوصات البايوكيميائية: لقحت الاوساط الزرعية الخاصة بهذه الفحوصات بواسطة ملء (Loop) من العالق البكتيري (Bacterial Suspension) وشملت الفحوصات الخطوات الموضحه في (جدول ،1):

جدول (1): الفحوصات المعتمده في البحث.

التسلسل	الفحص	طريقه العمل
.1	درجة الحرارة	قدر النمو على درجة الحرارة 37 , 65 مْ بعد 24 ساعة من الحضن على الوسط الصلب Nutrient Agar.
.2	الكشف عن أنزيم الكاتليز	تم تلقيح الوسط الغذائي Nutrient Agar(N.A) بوساطة Loop وبطريقة التخطيط ثم حضنت لمدة 24ساعة عند حرارة 55 مْ وتم الكشف عن الأنزيم بإضافة 5 قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 35%.
.3	الكشف عن تخمر السكريات	لقحت الأوساط الخاصة بتخمر السكريات والمتكونة من إضافة 2% من السكر (الارابينوز ,الزايلوز ,المانيتول) كل على حده إلى 100 مل من الوسط المغذي السائل Nutrient Broth مع إضافة كاشف Bromogresol purple وأنبوبة درهم في كل أنبوبة اختبار وتحضن بدرجة حرارة 55 مْ لمدة 24 ساعة.
.4	فحص Voges-Proskauer	أضيف 5 مل من هيدروكسيد الصوديوم (40%) إلى 1 مل من المزرعة ثم أضيفت كمية قليلة من الكرياتين الى الوسط.
.5	الكشف عن اختزال النترات	لقح الوسط Nitrate Peptone Water لمدة 24 ساعة بدرجة 55مْ ثم اضيف كاشف Grieses-Hosvaay Reagent (1مل حامض السلفانيك و1مل من كاشف الالفانفثول) وترك الوسط لبضع دقائق.

.6	النمو في تركيز ملحيNaCL %5	لقحت الأنابيب الحاوية على وسط Nutrient broth (N.B) بتركيز ملحي 5% وحضنت 24 ساعة على حرارة 55 مْ وتم قياس النمو على طول موجي 660 نانوميتر.
.7	النمو بوجود الازايدNaN3 %0.02	لقحت الأنابيب الحاوية على وسط Nutrient broth بتركيز 0.02% من الازايد وحضنت 24 ساعة على حرارة 55مْ وتم قياس النمو على طول موجي 660 نانو ميتر.
.8	النمو بوجود انزيم اللايسوزايم بتركيز %0.001	لقحت الأنابيب الحاوية على وسط Nutrient broth بتركيز 0.001% من أنزيم اللايسوزايم وحضنت 24 ساعة على حرارة 55مْ وتم قياس النمو على طول موجي 660 نانو ميتر.واجريت كذلك تجربة Disc diffusion وتم ملاحظة قطر هالة منطقة التثبيط.
.9	النمو في وسط Tyrosin Peptone Water	لقحت الانابيب الحاوية على وسط Tyrosin Peptone Water وحضنت 24 ساعة على حرارة 55مْ ثم اضيف لها عده قطرات من محلول للننهايدرين (2.5%) وسخن الأنموذج.
.10	النمو في وسط Trypton Peptone Water	لقحت الانابيب الحاوية على وسط Trypton Peptone Water وحضنت 24 ساعة على حرارة 55 مْ ثم أضيف لها 0.5 مل من كاشف Kovac's reagent ويحرك بلطف.
.11	النمو في وسط Skim Milk Agar (فحص)	لقحت االاطباق الحاوية على هذا الوسط بطريقة التخطيط وحضنت 24 ساعة على حرارة 55 مْ.
.12	النمو في وسط Sabuorud Dexstros Agar	لقحت الأطباق الحاوية على الوسط بطريقة التخطيط وحضنت 24 ساعة على حرارة 55 مْ و 28 مْ .

.13	النمو في ظروف لاهوائية	لقحت الأطباق الحاوية على وسط N.A ووضعت في داخل Anaerobic (حاوية تنمية لاهوائية مفرغة من الهواء) حضن jar بعدها على حرارة 55 مْ لمدة 24 ساعة.
.14	فحص السترات	لقحت الأنابيب الحاوية على وسط Koser Citrate وحضنت لمدة 24 ساعة على حرارة 55 مْ.

الاستخلاص: تضمن استخلاص 25 غم من المسحوق المطحون لمخلفات العنب المعصور بجهاز السوكسليت (Soxhelt) بوساطة الايثر النفطي (Petroleum ether) على حرارة (60–80)مْ لمدة 6 ساعات للتخلص من المواد الدهنية، يعقبها استخلاص المسحوق المنزوع الدهن بالجهاز نفسه لمدة 8 ساعات بوساطة خليط من المذيبات المتكون من الكحول المثيلي: الماء: حامض الخليك (90 :9.5 :0.5)، المستخلص الناتج رشح وركز تحت التفريغ وبالتالي تم الحصول على المستخلص الخام والذي حفظ داخل اناء التجفيف(22).

اختبار تأثير المستخلص مع الحرارة في تثبيط نمو بكتريا الدراسة: اتبعت الطريقة المذكورة في (11) بتطبيق ثلاث درجات حرارية مختلفة 40 و60 و80 م ولفترات زمنية 0 و 10 و 30 و 40 و 50 دقيقة لكل درجة حرارية مستعملة في الاختبار، بأعتماد 500 جزء بالمليون تركيز المستخلص(2) الذي تم الاختبار عليه عند كل درجة حرارية من الدرجات الثلاث.

النتائج والمناقشة

انتخبت العزلة البكتيرية للنماذج المأخوذة من التربة من بين العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة، اذ اعتمد على الخصائص الزرعية والتي تضمنت شكل المستعمرة الكروي او الدائري ذا الالوان البيضاء او الكريمية، محدبة ذات حافة منتظمة. اما الصفات المجهريةا لشكلية للخلايا فهي عصوية مفردة وبشكل سلاسل موجبة لصبغة كرام ومتحركة، ذات سبور طرفي. وأكمل تشخيص العزلة البكتيرية التي اختيرت بأجراء الفحوصات البايوكيمياوية عليها، (الجدول، 2) يظهر نتائج هذه الفحوصات التي تم تطبيقها.

(جدول، 2): الفحوصات البايوكيميائية لبكتريا Bacillus stearothermophilus

ت	الفحوصات	النتيجة	الملاحظات
1	الأبعاد (العرض× الطول)	(0.71- 3) مايكروميتر	قيست الأبعاد بوساطة Stage micrometer وبمعدل 20 مكرر للبكتريا.
2	التفاعل مع الصبغة	+	موجبة لصبغة كرام
3	الحركة	+	متحركة
4	الكاتليز Catalase	+	تم الكشف عن الأنزيم بإضافة حجم مناسب من محلول بيرو كسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز 35% فتولد فقاعات هوائية دلالة على وجود الأنزيم .
5	النمو بدرجة الحرارة العليا Maximum	65- 75 مْ	نمت بدرجة حرارة 70 مْ.
6	النمو بدرجة الحرارة الدنيا Minimum	30- 45 مْ	نمت بدرجة حرارة37 مْ.
7	قدرة البكتريا على تكوين الحامض بوسط حاوي على الارابينوز Arabinose	+	انتجت البكتريا حامض بدون غاز. فتغير اللون من البنفسجي إلى الأصفر دلالة على انتاج الحامض بسبب تخمر السكريات
8	قدرة البكتريا على تكوين الحامض بوسط حاوي على الزايلوز Xylose	+	انتجت البكتريا حامض بدون غاز. فتغير اللون من البنفسجي إلى الأصفر دلالة على انتاج الحامض بسبب تخمر السكريات
9	قدرة البكتريا على تكوين الحامض بوسط حاوي على المانيتول Mannitol	±	انتاج البكتريا حامض ضعيف بدون غاز .تحول اللون إلى بنفسجي فاتح دلالة على أنتاج ضعيف للحامض
10	النمو على وسط – Sabuorud Dexstros- Agar	-	لم تنمو.
11	النمو في ظروف لاهوائية	-	لم تنمو
12	النمو في تركيز ملحي NaCL 5%	+	قدرة البكتريا على النمو من خلال قراءة الامتصاصية للتعكر على طول موجي 660 نانوميتر و كانت قيمة الامتصاص

			عند الزرع 0.213 مقارنة مع أنبوب الزرع بدون NaCl والتي كانت 0.253
13	النمو بوجود الازايد NaN3 0.02%	–	لم تنم . من خلال قراءة الامتصاصية للتعكر على طول موجي 660 نانوميتر وكانت قيمة الامتصاص 0.00 مقارنة مع أنبوب الزرع بدون الازايد NaN3 والتي بلغت 0.265
14	النمو بوجود إنزيم اللايسوزايم بتركيز 0.001%	–	لم تنمو. تم قياس النمو على طول موجي 660 نانوميتر وكانت قيمة الامتصاص 0.00 مقارنة مع أنبوب الزرع بدون الإنزيم والتي بلغت 0.341.و أجريت كذلك تجربة Disk diffusion وتم ملاحظه قطر هالة منطقة التثبيط فتكون الهالة دلالة على تأثر البكتريا بالإنزيم, وبما إن البكتريا من نوع الموجبة لصبغة غرام هذا يعني تأثرها بالإنزيم أكثر من البكتريا السالبة لصبغة غرام لاختلاف التركيب الكيميائي للجدار والذي يعود إلى طبقة الببتيدو كلايكان (Peptidoglycan) إذ إنها أكثر سمكاً في جدار البكتريا الموجبة لصبغة غرام فضلاً عن وجود مكون إضافي هو حامض التيكويك (Teichoic acid) . (1)
15	النمو في وسط Trypton Water	–	لم تنمو .نتيجة عدم تكون حلقة حمراء أعلى سطح الوسط الغذائي دلالة على عدم تحلل الحامض الاميني التربتوفان وإنتاج حلقة الاندول التي تعطي اللون الأحمر بوجود الكاشف.
16	الكشف عن اختزال النترات	±	نمو ضعيف. تطور اللون إلى الأحمر الباهت يشير إلى اختزال النترات الى نتريت مقارنة بالوسط الغير المزروع.
17	النمو في وسط Skim Milk Agar (فحص الكازين)	+	قدره البكتريا على النمو. فنمو المستعمرات مع هالة تحيط بها أزال ضبابية الوسط إلى رائق يعني قدرتها على النمو في هذا الوسط وتحلل بروتين الحليب(الكازين).
18	النمو في وسط Tyrosin Water	–	لم تنمو. إذ إن إضافة الكاشف (النهايدرين 2.5%) وتسخين الأنموذج أعطى لوناً ازرق .(الحوامض الامنية الالفاتية تعطي لوناً ازرق),مقارنة مع أوساط غير مزروعة التي أعطت نفس اللون .
19	فحص السترات	–	لم تنمو.بقى لون الوسط ازرق نتيجة لعدم استهلاك السترات.
20	فحص Voges–Proskauers	–	لم تنمو. نتيجة لعدم تطور اللون إلى الوردي أي عدم قدرة البكتريا على تكوين مركب ثنائي الاستيل.

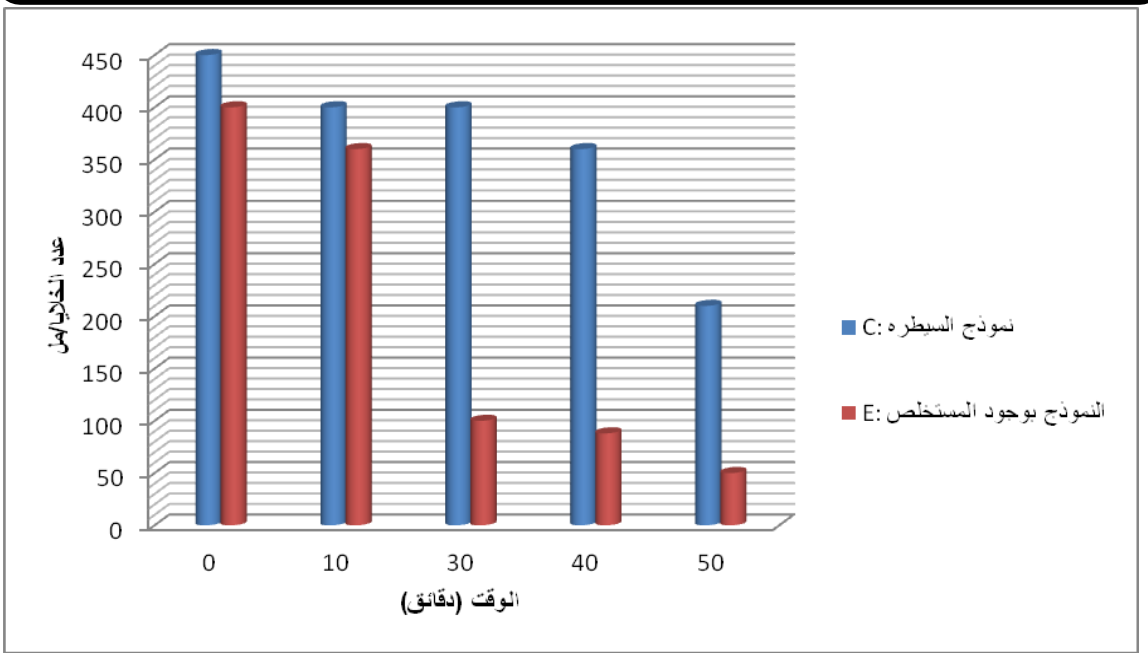
يسعى الباحثون في مجال تقنيات الاغذية للاستفادة من كنوز النباتات بما تحويه من مكونات فعالة حيث لها تاثيرات بايولوجية مختلفة منها الفعالية المضادة للاحياء المجهرية والاكسدة وغيرها، وفي هذه الدراسة جرى الاستفادة من مستخلص مخلفات العنب المعصور في تثبيط نمو البكتيريا المكونه للسبورات للتعرف على الفعل المساعد للمستخلص مع درجة الحرارة من اجل اختزال درجة الحرارة او الوقت الذي تتعرض له الاغذيه من اجل تثبيط نموالبكترية المختبرة للحفاظ على نوعية غذاء افضل.

يبين (الجدول 4) و (الشكل، 1) الانخفاض في اعداد البكتريا لمعاملة المستخلص مع تقدم وقت التجربة عند دراسة تأثير الدرجة الحرارية 80 مْ اذ كان العدد 4 ×10^2cfu عند الوقت الابتدائي للتجربة (0 دقيقة) واختزل الى 5 ×10^1cfu بعد مرور 50 دقيقة من وقت التجربة (الوقت النهائي)، في حين بلغ العدد 2.1 ×10^2cfu لمعاملة السيطرة عند الوقت النهائي للتجربة. كما يلاحظ الفرق بين قراءات اعداد البكتريا للفترات الزمنية الخمس المختبرة لمعاملة المستخلص ولمعاملة السيطرة باختبار درجة الحرارة 60 م (الجدول، 3) و (الشكل، 2) حيث ان العدد البكتيري عند الوقت الابتدائي اعلى من المدى المسموح به للمعاملتين، ثم انخفض الى 5.6 ×10^1cfu بعد 30 دقيقة من بدء التجربة واستمر بالانخفاض لاخر فترة زمنية مختبرة (50 دقيقة) اذ بلغ 4.0 ×10^1cfu، بينما لم يلاحظ هكذا انخفاض في اعدادالبكتريا لمعاملة السيطرة بعد الفترة الزمنية الثالثة (30 دقيقة) والاخيرة بلغ العدد 3.50 ×10^2cfu وانخفض الى 3.0 ×10^2cfu على التوالي.

جدول (3): تأثير الدرجة الحرارية 80 م في نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus.

الوقت/ دقيقة	معاملة المستخلص Cfu	معاملة السيطرة Cfu
0	10^2× 4.0	T.n.c
10	10^2× 3.60	T.n.c
30	10^2× 1.0	10^2× 4.0
40	10^2× 0.8	10^2× 3.6
50	10^1× 5.0	10^2× 2.1

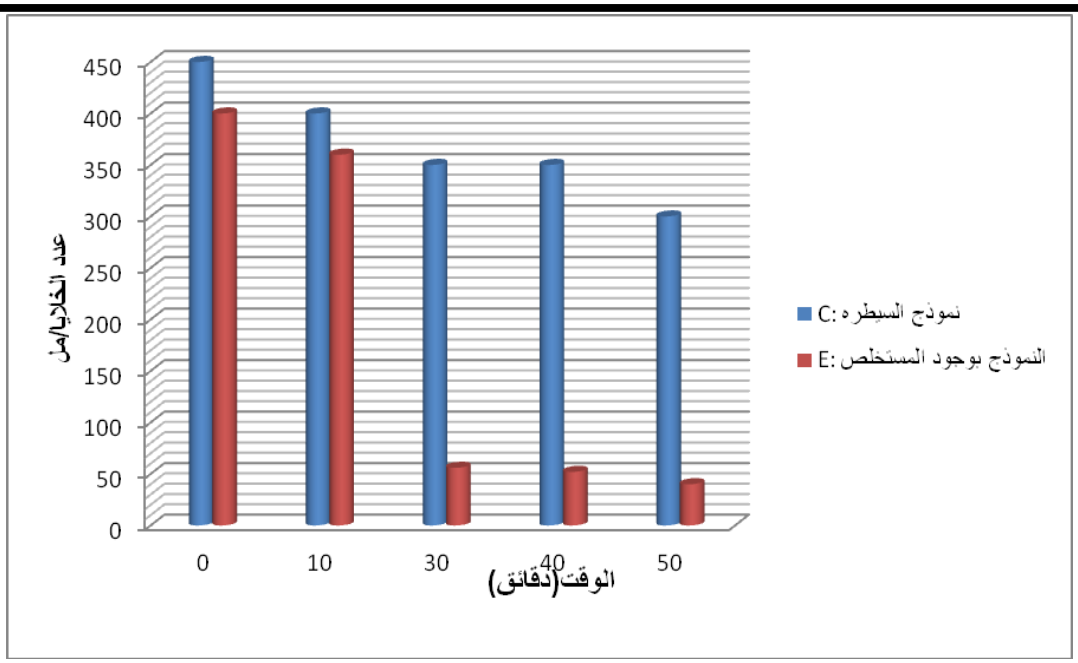
T.n.c : Too numerous to count.



شكل (1): تاثير الدرجة الحرارية 80م في نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus.

جدول (4): تأثير الدرجة الحرارية 60م في نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus.

الوقت/ دقيقة	معاملة المستخلص	معاملة السيطرة
0	T.n.c	T.n.c
10	T.n.c	T.n.c
30	$10^{1}\times$ 5.6	$10^{2}\times$ 3.50
40	$10^{1}\times$ 5.2	$10^{2}\times$ 3.50
50	$10^{1}\times$ 4.0	$10^{1}\times$ 3.0



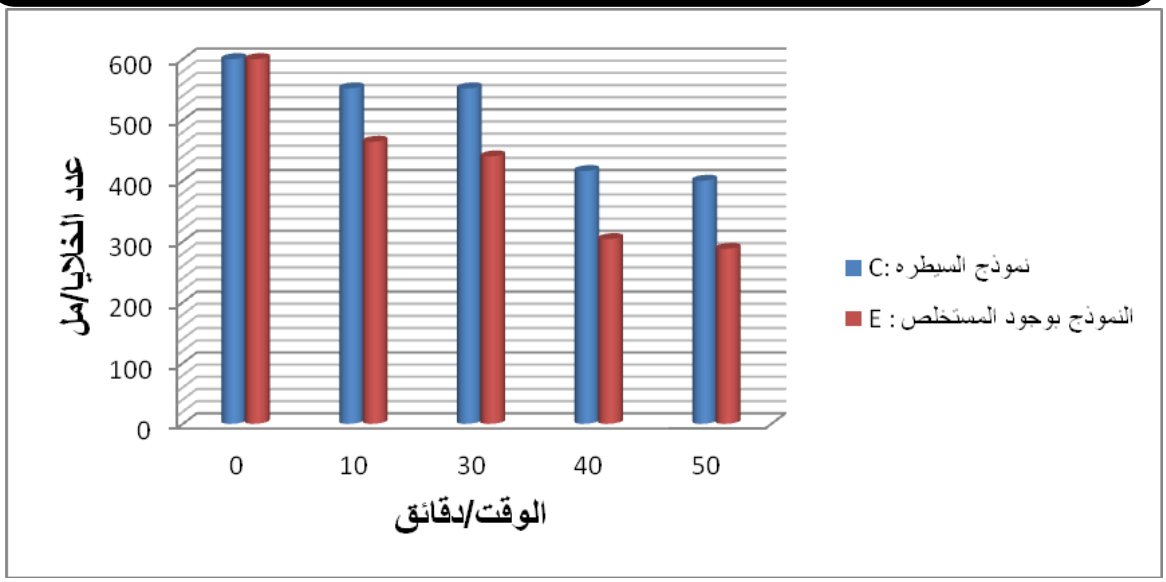
شكل (2): تاثير الدرجة الحرارية 60م في نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus.

ونستدل من نتائج (الجدول، 3) و (الشكل، 2) ان المستخلص مع الدرجة الحرارية 60م وهي الدرجة الحرارية المثلى لنمو بكتيريا Bacillus stearothermophilus اكثر وقعا منه مع الدرجة 80م في تثبيط نمو البكتريا المختبرة. الدرجة الحرارية المثلى لنمو البكتريا بين 60- 65م (16) وان سبورات بكتريا Bacillus stearothermophilus من اكثر السبورات المقاومة للحرارة وتتواجد باعداد كبيرة في التربة والمياه، اذ تبقى باعداد كبيرة لقابليتها المفرطة على تحمل الحرارة لتعود للانبات والنمو في المنتجات المرتفعة درجة الحرارة وتحدث في الاغذية المنقولة في المناطق الاستوائية في العالم (10). محدودية الدراسات عن استعمال مستخلصات النباتية كعامل مساعد مع الحرارة لاختزال اعداد بكتريا Bacillus stearothermophilus في المنتوجات الغذائية، فبعض الدراسات اشارت الى مقاومة سبورات بكتريا Bacillus stearothermophilus للضغط كعامل مساعد مع الحرارة في العمليات التصنيعية (BATB) تفوق مقاومة عدة انواع اخرى تابعة لنفس جنس Bacillus مثل B.subtilis وB.polymyxa (20). لكن اقل من مقاومة بكتريا Clostridium botulinum نوع A وb(21). قد يؤدي تعرض المنتجات الغذائية لفترة طويلة للحرارة الى تغير في بعض خواصها بشكل يجعلها غير مرغوبة من قبل المستهلك علاوه على تاثير نوعية الغذاء، فمنتجات البيض المصنعة بفترات حراية مفرطه من اجل تامين القضاء على سبورات البكتريا المؤذية ربما تصبح المنتجات بنوعية اقل بمواصفات معينة كالمطاطية في

النسجة ولون مخضر Greenish ونكهة ضعيفة (5؛ 10). يوضح (الجدول، 5) و(الشكل، 3) اعداد بكتريا Bacillus stearothermophilus خلال الفترات الزمنية الخمس المختبرة لمعاملة المستخلص والسيطرة باستعمال درجة الحرارة 40 مْ، اذ يلاحظ الاختزال في عدد البكتريا لكلا المعاملتين مع تقدم الوقت، اذ بلغ العدد $10^2\times$ 4.40 cfu و $10^2\times$ 5.52 cfu لمعاملة المستخلص والسيطرة على التوالي عند الوقت 30 دقيقة و استمر الانخفاض في العدد الى $10^2\times$ 2.88 cfu لمعاملة المستخلص بينما انخفض العدد الى $10^2\times$ 4.0 cfu لمعاملة السيطرة عند الوقت 50 دقيقة. يتبين من هذه النتائج ان مقاومة بكتريا Bacillus stearothermophilus للمعاملة الحرارية بوجود المستخلص دون مقاومة الحرارة بمفردها اذ استدل على ذلك من خلال معطيات التجربه لوحظ الاختزال في اعداد البكتريا في معاملة المستخلص مع تقدم الوقت اعلى من معاملة السيطرة وهذا ما يوافق ما ذكره (4؛ 20) من ان سبورات بكتريا Bacillus stearothermophilus لها مقاومة اكبر معنويا ($p<0.0s$) الى المعاملة الحرارية من مقاومتها الحرارة مع الضغط. فضلا عن ان البكتريا المحبة للحرارة Thermophiles تستطيع النمو اسرع من البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة Mesophiles كما ان عدد من الانزيمات فيما تظهر ثباتية اكثر بالحرارة ومتحملة للكيمياويات المدنترة(13).

جدول(5): تأثير الدرجة الحرارية 40مْ في نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus.

معاملة المستخلص	معاملة السيطرة	الوقت/ دقيقة
T.n.c	T.n.cβ	0
$10^2\times$4.64	$10^2\times$5.52	10
$10^2\times$4.40	$10^2\times$5.52	30
$10^2$4×3.0	$10^2\times$4.16	40
$10^2\times$2.88	$10^2\times$4.0	50



شكل(3): تاثير الدرجة الحرارية 40مْ في نمو بكتريا Bacillus stearothermophilus.

المصادر

1. باقر، عبد الواحد وعلي، لوزان أمين والراوي، أنيس مالك وعبد الغني، زكي كوركيس والعاني، فاروق ياس وابراهيم، محمد عبد القادر والصقر، الحان مهدي ومهدي ،هدى صالح .(1989). البكتريا. كلية التربية للبنات/جامعة بغداد– بيت الحكمة
2. محمد، اشراق منير .(2011). استخلاص بعض المركبات الفينولية من بذور العنب شدة سوداء وبيضاء ومخلفات عصير العنب المحلي ودراسة فعاليتها المضادة للأحياء المجهرية و للأكسدة.رسالة ماجستير من كلية الزراعة/ جامعه بغداد.جمهورية العراق.
3. محمد، اشراق منير وصالح، نضال محمد وثابت، أكرم. (2014). دراسة الفعاليه المضادة للأكسدة للكاتكينات المستخلصة من بذور العنب شدة سوداء وبيضاء ومخلفات العنب المعصور. مجله التقانات الاحيائيه/ جامعه النهرين. المجلد الثامن العدد الثاني.
4. محمد، اشراق منير وصالح، نضال محمد. (2014). تأثير المعاملات الحرارية على الفعاليه الحيويه للكاتكينات المستخلصه من صنفي بذور العنب شدة سوداء وبيضاء. مجله وزاره الزراعه. المجلد الثامن العدد السابع. صفحه 80.

5. Barbosa- Canobas, G. V., T. N., Koutchma, V. M. Balasueramani am, G. D., Sadier, S. Claek. (2004). High pressure prossing of egg – based product. Annual meeting of Institute of Food Technologists Las Vegas, NA, July 12-16(Abstract number 86-4).

6. Buchanan, R. E., N. E., Gibbons, S. T., Cowan, J. G. Holt, J. Liston, R.G.E.Murray, C.V.Niven, A. W. Ravin, and R. Y Stanier. (1976). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The William& Wilkins Company- Baltimore.

7. Burton, H. (1988). Ultra high temperature processing of milk and milk products. Elsevier Applied Scienice.

8. Chen , W., H. Chen , Y. Xia, J. Yang, J. Zhao, and H. Zhang. (2008). Immobilization of recombinant thermostable B–galactosidase from Bacillius stearothermophilus for lactose hydrolysis in milk. J.Dairy Science. 92; 491-498.

9. Cheng, T. C., K. J. Duan, and, D. C. Sheu. (2006). Applaction of Tris (hidroxymetrhyl) phosphine as acoupling agent for β–galactosidase Immobilized on chitosan to produce galactooligosacchrides. J. Chem.Technol. Biotechnol. 81:233-236.

10. Gffiths, M. W. (1995). Fooborn illness caused by Bacillus SPP. other than B. cereus and their importance to the dairy in dustry. Int. Dariy Fed. Bull. 302:3-6.

11. Harrigan, W. F. and M. E. McCance. (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic press, London.

12. Jiannan Guo, Louis Y. P. Luk, E. Joel Loveridge. (2014). Thermal Adaptation of Dihydrofolate Reductase from the Moderate Thermophile Geobacillus stearothermophilus,j. Biochemistry. 53 (17), pp 2855–2863.

13. Ljungdahl, L. G. (1979). Physiology of thermophilic bacteria. Adv. Microb. Physiol. 19:149-243.

14. Michael, R. and C. W. Bart. (1997). Immunomagnetic Detection of Bacillius stearothermophilus Spores in Food and Enviromental Samples. J. American Society for Microbiology. 63(5): 1643-1646.

15. Minzhang, N. Hiroaki and I. Tadayuki. (1988). Useful Host-Vector in Bacillius stearothermophilus .54:3162-3164.

16. Mori Y, T.Hirano and T. Notomi. (2006). "Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers". BMC Biotechnol. 6: 3.

17. Nazina, T. N., T. P, Tourova, A. B., Poltaraus, E. V., Novikova, A. A. Grigoryan; A.E Ivanova,; A. M. Lysenko, V. V., Pentrunyaka,

G. A., Osipov, S. S Belyaev and M. V. Ivanov. (2001). 'Taxonomic study of aerobic therrmophilic bacilli: descriptions of Geobacillussubterraneus, gen. nov., sp. nov. and Geobacillusuzenensissr. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillusthermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans to Geobacillus as the new combinations G. stearothermophilus, G. th" International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 433- 446.

18. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 50, part 2, of the IJSEM (http:/ijs.sgmjournals.org/ cgi/reprint/51/3/795.pdf) International of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(3): 795. 2001. Doi: 10. 1099/ 00207713- 51-3-795.

19. Panesar, P.S., R. Panesar, R.S. Singh, J. F. Kennedy and H. Kumar. (2006). Microbial Production, immobilization and application of B-D- galactosidase. J. Chem. Technol. Biotechnol. 81 :530-543.

20. Rajan, S., S., Pandrangi, V. M. Balasubramaniam and, A. F., Yousef.(2015). Inactivation of Bacillus stearothermophillus spores in egg patties by pressure assistedthermal processing. Fyffe Road, Cohambus, OH 43210-1007. USA.

21. Reddy,N.R., H. M., R. C., Solomon Tetzloff, and j., Rhodehmel. (2003). Inactivation of Clostridium botulinum type A. spore by high pressure of elevated temptures. J. Food Protection, 66(8): 1402-1407.

22. The wealth of India: a dictionary of Indian raw materials, publication and information directorate. (1976). New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research.

23. Torres, J. I. and R. Bobet. (2001). New flavonol derivatives from grape by products antioxidant aminoethylthio- flavan- 3- ol conjugates from apolymeric waste fraction used asourse of flavonols, J. Agrig. foodchem. 49:4627-4634.