توصيف جزئي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في عزلات جرثومة *Serratia marcescens* المعـزولة محليا♦

خالد دحام احمد
هيفاء مازن الياس
قسم علوم الحياة/ كلية التربية
قسم علوم الحياة / كلية التربية للبنات
جامعة الموصل

Abstract

This study involved isolation of twenty eight primary isolates of the genus *Serratia* from different clinical human infections from different hospitals in Mosul city . After microscopic examination and diagnosis using biochemical tests, cultural characters and API 20 E system ,eleven isolates of *Serratia marcescens* were identified from them .Amplification of plasmid DNA content in *S.marcescens* isolates were tested in presence of chloramphenicol (100µ/ml), tetracycline and starvation . The isolates showed variation in their ability to amplify their plasmid DNA content in the presence of chloramphenicol and by starvation as compared with unamplfied cultures. While in presence of tetracycline (150 µ/ml), only one isolate out of seven showed this characteristic. Phages isolated from sewage water were used to control viability of bacterial isolates. The results showed that these phages appear to be ineffective on these isolates.

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة جمع (28) عزلة أولية تعود لجـنس الـ *Serratia* مـن حـالات مرضية مختلفة في الإنسان من مستشفيات مختلفة في مدينة الموصل . شخصت العـزلات الجرثومية التي تم الحصول عليها بالاعتماد على الفحص ألمجهـري والـصفات المزرعيـة والاختبارات الكيموحيوية وأخيرا اختبار نظام API 20 E . حيث أمكـن تـشخيص (11) عزلة لجرثومة *Serratia marcescens* من هذه العـزلات الأولية . اختبرت قابلية تضخيم محتوى الـ DNA البلازميدي في عزلات جرثومة الـ *S.marcescens* بوجـود المـضادين الحيويين Chloramphenicol و Tetracycline وكذلك بعملية التجويـع حيـث تباينـت العـزلات في قابليتها على تضخيم محتواها من DNA البلازميدي بوجود المضاد الحيـوي Chloramphenicol بتركيز 100 مايكروغرام/ مل وكذلك بعملية التجويـع مقارنـة مـع العزلات غير المعاملة بوصفها نموذج سيطرة أضف الى ذلك فان عزلة واحدة فقط أظهـرت

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

هذه الخاصية بوجود المضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 150 مايكروغرام/ مل . استخدمت العاثيات التي تم عزلها من مياه المجاري للسيطرة على حيوية العزلات الجرثومية . حيث تبين بان العاثيات التي تم عزلها لم تكن فعالة في السيطرة على هذه العزلات .

المقدمة

جنس الـ *Serratia* واحدا من الأجناس الواقعة ضمن العائلة المعوية (4) ، حيث يعد النوع marcescens النوع النموذجي والأكثر شيوعا في العينات السريرية المأخوذة من الإنسان ، اذ شهدت السنوات الأخيرة اهتماماً متزايداً بهذه الجرثومة لما تبديه من دور فعال ومؤثر في الاصابات المعروفة بعدوى المستشفيات (26) ، فهي تشكل تهديداً حقيقياً بعد جرثومة *E.coli* ، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* (8) .

قدرة بعض الانواع الواقعة ضمن هذا الجنس على انتاج الصبغة الحمراء المعروفة بالـ Prodigiosin يعد من الصفات المميزة لجنس *Serratia* إلا إن إنتاجها متباين بدرجة كبيرة بين الأنواع وحتى بين السلالات ضمن النوع الواحد (13) .

ترجع قابلية هذه الجرثومة على إحداث المرض إلى امتلاكها لعوامل ضراوة مهمة التي تتمثل بإنتاجها لمتعدد السكريات ألدهني (LPS) Lipopolysaccharides ، عوامل الالتصاق المتمثلة بالأهداب (19) ، وكذلك إنتاج أل Heamolysine وبعض الأنزيمات إضافة إلى إنتاج نوع خاص من البروتينات التي تعرف بـ Pore forming cytotoxins (18) .

يشير مصطلح التضخيم الجيني Gene amplification إلى الزيادة في عدد المورثات استجابة لإشارات معينة (17) ، حيث استخدمت عملية التضخيم الجيني للبلازميدات في بعض أنواع الجراثيم والفطريات لزيادة عدد نسخ البلازميدات التي تحمل المورثات المسؤولة عن إنتاج المضادات الحيوية Antibiotics وبالتالي زيادة إنتاج هذه المضادات فضلا عن إنتاج مواد أخرى مثل الأنزيمات ، الأحماض الامينية ،الفيتامينات (10) .

استخدمت االعاثيات Phages بديلاً عن المضادات الحيوية في علاج الكثير من الاصابات المتسببة عن الجراثيم والتي فتحت الطريق لدراسة السيطرة على الخلايا الجرثومية على المستوى ألجزيئي حيث إن المعالجة بالعاثيات Phages therapy كانت قد تطورت في المدة المبكرة من القرن العشرين (20) . تميزت العاثيات المحللة Lytic phages بقصر دورة حياتها مما ساعد في استخدامها في العلاج حيث إن مثل هذه العاثيات تصيب الخلايا الجرثومية من الخارج بإدخال مادتها الوراثية إلى الجرثومة بدون إقحام معلوماتها الوراثية في داخل المحتوى الوراثي للخلايا الجرثومية المضيفة (21) .

المواد وطرائق العمل

يتضمن البحث عزل وتشخيص عزلات من جرثومة *S. marcescens* من حالات مرضية مختلفة في الانسان وكذلك توصيف جزئي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هذه العزلات .

جمع العينات

تم الحصول على (28) عزلة أولية من جرثومة الـ *Serratia* من نماذج مرضية مختلفة في الإنسان توزعت بين الإدرار، الجروح ، الحروق والدم ، حيث كان مصدر هذه العزلات من مختبرات الأحياء المجهرية لعدة مستشفيات في مدينة الموصل . استخدمت موائل الاكار المغذي في نقلها إلى مختبرات الأحياء المجهرية للبحوث ، قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل .

تشخيص العزلات الجرثومية

شخصت العزلات الجرثومية بالاعتماد على الصفات الزرعية والشكلية حيث استخدمت مجموعة من الاوساط الغذائية البسيطة والتفريقية المجهزة من شركات (Himedi، Difco ، Maknur، Oxoid) والتي تضمنت أوساط الاكار المغذي ، المرق المغذي ، أكار اليوريا ، واكار الـ DNA الأساس .

اعتمدت صبغة كرام للتحري عن الصفات الشكلية للمستعمرات بينما استخدمت طريقة التخطيط على وسط الاكار المغذي واكار الماكونكي والتحضين بدرجة 37م° و 30م° لغرض التعرف على الصفات الزرعية وتنقية المستعمرات المنتجة وغير المنتجة للصبغة الحمراء والحاملة لصفات مستعمرات الـ Serratia كذلك استخدمت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية للتحري عن الصفات الكيموحيوية الخاصة بجرثومة *S. marcescens* والمتمثلة بمجموعة اختبارات الـ (IMViC) التي أجريت حسب الطريقة المتبعة من قبل Atlas واخرون (6) وHarley وPrescott (16) واختبار إنتاج الأنزيم المحلل للـ DNA حسب طريقة Gilardi(14) كما اعتمدت طريقةSeeley (25)في إجراء اختبارنظامAPI20E

اختبار قابلية محتوىDNA البلازميدي لعزلات جرثومة الـ *Serratia* على تضخيم عدد نسخهُ

تم اختبار نمو العزلات الجرثومية على اوساط غذائية حاوية على المضادين Chloramphenicol(Cm) وTetracycline (Tc)بتراكيز نهائية (10،15) مايكروغرام / مل على التوالي وكلا على حدا . العزلات الجرثومية التي لها القابلية على النمو اختبر تحملها لتركيز عالي من المضادين Cm و Tc بتركيز عالي 100 و150 مايكروغرام / مل على التوالي وكلا على حدا . بعدها العزلات الجرثومية التي تحملت التركيز العالي من المضادين

اجريت عليها عملية التضخيم حسب طريقةClewell (12) واختيرت العزلات التي لم يحدث أي تغير في الكثافة الضوئية (O.D) لها بعد اضافة المضادين بتراكيزهما العالية كلا على حدا والتحضين لمدة 12 ساعة . نقي الـ DNA البلازميدي من العزلات المضخمة وغير المضخمة حسب طريقة Birnboim و Doly (9) بعدها قدر تركيزه طيفيا بالاعتماد على طريقة Brown (11) . اضف الى ذلك درس تأثير عملية التجويع باستخدام الوسط الغذائي الأدنى المحضر حسب طريقة Miller (23) والمضاف له المضاد Cm على عملية التضخيم.

السيطرة على حيوية عزلات جرثومة *S.marcescens* باستخدام العاثيات

استخدمت العاثيات وسيلة للسيطرة على حيوية العزلات الجرثومية وتضمنت هذه العملية ثلاث مراحل هي:-

1. عزل العاثيات

اتبعت طريقة Benson (7) في عزل العاثيات حيث أضيف 5 مل من مزرعة جرثومية للـ *S.marcescens* إلى 45 مل من مياه المجاري المأخوذة من مستشفيات (السلام العام ، الخنساء ، الشيخان ، ابن الاثير) وبعد مرور 24 ساعة من التحضين رسب المزيج (مياه المجاري + الجرثومة) عن طريق النبذ المركزي عند سرعة ترسيب 2500 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق ، كررت عملية الترسب ثلاث مرات بعدها مرر الراشح خلال أوراق ترشيح نوع Milli pore filter paper معقمة وبقطر ثقوب 0.22 مايكروميتر وبعدها وضع الراشح الذي يحتوي على العاثيات في أنبوبة اختبار معقمة وحفظ بدرجة 4 °م لحين الحاجة إلى استخدامها .

2. زيادة تركيز العاثيات المعزولة

استخدم وسط الاكار المغذي نصف الصلب (0.7 % أكار) لغرض زيادة تركيز العاثيات المعزولة وذلك حسب طريقة Harley وPrescott (16) .

3. طريقة الاصابة

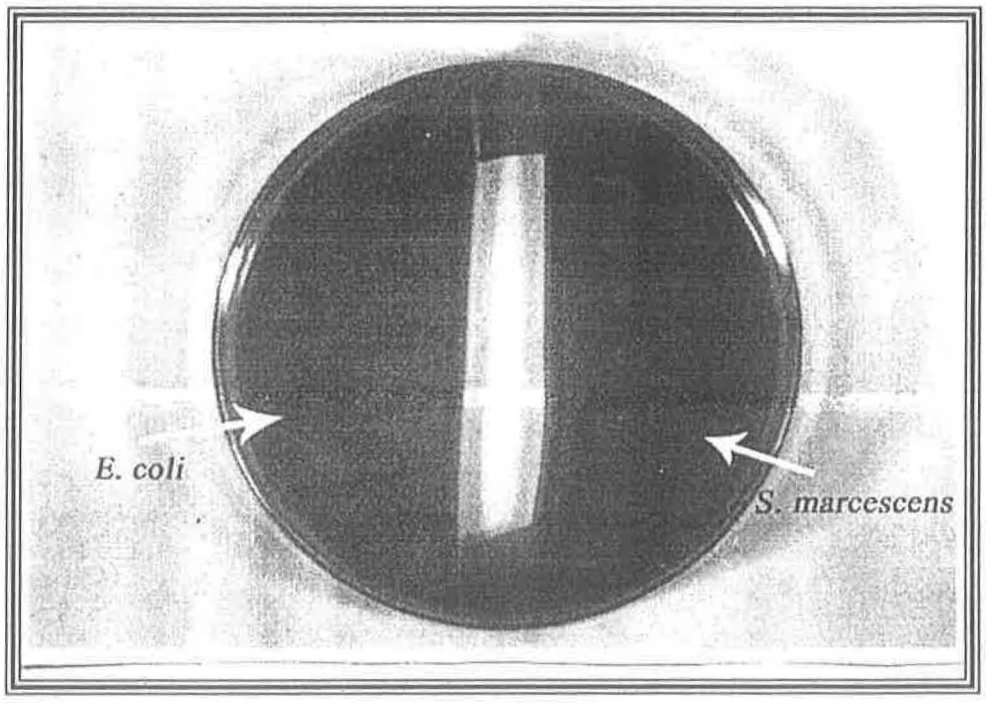
تم اصابة العزلات الجرثومية بالعاثيات بطريقة التنقيط على النمو الجرثومي وحسب الطريقة المتبعة من قبل Benson (7) حيث فرش (0.1) مل (3.5×10^9 خلية / مل) من المزارع الجرثومية النامية على أطباق الاكار المغذي باستخدام ناشر زجاجي معقم Sterile Spreader ، بعد التحضين لمدة 18-24 ساعة اصيبت العزلات عن طريق تنقيط الراشح الحاوي على العاثيات على النمو الجرثومي وذلك باستخدام ماصة باستور معقمة ، تركت القطرات لتجف لمدة 15-30 دقيقة . وتم التأكد من من اصابة العاثيات بعد مرور ثلاث

ساعات من التحضين وذلك من خلال ظهور مساحات خالية من النمو الجرثومي في منطقة الاصابة والتي تعرف بـ Plaques .

النتائج والمناقشة

1. جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها

اظهرت نتائج الاختبارات المعتمدة على الصفات الشكلية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية واختبار نظام API 20E ، ان (11) عزلة من مجموع (28) عزلة تعود للنوع *S.macescens* حيث ظهرت بعضها بشكل مستعمرات بيضاء وبعضها الاخر بشكل مستعمرات حمراء . اذ كان عدد المستعمرات المنتجة للصبغة الحمراء ست عزلات ، وأظهرت جميعها سالبيتها لاختبار الاندول والمثيل الاحمر وايجابيتها لاختبار الفوكس بروسكور واستهلاك السترات وعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز كذلك لم تنتج هذه العزلات أنزيم اليوريز ولم تظهر أي فعالية لأنزيم السايتوكروم اوكسيديز . اضف الى ذلك أنتج أنزيم الـ DNase من قبل جميع العزلات وكما هو مبين في الصورة (1)



الصورة (1)

إنتاج أنزيم الـ DNase في عزلات جرثومة *S.marcescens* ومقارنتها مع جرثومة *E.coli* غير المنتجة .

اختبار قابلية محتوى الـ DNA البلازميدي لعزلات جرثومة *S.marcescens* على تضخيم عدد نسخه

التضخيم باستخدام المضادين Chloramphenicol وTetracycline

بعد اختبار نمو العزلات الجرثومية على اوساط غذائية حاوية على المضادين Cm و Tcكلا على حدا وبتراكيز نهائية (15،10) مايكروغرام / مل على التوالي حيث لوحظ ان جميع العزلات قد نمت وبعد زيادة تركيز هذين المضادين وجد ان (7) عزلات استطاعت النمو بوجود مضاد الـ Cm بتركيز 100 مايكروغرام / مل والباقي لم تتحمل ، في حين لوحظ تباين العزلات الجرثومية في تحملها لمضاد Tc بتركيز 150 مايكروغرام / مل وكان التركيز الذي تحملته جميع العزلات واقعاً ضمن المدى (60-120) مايكروغرام / مل .وبعد تقدير تركيز الـDNA البلازميدي المنقى من العزلات الجرثومية المعاملة وغير المعاملة بتراكيز عالية من من المضادين Cm وTc كلا على حدة حيث اختيرت (7) عزلات على اساس تحملها لتراكيز عالية من المضادين وكذلك اختلاف في مصدر العزل ، ونتائج التضخيم موضحة في الجدول (1)

جدول (1) التضخيم باستخدام المضاد Chloramphenicol

رقم العزلة	مصدر العزل	تركيز الـ DNA البلازميدي (مايكروغرام / مل)	
		بوجود المضاد Cm بتركيز 10 مايكروغرام/ مل	بوجود المضاد Cm بتركيز 100 مايكروغرام/ مل
1	جروح	29	27.88
2	جروح	24.7	23.78
3	حروق	23.75	69.45
4	إدرار	28.85	51.5
7	إدرار	30.22	30.12
10	دم	50.65	69.8
11	دم	25.8	87.15

من الجدول اعلاه لوحظ قابلية محتوى الـ DNA البلازميدي على تضخيم محتواه بوجود مضاد الـ Cm في اربع عزلات هي (11,10,4,3) من مجموع (7) . حيث كانت الزيادة في تركيز الـ DNA واقعة ضمن المدى (1.5- 3.5) اضعاف تركيزه قبل المعاملة ،

كما أن العزلات التي مصدرها من الجروح لم يكن لبلازميداتها القابلية على تضخيم محتواها وكذلك لوحظ تباين العزلات التي من المصدر نفسه على اظهار هذه الصفة . أضف إلى ذلك أن عزلة واحدة فقط هي العزلة (3) كانت لبلازميداتها القدرة على زيادة عدد نسخها باستخدام مضاد الـ Tc من خلال زيادة تركيز DNA البلازميدي الى (58.6) مايكروغرام/ مل مقارنة بتركيزه قبل المعاملة والذي كان (44.32) مايكروغرام / مل بينما لم يلاحظ أي زيادة في تركيز الـ DNA البلازميدي لبقية العزلات .

زيادة عدد نسخ البلازميد من خلال زيادة تركيزه في بعض العزلات عند استخدام تراكيز عالية من مضاد الـ Cm ربما يعزى الى زيادة التكرارات الترادفية للمحددة (r) فضلا عن وجود نظام إعادة الاتحاد في هذه العزلات وهذا يتفق مع ما ذكره Mitsuhashiو آخرون (24) وإن عدم زيادة تركيز الـ DNA البلازميدي في العزلات (1،2،7) يعني عدم قدرة الـ DNA البلازميدي في هذه العزلات على زيادة عدد نسخه التي يمكن أن تكون ناتجة عن إن جزئيات DNA البلازميدي عانت من عملية تضخيم عكسي نتيجة لكبر حجم البلازميد حيث إن عدد نسخ البلازميد تقل مع كبر حجم البلازميد وهذا يتطابق مع مابينه Yagi و Clewell (27) .

إن السبب في عدم قدرة البلازميدات على تضخيم محتواها بوجود المضاد Tc ربما يعزى إلى إن مورثات المقاومة للمضاد Tc واقعة على عامل الانتقال RTF ومن المعروف إن الـ RTF يكون تضاعفه تحت سيطرة مشددة وبالتالي ليس له القابلية على تضخيم عدد نسخه مقارنة مع المحددة r التي تتضاعف تحت سيطرة مسترخية أو قد يكون ناتج عن نقصان في عدد نسخ البلازميد عند كبر حجمه وهذا يتفق مع ماذكره Yagiو Clewell (27) في بقاء كتلة الـ DNA البلازميدي ثابتاً نسبة إلى كتلة الـ DNA الكروموسومي بغض النظر عن عملية التضخيم لان عدد نسخ البلازميد تقل كلما أصبح حجمه اكبر.

ان ما تم التوصل اليه من نتائج يتطابق مع ماذكره Mattes وآخرون (22) في إن البلازميدات مانحة المقاومة لـ Tc في جرثومة *E.coli* عانت من تقليل في مستوى التضخيم الجيني للمورثات المحمولة عليها . وكذلك تطابقت مع ما وجده الاسدي (2) في عدم تحمل عزلات جرثومة *S. typhimurium* المعزولة من مصادر مختلفة لتراكيز عالية من مضاد الـ Tc وبالتالي عدم استخدامه عاملا مضخماً لمحتوى الـ DNA في هذه العزلات .

تبين النتائج التي تم التوصل إليها أيضاً إن عملية التضخيم لم تحصل في جميع العزلات قيد الدراسة والمعزولة من مصادر مختلفة وكذلك لم يحصل التضخيم ايضاً بين عزلات من المصدر نفسه وهذا يتطابق مع ما أشارت إليه نتائج كل من الدليمي (1) وحسن (3) والاسدي (2) في عدم قدرة بلازميدات جميع سلالات جرثومة *E.coli* ,

K.pneumoniae و *Salmonella typhimurium* على التوالي في تضخيم عدد نسخها . وهذا دلالة على وجود صفة مشتركة بين بلازميدات الجراثيم الواقعة ضمن العائلة المعوية .

التضخيم باستخدام المضاد Chloramphenicol في وسط غذائي أدنى

بعد تنقية الـ DNA البلازميدي وتقدير تركيزه من المزارع الجرثومية النامية في وسط غذائي ادنى المعاملة وغير المعاملة بتراكيز عالية من مضاد الـ Cm والجدول (2) يوضح نتائج هذه المعاملة

جدول (2) التضخيم باستخدام المضاد Chloramphenicol في وسط غذائي أدنى

رقم العزلة	مصدر العزل	تركيز الـ DNA البلازميدي (مايكروغرام / مل)	
		بوجود المضاد Cm بتركيز 10 مايكروغرام/ مل	بوجود المضاد Cm بتركيز 100 مايكروغرام/ مل
1	جروح	33.4	33.2
2	جروح	43.6	42.9
3	حروق	29.35	62.25
4	إدرار	25.5	52.75
7	إدرار	24.15	98.56
10	دم	85.05	96.85
11	دم	57.7	93.6

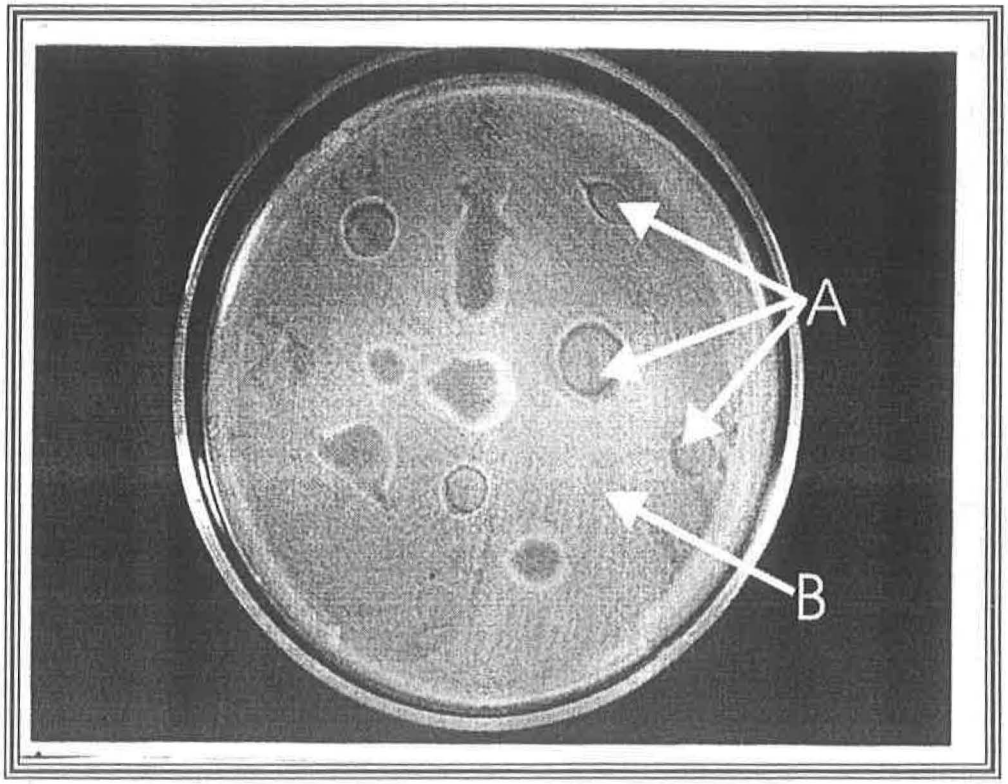
من الجدول (2) يتبين قدرة البلازميدات لـ (5) عزلات من مجموع (7) عزلات على تضخيم عدد نسخها بينما فشلت البلازميدات في العزلات التي مصدرها من الجروح على إظهار هذه الصفة . لوحظت عملية التضخم من خلال زيادة تركيز الـ DNA البلازميدي بعد المعاملة حيث كانت الزيادة في تركيزه واقعة ضمن المدى (1-4.5) اضعاف تركيزه قبل المعاملة . كما تبين إن لعملية التجويع باستخدام الوسط الغذائي الأدنى دوراً في زيادة تركيز البلازميد في العزلة (7) الى أربعة أضعاف ونصف تقريبا مقارنة مع تركيزه المقدر في المزرعة غير المعاملة مع العلم إن البلازميدات في هذه العزلة لم تكن قادرة على تضخيم عدد نسخها باستخدام المضاد Cm في وسط المرق المغذي .

إن زيادة تركيز البلازميد في معظم العزلات ربما يكون بسبب وضع العزلات تحت عاملين لتثبيط تصنيع البروتين المتبوع بتوقف تضاعف الكروموسوم وذلك باستخدام المضاد

Cm وتجويع الخلايا الجرثومية بتنميتها في وسط غذائي أدنى . من هذا نستنتج إن وضع العزلات الجرثومية قيد الدراسة تحت عاملين يكون أفضل في تحفيز عملية التضخيم .

3. السيطرة على حيوية عزلات جرثومة *S.marcescens*

بينت نتائج اصابة العاثيات للعزلات الجرثومية بعد مرور ثلاث ساعات من الاصابة الى ان المساحات او الهالات Plaques التي ظهرت في النمو الجرثومي لم تكن رائقة بل كانت تحتوي على عكورة وكما هو مبين في الصورة (2) A .



الصورة (2)

A:الهالات Plaques المتكونة نتيجة اصابة العاثيات لعزلات جرثومة *S.marcescens*

B: Blank plaque المتكونة نتيجة تنقيط قطرة من الماء المقطر المعقم

من الصورة (2) A نلاحظ عكورة في الـ Plaques المتكونة نتيجة إصابة العاثيات للعزلات الجرثومية قيد الدراسة مقارنة مع الـ Blank plaque في الصورة (2) B المتكونة نتيجة تنقيط قطرة من الماء المقطر على النمو الجرثومي باعتبارها نموذج سيطرة . هذه العكورة ربما هي عبارة عن نمو جرثومي وهذا يعني إن العاثيات التي أصابت العزلات الجرثومية ربما كانت من النوع التحللي Lysogenic ولم تكن من النوع المحلل Lytic أي أن العاثية لم تثبط النمو الجرثومي بل استخدمت دورة الاستيطان في حياتها وان DNA العاثية اقتحم كروموسوم الخلية الجرثومية وأصبح جزءاً منها .

من جهة أخرى أصيبت عزلات جرثومية لجراثيم أخرى منها جرثومة *K.pneumoniae*، *E.coli, P.aeruginosa* ، *S.aureus* بهذه العاثيات فلوحظ عدم ظهور أي مناطق رائقة ولا مناطق بها عكورة وهذا ربما يعود إلى كون العاثيات التي تم الحصول عليها هي متخصصة لإصابة جرثومة الـ *S.marcescens* .

إن ما تم التوصل إليه من نتائج يتفق مع ما ذكره كل من Kutter (20) و Lorch (21) حول إمكانية عزل العاثيات من مياه المجاري ، من جهة أخرى لم تتفق مع نتائج دراسة Hamilton و Brown (15) حيث بينا عزل (34) نوعا من العاثيات المحللة لـ *Serratia* من مياه المجاري .

إن عدم الحصول على عاثيات من النوع المحلل ربما يكون بسبب مصدر عزل هذه العاثيات حيث إن الحصول على عاثيات من هذا النوع من المحتمل أن يكون من مصادر أخرى قد تكون التربة ،مياه الينابيع ، البراز و النباتات التي تتميز بكثرة الجراثيم فيها حيث أشار Ashelford واخرون (5) إلى إمكانية عزل العاثيات من مصادر مختلفة التي تكثر فيها الجراثيم باعتبارها المضيف الرئيسي لها وهذه المصادر هي التربة ، مياه الينابيع ، البراز والنباتات وغيرها من المصادر .

من النتائج التي تم التوصل إليها يتبين بان العاثيات التي تم الحصول عليها كانت من النوع التحللي وهذا النوع لا يمكن استخدامه في السيطرة على حيوية عزلات جرثومة *S.marcescens* وكذلك لايمكن استخدامها في علاج الإصابات الجرثومية المتسببة عنها . وفقط المستخدمة في العلاج هي العاثيات المحللة لقصر دورة حياتها .

المصادر

1. الدليمي ،ألاء سعيد شيت. رسالة ماجستير، كلية التربية ، جامعة الموصل (2005) .
2. الاسدي ، زيد علي عزيز مصطفى. رسالة ماجستير،كلية التربية ، جامعة الموصل (2002) .
3. حسن ،أياد حازم . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (2000) .
4. Ania J .; Herchline,T. ; Talavera ,F. ; Brusch , J. L. ; Mylonakis ,B.A. and Cunha,B.A. *Serratia* .eMedicine World Medical Library, http : // www. emedicinehealth. Comp. (2005) .
5. Ashelford K.E.; Ery,J.C.; Bailey , M.j.; Jeffries , A.R. and Day, M.J.,J. Appl. Environ .Microbiol.,65(5):1959-1965 (1999).
6. Atlas R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C., "Laboratory Manual Experimental Microbiology" . Mosby-Year Book,Ink.,U.S.A. (1995).

7.Benson,H.J."Microbiological Applications".7th Ed.MaGrow-Hill Comp. U.S.A.(1998).
8.Bihari D.J.; Aujard , Y.; Vilmer , E. and Elin , J., J.Clin.Microbiol.,30:2088-2091 (1993) .
9.Birnboim, H.C. and Doly, J., Nucleic Acids Res.,7:1513-1524 (1979).
10.Black,J.G., "Microbiology : Principles and Exploration" . 4th Ed ., Simon and Schuster /a Viacom Comp., Prentice Hall,Inc.,U.S.A. (1999).
11.Brown , T.A., "Gene Cloning an Introduction" . 3rd Ed .,Chapman and Hall , London (1997).
12.Clewell , D.B., J.Bacteriol .,10 :667-676 (1972).
13.Geri, A.V.; Anandkumar, N.; Muthukumaran,G. and Pennathur,G., BMC Microbiol., 4 : 11-14 (2004) .
14.Gilardi, G.L.,"Glucose non fermenting gram- negative bacteria in clinical microbiology" . CRC Press, Inc., West Palm Beach .cited by (Lennette *et al.*,1985) (1978) .
15.Hamilton , R.L. and Brown , W.J.,J. Appl .Microbiol ., 24 (6) :899-906 (1972).
16.Harley, J.P. and Prescott, L.M., "Laboratory Exercises in Microbiology".3rd Ed ., McGraw-Hill Comp ., U.S.A.(1996) .
17.Hartle , D.L., "Basic Genetics" . 2nd Ed ., Jones and Bartlett Publishers, Inc., U.S.A.(1991) .
18.Hartle,R.,Science,6 (4):313- 325(2005) .
19.Hejazi , A. and Falkiner , F.R.,J. Med . Microbiol., 46(11): 903-912 (1997) .
20.Kutter,E.,http://www.evergreen.edu/user/t4/phagetherapy/phagethea.html .,(2000).
21.Lorch,A., Biotechnol. Develop.Mon.,3:14-17 (1999) .
22.Mattes ,R.; Burkhart,H.J.and Schmitt,R., Mol.Gen.Genet.,168:173-184 (1979) .
23.Miller,J.H."Experiment in Molecular Genetics".Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A. (1972) .
24.Mitsuhashi, S. "Microbial Drug Resistance" . Vol.2, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1979) .
25.Seeley,H.W.;VanDemark ,P.J. and Lee,J.J ."Selected Exercises From Microbes in Action : A laboratory Manual of Microbiology" .4th Ed., W.H. Freeman and Comp., New York , U.S.A. (1997)
26.VanOgotrop , J.L.; Grobben,S. ; Salmons , E.M.A. and VanBoven , C.P.A., J.hosp. Infect.,36:95-103 (1997).
27.Yagi , Y. and Clewell , D.B., J.Bacteriol.,143(2):1070- 1072 (1980).