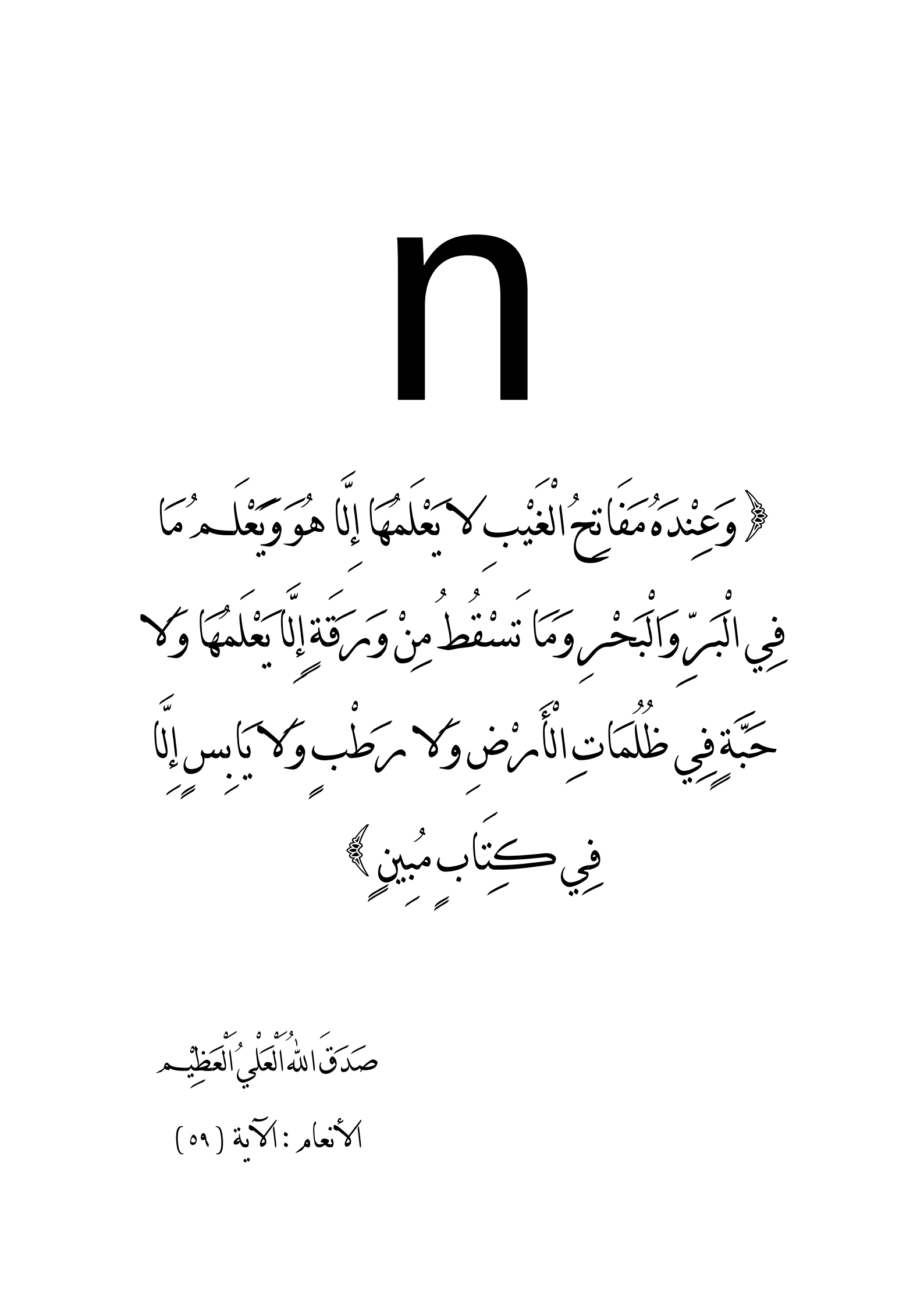
دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Bacillus cereus* المعزولة من بعض الأغذية

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية العلوم – جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم
في علوم الحياة / التقنيات الأحيائية

من
ذكرى عبد العالي الكعبي

ذو القعدة ١٤٢٦ **كانون الأول ٢٠٠٥**



﴿ وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يَعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ مَا
فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا تَسْقُطُ مِنْ وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا
حَبَّةٍ فِي ظُلُمَاتِ الْأَرْضِ وَلَا رَطْبٍ وَلَا يَابِسٍ إِلَّا
فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴾

صَدَقَ اللهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

الأنعام : الآية (٥٩)

توصية الأستاذين المشرفين

نشهد أن إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / التقنيات الأحيائية .

التوقيع :
المشرف : د. سامرة يونس يوسف
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
قسم التقنيات الأحيائية / كلية العلوم
جامعة بغداد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
المشرف : د. حسن فاضل ناجي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة بابل
التاريخ : / / ٢٠٠٦

توصية رئيس القسم

إشارة إلى التوصية أعلاه المقدمة من قبل الأستاذين المشرفين ، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :
الاسم : د. كريم حميد رشيد
المرتبة العلمية : أستاذ
رئيس قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة بابل
التاريخ : / / ٢٠٠٦

قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة نشهد أننا قد اطلعنا على هذه الرسالة ، وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ ١١ / ٤ / ٢٠٠٦ ووجدنا أنها جديرة بالقبول بتقدير ( ) لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / التقنيات الأحيائية .

التوقيع :
رئيس اللجنة : عدنان مهران أوانيس
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة : عبد الله كاظم هندي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة : عبد الكريم عبد الرزاق القزاز
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة (المشرف) : سامرة يونس يوسف
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

التوقيع :
عضو اللجنة (المشرف) : حسن فاضل ناجي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / ٢٠٠٦

مصادقة عمادة كلية العلوم / جامعة بابل
أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :
الاسم : عودة مزعل الزاملي
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : / / ٢٠٠٦

الإهداء

إلى الخيمة التي أظلتني صغيراً وآوتني كبيراً . . . والدي .

إلى مدرستي الأولى وجذري الذي روانـي من مكرماته وأودعني كلَّ سماته وصفاته ، فلذةُ كبدي ، روحي وجسدي ، يُنبوع الحنان وسرُّ الأمان ، ساكنةُ العقلِ والجَنان ، حبّي الصادق ولساني الناطق ، نوري

الـدائم وحارسـي القاعـد القـائم ، ملهمتـي دومـاً لا يومـاً ، وكلمتي التي لا أمَلُّ ترديدها . . . أُمّي .

إلى الذين أحاطوني بالحب والحنان ، نعمة السماء . . . أخوتي .

أُهدي ثمرة جهدي البسيط والمتواضع .

ذكرى

شكر وتقدير

الحمد لله على ما عرَّفنا من نفسه وألهمنا من شُكره وفتح لنا من أبواب العلم بربوبيته ودلَّنا عليه من الإخلاص لهُ في توحيده وجنّبنا من الإلحاد والشك في أمره . والحمد لله الذي اختار لنا محاسن الخلق وأجرى علينا طيبات الرزق وجعل لنا الفضيلة بالمَلَكةِ على جميع الخلق . والحمد لله الذي منَّ علينا بمحمدٍ نبيّه صلّى الله عليه وآله ، اللهم فصلِّ على محمدٍ أمينك على وحْيك ونجيبك من خلقك وصفيّك من عبادك وآلهِ الطيّبين الطاهرين الأخيار الأنجبين وأجعلني لنعمائك من الشاكرين ولآلائِكَ من الذاكرين برحمتك يا أرحم الراحمين .

يطيب لي ورسالتي قد بلغت نهايتها أن أتقدم بوافر شكري وفائق تقديري إلى أستاذتي الفاضلة الدكتورة سامرة يونس يوسف لاقتراحها موضوع البحث وجهودها القيّمة في التوجيه والمتابعة وإرشاداتها العلمية طيلة فترة الدراسة ، والى أستاذي الدكتور حسن فاضل على متابعته ومساعدته لي في إنجاز البحث جزاهما الله الجزاء الأوفى .

ويُشرّفني أن أقدم شكري الجزيل إلى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة أساتذة ومنتسبين وبالأخص الدكتور إبراهيم شناوة والدكتور فكرت مجيد الونداوي عرفاناً مني بالجميل لأنه كان المُوجّه والمُرشد الأساسي للخوض في هذا المجال الذي يزيد من الإمكانات العلمية والمعرفية ، وإلى جميع طلبة الدراسات العليا .

وتتطلب الأمانة العلمية أن أُسدي بالتقدير والشكر إلى قسم التقنيات الأحيائية في كلية العلوم – جامعة بغداد أساتذةً ومنتسبين وفي مقدمتهم الدكتورة أليس كريكور رئيس القسم والدكتور غازي منعم عزيز والأستاذ رائد بحر لدعمهم المتواصل ولتسهيل متطلبات البحث ، وإلى جميع طلبة الدراسات العليا لما أبدوه من تعاون وتكاتف خلال فترة البحث .

وتنتهي الكلمات ويعجز لساني وأنا أعرب عن عميق شكري واحترامي وتقديري لطالبة الدكتوراه الأخت دلفاء الكيلاني لمساعدتها القيّمة والجهد المخلص خلال فترة البحث والذي لا تسعه كلمات شكر بسيطة ، وفّقها الله لكل خير .

شكري وتقديري إلى طلبة الدكتوراه الأخوات ذكرى عدنان ووجدان رضا وفريال جميل وأزهار عمران .

ولا تكفي الكلمات الجميلة والمشاعر والأحاسيس وأنا أعبّر عن وشكري وتقديري واحترامي لصاحبة القلب الطيب ، أختي وصديقتي ورفيقة دربي أنوار الحسيني .

وشكراً لكل من كان له دور في إتمام هذا البحث ممن لم تسعفني الذاكرة من ذكر أسمائهم .

وأخيراً لا تفي كلمات الشكر والإحترام للتعبير عن شكري وتقديري إلى خير عون وسند لإتمام دراستي والدي ووالدتي العزيزة وأخوتي وبالخصوص أخي الدكتور باسم لما أبدى من مساعدة ونصائح قيّمة أثناء فترة البحث متمنية له دوام النجاح والموفقية .

وفّقنا الله لمرضاته في الدنيا والآخرة .

ذكرى

Bacteriological and Genetical study of *Bacillus cereus* isolated from some foods

A Thesis
Submitted to the Council of College of Science University of Babylon
In Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Master in Biology – Biotechnology

By
Thekra Abdul A'ali Al-Kaabi

Thoulqada ١٤٢٦ December ٢٠٠٥

Summary

Two hundred of milk, dairy products and different food samples were collected from different restaurants in Hilla City, through the period of December, ٢٠٠٣ to August, ٢٠٠٤.

Morphrphological cultural characterization and biochemical tests confirmed that ١٠ isolates which obtained from cream, butter and mahalabi were *Bacillus cereus*.

The antibiotic sensitivity tests of these isolates to ١٨ antibiotics were checked. It was found that all isolates were resistant to penicillin – G, Ampicillin, Ampiclox, Amoxycillin and Cefotaxime, and producers of β–Lactamase enzyme. All isolates were sensitive to Amikacin, Neomycin, Doxycycline, Imipenem, Ciprofloxcine and Chloramphenicol.

The results from different experiments to detect the ability of these isolates to produce of toxins has been done by using the laboratory animals (local rabbits aging ٤ months and the Swiss white mice Balb/c aging ٣ weeks) showed that all isolates of *B. cereus* gave positive skin redness reactions, whereas ٦ isolates (Bc٣, Bc٤, Bc٦, Bc٨, Bc٩, Bc١٠) showed positive skin ulcer test and three isolates (Bc٨, Bc٩, Bc١٠) killed the white mice.

Agarose gel electrophoresis showed that all isolates have two small plasmid bands. These were checked by transformation experiments after showing expression in *Escherichia coli*. The genes responsible for resistance of Penicillin – G, Ampicillin, Amoxycillin and Ampiclox were located on the plasmids. Some of the structural or regulation genes responsible for toxin production located on these plasmids, these results were confirmed by data obtained from curing experiments.

الخلاصة

جُمعت ٢٠٠ عينة غذاء تضمنت الحليب ومنتجاته وعينات أخرى من مطاعم مختلفة في مدينة الحلة للفترة من كانون الأول / ٢٠٠٣ لغاية آب / ٢٠٠٤ .

أكدت الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية عائدية ١٠ عزلات لبكتريا *Bacillus cereus* بعد أن تم عزلها من عينات القشطة والزبد والمحلبي .

اختُبرت حساسية العزلات العشرة تجاه ١٨ مضاد حيوي وكانت جميع العزلات مقاومة للبنسلين – ج والامبيسلين والامبيكلوكس والاموكسيسلين والسيفوتاكسيم ، إذ أظهرت قابلية عالية لإنتاج إنزيم البيتالاكتميز . كانت جميع العزلات حساسة للاميكاسين والنيومايسين والدوكسي سايكلين والسايبروفلوكساسين والامبينيم والكلورامفينكول .

بينت نتائج اختبارات السُمية باستخدام حيوانات التجارب (الأرانب المحلية ذات عمر ٤ أشهر ، والفئران البيض السويسرية Balb/c بعمر ٣ أسابيع) أن جميع عزلات *B. cereus* كانت موجبة في اختبار احمرار الجلد ، بينما كانت ٦ عزلات منها (Bc٣, Bc٤, Bc٦, Bc٨, Bc٩, Bc١٠) موجبة في اختبار تقرح الجلد ، وتسببت ٣ عزلات منها (Bc٨, Bc٩, Bc١٠) في قتل الفئران .

دُرس النسق البلازميدي للعزلات لمعرفة مدى العلاقة بينه وبين جينات المقاومة للمضادات الحيوية وإنتاج السموم ، إذ لوحظ احتواء جميع العزلات على حزمتين بلازميديتين صغيرتين .

اظهرت نتائج تجارب التحول قابلية بلازميدات هذه العزلات على التعبير في بكتريا *Escherichia coli* ، وإن جينات المقاومة للبنسلين – ج والامبيسلين والاموكسيسلين والامبيكلوكس هي بلازميدية الموقع ، كما إن بعض الجينات التركيبية أو التنظيمية المسؤولة عن إنتاج السموم كانت بلازميدية الموقع وهذا ما أكدته نتائج تجارب التحييد .

المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة	**I**
	المحتويات	**II**
	المختصرات	**V**
	الأشكال	**VI**
	الجداول	**VII**
	الملاحق	**VII**
١ -	**الفصل الأول – المقدمة**	**١**
٢ -	**الفصل الثاني – استعراض المراجع**	**٢**
٢ – ١	جنس العصيات *Bacillus*	٢
٢ – ٢	تصنيف جنس *Bacillus*	٢

٢ – ٣	بكتريا *B. cereus*	٤
٢ – ٤	التلوث والتسمم الغذائي ببكتريا *B. cereus*	٥
٢ – ٥	سُمّية بكتريا *B. cereus*	٧
٢ – ٦	سموم بكتريا *B. cereus*	٨
٢ – ٦ – ١	السموم المعوية أو سُم الإسهال Diarrheal Enterotoxins	٨
٢ – ٦ – ٢	سُم القيء Emetic Toxin	١٠
٢ – ٧	عوامل الضراوة	١١
٢ – ٧ – ١	الفوسفولايبيز Phospholipase	١١
٢ – ٧ – ٢	الهيمولايسين Haemolysin	١١
٢ – ٧ – ٣	البيتالاكتميز β – Lactamase	١٢
٢ – ٨	الحساسية الدوائية Antibiotic Susceptibility	١٣
٢ – ٩	بلازميدات بكتريا *B. cereus*	١٤
٢ – ١٠	تحييد البلازميدات Plasmids Curing	١٥
٣ -	**الفصل الثالث – المواد وطرائق العمل**	**١٧**
٣ – ١	المواد Materials	١٧
٣ – ١ – ١	الأجهزة Equipments	١٧
التسلسل	**الموضوع**	**الصفحة**
٣ – ١ – ٢	المواد الكيمياوية	١٨
٣ – ١ – ٣	الأوساط الزرعية الجاهزة	٢٠
٣ – ١ – ٤	المضادات الحيوية Antibiotics	١٢
٣ – ١ – ٥	السلالات القياسية المستخدمة	٢٢
٣ – ١ – ٦	المواد المتفرقة ومصادرها	٢٢
٣ – ١ – ٧	المحاليل والدوارئ	٢٣
٣ – ١ – ٨	الكواشف والصبغات Reagents and Dyes	٢٦
٣ – ١ – ٩	الأوساط الزرعية المستخدمة	٢٩
٣ – ١ – ٩ – ١	الأوساط الزرعية الجاهزة	٢٩
٣ – ١ – ٩ – ٢	الأوساط التركيبية	٢٩
٣ – ٢	طرائق العمل Methods	٣٢
٣ – ٢ – ١	جمع العينات	٣٢
٣ – ٢ – ٢	تحضير العينات	٣٢
٣ – ٢ – ٣	زرع العينات	٣٣
٣ – ٢ – ٤	تشخيص البكتريا	٣٣
٣ – ٢ – ٤ – ١	الصفات المظهرية	٣٣
٣ – ٢ – ٤ – ٢	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests	٣٣
٣ – ٢ – ٥	حفظ وإدامة العزلات	٣٧
٣ – ٢ – ٦	اختبار الحساسية الدوائية	٣٨
٣ – ٢ – ٧	اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البيالاكتميز	٣٨
٣ – ٢ – ٨	إنتاج السموم	٣٩
٣ – ٢ – ٨ – ١	اختبارات السُمّية	٣٩
٣ – ٢ – ٩	استخلاص الدنا البلازميدي	٤٠

٣ – ٢ – ١٠	الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز	٤١
٣ – ٢ – ١١	التحول البكتيري Bacterial Transformation	٤٢
٣ – ٢ – ١٢	تحييد البلازميدات Plasmids Curing	٤٣
٤ -	**الفصل الرابع – النتائج والمناقشة**	**٤٥**
٤ – ١	عزل وتشخيص بكتريا *B. cereus*	٤٥
التسلسل	**الموضوع**	**الصفحة**
٤ – ٢	مقاومة بكتريا *B. cereus* للمضادات الحيوية	٤٩
٤ – ٣	إنتاج إنزيم البيتالاكتميز	٥٢
٤ – ٤	إنتاج السموم واختبارات السُمّية	٥٣
٤ – ٥	النسق البلازميدي Plasmid Profile	٥٧
٤ – ٦	التحول Transformation	٦٠
٤ – ٧	تحييد البلازميدات Plasmids Curing	٦٢
	الاستنتاجات	**٦٦**
	التوصيات	**٦٦**
	المصادر	**٦٧**
	الملاحق	**٨١**
	ملخص الرسالة باللغة الإنكليزية	**A**

المختصرات

المختصر	المصطلح
β	Beta
α	Alpha
B.	*Bacillus*
BHIA	Brain Heart Infusion Agar

C. perfringens	*Clostridium perfringens*
cfu	colony forming unit
Cytk	Cytotoxin K
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
Ent T	Enterotoxin T
EsBLs	Extra spectrum Beta – Lactamases
HBL	Haemolysin BL
HEP – ٢ cell	Human Epidermoid Carcinoma
L – Broth	Luria Broth
MR	Methyl Red
MYP	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar
NHE	Non Haemolytic Enterotoxins
PBPS	Penicillin Binding Proteins
PEMBA	Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol-Bromophenol Blue agar
RNA Polymerase	Ribonucleic Acid Polymerase
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SDS	Sodium Dodecyle Sulphate
SET	Sodium Acetate – EDTA – Tris HCl
TBE	Tris OH – Boric Acid – EDTA
TE	Tris OH – EDTA
TSI	Triple Sugar Iron Agar
VP	Vogas Proskaur

الأشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
٤ – ١	A – اختبار احمرار الجلد للأرانب المحلية B – اختبار تقرح الجلد للأرانب المحلية	٥٦
٤ – ٢	A و B – الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨ %) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *B. cereus*	٥٨ – ٥٩
٤ – ٣	الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨ %) بفرق جهد	٦١

	٦٥ فولت والذي يُظهر الحُزم البلازميدية والكروموسومية للعزلات المستخدمة في التحول	
٤ – ٤	الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨ %) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حُزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *B. cereus* المُعاملة وغير المعاملة بـ SDS	٦٤

الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
٣ – ١	المضادات الحيوية المستخدمة	٢١
٣ – ٢	السلالات القياسية	٢٢
٤ – ١	تواجد بكتريا *B. cereus* في عينات الأغذية	٤٦
٤ – ٢	الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *B. cereus*	٤٨
٤ – ٣	الحساسية الدوائية لعزلات بكتريا *B. cereus*	٥٠
٤ – ٤	الفترة الزمنية اللازمة لحدوث التغير اللوني في الكشف عن إنزيم البيتالاكتميز	٥٣
٤ – ٥	اختبارات السُمّية لعزلات بكتريا *B. cereus*	٥٥
٤ – ٦	تراكيز المادة المُحيدة SDS للعزلتين Bc١ و Bc٦	٦٣

الملاحق

الرقم	العنوان	الصفحة

١	قطـر منطقـة التثبـيط القياسـية لأقـراص المضـادات الحيويـة المستعملة	٨١

الاستنتاجات والتوصيات ConclusionsandRecommendations

أولاً : الاستنتاجات

١. كانت أعلى نسب عزل لبكتريا *B. cereus* هي من القشطة والزبد والمحلبي .
٢. أظهرت جميع العزلات مقاومة بنسبة ١٠٠ % لمضادات البيتالاكتام والتي تضم البنسلين – ج والامبيسلين والامبيكلوكس والاموكسيسلين والسيفوتاكسيم ، والذي يؤكد قدرتها على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز ، وحساسة بنسبة ١٠٠ % للاميكاسين والنيومايسين والدوكسي سايكلين والسايبروفلوكساسين والامبنيم والكلورامفينكول .
٣. أبدت عزلات *B. cereus* القدرة على إنتاج السموم .
٤. احتواء عزلات *B. cereus* على حُزم بلازميدية تمتلك القدرة على التعبير في أكثر من مُضيف من خلال تجارب التحول والتحييد ، وإن جينات إنزيم البيتالاكتميز وبعض الجينات التركيبية أو التنظيمية المسؤولة عن إنتاج السموم هي بلازميدية الموقع .

ثانياً : التوصيات

١. التوسع في دراسة بكتريا *B. cereus* من الناحية الوراثية ، واستخدام تقنيات أكثر تطوراً في العزل والتشخيص كتقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) وتقنية Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .
٢. إجراء دراسة مناعية حول سموم بكتريا *B. cereus* باستخدام تقنية Enzyme Linked Immunsorbent Assay (ELISA) وتقنية Reverse Passive Latix Agglutination Test .
٣. دراسة أنواع البيتالاكتميز المنتج من قبل بكتريا *B. cereus* ودوره في المقاومة لمجموعة البيتالاكتام ، وخاصة البيتالاكتميز واسعة الطيف (Extra Spectrum β – Lactamase (ESBLs)) .

١ ـ المقدمة Introduction

يحدث التسمم الغذائي عن طريق تناول الأغذية الملوثة بالأحياء المجهرية أو سمومها، وتُعد بكتريا *B. cereus* عامل ممرض انتهازي ، وعلى الرغم من تسببها بالكثير من الأمراض مثل الأنتان الدموي (Septicemia) ، التهاب باطن العين (Endopthalmitis) ، التهاب باطن القلب (Endocarditis) ، التهاب الجهاز البولي ، التهابات الجروح ، تجرثم الدم (Bacteremia) وعدد آخر من الأخماج ، إلاّ أن ارتباطها الأساس يكون مع حالات التسمم الغذائي البكتيري (Miller *et al*., ١٩٩٧; Lund *et al*., ٢٠٠٠) .

تسبب بكتريا *B. cereus* نوعين من التسمم الغذائي ، هما متلازمة الإسهال (Diarrheal Syndrome) ، ومتلازمة القيء (Emetic Syndrome) ، تحدث متلازمة الإسهال بسبب سموم معوية (Enterotoxins) تنتج خلال نمو البكتريا في الأمعاء الدقيقة ، في حين تحدث متلازمة القيء بسبب نمو البكتريا في الغذاء (Granum, ٢٠٠٣) .

تحصل متلازمة الإسهال نتيجة تناول أغذية مختلفة كاللحم والدجاج المطبوخ والسجق والحليب الخام والمثلجات ، وغالباً ما تكون مرتبطة بتناول الأغذية البروتينية والصلصات (Sauces) والخضروات (Rangasamy *et al*., ١٩٩٣) .

أما متلازمة القيء فتكون مرتبطة بتناول الأغذية النشوية خصوصاً الرز المطبوخ ، وتم تشخيص سم القيء لأول مرة في المملكة المتحدة في بداية السبعينات ، بعد عدّة حالات تسمم مرتبطة بتناول الرز المطبوخ من المطاعم الصينية ومطاعم الأكلات السريعة (Bean and Griffin, ١٩٩٠) .

وبسبب عدم توفر دراسات محلية حول دور بكتريا *B. cereus* في تسمم الأغذية ، فقد هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة مدى علاقة البلازميدات الموجودة في هذه البكتريا بإنتاج السموم ، والمقاومة للمضادات الحيوية وإنتاج إنزيمات البيتالاكتميز ، من خلال تجارب التحول والتحييد . إذ تضمنت الدراسة الأهداف الآتية :

١. عزل وتشخيص بكتريا *B. cereus* من عينات الغذاء المختلفة .
٢. توصيف العزلات من حيث قابليتها على إنتاج السموم المعوية (Enterotoxins) .
٣. دراسة نمط الحساسية الدوائية لهذه العزلات .
٤. اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم β – Lactamase .
٥. دراسة النسق البلازميدي لهذه البكتريا .

٢ ـ استعراض المراجع Literatures Review

٢ ـ ١ جنس العصيات *Bacillus*

إن أغلب أنواع جنس العصيات تكون رمّية المعيشة ومنتشرة بشكل واسع في البيئات الطبيعية ، ما عدا بعض الأنواع التي تكون ممرضات انتهازية أو إجبارية للإنسان والحيوان والحشرات واللبائن الأخرى (Nicholson, ٢٠٠٢) . وهي عبارة عن عصيات موجبة أو متغيرة لصبغة كرام (Gram's Stain) ، مكونة للأبواغ ، هوائية ولاهوائية اختيارية ، وغير مكونة للمايسليم (Mycelium) .

إن جنس *Bacillus* يعود إلى العائلة العصوية Bacillaceae والتي تضم جنس آخر هو *Clostridium* (Claus and Berkeley, ١٩٨٦; Holt *et al*., ١٩٩٤; MacFaddin, ٢٠٠٠) .

يتراوح قطر الخلية الخضرية بين ٠.٥ × ١.٢ – ٢.٥ × ١٠ مايكروميتر وتتراوح درجة الحرارة المثلى لنموها بين ٢٥ – ٣٧°م ، ولكن بعض العزلات المتحملة للحرارة أو البرودة العالية ، لها القدرة على النمو في درجات حرارة أعلى من ٧٥°م وأقل من ٣°م ، وبعض العزلات تكون في حالة نشاط وإنتاج عاليين في رقم هيدروجيني متطرف يتراوح بين ٢ – ١٠ (Turnbull *et al*., ١٩٩٠; Turnbull and Kramer, ١٩٩١) .

إن أبواغ جنس *Bacillus* تبدي مقاومة عالية جداً للعوامل الفيزياوية والكيمياوية مثل الحرارة والبرودة والجفاف والإشعاع وغيرها من العوامل ، لذا تستطيع العيش لفترات زمنية طويلة في ظروف بيئية سيئة (Cano and Bourucki, ١٩٩٥) .

٢ ـ ٢ تصنيف جنس *Bacillus*

من المظاهر المميزة لجنس *Bacillus* هو شكل البوغ والحافظة البوغية ، واعتماداً على ذلك يقسم الجنس إلى ٣ مجاميع واسعة ، وهذا التقسيم تم اقتراحه من قبل Smith وجماعته (١٩٥٢) ، وتم تطويره لاحقاً من قبل Gordon وجماعته (١٩٧٣) ، وذلك كما يأتي :

المجموعة الأولى : وتشمل أنواع الجنس *Bacillus* التي تكون عصيات موجبة لصبغة كرام ، وذات أبواغ مركزية أو نهائية الموقع ، بيضوية أو اسطوانية الشكل ، ولا تسبب انتفاخ الحافظة البوغية ، فالأنواع ذات الخلايا الكبيرة والتي تقع ضمن المجموعة الأولى A (Group ١A) تمتلك خلايا ذات قطر أكبر أو يساوي ١ مايكروميتر ، وتنتج المُركب (Poly-beta-hydroxybutyrate) في البروتوبلازم والذي يُعد مصدر كاربوني لاختزال الطاقة في خلية البكتريا ، وهذه المجموعة تشمل الأنواع *B. cereus* ، *B. megaterium* ، *B. anthracis* ، *B. thuringienesis* ، *B. cereus* var mycoids .

إن معظم أنواع الجنس *Bacillus* المهمة سريرياً تقع ضمن هذه المجموعة ، أما الأنواع ذات الخلايا الصغيرة والتي تقع ضمن المجموعة الأولى B (Group ١B) فخلاياها تكون ذات قطر أقل من ١ مايكروميتر ، ولا تُكوّن (Poly-beta-hydroxybutyrate) في البروتوبلازم ، وهذه المجموعة تشمل *B. subtilis* ، *B. pumilus* ، *B. coagulans* ، *B. licheniforms* (Smith *et al*., ١٩٥٢; Gordon, *et al*., ١٩٧٣; Turnbull *et al*., ١٩٩٠; Turnbull and Kramer, ١٩٩١) .

المجموعة الثانية : وتشمل أنواع الجنس *Bacillus* التي تكون عصيات متغيرة لصبغة كرام ، وذات أبواغ مركزية أو طرفية الموقع وبيضوية الشكل ، وتسبب انتفاخ الحافظة البوغية ، وهذه المجموعة تشمل *B. circulans* ، *B. macerans* ، *B. polymyxa* ، *B. popillae* ، *B. larvae* ، *B. lentimorbus* ، *B. alvei* ، *B. brevis* ، *B. stearothermophilus* (Turnbull and Kramer, ١٩٩١; Turnbull *et al*., ١٩٩٠; Chang and Chen, ٢٠٠٣) .

المجموعة الثالثة : وتشمل أنواع الجنس *Bacillus* التي تكون عصيات موجبة أو متغيرة لصبغة كرام ، وذات أبواغ طرفية أو شبه طرفية الموقع وكروية الشكل ، وتسبب انتفاخ الحافظة البوغية ، وتضم الجنس *B. sphaericus* (Turnbull *et al*., ١٩٩٠) .

إن أغلب أنواع جنس *Bacillus* تكون موجبة لاختبار الكاتاليز ، ومتحركة بواسطة الأسواط المحيطية (Boone and Liu, ١٩٩٥; Switzer Blum and Burns, ١٩٩٨) .

٢ – ٣ بكتريا *B. cereus*

تم عزل بكتريا *B. cereus* لأول مرة عام ١٨٨٧ من التربة ، من قبل Frankland and Frankland (Gilbert, ١٩٧٩; Griffiths and Scharft, ٢٠٠٢) .

وهي عبارة عن عصيات مستقيمة كبيرة ، هوائية ولاهوائية اختيارية وموجبة لصبغة كرام ، مكونة للأبواغ وخلاياها عادةً ما تترتب على شكل أزواج أو سلاسل ذات نهايات دائرية أو مربعة ، وتتحرك بواسطة أسواط محيطية (Peritrichous Flagella) ، وهي واسعة الانتشار في البيئة ، ويمكن أن تُعزل بسهولة من التربة ومختلف الأغذية كمنتجات الألبان واللحوم والتوابل والحبوب (Wong *et al*., ١٩٨٨; Christiansson *et al*., ١٩٨٩; Granum and Lund, ١٩٩٧) .

تكون خلايا *B. cereus* ذات عرض يتراوح بين ١ – ١.٢ مايكروميتر وطول يتراوح بين ٣ – ٥ مايكروميتر . إن درجة الحرارة المثلى لنمو أغلب العزلات هي بين ٣٥ – ٤٠°م ، وتستطيع الخلايا الخضرية للبكتريا العيش في درجات حرارة أعلى من ٥٥°م وأقل من ٥°م ، وزمن جيل البكتريا بين ٢٠ – ٣٠ دقيقة ، وتستطيع العيش في أس هيدروجيني يتراوح بين ٤.٥ – ٩.٣ (Spinosa, ٢٠٠٠; Nguyen – the and Carlin, ٢٠٠٣) .

وحسب تصنيف Smith وجماعته (١٩٥٢) فإن بكتريا *B. cereus* تعود إلى المجموعة الأولى التي تشمل أنواع الجنس *Bacillus* التي تكوّن أبواغاً بيضوية ، ولا تسبب انتفاخ الحافظة البوغية ، كما أشاروا أيضاً أن الأنواع *B. mycoids* ، *B. thuringienesis* ، *B. anthracis* تُعد ضروب للنوع *B. cereus* بدلاً من اعتمادها أنواعاً منفصلة ، إذ إنها تُصنّف ضمن مجموعة واحدة هي (مجموعة *B. cereus*) . كما أشارت دراسات أخرى أن هذه المجموعة تظهر تماثلاً عالياً في الحامض النووي المنقوص الأوكسجين DNA (Helgason *et al*., ٢٠٠٠a; Lund *et al*., ٢٠٠٠) .

هناك بعض الاختلافات التي تستخدم لغرض تمييز النوع *B. cereus* عن الأنواع الأخرى التابعة لمجموعة *B. cereus* ، فالنوع *B. thuringienesis* يتميز بإنتاجه للبلورات شبه البوغية (Parasporal Crystal) وهي عبارة عن سموم داخلية قاتلة للحشرات ، تستخدم بشكل واسع كعامل مهم في السيطرة الحياتية (Schnepf *et al*., ١٩٩٨) ، أما النوع *B.*

mycoids فيتميز بالنمو الجذري (Rhizoid Growth) على وسط الأكار المغذي (مستعمرات ذات تركيب يشبه الجذور) ، أما النوع *B. anthracis* والذي يكون من الأنواع الممرضة للإنسان والحيوان وينتج سم الأنثراكس ، فتكون سلالاته غير متحركة ولا تسبب حل الدم وحساسة للبوليمكسين (Ash *et al*., ١٩٩١; Crickmore *et al*., ١٩٩٨) .

إن بكتريا *B. cereus* تكون موجبة لاختبار الكاتاليز ، ومنتجة لإنزيم اللسيثينيز ، ومقاومة للبوليمكسين وليس لها القدرة على تخمير سكر المانيتول (Harmon, ١٩٨٢; Claus and Berkeley, ١٩٨٦) ، وتستطيع النمو بشكل جيد على الأكار المغذي ، ولا تحتاج إلى فيتامينات واحتياجاتها لبعض الأحماض الأمينية قليلة ، ولها القدرة على تخليق أو تصنيع مختلف المواد خارج الخلوية مثل السموم والمضادات الحيوية وغيرها (Gilbert, ١٩٧٩; Griffiths and Scharft, ٢٠٠٢) .

٢ ـ ٤ التلوث والتسمم الغذائي ببكتريا *B. cereus*

إن الأبواغ (Spores) والأشكال الخضرية (Vegetative Forms) لبكتريا *B. cereus* غالباً ما تستوطن مدى واسع من البيئات التي تشمل التربة والهواء والغبار والمياه الطبيعية والحشائش ، وكذلك العديد من الأغذية الجافة والرطبة كاللحوم والدجاج والحبوب والتوابل والخضروات والحليب وغيرها (Meer *et al*., ١٩٩١; Granum and Lund, ١٩٩٧; Nicholson, ٢٠٠٢) .

تُعد أبواغ بكتريا *B. cereus* من الأبواغ المقاومة للجفاف والحرارة العالية ، إذ أشارت إحدى الدراسات إلى أن تعريض الأبواغ إلى درجة حرارة ٨٠ °م لمدة ٢٥ – ٣٠ دقيقة ، أدى إلى قتل الخلايا الخضرية دون التأثير على تلك الأبواغ (Spinosa, ٢٠٠٠) .

عُرفت بكتريا *B. cereus* كملوث لبعض الأغذية ومُسببة للتسمم الغذائي ، وتُعد التربة المصدر الأول لتلوث الغذاء بأبواغ *B. cereus* إذ تحتوي على ما يقارب $١٠^{٣}$ – $١٠^{٥}$ بوغ / غم (Te Giffel *et al*., ١٩٩٥; Christiansson *et al*., ١٩٩٩; Guinebretiere and Nguyen – the, ٢٠٠٣) .

تُعد *B. cereus* الملوث الرئيسي للرز المقلي بالزيت في مطاعم الأكلات السريعة ، إذ إن أبواغ هذه البكتريا قادرة على مقاومة طبخ الرز ، ومن ثم تنبت وتتكاثر بسرعة في كل من الرز المقلي والرز المطبوخ ، إذ يترك الرز المقلي لساعات عديدة وأحياناً ليوم كامل عند درجة حرارة الغرفة إلى أن يتم قليه في اليوم التالي ، مما يسمح بتكاثر الخلايا الخضرية لبكتريا *B. cereus* الموجودة أصلاً في الرز الخام ، ومن ثم إنتاج أبواغ مقاومة للحرارة (Gilbert *et al*., ١٩٧٤; Bishai and Sears, ١٩٩٣; Afghani and Stutman, ١٩٩٤) .

إن نمو الخلايا الخضرية يُحفّز أكثر بإضافة مواد أخرى إلى الرز كاللحم والدجاج والبيض (Drobniewski, ١٩٩٣) . كما أن حرارة الطبخ قد لا تتوزع عادةً بالشكل الصحيح إلى كل أجزاء الغذاء بالقدر الكافي لمنع نمو وإنتاج السموم بواسطة الأبواغ النشطة (Bryan and Mckinley, ١٩٧٩) .

تُعد بكتريا *B. cereus* ملوّثاً شائعاً لمنتجات الألبان (Becker *et al*., ١٩٩٤) فهي المسؤولة عن تلف الحليب مُسببة القشدة المثقبة (Bitty Cream) نتيجة لإنتاج البكتريا لإنزيم الليسثنيز (Lecithenase) خصوصاً في الطقس الحار (Billing and Cuthbert, ١٩٥٨) ، كما إنها تسبب ما يُعرف بالتجبن الحلو (Sweet Curdling) نتيجة لإفراز إنزيم الرنين الذي

يُرسب الكازائين في الحليب السائل (Overcast and Atmaram, ١٩٧٤) .

كما إن استهلاك الغذاء الذي يحتوي على $١٠^{٦}$ خلية / غم أو أكثر من بكتريا *B. cereus* يؤدي إلى حصول تسمم غذائي (Notermans and Batt, ١٩٩٨) .

في عام ١٩٠٦ كانت *B. cereus* مرتبطة مع حالات تسمم غذائي في أوربا ، وقد سُجلت حالات تفشي للتسمم الغذائي كان سببها عصيات هوائية مكونة للأبواغ سمّيت بالأنثراكويد (Anthracoid) وسيدوأنثراكس (Pseudoanthrax) ، لكن في عام ١٩٥٠ في النرويج قدّم Steinar Hauge الإحصاء الأول المتكامل عن التسمم المسبب بواسطة بكتريا *B. cereus* ، وبرهن على إن هذا الكائن المجهري هو عامل ممرض للإنسان ، ففي الأعوام ١٩٤٧ – ١٩٤٩ قام بالتحري في أربع حالات تفشي للتسمم الغذائي بمجموع ٦٠٠ شخص مصاب ، وكان الناقل الغذائي في جميع هذه الحالات هو صلصة الفانيلا المحضّرة من نشا الذرة الحاوي على أبواغ بكتريا *B. cereus* ، إذ وجد Hauge أن نشا الذرة المستخدم في هذه الحالة كان يحتوي على ما يقارب $١٠^{٤}$ من أبواغ *B. cereus* لكل غم ، وكانت الحلوى قد حُضّرت وخُزنت عند درجة حرارة الغرفة حتى تم إيصالها وتناولها في اليوم التالي ، وبالنتيجة فإن كل من تناول الحلوى قد ظهرت عليه أعراض سريرية للتسمم الغذائي ، ولتوفير الدليل على أن *B. cereus* كانت هي السبب في هذا التسمم . قام Hauge بتنمية البكتريا حتى مستوى ٤×١٠^{٦} خلية / ملليتر ، ومن ثم قام بشرب ٢٠٠ ملليتر من مُعلّق البكتريا ، وبعد ١٣ ساعة بدأت أعراض التسمم الغذائي بالظهور عليه . ومنذ عام ١٩٥٠ ظهرت في أوربا عدّة حالات من التفشي ، التي حصلت في أنواع مختلفة من الغذاء مثل اللحوم وحساء الخضروات واللحم المطبوخ ولحم الدجاج والسمك والحليب والمرطبات ، وفي عام ١٩٥٤ فشلت التجارب التي أجريت على متطوعين في الولايات المتحدة في إثبات مشاهدات Hauge ، وفي عام ١٩٦٩ تم توثيق حصول أول تفشي مميز لبكتريا *B. cereus* في الولايات المتحدة ، ومنذ عام ١٩٧١ تم تسجيل عدد من إصابات التسمم المختلفة النوع والمُسببة بواسطة بكتريا *B. cereus* ، وسمي بالنوع المسبب للتقيؤ والمرتبط مع استهلاك الرز المطبوخ (Hauge, ١٩٥٥; Gilbert, ١٩٧٩; Holmes *et al*., ١٩٨١; Debuono *et al*., ١٩٨٨; Griffiths and Scarft, ٢٠٠٢) .

هناك العديد من الأوساط الزرعية المستخدمة لعزل البكتريا *B. cereus* من الأغذية ، وغالبيتها تعتمد على تفاعل مُح البيض الناتج من تحلل الليسثين نتيجة فاعلية إنزيم اللسيثنيز ، ومنها وسط كيم وجويبفرت (Kim and Goepfert, ١٩٧١) ، وكذلك وسط Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol – Bromophenol Blue Agar) (PEMBA)) الذي وُصف من قبل هولبروك وأندرسون (Holbrook and Anderson, ١٩٨٠) ، إلاّ أن الوسط (Mannitol – egg Yolk – Polymyxin Agar (MYP)) والمقترح من قبل موسيل وجماعته (Mossel *et al*., ١٩٦٧) يسهّل عزل بكتريا *B. cereus* من الأغذية ، إذ يعتمد على تفاعل مُح البيض (تحلل الليسثين) نتيجة لقدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الليسثنيز ، فضلاً عن عدم قدرة البكتريا على تخمير سكر المانيتول ، إذ تستخدم هذه الصفة في تمييز النوع *B. cereus* عن الأنواع الأخرى الشائعة من جنس *Bacillus* ، وإن هذا الوسط يحتوي على المضاد الحيوي Polymyxin B لزيادة درجة انتقائية الوسط للنوع *B. cereus* ، وبعد مرور ٢٤ ساعة حضن عند درجة حرارة ٣٢°م ، تظهر المستعمرات كبيرة وجافة ، مسطحة وخشنة بيضاء – كريمية مع خلفية حمراء بنفسجية مُحاطة بهالة من راسب أبيض لمح البيض المتحلل .

٢ – ٥ سُميّة بكتريا *B. cereus*

تُعد بكتريا *B. cereus* من المسببات المهمة للأمراض المنقولة عن طريق الغذاء (Food Borne Illnesses) ، فهي تسبب نوعين من التسمم الغذائي ، هما : متلازمة الإسهال ومتلازمة القيء (Granum and Lund, ١٩٩٧) .

تتصف متلازمة الإسهال (Diarrheal Syndrome) بمدة حضانة ٨ – ١٢ ساعة أو ٨ – ١٦ ساعة بعد تناول الغذاء الملوث ، والأعراض هي تشنجات في البطن والإسهال وزحير مستقيمي (Rectal Tenesmus) يصاحبها شعور بالغثيان أحياناً ، وعموماً تزول الأعراض بعد ٢٤ ساعة ، وهو ما يشبه نوعاً ما التسمم الغذائي ببكتريا *Clostridium perfringens* من حيث الأعراض ومدة الحضانة (Cantoni and Bresciani, ١٩٨٧; Rangasamy *et al*., ١٩٩٣; Drobniewski, ١٩٩٣; Bishai and Sears, ١٩٩٣) .

أما متلازمة القيء (Emetic Syndrome) فتتصف بمدة حضانة ١ – ٦ ساعات بعد تناول الغذاء الملوث ، وتشمل الأعراض الغثيان والتقيؤ وتشنجات في البطن ، وتزول الأعراض بعد مرور ٦ – ٢٤ ساعة ، وهو ما يشبه نوعاً ما التسمم الغذائي ببكتريا *Staphylococcus aureus* في الأعراض ومدة الحضانة (Mortimer and McCann, ١٩٧٤; Bishai and Sears, ١٩٩٣; Lee *et al*., ١٩٩٥; Shah *et al*., ١٩٩٦) .

٢ – ٦ سموم بكتريا *B. cereus*

٢ – ٦ – ١ السموم المعوية أو سم الإسهال

Diarrheal Enterotoxins

إن السم المعوي لبكتريا *B. cereus* هو المسؤول عن متلازمة الإسهال ، وهو عبارة عن بروتين مفرد ذو وزن جزيئي حوالي ٤٠٠٠ – ٥٠٠٠ دالتون (Thompson *et al*., ١٩٨٤; Beecher and MacMillan, ١٩٩١; Ombui, ١٩٩٧; Granum, ٢٠٠٣).

وتحصل معظم حالات التسمم بهذا السم نتيجة تناول أغذية مختلفة تتضمن اللحوم ومنتجاتها والخضروات والسجق والصوصج والحليب ومنتجاته والدجاج (Cantoni and Bresciani, ١٩٨٧; Rangasamy *et al*., ١٩٩٣; Phelps and Mckillip, ٢٠٠٢) . وليس من الواضح فيما إذا كان التسمم الغذائي ينشأ عن طريق الإنتاج المسبق للسم في الغذاء ، أو عند التهام خلايا *B. cereus* في الغذاء ومن ثم ينتج السم في الأمعاء الدقيقة ، إذ تبين أن $١٠^{٥}$ – $١٠^{٧}$ خلية / مليليتر أو غم من الغذاء كافية لإحداث التسمم ، كما إن من الصعوبة الكشف عن وجود السم قبل وصول العدد إلى $١٠^{٧}$ خلية / مليليتر أو غم من الغذاء تحت الظروف المثلى (Gilbert and Parry, ١٩٧٧; Doyle, ١٩٨٨; Granum, ١٩٩٤; Granum, ٢٠٠٣) .

وهناك أربعة أنماط من السموم المعوية المنتجة بواسطة *B. cereus* ، وهي : حال الدم BL (Haemolysin BL (HBL)) ، والسموم المعوية غير الحالة للدم (Non-Haemolytic Enterotoxins (NHE))، والسم الخلوي K (Cytotoxin K) ، والسم المعوي T (Enterotoxin T) (Agata *et al*., ١٩٩٥; Granum and Lund, ١٩٩٧; Lund *et al*., ٢٠٠٠) .

الأنواع الثلاثة الأولى لها علاقة بتفشي الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء ، بينما السم المعوي T يُصنّف كسُم معوي استناداً إلى العلاقة الجينية والتركيبية مع السموم البكتيرية الأخرى (Agata *et al*., ١٩٩٥) .

يحتوي السم المعوي الحال للدم (HBL) على ثلاث وحدات بروتينية فرعية (B و $L_{١}$ و $L_{٢}$) إحداهما عامل رابط والوحدتين الأُخريين تُعد عوامل محللة على التوالي ، وقد قام

الباحثون بتنقية وتمييز الوحدات الفرعية الثلاثة ، وأظهر السم نشاطاً في تحليل الجلد وإمكانية النفاذية من خلال الأوعية ، كما إن وجود المكونات الثلاثة ضروري لإحداث أقصى نشاط للسمية (Beecher and Wong, ١٩٩٤; Beecher *et al*., ١٩٩٥; Beecher and Wong, ١٩٩٧; Hsieh *et al*., ١٩٩٩) .

تم تمييز سموم (NHE) مؤخراً ، وهي سموم مشابهة لسموم (HBL) تتألف كذلك من وحدات بروتينية فرعية (nheA و nheB و nheC) اثنتان منها عوامل محللة والثالثة عامل رابط على الترتيب ، وعلى الرغم من أن الارتباطات الثنائية للوحدات الفرعية قد تُظهر بعض التأثير الحيوي ، لكن أعظم نشاط يتحقق عندما تكون جميع المكونات الثلاثة موجودة (Heinrichs *et al*., ١٩٩٣; Lund and Granum, ١٩٩٦; Lund and Granum, ١٩٩٧; Ryan *et al*., ١٩٩٧) . وقد تم تنقية هذه المكونات من عزلات *B. cereus* بعد حدوث التفشي الكبير للتسمم الغذائي في النرويج سنة ١٩٩٥ (Granum, ٢٠٠٣) . كما يوجد تشابه أساسي بين البروتينات في السموم المعوية HBL و NHE (Granum *et al*., ١٩٩٩) .

أما أشد سم معوي لبكتريا *B. cereus* فهو (Cyt – K) ، وقد تم وصفه حديثاً ، إذ تم اكتشافه بعد حدوث حالة تسمم غذائي في منزل قديم في فرنسا سنة ١٩٩٨ أدت إلى إصابة ٦ من مجموع ٤٤ مصاباً بإسهال دموي أدى إلى وفاة ٣ منهم (Lund *et al*., ٢٠٠٠; Granum, ٢٠٠٣) .

ويُعد (Cyt – K) سماً معوياً يحتوي على جزء بروتيني منفرد يُظهر نشاطاً مُنخّراً ومحللاً ، و هو عالي السمّيّة في الخلايا الطلائية للإنسان (Hardy *et al*., ٢٠٠١) .

أما النوع الرابع (Ent – T) فقد وُصف من قبل (Agata) وزملاءه (١٩٩٥) ، وسُمي هذا المركب استناداً إلى تجارب الكلونة والوسم المناعي (Immunoblot) ، وتم تنفيذ تجارب الكشف عن نشاط هذا السم باستخدام منتج مُصنّع من جين (*bce – T*) ، ومع كل ذلك ولحد الآن لا يوجد رابط بين السم المعوي مع تفشي الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء (Agata *et al*., ١٩٩٥) .

٢ – ٦ – ٢ سُم القيء Emetic Toxin

يُعد سُم القيء لبكتريا *B. cereus* مسؤولاً عن متلازمة القيء ، وهو ببتيد حلقي صغير عالي الثباتية ، ذو وزن جزيئي ٥٠٠٠ دالتون ، مقاوم للحرارة حتى ١٢٦°م لمدة ٩٠ دقيقة ، كما إنه ثابت للتحلل البروتيني ولقيم الأس الهيدروجيني التي تتراوح بين ٢ – ١١ (Turnbull *et al*., ١٩٧٩; Thompson *et al*., ١٩٨٤; Ombui, ١٩٩٧; Granum and Lund, ١٩٩٧; Granum, ٢٠٠٣) .

لقد تم تشخيص سم القيء لأول مرة في المملكة المتحدة عامي ١٩٧١ و ١٩٧٨ بعد عدّة حوادث تسمم مرتبطة بتناول الرز المقلي بالزيت في المطاعم الصينية ومطاعم الأكلات السريعة ، إذ ظهر أن $١٠^{٥}$ – $١٠^{٨}$ بكتريا *B. cereus* / مليليتر أو غم من الغذاء كانت جرعة مُحدثة للتسمم (Granum, ١٩٩٤; Bean and Griffin, ١٩٩٠) .

كما تم دراسة فاعلية سُم القيء الحيوية عن طريق إطعام القرود (Melling and Capel, ١٩٧٨) ، وهناك دراسات حول تأثيره على الخلايا باستخدام خط خلايا (Human Epidermoid Carcinoma (HEP – ٢)) وهي عبارة عن خلايا سرطانية في الحنجرة (Laryngeal Carcinoma) أو خلايا المبيض للهامستر الصيني (Chinese Hamster Ovary Cells (CHO)) (Hughes *et al*., ١٩٨٨; Szabo *et al*., ١٩٩١) ، حيث يعمل سُم القيء بالتأثير على وظيفة المايتوكوندريا (Mitochondrial Function) في هذه الخلايا مؤدياً إلى انتفاخ المايتوكوندريا ، إذ يُلاحظ

أولاً تكوّن فجوات أو حويصلات متميزة وواضحة المعالم ، وتبدأ بالتوسع إلى أن تصل إلى حد متأخر جداً (Post Vaculation) ، وبعد ذلك تتكون حبيبات سايتوبلازمية سوداء تحل تماماً محل الفجوات المتأخرة والتي تؤدي إلى انهيار المايتوكوندريا أو إصابتها بضعف شديد وبالتالي فقدان المايتوكوندريا وظيفة الأكسدة (β – Oxidation) وهي عملية تكوين الطاقة بواسطة سلسلة انتقال الإلكترونات ، مما يؤدي إلى التأثير السلبي على الاستجابة الأيضية (Mahler *et al.*, ١٩٩٧; Finlay *et al.*, ١٩٩٩) .

٢ ـ ٧ عوامل الضراوة

٢ ـ ٧ ـ ١ الفوسفولايبيز Phospholipase

تُنتج *B. cereus* عدداً من إنزيمات الفوسفولايبيز مثل (فوسفولايبيز C) ، ويتضمن فوسفاتيدل كولين هايدروليز (Phosphatidylcholine Hydrolase (PCH)) ذو الوزن الجزيئي ٢٣٠٠٠ دالتون تقريباً وهو يحلل الفوسفاتيدل كولين ، فوسفاتيدل أنوسيتول هايدروليز (Phosphatidylinositol Hydrolase (PIH)) ذو الوزن الجزيئي ٢٩٠٠٠ ـ ٣٥٠٠٠ دالتون تقريباً وهو يحلل الفوسفاتيدل أنوسيتول ، وسفنغومايلينيز (Sphingomylinase (SM)) ذو الوزن الجزيئي ٢٩٠٠٠ دالتون تقريباً وهو يحلل السفنغومايلين (Jackson, ١٩٨٩; Wazny *et al.*, ١٩٩٠; Granum, ١٩٩٤) .

يسمى الفوسفولايبيز C بالأصل بالليستنيز وغالباً ما يُطلق عليه اسم سُم ألفا (α – Toxin) ، وهو يعمل على فك الارتباط بين الكلسيرول والفوسفيت بواسطة التحلل المائي في الليستين والفوسفاتيدات الأخرى ، وينتج الفوسفولايبيز C في عدد من الأجناس البكتيرية الأخرى مثل *S. aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *C. perfringens* (Otnaess *et al.*, ١٩٧٧) .

الفوسفولايبيز C محلل للدم ويعمل على تحلل الجلد ، بالإضافة إلى إنه قاتل في بعض الأحيان ، وهو من الإنزيمات الخارج – خلوية (Extracellular Enzyme) ويسبب تفاعل مُح البيض (Egg Yolk Reaction) (O'Toole, ١٩٧٥) .

العزلات المنتجة للفوسفولايبيز C تسبب تحرراً للإنزيمات الحالّة من الخلايا العدلة (Neutrophile) ويعتمد ذلك على كمية الجرعة (Wazny *et al.*, ١٩٩٠) ، ومن المحتمل أن يعمل الفوسفولايبيز C كعامل وسيط في عملية تحطيم الأنسجة ، وخاصة في الجروح والتهابات العيون ، كما قد يكون له دور في المقاومة للبلعمة التي تُعزى أيضاً إلى تحرر الفوسفولايبيز (Rahmet – Alla and Rowley, ١٩٩٠) .

٢ ـ ٧ ـ ٢ الهيمولايسين Haemolysin

تُنتج *B. cereus* نوعين من الإنزيمات الحالّة للدم هما سيرولايسين O (Cereolysin O) وسيرولايسين AB (Cereolysin AB) .

يُعرّف سيرولايسين O على أنه هيمولايسين I أو عامل قاتل الفئران I ، وهو بروتين منشط بالثايول ، ذو وزن جزيئي ٤٩٠٠٠ ـ ٥٩٠٠٠ دالتون ، يثبط بواسطة الكولسترول ويتفاعل تصالبياً مع مضادات سترتبتولايسين O (Anti-Streptolysin O) (Bhakdi and Tranum – Jensen, ١٩٨٦; Kolstø *et al.*, ٢٠٠٢) .

يُنتج السيرولايسين O بواسطة أنواع مختلفة من البكتريا ، ويُنقى بصورة جيدة وبدقة من بكتريا *B. cereus* (Honda *et al.*, ١٩٩١) .

أما سيرولايسين AB فهو يتكون من إنزيمين هما الفوسفاتيدل كولين – فوسفولايبيز وسنفغومايلينيز اللذان يعملان تعاونياً مخلّقة هيمولايسين مضاعف يسمى سيرولايسين AB الذي يقوم بدوره بعملية تحليل كريات الدم الحمراء (Gilmore *et al.*, ١٩٨٩) .

ويعرف السيرولايسين AB على أنه هيمولايسين II ، وهو بروتين حساس للحرارة ذو وزن جزيئي ٢٩٠٠٠ – ٣٤٠٠٠ دالتون ، لا يتأثر بواسطة الكولسترول أو مضاد الستربتولايسين O وليس له دور مميز داخل الخلايا ، كما إنه لا يُسبب تجمع السوائل في معي الفئران ولكنه يسبب قتل الفئران عند الحقن الوريدي (Shingawa *et al.*, ١٩٩١) .

٢ – ٧ – ٣ البيتالاكتميز β – Lactamase

هي عبارة عن إنزيمات حماية تنتج بواسطة البكتريا ، وتحفز على التحلل المائي لحلقة البيتالاكتام لمضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات ، ويُعد إنتاجها المادة الأساسية لمقاومة مضادات البيتالاكتام (Ghuysen, ١٩٩٤; Bush *et al.*, ١٩٩٥; Livermore, ١٩٩٥) .

تتواجد هذه الإنزيمات في كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، وتُشفر بواسطة جينات تقع على البلازميدات أو الترانسبوزونات (Transposons) أو على الكروموسوم البكتيري (Medeiros, ١٩٩٧) .

تُصنف إنزيمات البيتالاكتميز إلى أربعة مجاميع ، تشمل :

- إنزيمات النوع A وتشمل بنسلينيز (Penicillinase) وسيفالوسبورينيز (Cephalosporinase) ، وعادةً توجد جيناتهاعلى البلازميدات أو الترانسبوزونات .
- إنزيمات النوع B وهي ميتالوبيتالاكتميز (Metallobetalactamase) .
- إنزيمات النوع C وتشمل السيفالوسبورينيز الكروموسومي .
- إنزيمات النوع D وهي أوكزالوسيلينيز (Oxalocillinase) .

(Medeiros, ١٩٩٧; Ambler *et al.*, ١٩٩١)

تنتج *B. cereus* ثلاثة أشكال مختلفة من البيتالاكتميزات هما I و II و III وتُعد هذه الإنزيمات إحدى المنتجات الطبيعية الأساسية في هذه البكتريا (Kotiranta *et al.*, ٢٠٠٠).

الشكل I و II من البيتالاكتميز هي بروتينات صنف A والتي لها علاقة بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين ((Penicillin Binding Proteins (PBPS) (Sloma and Gross, ١٩٨٣) ، وهي إنزيمات محللة للبنسلين تفرز عادة في السائل الموجود خارج الخلية وتمنع عمل البنسلين ضد البكتريا (Imsande *et al.*, ١٩٧٠; Sloma and Gross, ١٩٨٣) .

الشكل II من البيتالاكتميز يسمى أيضاً ميتالوبيتالاكتميز ، وهو عبارة عن إنزيمات صنف B واسعة الطيف ، تُحلل مائياً مختلف البنسلينات (Penicillins) والسيفالوسبورينات (Cephalosporins) والكاربابنيم (Carbapenems) والذي يُثبط على نحو قليل بواسطة أغلب الجزيئات المحتوية على البيتالاكتام (Osano *et al.*, ١٩٩٤; Bush *et al.*, ١٩٩٥; Poirel *et al.*, ٢٠٠٠; Rossolini *et al.*, ٢٠٠١) .

٢ – ٨ الحساسية الدوائية Antibiotic Sensitivity

إن الاستخدام الخاطئ لأغلب المضادات الحيوية والتي لها دور واضح في علاج مختلف الإصابات البكتيرية يؤدي إلى ظهور سلالات تمتاز بمقاومتها العالية لمجموعة كبيرة من المضادات الحيوية (Guilfoile and Hutchinson, ١٩٩٢) ، ويعتقد أن الميكانيكيات الحقيقية لمقاومة المضادات الحيوية في كائنات معينة قد نشأت في الأحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية (Benveniste and Davis, ١٩٧٣; Walker and Skovaga, ١٩٧٣; Cundliffe, ١٩٨٩; Davies, ١٩٩٤) .

يُعزى عدم اهتمام الباحثين بدراسة ملامح الحساسية الدوائية لأنواع جنس *Bacillus* على الرغم من كون بعض أنواع هذا الجنس مُمرضة انتهازية ، إلى أسباب عدّة منها : المعرفة القليلة لقابلية أنواع الجنس *Bacillus* عدا *B. anthracis* على إحداث الإصابة للإنسان ، وندرة حصول الجمرة الخبيثة (Anthrax) للإنسان ، وكذلك الحساسية العالية لبكتريا *B. anthracis* للبنسلين مرتبطة بالحالات النادرة التي تكون فيها هذه البكتريا مقاومة للبنسلين (Lightfoot *et al.*, ١٩٩٠; Doganay and Aydin, ١٩٩١; Turnbull *et al.*, ٢٠٠٤) .

أشارت نتائج دراسة أُجريت من قبل Bernhard وجماعته (١٩٧٨) أن بكتريا *B. cereus* تبدي مقاومة عالية للأمبسلين والكوليستين والبوليمكسين . كما أكدت نتائج دراسات أخرى أن بكتريا *B. cereus* تنتج البيتالاكتميز ولذلك فهي مقاومة للمضادات من مجموعة البيتالاكتام والتي تضم السيفالوسبورينات ، وهي عادة حساسة للأمينوكلايكوسايديزات ، كلندامايسين ، فانكومايسين ، كلورامفنيكول والأرثرومايسين (Coonrod *et al.*, ١٩٧١; Turnbull and Kramer, ١٩٨٣; Wiedermann, ١٩٨٧; Banerjee *et al.*, ١٩٨٨; Patrick *et al.*, ١٩٨٩; Weisse *et al.*, ١٩٩١) .

٢ – ٩ بلازميدات بكتريا *B. cereus*

البلازميدات هي عبارة عن عناصر خارج كروموسومية ذات دنا حلقي مزدوج الشريط ، وتتميز بامتلاكها منشأ تكرار ولهذا فإن لها القابلية على التضاعف بصورة مستقلة عن كروموسوم الخلية المضيفة (Solar *et al.*, ١٩٩٨) .

تُعد معظم أنواع البكتريا ممتلكة للبلازميدات ، لأن مختلف الوظائف الحيوية الخاصة مثل الخصوبة ، والمقاومة للمضادات الحيوية ، وإنتاج المضادات الحيوية ، وإنتاج البكتريوسين ، وإنتاج السموم قد تكون مؤشراتها الوراثية محمولة على هذه العناصر الوراثية (Helinski and Clewell, ١٩٧١; Helinski, ١٩٧٣; Cohen, ١٩٧٦) .

تُعد أغلب البلازميدات المصنفة في جنس *Bacillus* من النوع الخفي (Cryptic Plasmids) التي تفقد المؤشرات الوراثية المظهرية (Phenotypic Genetic Markers) (Lovett and Bramucci, ١٩٧٥; Lovett *et al.*, ١٩٧٦; Tanaka *et al.*, ١٩٧٧) .

أشارت نتائج دراسة أجريت من قبل Bernhard وجماعته (١٩٧٨) إلى أن عزلات *B. cereus* تحتوي على واحد أو أكثر من البلازميدات تختلف في صفاتها الفيزياوية ، ذات أوزان جزيئية تتراوح بين ١.٨ × ١٠^٦ – ١٠٥ × ١٠^٦ دالتون ، وتحمل مؤشرات وراثية مسؤولة عن إنتاج البكتريوسين والمقاومة للتتراسايكلين والكانامايسين وعدد آخر من المضادات الحيوية ، وهذه البلازميدات هي أكبر بكثير من حيث الوزن الجزيئي من تلك المشخصة في *B. subtilis* والمشار إليها في دراسات سابقة (Lovett and Bramucci, ١٩٧٥; Tanaka *et al.*, ١٩٧٧) .

٢ ـ ١٠ تحييد البلازميدات Plasmids Curing

التحييد هو إمكانية إزالة البلازميدات من الخلية البكتيرية دون التأثير على حيويتها ، حيث تمتاز معظم البلازميدات بثباتها ، لكن يحصل في بعض الأحيان وبمعدلات واطئة جداً انعزال تلقائي للبلازميدات ومن ثم فقدانها من الخلية البكتيرية ، لذلك يتطلب استخدام عوامل تحييد كيمياوية أو فيزياوية تؤدي إلى زيادة نسب الانعزال وبعد ذلك فقدان البلازميد نهائياً (Trevors, ١٩٨٦) .

أهم العوامل المحيدة هي الأكردين البرتقالي (Acridine Orange) الذي يؤدي إلى تثبيط مباشر لتضاعف البلازميد وبالتالي يؤدي إلى فقدانه (Hohn and Korn, ١٩٦٩) .

كما استخدم الريفامبسين الذي يرتبط مباشرة مع إنزيم RNA Polymerase ويُثبط عمله (Johnston and Richmond, ١٩٧٠) .

واستخدم بروميد الأثيديوم كعامل مُحيد في بكتريا *Staphylococcus* ، وقد وُجد أن بروميد الأثيديوم يؤدي إلى تحييد عالي للبلازميدات الحاملة لجين إنزيم بنسلينيز (Penicillinase) في هذه البكتريا (Bouanchaud *et al*., ١٩٦٩; Rubin and Rosenblum, ١٩٧١) .

كما إن سلفات دودسيل الصوديوم (Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) لها القدرة على تحييد بعض البلازميدات ، إذ إن بعض الخلايا الحاوية على البلازميدات تكون حساسة بدرجة كبيرة للـ SDS (Sonstein and Baldwin, ١٩٧٢) .

تُستخدم الطريقة المعتمدة على رفع أو خفض درجة حرارة نمو البكتريا في تحييد البلازميدات أيضاً ، وقد وُجد أن تأثيرها جزئي وكفاءتها أقل إذا ما قورنت بالمواد الكيمياوية (May *et al*., ١٩٦٤) .

وأشار Trevors (١٩٨٦) إلى أن الـ SDS هو أفضل العوامل المُحيّة تأثيراً مقارنةً مع المعاملة ببروميد الأثيديوم أو مزارع النمو المعتمدة على رفع درجة الحرارة .

في دراسة أجريت من قبل Bernhard وجماعته (١٩٧٨) استخدم بروميد الأثيديوم في تحييد بلازميدات بكتريا *B. cereus* وفقدت جينات المقاومة للمضاد الحيوي تتراسايكلين التي تحملها هذه البلازميدات .

كما استخدم بروميد الأثيديوم والـ SDS في هذه الدراسة أيضاً لتحييد بلازميدات بكتريا *B. cereus* وفقدت جينات المقاومة للمضاد الحيوي كانامايسين التي تحملها هذه البلازميدات .

إن عملية التحييد لوحدها لا تكفي للدلالة على الأساس البلازميدي للجينات تحت الدراسة ، ولهذا يجري عزل البلازميدات بالطرق الجزيئية للتأكد من وجودها في العزلة الأم أولاً ، ومن ثم الكشف عن فقدانها في العزلات المحيدة التي يتم عزلها على أساس فقدانها للصفة (Trevors, ١٩٨٦) .

٣ ـ المواد وطرائق العمل Materials and Methods

٣ ـ ١ المواد Materials

٣ ـ ١ ـ ١ الأجهزة Equipments

١. ميزان الكتروني حساس	Analytical Electronic Balance (Sartorius – Germany)
٢. موصدة	Autoclave (National, Japan)
٣. خلاط	Blender (Jlassco / India)
٤. نابذ مركزي	Centrifuge (Hermle, Germany)
٥. مجهر ضوئي مركب	Compound Light Microscope (Olympus, Japan)
٦. مجمدة عالية التجميد	Deep Freezer (Idesit – Italy)
٧. جهاز تقطير الماء	Distiller (Ogawa Seiki, Japan)
٨. ميزان الكتروني	Electronic Balance (Mettler Pj ٦٠٠, Italy)
٩. وحدة الترحيل الكهربائي	Electrophoresis Unit (Shndon, Scientific Co. LTD England)
١٠. حاضنة	Incubator (Gallenkamp, England)
١١. محرك مغناطيسي	Magnetic Stirrer (Scientific industries, USA)
١٢. نابذ مركزي دقيق	Microfuge (Eppendrof – USA)
١٣. ماصات دقيقة	Micropipettes(Oxford, USA)
١٤. مرشحات غشائية نبيذة ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ و ٠.٤٥ مايكروميتر	Millipore Filter (Sartorius membrane filter GM bH, W. Germany)
١٥. فرن كهربائي	Oven (Memmert, Germany)
١٦. جهاز قياس الرقم الهيدروجيني	pH – Meter (Hoeleze & Cheluis K.G. Germany)
١٧. ماصات باحجام مختلفة	Pipettes (Oxford, USA)
١٨. مجهز القدرة	Power Supplier (Bio Rad, Italy)
١٩. نابذ مركزي مبرد	Refrigerated Centrifuge (Baird and Tatlock, England)
٢٠. ثلاجة	Refrigerator (Frigidaire, USA)
٢١. حاضنة هزازة	Shaking Incubator (Gallenkamp, England)
٢٢. باعث الأشعة فوق البنفسجية	Ultra – Violet (U.V.) Transilluminator (San, Gabird, USA)
٢٣. مازج	Vortex (Griffen & George, UK)
٢٤. حمام مائي	Water Bath (Gallenkamp, England)

٣ ـ ١ ـ ٢ المواد الكيمياوية

١. ألفا – نفثيل أمين	α – Naphthyl Amine (BDH- England)
٢. صبغة ألفا – نفثول أمين	α – Nephthol Amine (BioMerieux – France)
٣. ايثانول مطلق	Absolute Ethanol (٩٩ %) (BDH- England)
٤. حامض الخليك	Acetic acid (BDH- England)

٥. أسيتون	Acetone (Diagnostic – International Inc. USA)
٦. أكار – أكار	Agar – Agar (Oxoid- England)
٧. أكاروز	Agarose (Sigma – USA)
٨. كلوريد الباريوم المائي	$BaCl_2 . 2H_2O$ (BDH- England)
٩. باكتو – تربتون	Bacto – tryptone (Fluka-Switzerland)
١٠. مستخلص لحم البقر	Beef extract (BioMerieux- France)
١١. صبغة بروموفينول الازرق	Bromophenol Blue (BDH- England)
١٢. كلوروفورم	Chloroform (BDH- England)
١٣. البلورات البنفسجية	Crystal Violet (Oxoid- England)
١٤. سكر الارابينوز	D – Arabinose (Fluka-Switzerland)
١٥. سكر الكلوكوز	D – Glucose (Fluka-Switzerland)
١٦. سكر المانيتول	D – Mannitol (Fluka-Switzerland)
١٧. سكر الزايلوز	D – Xylose (Fluka-Switzerland)
١٨. بروميد الاثيديوم	Ethidium – Bromide (Sigma – USA)
١٩. اثلين ثنائي أمين – رباعي حامض الخليك	Ethylene Di amine–Tetra acetic acid (EDTA) (BDH – England)
٢٠. أكياس النمو اللاهوائي	Gas – Pack (Oxoid- England)
٢١. جيلاتين	Gelatin (Fluka-Switzerland)
٢٢. كليسيرول	Glycerol (BDH- England)
٢٣. حامض الكبريتيك	H_2SO_4 (BDH- England)
٢٤. حامض البوريك	H_3BO_3 (Merck, Germany)
٢٥. حامض الهيدروكلوريك	Hydrochloric acid (BDH- England)
٢٦. بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide (BDH- England)
٢٧. يود	Iodin (BDH- England)
٢٨. كحول ايزو اميلي	Isoamyl alcohol (BDH- England)
٢٩. كحول ايزوبروبانول	Isopropanol alcohol (BDH- England)
٣٠. فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	K_2HPO_4 (BDH- England)
٣١. كلوريد البوتاسيوم	KCl (Tabb Laboratories – England)
٣٢. فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4 (BDH- England)
٣٣. يوديد البوتاسيوم	KI (BDH- England)
٣٤. نترات البوتاسيوم	KNO_3 (BDH- England)
٣٥. هيدروكسيد البوتاسيوم	KOH (BDH- England)
٣٦. اللايسوزايم	Lysozyme (BDH- England)
٣٧. صبغة الملاكايت الخضراء	Malachite Green (Oxoid – England)
٣٨. أحمر المثيل	Methyl Red (Merck, Germany)
٣٩. كلوريد المغنيسيوم	$MgCl_2$ (Tabb Laboratories – England)
٤٠. رباعي مثيل-ب- فنيلين ثنائي الأمين ثنائي الهيدروكلورايد	*N,N,N,'N'*, Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride (Fluka-Switzerland)
٤١. فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	$Na_2 HPO_4$ (BDH- England)
٤٢. فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية	$Na_2 H_2PO_4 . 2H_2O$ (BDH- England)
٤٣. كلوريد الصوديوم	NaCl (BDH- England)
٤٤. هيدروكسيد الصوديوم	NaOH (BDH- England)

٤٥. بارا مثيل امينو بنزالديهايد	Para Methyl Amino Benzaldehide (Fluka-Switzerland)
٤٦. ببتون	Peptone (Sigma – USA)
٤٧. صبغة الفينول الأحمر	Phenol Red (Oxoid – England)
٤٨. السفرانين	Safranine (BioMerieux- France)
٤٩. حليب فرز	Skim Milk (BDH- England)
٥٠. كبريتات دوديسيل الصوديوم	Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Fluka – Switzerland)
٥١. نشا ذائب	Soluble Starch (Fluka-Switzerland)
٥٢. حامض السلفانيلك	Sulfanilic acid (BDH- England)
٥٣. الترس القاعدي	Trise-Base
٥٤. اليوريا	Urea (BDH- England)
٥٥. مستخلص الخميرة	Yeast extract (BioMerieux- France)

٣ ـ ١ ـ ٣ الأوساط الزرعية الجاهزة

١. وسط أساس أكار الدم	Blood Agar Base (Mast – UK)
٢. وسط أكار نقيع الدماغ والقلب	Brain Heart Infusion Agar (Oxoid – England)
٣. وسط مرق نقيع الدماغ والقلب	Brain Heart Infusion Broth (Oxoid – England)
٤. وسط اختبار احمر المثيل وتكوين الأسيتون	MR – VP medium (Hi Media – Spain)
٥. وسط أكار مولر – هنتون	Muller – Hinton Agar (Oxoid – England)
٦. وسط الاكار المغذي	Nutrient Agar (Hi Media – Spain)
٧. وسط المرق المغذي	Nutrient Broth (Fluka – Switzerland)
٨. وسط ماء الببتون	Peptone Water Medium (Oxoid – England)
٩. وسط سيمون سترات	Simmon Citrate Agar (Oxoid – England)
١٠. وسط الحديد ثلاثي السكر	Triple Sugar Iron Agar (Fluka – Switzerland)
١١. وسط أساس اكار اليوريا	Urea Agar Base (Oxoid – England)

٣ ـ ١ ـ ٤ المضادات الحيوية Antibiotics

جدول ٣ ـ ١ . المضادات الحيوية المستخدمة

ت	المضاد الحيوي*	رمز المضاد	التركيز µg / disc

١	سايبروفلوكساسين	Ciprofloxacin	CIP	٥
٢	امبينيم	Imipenem	IPM	١٠
٣	امبيسلين	Ampicillin	AM	١٠
٤	بنسلين - ج	Penicillin – G	P	١٠**
٥	لنكومايسين	Lincomycin	L	٢
٦	تـــراي ميثبـــرم - سلفاميثاكسازول	Trimethoprim – Sulfamethxazole	SXT	١.٢٥ + ٢٣.٧٥ (٢٥)
٧	دوكسي سايكلين	Doxycycline	DO	٣٠
٨	سيفالاكسين	Cephalexin	CL	٣٠
٩	جنتامايسين	Gentamycin	CN	١٠
١٠	اموكسيسلين	Amoxycillin	Amx	٢٥
١١	سيفوتاكسيم	Cephotaxime	CTX	٣٠
١٢	امبيكلوكس	Ampiclox	AX	٣٠
١٣	نيومايسين	Neomycin	N	٣٠
١٤	اميكاسين	Amikacin	AK	٣٠
١٥	تتراسايكلين	Tetracycline	TE	٣٠
١٦	كلورامفينكول	Chloramphenicol	C	٣٠
١٧	ارثرومايسين	Erythromycin	E	١٥
١٨	كلنداميسين	Clindamycin	DA	٢

*** جميع المضادات الحيوية المستخدمة مُجهزة من شركة Oxoid .**

**** وحدة دولية (IU – International Unit) .**

٣ ـ ١ ـ ٥ السلالات القياسية المستخدمة

جدول ٣ – ٢ . السلالات القياسية

ت	اسم السلالة	التركيب الوراثي	المصدر
١	*E. coli* MM ٢٩٤	end AI, Leu$^-$, Pro$^-$, thr$^-$, gal$^-$, Lac$^+$, recA$^-$, Rif^r	قسم التقنيات الاحيائية كلية العلوم – جامعة بغداد
٢	*E. coli* HB ١٠١	end AI, hsd R$^-$, Lac$^-$, thi$^-$, pro$^-$, rec A$^-$, Tc^r. Amp^r, pBR٣٢٢$^+$, tra$^-$	

الرموز

١. end AI : خالية من الإنزيمات المحللة للدنا الداخلية .

٢. Leu$^-$, Pro$^-$, thr$^-$, gal$^-$, thi$^-$: الحاجة إلى الليوسين ، البرولين ، الثريونين ، الكالاكتوز والثايمين على التوالي .

٣. Lac$^+$: القدرة على تخمير سكر اللاكتوز .

٤. Lac$^-$: فاقدة القدرة على تخمير سكر اللاكتوز .

٥. $recA^-$: فقدان نظام إعادة الارتباط .
٦. Rif^r , Amp^r, Tc^r : المقاومة للريفامبسين ، الأمبسلين والتتراسايكلين على التوالي .
٧. tra^- : عدم القدرة على الاقتران .
٨. $hsd\ R^-$: خالية من أنظمة التقييد .
٩. $pBR٣٢٢^+$: امتلاك بلازميد pBR٣٢٢ .

٣ ـ ١ ـ ٦ المواد المتفرقة ومصادرها

١. أكياس الدم البشري : مصرف الدم / مستشفى الحلة الجراحي
٢. دم الأغنام : المجزرة
٣. نبيذة طبية : شركة المحاقن الطبية / سوريا
٤. شمع البارافين : Paraffin Wax (BDH – England)
٥. شريط شمعي لاصق : Para film (BDH – England)
٦. المرطبان اللاهوائي : Anaerobic Jar (BBL – England)
٧. أرانب محلية : الأسواق المحلية
٨. فئران بيضاء : البيت الحيواني ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم – جامعة بغداد

٣ ـ ١ ـ ٧ المحاليل والدوارئ

٣ ـ ١ـ ٧ ـ ١. محلول الملح الفسلجي Physiological Normal Saline (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥)

حضر المحلول بإذابة ٨.٥ غم من الـ NaCl (كلوريد الصوديوم) في كمية مناسبة من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم إلى لتر ، عقم بالموصدة وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال ، استعمل هذا المحلول لأغراض التخفيف .

٣ ـ ١ ـ ٧ ـ ٢. محلول مستحلب مُح البيض Egg Yolk Emulsion (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥)

حضر المحلول بنقل مُح بيضة طازج في ظروف معقمة إلى ١٠٠ مليليتر من محلول الملح الفسلجي ، وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٢ ، رج المحلول جيداً ونُبذ بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة عند درجة حرارة ٤ °م لمدة ٣٠ دقيقة ، جمع الراشح في أنابيب معقمة وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م على أن لا تزيد مدة الحفظ على ثلاثة أيام .

٣ ـ ١ ـ ٧ ـ ٣. محلول اليوريا (٤٠ %) (De la maza *et al.*, ١٩٩٧)

حضر المحلول بإذابة ٤٠ غم من مسحوق اليوريا في كمية مناسبة من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم بترشيحه عبر مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٤٥ مايكروميتر إلى قناني معقمة .

٣ ـ ١ ـ ٧ ـ ٤. محاليل السكريات الخزنية (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥)

حضرت محاليل خزينة لكل من السكريات المستخدمة (كلوكوز ، أرابينوز ، مانيتول ، زايلوز) وذلك بإذابة ١ غم من كل سكر على حده بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٥٠ مليليتر وعقم بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر ، وحفظت عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٧ – ٥. محلول ماكفرلاند القياسي Macfarland Solution (MacFaddin, ٢٠٠٠)

يتكون من محلولين :

- محلول A : حضر بإذابة ١.١٧٥ غم من كلوريد الباريوم $BaCl_2$ في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر .
- محلول B يتكون من ١ % حامض الكبيرتيك H_2SO_4

حضر المحلول القياسي بمزج ٠.٠٥ مليليتر من محلول A مع ٩.٩٥ مليليتر من محلول B مع رج المزيج جيداً ليعطي كثافة تضبيب مساوية (١.٥ X 10^8 cfu / ml) ، أغلقت الأنبوبة بإحكام وحفظت عند درجة حرارة الغرفة مع مراعاة رج المزيج جيداً قبل الاستخدام .

٣ – ١ – ٧ – ٦. محلول دارئ الفوسفات (١٩٩٦ Collee *et al.*,)

يتكون من محلولين :

- محلول A : حضر بإذابة ٣.١٢ غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية ($Na_2H_2PO_4 . 2H_2O$) في ٩٠ مليليتر من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر .
- محلول B : حضر بإذابة ٢.٨٣٩ غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (Na_2HPO_4) في ٩٠ مليليتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر .

تم مزج ٢٨ مليليتر من محلول A مع ٧٢ مليليتر من محلول B لغرض تحضير دارئ الفوسفات ذي رقم هيدروجيني ٧.٢ وأكمل الحجم إلى ٢٠٠ مليليتر بالماء المقطر .

٣ – ١ – ٧ – ٧. محلول بنسلين – ج Penicillin G (١٩٩٦ Collee *et al.*,)

حضر المحلول آنياً بإذابة ٠.٦ غم من مسحوق المضاد الحيوي Penicillin G في ٦٠ مليليتر من دارئ الفوسفات ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم المحلول بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر إلى داخل قنينة زجاجية معتمة ومعقمة .

٣ – ١ – ٧ – ٨. محلول النشا الذائب Soluble Starch Solution (١٩٩٦ Collee *et al.*,)

حضر المحلول بتركيز ١ % إذ أذيب ١ غم من مسحوق النشا في ٩٠ مليليتر من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، مع وضع القنينة في حمام مائي عند درجة حرارة ١٠٠ °م مع الرج الجيد لحين ذوبانه تماماً .

٣ – ١ – ٧ – ٩. محلول اليود Iodine Solution (١٩٩٦ Collee *et al.*,)

حضر المحلول بإذابة ٢.٠٣ غم من اليود Iodine مع ٥.٣٢ غم من يوديد البوتاسيوم Potassium Iodide في ٩٠ مليليتر من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، حفظ المحلول في قنينة معتمة .

٣ – ١ – ٧ – ١٠. دارئ SET (١٩٩٥ Pospiech and Neuman,)

حضر من مزج ٧٥ ملي مولار NaCl و ٢٥ ملي مولار EDTA و ٢٠ ملي مولارTris-OH في كمية مناسبة من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم الدارئ بالموصدة لمدة ١٠ دقائق وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٧ – ١١. محلول اللايسوزايم (٥٠ ملغم / مليليتر) (Pospiech and Neuman, ١٩٩٥)

حضر المحلول آنياً بإذابة ٥٠ ملغم من اللايسوزايم في ١ مليليتر من الماء المقطر المعقم .

٣ – ١ – ٧ – ١٢. محلول SDS (١٠ %) (Pospiech and Neuman, ١٩٩٥)

حضر بإذابة ١ غم من الـ SDS في ١٠ مليليتر من الماء المقطر وسخن المحلول إلى درجة حرارة ٥٥ °م وحفظ عند درجة حرارة الغرفة .

٣ – ١ – ٧ – ١٣. محلول NaCl (٥ مولار) (Pospiech and Neuman, ١٩٩٥)

حضر بإذابة ٧.٢٧٥ غم من كلوريد الصوديوم في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٢٥ مليليتر ، عقم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٧ – ١٤. دارئ TE (Pospiech and Neuman, ١٩٩٥)

حُضر من مزج ١ ملي مولار EDTA و ١٠ ملي مولار Tris-OH في كمية مناسبة من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، عقم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٧ – ١٥. دارئ الترحيل TBE (Lema *et al.*, ١٩٩٤)

حُضر من مزج ٥٠ ملي مولار Tris-OH و ٥٠ ملي مولار Boric Acid و ١ ملي مولار EDTA في كمية مناسبة من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ، أكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر ، عقم بالموصدة لمدة ١٠ دقائق وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٧ – ١٦. دارئ التحميل Loading Buffer (Maniatis *et al.*, ١٩٨٢)

حضر الدارئ من ٣ مليليتر Glycerol و ٠.٠٢٥ مليليتر Bromophenol Blue و ٥ مليليتر من TBE ، أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر بالماء المقطر ، مزج المحلول جيداً وحفظ في قنينة معتمة ومعقمة .

٣ – ١ – ٧ – ١٧. محلول كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ (٠.١ مولاري) (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩)

حضر بإذابة ٠.٣٦٧٥ غم من كلوريد الكالسيوم في كمية مناسبة من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم إلى ٢٥ مليليتر ، عقم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٧ – ١٨. محاليل المضادات الحيوية (Maniatis *et al.*, ١٩٨٢)

حضرت محاليل خزنية (Stock Solution) لكل من Penicillin G, Ampicillin ، وبتراكيز ١٠ ملغم / مليليتر ، عقمت بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر ، وحفظ عند درجة حرارة ٤ °م .

٣ – ١ – ٨ الكواشف والصبغات Reagents and Dyes

٣ – ١ – ٨ – ١. كاشف كوفاكس Kovac's Reagent (MacFaddin, ٢٠٠٠)

حضر الكاشف بإذابة ١٠ غم من بارا مثيل أمينو بنزألديهايد *P*-methyl aminobenzaldehyde في ٥٠ مليليتر من Amyl Alcohol ، أكمل الحجم إلى ١٥٠ مليليتر وأضيف ٥٠ مليليتر من حامض الهيدروكلوريك المركز بصورة تدريجية إلى المزيج . خُزن المحلول في قنينة معتمة ورُج بلطف قبل الاستعمال . استخدم هذا الكاشف للكشف عن حلقة الاندول .

٣ – ١ – ٨ – ٢. كاشف احمر المثيل Methyl Red Reagent (MacFaddin, ٢٠٠٠)

حضر الكاشف بإذابة ٠.١ غم من صبغة أحمر المثيل في ٣٠٠ مليليتر من ٩٥ % كحول أثيلي وأكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر باستخدام الماء المقطر .

٣ – ١ – ٨ – ٣. كاشف فوكاس بروسكاور Vogas – Proskaur Reagent (MacFaddin, ٢٠٠٠)

يتكون هذا الكاشف من :

- محلول A : حضر بإذابة ٥ غم من ألفا – نفثول أمين α-Naphthol Amine في كمية مناسبة من الكحول الأثيلي بتركيز ٩٦ % وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ليصبح تركيزه النهائي ٥ % .
- محلول B : أذيب ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في كمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ليصبح تركيزه النهائي ٤٠ % .

٣ – ١ – ٨ – ٤. كاشف الاوكسيديز Cytochrome C Oxidase Reagent (Baron *et al.*, ١٩٩٥)

حضر الكاشف آنياً عند الاستخدام في قنينة معتمة ومعقمة بإذابة ٠.١ غم من ربـاعي مثيل – ب – فنيلين ثنائي الأمين ثنائي الهيدروكلورايد *N,N,N,'N'*-Tetramethyl-*p*-paraphenylene diamine dihydrochloride في كمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر .

٣ – ١ – ٨ – ٥. كاشف اختبار الكاتاليز H_2O_2 (٣ %) Catalase Reagent (Baron *et al.*, ١٩٩٥)

حضر الكاشف في قنينة معتمة ومعقمة بإضافة ٧.٥ مليليتر من محلول ٤٠ % بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ٩٢.٥ مليليتر من الماء المقطر المعقم .

٣ – ١ – ٨ – ٦. كاشف لوكال Lugal's Reagent (MacFaddin, ٢٠٠٠)

حضر بإذابة ١٥ غم من يوديد البوتاسيوم KI و ٥ غم من اليود I_2 في كمية مناسبة من الماء المقطر ، ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، رج المزيج ببطء حتى يذوب ، (إذا لم تتم الإذابة الجيدة يستخدم محرك مغناطيسي Magnetic Stirrer) ، رشح وحفظ في قناني معتمة ومعقمة .

٣ – ١ – ٨ – ٧. كاشف اختزال النترات Nitrate Reduction Reagent (Collee *et al.*, ١٩٩٦)

يتكون هذا المحلول من :

- محلول A : حضر بإذابة ٨ غم من حامض السلفانيلك Sulfanilic Acid في كمية مناسبة من محلول ٥ عياري من حامض الخليك Acetic Acid ، ثم أكمل الحجم إلى لتر .
- محلول B : حضر بإذابة ٥ غم من ألفا – نفثيل أمين α-Naphthyl Amine في كمية مناسبة من محلول ٥ عياري من حامض الخليك Acetic Acid ، ثم أكمل الحجم إلى لتر .

مزج قبل الاستعمال حجمان متساويان من كِلا المحلولين لتكوين الكاشف .

٣ – ١ – ٨ – ٨. محاليل صبغة كرام Gram's Stain Solution (Brooks *et al.*, ١٩٩٨)

حضرت محاليل صبغة كرام وتطبيقها اعتماداً على وفق ما ورد في المصدر أعلاه .

٣ – ١ – ٨ – ٩. محلول صبغة الملاكايت الأخضر (٥ %) Malachite Green Stain (MacFaddin, ٢٠٠٠)

حضر بإذابة ٥ غم من صبغة الملاكايت الخضراء في كمية مناسبة من الماء المقطر ، مُزجت جيداً ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر ، رشح وحفظ في قناني نظيفة ومعقمة .

٣ – ١ – ٨ – ١٠. محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩)

حضر المحلول الخزين بتركيز ١٠ ملغم / مليليتر في قنينة معتمة ومعقمة بإذابة ٠.١ غم من بروميد الاثيديوم في ١ مليليتر من الإيثانول المطلق ، أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر بالماء المقطر .

٣ – ١ – ٨ – ١١. محلول صبغة أحمر الفينول Phenol Red (MacFaddin, ٢٠٠٠)

حضر المحلول بإذابة ٠.٠٥ غم من صبغة أحمر الفينول في ٥ مليليتر من الكحول الأثيلي ٩٥ % ، ثم أكمل الحجم إلى ١٠ مليليتر بالماء المقطر .

٣ – ١ – ٩ الأوساط الزرعية المستخدمة

٣ – ١ – ٩ – ١ الأوساط الزرعية الجاهزة

حضرت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة ، حسب ما أوصت به الشركة المجهزة وكما مثبت على العبوة ، ثم عقمت بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ °م وضغط ١٥ باوند / انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة ، بُرّدت إلى درجة حرارة ٥٠ °م ، وصُبّت في أطباق معقمة أو أنابيب معقمة .

٣ – ١ – ٩ – ٢ الأوساط الزرعية التركيبية

١. وسط اختزال النترات Nitrate Reduction Medium (Collee *et al.*, ١٩٩٦)

حضر بإذابة ٠.٢ غم من نترات البوتاسيوم KNO_3 و ٥ غم ببتون في ٩٥٠ مليليتر من الماء المقطر ، أذيبت هذه المكونات في حمام مائي وأكمل الحجم إلى لتر ، وزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة ، استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على اختزال النترات إلى نتريت .

٢. وسط الحركة Motility Medium (Wilson & Miles, ١٩٦٦)

حضر من المرق المغذي (Nutrient Broth) ، أضيف إليه ٠.٢ % أكار ليعطي وسطاً شبه صلب ، وُزّع في أنابيب نظيفة وعقم بالموصدة .

٣. وسط كلوريد الصوديوم Sodium Chloride Medium (MacFaddin , ٢٠٠٠)

حضر بإضافة كلوريد الصوديوم إلى المرق المغذي (Nutrient Broth) بتركيز نهائي قدره ٧.٥ % ، وُزّع في أنابيب نظيفة وعقم بالموصدة .

٤. وسط أكار النشا Starch Agar Medium (MacFaddin , ٢٠٠٠)

حضر بإذابة ٥ غم من Peptone و ٣ غم Beef Extract و ٥ غم كلوريد الصوديوم و ٢٠ غم Agar – Agar ، في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر . أذيبت هذه المكونات في حمام مائي ، بعد ذلك أذيب ٢٠ غم من النشا في كمية مناسبة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ٢٥٠ مليليتر ، أضيف محلول النشا إلى المزيج السابق وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر ، عقم بالموصدة وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة .

٥. وسط أكار الحليب Milk Agar Medium (Aaronson, ١٩٧٣)

حضر بإذابة ٢٠ غم من الحليب الفرز Skim Milk في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر لتكوين المحلول A . كما أذيب ٢٠ غم من الأكار في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٥٠٠ مليليتر لتكوين المحلول B ، ضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧ ، عقم المحلولان كُلاً على حدة بالموصدة ، ثم برّد المحلولان إلى درجة حرارة ٤٠ – ٤٥ °م ومزجاً جيداً وصب الوسط في أطباق نظيفة ومعقمة .

٦. وسط SOC (Hanahan *et al.*, ١٩٩٦)

حضر بإذابة ٢٠ غم من Bacto-trypton و ٥ غم Yeast Extract و ١٠ مليليتر من ١ مولاري NaCl و ٢.٥ مليليتر من ١ مولاري KCl و ١٠ مليليتر من ٢ مولاري $MgCl_2$ بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم ٩٩٠ مليليتر ، عقم بالموصدة وبرد إلى ٥٠ °م وأضيف له ١٠ مليليتر من ٢ مولاري كلوكوز معقم بالترشيح ، مزج جيداً ووزع في أنابيب نظيفة ومعقمة .

٧. وسط أكار اللسيثين Lecithin Agar (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥)

حضر بإذابة ١.٨ غم من Agar – Agar في كمية مناسبة من الماء المقطر ، أكمل الحجم إلى ٩٠ مليليتر ، عقم بالموصدة وبرد إلى ٥٠ °م ثم أضيف له ١٠ مليليتر من محلول مستحلب مح البيض ، مزج جيداً وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة .

٨. وسط لوريا السائل Luria Broth (Maniatis *et al.*, ١٩٨٢)

حضر بإذابة ١٠ غم من الـ Trypton و ١٠ غم من الـ NaCl و ٥ غم من الـ Yeast Extract في كمية مناسبة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى لتر ، وزع الوسط في أنابيب نظيفة وعقم بالموصدة .

٩. وسط المانيتول – مح البيض – بوليمكسين أكار

Mannitol – Egg Yolk – Polymyxin Agar (MYP)

(Mossel *et al.*, ١٩٦٧)

حضـــر بإذابـــة ١ غـــم Beef Extract و ١٠ غـــم Peptone و ١٠ غـــم D – Mannitol و ١٠ غم كلوريد الصوديوم و ٠.٠٢٥ غم Phenol Red و ٢٠ غم Agar Agar – ، أذيبت المكونات في كمية مناسبة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ٩٠٠ مليليتر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٢ وعقم بالموصدة وبُرّد إلى ٥٠ °م ، أضيف لكل ٩٥ مليليتر من الوسط ٥ مليليتر من محلول مستحلب مُح البيض وأضيف بعدها لكل ١٠٠ مليليتر من الوسط ٠.٠٠١ غم من المضاد الحيوي بوليمكسين B (Polymyxin B) ، مزج جيداً وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة .

١٠. وسط اختبار السكريات (Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥)

حضر بإذابة ١ غم من الببتون في كمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٥٠ مليليتر ، أضيف إليه محلول صبغة أحمر الفينول ، ضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٢ وعقم بالموصدة ، أضيف إليه محاليل السكريات (كلوكوز ، أرابينوز ، مانيتول ، زايلوز) كلٌّ على حده ووُزع في أنابيب نظيفة ومعقمة .

١١. وسط الجيلاتين (MacFaddin , ٢٠٠٠)

حضر بإذابة ١٢٠ غم من الجيلاتين في ٥٠٠ مليليتر من وسط المرق المغذي ، ثم أكمل الحجم إلى لتر ، سخن عند درجة حرارة ١٠٠ °م ، ضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٨.٤ ووُزع في أنابيب نظيفة وعقم بالموصدة .

١٢. وسط تخمر الكلوكوز لاهوائياً Anaerobic Glucose Fermentation Medium

(MacFaddin , ٢٠٠٠)

حضر بإذابة ١٠ غم من الببتون و ٥ غم من NaCl بكمية مناسبة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ٩٩٠ مليليتر ، أضيف إليه محلول صبغة أحمر الفينول ، ضُبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٢ وعقم بالموصدة ، ثم أضيف إليه ١٠ مليليتر محلول سكر الكلوكوز المعقم ، ووُزع في أنابيب نظيفة ومعقمة .

١٣. وسط أكار الدم (MacFaddin , ٢٠٠٠)

حضر وسط أساس أكار الدم ، وبرّد إلى درجة حرارة ٤٥ – ٥٠ °م ، أضيف إليه الدم البشري أو دم الأغنام ٥ % ثم مُزج جيداً وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة .

١٤. وسط أكار اليوريا (De la maza *et al.*, ١٩٩٥)

حضر وسط أساس أكار اليوريا ، وبرّد إلى درجة حرارة ٤٥ °م ، أضيف إليه محلول اليوريا ٥ مليليتر ثم مُزج جيداً ووُزِع في أنابيب نظيفة ومعقمة .

٣ – ٢ طرائق العمل Methods

٣ ـ ٢ ـ ١ جمع العينات

تم جمع ٢٠٠ عينة غذاء مختلفة تضمنت الحليب ومنتجاته وعينات غذاء أخرى من مطاعم متعددة من مدينة الحلة ، جُمعت في حاويات صغيرة مبرّدة ونقلت مباشرةً إلى المختبر .

٣ ـ ٢ ـ ٢ تحضير العينات (Christiansson *et al.*, ١٩٨٩)

وزّن ١٠ غم من عينات الغذاء الصلبة أو مشتقات الحليب ونقلت إلى خلاط كهربائي Blender معقم بالكحول ، أضيف إليه ٩٠ مليليتر من محلول الملح الفسلجي المعقم ، هرست العينة لمدة دقيقة واحدة على السرعة العالية وصبت المحتويات في دورق معقم لإجراء الاختبارات .

أما بالنسبة لعينات الحليب فقد أُخِذ ١٠ مليليتر من الحليب ونقل إلى دورق معقم ، أضيف إليها ٩٠ مليليتر من محلول الملح الفسلجي المعقم ، رُج المزيج بلطف لإجراء الاختبارات .

٣ ـ ٢ ـ ٣ زرع العينات (Christiansson *et al.*, ١٩٨٩)

بعد إجراء التخافيف اللازمة للعينات المحضرة في الفقرة السابقة ، نُشر ٠.١ مليليتر من كل تخفيف على وسطي Nutrient Agar و Blood Agar ، حضنت الأطباق لمدة ٢٤ ـ ٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٢ °م ، تم انتقاء المستعمرات المفردة النقية وزرعت على وسط MYP وخضعت بعد ذلك للتشخيص .

٣ ـ ٢ ـ ٤ تشخيص البكتريا

شخصت البكتريا المعزولة حسب ما ذكر في Claus and Berkeley (١٩٨٦) و Holt وجماعته (١٩٩٤) ، وتم الاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية في التشخيص وكما يأتي :

٣ ـ ٢ ـ ٤ ـ ١ الصفات المظهرية

شخصت المستعمرات النامية تشخيصاً أولياً اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية والمتضمنة حجم وحافة وارتفاع ولون المستعمرات وكذلك الصفات المظهرية للخلايا وأبواغها مثل اصطباغها بصبغة كرام للتعرف على صفات الخلايا ، واصطباغها بصبغة الملاكايت الأخضر للتعرف على شكل البوغ وموقعه بعد فحصها تحت المجهر الضوئي المركّب .

٣ ـ ٢ ـ ٤ ـ ٢ الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests

١. الكشف عن إنزيم الكاتاليز Catalase Test (Collee *et al*, ١٩٩٦)

نُقل جزء من مستعمرة مفردة نامية بعمر ٢٤ ساعة بواسطة عود خشبي معقم إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ، ثم أضيف لها قطرة من ٣ % بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) إذ إن ظهور الفقاعات الغازية هو الدلالة على النتيجة الموجبة .

٢. الكشف عن إنزيم الاوكسيديز Cytochrome C Oxidase Test
(Collee *et al.*, ١٩٩٦)

تم نقل جزء من مستعمرة مفردة نامية بواسطة عود خشبي معقم إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف إنزيم الاوكسيديز ، تلون المستعمرات البكتيرية خلال ٤ - ٥ ثواني باللون البنفسجي دلالة على النتيجة الموجبة .

٣. اختبار الحديد ثلاثي السكر TSI Test (MacFaddin, ٢٠٠٠)

زرعت البكتريا على وسط الحديد ثلاثي السكر بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل ، حضنت الأنابيب لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٢ °م ، ظهور فقاعات غازية أو تكون راسب أسود أو تغيير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دلالة على النتيجة الموجبة .

٤. فحص اختزال النترات Nitrate Reduction (Collee *et al.*, ١٩٩٦)

لقح وسط اختزال النترات بالبكتريا المراد تشخيصها ، حضنت عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٤٨ – ٩٦ ساعة ، وبعد انتهاء فترة الحضن أضيف ١ مل من كاشف اختزال النترات ، ظهور اللون الأحمر خلال ٣٠ ثانية هو الدلالة على النتيجة الموجبة .

٥. اختبار الاندول Indol Test (MacFaddin, ٢٠٠٠)

لقح وسط ماء الببتون وذلك بأخذ جزء من مستعمرة مفردة نقية بواسطة عروة ناقل ، وبعد مدة حضانة ٤٨ ساعة أضيف ٠.٥ مليليتر من كاشف كوفاكس Kovac's Reagent إلى الوسط ورجت الأنبوبة بهدوء ، تكوّن اللون الأحمر بشكل حلقة دائرية بين الوسط والكاشف الكحولي دلالة على النتيجة الموجبة .

٦. اختبار أحمر المثيل Methyl Red Test (Collee *et al.*, ١٩٩٦)

لقح وسط MR – VP بالبكتريا المراد تشخيصها ، حضنت عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، ثم أضيفت ٥ قطرات من كاشف أحمر المثيل ، تحول لون الوسط إلى اللون الأحمر دلالة على النتيجة الموجبة .

٧. اختبار فوكس بروسكاور Voges Proskaur Test (Collee *et al.*, ١٩٩٦)

لقح وسط MR – VP بالبكتريا المراد تشخيصها ، حضنت عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، ثم أضيف ٠.٦ مليليتر من كاشف ألفا – نفثول و ٠.٢ مليليتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم إلى كل أنبوبة ، ظهور اللون الوردي دلالة على النتيجة الموجبة .

٨. اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test (MacFaddin, ٢٠٠٠)

لقح وسط Simmon Citrate بالبكتريا المراد تشخيصها وذلك بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل ، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة . تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالة على النتيجة الموجبة .

٩. اختبار إنزيم اليوريز Urease Test (De la maza *et al.*,١٩٩٧)

زرعت البكتريا على مائل أكار اليوريا Urea Agar Slant بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل ، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ، تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي دلالة على النتيجة الموجبة .

١٠. اختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation Test (Cruickshank *et al.*,١٩٧٥)

لقح وسط اختبار السكريات بالبكتريا المراد تشخيصها وحضن عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ، تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دلالة على النتيجة الموجبة .

١١. فحص النمو اللاهوائي Anaerobic Test (MacFaddin, ٢٠٠٠)

لقح وسط أكار الدم بالبكتريا المراد تشخيصها بالتخطيط بعروة الناقل ، وضعت الأطباق داخل المرطبان مع استخدام أكياس النمو اللاهوائي Gas – Pack ، حضنت عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٤٨ – ٧٢ ساعة ، إن ظهور النمو دلالة على النتيجة الموجبة .

١٢. فحص الحركة Motility Test (MacFaddin, ٢٠٠٠)

تم تلقيح وسط الحركة Motility Medium بالبكتريا المراد تشخيصها بطريقة الطعن بواسطة الإبرة الناقلة في مركز الوسط ، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة ، تتم ملاحظة انتشار النمو من خط الطعنة وهذا الانتشار دلالة على النتيجة الموجبة .

١٣. النمو في (٧.٥ %) كلوريد الصوديوم (MacFaddin, ٢٠٠٠)

لقحت أنابيب وسط كلوريد الصوديوم من مزرعة حديثة بعمر ٢٤ ساعة نامية في وسط المرق المغذي بواسطة عروة ناقل ، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٧ أيام ، ظهور العكورة في الوسط دلالة على النتيجة الموجبة .

١٤. اختبار تحلل النشا Starch Hydrolysis Test (MacFaddin, ٢٠٠٠)

لقح وسط أكار النشا بالبكتريا المراد تشخيصها ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة ، إضيفت بضع قطرات من كاشف لوكال إلى كل طبق ، إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات النامية دلالة على النتيجة الموجبة .

١٥. اختبار الليسيثنيز Lecithenase Test (Cruickshank *et al.*,١٩٧٥)

لقح وسط أكار الليسيثن بالبكتريا المراد تشخيصها على هيئة خطوط بطول ٣ سم في مركز الطبق ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٤٨ ساعة ، إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات النامية دلالة على النتيجة الموجبة .

١٦. اختبار تحلل الكازائين Casein Hydrolysis Test (Aaronson, ١٩٧٣)

لقح وسط أكار الحليب Milk Agar بالبكتريا المراد تشخيصها ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات النامية دلالة على النتيجة الموجبة .

١٧. فحص تخمر الكلوكوز لاهوائياً Anaerobic Glucose Fermentation Test (MacFaddin , ٢٠٠٠)

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر الكلوكوز بالبكتريا المراد تشخيصها وغطيت بطبقة من شمع البارافين المعقم الساخن بارتفاع ٢ سم ، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢

°م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، تحول لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دلالة على النتيجة الموجبة .

١٨. اختبار تمييع الجلاتين Gelatin Liquefaction Test (MacFaddin , ٢٠٠٠)

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين بالبكتريا المراد تشخيصها بطريقة الطعن بواسطة الإبرة الناقلة في مركز الوسط ، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، إن عدم تصلب الجيلاتين بعد حفظه بدرجة ٤ °م مدة ١٠ دقائق دلالة على النتيجة الموجبة .

١٩. اختبار إنتاج إنزيم محلل الدم Haemolysin Test
(Cruickshank *et al.*, ١٩٧٥)

لقحت الأطباق الحاوية على وسط أكار الدم البشري ودم الأغنام Sheep Blood بالبكتريا المراد تشخيصها بالتخطيط بعروة الناقل ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٢ °م و ٣٧ °م لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة ، إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات النامية دلالة على النتيجة الموجبة .

٣ – ٢ – ٥ حفظ وإدامة العزلات

- **الحفظ قصير الأمد (Harly and Prescott, ١٩٩٦)**

لقح وسط الأكار المغذي بالعزلات المشخصة وحضنت عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ، أحيطت الأطباق بوساطة شريط شمعي لاصق (Para Film) . جمعت الأطباق داخل أكياس معلّمة وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ °م لمدة ٧ أيام .

- **الحفظ متوسط الأمد (Harly and Prescott, ١٩٩٦)**

لقحت أنابيب مائل الأكار المغذي بالعزلات المراد حفظها مع حضن الأنابيب في درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ، تم إحاطة سدادة الأنابيب بواسطة شريط شمعي لاصق Para Film ، حفظت الأنابيب في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ °م لمدة تتراوح بين ١ – ٤ أشهر .

- **الحفظ طويل الأمد (Karch *et al.*, ١٩٩٥)**

لقحت أنابيب حاوية على ١٠ مليليتر من المرق المغذي بـ ٠.١ مليليتر من مزروع بكتيري عمره ٤ ساعات للعزلة المراد حفظها ، حفظت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ، بعدها أخذ ١ مليليتر من المزروع البكتيري النامي ونقل إلى أنبوب معقم يحتوي على ١ مليليتر من الكليسيرول المعقم . مزجت المحتويات بشكل جيد وحفظت عند درجة حرارة -٢٠ °م لمدة ٦ أشهر .

٣ – ٢ – ٦ اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Bauer *et al.*, ١٩٦٦)

اختبرت حساسية العزلات تجاه عدد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال طبياً والتي استعملت بشكل أقراص جاهزة ، وكما يأتي :

١. حضر عالق بكتيري وذلك بأخذ جزء من مستعمرة مفردة نقية بواسطة عروة ناقل ونقلت إلى وسط المرق المغذي وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢ – ٥ ساعات أو لحين ظهور العكورة .
٢. عدل تركيز الخلايا الجرثومية في الوسط باستخدام أنبوبة ماكفرلاند القياسية ٠.٥ .

٣. زرعت على وسط مولر هنتون الصلب باستعمال مسحة قطنية Cotton Swab مبللة بالعالق الجرثومي وبثلاثة اتجاهات لغرض نشر البكتريا على سطح الوسط والحصول على نمو متجانس .
٤. تركت الأطباق مدة ٣ – ٥ دقائق حتى تجف ، وضعت بعدها أقراص المضادات الحيوية (٦ أقراص للطبق الواحد) باستخدام ملقط معقم وضغطت الأقراص بلطف .
٥. حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك تمت قراءة النتائج بقياس أقطار التثبيط حول أقراص المضادات الحيوية ومقارنتها بالمعدلات القياسية .

٣ – ٢ – ٧ اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البيتالاكتميز (Collee *et al.*, ١٩٩٦)

استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة Rapid Iodometric Method في الكشف عن قدرة العزلات قيد الدراسة على إنتاج إنزيم الـ β – Lactamase وكما يلي :

١. حضرت مزارع بكتيرية بعمر ٢٤ ساعة منماة على وسط الأكار المغذي ، نقل جزء من مستعمرة مفردة نقية بوساطة ناقل معقم إلى أنابيب أبندروف حاوية على ٠.١ مليليتر من محلول Penicillin G ، حضنت هذه الأنابيب في ٣٢ °م لمدة ٦٠ دقيقة .
٢. تمت إضافة ٥٠ مايكروليتر من محلول النشا .
٣. أضيف ٢٥ مايكروليتر من محلول كاشف اليود ، رجت الأنابيب جيداً لضمان تجانس محتويات الأنبوبة إذ إن تكوّن لون أزرق غامق دلالة على تفاعل اليود مع النشا .
٤. إن التغيير السريع في اللون من الأزرق إلى الأبيض دلالة على النتيجة الموجبة .

٣ – ٢ – ٨ إنتاج السموم (Kramer *et al.*, ١٩٨٢)

١. نميت عزلات بكتريا الـ *B. cereus* على وسط المرق المغذي لمدة ١٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٢ °م .
٢. نقل ٠.٥ مليليتر من النمو البكتيري لتلقيح وسط Brain Heart Infusion Broth المضاف له ٠.١ % كلوكوز والموزع بحجم ١٠ مليليتر في دوارق مخروطية سعة ٢٥٠ مليليتر وحضن عند درجة حرارة ٣٢ °م لمدة ٦ ساعات في حمام مائي هزاز بواقع ٢٠٠ هزة / دقيقة .
٣. بعد الحضن لمدة ٣.٥ و ٤.٥ ساعة أضيف ٠.١ مليليتر من محلول ٠.١ عياري هيدروكسيد الصوديوم ، وبعد انتهاء مدة الحضن نبذ الوسط المستنبت باستخدام النابذ المبرّد Cold Centrifuge بسرعة ١٢٠٠٠ xg لمدة ٣٠ دقيقة وعند درجة حرارة ٤ °م .
٤. ثم اخذ الراشح ورشح باستخدام مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر ٠.٤٥ مايكروميتر وحفظ عند درجة حرارة - ٢٠ °م لحين إجراء اختبار الكشف عن السموم .

٣ – ٢ – ٨ – ١ اختبارات السمية

١. اختبار تفاعل الجلد Skin Reaction Tests

(Parry *et al.*, ١٩٨٣; Kramer *et al.*, ١٩٨٢)

استعملت في هذا الاختبار أرانب محلية بالغة ذات وزن ١.٢٥٠ كغم وعمر ٤ أشهر ، تم حلق الشعر عن المنطقة الظهرية ثم حقنت مكررات بمقدار ٠.٠٥ مليليتر من الراشح البكتيري لعزلات بكتريا الـ *B. cereus* تحت الجلد (Intradermally) ، سجلت النتائج بعد ٤ ساعات من الحقن وكذلك بعد مرور ٢٤ ساعة ، ظهور حلقات حمراء (Erythemal Reaction) عند نقطة الحقن دلالة على النتيجة الموجبة .

٢. اختبار قتل الفئران Mice Killing Test

(Parry *et al.*, ١٩٨٣; Kramer *et al.*, ١٩٨٢)

اجري هذا الاختبار للكشف عن الذيفانات المميتة (Lethal Toxins) لعزلات الـ *B. cereus* ، تم حقن مكررين بمقدار ٠.٥ مليليتر من الراشح البكتيري في وريد الذيل للفئران البالغة ، ذات وزن ١٨ – ٢٢ غم وعمر ٣ أسابيع (إذ إن الوريد يظهر بوضوح بعد سحب الذيل) ، سجلت النتائج بعد مرور ٤٥ دقيقة وكذلك خلال ٢٤ ساعة ، موت الفئران دلالة على النتيجة الموجبة .

٣ – ٢ – ٩ استخلاص الدنا البلازميدي(Pospiech and Neuman, ١٩٩٥)

تم اعتماد طريقة التمليح الخارجي (Salting Out) وكما يأتي :

١. لقح وسط L – Broth بالبكتريا بأخذ جزء من مستعمرة مفردة نقية بواسطة عروة ناقل ، حضنت الأنابيب في الحاضنة الهزازة لمدة ١٨ ساعة ، عند درجة حرارة ٣٧ °م وبسرعة ١٥٠ دورة / دقيقة .
٢. نبذ ٣٠ مليليتر من النمو البكتيري بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ٤ °م ، أهمل الراشح .
٣. عُلقت الخلايا في ٥ مليليتر من دارئ SET وأضيف لها ١٠٠ مايكروليتر من محلول اللايسوزايم مع الرج باستعمال المازج لمدة دقيقة واحدة ، ثم حضن عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ساعة .
٤. أضيف ٦٠٠ مايكروليتر من محلول SDS ثم حضنت عند درجة حرارة ٥٥ °م لمدة ٢ ساعة .
٥. بردت الأنابيب إلى درجة حرارة ٣٧ °م وأضيف إليها ٢ مليليتر من محلول NaCl ، ثم أضيف ٥ مليليتر من الكلوروفورم مع التقليب المستمر للأنابيب لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة .
٦. نبذت الأنابيب بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة .
٧. نقلت الطبقة المائية العليا إلى أنبوب معقم وأضيف الايزوبروبانول المبرد بما يعادل ثلثي الحجم الأصلي ، رج ببطء لمدة ٣ دقائق ، حفظ الأنبوب عند درجة حرارة - ٢٠ °م لمدة ٣٠ دقيقة .
٨. نبذت الأنابيب مركزياً بسرعة ١٠٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة ٤ °م ، أهمل الراشح وترك الراسب ليجف .
٩. أذيب الراسب بـ ١٠٠ – ٢٠٠ مايكروليتر من دارئ TE وحفظ عند درجة حرارة - ٢٠ °م لحين إجراء الترحيل .

٣ – ٢ – ١٠ الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

(Maniatis *et al.*, ١٩٨٢)

تم الكشف عن النمط البلازميدي للعزلات قيد الدراسة بعملية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز .

١. حضر الهلام من إذابة ٠.٤ غم من الاكاروز مع ٥٠ مليليتر من دارئ الـ TBE ، سُخّن حتى الغليان ، تُرك ليبرد إلى درجة حرارة ٤٥ – ٥٠ °م .
٢. أضيف له ٢ مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم .
٣. تم تهيئة قالب الصب (Tray) بإحاطة حافتاه بشريط لاصق وثبت المشط (Comb) الخاص بعمل الحفر (Wells) بالقرب من إحدى نهايتيه ، صُب الهلام مع مراعاة وضع القالب على سطح مستوٍ وترك بعدها ليتصلب .
٤. رفع المشط بهدوء من الهلام المتصلب ، أزيل الشريط اللاصق من جانبي قالب الصب وثبت القالب على مسانده في حوض الترحيل الكهربائي (Tank) الذي سبق ملؤه بدارئ TBE إذ غمر هذا المحلول سطح الهلام كلياً .
٥. حمّل الهلام بنماذج الدنا بمقدار ٢٥ مايكروليتر لكل عينة مضاف إليه ٥ مايكروليتر من دارئ التحميل ، بعدها مرر تيار كهربائي بفرق جهد مقداره ٦٥ فولت مدة ٢ – ٣ ساعة .
٦. فحصت مواقع حزم الدنا المستخلص والمُرحّل في هلام الأكاروز باستخدام باعث الأشعة فوق البنفسجية (U.V. Transilluminator) عند طول موجي مقداره ٣٥٠ نانوميتر ، وتم تصويره .

٣ – ٢ – ١١ التحول البكتيري Bacterial Transformation (Maniatis *et al.*, ١٩٨٢)

استخدم الدنا البلازميدي المستخلص من بعض العزلات المراد اختبارها لتحويل سلالة البكتريا *E. coli* MM٢٩٤ (Rif^r) ، وكما يأتي :

١. لقح ٥٠ مليليتر من وسط SOC السائل في دورق سعة ٢٥٠ مليليتر بـ ١ مليليتر من مزرعة السلالة *E. coli* MM٢٩٤ بعمر ١٨ ساعة ، حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة ١٠٠ دورة / دقيقة عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٣ ساعات .
٢. وزع النمو البكتيري في أنابيب اختبار بمقدار ١٠ مليليتر ووضعت في الثلج لمدة ١٠ دقائق ، نبذت مركزياً بسرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة مدة ١٥ دقيقة .
٣. أهمل الراشح ثم قلبت الأنابيب الحاوية على راسب الخلايا على ورقة ترشيح معقمة لمدة دقيقة واحدة مع المحافظة على برودة الأنابيب .
٤. علقت الخلايا بـ ٣ مليليتر من محلول كلوريد الكالسيوم المبرد .
٥. وضعت الأنابيب في الثلج لمدة ٣٠ دقيقة ثم نبذت مركزياً بنفس الظروف السابقة .
٦. أهمل الراشح وعلقت الخلايا بـ ١ مليليتر من محلول كلوريد الكالسيوم وبذلك تم الحصول على الخلايا المؤهلة ، وزعت هذه الخلايا بمقدار ٢٠٠ مايكروليتر في أنابيب أبندروف معقمة .
٧. أخذت ثلاث أنابيب حاوية على الخلايا المؤهلة ، أضيف للأولى ١٠ مايكروليتر من داري TE ، وعُدّ أنموذجاً للسيطرة لحساب العدد الكلي للخلايا المؤهلة ، وأضيف

للأنبوبة الثانية ١٠ مايكروليتر من الدنا المستخلص من العزلة المراد اختبارها ، وأضيف للأنبوبة الثالثة ١٠ مايكروليتر من دنا بلازميد pBR٣٢٢ المستخدم كسيطرة موجبة ، كذلك استخدمت أنبوبة رابعة حاوية على الدنا البلازميدي للعزلة المراد اختبارها فقط .

٨. وضعت الأنابيب في الثلج لمدة ٤٢ – ٦٠ دقيقة ، بعد ذلك عُرّضت الخلايا إلى صدمة حرارية بوضع الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة ٤٢ °م لمدة ٩٠ ثانية ، ثم أعيد وضعها في الثلج مدة ٣ دقائق .

٩. أضيف لكل أنبوبة ٨٠٠ مايكروليتر من وسط SOC السائل وحضنت لمدة ١ – ٢ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ °م .

١٠. تم نشر ١٠٠ مايكروليتر من تخافيف مناسبة لكل معاملة على أطباق من وسط الأكار المغذي ، كما تم نشر ١٠٠ مايكروليتر على الأوساط الانتخابية (وسط الأكار المغذي الحاوي على بنسلين – ج والامبيسلين بتركيز ١٠٠ مايكرو غرام لكل مليليتر من الوسط) . حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة وفي حالة الحصول على مستعمرات مقاومة لأحد المضادات الحيوية تختبر مقاومتها للمضادات الأخرى .

١١. تم حساب عدد المستعمرات النامية على الأوساط الانتخابية (متحولات) ، أما المستعمرات النامية على وسط الأكار المغذي فتمثل عدد الخلايا المؤهلة ، حسب تكرار التحول حسب المعادلة الآتية :

$$\text{تكرار التحول} = \frac{\text{عدد الخلايا المتحولة}}{\text{العدد الكلي للخلايا المؤهلة}}$$

٣ – ٢ – ١٢ تحييد البلازميدات Plasmids Curing (Trevors, ١٩٨٦)

استخدمت مادة الـ SDS لتحييد بلازميدات بعض العزلات قيد الدراسة وكما يأتي :

١. حضرت مجموعة من الأنابيب ذات السدادات المحكمة سعة ٢٥ مليليتر كل منها يحوي على ١٠ مليليتر من وسط L – Broth .

٢. أضيف لكل أنبوبة كمية من المحلول الخزين لمادة SDS للحصول على التراكيز (٥ ، ١٠ ، ١٥ ، ٢٠ ، ٢٥ ، ٣٠ ، ٣٥ ، ٤٠) مايكروغرام / مليليتر .

٣. لقحت جميع الأنابيب بـ ١٠٠ مايكروليتر من مزروع فتي البكتريا النامية على وسط L Broth – ، كما لقحت أنابيب أخرى تحوي على وسط L – Broth فقط بوصفها نماذج سيطرة ، حضنت جميع الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة .

٤. تم نشر ١٠٠ مايكروليتر من تخافيف مناسبة لعينات أخذت من الأنابيب التي تحتوي على أعلى تركيز من المادة المحيدة والذي اظهر نمواً للبكتريا يمكن ملاحظته بالعين المجردة ، ومن أنابيب السيطرة على وسط Brain Heart Infusion Agar وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة .

٥. كررت ٣٠٠ مستعمرة منفردة من كل تركيز باستعمال طريقة الالتقاط والنقل (Pick and Patch) إلى أطباق بتري حاوية على وسط Brain Heart Infusion Agar لتكون بمثابة أطباق مرجعية (Master Plates) وإلى أطباق حاوية على أوساط انتخابية (وسط BHIA الحاوي على بنسلين – ج والامبيسلين بتركيز ١٠٠ مايكروغرام لكل مليليتر من الوسط) ، حضنت جميع الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة .

٦. حددت المستعمرات التي فشلت في النمو على الأوساط الانتخابية وأكدت حساسيتها للمضادات الحيوية .

٤ ـ النتائج والمناقشة Results and Discussion

٤ ـ ١ عزل وتشخيص بكتريا *B. cereus*

جُمعت ٢٠٠ عينة غذاء مختلفة شملت الحليب ومنتجاته وعينات غذاء من مطاعم مختلفة من مدينة الحلة ، وبعد دراسة الصفات المظهرية من شكل المستعمرات وشكل الخلايا البكتيرية والاختبارات الكيموحيوية ، أثبتت هذه الفحوصات عائدية ١٠ عزلات فقط إلى بكتريا *B. cereus* .

تم استخدام وسطي Nutrient agar و Blood agar للعزل الأولي لبكتريا *B. cereus* وكانت المستعمرات النامية كبيرة الحجم وذات لون ابيض مائل للرمادي وجافة وذات حافة غير مستقرة ، وشخصت مبدئياً كونها تنتمي إلى جنس *Bacillus* اعتماداً على شكل المستعمرة وحجمها (Claus and Berkeley, ١٩٨٦; Holt *et al.*,١٩٩٤; MacFaddin, ٢٠٠٠) .

كما استخدم الوسط الانتقائي أكار مانيتول – مُح البيض – بوليمكسين (MYP) لغرض العزل والتنقية الأولية لبكتريا *B. cereus* من الأغذية ، إذ سهّل هذا الوسط عزل هذه البكتريا من الأغذية ، وهو يعتمد على تفاعل مُح البيض (تحلل الليسثين) من خلال إنتاج البكتريا لإنزيم الليسثينيز وعدم قدرتها على تخمير سكر المانيتول ، وتزداد درجة انتقائية الوسط للنوع *B. cereus* خصوصاً عند إضافة المضاد الحيوي Polymyxin B (Mossel *et al.*,١٩٦٧) .

ظهرت المستعمرات النامية على وسط (MYP) بعد مدة حضانة ٢٤ ساعة وعند درجة حرارة ٣٢°م كبيرة وجافة ومُسطحة وخشنة وبيضاء كريمية مع خلفية حمراء بنفسجية محاطة بهالة تُرى بوضوح من راسب أبيض لمُح البيض المتحلل . وتم تنقية البكتريا على وسط (MYP) نفسه حيث تظهر هذه الصفات بوضوح .

كان شكل الخلايا لبكتريا *B. cereus* وبعد معاملتها بصبغة الكرام بنفسجية اللون ، (موجبة لصبغة كرام) ، عصوية الشكل ، بهيئة خلايا مفردة أو أزواج أو سلاسل ذات نهايات دائرية أو مربعة وبأطوال مختلفة ، أما عند معاملتها بصبغة الملاكايت الأخضر أو صبغة الأبواغ فإن الخلايا اصطبغت باللون الأحمر بينما اصطبغت الأبواغ باللون الأخضر ، وكانت الأبواغ بيضوية ذات موقع مركزي وبدون أن تسبب انتفاخ الحافظة البوغية . وهذا يتفق مع ما أشارت إليه الدراسات التي أجريت على بكتريا *B. cereus* (Claus and Berkeley,١٩٨٦; Holt *et al.*,١٩٩٤; MacFaddin, ٢٠٠٠) .

كانت أعلى نسبة عزل تم الحصول عليها كما مبين في الجدول (٤ – ١) هي ٨ عزلات من مجموع ٣٢ عينة قشطة ، كما تم الحصول على عزلة واحدة من مجموع ١٨ عينة زبد ، وعزلة واحدة من مجموع ٨ عينات محلبي .

جدول ٤ – ١ . تواجد بكتريا *B. cereus* في عينات الأغذية

ت	نوع عينة الغذاء *	عدد العينات	عدد عزلات بكتريا *B. cereus*
١	حليب	٧٣	٠
٢	قشطة	٣٢	٨
٣	زبد	١٨	١
٤	محلبي	٨	١
٥	جبن عرب	٧	٠
٦	لبن رائب	٧	٠
٧	حليب مجفف	٢	٠

٨	شوربة مجففة	٢	٠
٩	كاسترد	١	٠
١٠	الرز المطبوخ	١٣	٠
١١	دجاج مطبوخ	١	٠
١٢	همبركر	٢	٠
١٣	كبة	١	٠
١٤	كباب	١	٠
١٥	عجين	٢	٠
١٦	طحين	١	٠
١٧	حمص بطحينة	٤	٠
١٨	بطاطا مسلوقة	٤	٠
١٩	طماطا / من مكونات السلطة	٧	٠
٢٠	خس / من مكونات السلطة	٧	٠
٢١	فلافل	٥	٠
٢٢	بهارات	٢	٠
المجموع		٢٠٠	١٠

*** جميع عينات الأغذية مصدرها محلي .**

أجريت العديد من الدراسات حول تواجد بكتريا *B. cereus* في الأغذية خصوصاً منتجات الألبان ، فقد أشار Wong وجماعته (١٩٨٨) إلى عزل هذه البكتريا من منتجات الألبان وخصوصاً الحليب المتخمر والمثلجات (الآيس كريم) وغيرها ، كما يمكن عزل بكتريا *B.cereus* من الحلويات ، حيث عزلت من صلصة الفانيلا (Hauge, ١٩٥٥) ، كما أشار Schlegelova وجماعته (٢٠٠٣) إلى عزلها من منتجات الألبان .

يتضح أيضاً من النتائج المبينة في الجدول ٤ – ١ عدم الحصول على أي عزلة لبكتريا *B. cereus* من عينات الأغذية الأخرى ، في حين أشارت العديد من الدراسات في أنحاء مختلفة من العالم إلى تواجدها في عينات أغذية مختلفة ، وبنسب تكاد تكون عالية في الرز المطبوخ والحليب الخام (Gilbert *et al.*, ١٩٧٤; Christiansson *et al.*,١٩٨٩; Lee *et al.*,١٩٩٥; Te Giffel *et al.*,١٩٩٧; Torkar and Mozina, ٢٠٠٠; Borge *et al.*, ٢٠٠١) .

وقد يعود السبب إلى عدم الحصول على أي عزلة إلى اختلاف طريقة طبخ الرز التي تكون باستخدام حرارة أعلى ولفترة زمنية أطول وهذا ما أشار إليه الجاف (١٩٩٧) حيث لم يحصل على أي عزلة لبكتريا *B. cereus* من عينات الرز المطبوخ المأخوذة مباشرةً بعد عملية الطبخ .

كما إن قيام بعض المزارعين بإضافة المضادات الحيوية إلى الحليب لمنع تلوثه بالأحياء المجهرية ، لأن عملية جمعه ونقله إلى الأسواق قد تستغرق فترة طويلة ، أو إعطاء المضادات الحيوية للأبقار أثناء إصابتها بالأمراض ، قد يكون السبب في عدم الحصول على أي عزلة من عينات الحليب (McEwen *et al.*, ١٩٩١; Langford *et al.*, ٢٠٠٣)

أكدت نتائج الاختبارات الكيموحيوية المبينة في الجدول ٤ – ٢ عائدية العزلات العشرة المعزولة في هذه الدراسة إلى بكتريا *B. cereus* (Claus and Berkeley, ١٩٨٦; Holt *et al.*, ١٩٩٤; MacFaddin, ٢٠٠٠) .

جدول ٤ – ٢ . الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *B. cereus*

ت	الاختبارات الكيموحيوية	النتيجة
١	شكل الخلايا	عصيات
٢	الاستجابة لصبغة كرام	+
٣	شكل الأبواغ الداخلية	بيضوي
٤	موقع الأبواغ	مركزي
٥	انتفاخ الحافظة البوغية	-
٦	إنتاج الكاتاليز	+
٧	إنتاج الأوكسيديز	+
٨	الحركة	+
٩	النمو اللاهوائي	+
١٠	تحلل الدم	β
١١	إنتاج الاندول	-
١٢	تفاعل المثيل الأحمر Methyl Red	+
١٣	تفاعل الفوكس بروسكار Vogus Proskaur	+
١٤	استهلاك السترات	+
١٥	التحلل المائي للنشا	+
١٦	إنتاج إنزيم الليسيثيز	+
١٧	تحلل الكازائين	+
١٨	تمييع الجلاتين	+
١٩	(Triple Sugar Iron) T.S.I Slant Butts H_2S	 أحمر (قاعدي) أصفر (حامضي) -
٢٠	فعالية إنزيم اليوريز	V
٢١	اختزال النترات إلى نتريت	+

ت	الاختبارات الكيموحيوية	النتيجة
٢٢	إنتاج الحامض من السكريات أ. كلوكوز ب. مانيتول ج. ارابينوز د. زايلوز	 + - - -
٢٣	النمو اللاهوائي واستخدام الكلوكوز مع انتاج حامض	+

٢٤	النمو في ٧.٥ % NaCl	+

الرمـــوز : + موجبـــة الاختبـــار ، - ســـالبة الاختبـــار ، β بيتـــا (تحلـــل الـــدم الكامـــل) ، V متغايرة النتيجة .

٤ – ٢ مقاومة بكتريا *B. cereus* للمضادات الحيوية

تم اختبار تأثير ١٨ مضاد حيوي على عزلات بكتريا *B. cereus* ، وحُددت مقاومتها للمضـــادات الحيويـــة اعتمـــاداً علـــى قيـــاس قطـــر منطقـــة التثبـــيط (بـــالمليمتر) وفقاً لما ورد في National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS, ١٩٩٠) ، ملحق ١ .

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (٤ – ٣) بأن العزلات جميعها كانت مقاومة ١٠٠ % للبنسلين ج والأمبسيلين والامبيكلوكس والسيفوتاكسيم والاموكسيسلين ، في حين كانت جميع العزلات حساسة ١٠٠ % للاميكاسين والنيومايسين والسايبروفلوكساسين والكلورامفينكول والدوكسي سايكلين والأمبنيم ، كما أظهرت النتائج أن العزلات كانت حساسة بنسبة ٧٠ % للسيفالاكســـــــين و ٨٠ % للجنتامايســـــــين و ٩٠ % للتتراســـــــايكلين و ٨٠ % للتراي مثيبرم – سلفاميثاكسازول و ٩٠ % للارثرومايسين و ٨٠ % للكلندامايسين و ٤٠ % للنكومايسين .

جدول (٤ – ٣)

من ملاحظة نتائج فحص الحساسية نجد أن العزلات أظهرت صفة المقاومة لمضادات البيتالاكتام ، وهذا ما أكدته نتائج دراسات سابقة أخرى على قابلية عزلات بكتريا *B. cereus* للمقاومة العالية لهذه المجموعة من المضادات (Wong *et al.*, ١٩٨٨; Weber *et al.*,١٩٨٨) .

إن بكتريا *B. cereus* تتميز بمقاومتها العالية لمجموعة البيتالاكتام والتي تضم البنسلينات والسيفالوسبورينات ، إذ إنها تنتج ثلاث أشكال مختلفة من إنزيمات البيتالاكتميز (Imsande *et al.*, ١٩٧٠; Chantalat *et al.*, ٢٠٠٠; Kotiranta *et al.*, ٢٠٠٠; Navarro *et al.*, ٢٠٠٤) .

أظهرت نتائج هذه الدراسة أيضاً أن العزلات حساسة لمضادات السلفونامايت والتي تضم التراي ميثبريم – سلفاميثاكسازول ، ولمضادات الماكروليدات والتي تضم الاريثرومايسين والكلندامايسين واللنكومايسين ، ولمضادات الكينولينات والتي تضم السايبروفلوكساسين ، ولمضادات الامينوكلايكوسيدات والتي تضم الاميكاسين والنيومايسين والجنتامايسن ، ولمضادات الكاربابنيمات والتي تضم الأمبنيم ، ولمضادات الكلورامفينكولات والتي تضم الكلورامفنيكول ، ولمضادات التتراسايكلينات والتي تضم التتراسايكلين والدوكسي سايكلين .

تمتلك مضادات السلفونامايت فعالية عالية تجاه البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتعمل على تثبيط بناء الأحماض النووية للخلية البكتيرية والذي يؤدي إلى موتها (Rubin and Swartz, ١٩٨٠; O'Brien, ١٩٨٧; Wong *et al.*, ١٩٨٨) .

أما مضادات الماكروليدات فهي من المضادات ذات الطيف الواسع ، كما تُعد من المضادات القاتلة للعديد من الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام ، وتعمل على تثبيط بناء البروتينات من خلال الارتباط بالوحدات الفرعية للرايبوسوم ومن ثم منع عملية بناء السلسلة الببتيدية (Sliman *et al.*, ١٩٨٧; Weber *et al.*, ١٩٨٨; Gigantelli *et al.*, ١٩٩١; Turnbull *et al.*, ٢٠٠٤) .

في حين أن مضادات الكينولينات تمتلك فعالية عالية ضد العصيّات وتعمل على تثبيط بناء الدنا البكتيري (Turnridge, ١٩٩٥; Andrews and Wise, ٢٠٠٢) .

تمتلك مضادات الأمينوكلايكوسيدات القابلية على قتل النمو البكتيري من خلال قدرتها على اختراق الجدار والغشاء الخلوي والارتباط بالرايبوسوم مُحدثة اضطرب في وظيفته ومن ثم تثبيط عملية بناء البروتين مما يؤدي إلى موت الخلية البكتيرية (Patrick *et al.*, ١٩٨٩; Silver and Bostian, ١٩٩٣; Kunin, ١٩٩٣; Turnbull *et al.*, ٢٠٠٤) .

أما مضادات الكلورامفينكول والتتراسايكلين فتعمل إما على تثبيط بناء البروتين أو تثبيط بناء الأحماض النووية (Weber *et al.*, ١٩٨٨; Andrews and Wise, ٢٠٠٢; Turnbull *et al.*, ٢٠٠٤) .

٤ – ٣ إنتاج إنزيم البيتالاكتميز

أظهرت العزلات العشرة لبكتريا *B. cereus* مقاومة لمضادات البيتالاكتام وكانت موجبة لفحص إنتاج إنزيم البيتالاكتميز باستعمال طريقة اليود القياسية ، إذ يتغير اللون من البنفسجي إلى الأبيض .

تعتمد هذه الطريقة على أساس واحد هو الكشف عن مركبي حامض البنسلوك والسيفالوسبورنك المتكونة من كسر آصرة الأميد (Amid Bond) في حلقة البيتالاكتام لكل من البنسلينات والسيفالوسبورينات ، حيث يتفاعل اليود والنشا لتكوين معقّد بنفسجي غامق اللون يبقى بدون تغيير في حالة عدم إفراز إنزيم البيتالاكتميز . يقوم حامض البنسلوك والسفالوسبورنك المتكونين نتيجة فاعلية إنزيم البيتالاكتميز الناتج من البكتريا باختزال اليود (Iodine) إلى أيوديد (Iodide) ويكون الأخير فاقداً لقابلية التفاعل مع النشا وتكوين المعقد البنفسجي اللون ويتحول اللون مباشرة إلى الأبيض (Sykes and Mattew, ١٩٧٦; Bush *et al.*, ١٩٩٥; Rodgers *et al.*, ٢٠٠١) .

يتضح من النتائج المبينة في الجدول ٤ – ٤ وجود تباين في الوقت اللازم لظهور النتيجة الموجبة ، إلاّ إن عدم تجاوز الفترة الزمنية عن ٩٠ ثانية يدل على أن كمية إنزيم البيتالاكتميز المفرزة عالية جداً ، فلقد أشار العديد من الباحثين إلى أن اختزال اليود السريع إلى أيوديد يعتمد بصورة أساسية على تركيز إنزيم البيتالاكتميز ، إضافة إلى ذلك تلعب كل من الحرارة ومقدار الأس الهيدروجيني دوراً في زيادة أو نقصان الفعالية الإنزيمية (Perret, ١٩٥٤; Foley and Perret, ١٩٦٢) .

لذا يمكن القول أن العزلات قيد الدراسة والتي أعطت جميعها فحصاً موجباً سريعاً لها من جزيئات الإنزيم ما يكفي لتحويل أكبر عدد ممكن من جزيئات البنسلين إلى حامض البنسلوك (Bush and Sykes,١٩٨٦; Bush, ١٩٨٩) .

جدول ٤ – ٤ . الفترة الزمنية اللازمة لحدوث التغيير اللوني في الكشف عن إنزيم البيتالاكتميز

ت	العزلة	المصدر	التغير اللوني (ثانية)
١	Bc١	زبد	٦٠
٢	Bc٢	محلبي	٥
٣	Bc٣	قشطة	٦٠
٤	Bc٤	=	٤
٥	Bc٥	=	٦
٦	Bc٦	=	٩٠
٧	Bc٧	=	٣٠
٨	Bc٨	=	٥
٩	Bc٩	=	٩٠
١٠	Bc١٠	=	٤

امتازت طريقة اليود القياسية بسهولة إجراءها وقصر الفترة الزمنية للحصول على النتيجة إضافة إلى توفر المواد اللازمة لعمل الاختبار ، ويُعد البنسلين – ج المستخدم في الفحص كمادة أساس لكل إنزيمات البيتالاكتميز بنوعيها البنسلينيز والسيفالوسبورنيز ، وبذلك يمثل

الاختبار مسحاً أوليا شاملاً لكل أنواع إنزيمات البيتالاكتميز الموجودة (Bush *et al.*,١٩٩٥) .

أشارت دراسة سابقة (Sykes and Mattew, ١٩٧٦) إلى أن مساوئ الطريقة تكمن في احتمال إعطاء نتيجة كاذبة في حالة استخدام مضاد مُحضّر منذ فترة زمنية طويلة ، لذا يفضّل تحضيره آنياً وعدم خزنه لفترات طويلة تتجاوز الأسبوعين ، إضافة إلى إخفاق الطريقة في التحري عن وجود إنزيمات كروموسومية محفزة منتجة بكميات قليلة .

٤ – ٤ إنتاج السموم واختبارات السمية

أجريت اختبارات السمية للعزلات العشرة لبكتريا *B. cereus* استناداً إلى طريقة Kramer وجماعته (١٩٨٢) باستخدام حيوانات التجارب (الأرانب والفئران) ، وكان الاختبار الذي أجري على الأرانب هو اختبار تفاعل الجلد الذي تضمن احمرار الجلد وتقرح الجلد ووذمة الجلد ، أما الاختبار الذي اجري على الفئران فهو اختبار قتل الفئران الذي يكشف عن وجود سم مميت للفئران .

يتضح من النتائج المبينة في الجدول ٤ – ٥ أن العزلات العشرة أعطت نتيجة موجبة لاختبار احمرار الجلد بعد مرور ٤ ساعات من الحقن مؤدياً إلى حصول احمرار حول منطقة الحقن ، شكل ٤ – ١ – A ، وهذا ما أكدته نتائج دراسات محلية أخرى أشارت إلى إن جميع العزلات كانت موجبة لاختبار احمرار الجلد ، وأشار الباحثين إلى احتمالية وجود علاقة بين إنتاج إنزيم Phospholipase C من بكتريا *B. cereus* وإيجابية احمرار الجلد (الجاف ، ١٩٩٧ ومهدي ، ٢٠٠١) .

أما بالنسبة إلى اختبار تقرح الجلد الذي تم بعد مرور ٢٤ ساعة أو أكثر ، شكل ٤ – ١ – B ، فقد أعطت ٦ عزلات نتيجة موجبة ، وهذا يشير إلى احتمالية وجود عامل مسؤول عن احمرار الجلد غير العامل المسؤول عن قرحة الجلد ، كما إنه ليس هناك علاقة بين إنتاج إنزيم Phospholipase C وشّة تقرح الجلد (الجاف ، ١٩٩٧) .

وهذا ما أكده Glatz وجماعته (١٩٧٤) بأن تفاعل الجلد يحدث نتيجة لفعالية عاملين هما : حال الدم Cereolysin O ، والسم المعوي البروتيني Proteinaceous Necrotic Enterotoxin .

نظراً لوجود تشابه كبير بين *B. cereus* و *B. anthracis* فقد تم التحري عن وجود وذمة (Edema) عند منطقة الحقن في الجلد ، ويُعد هذا دليل على وجود سم الجمرة (Anthrax Toxin) الذي تنتجه *B. anthracis* (Logan and Berkeley, ١٩٨٤; Dixon *et al.*, ١٩٩٩; Kumar *et al.*, ٢٠٠٢) .

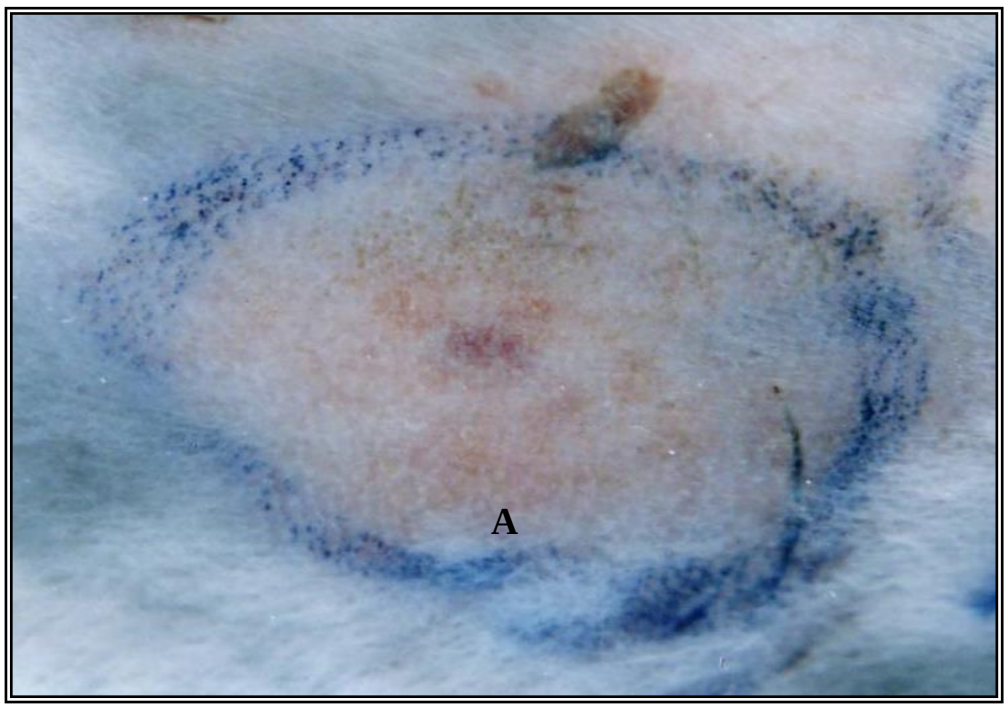
أظهرت النتائج المبينة في الجدول ٤ – ٥ أن جميع العزلات أعطت نتيجة سالبة لهذا الفحص ، ويتفق هذا أيضاً مع النتائج التي توصل إليها الجاف (١٩٩٧) ويؤكد على أن كل العزلات عائدة إلى بكتريا *B. cereus* وغير منتجة لسم الجمرة .

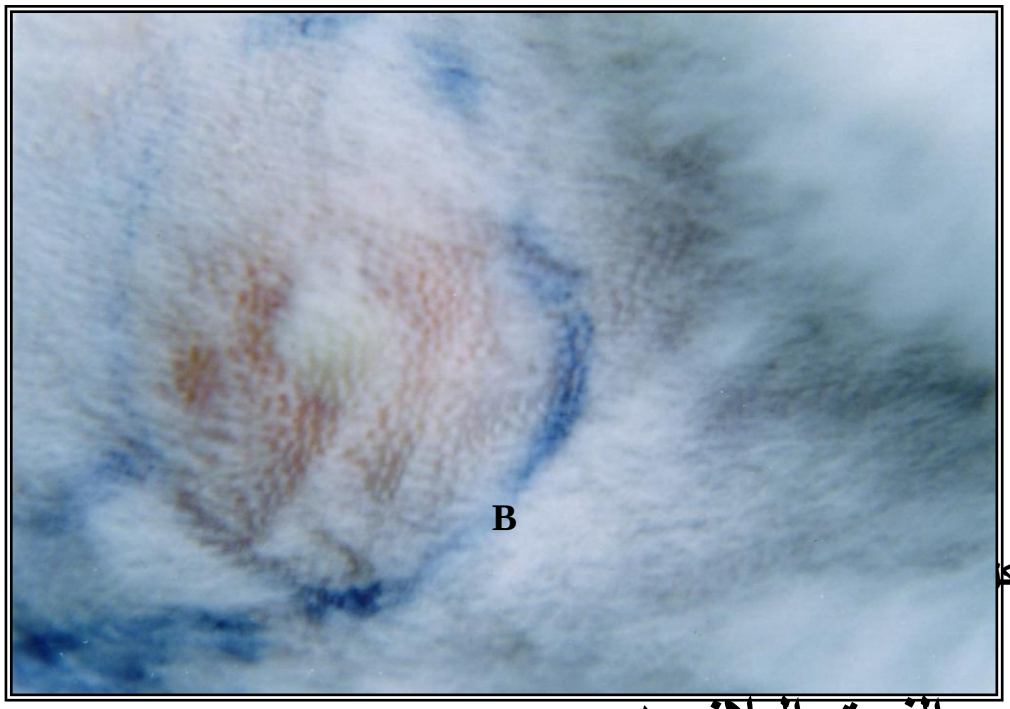
أما في اختبار قتل الفئران ، الجدول ٤ – ٥ فقد لوحظ أن ٣ عزلات أدت إلى قتل الفئران على الرغم من امتلاك كل العزلات لفاعلية حل الدم كما موضح في الجدول ٤ – ٢ ، وهذا ما أكده Wong وجماعته (١٩٨٨) إذ وجدوا أن من مجموع ١١ عزلة تمتلك فاعلية قوية لحل الدم (٣ عزلات فقط أدت إلى قتل الفئران) ، في حين بينت نتائج دراسات محلية إلى احتمال وجود علاقة بين امتلاك العزلة لفعالية حل الدم وقتل الفئران واعتبروا أن حال الدم Cereolysin O هو المسؤول عن قتل الفئران (الجاف ، ١٩٩٧ ومهدي ، ٢٠٠١) .

جدول ٤ – ٥ . اختبارات السمية لعزلات بكتريا *B. cereus*

ت	العزلة	المصدر	احمرار الجلد	تقرح الجلد	وذمة الجلد	قتل الفأر
١	Bc١	زبد	+	-	-	-
٢	Bc٢	محلبي	+	-	-	-
٣	Bc٣	قشطة	+	+	-	-
٤	Bc٤	=	+	+	-	-
٥	Bc٥	=	+	-	-	-
٦	Bc٦	=	+	+	-	-
٧	Bc٧	=	+	-	-	-
٨	Bc٨	=	+	+	-	+
٩	Bc٩	=	+	+	-	+
١٠	Bc١٠	=	+	+ وبشدة	-	+

الرموز : + موجبة الاختبار ، - سالبة الاختبار .





شكل

٤ – ٥ النسق البلازميدي Plasmid Profile

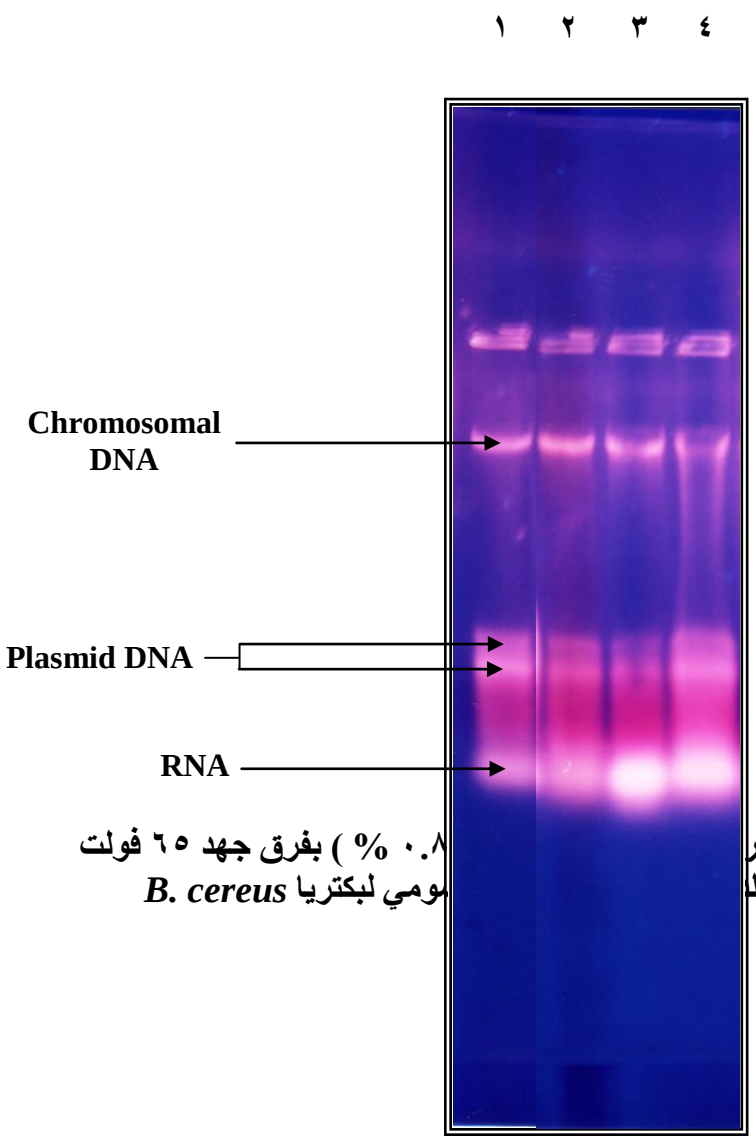
تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلات العشرة لبكتريا *B. cereus* للتعرف على دور جينات هذه البلازميدات في المقاومة للمضادات الحيوية وإنتاج السموم وذلك باستخدام طريقة التمليح الخارجي (Salting Out) التي أوضحها Pospiech and Neuman (١٩٩٥) بوصفها أفضل طريقة لعزل الدنا الكلي .

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لمستخلص الدنا على هلام الاكاروز ، الشكل ٤ – ٢ . A وB احتواء عزلات بكتريا *B. cereus* على حزمتين بلازميديتين صغيرتين ذات أوزان جزيئية متقاربة مع بعضها البعض ومقاربة بالحجم للبلازميد pBR٣٢٢ الذي استخدم بوصفه دليلاً حجمياً .

وهذا يتفق مع ما أشار إليه Bernhard وجماعته (١٩٧٨) من أن عزلات بكتريا *B. cereus* تحتوي ١ – ٢ بلازميد أو أكثر ذات أوزان جزيئية تتراوح بين ١.٨ × ١٠^{٦} – ١٠٥ × ١٠^{٦} دالتون ، وتحمل جينات وراثية مسؤولة عن إنتاج البكتريوسين والمقاومة للتتراسايكلين والكانامايسين وعدد آخر من المضادات الحيوية .

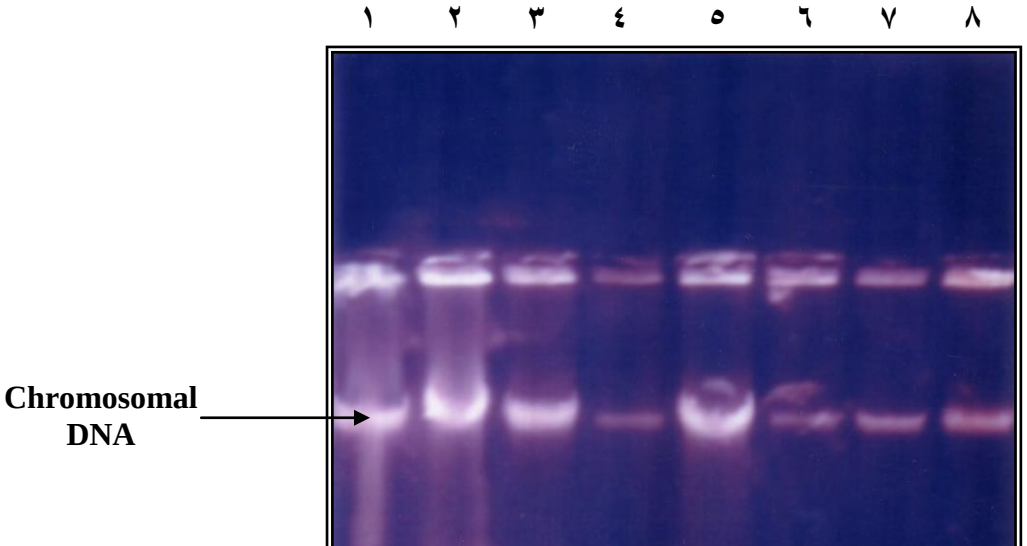
ففي دراسة أجريت من قبل Debuono وجماعته (١٩٨٨) أظهرت ١١ عزلة لبكتريا *B. cereus* تماثلاً في النسق البلازميدي ، كما أن كل العزلات كانت تمتلك ٤ بلازميدات ذات أوزان جزيئية تتراوح بين ٥.١ – ٣٤ ميكا دالتون .

وهناك دراسات أخرى تشير إلى أن بكتريا *B. cereus* تحتوي على البلازميدات وإن معظم هذه البلازميدات تحمل الكثير من الجينات الوراثية المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية (Kado, ١٩٩٨; Rowan *et al.*, ٢٠٠٣) .



شكل ٤ – ٢ . A. الترحيل الكهر ... ٠.٨ %) بفرق جهد ٦٥ فولت
والذي يُظهر مواقع حزم ال ... ومي لبكتريا *B. cereus*

المسار ١ : البلازميد pBR٣٢٢
المسار ٢ : العزلة Bc٢
المسار ٣ : العزلة Bc٣
المسار ٤ : العزلة Bc٤



شكل ٤ – ٢ . B. الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨ %) بفرق جهد ٦٥ فولت والذي يُظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *B. cereus*

المسار ١ : البلازميد pBR٣٢٢
المسار ٢ : العزلة Bc١
المسار ٣ : العزلة Bc٥
المسار ٤ : العزلة Bc٦
المسار ٥ : العزلة Bc٧
المسار ٦ : العزلة Bc٨
المسار ٧ : العزلة Bc٩
المسار ٨ : العزلة Bc١٠

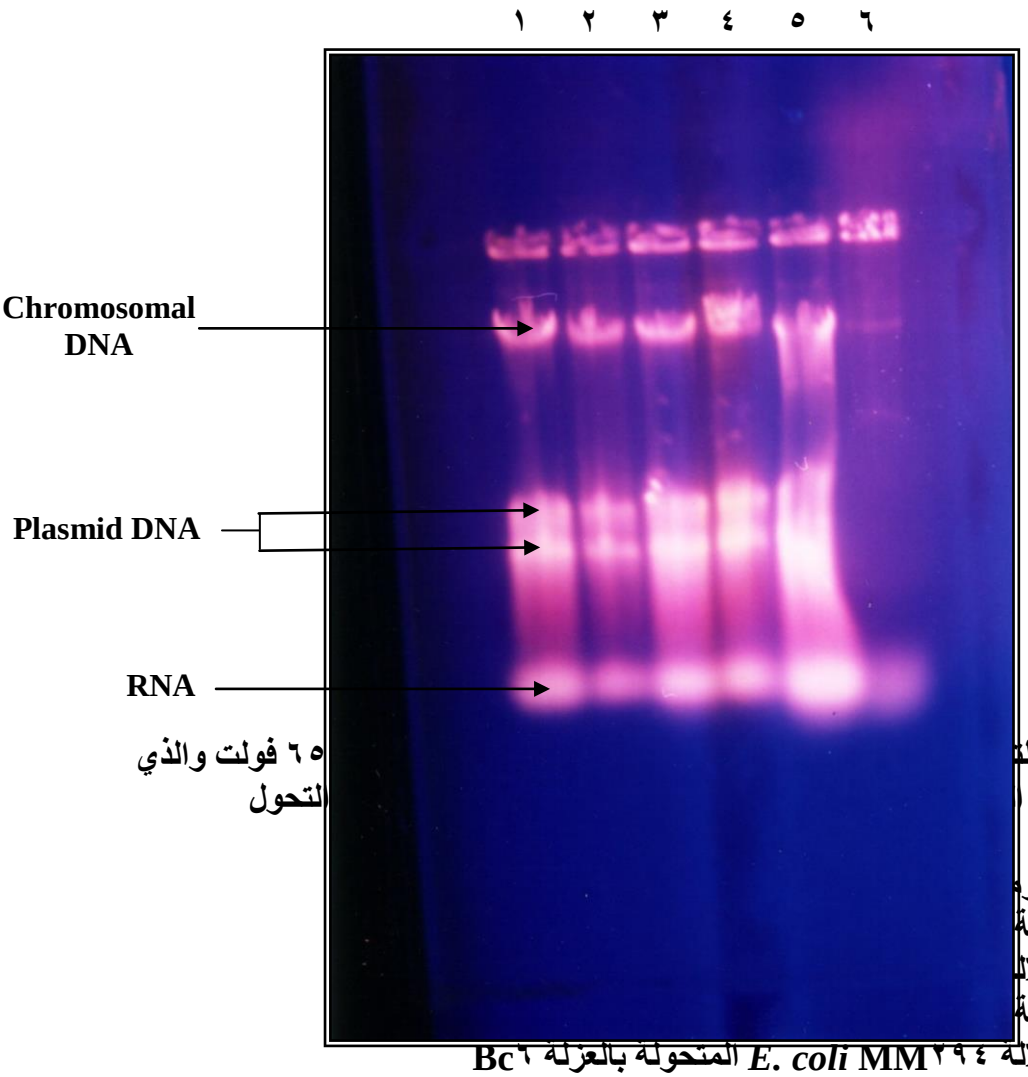
٤ – ٦ التحول Transformation

لتحديد دور بلازميدات عزلات بكتريا *B. cereus* في المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، أجريت محاولات لتحويل سلالة البكتريا *E. coli* MM٢٩٤ (Rif^r) بالدنا البلازميدي المستخلص من العزلتين Bc١ و Bc٦ ، واستخدمت السلالة *E. coli* MM٢٩٤ لكونها تتميز بعدم احتوائها على نظام تقييد (r^-) وعدم احتوائها على نظام تبادل وراثي (Recombination) (rec^-) وبالتالي فإن البلازميد في حالة انتقاله إلى هذه السلالة فانه لا يتعرض للتقطيع بفعل إنزيمات التقييد ولا يحصل له تبادل وراثي مع كروموسوم هذه السلالة ، كما حولت السلالة نفسها بالبلازميد pBR٣٢٢ ($Amp^r . Tc^r$) المستخلص من السلالة *E. coli* HB١٠١ بوصفة سيطرة موجبة وذلك للتأكد من نجاح طريقة التحول المستخدمة .

كان تردد التحول للسلالة *E. coli* MM٢٩٤ المتحولة بمستخلص الدنا البلازميدي للعزلتين Bc١ و Bc٦ هو ٣.٤×١٠^{-٦} و ٨.١×١٠^{-٤} على التوالي .

تعتمد كفاءة التحول على تهيئة وتحضير الخلايا الكفوءة ، إذ إن معاملة الخلايا بمادة كلوريد الكالسيوم المبرد ، ثم تعريضها لصدمة حرارية سوف يسهّل من دخول الدنا البلازميدي إلى الخلايا الكفوءة (Cohen *et al.*, ١٩٧٢) .

بعد استخلاص دنا المتحولات وترحيله كهربائياً بهلام الاكاروز كان النسق البلازميدي لهذه المتحولات مشابهاً للنسق البلازميدي للعزلتين Bc١ و Bc٦ ، الشكل ٤ – ٣ وهذا يدل على نجاح التحول وانتقال البلازميدات الحاملة لصفة المقاومة للبنسلين – ج والامبيسلين .



شكل ٤ – ٣ . التـ ٦٥ فولت والذي يُظهر ا التحول

المسار ١ : البلازـ
المسار ٢ : العزلة
المسار ٣ : السلالـ
المسار ٤ : العزلة
المسار ٥ : السلالة *E. coli* MM٢٩٤ المتحولة بالعزلة Bc٦
المسار ٦ : السلالة *E. coli* MM٢٩٤

إن نجاح البلازميدات الصغيرة الحجم المستخلصة من العزلتين Bc١ و Bc٦ في قدرتها على التعبير المظهري في السلالة *E. coli* MM٢٩٤ يدل على أن هذه البلازميدات ذات مدى عائلي واسع ، إذ تشير الدراسات إلى إمكانية تعبير البلازميدات المستخلصة من بكتريا *B. cereus* في بكتريا *E. coli* و *B. subtilis* (Sloma and Gross, ١٩٨٣; Rondon *et al.*, ١٩٩٩) .

كما أكد Bernhard وجماعته (١٩٧٨) حصول ظاهرة التحول في بكتريا *Bacillus* وبّين دورها في انتقال البلازميدات المسؤولة عن هذه المقاومة للمضادات الحيوية بين عزلات هذه البكتريا المقاومة لهذه المضادات إلى عزلات حساسة لها .

أشار Belliveau and Trevors (١٩٨٩) إلى ظاهرة التحول الوراثي بين عزلات بكتريا *Bacillus* ، حيث قاما بتحويل سلالة من *B. cereus* بواسطة البلازميد Pc١٩٤ الحامل لصفة المقاومة للمضاد الحيوي الكلورامفينكول المعزول من *B. subtilis* وكان تكرار التحول ٢ × $١٠^{-٥}$.

كما أشار Brown and Carlton (١٩٨٠) إلى ظاهرة التحول من خلال تحويل بكتريا *B. megaterium* بواسطة بلازميدات معزولة من *B. cereus* و *S. aureus* .

٤ – ٧ تحييد البلازميدات Plasmids Curing

الهدف الأساسي من إجراء تجارب التحييد هو لتحديد دور بعض الجينات المسؤولة عن الصفات التي تكون محمولة على البلازميد ومن المحتمل فقدانها أثناء المعاملة بالمواد المُحيّدة (Trevors, ١٩٨٦) ، ومن هذه المواد والتي استخدمت في الدراسة الحالية مادة SDS لتحييد بعض بلازميدات بكتريا *B. cereus* ، فبعد معاملة العزلات Bc١ و Bc٦ بتراكيز مختلفة من الـ SDS والمبينة في الجدول ٤ – ٦ . تم تحديد التركيز القاتل الذي ينعدم فيه النمو كلياً والذي بلغ ٤٠ مايكروغرام / مليليتر في حين كان التركيز المثبط الأدنى هو ٣٥ مايكروغرام / مليليتر .

جدول ٤ – ٦ . تراكيز المادة المحيدة SDS للعزلتين Bc١ و Bc٦

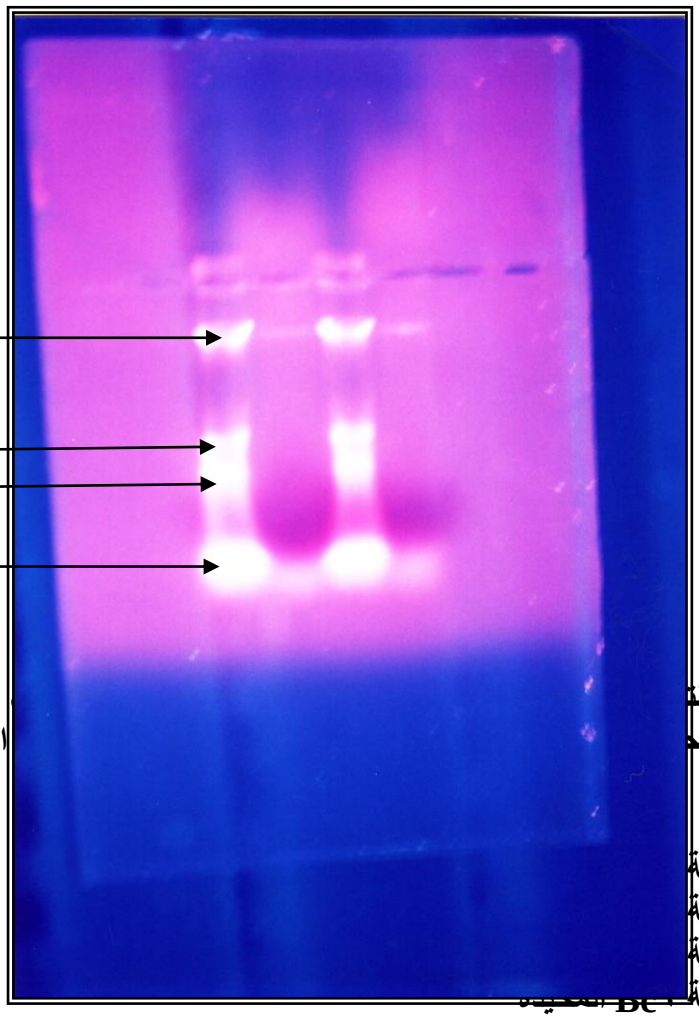
العزلة	التركيز (مايكروغرام / مليليتر)							
	٥	١٠	١٥	٢٠	٢٥	٣٠	٣٥	٤٠
Bc١	++++	++++	+++	++	++	++	+	-
Bc٦	++++	++++	+++	++	++	++	+	-

الرموز : ++++ نمو كثيف جداً ، +++ نمو كثيف ، ++ نمو متوسط ، + نمو ضعيف ، - انعدام النمو .

وبعد إجراء اختبار الحساسية لمضادات البنسلين – ج والامبيسلين والاموكسيسلين والامبيكلوكس على المستعمرات المُحيَّدة المنتخبة CBc١ و CBc٦ ومقارنتها مع العزلات الاصلية Bc١ و Bc٦ لوحظ أن جينات المقاومة لهذه المضادات قد تم فقدانها عند معاملتها بمادة SDS بالتراكيز ٢٠ و ٢٥ مايكروغرام / مليليتر للعزلتين Bc١ و Bc٦ على التوالي .

بعد استخلاص الدنا البلازميدي لكِلا العزلتين والكشف عن حُزم الدنا لوحظ اختفاء الحُزم البلازميدية في العزلات المُحيّدة الآنفة الذكر ، شكل ٤ – ٤ ، وفقدان هذه الحزم يشير إلى ارتباط الجينات الوراثية للمضادات الحيوية البنسلين – ج والامبيسلين والاموكسيسلين والامبيكلوكس بالحُزم البلازميدية المفقودة ، أي بمعنى آخر أنها محمولة على البلازميد ، وهذا يتفق مع ما أشارت إليه بعض الدراسات من أن الجينات الوراثية المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية

تكون محمولة على البلازميدات (Kado, ١٩٩٨; Helgason *et al*., ٢٠٠٠b) . تم إجراء فحص إنتاج إنزيم البيتالاكتميز لغرض التأكد والكشف عن إمكانية العزلات المُحّيدة CBc١ و CBc٦ على إنتاج الإنزيم ، وقد لوحظ أن هذه العزلات قد فقدت قابليتها على الإنتاج ، وهذا يؤكد أن الجينات المُشفّرة لإنتاج البيتالاكتميز هي بلازميدية الموقع ، كما تم الكشف عن قابلية العزلات المُحّيدة CBc١ و CBc٦ على إنتاج السموم ، وقد لوحظ أنها فقدت هذه الصفة أيضاً ، مما يدل على إن البلازميدات قد تحمل أحد الجينات المسؤولة عن إنتاج السموم أما من الناحية التركيبية أو التنظيمية ، ولا توجد أي أدبيات علمية حول هذا الجانب .



شكل ٤ – ٤ . ال... ٦٥ فولت والذي
يُظهر مواقع ... المعاملة وغير

المسار ١ : العزلة...
المسار ٢ : العزلة...
المسار ٣ : العزلة...
المسار ٤ : العزلة...

تُعد مادة الـ SDS شائعة الاستعمال في تجارب التحييد ، وهي من المواد المؤثرة على جدران الخلايا البكتيرية إذ تعمل على تحطيمها ، ويؤدي ذلك إلى فقدانها لمواقع ارتباط البلازميدات بجدار الخلية .

استخدم الجاف (١٩٩٧) مادة بروميد الاثيديوم في تحييد عزلات بكتريا *B. cereus* ولم يحصل على أي عزلة مُحيّدة ، كما أشار Bernhard وجماعته (١٩٧٨) إلى استخدام مادة بروميد الاثيديوم في تحييد بلازميدات بكتريا *B. cereus* الحاملة لصفة المقاومة للتتراسايكلين ، وقد تم الحصول على عزلة واحدة فقط مُحيّدة ، كما أشاروا إلى أن استخدام بروميد الاثيديوم مع الـ SDS في تحييد بلازميدات بكتريا *B. cereus* الحاملة لصفة المقاومة للكانامايسين أدت إلى الحصول على عزلات مُحيّدة فاقدة لهذه الصفة . كما أشار Trevors (١٩٨٦) إلى أن مادة SDS هي من أفضل العوامل المُحيّدة مقارنة ببروميد الاثيديوم ومزارع النمو المعتمدة على رفع درجة الحرارة .

المصادر References

أولاً : المصادر العربية

الجاف ، بهروز ، محمود أمين (١٩٩٧) . دراسة مايكروبايولوجية ووراثية على عزلات محلية لبكتريا *Bacillus cereus* . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

مهدي ، معتز ، عبد الواحد عبد المنعم (٢٠٠١) . دور بعض أنواع البكتريا الهوائية المكونة للأبواغ في فساد الحليب . أطروحة دكتوراه ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد .

ثانياً : المصادر الأجنبية

Aaronson, S. (١٩٧٣). Enrichment Culture, In: CRC – Handbook of Microbiology. Organismic Microbiology. Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. (eds.), The Chemical Rubber Co. Press, Cleveland, U.S.A., PP. ٧٢٥ – ٧٣٥.

Afghani, B. and Stutman, H.R. (١٩٩٤). Toxin related diarrheas. Ped. Ann. **٣**: ٥٤٩ – ٥٥٥.

Agata, N.; Ohta, M.; Arakawa, Y. and Mori, M. (١٩٩٥). The *becT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. Microbiol. **١٤١ (٤)**: ٩٨٣ – ٩٨٨.

Ambler, R.P.; Coulson, A.F.W.; Frere, J-M.; Ghuysen, J-M.; Joris, B.; Forsman, M.; Levesque, R.C.; Tiraby, G. and Waley, S.G. (١٩٩١). A Standard numbering Scheme for the class A beta–lactamases. Biochem. J. **٢٦٠ (٣)**: ٢٦٩ – ٢٧٢.

Andrews, J.M. and Wise, R. (٢٠٠٢). Susceptibility testing of *Bacillus* species, Antimcrob. Chemother. **٤٩**: ١٠٤٠ – ١٠٤٢.

Ash, C.; Farrow, J.A.E.; Dorsch, M.; Stackebrandt, E. and Collins, M. D. (١٩٩١). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of ١٦S rRNA. Int. J. Syst. Bacteriol. **٤١**: ٣٤٣ – ٣٤٦.

Banerjee, C.; Bustamante, C.I.; Wharton, R.; Talley, E. and Wade, J.C. (١٩٨٨). *Bacillus* infections in Patients with Cancer. Arch. Intern. Med. **١٤٨**: ١٧٦٩ – ١٧٧٤.

Baron, E.J.; Peterson, L.R. and Finegold, S.M. (١٩٩٥). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. "٩th ed.". The C-V. Mosby Company. New York, U.S.A.

Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherries, J.C. and Turck, M. (١٩٦٦). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. **٣٦**: ٤٩٣ – ٤٩٦.

Bean, N.H. and Griffin, P.M. (١٩٩٠). Food borne disease outbreaks in the United States, ١٩٧٣ – ١٩٨٧: Pathogenes, vehicles, and trends. Food Product. **٥٣**: ٨٠٤ – ٨١٧.

Becker, H.; Schaller, G.; Von Wiese, W. and Terplan, G. (١٩٩٤). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. Int. J. Food Microbiol. ٢٣: ١ – ١٥.

Beecher, D.J. and MacMillan, J.D. (١٩٩١). Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. ٥٩: ١٧٧٨ – ١٧٨٤.

Beecher, D.J. and Wong, A.C. (١٩٩٤). Improved Purification and characterization of Hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. ٦٢: ٩٨٠ – ٩٨٦.

Beecher, D.J. and Wong, A.C. (١٩٩٧). Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*: Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. J. Biol. Chem. ٢٧٢: ٢٣٣ – ٢٣٩.

Beecher, D.J.; Schoeni, J.L. and Lee Wong, A.C. (١٩٩٥). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. ٦٣ **(١١)**: ٤٤٢٣ – ٤٤٢٨.

Belliveau, B.H. and Trevors, J.T. (١٩٨٩). Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by Electroporation. Appl. Environ. Microbiol. ٥٥ **(٦)**: ١٦٤٩ – ١٦٥٢.

Benveniste, R. and Davies, J. (١٩٧٣). A Minoglycoside antibiotic – inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic – resistance bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. ٧٠: ٢٢٧٦ – ٢٢٨٠.

Bernhard, K.; Schrempf, H. and Goebel, W. (١٩٧٨). Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol. ١٣٣ **(٢)**: ٨٩٧ – ٩٠٣.

Bhakdi, S. and Tranum – Jensen, J. (١٩٨٦). Membrane damage by pore – forming bacterial cytolysins. Microb. Pathogen. ١: ٥ – ١٤.

Billing, E. and Cuthbert, W.A. (١٩٥٨). "Bitty" Cream. The occurrence and significance of *Bacillus cereus* Spores in raw milk supplies. J. Appl. Microbiol. ٢١: ٦٥ – ٧٨.

Bishai, W.R. and Sears, C.L. (١٩٩٣). Food Poisoning Syndromes. Gastroenterol. Clin. **NA**٢٢: ٥٧٩ – ٦٠٨.

Boone, D.R. and Liu, Y. (١٩٩٥). *Bacillus infernus* sp. Nov. an Fe (III) and Mn (IV) reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. Int. J. Syst. Bacteriol. ٤٥: ٤٤١ – ٤٤٨.

Borge, G.I.A.; Skeie, M.; Sørhaug, T.; Langsrud, T. and Granum, P.E. (٢٠٠١). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. International J. Food Microbiol. ٦٩: ٢٣٧ – ٢٤٦.

Bouanchaud, D.H.; Scauizzi, M.R. and Chabbert, Y.A. (١٩٦٩). Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in *Enterobacteria* and *Staphylococci*. J. Gen. Microbiol. **٥٤**: ٤١٧ – ٤٢٥.

Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (١٩٩٨). In: Jawetz, Melnik and Adelberg's Medical Microbiology, "٢١th ed.". Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (eds.), Appleton and Lang, California, PP. ١٩٠ – ٢٦٦.

Brown, B.J. and Carlton, B.C. (١٩٨٠). Plasmid–mediated transformation in *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. **١٤٢ (٢)**: ٥٠٨ – ٥١٢.

Bryan, F.L. and Mckinley, T.W. (١٩٧٩). Hazard analysis and control of roast beef preparation on foodservice establishments. J. Food Prot. **٤٢**: ٤ – ١٨.

Bush, K. (١٩٨٩). Characterization of β-Lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٣ (٣)**: ٢٥٩ – ٢٦٣.

Bush, K. and Sykes, R.B. (١٩٨٦). Methodology for the study of β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٠ (١)**: ٦ – ١٠.

Bush, K.; Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A. (١٩٩٥). A Functional classification scheme for beta – lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٩ (٦)**: ١٢١١ – ١٢٣٣.

Cano, R.J. and Bourucki, M.K. (١٩٩٥). Revival and identification of bacterial spores in ٢٥ – to ٤٠ – million – year – old dominican amber. Science. **٢٨٦**: ١٠٦٠ – ١٠٦٤.

Cantoni, C. and Bresciani, C.M. (١٩٨٧). Occurrence of *Bacillus cereus* in foods. Industrie – Alimentary. **٢٦**: ٦٤١.

Chang, J.M. and Chen, T.H. (٢٠٠٣). Bacterial Food borne outbreaks in central Taiwan, ١٩٩١ – ٢٠٠٠. J. Food and Drug Analysis. **١١**: ٥٣ – ٥٩.

Chantalat, L.; Duee, E.; Galleni, M.; Frere, J-M. and Dideberg, O. (٢٠٠٠). Structural effects of the active site mutation cysteine to serine in *Bacillus cereus* Zinic – β- lactamase. Protein Science. **٩**: ١٤٠٢ – ١٤٠٦.

Christiansson, A.; Bertilsson, J. and Svensson, B. (١٩٩٩). *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. Dairy Science. **٨٢**: ٣٠٥ – ٣١٤.

Christiansson, A.; Naidu, A.S.; Nilsson, I.; Wadstrom, T. and Petterson, H-E. (١٩٨٩). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. **٥٥**: ٢٥٩٥ – ٢٦٠٠.

Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (١٩٨٦). Genus *Bacillus*. Cohn ١٨٧٢, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt J.G. (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, PP. ١١٠٥ – ١١٣٩.

Cohen, S.N. (١٩٧٦). Transposable elements and plasmid evolution. Nature (London). **٢٦٣**: ٧٣١ – ٧٣٨.

Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Hsu, L. (١٩٧٢). Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. **٦٩ (٨)**: ٢١١٠ – ٢١١٤.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (١٩٩٦). Practical Medical Microbiology "١٤th ed.". The Churchill Livingstone. Inc. New York, U.S.A.

Coonrod, J.D.; Leadley, P.J. and Eickhoff, T.C. (١٩٧١). Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. J. Infect. Dis. **١٢٣**: ١٠٢ – ١٠٥.

Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Von Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J. and Dean, D.H. (١٩٩٨). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **٦٢**: ٨٠٧ – ٨١٣.

Cruickshank, R.; Duguid, J.R.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. (١٩٧٥). Medical Microbiology. "١٢th ed.". Churchill Livingston. Inc. New York, U.S.A., PP. ٤٥٤ – ٤٦١.

Cundliffe, E. (١٩٨٩). How antibiotic – producing organisms avoid suicide. Annu. Rev. Microbiol. **٤٣**: ٢٠٧ – ٢٣٣.

Davies, J. (١٩٩٤). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science, **٢٦٤**: ٣٧٥ – ٣٨٢.

De la maza, L.A, Pezzlo, M.T. and Baron, E.J. (١٩٩٧). Colour Atlas of Microbiology. Mosby, Missouri.

Debuono, B.A.; Brondrum, J.; Kramer, J.M.; Gilbert, R.J. and Opal, S.M. (١٩٨٨). Plasmid, Serotypic, and enterotoxin analysis of *Bacillus cereus* in an outbreak setting. Clin. Microbiol. **٢٦ (٨)**: ١٥٧١ – ١٥٧٤.

Dixon, T.C.; Meselson, B.S.M.; Guillemin, J. and Hanna, C. (١٩٩٩). Anthrax. Medical Progress. **٣٤١ (١١)**: ٨١٥ – ٨٢٦.

Doganay, M. and Aydin, N. (١٩٩١). Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. Scand. J. Infect. Dis. **٢٣**: ٣٣٣ – ٣٣٥.

Doyle, M.P. (١٩٨٨). *Bacillus cereus*. Food Technol. April: ١٨١ – ٢٠٠.

Drobniewski, F.A. (١٩٩٣). *Bacillus cereus* and related species. Clin. Microbiol. Rev. **٦ (٤)**: ٣٢٤ – ٣٣٨.

Finlay, W.J.J.; Logan, N.A. and Sutherland, A.D. (١٩٩٩). Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol. **٦٥ (٤)**: ١٨١١ – ١٨١٢.

Foley, J.M. and Perret, G.J. (١٩٦٢). Screening bacterial colonies for Penicillinase Production. Nature. **١٩٥ (٤٨٣٦)**: ٢٨٧ – ٢٨٨.

Ghuysen, J-M. (١٩٩٤). Molecular structures of penicillin – binding proteins and beta – lactamases. Trends Microbiol. **٢**: ٣٧٢ – ٣٨٠.

Gigantelli, J.W.; Gomez, J.T. and Osato, M.S. (١٩٩١). In *vitro* susceptibilities of Ocular *Bacillus cereus* isolates to clindamycin, gentamycin, and vancomycin alone or in combination. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٥ (١)**: ٢٠١ – ٢٠٢.

Gilbert, R.J. (١٩٧٩). *Bacillus cereus*, In: Food borne Infections and Intoxications, "٢nd ed.". Reimann H. and Bryan F.L. (eds.), Academic Press, New York, PP. ٤٩٥ – ٥١٤.

Gilbert, R.J. and Parry, J.M. (١٩٧٧). Serotypes of *Bacillus cereus* from outbreaks of food poisoning and from routine foods. J. Hyg. (Cambridge). ٧٨: ٦٩ – ٧٤.

Gilbert, R.J.; Stringer, M.F. and Peace, T.C. (١٩٧٤). The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. J. Hyg., Camb. **٧٣**: ٤٣٣ – ٤٤٤.

Gilmore, M.S.; Cruz – Rodz, A.L.; Leimeister – Wachter, M.; Kreft, J. and Goebel, W. (١٩٨٩). A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: Nucleotide sequence and genetic linkage. J. Bacteriol. ١٧١: ٧٤٤ – ٧٥٣.

Glatz, B.A.; Spira, W.M. and Goepfert, J.M. (١٩٧٤). Alternation of Vascular Permeability in Rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species. Infect. Immun. **١٠ (٢)**: ٢٩٩ – ٣٠٣.

Gordon, R.E.; Haynes, W.C. and Pang, C.H.-N. (١٩٧٣). The Genus *Bacillus*. United States Department of Agriculture. Agriculture Handbook No. ٤٢٧. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Granum, P.E. (١٩٩٤). *Bacillus cereus* and its Toxins. Appl. Bacteriol. Suppl. **٢٣**: ٦١S – ٦٦S.

Granum, P.E. (٢٠٠٣). Food Poisoning. The Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, Norway.

Granum, P.E. and Lund, T. (١٩٩٧). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. **١٥٧**: ٢٢٣ – ٢٢٨.

Granum, P.E.; O'Sullivan, K. and Lund, T. (١٩٩٩). The sequence of the non – haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. **١٧٧ (٢)**: ٢٢٥ – ٢٢٩.

Griffiths, M.W. and Scharft, H. (٢٠٠٢). *Bacillus cerus* food poisoning, In: Food borne disease, "٢nd ed.". Cliver, D.O. and Riemann, H.P. (eds.), Academic Press, New York, PP. ٢٦١ – ٢٧٠.

Guilfoile, P.G. and Hutchinson, C.R. (١٩٩٢). The Streptomyces glaucescens TcmR protein represses transcription of the

divergently oriented *TcmR* and *TcmA* genes by binding to an intergenic operator region. J. Bacteriol. ١٧٤: ٣٦٥٩ – ٣٦٦٦.

Guinebretiere, M.H. and Nguyen-the, C. (٢٠٠٣). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing plant, differentiated by two PCR – based methods. FEMS Microbiol. Ecology. ٤٣: ٢٠٧ – ٢١٥.

Hanahan, D.; Jesse, J. and Bloow, F.R. (١٩٩٦). Techniques for transformation of *Escherichia coli*, In: DNA cloning, core techniques a practical approach. Glover, D.M. and Hames, B.D. (eds.), Information Press. Ltd. Enyshum, Oxon.

Hardy, S.P.; Lund, T. and Granum, P.E. (٢٠٠١). Cytk toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. FEMS Microbiol. Lett. ١٩٧: ٤٧ – ٥١.

Harly, J.P. and Prescott, L.M. (١٩٩٦). Laboratory exercises in Microbiology. "٣rd ed.". WCB. McGraw Hill. New York, U.S.A.

Harmon, S.M. (١٩٨٢). New method for differentiating members of the *Bacillus cereus* group: Collaborative study. Assoc. off. Anal. Chem. ٦٥: ١١٣٤ – ١١٣٩.

Hauge, S. (١٩٥٠). Matforgiftninger fremkalt av *Bacillus cereus*. Nordisk Hygienisk Tidskrift. ٣١: ١٨٩ – ٢٠٥. (Cited by Concon, ١٩٨٨).

Hauge, S. (١٩٥٥). Food poisoning caused by aerobic spore forming Bacilli. J. Appl. Bacteriol. ١٨: ٥٩١ – ٥٩٥.

Heinrichs, J.H.; Beecher, D.J.; MacMillan, J.D. and Zilinskas, B.A. (١٩٩٣). Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. ١٧٥: ٦٧٦٠ – ٦٧٦٦.

Helgason, E. Okstad; O.A., Caugant, D.A.; Johansen, H.A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I. and Kolstø, A-B. (٢٠٠٠a). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. ٦٦: ٢٦٢٧ – ٢٦٣٠.

Helgason, E.; Caugant, D.A.; Olsen, I. and Kolstø A-B. (٢٠٠٠b). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodonitis and other human infections. Clin. Microbiol. ٣٨ **(٤)**: ١٦١٥ – ١٦٢٢.

Helinski, D.R. (١٩٧٣). Plasmid determined resistance to antibiotics: Molecular properties of R – factors. Annu. Rev. Microbiol. ٢٧: ٤٣٧ – ٤٧٠.

Helinski, D.R. and Clewell, D.B. (١٩٧١). Circular DNA. Annu. Rev. Biochem. ٤٠: ٨٩٩ – ٩٤١.

Hohn, B. and Korn, D. (١٩٦٩). Cosegregation of a sex factor with the *Escherichia coli* chromosome during curing by acridine orange. J. Mol. Biol. ٤٥: ٣٨٥ – ٣٩٥.

Holbrook, R. and Anderson, J.M. (١٩٨٠). An Improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Can. Microbiol. **٢٦٣**: ٧٥٣ – ٧٥٩.

Holmes, J.R.; Plunkett, T.; Pate, P.; Roper, W.L. and Alexander, W.J. (١٩٨١). Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. Arch. Intern. Med. **١٤١**: ٧٦٦ – ٧٦٧.

Holt, J.G.; Kreig, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (١٩٩٤). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. "٩th ed.". Williams and Wilkins. Co. Baltimore, London.

Honda, T.; Shiba, A.; Seo, S.; Yamamoto, J.; Matsuyama, J. and Miwatani, T. (١٩٩١). Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringensis* and *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. **٦٣**: ٢٠٥ – ٢٠٩.

Hsieh, Y.M.; Sheu, S.J.; Chen, Y.L. and Hsen, H.Y. (١٩٩٩). Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food – borne outbreaks. J. Appl. Microbiol. **٨٧**: ٤٨١ – ٤٩٠.

Hughes, S.; Bartholomew, B.; Hardy, J.C. and Kramer, J.M. (١٩٨٨). Potential application of a HEP – ٢ cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic – syndrome food poisoning. FEMS Microbiol. Lett. **٥٢**: ٧ – ١٢.

Imsande, J.; Gillin, F.D.; Tanis, R.J. and Atherly, A.G. (١٩٧٠). Properties of penicillinase from *Bacillus cereus* ٥٦٩. Biol. Chem. **٢٤٥ (٩)**: ٢٢٠٥ – ٢٢١٢.

Jackson, S.G. (١٩٨٩). Development of a fluorescent immunodot assay for *Bacillus cereus* enterotoxin. J. Immunol. Methods. **١٢٠**: ٢١٥ – ٢٢٠.

Johnston, J.H. and Richmond, M.H. (١٩٧٠). The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. J. Gen. Microbiol. **٦٠**: ١٣٧ – ١٣٩.

Kado, C.I. (١٩٩٨). Origin and evolution of plasmids. Antonie Leeuwenhoek. **٧٣**: ١١٧ – ١٢٦.

Karch, H.; Russmann, H.; Schmidt, H.; Schwar, Z.K.A. and Heesemann, J. (١٩٩٥). Long-term shedding and clonal turnover of EHEC ٠١٥٧ in diarrhea disease. J. Clin. Microbiol. **٣٣**: ١٦٠٢.

Kim, H.U. and Goepfert, J.M. (١٩٧١). Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products. J. Milk Food Technol. **٣٤**: ١٢ – ١٥.

Kolstø, A.B.; Lereclus, D. and Mock, M. (٢٠٠٢). Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **٢٦٤**: ٩٥ – ١٠٨.

Kotiranta, A.; Lounatmaa, K. and Haapasalo, M. (٢٠٠٠). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microb. Infect. ٢: ١٨٩ – ١٩٨.

Kramer, J.M.; Turnbull, P.C.B.; Munshi, G. and Gilbert, R.J. (١٩٨٢). Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with food poisoning. In: Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms. Corry. J.E.L.; Robert, D. and Skinner, F.A. (eds.), Academic Press. LTD., London, PP. ٢٦١ – ٢٨٦.

Kumar, P.; Ahuja, N. and Bhatnagar, R. (٢٠٠٢). Anthrax Edema toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. Infect. Immun. ٧٠ **(٩)**: ٤٩٩٧ – ٥٠٠٧.

Kunin, C.M. (١٩٩٣). Resistance to antimicrobial drugs: A Worldwide Calamity. Ann. Intern. Med. ١١٨: ٥٥٧ – ٥٦١.

Langford, F.; Burstyn, U.; Fisher, L.; Shelford, J. and Weary, D. (٢٠٠٣). Feeding waste milk to calves and antibiotic resistance. Canadian Dairy Seminar. ١١ **(١٤)**: ١.

Lee, P.K.; Buswell, J.A. and Shingawa, K. (١٩٩٥). Technical report: Distribution of toxogenic *Bacillus cereus* in rice samples marketed in Hong Kong. World. J. Microbiol. Biotecnol. ١١: ٦٩٦ – ٦٩٨.

Lema, M.W.; Brown, A.; and Calkins, J.H. (١٩٩٤). A General method for extraction of DNA from bacteria. J. Microbiol. Methods. ١٩: ١٦٧ – ١٧٢.

Lightfoot, N.F.; Scott, R.J.D. and Turnbull, P.C.B. (١٩٩٠). Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis*. Proceedings of the International works – shop on anthrax, ١١ – ١٣ April ١٩٨٩, Winchester, England. Salisbury Med. Bull. ٦٨ **(Suppl.)**: ٩٥ – ٩٨.

Livermore, D.M. (١٩٩٥). β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. ٨ **(٤)**: ٥٥٧ – ٥٨٤.

Logan, N.A. and Berkeley, R.C.W. (١٩٨٤). Identification of *Bacillus* strain using the API system. Gen. Microbiol. ١٣٠: ١٨٧١ – ١٨٨٢.

Lovett, P.S. and Bramucci, M.G. (١٩٧٥). Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus*. J. Bacteriol. ١٢٤: ٤٨٤ – ٤٩٠.

Lovett, P.S.; Duvall, E.J. and Keggins, K.M. (١٩٧٦). *Bacillus pumilus* plasmid pPL١٠: Properties and insertion into *Bacillus subtilis* ١٦٨ by transformation. J. Bacteriol. ١٢٧: ٨١٧ – ٨٢٨.

Lund, T. and Granum, P.E. (١٩٩٦). Characterization of a non – haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. FEMS Microbiol. Lett. ١٤١ **(٢/٣)**: ١٥١ – ١٥٦.

Lund, T. and Granum, P.E. (١٩٩٧). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. Microbiol. **١٤٣**: ٣٣٢٩ – ٣٣٣٦.

Lund, T.; De Buyser, M.L. and Granum, P.E. (٢٠٠٠). A New cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol. **٣٨**: ٢٥٤ – ٢٦١.

MacFaddin, J.E. (٢٠٠٠). Biochemical test for identification of medical bacteria. "٣rd ed.". Lippn Cott. Williams and Wilkins. Philadelphia. U.S.A.

Mahler, H.; Pasi, A.; Kramer, J.A.; Schulte, P.; Scoging, A.C.; Bar, W. and krahenbuhl, S. (١٩٩٧). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N. Engl. J. Med. **٣٣٦**: ١١٤٢ – ١١٤٨.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; and Sambrook, J. (١٩٨٢). Molecular cloninig: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, U.S.A.

May, J.W.; Houghton, R.H. and Perret, C.J. (١٩٦٤). The Effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. **٣٧**: ١٥٧ – ١٦٩.

McEwen, S.A.; Black, W.D. and Meek, A.H.(١٩٩١). Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. J. Dairy Sci. **٧٤**: ٢١٢٨ – ٢١٣٧.

Medeiros, A.A. (١٩٩٧). Evolution and dissemination of beta – lactamases accelerated by generations of beta – lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis. **٢٤ (s)**: ١٩ – ٤٥.

Meer, R.R.; Baker, J.; Bodyfelt, F.W. and Griffiths, M.W. (١٩٩١). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A Review. J. Food Prot. **٥٤**: ٩٦٩ – ٩٧٩.

Melling, J. and Capel, B.J. (١٩٧٨). Characteristics of a *Bacillus cereus* emetic toxin. FEMS Microbiol. Lett. **٤**: ١٣٣ – ١٣٥.

Miller, J.M.; Hair, J.G.; Hebert, M.; Hebert, L. and Roberts, F.J.J. (١٩٩٧). Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. J. Clin. Microbiol. **٣٥ (٢)**: ٥٠٤ – ٥٠٧.

Mortimer, P.R. and McCann, G. (١٩٧٤). Food poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. Lancet. **i**: ١٠٤٣ – ١٠٤٥.

Mossel, D.A.A.; Koopman, M.J. and Jongerius, E. (١٩٦٧). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Appl. Microbiol. **١٥**: ٦٥٠ – ٦٥٣.

Navarro, P.G.; Osso, B.Q.; Ortiz, R.G.; De las Parras, P.J.M.; Puentedura, M.I.M. and Gonzalez, C.C. (٢٠٠٤). Inhibition of β-lactamase II of *Bacillus cereus* by Penamaldic derivatives of penicillins. Antimicrob. Agents Chemother. **٤٨ (٣)**: ١٠٥٨ – ١٠٦٠.

NCCLS. (١٩٩٠). National Committee For Clinical Laboratory Standards Performance For Antimicrobic Susceptibility Testing.

Nguyen – the, C. and Carlin, F. (٢٠٠٣). *Bacillus cereus* et. securite des aliments. Bulletin de la Societe Francaise de Microbiologie. ١٨: ١٠٤ – ١١٢.

Nicholson, W.L. (٢٠٠٢). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cell Mol Life Sci. ٥٩: ٤١٠ – ٤١٦.

Notermans, S. and Batt, C.A. (١٩٩٨). A Risk assessment approach for food borne *Bacillus cereus* and its toxins. Applied Microbiol. Symposium Supplement. ٨٤: ٥١S – ٦١S.

O'Brien, T.F. (١٩٨٧). Resistance of bacteria to anti-bacterial agents. Rev. Infec. Dis. ٩ **(suppl.٣)**: S ٢٤٤.

Ombui, J.N. (١٩٩٧). *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. FEMS Microbiol. Lett. ١٤٩: ٢٤٥ – ٢٤٨.

Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F. and Kato, N. (١٩٩٤). Molecular characterization of an enterobacterial methalo-β-lactamase found in a clinical isolates of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٨: ٧١ – ٧٨.

Otnaess, A.B.; Little, C.; Sletten, K.; Wallin, R.; Johansen, S.; Flensgrud, R. and Prydz, H. (١٩٧٧). Some characteristic of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Eur. J. Biochem. ٧٩: ٤٥٩ – ٤٦٨.

O'Toole, K. (١٩٧٥). The Effect of phospholipase C teartment on the latency and sedimentability of rat liver microsomal nucleoside diphosphatase, FEBS Lett. ٥٢: ١٨٠.

Overcast, W.W. and Atmaram, K. (١٩٧٤). The Role of *Bacillus cereus* in sweet curding of fluid milk. J. Milk Food Technol. ٣٧: ٢٣٣ – ٢٣٦.

Parry, J.A.; Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R. (١٩٨٣). A Colour Atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Publications. Ltd., England.

Patrick, C.C.; Langston, C. and Baker, C.J. (١٩٨٩). *Bacillus* species infections in neonates. Rev. Infect. Dis. ١١: ٦١٢ – ٦١٥.

Perret, G.J. (١٩٥٤). Iodometric assay of penicillinase, Nature. ١٧٤ **(٤٤٣٩)**: ١٠١٢ – ١٠١٣.

Phelps, R.J.; and Mckillip, J.L. (٢٠٠٢). Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol. ٦٨: ٣١٤٧ – ٣١٥١.

Poirel, L.; Naas, T.; Nicolas, D.; Collet, L.; Bellais, S.; Cavallo, J.-D. and Nordmann, P. (٢٠٠٠). Characterization of VIM – ٢, a carbapenem – hydrolysing Metallo – beta – lactamase and its plasmid – and integron – borne gene from a *Pseudomonas*

aeruginosa clinical isolate in France. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٤: ٨٩١ – ٨٩٧.

Pospiech, J.; and Neuman ,T. (١٩٩٥). Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. "ed. Kieser, T." Norwich, U.K.

Rahmet – Alla, M. and Rowley, A.F. (١٩٩٠). Studies on the cellular defense reactions of the Madeira Cockroach, *Leucophaea maderae*: In *vitro* phagocytosis of different strains of *Bacillus cereus* and their effect on hemocyte viability. Invertebr. Pathol. ٥٥: ٣٥٠ – ٣٥٦.

Rangasamy, P.N.; Lyer, M. and Raginski, H. (١٩٩٣). Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. Australian. Dairy Technol. ٤٨: ٩٣ – ٩٥.

Rodgers, G.W.; Huang, W. and Palzkill, T. (٢٠٠١). Binding properties of a peptide derived from β-lactamase inhibitory protein. Antimicrob. Agents Chemother. **٤٥ (١٢)**: ٣٢٧٩ – ٣٢٨٦.

Rondon, M.R.; Raffel, S.J.; Goodman, R.M. and Handelsman, J. (١٩٩٩). Toward functional genomics in bacteria: Analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. ٩٦: ٦٤٥١ – ٦٤٥٥.

Rossolini, G.M.; Condemi, A.; Pantanella, F.; Docquier, J.-D.; Amicosante, G. and Thaller, M.C. (٢٠٠١). Metallo – beta – lactamase producers in environmental microbiota: New molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٥: ٨٣٦ – ٨٤٣.

Rowan, N.J.; Caldow, G.; Gemmel, C.G. and Hunter, I.S. (٢٠٠٣). Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factor by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with Non-gastrointestinal infections. Appl. Environ. Microbiol. **٦٩ (٤)**: ٢٣٧٢ – ٢٣٧٦.

Rubin, R.H. and Swartz, M.N. (١٩٨٠). Trimethoprim – sulfamethoxazole. N. Engl. J. Med. ٣٠٣: ٤٢٥.

Rubin, S.J. and Rosenblum, E.D. (١٩٧١). Effects of ethidium bromide on growth and on loss of the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. ١٠٨: ١٢٠٠ – ١٢٠٤.

Ryan, P.A.; MacMillan, J.D. and Zilinskas, B.A. (١٩٩٧). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L_1 and L_2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. ١٧٩: ٢٥٥١ – ٢٥٥٦.

Sambrook, J.; Fritsch, E.; and Maniatis, T. (١٩٨٩). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, U.S.A.

Schlegelova, J.; Brychta, J.; Klimova, E.; Napravnikova, E. and Babak, V. (٢٠٠٣). The Prevalence of and resistance to antimicrobial agents of *Bacillus cereus* isolates from foodstuffs. Vet. Med. – Czech. **٤٨ (١١)**: ٣٣١ – ٣٣٨.

Schnepf, E.; Crickmore, N.; Vanrie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (١٩٩٨). *Bacillus thruingiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **٦٢ (٣)**: ٧٧٥ – ٨٠٦.

Shah, R.C.; Wadher, B.J. and Bhoosreddy, G.L. (١٩٩٦). Incidence and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from Indian foods. Food Sci. Technol. **٣٣**: ٢٤٩ – ٢٥٠.

Shingawa, K.; Ichikawa, K.; Matsusaka, N. and Sugii, S. (١٩٩١). Purification and some properties of a *Bacillus cereus* mouse lethal toxin. J. Vet. Med. Sci. **٥٣**: ٤٦٩ – ٤٧٤.

Silver, L.L. and Bostian, A.K. (١٩٩٣). Discovery and development of new antibiotics: The Problem of antibiotic resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٧**: ٣٧٧ – ٣٨٣.

Sliman, R.; Rehm, S. and Shlaes, M. (١٩٨٧). Serious infection caused by *Bacillus cereus*. Medicine. **٦٦**: ٢١٨ – ٢٢٣.

Sloma, A. and Gross, M. (١٩٨٣). Molecular cloning and neucleotide sequence of the type I beta – lactamase gene from *Bacillus cereus*. Nucl. Acids. Res. **١١**: ٤٩٩٧ – ٥٠٠٤.

Smith, N.R.; Gordon, R.E. and Clark, F.E. (١٩٥٢). Aerobic spores-forming bacteria. Department of Agriculture Monograph ١٦. U.S. Government Printing Office, Washington D.C.

Solar, G.D.; Grialdo, R.; Ruiz – Echevarria, M.; Espinosa, M. and Diaz – Orejas, R. (١٩٩٨). Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **٦٢ (٢)**: ٤٣٤ – ٤٦٤.

Sonstein, S.A. and Baldwin, J.N. (١٩٧٢). Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. J. Bacteriol. **١٠٩ (١)**: ٢٦٢ – ٢٦٥.

Spinosa, M.R. (٢٠٠٠). On the fate of ingested *Bacillus* spores. Res. Microbiol. **١٥١**: ٣٥١ – ٣٦٨.

Switzer Blum, J. and Burns, A. (١٩٩٨). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. Nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. Nov.: Two haloalkaliphiles from mono Lake, California that respire Oxyanions of Selenium and arsenic, Arch. Microbiol. **١٧١**: ١٩ – ٣٠.

Sykes, R.B. and Mattew, M. (١٩٧٦). The β–lactamase of Gram negative bacteria and their role in resistance to β–lactam antibiotics, J. Antimicrob. Chemother. **٢**: ١١٥ – ١٥٧.

Szabo, R.A.; Speirs, J.I. and Akhtar, M. (١٩٩١). Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat – stable toxin. Food Prot. **٥٤**: ٢٧٢ – ٢٧٦.

Tanaka, T.; Kuroda, M. and Sakaguchi, K. (١٩٧٧). Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **١٢٩**: ١٤٨٧ – ١٤٩٤.

Te Giffel, M.C.; Beumer, P.R.; Granum, P.E. and Rombouts, F.M. (١٩٩٧). Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. International J. Food Microbial. **٣٤**: ٣٠٧ – ٣١٨.

Te Giffel, M.C.; Beumer, R.P.; Slaghuis, B.A. and Rombouts, F.M. (١٩٩٥). Occurrence and characterization of psychrotrophic *Bacillus cereus* on farms in Netherlands. Netherlands Milk and Dairy J. **٤٩**: ١٢٥ – ١٣٨.

Thompson, N.E.; Ketterhagen, M.j.; Bergdoll, M.S. and Schantz, E.J. (١٩٨٤). Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. Infect. Immun. **٤٣**: ٨٨٧ – ٨٩٤.

Trevors, J.T. (١٩٨٦). Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **٣٢**: ١٤٩ – ١٥٧.

Torkar, K.G. and Mozina, S.S. (٢٠٠٠). Differentiation of *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products with biochemical, immunological, AP – PCR and PCR – RFLP methods. Food Technol. Biotechnol. **٣٨ (٢)**: ١٣٥ – ١٤٢.

Turnbull, P.C.B. and Kramer, J.M. (١٩٨٣). Non – gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: An Analysis of exotoxin production by strains isolated over a two – years period. J. Clin. Pathol. **٣٦**: ١٠٩١ – ١٠٩٦.

Turnbull, P.C.B. and Kramer, J.M. (١٩٩١). *Bacillus*, In: Manual of Clinical Microbiology, "٥th ed". Balows, A.; Hausler, W.J.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., PP. ٢٩٦ – ٣٠٣.

Turnbull, P.C.B.; Kramer, J. and Melling, J. (١٩٩٠). *Bacillus*, In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, "٨th ed". Edward Arnold, London, PP. ١٨٨ – ٢١٠.

Turnbull, P.C.B.; Kramer, J.M.; Jorgensen, K.; Gilbert, R.J. and Melling, J. (١٩٧٩). Properties and production characteristics of vomiting, diarrhoeal and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. American J. Clin. Nutrition. **٣٢**: ٢١٩ – ٢٢٨.

Turnbull, P.C.B.; Sirianni, N.M.; LeBron, C.I.; Samaan, M.N.; Sutton, F.N.; Reyes, A.E. and Peruski, Jr.L.F. (٢٠٠٤). MICs of selected Antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus*

thuringiensis and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the E test. Clin. Microbiol. **٤٢ (٨)**: ٣٦٢٦ – ٣٦٣٤.

Turnridge, J. (١٩٩٥). Epidemiology of quinolone resistance. Eastern hemisphere. Drugs. **٤٩**: ٤٣ – ٤٧.

Walker, J.G. and Skovaga, M. (١٩٧٣). Phosphorylation of streptomycin and dihydrostreptomycin by streptomyces. Enzymatic synthesis of different diphosphorelated derivatives. J. Biol. Chem. **٢٤٨**: ٢٤٣٥ – ٢٤٤٠.

Wazny, T.K.; Mummaw, N. and Styrt, B. (١٩٩٠). Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **٩**: ٨٣٠ – ٨٣٢.

Weber, D.J.; Saviteer, S.M.; Rutala, W.A. and Thomann, C.A. (١٩٨٨). In Vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. **٣٢ (٥)**: ٦٤٢ – ٦٤٥.

Weisse, M.E.; Bass, J.W.; Jarrett, R.V. and Vincent, M.J. (١٩٩١). Non – anthrax *Bacillus* infections of central nervous system. Pediatr. Infect. Dis. J. **١٠**: ٢٤٣ – ٢٤٦.

Wiedermann, B.L. (١٩٨٧). Non – anthrax *Bacillus* infections in children. Pediatr. Infect. Dis. J. **٦**: ٢١٨ – ٢١٩.

Wilson, G.S. and Miles, A.A. (١٩٦٦). In Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, "٥th ed". Wilson, G.S. and Mniles, A.A. (eds.), Edward Arnold, London, P. ٢٤٨.

Wong, H.C.; Chang, M.-H. and Fan, J.-Y. (١٩٨٨). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. Appl. Environ. Microbiol. **٥٤**: ٦٩٩ – ٧٠٢.

جدول ٤ – ٣ . الحساسية الدوائية لعزلات بكتريا *B. cereus*

مجاميع المضادات الحيوية	المضاد الحيوي	رقم العزلة										% للمقاومة
		Bc١	Bc٢	Bc٣	Bc٤	Bc٥	Bc٦	Bc٧	Bc٨	Bc٩	Bc١٠	
البنسلينات	Penicillin G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	١٠٠
	Ampicillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	١٠٠
	Ampiclox	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	١٠٠
	Amoxycillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	١٠٠
السيفالوسبورينات	Cephalexin	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	٣٠
	Cefotaxime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	١٠٠
الأمينوكلايكوسيدات	Amikacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	٠
	Neomycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	٠
	Gentamycin	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	٢٠
الكينولونات	Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	٠
الكلورامفنيكولات	Chloramphenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	٠
التتراسايكلينات	Tetracycline	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	١٠
	Doxycycline	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	٠
السلفونامايت	Trimethoprim – Sulfamethoxazol	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	٢٠
الماكروليدات	Erythromycin	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	١٠
	Clindamycin	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	٢٠
	Lincomycin	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	٦٠
الكاربابنيمات	Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	٠

الرموز : R مقاومة (Resistance) ، S حساسة (Sensitive) .

ملحق ١
قطر منطقة التثبيط القياسية لأقراص المضادات الحيوية المستعملة
(NCCLS, ١٩٩٠)

ت	المضاد الحيوي	الرمز	التركيز (مايكروغرام/قرص)	قطر منطقة التثبيط		
				المقاومة (مليميتر أو أقل)	متوسطة الحساسية	الحساسة (مليميتر أو أكثر)
١	بنسلين – ج	P	*١٠	٢٨	-	٢٩
٢	أموكسلين	Amx	٢٥	٢٢	٢٣ – ٣٠	٣١
٣	أمبسلين	Amp	١٠	٢٨	-	٢٩
٤	دوكسي سايكلين	DO	٣٠	١٤	١٥ – ١٦	١٩
٥	لنكومايسين	L	٢	٩	١٠ – ١٤	١٥
٦	سيفالكسين	CL	٣٠	١٤	١٥ – ١٧	١٨
٧	سبروفلوكساسين	Cip	٥	١٥	١٦ – ٢٠	٢١
٨	ارثرومايسين	E	١٥	١٣	١٤ – ١٧	١٨
٩	كلورامفنكول	C	٣٠	١٢	١٥ – ١٧	١٨
١٠	نيومايسين	N	٣٠	١٢	١٣ – ١٦	١٧
١١	تراي مثبرم	SXT	١.٢٥ + ٢٣.٧٥	١٠	١١ – ١٥	١٦
١٢	تتراسيكلين	TE	٣٠	١٤	١٥ – ١٨	١٩
١٣	سيفوتاكسم	CTX	٣٠	١٨	٢١ – ١٩	٢٢
١٤	جنتامايسين	CN	١٠	١٢	١٤ – ١٣	١٥
١٥	كلندامايسين	DA	٢	١٤	٢٠ – ١٥	٢١
١٦	أميكاسين	AK	٣٠	١٤	١٥ – ١٦	١٧
١٧	ريفامبسين	Rif	٥	١٦	١٧ – ١٩	٢٠

* وحدة دولية (IU – International Unit) .