مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (6) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (6) 2014

مقارنة بين طريقة التشتت الضوئي الليزري والطّرائق التّقليدية في تمييز بعض الأنواع البكتيرية التابعة للجنسين *Campylobacter* و *Staphylococcus* المعزولة من الأغذية

الدكتور عبد الحكيم عزيزية*
الدكتورة لينة الأمير**
رضوان بدر الدين***

(تاريخ الإيداع 26 / 5 / 2014. قبل للنشر في 10 / 11 / 2014)

□ ملخّص □

تعدُّ البكتريا التابعة للجنس *Campylobacter* مسبباً رئيسياً للأمراض المنقولة عن طريق الغذاء، في الدول المتقدمة والنامية على حدٍّ سواء، إذ تعدُّ مسبباً رئيسياً لحدوث الإسهال والتهاب المعدة والأمعاء، كما تعدُّ البكتريا التابعة للجنس *Staphylococcus*وبخاصة النوع*S. Aureus* مسبباً رئيسياً للتسمم؛ بسبب قدرته على إنتاج السم المعوي.

تحتاج الطرائق التقليدية المستخدمة في تمييز أنواع البكتريا إلى وقت طويل للحصول على النتائج، كما أنها مجهدة، ومكلفة من الناحية الاقتصادية، لذلك فمن الضروري تطوير تقنيات جديدة تتميز بالدقة والسرعة في الحصول على النتائج وانخفاض التكاليف من بين هذه الطرائق طريقة تشتت الضوء الليزري.

تمّ الحصول على 13 عزلة من البكتريا التابعة للجنس *Campylobacter* و22 عزلة تابعة للجنس *Staphylococcus* من مصادر غذائية مختلفة. واستخدمت الطرائق التقليدية المعتمدة على الاختبارات البيوكيميائية في تمييز الأنواع المعزولة، كما درست إمكانية استخدام تقنية تشتت الضوء الليزري في تمييز العزلات السابقة.

وجد أن تقنية تشتت الضوء الليزري قادرة على تمييز كافة العزلات التي تمّ الحصول عليها بدقة عالية وبسرعة في الحصول على النتائج، وبتكلفة منخفضة، إذ يمكن استخدامها كبديل محتمل للطرائق التقليدية في تحديد هذه البكتريا.

الكلمات المفتاحية: *Campylobacter*، *Staphylococcus*، طريقة تشتت الضوء الليزري، الطرائق التقليدية.

* أستاذ –قسم علوم الأغذية –كلية الزراعة –جامعة دمشق– سورية
** أستاذ مساعد– الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق– سورية.
*** طالب دراسات عليا (دكتوراه)–الهيئة العامة للتقانة الحيوية– دمشق– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) العدد (6) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (36) No. (6) 2014

Comparison between laser light-scattering method and traditional methods in identifying some *Campylobacter* and *Staphylococcus* isolates from foods

Dr. Abd Alhakem Azizieh[*]
Dr. Liana Al-Amir[**]
Rodoan Badr Al-Deen[***]

(Received 26 / 5 / 2014. Accepted 10 / 11 /2014)

□ ABSTRACT □

Species of the genus *Campylobacter*are recognized as the main cause of foodborne disease in both developing and developed countries. They are main causative of diarrhea and gastroenteritis worldwide. *Staphylococcus* bacteria especially *S. aureus* are responsible of food poisoning due to their ability to produce enterotoxins.

Traditional methods which are used to identify bacteria are time-consuming and labor intensive and very expensive.

Thirteen isolates of *Campylobacter* and twenty-two isolates of *Staphylococcus* were isolated from a variety of foods. Traditional methods based on biochemical tests were used for identification in addition to laser light-scattering technique to discriminate isolates.

Laser light-scattering technique showed the ability to distinguish all isolate in high accuracy, rapid and low costs manner, thus it may represent a potential alternative to traditional methods to identify these bacteria.

So it is a very important issue to find new alternative methods characterized by high accuracy, low costs and rapidity in results achievement, to replace traditional methods, thus laser light-scattering may be a possible alternative.

Key words: Campylobacter, Staphylococcus, identification, laser light-scattering, traditional methods.

[*]**Professor, Department of Food Science, Agriculture Faculty, Damascus University, Syria**
[**]**Assistant Professor, National Commission for Biotechnology, Damascus , Syria**
[***]**Postgraduate student, National Commission for Biotechnology, Damascus , Syria**

مقدمة:

تعدُّ البكتيريا الممرضة المنقولة عن طريق الأغذية سبباً أساسياً للأمراض أو الوفيات، وهناك تطوير مستمر لطرائق سريعة وموثوقة للكشف عن هذه البكتيريا. إن تقدم التقانة الحيوية استبدلت طرائق الاختبار التقليدية، وأدى إلى تطور في مجالات التقانات المناعية والبيولوجيا الجزيئية الحيوية والأتمتة الحاسوبية وإيجاد طرائق أسهل وأسرع وأكثر حساسية في مجال ميكروبيولوجيا الغذاء (Mandal*et al*., 2011).

تعتمد الطرائق التقليدية لفحص البكتيريا على الأوساط الانتقائية لعد وعزل الخلايا البكتيرية النشطة (Doyle, 2001). تعتمد الطرائق التقليدية لتحري البكتيريا الموجودة في الغذاء على المراحل الأربع الآتية: الإغناء الأولي، الإغناء الانتقائي، الزرع على أطباق انتقائية، المسح الكيمياحيوي والتحقق المصلي (Vunrcrzant and Pllustoesser, 1987). تحتاج هذه الطرائق التقليدية إلى عدة أيام لإعطاء النتائج ، لأنها تعتمد على قابلية الكائن الحي الدقيق للتضاعف لإعطاء مستعمرات مرئية (Biswas, 2005) ، كما تحتاج إلى سلسلة من الاختبارات قبل أن يتمَّ التحديد (Invitski*et al*., 1999). علاوة على ذلك يعد تحضير الأوساط وتلقيحها وعد المستعمرات من الطرائق المجهدة. تحتاج الطرائق التقليدية لعدة أيام لإكمال تحديد البكتيريا الممرضة، وأن كلَّ تعديلٍ يؤدي إلى تقليل الزمن يمكن أن يُدعى طريقة سريعة من الناحية التقنية (Mandal*et al*., 2011).

تتميز بكتريا *Staphylococcus aureus* بأنها بكتريا ممرضة انتهازية واسعة الانتشار يمكن أن تسبب الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء، وتوجد أحياناً في الحليب الطازج ومنتجات الأجبان المصنوعة من الحليب الطازج، وتحتاج الطرائق التقليدية المستخدمة في تشخيص أنواع بكتريا *Staphylococcus* إلى وقت طويل وإلى عدد كبير من الاختبارات (Lamprell*et al*., 2006). وتعدُّ بكتريا *S. aureus* ثاني أكبر مسبب للأمراض المنقولة عن طريق الغذاء في أوروبا (De Buyser*et al*., 2001)، كما تعدُّ الأجبان الملوثة ببكتريا *Staphylococcus* وخاصة النوع *S. aureus* مسؤولة عن انتشار التسمم الغذائي؛ بسبب إنتاجها السم المعوي (enterotoxin) (Le Loir *et al*., 2003).

صنفت بعض الدراسات الحديثة بكتريا النوع *S. haemolyticus* كمسبب للعدوى الشديدة التي تشمل التهاب السحايا، التهاب الجلد والأنسجة الرخوة وتجرثم الدم (Falcone *et al*., 2006)

تعدُّ طريقة الكشف البكتيري السريع باستخدام تقنية التشتت الضوئي (Bacterial Rapid Detection using Optical scatter technology) التي تعرف اختصاراً باسم BARDOT طريقةً غير تدميرية خاليةً من الوسم (marker-free)، تستخدم حزمة ضوئية ليزرية بطول موجة 635 نانو متر تمرُّ من خلال مركز المستعمرة، وتشكّل بصمة فريدة يمكن أن تستخدم في كشف وتمييز البكتريا(Banada *et al*., 2009؛ Bae*et al*., 2008)، تضمن هذه التقنية الضوئية سلامة المستعمرة وقابليتها للاستخدام في الاختبارات اللاحقة، وأثبت أن هذه التقنية تمكن من تمييز بكتريا *Escherichia* و*Listeria* و*Salmonella* و*Staphylococcus*و*Vibrio* على مستوى الجنس بدقة تصل إلى 90-99 % (Bayraktar*et al*., 2006؛Banada*et al*., 2007)، كما استخدمت هذه التقنية في تمييز بكتريا *Listeria monocytogenes* على أطباق الأغار الحاوية على البكتريا المثبتة والمركزة سابقاً باستخدام الخرزات المغناطيسية (Koo *et al*., 2011). أمّا حالياً فتستخدم تقنية BARDOT للكشف عن العديد من الأنواع الممرضة التابعة للجنس *Vibrio* التي تضمُّ *Vibrio parahaemolyticus*و*V. vulnificus* و *V. cholerae* في عينات المحار والماء (Huff *et al*., 2012)، كما استخدمت في تحديد سلالات البكتريا التابعة للنوع *Salomellaenterica* (Singh *et al*., 2014).

وبكتريا *Campylobacter* عصياتٌ سالبة غرام متحركة أسطوانيةٌ أو حلزونية الشّكل، تبدو بشكل شبيه بالضمة، وهي محبّةٌ للأوكسجين القليل (microaerophilic)، إذ تنمو أفضل في الوسط الهوائي بوجود 5-10% أكسجين و10% ثنائي أكسيد الكربون و85% نتروجين (Sallam, 2006). وعلى الرغم من كون العديد من الأنواع الحيوانية مضيفة لبكتريا *Campylobacter* في قناتها الهضمية إلا أن الطيور البرية والدواجن تعدّ المصادر الأكثر أهمية واحتمالاً لوجود هذه البكتريا، ودرجة حرارة أجسامها هي الحرارة المثلى لنمو بكتريا *C. jejuni* و *C. coli* (Adams and Moss, 2000). سجلت المستويات العالية من عزلات بكتريا *Campylobacter* من الفروج الموزع بالتجزئة في البلدان المتقدمة والنامية، على حدٍّ سواء (Eyigor*et al*., 1999; Sallam, 2001; Tokumaru*et al*., 1991).

وتعدّ بكتريا *Campylobacterjejuni* مسبباً رئيسياً للإسهال والتهاب المعدة والأمعاء المنقول عن طريق الغذاء، على مستوى العالم، وفي أغلب الحالات لا تبدي الطيور البرية أو الحيوانات الداجنة الحاملة للمرض أية أعراض، لكنها يمكن أن تكتسب مناعة بعد العدوى ببكتريا *C. jejuni*. تستطيع هذه البكتريا أن تدخل إلى الوسط عن طريق مياه الشرب أو التلوث بمياه الصرف الصحي أو الحيوانات المصابة أو البشر المصابين، وإن استهلاك الأغذية أو المياه الملوثة بالفضلات البشرية أو الحيوانية غير المعالجة مسؤول عن 70% من إصابات *C. jejuni* (Gong and Liu, 2004). تكون العدوى حادة، عادة، وتزول تلقائياً بعد فترة 3-5 أيام من التهاب الأمعاء والألم البطني. تتراوح الأعراض السريرية للعدوى ببكتريا *C. jejuni* من الإسهال المائي المتوسط إلى المرض الشبيه بالزحار ذو البراز الدموي (Ertas*et al*., 2004). لكن يمكن أن تحدث مضاعفات مثل، التهاب القناة البولية، فضلاً عن ذلك فإن بكتريا *Campylobacter* عاملٌ أساسيٌّ لظهور أعراض متلازمةGuillain، وهو السبب الرئيسي الشائع لحدوث الشلل الحاد عند الأطفال والكبار، على حد سواء (Gong and Liu, 2004).

تتضمن مصادر العدوى ببكتريا *C. jejuni* الحليب غير المبستر، التلامس مع الحيوانات الأليفة مثل الكلاب والقطط وتداول منتجات اللحوم غير المطبوخة الملوثة ببكتريا *Campylobacter*. تعدّ الدواجن ومنتجات الدواجن المصدر الرئيسي، وتلعب دوراً مهماً في انتقالها، ووجد أن 30-40% من منتجات الدواجن في الدنمارك ملوثة على مستوى تجارة التجزئة ببكتريا *C. jejuni* (Sahin*et al*., 2003) وأن هذه الظاهرة أكثر انتشاراً في البلدان النامية (Liu *et al*., 2006).

إن الجرعة الممرضة لبكتريا *C. jejuni* صغيرة جداً، ويقدر بأن عدداً قليلاً من الخلايا لا يتجاوز 500 خلية يمكن أن تسبب المرض للبشر. وهذا يعني أن عدداً قليلاً جداً من خلايا *C. jejuni* في الماء أو الغذاء تمثل خطراً محتملاً على الصحة. لذلك هناك حاجة ماسة لطرائق حساسة للكشف عن بكتريا *C. jejuni* في الغذاء والماء (Liu *et al*., 2006).

يوجد، لسوء الحظ، العديد من المشاكل عديدة المرتبطة بالكشف عن خلايا *C. jejuni* في الغذاء والدواء باستخدام الطرائق الزرعية ، والصعوبتان الأكثر أهمية هما: الأعداد القليلة ومعدل النمو البطيء. والطرائق التقليدية المستخدمة حالياً مجهدة وتحتاج إلى وقت طويل وفترة تحضين طويلة (1-2 يوم) وإغناء انتقائي لتقليل نمو الفلورا المرافقة ويليه التحديد البيوكيميائي، وعلاوة على ذلك يمكن أن تدخل بكتريا *C. jejuni* في وضعيات تكون فيها حية، ولكنها غير قابلة للزرع؛ نتيجة للإجهاد الفيزيائي وضعف التغذية (Waage*et al*., 1999).

أهمية البحث وأهدافه:

تعدُّ البكتريا التابعة للجنسين *Staphylococcus* و *Campylobacter* من أهمِّ البكتريا المسببة للأمراض المنقولة عن طريق الغذاء، وهناك صعوبة في تحديدها بالطرائق التقليدية؛ لأنها تحتاج إلى فترة زمنية طويلة لإعطاء النتائج، ولكونها مكلفة لأنها تحتاج إلى العديد من الاختبارات البيوكيمائية والأوساط والكواشف باهظة الثمن، لذلك نجد حاجةً ماسةً لتطوير طرائق سريعة ودقيقة ورخيصة الكلفة، ومن بين هذه الطرائق طريقة التشتت الضوئي الليزري. لذلك هدف هذا البحث إلى تقييم كفاءة الطريقة السابقة في تحديد عزلات البكتريا التابعة للجنسين *Staphylococcus* و *Campylobacter* المعزولة من بعض أنواع الأغذية المحلية لمدينة دمشق وريفها.

طرائق البحث و مواده:

تمّ الحصول على22 عزلة لبكتريا *Staphylococcus* و13 عزلة لبكتريا *Campylobacter* من مصادر مختلفة (لحوم حمراء، دجاج، حليب طازج،الجبن واللبنة) في مدينة دمشق وريفها.

- **عزل بكتريا *Campylobacter***

تمّ عزل بكتريا *Campylobacter* وفق المواصفة القياسية السورية رقم 3455 لعام 2009 (طريقة التحري عن جراثيم *Campylobacter*)، وذلك بأخذ 25 غ (مل) من العينة وإضافة 225 مل من وسط مرق Bolton. جنست العينة جيداً، وحضن المعلق في جوٍّ قليل الهواء (microaerophilic)؛ وذلك باستخدام دورق مزود بغطاء حلزوني محكم الإغلاق مع ترك فراغ هوائي صغير، وحضن المعلق لمدة 4ساعات بحرارة 37° م، ثم لمدة44 ساعة بحرارة 41.5 ° م.

نقلت حمولة عروة التلقيح وخططت على طبق Modified charcoal cefoperazonedeoxycholate agar(mCCD) أغار (مستخلص اللحم 10 غ، نسيج حيواني مهضوم أنزيمياً 10 غ، كلوريد الصوديوم 5 غ، فحم نباتي 4 غ، كازين مهضوم أنزيمياً 3 غ، sodium deoxycholate 1 غ، كبريتات الحديدي 0.25 غ، بيروفات الصوديوم 0.25 غ، أغار 18 غ، ماء مقطر 1000 مل، pH=7.4)، وحضنت الأطباق في جو قليل الهواء (وذلك باستخدام الأكياس اللاهوائية وظروف GENbagmicroaer، bioMérieux، l'Etoile، France)، لمدة 44 ساعة بحرارة 41.5 ° م.

- **عزل بكتريا Staphylococcus**

عُزلت بكتريا *Staphylococcus* وفقاً لطريقة FDA (2001)، وذلك بتحضير تخفيفات من 10^{-1} وحتى 10^{-5} باستخدام المحلول الملحي المكون من الماء المقطر المضاف إليه كلوريد الصوديوم بنسبة 0.85 %. تم توزيع 1مل من كل تخفيف على ثلاثة أطباق (نقل0.4 مل إلى الطبق الأول و0.3 مل لكل من الطبقين الثاني والثالث) من وسطBaird-Parker agar ، ونشرت على سطح الأطباق باستخدام قضيب زجاجي معقوف وتركت الأطباق حتى تجف لمدة 10 دقائق، وحضنت الأطباق لمدة 48 ساعة بحرارة 35 ° م.

تمّ تحديد العزلات التابعة للجنسين *Campylobacter* و *Staphylococcus* باختبارات صبغة غرام (Benson, 2001) ثم باستخدام دليل بيرجي للتصنيف (Whitman, 2009)، وفق الاختبارات الآتية:

-بكتريا *Campylobacter:* صبغة غرام، القدرة على إنتاج أنزيمات كتالاز، أكسيداز، اليورياز، ل-أسبارتات أريلأميداز ؛اختبار فوغس-بروسكاور، إرجاع النترات، حلمأة الهيبورات وأسيتات الأندوكسيل، إرجاع السيلينيت و تري فينيل تترازوليوم كلورايد، إنتاج غاز H_2S، الحساسية لحمض ناليديكسيك و إريثرومايسين وسيفالوثين الصوديوم؛ القدرة على تمثيل سكسونات الصوديوم، البروبيونات والمالات.

-بكتريا *Staphlococcus*: صبغة غرام، إنتاج أنزيم اليورياز، إرجاع النترات، إنتاج أنزيم الأوكسيداز، إنتاج أنزيم أرجنين ديهايدرولاز، إنتاج أنزيم β-غلوكوزيداز، اختبار فوغس-بريسكاور، إنتاج أنزيم الفوسفاتاز القلوي، تمثيل د-غلوكوز، القدرة على إنتاج الأحماض من سكريات أرابينوز، سلوبيوز، فركتوز، فوكوز، غالاكتوز، لاكتوز، مالتوز، مانيتول، مانوز، رافينوز، ساليسين، سكروز، تريهالوز، كزيليتول و د-كزيلوز.

- استخدم جهاز التشتت الضوئي الليزري المكون من مصدر لضوء الليزر بطول موجة 635 نانو متر والمزود بكاميرا من النوع Cable Charged Detector (CCD) متصلة بحاسوب مع برنامج PhotoImpression 5 لتخزين ومعالجة الصور الناتجة، وساحة متحركة على مستوى ثلاثي الأبعاد (عمودي: لضبط المسافة بين المصدر الضوئي وطبق البتري بمسافة 10 سم والمسافة بين الطبق وسطح استقبال صورة التشتت الضوئي بمقدار 20 سم، وأفقي باتجاهين جانبي وأمامي خلفي: لتركيز حزمة ضوء الليزر على مركز المستعمرة) (Banada*et al.*, 2007).

النتائج والمناقشة:

المصادر الغذائية لعزلات بكتريا الجنسين *Staphylococcus* و *Campylobacter*

تمَّ عزل بكتريا التابعة للجنس *Staphylococcus* وهي ثلاثة أنواع (*S. aureus*، *S.haemolyticus* و*S. hominis*) والبكتريا التابعة للجنس *Campylobacter* وهي نوعان (*C. jejuni* و*C. coli*) من مصادر غذائية مختلفة شملت: اللحوم الحمراء ولحوم الدواجن والحليب الطازج والجبن واللبنة، والجدول 1 يوضح مصادر العزلات التي تمَّ الحصول عليها.

جدول 1 مصادر العزلات التابعة للجنسين *Staphylococcus* و*Campylobacter*

نوع البكتريا	المصدر				
	لحوم حمراء	لحوم دواجن	حليب خام	جبن	لبنة
S. aureus	4	6	1	3	4
S.haemolyticus	2	2	-	2	1
S. hominis	2	4	-	1	1
C. jejuni	2	4	1	-	-
C. coli	1	3	2	-	-

نتائج الزّرع على أوساط انتقائية:

ظهرت بكتريا *Staphylococcus aureus* دائرية، ناعمة، محدبة، رطبة، بقطر 2-3 مم بلون رمادي إلى أسود داكن مع حواف بيضاء ضاربة إلى الصفرة محاطة بمنطقة غير شفافة، في حين شكلت بكتريا

Campylobacter على وسط mCCD agar مستعمرات بلون رمادي مع لمعان معدني ذات سطح مستو وتميل إلى الانتشار.

نتائج الاختبارات البيوكيميائية:

-بكتريا *Campylobacter*:

أثبتت نتائج الاختبارات البيوكيميائية أن عزلات البكتريا التي تتبع الجنس *Campylobacter* التي تمَّ الحصول عليها من الأغذية المختلفة تنتمي إلى النوعين *C. jejuni* و*C. Coli*، وذلك استناداً إلى الاختبارات المبينة في الجدول (2).

جدول (2)نتائج الاختبارات البيوكيميائية للأنواع التابعة للنوعين *C. jejuni* و*C. coli*

الاختبار	*Campylobacter jejuni*	*Campylobacter coli*
صبغة غرام	عصيات سالبة غرام منحنية	عصيات سالبة غرام منحنية
اختبار إنتاج أنزيم كتالاز	+*	+
اختبار إنتاج أنزيم أكسيداز	+	+
اختبار فوغس-بروسكاور	-**	-
إرجاع النترات	+	+
حلمأة الهيبورات	+	-
إنتاج أنزيم اليورياز	-	-
حلمأة أسيتات الأندوكسيل	+	+
إرجاع السيلينيت	+	-
إنتاج غاز H_2S	-	-
إرجاع تري فينيل تترازوليوم كلورايد	+	+
النمو بوجود حمض ناليديكسيك	-	+
النمو بوجود إريثرومايسين	-	+
إنتاج أنزيم ل-أسبارتات أريلأميداز	-	-
تمثيل سكسونات الصوديوم	+	+
النمو بوجود سيفالوثين الصوديوم	+	+
تميثل البروبيونات	-	+
تمثيل المالات	-	+

*+ وجود نمو/اختبار موجب

**- غياب النمو/اختبار سالب

-بكتريا *Staphylococcus*:

أثبتت نتائج الاختبارات البيوكيميائية أن عزلات البكتريا التابعة للجنس ***Staphylococcus*** التي تم الحصول عليها تنتمي إلى ثلاثة أنواع هي: *S. aureus* و*S. haemolyticus*و*S. hominis* ويبين الجدول (3) نتائج هذه الاختبارات البيوكيميائية.

جدول (3) نتائج الاختبارات البيوكيميائية للأنواع التابعة للجنس *Staphylococcus*

الاختبار	*Staph. aureus*	*Staph. haemolyticus*	*Staph. hominis*
صبغة غرام	مكورات موجبة	مكورات موجبة	مكورات موجبة
إنتاج أنزيم اليورياز	+*	−	+
إنتاج أنزيم الأوكسيداز	−**	−	−
إرجاع النترات	+	+	+
إنتاج أنزيم أرجنين ديهايدرولاز	+	+	−
إنتاج أنزيم β−غلوكوزيداز	+	+	−
اختبار فوغس−بريسكاور	+	−	−
إنتاج أنزيم الفوسفاتاز القلوي	+	−	−
تمثيل د−غلوكوز	+	+	+
إنتاج الحمض من أرابينوز	−	−	−
إنتاج الحمض من سلوبيوز	−	−	−
إنتاج الحمض من فركتوز	+	+	+
إنتاج الحمض من فوكوز	−	−	−
إنتاج الحمض من غالاكتوز	+	+	+
إنتاج الحمض من لاكتوز	+	+	−
إنتاج الحمض من مالتوز	+	+	+
إنتاج الحمض من مانيتول	+	−	−
إنتاج الحمض من مانوز	+	−	−
إنتاج الحمض من رافينوز	−	−	−
إنتاج الحمض من ساليسين	−	−	−
إنتاج الحمض من سكروز	+	+	+
إنتاج الحمض من تريهالوز	+	+	+
إنتاج الحمض من كزيليتول	−	−	−
إنتاج الحمض من د−كزيلوز	−	−	−
* + وجود نمو/اختبار موجب ** − غياب النمو/اختبار سالب			

يبين الجدول (2) نتائج الاختبارات البيوكيميائية للنوعين التابعين للجنس *Campylobacter* وهما *C. jejuni* و *C. coli*، إذ وجد أن العزلات التابعة للنوعين هي عصيات سالبة غرام منحنية قادرة على إنتاج أنزيمي كاتالاز وأكسيداز، ولها القدرة على إرجاع النترات ومركب تري فينيل تترازوليوم كلورايد، وتمثيل سكسونات الصوديوم وحلمأة أسيتات الأندوكسيل، كما أنها مقاومة لمركب سيفالوثين الصوديوم.

وجد أن كلاً من النوعين *C. jejuni* و *C. coli* سالبان لاختبار فوغس–بروسكاور، وغير قادرين على إنتاج أنزيمي ل–أسبارتات أريلأميداز و اليورياز ، وكذلك غير قادرين على إنتاج غاز H_2S.

ويمكن تمييز النوعين *C. jejuni* و *C. coli* عن بعضهما بعض بقدرة النوع الأول على حلمأة الهيبورات وإرجاع السيلينيت بعكس النوع الأخير. بينما يمتاز النوع *C. coli* بمقاومته لإريثرومايسين وحمض ناليديكسيك وقدرته على تمثيل المالات والبروبيونات على النقيض من النوع *C. jejuni*.

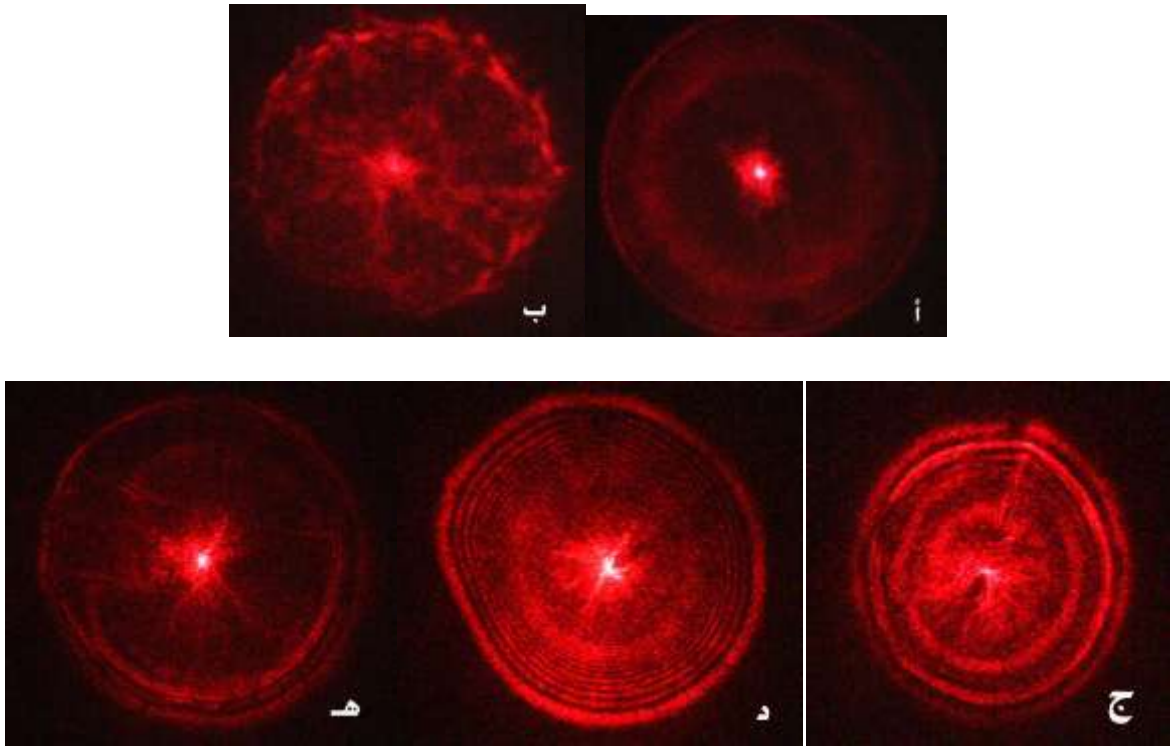
يلاحظ من الجدول (3) بأن الأنواع التابعة للجنس *Staphylococcus* تشابهت في كونها جميعاً مكورات موجبة غرام، سالبة الأكسيداز، وبأنها قادرة على إرجاع النترات، وتمثيل سكر د–غلوكوز وإنتاج الأحماض من سكريات فركتوز وغالاكتوز وسكروز ومالتوز وتريهالوز، وعدم قدرتها على إنتاج الأحماض من سكريات أرابينوزوسيلوبيوزوفوكوز، رافينوز وساليسينوكزيليتول و د–كزيلوز.

وجد أن بكتريا النوع *S. aureus* تختلف عن النوعين *S. haemolyticus* و *S. hominis* بإيجابية اختبار فوغس–بريسكاور وقدرتها على إنتاج أنزيم الفوسفتاز القلوي، كما انفردت بقدرتها على إنتاج الأحماض من سكري مانيتول ومانوز، في حين اشتركت مع بكتريا النوع *S. haemolyticus* في قدرتها على إنتاج الحمض من سكر لاكتوز وإنتاج أنزيمي أرجنين ديهايدرولاز و β–غلوكوزيداز، وتشابهت مع بكتريا النوع *S. hominis* في قدرتها على إنتاج أنزيم يورياز.

تميزت بكتريا النوع *S. haemolyticus* بعدم قدرتها على إنتاج أنزيم يورياز عند مقارنتها ببكتريا النوعين *S. aureus* و*S. hominis*، وبالمقابل فإن بكتريا النوع *S. hominis* غير قادرة على إنتاج الحمض من سكر لاكتوز بعكس النوعين *S. aureus* و*S. haemolyticus*.

–نتائج التمييز باستخدام تقنية التشتت الضوئي الليزري

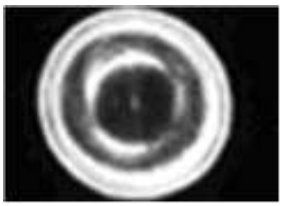
زرعت المستعمرات النقية على وسط Luria Birtani Broth (LB) بدرجة حرارة 37 ° م لمدة 24 ساعة. حضرت تخفيفات من 10^{-1} إلى 10^{-5} من معلق البكتريا لكل عزلة تابعة للجنس *Campylobacter* و *Staphylococcus*، ثم أخذت كمية 5 µL من كل تخفيف وزرعت على أطباق بتري حاوية على وسط Luria Birtani agar (LBA) (المكون من التركيب السابق ذاته لوسط LB والمضاف إليه 15 غ أغار، pH=7.3) ووزعت على سطح الأطباق باستخدام الناشر الزجاجي. جفف الطبق لمدة 10 دقائق، وحضنت الأطباق بحرارة 37°م في جو قليل الأوكسجين بالنسبة لبكتريا الجنس *Campylobacter* وفي شروط هوائية بالنسبة لبكتريا الجنس *Staphylococcus* حتى أصبح قطر المستعمرات بحدود 1–1.5 مم. اختيرت الأطباق التي تحتوي على مستعمرات متباعدة ذات شكل نموذجي للحصول على أطياف التشتت الضوئي الليزري، إذ شكلت مستعمرات كل نوع من الأنواع الخمسة المختبرة في هذا البحث التابعة للجنسين *Campylobacter*و*Staphylococcus* بصمة فريدة يمكن من خلالها تمييز الأنواع *C. jejuni* و*C. coli*، *S. aureus* و*S. haemolyticus* و*S. hominis* عن بعضها بسهولة ودقة عالية. ويوضح الشكل (1) يوضح أنماط التشتت الضوئي الليزري للأنواع الخمسة المدروسة



شكل (1) صور التشتت الضوئي التي تم الحصول عليها في البحث الحالي لأنواع البكتريا: أ-*Campylobacter jejuni*، ب-*Campylobacter coli* ج-*Staphylococcus aureus*، د-*Staph. haemolyticus* و هـ- *Staph. hominis*

يلاحظ من الشكل 1-أ- أن صورة التشتت الضوئي الليزري التي تمّ الحصول عليها في هذا البحث لبكتريا *C. jejuni* تتكون من قرص دائري مضيء في المركز يليه حلقة دائرية مظلمة تمتد حتى ثلثي الطيف المتشكل، ثم حلقة دائرية مضيئة عريضة ومجموعة دوائر مضيئة تفصل بينها مسافات مظلمة مساوية لها في العرض، ثم دائرة مظلمة، وأخيراً دائرة محيطية مضيئة أقل عرضاً، ولا توجد أية مراجع تحتوي صورة التشتت الضوئي الليزري لهذا النوع من أجل المقارنة، أمّا طيف التشتت الضوئي الليزري لبكتريا النوع *C. coli* (الشكل 1-ب) فيلاحظ فيه دوائر مضيئة شعاعية الشكل متحدة المركز، ولا توجد كذلك أية مراجع تعرض صورة التشتت الضوئي الليزري لهذا النوع من أجل المقارنة.

أمّا بالنسبة للبكتريا التابعة للجنس *Staphylococcus*، يبين الشكل 1-ج الخاص بصورة التشتت الضوئي للنوع *S. aureus* لوحظ وجود قرص دائري مركزي مضيء يليه حلقة دائرية مظلمة تمتد إلى ثلثي الطيف تقريباً، يليها حلقة دائرة مضيئة عريضة ثم حلقة دائرية مظلمة، وأخيراً حلقة دائرية مضيئة، والطيف الذي تمّ الحصول في البحث الحالي يشابه، إلى حدٍّ كبير، ذلك الطيف المسجل من قبل Bhunia وآخرين (2006) المبين في الشكل 2.



شكل 2 صورة التشتت الضوئي لبكتريا *S. aureus* (عن Bhunia وآخرون، 2006)

يبيّن الشكل (1–د) أن طيف التشتت الضوئي الليزري لبكتريا *S. haemolyticus* يتكون من قرص دائري مركزي مضيء، يليه حلقة دائرية مظلمة، تمتد حتى منتصف الطيف تقريباً، يليها مجموعة حلقات دائرية ضيقة متقاربة يليها حلقات دائرية متباعدة باتجاه أطراف الطيف، وأخيراً حلقة دائرية عريضة في الناحية الخارجية للطيف، ولا توجد أية مراجع تبين شكل طيف التشتت الضوئي لبكتريا *S. haemolyticus* من أجل المقارنة.

يتكون طيف التشتت الضوئي الليزري لبكتريا *S. hominis* (الشكل 1–هـ) من قرص دائري مركزي مضيء صغير يليه منطقة مظلمة تمتد حتى ثلاثة أرباع الطيف تقريباً، ثم حلقات مضيئة متناوبة مع حلقات مظلمة مساوية لها في العرض، ثم حلقة دائرية مظلمة عريضة يليها حلقة دائرية مضيئة مساوية في العرض، وأخيراً حلقة دائرية عريضة تحيط بالطيف، ولا توجد أية دراسة سابقة تبين شكل طيف التشتت الضوئي الليزري للنوع السابق.

الاستنتاجات والتوصيات:

- شملت البكتريا المعزولة من الأغذية التابعة للجنس*Campylobacter*النوعين *C. jejuni* و *C. coli* ، أمّا البكتريا التابعة للجنس *Staphylococcus* فتضمنت ثلاثة أنواع هي: *S. aureus*، *S. haemolyticus* و*S. Hominis*.
- يمكن استخدام طريقة تشتت الضوء الليزري في تمييز النوعين *C. jejuni* و *C. coli* التابعين للجنس *Campylobacter* والأنواع الثلاثة المدروسة في هذا البحث التابعة للجنس *Staphylococcus* وهي: *S. aureus*، *S. haemolytics* و*S. hominis* كبديل عن الطرائق التقليدية المعتمدة على الاختبارات البيوكيميائية لكونها مجهدة وتحتاج إلى فترة زمنية طويلة للحصول على النتائج.
- فضلاً عن الدقة العالية والسرعة في الحصول على النتائج تمتاز طريقة تشتت الضوء الليزري بأنها تقنية غير تدميرية (أي أن المستعمرة المدروسة لا تتأثر بالاختبار ويمكن استخدامها في الاختبارات اللاحقة) بعكس الاختبارات التقليدية والتقنيات الأخرى كالتقنيات المعتمدة على الـ DNA، كما أنها قليلة الكلفة؛ لأنها لا تحتاج إلى أية كواشف أو أوساط خاصة (باستثناء الوسط المستخدم في الحصول على المستعمرات النقية).
- يُقترح إجراء دراسات تتضمن تمييز أنواع البكتريا بطريقة التشتت الضوئي الليزري لأنواع البكتريا الهامة في مجال الأغذية التي غير المشمولة في هذا البحث.
- دراسة تأثير شروط النمو على أطياف التشتت الضوئي للبكتريا الهامة في مجال الأغذية.

المراجع:

المواصفة القياسية السورية رقم 3455، 2009*طريقة التحري عن جراثيم العطيفة (الكمبيلوبكتر)*. الهيئة العامة للمواصفات والمقاييس العربية السورية.

ADAMS, M. R.;MOSS, M. O. 2000,*Food microbiology*. 2nd ed.,Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 194–199

BAE, E.; BANADA, P.P.;HUFF, K.;BHUNIA, A.K;ROBINSON, J.P;HIRLEMAN, E.D.2008,*Analysis of time-resolved scattering from macroscale bacterial colonies*. J. Biomed. Opt. VOL.13,014010. http://dx.doi.org/10.1117/1.2830655.

BANADA, P.P.;GUO, S.;BAYRAKTAR, B.;BAE, E.;RAJWA, B.;ROBINSON, J.P.;HIRLEMAN, E.D.;BHUNIA, A.K. 2007. *Optical forward-scattering for detection of Listeria monocytogenes and other Listeria species*. Biosens. Bioelectron, VOL. 22,1664–1671. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.07.028.

BANADA, P.P.;HUFF, K.;BAE, E.;RAJWA, B.;AROONNUAL, A.;BAYRAKTAR, B.;ADIL, A.;ROBINSON, J.P.;HIRLEMAN, E.D.;BHUNIA, A.K. 2009,*Label-free detection of multiple bacterial pathogens using light-scattering sensor*. Biosens. Bioelectron.Vol. 24, 1685–1692. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.053.

BAYRAKTAR, B.;BANADA, P.P.;HIRLEMAN, E.D.;BHUNIA, A.K.;ROBINSON, J.P.;RAJWA, B. 2006,*Feature extraction from light-scatter patterns of Listeria colonies for identification and classification*. J. Biomed. Opt., Vol. 11,34006. http://dx.doi.org/10.1117/1.2203987.

BENSON, H.J.2001,*Microbiological applications laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. The McGraw-Hill. 64-68.

BHUNIA, A.K.; ROBINSON, J.P.; RAJWA, B. 2006, *O. HTTP://WWW.INDABOOK.ORG/PREVIEW/GS7R7R3QNORX_AQOY-TCWL-R7ABOUTYSSO6NQX3OVCK,/BHUNIA-TALK-3-LIGHT-SCATTERING-PURDUE-UNIVERSITY.HTML?QUERY=CFSE*

BISWAS, A.K.2005,*Evaluation of export buffalo meat for some chemical residues and microbial contaminants*. Ph. D. Thesis, India Veterinary Research Institute, Izatnagar, Bareilly.

DEBUYSER, M.;DUFOUR, B.;MAIRE, M.;LAFARGE, V. 2001,*Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 67, 1– 17.

DOYLE, M.P.2001,*Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. 2nded. ASM Press, Washington. 171-191

ERTAS, H. B.;CETINKAYA, B.;MUZ, A. 2004,*Genotyping of broiler-originated Campylobacter jejuniand Campylobacter coli isolates using fla typing and random amplified polymorphic DNA methods*. International Journal of Food Microbiology.Vol. 15, VOL.94, 203–209.

EYIGOR, A.;DAWSON, K. A.;LANGLOIS, B. E.;PICKETT, C. L. 1999,*Detection of cytolethal distending toxin activity and cdt genes in Campylobacter spp. isolated from chicken carcasses*, Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65, 1501–1505.

FALCONE, M.;GIANNELLA, M.;RAPONI, G.;MANCINI, C.; VENDITTI, M. 2006,*Teicoplanin use and emergence of Staphylococcus haemolyticus: is there a link?*ClinMicrobiol Infect. Vol. 12, 96–97.

Food and Drugs Administration (FDA), 2001,*Bacteriological analytical manual online. Chapter 12 Staphylococcus aureus*. Center for Food Safety & Applied Nutritiion.

GARRITY, G.M., 2005,*Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Springer New York, USA, 1145-1160.

GONG, J.;LIU, S. L.2004,*Progress of genotyping of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. Chinese Journal of Microbiology Immunology.Vol. 5, 414–418.

HUFF, K.;AROONNUAL, A.;LITTLEJOHN, A.E.;RAJWA, B.;BAE, E.; BANADA, P.P.;PATSEKIN, V.;HIRLEMAN, E.D.;ROBINSON, J.P.;RICHARDS, G.P.;BHUNIA, A.K. 2012,*Light-scattering sensor for real-time identification of Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus and Vibrio cholerae colonies on solid agar plate*. J. Microb. Biotechnol. Vol. 5, 607–620. http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00349.x.

INVITSKI, D.;HARNID,L.A.;ATANASOV, P.;WILKINS, E. 1999,*Biosensors for detection of pathogenic bacteria*. Biosensors Bioelectronics. Vol. 14, 599-624.

KOO, O.K.;AROONNUAL, A.;BHUNIA, A.K. 2011,*Human heat-shock protein 60 receptor-coated paramagnetic beads show improved capture of Listeria monocytogenes in the presence of other Listeria in food*. J. Appl. Microbiol. Vol. 111, 93–104. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05040.x.

LAMPRELL, H.;MAZEROLLES, G.;KODJO, A.;CHAMBA, J.F.;NOËL, Y.;BEUVIER, E. 2006,*Discrimination ofStaphylococcus aureus strains from different species of Staphylococcus using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 108, 125 – 129.

LELOIR, Y.;BARON, F.;GAUTIER, M. 2003,*Staphylococcus aureus and food poisoning.* Genetics and Molecular Research. Vol. 2, N°. 1, 7 –28.

LIU, G.;HAN, Y.;LI, X. 2006,*Applicability of a rapid method based on immunomagnetic capture-fluorescent PCR assay for Campylobacter jejuni*. Food Control. Vol. 17, 527-532.

MANDAL, P.K.;BISWAS, A.K.;CHOI, K.;PAL,U.K. 2011,*Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview*. American journal of food technology. Vol. 6, N°. 2, 87-102.

SAHIN, O.;KOBALKA, P.;ZHANG, Q. 2003,*Detection and survival of Campylobacter in chicken eggs*. Journal of Applied Microbiology.Vol. 95, 1070–1079.

SALLAM, I.S. 2006,*Prevalence of Campylobacter in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan*. Food Control. Vol.18, 1113-1120.

SALLAM, K. I. 2001,*Campylobacter contamination in retailed chicken carcasses from Mansoura – Egypt, and its relation to public health*. Alexandria Journal of Veterinary Sciences.Vol. 17, 157–169.

SINGH, A.K.;BETTASSO, A.M.;BAE, E.;RAJWA, B.;DUNDAR, M.M.;FORSTER, M.D.;LIU, L.;BARRETT, J.L.;LOVCHIK, J.;ROBISON, J.P.;HIRLEMAN, E.D.;BHUNIA, A.K. 2014,*Laser optical sensor, a label-free on plate Salmonella enterica colony detection tool*. mBio. Vol. 5, N°. 1, 01019-13. doi:10.1128/mBio.01019-13.

TOKUMARU, M.;KONUMA, H.;UMESAKO, M.;KONNO, S.;SHINAGAWA, K. 1991, *Rates of detection of Salmonella and Campylobacter in meats in response to the sample size and the infection level of each species*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 13, 41–46.

VUNRCRZANT, C.;PLLUSTOESSER, D.F. 1987,*Compendium of methods for microbiological examination of food*. 3rded. American Public Health Association. New York.

WAAGE, A. S.;VARDUND, T.;LUND, V. 1999,*Detection of small numbers of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay*. Applied Environment Microbiology.Vol. 65, 1636–1643.

WHITMAN, W.B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ednd.Springer-Verlag, New York. 392-420.