مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (4) / المجلد (17) : 2009

دراسة النسق البلازميدي ومواقع جينات مضادات البيتالاكتام وانتاج السموم في بكتريا *Bacillus cereus*

ذكرى عبد العالي الكعبي **حسن فاضل ناجي** **سامرة يونس يوسف**

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ،جامعة بابل قسم علوم الحياة، كلية العلوم ،جامع دهوك

الخلاصة

تم عزل وتشخيص عشر عزلات لبكتريا *Bacillus cereus* من عينات بعض منتجات الالبان المحلية. كانت جميع هذه العزلات مقاومة لمضادات البيتالاكتام (البنسلين - ج ،الامبيسلين،الامبيكلوكس ،الاموكسيسلين والسيفوتاكسيم). بينت نتائج الاختبارات السُمية بأن كافة عزلات *B. cereus* كانت موجبة لاختبار احمرار جلد الارانب وسته منها سببت تقرح جلد الارانب وثلاث عزلات قتلت الفئران البيض . اشارت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز للدنا الكلي على ان جميع العزلات قد احتوت على حزمتين بلازميديتين صغيرتين ، فيما بينت نتائج التحول قابلية بلازميدات هذه العزلات على التعبير في بكتريا *Escherichia coli* MM294 . تظهر هذه الدراسة بأن جينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام و بعض الجينات التركيبية أو التنظيمية المسؤولة عن إنتاج السموم هي ذات اساس بلازميدي وهذا ما أكدته نتائج تجارب التحييد .

Abstract

Ten isolates of *Bacillus cereus* were isolated and characterized from some local dairy products. These isolates were resistant to β-Lactam antibiotics(penicillin- G, ampicillin, ampiclox, amoxycillin and cefotaxime) . The results of toxicity experiments of *B.cereus* isolates were revealed that all isolates were positive to skin redness reactions of rabbits, 6 isolates were positive to skin ulcer of rabbits and 3 isolates were caused to kill the white mice. The agarose gel electrophoresis of whole DNA showed that all isolates have two small plasmid bands. These were checked by transformation experiments after showing expression in *Escherichia coli* MM294. This study showed that the genes responsible for resistant of β–Lactam antibiotics and some of structural or regulatory genes which control the production of toxins were located on the plasmids, these were confirmed by data obtained from curing experiments.

المقدمة Introduction

يحدث التسمم الغذائي نتيجة تناول الأغذية الملوثة بالأحياء المجهرية أو سمومها، وعلى الرغم من كون بكتريا *B. cereus* عامل ممرض انتهازي إلاّ أن ارتباطها الأساس يكون مع حالات التسمم الغذائي البكتيري (Lund *et al.*, 2000) . فهي تسبب نوعين من التسمم الغذائي ، هما متلازمة الإسهال(Diarrheal syndrome) والذي يحدث بسبب انتاجها للسموم المعوية، ومتلازمة القيء (Emetic syndrome)والذي يحدث بسبب نمو البكتريا في الغذاء (Granum, 2003) .

تنتج بكتريا *B. cereus* انزيمات البيتالاكتاميز والتي تسبب التحلل المائي لحلقة البيتالاكتام في مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات,اذ انها تشفر من قبل جينات قد تكون محمولة على بلازميدات او ترانسبوزونات اوكروموسوم البكتريا(Medeiros, 1997). تنتقل الجينات بين البكتريا ومنها المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية بطرق وراثية متعددة, فقد قام Belliveau and Trevors (1989) بتحويل سلالة من *B. cereus* بواسطة البلازميد pC194 الحامل لصفة المقاومة للكلورامفينكول المعزول من *B. subtilus* و بتكرار تحول بلغ 2×10^{-5} . وقد تحيد البلازميدات من الخلية البكتيرية من غير التأثير على حيويتها بفعل بعض العوامل الكيمياوية او الفيزياوية (Trevors,1986). لذا هدفت هذه الدراسة الى توضيح النسق البلازميدي في بكتريا *B. cereus* وعلاقته بالمقاومة لمضادات البيتالاكتام وانتاج السموم.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1. عزلات البكتريا Bacterial isolates

تم عزل بكتريا *B. cereus* من عينات القشطة والزبد والمحلبي بعد ان جمعت من الاسواق المحلية في مدينة الحلة. استخدام وسطي الاكار المغذي Nutrient agar (Hi media) واساس اكار الدم Blood agar base(Mast) في العزل الأولي ووسط أكار المانتول -مُح البيض- بوليمكسين(Oxoid)Mannitol- egg yolk-polymyxin في العزل النهائي. شخصت العزلات اعتمادا على الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية MacFaddin ;1967 ., *et al* (Mossel *et al*.,2000) . كما تم الحصول على السلالتين القياسيتين *E. coli* MM294 و*E. coli* HB101 من قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم ،جامعة بغداد.

2. الحيوانات المختبرية Laboratory animals

اشتريت ارانب بالغة(*Oryctolagus cuniculus*) بعمر 4 اشهر من الاسواق المحلية وتم الحصول على الفئران البيض السويسرية (Balb/c) بعمر 3 اسابيع من بيت الحيوانات، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة بابل.

3. اختبار الحساسية الدوائية Antibiotic susceptibility test

حددت الحساسية الدوائية للعزلات تجاه مضادات البيتالاكتام (بنسلين -ج ،الأمبسلين ،الامبيكلوكس، الاموكسيسلين والسيفوتاكسيم) والمجهزة بشكل اقراص من شركة Oxoid بتراكيز 10 وحدة دولية ، 10 ،30، 25 و 30 مايكروغرام /قرص على التوالي بالاعتماد على ماذكر في NCCLS (2005).

4. إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز Production of β-Lactamase

استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة (Rapid Iodometric Method) في الكشف عن قدرة العزلات على إنتاج إنزيم β - Lactamase (Collee *et al*., 1996).

5. إنتاج السموم Production of toxins

اتبعت طريقة Kramer وجماعته(1982) في انتاج السموم من عزلات بكتريا *B. cereus*.

6. الاختبارات السمية Toxicity tests

استخدمت الارانب المحلية البالغة من العمر4 أشهر وبوزن 1.250 كغم في فحص الانتشار المناعي الشعاعي المفرد في الجلد. كما استخدمت الفئران البيض السويسرية بعمر 3 اسابيع وبوزن 20 غم في الكشف عن الذيفانات المميتة (Kramer *et al*.,1982).

7. استخلاص الدنا الكلي Extraction of whole DNA

اعتمدت طريقة التمليح الخارجي (Salting out) كما ذكرت من قبل Pospiech and Neuman (1995) في استخلاص الدنا الكلي.

8. الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis

تم الكشف عن النسق البلازميدي لعزلات البكتريا بعد اجراء الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (Maniatis *et al*., 1982) .

9. التحول البكتيري Bacterial transformation

استخدم الدنا البلازميدي المستخلص من العزلات المراد اختبارها لتحويل سلالة البكتريا *E. coli* MM294 كما هو متبع في Maniatis وجماعته (1982).

10. تحييد البلازميدات Plasmids curing

استخدمت كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل(Sodium dodecyle sulphate) في تحييد بلازميدات العزلات (Trevors, 1986).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

عزلت عشر عزلات بكتيرية من منتجات الالبان , تضمنت 8 عزلات من 32 عينة للقشطة وعزلة واحدة من كل من 18 عينة للزبد و8 عينات للمحلبي. اكدت نتائج الصفات المظهرية والاختبارات الكيميوحيوية عائدية هذه العزلات الى بكتريا *B. cereus* . سميت العزلات مبتدأة بالعزلة *B. cereus* Bc1 ومنتهية بالعزلة *B. cereus* Bc10 (جدول1). فقد اشار Wong وجماعته (1988) الى خطورة تلوث منتجات الالبان ببكتريا *B. cereus* . أبدت جميع العزلات مقاومة تجاه مضادات البيتالاكتام(البنسلين - ج ،لامبيسلين ،الامبيكلوكس،الاموكسيسلين والسيفوتاكسيم)، ولدى اختبار قابلية هذه العزلات على انتاج انزيم البيتالاكتاميز بطريقة اليود القياسية السريعة وجد انها موجبة لهذا الاختبار ,اذ يمثل هذا الاختبار مسحا اوليا لكل انواع انزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من قبل هذه البكتريا (Bush *et al.*,1995). تتميز بكتريا *B. cereus* بمقاومتها العالية لمضادات البيتالاكتام, اذ انها تنتج ثلاث انواع مختلفة من انزيمات البيتالاكتاميز هما I، II وIII وتعد هذه الانزيمات احدى المنتجات الطبيعية الاساسية في هذه البكتريا (Kotirana *et al.*,2000;Navarro *et al.*, 2004) . اظهرت عزلات بكتريا *B. cereus* كما مبين في الجدول1 نتيجة موجبة بعد مرور4 ساعات من الحقن مؤدية الى احمرار جلد الارانب حول منطقة الحقن، وسببت ستةعزلات (*B. cereus* Bc3,4,6,8,9&10) تقرح جلد الارانب بعد 24 ساعة من الحقن . فقد ذكر Glatz وجماعته(1974) بان بعض التفاعلات المناعية التي تحدث في جلد الارانب هي نتيجة لفعالية حال الدمO (Cereolysin O) والسم المعوي البروتيني(Proteinaceous necrotic enterotoxin) المنتجين من قبل بكتريا *B. cereus* . كما ان كافة العزلات لم تسبب وذمة(Edema) عند منطقة حقن جلد الارانب اذ يدل هذا على عدم قدرة العزلات على انتاج سموم الجمرة (Anthrax toxins) وهذا ما اشار اليه Kumar وجماعته (2002). لقد سببت العزلات *B.cereus* Bc 8,9&10 قتل الفئران المحقونة بمستخلصات سمومها خلال 24 ساعة من الحقن ولم تسبب العزلات الاخرى اذى يذكر للفئران المحقونة بمستخلصات السموم (جدول1) فقد ذكر Wong وجماعته(1988) بأن بعض عزلات بكتريا *B. cereus* تمتلك القدرة على قتل الفئران المختبرة .

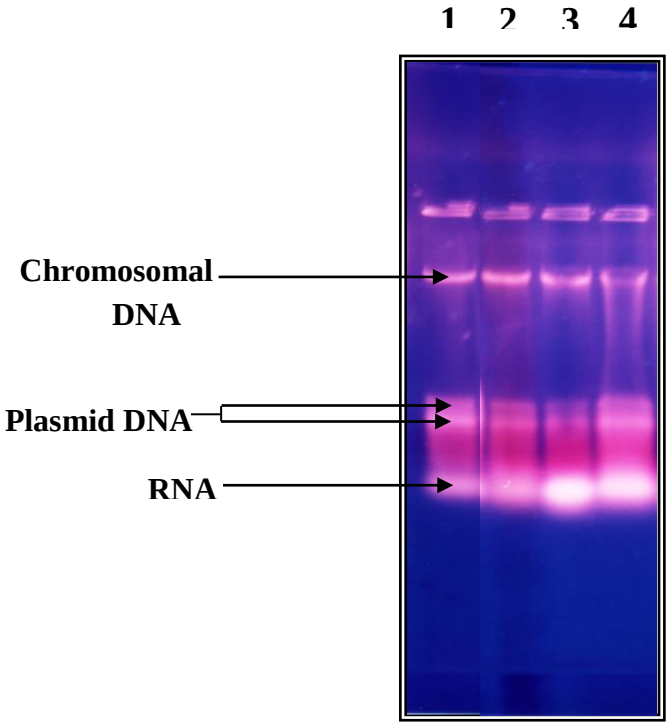
جدول1 . مصادر العزلات وفعالية انزيم البيتالاكتاميز والاختبارات السمية لعزلات بكتريا *B. cereus*

ت	اسم العزلة	المصدر	التغيراللوني لانزيم البيتالاكتاميز(ثانية)	احمرار الجلد	تقرح الجلد	وذمة الجلد	موت الفأر
1	Bc1	زبد	60	+	–	–	–
2	Bc2	محلبي	5	+	–	–	–
3	Bc3	قشطة	60	+	+	–	–
4	Bc4	=	4	+	+	–	–
5	Bc5	=	6	+	–	–	–
6	Bc6	=	90	+	+	–	–
7	Bc7	=	30	+	–	–	–
8	Bc8	=	5	+	+	–	+
9	Bc9	=	90	+	+	–	+
10	Bc10	=	4	+	+ وبشدة	–	+

الرموز : + موجبة الاختبار ، – سالبة الاختبار .

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لمستخلصات دنا عزلات بكتريا *B. cereus* في هلام الاكاروز(شكل 1. A وB) احتواء هذه العزلات على حزمتين بلازميديتين صغيرتين ذات أوزان جزيئية متقاربة مع

بعضها البعض ومقاربة بالحجم للبلازميد pBR322 الذي استخدم بوصفه دليلاً حجمياً . وهذا يتفق مع ما أشار إليهBernhard وجماعته (1978) من أن عزلات بكتريا *B. cereus* قد تحتوي على بلازميد واحد أو اكثر ذات أوزان جزيئية تتراوح بين 1.8-105x 10^6 دالتون ، وتأوي جينات مسؤولة عن المقاومة لعدد من المضادات الحيوية ، ففي دراسة أجريت من قبل Debuono وجماعته (1988) ظهر تماثلاً في النسق البلازميدي لاحد عشر عزلة من بكتريا *B. cereus* ، وان هذه العزلات كانت تمتلك اربعة بلازميدات ذات أوزان جزيئية تتراوح بين 5.1 – 34 ميكادالتون.



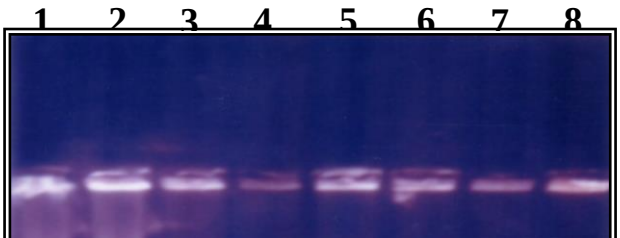
شكل 1. A. الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز(0.8%) بفرق جهد 65 فولت والذي يُظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *B. cereus* .

المسار 1 : البلازميد pBR322

المسار 2 : العزلة Bc2

المسار 3 : العزلة Bc3

المسار 4 : العزلة Bc4



DNA

شكل 1. B. الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (0.8%) بفرق جهد 65 فولت والذي يُظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لبكتريا *B. cereus* .

المسار 1 : البلازميد pBR322 المسار 5 : العزلة Bc7

المسار 2 : العزلة Bc1 المسار 6 : العزلة Bc8

المسار 3: العزلة Bc5 المسار 7 : العزلة Bc9

المسار 4: العزلة Bc6 المسار 8: العزلة Bc10

ولتحديد دور بلازميدات عزلات بكتريا *B. cereus* في المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، أجريت محاولات لتحويل سلالة البكتريا *E. coli* MM294 (Rif^r) بالدنا البلازميدي المستخلص من العزلتين Bc1 وBc6 ، استخدمت هذه السلالة لكونها تتميز بعدم احتوائها على نظامي التقييد(r^-) والتبادل الوراثي(rec^-) وبالتالي فإن البلازميد في حالة انتقاله إلى هذه السلالة فانه لا يتعرض للتقطيع بفعل إنزيمات التقييد ولا يحصل له تبادل وراثي مع كروموسوم هذه السلالة ، كما حولت السلالة نفسها بالبلازميد pBR322 ($Amp^r.Tc^r$) المستخلص من السلالة *E. coli* HB101 الحامل لصفة المقاومة للتتراسايكلين والامبسلين بوصفة سيطرة موجبة وذلك للتأكد من نجاح طريقة التحول المستخدمة. كان تردد التحول للسلالة *E. coli* MM294 المتحولة بمستخلص الدنا البلازميدي للعزلتين Bc1 و Bc6 هو 3.4×10^{-6} و 8.1×10^{-4} على التوالي . تعتمد كفاءة التحول على تهيئة وتحضير الخلايا الكفوءة ، إذ إن معاملة الخلايا بمادة كلوريد الكالسيوم المبرد ، ثم تعريضها لصدمة حرارية سوف يسهّل من دخول الدنا البلازميدي إلى الخلايا الكفوءة (Cohen *et al*., 1972) . بعد استخلاص دنا المتحولات وترحيله كهربائياً في هلام الاكاروز كان النسق البلازميدي لهذه المتحولات مشابهاً للنسق البلازميدي للعزلتين Bc1 و Bc6 ، (شكل 2) . إن نجاح البلازميدات الصغيرة الحجم المستخلصة من العزلتين Bc1 وBc6 في قدرتها على التعبير المظهري في السلالة *E. coli* MM294 يدل على أن هذه البلازميدات ذات مدى عائلي واسع ، إذ تشير الدراسات إلى إمكانية تعبير البلازميدات المستخلصة من بكتريا

(Sloma and Gross, 1983; Rondon *et al*., 1999) *B. subtilus* و *E. coli* في بكتريا *B. cereus*

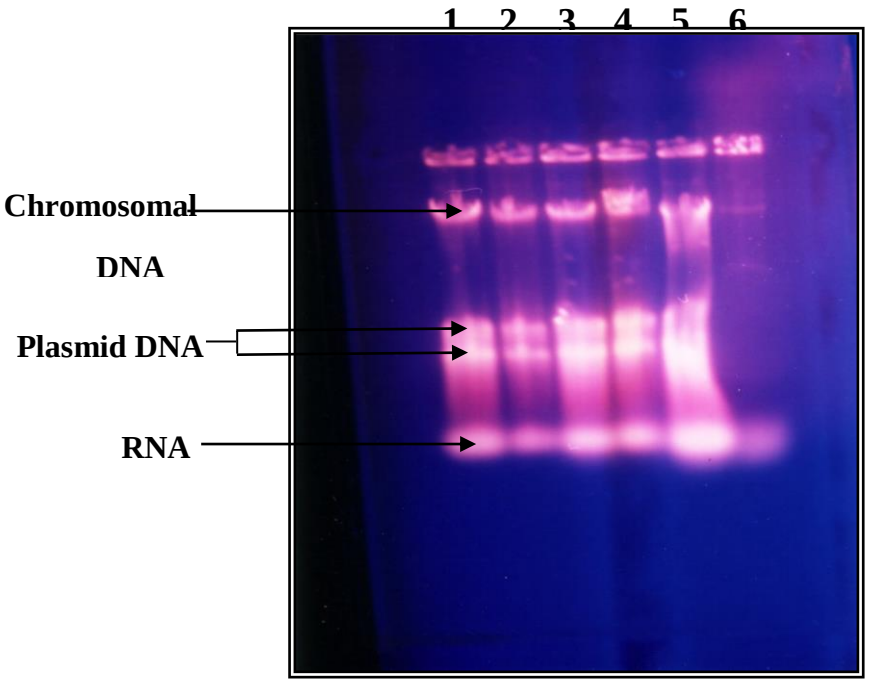
.

بعد ذلك تم تحديد التركيز القاتل للعزلتين Bc1 وBc6 بعد معاملتها بتراكيز مختلفة من SDS والمبينة في الجدول 2 والذي انعدم فيه النمو كلياً ، اذ بلغ40 مايكروغرام / مليليتر في حين كان التركيز المثبط الأدنى هو 35 مايكروغرام / مليليتر .

جدول 2 . تأثير تراكيز المادة المحيدة (SDS) على نمو العزلتين Bc1 و Bc6 *B. cereus*

العزلة	التركيز (مايكروغرام / مليليتر)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
Bc1	++++	++++	+++	++	++	++	+	–
Bc6	++++	++++	+++	++	++	++	+	–

الرمــوز : ++++ نمــو كثيــف جــداً ، +++ نمــو كثيــف ، ++ نمــو متوســط ،+ نمــو ضــعيف، – انعدام النمو .



شكل 2 . الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز(0.8%) بفرق جهد 65 فولت والذي يُظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي للعزلات المستخدمة في التحول.

المسار 1 : البلازميد pBR322

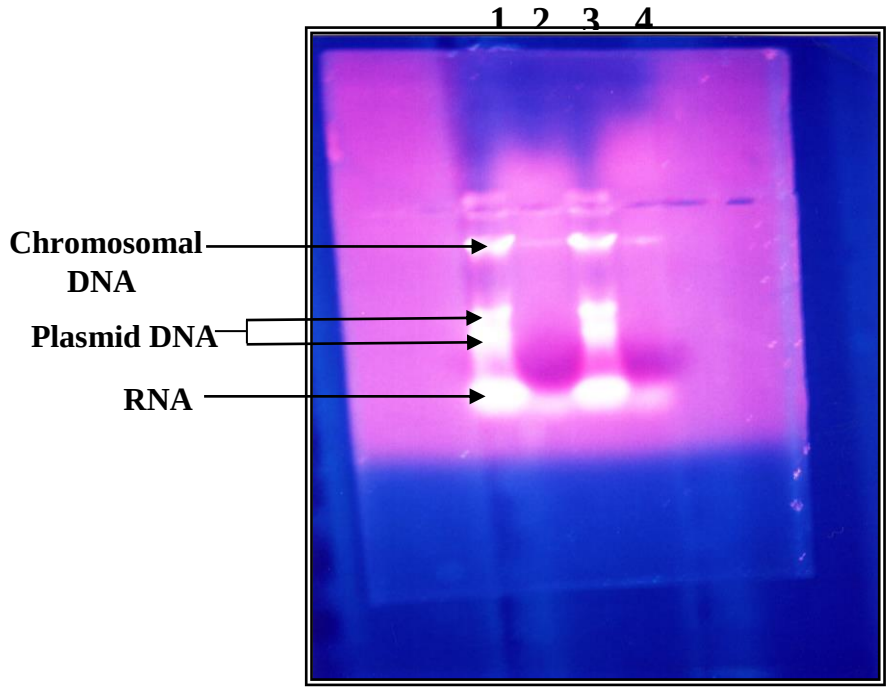
المسار 2: العزلة Bc1

المسار 3: السلالة *E. coli* MM294 المتحولة بالعزلة Bc1

المسار 4 : العزلة Bc6

المسار 5 : السلالة *E. coli* MM294 المتحولة بالعزلة Bc6

المسار 6 : السلالة *E. coli* MM294



شكل 3 . الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (0.8%) بفرق جهد 65 فولت والذي يُظهرمواقع الدنا البلازميدي والكروموسومي لعزلات *B. cereus* المعاملة وغير والمعاملة بالـ SDS .

المسار 1 : العزلة Bc1 غير المُحيّدة

المسار 2 : العزلة CBc1 المُحيّدة

المسار 3 : العزلة Bc6 غير المُحيّدة

المسار 4 : العزلة CBc6 المُحيّدة

وبعد إجراء اختبار الحساسية لمضادات البنسلين - ج ،الامبيسلين ، الامبيكلوكس ،الاموكسيسلين والسيفوتاكسيم على المستعمرات المُحيَّدة المنتخبة CBc1 و CBc6 ومقارنتها مع العزلتين الاصليتين Bc1 و Bc6 لوحظ أنها حساسة لهذه المضادات أي ان جينات المقاومة لهذه المضادات قد فقدت عند معاملتها بمادة SDS بالتراكيز 20 و 25 مايكروغرام / ملليلتر للعزلتين Bc1 و Bc6 على التوالي .

بعد استخلاص الدنا البلازميدي لكِلا العزلتين والكشف عن حُزم الدنا لوحظ اختفاء الحُزم البلازميدية في العزلات المُحيّدة الآنفة الذكر (شكل 3) وفقدان هذه الحزم يشير إلى ارتباط الجينات الوراثية للمضادات الحيوية البنسلين - ج ,الامبيسلين , الامبيكلوكس ,الاموكسيسلين والسيفوتاكسيم بالحُزم البلازميدية المفقودة ، أي بمعنى آخر أنها محمولة على البلازميد ، وهذا يتفق مع ما أشارت إليه بعض الدراسات (Kado, 1998; Helgason *et al.*, 2000). تم إجراء فحص إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز لغرض التأكد والكشف عن إمكانية العزلات المُحيّدة CBc1 و CBc6 على إنتاج هذا الإنزيم وقد لوحظ أن هذه العزلات قد فقدت قابليتها على الإنتاج ، وهذا يؤكد أن الجينات المُشفّرة لإنتاج البيتالاكتاميز هي بلازميدية الموقع . كما تم الكشف عن قابلية العزلات المُحيّدة CBc1 و CBc6 على إنتاج السموم ، وقد لوحظ أنها فقدت هذه الصفة أيضاً ، مما يدل على إن البلازميدات قد تحمل أحد الجينات المسؤولة عن إنتاج السموم أما من الناحية التركيبية أو التنظيمية.

References

Belliveau, B.H. and Trevors, J.T. (1989).Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. Appl. Environ. Microbiol.**55 (6)**: 1649 – 1652.

Bernhard,K.; Schrempf, H. and Goebel,W.(1978).Bacteriocinand antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *B. subtilis*, J.Bacteriol. **133 (2)**: 897 – 903.

Bush, K.; Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta -Lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. **39 (6)**: 1211 – 1233.

Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y. and Hsu, L. (1972). Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. **69 (8)**: 2110 – 2114.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology "14th ed.". The Churchill Livingstone. Inc. New York, U.S.A.

Debuono, B.A.; Brondrum, J.; Kramer, J.M.; Gilbert, R.J. and Opal, S.M. (1988). Plasmid, serotypic and enterotoxin analysis of *Bacillus cereus* in an outbreak setting. Clin. Microbiol. **26 (8)**: 1571 – 1574.

Glatz, B.A.; Spira, W.M. and Goepfert, J.M. (1974). Alternation of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species. Infect. Immun. **10 (2)**: 299 – 303.

Granum, P.E. (2003). Food poisoning. The Norwegian school of veterinary science, Oslo, Norway.

Helgason, E.; Caugant, D.A.; Olsen, I. and Kolstø A-B. (2000). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodonitis and other human infections. Clin.Microbiol. **38 (4)**: 1615 – 1622.

Kado,C.I.(1998).Origin and evolution of plasmids.Antonie Leeuwenhoek.**73**:117-126.

Kotiranta, A.; Lounatmaa, K. and Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microb. Infect. **2**: 189 – 198.

Kramer, J.M.; Turnbull, P.C.B.; Munshi, G. and Gilbert, R.J. (1982). Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with food poisoning. In: Isolation and identification methods for food poisoning organisms. Corry. J.E.L.; Robert, D. and Skinner, F.A. (eds.), Academic Press. LTD., London, PP. 261 – 286.

Kumar, P.; Ahuja, N. and Bhatnagar, R. (2002). Anthrax Edema toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. Infect. Immun. **70 (9)**: 4997 – 5007.

Lund, T.; De Buyser, M.L. and Granum, P.E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol.**38**: 254– 261.

MacFaddin, J.E. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. "3rd ed.". Lippn Cott. Williams and Wilkins. Philadelephia. U.S.A.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; and Sambrook, J. (1982). Molecular cloninig:A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, U.S.A.

Medeiros, A.A. (1997). Evolution and dissemination of beta -Lactamases accelerated by generations of beta -Lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis. **24**: 19 – 45.

Mossel, D.A.A.; Koopman, M.J. and Jongerius, E. (1967). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Appl. Microbiol. **15**: 650 – 653.

Navarro, P.G.; Osso, B.Q.; Ortiz, R.G.; De las Parras, P.J.M.; Puentedura, M.I.M. and Gonzalez,C.C.(2004).Inhibition of β-Lactamase II of *Bacillus cereus* by

penamaldic derivatives of penicillins. Antimicrob. Agents Chemother.**48(3)**: 1058 – 1060.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2005). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th .ed. informational supplement (M100-S15) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wanye, Pa.USA.

Pospiech, J. and Neuman ,T. (1995). Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. "ed. Kieser, T." Norwich, U.K.

Rondon, M.R.; Raffel, S.J.; Goodman, R.M.and Handelsman, J.(1999).Toward functional genomics in bacteria: Analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 6451 – 6455.

Sloma, A. and Gross, M. (1983). Molecular cloning and neucleotide sequences of the type Iβ-Lactamase gene from *Bacillus cereus*. Nucl. Acids.Res.**11**:4997-5004.

Trevors, J.T. (1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **32**:149 - 157.

Wong, H.C.; Chang, M.-H. and Fan, J.-Y. (1988). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 699 – 702.