مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (1) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (1) 2013

التحري عن وجود جراثيم الكلِبْسيلَّة من بعض أنواع التوابل المأخوذة من الأسواق المحلية

الدكتورة ابتسام حمد*
الدكتور أيمن المريري**
نور سليمان***

(تاريخ الإيداع 23 / 9 / 2012. قبل للنشر في 14 / 1 / 2013)

□ ملخّص □

للتوابل أهمية آخذة في الازدياد نظراً إلى احتوائها على عناصر فعالة وكونها تُستعمل كصادات حيوية، وفي الوقت الحاضر يتجه العالم نحو استعمال بعض التوابل بدلاً من الأدوية الكيماوية، إلا أن ذلك لا يعني خلوها من عوامل ممرضة قد تكون خطيرة ومنها جراثيم الكلِبْسيلَّة .*Klebsiella* spp التي يمكن أن تُسبب العديد من الحالات المرضية، ولاسيَّما الالتهاب الرئوي، إنتانات المسالك البولية، وتجرثم الدم. وبالرغم من أن الموطن الطبيعي للكلِبْسيلَّة غير محدد بدقة إلا أنَّ وجودها بنسبة كبيرة في التوابل قد يشير إلى أن النباتات تمثل الخازن الطبيعي لها.

أُجري العزل الأولي للكلِبْسيلَّة بتنميتها على وسط منمي عام، ثمَّ على وسط اصطفائي، إن مستعمرات الكلِبْسيلَّة المعزولة دائرية محدبة قطرها 3–4 مم، ذات حواف مخاطية ولزجة، وتكون محاطة بمحفظة. وأمكن تحديد هويتها من خلال التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR، والاختبارات الحيوية الكيميائية. وقد أظهرت النتائج أن نحو 32% من العينات المدروسة تحتوي جراثيم الكلِبْسيلَّة.

الكلمات المفتاحية: الكلِبْسيلَّة – التوابل – الاختبارات الحيوية الكيميائية – التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR.

*أستاذ– قسم العلوم البيئية – كلية العلوم – جامعة دمشق – سورية .
**باحث– قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية – هيئة الطاقة الذرية – سورية.
***طالبة دراسات عليا (ماجستير) – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (1) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (1) 2013

Detection of *Klebsiella* spp. in Some Spices Taken from Local Markets

Dr. Ibtesam Hamad[*]
Dr. Ayman Al-Mariri[**]
Nour Souleman[***]

(Received 23 / 9 / 2012. Accepted 14 / 1 /2013)

□ ABSTRACT □

Spices are becoming increasingly important world-wide due to their effectiveness as natural antibiotics, the thing that makes the world nowadays tend to use spices instead of chemical drugs. However, this doesn't mean they are free of some dangerous pathogens such as Klebsiella spp. which can lead to a wide range of illnesses, notably pneumonia, urinary tract infections (UTIs), and bacteremia. Although we don't know the natural habitat of this bacterium we find that it thrives in herbs and spices, concluding thus that plants may be its natural habitat.

The primary isolation of this bacterium was based first on its growth on general media and then isolation on selective media. Colonies of the microorganisms were counted on different media then Klebsiella was isolated from a selective media. The isolated colonies of Klebsiella were circular, dome-shaped, 3-4 mm in diameter, with mucoid sticky edges, and surrounded by capsule. After this we chose the typical colony and identified it using Polymerase chain reaction PCR and biochemical tests. Our results showed that 32% of examined specimen contained Klebsiella spp.

Keywords: *Klebsiella*, Spices, Biochemical tests, Polymerase chain reaction (PCR).

[*]**Professor, Ecology Department, Faculty of Sciences, University of Damascus, Syria.**
[**]**Researcher, Molecular Biology and Biotechnology Department, Atomic Energy Commission, Syria.**
[***]**Postgraduate student, Plant Biology Department, Faculty of Sciences, University of Damascus, Syria.**

مقدمة:

ترتبط الجراثيم الملوثة والمسممة للغذاء في معظم الأحيان ارتباطاً وثيقاً بالمادة الخام، حيث يؤكد مركز مكافحة الأمراض والوقاية منها (CDC) أنه يوجد نحو 250 مسبباً للمرض ينتقل عن طريق الأغذية. بعض هذه الجراثيم تأتي للغذاء في عمليات التصنيع ومختلف عمليات التداول للمادة الخام من تخزين وتوزيع، حتى في أثناء الاستهلاك (Ivana *et al*., 2009). وعندما يؤكل الطعام الملوث تصل هذه الممرضات وتتكاثر في الجهاز الهضمي ثم تنتقل لتلتصق بخلايا البطانة المعوية، لتبقى في الأمعاء وينتج عن بعضها ذيفانات Toxins لتمتص داخل مجرى الدم، ويغزو بعضها الآخر نُسج الجسم العميقة مسببة المرض (Mead *et al,*. 1999).

إنّ التوابل كأي مادة غذائية أساسية، تحمل بعض أنواع الجراثيم أحياناً وتؤكد اللجنة الدولية للميكروبيولوجيا (ICMSF,1986) أن الفلورا الغالبة للتوابل هي عادة أبواغ الجراثيم الهوائية وبعض الأحياء الدقيقة الممرضة. وإن تلوث التوابل بهذه الممرضات يُعد السبب الرئيس لاضطرابات المعدة والأمعاء الناجمة عن تناول الأغذية المضاف إليها التوابل.

يمكن تعريف التوابل بحسب منظمة المعايير والمواصفات الدولية (ISO, 1872) على أنها أجزاء مختلفة من النباتات (ثمار أو بذور أو جذور) أو منتجاتها، معظمها يجري تجفيفها. تستعمل لإعطاء الأطعمة نكهة خاصة وتُصنف إلى مجموعة كبيرة من المكملات الغذائية لوجبات الطعام وبعض المشروبات، تتصف برائحتها العطرية ومذاقها القوي. تستعمل التوابل استعمالاً واسعاً جداً في الوقت الحاضر في العديد من المأكولات في العالم لتحسين مذاق الطعام، ولكل نوع من الأطعمة بهارات خاصة تضفي عليه مذاقاً مميزاً، وتفضل الشعوب العربية البهارات ذات الرائحة الطيبة، أما شعوب شرقي آسيا فيفضلون البهارات ذات الرائحة القوية والحارة والأعشاب البحرية لما لها من فوائد طبية عديدة. وفي الغرب يقل استعمال البهارات في أطعمتهم ويقتصر على عدد قليل من البهارات في بعض الأطعمة. إلا أن هذه الفوائد الكثيرة للتوابل تترافق مع وجود عدة عوامل ممرضة منها جراثيم الكلِبْسيلَّة. الكلِبْسيلَّة جراثيم عصوية سالبة الغرام، تتراوح أبعادها من (0.1-0.3) x (0.6-6.0) ميكروناً، محاطة بمحفظة، تترتب بشكل مفرد، أو أشفاع، أو سلاسل قصيرة، تتفق مع التعريف العام لفصيلة الأمعائيات *Enterobacteriaceae*، غير متحركة ماعدا الجنس *K. mobilis*، لا هوائية اختيارية، تخمر سكر اللاكتوز، موجبة اليورياز، تستقلب السترات، غير منتجة لغاز H_2S، مستعمراتها مخاطية، وأحياناً تكون لزجة ملتصقة بسطح الآغار (Garrity, 2005).

تُفرز الكلِبْسيلَّة ذيفاناً داخلياً (LPS) متحملاً للحرارة نسبياً، الذي يُعدّ مسؤولاً عن حالات التسمم الغذائي (Dokladny *et al*., 2010)، كما أنها تفرز إنزيم يورياز (Urease) الذي يتصف بدور مهم في آفة الجهاز البولي، وبهذا تعتمد إمراضية الكلِبْسيلَّة على النمط الجرثومي وعوامل الفوعة (Augustin *et al*., 2009)، حيث تُصيب بالدرجة الأولى المرضى في المستشفيات الذين يعانون من نقص في المناعة، الأطفال، مرضى السكري، والمدمنين على الكحول والمخدرات، ومن يعاني من انسداد رئوي مزمن (Anderson *et al*., 2006). وضعت الكلِبْسيلَّة بين ثمانية من أهم مسببات العدوى الجرثومية في المستشفيات إذ تأتي بالمرتبة الثانية بعد الإيشيريشيا القولونية *E. coli* (Anonymous, 2002). إنَّ الكلِبْسيلَّة واسعة الانتشار في البيئة، وقد تكون مستعمرة للسطوح المخاطية عند الثدييات (Curtis *et al*., 2008).

هناك 7 أنواع مختلفة من جراثيم الكلِبْسيلَّة التي تبدي تشابهاً في الدنا DNA (Brooks *et al*., 2004). ومن أكثر هذه الأنواع أهميةً من الناحية الطبية هي الكلِبْسيلَّة الرئوية *K. pneumoniae*، حيث تُعد من أهم الممرضات

سريرياً من بين الأمعائيات، تُصيب جهاز التنفس وخاصة الرئتين، مسببة الالتهاب الرئوي، ويمكن أن تؤدي إلى التهاب واسع النطاق، ثم النزف فالموت (Rosen *et al*., 2008). تليها الكلِبْسيلَّة المُعجِلة للولادة *K. oxytoca* التي تُشبه الرئوية بكونها تُحْدِث آفة في الجهاز التنفسي، وتسبب التهاب الغشاء المخاطي الأنفي، والدم والتهاب الأذن الوسطى القيحي الحاد (Bleich *et al*., 2008). يتميز النوع المُعجل للولادة عن باقي الأنواع بكونه إيجابي الإندول كما أن له خصائص نمو مختلفة قليلاً حيث يمكن أن ينمو على وسط يحتوي Melezitose ولا ينمو على وسط يحتوي 3-hydroxybutyrate بينما ينمو عليه النوع الرئوي (Högenauer *et al*., 2006).

أهمية البحث وأهدافه :

أهداف البحث:

يهدف هذا البحث إلى التحري عن الكلِبْسيلَّة ولمعرفة الحمولة الجرثومية لبعض أنواع التوابل المضافة إلى اللحوم وبعض أنواع الأغذية ولكي تكون الخطوة الأولى في دراسة وبائية لهذه الجراثيم في محافظتي دمشق وريفها، إضافةً إلى كونها الدراسة الأولى في سورية فيما يرتبط بعزلها من التوابل.

أُنجز البحث في مختبرات هيئة الطاقة الذرية السورية– دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في الفترة الواقعة بين 2011/10/1 حتى 2012/4/1.

طرائق البحث ومواده :

1- المواد:

أوساط الاستزراع والزرع:

ماء الببتون الموقي Buffered Pepton Water (BPW)، وسط إيوزين أزرق المتيلين Eosin Methylen blue Agar (EMB Agar).

مواد الاختبارات الحيوية الكيميائية:

ماء أوكسجيني 3%، ستريبات أوكسيداز $BBL^{TM}DrySlide^{TM}$ (BD,USA)، KOH، ألفا نفتول، أحمر الميتيل، وسط MR-VP، كاشف الإندول Indole test reagent (Ehrlich Kovacs). وسط الكبريت–الإندول–الحركةMotility- Sulfur reduction-Indole production (SIM)، وسط MacConkey Agar، وسط Simon citrat، أملاح التترازوليوم Tetrazolium Salts.

مواد عزل الجينوم الجرثومي:

الوقاء TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)، SDS 10%، بروتيناز K 20mg/ml، NaCl 5M، CTAB NaCl، كلوروفورم إيزوأميل الكحول (24:1)، فينول كلوروفورم إيزوأميل الكحول (25:24:1)، إيزوبروبانول، إيتانول 70%.

مواد التفاعل السلسلي للبوليميراز والرحلان:

وقاء 10X PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl,100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1mg/ml BSA, 1% Triton)، $MgSO_4$، نكليوتيدات (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)، أنزيم DNA بوليميراز، مرئسات

نوعية (الجدول 2)، هلامة الآغاروز 1.5% (W/V)، الوقاء 1X TAE المحضر من الوقاء 50X TAE (0.4 M Tris-Base, 10 mM EDTA pH 8.0, 57.1 ml Glacial Acetic Acid).

مادة الحفظ: غليسيرول 50%.

طرائق البحث ومواده :

الطرائق:

جمع العينات Sample collection:

بلغ عدد العينات 75 عينة، من التوابل (المخلوطة، غير المخلوطة)، وقد جُمِعَت من مناطق مختلفة من دمشق وريفها في الفترة الواقعة مابين 2011/10/1 و2012/2/1. تمَّ جمعها في أكياس معقمة.

الجدول 1. أنواع التوابل التي جُمعت من مناطق دمشق وريفها.

التوابل المخلوطة	عدد العينات	التوابل غير المخلوطة	عدد العينات
بهارات أوزي	1	أوريغانو	1
بهارات بروستد	1	جوزة الطيب	1
بهارات بيضاء	2	حلبة مطحونة	1
بهارات جبنة	1	خميرة بسكوت	1
بهارات دجاج(ماجي)	2	زنجبيل	1
بهارات سلطة	1	سماق	3
بهارات سمك	3	شطة	3
بهارات شاورما	1	شمرة	1
بهارات شيش	1	عصفر خشن	3
بهارات طاهي	1	عصفر مطحون(كركم)	3
بهارات فلافل	2	فلفل أبيض	1
بهارات كبسة	5	فلفل أسود	3
بهارات مشكلة	4	فليفلة حمراء	2
بهارات مكسيكي	1	قرفة خشنة	2
بهارات مشاوي	1	قرفة ناعمة	3
بهارات نقانق	1	كراوية	1
كاري	4	كزبرة	4
		كمون	4
		نعنع	4
		يانسون حب	1

معالجة العينات Sample processing:

بعد وزن 0.5 غ من العينة المدروسة:

- أُجري الإغناء الأولي غير الاصطفائي في وسط ماء البيبتون الموقي Water Buffered Peptone (BPW) في الدرجة 37°م لمدة 24 ساعة.
- أُجري الإغناء الاصطفائي في وسط EMB 37°م مدة 24 ساعة.
- أُجري انتقاء المستعمرات المخاطية ذات الهالة الوردية، ذات المحفظة لإجراء:

-التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) باستعمال مرئسات نوعية، تمَّ تصميمها في مخابر هيئة الطاقة الذرية.

-اختبارات حيوية كيميائية (الأوكسيداز، اليورياز، غاز كبريت الهيدروجين H_2S، تخمر اللاكتوز، الإندول).

مراحل العمل:

- **التعداد العام الكلي:**

قبل التحري عن وجود الكلِبْسيلَّة في عينات التوابل، أُجري التعداد الكلي للأمعائيات وللكلِبْسيلَّة على وسط EMB.

- **عزل الكلِبْسيلَّة من عينات التوابل:**

يتضمن زرع جراثيم الكلِبْسيلَّة *Klebsiella* spp. عدة مراحل:

1- مرحلة الإغناء الأولي غير الاصطفائي: أُجري وزن 0.5 غ من العينة وتنميتها في 4.5 مل من ماء البيتون الموقي بالدرجة 37°م مدة 24 ساعة مع الهز بسرعة 180 rpm.

2- مرحلة الإغناء الاصطفائي: أُخذ 10 µl من الوسط السابق وجرى زرعها على وسط (EMB)، ثم تحضن بالدرجة 37°م لمدة 24 ساعة. وللحصول على هذه الجراثيم نقيةً تؤخذ مستعمرة مفردة وتزرع على وسط (EMB) وتكرر هذه العملية حتى الحصول على طبق يحتوي مستعمرات نموذجية فقط.

3- خصائص المستعمرات Colony characteristics:

تبدو مستعمرات الكلِبْسيلَّة النموذجية على وسط (EMB): كبيرة قطرها بين 3- 4 مم، محدبة الشكل، مخاطية، بنفسجية ذات هالة وردية. تُنتقى هذه المستعمرات من أجل تلوينها.

4- الفحص المجهري:

- **صبغة غرام Gram Staining:**

يُحضر الغشاء الجرثومي ثم يُلون بطريقة غرام.

- **تلوين المحفظة Capsular staining:**

1. يُحضر الغشاء الجرثومي ويثبت بالطريقة المعتادة (استعمال الكحول مع تجنب استعمال الماء) لأن المحفظة تذوب بالماء.

يُغمر الغشاء بمحلول 30% من صبغة الفوكسين القاعدية، وتُمرر الصفيحة فوق اللهب حتى يبدأ الملون بالتبخر.

2. يُغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس 20%.
3. يُغمر الغشاء في محلول أزرق المتيلين 1%، ثم يُغسل بالماء.

4. تُجفف الصفيحة وتُفحص تحت المجهر بالعدسة الغاطسة.

التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

أُجرِي تفاعل PCR على المستعمرات النموذجية النامية على وسط (EMB) بعد عزل الجينوم الجرثومي لها وفق الآتي (Promega, PCR Protocols Guide):

1. نُمِّيَت الجراثيم في ماء الببتون الموقي ثم ثُفِلَت مدة 5 دقائق بسرعة 4000 rpm وفي الدرجة 4+ مْ وجرى التخلص من السائل الطافي.

2. حُلَّ الراسب في 567 µl من الموقي TE بوساطة الميكروبيبت، ثم أُضيف إليه 30 µl من SDS 10% و 3 µl من proteinase K 20 mg/ml. مُزِج المجموع وحُضِن لمدة ساعة بالدرجة 37°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.

3. أُضيف 100 µl من الـ 5M NaCl ومُزِج جيداً ثم أُضيف 80 µl من محلول CTAB/NaCl. مُزِج المجموع وحُضِن لمدة 10 دقائق بالدرجة 65°م مع الرج بسرعة 1000 rpm.

4. أُضيف 780 µl من chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ومُزِج ثم ثُفِّل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقِل الطافي إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.

5. أُضيف إلى الطافي حجم مماثل من الـ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ومُزِج ثم ثُفِّل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ونُقِل الطافي بعدها إلى أنبوب جديد مع تجنب سحب أي جزء من الطبقة الوسطى البروتينية.

6. أُضيف إلى الطافي النهائي كمية من الإيزوبروبانول تعادل 0.6 مل من حجمه ومُزِج بلطف بقلب الأنبوب 4-6 مرات حتى يترسب الدنا DNA حيث يظهر بشكل خيوط سابحة في السائل ثم ثُفِّل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ثم أمكن التخلص من الإيزوبروبانول بلطف لتجنب رمي الدنا DNA.

7. غُسِل الراسب بإضافة 1 مل من الإيتانول 70% ثم ثُفِّل مدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm وجرى رمي الطافي وجُفِّف الراسب بوساطة جهاز Concentrator (شركة Eppendorf).

8. حُلَّ الراسب الناتج في 25 µl من الموقي TE ثم قِيس تركيزه بوساطة المطيافية (Nano Drop) ومُدِّد للوصول إلى تركيز يساوي 100 ng/µl.

أُجري التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR على الدنا DNA المعزول من الكلِبْسيلَّة باستعمال المرئسات النوعية الموضحة في الجدول 2.

الجدول 2. المرئسات النوعية المستعملة لجنس الكلِبْسيلَّة.

	Sequence التتالي	طول العصابة
Klebrib-1	5'- GTAATGTCTGGGAAACTGCC-3'	1500 bp
Klebrib-2	5'- CCACCTTCCTCCAGTTTATC-3'	

أُجري التفاعل بحجم 25 µl ويوضح الجدول 3 المواد المستعملة في التفاعل، في حين يوضِّح الجدول 4 الشروط اللازمة لحدوث هذا التفاعل.

الجدول 3. المواد المستعملة في تفاعل PCR

المواد المستعملة Materials	التركيز النهائي (ميكروليتر) Final conc. µl	حجم التفاعل النهائي (25ميكروليتر) 25 µl PCR
Genomic DNA	200-500 ng	**5** µl DNA (100 ng)
Primer 1 -10 µM	20 µM	1 µl
Primer 2-10 µM	20 µM	
dNTPs 20 Mm	0.4 Mm	0.5 µl
Buffer 10X	1X	2.5 µl
MgSO4 50 mM	3 Mm	1.5 µl
Taq 5U	2 U	0.2 µl
H_2O	----	16.3 µl

الجدول 4. شروط تفاعل PCR

		درجة الحرارة	الزمن
	التمسخ الأولي Initial denaturation	95°C	5 mins
35 Cycle	التمسخ Denaturation	95°C	30 sec
	الالتحام Annealing	60°C	30 sec
	الاستطالة Extension	72°C	1 min
	الاستطالة النهائية Final Extension	72°C	10 mins

ثم أُجري الكشف عن نواتج PCR باستعمال هلامة الآغاروز1.5% (W/V) المحضرة في الوقاء 1X TAE والترحيل على فولطية 85 V مدة نصف ساعة. أُجري الاحتفاظ بالمستعمرات المؤكدة في BPW مع الغليسيرول 50%، وثمّ حُفِظت بالدرجة -80°م من أجل الدراسات اللاحقة.

الخصائص الحيوية الكيميائية Biochemica Identification:

أُجرِيَت على العزلات المؤكدة عن طريق تفاعل PCR بأنها كلِبْسيلَّة، الاختبارات الحيوية الكيميائية الآتية:

*__اختبار الحركة:__ أُجري باستعمال الآغار نصف الصلب (وهو ماء الببتون الموقي المضاف إليه كمية من الآغار) والمضاف إليه أملاح التترازوليوم Tetrazolium Salts (وهو ملون حيوي يحافظ على الخلايا الجرثومية ويصبغ الجراثيم باللون الأحمر ولا يصبغ الوسط)، حيث يجري التلقيح بطريقة الوخز، فإذا كانت الجراثيم متحركة يُلاحظ تفشي اللون الأحمر في الوسط بحسب حركة الجراثيم، أما إذا كانت الجراثيم غير متحركة فيلاحظ اللون الأحمر مكان الوخز فقط .

*__اختبار الأوكسيداز:__ أُجرِي باستعمال ستريبات $BBL^{TM}DrySlide^{TM}$ (BD,USA) حيث يُوضع عليها جزء من المستعمرة فإذا تغير اللون إلى الأزرق البنفسجي يُعد التفاعل إيجابياً، وسلبياً إذا لم يتغير اللون.

*__اختبار تخمير اللاكتوز:__ جرى باستعمال أطباق ماكونكي آغار الحاوية على سكر اللاكتوز، إذ تقوم الجراثيم المخمرة للاكتوز بإنتاج مركبات حمضية تخفض pH إلى أقل من 6.8 مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه مشعراً لونياً هو الأحمر المعتدل neutral red.

*اختبار استقلاب السترات: أُجري باستعمال أنابيب تحتوي وسط سيمون سترات الذي يحتوي سيترات الصوديوم، إذ إن الجراثيم التي يمكن أن تفكك السترات هي وحدها تستطيع النمو على هذه الأوساط، وتنتج مركبات قلوية ترفع قيمة pH مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه مشعراً لونياً هو أزرق بروموتيمول.

*اختبار حلمهة البولة Urease: أُجري باستعمال أنابيب تحتوي وسط اليوريا Urea، إذ تقوم الجراثيم التي تُنتج إنزيم اليورياز بتفكيك البولة إلى نشادر الذي يتحول بدوره إلى كربونات الأمونيوم التي تقلون الوسط مما يتسبب بتغير لون الوسط لاحتوائه على مشعراً لونياً هو حمرة الفينول.

*اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين H_2S: أُجري باستعمال أنابيب تحتوي وسط SIM، ثم حُضِنَت المزرعة في درجة حرارة 37°م مدة 24 ساعة، في حال تشكل لون أسود ضمن الوسط فهذا يدل على أن الجراثيم قد أنتجت غاز كبريت الهيدروجين H_2S.

*اختبار إنتاج الإندول Indole Production Test: أُجري باستعمال أنابيب تحتوي وسط SIM، ثم حُضِنَت المزرعة في درجة حرارة 37°م مدة 24 ساعة. استعمل هذا الاختبار للكشف عن قابلية بعض أنواع من الجراثيم على تحليل الحمض الأميني وإنتاج الإندول. ويجري الكشف عن الإندول بإضافة قطرات من كاشف الكوفاكس للوسط الزرعي المحضّن 24 ساعة، إنَّ تشكل حلقة حمراء في قمة الأنبوب هو مؤشر لنتيجة إيجابية بينما عدم تغير اللون وتشكل حلقة صفراء مؤشر لنتيجة سلبية.

النتائج والمناقشة:

يُوضح الجدول 5 نتائج التحري عن *Klebsiella* في 75 عينة من التوابل حيث وُجِدت في 24 عينة على أساس شكلها على الوسط الانتقائي، وكان التعداد العام للجراثيم أكبر من 10^9 خلية/مل، وأن تعداد الأمعائيات بين $9*10^2$ حتى 10^9 منها كان تعداد جراثيم الكلِبْسيلَّة من $1*10^2$ إلى $8.1*10^5$.

شكلت الكلِبْسيلَّة النامية على الوسط الانتقائي EMB مستعمرات كبيرة محدبة مخاطية، ثخانتها نحو (3.0 µm) وطولها نحو (1.0 µm)، بلون بنفسجي غامق ذات هالة وردية. بدت الكلِبْسيلَّة تحت المجهر الضوئي بشكل عصيات قصيرة، سالبة صبغة الغرام، محاطة بمحفظة.

الجدول 5. التعداد العام الكلي للجراثيم على أوساط مختلفة.

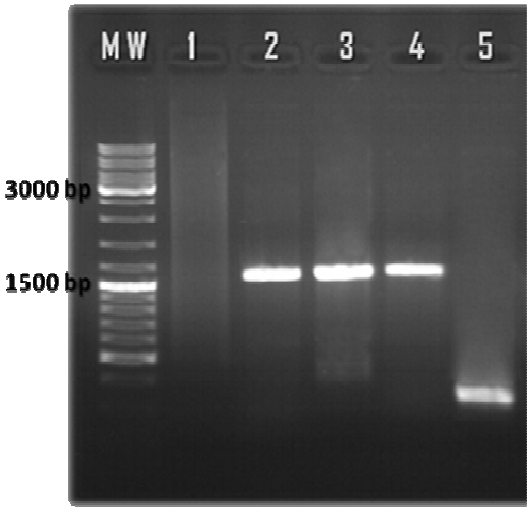
رقم العينة	اسم التابل	نوع التابل	عزلات الأمعائيات	التعداد العام الكلي	تعداد الأمعائيات	تعداد الكلبسيلة
1	أوريغانو	غير مخلوط	*E.coli*	$>10^9$	$2.1*10^3$	-
2	بهارات أوزي	مخلوط	*Enterobacter*	$>10^9$	$1.81*10^3$	-
3	بهارات بروستد	مخلوط	*E.coli+Salmonella*	$>10^9$	$4.5*10^5$	-
4	بهارات بيضاء	مخلوط	*E.coli*	$4.5*10^4$	$1.6*10^2$	-
5	بهارات بيضاء	مخلوط	*Enterobacter+Salmonella*	$>10^9$	$1.9*10^3$	-
6	بهارات جبنة	مخلوط	*Enterobacter*	$3*10^4$		-

7	بهارات سلطة	مخلوط		$1.9*10^3$		-
8	بهارات سمك	مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	$>^9 10$	$^5 10*6.3$	$^3 10*2.8$
9	بهارات سمك	مخلوط		$>^9 10$		-
10	بهارات سمك	مخلوط	*Enterobacter*	$^6 10*4.23$	$^3 10*1.5$	-
11	بهارات شاورما	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$>^9 10$	$^3 10*4.8$
12	بهارات شيش	مخلوط	*Enterobacter*	$>^9 10$	$^2 10*9$	-
13	بهارات طاهي	مخلوط		$^3 10*1.2$		
14	بهارات فلافل	مخلوط	*Salmonella*	$>^9 10$	$^6 10*3.96$	-
15	بهارات فلافل	مخلوط		$2.5*^4 10$		-
16	بهارات كبسة	مخلوط	*Salmonella*	$>^9 10$	$^4 10*4.45$	-
17	بهارات كبسة	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$^6 10*3.15$	
18	بهارات كبسة	مخلوط		$>^9 10$	$^5 10*1.8$	-
19	بهارات كبسة	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$^6 10*2.07$	$^2 10*1.1$
20	بهارات كبسة	مخلوط		$>^9 10$	$^3 10*5.4$	-
21	بهارات ماجي	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$^5 10*8.1$	
22	بهارات ماجي	مخلوط		$>^9 10$		-
23	بهارات مشاوي	مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	$>^9 10$	$^3 10*2$	
24	بهارات مشكلة	مخلوط		$>^9 10$	$^4 10*1.7$	-
25	بهارات مشكلة	مخلوط	*E.coli+Salmonella*	$>^9 10$	$^2 10*4$	-
26	بهارات مشكلة	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$^3 10*5.72$	$^2 10*3.15$
27	بهارات مشكلة	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$^3 10*3$	$^2 10*1.12$
28	بهارات مكسيكي	مخلوط	*Klebsiella*	$>^9 10$	$7.3*^5 10$	$^3 10*1.9$
29	بهارات نقانق	مخلوط	*E.coli*	$>^9 10$	$2*^3 10$	-
30	جوزة الطيب	غير مخلوط		$>^9 10$	$^3 10*3.17$	-
31	حلبة	غير مخلوط	*E.coli*	$>^9 10$	$^3 10*1.3$	-
32	خميرة بسكوت	غير مخلوط		$>^9 10$	$^3 10*2.23$	-
33	زنجبيل	غير مخلوط	*Enterobacter+Klebsiella*	$>^9 10$	$^5 10*3.2$	$^3 10*2.45$
34	سماق	غير مخلوط		$>^9 10$	$^6 10*6.21$	-
35	سماق	غير مخلوط		$^2 10*7$	$^4 10*1.57$	-

36	سماق	غير مخلوط	*Klebsiella*	>^{9}10	^{4}10*4.3	^{3}10*2
37	شطة	غير مخلوط		^{3}10*1		-
38	شطة	غير مخلوط		^{4}10*9		-
39	شطة	غير مخلوط	*Klebsiella*	>^{9}10	^{6}10*3.15	^{2}10*2.1
40	شمرة	غير مخلوط		^{4}10*1		-
41	عصفر	غير مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	>^{9}10	^{6}10*5.04	^{3}10*1.2
42	عصفر	غير مخلوط		>^{9}10	^{4}10*1.17	-
43	عصفر	غير مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	>^{9}10	^{3}10*7.5	^{4}10*2.41
44	عصفر (كركم)	غير مخلوط		>^{9}10	^{3}10*1	^{4}10*2.41
45	عصفر (كركم)	غير مخلوط		>^{9}10	^{3}10*1.13	^{3}10*1.8
46	عصفر (كركم)	غير مخلوط	*E.coli*	>^{9}10	^{2}10*1	-
47	فلفل أبيض	غير مخلوط		>^{9}10	^{3}10*1.9	-
48	فلفل أسود	غير مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	>^{9}10	^{3}10*8.3	^{2}10*3
49	فلفل أسود	غير مخلوط	*Klebsiella*	>^{9}10	^{5}10*3.6	^{3}10*1.9
50	فلفل أسود	غير مخلوط	*Enterobacter+Klebsiella*	>^{9}10	^{6}10*4.23	^{3}10*3.1
51	فليفلة حمراء	غير مخلوط		^{2}10*2.3		-
52	فليفلة حمراء	غير مخلوط		>^{9}10	^{3}10*1.8	-
53	قرفة خشنة	غير مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	>^{9}10	^{5}10*1.2	^{3}10 *4
54	قرفة خشنة	غير مخلوط		>^{9}10	^{5}10*1	-
55	قرفة ناعمة	غير مخلوط		>^{9}10	^{3}10*1.3	-
56	قرفة ناعمة	غير مخلوط	*E.coli+Salmonella*	>^{9}10	^{2}10*2.1	-
57	قرفة ناعمة	غير مخلوط	*E.coli+Salmonella*	>^{9}10	^{4}10*2.81	-
58	كاري	غير مخلوط		>^{9}10	^{4}10*1	-
59	كاري	غير مخلوط	*E.coli+Salmonella*	>^{9}10	^{3}10*3.75	-
60	كاري	غير مخلوط		>^{9}10	^{4}10*3.15	-
61	كاري	غير مخلوط	*Klebsiella*	^{6}10*3.3	^{4}10*5.31	^{2}10*2.71
62	كراوية	غير مخلوط		^{2}10*4.3		
63	كزبرة يابسة	غير مخلوط		>^{9}10	^{3}10*2.3	-
64	كزبرة يابسة	غير مخلوط	*Enterobacter+Klebsiella*	>^{9}10	^{5}10*1.8	^{2}10*1

65	كزبرة يابسة	غير مخلوط		$>10^9$	$10*1.8^4$	-
66	كزبرة يابسة	غير مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	$>10^9$	$10*5.85^4$	$3*10^2$
67	كمون	غير مخلوط	*E.coli*	$>10^9$		-
68	كمون	غير مخلوط		$10*3.2^3$		-
69	كمون خشن	غير مخلوط	*E.coli*	$>10^9$	$10*5.3^4$	-
70	كمون مطحون	غير مخلوط	*E.coli*	$>10^9$	$10*2.8^4$	-
71	نعنع	غير مخلوط		$>10^9$	$10*2.25^6$	-
72	نعنع	غير مخلوط	*E.coli+Klebsiella*	$>10^9$	$10*4.5^3$	$10*7^2$
73	نعنع	غير مخلوط	*Klebsiella*	$>10^9$	$>10^9$	$>10^9$
74	نعنع	غير مخلوط	*Enterobacter+Klebsiella*	$>10^9$	$10*3^4$	$10*1^2$
75	يانسون حب	غير مخلوط		$10*2.34^6$		-

كانت عدد عزلات الكلِبْسيلَّة بحسب شكل المستعمرات النموذجية على الوسط الانتقائي 24 عزلة، جرى انتقاء هذه المستعمرات لإجراء التفاعل السلسلي للبوليمراز، حيث يُوضح الشكل 1 تفاعل PCR على المستعمرات النموذجية لتمييز الكلِبْسيلَّة في عينة التوابل الملوث، وذلك باستعمال البادئات النوعية لجنس الكلِبْسيلَّة (الجدول 2).



ناتج التفاعل السلسلي للبوليميراز على هلامة الآغاروز 1.5% (W/V)
MW. واسم DNA جزيئي.
1- عينة بدون دنا (شاهد سلبي)
2- 3 كلِبْسيلَّة معزولة من بعض عينات التوابل.
4- كلِبْسيلَّة عيارية من الطاقة الذرية السورية (شاهد إيجابي)، ذات الرقم NS2686.
5- *Enterobacter sakazakii* مع مرئساتها النوعية (شاهد ايجابي)

الشكل رقم 1 . كشف DNA الكلِبْسيلَّة بوساطة PCR

يُلاحظ في المسار 1 هو ناتج PCR لعينة خالية من DNA (شاهد سلبي للتقنية). إن المسارات (2-3) هي عصابات دنا الجراثيم المعزولة على أوساط انتقائية من بعض عينات التوابل، والتي تكافئ في الحجم الجزيئي 1500 أساس آزوتي لعصابة الكلِبْسيلَّة العيارية (حصلنا عليها من مختبرات هيئة الطاقة الذرية السورية) الموجودة في المسار 4؛ بينما كان المسار5 نتيجة التقانة الإيجابية لعينة *Enterobacter sakazakii* مع مرئساتها النوعية، مما يؤكد العزل النوعي لجنس الكلِبْسيلَّة من هذه العينات.

يُلاحظ من الشكل أنه يمكن استعمال تقنية PCR لتمييز الكلِبْسيلَّة في عينات التوابل الملوثة. ولتنميط بعض أنواع الكلِبْسيلَّة المعزولة من عينات التوابل، تمَّ إجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية على كل الجراثيم التي أمكن تأكيدها عن طريق التفاعل السلسلي للبوليمراز.

ويوضح الجدول 5 النسب المئوية لوجود جراثيم الكلِبْسيلَّة المعزولة من التوابل التي حددها التفاعل السلسلي للبوليمراز.

الجدول 6. النسب المئوية لجراثيم الكلِبْسيلَّة المعزولة من التوابل.

المادة الغذائية	عدد العينات	عدد عزلات الكلِبْسيلَّة	النسبة المئوية %
التوابل غير المخلوطة	43	14	32.3
التوابل المخلوطة	32	19	59.5
المجموع الكلي	75	24	32

بدت معظم الكلِبْسيلَّة المعزولة، غير متحركة، سالبة الأكسيداز، مخمرةَ لسكر اللاكتوز، غير منتجة لغاز كبريت الهيدروجين H_2S، وبعض هذه العزلات نمت على وسط سيمون سترات وقَلوَنت الوسط. أنتجت بعض سلالات الكلِبْسيلَّة المعزولة إنزيم اليورياز، وأثبت أنّ بعض أنواع هذه الجراثيم القابلية على تحليل الحمض الأميني وإنتاج الإندول بعد الحضن بدرجة 37مْ، وكانت من النوع *K. oxytoca* وهذا يتفق مع نتائج الدراسات العالمية حول هذه الجراثيم (Garrity ,2005). إن نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية تشير إلى أن الكلِبْسيلَّة المعزولة هي من نوعين مختلفين أو أكثر. أمكن الحصول على السلالات العيارية المستعملة في هذه الدراسة من مختبر الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية، (*Ko = *K. oxytoca* - *Kp = *K. pneumoniae*). يُوضح الجدول 7 نتيجة هذه الاختبارات لبعض المستعمرات المعزولة من التوابل.

الجدول رقم 7. نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للكلِبْسيلَّة

العينات	الحركة	الأوكسيداز	تخمر اللاكتوز	استقلاب السترات	البولة	كبريت الهدروجين	الإندول
*Kp	-	-	+	+	+	-	-
*Ko	-	-	+	+	+	-	+
8 عزلات	-	-	+	+	+	-	+
12 عزلة	-	-	+	+	+	-	-
4عزلات	+	-	+	-	+	+	-

كانت النتيجة وجود عدد كبير من الأحياء الدقيقة في عينات التوابل، وقد يعود السبب إلى تلوث موائل نباتات التوابل من مياه الصرف الصحي أو فضلات الحشرات أو القوارض أو الطيور أو بسبب ظروف التخزين غير المناسبة (Sagoo *et al.,* 2008). يفسر وجود الأمعائيات عدم كفاية صيانة الآلات وأجهزة المعالجة والتعبئة والتغليف. يُفضل الحفاظ على عقامة بعض أنواع التوابل التي تمتلك التأثير القوي المضاد للفطريات والجراثيم حيث يُفضل الحفاظ عليها عن طريق إدخال مراقبة صارمة في أثناء دورة المعالجة والتخزين، بدءاً من نمو النبات حتى الحصاد والتخزين والتجهيز للبيع . هناك اهتمام كبير عند حدوث الأمراض بسبب جراثيم الكلِبْسيلَّة، حيث تمتلك هذه الجراثيم آليات للدفاع بسبب مستضدات محفظية (K) المرمزة للمحفظة التي تقاوم عملية البلعمة، وتقاوم درجة الحرارة 100 مْ (Nordmann *et al.*, 2009)، لقد أظهرت نتائجنا أنه يمكن التحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات التوابل بوساطة التفاعلات الحيوية الكيميائية وبوساطة التضخيم السلسلي باستعمال مرئسات نوعية للمورثة 16sRNA المحافظة ضمن الجنس. إن تقنية PCR لا تستغرق سوى يوم واحد، وهذا يفيد في إمكان استعمالها كطريقة عيارية في الكشف عن الكلِبْسيلَّة. كما أنها تقنية تجنب العاملين في مختبرات الجراثيم من الإصابة بهذه الجراثيم، وهي أسرع وأكثر حساسية من الاختبارات الحيوية الكيميائية ونعتقد أنها ستكون المعتمدة في المستقبل للتحري عن جراثيم الكلِبْسيلَّة في عينات التوابل والأغذية عامة (Min Wang *et al*., 2008). أظهرت الخصائص الشكلية والحيوية كيميائية أن نسبة الكلِبْسيلَّة في التوابل بمختلف أنواعها 32% من أصل 75 عينة وهذا يتفق إلى حد ما مع Stankovic وزملاؤه حيث كانت نسبة الكلِبْسيلَّة المعزولة 36% (Stankovic *et al*,. 2006). بينما لم تتفق نتائجنا مع Masood وزملاؤه حيث كانت نسبة تواجد الكلِبْسيلَّة ضمن دراستهما للتوابل في الباكستان 14% (Masood *et al*., 2006). ونعتقد أن سبب الاختلاف في نسبة الفلورا من الكلِبْسيلَّة في البيئة المحيطة بالنباتات في الباكستان عنه في سورية. لاحظنا أن عدد الدراسات التي تبحث عن الكلِبْسيلَّة في التوابل قليل نسبياً ربما بسبب عدم وجودها ضمن الفلورا الطبيعية للتوابل بل توجد بالبيئة المحيطة بنباتاتها، أو أنه تقليدياً يكون التحري عن الكلِبْسيلَّة ضمن أنواع أخرى من الأغذية كاللحوم والوجبات السريعة عموماً وبشكل خاص في العينات الطبية لأنها تُعد من الجراثيم التي تنتقل عبر عدوى المستشفيات.

علماً أنه حتى الآن يجري التعامل مع اللحوم عند انتاجها بإضافة التوابل التي قد تحتوي نسبة عالية من الحمولة الجرثومية وقد يظهر تأثير هذه الجراثيم في منتجات اللحوم وبالتالي سوف تكون مصدراً لتلوث اللحوم في أثناء تجهيزها (Shamsuddeen, 2009). أظهرت نتائجنا نسبة لا بأس بها من الكلِبْسيلَّة ضمن عينات التوابل مما يدل على جدوى الدراسة من تطوير اختبار تفريقي للكلِبْسيلَّة ضمن عينات التوابل؛ كما أنه يجب متابعة البحث لتحديد الفوعة المرضية لهذه العزلات لمعرفة فيما إذا كانت تُساهم في إصابة الجهاز البولي–التناسلي أو الجهاز التنفسي حتى تجرثم الدم، ولإثبات أنها من الممرضات التي تنتقل عن طريق الغذاء.

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات:

أظهرت النتائج أنه يمكن التحري عن الكلِبْسيلَّة في عينات التوابل بوساطة التفاعلات الحيوية الكيميائية وبوساطة التضخيم السلسلي باستخدام مرئسات نوعية للمورثة 16sRNA المحافظة ضمن الجنس.

كما أن الكلِبْسيلَّة واسعة الانتشار في الطبيعة وتعدَّ التوابل أحد المخازن الطبيعية المحتملة لها لذا يجب اتخاذ حيطة خاصة لدى تحضير الأغذية ولاسيمّا التي تضاف إليها التوابل بكميات كبيرة بهدف تجنب التلوث من هذه المصادر.

التوصيات:

1. تصميم مرئسات نوعية للتميز بين نوعين من جراثيم الكلِبْسيلَّة، النوع الرئوي والنوع المُعَجل للولادة.
2. دراسة التأثير المثبط للصادات الحيوية في الكلِبْسيلَّة ولاسيّما المستعملة في علاج مرضى الالتهابات الرئوية وتحديد فعاليتها في هذه المعالجة.

المراجع :

1. Anderson, D. J. Engemann, J. J. Harrell, Carmeli, L. J. Y. Reller, L. B. and Kaye, K. S. *Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae. Antimicrob*. Agents Chemother., V.50, 2006, 1715–1720.
2. Anonymous. *The cost of antibiotic resistance: effect of resistance among Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, and Pseudomonas aeruginosa on length of hospital stay*. *Infect.* Control Hosp. Epidemiol, V.23, 2002, 106–108.
3. Augustin, A. Seng Duong, L. Kalavsky, E. Liskova, A. Kisac, P. and Krcmery, V. *Colonization with cefotazime-resistant Enterobacter spp. and Klebsiella spp. in HIV-positive Cambodian children decreases with immune reconstitution after HAART*. J Chemother., V.21, 2009, 232-233.
4. Bleich, A. Kirsch, P. Sahly, H Fahey. J., Smoczek, A. Hedrich, HJ. and Sundberg, JP. *Klebsiella oxytoca: opportunistic infections in laboratory rodents.* Lab Anim., V.42, 2008,. 369-375.
5. Brooks, S. E. Walczak, M. A. Malcolm, S. and Hameed,. R. *Intrinsic Klebsiella pneumoniae contamination of liquid germicidal hand soap containing chlorhexidine*. *Infect.* Control Hosp Epidemiol., V.25, 2004,. 883–885.
6. Curtis, L. Nakipoglu, Y. Kucuker, MA. Katranci, H. Derbentli, S. *Need for more environmental control of Klebsiella and other gram negative infections*. Saudi Med J., Vol.29, 2008, 1069.
7. Dokladny, K. Lobb, R. Wharton, W. Thomas, Y. and Moseley, P. *LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF-$_K$B*, Cell Stress Chaperones, V.15, 2010, 153–163.
8. Garrity, M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Department of Microbiology and Molecular Genetics, V.2, 2005, 716-724
9. Högenauer, C. Langner, C. Beubler, E . *et al.*. *Klebsiella oxytoca as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis*. The New England Journal of Medicine. V.355, 2006, 2418-2426.
10. Ivana, S. Bogdan, A. Judith, I. Tudor, L. Stelian, B. Magdalena, D. *Food microbial contamination - the main danger in the catering type.* food industry in Romania.vol.1,2009, 511-516.
11. Masood, N. Chaudhery, A. Perween, T. *Bactericidal activity of black pepper,Bayleaf,Aniseed and Coriander against oral isolates*. Pak. J. Pharm. Sci. Vol.19, 2006, 214-218

12. Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J. S. and Shapiro C. *Food-related illnesses and death in the United State*. Emerg. Infect. Dis.vol.5, 1999, 607-625.
13. Min Wang, Boyang Cao, Qunfang Yu, Lei Liu, Qili Gao, Lei Wang, Lu Feng J Clin. *Microbiol Analysis of the 16S–23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Region in Klebsiella Species*. J.clin. Microbiol., V.46, 2008, 3555–3563.
14. Nordmann, P Cuzon, G. Naas, T., *The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria*. Lancet. Infect. Dis., V.9, 2009., 228–236.
15. Rosen, D. A. Pinkner, J. S. Jones, J. M., Walker J. N., Clegg S., Hultgren S. J.,. *Utilization of an intracellular bacterial community pathway in Klebsiella pneumoniae urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression*. Infect. Immun., V.76, 2008, 3337-3345.
16. Sagoo, SK. Little, CL. Greenwood, M. Mithani, V. McLauchlin, E. Pinna, J. *Microbiological Examination of Dried Spices and Herbs from Production and Retail Premises in the United Kingdom.* Microbiological safety of food. Information paper 2008.
17. Shamsuddeen, U. *Microbiological Quality of spice used in the production of Kilishi a traditionally dried and grilled meat product.* Bayero Journal of Pure and Applied Sciences. Vol. 2, 2009, 66 – 69.
18. Stankovic, N. Comic, L. Kocic, B. *Microbiological correctness of spices on sale in health food stores and supermarkets*. Acta fac. Med Naiss. Vol.23, 2006, 79-84.