طارق زيد ابراهيم العزاوي

Friday, December 24, 2010
2:53 PM

مجلة ام سلمة للعلوم مجلد 6(2) 2009

تأثر حيوية بكتريا *Brucella melitensis* بفعالية بادئ اللبن التقليدي أثناء تخمر الحليب

*طارق زيد ابراهيم العزاوي**

تاريخ قبول النشر 2/ 9 / 2008

الخلاصة

تم عزل وتشخيص بكتريا *Brucella melitensis* من مصدرين الاول من الاصابات البشرية والاخر من حليب اغنام مصابة بالاجهاض في ضواحي مدينة الموصل . استعملت عزلة بشرية واخرى من حليب الاغنام لاجراء الدراسة . اضيفت اعداد من خلايا البروسيلا من مزرعة سائلة بنسبة 2.5% وقسم الحليب الى معاملات ، الاولى اضيف اليها بادئ اللبن التقليدي *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (1:1) بنسبة 2% وحضنت بدرجة حرارة 42°م لمدة 3 ساعات . المعاملة الثانية أضيفت بكتريا البروسيلا بدون البادئ وجرى تخفيض الرقم الرقم الهيدروجيني pH على مدد متقطعة بشكل يحاكي انخفاض الرقم الهيدروجيني نتيجة إضافة بادئ اللبن . والمعاملة الثالثة شملت اضافة بكتريا البروسيلا وبادئ اللبن (بالنسب المذكورة) اضافة الى دارئ للتخفيف من حدة انخفاض الرقم الهيدروجيني اذ انخفض الرقم في هذه الحالة الى 6.1 في نهاية مدة الحضن مقارنة بانخفاضه الى 4.9 في حالة عدم الاضافة . اسفرت النتائج عن ان انخفاض الرقم الهيدروجيني واعداد البروسيلا ارتباط بشكل عكسي ومتزامن في المعاملة الاولى ، اذ كان معامل الارتباط بالنسبة للعزلة البشرية (r = - 0.945) ولعزلة الحليب (r = - 0.974) . اما اضافة حامض اللاكتيك دون اضافة البادئ فقد ادى الى التقليل من نسبة قتل الخلايا فعند انهاء مدة التخمر (180 دقيقة) كانت اعداد البروسيلا ثلاث اضعاف المعاملة المناظرة بالنسبة للعزلة البشرية (نسبة القتل 67.7 %) و 1.6 بالنسبة لعزلة الحليب (نسبة القتل 37.5 %) . اما اضافة الدارئ فقد قلل أيضا من قتل خلايا البروسيلا ، اذ كانت اعداد البروسيلا البشرية 5.8 مرات بقدر المعاملة النظيرة من المعاملة الاولى (نسبة القتل 17.2 %) و اعداد عزلة الحليب 7 اضعاف الاعداد (نسبة القتل 13.5 %)التي ظهرت في المعاملة الاولى عند انتهاء مدة التخمر .

الكلمات المفتاحية: *Brucella melitensis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* , *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* , Zoonosis

المقدمة

ينتمي جنس البروسيلا الى عائلة Brucellaceae التي تندرج تحت القسم α2 Proteobacteria ذات المعيشة التطفلية (1) ويضم الجنس مجموعة من الانواع منها *B. melitensis* و *B.abortus* و *B. suis* و *B. canis* وتسبب هذه الانواع امراض مشتركة بين الحيوان والانسان (Zoonosis) اذ تنتقل الى الانسان بطريقة مباشرة عن طريق التعامل المباشر مع الحيوانات المصابة من خلال الجروح والخدوش او عن طريق الجهاز التنفسي ، وبطريقة غير مباشرة بواسطة الاغذية الملوثة بهذه البكتريا مثل الحليب الخام ومنتجاته مسببة حمى مالطا او الحمى المتموجة عند الاشخاص التي يطلق عليها بشكل عام Brucellosis (2) وهي واسعة الانتشار وخاصة في الدول النامية ودول الشرق الاوسط نظرا لغياب الوعي الصحي وانتشار العادات القديمة والمتضمنة استهلاك حليب الاغنام والماعز والأبقار الخام ومنتجاته بدون معاملة حرارية لضمان صحة هذه المنتجات (3) . يعد النوع *B. melitensis* من انواع بكتريا البروسيلا الاكثر ضراوة في احداث المرض ، اضافة لصعوبة علاج المرض الذي تحدثه نظرا لقدرته على مقاومة طيف واسع من المضادات الحيوية المختلفة ، فضلا عن موقعها داخل الخلايا الجسمية والذي يعطيها حماية اضافية من التعرض للمضادات الموجودة خارج هذه الخلايا (4) وقد ظهرت حديثا توجهات جديدة للوقاية من حمى مالطا والمتضمنة استخدام بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria ، تنتج هذه البكتريا بعض المواد القاتلة للمكروبات مؤدية الى حفظ البيئة التي حولها ومن ضمنها انتاج المواد القاتلة ، مثل البكتريوسينات (Bacteriocines) وكذلك خفض الرقم الهيدروجيني (pH) بفعل انتاج حامض اللاكتيك وتغيير طبيعة الوسط ولذلك استخدمت للاغراض العلاجية واستعمالت في توجهات Biopreservation (5) فضلا عن تداخلها مع الجهاز المناعي البشري وتحويره (6

*قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية /كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / العراق

7). لذلك فقد تناولت هذه الدراسة ايجاد نوع العامل المؤثر في حيوية بكتريا *B. melitensis* في اللبن (Yogurt) اثناء مرحلة التحضين (ثلاث ساعات) لغرض التوجه نحو انتاج منتجات حليب اكثر أمنا من الاصابة بمرض حمى مالطا والأمراض الاخرى التي تنتقل عن طريق الحليب ومنتجاته .

مواد وطرائق العمل

عزل بكتريا البروسيلا وتشخيصها : اخذت عينات دم من 30 مريض ظهرت عليهم اعراض الحمى المتموجة واعطى مصلهم تفاعلا ايجابيا في اختبار Rosebengal (شركة LABKIT \ الاسبانية) وحقنت عينات الدم في انابيب حاوية على وسط نقيع القلب والمخ (8) . وجمعت 22 عينة حليب من اغنام عانت الاجهاض واعطت امصالها نتيجة موجبة في اختبار الروزبنكال من مناطق حول مدينة الموصل وعزلت وفق طريقة Collee واخرون (9) باستخدام وسط اكار فاريل المحور Modified Farrell's medium (وسط انتخابي) ، شخصت العزلات التي تم الحصول عليها حسب طريقة Koneman واخرون (10) و Alton واخرون (11) بأستعمال الفحوص الكيموحيوية .

تم انتخاب عزلتين الاولى من المصدر البشري والثاني من حليب الاغنام المصابة وحضر مستنبت بكتيري للعزلات المشخصة بزرع العزلات في وسط مرق البروسيلا Brucella broth لغرض استخدامها في خطوات التجربة اللاحقة .

تحضير الحليب الملقح بالبكتريا واجراء المعاملات : اخذ حليب اغنام وعومل حراريا على درجة 85°م لمدة 30 دقيقة وبرد الى درجة حرارة 42°م ثم اضيف اليه 2.5 % من مزرعة سائلة لبكتريا البروسيلا ومن ثم قسم الحليب الملقح بالبكتريا الى ثلاث اجزاء : المعاملة الاولى اضيف للحليب بادئ لبن مختلط من *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* بنسبة (1 : 1) المجهز من معمل البان الموصل بنسبة بادئ 2 % ، اما الجزء الثاني اضيف له بادئ اللبن مع اضافة دارئ للحفاظ على الرقم الهيدروجيني من الانخفاض (شركة BDH Ltd. البريطانية) ، والجزء الثالث اضيفت بكتريا البروسيلا فقط للحليب وتم تخفيض الرقم الهيدروجيني تدريجيا باضافة حامض اللاكتيك اثناء مدة التحضين لغرض خفض الرقم الهيدروجيني للحليب . ثم حضنت المعاملات بدرجة حرارة 42°م ولمدة ثلاث ساعات مع اخذ نماذج لمتابعة عدد بكتريا البروسيلا في الحليب باستخدام وسط اكار فاريل المحور وقياس الرقم الهيدروجيني باستخدام جهاز pH-meter . اجريت التجربة ثلاث مرات وبواقع مكررين لكل مؤشر .

التحليل الاحصائي : تم حساب معامل الارتباط Correlation coefficient (r) لبعض العلاقات (12) .

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج التشخيص العزلات التي تم الحصول عليها من المصادر البشرية او حليب الاغنام المصابة الى انها تعود الى النوع *B. melitensis* وقد اطلق على المعزولة من الانسان بالعزلات البشرية والاخرى عزلات الحليب ، واستعملت عزلة واحدة من العزلات البشرية و واحدة من عزلات الحليب لاجراء الدراسة الحالية ، ويبين الجدول (1) الاختبارات التشخيصية لكلا العزلتين المنتخبتين .

جدول (1) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا البروسيلا للعزلة البشرية وعزلة الحليب

نوع الاختبار		العزلة البشرية	عزلة الحليب
اختبار الاوكسديز	Oxidase test	+	+
اختبار الكتاليز	Catalase test	+	+
الاحتياج لغاز ثنائي اوكسيد الكاربون	CO_2	-	-
انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين	H_2S production	-	-
اختبار اليوريز	Urease test	-	-
النمو بوجود صبغة الفوكسين القاعدي بتركيز	Basic fuchsin 20 µg/ml		+ +
النمو بوجود صبغة الثايونين بتركيز أ.	20 µg/ml		+ +
ب.	40 µg/ml		+ +
تحلل الدم	Hemolysis on blood Agar	+α	-
اختبار الاندول	Indol test	-	-
اختبار احمر المثيل	Methyl red test	-	-
اختبار فوكس بروسكور	Voges – Proskauer test	-	-
اختبار استهلاك السترات	Citrate utilizing test	-	-
اختبار اختزال النترات	Nitrate reduction test	+	+
اختبار حليب زهرة الشمس	Litmus milk test	-	-
اختبار اسالة الجيلاتين	Gelatin liquefying test	-	-
اختبار الحركة	Motility test	-	-

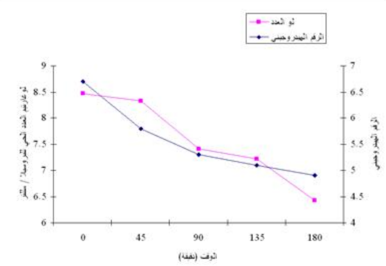
تمتاز معظم انواع جنس *Brucella* بقابليتها للتأقلم مع الظروف المجهدة التي تتعرض لها سواء عند وجودها في البيئة الطبيعية (الخارجية) او داخل الخلايا الابتلاعية (Macrophages) (13) ، ومن اهمها انخفاض الرقم الهيدروجيني (14) . وقد اجريت الدراسة الحالية على بكتريا *Brucella melitensis* من مصدرين مختلفين وهي السلالة البشرية المعزولة من الانسان واخرى معزولة من حليب اغنام اصيبت بالبكتريا وادى الى اجهاضها . وكان الهدف من الدراسة هو التعرف على نمط بقاء السلالتين عند انتاج اللبن من حليب الاغنام باستعمال بادئ اللبن التقليدي المكون من *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (بنسبة 1 : 1) ويوضح الشكل (1) نمط بقاء بكتريا البروسيلا البشرية وكذلك تغير الرقم الهيدروجيني على مدى مدة التخمر 180 دقيقة ، ويلاحظ ان الرقم الهيدروجيني انخفض الى 4.9 ، وعدد خلايا البروسيلا قد انخفض الى اكثر من دورتين لوغارتميتين ووصلت نسبة القتل الى 99.1 % بالنسبة للعزلة البشرية والى 98.96 % بالنسبة لعزلة الحليب شكل (2). وكان معامل الارتباط بين مدة الحضن وانخفاض الرقم الهيدروجيني عالي و سالب القيمة (r = - 0.945) والارتباط بين مدة الحضن والاعداد الحية كان عاليا ايضا (r = - 0.974) شكل (1) ، اما معاملات الارتباط بالنسبة لعزلة الحليب فان معامل الارتباط بين المدة وانخفاض الرقم الهيدروجيني (r= - 0.945) والارتباط بين المدة وانخفاض الاعداد الحية (r = - 0.968) شكل (2) ، والانخفاض في الارقام الهيدروجينية يكون بشكل كبير نتيجة لفعالية بكتريا البادئ (15) .

ولدراسة تاثير الحامض مثل حامض اللاكتيك (بشكل رئيس) في نمط بقاء سلالات البروسيلا ثم تلقيح الحليب باعداد من خلايا البروسيلا فقط وحضنها بدرجة حرارة 42 ْم ، ثم تم تخفيض الرقم الهيدروجيني بالتدريج على مدى 180 دقيقة بنمط مشابه لانخفاض الرقم الهيدروجيني بتاثير بكتريا البادئ الموضحة في الاشكال (1) و (2) ، والنتائج موضحة في الشكل (3) بالنسبة للعزلة البشرية والشكل (4) بالنسبة لعزلة الحليب . ويلاحظ انه عند نهاية مدة الحضن كانت اعداد خلايا البروسيلا في الحليب المضاف اليه حامض اللاكتيك هي حوالي ثلاث اضعاف الاعداد المتبقية عند استعمال البادئ (المعاملة الاولى) ، اذ كانت الاعداد في الحالة الاولى (حليب + بكتريا البادىء) 8.3×10^{6} وحدة تكوين المستعمرات (CFU) \مللتر وفي الحالة الثانية 2.68×10^{6} وحدة تكوين المستعمرات (CFU) \ مللتر (في حالة السلالة البشرية) ، اما بالنسبة لعزلة الحليب فكانت اعداد الخلايا في الحليب الخالي من البادئ والمحمض بحامض اللاكتيك حوالي 1.6 مرة . وقد درست امكانية التخفيف من تاثير الحوامض وانخفاض الرقم الهيدروجيني في اعداد البروسيلا الحية على مدى مدة الحضن وذلك باضافة الدارئ الى المزارع الحاوية على بادئ اللبن وبكتريا البروسيلا ، والتاثير موضح في الشكل (5) ، والملاحظ ان اضافة الدارئ قد ادى الى الحفاظ على الرقم الهيدروجيني 6.1 ، في حين ان عدم وجود الدارئ قد سمح بانخفاض الرقم الهيدروجيني الى 4.9 في نهاية مدة الحضن(المعاملة الاولى) . وقد سجلت الاعداد الحية للبروسيلا ومدى بقائها كما موضح في الشكل (6) بالنسبة للعزلة البشرية والشكل (7) لعزلة الحليب . ويلاحظ ان وجود الدارئ قد خفف من نسبة القتل للسلالتين ، اذ كانت اعداد السلالة البشرية حوالي 5.8 مرة بقدر اعدادها عند غياب الدارئ في نهاية مدة الحضن (2.68×10^{6} الحالة الطبيعية و15.6×10^{6} بوجود الدارئ) . اما وجود الدارئ فقد ادى الى زيادة اعداد سلالة الحليب بـ 7 مرات عن نظيرتها عند غياب الدارئ (2.81×10^{6} الحالة الطبيعية و 19.8×10^{6} بوجود الدارئ) . وعند الاخذ بنظر الاعتبار تساوي الارقام الهيدروجينية ولكن بوجود بادئ اللبن وعدم وجوده يمكن مقارنة النسبة المئوية للقتل عند الرقم الهيدروجيني 6.1 الذي تمت المحافظة عليه بوجود الدارئ (الشكل 5) ، يمكن مقارنة نسبة القتل الموضحة في الشكل (8) .

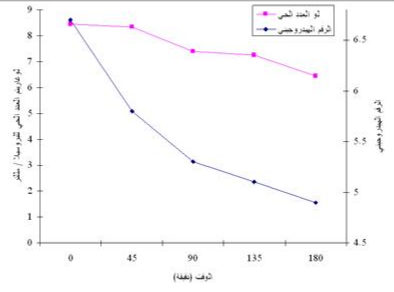
ومن هذه النتائج يتضح ان الرقم الهيدروجيني يشارك بالنسبة الاكبر من قتل الخلايا وتشير الدراسات الى ان خلايا البروسيلا يمكن ان تتحمل الارقام الهيدروجينية الاوطأ من المستعملة في هذه التجربة (14) . ولكن في الدراسة الحالية كان هناك اكثر من عامل اجهاد مسلط على الخلايا ، ومنها ارتفاع درجة حرارة الحضن 42 ْم المستعملة لانتاج اللبن ، اضافة الى وجود خلايا البادئ واعداد كبيرة من بكتريا البروسيلا مما يؤدي الى حث ظاهرة تحسس الزحام Quorum sensing . كل هذه الاجهادات Stresses تؤدي الى دخول الخلايا طور الركود Stationary phase من حيث النمو والتكاثر ، كما ان انخفاض الحموضة يؤدي الى دخول الخلايا طور الركود مبكرا (14) . والمتوقع ان يتوقف نمو البروسيلا تحت الظروف المطبقة في الدراسة الحالية فقد وجد ان خلايا بعض انواع البروسيلا الاخرى تتحلل عند انخفاض الرقم الهيدروجيني (14) . كما ان الخلايا المجهدة وتحت الظروف المطبقة تلجأ الى تغيير نمط فعالياتها الحيوية فالمتوقع عند ارتفاع الحرارة تقوم الخلايا بتخليق البروتينات الوصفية Chaperones مثل البروتينات Dnak و GroEL وغيرها (16) وقد سجل انتاج Dnak في البكتريا *B.*

melitensis تحت اجهاد الحموضة أي ان هذا البروتين الوصيف يشارك في ايض الاجهاد الحراري والحموضة ، فضلا عن ان اجهاد الحموضة يؤدي الى تخليق بروتينات صدمة الحامض Acid shock proteins ضمن ظاهرة الاستجابة التطبيعية للحامض Acid (ATR) tolerance response التي تكون ضرورية لبكتريا البروسيلا التي تعيش في الاجسام الابتلاعية Phagosomes في الخلايا الابتلاعية ذات المحيط الحامضي (16) ومنها Asp24 و Asp60 (17) . ومثل هذه الاجهادات تؤدي الى تعثر النمو وربما موت الخلايا . ومن جهة ثانية اشارت العديد من الدراسات الى ان اسباب الاصابة بالبروسيلا تاتي بشكل رئيس من تناول منتجات الالبان غير المعقمة مثل الحليب الخام او الاجبان المصنعة من حليب حيوانات مصابة (18 ، 19 ، 20) . اما تاثير بكتريا حامض اللاكتيك فان تاثيرها في البروسيلا يكون مختلفا فقد سجل فعل تثبيطي لها في البروسيلا (21 ، 22 ، 23) بشكل متفاوت يعتمد على مصدر عزل بكتريا حامض اللاكتيك . وبكتريا بادئ اللبن التقليدي *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *S. salivarius* subsp. *thermophilus* لم يسجل لها عدد كبير من البكتريوسينات ، والمنتجة منها تكون ضعيفة التاثير (24 ، 25 ، 26) ، وانما تستعمل هذه الاحياء اعتمادا على الاغراض الصناعية والاقتصادية في انتاج الالبان .

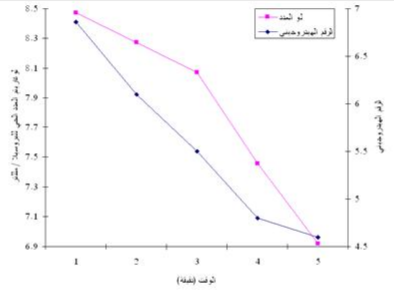
ويستنتج من الدراسة اعلاه ان الحليب المتخمر يمكن ان يكون امين الاستعمال وان اشارت الدراسة الى وجود مايقرب من 10^6 وحدة تكوين المستعمرات \ مللتر عند نهاية مدة التخمر و من المتوقع ان عملية الخزن المبرد التي تعقب عملية التخمر التي تجرى اثناء تصنيع اللبن يمكن ان تقضي على اعداد اخرى (27) . فضلا عن ان الدراسة الحالية كانت تركز على وجود اعداد كبيرة من البروسيلا التي اضيفت بمستوى10^8ومثل هذه الاعداد لايتوقع ان توجد في المواد الخام فضلا عن ان الحليب الخام المعد لانتاج اللبن يبستر او يعامل حراريا لاغراض كثيرة غير التخلص من الاحياء المجهرية (28) والتي تؤدي الى التخلص من البروسيلا في حالة وجودها في الحليب خاصة من الحيوانات المصابة ولا بد من الاشارة الى انه يمكن ان يتلوث الحليب بعد المعاملة الحرارية عند اعداده في اواني غير معقمة وغير نظيفة وخاصة في المناطق الريفية التي يغيب فيها الوعي الصحي .



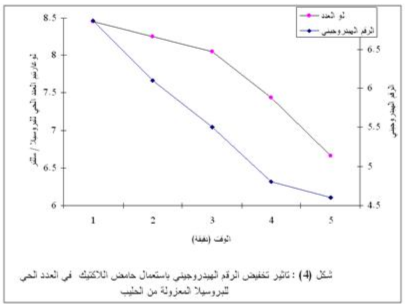
شكل (1) : نمط بقاء وتغيير الرقم الهيدروجيني للعزلة البشرية عند تخمر الحليب باستعمال البادىء التقليدي لانتاج اللبن



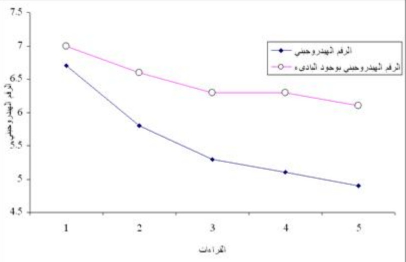
شكل (2) : نمط بقاء وتغيير الرقم الهيدروجيني لعزلة الحليب عند تخمر الحليب باستعمال بادىء اللبن التقليدي



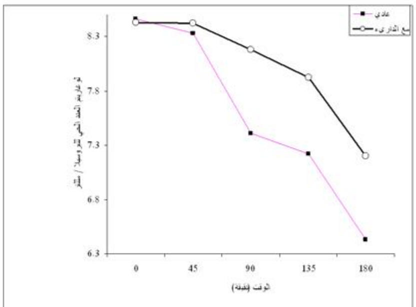
شكل (3) : تاثير تخفيض الرقم الهيدروجيني باستعمال حامض اللاكتيك في بقاء العزلة البشرية



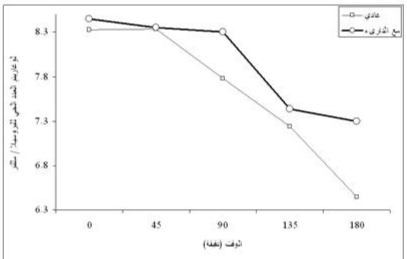
شكل (4) : تاثير تخفيض الرقم الهيدروجيني باستعمال حامض اللاكتيك في العدد الحي للبروسيلا المعزولة من الحليب



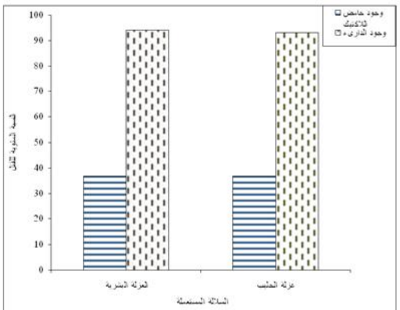
شكل (5) : تاثير اضافة الدارىء في الرقم الهيدروجيني للمزارع



شكل (6) تاثير اضافة الدارىء في الاعداد الحية للبروسيلا البشرية على مدة الحضن



شكل (7) تاثير اضافة الدارىء في اعداد الحية للبروسيلا المعزولة من حليب الاغنام على مدى مدة الحضن



شكل (8) : النسبة المئوية للقتل للبروسيلا عند وجود حامض اللاكتيك لوحده ووجود البادىء عند تساوي الارقام الهيدروجينية (6.1)

المصادر:

1. Celli, J. , Chastellier, C. , Franchini, D. , Pizarro – Cerda, J. , Moreno, E. and Gorvel, J. 2003 . *Brucella* evades macrophage killing via VirB dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. 198 : 545 – 556 .
2. Billard , E., Dornand , J. and Gross , A. 2007 . *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion . Infect. Immun. 75:4980-4989 .
3. Al-Anazi , K.A. and Al-Jasser , A.M. 2007. *Brucella* bacteremia in patients with acute leukemia : a case series . J. Med. Cas. Repor. 1:144-148 .
4. Turkmani , A., Ioannidis , A., Christidou , A., Psaroulaki , A., Loukaides , F. and Tselentis , Y. 2006 . *In vitro* susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics . Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobials 5 : 24-28 .
5. Stiles , M.E. 1996 . Biopreservation by lactic acid bacteria . Antonie Van Leeuwenhock 70:331-345 .
6. Reid , G., Jass , J., Sebulsky , M.T. and McCormick , J.K. 2003 . Potential uses of probiotics in clinical practice . Clin. Microbiol. Rev. 16:658-672 .
7. Gill , H.S. and Guarner , F. 2004 . Probiotics and human health : a clinical perspectives . Postgraduate Med. J. 80 : 516-526 .
8. Vandepitte, J. , Engbaek, K. , Piot, P. and Heuck, C. C. 1991 . Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology . World Health Organization, Geneva . p 35 – 41 .
9. Collee, J. G. ; Fraser, A. G. ; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996) Practical Medical

brucellosis in Ghardaia (Algeria) . Inst. Pasteur. Algeria 55 : 9-14 .
19. Abu Shagra , Q.M. 2000 . Epidemiological aspects of brucellosis in Jordan . Eur. J. Epidemiol. 16 : 581-584 .
20. Kasimoglu, A. 2002 . Determination of *Brucella spp.* in raw milk and Turkish white cheese in kirikkale, Deutsche, Tiearztliche, Wochenschrift 109 : 324-326 .
21. Al-Khafaji , Z.M., Nakash , A.F. and Al-Kareemi , K.K. 2002 . I . Study of yoghurt lactic acid bacteria effect towards cheese *Brucella* in an attempt to produce safe soft cheese . J. Al-Buhooth Al-Tachaniya. 1: 63-69 .
22. Al-Khafaji , Z.M., Al-Kareemi , K.K. and Nakash , A.F. 2002 . II . Effect of raw milk lactic acid bacteria against *Brucella* cheese . J. Al-Buhooth Al-Tachaniya. 1: 51-57 .
23. Al-Khafaji , Z.M. , Al-Kareemi , K.K. and Nakash , A.F. 2003 . Antagonism of cheese lactic acid bacteria towards *Brucella* isolated from cheese . J. Al-Buhooth Al-Tachaniya . 2: 54-60 .
24. Lindgren , S. E. and Dobrogosz , W. J. 1990 . Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation . FEMS Microbiol. Rev. 87:149-164.
25. Klaenhammer , T.R. 1993 .Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria . FEMS Microbiol. Rev. 12:39-86 .
26. Nes , L.F., Diep , D.B. , Havarsten , L.S., Brurberg , M.B., Eijsink ,V. and Holo , H. 1996 . Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria . Antonie Van Leeuwenhoek .70:113-128 .
27. Zuniga-Estrada , A. , Mota , G.L., Sanchez , M.M., Santos ,L.E . , Filardo , K.S. and Lopez , M.A. 2005 . Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt Microbiology, 14th ed. , Churchill Livingstone Inc. , New York . p 473 – 478 .
10. Koneman, E. W. , Allen, S. D. , Dowell, V. R. , Jando, W. M. , Sommer, H. A. and Winn , W. C. 1997 . Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th ed. , J. B. Lippinaott Comp. , Philadelphia , USA . p 431 – 437 .
11. Alton, G. G. , Jones, L. M. , Angus, R. D. and Verger, J. M. 1988 Techniques for the brucellosis laboratory, INRA. Paris . p40 – 55 .
12. Steel , R.G. and Torrie , J.H. 1980 . Principles and Procedures of Statistics . McGraw-Hill , New York .
13. Sangeri , F.J. and Aguero , J. 1996 . Molecular basis of *Brucella* pathogenicity : an update . Microbiol. 12 : 207-218.
14. Kulakov , Y.K. , Guigue , T.P. , Ramuz , M.R. and O'Callaghan , D. 1997 . Response of *Brucella suis* 1330 and *B. canis* RM6166 to growth at acid pH and induction of an adaptive acid tolerance response . Res. Microbiol. 148:145-151 .
15. Mckay , L. L. and Baldwin , K. A. 1990 . Application for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria . FEMS Microbiol. Rev . 87:3-14.
16. Teixeira-Gomes, A. P. , Cloeckaert, A. and Zygmunt, M. S. 2000 . Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis* . Infect. Immun. 68 : 2954-2961 .
17. Lin, J. and Ficht, T. A. 1995 . Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection . Infect. Immun. 63 : 1409 -1414 .
18. Cherif, A. ; Benelmouffok, A. and Doudou, A. (1987) Consumption of goat cheese and human

Technology . Program Press: Oxford . pp 431 .

starter culture . Rev. Latinoam Microbiol. 47:88-91 .

28. Tamime , A.Y. and Robinson , R. 1985 . Yoghurt : Science and

Influence of *Brucella melitensis* Viability by the Activity of Classical Yoghurt Starter During Milk Fermentation

Tariq Z. I. Al-Azzawy

*Food Science and Biotechnology Dept. , College of Agric. and Forestry , Mosul Univ. , Iraq

Abstract :

Brucella melitensis isolates were obtained from human infections , and milk which obtained from aborted sheep at Mosul city vicinity . One isolate from each source was used in carrying out this study. *Brucella* liquid culture was added to sheep milk at 2.5 % for treatments . To first treatment 2 % of yoghurt starter (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (1: 1)) . Second treatment was carried out without addition of yoghurt starter but the pH was lowered using lactic acid in pattern similar to first treatment . Third treatment was similar to the first treatment but contained buffer to alleviate the reduction in pH , which reduced to 6.1 in comparison to 4.9 of the first treatment .

Results showed that there was a parallel reduction in pH value and *Brucella* number with correlation coefficient of (r = -0.945) for human isolate , and (r = -0.974) for milk isolate . Addition of lactic acid with out starter led to decrease the killing of *Brucella* as the resulted numbers were three folds higher than the corresponding treatment of human isolate (67.7 % killing) and 1.6 times for milk isolate (37.5 % killing) . Addition of buffer reduced the killing percentage of *Brucella* and the viable count of *Brusella* , and it was 5.8 times the corresponding first treatment (17.20% killing), while the milk isolates was 7 times (13.5 % killing) at the end of fermentation process .