مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 28 (1)،103-114، 2015

عزل بكتريا *Clostridium botulinum* من مصادر متنوعة وتشخيصها

آمال كاظم غضبان و حيدر إبراهيم علي ونورس محمد حسن

قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

المستخلص: تم عزل 16عزلة محلية من بكتريا *Clostridium* من مصادر متنوعة وهي التربة واللحم والعسل، وأخذت عينات هذه المصادر من مناطق مختلفة لمحافظة البصرة. وقد أجري تشخيص العزلات بعد تنقيتها وذلك باستعمال الفحوصات المظهرية والكيموحيوية وتبين أنها تعود لبكتريا *Clostridium botulinum* ، إذ أظهر الفحص المجهري أن البكتريا ذات خلايا عصوية ، موجبة لصبغة كرام، لاهوائية ، مكونة للسبورات ومتحركة. أما مستعمراتها فكانت ذات شكل منتشر وحافاتها غير منتظمة عند تنميتها على الأوساط الزرعية الصلبة مثل أكار الدم Blood agar ووسط صفار البيض الصلب Egg yolk agar وكانت تبدو شفافة إلى رمادية اللون. أظهرت الاختبارات الكيموحيوية فقد أظهرت أنها محللة للدم من نوع بيتا β-hemolysis ومحللة للدهن ومنتجة لغاز H_2S وكانت جميعها سالبة لإنتاج الأندول واختزال النترات وتحلل النشأ وإنتاج أنزيم الكاتاليز. وقد نمت في مدى من الدالة الحامضية (4-6) ودرجات حرارة (42,30,10)°م و NaCl (3-12)%، وكانت مخمرة للسكريات: الكلوكوز والفركتوز والسكروز والتريهالوز والمالتوز، ووجد أنها خمرت جميع السكريات عدا اللاكتوز والكالاكتوز والرايبوز والاميكدالين والاينوسيتول. أما اختبار التحسس للمضادات الحياتية فقد أظهرت البكتريا تحسساً تجاه الأرثرومايسين والريفامبين والميترونيدازول، إلا أنها كانت مقاومة للجنتامايسين والترايمثبريم و النالدكسك أسد.

كلمات مفتاحية: *Clostridium botulinum* ،عزل، تشخيص.

المقدمة

التسمم البوتيوليني Botulism : يعني باللاتيني السجق أو النقانق Botulus إذ ظهر هذا التسمم في عام 1895 في وجبة سجق من لحم خنزير مملح وغير مطهي ، وهو من الأنواع الشائعة من التسمم ويحدث نتيجة السموم (الذيفانات) toxins التي تفرزها بكتريا *Clostridium botulinum* وتعد أقوى السموم الحيوية المعروفة لحد الآن إذ تعادل سميتها 20 مرة من سم أفعى الكوبرا . وتنتج هذه السموم في نهاية الطور اللوغاريتمي logarithmic phase وبداية طور الثبوت stationary phase لنمو البكتريا إذ يتكون بروتين غير سام يسمى Protoxin الذي يتحول إلى السم داخل الخلية أو بعد خروجه من الخلية بوساطة بعض الأنزيمات المحللةللبروتين وتمتاز هذه السموم بأوز ان جزيئية عالية تصل إلى المليون (17). توجد سبعة أنماط من هذه السموم وهي A، B، C، D، E ، F، G وتعد الأنماط A وB و E وF هي المسبب الرئيس للتسمم البوتيوليني للإنسان إذ تؤثر في مراكز حساسة في الجسم وهي نقاط التقاء الأعصاب بالعضلات إذ تمنع وصول مادة Acetyl Choline إلى هذه المنطقة والتي تعمل على تثبيط حركة العضلات وتقلصها مسببة الموت أو شلل عضلات الحجاب الحاجز وأعضاء التنفس الأخرى كالرئتين فيحدث الاختناق أو الإخفاق في عضلة القلب ويحصل ذلك بعد (4-8) أيام من ظهور الأعراض (3 و8) . درست أولى حالات التسمم البوتيوليني من قبل Van ermengem وقد أطلق على الميكروب اسم *Bacillus botulinus* التي سميت فيما بعد بكتريا *Clostridium botulinum* (5، 9). وتمتاز هذه البكتريا بكونها عصوية موجبة لصبغة كرام ومكونة للسبورات وتنمو عند درجة حرارة 37م وبدالة حامضية (7.2-7.6) وتقاوم سبوراتها درجة الغليان لمدة 3-5 ساعات إلا أنها تقتل على درجة حرارة 121م لمدة 20 دقيقة بالمؤصدة كما تمتاز هذه البكتريا بأنها غير هوائية منتجة للسموم الخارجية exotoxins ومحللة للدم من نوع بيتا ومحللة للبروتين والدهن(13). تقسم سلالات

البكتريا من(G-A) وفقاً للسموم المضادة للجينات. تعد سبورات السلالة A من أكثر السبورات مقاومة للحرارة وعلى الرغم من أن معظم التسمم البوتيوليني يعود إلى عدم كفاية المعالجة الحرارية للأغذية المعلبة وخاصة في بداية ظهور صناعة التعليب Canning Processing ولكن صناعة التعليب قد تجاوزت هذه الحقبة من حيث درجة المعاملة الحرارية إلا أنه حالات التسمم البوتيوليني لازالت تظهر في الأغذية المعلبة منزلياً (1). إن وجود حامض البيوتريك في البيئات المحتوية على السكر دلالة على التلوث بهذه البكتريا كما أنها تنتشر في الطبيعة والتربة ويعد الكلوكوز والمالتوز ضروريين لإنتاج السم بالإضافة إلى عوامل أخرى كالرطوبة ومعدل الأكسدة والاختزال وتركيز الملح ودرجة الحرارة ومدة التخزين ويلاحظ أن وجود البكتريا في بعض الأغذية يؤدي إلى رائحة كريهة متزنخة تشجع على رفض الغذاء كما في الأغذية البروتينية كاللحم أما الأغذية الأكثر حموضة والقليلة البروتين قد تصبح سامة دون حدوث دليلاً واضحاً كما أن بعض السلالات لا تعطي دليلاً واضحاً على الفساد فضلاً عن أن إنتاج الغاز ليس دائماً مقترناً بالتسمم البوتيوليني لذا يجب رفض جميع الأغذية سواءاً كانت خاماً أم معلبةً (6).

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 30 عينة مختلفة وشملت (10 عينات تربة و10 عينات عسل و10 عينات لحم). وكانت فترة سحب العينات مابين كانون الأول 2011 وشباط 2012. إذ وضعت عينات التربة واللحم في أكياس من البولي أثيلين أما عينات العسل فقد وضعت في عبوات معقمة محكمة الغلق ووضعت العبوات في حاويات مبردة لنقلها إلى مختبر التقنية الحياتية التابع إلى قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة لإجراء عملية العزل للبكتريا. والجدول(1) يبين المصادر المستعملة في عزل البكتريا.

جدول (1): مصادر العزل وعدد عزلات بكتريا *Clostridium* المستحصل عليها.

ت	مصدر العزل	العزلة	ت	مصدر العزل	العزلة	ت	مصدر العزل	العزلة
1	تربة- كرمة علي 1	Cl.1	11	لحم- الطويسة 1		21	عسل- أبي الخصيب 1	Cl.13
2	تربة- كرمة علي 2		12	لحم- الطويسة 2		22	عسل- أبي الخصيب 2	
3	تربة- أبي الخصيب 1	Cl.2	13	لحم- الطويسة 3	Cl.7	23	عسل- أبي الخصيب 3	Cl.14
4	تربة- أبي الخصيب 2		14	لحم- البصرة القديمة 1	Cl.8	24	عسل- المعقل 1	
5	تربة- أبي الخصيب 3	Cl.3	15	لحم- البصرة القديمة 2	Cl.9	25	عسل- المعقل 2	
6	تربة- أم قصر 1		16	لحم- البصرة القديمة 3	-	26	عسل- المعقل 3	Cl.15
7	تربة- أم قصر 2	Cl.4	17	لحم -البصرة القديمة 4	Cl.10	27	عسل- المعقل 4	
8	تربة- حقل كلية الزراعة 1	Cl.5	18	لحم- الجزائر 1	Cl.11	28	عسل- شط العرب 1	
9	تربة- حقل كلية الزراعة 2		19	لحم- الجزائر 2	-	29	عسل- شط العرب 2	Cl.16
10	تربة- حقل كلية الزراعة 3	Cl.6	20	لحم- الجزائر 3	Cl.12	30	عسل- شط العرب 3	

عزل بكتريا *Cl. botulinum*

حسب طريقة (2 و14). سحبت عينات التربة باستعمال ملاعق معقمة ووضعت في أكياس من البولي أثيلين في ظروف معقمة ونقلت إلى المختبر لغرض العزل، أما اللحم فقد استعملت سكاكين معقمة لسحب النماذج وتقطيع اللحم وباستعمال كفوف طبية ووضعت في أكياس البولي أثيلين ونقلت إلى المختبر لغرض العزل، بينما نماذج العسل فقد تم الحصول عليها من بعض مناحل محافظة البصرة وذلك باستعمال ملاعق معقمة وعبوات معقمة ونقلت إلى المختبر واستعملت لغرض

عزل البكتريا، فبعد وصول عينات التربة واللحم إلى المختبر تم وزن 2 غم من العينات في ظروف معقمة وإضافتها إلى 10 مل من ماء الببتون 0.1% بعدها تم تعريض المزيج إلى درجة حرارة 80 °م في حمام مائي لمدة 10 دقائق ثم تمت مجانسة المزيج بوساطة المازج Vortex بعدها أجريت مجموعة من التخافيف ثم زرعت العينات في أطباق بتري باستعمال طريقة الصب أي أنه تم إضافة العينة للطبق ومن ثم صب وسط أكار الدم Blood agar والذي استعمل معه دم الخراف بنسبة 5% بعدها نقلت الأطباق إلى الحاوية اللاهوائية anaerobic Jar ووضع بداخلها كيس لتوفير ظروف منقوصة الأوكسجين gas generation kit مع مراعاة السرعة في إتمام عملية فتح الكيس وغلق الحاوية بإحكام إذ يذوب غاز H_2 بسرعة ويتفاعل مع O_2 بوجود عامل مساعد Catalyst وبذلك تتوفر الظروف المطلوبة وهي 5% غاز O_2 و 10% غاز CO_2 و 85% غاز N_2. بعدها نقلت الحاوية إلى الحاضنة وحضنت عند درجة حرارة 37°م لمدة (24-48) ساعة بعدها فحصت الأطباق ولوحظ شكل وحجم المستعمرات وقابلية التحلل للدم (15) بينما تم معاملة عينات العسل بمحلول الايثانول المطلق بتركيز 96% بدلا من الحمام المائي (2) واتبعت الخطوات السابقة نفسها في طريقة الزرع والحضن. بالنسبة لعينات اللحم فقد تم استعمال نوعين الأول كان لحماً طازجاً والثاني قد تم حفظه في ظروف غير صحية وذلك بعد وضعه في أكياس من البولي أثيلين تم وضعه في وعاء معقم بدرجة حرارة الغرفة لمدة 3 أيام ومن ثم إجراء العزل منه.

تنقية العزلات

حسب طريقة (2). لغرض الحصول على عزلات نقية لبكتريا *Cl. botulinum* تم استعمال وسط (CM) Cooked meat كما تم استعمال وسط (TPGY) Trypticace Glucose Yeast Extract broth وأخذت مسحة من المزرعة الأصلية بوساطة الناقل المعدني (Loop) أي من الأطباق المحتوية على وسط أكار الدم Blood agar بعدها وضعت الأنابيب الملقحة في الحاوية اللاهوائية ووضع بداخلها كيس لتوفير ظروف منقوصة الأوكسجين بعدها نقلت الحاوية إلى الحاضنة وحضنت عند درجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة.

تنشيط العزلات حسب طريقة (12). لقحت الأنابيب الحاوية على وسط Brain heart infusion بـ0.1 مل من المزرعة البكتيرية الأصلية بعمر 24 ساعة بوساطة ماصة معقمة وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة.

تصبيغ كرام حسب شركة Syrbio السويسرية التصبيغ بصبغة المالاكايت الخضراء. حسب (11)

اختبار حركة البكتريا حسب طريقة (11).

الاختبارات الكيموحيوية: وشملت:1- النمو في ظروف هوائية، 2- فحص التوهج بالأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 490 نانوميتر 3- إنتاج أنزيم الكاتاليز، 4- اختزال النترات 5- تحلل النشا، 6- النمو في

جدول(2): المضادات الحياتية التي تم إختبار قدرتها التثبيطية ضد بكتريا *Cl. botulinum*.

ت	اسم المضاد	الكمية µg	ت	اسم المضاد	الكمية µg
1	Erythromycin	15	6	Chloramphenicol	10
2	Metronidazole	30	7	Trimethoprim	10
3	Penicillin	10	8	Clindamycim	2
4	Rifampin	5	9	Gentamicin	30
5	Tetracycline	10	10	Nalidixic acid	10

تراكيز من كلوريد الصوديوم (3-12)%، 7- النمو في مدى من الدالة الحامضية (4-6) ، 8- النمو في درجات حرارة (42,30,10)° م، 9- تحلل الدهن، 10- تخمر الكربوهيدرات،11- إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين، 12- حساسية العزلات للمضادات الحياتية وكما في الجدول (2).

• النتائج والمناقشة

عزل بكتريا *Clostridium*.

يبين الجدول (1) المصادر التي تم استعمالها في عزل بكتريا *Clostridium* والتي تضمنت ثلاثة مصادر رئيسة (التربة واللحم والعسل) واختلفت هذه المصادر في مناطق الحصول عليها وقد اختلف موسم الإنتاج بالنسبة للعسل . تم الحصول على 16 عزلة محلية من بكتريا *Clostridium* من أصل 30 عينة من ثلاثة مصادر طبيعية مختلفة وهي (التربة واللحم والعسل).إذ كان عدد عينات التربة هو10عينات ومن مناطق متعددة في محافظة البصرة وهي تربة حقل كلية الزراعة وكرمة علي وقضاء أبي الخصيب و أم قصر وتم الحصول على 6 عزلات لبكتريا *Clostridium* ،إذ كانت عزلة واحدة من تربة كرمة علي من مجموع عينتين أي بنسبة عزل (6.25%) وعزلة واحدة من تربة أم قصر من أصل عزلتين أي بنسبة عزل (6.25%) ، وعزلتين من تربة أبي الخصيب من مجموع ثلاث عينات أي بنسبة (12.5)% بينما تربة حقل كلية الزراعة فقد تم الحصول على عزلتين من مجموع 3عينات أي نسبة (12.5%)، وقد تم العزل من اللحم البقري وكان من مناطق مختلفة في محافظة البصرة وهي الجزائر والبصرة القديمة والطويسة وكان عدد العينات 10عينات وقد تم العزل من اللحم الطازج ولكن لم يتم الحصول على أي نتيجة لبكتر يا *Clostridium* لذلك فقد تم تعريض اللحم لظروف غير صحية لأجل الحصول على عزلات لبكتريا *Clostridium* وذلك بعد وضع اللحم بأكياس البولي أثيلين تم غلق الأكياس ووضعها في وعاء مغلق لمدة 3 أيام بدرجة حرارة الغرفة بعدها تم إجراء العزل منها وقد تم الحصول على 6عزلات،إذ كانت عزلة واحدة من منطقة الطويسة من مجموع 3عينات أي بنسبة (6.25%) و3عزلات من منطقة البصرة القديمة من مجموع 4عينات أي بنسبة عزل (18.75%) في حين أن اللحم المستحصل عليه من منطقة الجزائر فقد تم الحصول منه على عزلتين من مجموع 3عينات أي (12.5%)،

جدول (3): النسب المئوية لعزلات بكتريا *Clostridium* من المصادر التي عزلت منها.

مصدر العزل	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية %
تربة أبي الخصيب	3	2	12.5
تربة كرمة علي	2	1	6.25
تربة أم قصر	2	1	6.25
تربة حقل كلية الزراعة	3	2	12.5
لحم الجزائر	3	2	12.5
لحم البصرة القديمة	4	3	18.75
لحم الطويسة	3	1	6.25
عسل شط العرب	3	1	6.25
عسل أبي الخصيب	3	2	12.5
عسل المعقل	4	1	6.25
المجموع	30	16	100

كما تم استعمال 10 عينات عسلمصدر اً للعزل من مناطق شط العرب وأبي الخصيب والمعقل واختلفت هذه العينات في موسم الإنتاج (ربيعي وخريفي) كذلك في طبيعة التغذية (عسل سدر و عسل أزهار) وقد تم الحصول على 4 عزلات لبكتريا *Clostridium* إذ كانت عزلتان من عسل منطقة أبي الخصيب من مجموع 3

جدول (4): الاختبارات التشخيصية للعزلات المحلية لبكتريا *Cl. botulinum*.

العزلة	تحلل الدم	تصبيغ كرام	الحركة	إنتاج الكاتاليز	تكون السبور	تحلل النشأ	إنتاج الأندول	اختزال النترات	تحلل الدهن	النمو في دالة حامضية (4-6)	النمو في NaCl (3-12)%
Cl.1	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.2	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.3	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.4	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.5	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.6	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.7	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.8	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.9	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.10	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.11	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.12	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.13	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.14	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.15	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Cl.16	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+

عينات أي بنسبة (12.5%) أما عسل منطقة المعقل فقد حصل منه على عزلة واحدة من أصل 4 عينات أي بنسبة (6.25%) في حين أن منطقة شط العرب فقد نم الحصول على عزلة واحدة منه أي بنسبة (6.25%) واتفقت نتائج العزل من هذه المصادر مع نتائج الباحثين (2 ، 13 ، 12).

التشخيص Identification

تبين الجداول (4و5و6) الاختبارات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية للعزلات المحلية لبكتريا *Cl. botulinum* حسب (2، 15).

الصفات المظهرية

أن معاملة العينات بدرجات حرارة 80م لمدة 15 دقيقة في حمام مائي قبل تنميتها على وسط أكار الدم قد زاد من فرصة عزل بكتريا *Clostridum* وذلك لإجراء غربلة نوعية qualitative screening للعزلات الموجودة في عينات مصادر العزل فقد عمدت المعاملة الحرارية على التخلص من جميع الأحياء المجهرية غير المحبة للحرارة العاليةو أن التنمية اللاهوائية قد زادت في عملية الغربلة النوعية وهذا ما ظهر في النتائج التي كانت متفقة مع نتائج (12 و15) ويبين الشكل (1) بعض أشكال مستعمرات العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها بعد تنميتها على وسط أكار الدم إذ تميزت المستعمرات بنمو كثيف وغير منتظم وذات حواف مشرشبة وكانت محللة للدم من نوع بيتا فقد ظهرت هالة خضراء اللون حول المستعمرة وتميزت المستعمرة بلونها الرماي إلى نصف شفاف وحجمها (1-6) ملم وقد تميزت المستعمرات بوجود رائحة كريهة وكانت هذه النتائج مطابقة لما ذكره (12) بينما يبين الشكل (2) أنه عند تنمية البكتريا على وسط اللحم المطبوخ السائل فقد أظهرت نمواً جيداً بسبب كون هذا الوسط يعد وسطاً جيداً لنمو بكتريا *Cl.botulinum* وذلك لإحتوائه على المغذيات الأساسية لنموها والمتمثلة بـ Proteose Peptone الذي يجهز البكتريا بالنتروجين والفيتامينات الضرورية لنموها ، كذلك إحتواءه على الدكستروز الذي يعد مصدراً كاربوهيدراتياً ضرورياً لنمو ونشاط البكترياو أن وجود كلوريد الصوديوم يحافظ على التوازن الأزموزي للوسط وقد أمكن تمييز النمو في هذا الوسط من خلال ظهور العكار ة وسواد

جدول (5): الفحوصات التشخيصية التأكيدية للعزلات المحلية لبكتريا ***Cl. botulinum***.

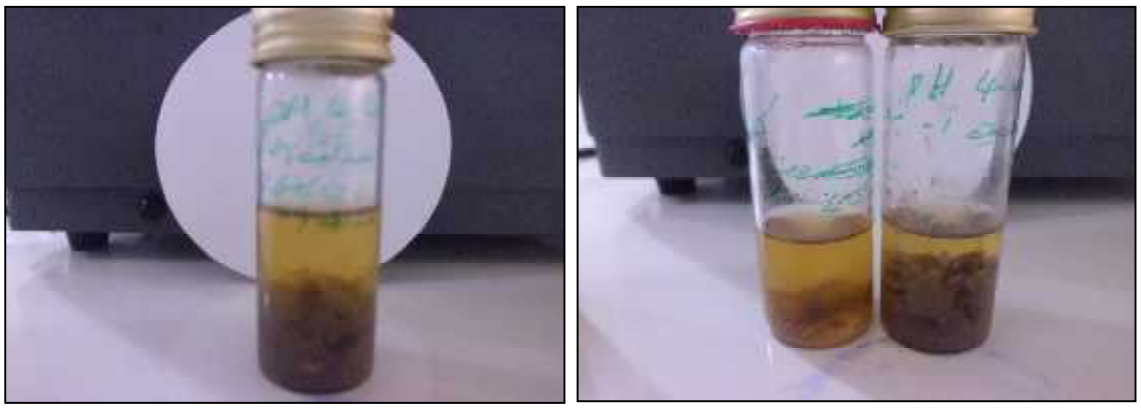
العزلة	النمو في درجات الحرارة			الحساسية تجاه للمضادات الحياتية										
	10م	30م	42م	النمو في ظروف التوهج بالأشعة فوق البنفسجية	Erethromycin	Metronedazol	Clindamycin	Rifampin	Tetracyclin	Penicillin	Chlorampheni col	Trimethoprim	Gentamicn	Nallidixic acid
Cl.1	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.2	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.3	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.4	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.5	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.6	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.7	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.8	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.9	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.10	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.11	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.12	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.13	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.14	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.15	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Cl.16	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−

اللحم وتحلله وتغير حجمه وظهور الرائحة الكريهة وكانت هذه النتائج متفقة مع (12 و2) كذلك عند تنمية البكتريا في وسط TPGY السائل قد أعطت نمواً جيداً لكون هذه الوسط يتكون من مجموعة مواد تساعد على توفير ظروف ملائمة لنمو البكتريا وتطورها مثل متحلل الكازين الذي أدى دوراً مهماً في نموها ، كذلك احتواء الوسط على الكلوكوز الذي يمثل مصدراً كاربوهيدراتياً جيداً وضرورياً لنمو البكتريا ، وكان لوجود فوسفات البوتاسيوم الثنائية أهمية كبيرة لكونها عاملاً منظماً تمتلك فعلاً دارئاً لتغير الدالة الحامضية ، أما احتواء الوسط على مستخلص الخميرة له أهمية في تغذية البكتريا لكونه مصدراً نتروجينياً جيداً وقد جاءت نتائج استعمال هذا الوسط مطابقة لنتائج (7)

جدول (6): نتائج تخمر السكريات للعزلات المحلية لبكتريا *Cl. botulinum*.

العزلة	تخمر السكريات																			
	كلوكوز	فركتوز	تريهالوز	سكروز	سليبايوز	مانيتول	ارابينوز	رامينوز	رافينوز	سوربيتول	زايلوز	مالتوز	مانوز	سالسين	مليبايوز	رايبوز	لاكتوز	كالاكتوز	اينوسيتول	امكدالين
Cl.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Cl.16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−

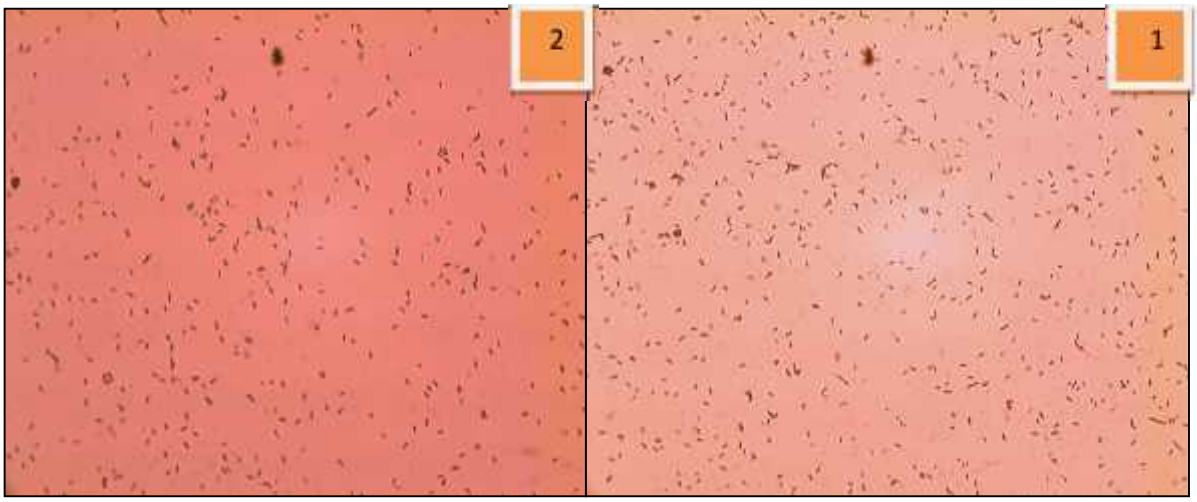
شكل (1): شكل المستعمرات النامية لبكتريا *Cl. botulinum* على وسط أكار الدم **Blood agar**.



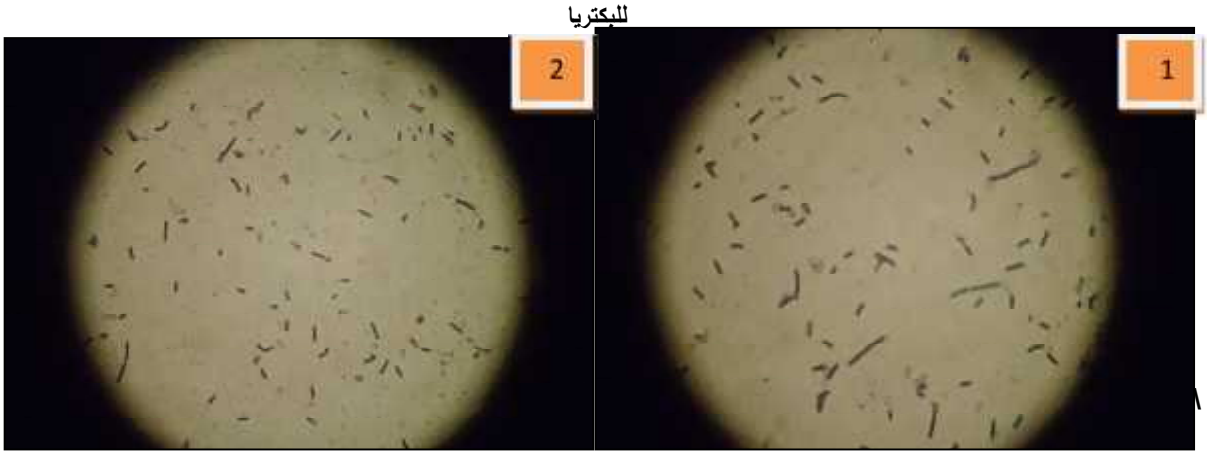
شكل (2) نمو بكتريا *Cl.botulinum* في وسط اللحم المطبوخ السائل (CM).

الفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية

تشير الفحوصات المجهرية وكما في الشكلين(3و4) إلى أن جميع العزلات كانت موجبة لصبغة كرام ، عصوية ،متحركة بحركة عشوائية، مكونة للسبورات ويكون السبور شبه طرفي منتفخ في إحدى نهايتي الخلية البكتيرية محللة للدم من نوع بيتا وهذا متفق مع (2) وكانت جميع الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت للعزلات المستعملة مطابقة لصفات بكتريا *Clostridium botulinum* إذ بينت النتائج أن العزلات كانت محللة للدم من نوع بيتا سالبة للكاتاليز وغير محللة للنشأ وغير منتجة للأندول و غير مختزلة للنترات بينما كانت محللة للدهن وكانت هذه النتائج متفقة مع (2 و13 و15). وقد تميزت بتخمرها لبعض السكريات ومنها الكلوكوز والمانيتول والارابينوز والفركتوز والمالتوز والزايلوز والمانوز والسليبايوز والرامينوز والسالسين والسوربيتول والسكروز والتريهالوز والرافينوز والمليبايوز. في حين أنها كانت غير مخمرة للسكريات الاينوسيتول واللاكتوز والرايبوز والامكدالين والكالاكتوز وكما مبين في الشكل (5) وكانت هذه النتائج متفقة مع (4 و15). وقد أظهرت العزلات حساسيتها لبعض المضادات الحياتية مثل Rifampin و Clindamycin و Tetracycline و Metronedazol و Erethromycin و Penicillin من خلال تكوين هالة التثبيط في الطبق وذلك عند تنميتها على وسط Meueller Hinton agar وكما موضح في الشكل (6) إذ أنه من خلال قياس قطر هالة التثبيط في الطبق بينت النتائج أن أكبر هالة كانت للمضادين الحيويين Penicillin و Metronedazole إذ كان قطر هالة التثبيط 35 و30 ملم على التوالي في حين تراوحت أقطار الهالات الأخرى (22-29) ملم بينما كان اصغر قطر لهالة التثبيط للمضادين الحيويين Clindamycin و Chloramphnicol إذ بلغ قطر الهالة 20 ملم ، بينما كانت مقاومة للمضادات الحياتية Trimethoprimeو Gentamicin و Nalidixic acid وقد أظهرت العزلات البكتيرية قدرتها على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وذلك من خلال سواد لون الوسط وكذلك النمو بدرجات حرارية واطئة 10°م وكذلك درجات حرارية عالية 42 م وقد تطابقت هذه الاختبارات مع النتائج التي حصل عليها(12) وقد بينت النتائج عدم قدرة العزلات البكتيرية من النمو في ظروف هوائية وكذلك عدم حدوث توهج بالأشعة فوق البنفسجية كما في جدول(4). وقد أظهرت النتائج في الجدول (5) أن العزلات البكتيرية تستطيع النمو بمدى من الدالة الحامضية (4-6) وبمدى من التراكيز الملحية (3-12)% ولذا فإن العزلات البكتيرية التي أظهرت تطابقاً تجاه الاختبارات السابقة هي تعود لبكتريا *Cl. botulinum* وهذا ما أكده (12).

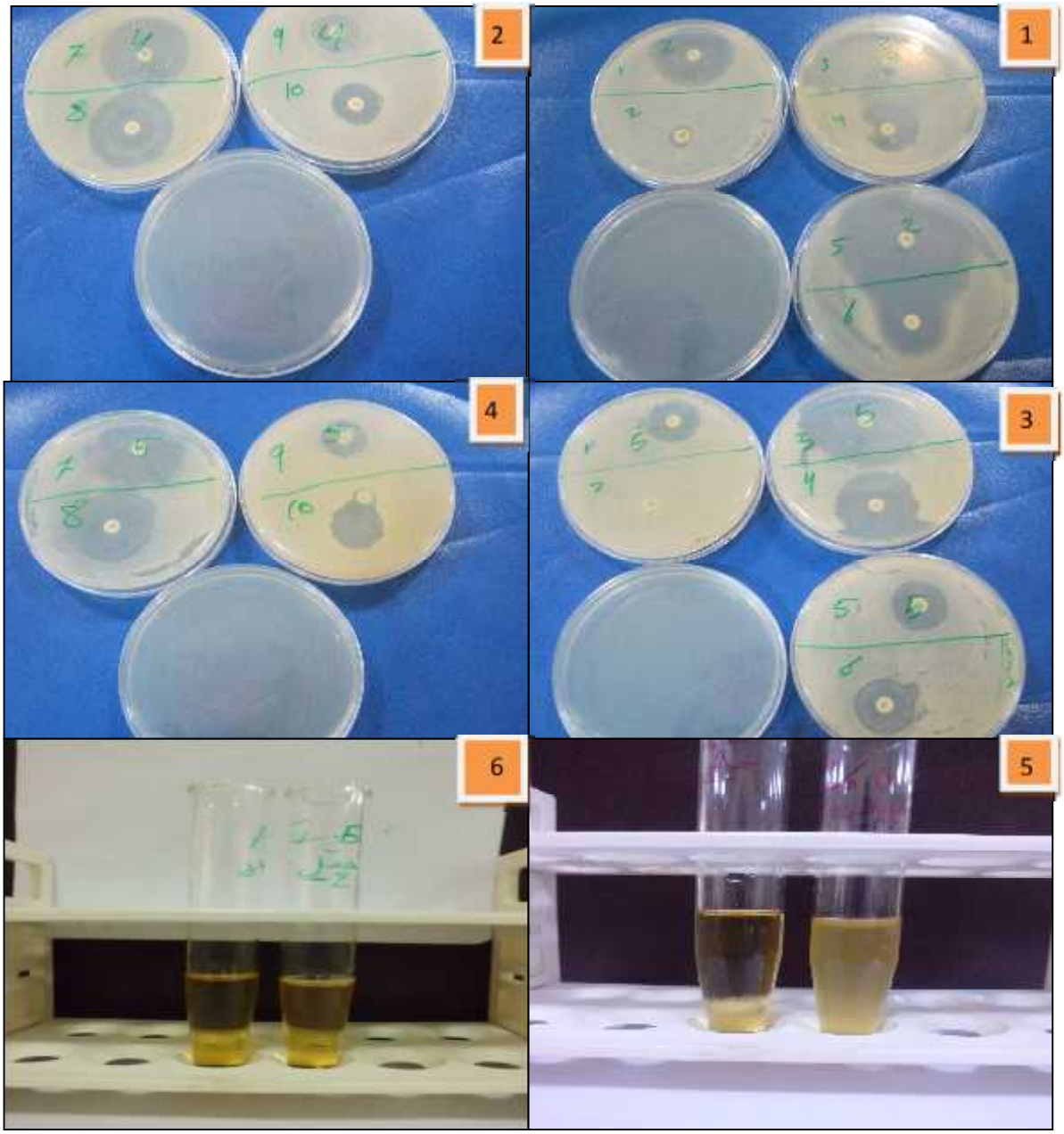


شكل (3): خلايا بكتريا *Cl. botulinum* وهي تبدو تحت المجهر الضوئي (Novel) وبقوة تكبير 100.(1-2) خلايا خضرية للبكتريا



شكل (4): خلايا بكتريا *Cl. botulinum* وهي تبدو تحت المجهر الضوئي (Novel) وبقوة تكبير 100. (2,1) شكل السبور لخلايا البكتريا.

شكل (5): الفحوصات التشخيصية لبكتريا *Cl.botulinum* .(1و2) تخمر السكريات و(3) تحلل الدهن و(4) إنتاج الكاتاليز .



شكل (6): الفحوصات التشخيصية لبكتريا *Cl. botulinum*. (1-4) حساسية البكتريا للمضادات الحياتية ، (5) النمو بتركيز ملح 12% والصورة (6) النمو بدالة حامضية 4.5.

المصادر

1-المرجاني، محمد فرج وعبدالهادي، علي حيدر وسلمان، جيهان عبد الستار (2012). السموم البكتيرية. الطبعة الأولى، الذاكرة للطباعة والنشر. 152ص.

2-Ahmed, S.H.; Badary, M.S.; Mohamed, W.A. and Elkhawaga, A.A. (2011). Multiplex PCR for detection and genotyping of *Cl. botulinum* type A,B,E and F neurotoxin genes in some Egyptian food products. Journal of American Science, 7(10): 176-190.

3.Barr, J.R; Moura, H.; Boyer, A.E.; Woolfitt, A.; Kalb, S.R.; Pavlopoulos, A.; McWilliams, L.G.; Schmidt, J.G.; Martinez, R.A and Ashley, L.A. (2005). Emerging infectious Diseases, 11(10): 1578-1583.

4.Bianco, M.I.; Luquez, C.; Jong, L.I. and Fernandez, R.A. (2009). Linden flower (*Tillia* spp.) as potential vehicle of

Clostridium botulinum spores in the transmission of infant botulism. Revisit Argentina de Microbiologia, 41(4): 232-236.

5.CDC: Centers for Disease Control and Prevention (1998). Botulism in the united states,1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. Center for Disease control and prevention, Atlanta. 43pp.

6.Duchenes, C.; Granum, P.E; Menozzi, M.G; Pwck, M.; Pelkonen, S.; Popoff, M.; Stackebrandt, E. and Titball, R. (2006). Clostridia in medical, veterinary and food Micobiology, Diagnosis and typing, Europeon Concerted Action, genus *Clostridium*. Typing European commission. 218pp.

7.Franciosa, G.; Floridi, F.; Maugliani, A. and Aureli, P. (2004). Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A Complex in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. Applied and Environmental Microbiology, 70(12): 7192-7199.

8.Gill, M.D. (1982). Bacterial toxins: A table of lethal amounts. Microbiological Review, 46: 86-94.

9.Greenberg, R.A.; Bladel, B.O. and Zingelmann, W.J. (1966). Use of the anaerobic puch in isolating *Clostridum botulinum* spores from meat.Applied Microbiology, 14(2): 223-228.

10.Hajmeer, M. (2007). *Clostridium botulinum.* PHR 250, on 4/30/2007, 6pp.

11.Harley, J. P. and Prescott, L. M. (2002). Laboratory exercises in Microbiology, 5th Ed, The McGraw-Hill Companies, 449pp.

12.Lindstrom, M. and Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. Journal Clinical Microbiology Reviews, 19(2): 298-312.

13.Midura, T.F. (1996). Infant botulism. Clinical Mirobiology Reviews, 9(2): 119-125.

14.Ortega, D.O.; Jimenez, L.C.V. and Martinez, Re. R. (2012). Isolation and typing of *Clostridium* spp. 16S rRNA from soil oil samples obtained in areas with sudden mortality history in Colombia. Journal of Microbiology, 1(13): 44-40.

15.Rainey, F.A.; Hollen, B.J. and Small, A. (2009). Bergey's manual of systematic Bacteriology. 2nd. ed. class 2 Clostridia class. nov. New York (3): 736-828.

16-Shapiro, R.L.; Hatheway, C.L. and Swerdlow, D. L. (1998). Botulism in the united states: A clinical and epidemiologic review. Ann. Intern. Medicine., 129: 221-228.

17-Ting, P.T and Freiman, A. (2004). The story of *Clostridium botulinum* from food poisoning to botox. Clinical Medicine, 4(3): 258-261.

Basrah J. Agric. Sci., 28 (1): 103-114, 2015

Isolation and Identification of *Clostridium botulinum* from different resources

Amal K. Gadban, Hayder I. Ali and Nawras M. Hasan

Department of Food Sciences, College of Agriculture, University of Basrah, Iraq

Abstract: Sixteen local isolates of *Clostridium* were isolated from sources: Soil, meat and honey. Those sources were obtained from different districts in Basrah government. Characterization of isolates were made after purification by using morphological and biochemical tests which revealed that the isolates were *Clostridium botulinum*. The microscopic test appeared that all isolates are bacilli, gram positive, obligate anaerobic ,forming spores and motile. There's colonies had wide spread form with uniform border when grown of blood agar and egg yolk agar and looked transparent to gray. The biochemical tests revealed that the isolates are β-heamolysis, lipid hydrolyzed, produced H_2S, all of them were negative in indole production, nitrate reduction, starch hydrolysis and catalase production. They were grown in pH (4-6), temperature (10, 30,45)°C and NaCl (3-12)%. They fermented all the sugars to jog lactose, galactose, amygdalin, Eunosetol and ribose. They were sensitive for some antibiotics like Erethromycin, Refampin, Metronidazol and Penicillin, Penicillin but they were resistant for, Gentamicin, Nalidixic acid and Trimethoprim.

Key words: *Clostridium botulinum*, Isolation, Identification.