

تقدير الهستامين في بعض الأغذية المحلية وتحديد جينات الهستدين (*hdc*) وتتابعاتها في البكتيريا المعزولة منها ودورها في تراكم الهستامين**ملخص الأطروحة:**

استُعملت تقنية ELISA في الدراسة الحالية لتقدير الهستامين من عضلات عدة أنواع من الأسماك الطازجة منها سمكة الصبور والحمام والخباط والضلعة فضلاً عن الروبيان ووجد أن معدل الهستامين فيها كان ٤.٤٨٣ و ٣.٩٥٣ و ٣.٣٥٣ و ٣.١٦ و ٢.٠٣ ملغم/كغم على التوالي كما استُعملت تقنية ELISA لتقدير الهستامين في الأجبان المنضجة الشيدر والكودا والموزيرلا والأيدام وجبن Hajdu المدخن وأن معدل الهستامين فيها كان 4.267 و 2.433 و 1.167 و 3.667 و 1.833 ملغم/١٠٠ غم على التوالي. تم عزل أجناس البكتيريا وتشخيص أنواعها من الأسماك والروبيان وهي *K.pneumonia sub. pneumonia* و *M.morganii sub.Morganii* و *E.aerogenes* و *P.marina* و *E.cloacae* و *S.fonticola* و *S.marcescens* و *E.coli* و *H.alvei* و *C.amalonaticus* و *C.freundii* و *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *E.taylorae* و *C.sakazakii* و *V.alginolyticus* و *V.vulnificus* و *V.diazotrophicus* و *V.hollisae* و *V.cholera* و *V.parahaerolyticus* و *V.fluvialis* و *L.helveticus* و *L.crispatus* و *L.gasseri* و *L.reuteri* و *L.rhamnosus* و *L.johnsonii* و *L.salivarius* و *P.aeruginosa* و *P.fluorescens* و *S.saprophyticus* و *S.aureus* و *S.intermedius* و *S.epidermidis* و *A.encheleia* و *A.veronii* و *A.eucrenophila* و *A.sobria* و *A.veronii bv.veronii* و *A.caviae* و *B.alvei* و *B.firmus* و *B.licheniformis* و *B.pumilus* و *B.subtilis* وتم تشخيص بكتيريا *Lactobacillus* المعزولة من الأسماك والروبيان والأجبان المنضجة بصورة ١٠٠% باستعمال تقنية (PCR) بالاعتماد على 16S rRNA للبكتيريا باستعمال واسمات للأنواع المختلفة وتم تحديد الجينات المشخصة لكل منها *L.acidophilus* و *L.plantarum* و *L.delbrueckii* و *L.fermentium* و *L.helveticus* و *L.crispatus* و *L.gasseri* و *L.reuteri* و *L.rhamnosus* و *L.paracasei* و *L.johnsonii* و *L.salivarius* و *L.casei* كما استُعملت ٩ واسمات في تقنية RAPD لمعرفة الارتباط الجيني بين السلالات بكتيريا *Lactobacillus* وبينت النتائج إن عدد الحزم العشوائية وموقعها قد اختلفت في بعض الأنواع البكتيرية وأخرى قد تطابقت معها وأنتجت مجموعة من السلالات البكتيرية عدداً من الحزم كما أمكن الحصول على مجموعة من التشكيلات الوراثية المختلفة ما بين عزلات بكتيريا *Lactobacillus* وأوضحت النتائج المتحصل عليها من تقنية RAPD أن عدد الحزم الكلية كانت ٦٣٠ حزمة وعدد الحزم الكلية المتشكلة وراثياً كانت ١٢٧ حزمة وأن نسبة التباين الوراثي الكلي بين العزلات بلغت ٢٠.١٥% وأظهرت نتائج تضخيم الجينات المسؤولة عن إنتاج الهستامين *hdc* للبكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام المعزولة من الأسماك والأجبان المنضجة وعددها 53 بكتيريا ووجدتها في 46 بكتيريا فقط وتم استعمال الواسمات HIS1-F/HIS1-R و *JV17HC/JV16HC* و *Hdc-f/Hdc-r* و *106/107* و *UNI-R/UNI-L* في عملية التضخيم. وضخم الواسم *JV17HC/JV16HC* وحجم الجين (*hdcA*) كان ٣٥٠ زوجاً قاعدياً وتم تضخيم الجين في البكتيريا الموجبة لصبغة كرام فقط والمعزولة من الأسماك والروبيان والأجبان المنضجة. وضخم الواسم HIS1-F/HIS1-R وحجم الجين (*hdcA*) كان ٣٥٥ زوجاً قاعدياً وهي قريبة لنتيجة الواسم *JV17HC/JV16HC* وضخم هذا جين في معظم البكتيريا المعزولة الموجبة لصبغة كرام أيضاً. وضخم الواسم *Hdc-f/Hdc-r* لجين المنتج للهستامين (*hdcP*) وأن حجم الجين كان 709 زوج قاعدي وضخم الجين في البكتيريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من عينات الأسماك والروبيان كما تم تضخيم الواسم 106/107 لجين الهستامين للبكتيريا السالبة لصبغة كرام فقط والمعزولة من العينات وحجم الجين ٥٣٠ زوجاً قاعدياً. إما الواسم UNI-R/UNI-L لجين الهستامين فإنه لم يتم تضخيمه في البكتيريا المعزولة من الأسماك والروبيان والأجبان المنضجة. أظهرت نتائج تتابعات الجينات المنتجة للهستامين والتي تم تضخيمها بتقنية البيولوجيا الجزيئية لمعرفة تسلسل القواعد النايتروجينية لها تطابقاً بنسبة (٨٥ - ١٠٠)% للجينات الموجودة في Gene Bank وتم استخلاص البلازميدات من البكتيريا المعزولة وقد أظهرت النتائج إن العزلات امتلكت أنواعاً مختلفة من الحزم البلازميدية (صغيرة وكبيرة الحجم) ولم يتم الكشف عن وجود الجينات المسؤولة عن إنتاج الهستامين بتقنية PCR في بلازميدات البكتيريا المعزولة إذ لم يتم تضخيم أي نوع من الواسمات المستعملة وهذا يدل على وجود الجينات المنتجة للهستامين على جينوم البكتيريا وليس على بلازميدات البكتيريا المعزولة.

Dept.:Food science

Certificate: P.H.D.

Name of supervisor : A.P.Dr.Kithar.R.Majeed A.P.Dr.Talib A.Jaayid

Specilization: Food Science (Genetic Engineering)

Estimation of histamine in some local food and detection of histidine genes (*hdc*) and sequences it from some bacteria and role it's in accumulation of histamine**Abstract of Thesis:**

ELISA technique was used to estimate of histamine in muscles of several types of local fresh fish, including fish: *Tenualosa ilisha*, *Megalaspis cordyla*, *Chirocentrus dorab* and *Scomberoides commersonianus* in addition of the shrimp *Metapenaeus affinis*. The rate of histamine were 4.483 and 3.953 and 3.353 and 3.16 and 2.03 mg/kg respectively. And estimate of histamine in Ripening cheese such as cheddar, Alkuda, Almoszerla and Oloadam cheese and smoked Hajdu. Results found that the rates of histamine were 4.267, 2.433, 1.167, 3.667 and 1.833 mg /100 g respectively. The isolation bacteria were found as a follow : *K. pneumonia sub. pneumonia*, *K. oxytoca*, *M.morganii sub. Morganii*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *C.sakazakii*, *E.taylorae*, *C. freundii*, *C. amalonaticus*, *P.marina*, *P.vulgaris*, *P.mirabilis*, *H.alvei*, *E.coli*, *S.marcescens*, *S.fonticola*, *V.vulnificus*, *V.diazotrophicus*, *V.hollisae*, *V.alginolyticus*, *V.cholera*, *V.parahaerolyticus*, *V.fluvialis*, *L.helveticus*, *L.crispatus*, *L.gasseri*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus*, *L.johnsonii*, *L.salivarius*, *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *S.saprophyticus*, *S.aureus*, *S.intermedius*, *S.epidermidis*, *B.pumilus*, *B.licheniformis*, *B.firmus*, *B.subtilis*, *B.alvei*, *A.caviae*, *A.veronii bv.veronii*, *A.eucrenophila*, *A.sobria*, *A.veronii*, *A.encheleia*, *L.plantarum*, *L.delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus paracasei*. Polymerase chain reaction (PCR) technique was used for identification all isolated of *Lactobacillus* bacteria which was isolated from fish and shrimp, as well as ripening cheese depending on the bacterial 16S rRNA gene sequences of bacteria with using several different types of diagnosed primers have been identified for each of the bacteria : *L.acidophilus*, *L.plantarum*, *L.delbrueckii*, *L.fermentium*, *L.helveticus*, *L.crispatus*, *L.gasseri*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus*, *L.paracasei*, *L.johnsonii*, *L.salivarius* and *L.casei*. Used 9 primers in RAPD technique to find out the genetic link between different strains of *Lactobacillus* bacteria, the results showed that the number and location of randomized bands may differ in some bacterial species and other has fit with it's and produced a variety genetic of bacterial strains, in particular a number of bands as possible to get a variety of different genetic profiles among *Lactobacillus* isolates. The results obtained from RAPD technique showed that the total number of bands were 630 bands and the total number of bands formed genetically was 127 and the total proportion of genetic variation among the isolates amounted to 20.15%. All fifty three isolates of bacteria which isolated from fish, shrimp and ripening cheeses that producing and did not producing histamine subjected to amplified genes which responsible of the histamine production by using the primers HIS1-F/HIS1-R ; *JV16HC/ JV17HC* ; *Hdc-f/ Hdc-r* ; *106/107* and *UNI-L/ UNI-R*. Amplification results showed that all primers used to amplified genes of histamine gene different genes sizes depending on the types of bacteria when were positive or negative to Gram stain and their Origen It was found the size of the gene was 350 base pairs, was found in G⁺ bacteria which isolated from fish, shrimp and cheese ripening. same results were found when amplified HIS1-R/HIS1-F primer, the size of histamine gene most positive Gram bacteria stain. High size of histamine gene 709 base pair appeared when amplified *Hdc-r/ Hdc-f* primer. However, the size of histamine gene was 530 base pairs, when amplified *106/107* primer, the gene was found in most G⁻ bacteria. On the other hand, the *UNI-L/UNI-R* primer did not amplify in all isolates of bacteria which isolated from fish, shrimp and ripening cheeses. Results of sequences of histidine gene rate of semilarity(85-100%) comparing with the genes of Gene Bank. Extraction of plasmids from all isolated bacteria was done. Results showed that isolates have different types of plasmids bands (small and large size) and when the electric deportation of the genetic material of plasmids on gel agarose while some other isolates appeared possess one plasmid.