مقارنة بين تقانة مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء المزودة بوحدة الانعكاس الكلي المخفف والطرائق التقليدية في تمييز بعض العزلات البكتيرية التابعة للجنس *Bacillus* من بعض الأغذية

رضوان بدر الدين[1] و عبد الحكيم عزيزية[2] و لينة الأمير[3]

الملخّص

حُصل على 45 عزلة من البكتريا التابعة للجنس *Bacillus* من أغذية مختلفة (بهارات، حبوب، حليب مجفف)، وصنفت اعتماداً على دليل Bergey باتباع طرائق تقليدية تشمل الاختبارات الشكلية (صبغة غرام، صبغ الأبواغ) والاختبارات الفيزيولوجية (درجة الحرارة المثلى للنمو، درجة الـ pH، نسبة NaCl) والاختبارات البيوكيميائية (فوغس- بروسكاور، حلمأة الجيلاتين، حلمأة الإسكولين، استخدام السترات، اختبار بيتا-غالاكتوزيداز، اختبار لايزين ديكاربوكسيلاز وأورنيثين ديكاربوكسيلاز، إنتاج الحمض من السكريات المختلفة). وحُضّر معلق بكتيري من العزلات السابقة للحصول على أطياف تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR)، عن طريق وحدة الانعكاس الكلي المخفف (ATR) المكونة من موشور مصنع من مادة ZnSe بالمسح ضمن المجال 4000-400 سم$^{-1}$. بينت نتائج الاختبارات أن العزلات تنتمي إلى خمسة أنواع (*B. pumilus* و*B. subtilis* و*B. lentus* و*B .megaterium* و*B. cereus*). كما بينت إمكانية استخدام طريقة FTIR-ATR بوصفها طريقة موثوقة لتحديد العزلات التابعة للأنواع السابقة، لأنها تمتاز بالدقة والسرعة وسهولة التطبيق بالإضافة إلى انخفاض التكاليف.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus*، الاختبارات التقليدية، دليل Bergey، الاختبارات البيوكيميائية، مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء، وحدة الانعكاس الكلي المخفف.

(1) طالب دكتوراه، (2) أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
(3) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الصناعية والغذائية ص.ب 31902، سورية.

Comparison between FTIR-ATR technique and traditional methods in discrimination of *Bacillus* isolates from some foods

Badr AL-Deen, R. [1], A. Azizieh[2] and L. AL-Amir[3]

Abstract

Forty-five *Bacillus* isolates were obtained from different foods (spices, grains, dried milk), the isolates were identified using traditional method from Bergey's manual based on morphological tests (gram staining, spores staining), physiological tests (optimum growth temperature, pH, NaCl concentration) and biochemical tests (Voges-Proskauer, gelatin hydrolysis, esculin hydrolysis, β-Galactosidase test, Lysine decarboxylase and Ornithine decarboxylase, production of acid from different sugars). Bacterial suspensions were prepared from the isolates and FTIR spectrums were obtained using ATR unit, which consists of ZnSe prism, by scanning at the range of 4000-400 cm^{-1}. Results revealed that the isolates represented 5 species of *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. megaterium*, *B. cereus*) and the potential of Fourier transform infrared spectroscopy-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) method as a reliable method for discrimination among *Bacillus* isolates, which is accurate, rapid, easy to apply and cheap.

Keywords: *Bacillus*, Traditional methods, Bergey's manual, Biochemical tests, Fourier transform infrared spectroscopy, Attenuated total reflectance.

[1]Ph. D. student, [2] Professor, Dep. Food Sci., Agric. Fac., B. O. Box: 30621, Damascus Univ., Syria.
[3]Nat. Comm. Biotech., Dep. Ind. Food Tech.. B. O. Box: 31902. Syria.

المقدمة

لايزال الافتقار إلى طريقة سريعة وبسيطة في تحديد البكتريا الممرضة المنقولة عن طريق الغذاء عائقاً أمام تشخيص البكتريا الممرضة والسيطرة عليها. وتتضمن إجراءات الزرع التقليدية لتحديد البكتيريا العديدَ من المزارع الثانوية وخطوات التحديد بالتنميط المصلي أو الحيوي وتتطلب فترة زمنية طويلة قد تصل إلى أسبوع للحصول على النتائج المثبتة (Lefier وزملاؤه، 1997؛ Rebuffo وزملاؤه، 2006؛ Naravaneni وKaiser، 2005). علاوة على ذلك، غالباً ما تكون هذه الطرائق مضللة (Al-Qadiri وزملاؤه، 2006)، وقد ركزت أغلب الجهود على تطوير تقانات جزيئية وحيوية مناعية، لكن استخدامها من أجل الكشف الروتيني ما يزال محدوداً نتيجة لكلفتها المادية العالية وحاجتها للأشخاص المدربين (Rebuffo وزملاؤه، 2006). ومطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (FT-IR) هي طريقة فيزيائية كيميائية تعتمد على قياس اهتزاز الجزيئة المثارة بإشعاع IR في مجال طول موجي محدد. ويمكن أن تستخدم أطياف FT-IR للخلايا البكتيرية لتحليل التركيب الإجمالي الذي يشمل البروتينات والأحماض الأمينية والكربوهيدرات والأحماض النووية ومتعددة السكريات اللبيدية (lipopolysaccharides) (Davis وMauer، 2010).

ويمتلك طيف FTIR أهمية كبيرة بوصفه طريقة سريعة وقليلة التكاليف لتحديد البكتريا الممرضة في مجال التصنيع الغذائي على عكس الطرائق البيولوجية المجهدة والمكلفة نتيجة حاجتها لكميات كبيرة من الكواشف والتجهيزات لتحديد السلالة (Puzey وزملاؤه، 2008).

ويستخدم ATR الأفقي (HATR) بالشكل شائع مع بلورة ZnSe للدراسات الميكروبيولوجية. ويمكن أن يتعامل HATR مع العينات السائلة أو الصلبة أو الغشائية أو المسحوقة (Burgula وزملاؤه، 2006؛ Winder وGoodacre، 2004؛ Burgula وزملاؤه، 2008).

لقد اكتشف استخدام طيف FTIR لتحليل البكتريا المنقولة عن طريق الغذاء منذ ثمانينات القرن الماضي، عندما سجل تطبيقها في الميكروبيولوجيا التشخيصية (Naumann وزملاؤه، 1988). ومنذ ذلك الحين طبق طيف FTIR بنجاح لتحديد وصنفت سلالات البكتريا المنقولة عن طريق الغذاء والأنواع التابعة لأجناس مختلفة، بما فيها *Listeria* (Rebuffo وزملاؤه، 2006؛ Holt وزملاؤه، 1995)، *Bacillus* (Helm وزملاؤه، 1991؛ Beattie وزملاؤه، 1998)، *Staphylococcus*، *Clostridium*، *Escherichia coli* (Helm وزملاؤه، 1991؛ Naumann، 1998)، *Lactobacillus* (Curk وزملاؤه، 1994).

والبكتريا التابعة للنوع *Bacillus cereus* هي بكتريا هوائية متبوغة توجد عادة في التربة، على الخضراوات وفي العديد من الأغذية الطازجة أو المصنعة، ويؤدي استهلاك الغذاء الحاوي على تركيز أعلى من 10^6 CFU/mL إلى التسمم الغذائي (Rhodehamel وHarmon، 1998).

وتعزل بكتريا *Bacillus cereus* من أنواع الأغذية المختلفة التي تشمل الأرز والتوابل واللحوم والبيض ومنتجات الألبان (Johnson، 1984). ويمكن أن يسبب هذا النوع فساد الغذاء، وهو يرتبط بنوعين من الأمراض وهما الإسهال أو التقيؤ، وينتج مرض التقيؤ عن السم الثابت حرارياً (cereulide) (Kuhm وزملاؤه، 2010). ويتميز الأول منهما بألم بطني وإسهال وبفترة حضانة 4-16 ساعة، وتستمر الأعراض من 12 إلى 24 ساعة؛ أما النوع الثاني فيتميز بالغثيان الحاد والتقيؤ الذي يحدث بعد 1-5 ساعات من استهلاك الغذاء الملوث، ولا يظهر الإسهال في هذا النوع (Rhodehamel وHarmon، 1998). ويحدث التسمم الغذائي الناتج عن بكتريا *Bacillus cereus* عندما يحضر الغذاء ويحفظ بدون تبريد كاف لعدة ساعات قبل الاستهلاك (Rhodehamel وHarmon، 1998). ويعتبر النوعان *Bacillus mycoides* و *Bacillus thuringiensis* شديدي القرابة بالنوع *Bacillus cereus*، وهما قادران أيضاً على إنتاج السموم المعوية (enterotoxins) (Beattie، 1997)، ويمكن أن تسبب الأنواع الشديدة القرابة بالنوع *B. cereus* العدوى أيضاً (Damgaard، 1995).

ومن الصعب التمييز بين سلالات *B. cereus*، *B. thuringiensis* و *B. mycoides* باستخدام اختبارات استخدام السكريات لوحدها (Logan وBerkeley، 1984). غير أن من الممكن تمييز هذه الأنواع عن بعضها باستخدام تحليل الأحماض الدهنية (Wintzingerode وزملاؤه، 1997)، ويمكن تصنيف سلالات بكتريا *B. cereus*، *B. myccoides* و *B. thuringiensis* باستخدام كروماتوغرافيا التحلل الحراري الغازية-السائلة (pyrolysis gas-liquid chromatography) (O'Donnell وزملاؤه، 1980)، أو باستخدام تقانة FTIR-ATR، فقد وجد Faber (1999) الذي قام بمقارنة بين طريقتي FTIR-ATR والانعكاس الكلي المنتشر للتمييز بين النوعين *B. cereus* و *B. subtilis*، وأن طريقة FTIR-ATR هي الطريقة الأفضل بدقة 100%.

وهدف البحث إلى دراسة إمكانية استخدام طريقة FTIR-ATR بوصفها طريقة سريعة وموثوقة لتمييز العزلات البكتيرية التابعة للجنس *Bacillus* المعزولة من الأغذية، نظراً للصعوبة الكبيرة لتحديدها بالطرائق التقليدية، إضافة إلى أنها تعطي نتائج مضللة أحياناً.

مواد البحث وطرائقه

حُصل على 45 عزلة من البكتريا التابعة للجنس *Bacillus* من أنواع مختلفة من الأغذية (بهارات، حبوب، حليب مجفف)، وفق Ludwig وزملائه (2009) بتسخين معلق العينة في الماء منزوع الشوارد بنسبة 1 : 2 (وزن/حجم) بحرارة 80 °م لمدة 10 دقائق في حمام مائي (نموذج Memmert 14wb). ثم وزع المعلق في 5 أطباق من وسط لوريا برتاني آغار (LBA) بمعدل 1 مل لكل طبق على ثلاثة مكررات، وحضنت الأطباق بدرجات الحرارة التالية: 20، 30، 40، 50 و 55 °م، لمدة 24 ساعة وسجلت درجة الحرارة المثالية للنمو، كما سجل النمو عند درجات الحرارة المتبقية (في حال وجوده). وحددت العزلات وفقاً لدليل بيرجي للتصنيف باختبارات صبغة غرام وفحص الأبواغ بطريقة Benson (2001) والاختبارات الآتية:

1. النمو عند درجات pH مختلفة: درس النمو على درجات pH 5، 6، 7 و8: بحسب (Benson، 2001).
2. القدرة على النمو بدرجات حرارة مختلفة: 20، 30، 40، 50، 55 °م: بحسب (Whitman، 2009).
3. النمو عند مستويات مختلفة من الملح NaCl: 2، 5 و7%: بحسب (Benson، 2001).
4. اختبار فوغس بروسكاور: بحسب (Benson، 2001).
5. اختبارات حلمأة الجيلاتين، وحلمأة الإسكولين، واستخدام السترات، بيتا-غالاكتوزيداز، لايزين ديكاربوكسيلاز، وأورنيثين ديكاربوكسيلاز، وإنتاج الحمض من السكريات بحسب (Harrigan، 1998).

وحُصل على أطياف FTIR-ATR بتحضير معلق تركيزه 2 على مقياس McFarland باستخدام جهاز قياس العكارة (Densemat) (شركة bioMérieux) من المستعمرات النقية النامية على أطباق (LBA) المحضنة عند درجة الحرارة المثالية للنمو لكل نوع لمدة 24 ساعة، عبر نقل المستعمرات باستخدام حلقة إبرة تلقيح معقمة إلى أنبوب يحوي الماء المقطر وتعليقها بالرج باستخدام مقلب نموذج Velp حتى الوصول إلى تركيز 2 McFarland، ونقل حوالي 0.5 مل من هذا المعلق مباشرة إلى وحدة ATR المكونة من موشور مصنوع من مادة ZnSe مع تجنب تكوين الفقاعات، وأجري المسح بدرجة حرارة الغرفة ضمن المجال 4000-400 سم$^{-1}$ بمعدل 512 مكرر لكل عينة باستخدام جهاز FT-IR نموذج JASCO 6300. واستخدم الماء المقطر شاهداً.

ثم أجري التحليل الإحصائي المتعدد المتغيرات بطريقة تحليل المكون الرئيسي (principal component analysis) PCA باستخدام برنامج SPSS النسخة 17.

النتائج والمناقشة

نتائج التصنيف باستخدام دليل بيرجي (Whitman، 2009)

الاختبارات الفيزيائية والصبغات: أجريت اختبارات القدرة على النمـــو (الجـــدول1) بدرجات حرارة ودرجات pH مختلفة، واختبارات النمو عند مـــستويات NaCl مختلفـــة، وكذلك اختبارات صبغة غرام، صبغ الأبواغ.

الجدول (1) نتائج الاختبارات الفيزيولوجية واختبارات الصبغات

الاختبار/النوع	*B. cereus*	*B. pumilus*	*B. subtilis*	*B. lentus*	*B. megaterium*
صبغة غرام	عصيات موجبة	عصيات موجبة	عصيات موجبة	عصيات موجبة	عصيات موجبة
تكوين الأبواغ	+ [1]	+	+	+	+
النمو بدرجة pH					
5	- [2]	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
النمو بدرجة حرارة°س					
20	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+
40	+	+	+	-	-
50	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-
النمو بوجود NaCl%					
2	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	-	+	+	-	+
[1] + **إيجابي/وجود النمو** [2] - **سلبي/غياب النمو**					

يلاحظ من الجدول (1) أن جميع الأنواع المدروسة هي عبارة عن عصيات موجبـــة غرام مكونة للأبواغ، وغياب النمو بدرجة pH 5 لكافة الأنواع، في حين أنها تنمو بدرجة pH من 6-8. أما بخصوص درجة حرارة النمو فالأنواع جميع ها تنمو بدرجة حـــرارة 20 و30° س، ولا تنمو بدرجتي الحـــرارة 50 و55° س، فـــي حـــين تنمـــو الأنـــواع *B. cereus*، *B.pumilus* و*B. subtilis* بدرجـــة حـــرارة 40° س، ولا ينمـــو النوعـــان *B. lentus* و*B. megaterium* في درجة الحرارة هذه.

وتستطيع الأنواع المدروسة جميعُها النمو بوجود نسب 2-7% من كلوريد الصوديوم في وسط النمو ما عدا النوعين *B. cereus* و*B. lentus* اللذين لا يستطيعان النمو بوجـــود نسبة 7% من كلوريد الصوديوم.

الاختبارات البيوكيميائية: أجريت اختبارات فوغس-بروسكاور (Voges Proskauer)، وحلمأة الجيلاتين، وحلمأة الإسكولين، واستخدام السترات، وإنتاج الحمض من الـــسكريات المختلفة (الجدول 2).

الجدول (2) نتائج الاختبارات البيوكيميائية

الاختبار/النوع	*B. cereus*	*B. pumilus*	*B. subtilis*	*B. lentus*	*B. megaterium*
بيتا-غالاكتوزيداز	-	+	+	+	+
لايزين ديكاربوكسيلاز	-	-	-	-	-
أورنيثين ديكاربوكسيلاز	-	-	-	-	-
فوغس-بروسكاور	+	+	+	-	-
حلمأة الجيلاتين	+	+	+	-	+
حلمأة الإسكولين	+	+	+	+	+
استخدام السترات	+	+	+	+	+
غليسرول	+	+	+	-	+
إيريثريتول	-	-	-	-	-
د-أرابينوز	-	+	-	-	-
ل-أرابينوز	-	+	+	+	+
د-رايبوز	+	+	+	+	+
د-زايلوز	-	+	+	+	+
ل-زايلوز	-	-	-	-	-
د-أدونيتول	-	-	-	-	-
ميثيل بيتا-د-زايلوبايرانوزايد	-	-	-	-	-
د-غالاكتوز	-	+	-	-	+
د-غلوكوز	+	+	+	-	+
د-فركتوز	+	+	+	-	+
د-مانوز	-	+	+	-	+
ل-سوربوز	-	-	-	-	-
ل-رامنوز	-	-	-	-	-
دولسيتول	-	-	-	-	-
إينوسيتول	-	-	+	-	-
د-مانيتول	-	+	+	-	+
د-سوربيتول	-	-	+	-	+
ميثيل ألفا د-مانوبايرانوزايد	-	-	-	-	-
ميثيل ألفا د-غلوكوبايرانوزايد	-	+	+	-	-
ن-أستيل غلوكوزأمين	+	-	-	-	+
أميغدالين	-	-	+	-	-
أربوتين	+	-	-	-	-
ساليسين	+	+	-	+	+
د-سيلوبيوز	+	+	+	+	+
د-مالتوز	+	+	+	+	+
د-لاكتوز	-	-	-	+	-
د-ميليبيوز	-	-	+	+	+
د-سكروز	+	+	+	+	+
د-تريهالوز	+	+	+	+	+
إينولين	-	-	+	+	+
د-ميليزيتوز	-	-	-	+	-
د-رافينوز	-	-	+	+	+
نشاء	+	-	-	-	+
غلايكوجين	+	-	+	-	+
زايليتول	-	-	-	-	-
جينتيوبيوز	-	-	-	-	-
د-تورانوز	-	+	-	-	+
د-لايكسوز	-	-	-	-	-
د-تاغاتوز	-	+	-	-	-
د-فوكوز	-	+	-	-	-
ل-فوكوز	-	-	-	-	-
د-أرابيتول	-	-	-	-	-
ل-أرابيتول	-	-	-	-	-
غلوكونات البوتاسيوم	-	-	-	-	-
2-كيتوغلوكونات البوتاسيوم	-	-	-	-	-
5-كيتوغلوكونات البوتاسيوم	-	-	-	-	-

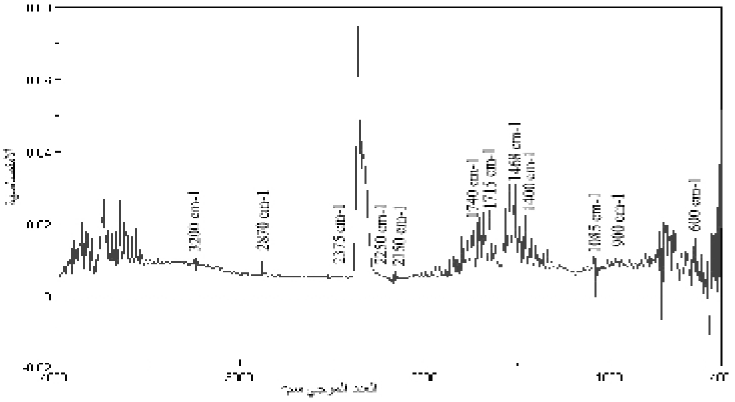
(1) + إيجابي/وجود النمو (2) - سلبي/غياب النمو

يلاحظ من الجدول (1) أن هناك اختبارات معينة قادرة على تمييز أنواع بكتريا *Bacillus* الخمسة المدروسة؛ فقد وجد أن بكتريا النوع *B.cereus* تختلف عن بقية الأنواع بسلبية اختبارات بيتا-غالاكتوزيداز، ل-أرابينوز ود-زايلوز.

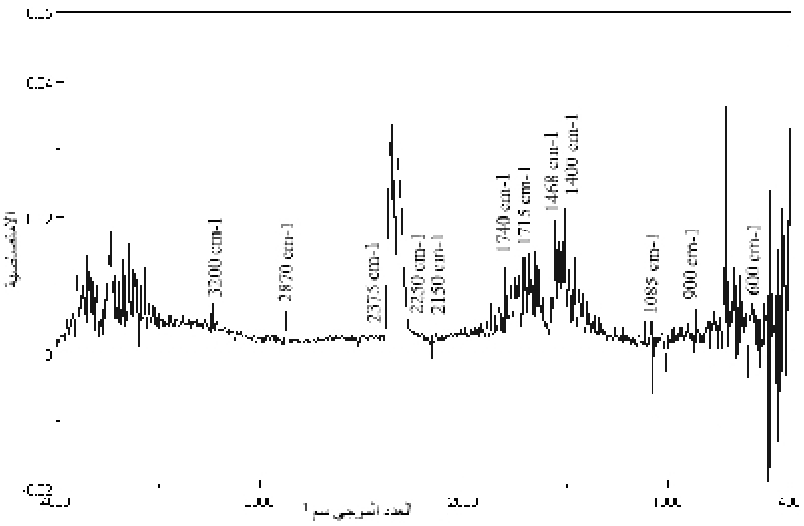
ويمكن تمييز بكتريا النوع *B. pumilus* عن الأنواع الأخرى بإيجابية اختبارات د-أرابينوز، د-فوكوز ول-فوكوز. كما أن بكتريا النوع *B. subtilis* تمتاز بإيجابية اختباري إينوسيتول وأميغدالين وسلبية اختبارٍ ساليسين بخلاف الأنواع الأربعة الأخرى المدرجة في الجدول السابق. وبينت الدراسة أيضاً أن بكتريا النوع *B.lentus* سلبية الغليسرول، وهي لا تستطيع حلمأة الجيلاتين وتخمير سكريات د-غلوكوز ود-فركتوز، في حين أنها تستطيع تخمير سكري لاكتوز ود-ميليزيتوز بعكس بقية الأنواع الأخرى المدروسة.

نتائج التصنيف باستخدام FTIR-ATR: أجري المسح الطيفي للعينات ضمن المجال 4000-400 سم$^{-1}$ باستخدام وحدة ATR الحاوية على موشور مصنوع من مادة ZnSe. والأشكال الآتية توضح الأطياف التي حصل عليها لكل نوع من الأنواع المدروسة، وهي: (*B. cereus* ،*B .megaterium* ،*B. lentus* ،*B. subtilus* ،*B. pumilus*):

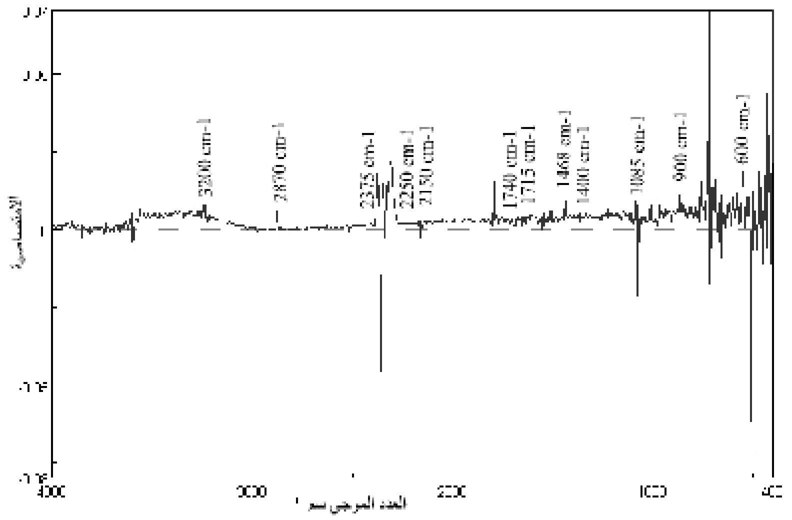
إن مقارنة الأطياف السابقة عند العدد الموجي 3200 سم$^{-1}$ [تمدد N-H للأميد A في البروتينات (Davis و Mauer، 2010)] والعدد الموجي 2870 سم$^{-1}$ [التمدد المتناظر لـ C-H لـ -CH_3- في الأحماض الدهنية (Naumann، 2000)] تبين وجود تشابه بين الأنواع *B. pumilus* و *B. lentus* و *B. megaterium*، في حين تلاحظ اختلافات بين النوعين الباقيين (*B. subtilis* ،*B. cereus*)، ومنه يمكن تمييز النوعين الأخيرين بعضهما عن بعض من جهة، وتمييز كل منهما عن الأنواع *B. pumilus* و *B. lentus* و *B. megaterium* من جهة ثانية. غير أنه لا يمكن تمييز الأنواع الثلاثة الأخيرة بعضها عن بعض اعتماداً على العددين الموجيين السابقين.



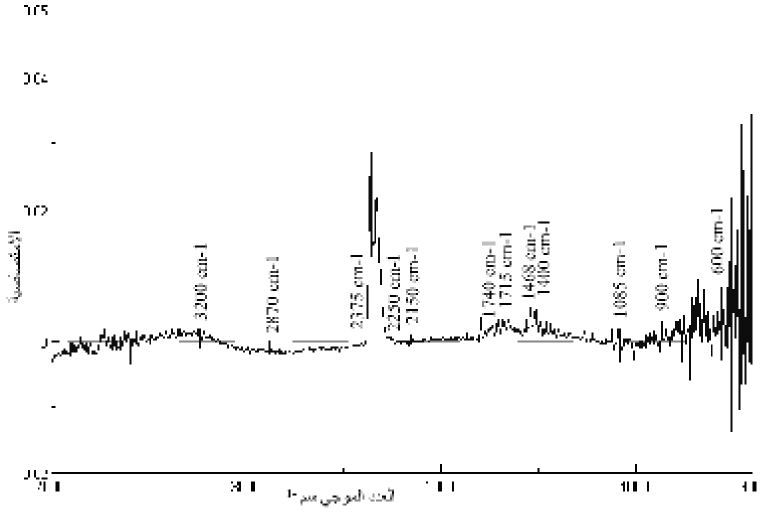
الشكل (1-أ) طيف FTIR-ATR لبكتريا *B. pumilus*



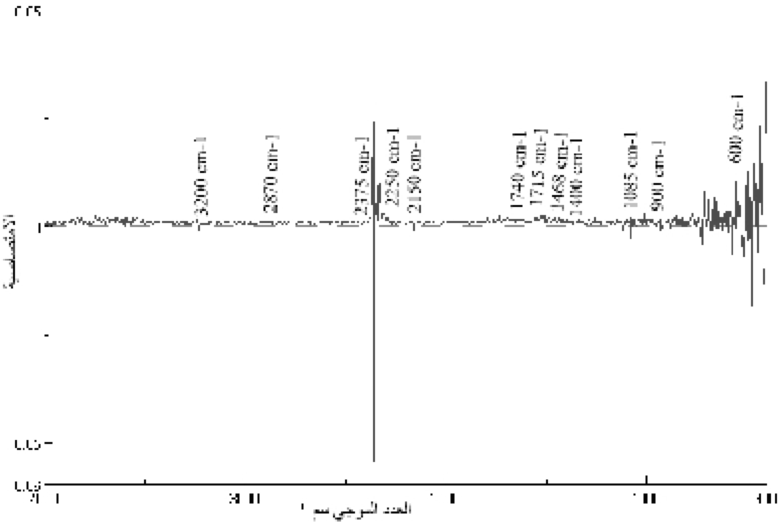
الشكل (1-ب) طيف FTIR-ATR لبكتريا *B. subtilis*



الشكل (1-ج) طيف FTIR-ATR لبكتريا *B. lentus*



الشكل (1-د) طيف FTIR-ATR لبكتريا *B. megaterium*



الشكل (1-هـ) طيف FTIR-ATR لبكتريا *B. cereus*

ولا توجد اختلافات بين الأطياف السابقة كافة عند الأعداد الموجية 2955 و2930 و2898 سم$^{-1}$ (التمدد غير المتناظر C-H في المجموعة CH3– في الأحماض الدهنية، والتمدد غير المتناظر C-H في المجموعة CH2< في الأحماض الدهنية وتمدد C-H في المجموعة ≥C-H في الأحماض الأمينية على الترتيب (Davis وMauer، 2010). وبالتالي لا يمكن التمييز بين الأنواع الخمسة المدروسة التابعة للجنس *Bacillus* بالاعتماد على هذه المناطق الطيفية. إن المنطقة الطيفية 2375-2250 سم$^{-1}$ هي أكثر المناطق تميزاً في الأطياف، إذ يمكن تمييز الأنواع الخمسة المدروسة بعضها عن بعض ضمن المنطقة الطيفية السابقة.

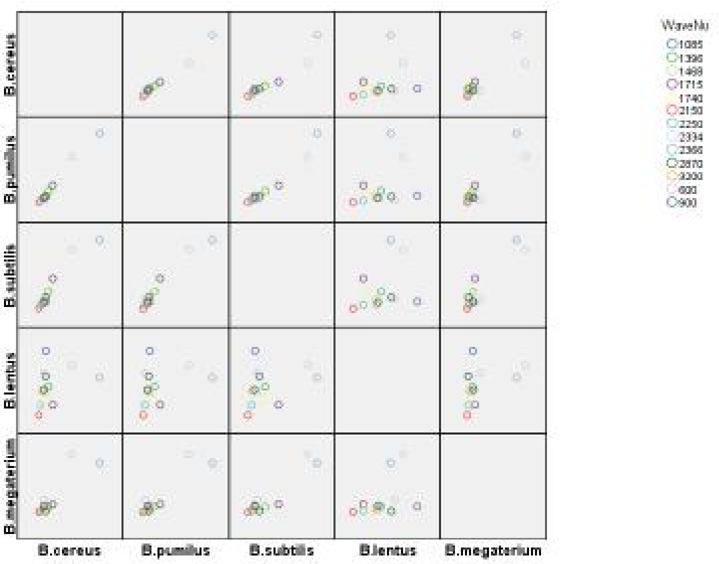
أمكن تمييز النوع *B.cereus* عند العدد الموجي 2150 سم$^{-1}$عن بقية الأنواع التابعة لهذا الجنس، في حين لا يمكن تمييز بقية الأنواع الأربعة (*B. pumilus*، *B. subtilis*، *B. lentus* و *B. megaterium*).

ويلاحظ التشابه في الأطياف بين النوعين *B. pumilus* و*B. subtilis* عند العدد الموجي 1740 سم$^{-1}$ (الخاص بالتمدد C=O< لإسترات اللبيدات (Sanjai وChorover، 2006)، والعدد الموجي 1715 سم$^{-1}$ (الخاص بتمدد C=O< للإستر في الأحماض النووية والأحماض الكربوكسيلية)، والمنطقة الطيفية 1695-1675 سم$^{-1}$ (الخاصة بمكونات الحزمة الأميدية I للبروتين)، والعدد الموجي 1655 سم$^{-1}$ (الخاص بالأميد I للتركيب ألفا الحلزوني للبروتينات (Sanjai و Chorover، 2006)، والعدد الموجي 1468 سم$^{-1}$ (التشويه C-H لمجموعة CH_2< في اللبيدات والبروتينات)، والعدد الموجي 1415 سم$^{-1}$ (الانحناء المستوي C-O-H في الكربوهيدرات وهيكل RNA/DNA والبروتينات) و1400 سم$^{-1}$ (الاهتزاز المتناظر C=O لمجموعة -COO في الأحماض الأمينية والدهنية) (Naumann، 2000).

ولوحظ اختلاف واضح في أطياف بقية الأنواع وهي: *B. lentus*، *B. megaterium* و*B.cereus*. ولذلك يمكن تمييز الأنواع الأخيرة ضمن الأعداد والمجالات الموجية السابقة. وتتشابه أطياف الأنواع *B. pumilus*، *B. subtilis* و*B. lentus* عند العدد الموجي 1085 سم$^{-1}$ (التمدد المتناظر P=O في الـ DNA وRNA والفوسفولبيدات (Davis وMauer، 2010)، في حين يوجد اختلافات في الطيفين الخاصين بالنوعين *B. megaterium* و*B. cereus*، وأمكن تمييز النوعين السابقين بعضهما عن بعض من جهة، وعن باقي الأنواع من جهة ثانية. ولم يمكن تمييز الأنواع الثلاثة الأولى.

ويلاحظ كذلك وجود اختلافات بين الأنواع المدروسة جميعها في المنطقة الطيفية 900-600 سم$^{-1}$ (منطقة البصمة (Naumann، 2000). وبالتالي أمكن تمييز هذه الأنواع بعضها عن بعض بمقارنة الأطياف الخاصة بها عند المنطقة الطيفية السابقة.

نتائج التحليل الإحصائي: أجري التحليل الإحصائي المتعدد المتغيرات بطريقة PCA عند الأعداد الموجية التي لوحظ فيها وجود اختلافات بين الأنواع الخمسة المدروسة. والشكل (2) يبين نتائج التحليل السابق، إذ يلاحظ وجود تشابه بين النوعين (*B. cereus* و*B. megaterium*)، (*B. cereus* و*B. pumilus*)، (*B. pumilus* و*B. megaterium*)، (*B. pumilus* و*B. subtilis*) وبدرجة أقل بين النوعين (*B. cereus* و*B. subtilis*)، في حين تلاحظ الاختلافات الواضحة بين النوع *B. lentus* وبقية الأنواع الأربعة المدروسة.



الشكل (2) نتائج التحليل الإحصائي متعدد المتغيرات بطريقة PCA

واستنتج أنً استخدام تقانة FTIR-ATR تساعد في تمييز أنواع البكتريا المدروسة التابعة للجنس *Bacillus* وهي: *B. cereus*، *B. pumilus*، *B.subtilis*، *B. lentus* و*B. megaterium* وبخاصة في منطقة البصمة (900-600 سم$^{-1}$) بدقة وسهولة كبيرة وسرعة (فهي تحتاج فقط إلى 10 دقائق للتشخيص) وبتكلفة قليلة (تكلفة تحضير العينات والتشخيص تقتصر فقط على تحضير معلق البكتريا ولا تحتاج إلى أوساط وكواشف).

References المراجع

Al-Qadiri, H. M., M. A. Al-Holy. M. Lin. N. I. Alami. A. G. Cavinato and B. A. Rasco. 2006. Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. J. Agric. Food Chem., 54(16): 5749-5754.

Beattie, S. H. 1997. The incidence and importance of *Bacillus* species in raw milk and the dairy environment. Ph. D. thesis, Glasgow University.

Beattie, S. H., C. Holt. D. Hirst and A. G. Williams. 1998. Discrimination among *Bacillus cereus, B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by fourier transform infrared spectroscopy. FEMS. Microbiol. Lett., 164: 201-206.

Benson, H. J. 2001. Microbiological applications laboratory manual in general microbiology. In microscope slide techniques. 8th edition. The McGraw-Hill. Pp: 64-68.

Burgula, Y., D. Khali. S. Kim. S. S. Krishnan. M. A. Cousin. B. L. Reuhs and L. J. Mauer. 2006. Detection of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* using filtration followed by FT-IR spectroscopy. J. Food Prot., 69:1777-1784.

Burgula, Y., B. L. Reuhs and L. J. Mauer. 2008. Rapid FT-IR methods for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices. http://www.iufost.org/publications/world_of_ food_science, 15/3/2013.

Curk, M. C., F. Peladan. and J. C. Hubert. 1994. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol. Lett., 123: 241-248.

Damgaard, P.H. 1995. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 12: 245-250.

Davis, R., and L. J. Mauer. 2010. Fourier tansform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. Mendez-Vilas, A. (Ed). Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Pp: 1582-1594.

Faber, N. M. 1999. Estimating the uncertainty in estimates of root mean square error of prediction: application to determining the size of an adequate test set in multivariate calibration. Chemom. Intell. Lab. Syst., 49: 79-89.

Harrigan, W. F. 1998. Laboratory methods in food microbiology, 3ed. Academic Press, California, USA. Pp: 100-117.

Helm, D., H. Labischinski. G. Schallehn. and D. Naumann. 1991. Classification and identification of bacteria by Fouriertransform infrared spectroscopy. J. Gen. Microbiol., 137(1): 69-79.

Holt, C., D. Hirst. A. Sutherland and F. MacDonald. 1995. Discrimination of species in the genus Listeria by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis. Appl. Environ. Microbiol., (61): 377-378.

Johnson, K. M. 1984. *Bacillus cereus* foodborne illness : an update. J. Food Prot., 47: 145-153.

Kuhm, A., M. Contzen. and J. Rau. 2010. FT-IR a helpful tool for the differentiation of *Bacillus* species in food control. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstr. P: 1.

Lefier, D., D. Hirst. C. Holt and A. G. Williams. 1997. Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus Listeria by Fourier transform

infrared spectroscopy and canonical variates analysis. FEMS Microbiol. Lett., 147: 45-50.

Logan, N. A., and R. C. W. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. J. Gen. Microbiol., 130: 1871-1882.

Ludwig, W., K. H. Schleifer and W. B. Whitman. 2009. Class I. *Bacilli* class nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. De Vos, Garrity, P., G. Jones. D. Krieg, N. R. Ludwig. W. Rainey. F.A. Schleifer. K.H. and W. B. Whitman (eds.), 2ed Edition, Springer-Verlag, New York, 3: 19-120.

Naravaneni, R. and J. Kaiser. 2005. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. J. Med. Microbiol., 54: 51-54.

Naumann, D., 1998. Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology. Proc. SPIE, 3257: 245-257.

Naumann, D. 2000. Infrared spectroscopy in microbiology. In Encyclopedia of analytical chemistry. Meyers, R. A., (ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester. Pp: 102-131.

Naumann, D., V. Fijala. H. Labischinski and P. Giesbrecht. 1988. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. J. Mol. Struct., 174: 165-70.

O'Donnell, A. G., H. J. H. MacFie and J. R. Norris. 1980. An investigation of the relationship between *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* using pyrolysis gas-liquid chromatography. J. Gen. Microbiol., 119: 189-194.

Puzey, K. A., P. J. Gardner. V. K. Petrova. C. W. Donnelly and G. A. Petrucci. 2008. Automated species and strain identification of bacteria in complex matrices using FTIR spectroscopy. SPIE, 6954: 9.

Rebuffo, C. A., J. Schmitt. M. Wenning. F. Von Stetten and S. Scherer. 2006. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol., 72: 994-1000.

Rhodehamel, E. J. and S. M. Harmon. 1998. Bacillus cereus, In: AOAC International, Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual (8th edition, revision A), Gaithersburg, MD, USA, Pp: 14.01-14.08.

Sanjai, J. P. and J. Chorover. 2006. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. Langmuir, 22: 8492-8500.

Whitman, W.B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ed Edition, Springer-Verlag, New York.

Winder, C. L. and R. Goodacre. 2004. Comparison of diffuse-reflectance absorbance and attenuated total reflectance FT-IR for the discrimination of bacteria. The Analyst., 129: 1118-1122.

Wintzingerode, F. V., F. A. Rainey. R. M. Kroppemstedt and Stackebrandt E. 1997. Identification of environmental strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rRNA oglionucleotide probe. FEMS Microbiol. Ecol., 24: 201-209.

Received	2013/09/30	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2014/03/25	قبول البحث للنشر