



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد  
كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم  
قسم علوم الحياة

# دراسة مظهرية وجزئية لتأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية على بكتريا *Cronobacter sakazakii*

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ابن الهيثم - جامعة بغداد  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة / الاحياء المجهرية  
من قبل

كاردينيا عامر اسماعيل عبد الحافظ الشبخلي

بكالوريوس علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/ ابن الهيثم -جامعة بغداد

2016 - 2015

باشراف

الاستاذ المساعد الدكتورة لى عبد الهادي زوين

اب 2019 م

ذو الحجة 1440 هـ

# بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(هُوَ الَّذِي بَعَثَ فِي الْأُمِّيِّينَ رَسُولًا مِّنْهُمْ يَتْلُوا  
عَلَيْهِمْ آيَاتِهِ وَيُزَكِّيهِمْ وَيُعَلِّمُهُمُ الْكِتَابَ  
وَالْحِكْمَةَ وَإِن كَانُوا مِن قَبْلُ لَفِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ ﴿٢﴾)

﴿صدق الله العظيم﴾

سورة الجمعة

الاية (٢)

## أقرار المشرف

اشهد أن اعداد هذه الرسالة قد جرى تحت اشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم/ جامعة بغداد، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / احياء المجهرية.

التوقيع:

المشرف: ا.م. د لى عبد الهادي زوين

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن

الهيثم/ جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 12 / 2

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه أرشح هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدارستها وبيان

الرأي فيها

التوقيع:

الاسم: د. ثامر عبد الشهيد محسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم/جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 12 / 4

## إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه ، نشهد أننا اطلعنا على الرسالة الموسومة (دراسة  
مظهرية وجزئية لتأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية على بكتيريا *Cronobacter*  
*sakazakii*) من قبل الطالبة (كاردينيا عامر اسماعيل ) ، وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له  
علاقة بها وذلك بتاريخ ٢٠١٩/١١/٤ ووجدناها مستوفية لمتطلبات درجة الماجستير علوم في علوم  
الحياة/ الاحياء المجهرية وعليه نوصي بقبول الرسالة.

عضو اللجنة

التوقيع:

الأسم : أ.د.رنا مجاهد عبد الله

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان:جامعة بغداد/كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم

التاريخ: ٢٠١٩ / ١٢ / ٢

رئيس اللجنة

التوقيع:

الأسم: أ.د.جيهان عبد الستار سلمان

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: الجامعة المستنصرية/كلية العلوم

التاريخ: ٢٠١٩ / ١٢ / ٣

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

الأسم : أ.م.د.لمى عبد الهادي زوين

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان:جامعة بغداد/كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم

التاريخ: ٢٠١٩ / ١٢ / ٢

عضو اللجنة

التوقيع:

الأسم: أ.م.د.محمد مهدي جواد

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان:جامعة بغداد/كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم

التاريخ: ٢٠١٩ / ١٢ / ٢

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم/ جامعة بغداد

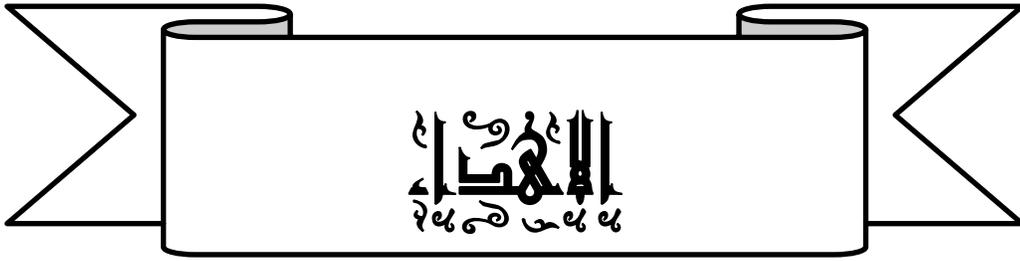
التوقيع:

أ.م.د. فراس عبد الحميد عبد اللطيف

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان:كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم/جامعة بغداد

التاريخ: ٢٠١٩ / ١٢ / ٤



الى الشمسُ التي أمدتني من نورها ودفنُها وقوتها .... أمي الحبيبة

الى القمرُ الذي أنار دربي في أصعب الليال .... أبي الحبيب

الى النجمُ الصغير الذي رافقني في كل حياتي ..... أخي الحبيب

الى الكوكب الذي زادني علماً بأسراره .... مشرفتي الفاضلة

## شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على افضل خلق الله سيدنا محمد صلى الله عليه واله  
وصحبه وسلم اجمعين

اما بعد

اتقدم بجزيل الشكر والثناء والاحترام والتقدير بعد ان انهيت بحثي هذا الى استاذتي وقدوتي في  
العلم والخلق النبيل الى الاستاذ المساعد الدكتورة لى عبد الهادي زوين لاشرفها على  
الرسالة ومابذلته من جهود علمية طيبة فيها .

كما أتقدم بالشكر والتقدير والثناء والاحترام الى عمادة كلية التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة /  
ابن الهيثم / جامعة بغداد والى رئيس قسم علوم الحياة الدكتور ثامر عبد الشهيد محسن والى  
جميع اساتذتي الافاضل لما قدموه من معلومات علمية ونصائح وارشادات

كما اتقدم بجزيل الشكر والامتنان الى المدرس المساعد ذاريات عبد الرحمن مطلق الجبوري  
لمساعدتها لي في الحصول على عزلات البكتريا مجهزة من قبلها

والشكر الجزيل الى جميع زملائي من طلبة الدراسات العليا لمساندتهم الي طول مدة الدراسة

## الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للتحري عن مدى تثبيط نمو بكتريا *Cronobacter sakazakii* باستعمال مركبات (Trans-cinnamaldehyde، Resveratrol، Inulin، Curcumin، Citral)، وتم الحصول على 17 عزلة من مصادر سابقة، وتضمنت 6 عزلات من عينات الدم (B) و6 عزلات من سائل النخاع الشوكي (CSF) و3 عزلات من عينات حليب Dialac (A1) وعزلة واحدة من حليب Novolac Allernova (C1) وعزلة واحدة من عينة الحليب Novolac AD (C2) اذ زرعت العزلات على وسطي الاكار ماكونكي ووسط تربتون صويا الصلب ثم شخّصت جميع العزلات باستعمال جين التشخيص 16S rRNA وكانت جميعها تعود لبكتريا *C. sakazakii*.

بينت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *C. sakazakii* مظهرياً، ان جميع العزلات لها القدرة على الحركة Motility، واحداث حركة السباحة Swimming بقطر يتراوح (17-79) ملم، وتكوين ظاهرة الانثيال Swarming بقطر يتراوح (4-46) ملم، كما لوحظ قدرتها على انتاج انزيم البروتيز Protease بقطر يتراوح (8-30) ملم، و قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة Microtiter Plate.

دُرس تأثير كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin، Curcumin، Citral)، (Trans-cinnamaldehyde، Resveratrol) في نمو بكتريا *C. sakazakii* للعزلات المنتخبة (CSF4، B4، A1b) باستعمال كل من التركيز (1، 10، 100) مايكروغرام / ملتر فقد أظهرت جميع المركبات فعلاً تثبيطياً عند التراكيز العالية، اما مركب Trans-cinnamaldehyde فقد اظهر فعلاً تثبيطياً عند التراكيز الواطئة والعالية.

تم دراسة تأثير كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في ظاهرتي السباحة Swimming والانثيال Swarming على كل من العزلة (A1b، B4، CSF4) فقد أظهرت كل المركبات تأثيراً تثبيطياً وبنسب متفاوتة اعتماداً على نوع المركب وتركيزه.

كما درس تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في عوامل ضراوة أخرى لبكتريا *C. sakazakii* مثل انتاج انزيم البروتيز في العزلات المنتخبة، واطهر تأثير المركبات قيد الدراسة كان مختلف اعتماداً على نوع العزلة والتركيز المستخدم . اما تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلات بكتريا *C. sakazakii* فقد أظهرت فعالية المركبات في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي عند التراكيز المنخفضة والعالية.

درس تأثير درجات الحرارة المختلفة في نمو جميع العزلات لبكتريا *C. sakazakii* اذ أظهرت درجة الحرارة 55°م انخفاضاً في نمو البكتريا مقارنةً بدرجة 25 و 37°م .  
درس تأثير الرقم الهيدروجيني pH في نمو جميع العزلات لبكتريا *C. sakazakii* فقد لوحظ انخفاض نمو البكتريا عند الرقم الهيدروجيني الحامضي 4 مقارنةً بالرقم الهيدروجيني القاعدي 9 والمتعادل 7 .

تم التحري عن بعض جينات الضراوة لبكتريا *C. sakazakii* وتضمنت هذه الجينات كلاً من *zpx* وجين *flgJ* وأظهرت النتائج وجود هذه الجينات بنسبة 100% في العزلة CSF4 .

درس تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في مقدار التعبير الجيني لجين *flgJ*، اذ تشير النتائج الى وجود تباين في مستويات التعبير عن جين *flgJ* بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* في العزلة CSF4، اذ ادى مركب Curcumin بتركيز تحت الأدنى المثبط Sub minimum

inhibition concentration (SMIC) (انتخب على اساس تجارب منفردة) الى خفض التعبير الجيني الى 0.2 Folding Change مقارنةً مع معاملة السيطرة والمركبات الأخرى ، ودرس تأثير المركبات في جين *zpx*، وقد أشارت النتائج الى وجود زيادة في مستويات التعبير عن جين *zpx* بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* للعزلة (CSF4) مقارنةً مع معاملة السيطرة .

درس تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في مقدار التعبير الجيني لجين *flgJ* باستعمال وسط Swimming ووسط Swarming بعد معاملة بكتريا *C. Sakazakii* للعزلة CSF4 ، فقد لوحظ انخفاض التعبير عن جين *flgJ* للعزلة الممتالة الى 0.14 Folding change مقارنةً مع معاملة السيطرة في حين أدى الى زيادة التعبير عن جين *flgJ* في العزلة السابحة الى Folding Change 13.65 مقارنةً بمعاملة السيطرة.

اما تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في مقدار التعبير الجيني لجين *zpx* باستعمال وسط Swarming ووسط Swimming بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* للعزلة CSF4 اذ أدى الى زيادة التعبير عن جين *zpx* في ظاهرة Swarming و Swimming مقارنةً بمجموعة السيطرة.

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
1	الفصل الأول /المقدمة	1
	الفصل الثاني/ استعراض المراجع	2
5	الصفات العامة لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	1-2
6	Nomenclature and Classification of تسمية وتصنيف Cronobacter Bacteria	2-2
7	<i>Cronobacter sakazakii</i> Source مصادر بكتريا	3-2
7	Food and Enviromental sorces المصادر البيئية والغذائية	1-3-2
8	Clinical Sorces المصادر السريرية	2-3-2
9	Pathogenicity الامراضية	4-2
10	Virulence Factor عوامل الضراوة	5-2
11	Lipopoly saccharide (LPS) السكريات المتعددة الدهنية	1-5-2
11	Endotoxin الذيفان الداخلي	2-5-2
12	O-antigen المستضد السطحي	3-5-2
12	Capsule المحفظة	4-5-2
13	Biofilm الغشاء الحيوي	5-5-2
14	Flagellum الاسواط	6-5-2
14	OmpA ،OmpX بروتينات الغشاء الخارجي	7-5-2
15	Cronobacter Plasminogen activator (cpa)	8-5-2
15	Zpx جين	9-5-2
16	Enviroment Adaptation التكيف مع البيئة	6-2
17	Resistance to antibiotics مقاومة المضادات الحيوية	7-2
18	المركبات ذات المصادر الطبيعية	8-2
18	Citral	1-8-2
19	Curcumin	2-8-2

20	Inulin	3-8-2
20	Resveratrol	4-8-2
21	Trans-cinnamaldhyde	5-8-2
23	الفصل الثالث/ المواد وطرائق العمل	
23	Material And Methods العمل وطرائق العمل	3
23	Materials المواد	1-3
23	Laboratory Equipment and الأجهزة والأدوات المختبرية Instrumens	1-1-3
24	Chemical Materials المواد الكيميائية	2-1-3
25	Culture Media الأوساط الزرعية	3-1-3
26	المركبات ذات المصادر الطبيعية	4-1-3
26	Dyes, Reagents, Solution الصبغات والكواشف والمحاليل	5-1-3
27	Primers تسلسلات البوداي	6-1-3
27	العدد المستعملة في الدراسة	7-1-3
29	Methods طرائق العمل	2-3
29	Sterilization التعقيم	1-2-3
29	Preparation of solution تحضير المحاليل	2-2-3
29	:McFarland محلول العكورة ماكفرلاند	1-2-2-3
30	Normal saline solution المحلول الفسلجي الملحي	2-2-2-3
30	Phosphate Buffer Saline محلول دارى الفوسفات الملحي Solution	3-2-2-3
30	Crystal violet solution محلول صبغة البنفسج البلوري	4-2-2-3
30	Primers solution محاليل البادئات	5-2-2-3
31	Tris - acetate EDTA Buffer محلول دارى الترحيل	6-2-2-3
31	تحضير المركبات ذات المصادر الطبيعية	3-2-3
31	Prepration of culture media تحضير الأوساط الزرعية	4-2-3
31	Ready culture media تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة	1-4-2-3
32	Laboratory Culture media تحضير الأوساط الزرعية التركيبية	2-4-2-3

32	وسط اليوريا الصلب Urea agar	1-2-4-2-3
32	وسط اختبار الحركة Motility media	2-2-4-2-3
32	وسط اختبار حركة السباحة Swimming	3-2-4-2-3
32	وسط اختبار حركة الانثيال Swarming	4-2-4-2-3
33	وسط اكار الحليب الفرز Skim milk agar	5-2-4-2-3
33	وسط حركة السباحة Swimming المضاف له المركبات ذات المصادر الطبيعية	6-2-4-2-3
33	وسط حركة الانثيال Swarming المضاف له المركبات ذات المصادر الطبيعية	7-2-4-2-3
33	وسط انتاج انزيم البروتيز المضاف له المركبات ذات المصادر الطبيعية	8-2-4-2-3
34	العزلات البكتيرية Bacterial Isolates	5-2-3
34	جمع العزلات البكتيرية Bacterial Isolates Collection	1-5-2-3
34	التشخيص المزرعي	2-5-2-3
34	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test	3-5-2-3
34	اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	1-3-5-2-3
35	اختبار تخمر السكريات وإنتاج غاز ثنائي أوكسيد الكربون وغاز كبريتيد الهيدروجين Kliglar Iron Agar	2-3-5-2-3
35	اختبار انتاج انزيم اليوريز Urease test	3-3-5-2-3
35	استخلاص الدنا البكتيريا الجينومي Genomic DNA extraction	6-2-3
37	التشخيص بوساطة الجين 16S rRNA	7-2-3
38	الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis	8-2-3
39	حفظ العزلات البكتيرية	9-2-3
39	حفظ العزلات لمدة قصيرة Short storage isolates	1-9-2-3
39	حفظ العزلات لمدة طويلة Long storage isolates	2-9-2-3
39	اختبار الحركة Motility	10-2-3
39	اختبار الحركة على وسط السباحة Swimming Motility test	11-2-3
40	اختبار الحركة على وسط الانثيال Swarming Motility test	12-2-3

40	اختبار انتاج انزيم Protease	13-2-3
40	اختبار تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في نمو بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	14-2-3
41	اختبار تاثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في حركة السباحة Swimming لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	15-2-3
41	اختبار تاثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في ظاهرة Swarming لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	16-2-3
41	اختبار المركبات ذات المصادر الطبيعية في انتاج انزيم Protease لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	17-2-3
41	أختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة اطباق المعايرة Micro-titer plate method لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	18-2-3
43	اختبار تاثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو بكتريا <i>Cronobacter sakazaki</i>	19-2-3
43	اختبار تاثير درجات الحرارة	1-19-2-3
43	اختبار تأثير الرقم الهيدروجيني	2-19-2-3
43	الكشف الجزيئي للجين <i>zpx</i> و <i>flgJ</i> باستعمال جهاز التقدير الكمي Real time - PCR لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	20-2-3
46	استخلاص RNA والتعبير الجيني	21-2-3
46	استخلاص RNA والتعبير الجيني للعزلات قيد الدراسة	1-21-2-3
50	استخلاص RNA للعزلات التي تم تتميتها على وسط Swimming و Swarming	2-21-2-3
51	حساب مقدار التغير في مستوى التعبير الجيني حسب المعادلات	22-2-3
51	معادلة حساب نسبة التثبيط	23-2-3
52	الفصل الرابع /النتائج والمناقشة	4
52	جمع وزرع العزلات البكتيرية Collection and culturing of bacterial isolates	1-4
52	تأكيد تشخيص العزلات البكتيرية Isolation and identification of bacterial isolates	2-4

52	Cultural Identification التشخيص المزرعي	1-2-4
52	Biochemical identification التشخيص بالفحوصات الكيموحيوية	2-2-4
54	Molecular identification التشخيص الجزيئي	3-2-4
54	اختبار قدرة عزلات بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i> على الحركة Motility	3-4
56	اختبار قدرة عزلات بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i> على حركة السباحة Swimming والانتقال Swarming	4-4
58	اختبار قدرة عزلات بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i> على انتاج انزيم البروتيز	5-4
59	اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في نمو عزلات بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	6-4
65	اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في ظاهرتي حركة السباحة Swimming والانتقال Swarming لعزلات بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	7-4
72	تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في أنتاج انزيم البروتيز لبكتريا <i>C. sakazakii</i>	8-4
75	تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	9-4
80	اختبار تأثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	10-4
80	اختبار تأثير درجات الحرارة	1-10-4
83	اختبار تأثير الرقم الهيدروجيني pH في نمو بكتريا <i>C. sakazakii</i>	2-10-4
85	Molecular detection of gene الكشف الجزيئي عن الجينات	11-4
86	حساب مستويات التعبير الجيني للجين <i>flgJ, zpx</i> لبكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	12-4
86	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في تعبير الجين <i>flgJ</i>	1-12-4
87	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في تعبير الجين <i>zpx</i>	2-12-4

89	تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في التعبير الجيني لجين <i>flgJ</i> في ظاهرتي السباحة Swimming والانثيال Swarming للعزلة <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	3-12-4
90	تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في التعبير الجيني لجين <i>zpx</i> في ظاهرتي السباحة Swimming والانثيال Swarming للعزلة <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	4-12-4
92	الاستنتاجات	
94	التوصيات	
95	المصادر	
	الملاحق	

## قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
23	الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة	1-3
24	المواد الكيميائية Chemical substances	2-3
25	الأوساط الزرعية Culture media	3-3
26	المركبات ذات المصادر الطبيعية Natural compound	4-3
26	الصبغات والكواشف والمحاليل Dyes, Reagents, Solution	5-3
27	تسلسل ومصدر بواقي الجينات المستعملة في الدراسة	6-3
27	العدد Kits المستعملة في الدراسة	7-3
37	محتويات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للجين 16S rRNA	8-3
37	الظروف المثلى للكشف عن جين 16S rRNA لتشخيص بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	9-3
44	مزيج تفاعل RT-PCR للجين <i>zpx</i>	10-3
44	مزيج تفاعل RT-PCR للجين <i>flgJ</i>	11-3
45	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>zpx</i> باستعمال RT-PCR	12-3
45	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>flgJ</i> باستعمال RT-PCR	13-3
47	مكونات مزيج التفاعل للتعبير الجيني RT-PCR للجين المحافظ	14-3
48	مكونات مزيج التفاعل للتعبير الجيني RT-PCR للجين <i>flgJ</i>	15-3
48	مكونات مزيج التفاعل للتعبير الجيني RT-PCR للجين <i>zpx</i>	16-3
48	الظروف المثلى للتعبير الجيني للجين المحافظ	17-3
49	الظروف المثلى للتعبير الجيني للجين <i>flgJ</i>	18-3
49	الظروف المثلى للتعبير الجيني للجين <i>zpx</i>	19-3
53	الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا <i>Cronobacter sakazakii</i>	1-4
55	اختبار الحركة Motility لعزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i>	2-4

## قائمة الاشكال

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
18	التركيب الكيميائي لمركب Citral ( $C_{10}H_{16}O$ )	1-2
19	التركيب الكيميائي لمركب Curcumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ )	2-2
20	التركيب الكيميائي لمركب Inulin ( $C_{228}H_{382}O_{191}$ )	3-2
21	التركيب الكيميائي لمركب Resveratrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ )	4-2
22	التركيب الكيميائي لمركب Trans-cinnamaldehyde ( $C_9H_8O$ )	5-2
54	الترجيل الكهربائي لنتاج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين 16S rRNA لعزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i> بفرق جهد (100) فولت لمدة 70 دقيقة و 1% Agarose المسار M يمثل الدنا القياسي والمسار (107، 133، 131، 10، 113، 19) تمثل عزلات الدم والمسار (59، 82، 84، 50، 83، 132) تمثل عزلات سائل النخاع الشوكي والمسار (6، 9، 17، 14، 13) تمثل عزلات الحليب	1-4
56	اقطار حركة السباحة Swimming لعزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i>	2-4
57	اقطار حركة الانثيال Swarming لعزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i>	3-4
58	اقطار انتاج انزيم البروتيز لعزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i>	4-4
59	نسب تثبيط عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i> باستعمال مركب Citral	5-4
60	نسب تثبيط عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i> باستعمال مركب Curcumin	6-4
61	نسب تثبيط عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i> باستعمال مركب Inulin	7-4
62	نسب تثبيط عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i> باستعمال مركب Resveratrol	8-4

64	نسب تثبيط عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i> باستعمال مركب Trans-cinnamaldhyde	9-4
66	تأثيرمركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin ، Curcumin ، Citral) في حركة السباحة (Swimming) لعزلة بكتريا <i>C.sakazakii</i> (A1b) (Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde)	10-4
67	تأثيرمركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin ، Curcumin ، Citral) في حركة السباحة (Swimming) لعزلة بكتريا <i>C.sakazakii</i> (B4) (Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde)	11-4
68	تأثيرمركبات ذات المصادر الطبيعية في حركة السباحة (Swimming) لعزلة بكتريا <i>C.sakazakii</i> (CSF4) A: تأثيرمركبات (Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol) B: تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde	12-4
69	تأثيرمركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin ، Curcumin ، Citral) في حركة الانتثال (Swarming) لعزلة بكتريا <i>C.sakazakii</i> (A1b) (Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde)	13-4
70	تأثيرمركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin ، Curcumin ، Citral) في حركة الانتثال (Swarming) لعزلة بكتريا <i>C.sakazakii</i> (B4) (Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde)	14-4
71	تأثير مركبات ذات المصادر الطبيعية في حركة الانتثال (Swarming) لعزلة بكتريا <i>C.sakazakii</i> (CSF4) A: مركبات (Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol) B: مركب Trans-cinnamaldhyde	15-4
73	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral) في إنتاج انزيم Protease (Resveratrol, Trans-cinnamaldhyde) لعزلة بكتريا <i>C. sakazakii</i> (A1b)	16-4

74	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral), Protease (Trans-cinnamaldhyde ,Resveratrol, في انتاج انزيم لعزلة بكتريا ( <i>C. sakazakii</i> (B4)	17-4
74	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral), Protease (Trans-cinnamaldhyde Resveratrol في انتاج انزيم لعزلة بكتريا ( <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	18-4
76	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral), Protease (Trans-cinnamaldhyde ,Resveratrol, في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا ( <i>Cronobacter sakazakii</i> (A1b)	19-4
76	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral), Protease (Trans-cinnamaldhyde ,Resveratrol, في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا ( <i>C. sakazakii</i> (B4)	20-4
77	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral), Protease (Trans-cinnamaldhyde ,Resveratrol, في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا ( <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	21-4
81	تأثير درجات الحرارة في نمو عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i>	22-4
84	تأثير الرقم الهيدروجيني في نمو عزلات بكتريا <i>C. sakazakii</i>	23-4
85	نتائج تفاعل RT-PCR لعزلات بكتريا ( <i>C. sakazakii</i> (CSF4) باستعمال بادئ Primer لجين <i>flgJ</i> بوزن جزيئي 55 زوج قاعدة	24-4
86	نتائج تفاعل RT-PCR لعزلات بكتريا ( <i>C. sakazakii</i> (CSF4) باستعمال بادئ Primer لجين <i>zpx</i> ذو الوزن الجزيئي 94 زوج قاعدة	25-4

87	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في التعبير الجيني لجين <i>flgJ</i> في العزلة <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	26-4
88	تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في التعبير الجيني لجين <i>zpx</i> لعزلة <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	27-4
89	تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde في التعبير الجيني لجين <i>flgJ</i> في ظاهرتي السباحة Swimming والانتقال Swarming للعزلة <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	28-4
90	تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde في التعبير الجيني لجين <i>zpx</i> في ظاهرتي السباحة Swimming والانتقال Swarming للعزلة <i>C. sakazakii</i> (CSF4)	29-4

## قائمة الاختصارات

المختصرات	المصطلحات
AHLs	N-acyl -homoserine Lactones
API	Analytical Profile Index
ASP	Acid Shock Protien
ATP	Adenosine Triphosphate
BBB	Blood -Brain Barrier
Bp	Base Pair
BPI	Bactericidal/Permeability-Increasing Protein
Caco-2	Colorectal adenocarcinoma epithelial cell
Cpa	Cronobacter Plasminogen activator
CSF	Cerebrospinal Fluid
Cycler Threshold	CT
DC	Dendritic cell
DFI	Druggan-Forsyth -inversion
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMB	Eosine Methylene Blue
FDA	United States Food and Drug Administration
FlgJ	Flagella J
FtsZ	Filmenting Temperature Sensitive
HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cell
KIA	Kligler Iron Agar
LPS	Lipopoly Saccharide
MCP	methyl-accepting chemotaxis protein
MDRP	multi drug resistance Pump
MIC	Minimum Inhibition Concentration
NEC	Necrotizing Enterocolites
OmpL	Outer membrane Proline L
Omps	Outer membrane Protien
PBS	Phosphate buffer Solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIF	Powder Infant Formula
Pla	Plasminogen activator

QS	Quarum Sensing
Rimp	Ribosome Maturation Protien
SMIC	Sub Minimum Inhibition Concentration
TAE	Tris- acetate -EDTA Buffer
TC	Trans-cinnamaldhyde
TSA	Trypton Soy Agar
TSB	Trypton Soy Broth
$\alpha$ 2AP	$\alpha$ 2-antiplasmin

# الفصل الأول

## المقدمة

## 1- المقدمة

عرفت بكتريا *Cronobacter sakazakii* بأنها بكتريا سالبة لصبغة كرام، اختيارية لاهوائية (Singh *et al.*, 2015) ، يمكن عزلها من مواد متنوعة مثل الخضروات، السلطات، اللحوم، الأجبان والحليب (Beuchat *et al.*, 2009) . كما تم عزلها من الجلد، الفم والوجه (Holy and Forsythe, 2014).

ان بكتريا *C. sakazakii* تصيب الأطفال الرضع الذين تقل أعمارهم عن الشهرين الذين يعتمدون في تغذيتهم على الحليب المجفف (Parra-Flores *et al.*, 2015). كما يمكن ان تصيب الأطفال الرضع بالتهاب السحايا Meningitis والالتهاب المعوي القولوني الناخر Necrotizing enterocolitis (NEC)، وتصيب البالغين بالتهاب رئوي، تسمم الدم، التهاب نقي العظم وخراجات الطحال (Mashoufi *et al.*, 2017).

ان بكتريا *C.sakazakii* لها القدرة على مقاومة العديد من الظروف البيئية من درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني، الضغط الازموزي والجفاف (Amalardjou and Venkitanarayanan., 2011b). تمتلك بكتريا *C. sakazakii* عدداً من عوامل الضراوة تمكنها من الغزو والالتصاق واصابة خلايا المضيف (Singh *et al.*, 2015). ومنها بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins (OMPs) (Kim *et al.*, 2010a)، الليفان الداخلي Endotoxin Lipopoly saccharide ، تكوين طبقة السكريات المتعددة الدهنية (Pagotto *et al.*, 2003) ، تكوين المحفظة (Townsend *et al.*, 2007) (LPS)، وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm على سطح اللاتكس وانابيب التغذية (2003) كما لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm على سطح اللاتكس وانابيب التغذية المعوية الذي يزيد من مقاومة البكتريا للمؤثرات البيئية (Beuchat *et al.*,2009).

تمتلك بكتريا *C. sakazakii* القدرة على انتاج انزيمات البروتيز Proteases التي تسمح للكائن من عبور الحواجز الضيقة للدماغ وتدمير عدد من الخلايا الأمعاء في الأطفال الرضع مع احداث الالتهاب المعوي القولوني الناخر (Chenu and Cox , 2009).

لوحظ ان استعمال عدد من المضادات المايكروبية المستخلصة من بعض النباتات والزيوت الاساسية له تأثير فعال في العديد من أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، فضلاً عن تأثيرها في بكتريا *C. sakazakii* (Frankova et al., 2014). وهذا ماتم رصده من قبل منظمة الغذاء و الدواء الامريكية (United States Food and Drug Administration (FDA) فمثلاً مركبات مستخلص القرفة Trans- cinnamaldehyde الذي بالرغم من دوره الفعال في تثبيط البكتريا الا انه يعد من المركبات الامنة (Adams et al., 2004). وأشار Shi et al. (2017) بان مستخلص الليمون Citral له تأثير كبير ومهم في تثبيط العديد من عوامل الضراوة لبكتريا *C. sakazakii* منها حركة البكتريا و اشارات ادراك النصاب (Quorum sensing (QS) وتكوين الغشاء الحيوي و انتاج الذايفان الداخلي Endotoxine .

اما Paulo et al. (2001) و Qin et al. (2014) و Subramaniana et al. (2014) فقد اشاروا الى ان زيادة مقاومة المايكروبات لعدد من المضادات الحيوية شجع على استعمال عدد من المركبات النشطة ضدها ومنها مركب Resveratrol المستخلص من الخضروات والعنب و الذي له دور في منع نشوء العديد من الامراض وهو مضاد لعدد من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. اما مركب Inulin فله أهمية غذائية كبيرة اذ يعمل كالياف تسهل وتحسن عملية الهضم وتعزيز امتصاص الكالسيوم والمغنيسيوم كما يشارك في ايض الدهون ويقلل من خطر الإصابة بامراض السرطان (RoberFroid , 2007). كما له تأثير في نظام التكوين المايكروبي للام الحامل وطفلها اذ

يوفر الانبولين الطاقة للطفل والام (Zhou et al., 2017). كما لوحظ تأثير الانبولين في الطبقة الظهارية للأمعاء ومنع المايكروبات من عبور الحاجز المعوي من خلال تعزيز منع الحواجز من دخول المايكروب (Wu et al., 2017).

اما مركب Curcumin فقد اشارت دراسة (Tyagi et al., 2015) الى تأثيره في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام فضلاً عن احداثه اضرار في الغشاء البكتيري.

نظراً لامتلاك بكتريا *C. sakazakii* العديد من عوامل الضراوة ودورها في احداث الامراض في الأطفال الرضع وحديثي الولادة فضلاً عن تحملها للظروف البيئية فقد تم استعمال عدد من المركبات ذات المصادر الطبيعية التي تعمل على تثبيط هذه البكتريا ، ولتحقيق هذا الهدف تم اتباع الخطوات الاتية:

1. الحصول على بكتريا *C. sakazakii* من دراسات سابقة.
2. التأكد من تشخيص بكتريا *C. sakazakii* بالاعتماد على الصفات المزرعية والفحوصات الكيموحيوية واستعمال جين التشخيص 16S rRNA.
3. الكشف عن بعض عوامل الضراوة منها حركة السباحة Swimming والانثيال Swarming وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وإنتاج انزيم Protease.
4. دراسة تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية مثل Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde على نمو بكتريا *C. sakazakii* وعلى بعض عوامل الضراوة كالسباحة Swimming، والانثيال Swarming وإنتاج انزيم البروتيز Protease وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm .

5. دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على نمو بكتريا

*C.sakazakii*

6. دراسة تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral ، Curcumin ، Inulin ،

Resveratrol ، Trans-cinnamaldehyde) باستعمال التركيز SMIC في التعبير الجيني

لجين *zpx* و *flgJ* في بكتريا *C. sakazakii*

# الفصل الثاني

## استعراض المراجع

## 2- استعراض المراجع Literatures Review

### 2-1: الصفات العامة لبكتريا *Cronobacter sakazakii*

اكتشفت بكتريا *Cronobacter sakazakii* اول مرة من قبل العالم الياباني Richii sakazakii وقد سميت باسمه تكريماً له (Forsythe, 2010). وهي بكتريا ممرضة تصيب الأطفال الرضع وتنتمي الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae، ومن صفاتها انها سالبة لصبغة كرام، لاهوائية اختيارية، متحركة بأسواط محيطية (Feeney et al., 2014). تنمو بكتريا *C. sakazakii* على وسط الاكار، وتنتج نوعين من المستعمرات باهتة ولامعة اعتماداً على ظروف النمو (Mashoufi et al., 2017). كما يمكن ان تنمو على وسط الماكونكي بمستعمرات خضراء وزرقاء اللون (Fakruddin et al., 2014)، ولها القابلية على تكوين مستعمرات صفراء على وسط (TSA) Trypton Soy Agar في درجة حرارة 25م° (Iversen and Forsythe 2003) و (Fakruddin et al., 2014) ويمكن ان تنمو البكتريا على وسط Eosin methylene blue (EMB) ووسط Deoxycholate agar (Mashoufi et al., 2017). تكون بكتريا *C. sakazakii* موجبة لاختبار الفوكس بروسكاور واستهلاك السترات وسالبة لاختبار احمر المثل والاندول ولها القدرة على تكوين الغاز (Baily and scotts, 2007).

ان انتاجها لانزيم  $\alpha$ -glucosidase وعدم انتاجها لانزيم Phosphoamidase جعل لها صفات مميزة عن افراد العائلة المعوية (Muytjens et al., 1984). كما لها القدرة على النمو بدرجة حرارة متفاوتة اذ يمكن ان تنمو بدرجة حرارة تتراوح بين (41-45) م° وحرارة منخفضة تتراوح بين (5.5-8.0) م° (Mashoufi et al., 2017). أظهرت الدراسات ان افضل نمو لبكتريا *C. sakazakii* عند درجة حرارة 30م°، ويمكن للبكتريا ان تنمو على سطوح المواد الغذائية الطازجة

كالتفاح والجزر والخيار والطماطم في درجة حرارة 25 °م (Mashoufi *et al.*, 2017). وبمعدل الرقم الهيدروجيني للبكتريا يتراوح بين (3.89 - 9) ولا تستطيع بكتريا *C.sakazakii* ان تنمو عند انخفاض الرقم الهيدروجيني الى 2.5، كما انها تنمو بوجود 10% ملح كلوريد الصوديوم وبتركيز 5% من املاح الصفراء (Fakruddin *et al.*, 2014; Lambert and Bidlas, 2007).

## 2-2: تسمية وتصنيف بكتريا *Cronobacter*

### Nomenclature and Classification of *Cronobacter* Bacteria

كان جنس *Cronobacter* يشار اليه سابقا ببكتريا القولونية المعوية الصفراء ثم تم إعادة التصنيف لها بنوع *Cronobacter sakazakii* عام 1980 (Farmer *et al.* , 1980) . أشار Iversen *et al.* (2007) الى وجود ستة أنواع من بكتريا *Cronobacter* شملت *C.turicensis* ، *C.dublinensis* ، *C.muytjensii* ، *C.sakazakii* ، *C.genomospecies* ، *C.malonaticus* ، في حين أشار Feeney *et al.* (2014) الى ان جنس *Cronobacter* يمكن تصنيفه الى 7 أنواع شملت *C. universalis* ، *C.condimenti* ، *C.sakazakii* ، *C.malonaticus* ، *C.dublinensis* ، *C.turicensis* ، *C. muytjensii* أدى استعمال 16s rRNA وعدة الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Kits و Analytical Profile Index( API-20) الى اكتشاف سلالات لبكتريا *C. sakazakii* شملت ATCC 51329 ، NCIMB 8272 ، NCTC 11467 ، ATCC 29004 (Iversen *et al.* , 2004) . كما أشار Joseph and Forsythe (2011) الى سلالة تدعى *C. sakazakii* ST4 المسؤولة عن احداث إصابة حديثي الولادة لاسيما التهاب السحايا الولادي .

صنفت بكتريا *C. sakazakii* حسب ماورد في تصنيف (Bergys manual , 2005)

Kingdom: Bacteria

Phylum :proteobacteria

Class:Gammaproteobacteria

Order:Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: Enterobacter

Species: *Cronobacter sakazakii* (Holy and Forsythe ., 2014)

### 3-2: مصادر بكتريا *Cronobacter sakazakii* Source

#### 1-3-2: المصادر البيئية والغذائية Food and Enviromental sources

تعزل بكتريا *C. sakazakii* من مصادر بيئية وغذائية عديدة منها نباتية كالخضروات والفواكة والحبوب والتوابل والاعشاب ، ومن بعض المصادر الحيوانية كاللحوم كما في لحم الجمل، الخنزير، الدواجن، الاسماك والحليب والأجبان والبيض فضلاً عن إمكانية نمو بكتريا *C. sakazakii* في أغذية الأطفال الرضع والمنتجات الطازجة والعصائر المصنوعة من المنتجات الطازجة كالخيار والتفاح والبطيخ والخس والطماطم والجزر كما يمكن عزلها من الحليب المجفف ( Friedemann, 2007; Beuchat et al., 2009).

تتواجد بكتريا *C. sakazakii* في بعض أغذية الأطفال الرضع الحاوية على القمح وحليب الابقار المبستر والخام والبطاطا (Hochel et al., 2012)، كما تم عزلها من أماكن تصنيع الشوكلاته والدقيق والمعكرونة مما يدل على انها كائن واسع الانتشار (Kandhai et al., 2004) عزلت ايضاً من بعض الكائنات الحية مثل ذبابة الفاكهة المكسيكية ومن امعاء يرقات

ذبابة الاسطبل (Hamilton *et al.*, 2003)، والطين والماء ولحوم الابقار (Iversen and Forsythe , 2003) . أشار Parra-Flores *et al.*(2018) الى وجود بكتريا *C. sakazakii* في منتجات الالبان في Chile وسنغافورة Sinapore مما أدى الى اصدار أوامر رسمية لإزالة المنتجات الملوثة بها من الاسواق والصيدليات.

### 2-3-2: المصادر السريرية Clinical Sources

بالرغم من ان اول تسجيل لبكتريا *C. sakazakii* كان في عام 1950 الا ان اول تسجيل للبكتريا في العينات السريرية كان في العام 1953 وفي 1958 وكان في عينات التهاب السحايا الولادي، ثم سجلت بعد سنوات عدة الى العام 1988 اذ عزلت من حالات تجرثم الدم Bacteremia وفي عام 2001 اكتشفت إصابة بالبكتريا نتيجة تناول الأطفال الرضع للمنتجات المدعمة بالحليب المجفف والذي أكدته منظمة الصحة والغذاء تلوث مثل هذه المنتجات ببكتريا *Enterobacter sakazakii* ( *C. sakazakii* ) (Farmer, 2015). كما تم عزلها من الوجه، البلغم، الجروح، خراجات المعدة، مسحة الشرج وعينات الدم (Farmer *et al.*, 1980 Vanacker *et al.*, 2001).  
 في حين أشار Caubilla-Barron *et al.* (2007) الى وجود 13 حالة إصابة ببكتريا *C. sakazakii* في وحدات العناية المركزة في فرنسا أدت الى وفاة ثلاث حالات. اما Joseph and Forsythe (2011) فقد أشار الى ان بكتريا *C. sakazakii* تم عزلها خلال المدة 1977-2008 من حالات سريرية عديدة. وذكر Lang *et al* (2017) الى كشف عن عدد من الحالات السريرية في عدد من الدول للإصابة ببكتريا *Cronobacter spp.* ومنها 3 حالات عام 1986 في ايسلندا و4 حالات عام 1988 في أمريكا و12 حالة عام 1998 في بلجيكا و11 حالة في عام 2001 في

أمريكا و 3 حالات في عام 2004 في فرنسا وحالتين في عام 2008 في أمريكا و 4 حالات عام 2011 في أمريكا.

## 2-4: الامراضية Pathogenicity

ترتبط بكتريا *C. sakazakii* بالعديد من الامراض مثل الالتهاب المعوي القولوني الناخر Necrotizing Enterocolitis (NEC) والسحايا Meningitis وتجرثم الدم للأطفال والرضع حديثي الولادة (Singh et al., 2015)، وتصل نسبة إصابة الأطفال الرضع ببكتريا *C. sakazakii* الى حوالي 90% عند تناولهم الحليب المجفف (Kalyantanda et al., 2015). تستطيع بكتريا *C. sakazakii* من اختراق الغشاء المخاطي لانسجة المضيف فتتشتت العديد من الخلايا البلعمية Phagocyte وكذلك إنتاج وسائط التهابية أخرى تؤدي الى تعفن الدم Septicimia و الالتهاب المعوي القولوني الناخر (Hackam et al., 2005).

أشار (Kim and Loessner 2008) الى ان بكتريا *C. sakazakii* تتمكن من غزو الخلايا الظهارية للأمعاء ، ويعتمد ذلك على مدة تعرض نسيج الأمعاء للبكتريا ووجود بروتين متخصص ، ولا تعتمد الإصابة على قطبية جدار الخلايا البكتيرية عند وجودها في الارتباطات المحكمة Tight Junction في الأمعاء، مشيراً الى ان دخول بكتريا *C. sakazakii* عن طريق الفم يُسبب عدوى جهازية ، اذ تتمكن من الوصول الى الدورة الدموية ثم تنتشر بجسم المضيف.

كما اشار (Emami et al. 2011) الى ان بروتين Outer membrane Protien (ompA) في بكتريا *C. sakazakii* يمثل دوراً في الإصابة بتتخر الأمعاء من خلال تغير نضوحية الاغشية والموت المبرمج Apoptosis للخلايا المعوية Enterocyte مشيراً الى ان الإصابة ببكتريا *C. sakazakii* تعمل على اضرار الخلايا الطلائية بتجنيد اعداد كبيرة من الخلايا الشجرية

Dendritic cells (DC) وخلايا البلعمية Microphage وخلايا العدلة Neutrophils في الامعاء وتنشيط نضج الخلايا الشجرية، كما تسبب بكتريا *C. sakazakii* مرض التهاب السحايا (Drudy *et al.*, 2006)، اذ تتمكن البكتريا من عبور الحواجز الدموية للدماغ Blood Brain Barrier (BBB) عن طريق Transcellular او Paracellular Traversal والخلايا البلعمية المصابة Infected phagocyte (Barichello *et al.*, 2013)، وتستطيع مهاجمة الجهاز المناعي والتضاعف داخل الخلايا والبقاء فيها (Townsend *et al.*, 2007).

أشار (2014) Holy and Forsythe الى ان علاقة بكتريا *Cronobacter* بالتهاب السحايا هو احداثها تغيرات كيسية، تجمع خراجات السوائل، احتشاء الدماغ، تنخر انسجة الدماغ، سيلان المادة السحائية البيضاء وارتفاع نسبة الوفيات الى 40-80 % فضلاً عن احداثها التهاب المسالك البولية والتهاب الأمعاء التنخري، وهذا ما أشار اليه (Drudy *et al.*, 2006) الى ان 94 % من الأطفال الناجين من التهاب السحايا يعانون من تأخر النمو الجسدي والعصبي وشلل رباعي وضعف السمع والبصر مشيراً الى ان الأطفال الذين تقل أعمارهم عن 28 يوماً هم اكثر عرضة للإصابة بالبكتريا، اما (Healy *et al.*, 2010) فقد أشار الى ان إصابة البالغين ببكتريا *C. sakazakii* أدى الى ظهور التهاب رئوي، تعفن الدم، قرحة القدم، التهاب الجروح و خراجات الطحال.

## 2-5: عوامل الضراوة Virulence factor

ترتبط خطورة المرض عند ارتفاع نسبة الوفيات الى حوالي 80 % ولاسيما عند الأطفال الرضع وحديثي الولادة ويعود ذلك الى الإصابة ببكتريا *C. sakazakii* وضراوتها ولهذا يجب اجراء العديد من الدراسات عن عوامل الضراوة (Mashoufi *et al.*, 2017)

## 2-5-1: السكريات المتعددة الدهنية (LPS) Lipopoly saccharide

يعد الجزء المهم للغشاء الخارجي للبكتريا السالبة وهو احد السموم البكتيرية الثابتة بالحرارة لاسيما الدهون في منطقة اللب التي تقاوم درجة 100 م° ، وتمتاز LPS ببقاء فعاليتها البيولوجية في الحليب المجفف حتى بعد قتل الخلايا البكتيرية ، كما تؤدي دوراً في تحطيم الارتباط المحكم Tight Junction بين خلايا أنسجة المضيف مما يزيد من نفاذية دخول البكتريا من خلال الحاجز المعوي وغزوها للخلايا ، لاسيما عند تناول الحليب المجفف الملوث بأعداد كبيرة من البكتريا *C. sakazakii* (Townsend et al ., 2007) .

وأشار (Levy 2002) الى ان الأطفال حديثي الولادة ذوو الوزن المنخفض وقبل رضاعتهم يكون لديهم مبيد الجراثيم Bactericidal وبروتين زيادة النضوح Permeability Increasing Protien (BPIP) / في خلايا العدلة بنسبة اقل بحدود (3-4) مرات عن الأطفال الرضع ، وأشار الباحث الى ان ارتباط LPS مع BPI يعمل على انقاص كفاءة جهاز المناعة .

ان الدراسة النسجية لقولون الأطفال الذين يتناولون الحليب المجفف الملوث بمستويات عالية من LPS يظهر عليهم انتفاخ ملحوظ في الطبقات المخاطية والعضلية للقولون (Townsend et al ., 2007) .

## 2-5-2: اليفان الداخلي Endotoxin

اشارت دراسات عديدة الى ان بكتريا *C. sakazakii* المعزولة من مصادر غذائية وسريية والتي أعطت نتيجة موجبة لانتاجها اليفان الداخلي، أدت الى قتل الفئران عند حقنها بالبكتريا (Pagotto et al., 2003). في حين أشار (Townsend et al. 2007) الى ان وجود السموم الداخلية في حليب الأطفال الرضع يعد عامل خطر لأصابتهم، وان وجود السموم الداخلية وبمستويات

عالية في حليب الأطفال الرضع يساهم في فشل وظائف الأمعاء ويسبب إصابات موضعية وجهازية فضلاً عن انتقال السموم عبر الطبقات الطلائية للأمعاء الى الانسجة العميقة. اما Chenu and Cox (2009) فقد أشارا الى ان أهمية السموم الداخلية ماتزال غير واضحة والجينات التي تشفر عن بروتين السم لم تكتشف بعد.

### 2-5-3: المستضد O-antigen

تمتلك بكتريا *C. sakazakii* سبعة أنماط مصلية (Sun *et al.*, 2011) ، وتتشترك تلك الأنماط في امراضية البكتريا التي تسبب الوباء المعوي للأطفال حديثي الولادة والرضع (Sun *et al.*, 2012) ، وان استعمال التتميط المصلي الجزئي مهم لمعرفة الخصائص الوبائية لسلاسل بكتريا *C. sakazakii* ، وأشار (Jaradat *et al.*, 2014) الى وجود 17 نمطاً مصلياً يعود الى سبعة أنواع من بكتريا *Cronobacter* ، ان تنوع المستضد O ناتج من التنوع في مجموعة من الجينات التخليقية تتضمن O- antigen Flippase (WZX) و Polymerase (WZY) (Arbatsky *et al.*, 2012). ان نمط المستضد O2 لبكتريا *C. sakazakii* هو السائد بين 141 عزلة في Powder Infant Formula (PIF) (Muller *et al.*, 2013) . كما ان جينات المستضد O لبكتريا *Cronobacter* تتكون من 6-9 جين يختلف بالطول ما بين (6-20) كيلو زوج قاعدة (Ogrodzki and Forsythe, 2015)

### 2-5-4: المحفظة Capsule

تتكون المحفظة من سلسلة طويلة من السكريات المتعددة التي تكون مسؤولة عن تميز البكتريا مصلياً فضلاً عن دورها في امراضيتها (Willis and Whitfield, 2013). وأشار Barron and Forsythe (2007) الى ان امتلاك البكتريا للمحفظة يمكنها من تحمل الظروف البيئية القاسية والبقاء

على قيد الحياة لمدة اكثر من سنتين، وان انتاجها يمكن البكتريا من البقاء في بيئة جافة في الحليب المجفف و مقاومة وغزو الخلايا البلعمية (Ogrodzki and Forsythe, 2015).

## 2-5-5: الغشاء الحيوي Biofilm

يتكون الغشاء الحيوي من تجمعات متحدة من كائنات مجهرية مطمورة في داخل بوليمرات متعددة خارج خلوية تدعى Extracellular Polymeric substances وان تكوين الغشاء الحيوي يختلف باختلاف السلالات التي تعتمد ايضاً وبشكل كبير على نوع الوسط الزراعي وطبيعة السطح الذي تنمو عليه البكتريا (Hartmann *et al.*, 2010).

أشار (2004). Iversen *et al.* و (2005). Lehner *et al.* الى قابلية بكتريا *C. sakazakii* المعزولة من حليب الرضع من الالتصاق على سطح الزجاج واللاتكس والسليكون بشكل افضل من سطح الفولاذ المقاوم للصدأ Stainless steel مما يجعلها تكون الغشاء الحيوي. وهذا ما أشار اليه ايضاً (2006). Kim *et al.* واكد ان بعض سلالات *C. sakazakii* يمكن ان تنمو على سطح الفولاذ المقاوم للصدأ وعلب التغذية المعوية Enteral feeding tubes التي تعتمد على درجة الحرارة ونوع الوسط الغذائي اللذان لهما تأثير مهم في قابلية البكتريا على الالتصاق بالسطوح وتكوين الغشاء الحيوي.

هناك العديد من الجينات التي تؤدي دوراً في تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *C. sakazakii* مثل اوبيرون تخليق السليلوز (*bcs* AGC) وتكوين الاسواط (*fli* E, *flg* J, *fli* D ) وجين *cyoD* الخاص بإنتاج الطاقة وجين *flisK* الخاص بانقسام الخلايا (Hartmann *et al.*, 2010)

## 2-5-6: الاسواط Flagellum

السوط تركيب معقد يتألف من اكثر من 20 بروتيناً مختلفاً، اذ يتركب من الجسم القاعدي والذي يكون في طبقة جدار الخلية والكلاب الذي يرتبط بالجسم القاعدي مع خويط السوط، وليس للسوط أهمية في حركة البكتريا فقط وانما يشترك في وظائف بايولوجية عديدة منها الالتصاق وغزو خلايا المضيف فضلاً عن توليد الاستجابة المناعية (Haiko and Westerlund-Wikstrom , 2013)

أشار (2010). Hartmann *et al* الى دور الاسواط في التصاق بكتريا *C. sakazakii* على سطوح الخلايا الطلائية للامعاء باستعمال خط خلوي Colorectal adenocarcinoma epithelial cell (Caco-2) ، مشيراً الى ان هناك العديد من جينات الاسواط التي لها دور في تكوين الغشاء الحيوي (*flgJ, flgD, flid*) . كما أشار (2012) Cruz-cordoval *et al* الى دور الاسواط وبروتين السوط Flagelline في اطلاق العديد من الوسائط الالتهابية الأولية ومثبطات الالتهابات الأولية مثل TNF- $\alpha$ ، IL-10، IL-8 في الخلايا البلعمية. وأشار (2015) Ye *et al* الى ان هناك علاقة بين حركة السوط وتكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *C. sakazakii* إذ لاحظ ان الخلايا التي لها القابلية على تكوين ظاهرة الانثيال لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي على نقيض من الخلايا السابحة فلم يُلاحظ أي دور لها في تكوين الغشاء الحيوي.

## 2-5-7: بروتينات الغشاء الخارجي OmpA، OmpX

تغزو بكتريا *C. sakazakii* خلايا بطانة الاوعية الدموية الدقيقة للدماغ في الانسان Human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) وذلك لامتلاكها بروتين OmpA ، وان حدوث طفرة في البروتين ompA يقلل الإصابة بمقدار سبعة اضعاف مقارنةً

بالبكتريا غير المطفرة فضلاً عن عدم احداث تضاعف البكتريا داخل (HBMEC)، وان غزو بكتريا *C. sakazakii* يعتمد على النيببات الدقيقة Microtube في HBMEC ولا يعتمد على خيوط الاكتين Actin Filament (Singamsettya et al., 2009). كما ان كل من OmpA, OmpX لهما دور في غزو الخلايا الطلائية للمعاء فضلاً عن تمكين *C. sakazakii* من الانتشار واصابة الاعضاء الأخرى مثل الكبد والطحال (Kim et al., 2010a).

### 2-5-8: Cronobacter Plasminogen activator (cpa)

تمتلك بكتريا *C. sakazakii* سلسلة من الاحماض الامينية التي تكون بروتين الغشاء الخارجي Outer membrane protease مع اختلافها عن عائلة Outer membrane proteins (OMPs)، التي تشير الى ان البروتينات تكون ضمن تحت العائلة Plasminogen activator (Pla) والتشابه مع Pla يمكن ان يسمى Cronobacter Plasminogen Protease (cpa) والذي يحافظ على بكتريا *C. sakazakii* من النظام المناعي المتمم Complementary وتثبيط فعالية  $\alpha$ 2-antiplasmin ( $\alpha$ 2AP) (Franco et al., 2011).

### 2-5-9: جين zpx

يشفر جين *zpx* الى انزيمات تحلل البروتين الحاوية على الزنك، كما ان جين *zpx* مسؤول عن تحلل الكولاجين ويُمكن البكتريا من عبور الحواجز الدموية للدماغ (Kothary et al., 2007). فضلاً عن تمكين البكتريا من احداث التخر في امعاء الأطفال الخدج (Chenu and Cox, 2009).

## 2-6: التكيف مع البيئة Enviromental Adaptation

تمتاز بكتريا *C. sakazakii* بمقاومتها للعديد من الظروف البيئية من درجة الحرارة والجفاف والرقم الهيدروجيني مما يساعدها على البقاء لمدة طويلة. وهذا ما أشار اليه Nazarowec-White and Farber( 1997) حول قابلية بكتريا *C. sakazakii* المعزولة من مصادر غذائية وسريية على النمو بدرجة 23 م° بزمن جيل Generation time مدته حوالي 40 دقيقة . في حين كانت بدرجة 10 م° بزمن جيل مدته 4.98 ساعة ولم يلاحظ النمو عند درجة 4 م°.

. كما أشار (2017) Ueda الى ان جميع أنواع بكتريا *Cronobacter* مثل *C. sakazakii* ، *C. turicensis* ، *C. molanticus* ، *C. dublinesis*. لها القدرة على النمو بدرجة حرارة (35-44)م° لمدة 16 ساعة حضن ويقل النمو عند درجة حرارة 5 و 15 م° لمدة (6-8) ساعات . في حين أشار (2003) Breeuwer et al. الى قابلية بكتريا *C. sakazakii* على تحمل الضغط الازموزي والتجفيف ليصل قيمة D-value الى 58 م° من (0.39-0.60) دقيقة وذلك يعود الى قابليتها في حماية نفسها عن طريق سرعة تراكم الأيونات داخل الخلايا لاسيما ايونات البوتاسيوم K الموجبة ثم تراكم كل من البرولين Proline و الكلايسين glycine والبيتاين betaine والتريهالوز Trehalose (Kempf and Bremer , 1998). اما (2004) Iversen et al. فوضح قابلية بكتريا *C. sakazakii* على النمو بدرجات الحرارة المنخفضة والعالية (6 و 44) م° على التوالي .

اما (2009) Dancer et al. فأشار الى قدرة بكتريا *C. sakazakii* على النمو في وسط ذي رقم هيدروجيني 3.9 او 4.0 وفي نشاط مائي 0.94 حاوي على السكروز وملح كلوريد الصوديوم .

أشار (2005) Gurtler and Beuchat الى ان قابلية بكتريا *C. sakazakii* على تحمل ظروف الحرارة العالية 55 م° والتجميد -20 م° والوسط الحامضي 3.54 والوسط القاعدي 11.25 ، اذ يعتمد

على نوع الوسط الزراعي الذي تنمو فيه البكتريا ، فكانت الأوساط الانتخابية لبكتريا *C. sakazakii* مناسبة لمعيشة البكتريا وتحملها للظروف القاسية . كما وجد ان بعض سلالات بكتريا *C. sakazakii* تمتلك القدرة على البقاء لمدة طويلة في وسط منخفض النشاط المائي (Chen *et al.*, 2018) . كما تبين ان جين *rpoS* له علاقة بتحمل بكتريا *C. sakazakii* للعديد من الظروف القاسية (Alvarez-Ordone *et al.* , 2013) . كما ان بكتريا *Cronobacter spp* تستطيع مقاومة العديد من العوامل وذلك لإنتاجها الصبغة الصفراء وتكوين المحفظة Capsule وعوامل أخرى تمكنها من مقاومة الجفاف والضغط البيئية (Hu *et al.* , 2017) .

## 2-7: مقاومة المضادات الحيوية Resistance to antibiotics

تمتاز بكتريا *C. sakazakii* بمقاومتها لعدد من المضادات الحيوية مثل Ampicillin و Cefazolin والبنسلينات واسعة الطيف Wide Spectrum Pencillins ، في حين كانت حساسة الى Cephalosporins الجيل الثالث و Quinolones وهي حساسة بنسبة عالية لمجموعة Aminoglycosides و Trimethoprim –sulfamethoxazole (Lai, 2001) . وأكد Drudy *et al.* (2006) الى ان أنواع بكتريا Enterobacter مقاومة لطيف واسع من المضادات الحيوية مثل Pencillin ,Cephalosporins ويعود ذلك لإنتاجها انزيمات Beta-lactamase وهذا ما وجد في بكتريا *E. sakazakii* (*C. sakazakii*) مما أدى الى استعمال أنواع جديدة من Cephalosporin وكذلك مزجها مع مضادات Aminoglycoside .

كما بين (Hochel *et al.* (2012) الى ان سلالات بكتريا *Cronobacter* كانت مقاومة الى

Erythromycin ونسبة قليلة جداً مقاومة Tetracycline . اشارت دراسة (Zeng *et al.* (2018)

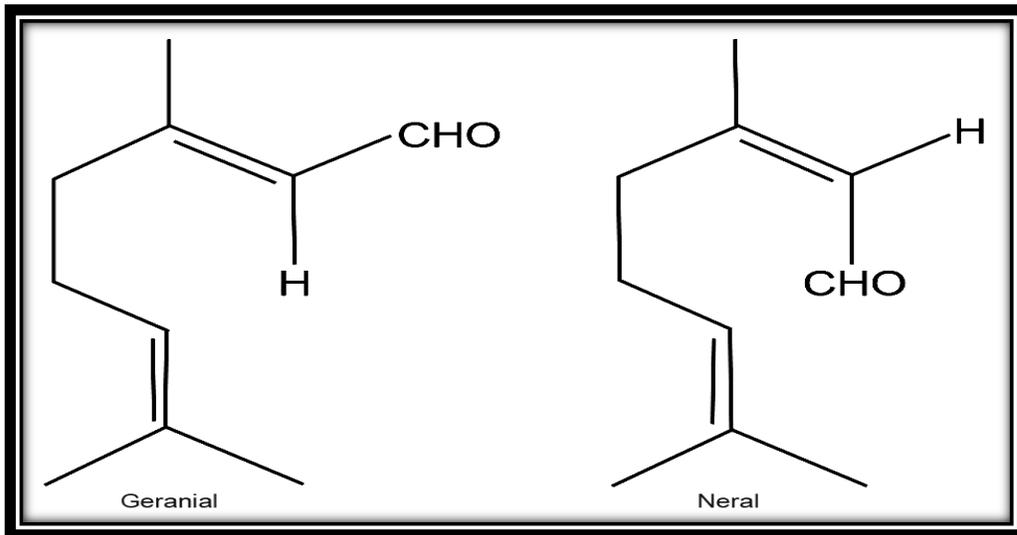
مقاومة بكتريا *C. sakazakii* ST256 لعدد من المضادات الحيوية أهمها Ampicillin،

Trimethoprim، Tetracycline، Gentamicin، Aztreonam، Ceftriaxone، Cefazolin  
.Sulfamethoxzole، Chloramphenicol

## 8-2 : المركبات ذات المصادر الطبيعية

### Citral :1-8-2

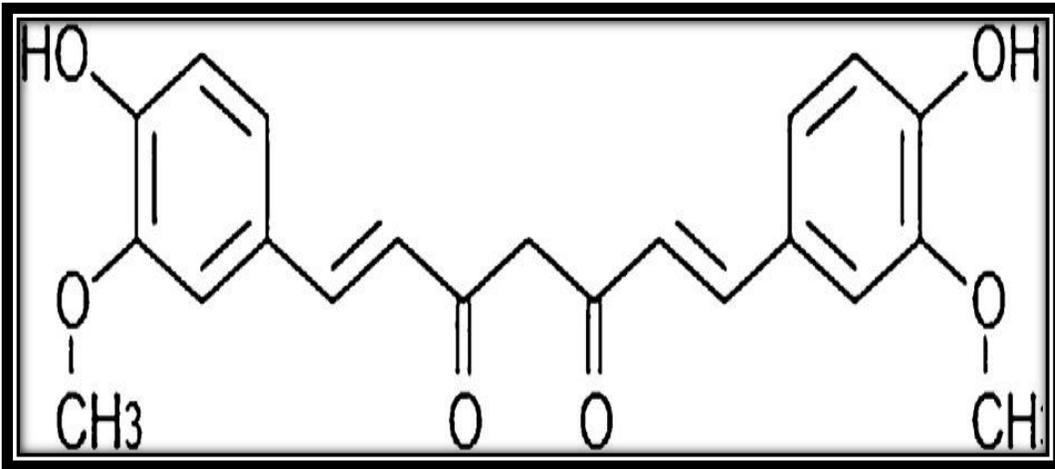
يتكون مركب Citral من (3, 7- dimethyl-2,6- Octadienal) (Shahzadi *et al.* , 2014) وهو مكون رئيس لزيت الحامض ، ولهذا المركب دوراً في تثبيط نمو بعض أنواع البكتريا مثل *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E.coli* كما له دور في تثبيط بعض من عوامل الضراوة لبكتريا *C. sakazakii* مثل الحركة وتكوين الغشاء الحيوي وإنتاج الذايفان الداخلي فضلاً عن خفض قابلية البكتريا على الغزو والالتصاق والبقاء والتكاثر (Shi *et al.* , 2017)



الشكل (1-2) التركيب الكيميائي لمركب Citral ( $C_{10}H_{16}O$ ) (Cardoso and Soares ,2010)

## Curcumin 2-8-2

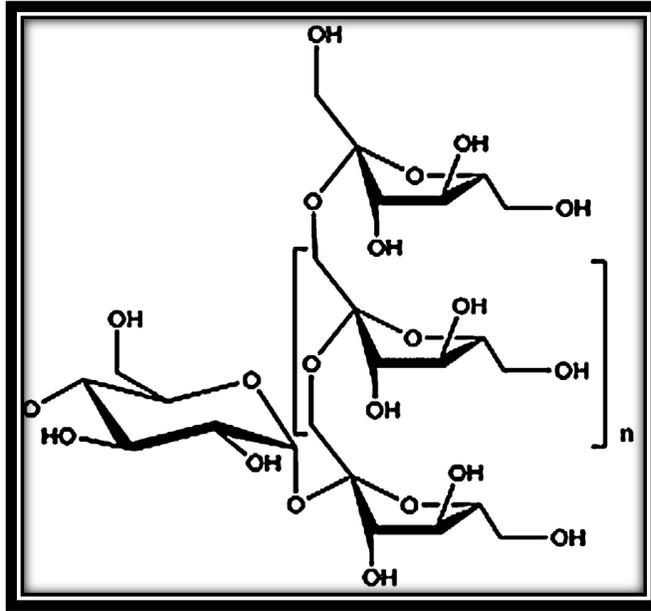
تتكون مادة الكركم Curcuma longa من bis(4-hydroxy -3-methoxyphenyl)-7-1 hepta-1-6-diene-3-5-dione ( وهي مادة زيتية غير قابلة للذوبان في الماء الحامضي او المتعادل وانما في الوسط القاعدي وهي مادة تنتمي الى العائلة الزنجبيلية التي توجد في اغلب البلدان ومنها البلدان الاسيوية مثل الهند التي تعد من اكبر البلدان المنتجة والمصدره لمادة الكركم ، يحوي الكركم على مادة Curcuminoid والتي تشكل 2-9% وتتكون من 77% من Curcumin و17% من مادة Dimethoxy-curcumin و3% Bis-demethoxy-curcumin وتستعمل كمادة مضادة للالتهابات ومضادة للاكسدة والسرطان، يعتمد لون الكركم على الرقم الهيدروجيني اذ يعطي اللون الأصفر عند رقم هيدروجيني يتراوح بين (2.5-7.0) ، اما اذا كان اعلى من 7.0 يعطي اللون الأحمر (Jovicic et al., 2017). أشار Tyagi et al. (2015) الى تأثير مركب الكركمين في تثبيط أنواع متعددة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام .



شكل (2-2) التركيب الكيميائي لمركب Curcumin  $C_{21}H_{20}O_6$  (Mun et al ., 2013)

**Inulin :3-8-2**

يتكون مركب الانبولين Inulin من  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-[B-D-Fructofuranosyl] من  $(n-1)$ -D-Fructofuranoside (Barclay *et al.*, 2010). وهو عبارة عن سكريات متعددة مخزونة ذائبة بالماء تنتمي الى مجموعة الكربوهيدرات غير قابلة للهضم تدعى Fructans والذي يستعمل كبديل للسكر والدهن كما ان له دور في زيادة كفاءة الجهاز الهضمي و يتواجد المركب في اكثر من 36000 نوع من النباتات ، ومن المصادر الطبيعية له الهندباء، الخرشوف ،الثوم ،البصل ،الكراث ،القمح والموز (Shoaib *et al.*, 2016 ; Roberfroid , 2007).



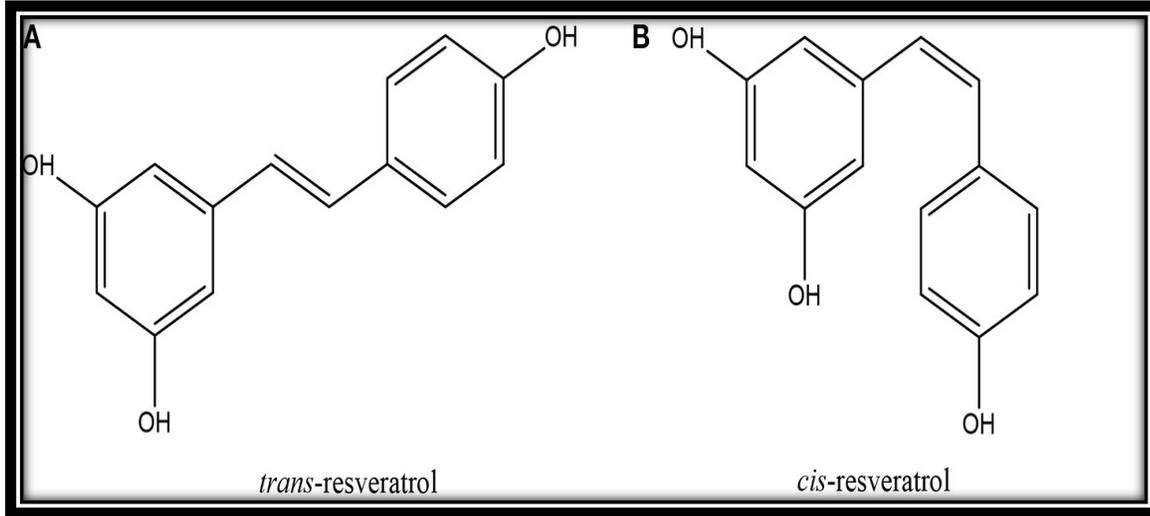
شكل (3-2) التركيب الكيميائي لمركب Inulin ( $C_{228}H_{382}O_{191}$ ) (Shoaib *et al.*, 2016)

**Resveratrol :4-8-2**

يتكون مركب Resveratrol من (3,4,5-trihydroxystilbene)، اكتشف عام 1940

وبدأت الدراسة عليه في بداية التسعينات و يتواجد في العنب ومنتجاته والفول السوداني والفراولة

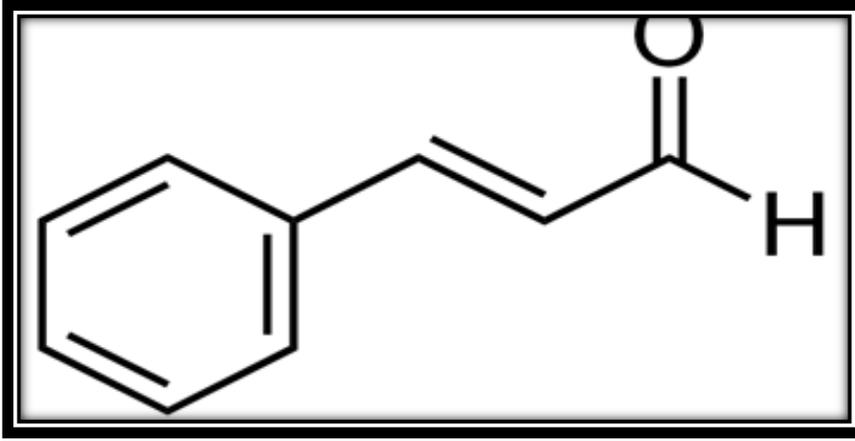
والتوت البري وهو يستعمل في تقليل الاصابة بالعديد من الامراض منها امراض القلب والاعوية الدموية فضلاً عن استعماله كمضاد للألتهابات والاكسدة ومضاد للجراثيم (Paulo *et al.*, 2001).



شكل (2-4) التركيب الكيميائي لمركب Resveratrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ) (Ma *et al.*, 2018)

### 2-8-5: Trans-cinnamaldehyde

السينامالديهايد Cinnamaldehyde هو التسمية الكيميائية لمادة القرفة Cinnamon ، ويتم الحصول عليها من طبقات اللحاء الداخلية من أشجار نبات القرفة كثيفة الأوراق الخضراء ، ويتكون مركب Trans-cinnamaldehyde من ((E)-3-Phenyl-2-Propenal) وهو المكون الاساسي لزيت القرفة ومسؤول عن رائحتها المميزة ، يتركب من حلقة Phenyl مع الالديهايد غير المشبع (Ashakirin *et al.*, 2017 ; Zinn *et al.* , 2015). وأشار Amalaradjou and Venkitanaryanan (2011b) الى تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii* والحد من مقاومتها للظروف البيئية كالحرارة والحامضية والتجفيف.



الشكل (5-2) التركيب الكيميائي لمركب Trans-cinnamaldehyde ( $C_9H_8O$ )

(Ashakirin *et al.* , 2017)

# الفصل الثالث

## المواد وطرائق العمل

### 3- المواد وطرائق العمل Material And Methods

#### 3-1 المواد Materials

#### 3-1-1 Laboratory Equipment and Instrumens الأجهزة والأدوات المختبرية

جدول (1-3) الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة	الجهاز	
Webco (Germany)	Autoclave	المؤصدة
Biozek(Switzerland)	Petri Dishes	اطباق بتري
-----	Glassy tubes, Beakers, Flasks	انابيب زجاجية وبيكرات وفلاسكات
Afco (Jordan)	P-line Tubes	انابيب مختبرية
(China)	PH paper	اوراق قياس الرقم الهيدروجني
AFMA (Jordan)	Microtiter 96 Wells plates	أطباق المعايرة تحتوي على 96 حفرة
China	Cork Borer	ثاقب فليني
Kelon (Korea)	Refrigerator	ثلاجة
Biorad (US)	PCR Thermal Cycler	جهاز التدوير الحراري تضاعف البلمرة المتسلسل
Thermoscientific(US)	Gel Electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي
Bio Molecular System (Australia)	Mic qPCR Cycler (RT-PCR)	جهاز التقدير الكمي
Thermoscientific (US)	Microcentrifuge	جهاز الطرد المركزي الصغير (لانايبب الابندروف)
Biorad (US)	ELISA reader	جهاز اللاليزا
Optima ( Japan)	Spectrophotometer	جهاز المطياف الضوئي
Mennert (Germany)	Incubator	حاضنة

Local Market (China)	Water bath	حمام مائي
DLTG (China)	Electrical Oven	فرن كهربائي
Labtech (Korea)	Laminar Flow Clean Bench	كابينة الزرع
Canon (US)	Digital Camera	كاميرا رقمية
Griffin (England)	Vortex	مازج
Brand- W(Germany)	Micropipettes	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Stuart (UK)	Hot Plate & Magnetic Stirrer	مسخن حراري ممغنط
Major Science (Taiwan)	Uv- Transilluminator	مصدر للاشعة فوق البنفسجية
Denver (Germany)	Sensitive Electric Balance	ميزان كهربائي حساس
Himedia(India)	Loop	ناقل معدني
AFCO(Jordan)	Millipore filter	وحدات الترشيح الدقيقة

### Chemical Materials 2-1-3 المواد الكيميائية

جدول (2-3) المواد الكيميائية والشركة المصنعة

الشركة المصنعة	المادة الكيميائية	
Promega (US)	Agarose	الاكاروز
India (Himedine)	Tryptose	التربتوز
BHD (England)	Ethanol (70%)	ايتانول
CDH (India)	Dimethyl sulphoxide (DMSO)	ثنائي ميثيل سلفوكسيد
BDH (England)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	حامض الكبريتيك المركز
(India)	Hydrochloric acid (HCL)	حامض الهيدروكلوريك
Pemearce (Spain)	Sucrose	سكر السكروز
Pemearce (Spain)	Glucose	سكر الكلوكوز
Bioneer (Korea)	Ethyl Alcohol (99%)	كحول ايثيلي مطلق

BDH (England)	Barium Chloride dehydrate (BaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	كلوريد الباريوم المائي
BDH (England)	Sodium Chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم
Promega ( US )	Deionized Sterile Distal Water	ماء المقطر اللايوني
Solarbio ( China)	Agar-Agar	مسحوق الاكار - اكار
(China)	Crystal Violet Powder	مسحوق البنفسج البلوري
Himedid ( India)	Skim milk Powder	مسحوق حليب الباودر
(US)	Methanol	ميثانول
(Spain)	Hydroxide Sodium (NaOH)	هيدروكسيد الصوديوم
Laboratory Reagent (India)	Urea	يوريا

### 3-1-3 الأوساط الزرعية Culture Media

جدول (3-3) الأوساط الزرعية والشركة المصنعة

الشركة المصنعة	اسم الوسط	
Salucea (Holland)	Tryptone soy broth (TSB)	وسط التريبتون صويا السائل
Salucea (Holland)	Tryptone soy agar (TSA)	وسط التريبتون صويا الصلب
Direvo (Germany)	Kliglar Iron Agar	وسط الحديد - ثنائي السكر الصلب
Direvo (Germany)	Simmons Citrate agar	وسط السترات السيمون الصلب
Salucea (Holland)	MacConky agar	وسط الماكونكي الصلب
Direvo (Germany)	Nutrient broth	وسط المرق المغذي
Direvo (Germany)	Nutrient Agar	وسط المغذي الصلب
Divero (Germany)	Urea agar base	وسط اليوريا الصلب

## 4-1-3 المركبات ذات المصادر الطبيعية

جدول (4-3) المركبات ذات المصادر الطبيعية المستعملة في الدراسة والبلد المنشأ

البلد المنشأ	المركب
TCI ( China )	Citral
Chemical point (Germany)	Curcumin
Qualikemis (India)	Inulin
Chemical point( Germany)	Resveratrol
Chemical point( Germany)	Trans-cinnamaldhyde

## 5-1-3 الصبغات والكواشف والمحاليل Dyes, Reagents and Solution

جدول (5-3) الصبغات والكواشف والمحاليل والبلد المنشأ

البلد المنشأ	الصبغات والكواشف والمحاليل	
Promega (US)	Tris-acetate- EDTA Buffer	دارئ الترحيل الكهربائي TAE
Chemical Point (Germany)	Phosphate Buffer Saline	دارئ الفوسفات الملحي
Promega (US)	Ethidium Bromide dye	صبغة الاثيديوم برومايد
Promega(US)	Loading dye	صبغة التحميل
Promega (US)	Quanti Fluro RNA dye	صبغة الرنا المتألقة

## Primers 6-1-3

جدول (6-3) تسلسل ومصدر بواقي الجينات المستعملة في الدراسة

Gene	Primer Sequence (3'-5')	حجم الناتج bp	المصدر
16S rRNA Saka-1 F Saka-2aR	ACAGGGAGCCAGCTTGCTGC TGCTGCGGTTATTAACCAC	406	Hassan <i>et al.</i> (2007)
<i>flgJ</i> F <i>flgJ</i> R	GACGGCGGGCAAAGG GCCGCCCATCTGTTTGAC	55	. Amalaradjou and Venkitanarayanan (2011a)
<i>zpx</i> F <i>zpx</i> R	GAAAGCGTATAAGCGCGATTC GTTCCAGAAGGCGTTCTGGT	94	Kothary <i>et al.</i> (2007)

## 7-1-3 العدد المستعملة في الدراسة

جدول (7-3) العدد Kits والمواد المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	العدة
Promega (US)	عدة استخلاص DNA الجينوم البكتيري Wizard <sup>®</sup> Genomic DNA purification Kit وتشمل (Nuclei lysis solution ,RNAase solution Protien precipitation solution, DNA rehydration)

ROMIL pure Chemistry (UK)	Isopropanol Ethanol 70%
Promega (US)	100-1500 bp DNA Ladder زوج قاعدي
Promega (US)	GoTaq <sup>®</sup> Green عدة تفاعلات سلسلة البلمرة Master Mix PCR 2× وتشمل (Taq DNA Polymerase , dNTPs, Mgcl2, PCR Buffer)
Qiagen( Gemany)	عدة استخلاص RNA البكتيري Quantiflour <sup>®</sup> RNA System وتشمل
ROMIL pure Chemistry (UK)	Isopropanol Ethanol 70%
Li Chrosolv ( Germany)	Chloroform
Thermoscientific (US)	Trizole
Promega (US)	Nuclease free water
Promega (US)	عدة تفاعل التقدير الكمي Go Taq <sup>®</sup> 1-step RT-qPCR system وتشمل Go Tag <sup>®</sup> qPCR Master Mix Go script RT mix MgCl <sub>2</sub> Nuclease-free water

**2-3: طرائق العمل Methods****1-2-3: التعقيم Sterilization**

عقمت الأوساط الزرعية المستعملة في هذه الدراسة ، التي تحتاج الى تعقيم باستعمال جهاز المؤصدة Autoclave عند درجة حرارة 121م° وضغط 15 باوند /انج لمدة 15 دقيقة في حين عقمت الأدوات الزجاجية في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 180 م ° لمدة ساعتين فيما استعملت طريقة الترشيح بمرشحات دقيقة نوع Milipore filters قطر فتحتها 0.22 مايكروميتر للمواد التي تتأثر بدرجة الحرارة العالية .

**2-2-3: تحضير المحاليل Preparation of solutions****1-2-2-3: محلول العكورة ماكفرلاند Mcfarland**

- أ- اذيب 1 غرام من كلوريد الباريوم المائي  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  في 100 مل من الماء المقطر .  
 ب- اضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز  $H_2SO_4$  في 100 مل من الماء المقطر بعدها  
 حُضرت التراكيز المطلوبة وكالاتي (Stockes and Ridgway, 1987):

NO.9	NO.0.5	المواد
0.9	0.05	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (مل)
9.1	9.95	$H_2SO_4$ (مل)
27	1.5	كثافة الخلايا البكتيرية ( $\times 10^8$ / مل)

No. Tube number

### 3-2-2-3: المحلول الفسلجي الملحي Normal saline solution

حضر المحلول بإذابة 8.5 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 1000 مللتر من الماء المقطر ذا الاس الهيدروجيني 7 وعقم بجهاز المؤصدة وخرن المحلول بالثلاجة لحين الاستعمال (Vandepitte *et al.*, 2003).

### 3-2-2-3: محلول دارئ الفوسفات الملحي Phosphate Buffer saline Solution

حضر بإذابة 9.86 غم من مادة PBS في 1 لتر من الماء المقطر ذا الاس الهيدروجيني 7.4 وعقم بجهاز المؤصدة ثم حفظ بالثلاجة لحين الاستعمال.

### 3-2-2-3: محلول صبغة البنفسج البلوري Crystal violet solution

حضر بإذابة 0.25 غم من صبغة البنفسج البلوري في 100 مللتر من الماء المقطر ثم حفظت بدرجة حرارة الاعتيادية لحين الاستعمال (Cucarella *et al.*, 2002)

### 3-2-2-3: محاليل البادئات Primers solution

حضرت محاليلها الخزينة بحسب تعليمات الشركة المصنعة Promega وباستعمال الماء المقطر اللايوني Nuclease-free water المعقم للحصول على 100 بيكو مول /مايكروليتر وحظر محلول كل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكو مول/ مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين Stock لكل بادئ واضافته الى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللايوني ومزج جيدا وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال وحفظت المحاليل الخزينة للبادئ في درجة حرارة -20 م مع مراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من الثلاجة باستعمال المازج vortex لمجانسة قبل الاستعمال.

### 3-2-2-6 محلول دارئ الترحيل Tris - acetate EDTA Buffer

حضر المحلول المجهز من قبل شركة Promega باضافة 25 مللتر من الدارئ TAE بتركيز 40X الى 975 مللتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز 1X من الدارئ في قنينة زجاجية معقمة ثم حفظ بالثلاجة لحين الاستعمال.

### 3-2-3 تحضير المركبات ذات المصادر الطبيعية

حضر بإذابة 0.1غم كل من (Trans-Resveratrol ، Inulin ، Curcumin ، Citral) في 100مللتر من المذيب ثنائي مثيل سلفوكسيد (Dimethyl Sulphoxide) (Cinnamaldehyde) ثم عقت كل واحدة منهم بوساطة المرشحات الدقيقة Millipore filter بقطر 0.22 مايكروميتر ثم حفظت بالثلاجة لحين الاستعمال.

### 3-2-4: تحضير الأوساط الزرعية Prepration of culture media

### 3-2-4-1: تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة Ready culture media

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة وفقاً لتعليمات الشركات المجهزة وشملت كل من وسط الماكونكي الصلب MacConky agar، وسط تربتون الصويا الصلب Trypton soy Agar (TSA)، وسط التربتون الصويا السائل ( TSB ) Trypton Soy Broth، وسط سيمون السترات الصلب Simmon's Citrate agar وسط الحديد - ثنائي السكر الصلب Kliglar iron agar ثم صبت في اطباق بتري وأنابيب وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها قبل الزرع .

### 2-4-2-3: تحضير الأوساط الزرعية التركيبية Laboratory Culture media

#### 1-2-4-2-3: وسط اليوريا الصلب Urea agar

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 24 غم من وسط أساس اليوريا الصلب في 950 مل من الماء المقطر وعقم بجهاز المؤصدة وبعد تبريده الى درجة حرارة 45 م° اكمل الحجم الى اللتر بإضافة 50 مل من مادة اليوريا بتركيز 40 % (المحضر بإذابة 40 غم من مادة اليوريا في 100 مل وتعقيمها بوساطة المرشحات الدقيقة Millipore filters ( قطر فتحتها 0.22 مايكرومتر) واضيفت الى وسط اليوريا الصلب وصبت في انابيب معقمة .

#### 2-2-4-2-3: وسط اختبار الحركة Motility media

حضر بإذابة 1.3 غم من وسط المرق المغذي Nutrient agar و 0.5 غم من مادة الاكار - الاكار في 100 مللتر من الماء المقطر ثم وزعت في انابيب وعقمت بجهاز المؤصدة Autoclave وتركت بشكل عمودي (MacFaddin, 2000).

#### 3-2-4-2-3: وسط اختبار حركة السباحة Swimming

حضر بإذابة 10 غم من Tryptose و 5 غم من كلوريد الصوديوم و 3 غم من مادة الاكار - الاكار في 1000 مللتر من الماء المقطر ثم عقم بجهاز المؤصدة وصبت في اطباق وتركت حتى تتصلب (fusco et al., 2017).

#### 4-2-4-2-3: وسط اختبار حركة الانثيال Swarming

حضر بإذابة 13 غم من وسط المرق المغذي و 5 غم من سكر الكلوكوز و 5 غم من مادة الاكار - الاكار في 1000 مللتر من الماء المقطر ذي الاس الهيدروجيني 7 ثم عقم بجهاز المؤصدة وصبت في اطباق ثم تركت حتى تتصلب (Ye et al., 2015).

### 3-2-4-2-3: وسط اكار الحليب الفرز Skim milk agar

حضر حسب شركة Himedia Laboratories وذلك بإذابة 28 غم من مادة Skim milk في 100 مللتر من الماء المقطر و 28 غم من وسط الاكار المغذي في 900 مللتر من الماء المقطر ثم عقم بجهاز المؤصدة Autoclave ثم صب في اطباق وترك حتى يبرد .

### 3-2-4-2-3: وسط حركة السباحة Swimming المضاف له المركبات ذات المصادر الطبيعية

حضر الوسط بإضافة كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trance-cinnamaldhyde) المحضرة كما في الفقرة (3-2-3) كل منهم بتركيز (25، 50، 75، 100) مايكروغرام / مللتر كلاً على انفراد الى وسط السباحة Swimming المحضر في الفقرة (3-2-4-2-3) اذ تم مزجها جيداً وصبت في اطباق وتركت حتى تتصلب.

### 3-2-4-2-3: وسط حركة الانثيال Swarming المضاف له المركبات ذات المصادر الطبيعية

حضر الوسط بإضافة كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldhyde) المحضرة في الفقرة (3-2-3) كل منهم بتركيز (25، 50، 75، 100) مايكروغرام / مللتر كلاً على انفراد الى وسط الانثيال Swarming المحضر في الفقرة (3-2-4-2-3) ، اذ تم مزجها جيداً وصبت في اطباق وتركت حتى تتصلب.

### 3-2-4-2-3: وسط انتاج انزيم البروتيز المضاف له المركبات ذات المصادر الطبيعية

حضر الوسط بإضافة كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldhyde) المحضر في الفقرة (3-2-3) كل منهم بتركيز

(50 ، 100) مايكروغرام / ملتر كلاً على انفراد الى وسط انتاج انزيم البروتيز المحضر في الفقرة (3-2-4-2-5) ثم مزجت جيداً وصبت بعدها في اطباق وتركنت حتى تتصلب.

### 5-2-3 العزلات البكتيرية Bacterial Isolates

#### 1-5-2-3 : جمع العزلات البكتيرية Bacterial Isolates Collection

تم الحصول على 17 عزلة عائدة لجنس *C. sakazakii* من دراسة سابقة ، وتضمنت العزلات السريرية (6 من الدم، 6 من سائل النخاع الشوكي) وعزلات الحليب (3 من عينات حليب Dialac، 1 من عينات الحليب Novolac Allernova، 1 من عينات الحليب Novolac AD)، وهي مشخصة بجهاز Vitek-2 (الجبوري، 2016).

#### 2-5-2-3: التشخيص الزرعي

درست صفات المستعمرات النامية على وسط الماكونكي الصلب ووسط التريبتون الصويا الصلب (Fakruddin *et al.*, 2014).

#### 3-5-2-3 : الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test

##### 1-3-5-2-3: اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

اجري الاختبار بتلقيح وسط سترات السيمون الصلب المحضر في الفقرة (3-2-4-1) للبكتريا النامية على وسط اكار ماكونكي بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وكان تحول لون الكاشف من اخضر الى ازرق دليل على إيجابية الفحص (Bailey and Scotts, 2007).

2-3-5-2-3: اختبار تخمر السكريات وإنتاج غاز ثنائي أوكسيد الكربون وغاز كبريتيد

الهيدروجين (Kliglar Iron Agar).

أجري الاختبار بتلقيح وسط الحديد ثنائي السكر المحضر في الفقرة (1-4-2-3) للبكتريا النامية على وسط الماكونكي الصلب بطريقة الطعن ثم التخطيط على سطح الوسط و حضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة اعتمدت النتيجة على أساس التغيرات في الدلالة الحامضية في القعر والسطح من خلال تغير لون الكاشف من الأحمر الى الأصفر وإنتاج غاز CO<sub>2</sub> وتكوين راسب اسود H<sub>2</sub>S (Bailey and Scotts, 2007).

3-3-5-2-3: اختبار انتاج انزيم اليوريز Urease test

اجري الاختبار بتلقيح وسط اليوريا المحضر في الفقرة (1-2-4-2-3) للبكتريا النامية على وسط الماكونكي الصلب بطريقة التخطيط ثم حضنت في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ان عدم تغير لون الوسط الى اللون الوردي وبقائه باللون الأصفر دلالة على سلبية الفحص (Bailey and Scotts, 2007).

6-2-3 استخلاص الدنا الجينومي للبكتريا Genomic DNA extraction of the bacteria

استعملت العدة المجهزة من قبل شركة Promega لاستخلاص دنا البكتيريا وحسب الخطوات

الآتية :

1-لقت أنابيب حاوية على وسط التريبتون الصويا السائل بالبكتريا وحضنت بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة .

2-نقل 1400 مايكروليتر من العالق البكتيري من الوسط أعلاه بواسطة ماصة دقيقة الى أنابيب ابندورف معقمة Eppendorf Tube سعة 1500 مايكروليتر .

3- نبذت أنابيب الابدروف بجهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 2 دقيقة ثم تم التخلص من الطافي .

4- اضيف 500 مايكروليتر من محلول الحال Nuclei lysis solution الى أنابيب الابدروف الحاوية على راسب ومزج الراسب جيداً بوساطة جهاز Vortex لعدد من الثواني بعدها نقلت الانابيب الى حمام مائي Water Path بدرجة 70 م° لمدة 30 دقيقة ثم تركت تبرد بدرجة حرارة الغرفة .

5- اضيف 2.5 مايكروليتر من محلول RNAase Solution الى أنابيب الابدروف وتركت لمدة 15 دقيقة اذ يعمل على تثبيط عمل RNA.

6- اضيف 200 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين Protien Precipitation Solution الى أنابيب الابدروف وتركت لمدة 10 دقائق في الثلجة .

7- نبذت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13.000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق ثم نقل الطافي الى أنابيب الابدروف جديدة .

8- اضيف 500 مايكروليتر من كحول Isopropanole وتركت في الثلجة لمدة 10 دقائق

9- نبذت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13.000 دورة/دقيقة لمدة 2 دقيقة ثم سكب الطافي واحتفظ بالراسب .

10- اضيف 500 مايكروليتر من كحول Ethanol بتركيز 70% ونبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13.000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين

11- سحب الأيثانول ثم تركت الأنابيب مفتوحة لكي تجف

12- اضيف 100 مايكروليتر من محلول الاماهة (DNA rehydrate Solution) بعدها وضع في الثلجة لمدة 24 ساعة لحين الاستعمال.

## 7-2-3 التشخيص بوساطة الجين 16S rRNA

اختبرت 17 عزلة تعود لبكتريا *C. sakazakii* في التشخيص بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وباستعمال بادئ الجين الفرعي 16S rRNA اذ يتكون الحجم الكلي لمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل من 20 مايكروليتر كما في الجدول (3-8) ، بعد تحضير مزيج التفاعل تم ضبط الظروف المثلى لتفاعل البلمرة اذ ضخم الدنا DNA للعزلات البكتيرية بوساطة جهاز Thermal Cycler كما في الجدول (3-9) وحسب ماجاء (Hassan et al ., 2007).

جدول (3-8) محتويات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للجين 16S rRNA

الحجم بالميكروليتر	محتويات مزيج التفاعل
1	البادئ الامامي لجين Saka-a
1	البادئ العكسي لجين Saka-2a
3	DNA template
10	Go Taq Green Master Mix 2x
5	Nuclease –free water
20	الحجم الكلي

جدول (3-9) الظروف المثلى للكشف عن جين 16S rRNA لتشخيص بكتريا *Cronobacter sakazakii*

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل PCR
5 دقائق	دورة واحدة	95 م°	1-مرحلة مسخ الدنا الاولي Initial denaturation
30 ثانية		95 م°	2- مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية	30 دورة	52 م°	3- مرحلة الالتحام Annealing
30 ثانية		72 م°	4- الاستطالة Extension

7 دقائق	دورة واحدة	72 م°	5- مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
مستمرة	-	4 م°	6- مرحلة السيطرة Hold

### 3-2-8 الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

1- حضر هلام الاكاروز بإذابة 1 غم من Agarose في 100 مللتر من محلول دارى الترحيل

TAE المحضر في الفقرة (3-2-2-6) بعدها تم تسخين الاكاروز بدرجة الغليان ثم ترك ليبرد الى

درجة حرارة 50 م° بعد ذلك اضيف اليه 1 مايكروليتر من بروميد الايثيديوم Ethidium Bromide

بتركيز 0.1 مايكروغرام/مللتر .

2- صب الاكاروز في صفيحة الاسناد بعد تثبيت المشط داخل الصفيحة ، بعدها ترك ليتصلب .

3- رفع المشط بهدوء من صفيحة الاكاروز المتصلب ثم ثبتت الصفيحة داخل وحدة الترحيل

الكهربائي المتمثل بالحوض المستعمل في الترحيل الكهربائي بعدها تم ملء الحوض بمحلول TAE

بكمية تغطي سطح هلام الاكاروز بالكامل .

4- وضع 6 مايكروليتر من ناتج تفاعل PCR الى حفر المخصصة لها ووضع ايضاً 5 من محلول

الدليل البلمرة الحجمي DNA Ladder (100-1500) زوج قاعدي في اول حفرة المستعمل لتحديد

احجام قطع الدنا DNA ثم مرر تيار كهربائي بفرق جهد 100 فولت ولمدة 70 دقيقة .

5- فحص هلام الاكاروز بعد انتهاء الترحيل باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية UV-

.Transilluminator

### 9-2-3 حفظ العزلات البكتيرية

#### Short storage isolates 1-9-2-3 حفظ العزلات لمدة قصيرة

زرعت البكتريا على وسط التريبتون الصويا الصلب المحضر كما في الفقرة (1-4-2-3) في انابيب بطريقة التخطيط على الوسط بشكل مائل ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وبعدها حفظت في الثلاجة وجددت لحين الاستعمال (Harly and Prescott, 2002).

#### Long storage isolates 2-9-2-3 حفظ العزلات لمدة طويلة

زرعت البكتريا في وسط تريبتون الصويا السائل المحضر كما في الفقرة (1-4-2-3) اذ لقع الوسط بالبكتريا ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة ثم اضيف له كليسيروول بتركيز 20% وحفظت بالتجميد (Vandepitte et al., 2003).

#### 10-2-3: اختبار الحركة Motility

زرعت البكتريا في وسط الحركة المحضر كما في الفقرة (2-2-4-2-3) بطريقة الطعن ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة (MacFaddin, 2000).

#### 11-2-3: اختبار الحركة على وسط السباحة Swimming Motility test

زرعت العزلات البكتيرية على وسط السباحة Swimming المحضر في الفقرة (2-4-2-3-2-3) بنقل عذلة منفردة في مركز الطبق ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م ° ولمدة 24 ساعة بعدها تم قياس حركة المستعمرة بوحدة القياس الملمتري (Shi et al., 2017) (محور وذلك بنقل مستعمرة الى مركز الوسط وليس بطريقة التخطيط).

### 3-2-12: اختبار الحركة على وسط الانثيال Swarming Motility test

زرعت العزلات البكتيرية على وسط الانثيال Swarming المحضر في الفقرة (3-2-4-2-4) بنقل عزلة منفردة في مركز الطبق ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة وبعدها تم قياس قطر المستعمرة بوحدة القياس الملمتري (Shi et al., 2017) (محور وذلك بنقل مستعمرة الى مركز الوسط وليس بطريقة التخطيط).

### 3-2-13 : اختبار انتاج انزيم Protease

اجري الاختبار من خلال تحضير عالق بكتيريا بتلقيح المحلول الفسلجي Normal saline بمستعمرات البكتيريا ومايعادل ماكفرلاند  $27 \times 10^8$  خلية/ مل ثم نقلت منه 100 مايكروليتر الى الحفر التي عملت مسبقا بواسطة الثاقب الفليني لوسط الحليب الفرز الصلب المحضر في الفقرة (3-2-4-2) ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة وكانت النتيجة موجبة وظهور هالة سطحية بيضاء دلالة على إيجابية الاختبار (Kothary et al., 2007) (محور وذلك بنقل العالق البكتيري في حفرة وليس بطريقة التخطيط).

### 3-2-14: اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في نمو بكتريا *Cronobacter*

*sakazakii*

اضيف كل من (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) المحضرة كما في الفقرة (3-2-3) بتركيز (1، 10، 25، 50، 75، 100) مايكروغرام / ملتر الى وسط التريبتون الصويا السائل المحضر في الفقرة (3-2-4-1) ولقح بالعالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة ومايعادل ماكفرلاند  $1.5 \times 10^8$  خلية/ مل ، تم حضنها لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وتم قياس النمو بجهاز المطياف الضوئي بطول موجي 600 نانومتر.

3-2-15: اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في حركة السباحة **Swimming**

#### لبكتريا *Cronobacter sakazakii*

زرعت كل من العزلة قيد الدراسة، في مركز وسط السباحة الحاوي على المركبات ذات المصادر الطبيعية المحضرة كما في الفقرة (3-2-4-2-3)، ثم حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م، بعدها تم قياس حركة المستعمرة بوحدة القياس الملمتر (Shi et al., 2017).

3-2-16: اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في ظاهرة **Swarming** لبكتريا

#### *Cronobacter sakazakii*

زرعت كل من العزلة قيد الدراسة في مركز وسط السباحة الحاوي على المركبات ذات المصادر الطبيعية المحضرة في الفقرة (3-2-4-2-3)، ثم حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م °، بعدها تم قياس حركة المستعمرة بوحدة القياس الملمتر (Shi et al., 2017).

3-2-17: اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في إنتاج انزيم **Protease** لبكتريا

#### *Cronobacter sakazakii*

اجري الاختبار كما في الفقرة (3-2-13) على وسط انتاج انزيم البروتياز الحاوي على المركبات ذات المصادر الطبيعية المحضرة في الفقرة (3-2-4-2-3).

3-2-18: اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي باستعمال

#### طريقة اطباق المعايرة لبكتريا *Cronobacter sakazakii*

اتبعت طريقة (Choi et al., 2015) (المحورة) للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي باستعمال اطباق المعايرة **Microtiter plate**، اذ اختبر تأثير كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي **Biofilm** باستعمال اطباق صفيحة المعايرة **Microtiter plate** التي تمتلك

- 1- وضع 200 مايكروليتر من وسط التريبتون صويا السائل في العمود الأول وعد سيطرة سالبة.
- 2- وضع 175 مايكروليتر من وسط التريبتون صويا السائل و25 مايكروليتر من العالق البكتيري، في العمود الثاني وعد كسيطرة موجبة.
- 3- وضعت 200 مايكروليتر من وسط التريبتون الصويا السائل الحاوي على تراكيز مختلفة من مركب ( Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol ، Trance-cinnamaldhyde ) المحضرة في الفقرة (3-2-3) والعالق البكتيري بثلاثة مكررات لكل تركيز وعزلة بكتيرية.
- 4- حضنت اطباق المعايرة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم تم التخلص من محتويات الحفر
- 5- اضيف 100 مايكروليتر من Methanol لكل حفرة لمدة 15 دقيقة لغرض تثبيت الخلايا البكتيرية الملتنقة على جدار الحفر ثم سكب الميثانول وترك الطبق ليجف.
- 6- اضيف 200 مايكروليتر من صبغة Crystal violet المحضرة كما في الفقرة (3-2-2-4) لمدة 20 دقيقة ثم ازيلت الصبغة.
- 7- إضافة 200 مايكروليتر من محلول الفوسفات الدائري المحضر كما في الفقرة (3-2-2-3) وسكبها لمرتين لغرض غسل الحفر .
- 8- اضيف 200 مايكروليتر من كحول الايثانول المركز.
- 9- قرئت الكثافة الضوئية بجهاز الاليزا Enzyme Linked Immunsorbent Assay عند (ELISA reader) عند طول موجي 570 نانومتر
- 10- قيست نسبة التثبيط كما في الفقرة (3-2-2-3).

### 19-2-3 اختبار تأثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو بكتريا *Cronobacter sakazakii*

#### 1-19-2-3 اختبار تأثير درجات الحرارة

1-زرعت 17 عزلة لبكتريا *C. sakazakii* من مصادر مختلفة في وسط التريبتون صويا السائل

TSB المحضر كما في الفقرة (1-4-2-3)

2- حضنت الانابيب بدرجات حرارة مختلفة (25، 37، 55)°م لمدة 24 ساعة

3- قيس كثافة نمو البكتريا باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer بطول موجي

600 نانومتر.

#### 2-19-2-3 اختبار تأثير الرقم الهيدروجيني

1-زرعت 17 عزلة لبكتريا *C. sakazakii* في وسط التريبتون صويا السائل TSB المحضر في

الفقرة (1-4-2-3) بعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى (4 ، 7 ، 9) باستعمال حامض الهيدروكلوريك

HCL وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1 مولار

2- حضنت العزلات بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة

3- قيس كثافة نمو البكتريا باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer بطول موجي

يساوي 600 نانومتر

### 20-2-3 الكشف الجزيئي للجين *flgJ* و *zpx* باستعمال جهاز التقدير الكمي Real time-PCR

#### لبكتريا *Cronobacter sakazakii*

تم الكشف عن الجينين *zpx* و *flgJ* باستعمال تقانة RT-PCR للعزلة CSF4 ( مصدرها عينات

سائل النخاع الشوكي ) ، كما في الجدول (10-3) و(11-3)

جدول (3-10) مزيج تفاعل RT-PCR للجين *zpx*

الحجم بالميكروليتر	محتويات مزيج التفاعل
5	q PCR Master Mix
0.5	البادئ الامامي للجين <i>zpx F</i>
0.5	البادئ العكسي لجين <i>zpx R</i>
1.5	DNA template
2.5	Nuclease –free water
10	الحجم الكلي

جدول (3-11) مزيج تفاعل RT-PCR للجين *flgJ*

الحجم بالميكروليتر	محتويات مزيج التفاعل
5	q PCR Master Mix
0.5	البادئ الامامي للجين <i>flgJ F</i>
0.5	البادئ العكسي لجين <i>flgJ R</i>
1.5	DNA template
2.5	Nuclease –free water
10	الحجم الكلي

وضبطت الظروف المثلى لتفاعل RT-PCR للجين *zpx* حسب ما جاء في (Kothary *et al* ., 2007)

والموضحة في الجدول (3-12) وللجين *flgJ* حسب ماجاء في (Amalaradjon and

( Venkitanarayanan , 2011a ) والموضحة في الجدول (3-13)

الجدول (3-12) خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *zpx* باستعمال RT-PCR

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل RT-PCR
5 دقائق	دورة واحدة	95 °م	1-مرحلة مسخ الدنا الاولي Initial Denaturation
30 ثانية	45 دورة	95 °م	2- مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية		62 °م	3- مرحلة الالتحام Annealing
10 ثانية		72 °م	4- مرحلة الاستطالة Extension
0.3 م/ثانية		95-72 °م	5- Melt on green

الجدول (3-13) خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *flg J* باستعمال تفاعل RT-PCR

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل RT-PCR
5 دقائق	دورة واحدة	95 °م	1-مرحلة مسخ الدنا الاول Initial Denaturation
20 ثانية	45 دورة	95 °م	2- مرحلة مسخ الدنا Denaturation
20 ثانية		60 °م	3- مرحلة الالتحام Annealing
20 ثانية		60 °م	4- مرحلة الاستطالة Extension
0.3 م /ثانية		95-72 °م	5- Melt on green

### 21-2-3 استخلاص RNA والتعبير الجيني

#### 1-21-2-3 استخلاص RNA والتعبير الجيني للعزلة CSF4 قيد الدراسة

1- زرعت العزلة *C. sakazakii* (CSF4) على وسط الماكونكي MacConky للحصول على

عزلة منفردة وذلك بعد حضنها بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة

2- نقلت ثلاث مستعمرات منفردة الى وسط التريبتون صويا السائل المحضر في الفقرة (1-4-2-3)

للعزلة CSF4 ( مصدرها عينات سائل النخاع الشوكي) وعدت كمجموعة سيطرة .

3- درس التركيز المثبط الأدنى من المركبات قيد الدراسة اذ حضر (0.01-100) مايكروغرام/ ملتر

في وسط التريبتون الصويا السائل المحضر في الفقرة (3-2-14) بعدها زرعت العزلة *C. sakazakii*

(CSF4) على الوسط المذكور بوجود المركبات ذات المصادر الطبيعية بتركيز تحت المثبط

الادنى SMIC.

4- حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

5- سحب 1200 مايكروليتر من المزروع البكتيري ووضعة في انابيب الابدنروف Eppendorf

tube ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة دقيقتين وبسرعة 13000 دورة /دقيقة

6- سحب الطافي واحتفظ بالراسب ثم اضيف 600 مايكروليتر من مادة Trizole على الراسب ثم

مزجت جيداً بواسطة الماصة الدقيقة وتركت لمدة 10 دقائق .

7- اضيف 200 مايكروليتر من محلول Chloroform الى انابيب الابدنروف ومزجت جيداً

وتركت لمدة 5 دقائق

8- نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة /دقيقة لمدة 12 دقيقة

9-سحبت الطبقة المائية التي تحوي على RNA ووضعت في انابيب الابدنروف جديد

10- اضيف 500 مايكروليتر من Isopropanol الى انابيب الابدروف الجديدة ووضعت في الثلاجة لمدة 10 دقائق .

11- نبذت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة /دقيقة ولمدة 10 دقائق

12- سحبت طبقة Isopropanol وضيف 500 مايكروليتر من الايثانول بتركيز 70% ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة /دقيقة ولمدة 5 دقائق , ثم سحب الايثانول وتترك انابيب الابدروف مفتوحة حتى تجف

13- اضيف 70 مايكروليتر من Nuclease free water ثم حفظت العزلات في الثلاجة لحين الاستعمال .

14- اجري تفاعل Real Time-PCR وحسب الظروف المثلى للجين المحافظ كما في الجدول (3-17) و الجين *flgJ* كما في الجدول (3-18) والجين *zpx* كما في الجدول (3-19) وبجسم نهائي 10 مايكروليتر لكل من الجين المحافظ كما في الجدول (3-14) والجين *flgJ* كما في الجدول (3-10) والجين *zpx* كما في الجدول (3-16).

جدول (3-14) مكونات مزيج التفاعل للتعبير الجيني RT-PCR للجين المحافظ .

الحجم بالمايكروليتر	محتويات مزيج التفاعل
5	q PCR Master Mix
0.5	البادئ الامامي للجين المحافظ Saka-1
0.5	البادئ العكسي للجين المحافظ Saka -2a
0.25	RT Mix
0.25	MgCl <sub>2</sub>
1.5	RNA
2	Nuclease Free-Water
10	الحجم الكلي

جدول (3-15) مكونات مزيج التفاعل للتعبير الجيني RT-PCR لجين *flgJ*

الحجم بالميكروليتر	محتويات مزيج التفاعل
5	qPCR Master Mix
0.5	البادئ الامامي لجين <i>flgJ F</i>
0.5	البادئ العكسي لجين <i>flgJ R</i>
0.25	RT Mix
0.25	MgCl <sub>2</sub>
1.5	RNA
2	Nuclease Free-Water
10	الحجم الكلي

جدول (3-16) مكونات مزيج التفاعل للتعبير الجيني RT-PCR لجين *zpx*

الحجم بالميكروليتر	محتويات مزيج التفاعل
5	q PCR Master Mix
0.5	البادئ الامامي لجين <i>zpx F</i>
0.5	البادئ العكسي للجين <i>zpx R</i>
0.25	RT Mix
0.25	MgCl <sub>2</sub>
1.5	RNA
2	Nuclease Free-Water
10	الحجم الكلي

جدول (3-17) الظروف المثلى للتعبير الجيني للجين المحافظ

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة المئوية	المرحلة	التسلسل
دورة واحدة	15 دقيقة	37	<b>Reverse Transcriptase enzyme activation</b>	<b>1</b>
	5 دقيقة	95	<b>Initial denaturation</b>	<b>2</b>
دورة 45	20 ثانية	95	<b>Denaturation</b>	<b>3</b>
	20 ثانية	52	<b>Annealing</b>	<b>4</b>
	20 ثانية	72	<b>Extension</b>	<b>5</b>
	0.3 م / ثانية	95-72 م	<b>Melt on green</b>	<b>6</b>

جدول (3-18) الظروف المثلى للتعبير الجيني للجين *flgJ*

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة المئوية	المرحلة	التسلسل
دورة واحدة	15 دقيقة	37	<b>Reverse Transcriptase enzyme activation</b>	<b>1</b>
	5 دقيقة	95	<b>Initial denaturation</b>	<b>2</b>
دورة 40	29 ثانية	95	<b>Denaturation</b>	<b>3</b>
	20 ثانية	60	<b>Annealing</b>	<b>4</b>
	20 ثانية	60	<b>Extension</b>	<b>5</b>
	0.3 م° / ثانية	95-72 م°	<b>Melt on green</b>	<b>6</b>

جدول (3-19) الظروف المثلى للتعبير الجيني للجين *zpx*

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة المئوية	المرحلة	التسلسل
دورة واحدة	15 دقيقة	37	<b>Reverse Transcriptase enzyme activation</b>	<b>1</b>
	10 دقيقة	95	<b>Initial denaturation</b>	<b>2</b>
دورة 45	20 ثانية	95	<b>Denaturation</b>	<b>3</b>
	20 ثانية	62	<b>Annealing</b>	<b>4</b>
	20 ثانية	72	<b>Extension</b>	<b>5</b>
	0.3 م° / ثانية	95-72 م°	<b>Melt on green</b>	<b>6</b>

3-2-21-2 استخلاص RNA للعزلات التي تم تنميتها على وسط Swimming السباحة ووسط

### الانثيال Swarming

1- زرعت عذلة (*C. sakazakii* (CSF4) على وسط الماكونكي MacConkey للحصول على عزلات منفردة بعد حضنها بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة .

2- زرعت العذلة (*C. sakazakii* (CSF4) على وسط Swimming المحضر كما في الفقرة (3-2-4-2) ووسط Swarming المحضر في الفقرة (3-2-4-2-3) (عدت سيطرة).

3- درس التركيز المثبط الأدنى من مركب Trans-cinnamaldehyde اذ حضر (100-0.01) مايكروغرام / ملتر في وسط السباحة Swimming المحضر في الفقرة (3-2-3-15) ووسط الانثيال Swarming المحضر في الفقرة (3-2-3-16) بعدها زرعت العذلة (*C. sakazakii* (CSF4) في وسط Swimming ووسط Swarming الحاوي على مركب Trans-cinnamaldehyde بتركيز . SMIC

4- حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة

5- حضر عالق بكتيري بتلقيح العذلة المنتخبة (معامل السيطرة ومعامل الاختبار) بالمحلول الفسلجي Normal Saline بحجم 1000 مايكروليتر ثم نقلت الى انابيب الابندروف بعد التأكد من عكورة الوسط بمقارنتها مع عكورة محلول ماكفرلاند وما يعادل  $10^8 \times 27$  نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13.000 دورة /دقيقة ولمدة دقيقتين .

6- تم اتباع الخطوات نفسها في التسلسل (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) في الفقرة (3-2-21-1).

3-2-22 حساب مقدار التغير في مستوى التعبير الجيني حسب المعادلات الآتية :

$$\text{Folding} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT (Threshold Cycle)} = \Delta\text{CT}_{\text{Treated}} - \Delta\text{CT}_{\text{Control}}$$

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{gene}} - \text{CT}_{\text{House keeping gene}}$$

3-2-23 : معادلة حساب نسبة التثبيط

تم حساب نسبة التثبيط حسب المعادلة الآتية:

$$\text{نسبة التثبيط \%} = 100 \times \frac{\text{معاملة السيطرة} - \text{معامل لاختبار}}{\text{معاملة السيطرة}}$$

# الفصل الرابع

## النتائج والمناقشة

## 4- النتائج والمناقشة Result and Discussion

### 4-1 جمع وزرع العزلات البكتيرية

#### Collection and culturing of bacterial isolates

تم الحصول على 17 عزلة عائدة لنوع *C. sakazakii* من عينات سريرية وحليب الأطفال من دراسة سابقة ( الجبوري ، 2016 ) ، وتضمنت العزلات (6 من الدم ، 6 من سائل النخاع الشوكي CSF، 5 من عينات الحليب) وقد زرعت جميع العزلات على وسط الماكونكي الصلب ووسط التريبتون صويا الصلب.

### 4-2 تأكيد تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates

#### 4-2-1 Cultural Identification التشخيص المزرعي

أظهرت جميع العزلات البكتيرية نموها على وسط التريبتون صويا الصلب بمستعمرات صفراء ذهبية ، اما على وسط الماكونكي الصلب فقد ظهرت مستعمرات باللون الوردي وهذا يدل على انها مخمرة لسكر اللاكتوز.

#### 4-2-2 Biochemical Identification التشخيص بالفحوصات الكيموحيوية

بينت نتائج الأختبارات الكيموحيوية كما في الجدول (4-1) ، ان جميع عزلات بكتريا *C. sakazakii* أعطت نتيجة متغايرة لاختبار استهلاك السترات ، كما كانت موجبة لتخمير الكلوكوز واللاكتوز وغير منتجة لغاز  $H_2S$  ومنتجة لغاز  $CO_2$  على وسط Kligler Iron Agar (KIA) كما كانت سالبة لاختبار انزيم اليوريز وتشابهت هذه النتائج مع ماورد في (Fakruddin et al ., 2014) . وكما أشار الجبوري ( 2016 ) فإن جميع العزلات أعطت فحصاً سالباً لاختبار الاندول واختبار الاوكسيديز ، فيما أعطت فحصاً موجباً لاختبار الكتاليز وفحصاً موجباً

للحامض الاميني Ariginine و Ornithine مما يدل على انتاجها لانزيم Ornithine decarboxylase و Ariginine decarboxylase على التوالي ، وحصاً سالباً لحامض Lysine مما يشير الى عدم انتاجها لانزيم Lysine decarboxylase وأظهرت جميع العزلات قدرتها على تخمر عدد من السكريات وهي Raffinose و D- Melibios و Rhamnose وتكون اللون الأصفر للمستعمرات دلالة على قدرتها على انتاج الحامض من السكر .

جدول (1-4) الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *Cronobacter sakazakii*

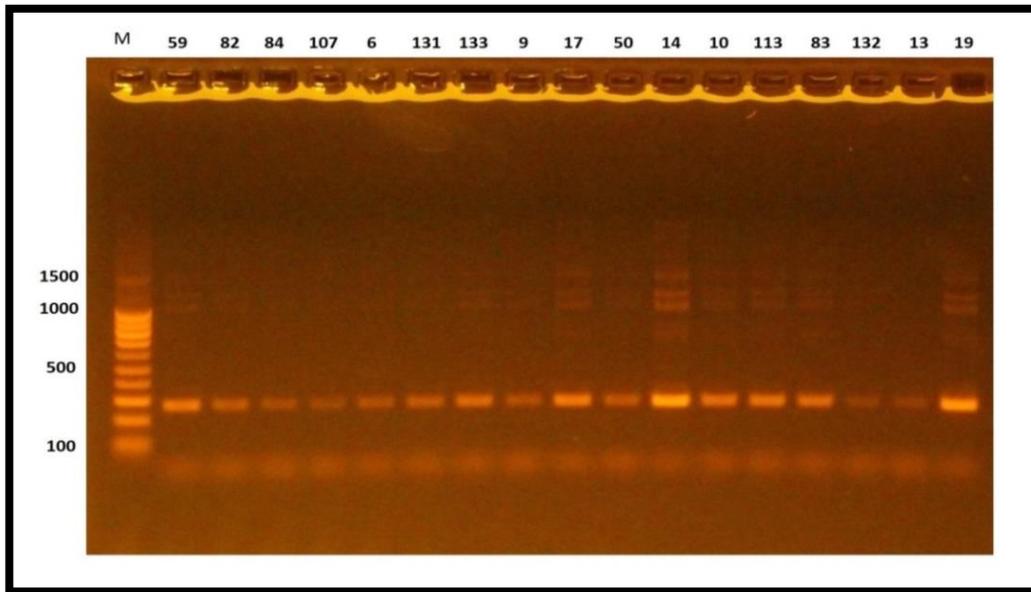
KIA				اليوريا	اختزال السترات	العزلة	المصدر
CO2	H2S	Butt	Slant				
+	-	Acid	Acid	-	/	B1	الدم Blood
				-	+	B2	
				-	(±)	B3	
				-	+	B4	
				-	+	B5	
				-	+	B6	
				-	+	CSF1	سائل النخاع الشوكي CSF
				-	+	CSF2	
				-	+	CSF3	
				-	+	CSF4	
				-	(±)	CSF5	
				-	+	CSF6	CSF
				-	+	A1a	عينات الحليب
				-	+	A1b	
				-	+	A1c	
-	+	C1					
-	/	C2					

Novolac AD :C2 ، Novolac Allernova: C1 ،Dialac: A1

(+) نتيجة موجبة، (-) نتيجة سالبة، (±) نتيجة سالبة وموجبة، (/) نتيجة مغايرة

### 3-2-4 Molecular Identification التشخيص الجزيئي

شخصت جميع عزلات بكتريا *C. sakazakii* السريرية (12 عذلة ) والعزلات المعزولة من الحليب (5 عزلات) باستعمال البادئ الفرعي للجين 16S rRNA للكشف عن جين 16S rRNA في جينوم البكتريا لتأكيد تشخيصها بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، باستعمال جهاز التدوير الحراري Thermal Cycler اذ أظهرت النتائج ان كل العزلات تعود للنوع *C. sakazakii* لاملاكها الجين 16S rRNA ذو الوزن الجزيئي (406) زوج قاعدة كما في الشكل (1-4)



شكل (1-4)الترجيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين 16S rRNA لعزلات بكتريا *C. sakazakii* بفرق جهد (100) فولت لمدة 70 دقيقة و 1% Agarose المسار M يمثل الدنا القياسي (100-1500) زوج قاعدة والمسار (107، 131، 133، 10، 113، 19) تمثل عزلات الدم والمسار (59، 82، 84، 50، 83، 132) تمثل عزلات سائل النخاع الشوكي والمسار (6، 9، 17، 14، 13) تمثل عزلات الحليب

### 3-4 اختبار قدرة عزلات بكتريا *Cronobacter sakazakii* على الحركة Motility

أختبرت قدرة عزلات بكتريا *C. sakazakii* على الحركة فأظهرت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية قادرة على الحركة وبمعدلات مختلفة بعد الحضان لمدة 24 ساعة، اذ كانت عزلتان من عينات

الدم، وثلاث عزلات من سائل النخاع الشوكي، وعزلة واحدة من الحليب ذات حركة قوية فيما كانت العزلات الأخرى متوسطة الحركة كما موضح في الجدول (2-4)

جدول (2-4) اختبار الحركة Motility لعزلات بكتريا *C. sakazakii*

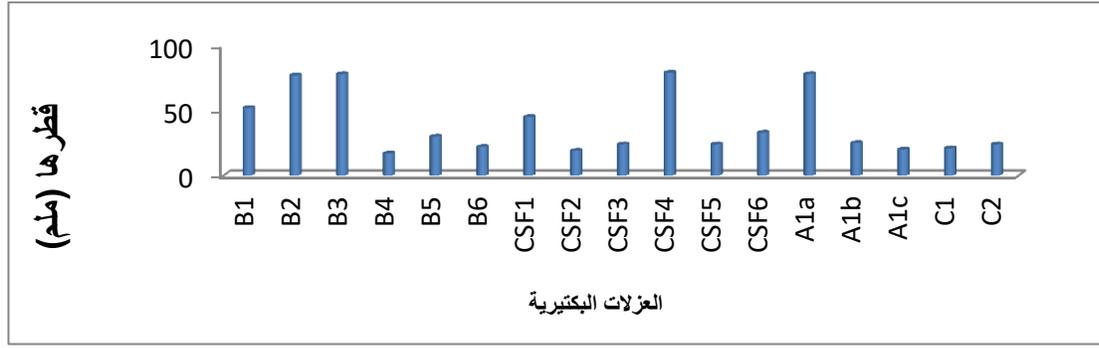
النتيجة	العزلة	المصدر	النتيجة	العزلة	المصدر
(+)	A1a	حليب Dialac	(+)	B1	الدم Blood
(+)	A1b		(+)	B2	
(++)	A1c		(+)	B3	
(+)	C1	حليب Novolac Allernova	(+)	B4	
			(++)	B5	
			(++)	B6	
(+)	C2	حليب Novolac AD	(+)	CSF1	سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid
			(+)	CSF2	
			(++)	CSF3	
			(+)	CSF4	
			(++)	CSF5	
			(++)	CSF6	

(++) حركة قوية، (+) حركة متوسطة

وهذا ماشار اليه (2017) Shi et al , الى قدرة بكتريا *C.sakazakii* على الحركة. كما أشار (2017) Hoeflinger and Miller الى ان بعض الظروف البيئية المحيطة مثل كثافة المواد الغذائية، تعمل على إيقاف الحركة من خلال تأثيرها في جينات الاسواط ، مشيراً الى ان امتلاك بكتريا *C. sakazakii* اكثر من 40 جيناً يعبر عن هيكل ووظيفة السوط.

#### 4-4 اختبار قدرة عزلات بكتريا *Cronobacter sakazakii* على حركة السباحة *Swimming* و والانثيال *Swarming*

أظهرت بكتريا *C. sakazakii* قدرتها على السباحة *Swimming* وتكوين ظاهرة الانثيال *Swarming* فقد بينت النتائج كما في الشكل (2-4) ، ان جميع العزلات لها القدرة على السباحة وبأقطار مختلفة، بعد الحضان لمدة 24 ساعة. فقد أظهرت 4 عزلات (A1a،CSF4، B3،B2) قطر الحركة (78،79،78،77) ملم على التوالي وتعد حركة قوية، و 4 عزلات (B1، B5، CSF1، CSF6) قطر الحركة (52، 30، 45، 33) ملم على التوالي وهي حركة متوسطة ، في حين العزلات (B4، B6، CSF2، CSF3، CSF5، A1b، A1c، C1، C2) كانت حركتها بقطر (17،22، 19، 24، 24، 25، 20، 21، 24) ملم على التوالي وتعد حركة ضعيفة .



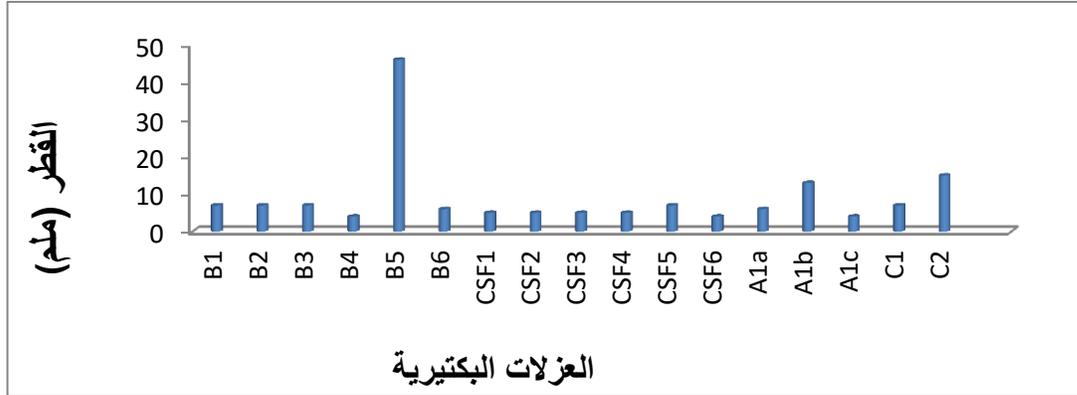
شكل (2-4) اقطار حركة السباحة *Swimming* لعزلات بكتريا *C. sakazakii*

B : الدم ، CSF ، Sائل النخاع الشوكي :Cerebrospinal Fluid ، A1 : حليب Dialac ، C1 حليب  
Novolac AD ، C2 : حليب Novolac Allernova

اما قدرة العزلات البكتيرية على حركة الانثيال *Swarming* كما في الشكل (3-4). فقد بينت النتائج ان عزلة واحدة (B5) بلغ قطرها 46 ملم وهي ذات حركة قوية ، في حين 16 عزلة كانت ذات قدرة ضعيفة على حركة الانثيال وتضمنت 3 عزلات (A1c ، CSF6 ، B4) قطر الحركة 4 ملم و4 عزلات (CSF4، CSF3 ، CSF2، CSF1) قطر الحركة 5 ملم وعزلتان (A1a، B6)

كان القطر 6 ملم و 5 عزلات ( B1 ، B2، B3، CSF5، C1) قطر الحركة 7 ملم والعزلة (A1b)

قطرها 13 ملم بينما العزلة C2 قطرها 15 ملم



شكل (3-4) اقطار حركة الانتثال Swarming لعزلات بكتريا *C. sakazakii*

B : الدم ، CSF ، Blood :سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal Fluid ، A1 : حليب Dialac ، C1 حليب Novolac AD ، C2 ، Novolac Allernova

تمتلك بكتريا *C. sakazakii* القابلية على حركة السباحة Swimming والانتثال

Swarming بنسب متباينة وهذا ما أشار اليه (2015). Ye et al ان لسلاطات بكتريا *C.*

*sakazakii* القابلية على حركة السباحة خلال 8 ساعات وحركة الانتثال خلال 12 ساعة وكانت

السلالة *C. sakazakii* L3101 اكثر قدرة على السباحة من السلالة *C. sakazakii* G362 في

حين كانت اضعف في قدرتها على الانتثال. كما ان جين Methyl-accepting chemotaxis

(MCP) protein المحمول على البلازميد يمثل دوراً في حركة بكتريا *C. sakazakii* .اذ أشار

(2015). Choi et al الى قلة حركة بكتريا *C. sakazakii* تحت الظروف البيئية القاسية اذ بلغت

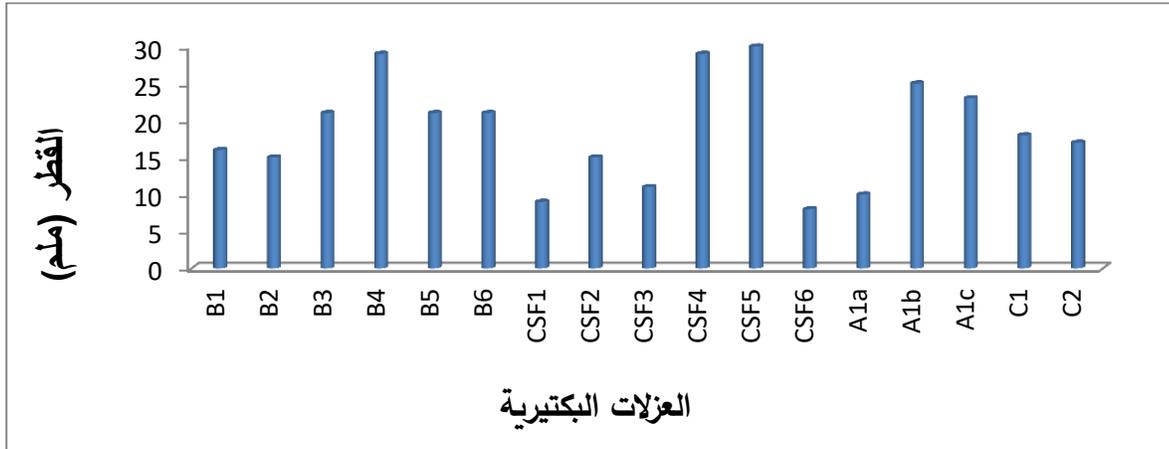
15.7 ملم في حين أدى تطفير جين MCP الى زيادة حركة البكتريا لتبلغ 31 ملم. بينت النتائج ان

اختلاف حركة السباحة والانتثال كانت اعتماداً على نوع السلالة ولم يلاحظ اختلافات بين العزلات

السريية والعزلات المعزولة من الحليب في قدرتها على حركة السباحة والانتثال.

#### 4-5 اختبار قدرة عزلات بكتريا *Cronobacter sakazakii* على انتاج انزيم البروتيز

للكشف عن انتاج انزيم البروتيز المنتج من قبل بكتريا *C. sakazakii* تم زراعتها على وسط الحليب الفرز الصلب ، اذ اظهر الشكل (4-4) جميع العزلات قدرتها على انتاج انزيم البروتيز وبنسبة 100% وبأقطار مختلفة، فقد كان قطر العزلة B4، CSF5،CSF4، بلغ (30،29،29) ملم وتعد قوية في انتاج انزيم البروتيز و 11 عزلة (C2،C1،A1c،A1b،CSF3،CSF2،B6،B5،B3،B2،B1) بلغ قطرها (15،16،17،18،23،25،11،15،21،21،21) ملم على التوالي وتعد متوسط الإنتاجية وكانت ثلاثة عزلات (A1a،CSF6،CSF1) قطرها (9، 8، 10) ملم وتعد الأقل إنتاجا للبروتيز.



شكل (4-4) اقطار انتاج انزيم البروتيز لعزلات بكتريا *C. sakazakii*

B : الدم CSF , Blood :سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal Fluid , A1 : حليب Dialac , C1 حليب  
C2 , Novolac Allernova : حليب Novolac AD

في حين أشار Kothary et al.(2007) الى قدرة بكتريا *C. sakazakii* على انتاج انزيم البروتيز في وسط الحليب الصلب بعد حضن لمدة 2 الى 3 أيام بدرجة حرارة 37 م ° وان 50% من العزلات كانت قادرة انتاج انزيم البروتيز. وهذا ما أشار اليه (Fakruddin et al. (2014) الى ان 50% من عزلات بكتريا *C. sakazakii* لها القدرة على انتاج انزيم البروتيز في وسط الحليب الصلب. ان اختلاف نسبة انتاج انزيم البروتيز عن دراستنا الحالية، قد يعود الى سلالة العزلة البكتيرية

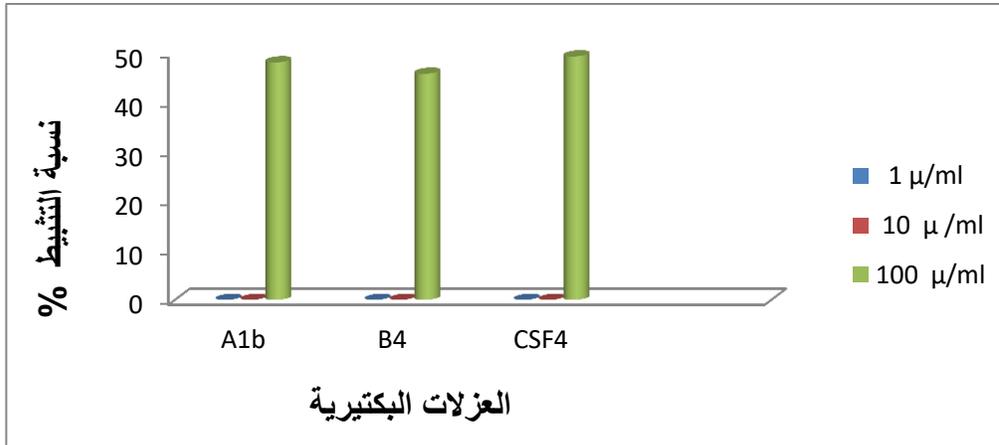
ومصدرها ولم يلاحظ اختلاف بين العزلات السريرية والعزلات المعزولة من الحليب في قابليتها على إنتاج انزيم البروتيز.

#### 4-6 اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في نمو عزلات بكتريا

##### *Cronobacter sakazakii*

قدر تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral) في بكتريا (*C. sakazakii* (A1b, B4, CSF4) وذلك باستخدام التراكيز (1, 10, 100) مايكروغرام/ ملتر.

اذ تشير النتائج الشكل (4-5) ان مركب Citral له القدرة في تثبيط بكتريا *C. sakazakii* عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر اذ بلغ (48.1، 45.8، 49.3) % للعزلات A1b, B4, CSF4 على التوالي، ولم يبدي التركيز (1, 10) مايكروغرام/ ملتر أي فعلاً تثبيطياً لنمو البكتريا.



شكل (4-5) نسب تثبيط عزلات بكتريا *C. sakazakii* باستعمال مركب Citral

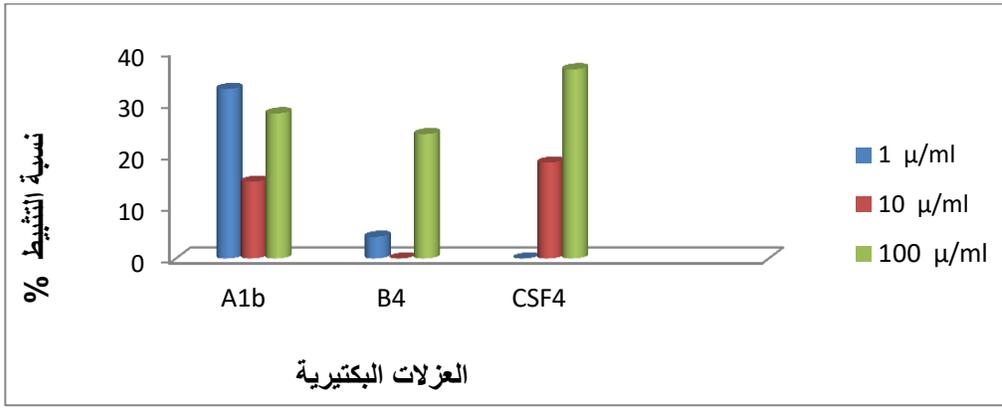
A1b: حليب Dialac، B4: الدم، CSF4: سائل النخاع الشوكي، Cerebrospinal fluid

أظهرت دراسة (Shi et al., 2017). التأثير المثبط لمركب Citral في نمو بكتريا *C.*

*sakazakii* بعد مدة حضن 24 ساعة، اذ لوحظ انخفاض معدل النمو عند التركيز 3600

مايكرومولار، ولم يلاحظ أي تثبيط عند تركيز اقل من 225 مايكرومولار.

وأشارت النتائج في الشكل (4-6) الى ان مركب الكركمين Curcumin له القدرة في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii* عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر فقد بلغت (28، 24، 36.5)% للعزلات CSF4، B4، A1b على التوالي، اما التركيز 10 مايكروغرام/ ملتر فقد بلغت (14.8، 18.5) للعزلتين CSF4، A1b على التوالي، ولم يلاحظ تثبيط العزلة B4 اما التركيز 1 مايكروغرام/ ملتر فبلغت (4.2، 32.7)% للعزلتين B4، A1b على التوالي ولم يلاحظ تثبيط العزلة CSF4.



شكل (4-6) نسب تثبيط عزلات بكتريا *C. sakazakii* باستعمال مركب Curcumin

A1b: حليب Dialac، B4: الدم، CSF4: سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid

أشار (Mun et al. (2013) و Tyagi et al. (2015) الى تأثير مركب Curcumin في

تثبيط نمو البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام من خلال تحليل الجدار والغشاء الساييتوبلازمي، وتغير

من نفاذية الاغشية الخلوية وتثبيط انزيم ATPase، مشيراً الى ان ارتباط مركب Curcumin مع

طبقة الببتيدوكلايكان لاتكون بصورة مباشرة. في حين أشار (Teow et al. (2016) ان التأثير

التثبيطي لمركب Curcumin تعود الى تثبيط بروتين (Filamenting temperature Sensitive)

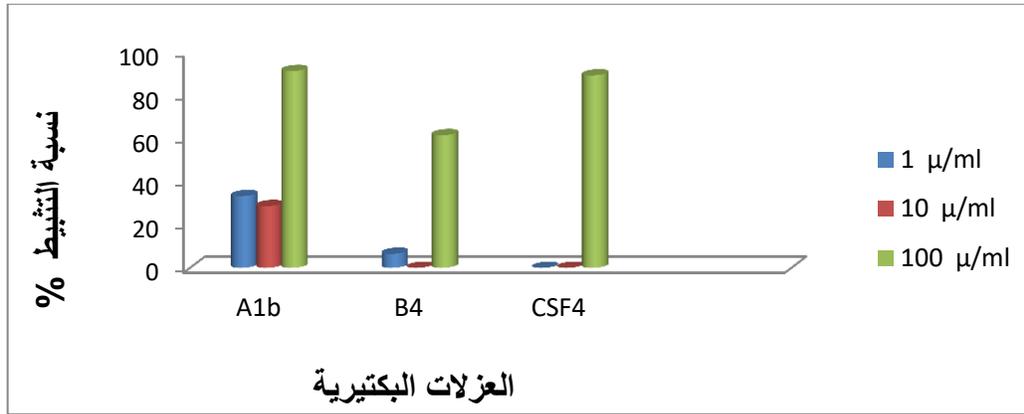
FtsZ المسؤول عن انقسام الخلايا من خلال تخليق بروتينات تنتج جدار خلوي للخلية المنقسمة، مشيراً

الى فعالية مركب Curcumin التأزيرية مع بعض مضادات B-lactamase (Fuoroquinolones،

Cephalosporins، Aminoglycosides، Tetracycline).

أشار Li *et al.* (2018) الى فعالية مركب Curcumin في تثبيط نمو البكتريا ودوره في تقليل انتاج السكريات المتعددة الخارجية فضلاً عن تأثيره في تقليل التعبير الجيني لجينات ابيض الكربوهيدرات والالتصاق وأنظمة النقل.

اما النتائج في الشكل (4-7) فقد اشارت الى ان مركب Inulin له القدرة في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii* عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر فقد بلغت (91.1 ، 61.4 ، 89.1)% للعزلات A1b ، B4 ، CSF4 على التوالي، اما التركيز 10 مايكروغرام/ ملتر فلم يبد أي تثبيط للعزلات CSF4 ، B4 وسبب تثبيط العزلة A1b بنسبة 28.6 %، اما التركيز 1 مايكروغرام/ ملتر فقد كانت نسب التثبيط 33.2 ، 6.5 % للعزلات B4، A1b على التوالي ولم يلاحظ أي تثبيط للعزلة CSF4.



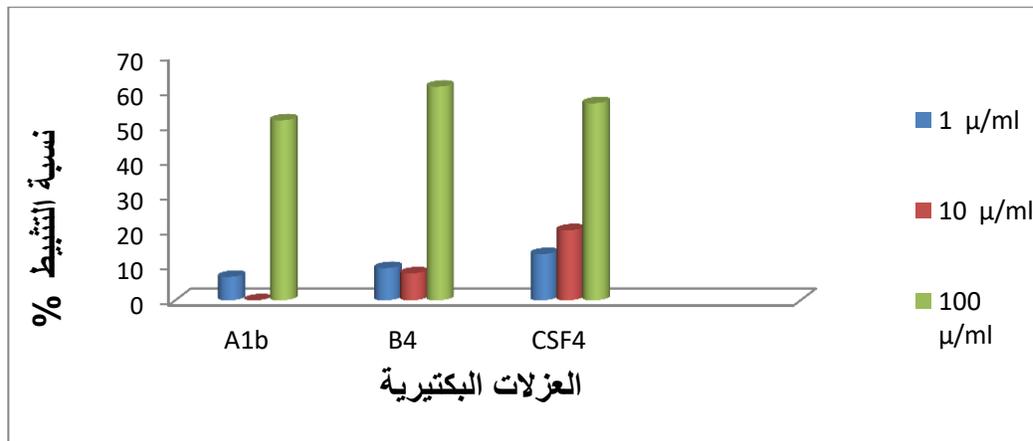
شكل (4-7) نسب تثبيط عزلات بكتريا *C. sakazakii* باستعمال مركب Inulin

A1b: حليب Dialac ، B4: الدم Blood ، CSF4: سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid

وهذا ما أشار اليه Walsh *et al.* (2010) الى انخفاض لوغارتم النمو البكتيري لبكتريا *C. sakazakii* بمقدار 1.5 في الحليب المجفف المدعم بمركب Inulin في الأشهر الأولى من الخزن، مشيراً الى ان العزلات من مصادر بيئية كانت اكثر تحملاً لظروف الجفاف بوجود Inulin من المصادر السريرية مبين سبب ذلك الى قلة تحمل العزلات من مصادر سريرية الى الظروف البيئية الصعبة، ان كل من السلالات البيئية لبكتريا *Cronobacter* TEAG155, TEAG115 كانت

أكثر مقاومة للظروف البيئية ومن ضمنها البقاء في الحليب المجفف المجفف، إذ لاحظ انخفاض في نمو السلالة بعدد لوغارتمي 1.2 باستعمال مركب Inulin في حين أشار Zhang *et al.* (2018) إلى امتلاك مركب Inulin فعالية تثبيطية ضعيفة ضد البكتريا المرضية، مشيراً إلى أن دمج Inulin مع مواد أخرى مثل الكايتوسن Chitosin يعمل على زيادة الفعالية التثبيطية، وذلك يعود إلى دور Inulin في تغيير عمليات الأيض في البكتريا (Buddington *et al.*, 2002 and Babu *et al.*, 2012). فضلاً عن زيادة الوزن الجزيئي Inulin يزيد من الفعالية التثبيطية (Zhang *et al.*, 2018).

أشارت النتائج في الشكل (4-8) إلى أن مركب Resveratrol له دور في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii*، فقد كانت نسب التثبيط عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر بلغت (51.4، 61، 56.3%) للعزلات (A1b، B4، CSF4) على التوالي وكانت عند التركيز 10 مايكروغرام/ ملتر بلغت (7.7، 20%) للعزلات B4، CSF4 على التوالي ولم تظهر أي نسبة تثبيط العزلة A1b أما التركيز 1 مايكروغرام/ ملتر فقد كانت نسب التثبيط (6.7، 9.2، 13.2%) للعزلات B4، A1b، CSF4 على التوالي.



شكل (4-8) نسب تثبيط بكتريا *C. sakazakii* باستعمال مركب Resveratrol

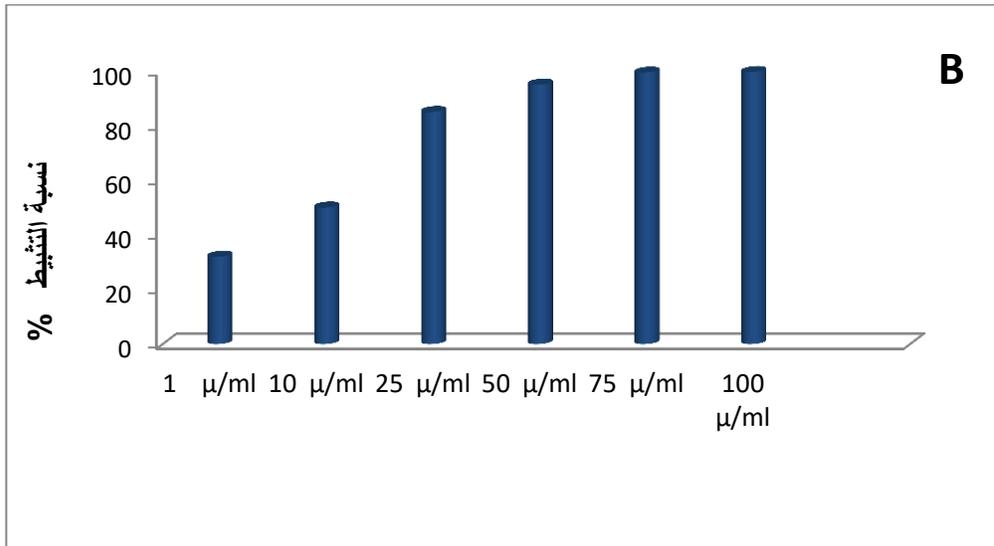
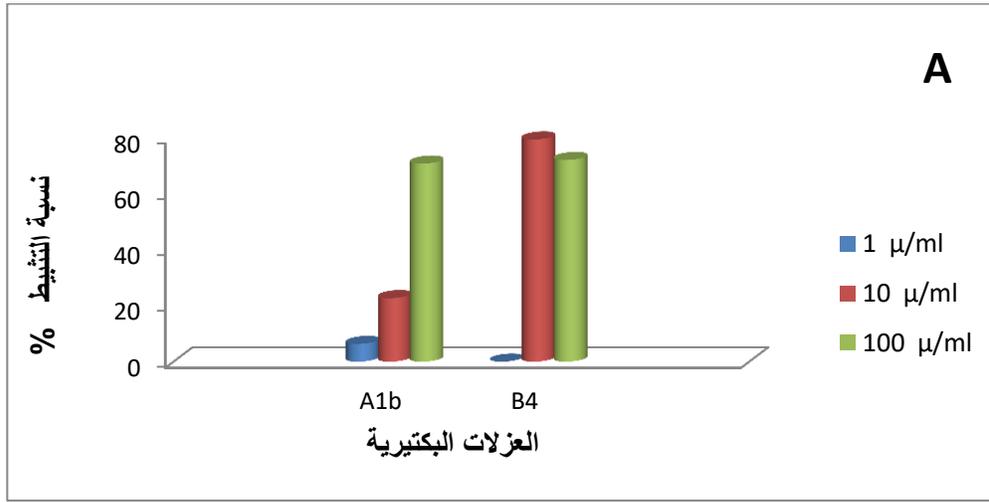
A1b: حليب Dialac، B4: الدم، CSF4: سائل النخاع الشوكي، Cerebrospinal fluid

ان لمركب Resveratrol القدرة على تثبيط عدد من الاحياء المجهرية، فضلاً عن تثبيطه بعض عوامل الضراوة (Paulo et al ., 2001). وقد أشار Kim et al .(2010b) الى ان عصير الميسكودين الأحمر Red muscadine Juice قد أظهر فعالية تثبيطية اتجاه بكتريا *C. sakazakii* أدى الى انخفاض عدد بكتريا *C. sakazakii* من 5 دورة لوغارتمية الى 2 دورة , مشيراً الى فعالية العصير التثبيطية تعود الى احتوائه على المركبات الصيدلانية ومن ضمنها Resveratrol .

كما أشار Ma et al. (2018) الى ان مركب Resveratrol له القدرة على تثبيط أنواع مختلفة من البكتريا الممرضة مثل *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurim*, *E. coli* O157: H7, اذ لاحظ ان تركيز المثبط الأدنى اتجاه البكتريا السالبة كان (0.625–521) مايكروغرام /مل، في حين كان اتجاه البكتريا الموجبة (16.5–260) مايكروغرام /مل، مشيراً الى ان نسبة تثبيط البكتريا الموجبة كان اكثر من البكتريا السالبة وذلك لامتلاك البكتريا السالبة المضخة المقاومة لعدد من المضادات Multi drug resistance pump (MDRP) او قد تعود الى تفاعل مركب Resveratrol مع تراكيب البكتريا يؤدي الى حدوث اضرار في الغشاء الساييتوبلازمي (Subramaniana et al., 2014) او تثبيط عملية الانقسام الخلوي (Haranahallia et al., 2016).

اشارت النتائج في الشكل (A 9 -4) الى ان مركب Trans-cinnamaldehyde له القدرة على تثبيط بكتريا *C.sakazakii* لكل من التركيز (10، 100) مايكروغرام/ ملتر اكثر من التركيز 1 مايكروغرام/ ملتر، اذ بلغت نسب التثبيط بمقدار (70.5، 71.8)% للعزلتين B4،A1b على التوالي للتركيز 100 مايكروغرام/ ملتر وكانت (22.6، 79.1)% للعزلتين B4، A1b على التوالي للتركيز

10 مايكروغرام/ ملتر اما التركيز 1 مايكروغرام/ ملتر فقد كانت نسب التثبيط (6.3%) في العزلة A1b ولم يلاحظ تثبيط في العزلة B4. كما درس اختبار تأثير المركب Trans-cinnamaldehyde وذلك لفعاليته في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii* (CSF4) في التراكيز المنخفضة اذ تم استعمال (1، 10، 25، 50، 75، 100) مايكروغرام/ ملتر كما في الشكل (4-9 B) وقد بلغت نسبة التثبيط (32، 50، 85، 95، 99.4، 99.6%) على التوالي.



شكل (4-9) نسب تثبيط عزلات بكتريا *C. sakazakii* باستعمال مركب Trans-cinnamaldehyde

A : A1b : حليب Dialac ، B4 : دم Blood

B : CSF4 : سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid

وهذا ما أشار اليه (Amalaradjou and Venkitanarayanan (2011b) فقد لاحظ تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii* عند التركيز المرتفعة. وقد أشار (Bouhdid *et al.* (2010) الى ان الفعالية التثبيطية لحاء القرفة، يعود الى تدمير مضخة البوتاسيوم مما يؤدي الى ضرر الغشاء السائتوبلازمي ومن ثم تغير من نفاذيته، او قد يعود الى تأثيره في بروتين FtsZ المهم في انقسام الخلايا مما يعمل على قتلها (Domadia *et al.* 2007) ، في حين اشار (Utchariyakiat *et al.* (2016) الى فعالية زيت لحاء القرفة وCinnamaldhyde في تثبيط البكتريا السالبة لصبغة كرام المقاوم للمضادات، مشيراً الى ان مركب Cinnamaldhyde يعد من المثبطات القوية ضد البكتريا ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، اذ يعمل على اختزال النمو البكتيري بمقدار 6 دورات لوغارتمية خلال (2-4) ساعات من النمو.

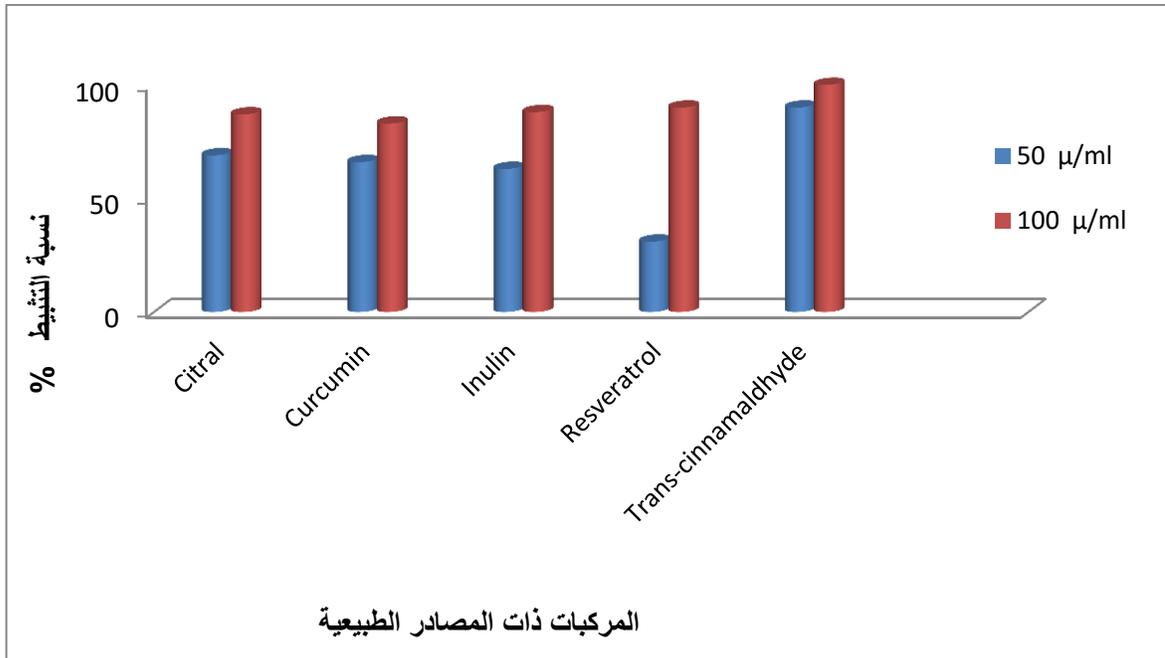
ولوحظ ان بعض التراكيز العالية للمركبات أعطت نسبة تثبيط اقل من التراكيز المنخفضة كما في مركب (Resveratrol، Inulin، Curcumin) ، وقد يعود ذلك الى نفاذية الغشاء السائتوبلازمي للمواد وحسب التراكيز. وهذا ما اشار اليه (Bernier and Surette (2013) الى ان التركيز التحت المثبط يعمل على تحفيز نمو الخلايا البكتيرية . وهذا قد يعود الى وجود مضخات الدفع التي لها دور كبير في دفع عدد كبير من العوامل مثل المعادن الثقيلة ، المركبات النباتية ، إشارات استشعار النصاب و مواد الايض البكتيرية (Blanco *et al.* , 2016).

#### 7-4 اختبار تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في ظاهرة حركة السباحة

##### Swimming والانتقال Swarming لعزلات بكتريا *Cronobacter sakazakii*

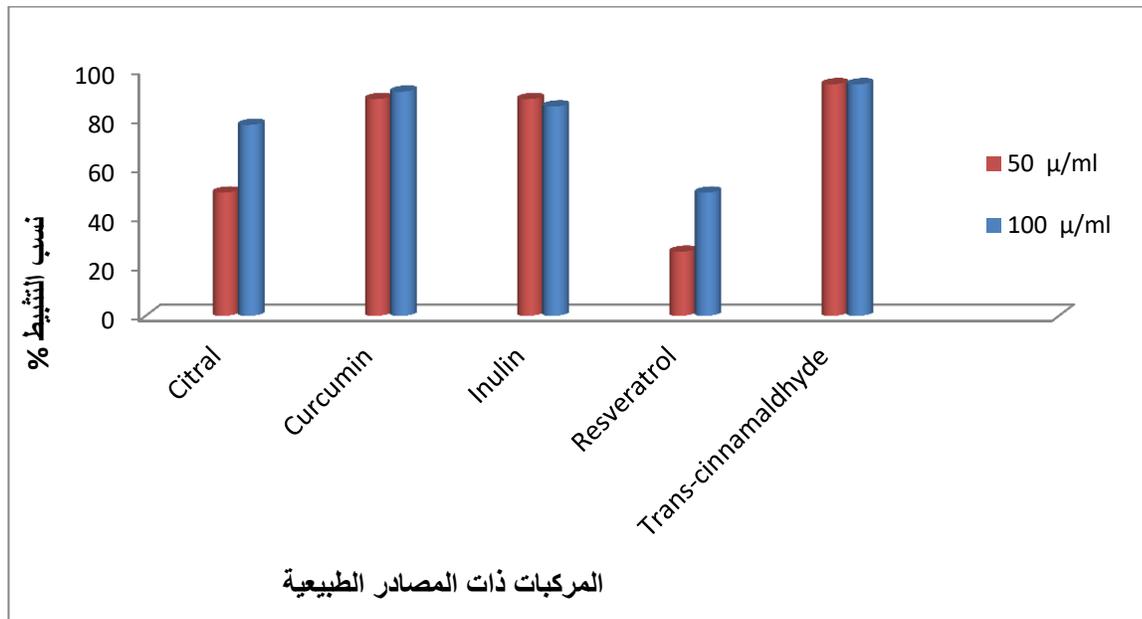
تم اختبار تأثير كل من المركبات ذات المصادر الطبيعية ( Citral، Curcumin، Inulin

العزلات للعثبات *Swarming*، *Swimming* في ظاهرتي (*Resveratrol*، *Trans-cinnamaldehyde* البكتيرية *A1b* و *B4* و *CSF4* وتم حساب نسبة التثبيط عند التركيز (50، 100) مايكروغرام/ ملتر . أظهرت النتائج كما في الشكل (4-10) للعزلة (*A1b*) *C.sakazakii* ان مركب-*Trans-cinnamaldehyde* اعطى اعلى نسبة للتثبيط للخلايا السباحة فقد بلغت 90% عند التركيز 50 مايكروغرام/ ملتر ، في حين اظهر مركب *Resveratrol* قدرة منخفضة في تثبيط حركة الخلايا السباحة *Swimming* اذ بلغت 31%، اما مركب *Citral*، *Curcumin*، *Inulin* فقد بلغت نسبة التثبيط (63، 66، 69)% على التوالي عند التركيز نفسه، وبلغت نسبة التثبيط (87، 83، 88، 90، 100)% للمركبات (*Trans-cinnamaldehyde*، *Resveratrol*، *Inulin*، *Curcumin*، *Citral*) على التوالي عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر .



شكل (4-10) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (*Inulin*، *Resveratrol*، *Curcumin*، *Citral*)، *Trans-cinnamaldehyde* في حركة السباحة *Swimming* لعزلة بكتريا (*A1b*) *C.sakazakii*.

أما العزلة *C. sakazakii* (B4) في الشكل (4-11) فقد كانت اقل نسبة تثبيط عند استعمال مركب Resveratrol فقد بلغت (26,50)% عند التركيز (50 ، 100) مايكروغرام/ ملتر على التوالي وزادت نسبة التثبيط عند استعمال مركب Citral فقد بلغت (50، 77.5)% اما المركبات الاخرى (Trans-cinnamaldhyde، Inulin ،Curcumin) فكانت اعلى تثبيط فقد بلغت (88، 88، 91، 85، 94)% للتركيزين نفسيهما على التوالي.



شكل (4-11) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol،

(Trans-cinnamaldhyde) في حركة السباحة Swimming لعزلة بكتريا *C. sakazakii* (B4).

وقد بين الشكل (4-12 A) ان نسب تثبيط العزلة CSF4 باستعمال مركب Citral و

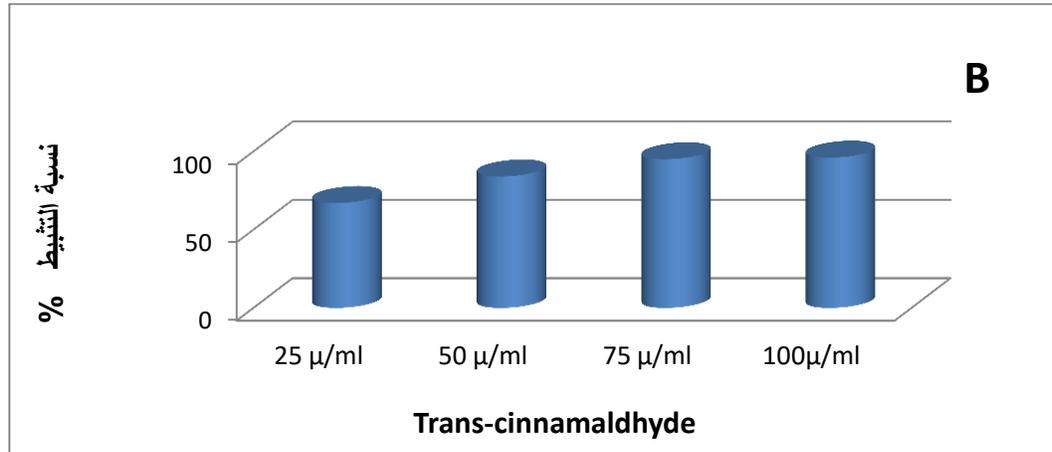
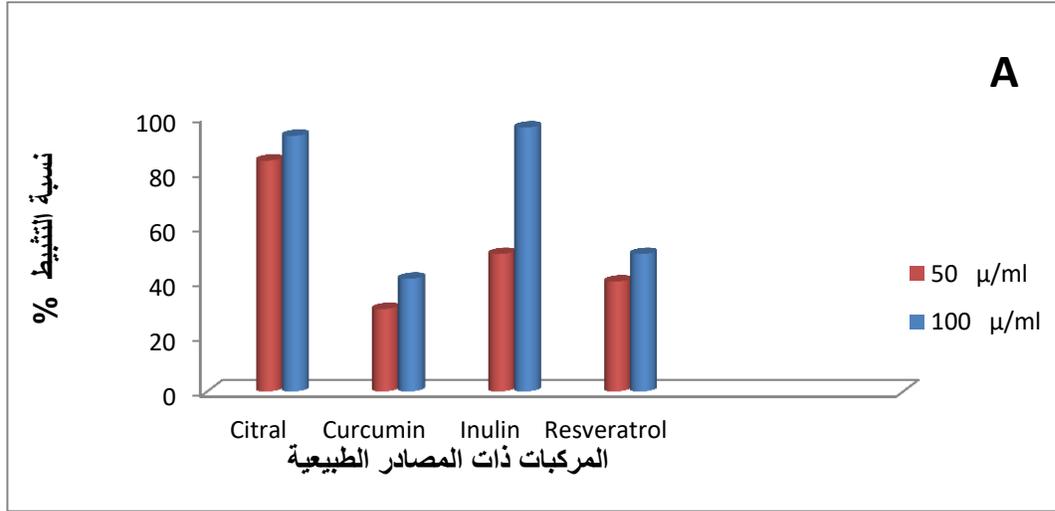
Curcumin و Inulin و Resveratrol) اذ بلغت (30، 40، 50، 84)% على التوالي عند التركيز

50 مايكروغرام/ ملتر و (41، 50، 93، 96)% على التوالي عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر،

وقد تم دراسة تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde وذلك لفعاليته باستعمال التراكيز المنخفضة

(25، 50، 75، 100) مايكروغرام/ ملتر في ظاهرة السباحة Swimming في العزلة CSF4، اذ

بين الشكل (B 12-4) ان اعلى نسبة تثبيط كانت عند التركيز (75 ، 100) مايكروغرام/ ملتر فقد بلغت (96 ، 95)% على التوالي اما التركيز (25 ، 50) مايكروغرام/ ملتر فقد كانت (84 ، 67)% على التوالي.



شكل (12-4) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في حركة السباحة Swimming لعزلة بكتريا *C.sakazakii* (CSF4).

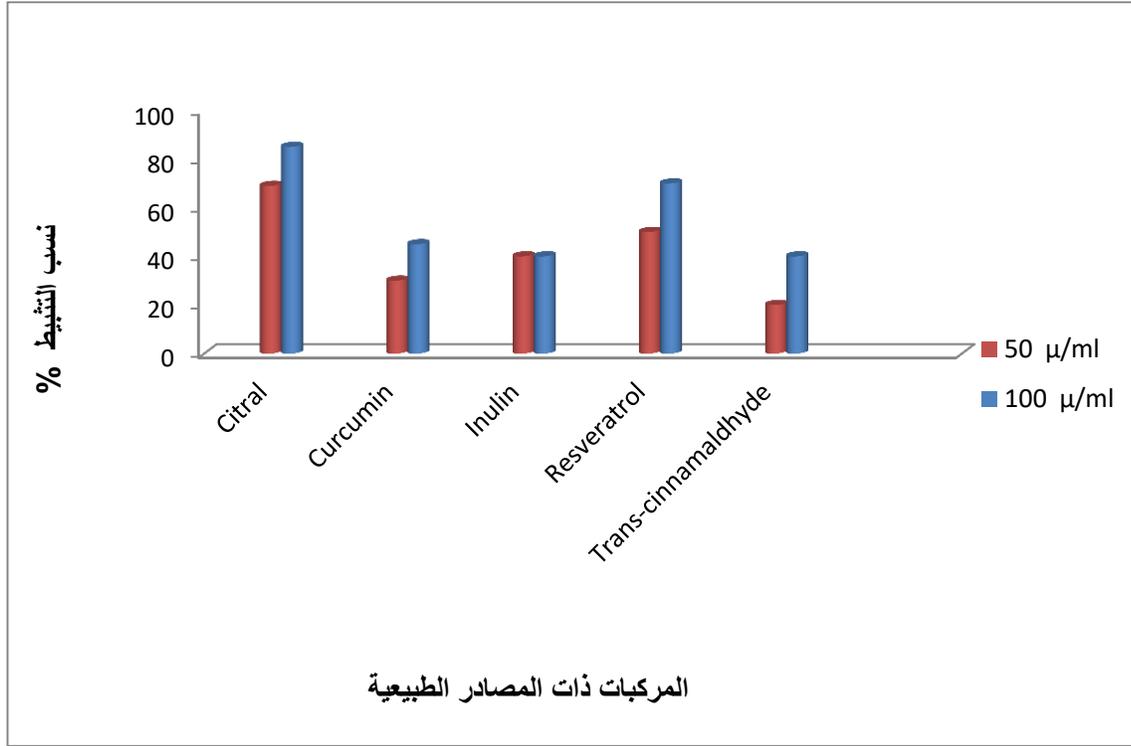
A: تأثير مركبات (Resveratrol ، Inulin ، Curcumin ، Citral)

B: تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde

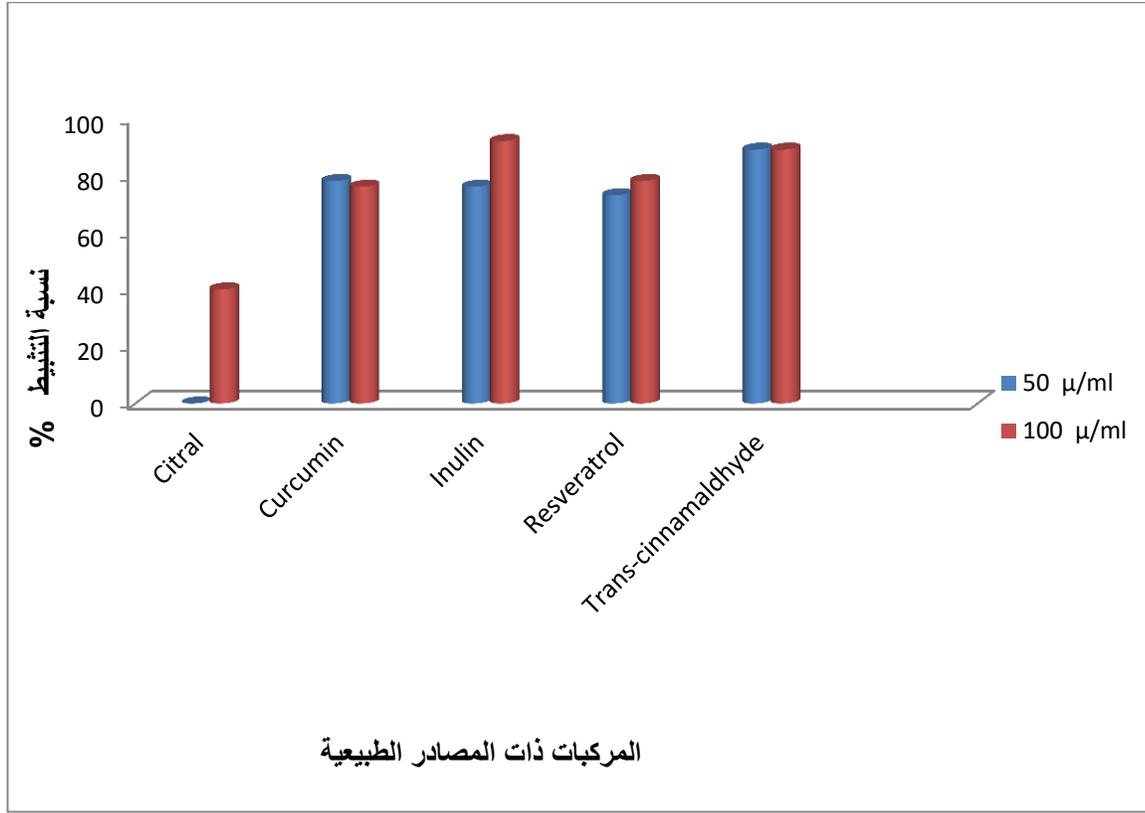
اما ظاهرة الانشغال Swarming فبين الشكل (13-4) ان المركبات ذات العناصر الطبيعية ( Citral ،

Curcumin ، Inulin ، Resveratrol ، Trans-cinnamaldehyde) تعمل على تثبيط

ظاهرة الانثيال بنسب مختلفة في العزلة A1b اذ كانت عند التركيز 50 مايكروغرام/ ملتر نسبة التثبيط بلغت (69، 30، 40، 50، 20)% على التوالي اما عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر فقد كانت نسب التثبيط (85، 45، 40، 70، 40)% على التوالي.

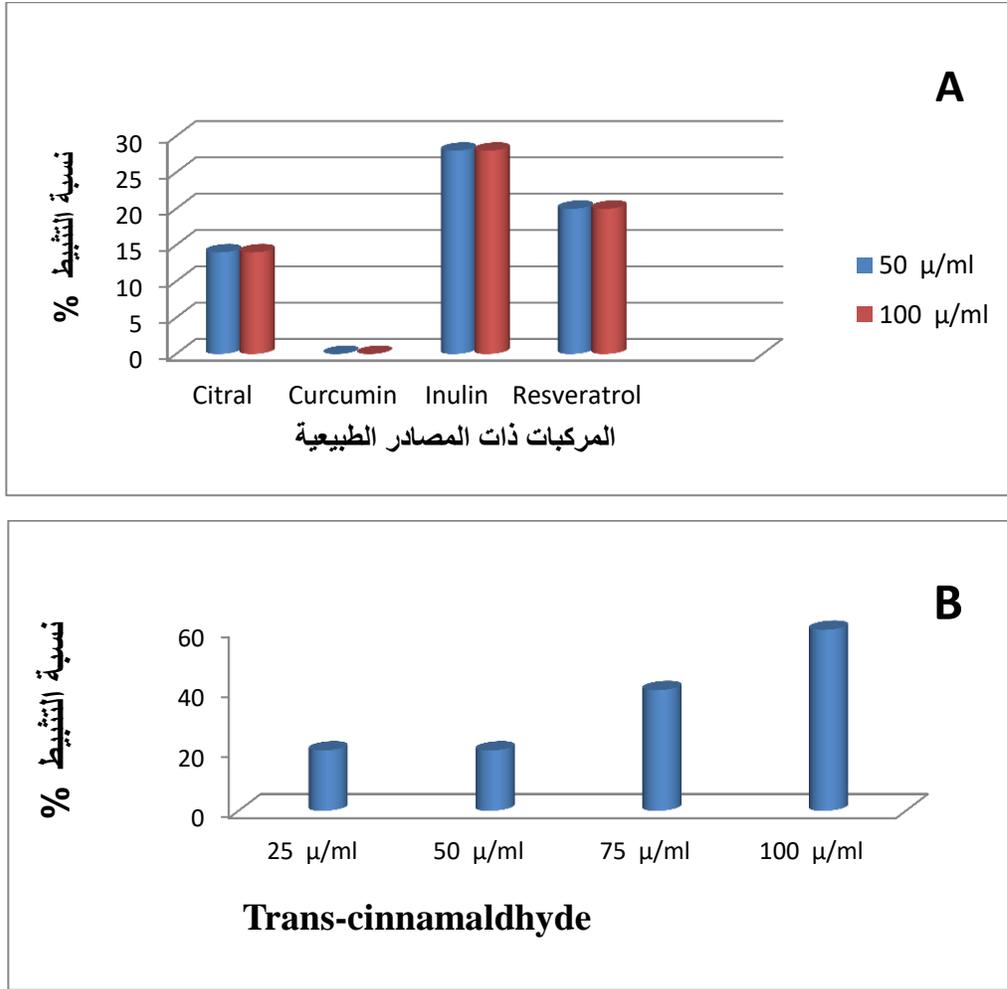


شكل (4-13) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في حركة الانثيال Swarming لعزلة بكتريا *C.sakazakii* (A1b). اما تأثير المركبات في العزلة B4 فيلاحظ من الشكل (4-14) عدم تأثير مركب Citral عند التركيز 50 مايكروغرام/ملتر في حركة الانثيال في حين كانت نسبة التثبيط منخفضة عند التركيز 100 مايكروغرام/ملتر اذ بلغت 40% اما تأثير المركبات (Resveratrol، Inulin، Curcumin) فقد بلغت نسبة التثبيط (78، 76، 73، 89)% على التوالي عند التركيز 50 مايكروغرام/ملتر وكانت (76، 92، 78، 89)% على التوالي عند التركيز 100 مايكروغرام/ملتر.



شكل (4-14) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في حركة الانثيال Swarming لعزلة بكتريا (*C. sakazakii* (B4).

اما تأثير المركبات في العزلة CSF4 فيلاحظ في الشكل (4-15 A) ان مركب Curcumin لم يبد أي تأثير في حركة الانثيال Swarming في حين كان مركب Citral و Inulin و Resveratrol ذا تأثير منخفض اذ بلغت (14, 28, 20)% عند التركيز (50، 100) مايكروغرام/ ملتر على التوالي ، وقد تم دراسة تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde وذلك لفعاليتها باستعمال التركيز (25، 50، 75، 100) مايكروغرام/ ملتر في العزلة CSF4 في ظاهرة الانثيال Swarming اذ بين الشكل (4-15 B) ان اعلى نسبة للتثبيط كانت عند التركيز (100، 75) مايكروغرام/ ملتر اذ كانت (60، 40)% على التوالي، اما في التركيز (50، 25) مايكروغرام/ ملتر فقد بلغت 20%.



شكل (4-15) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في حركة الانثيال Swarming لعزلة بكتريا *C.sakazakii* (CSF4)

A: مركبات (Resveratrol, Inulin, Curcumin, Citral)

B: مركب Trans-cinnamaldehyde

اظهرت دراسة Shi *et al.* (2017) تأثير مركب Citral في حركة السباحة Swimming

والانثيال Swarming، اذ أدى الى انخفاض حركة السباحة والانثيال في التركيز 225، 112.5

مايكرومولار، مشيراً الى ان ذلك الانخفاض يعود الى تغير في الاسواط عند فحصه بالمجهر

الالكتروني فضلاً عن قلة الاسواط في الخلايا البكتيرية المعاملة بمادة Citral مقارنةً مع الخلايا

البكتيرية غير المعاملة، او قد يعود الى ان وجود مركب Citral يؤدي الى خفض التعبير عن الجينات

التي تشارك في تركيب الاسواط وتخليقها.

أشار Lee *et al.* (2013) الى فعالية مركب Trans-Resveratrol في تثبيط حركة السباحة والانتقال ويعود ذلك الى تثبيط العديد من جينات ادراك النصاب (QS) Quorum sensing، فضلاً عن تثبيط جينات الحركة (*motB*، *fimH*، *fimA*، *flhD*) وقد أشار Amalaradjou *et al.* (2014). الى تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في حركة الانتقال يعود الى التأثير في بعض الجينات المسؤولة عن الحركة اما مركبات Curcumin، Inulin، Resveratrol فقد يعود سبب تثبيط حركة السباحة والانتقال الى تثبيط بعض الجينات الخاصة بالاسواط او تأثيرها في جينات استشعار النصاب QS مما تؤثر في الاسواط مما يؤدي الى تثبيط حركتهم.

نلاحظ من نتائج الدراسة الحالية تأثير التراكيز العالية من المركبات في تثبيط حركة السباحة في العزلات الثلاث في حين كانت نسبة التثبيط في حركة الانتقال مختلفة حسب نوع المركب وتركيزه ومصدر العزلة البكتيرية وكانت نسبة التثبيط اعلى في حركة السباحة مقارنة مع حركة الانتقال وهذا قد يعود الى ضراوة العزلات البكتيرية في حالة كونها خلايا مثالة.

#### 4-8 تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في انتاج انزيم البروتيز لبكتريا *C. sakazakii*

درس تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Trans- Inulin , Curcumin, Citral)

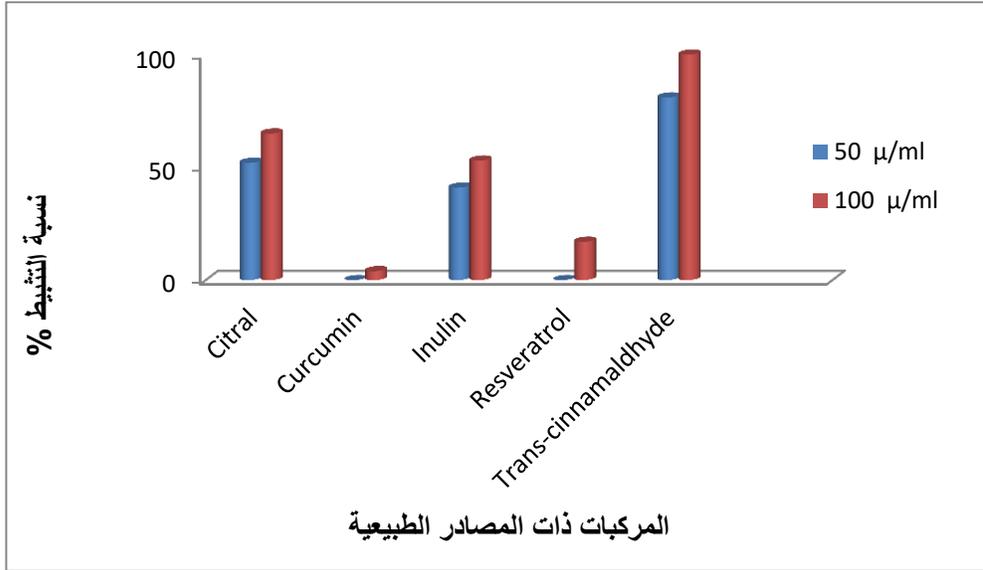
(cinnamaldehyde, Resveratrol, B4، A1b) في انتاج انزيم البروتيز من قبل عزلات بكتريا

*C. sakazakii* (CSF4)، اذ يوضح الشكل (4-16) تاثير مركب Trans-cinnamaldehyde

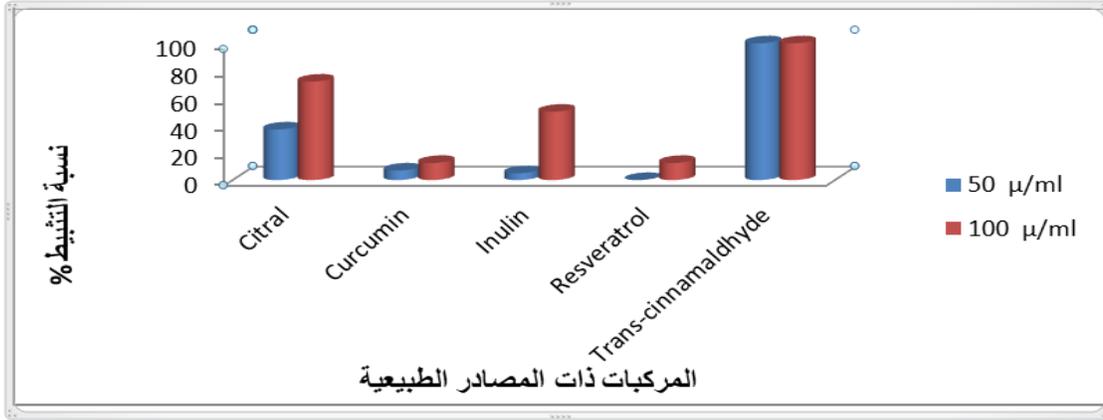
الكبير في تثبيط انتاج انزيم البروتيز للعزلة A1b بمقدار (81، 100)% عند التركيز (50، 100)

مايكروغرام/ ملتر على التوالي، ولم يلاحظ أي تثبيط لانتاج الانزيم بوساطة المركب Curcumin و

Resveratrol عند التركيز 50 مايكروغرام/ ملتر ، اما التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر فقد كانت نسبة التثبيط منخفضة (4،17)% على التوالي، اما نسبة التثبيط لمركب Citral و Inulin فكانت (52، 65)% و(41، 53)% عند التركيز (100،50) مايكروغرام/ ملتر على التوالي.



الشكل (4-16) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في إنتاج انزيم Protease لعزلة بكتريا *C. sakazakii* (A1b). اما قدرة الفعالية التثبيطية للمركبات ذات المصادر الطبيعية على العزلة B4 فقد لوحظ من خلال الشكل (4-17) الى ان اعلى نسبة لتثبيط إنتاج انزيم البروتيز بوساطة المركب Trans-cinnamaldehyde كانت (100)% في التركيز (50، 100) مايكروغرام/ ملتر اما نسب التثبيط للمركبات (Citral، Curcumin، Inulin) في إنتاج البروتيز فقد كانت (37،5،7)% على التوالي، ولم يظهر Resveratrol أي فعل تثبيطي عند التركيز 50 مايكروغرام/ ملتر، اما التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر فقد كانت نسبة التثبيط بمقدار (72، 12.5، 50، 12.5)% للمركبات (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol) على التوالي .



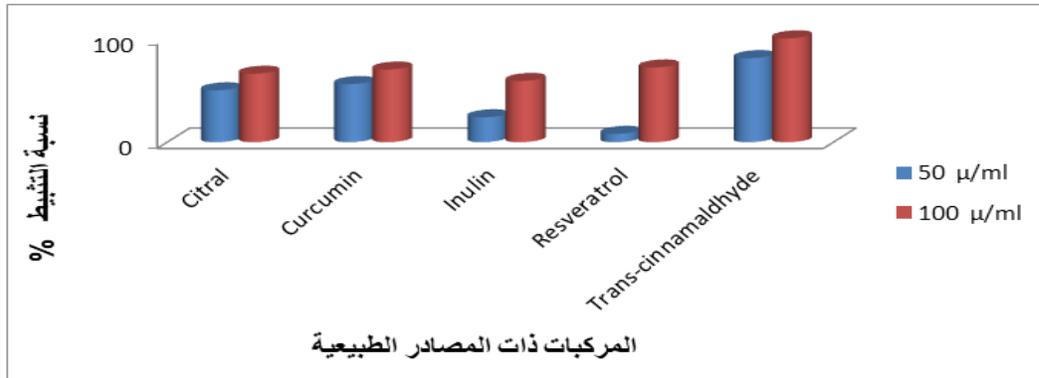
الشكل (4-17) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) في إنتاج انزيم Protease لعزلة بكتريا (*C. sakazakii* (B4).

وكانت الفعالية التثبيطية للعزلة CSF4 كما في الشكل (4-18) الذي بين تأثير المركبات

(Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) في إنتاج انزيم البروتيز

بنسبة (50، 56، 24، 8.1، 81)% على التوالي عند التركيز 50 مايكروغرام/ ملتر وكانت (66، 70،

59، 100، 72)% على التوالي عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر.



الشكل (4-18) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) في إنتاج انزيم Protease لعزلة بكتريا (*C. sakazakii* (CSF4).

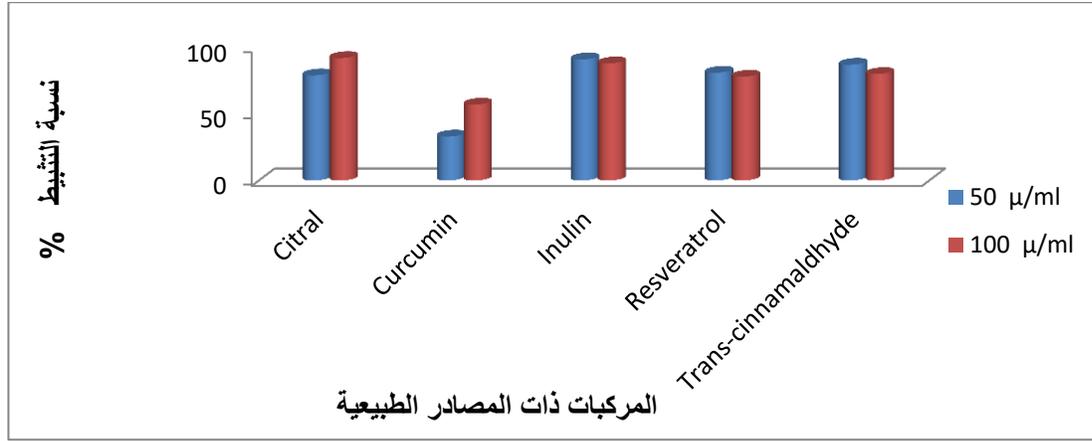
أشار (2008) Brackman *et al.* الى تأثير مركب Cinnamaldehyde في تثبيط فعالية انزيم

البروتيز بنسبة 34% بعد الحضان لمدة 24 ساعة. في حين أشار (2004) Liaw *et al.* الى ان

تنشيط فعالية انزيم البروتيز بفعل بعض المواد قد يعود الى فعاليتها في الارتباط بالموقع الفعال للانزيم مما يؤدي الى حدوث تغيرات في تركيبه الفراغي وتنشيطه، او قد يعود الى تنشيط الإشارات الكيميائية (QS) التي تؤدي الى تنشيط عوامل الضراوة ومنها انزيم البروتيز، وقد تعمل تلك المواد في الوقت نفسه على تنشيط ظاهرة السباحة والانثيال للبكتريا التي يتزامن تكوينها مع عوامل الضراوة او تنشيط انزيم البروتيز من خلال تنشيط العديد من الجينات التي لها علاقة وثيقة بتكوين ظاهرة الانثيال، والعلاقة نفسها بتكوين عوامل الضراوة ومنها جين *rsbA*. نلاحظ من نتائج الدراسة الحالية اختلاف نسبة تنشيط العزلات البكتيرية باستعمال المركبات ذات المصادر الطبيعية اعتماداً على تركيز المركب ونوعه ومصدر العزلة البكتيرية.

#### 4-9 تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لبكتريا *Cronobacter sakazakii*.

نميت العزلات البكتيرية في وسط زرع سائل، وبوجود تراكيز مختلفة من المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) اذ أظهرت النتائج تأثيراً واضحاً في تنشيط قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي. وقد بين الشكل (4-19) التأثير المنخفض لمركب Curcumin في تكوين الغشاء الحيوي في العزلة A1b فقد لوحظ ان نسب التنشيط كانت (33،57)% عند التركيز (50،100) مايكروغرام/ ملتر على التوالي، اما نسب التنشيط لمركبات (Citral، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) كانت (79، 81، 91، 87)% على التوالي عند التركيز 50 مايكروغرام/ ملتر وكانت (88، 78، 80)% على التوالي عند التركيز 100 مايكروغرام/ ملتر.



الشكل (4-19) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Resveratrol ، Inulin, Curcumin, Citral)

في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا *C.sakazakii* (A1b) (Trans-cinnamaldehyde,

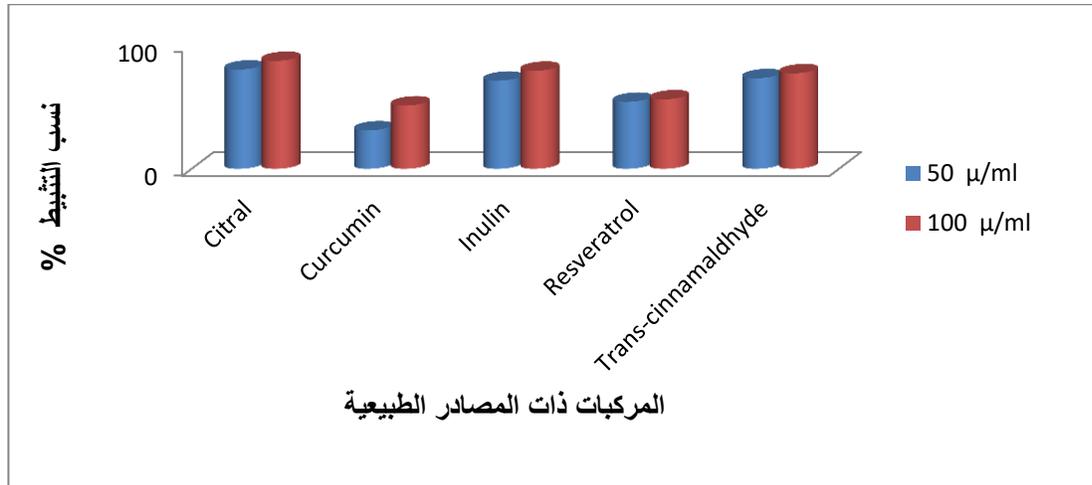
اما الشكل (4-20) فبين ان نسبة تثبيط تكوين الغشاء الحيوي في العزلة B4 ليست مرتفعة

في كل من المركب (Trans-cinnamaldehyde, Inulin, Citral) بمقدار (80، 71، 73) % للتركيز

50 مايكروغرام/ ملتر وبمقدار (87، 77، 79) % للتركيز 100 مايكروغرام/ ملتر، وكانت نسبة تثبيط

المركب Curcumin بمقدار (51، 31) % و Resveratrol (54، 56) % عند التركيز (50، 100)

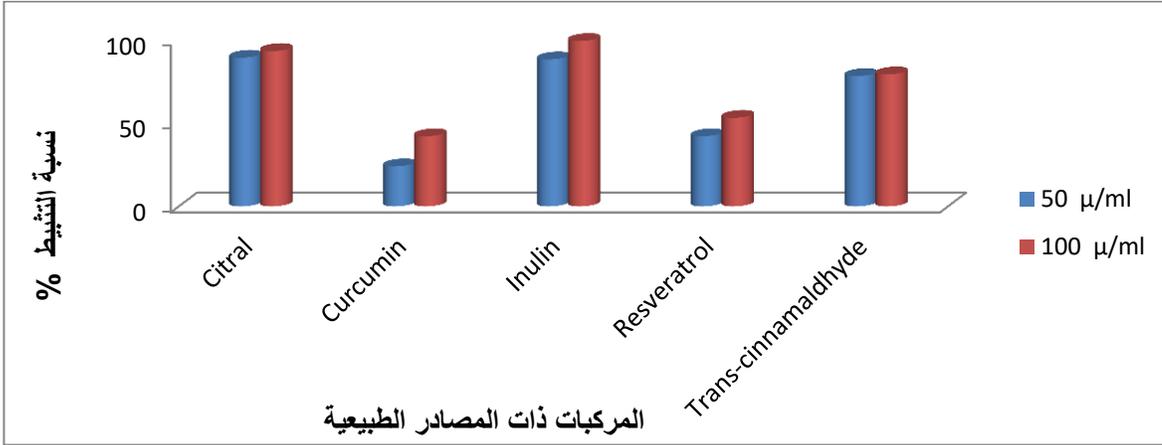
مايكروغرام/ ملتر على التوالي.



الشكل (4-20) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Resveratrol ,Inulin, Curcumin, Citral)

في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm لعزلة بكتريا *C.sakazakii* (B4) (Trans-cinnamaldehyde,

كما بين الشكل (4-21) ان نسب التثبيط للمركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans- cinnamaldehyde) في تكوين الغشاء الحيوي للعزلة CSF4 كانت (89، 24، 88، 42، 78) % و (93، 42، 99، 53، 79) % عند التركيز (50، 100) مايكروغرام/ ملتر على التوالي.



الشكل (4-21) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في تكوين الغشاء الحيوي لعزلة بكتريا (*C. sakazakii* (CSF4)). أشار Morohoshi *et al.* (2007) الى ان مركب Citral له تاثير كبير في تخليق المركبات التي تشترك مع تكوين السكريات المتعددة الخارجية التي تغير من تركيب الغشاء الحيوي مما يجعله اكثر حساسية فضلاً عن تأثيره في تثبيط تكوين إشارات استشعار النصاب (QS) ومنع تكوين مادة N-acyl-homoserine lactones (AHLs) والجينات التي تشترك في تكوين AHLs. في حين أشار Shi *et al.* (2017) ان مركب Citral يعمل على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي عن طريق تثبيط بروتين Lux R الذي يشترك في انتاج AHLs فضلاً عن تداخله مع الارتباطات التي تحدث بين خلية وخلية أخرى اثناء تكوين الغشاء الحيوي.

أظهرت دراسة Shi *et al.* (2017) تأثير مركب Citral في تكوين الغشاء الحيوي، اذ بلغت

نسبة التثبيط (67.1، 69.5، 70.1)% عند التركيز 225 مايكرومولار عند درجة حرارة 25 °م للمدة (24، 48، 72) ساعة على التوالي، مشيراً الى ان مركب Citral يعد مضاداً قوياً لتكوين الغشاء الحيوي Antibiofilm في درجات الحرارة الواطئة، وهذا يعود الى انخفاض عمليات الايض ونمو بكتريا *C.sakazakii* عند درجات الحرارة المنخفضة فضلاً عن تكوين الغشاء الحيوي بدرجة ضعيفة يكون اكثر حساسية لمركب Citral.

اما تأثير مركب Curcumin فقد أشار *Singh et al. (2017)* الى فعالية مركب Curcumin في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، مشيراً الى ان نسبة التثبيط تعتمد على تركيز المثبط. اما مركب Resveratrol فقد أشار *Ma et al. (2018)* الى فعالية مركب Resveratrol في تثبيط تكوين وتشكيل الغشاء الحيوي من قبل البكتريا المسببة لتلف الأغذية، مشيراً الى ان ذلك يعود الى قدرته على التداخل مع إشارات استشعار النصاب (QS) مما تؤثر في تخليق البروتينات السطحية والسكريات المتعددة المكونة للمحفظة لاسيما جينات *cap5ABC*FG مما يؤثر في تكوين الغشاء الحيوي.

أشار *Amalardjou and Venkitanaryana (2011a)* الى ان مركب Trans-cinnamaldehyde يؤثر في العديد من الجينات التي تشترك في تكوين الغشاء الحيوي ومن ضمنها *flgJ* ، اذ ان مركب Trans-cinnamaldehyde له دور في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من خلال تثبيط تكوين السكريات المتعددة، وتكوين الاسواط والاتصال مابين خلايا وخلايا أخرى فضلاً عن تأثيره في التعبير عن العديد من الجينات التي لها علاقة بأشارات QS. اما *Amalardjou et al. (2014)* فقد أشار الى ان مركب Trans-cinnamaldehyde يؤثر في العديد من عوامل الضراوة ومنها

جينات الحركة *flgJ*، *fliD*، *flhD*، مشيراً إلى أن ذلك يعتمد على التراكيز المستعملة فالتراكيز العالية تكون أكثر تأثيراً من التراكيز المنخفضة.

أما (Amalaradjon and Venkitanarayanan (2011a) فقد أشار إلى تأثير مركب Trans- cinnamaldehyde في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي عند درجة الحرارة 24°م مقارنةً بدرجة الحرارة 12°م باستعمال التركيز 750 مايكرومولار، ويعود ذلك إلى انخفاض تأثير مركب Trans- cinnamaldehyde (TC) بدرجة حرارة 12 إلى انخفاض معدل نمو بكتريا *C. sakazakii* عند درجات الحرارة المنخفضة فضلاً عن انخفاض عمليات الأيض مقارنةً مع درجة حرارة 24°م كما أن انخفاض تكوين الغشاء الحيوي عند استعمال مركب Trans-cinnamaldehyde يعود أيضاً إلى خفض التعبير الجيني لكل من الجينات (*lux R gene*, *bcsA*, *bcsG*, *fli D*, *flhD*, *flgJ*, *motA*, التي تؤدي دوراً في تكوين الغشاء الحيوي.

يلاحظ من نتائج الدراسة الحالية اختلاف نسبة التثبيط في تكوين الغشاء الحيوي لعزلات بكتريا *C. sakazakii* باختلاف نوع العزلة والتركيز المستعمل فضلاً عن نوع المركب المثبط وهذا ما أشار إليه (Lebeaux et al. (2014). ان تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل المضادات الحيوية، يعتمد على صنف المضاد الحيوي ومقدار انتشاره في الوسط وميكانيكية التعبير الجيني لتكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا فضلاً عن مقدار تماسك البكتريا المكونة للغشاء الحيوي أو مقدار تأثير المركبات على نمو البكتريا خلال الساعات الأولى من تكوين الغشاء الحيوي وإيضاً عن مقاومة الغشاء الحيوي لبعض المركبات. كما لم يلاحظ وجود فروقات في نسبة التثبيط بين التركيزين 50 و 100 مايكروغرام/ملتر.

## 10-4 اختبار تأثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو بكتريا *Cronobacter sakazakii*

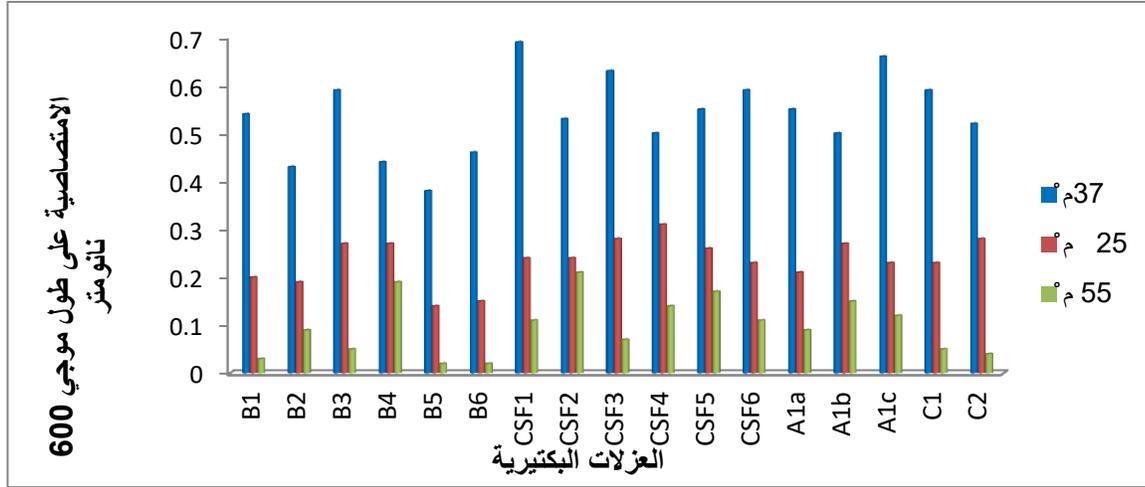
### 1-10-4 اختبار تأثير درجات الحرارة

أظهرت النتائج في الشكل (4-22) الى تأثير درجة الحرارة في نمو بكتريا *C.sakazakii* من خلال قياس الامتصاصية على طول موجي 600 نانومتر ، اذ لوحظ انخفاض النمو البكتيري عند درجة الحرارة 55° م مقارنةً مع درجة الحرارة المثلى 37°م وتباينت العزلات المعزولة من الدم في قابليتها في النمو اذ كانت العزلة B1، B2، B3، B5، B6 اقل امتصاصية اذ بلغت (0.03، 0.09، 0.05، 0.02، 0.02) على التوالي مقارنةً مع العزلة B4 التي بلغت مقدار امتصاصيتها 0.19 ، اما العزلات المعزولة من سائل النخاع الشوكي، فقد كانت العزلة CSF3 اقل امتصاصية بلغت 0.07 مقارنةً مع العزلات الأخرى التي تراوح مقدار الامتصاصية (0.11-0.21)، اما العزلات المعزولة من عينات الحليب فقد كانت العزلة A1 a ، C1 ، C2 اقل امتصاصية فقد بلغت ( 0.09 ، 0.05 ، 0.04) على التوالي اقل مقارنةً بالعزلتين (A1b ، A1c) التي بلغت مقدار امتصاصيتهما (0.15، 0.12).  
اما عند درجة الحرارة 25° م فتم قياس الامتصاصية اذ تراوح بين (0.14- 0.27) للعزلات البكتيرية المعزولة من الدم، وبين (0.23-0.31) في العزلات البكتيرية المعزولة من سائل النخاع الشوكي، وبين (0.21-0.28) في العزلات المعزولة من عينات الحليب مقارنةً بدرجة الحرارة المثلى 37° م التي تراوحت مقدار الامتصاصية بين (0.38-0.66).

لوحظ من النتائج ان افضل نمو لعزلات بكتريا *C. sakazakii* كان في درجة حرارة 37° م ثم

تلتها درجة 25° م ، ولوحظ انخفاض النمو عند درجة حرارة 55° م ، ولم يلاحظ وجود اختلاف بين

العزلات المعزولة من مصادر سريرية ومصادر الحليب من ناحية نموها في الدرجتين الحراريتين 25 ، 55 م°.



شكل (4-22) تأثير درجات الحرارة في نمو عزلات بكتريا *C. sakazakii*

B : عزلات الدم Blood , CSF , عزلات سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid , A1 : حليب Dialac ,  
C1 حليب Novolac Allernova , C2 : حليب Novolac AD

اشار (Nazarowec –White and farber (1997) الى ان قيمة D في العزلات السريرية تكون اعلى نسبة من العزلات الغذائية في نفس درجة الحرارة، وذلك يعود الى طبيعة المادة الغذائية اذ ان المحتوى العالي من المواد الصلبة والمواد الدهنية في الحليب المجفف يؤدي الى زيادة مقاومة البكتريا للحرارة العالية.

كما أشار (Shaker *et al.* (2008) الى ان قيمة D تكون بمقدار (52, 54.3, 62, 49.1)% عند درجة حرارة (52, 54, 56, 58) م° على التوالي، مبيناً ان تعرض البكتريا للمعقمات والحوامض تقلل مقاومتها للحرارة في حليب الرضع البودر، وان قيمة D باستعمال المنظفات والمعقمات مساوية الى قيمة D في الخلايا المجهددة بالتبريد واعلى من الخلايا المجهددة بالحرارة والجفاف ولكنها اقل من الخلايا النامية في وسط غذائي قليل القيمة الغذائية، كما اشارت البحوث الى ان المواد المذابة مثل

Chang *et al.* (2009)، تساعد على حماية الكائن الحي من تأثير الحرارة العالية. وهذا ما أشار اليه

*C. sakazakii* BCRC 13988 يمكنها النمو في وسط التريبتون

صويا السائل بدرجة تتراوح بين (45-48) م°، مشيراً الى ان اعلى نمو كانت عند 45 م° مع

اختزال النمو كلما ارتفعت درجة الحرارة ، اذ لاحظ حدوث الصدمة الحرارية للبكتريا بنسبة 0.81% عند

درجة حرارة 51 م° لمدة 10 دقائق ، في حين بدرجة 42 لمدة 10 دقائق و 5 دقائق فقد كانت نسبة

حدوث الصدمة (0.50, 0.27)% على التوالي.

مشيراً الى ان بكتريا *C. sakazakii* تنمو عند درجة حرارة 47 م° وان تعرض البكتريا للصدمة

الحرارية يؤدي الى زيادة تحمل البكتريا للحرارة العالية مما يزيد من طول مدة تحملها للحرارة، وان

زيادة الحرارة عن 48 م° يقلل من تحمل الحرارة مابين ذلك من خلال استعمال المجهر للبكتريا المعاملة

حرارياً والذي يظهر تأثير الحرارة في المادة النووية وبروتينات الخلايا.

اما (Walsh *et al.* (2010) فقد أشار الى ان العزلات السريرية لبكتريا *C. sakazakii* كانت

اقل مقاومة للحرارة عند درجة 55, 56 م° في وسط Druggan-Forsyth-Inversion (DFI)

السائل ووسط (TSA) Trypton Soy Agar اما عند درجة 60 م° فكانت مقاومة فقط في وسط

DFI، اذ تختلف عن العزلات البيئية في مقاومتها للحرارة.

كما أشار (Huertas *et al.* (2015) الى ان خزن سلالة بكتريا *C. sakazakii* DPC6529

بدرجة 58 م° لمدة 2.25 دقيقة يختزل نموها بمقدار 5 دورة لوغارتمية مقارنة بالسلالة المطفرة مشيراً

الى وجود 7 الى 10 طفرات تعود الى (Ribosome Maturation Protien (RimP) و Outer

membrane Prolin L (OmpL) المسؤولة عن تحمل البكتريا للحرارة العالية، اذ ان غياب الجين

ompL يؤدي الى غياب Cys و Glutathione مما يجعل البكتريا اكثر حساسية للحرارة مبيناً الى ان وجود الروابط الكبريتية في البروتينات تؤدي الى ثباتيتها ضد المعاملات الحرارية.

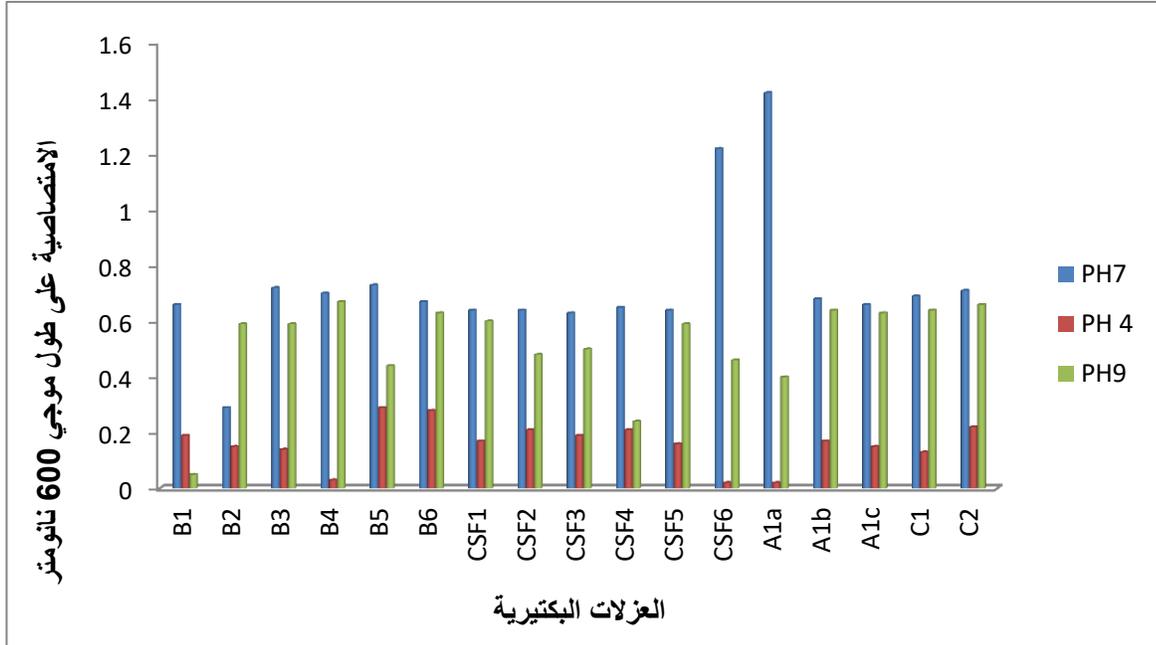
#### 2-10-4 اختبار تأثير الرقم الهيدروجيني pH في نمو بكتريا *C.sakazakii*

أظهرت النتائج في الشكل (4-23) الى تأثير الرقم الهيدروجيني في نمو بكتريا *C.sakazakii* من خلال قياس الامتصاصية، اذ لوحظ انخفاض الامتصاصية عند الرقم الهيدروجيني 4 مقارنة مع الرقم الهيدروجيني المتعادل ، وقد بينت العزلات المعزولة من الدم اذ كانت العزلة B4 اقل امتصاصية وبلغ 0.03 مقارنة بالعزلات الأخرى التي تراوح مقدار الامتصاصية (0.14-0.29) اما العزلات المعزولة من سائل النخاع الشوكي فقد كانت العزلة CSF6 اقل امتصاصية اذ كانت (0.02) مقارنةً بالعزلات الأخرى فقد تراوح مقدار الامتصاصية (0.16-0.21) اما العزلات البكتيرية المعزولة من عينات الحليب فقد كانت العزلة A1a اقل امتصاصية اذ كانت 0.02 مقارنةً ببقية العزلات والتي تراوح بين (0.13-0.22).

اما عند الرقم الهيدروجيني القاعدي، فقد بينت النتائج ارتفاع الامتصاصية اذ تراوح بين (0.05-0.67) للعزلات البكتيرية المعزولة من الدم وبين (0.24-0.6) للعزلات المعزولة من سائل النخاع الشوكي و(0.4-0.66) للعزلات المعزولة من عينات الحليب مقارنةً بالرقم الهيدروجيني المتعادل اذ تراوحت مقدار الامتصاصية بين (0.29-1.42).

اذ أظهرت النتائج ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو عزلات بكتريا *C. sakazakii* كان 7 ثم تلتها الرقم الهيدروجيني 9 فيما لوحظ انخفاض النمو عند الرقم الهيدروجيني 4 ، ولم يلاحظ وجود

اختلافاً بين العزلات المعزولة من مصادر سريرية ومصادر الحليب من حيث قابليتها في النمو في رقم هيدروجيني معين .



الشكل (4-23) تأثير الرقم الهيدروجيني في نمو عزلات بكتريا *C. sakazakii*

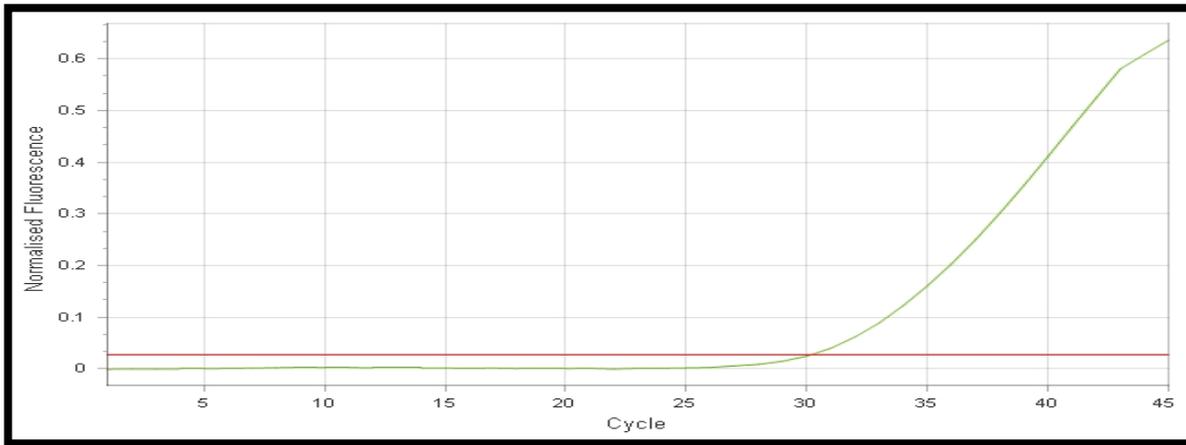
B : عزلات الدم Blood , CSF , عزلات سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal fluid , A1: حليب Dialac , C1 حليب Novolac Allernova , C2 : حليب Novolac AD

أشار Edelson –Mammel *et al.* (2006) إلى ان التعرض إلى الرقم الهيدروجيني 3 يؤدي إلى انخفاض أعداد بكتريا *C. sakazakii* بمقدار 4 دورات لوغارتمية خلال 5 ساعات، وقد تصل إلى 6 دورات لوغارتمية مشيراً إلى ان ذلك يعود إلى نوع السلالة. في حين أشار Foster (1991) و Phan-Thanh *et al.* (2000) إلى ان تحمل البكتريا للرقم الهيدروجيني الحامضي يعود إلى وجود عدد من الميكانيكيات الفسلجية ومنها بروتينات الصدمة الحامضية او حدوث تغير في طبيعة الاحماض الدهنية المتواجدة في الغشاء الحيوي للبكتريا. او قد يعود إلى امتلاك عامل سكما الذي ينظم عملية تحمل الحموضة في البكتريا اذ يشفر لهذا العامل جيناً يدعى *rpoS*، ويلاحظ هذا من ترجمة بروتين الصدمة الحامضي (ASP) (Kim *et al.*, 2012).

في حين أشار Kim *et al.* (2010b) الى عدم وجود تثبيط للخلايا البكتيرية عند تميمتها في وسط التريبتون صويا السائل برقم هيدروجيني مقداره 3.2. اما Hoeflinger and Miller (2017) فقد أشار الى ان سلالة بكتريا *C. sakazakii* 29544 تستطيع ان تنمو في رقم هيدروجيني يتراوح بين (5-8)، ولاستطيع النمو في الرقم الهيدروجيني 4 عند استعمال الوسط الزراعي نقيع القلب والدماغ السائل.

#### 4-11 الكشف الجزيئي عن الجينات Molecular detection of gene

بعد استخلاص DNA الكلي لعزلة بكتريا (*C. sakazakii* (CSF4) باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من قبل شركة Promega، وتم الكشف عن الجين *flgJ* في العزلة CSF4 وباستعمال بادئ Primers خاصة لبكتريا *C. sakazakii* والتي تستهدف تسلسلاً معيناً للجين *flgJ* لغرض معرفة امتلاك العزلة لهذا الجين كما في الشكل (4-24).



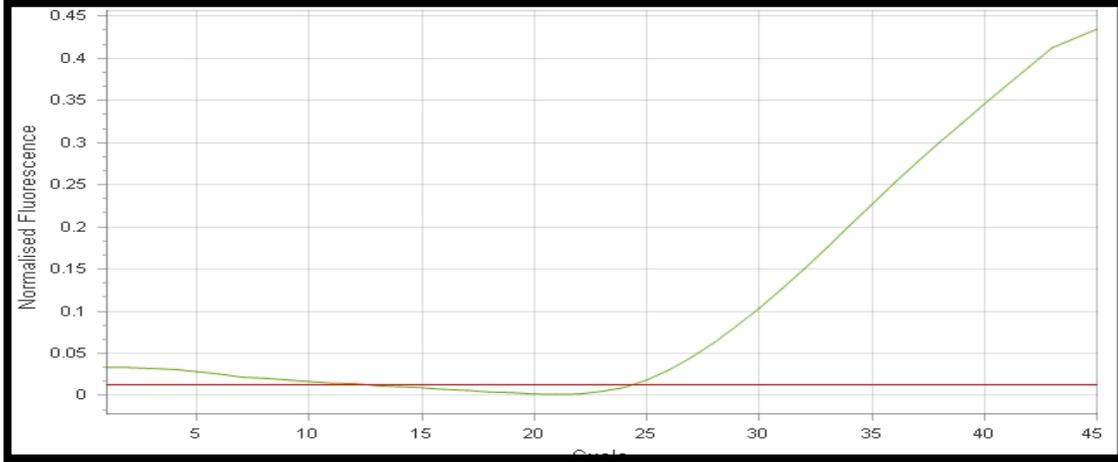
شكل (4-24) ناتج تفاعل RT-PCR لعزلة بكتريا (*C. sakazakii* (CSF4) باستعمال بادئ Primer للجين *flgJ* بوزن جزيئي 55 زوج قاعدة

هو مأكده Hartmann *et al.* (2010) من ان بكتريا *C. sakazakii* تمتلك الجين *flgJ* ودوره

في تكوين الغشاء الحيوي، اذ تزداد قابلية بكتريا *C. sakazakii* في تكوين الغشاء الحيوي لتصل الى

84% في حالة احتوائها على الجين مقارنةً بالخلايا غير الحاوية على الجين.

كما تم الكشف عن جين *zpx* في العزلة CSF4 باستخدام جهاز التقدير الكمي RT-PCR اذ تم اجراء التفاعل التضاعفي للدنا وباستعمال بواقي Primers خاصة لبكتريا *C. sakazakii* والتي تستهدف تسلسلاً معيناً للجين *zpx* لغرض معرفة امتلاك العزلة هذا الجين كما في الشكل (4-25).



الشكل (4-25) ناتج تفاعل RT-PCR لعزلة بكتريا (CSF4) *C. sakazakii* باستخدام بواقي Primer لجين *zpx* ذو الوزن الجزيئي 94 زوج قاعدة وهذا ما أشار اليه (Kothary et al. (2007) الى امتلاك بكتريا *C. sakazakii* جين *zpx* بنسبة 99% ويعتمد ذلك على نوع السلالة.

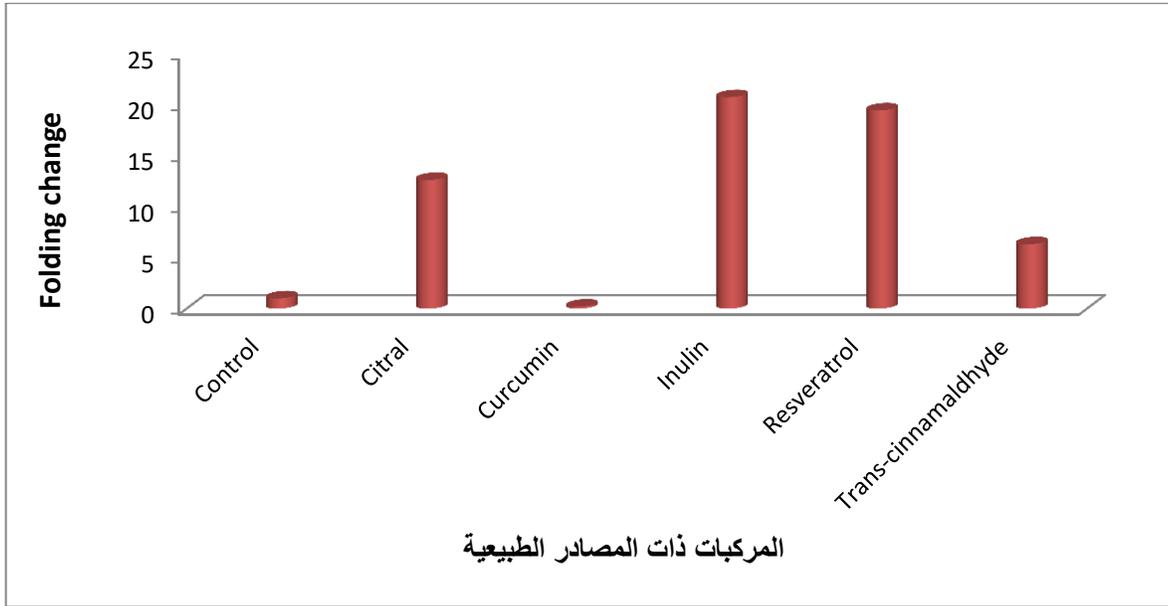
#### 4-12 حساب مستويات التعبير الجيني للجين *zpx*, *flgJ* لبكتريا *Cronobacter sakazakii*

لحساب التعبير الجيني Gene Expression للجين *zpx*, *flgJ* في بكتريا *C. sakazakii* باستخدام الجين 16S rRNA كجين محافظ وحسبت قيمة (CT) Cyler Threshold للجينين باستخدام قيم CT للجين المحافظ في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة.

#### 4-12-1 تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في تعبير الجين *flgJ*

درس تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Inulin, Curcumin, Citral, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) في مقدار التعبير الجيني للجين *flgJ*، اذ تشير النتائج

في الشكل (4-26) وملحق (2) الى وجود تباين في مستويات التعبير عن الجين *flgJ* بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* للعزلة CSF4 اذ ادى مركب Curcumin بتركيز SMIC الى خفض التعبير الجيني الى 0.2 Folding Change مقارنةً مع معاملة السيطرة اما مركب (Inulin, Citral, Trans-cinnamaldehyde, Resveratrol). فقد أدى الى زيادة التعبير عن الجين *flgJ* لتبلغ (6.3، 19.4، 20.7، 12.6) Folding Change على التوالي مقارنةً مع معاملة السيطرة .Folding change 1



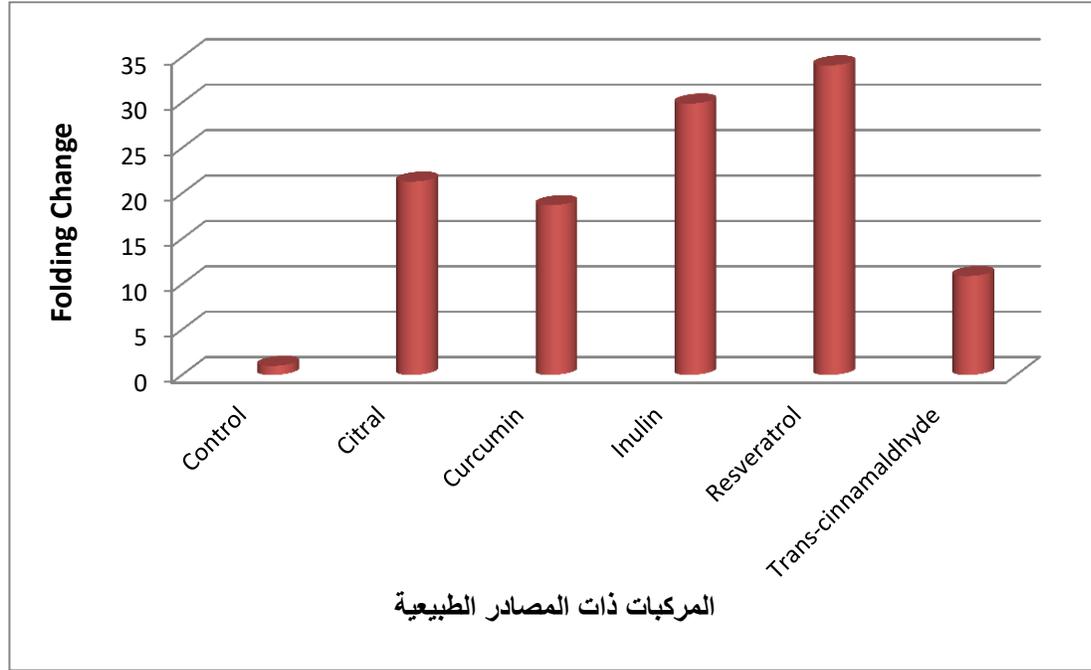
شكل (4-26) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في التعبير الجيني للجين *flgJ* في العزلة *C. sakazakii* (CSF4).

#### 2-12-4 تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية في التعبير الجيني للجين *zpx*

درس تأثير المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في مقدار التعبير الجيني للجين *zpx*، اذ تشير النتائج في الشكل (4-27) وملحق (3) الى وجود تباين في مستويات التعبير عن الجين *zpx* بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* للعزلة (CSF4)، اذ أدى استعمال كل من المركبات (Citral، Curcumin،

يبلغ (Trans-cinnamaldhyde،Resveratrol ،Inulin) الى زيادة التعبير عن الجين *zpx* ليبلغ (21.3، 18.7 ، 29.9 ، 34.1 ، 10.9) Folding Change على التوالي مقارنةً بمجموعة السيطرة

.Folding change 1



شكل (4-27) تأثير بعض المركبات ذات المصادر الطبيعية في التعبير الجيني للجين *zpx* لعزلة *C. sakazakii* (CSF4).

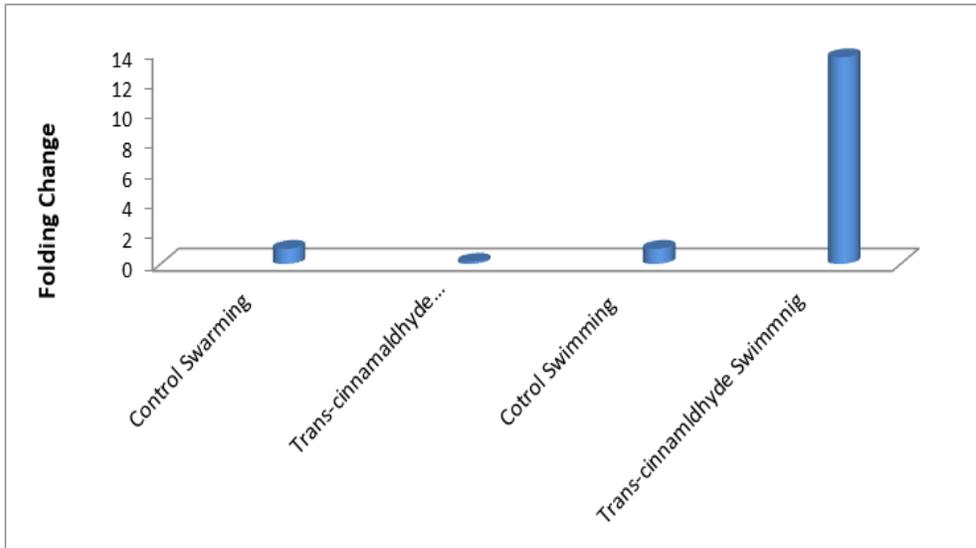
لوحظ من النتائج ارتفاع نسبة التعبير الجيني للجين *zpx* في العزلة *C. sakazakii* (CSF4) ، وان مركب Resveratrol كان اكثر تأثيراً في زيادة التعبير الجيني في حين كان مركب Trans-cinnamaldhyde اقل مركب تأثيراً في زيادة التعبير الجيني وذلك قد يعود الى الصيغة التركيبية للمركب وما يحتويه من مجاميع فعالة تزيد من التعبير الجيني . في حين أشار Shi et al. (2017) الى تأثير مركب Citral في تثبيط بعض جينات الضراوة ومنها جين *flgD* ، *flgJ* ، *fliD* اعتماداً على تركيز المركب، وتعود فعالية مركب Citral التثبيطية الى تأثيره في تخليق الاسواط ووظيفتها فضلاً عن تأثيره في إشارات استشعار النصاب والتي بدورها تؤثر في عوامل الضراوة ومنها الحركة.

اما Lee *et al.* (2013) أشار الى فعالية مركب Trans-Resveratrol في تثبيط حركة السباحة والانثيال ويعود ذلك الى تثبيط العديد من جينات ادراك النصاب (QS) فضلاً عن تثبيط جينات الحركة (*motB*, *fimH*, *FimA*, *flhD*).

#### 3-12-4 تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde في التعبير الجيني للجين *flgJ* في ظاهرتي السباحة Swimming والانثيال Swarming للعزلة *C. sakazakii* (CSF4)

درس تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde في مقدار التعبير الجيني للجين *flgJ* و اشارت النتائج في الشكل (4-28) وملحق (5) الى وجود فروقات في مستويات التعبير الجيني للجين *flgJ* بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* للعزلة CSF4، بمركب Trans-cinnamaldhyde بتركيز SMIC، اذ لوحظ انخفاض التعبير عن الجين *flgJ* في ظاهرة Swarming الى 0.14 Folding change مقارنةً مع معاملة السيطرة في حين كان استعمال مركب Trans-cinnamaldhyde بتركيز SMIC أدى الى زيادة التعبير عن جين *flgJ* في ظاهرة Swimming الى 13.65

Folding Change مقارنة بمعاملة السيطرة 1 Folding change



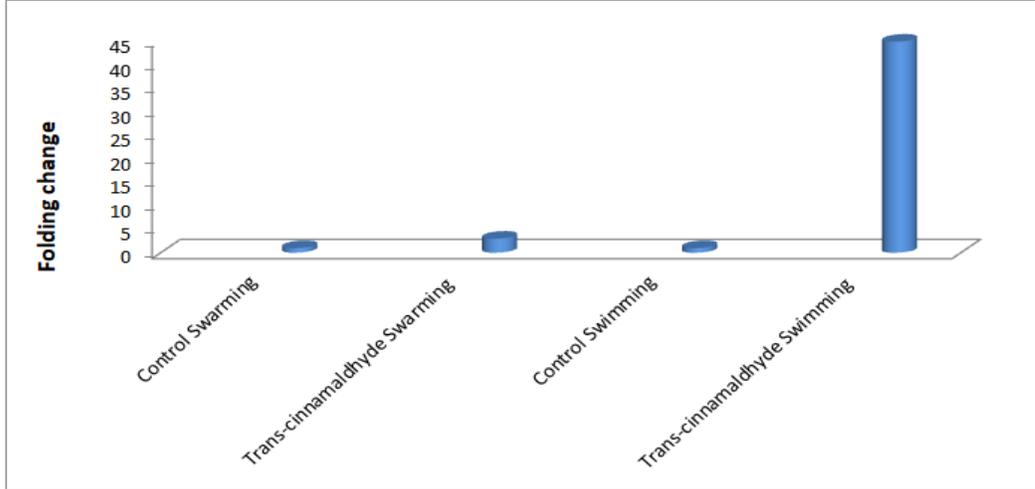
شكل (4-28) تأثير مركب Trans-cinnamaldhyde في التعبير الجيني للجين *flgJ* في ظاهرتي السباحة Swimming والانثيال Swarming للعزلة *C. sakazakii* (CSF4).

أشار (Amlardjou and Venkitanarayanan 2011b) الى ان استعمال التراكيز المنخفضة لمركب Trans-cinnamaldehyde قد تكون غير مثبطة لنمو بكتريا *C. sakazakii* وبالتالي غير مثبطة لعوامل ضراوة الضراوة ومنها الحركة .

#### 4-12-4 تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في التعبير الجيني للجين *zpx* في ظاهرتي

##### السباحة Swimming والانشيال Swarming للعزلة *C. sakazakii* (CSF4)

درس تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في مقدار التعبير الجيني للجين *zpx*, وأشارت النتائج في الشكل (4-29) وملحق (6) الى ظهور مستويات متباينة في التعبير عن جين *zpx* بعد معاملة بكتريا *C. sakazakii* للعزلة CSF4، اذ أدى الى زيادة التعبير عن جين *zpx* في ظاهرة Swarming عند استعمال تركيز SMIC لتصل الى 3.0 Folding change وفي ظاهرة Swimming الى 44.8 folding change مقارنةً مع معاملة السيطرة 1 Folding Change .



شكل (4-29) تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في التعبير الجيني لجين *zpx* في ظاهرتي

السباحة Swimming والانشيال Swarming للعزلة *C. sakazakii* (CSF4).

لوحظ من النتائج تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في ظاهرة Swarming تعتمد على

نوع الجين في حين لم تتأثر ظاهرة Swimming بالمعاملة في كلا الجينين.

اشار (2014) Amalardjou *et al.* الى ان مركب Trans-cinnamaldehyde يؤثر في العديد من عوامل الضراوة ومنها جينات الحركة مثل *flhD* ، *fliD* ، *flgJ* ، مشيراً الى ان ذلك يعتمد على التراكيز المستعملة فالتراكيز العالية تكون اكثر تأثيراً من التراكيز المنخفضة

كما أشار (2011a) Amalardjou and Venkitanaryana الى ان مركب Trans-cinnamaldehyde يؤثر في العديد من الجينات التي تشترك في تكوين الغشاء الحيوي ومن ضمنها الجين *flgJ*، اذ كان للمركب Trans-cinnamaldehyde دور في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من خلال تثبيط تكوين السكريات المتعددة ، وتكوين الاسواط والاتصال مابين خلايا وخلايا أخرى فضلاً عن تأثيره في التعبير عن العديد من الجينات.

كما أشار (2011 b) Amalaradjou and Venkitanarayanan الى ان استعمال التركيز تحت المثبط SMIC لمركب Trans-cinnamaldehyde يعمل على خفض مقاومة بكتريا *C. sakazakii* لظروف البيئة من درجة حرارة، واس هيدروجيني، وجفاف وذلك من خلال التأثير في بعض الجينات.

قد يعزى نسبة الزيادة في التعبير الجيني الى امتلاكها اسواط يتحكم بها 40 جين (Hoeflinger and Miller ., 2017) والذي ينتج عن تشفيرها حوالي 20 بروتين -Haiko and Westerlund (2013) ، مما يؤدي الى اختلاف في التعبير الجيني ، ان الجينات بصورة دائمية تعبر بميكانيكية معينة يتم التحكم بالزيادة والنقصان للتعبير عنها في انتاج بروتين معين ويكون الغرض الرئيسي والنهائي منها ان تستمر البكتريا في المعيشة ومقاومة الظروف المحيطة بها وخاصة الظروف غير الملائمة والتي تؤدي الى حدوث اجهاد ما ومنها المواد الكيميائية التي تنتشر في بيئتها .

الاستنتاجات

و

التوصيات

## الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

### الاستنتاجات Conclusions

1. أظهرت الدراسة قدرة البكتريا *C.sakazakii* على الحركة واحداث ظاهرتي الانثيال Swarming والسباحة Swimming فضلاً عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وإنتاج انزيم البروتيز Protease.
2. أظهرت المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol) فعاليتها في تثبيط نمو بكتريا *C. sakazakii* وبنسب متفاوتة باستعمال التراكيز المرتفعة ، اما مركب Trans-cinnamaldehyde فقد أظهرت كفاءته في تثبيط نمو البكتريا باستعمال التركيز العالية والمنخفضة.
3. كفاءة المركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol) في تثبيط ظاهرة السباحة اكثر من ظاهرة الانثيال.
4. أظهرت المركبات (Citral، Inulin، Trans-cinnamaldehyde) فعالية في تثبيط بعض عوامل الضراوة (انتاج انزيم البروتيز وتكوين الغشاء الحيوي) اكثر من مركب Curcumin و Resveratrol.
5. تأثر نمو بكتريا *C. sakazakii* عند درجات الحرارة العالية والمنخفضة مقارنةً مع درجة الحرارة المثلى 37 °م فضلاً عن تأثرها بالرقم الهيدروجيني الحامضي .
6. امتلاك عزلات بكتريا *C.sakazakii* كل من جين *zpx* و *flgJ* وبنسبة 100%.
7. أظهرت الدراسة الحالية تأثير التركيز تحت المثبط SMIC للمركبات ذات المصادر الطبيعية (Citral، Curcumin، Inulin، Resveratrol، Trans-cinnamaldehyde) في

8. التعبير الجيني لكل من الجين *flgJ* و *zpx* في العزلة (CSF4) فقد كان لمركب الكركمين تأثير في خفض التعبير الجيني لجين *flgJ* و زيادة التعبير عن جين *zpx*.
9. تأثير مركب Trans-cinnamaldehyde في مستوى التعبير الجيني لكل من جين *flgJ* و *zpx* في ظاهرتي السباحة *Swimming* والانتقال *Swarming*.

## التوصيات Recommendations

1. اجراء دراسات حول تاثير المركبات ( Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde ) في داخل الجسم الحي (In vivo)
2. اجراء تجارب عن تاثير المركبات ( Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde ) في جينات مقاومة الظروف البيئية .
3. اجراء تجارب عن تاثير المركبات ( Citral ، Curcumin ، Inulin ، Resveratrol ، Trans-cinnamaldhyde ) في انتاج التوكسينات من قبل بكتريا *C. sakazakii*
4. خلط المركبات ذات المصادر الطبيعية مع المضادات الحيوية ودراسة فعاليتها في تثبيط البكتريا .

# المصادر

## References المصادر

### المصادر العربية

الجبوري، ذاريات عبد الرحمن مطلق (2016). التحري عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا

*Cronobacter sakazakii* المعزولة من حليب الأطفال الرضع المجفف وعينات سريرية.

رسالة ماجستير، كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد: 92 صفحة.

## المصادر الأجنبية

- Adams, T.B.; Cohen, S.M.; Doull, J. ; Feron, V.J.; Goodman, J.I.; Marnett, L. J.; Munro, I.C.; Portoghese, P. C.; Smith, R.L.; Waddell, W. J. and Wagner, B. M. (2004). The FEMA GRAS assessment of cinnamyl derivatives used as flavor ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, 42(2) : 157-185.
- Álvarez-Ordóñez, A.; Begley, M. and Hill, C. (2013). Selection for Loss of RpoS in *Cronobacter sakazakii* by Growth in the Presence of Acetate as a Carbon Source. *Appl. Environ Microbiol.* 79(6): 2099–2102.
- Amalaradjou, M. A. R. and Venkitanarayanan, K. (2011a). Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J. Food Protect.* 74(2) : 200–208.
- Amalardjou ,M.A.R. and Venkitanarayanan, K.(2011b). Effect of Trans-cinnamaldehyde on reducing Resistance to environment stresses in *Cronobacter sakazakii* . *Food born pathogens and Disease* .8(3): 403-409.
- Amalaradjou, M.A.R.; Kim, K.S. and Venkitanarayanan. K. (2014). Sub-Inhibitory Concentrations of Trans-Cinnamaldehyde Attenuate Virulence in *Cronobacter sakazakii in Vitro*. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(5): 8639-8655.
- Arbatsky, N.P.; Sun, Y.; Shashkov, A. S.; Wang, M.; Liu, B.; Daeva, E.D. ; Wang , L.W. and Knirel, Y.A. (2012). Structure and genetics of the O-antigen of *Cronobacter sakazakii* G2726 (serotype O3) closely related to the O-antigen of *C. muytjensii* 3270. *Carbohydrate Res.*, 355: 50–55.

- Ashakirin, S. N.; Tripathy, M.; Patil, U.K. and Abdul Majeed, A.B. (2017). Chemistry and bioactivity of cinnamaldehyde: a natural molecule of medicinal importance . IJPSR, 8(6): 2333-2340.
- Babu, U.S.; Sommers, K.; Harrison, L.M. and Balan, K.V.(2012) . Effects of fructooligosaccharide-inulin on Salmonella-killing and inflammatory gene expression in chicken macrophages . Vet Immunol Immunopathol. 149: 92– 96.
- Barclay, T.; Ginic-Markovic, M.; Cooper, P. and Petrovsky, N. (2010). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. J. Excip. Food Chem., 1(3): 27-50.
- Barichello, T.; Fagundes, G.D.; Generoso, J.; Elias, S.G.; Simões L. and Teixeira, A.L. (2013). Pathophysiology of neonatal acute bacterial meningitis. J. Med. Microbiol., 62(12): 1781–1789.
- Barron, J. C. and Forsythe, S.J. (2007). Dry Stress and Survival Time of *Enterobacter sakazakii* and Other Enterobacteriaceae in Dehydrated Powdered Infant Formula. J. Food Prot., 70(9): 2111–2117.
- Beuchat, L.R.; Kim , H.; Gurtler, J.B.; Lin, L.C.; Ryu, J. H. and Richards, G.M. (2009). *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int J. Food Microbiol., 136(2): 204–213.
- Bernier, S.P, and Surette , M.G. (2013). Concentration- dependent activity of antibiotic in natural enviroments . Front microbial. 4 : 20
- Blanco,P.; Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J.A.; Corona,F.; Lira,F.; Alcalde-Rico,M.; Bernardini,A.; Sanchez , M.B. and Martinez ,J.L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. Microorganisms .4: 14

- Bouhdid, S.; Abrini, J.; Amensour, M.; Zhiri, A.; Espuny, M. J. and A. Manresa, A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by Cinnamomum32 verum essential oil . J. Appl. Microbiol., 109(4): 1139–1149 .
  
- Brackman, G.; Defoirdt, T.; Miyamoto, C.; Bossier, P.; Calenbergh, S.V.; Nelis, H. and Coenye, T. (2008). Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. BMC Microbiology. 8:149 .
  
- Breeuwer, P.; Lardeau, A.; Peterz, M. and Joosten, H.M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J Appl Microbiol. 95(5): 967-973.
  
- Buddington, K.K.; Donahoo, J.B. and Randal , K. Buddington, R.K. (2002). Dietary Oligofructose and Inulin Protect Mice from Enteric and Systemic Pathogens and Tumor Inducers. J. Nutr . 132: 472–477.
  
- Cardoso,J. and Soares,M.J. (2010) . In vitro effects of citral on Trypanosoma cruzi metacyclogenesis . Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(8): 1026-1032.
  
- Caubilla-Barron, J.; Hurrell,E.; Townsend, S.; Cheetham, P.; Loc-Carrillo, C.; Fayet, O.; Pre`re, M. and Forsythe, S.J. (2007). Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterofbacter sakazakii* Strains from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France . J clin microbiol. 45(12): 3979–3985 .
  
- Chang , C.; Chiang, M. and Chou, C. (2009). The effect of temperature and length of heat shock treatment on the thermal tolerance and cell

- leakage of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988. Int. J. Food Microbiol . 134: 184–189.
- Chen, Q.; Zhu, Y.; Qin , Z.; Qiu , Y. and Zhao, L. (2018). *Cronobacter spp.*, foodborne pathogens threatening neonates and infants. Front Agr Sci. Eng . 5(3): 330–339.
  - Chenu, J. W. and Cox, J.M. (2009). *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): current status and future prospects. Lett Appl Microbiol., 49: 153–159.
  - Choi, Y.; Kim, S.; Hwang, H.; Kim, K.; Kang, D. and Ryua, S. (2015). Plasmid-Encoded MCP Is Involved in Virulence, Motility, and Biofilm Formation of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544. Infect Immun. 83:197-204.
  - Cruz-Co´rdova1, A.; Rocha-Ramı´rez, L.; Ochoa , S.; Go´nzalez-Pedrajo, B.; Espinosa, N.; Eslava, C.; Herna´ndez-Chin˜as, U.; Mendoza-Herna´ndez, G.; Rodrı´guez-Leviz, A.; Valencia-Mayoral, P.; Sadowinski-Pine, S.; Herna´ndez-Castro, R.; Estrada-Garci´a,I.; Mun˜oz-Herna ´ndez,O.; Rosas,I. and Xicohtencatl-Cortes, J.(2012). Flagella from Five *Cronobacter* Species Induce ProInflammatory Cytokines in Macrophage Derivatives from Human Monocytes. Plos one. 7(12): e52091.
  - Cucarella,G.; Tormo,M.A.; Knecht,E.; Amorena,B.; Lasa,I.; Foster,t.j. and Panades,J.R.(2002).Examination of Biofilm – Associated Protien Interferes with Host Protien Receptors of *Staphylococcus aureus* and Alter the Infective Process. American Society for Microbiology . 70(6):3180-3186.
  - Dancer, J.I.; Mah, J. H.; Rhee, M.S.; Hwang, I.G. and Kang, D.H. (2009). Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) to environmental stresses. J. Appl. Microbiol. 107(5): 1606–1614.

- Domadia , P.; Swarup,S.; Bhunia , A.; Sivaraman, J. and Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde . *Biochem. Pharmacol* . 74 (6) : 831– 840.
- Drudy, D.; Mullane, N.R.; Quinn,T.; Wall, P.G. and Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula food safety. *Clin Infect Dis*. 42(7): 996-1002.
- Edelson-Mammel, S.; Porteous, M.K. and Buchanan, R.L. (2006). Acid Resistance of Twelve Strains of *Enterobacter sakazakii*, and the Impact of Habituating the Cells to an Acidic Environment. *J. Food Sci*. 71(6): 201 -206.
- Emami,C.; Mittal, R.; Wang, L.; Ford, H. and Prasadarao, N. (2011). Recruitment of Dendritic Cells Is Responsible for Intestinal Epithelial Damage in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. *J. Immunol* . 186: 7067–7079..
- Fakruddin, M.; Rahaman, M.; Ahmed, M.M. and Hoque, M.M. (2014). Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. *Biol. Res*. 47 : 63.
- Farmer , J.J. (2015). My 40-year history with *Cronobacter/ Enterobacter sakazakii* – lessons learned, myths debunked, and recommendations. *Front Pediatr*. 3:84.
- Farmer, J.J.; Asbury, M.A.; Hickman, F.W. ; Brennker, D. and The enterobacteriaceae study group .(1980). *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol* . 30(3): 569-584.
- Feeney, A.; Johnston, C.; Govender, R.; O’Mahony, J.; Coffey, A. and Sleator, R. D.(2014). Analysis of the role of the *Cronobacter sakazakii* ProP homologues in osmotolerance. *Gut Pathog*. 6:15

- Forbes , B. A. ; Saham , D. F. and Weissfeld , A. S (2007) . Baily and Scott's Diagnostic Microbiology .12th ed. , Mosby, Inc. , an anffilliate of Elsevier, Inc. 957 pp.
- Forsythe, S. (2010). Cronobacter species. Culture. 31: 1-5.
  - Foster, J.W. (1991). Salmonella Acid Shock Proteins Are Required for the Adaptive Acid Tolerance Response. J. Bacteriol . 173(21): 6896-6902.
  - Franco, A.A.; Kothary, M.H.; Gopinath,G.; Jarvis, K.G.; Grim, C.J.; Hu, L.; Datta, A.R.; McCardell, B.A. and Tall, B.D. (2011). Cpa, the Outer Membrane Protease of *Cronobacter sakazakii*, Activates Plasminogen and Mediates Resistance to Serum Bactericidal Activity. Infect immun., 79(4): 1578–1587. .
  - Frankova, A.; Marounek, M.; Mozrova, V. ;Weber, J.; Kloucek, P. and Lukesova, D. (2014). Antibacterial Activities of Plant-Derived Compounds and Essential Oils Toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Food pathogen Dis . 11(10): 795-797.
  - Friedemann, M.(2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food microbial . 116: 1-10.
  - Fusco, A; Coretti, L.; Savio, V.; Buommino, E.; Lembo, F. and Donnarumma, G. (2017). Biofilm Formation and Immunomodulatory Activity of *Proteus mirabilis* Clinically Isolated Strains. Int. J. Mol. Sci. 18(2): 1-11
  - Garrity, G.M.; Brenner, D. J.; Krieg, N.R. ; Staley , J.T.; Chairman; Boone, D.R.; Chairman, V.; De Vos, P.; Goodfellow, M.; Rainey, F. A. and Schleifer, K.H (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 the Proteobacteria Part B the Gammaproteobacteria. Publisher Springer: 304 pp.

- Gurtler, J.B. and Beuchat, L.R. (2005). Performance of Media for Recovering Stressed Cells of *Enterobacter sakazakii* as Determined Using Spiral Plating and Ecometric Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71( 12) : 7661–7669
- Hackam, D.; Upperman, J.; Grishin, A. and Ford, H. (2005). Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin. Pediatr. Surg.* 14: 49-57.
- Haiko, J. and Westerlund-Wikström, B. (2013). The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology.* 2(4): 1242-1267.
- Hamilton, J.; Lehane, M. and Braig, H. (2003). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg. Infect. Dis.* 9(10): 1355-1356.
- Haranahallia, K.; Tonga, S. and Ojima, I. (2016). Recent advances in the discovery and development of antibacterial agents targeting the cell-division protein FtsZ. *Bioorg Med Chem.*, 24(24): 6354–6369.
- Harly, J.P. and Prescott, L.M (2002) . *Laboratory Exercises In Microbiology.* 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill education, Inc . 466 pp .
- Hartmann, I.; Carranza, P.; Lehner, A.; Stephan, R.; Eber, L. and Riedel, K. (2010). Genes Involved in *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (7): 2251–2261 .
- Hassan, A. A. O.; Akineden, C.; Kress, S.; Estuningsih, E.; Schneider and E. Usleber (2007). Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 214-220.
- Healy, B.; Cooney, S.; O'Brien, S.; Iversen, C.; Whyte, P.; Nally, J.; Callanan, J. and Fanning, S. (2010). *Cronobacter (Enterobacter*

- sakazakii*): An Opportunistic Foodborne Pathogen. Foodborne Pathog. Dis . 7(4): 339-350.
- Hochel, I.; Ruzickova, H. and Demnerova, K. (2012). Occurrence of *Cronobacter spp.* in retail foods. J Appl Microbiol. 112(6): 1257-1265
  - Hoeflinger , J. and Miller, M.J. (2017). *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 Autoaggregation Requires FliC Flagellation, Not Motility. Front. Microbiol . 8: 301.
  - Holy, O. and Forsythe, S. (2014). *Cronobacter spp.* as emerging causes of healthcare-associated infection. J. Hosp. Infect. 86: 169-177.
  - Hu, S.; Yu, Y. and Xiao, X. (2017). Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter spp.* In dairy products: A review. Food Control. 85: 400-415.
  - Huertas, J.; Álvarez-Ordóñez, A.; Morrissey, R.; Ros-Chumillas, M.; Esteban, M.; Maté, J.; Palop, A. and Colin Hill, C. (2015). Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. Food Res. Int. 69: 401–409.
  - Iversen, C. and Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci Technol . 14(11) : 443–454.
  - Iversen, C.; Lehner, A.; Mullane, N.; Bidlas, E.; Cleenwerck, I.; Marugg, J.; Fanning, S.; Stephan, R. and Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter, Dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies*. BMC Evol Biol. 7:64.

- Iversen, C.; Waddington, M.; On, S.W. and Forsythe, S. (2004). Identification and Phylogeny of *Enterobacter sakazakii* Relative to Enterobacter and Citrobacter Species . J Clin Microbiol . 42(11): 5368–5370.
- Jaradat, Z.W.; Al Mousa, W.; Elbetieha, A.; Al Nabuls, A. and Tall, B. (2014). *Cronobacter spp.* – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. J. Med. Microbiol . 63: 1023–1037 .
- Joseph, S. and Forsythe, S. (2011) Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections . Emerg Infect Dis. 17(9): 1713-1715.
- Jovičić, D.; Jozinović, A.; Grčević, M.; Aleksovska, E. and Šubarić, D. (2017). Nutritional and health benefits of curcumin . Nutritional and health benefits . 6: 22-27.
- Kalyantanda, G.; Shumyak , L. and Archibald, L.K. (2015). *Cronobacter species* contamination of powdered infant formula and the implications for neonatal health. Front. Pediatr. 3: 65 .
- Kandhai, M. C.; Reij, M.W.; Gorris, L.G.M.; Guillaume-Gentil, O. and Schothorst, M.V. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. The Lancet.363(9402): 39-40
- .- Kempf, B. and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch Microbiol . 170(5):319–330.
- Kim, H.; Ryu, J.; Larry, R. and Beuchat, L. (2006). Attachment of and Biofilm Formation by *Enterobacter sakazakii* on Stainless Steel and Enteral Feeding Tubes. Appl.Environ.Microbiol. 72(9): 5846–5856.

- Kim, K. and. Loessner, M. (2008). *Enterobacter sakazakii* Invasion in Human Intestinal Caco-2 Cells Requires the Host Cell Cytoskeleton and Is Enhanced by Disruption of Tight Junction. *Infect Immun* . 76(2): 562–570.
- Kim, K.; Kim, K.; Choi, J.; Lim, J.; Lee, J.; Hwang, S. and Ryu, S. (2010a). Outer Membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol* . 76(15):5188–5198.
- Kim, S.; Bae, Y. and Lee, S. (2012). Stress Response of Acid-shocked *Cronobacter sakazakii* against Subsequent Acidic pH, Mild Heat, and Organic Acids . *Food Sci. Biotechnol*. 21: 205-210.
- Kim, T.J.; Weng, W.L.; Silva, J.L.; Jung, Y.S. and Marshall, D. (2010b). Identification of natural antimicrobial substances in red muscadine juice against *Cronobacter sakazakii* . *J Food Sci* . 75(3): 150-154.
- Kocaadam, B. and Şanlıer, N. (2017). Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 57(13): 2889–2895 .
- Kothary, M. H.; McCardell, B.A.; Frazar, C.D.; Deer, D. and Tall, B.D. (2007). Characterization of the Zinc-Containing Metalloprotease Encoded by *zpx* and Development of a Species-Specific Detection Method for *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol* . 73(13): 4142–4151.
- Lai, K. K. (2001). *Enterobacter sakazakii* Infections among Neonates, Infants, Children, and Adults. *Medicine*. 80 (2): 113-122.
- Lambert, R.W. and Bidlas, E. (2007). A study of the Gamma hypothesis: Predictive modelling of the growth and inhibition of *Enterobacter sakazakii*. *Int. J Food. Microbiol*. 115: 204- 213.

- Lang, E. ; Iaconelli, C.; Zoz, F.; Guyot, S.; Alvarez-Martin, P.; Beney, L.; Perrier-Cornet, J. and Gervais , P. ( 2017). Drying parameters greatly affect the destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella Typhimurium* in standard buffer and milk. Food Microbiol. 62: 82-91.
- Lebeaux,D.; Ghigo,J. and Beloin , C. (2014) . Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. MMBR. 78(3): 510-543.
- Lee, J.; Cho, H.S.; Joob, S.W.; Regmic, S.C.; Kim, J.; Ryud,C.; Ryue, S.; Moo Choa, H. and Jintae Lee, J. (2013). Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157:H7. Biofouling. 29(10): 1189-1203.
- Lehner, A.; Riedel, K.; Eberl, L.; Breeuwer, P.; Diep, B. and Stephan, R. (2005). Biofilm Formation, Extracellular Polysaccharide Production, and Cell-to-Cell Signaling in Various *Enterobacter sakazakii* Strains: Aspects Promoting Environmental Persistence. J. Food Prot. 68(11): 2287–2294.
- Levy, O. (2002). Impaired Innate Immunity at Birth: Deficiency of Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) in the Neutrophils of Newborns. Pediatr Res. 51(6): 667-669.
- Li, B.; Li, X.; Lin, H. and Zhou, Y. (2018). Curcumin as a Promising Antibacterial Agent: Effects on Metabolism and Biofilm Formation in *S. mutan*. Biomed. Res. Int. 4508709
- Liaw,S.J.; Lai, H.C. and Wang, W.B.(2004). Modulation of Swarming and Virulence by Fatty Acids through the RsbA Protein in *Proteus mirabilis*. Infect Immun . 72(12): 6836–6845 .
- Ma, D.S.; Tan, L.T.H.; Chan, K.G.; Yap, W.H.; Pusparajah, P.; Chuah, L.H.; Ming, L.C.; Khan, T.M.; Lee, L.H. and Goh, B.H. (2018).

Resveratrol-Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. *Pathogens. Front. Pharmacol.* 9: 102.

- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria* Third ed. Philadelphia, Baltimore, Maryland: Lippincott Williams&Wilkins, 225-28.
- Mashoufi, A.; Hashemi, M.; Ghazvini, K.; Mobarhan, M.G. and Afshari, A. (2017). *Cronobacter sakazakii*, a New Threat: Characteristic, Molecular Epidemiology and Virulence Factors. *ARRB* . 21(5): 1-21.
- Morohoshi, T.; Kato, M.; Fukamachi, K.; Kato, N. and Ikeda, T. (2007). N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC12472. *FEMS Microbiol Lett.* 279: 124–130.
- Mullane, N.; O’Gaora, P.; Nally, J.E.; Iversen, C.; Whyte, P.; Wall, P.G. and Fanning, S. (2008). Molecular Analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-Antigen Gene Locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12): 3783–3794
- Muller, A.; Stephan, R.; Fricker-Feer, C. and Lehner, A. (2013). Genetic Diversity of *Cronobacter sakazakii* Isolates Collected from a Swiss Infant Formula Production Facility. *J. Food Prot.* 76(5): 883–887.
- Mun, S.; Joung, D.; Kim, Y.; Kang, O.; Kim, S.; Seo, Y.; Kim, Y.; Lee, D.; Shin, D.; Kweon, K. and Kwona, D. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine.* 20:714-718.
- Muytjens, H.; Ros-Vanderepe, J. and Vandruuten, H.M. (1984). Enzymatic Profiles of *Enterobacter sakazakii* and Related Species with Special Reference to the ox-Glucosidase Reaction and Reproducibility of the Test System. *J. Clin. Microbiol.* 20 (4): 684-686.

- Nazarowec-white, M. and Farber, J.M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried – infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 9-13.
- Ogrodzki, P. and Forsythe, S. (2015). Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis. *BMC Genomics.* 16: 758.
- Pagotto, F.; Nazaroec-White, M.; Bidawid, S. and Farber, J.M. (2003). *Enterobacter sakazakii* :Infectivity and Enterotoxin Production In Vitro and In Vivo. *J Food Prot .* 66(3): 370– 375.
- Parra-Flores, J.; Cerda-Leal, F.; Contreras, A.; Valenzuela-Riffo, N.; Rodríguez, A. and Aguirre, J.(2018). *Cronobacter sakazakii* and Microbiological Parameters in Dairy Formulas Associated With a Food Alert in Chile. *Front. Microbiol.* 9: 1708 .
- Parra-Flores, J.; Rodriguez, A.; Riffo, F.; Arvizu-Medrano, S. M.; Arias-Rios, E. V. and Aguirre, J. (2015). Investigation on the factors affecting *Cronobacter sakazakii* contamination levels in reconstituted powdered infant formula. *Front Pediatr.* 3: 72.
- Paulo, L.; Oleastro, M.; Gallardo, E.; Queiroz, J. A. and Domingues, F. (2001). Antimicrobial properties of resveratrol: a review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* 2: 1225-1235.
- Phan-Thanh, L.; Mohouin, F. and Alige, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes* . *Int. J. Food Microbiol.* 55: 121-126.
- Qin, N.; Tan, X.; Jiao, Y.; Liu, L.; Zhao, W.; Yang, S. and Jia , A. (2014). RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. Sci Rep. 4: 5467.
- Roberfroid, M.B. (2007). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. J. Nutr . 137: 2493S–2502S
  - Shahzadi, P.; Muhammad, A.; Mehmood, F. and Chaudhry, M.Y. (2014). Synthesis of 3, 7-Dimethyl-2, 6-Octadienal Acetals from Citral Extracted from Lemon Grass, *Cymbopogon citrates*. J Antivir Antiretrovir. 6: 28-31
  - Shaker, R.R.; Osaili, T.M.; Abu AL-Hasan, A.S.; Ayysh, M.M. and Forsythe, S.J. (2008). Effect of Desiccation, Starvation, Heat, and Cold Stresses on the Thermal Resistance of *Enterobacter sakazakii* in Rehydrated Infant Milk Formula. J. Food Sci. 73(7): 354-359.
  - Shi, C.; Sun, Y.; Liu, Z.; Guo, D.; Sun, H.; Sun, Z.; Chen, S.; Zhang, W.; Wen, Q.; Peng, X.; and Xia, X. (2017). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* Virulence Factors by Citral. Sci rep. 7: 43243.
  - Shoaib, M.; Shehzad, A.; Omar, M.; Rakha, A.; Raza, H.; Sharif, H.R. Shakeel, A.; Ansari, A. and Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. Carbohydr Polym. 147: 444–454.
  - Singamsettya, V.; Wang, Y.; Shimadab, H. and Prasadaraoa, N. (2009). Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. Microb Pathog. 45(3) : 181–191.
  - Singh, A. K.; Prakash, P.; Singh, R.; Nandy, N.; Firdaus, Z; Bansal, M.; Singh, R.K.; Srivastava, A. K. ; Roy, J.; Mishra, B. and Rakesh K. Singh, R.K.(2017). Curcumin quantum dots mediated degradation of bacterial biofilms. Front microbiol. 8: 1517.

- Singh, N.; Goell, G. and Raghav, M. (2015). Insights into virulence factors determining the pathogenicity of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence* 6(5) : 433-440
- Stokes , E.J. and Ridgway , G. (1987). *Clinical Bacteriology* , 6<sup>th</sup> edn . Edward Arnold, London: 215 pp.
- Subramaniana, M.; Goswamib, M.; Chakrabortya, S. and Jawalib, N. (2014). Resveratrol induced inhibition of *Escherichia coli* proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible reactive oxygen species generation. *Redox Biol.* 2: 865-872.
- Sun,Y.; Wang, M.; Liu,H.; Wang, J.; He,X.; Zeng, J.; Guo, X.; Li, K.; Cao, B. and Wang, L. (2011). Development of an O-Antigen Serotyping Scheme for *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(7): 2209–2214 .
- Sun,Y.; Wang, M.; Wang, Q.; Cao, B.; He, X.; Li, K.; Feng, L. and Wang, L.(2012). Genetic Analysis of the *Cronobacter sakazakii* O4 to O7 O-Antigen Gene Clusters and Development of a PCR Assay for Identification of All *C. sakazakii* O Serotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(11): 3966–3974.
- Teow,S.Y.; Liew,K.; Ali, S.A.; Khoo,A.S.B. and Peh,S.C. (2016). Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *J. Trop. Med.* 2853045.
- Townsend, S.; Barron, J.C.; Loc-Carrillo, C. and Forsythe, S. (2007). The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiol.* 24: 67–74.

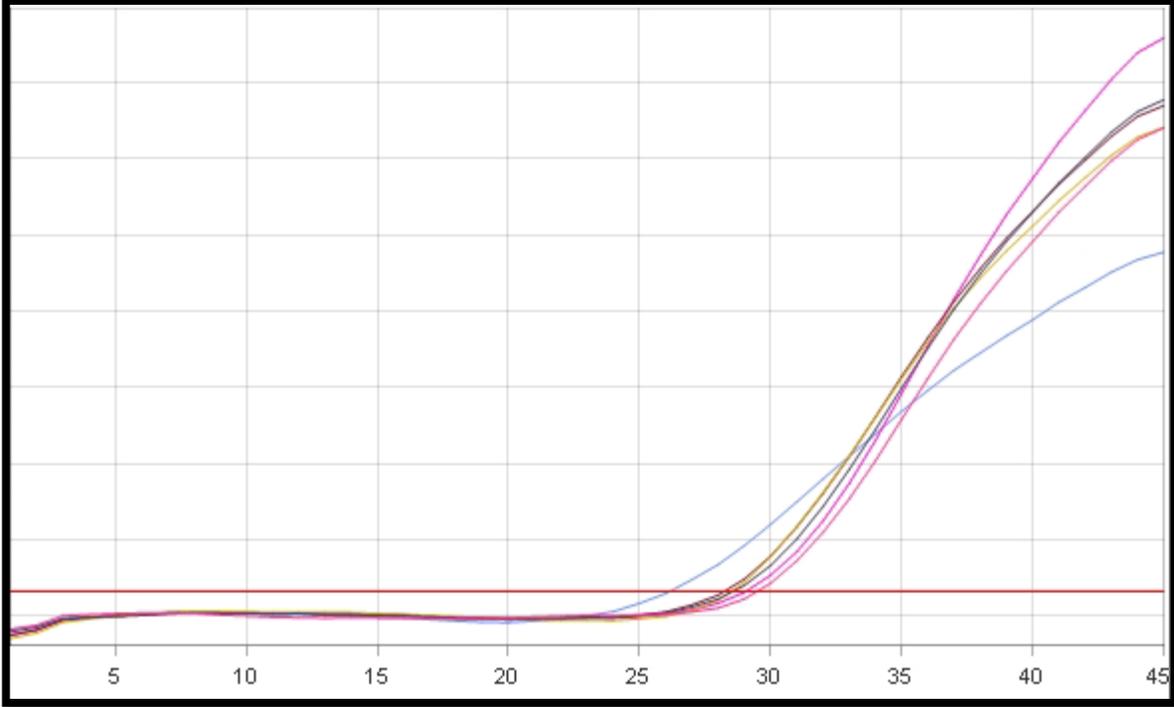
- Tyagi, P.; Singh, M.; Kumari, H.; Kumari, A. and Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal Activity of Curcumin IIs Associated with Damaging of Bacterial Membrane. Plos one . 10(3):0121313.
  - Ueda, S. (2017) .The effect temperature on the growth and heat resistance of *Cronobacter spp.* Biocontrol Sci. 22(2): 125- 129.
  - Utchariyakiat, I.; Surassmo, S.; Jaturanpinyo, M.; Khuntayaporn, P. and Chomnawang, M.T. (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. BMC compl Altern Med. 16: 158 .
  - Vanacker, J.; Smet, F.D.; Muydermans, G.; Bougatef, A.; NAESSENS, A.; and Lauwers, S. (2001). Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula. J. Clin. Microbial. 39: 293–297.
  - Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck ,C.C.:(2003) . Bacteriological investigation . In: World health organization .2 ed. Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology ,WHO,Geneva .167 pp.
  - Walsh, D.; Molloy, C.; Iversen, C.; Carroll, J.; Cagney, C.; Fanning, S. and G. Duffy, G. (2010). Survival characteristics of environmental and clinically derived strains of *Cronobacter sakazakii* in infant milk formula (IMF) and ingredients. J. Appl. Microbiol. 110:697–703.
- Willis, L. M. and Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. Carbohydr Res.378: 35-44.
- Wu, R.Y.; Abdullah,M. ; Määttänen, P.; Pilar, A. V. C.; Scruten, E.; Johnson-Henry, K.; Napper, S.; O'Brien, C.; Jones, N. and Sherman,

- P.M. (2017). Protein kinase C $\delta$  signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Sci rep* . 7: 40820.
- Ye, Y.W.; Gao, J.; jiao,R.; li, H.; Wu,Q.; ; Zhang, J. and Zhong, X. (2015). The membrane protein involved in virulence of *Cronbacter sakazakii* Virulent G362 and attenuated L3101 isolates. *Front Micro*. 6:1238.
  - Zeng, H.; Lei, T.; He, W.; Zhang, J.; Liang, B.; Li, C.; Ling, N.; Ding, Y.; Wu, S.; Wang, J. and Wu, Q. (2018). Novel Multidrug-Resistant *Cronobacter sakazakii* Causing Meningitis in Neonate, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis*. 24 (11): 2121-2123.
  - Zhang , G.; Liu, J.; Li , R.; Jiao, S.; Feng, C.; Wang , Z.A. and Du, Y. (2018). Conjugation of Inulin Improves Anti-Biofilm Activity of Chitosan. *Mar. Drugs*. 16: 151.
  - Zhou, P.; Zhao, Y. ; Zhang, P.; Li, Y.; Gui, T. ; Wang, J.; Jin, C.; Che, L.; Li, J.; Lin,Y.; Xu, S.; Feng, B.; Fang, Z. and Wu, D. (2017). Microbial mechanistic insight into the role of Inulin in Improving maternal health in a pregnant sow model. . *Front microbiol*. 8: 2242
  - Zinn,S.; Betz, T.; Medcraftac, C. and Schnell, M. (2015). Structure determination of trans-cinnamaldehyde by broadband microwave spectroscopy. *PCCP*. 17(24): 16080-16085.

الملاحق

الملحق (1) الشكل البياني للتعبير الجيني للجين المحافظ لمعاملات السيطرة والتجربة لبكتريا

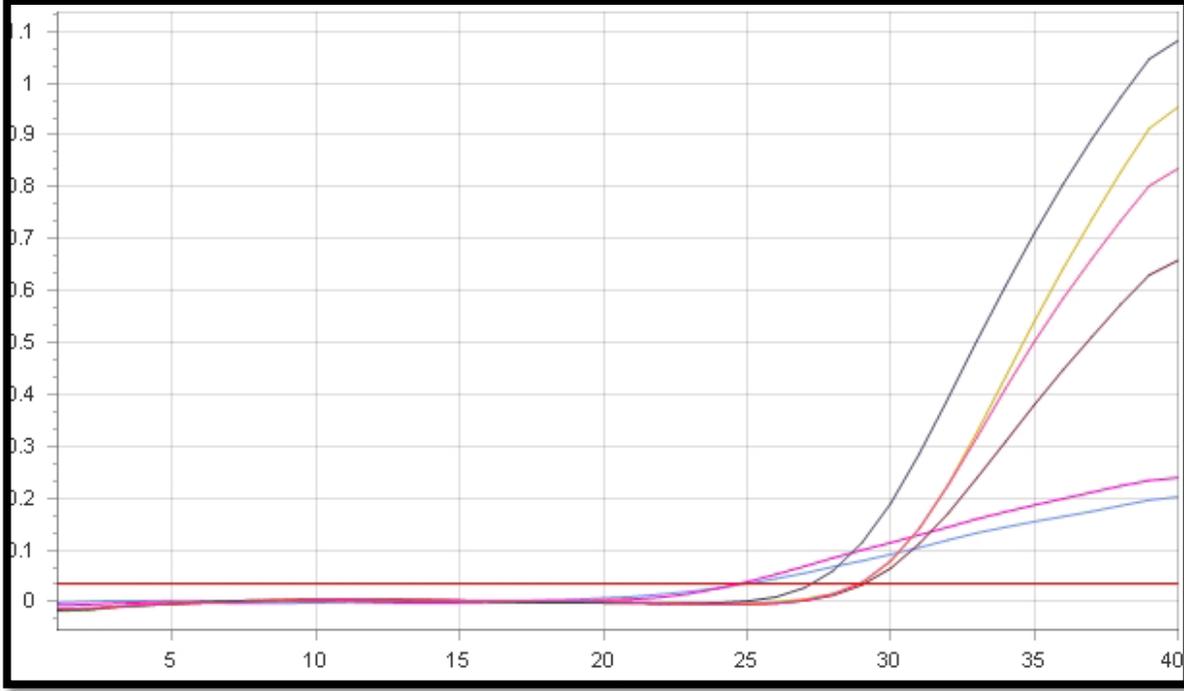
*Cronobacter sakazakii*.



اللون	المعاملة
	Control <i>C. sakazakii</i> (CSF4)
	Inulin/CSF4
	Curcumin/CSF4
	Teans-cinnamaldehyde/CSF4
	Resveratrol/CSF4
	Citral/CSF4

الملحق (2) الشكل البياني للتعبير الجيني للجين *flgJ* لمعاملات السيطرة والتجربة في بكتريا

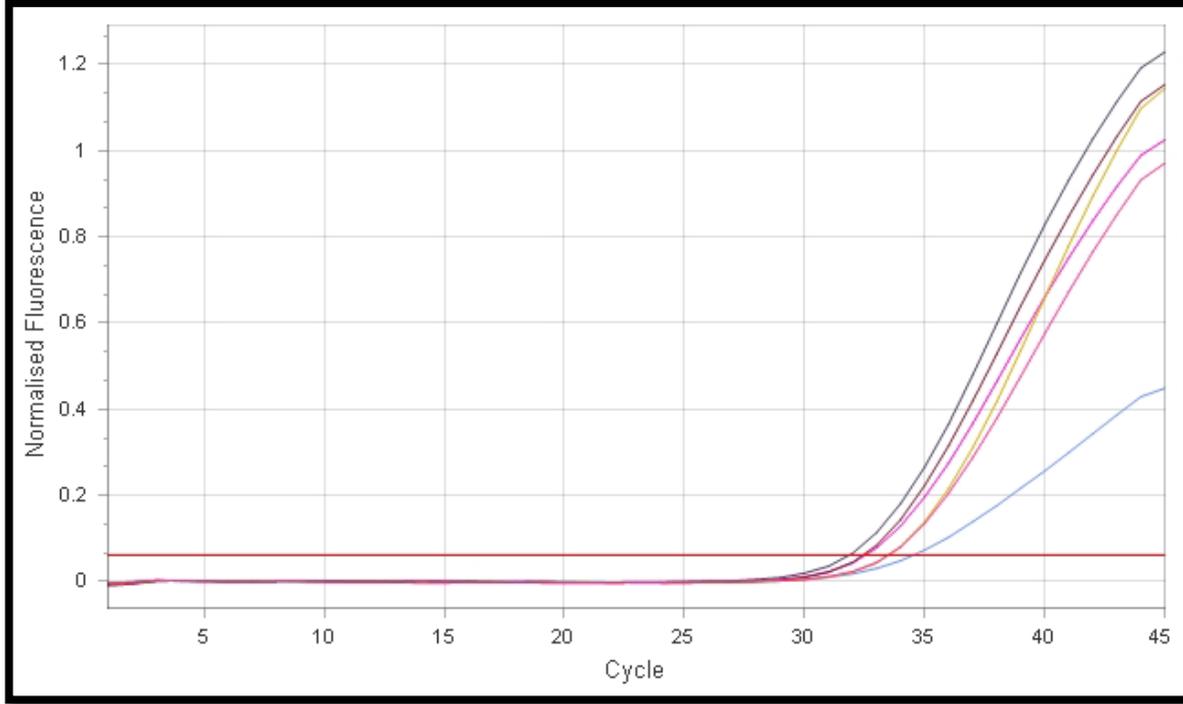
*Cronobacter sakazakii*.



اللون	المعاملة
	Control <i>C. sakazakii</i> (CSF4)
	Inulin/CSF4
	Curcumin/CSF4
	Tears-cinnamaldehyde/CSF4
	Resveratrol/CSF4
	Citral/CSF4

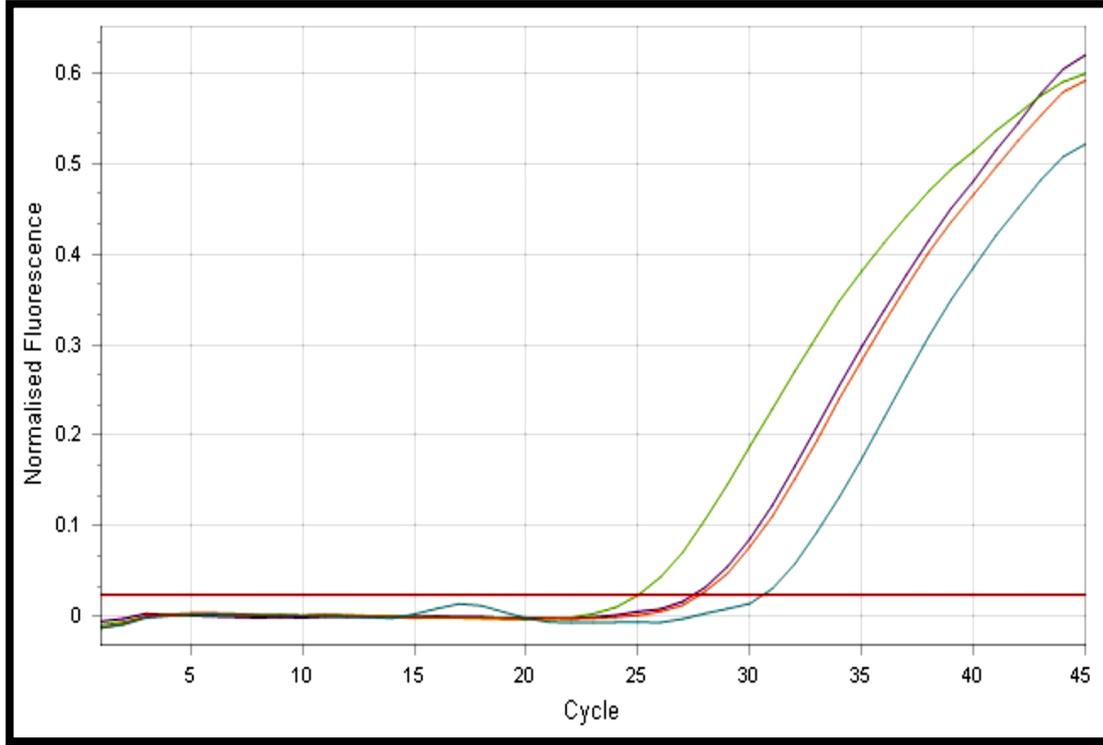
الملحق (3) الشكل البياني للتعبير الجيني للجين *zpx* لمعاملات السيطرة والتجربة في بكتريا

*Cronobacter sakazakii* .



اللون	المعاملة
	Control <i>C. sakazakii</i> (CSF4)
	Inulin/CSF4
	Curcumin/CSF4
	Teans-cinnamaldehyde/CSF4
	Resveratrol/CSF4
	Citral/CSF4

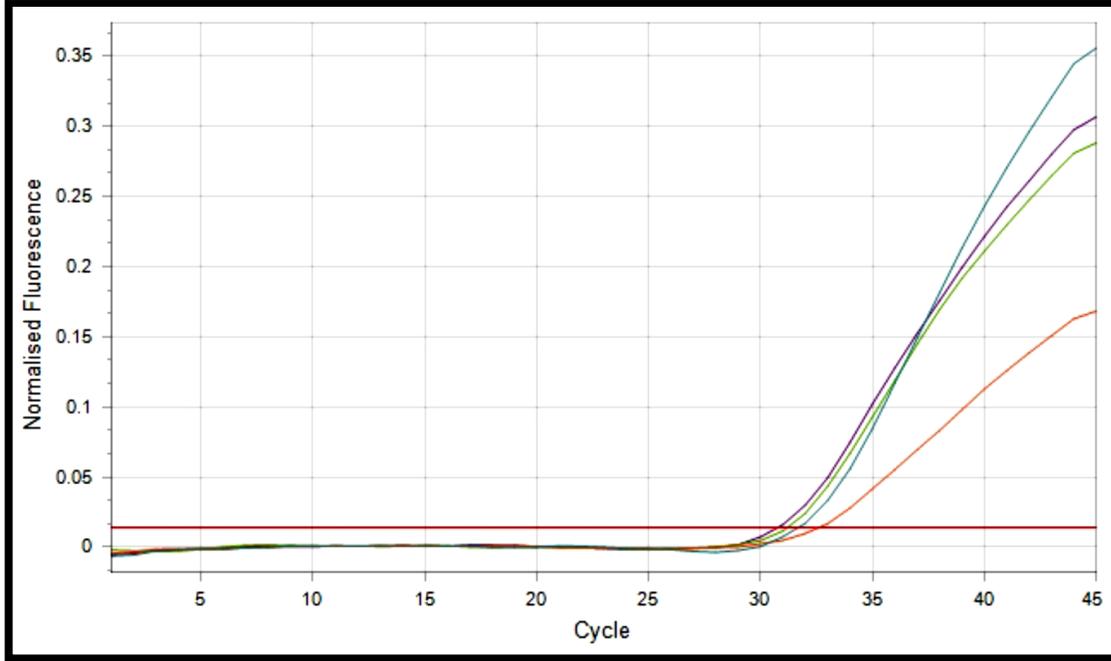
ملحق (4) الشكل البياني للتعبير الجيني للمحافظ لمعاملات السيطرة والتجربة في بكتريا *Cronobacter sakazakii* في Swimming و Swarming في ظاهرتي.



اللون	المعاملة
	Control Swarming
	Trance-Cinnamaldhyde SMIC
	Control Swimming
	Trance-cinnamaldhyde SMIC

الملحق (5) الشكل البياني للتعبير الجيني للجين *flgJ* لمعاملات السيطرة والتجربة لبكتريا

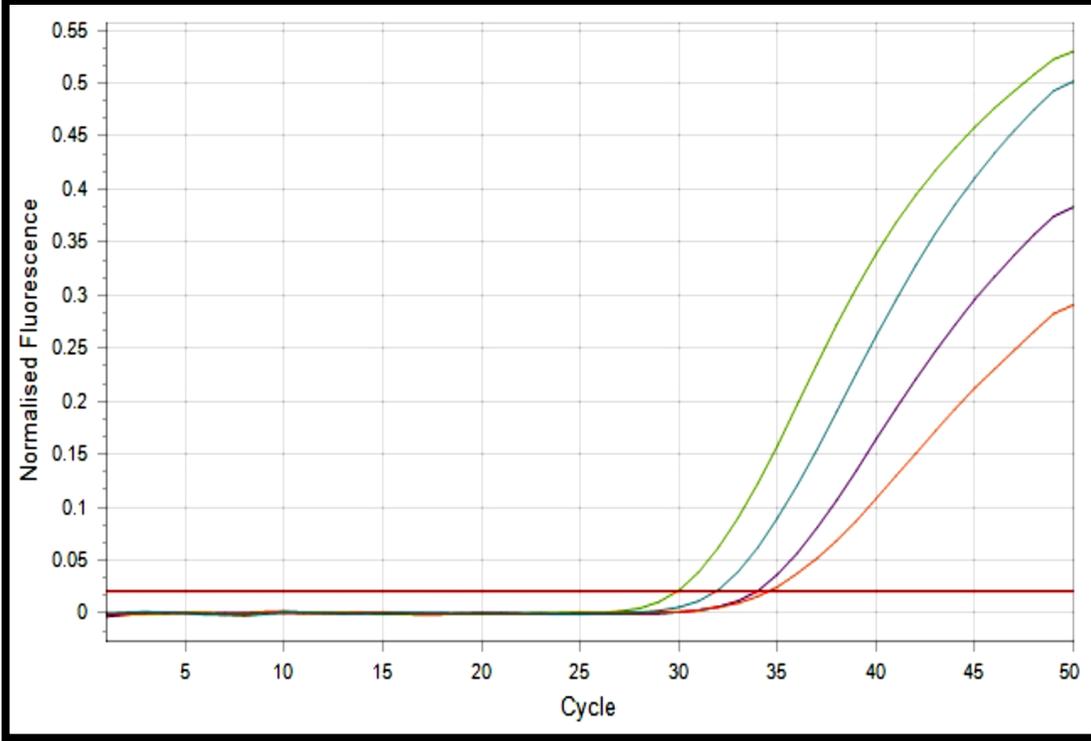
*Cronobacter sakazakii* في ظاهرتي Swarming و Swimming



اللون	المعاملة
	Control Swarming
	Trance-Cinnamaldhyde SMIC
	Control Swimming
	Trance-cinnamaldhyde SMIC

الملحق (6) الشكل البياني للتعبير الجيني للجين *zpx* لمعاملات السيطرة والتجربة لبكتريا

*Cronobacter sakazakii* في ظاهرتي Swarming و Swimming



اللون	المعاملة
	Control Swarming
	Trance-Cinnamaldhyde SMIC
	Control Swimming
	Trance-cinnamaldhyde SMIC

## Summary

In the present study aimed to detect the effect (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) compound on *C. sakazakii* growth. Seventeen isolate was calculated from previous study its included (6 from blood isolate (B), 6 from cerebrospinal fluid isolate (CSF), 3 from Dialac milk (A1), from Novolac Allernova milk, (C1) 1 from Novolac AD milk (C2)). and cultured on MacConkey and Trypton soy agar (TSA), as well as diagnostics using 16S rRNA gene and result showed that all isolate was returned to *C. sakazakii* .

This study to detect some virulence factor of *C. sakazakii* The result showed that all isolate could motility and swimming on diameter range (17-79) mm and swarming on diameter rang (4-64)mm , and to produce protease on diameter range (8-30) mm, and forming biofilm by microtiter plate method.

The study effect of ( Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) compound on *C. sakazakii* (A1b, B4 , CSF4) isolate at (1, 10, 100) microgram/ml concentration the result showed that all compounds could to inhibit isolate by uses high concentration, while Trans-cinnamaldehyde used could to inhibit isolate by high and low concentration. And the study of effect (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) compound on swimming and swarming motility of *C. sakazakii* (A1b, B4, CSF4) isolate, the result showed that all compound could to inhibit isolate on different ratio depended on type of compound and concentration.

And was studied effect of (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldehyde) compound on other virulence factor such as protease

## Summary

---

production on (A1b, B4, CSF4) isolate, and the result showed different of effect depended on type of isolate and compound concentration.

And result showed effect of all compound on *C. sakazakii* (A1b, B4, CSF4) isolate biofilm formation at low and high concentration. And was studied effect of different environment factors such as temperature and PH. The different temperature degress showed effect on *C. sakazakii* (Blood, Cerebrospinal fluid, milk) isolate and result showed at 55 C° was effect to reduce growth bacteria compared on 37 C° and 25 C°.

While study effect of pH on *C. sakazakii* was studied isolates result showed reduce growth at PH: 4 compared with PH 7 and PH 9.

Some of the virulence genes of *C. sakazakii* were diagnosed such as *zpx* gene and *flgJ* gene and the result the precence of these genes on 100% in CSF4 isolate.

This study effect of (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldhyde) in amount gene expression of *flgJ* gene and showed the result to found variation in *flgJ* gene expression in *C. sakazakii* (CSF4) isolate result showed the curcumin reduced *flgJ* gene expression to 0.2 folding change compared with control and other compound.

The result of effect (Citral, Curcumin, Inulin, Resveratrol, Trans-cinnamaldhyde) at SMIC on *zpx* gene expression was variation amount gene after *C. sakazakii* (CSF4) isolate treatment and caused to increase *zpx* gene expression compared with control.

And the study effect of Trans-cinnamaldhyde at SMIC on *flgJ* gene expression of swimming and swarming media, the result showed to found variation in *flgJ* gene expression after *C. sakazakii* (CSF4) treatment it was caused to reduce *flgJ* gene expression on swarming isolate to 0.14 folding

## Summary

---

change compared with control , and result showed to increase swimming isolate to 13.65 folding change compared with control .

While effect Trans-cinnamaldehyde at SMIC on *zpx* gene expression on swarming and swimming media after *C. sakazakii* (CSF4) isolate treatment it was increased *zpx* gene expression on swarming and swimming isolate compared with control.

Republic of Iraq  
The Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of Baghdad  
Collage of Education For Pure Sciences /Ibn-Al Haitham  
Department of Biology



# **Phynotypic and Molecular Study of Natural Compounds Effect on *Cronobacter sakazakii***

**Athesis submitted**

**To the council of Collage of Education for Pure sciences / Ibn –Al  
Hitham/ University of Baghdad as a partial fulfillment of the  
Requirements for the Degree of Master of science in Biology  
/Microbiology**

**By**

**Gardinea Amer Ismail Abd-Al-Hafud Al-Sheeqly**

**Bachelor of sciences in Biology / Collage of Education for pure sciences /  
Ibn AL- Haitham/ University of Baghdad 2015-2016**

**Supervised by**

**Assit-Professor Dr- Luma Abd alhadi Zewien**

**1440 A.H.**

**2019 A.D.**