جامعة الموصل
كلية الزراعة والغابات

عوامل الاجهاد المحفزة لانتاج مضاد بكتريا القولون في خام مستنبتات بكتريا *Lactobacillus plantarum*

يونس مظهر عبد الرزاق محمد
الطائي

رسالة ماجستير

علوم الأغذية

بإشراف

د. طارق زيد إبراهيم
أستاذ مساعد

1447هـ 2025م

الخلاصة

أجريت الدراسة في مختبر التسمم والتقنية الحيوية التابع لقسم علوم الأغذية كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل للمدة من 2023/11/21 الى 2024/9/26 اذ هدفت الدراسة الى تحديد عوامل الاجهاد المحفزة لانتاج مضادات البكتريا في خام مستنبتات بكتريا *Lactobacillus plantarum* لمعرفة أفضل درجة حرارة واس هيدروجيني وتركيز ملح الطعام والنيسين وحامض الكوجيك والامبسلين لانتاج مضادات البكتريا.

اجري التشخيص الجزيئي على بكتريا *L. plantarum* لمعرفة نسبة التطابق الجيني اذ عزل الـ DNA باستخدام العدة التشخيصية من شركة Geneaid وتم التأكد من نقاوته من خلا ل الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وتم تضخيم منطقة 16SrRNA باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتحديد تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 16SrRNA وتحليلها باستخدام برنامج Sequitrace اذاظهرت النتائج تطابقاً بنسبة 99.86% مع سلالات تابعة لجنس *L. plantarum*، وسجل التتابع في قاعدة بيانات GenBank بالرمز TZYM1.

بينت نتائج الدراسة ان مدة الحضن المثلى لبكتريا *L. plantarum* كانت في مدة 48 ساعة، وهي المدة الأفضل لانتاج مضادات الاحياء المجهرية وبلغت النسبة المئوية للتثبيط ضد بكتريا *E. coli* 55.555% عند درجة حرارة 37مْ اما في مدة حضن 24 ساعة بلغت النسبة المئوية للتثبيط هي 38.461% وعند الدرجة الحرارية نفسها ولكن عند درجة 8مْ لم يحدث نمو لبكتريا *L. plantarum* ولم يحدث انتاج لمضادات الاحياء المجهرية.

وكان الاس الهيدروجيني الأمثل لانتاج مضادات بكتريا *E. coli* من بكتريا *L. plantarum* عند اس هيدروجيني 5.5 اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط ضد بكتريا *E. coli* 51.019%.

وكان تركيز ملح الطعام الأمثل لانتاج المضاد من بكتريا *L. plantarum* عند تركيز 2% وبلغت النسبة المئوية للتثبيط ضد بكتريا *E. coli* 48.933% بينما الإنتاج الأقل للمضاد كان عند تركيز 5.5% اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط هي 31.424%.

واعطى اختبار إضافة حامض الكوجيك وبتراكيز مختلفة في انتاج المضاد من بكتريا *L. plantarum* تأثيرات مختلفة اذ كان التركيز الأكثر تأثيراً لانتاج مضادات بكتريا *E. coli* عند تراكيز 2 و4 ملغم / مل على التوالي وكانت النسبة المئوية للتثبيط 54.715% بينما التركيز الأقل تأثيراً في انتاج مضادات بكتريا *E. coli* عند تراكيز 1 و0.5 و0.25 و0.125 ملغم / مل اذ كانت النسبة المئوية للتثبيط 51.998% لكل التراكيز مقارنة بعينة السيطرة.

واظهرت النتائج ارتفاع انتاج مضادات بكتريا *E. coli* بانخفاض تراكيز النيسين المضافة وكان اعلى انتاج عند تركيز 0.1 وكانت النسبة المئوية للتثبيط 46.666% بينما كانت اقل نسبة انتاج للمضاد عند تركيز 0.5 وكانت النسبة المئوية للتثبيط 27.272%.

اعطى اختبار تأثير وجود الامبسلين في انتاج المضاد من بكتريا *L. plantarum* وبتركيز 0.25 ملغم / 1مل ضد بكتريا *E. coli* اذ وجد أن في هذه النسبة أن بكتريا *L. plantarum* كانت قادرة على النمو ولم تكن قادرة على انتاج مضادات بكتريا *E. coli*.

وكان لتأثير الصدمة الحرارية دور في معرفة انتاج المضاد من بكتريا *L. plantarum* ضد بكتريا *E. coli*، اذ كانت اعلى نسبة انتاج للمضاد في طور النمو اللوغاريتمي عند المعاملة بدرجة حرارة 60مْ ولمدة 150 ثانية اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 51.998% واقل نسبة انتاج للمضاد كانت في درجة حرارة 72مْ وكانت النسبة المئوية للتثبيط 50%. اما في طور الثبات فكانت اعلى نسبة انتاج للمضاد في درجة حرارة 65% اذ كانت النسبة المئوية للتثبيط 52.941% وكانت اقل نسبة لانتاج المضاد في درجة حرارة 60مْ وكانت النسبة المئوية للتثبيط 44.184%.

واظهر تأثير صدمة البرودة وفي درجة حرارة -17مْ وبأوقات زمنية مختلفة معرفة انتاج المضادات من بكتريا *L. plantarum* ضد بكتريا *E. coli*، اذ كانت اعلى نسبة انتاج للمضاد في طور النمو اللوغاريتمي في درجة حرارة -17مْ في مدة 24 ساعة وكانت النسبة المئوية للتثبيط 44.184%، بينما اقل نسبة انتاج للمضاد في درجة حرارة -17مْ في مدة زمنية محددة 0.5 ساعة وساعة واحدة على التوالي اذ كانت النسبة المئوية للتثبيط 38.461%. اما في طور الثبات فكانت اعلى نسبة انتاج للمضاد في درجة حرارة -17مْ في مدة 24 ساعة وكانت النسبة المئوية للتثبيط 45.452%، وكانت اقل نسبة انتاج للمضاد في درجة حرارة -17مْ في مدة ساعة واحدة اذ كانت النسبة المئوية للتثبيط 39.998%.

واظهرت نتائج تأثير الرج المستمر وبسرعة مختلفة 50 و100 و150 و200 دورة / دقيقة في انتاج مضادات المضاد من بكتريا *L. plantarum* ضد بكتريا *E. coli* سرعة الرج المثلى في انتاج المضاد اذ كانت النسبة المثلى في انتاج المضاد عند سرعة 50 دورة / دقيقة وبلغت النسبة المئوية للتثبيط 52.941%، وكانت اقل نسبة لانتاج المضاد عند سرعة 150 دورة / دقيقة اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 45.452%.

وفي استخدام الرج المتقطع ولمدة ساعتين لكل يوم فكانت النسبة المثلى في انتاج المضاد عند سرعة 50 دورة / دقيقة وبلغت النسبة المئوية للتثبيط 56.362%، اما في استخدام الرج المتقطع ولمدة

4 ساعات لكل يوم فكانت النسبة المثلى في انتاج المضاد عند سرعة 50 دورة / دقيقة وبلغت النسبة المئوية للتثبيط 56.362%.

واعطت نتائج تأثير التنمية في أوساط مختلفة السائل والصلب وشبه الصلب في انتاج المضاد من بكتريا *L. plantarum* ضد بكتريا *E. coli* ان الوسط الأمثل لانتاج المضاد كان الوسط السائل اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 42.857%.

واعطت نتائج تأثير مستنبتات بكتريا *E. coli* في انتاج المضاد من بكتريا *L. plantarum* وبنسب 1:1 و1:2 و1:3 و1:4 دوراً في معرفة النسبة المثلى في انتاج المضاد إذ كانت اعلى نسبة انتاج للمضاد عند نسبة 1:4 وبلغت النسبة المئوية للتثبيط 56.362%، واقل نسبة انتاج للمضاد كانت عند نسبة 1:1 و1:2 على التولي اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 53.845%.

SUMMARY

The study was carried out between November 21, 2023, and September 26, 2024, in the Biotoxicology and Biotechnology Laboratory of the Department of Food Science, College of Agriculture and Forestry, University of Mosul. By identifying the stressors that promote the development of antibacterial agents in raw cultures of *Lactobacillus plantarum*, the study sought to ascertain the ideal conditions for the creation of microbial antagonists, including temperature, pH, salt concentration, nisin, kojic acid, and ampicillin.

To ascertain the proportion of genetic identity, L. plantarum bacteria underwent molecular diagnostics. The Geneaid diagnostic kit was used to isolate the DNA, and agarose gel electrophoresis was used to verify its purity. The polymerase chain reaction (PCR) method was used to amplify the 16S rRNA area, and the Sequitrace program was used to identify and evaluate the nitrogenous base sequence of the 16S rRNA region. The sequence was registered in the GenBank database with the number TZYM1 and the findings demonstrated a 99.86% similarity with strains of the genus *L. plantarum*.

The study's findings demonstrated that 48 hours was the ideal incubation time for *L. plantarum*, which is the ideal duration for antibiotic production. At 37°C, the percentage of inhibition against the *E. coli* bacteria was 55.555%. At the same temperature, however, the percentage of inhibition increased to 38.461% after a 24-hour incubation period. Nevertheless, the *L. plantarum* did not proliferate and no antimicrobials were generated at 8°C.

The optimum pH for the production of anti-*E. coli* from *L. plantarum* was pH 5.5, with a 51.019% inhibition rate against *E. coli*.

The optimum concentration of table salt for the production of the antibiotic from *L. plantarum* was 2%, with a 48.933% inhibition rate against *E. coli*, while the lowest production rate was at 5.5%, with a 31.424% inhibition rate.

The test of adding kojic acid at different concentrations to produce the antibiotic from *L. plantarum* gave different effects. The most effective concentration for producing antibiotics against *E. coli* was at concentrations of 2 and 4 mg/ml, respectively, and the inhibition percentage was 54.715%. The least effective concentration for producing antibiotics against *E. coli* was at concentrations of 1, 0.5, 0.25, and 0.125 mg/ml, and the inhibition percentage was 51.998% for all concentrations compared to the control sample.

The results showed an increase in the production of antibacterial agents against *E. coli* with decreasing concentrations of added Nisin. The highest production was at a concentration of 0.1, and the inhibition percentage was 46.666%. The lowest production rate of the antibacterial agent was at a concentration of 0.5, and the inhibition percentage was 27.272%.

The effect of ampicillin on the production of antibiotics by *L. plantarum* at a concentration of 0.25 mg/1 ml against *E. coli* was tested. It was found that at this concentration, *L. plantarum* was able to grow but was unable to produce antibiotics against *E. coli*.

The effect of heat shock played a role in determining the production of the antibiotic from *L. plantarum* against, as the highest percentage of antibiotic production was in the logarithmic growth phase when treated at a temperature of 60°C for 150 seconds, as the percentage of inhibition reached 51.998%, and the lowest percentage of antibiotic production was at a temperature of 72°C, with a percentage of inhibition of 50%. As for the stationary phase, the highest percentage of antibiotic production was at a temperature of 65%, with a percentage of inhibition of 52.941%, and the lowest percentage of antibiotic production was at a temperature of 60°C, with a percentage of inhibition of 44.184%.

The effect of cold shock at -17°C and at different time periods revealed the production of antibodies from *L. plantarum* against *E. coli*. The highest

production of the antibiotic was in the logarithmic growth phase at -17°C over 24 hours, with a 44.184% inhibition percentage. The lowest production of the antibiotic was at -17°C over a specific time period of 0.5 hours and 1 hour, respectively, with a 38.461% inhibition percentage. In the stationary phase, the highest production of the antibiotic was at -17°C over 24 hours, with a 45.452% inhibition percentage. The lowest production of the antibiotic was at -17°C over 1 hour, with a 39.998% inhibition percentage.

The results showed the effect of continuous shaking at different speeds of 50, 100, 150 and 200 rpm on the production of antibiotics from *L. plantarum* against *E. coli*. The optimum shaking speed for producing the antibiotic was 50 rpm, with the inhibition percentage reaching 52.941%. The lowest rate of producing the antibiotic was at 150 rpm, with the inhibition percentage reaching 45.452%.

When using intermittent shaking for two hours each day, the optimum rate of production of the antigen was at a speed of 50 rpm, and the inhibition percentage reached 56.362%. When using intermittent shaking for four hours each day, the optimum rate of production of the antigen was at a speed of 50 rpm, and the inhibition percentage reached 56.362%.

The results of the effect of development in different liquid, solid and semi-solid media on the production of the antibiotic from *L. plantarum* against *E. coli* showed that the optimal medium for producing the antibiotic was the liquid medium, as the inhibition percentage reached 42.857%.

The results of the effect of *E. coli* cultures on the production of the antibiotic from *L. plantarum* at ratios of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 played a role in identifying the optimal ratio in the production of the antibiotic, as the highest production rate of the antibiotic was at a ratio of 1:4 and the percentage of inhibition reached 56.362%, and the lowest production rate of the antibiotic was at a ratio of 1:1 and 1:2 respectively, as the percentage of inhibition reached 53.845%.

University of Mosul

College of Agriculture and Forestry

Stress Factors That Stimulate The Production of Antibacterial Coliform Bacteria Agents in *Lactobacillus plantarum* Cultures

Younis Mudherher Abdulrazzaq Mohammed AL-tayy

M. Sc. Thesis

in

Food Science

Supervised by

Dr. Tariq Zaid Ibrahim

Assistant Professor

2025 A.D. **1447 A.H.**