دراسة قدرة بعض انواع البكتريا العصوية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من حليب الاطفال المجفف على انتاج السموم

نجلاء عبدالله فتحي

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

تاريخ الاستلام ٢٠١٣/٠٤/٠٨ تاريخ القبول ٢٠١٣/٠٦/٠٥

Study the Ability of Some Gram Positive Bacillus Species isolated from powdered infant milk to Produce Toxins

Najla'a A.Fathi

University of Mosul / College of science Dept. of Biology

Abstract:

Forty samples of different types of powdered infant milk had been collected including (celia 1-2 , biomil 1-2 , lery 1-2 , dialak 1-2 , albadee 2 ,nido 2 , kikos 2 , nictalia 1-2 , cerelak). Some of the milk cans were opened directly at the beginning of test while others had been opened three days or more before testing.

The results showed that Bacillus species were isolated and identified at different rates as Bacillus cereus has the highest rate (12.5%) then B.circulance and B. laterosporous at (5%) for each of them respectively, while B.megaterium was isolated at a rate of (2.5%).

The ability of the isolated Bacillus species to produce enterotoxin was detected by the use of Rapid and delayed permeability test for the detection of the heat stable enterotoxin and the results were recorded by the appearance of blue non necrotic lesions after injection of the rabbit with the cell free culture supernated (CFCS) and Lysate supernatant (LS) of the isolated Bacillus species, and for the detection of heat labile enterotoxin, the paw oedema test was also used , the increase in thickness of fore and hind arms appeared.

The ability of the Bacillus species to produce the enzyme lecithinase and lyse red blood cells were also studied and the results revealed that only Bacillus cereus produce the enzyme lecithinase. in addition all the isolates showed positive hemolytic activity.

الخلاصة:

تم خلال مدة الدراسة جمع ٤٠ عينة من حليب الاطفال المجفف وبانواع مختلفة تضمنت (celia 1-2، biomil 1-2، lery 1-2، ديالاك 2-1، البديع 2-1، نيدو2، كيكوز 2، نكتاليا-1 2، سريلاك) وقد فُتحت قسماً من علب الحليب اثناء اجراء البحث والقسم الاخر مضى على فتحها ٣ ايام او اكثر. وقد تم عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا العصوية الموجبة لصبغة كرام *Bacillus sp.* وبنسب مختلفة حيث اظهرت النتائج ان بكتريا *Bacillus cereus* عزلت باعلى نسبة حيث بلغت (12.5%) ثم تلتها *B.circulans* و *B.laterosporus* بنسبة (5%) لكل منهما على التوالي في حين عزلت *B.megaterium* بنسبة (2.5%).

كما تم خلال الدراسة الكشف عن قدرة الانواع المعزولة من بكتريا *Bacillus* على انتاج الذيفانات المعوية وذلك باستخدام اختبار النفاذية السريع والمتأخر لجلد الارنب Rapid and delayed permeability test of rabbit skin للكشف عن الذيفان الثابت بالحرارة heat stable enterotoxins حيث لوحظت النتيجة الموجبة بتكوين مناطق زرقاء غير متقرنة بعد حقن الارنب بـ (0.1) سم^{3} من Cell Free Culture Supernatant (CFCS) والـ Lysate Supernatant (LS) لأنواع *Bacillus* المعزولة. كما تم اجراء اختبار تورم اكف الفئران (paw oedema test) وذلك للكشف عن الذيفانات المعوية التالفة بالحرارة heat labile enterotoxins حيث ظهرت النتيجة الموجبة بزيادة سمك الاكف الامامية والخلفية للفئران.

وقد تم ايضاً الكشف عن قدرة انواع بكتريا *Bacillus* المعزولة على انتاج انزيم اللسثينيز وكذلك الكشف عن قدرتها على تحلل الدم , حيث اظهرت بكتريا *Bacillus cereus* فقط القدرة على انتاج انزيم اللسثينيز اما بقية الانواع المعزولة فأعطت نتيجة سالبة لهذا الاختبار. كما اظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة لاختبار تحلل الدم.

المقدمة:

يعد الحليب غذاء كامل للإنسان حيث يملك قيمة غذائية عالية لاحتوائه اهم العناصر الضرورية للنمو فهو يحتوي على البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والمعادن والفيتامينات, وبسبب احتواء الحليب على هذه العناصر الغذائية فهو يعتبر وسطاً ملائماً جداً لنمو كثير من

الاحياء المجهرية وقد يتلوث الحليب بأنواع من الجراثيم تصل اليه نتيجة الغبار او من الماء مثل الـ *Bacillus* والـ *Pseudomonas* وغيرها.[1]

ان الامراض التي تصيب الانسان نتيجة تلوث الاغذية قد تسبب له اعراضاً مرضية ناتجة عن الاصابة المباشرة بالجراثيم او عن طريق افراز السموم المنتجة من قبل بعضها الاخر في الغذاء مسببةً التسمم الغذائي. حيث تقوم الجراثيم بإفراز السموم toxin والتي هي عبارة عن مواد بروتينية حساسة للحرارة اذ تتحطم بالتسخين عند درجة حرارة 50 م° وهذه السموم اما ان تُفرز خارج الخلية وتُعرف بالسموم الخارجية او قد تكون جزءاً من الخلية وتسمى عندها بالسموم الداخلية وهي اكثر ثباتاً ومقاومة للحرارة.[14][2]

ويحدث التسمم الغذائي بالجراثيم العصوية *Bacillus* المنتجة للسموم وعلى رأسها *B.cereus* وان حالات الاصابة بها في تزايد في الوقت الحالي [3][4] ففي عام (1982) انتشرت 8 حالات من حالات التسمم الغذائي بجرثومة *B.cereus* (من مجموع 200 حالة) [5] وانتشرت حوالي 24 حالة تسمم ناتجة عن هذه الجرثومة وسُجلت في (CDc) Centers for disease control بين عامي 1982 و 1987 من مجموع 461 حالة,[6][7] وسجلت خلال هذه الفترة حوالي 1-3% من حالات التسمم الغذائي ببكتريا *B.cereus* في الولايات المتحدة وبريطانيا مقارنةً ب 22% من الحالات انتشرت في Netherland و7% في كندا نتيجة للأصابة بـ *B.cereus*.[8][9]

تنتشر جرثومة *B.cereus* في التربة, الماء, الغبار, ونسبة عالية منها عزلت من الغذاء متضمنة الخضراوات, اللبن, الحبوب, اللحم ومن غذاء الاطفال, والحليب الطازج المبستر والحليب المجفف والاغذية المجففة ومنتجات المخابز والبسكويت.[3][5]

والـ *B.cereus* عبارة عن جرثومة هوائية عصوية, عزلت لأول مرة في اوربا عام 1906 وأكد العالم plazikowski انها تنمو في حد ادنى من الحرارة بين (4-5)م° وحد اقصى يبلغ (48-50)م°.[6] تنتج نوعان من السموم المسؤولة عن ظهور العلامات السريرية وهي emetic toxin الذي يسبب التقيؤ والـ Diarrheal Enterotoxin المسؤول عن الاسهال وان متلازمة التقيؤ تسببها السموم الثابتة بالحرارة heat_stable toxins ومن علامات هذه المتلازمة الغثيان والقيء الذي يظهر بعد (1-6) ساعات من هضم الطعام الحاوي على السم. اما فيما يخص متلازمة الاسهال فهي تنتج عن السم التالف بالحرارة heat-lable toxine، وللوقاية من هذا التسمم يفضل حفظ الاطعمة في الثلاجة لمنع نمو الجرثومة وانتاجها للسم خلال فترة الخزن.[10]

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:-

جمعت (40) عينة من حليب الأطفال المجفف ومن نوعيات مختلفة شملت (celia 1-2، biomil 1-2، lery 1-2، ديالاك 1-2، البديع 1-2، نيدو2، كيكوز 2، نكتاليا2-1، سريلاك) كما أن علب الحليب المستخدمة في الدراسة فتحت قسم منها أثناء إجراء البحث والقسم الأخر مضى على فتحها ٣ أيام أو أكثر.

طريقة العمل :-

تم تخفيف عينات الحليب بالماء المقطر بنسبة ٥ غم /١٠ سم^{٣} ورجت العينات لغرض التجانس ولقحت على أوساط أكار الدم blood agar , ووسط الاكار المغذي , حضنت الأطباق عند درجة حرارة (37±1م^{o}) ولمدة ٢٤-٤٨ ساعة شخصت العينات مبدئيا بملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات النامية من ناحية حجم المستعمرة وارتفاعها وشكل حافاتها ولونها وحضرت مسحات رقيقة منها وصبغت بصبغة كرام ولوحظت أشكال الخلايا وترتيبها وقابليتها للاصطباغ بهذه الصبغة, كما أجريت الإختبارات الكيموحيوية Biochemical tests كاختبار فعالية أنزيم الكتاليز catalase test ومجموعة اختبارات Imvic واختبارات الحركة motility test واختبار فعالية أنزيم السايتوكروم اوكسيديز cytochrome oxidase وأنزيم اليوريز urease test واختبار تحلل النشا starch hydrolysis واختبار تحمل تركيز (7.5%) من ملح الطعام واختبار تخمر الكلوكوز والمانيتول والارابينوز والزايلوز واختبار تحلل الجيلاتين عند 22م^{o} واختبار اختزال النترات واختبار ازالة الامين من الحامض الاميني phenylalanine [13][14].

حضرت مسحات رقيقة من البكتريا النامية على وسط اكار الدم ووسط الاكار المغذي والتي كانت مستعمراتها كبيرة وذات حافات متفرعة على الوسط الغذائي وصبغت بصبغة كرام ولوحظت اشكال خلاياها وتفاعلها مع الصبغة وحضرت منها مزارع نقية على موائل الاكار المغذي ثم تم اختيار البكتريا العصوية الموجبة لصبغة كرام واجريت عليها الفحوصات السابقة للتمييز بين انواعها وتشخيصها.

دراسة قدرة البكتريا على إنتاج السموم المعوية:

a-1- تحضير المعلق الجرثومي:-

تم تلقيح (25) سم^3 من وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion agar المعقم بالمؤصدة والموزع في دوارق زجاجية معقمة سعة (100) سم^3 بـ 1 سم^3 من جرثومة bacillus بأنواعها المختلفة كل في دورق خاص به وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة في حاضنة هزازة عند سرعة (180xg).

2- تحضير راشح المزارع الجرثومية الخالي من الخلايا

Cell Free Culture Supernatant (CFCS)

رسبت الخلايا الجرثومية من المعلق الجرثومي الذي حضر كما في الفقرة (١) وباستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي عند سرعة (10000xg) لمدة نصف ساعة وبدرجة حرارة 4 درجة مئوية ومن نوع (MSE) إنكليزي الصنع, اخذ الرائق وتم ترشيحه خلال مرشحات غشائية بقطر Millipore (0.22) أطلق عليه راشح المستعمرات الجرثومية الخالي من الخلايا والذي رمز له CFCS [15][16].

3- تحضير رائق الخلايا المتكسرة Lysate Supernatant (LS)

أُخذَ الراسب الذي تم الحصول عليه في الفقرة السابقة (2-a) وعلق في 5 سم^3 من محلول الفوسفات المنظم Phosphate buffer بتركيز (0.02M) مولار ورقم هيدروجيني (7.4) [17]. حطمت الخلايا البكتيرية باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic من نوع (MSE No. p6 1545) بتسليط (20000) ذبذبة /ثانية لمدة ٣٠ ثانية كررت هذه العملية ثلاث مرات مع فترات توقف لمدة 30 ثانية بعد كل مرة لتبريد المحلول وللحفاظ على درجة حرارة 4 م في حمام ثلجي. فصل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد الفوقي بسرعة (10000xg) ولمدة نصف ساعة رشح الرائق خلال مرشحات غشائية (0.22Mm) وضع الرائق الذي اطلق عليه رائق الخلايا المتكسرة والذي رمز له بـ (LS) في التبريد لحين استخدامه (Hostacka et al ,1993).

b- التحري عن الذيفانات المعوية لجرثومة *bacillus sp* :-

تم التحري عن الذيفانات المعوية لجرثومة *bacillus sp* بنوعيها الثابت حراريا الذي تم التحري عنه باستخدام اختبار النفاذية السريع لجلد الارنب والذيفان التالف بالحرارة باستخدام توم اكف الفئران واختبار النفاذية المتأخرة لجلد الارنب.

1- اختبار النفاذية السريع والمتأخر لجلد الارنب:-

Rapid and delyed permeability test of rabbit skin

استخدمت ارانب بيض بالغة نوع albino وزنها (1.5-2)كغم اذ تم حقن 0.1سم^{3} من كل من CFCS والـ LS تحت الجلد في منطقة الظهر بعد ازالة الشعر من المنطقة وتعقيمها بالكحول. وبعد ساعة من الحقن تم حقن 0.8سم^{3} من صبغة Evan blue بتركيز (5%) بالوريد. وبعد اقل من (١٥ دقيقة) ظهرت النتيجة الموجبة بشكل مناطق دائرية زرقاء اللون وصل قطرها الى (٤ملم) بالنسبة لعامل النفاذية السريع الذي يعد اختباراً للذيفان المعوي الثابت حراريا اما بالنسبة لعامل النفاذية المتأخر فقد ظهرت النتيجة الموجبة بعد (48) ساعة بشكل مناطق متقرنة زرقاء اللون ويعد هذا الاختبار كشف عن الذيفان المعوي التالف بالحرارة[18][19].

2- التحري عن الذيفان التالف بالحرارة لجرثومة *bacillus sp*

Heat labile enterotoxin of bacillus sp.

***اختبار تورم اكف الفئران (paw oedema test)**

اتُبعت في هذا الاختبار طريقه الباحثين (Harne et al,1990) والتي تتضمن حقن اكف الفئران الامامية والخلفية ب (0.1) سم^{3} من CFCS وتم قياس سمكها بالفرنيا (Verenier caliper) قبل الحقن. كما اخذ القياس بعد الحقن بأوقات مختلفة متدرجة من (0-12-24-36-48-72-96) ساعة ونظرا لاختلاف السمك بين الاطراف الأمامية والخلفية التي حقنت بنفس النموذج فقد تم احتساب النسبة المئوية للسمك النسبي بدلا من الزيادة في السمك الكلي كقياس للسمية (RT%) Relative thickness.

السمك النسبي % = (معدل السمك لأكف الفئران في اوقات مختلفة بعد الحقن) / (معدل السمك لأكف الفئران قبل الحقن)

كما حقن نقيع القلب والدماغ المعقم كسيطرة للمقارنة.

النتائج والمناقشة:

يتبين من الجدول رقم (1) انه من بين (40) عينة حليب ظهرت لدينا (10) عزلات مختلفة من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وكانت نسبة العزل (25%) كعينات ذات مزارع موجبة للنوع *Bacillus* و (75%) عينات ذات مزارع سالبة, توزعت العينات ذات المزارع الموجبة بين (12.5%) لبكتريا *Bacillus cereus* و (5%) لكل من *B.laterosporus* و *B.circulans* على التوالي في حين كانت نسبة عزل *B.megaterium* (2.5%)

جدول (1) النسب المئوية للجراثيم المعزولة من عينات الحليب المختلفة.

العدد الكلي للعينات	العينات ذات المزارع السالبة		العينات ذات المزارع الموجبة		انواع الجراثيم المعزولة	العدد	%
	العدد	%	العدد	%			
					Bacillus cereus	5	12.5
40	30	75	10	25	*B.laterosporus*	2	5
					B.circulans	2	5
					B.megaterium	1	2.5

ويظهر الجدول رقم (2) النسب المئوية للجراثيم المعزولة من علب الحليب الجديدة والقديمة حيث يلاحظ من الجدول ان نسبة عزل كل من *B.cereus* والـ *B.circulans* المعزولة من العلب الجديدة التي فتحت مباشرةً اثناء اجراء الفحص كانت (5%) لكل منها على التوالي , اما *B.megaterium* فقد عزلت بنسبة (2.5%). اما بالنسبة للعلب القديمة من الحليب فقد عزلت منها بكتريا *B.cereus* بنسبة (7.5%) اما الـ *B.Laterosporus* فقد عزلت بنسبة (5%).

جدول (2) النسب المئوية للجراثيم المعزولة من العلب الجديدة والقديمة.

علب الحليب الجديدة				**علب الحليب القديمة**			
انواع الجراثيم المعزولة	**العينات الجديدة التي فتحت قبل اخذ العينة**			**انواع الجراثيم المعزولة**	**العينات القديمة التي فتحت قبل ستة ايام من أخذ العينة**		
	العدد	**%**	**نوع الحليب**		**العدد**	**%**	**نوع الحليب**
B. cereus	**2**	**5**	**ديالاك-٢- نكتاليا-٢-**	***B. cereus***	**3**	**7.5**	**ديالاك-٢- كيكوز-٢-**
B.circulans	**2**	**5**	**ليري-٢- نكتاليا-٢-**	***B.laterosporus***	**2**	**5**	**ديالاك-٢- ليري-٢-**
B.megaterium	**1**	**2.5**	**نكتاليا-١-**				

نلاحظ من خلال نتائجنا ان نسبة عزل جرثومة *B.cereus* من العلب القديمة كانت اكبر من نسبتها في العلب الجديدة حيث ازدادت نسبتها من 5% في العلب الجديدة الى (7.5%) في

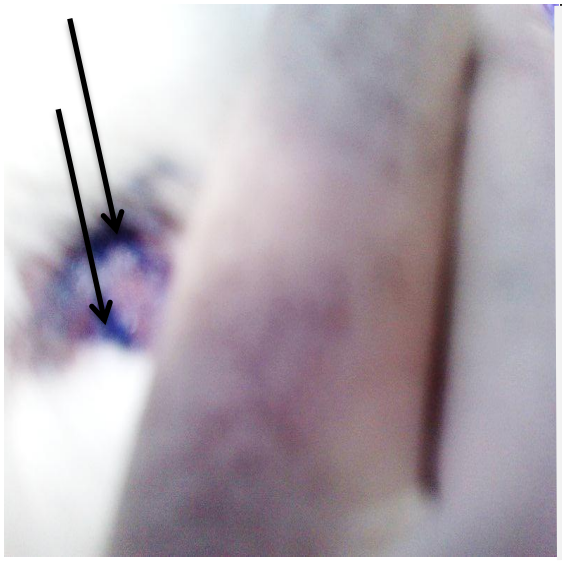
العلب القديمة وان هذه الزيادة قد تعود الى تواجد هذه الجرثومة في الهواء لكونها من البكتريا المكونة للسبورات حيث تنتشر سبوراتها في الهواء ويتعرض لها الحليب اثناء التداول. وتعتبر البكتريا المكونة للسبورات *Bacillaceae* مهمة لسببين الاول ان سبوراتها تقاوم المعاملات الحرارية والظروف القاسية [10][21] لذلك فهي تعد المسؤولة عن تلف الاغذية المعلبة والثاني هو قابليتها العالية على انتاج العديد من الانزيمات المحللة لمختلف الاغذية بالإضافة الى افرازها للسموم البكتيرية الخطرة جداً والمسببة للتسمم الغذائي[21][22].

تشير نتائجنا الى عزل جرثومة *Bacillus* من العلب الجديدة التي فتحت مباشرةً عند اجراء الفحص وذلك لمقاومة سبوراتها لعملية التسخين اثناء التصنيع والى عدم كفاءة عملية التعقيم. وجاءت نتائجنا في عزل *B.cereus* من العلب الجديدة بنسبة (5%) مقاربة لدراسة (Rawan and Anderson عام1997) اللذان عزلوا هذه الجرثومة بنسبة 6.8% من حليب الاطفال Infant Milk Formulae (IMF) واللذان فحصوها مباشرةً بعد اعادة تعليق الحليب Reconstitution واكدا على ان لهذه الجرثومة القدرة على انتاج السموم المعوية وبنسبة 30- 31% منها. كما تمكن (Becker et al 1994) واخرون من عزلها من الحليب المجفف للأطفال (IMF) بنسبة 54% من مجموع 261 عينة من حليب الاطفال [9][25] كما تمكن [Rowan et al ,2001] من عزل العديد من انواع *Bacillus* من حليب الاطفال المجفف IMF حيث عزل *B.cereus* بالإضافة الى *B.subtilis* و*B.circulans* والـ *B.megaterium* والـ *B.Licheniformis* بنسب مختلفة واكدو على قدرتها لإنتاج سم الاسهال (HBL) في Infant Milk Formulae (IMF) وقد تطابقت نتائجنا مع هذه الدراسة في عزل *B.circulans* والـ *B.megaterium* من الحليب. واكد [11] ان الانواع المختلفة من الـ *Bacillus* المعزولة من بيئة الالبان ربما تكون السبب في انتاج سم الاسهال, كما استطاع [11][26] من عزل العديد من انواع *Bacillus* من حليب الابقار الطازج (الخام) بالإضافة الى *B.cereus* مثل *B.circulans*والـ *B.subtilis* والـ *B.Laterosporus/cereus* و *B.Lentus* والـ *B.Licheniformis* و *B.mycoides*و *B.shaevicus* و *B.thuringensis* وان النوع *B.cereus* كان الاكثر عزلاً. كما اثبت (Beattie and Williams, 1999) بأن هذه الانواع من الباسلس لها القدرة على انتاج السموم المعوية ايضاً واوضح [23] انه على الرغم من انتشار التلوث بأنواع الباسلس في عينات حليب الاطفال فان نسبة التسمم بهذه الانواع تكون قليلة وذلك لان الحليب يحوي على نسبة قليلة من الاحماض الامينية الحرة ويفتقد او يفتقر للكلوكوز الذي يشجع انتاج هذه السموم [21][24]. كما ان قسماً من انواع الـ Bacillus التي

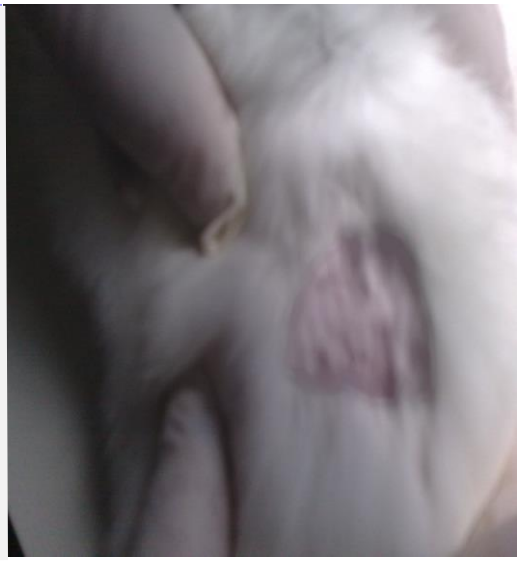
تنمو في الحليب تنتج سموم معوية والقسم الاخر من السلالات لا تنتج سموم.[23] ولاحظ [Rowan et al., 2001] ان قدرة بعض الانواع المعزولة من الباسلس على انتاج السموم المعوية Haemolysin BL (HBL) والـ *Bacillus cereus* enterotoxin T (BceT) بعد نموها في طعام الاطفال تتأثر بالمكونات الغذائية لهذه المنتجات حيث لاحظ Rawan and Andersonعام1997 ان وجود مادة المالتودكسترين في حليب الاطفال تزيد من انتاج هذه الانواع من السموم المعوية والادلة الحالية توضح ان المالتودكسترين يحفز نمو بكتريا *Bacillus cereus* في حليب الاطفال المجفف ويحفز انتاج السموم المعوية والمالتودكسترين المشتق من تحلل النشا يتواجد في منتجات الحليب للأطفال الرضع وخاصةً التي تعطى للأطفال الخدج والضعفاء [27][28] وقد اوضح Rawan and Andersonعام1997 ان التخزين الخاطئ للمكونات الحاوية على المالتودكسترين قد تكون مهدده لصحة المستهلكين وذلك لقدرتها على زيادة انتاج السموم المعوية المسببة للإسهال في هذه المنتجات وان تحضير الحليب يجب ان يكون تحت ظروف صحية كما ان استهلاكه يجب ان يتم خلال فترة لا تزيد عن اربع ساعات وذلك لضمان سلامة المستهلك.

***اختبار النفاذية السريع والمتأخر لجلد الارنب:**

أُجريَ هذا الاختبار بالاعتماد على طريقة الباحثين (sanderfur and peteron 1976) ويستخدم اختبار النفاذية السريع لجلد الارنب للتحري عن الذيفان المعوي الثابت حرارياً وظهرت النتيجة الموجبة للاختبار بشكل مناطق دائرية زرقاء غير متقرنة بقطر (4)ملم بعد اقل من نصف ساعة من حقن الارنب وريدياً بصبغة ايفان الزرقاء (Evan Blue) والمحقونة بـ (0.1) سم^{3} من الـ(CFCS) والـ(LS) لجرثومة *B.cereus* والـ*B.circulans* والـ*B.megaterium* و *B.laterosporus* في منطقة الظهر قبل ساعة من حقن الصبغة ويمكن ملاحظة هذه النتيجة في الشكل (1) والذي يبين ظهور مناطق زرقاء غير متقرنة مقارنةً بمناطق السيطرة التي حقنت بمرق نقيع القلب والدماغ المعقم والمناطق التي اعطت نتيجة سالبة للاختبار مثل *B.laterosporus*. اما عامل النفاذية المتأخر للأرنب فتم ملاحظته بعد 48 ساعة من الحقن وسجلت النتيجة الموجبة بتكون مناطق زرقاء متقرنة في مناطق الحقن مقارنةً بمناطق السيطرة التي لم تظهر فيها هذه المناطق.



شكل (1) نتيجة موجبة لاختبار النفاذية السريع لجلد الارنب (سيطرة) (الذيفان الثابت بالحرارة)



شكل (2) نتيجة سالبة لاختبار النفاذية السريع لجلد الارنب

ان نتائج دراستنا جاءت مقاربة لدراسة (kotiranta et al ,2000) الذي شخص الفعالية السمية لسم الاسهال (HBL) حيث اثبتت النتيجة الموضحة لفحص النفاذية والتنخر necrosis في جلد الارنب وتجمع او تراكم السوائل في فحص امعاء الارنب المربوطة (ileal loop) امعاء الارنب وسجل حدوث التنخر والالتهاب في جسم الحيوان. كما لاحظ (Rowan et al ,2001) ان *Bacillus cereus* تنتج الـ enterotoxin(HBL) ولاحظ ايضاً ان *B.circulans* والـ *B.megaterium* تنتج (HBL) وهذا مقارب للنتائج التي تم التوصل اليها. كما وجد ايضاً ان *B.subtilis* والـ *B.Licheniformis* ايضاً تنتج (HBL) انتروتوكسين بعد نموها في حليب الاطفال المعاد تعليقه بمساعدة او بوجود سم الاسهال لـ *Bacillus cereus*.

تفرز سلالات الـ *B.cereus* نوعين من السموم الغير ثابتة بالحرارة وهي Hemolysin BL (HBL) والـ enterotoxin proteinT(BceT) [31], وقد اوضحت الدراسات قدرة *Bacillus cereus* والانواع الاخرى المعزولة سريرياً او من الاغذية على التعبير عن سم الاسهال diarrheal HBL enterotoxin والـ BceT بعد نموها في حليب الاطفال المراد تعليقه. واظهرت ان لانواع الباسلس المعزولة من الحليب الخام القدرة على انتاج سموم الاسهال.[11]

ان مكونات HBL هي Lsub1,Lsub2,designated B واي من هذه المكونات لا يملك الفعالية التحليلية hemolytic او فعالية النفاذية VP activity بمفرده, والفعالية العظمى

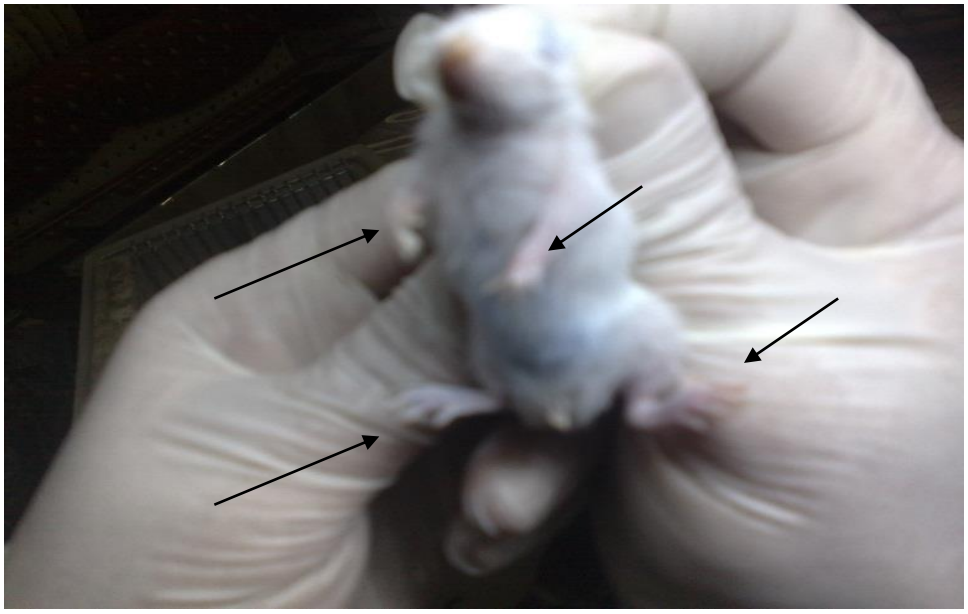
هي (اعلى حد من الفعالية) يحدث بوجود المكونات الثلاثة جميعاً[31] ، ولذلك فان تصنيفه كسم للإسهال diarrheal toxin يعتمد على احداث النفاذية في جلد الارنب [32]. وتمكن [Rowan et al ,. 2003] من عزل انواع مختلفة من الباسلس من عينات حليب الابقار الطازج واثبت قدرتها لانتاج السموم المعوية المسببة للاسهال وذلك باستخدام خلايا HEP-2- البشرية كما تمكن وباستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي polymeras chain reaction (PCR) من اثبات ان العديد من انواع الباسلس المعزولة تحمل الجين المسبب او المسؤول عن الاسهال diarrheagenic enterotoxin gene واوضح ان سبب سمية الـ HEP-2- هي سم الاسهال HBL enterotoxin.

اما السم المسبب للقيء فيتسبب بواسطة heat-stable dodecade psipeptid cereulide, اي توكسين ثابت بالحرارة. ويعد سم القيء اخطر من سم الاسهال لعدة اسباب هي ان وزنه الجزيئي اقل من سم الاسهال حيث يبلغ 5000 دالتون وهو مقاوم للحرارة والحموضة ولايكسر بواسطة انزيمي الببسين والتربسين مما يزيد من خطورته [29]. وقد تم الكشف عن هذا السم بظهور النتيجة الموجبة لاختبار النفاذية السريع لجلد الارنب.

***التحري عن انتاج الذيفان المعوي التالف بالحرارة**

اختبار تورم اكف الفئران:-

تم اتباع طريقة (Haren at al 1990) والمحورة عن طريقة (vartanyan et al 1977) في اجراء هذا الاختبار. نلاحظ في الشكل (3) فأرة تم حقن اكفها بـ 0.1 سم^{3} من مرق نقيع القلب والدماغ المعقم حيث سجل معدل سمك الاكف الامامية والخلفية بعد ٣٦ ساعة من الحقن (1) ملم و (1.1) ملم لكل من الاكف الامامية والخلفية على التوالي. وتم استخدام الفرنيا varnier caliper لقياس سمك الاكف. وعند مقارنته بالأشكال (4) و (5) التي توضح السمك في اكف الفئران الامامية والخلفية المحقونة ب (0.1)سم^{3} من ال (CFCS) لبكتريا الـ *Bacillus* المعزولة وصل سمكها الى (2.9) ملم للأكف الامامية في بعض المعاملات و (3.5) ملم في الاكف الخلفية في معاملات اخرى (بعد 36 ساعة من الحقن).اما عند حقن 0.1 سم^{3} من (LS) لبكتريا.*Bacillus المعزولة* فأظهرت النتيجة ان سمكها وصل اعلى ذروته بعد 36 ساعة حيث وصل الى 2.9 ملم لكل من الاكف الامامية و(4) ملم لكل من الاكف الخلفية في معاملات اخرى.



شكل (3) اكف الفئران المحقونة بمرق نقيع القلب والدماغ المعقم (سيطرة).

شكل (4) اكف الفئران الامامية المحقونة بCFCS لبكتريا *Bacillus sp*. (نتيجة موجبة)

شكل (5) أكف الفئران الخلفية المحقونة ب CFCS لبكتريا *Bacillus sp*. (نتيجة موجبة)

ان نتائج دراستنا جاءت مطابقة لدراسة (Notermans and Batt ,1998) و (Kotiranta et al ,2000) والذي اكد ان السم المسبب للإسهال يسبب السمية الخلوية (cytotoxicity) للخلايا ويسبب موت للفئران كما انه يسبب تراكم السوائل في فحص امعاء الارنب المربوطة في حيوانات التجارب وتقرحات جلدية. كما وصف (Jackson ,1993) فحص

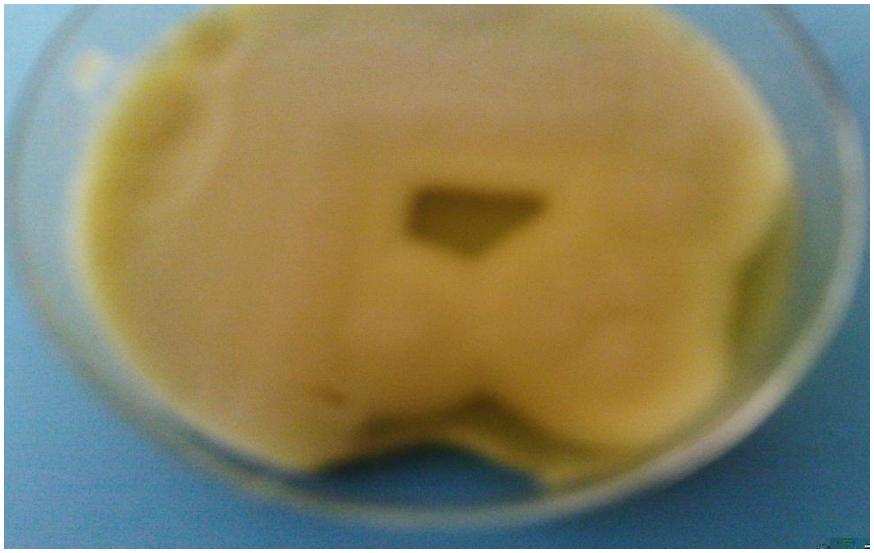
التحري السريع للمزارع النسيجية والتي تستخدم خلايا Mccoy cell الاحادية الطبقة لاكتشاف الانتروتوكسين *Bacillus cereus* في راشح الخلايا النقي Supernatant ولاحظ ان السلالات المنتجة للانتروتوكسين تسبب تدمير متدرج في الخلايا الاحادية الطبقة.

كما لاحظ (Rowan et al ,2001) ان انواع الـ Bacillus المعزولة سريرياً او من الطعام لها القابلية على الالتصاق والغزو (الهجوم) وانتاج التأثيرات السامة في خلايا الانسان من نوع HEP-2- والخلايا الطلائية caco-2 epithelial cell بعد نموها في المنتجات التجارية لطعام الاطفال ومنها حليب الاطفال المعاد تعليقه (IMF). وان هذا الحليب المعاد تعليقه يستخدم كمادة غذائية في هذا الوسط ومثل هذه المنتجات تتلوث تكراراً بأعداد قليلة من سبورات *Bacillus*.[36]

كما تمكن [Beattie and Williams,.1999] من قياس السمية للسائل المرشح من المزرعة البكتيرية (الراشح الخالي من الخلايا CFCS) وذلك باستخدام الفحوصات المناعية ولا حظ ان سلالات *B.cereus* تختلف في كمية التوكسين الذي تنتجه كما ذكر ان هناك انواع اخرى من الباسلس تكون سامة مثل *B.circulans* والـ *B.subtilis* والـ *B.Laterosporus/cereus* و *B.Lentus* والـ *B.Licheniformis* و *B.mycoides* و *B.thuringensis* ولاحظ ان اكثر من نوع واحد للسموم المعوية ربما ينتج من سلالات الباسلس سيريس والسلالات التي تم الكشف فيها عن السمية عزلت من الحليب الخام او من جبن chedder ولاحظ اختلاف كبير في كمية السم المنتج من قبل العزلات المختلفة ايضاً.

فحص انتاج انزيم اللسثنيز وفحص تحلل الدم :

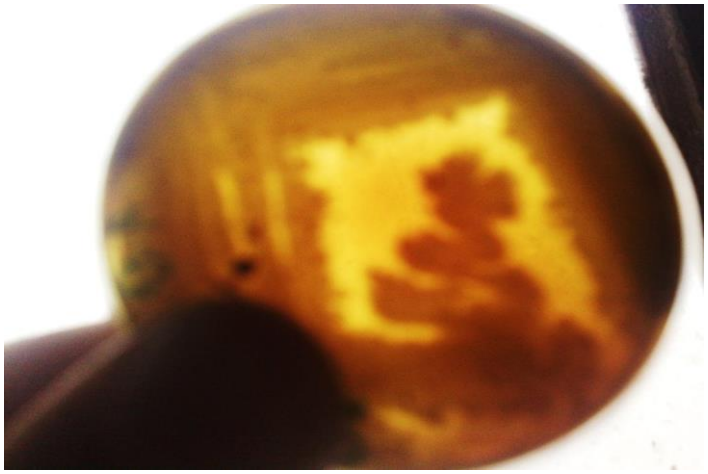
تم فحص قدرة الانواع المعزولة من جرثومة الـ *Bacillus (B.cereus، B.circulans , B.megateriu, B.Laterosporus)* على انتاج انزيم الـ (Lecithinase) وذلك بعد النمو 24 ساعة في وسط الاكار المغذي الاعتيادي المجهز بـ 8% من صفار البيض egg yolk واوضحت النتائج انه فقط الـ *B.cereus* لها القدرة على انتاج انزيم اللسثينز حيث انتجت هالة من الراسب غير الذائب من الداي اسايل كلسيرول in soluble di acyl glycerol حول المستعمرات البكتيرية



شكل (6) النتيجة الموجبة لفحص انتاج انزيم اللسثينز.

اما بقية انواع الـ Bacillus المدروسة فأعطت نتيجة سالبة لهذا الفحص. وجاءت نتائجنا مقاربة لـ [25] و [33] اللذين لاحظوا قدرة B.cereus على انتاج انزيم اللسثينز وتحلل الدم.

اما فيما يخص فحص القدرة على تحلل الدم على وسط blood agar الحاوي على 7% من دم الاغنام فأظهرت النتائج ان جميع انواع ال *Bacillus* المعزولة اظهرت هالة من التحلل الكامل Beta hemolysis كما في الشكل (7).



شكل(7) النتيجة الموجبة لفحص تحلل الدم.

ويعد انتاج انزيم اللسثينز والفوسفولايبيز والبرويتيز والـ enterotoxin والكولاجينيز من عوامل الضراوة المهمة في البكتريا الممرضة وذلك لنجاح الاصابة الجهازية systemic infection [22].

المصادر:

[1] المصلح , رشيد محجوب المصلح. علم الاحياء المجهرية في الاغذية والالبان.مديرية دار الكتب للطباعة والنشر جامعة الموصل. (1981)

[2] Prescott, L.M. Harley, J.P and Klein , D.A. Micobiology. 3rd. (ed.) WMC. Brown communication , Inc., Iowa , USA.(1996)

[3] Bergdoll Ms. clin Microbiol Newslett 3:85-87. (1981).

[4] Terranova W, Blake PA. N Eng L J Med 298:143-144..(1978)

[5] Maine. MMWR. *Bacillus cereus* :centers for Disease Control 35:408-410. (1986*)*

[6] Centers for disease control : CDC Surveillance summaries.CDC surveillance summaries 35, (1986)

[7] Centers for disease control : CDC Surveillance summaries , March . MMWR 39(55-1). (1990)

[8] Kramer JM, Turnbull PCB , Munshig , Gilbert RT. Bacillus cereus and other *Bacillus species*. In Doyle MP (ed): Food borne Bacterical pathogens , PP 21-70. New York, Marcel Dekker . (1989)

[9] Drobeniewski FA. clin Microbiol Rev 6:324-338.. (1993)

[10] Gilbert RJ , Parry JM. JHyg 78:69-74. (1977)

[11] Beattie , S.H., and A.G.Williams. Lett. APPL. Microbiol. 28:221-225. (1999)

[12] Rowan , N. J.,and J. G.Anderson. J. Hosp. infect 38:139-146. (1998)

[13] Macffadin , J. F. m.Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams and Willkins , Baltimore. USA. (1985)

[14] Koneman , E.; Allen , S.;Janda , W.; procop , G.; Schreckenbarger , G.color atlas and textbook of diagnostic microbiology 6th , J. B. Lippincot – Raven publishers philadephia , USA.(2006)

[15] Rahman H , singh VB , Sharma VD and Harne SD. Vet. Microbiol. 31:379-387. (1992)

[16] Mikami , T. , Horikawa , T. Murakami ,T., FEMS Microbiology Letters 119,53-58. (1994)

[17] Plummer TD."An Introduction To Practical Biochemistry". 2nd ed. McGraw –Hill Book Company , U. K. (1978)

[18] Sandefar PD , Peterson JW. Infect. Immun., 14:671. (1976)

[19] Bidawid , S. J. of food production 45 (3):251-255. (2003)

[20] Harne SD , Sharma VD , Rahman H. Indian J.EXP. Biol. 28:1141-1144. (1990)
[21] International Dairy Federation, p. 1-48. Bulletin No. 275. International Dairy Federation , Brussels , Bilgium. 1992
[22] Bacillus cereus Diarheal enterotoxin.Bacteriological Analytical Manual chapter 15. (2001)
[23] Rowan NJ and Anderson JG. APPL. Environ. Microbiol 63(3):1182. (1997)
[24] Beaker , H. G. Schaller , w. Von Wiese and G. Terplan. Int. J. Food Microbiol.23:1-15. (1994)
[25] Rowan NJ , Karen Deans , John G. Anderson , Curtis G. Gemmell , Iain S. Hunter and Thararat Chaithong. APPL. Environ Microbiol. 67 (q):3873. (2001)
[26] Battie , S. H. Incidence and Importance of *Bacillus cereus* species in Raw milk and the Dairy Environment. ph.D Thesis , Glasgow University. (1997)
[27] Baker , J. M., and Griffths W. M .J. Food prot. 58:443-445. 1995
[28] Rowan , N.J. studies on the growth , survival interaction , and detection of potentially pathogenic listeria and *Bacillas spp*. In infant milk formulae ph.D. thesis. University of strathelyde , Glasgow, Scotland. 1996
[29] Kotiranta , A.K. Lounatmaa and M, Haapasalo ,. Microbes Infect. 2 : 189-198. (2000)
[30] Hansen , B. M ; and Handriksen N. B. APPL. Environ. Microbiol. 67:185-189. (2001)
[31] Ryan.A ; J. D. Macmillan and B. A. Zilinkas . J. Bacteriol. 179 :2551-2556. (1997)
[32] Beecher, D. J and Lee Wang A. C, Infection and Immunity , 62, pp.980-986. (1994)
[33] Rowan N. J , Coldow G , Curtis GG and Hunter Z.S. Applied and Environmental Microbiology 69.(4).2372-2376..(2003)
[34] Notermans , S. and, Batt C. A. J. APPL. Microbiol. Symp. Suppl. 84:51s-61s. (1998)
[35] Jacson SG.J clin Microbiol 31:972-974. (1993)
[36] Rowan , N. J ; J. G. Anderson and A. Anderton. J. Food prot. 60:1089-1094. (1997)
[37] Beecher ,D. J. and Macmillan , J. D. Infection and Immunity , 59 , pp. 1778-1784. (1991)