مجلة تكريت للعلوم الصرفة ، 2018 (5) 23

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

مجلة تكريت للعلوم الصرفة

Journal Homepage: http://main.tu-jo.com/ojs/index.php/TJPS/index

استخدام مؤشرات RAPD للكشف عن التنوع الوراثي لعزلات للاشريكيا القولونية من بيئة مدينة كركوك

وعد محمود روؤف[1] ، عقيل حسين العاصي[2]، شيماء منشد مرشد[2]

[1] كلية الصيدلة، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

تأريخ الاستلال: 30 / 4 / 2018

تأريخ القبول: 14 / 1 / 2018

الكلمات المفتاحية: العزلات البيئية, جرثومة *E.coli*، تقنية RAPD

المراسلة مع:

الاسم: شيماء منشد مرشد

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

جمعت 130 عينة بيئية من التربة والماء (71) عينة ماء و(59) عينة تربة، شُخِّصت العزلات النامية بعد زرعها على الأوساط الزرعية الخاصة وملاحظة الصفات المظهرية والمجهرية. أظهرت نتائج بأن 51 عزلة تعود إلى *E.coli* بنسبة 45.9%, وبواقع 33 عزلة من الماء بنسبة 52.4% و18 عزلة من التربة بنسبة 37.5% . دُرِست حساسية العزلات البيئية لـ 9 مضادات حيوية من المضادات المختلفة وقد تفاوتت العزلات من حيث المقاومة للمضادات الحيوية، بينما كانت أعلى نسبة مقاومة للعزلات البيئية لمضاد cephalexin 80.4%, بينما لم تظهر العزلات البيئية أي مقاومة لمضاد Amikacin ومقاومة بنسبة 5.5% لمضاد Chloramphenicol. وقد انتخبت 24عزلة بيئية من عزلات *E.coli* اعتمادا على مقاومتها العالية للمضادات الحيوية ولمعرفة التنوع الوراثي لهذه العزلات ودراسة المؤشرات الوراثية بتقنية PCR وهي : مؤشرات التضاعف العشوائي لسلسلة الـ DNA Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). وقد استثمرت هذه المؤشرات في كشف التباينات الوراثية بين الانواع اذ تم عزل مادة الدنا من الخلايا البكتيرية ثم نفذت تفاعلات PCR عليها في مؤشرات ال RABD مع ثلاث بوادئ عشوائية ومن ثم ترحيلها على هلام الأكاروز وقد أظهرت هذه البادئات حزما "متماثلة المواقع Monomorphic bands, وحزما متباينة المواقع polymorphic bands ثم أدخلت البيانات التي تم الحصول عليها إلى الحاسوب ووفق البرنامج الإحصائي NTSYS-PC version 2.02 الخاص بهذا النوع من الدراسات.

المقدمة

تتواجد الاشريكيا القالونية في التربة والبيئة المائية وهي التلوث البرازي (1) ونظرا لما تمتاز به تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction من الخصوصية والسرعة العالية فقد استخدمت للتحري عن الجراثيم (2) ، ويعد التنوع الوراثي أحد الجوانب الأساسية للتنوع الحيوي (Biodiversity) التي تعني التنوع الموجود بين الأحياء المختلفة كالكائنات الدقيقة في مجتمعاتها الطبيعية وأن المحافظة على مستوى عالٍ من التنوع الحيوي ضرورية جداً للحفاظ على النظام البيئي.

ان *E.coli* من الجراثيم واسعة الانتشار في الطبيعة فهي توجد في التربة والمياه السطحية اذ انها تطرح مع غائط الانسان والحيوان بشكل ثابت فهي تتواجد في التربة الملوثة ببراز الانسان والحيوان وهي من مجموعة القولونيات Coliforms التي تستخدم كاحد الدلائل الجرثومية Indicator bacterium لتحديد صلاحية المياه من الناحية الصحية ويعد وجودها احد المؤشرات لتواجد احياء مجهرية اخرى من الجراثيم والفايروسات والابتدائيات (3). وقد استثمرت صفة ايشريكيا القولون في تواجدها الدائم والمميز في الامعاء (اي في البراز) , وقابليتها عل الاستمرار في هذا الوجود خارج الامعاء من خلال مقاومتها الظروف البيئية المختلفة التي قد تواجهها لفترة معينة , وبشكل خاص عند وصولها الى مصادر مياه الشرب او الغذاء كالحليب او غيره, بعد حدوث تلوث لها بالبراز في استخدام هذه الصفة

في الكشف عن هذا التلوث في هذه البيئات بدلالة وجود هذه الجراثيم , وقد لوحظ ان انواع الجراثيم القولونية تنتشر بكثرة في بيئة المستشفيات وبما انها انواع معوية فان ذلك يدعو بان كل من الغذاء والماء وامعاء المرضى الراقدين في المستشفيات تعد المصدر الاهم للتلوث بها (4) حيث تتسبب سلالات *E.coli* العديد من الاصابات المعوية وهي من اكثر المسببات شيوعا للامراض الناجمة من المياه والاغذية الملوثة في البلدان النامية, فهي تسبب سنويا 650 مليون اصابة بحالات الاسهال خاصة للاطفال دون الخامسة من العمر , كما انها تعد من المسببات الرئيسية للعديد من الاصابات الاخرى اهمها اصابات الجهاز البول (U.T.I)(5). توجد العديد من المؤشرات الوراثية المعتمدة على تقانة ال PCR تشترك بمواصفات عامة ولكل منها محاسن ومساوئ, اما اهم الاسس التي يتم بموجبها اختيار المؤشر دون الاخر هي ان يكون المؤشر سهل التطبيق, وغير مكلف, وعند الاعادة يعطي قابلية تكرار صحيحة ومن بين هذه المؤشرات مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال ال (RAPD).

الهدف من الدراسة:

عزل وتشخيص بكتريا الايشريكا القولونية من عينات بيئة مختلفة تتمثل ب(التربة والماء)، والتحري عن مقاومتها لبعض المضادات الحياتية ثم اجراء دراسة جزيئية بتقنية (RAPD-PCR) لتحديد التنوع الوراثي لها.

المواد وطرائق العمل

اولاً: جمع العينات:

جمعت 130 عينة بيئية من التربة بواقع 59عينة من بيئة (تربة المزارع والحدائق والترب الملوثة ببراز الانسان والحيوان) واما عينات الماء فقد تضمنت 71عينة (بحيرة , بركة, ساقية, شط) وذلك من مناطق مختلفة من داخل مدينة كركوك . وقد استخدمت انابيب مظببة – معقمة (Sterial plane tubes) وشملت المناطق البيئية من مدينة كركوك فضلاً عن نهر الخاصة جاي الذي يمر من مركز مدينة كركوك , اذ حدد مايقارب 22 موقعاً لجمع عينات المياه والتربة وبواقع من 5 الى 6 عينات للموقع الواحد وبعد عملية الجمع نقلت العينات الى المختبر مباشرة بواسطة حاوية مبردة . وشملت مناطق جمع العينات من الاحياء التالية (غرناطة – تسعين – المصلى – القورية – العسكري – القادسية – دوميز – واحد اذار – الصيادة – الواسطي – رحيم اوه – الشورجة – الماس – عرفة – النصر – العروبة– المعلمين– الخضراء)

ثانياً: تشخيص العزلات البكتيرية :

Identification of Bacterial Isolates

1 _التشخيص البكتريولوجي الاولي:–

شخصت المستعمرات النامية على سطح الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاولي مبدئياً بالاعتماد على الصفات الزرعية من حيث الشكل, الحجم, اللون, القوام, وتحلل الدم على وسط اكار الدم وتخميرها لسكر اللاكتوز على وسط اكاد الماكونكي , وظاهرة العج (Swarming) كما درست صفات الخلايا البكتيرية عن طريق الفحص المجهري وذلك بعد تصبيغها بصيغة كرام (Gram stain) ثم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لملاحظة حجم وشكل الخلايا البكتيرية وطريقة تجمعها وتفاعلها مع صبغة كرام (6) وقد استخدمت عدد من الاوساط الزرعية والكواشف والمحاليل وشخصت اعتماداً على الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بتشخيص الاشريكيا وحسب ما ورد في المصدرين (7) (8) .

2: اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على العزلات قيد الدراسة بطريقة الاقراص وبحسب طريقة(Kirby-bauer method) المعدلة والموصوفة من قبل منظمة الصحة العالمية (9) تم اختيار(9) انواع من المضادات الحيوية كما موضح في الجدول رقم (1).

جدول رقم (1) :اقراص المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار حساسية الـ *E.coli* للمضادات الحيوية.

ت	المضادات الحيوية	الرمز	تركيز القرص بالمايكروكرام µg/disc	قطر منطقة التثبيط القياسية بلملم			الشركة المصنعة
				حساسة >	متوسطة الحساسية	مقاومة <	
1	Ampicllin	Am	10	14	13-12	11	Bioanalyse (turkey)
2	Cephalexin	cI	30	18	17-15	14	
3	Amikacin	Ak	30	22	21-20	21	
4	Gentamicin	Gn	10	23	22-20	19	
5	Tobramycin	Top	10	23	20-22	19	
6	Ciprofloxacin	Cip	5	21	20-16	15	
7	Nitrofurant	F	300	17	15-14	13	
8	Chlorampheicol	C	30	17	16-14	13	
9	Trimethoprim	Tmp	5	16	15-11	10	

ثالثاً : تفاعلات الـRAPD

اخذت عينات DNA ـ24 عزلة (***E.coli***) بيئية لاجراء اختبار (RAPD) عليها , وتم اجراء تفاعلات الـ(RAPD) بالاستناد على . (10)

البادئات المستخدمة في الدراسة (Primer selection)

اذ تم تحضير محاليلها الخزينة حسب تعليمات شركة (Alpha DNA) المجهزة لها وكما موضح في الجدول رقم (2) باستعمال الماء المقطر اللايوني للحصول على تركيز 100بيكولول/مايكروليتر, وذلك باخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل باديء وبإضافته الى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللاأيوني, ومزج جيداً وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

جدول رقم (2) يوضح البوادئ , وتسلسلها والشركة المنتجة (Alpha DNA) وبتركيز 10 picomol

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئ
1	OPI-06	AAGGCGGCAG
2	OPE-16	GGTGACTGTG
3	OPD-3	GTCGCCGTCA

1- **Accupower PCR master Mix**

استخدمت الطريقة المرفقة مع العدة (Accupower PCR.Master Mix) وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Bioner) واجري التفاعل بحجم 20 مايكروليتراً .

2- طريقة العمل

تم ضبط تركيز الدنا في كافة العينات المدروسة للحصول على التركيز المطلوب لاجراء تفاعلات ال(RAPD) ويكون تقريباً من(25-50ng) نانو غرام / مايكروليتر لكل عينة، تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي (Master Reaction) وذلك بإضافة 3 مايكروليتر من الدنا و2مايكروليتر من كل بادئ الى الانبوبة الحاوية على خليط التفاعل (Master Mix) اضافة الماء المقطر لاكمال الحجم النهائي للتفاعل ليصبح 20 مايكروليتر. ادخلت انابيب التفاعل الى جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) لاجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج التالي دورة واحدة بدرجة 94 م° لفترة 5 دقائق ثم 45 دورة تتألف من مسخ بدرجة 94 م° لدقيقة واحدة ثم ارتباط البادئ بدرجة 36 م° ولدقيقة واحدة ثم الاستطالة عند درجة 72 م° واخيرا عشرة دقائق للاستطالة النهائية وبنفس الدرجة ولدورة واحدة.

بعد انتهاء وقت التفاعل ترحيل حجم 5 مايكروليتر من الناتج على هلام الاكاروز بتركيز 1,5 ثم يصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم لمدة و بالتالي تصوير الهلام باستخدام جهاز E.graph.(10)

التحليل الاحصائي :-

تم حساب معامل البعد الوراثي وكذلك معامل التشابه ما بين الأصناف المدروسة باستخدام معامل Nei's 72 .(11)، ثم أجري التحليل العنقودي (Cluster analysis) وتم رسم مخطط البعد الوراثي ما بين المدخلات باستخدام طريقة: (12) The unweighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA). أجريت كل التحاليل الإحصائية بواسطة الحاسوب باستخدام برنامج: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System 2.02, NTSYS-pc. (13)

النتائج والمناقشة

اولاً: العزل:

عزلت جرثومة *E.coli* من التربة (ترب الحدائق – الأماكن العامة – المستشفيات – الأرصفة) بواقع 18 عزلة وبنسبة 35.3% بينما عزلت من الماء بواقع 33عزلة بنسبة 64.7% . وتتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه الباحثة (6) والتي اشارت الى ان نسبة عزل جرثومة *E.coli* من التربة كانت اقل من نسبة عزلها من الماء فقد عزلتها من التربة بنسبة (13.9%) ومن الماء بنسبة 54.5% . ان نسبة القليلة المعزولة من التربة تدل على ان هذه البكتريا غير محبة للبرودة لأنه تم عزلها في فصل الشتاء ولهذا ظهرت هذه النسبة القليلة. أما فيما يخص عينات الماء فقد جمعت من مياه الأنهار والبرك والسواقي واتفقت نسبة العزل التي حصلنا عليها في هذه الدراسة مع عدد من الدراسات الأخرى التي أكدت سيادة جرثومة *E.coli* المعزولة من البيئة المائية مقارنة بالأنواع البكتيرية الأخرى. كما أظهرت دراسة (14) التي أجرتها على مياه رافد الزاب الاسفل ونهر الخاصة الجاي ومياه أبار مدينة كركوك فقد كانت جراثيم *E.coli* تمثل أكثر الأنواع المعزولة خلال مدة الدراسة مما يؤكد وجود تلوث برازي حديث للمياه من مصادر بشرية وحيوانية.

ثانياً: التشخيص Identification

1- **التشخيص والفحوصات الكيموحيوية**

تم تشخيص عزلات *E.coli* البيئية اعتمادا" على الصفات الزرعية والفحص ألمجهري والفحوصات الكيموحيوية اذ تم تنميتها على اوساط تشخيصية مختلفة تتمثل بوسط اكار ماكونكي وعلى وسط اكار الدم و وسط اكار الايوسين ازرق الميثلين وتبين ان جميع العزلات تعود لبكتيريا *E.coli* (15).

2- اختبار حساسية عزلات بكتيريا *Escherichia coli* المعزولة بيئيا" للمضادات الحيوية

درست حساسية عزلات بكتريا *E.coli* والبالغ عددها24 عزلة اتجاه 9 مضادات حيوية لمعرفة مدى حساسية او مقاومة هذه العزلات اتجاه هذه المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام والمتداولة في المؤسسات الصحية في معالجة أنواع مختلفة من الاخماج التي يتعرض لها الإنسان وقد تم تحديد مدى حساسية العزلات للمضادات الحيوية اعتمادا" على قطر منطقة التثبيط المحيطة بأقراص هذه المضادات ومن ثم مقارنتها مع الجداول القياسية الواردة في (16) وقد تباينت العزلات البيئية لجرثومة *E.coli* في حساسيتها للمضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة الحالية,كما موضح بالجدول رقم (3) :

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

جدول رقم (3) اختبار حساسية عزلات E.coli المعزولة بيئيا"

ت	المضاد الحيوي	R العدد (%)	I العدد (%)	S العدد (%)	المجموع الكلي
1	Ampicillin	14 (27.5)	1 (1.9)	36 (70.6)	51 (100)
2	Cephalexin	41 (80.4)	8 (15.7)	2 (3.9)	51 (100)
3	Amikacin	0 (0)	0 (0)	51 (100)	51 (100)
4	Gentamicin	8 (15.7)	2 (3.9)	41 (80.4)	51 (100)
5	Tobramycin	3 (5.9)	2 (3.9)	46(90.2)	51 (100)
6	Ciprofloxacin	5 (11.8)	3 (5.9)	42 (82.3)	51 (100)
7	Nitrofurantoin	2 (3.9)	0 (0)	49 (96.1)	51 (100)
8	Chloramphenicol	0 (0)	0 (0)	51 (100)	51 (100)
9	Trimethoprim	32 (62.7)	0 (0)	19 (37.3)	51 (100)

R – Resistance S – Sensitive I – Intermediate

ان الاختلاف في نسب مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية قد يعود الى عدة أسباب من أهمها نوع العزلات واختلاف مصدر العزل من الأسباب التي أدت الى اختلاف نسبة المقاومة عن باقي الأبحاث بالإضافة الى حجم العينة المدروسة . ان الأساس الوراثي لمقاومة المضادات الحيوية يكون ناتجاً عن وجود جينات مسؤولة عن هذه المقاومة والمحمولة على الكروموسوم او على البلازميد والتي تشفر لأنزيمات مسؤولة عن تحطيم المضادات الحيوية وتحويلها الى الشكل غير الفعال (17) . كما قد تظهر البكتريا المقاومة للعديد من المضادات الحيوية كنتيجة لانتقال عامل المقاومة R-factor الذي قد يكون المسئول عن زيادة المقاومة اذ تعد مقاومة العزلات البكتيرية الأكثر من مضاد حيوي واحد من المشاكل الخطيرة والكبيرة من الناحية الطبية وذلك لصعوبة اختيار العلاج المناسب للمريض ومن الأسباب الرئيسة لظهور المقاومة المتعددة هو الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية دون الاعتماد على إجراء فحص الحساسية لها مما يزيد من فرص تكيف البكتريا ومقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج (18) وبشكل عام فإن 90% من المضادات الحيوية المعروفة غير قادرة على تثبيط الكثير من أجناس الجراثيم السالبة لملون كرام ومنها ***E.coli*** ويعود هذا الى طبيعة جدارها الخلوي وامتلاكها للعديد من آليات المقاومة مثل أنظمة الدفق الفعال Efflux pump وإنتاج أنزيمات التي تسهم في مقاومة العديد من أنواع المضادات الحيوية (19).

كشف التباين الوراثي:

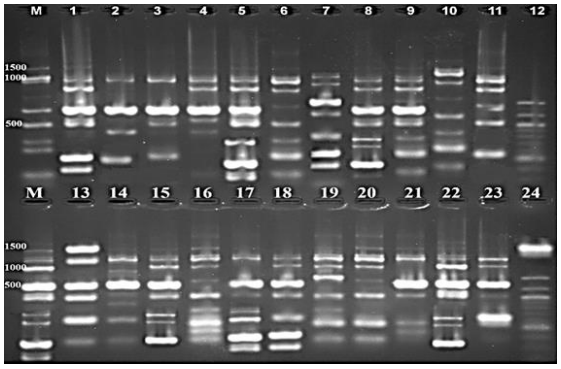
تفاعلات الـRAPD:

لدراسة التباين الوراثي بين العزلات البيئية ضمن العزلات المقاومة للمضادات الحيوية والبالغ عددها24 عزلة, تم استخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال (RAPD).

ومن خلال تحليل نتائج الـRAPD واعتماداً على ظهور او عدم ظهور حزم التضاعف وكذلك الاختلاف في الاحجام الجزيئية لتلك الحزم والتي تختلف باختلاف عدد المواقع المكملة لتتابعات الباديء على شريط الدنا المجيني وكذلك تختلف باختلاف المسافة بين موقع واخر (20).

1_البادئ OPI – 06 :

اظهرت نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPI – 06 للعزلات البيئة فقد اظهر هذا البادئ (14) موقعا للحزم تراوحت احجامها الجزيئية ما بين (200-1500)bp , وتوزعت اعداد الحزم بين التراكيب الوراثية ما بين (4-9) حزمة وقد كانت جميع الحزم متباينة ولم يظهر هذا البادئ حزمة عامة للعينات المدروسة, حيث بلغ عدد الحزم المتباينة (145) حزمة. كما موضح في الصورة رقم (1).

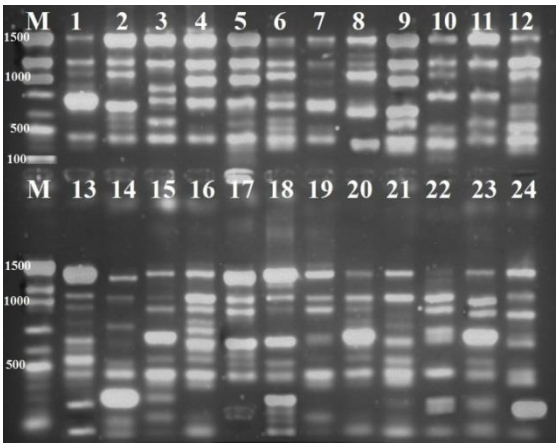


صورة رقم (1) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال البادىء OPI-06

2:البادئ OPE-16:

يتبين من خلال نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPE-16 للعينات البيئة فقد اظهرت النتائج لهذا البادئ (13) موقعا للحزم, تراوحت الاحجام الجزيئية لها ما بين (250-1500)bp , حيث توزعت اعداد الحزم للعزلات ما بين (4-9) حزمة, وقد اظهر هذا البادئ حزمة عامة لجميع العينات بحجم جزيئي (540)bp ان ظهور حزمة عامة لجميع العينات المدروسة تدل على تشابه المادة الوراثية في تلك المنطقة من ال DNA الجيني لكافة العزلات والتي تشترك بموقع ذو حجم جزيئي محدد وهي تدل على وجود تشابه وراثي بين العزلات. وما يمكن ملاحظته ايضا ظهور حزم لكافة العينات ما عدا العينة رقم (15) المتمثلة بالعزلة (82) المأخوذة من مياه نهر الخاصه جاي (عند الجسر الرابع) والتي لم تعطي حزمة وذلك لعدم وجود موقع لارتباط البادئ على الدنا المجيني لهذه العزلة وذلك عند الموقع (1250)bp . كذلك هو الحال بالنسبة للموقع (1500)bp , والذي اظهر وجود الحزم في كل العزلات ما عدا العينة رقم (22) المتمثلة بالعزلة (113) المعزولة من تربة منطقة حي تسعين. وقد تباينت باقي المواقع في الحزم المنتجة. وقد بلغ عدد الحزم المتباينة 131 حزمة.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

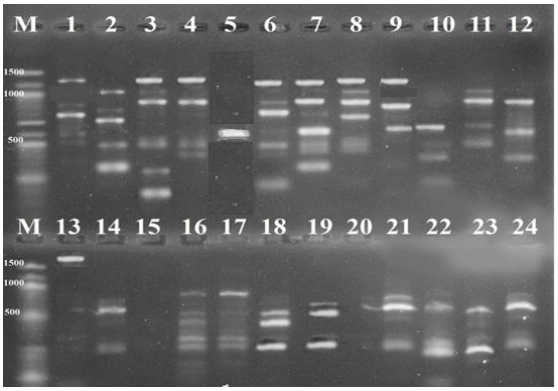


صورة (2) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال البادىء OPE-16

3_البادئ OPD-03 :

اظهرت نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPD-03 للعينات البيئة فقد اظهر هذا البادئ (14) موقعا تراوحت احجامها الجزيئية ما بين (1300-200)bp , وتوزعت اعداد الحزم بين العزلات ما بين (1-5) حزمة, وكانت جميع الحزم متباينة وكان عددها 74 حزمة وقد تميز هذا البادئ بانتاجه لحزمة فريدة للعينة رقم (1) المتمثلة بالعزلة (4) المعزولة من تربة حي الواسطي عند الموقع (1250)bp وتعد هذه الحزمة صفة تمييزيه لهذه العزلة عن باقي العزلات الاخرى عند ذلك الحجم الجزيئي, وما يمكن ملاحظته هو عدم اظهار هذا البادئ للحزم في العينة (15) المتمثلة بالعزلة (82) المعزولة من مياه نهر الخاصة جاي (عند الجسر الكبير) والعينة (20) المتمثلة بالعزلة (102) المعزولة من مياه منطقة رحيماوه, كذلك ما يمكن ملاحظته هو اظهار هذا البادئ لحزمة واحدة لكل من العينة رقم (13) المتمثلة بالعزلة (78) المعزولة من تربة حي الشورجة في كركوك.

وذلك عند الموقع (2000)bp وكذلك العينة رقم (5) المتمثلة بالعزلة 37 المعزولة من مياه حي الواسطي وذلك عند الموقع (500)bp, اما باقي العينات فقد تباينت من حيث اعداد الحزم واحجامها الجزيئية كما موضح في الصورة (3).



صورة (3) ناتج تفاعل PCR للكشف عن التنوع الوراثي باستعمال البادىء OPD-03

اظهرت البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة تباينا وراثيا واضحا بين العزلات المدروسة حيث نلاحظ ظهور حزمة رئيسة عامة وحزم مميزة فريدة وحزم ظهرت في عينات وغابت في عينات اخرى وكانت هذه الحزم بكل انواعها مختلفة في احجامها الجزيئية فكل هذه النتائج تدل على كم التباين الوراثي بين العينات المدروسة اذ ان حجم القطعة المتضاعفة من الاسس المعتمدة في مؤشرات RAPD والذي يستند الى بعد بين مواقع ارتباط البادئ على شريط سلسلة ال DNA القالب اذ ان البادئ يرتبط بمواقع مكملة له وبناء شريط جديد يمتد الى ان يستوقفه موقع ارتباطي اخر او نهاية شريط ال DNA القالب بالاضافة الى عامل الوقت المحدد لارتباط البادئ (annealing time) فالمنطقة المحصورة بين موقعي الارتباط هي التي ستشمل حجم القطعة المتضاعفة كون البادئ سيكرر ارتباطه بهذه المواقع في كل دوره ليضيف قطعة دنا جديدة تعمل قالبا في الدورة اللاحقة (21) وبما ان تلك المواقع منتشرة على المجين بشكل عشوائي وتتأثر بالتغيرات الوراثية الناتجة عن الطفرات التلقائية او المستحثة التي تحدث فأن ذلك ينعكس على البعد بين موقع واخر من العوامل المهمة الاخرى التي تساهم في بناء حجم هذه القطع هو نشاط انزيم البلمرة والذي تتراوح درجة فعاليته في البناء بين (70-80) م وله نشاط خاص في البناء يتراوح ب (35-100) نيوكليوتيده في الثانية لكل جزئية انزيم اذ يضيف القواعد عند نهاية.

واوضحت النتائج التي حصلنا عليها التباين في الاحجام الجزيئية للحزم الناتجة اذ يمثل حجم الحزمة البعد بين موقع واخر لارتباط البادئ كما ذكر اعلاه اي كلما زادت المسافة بينهما كبر حجم القطعة المتضاعفة كما يتمثل عدد تلك الحزم بعدد تلك المواقع ويعود السبب في تباين اعداد حزم التضاعف باستخدام كل بادئ الى نتائج تفاعلات ال RPAD باستخدام بادئات عشوائية تتناسب مع حجم المجين للكائن المدروس وكذلك اعداد النيوكليوتيدات للبادئ المستخدم (22) ويرجع السبب في وجود اختلافات في اعداد الحزم المتضاعفة بين عزلات بكتريا *E.Coli* الى وجود اختلاف في اعداد المواقع التي يتعرف عليها البادئ وكذلك فأن اختلاف المسافة بين موقع واخر يؤدي الى الحصول على قطع الاحجام الجزيئية.

فعندما يجد البادئ مناطق مشابهة له وفي شريط الدنا يتضاعف الناتج وعند تحليل الناتج تظهر حزم مختلفة (23) , كما اكد (24) ان الحزم المتضاعفة التي تظهر هلام الاكاروز والتي تختلف باحجامها الجزيئية تعتمد على نوع البادئ المستخدم, اذ انها تؤثر على حجم الحزم المتضاعفة. ان اختلاف عدد الحزم الناتجة باختلاف العينات يبدو منطقيا بسبب التغيير في تسلسل الدنا للعزلات اذ ان التفاوت في اعداد الحزم الناتجة يعود الى اختلاف ترتيب القواعد النتروجينية في الانماط الوراثية للعينات المدروسة وهذه النتيجة تنسجم مع دراسات عديدة في هذا المجال منها (22) (25).

لقد اظهرت نتائج تحليل البعد الوراثي ان ناتج عملية تحليل RAPD-PCR تعتمد على نوع البادئ المستعمل وبوجود بادئات مختلفة تنتج انماط مختلفة من الحزم ايضا, ان الاختلاف في هذه الحزم واعدادها واحجامها الجزيئية هو الذي يحدد حجم التباين الوراثي بين العزلات ان

هذا التنوع الوراثي هو احد فروع التنوع الحيوي والذي يمكن الافراد من التكيف مع التغييرات البيئية وهو ناتج عن مجموعة من الاختلافات الوراثية بين الافراد على مستوى DNA والخصائص البايوكيميائية والفسلجية والخصائص الشكلية .

البعد الوراثي للعينات البيئية :

تراوحت قيمة البعد الوراثي للعينات البيئية مابين (0.290-0.985) كما موضح في الشكل (1) . حيث كانت اقل قيمة للبعد الوراثي (0.290) بين العينة رقم (16) المتمثلة بالعزلة رقم 90 المعزولة من تربة منطقة رحيماوة والعينة 20 المتمثلة بالعزلة 102 المعزولة من نفس المنطقة .ان تواجد هاتين العزلتين في نفس المنطقة الجغرافية يفسر التقارب الوراثي بين العزلتين وهذا يدل على أنهما يمتلكان اكبر نسبة تشابه في المادة الوراثية وذلك بحسب نتائج البادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

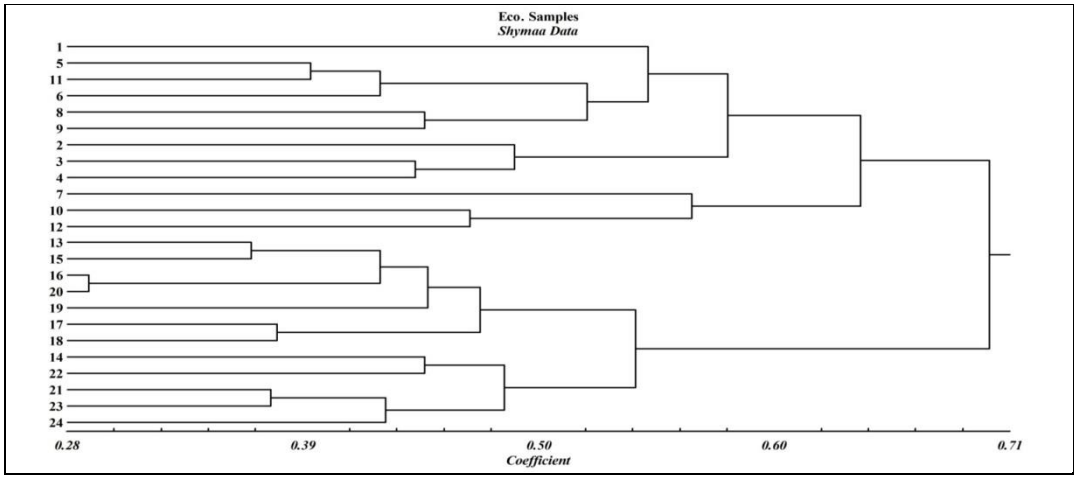
كما تتميز هاتين العزلتين بالإشتراك في المقاومة لثلاث مضادات حيوية .

اما أبعد عزلتين وراثياً فقد كانت العينة رقم (3) المتمثلة بالعزلة (22) المعزلة من تربة حي المصلى والعينة (19) المتمثلة 99 المعزولة من تربة حي دوميز حيث كانت قيمة البعد الوراثي (0.985) بين العزلتين فقد يعود البعد الوراثي الي إختلاف مكان العزل اي كل عينة من منطقة جغرافية تختلف بطبيعتها عن المنطقة الاخرى من حيث الظروف البيئية للتربة كالرطوبة ودرجة الحرارة بالإضافة للإختلاف في المواقع التي يتعرف عليها البادئ ضمن الجين او عدد المواقع التي قد تتغير نتيجة لحدوث تغيرات على مستوى كالطفرات.

اما العزلات الباقية التي تقع بين هذين البعدين فقد تفقدت الي عدة مجاميع وكما في الشكل (2) :

0.000																								
0.654	0.000																							
0.635	0.522	0.000																						
0.493	0.446	0.439	0.000																					
0.532	0.632	0.570	0.540	0.000																				
0.535	0.626	0.576	0.612	0.433	0.000																			
0.820	0.694	0.544	0.598	0.485	0.779	0.000																		
0.617	0.536	0.559	0.452	0.481	0.526	0.604	0.000																	
0.549	0.766	0.661	0.714	0.561	0.458	0.982	0.443	0.000																
0.790	0.723	0.556	0.592	0.561	0.634	0.536	0.572	0.875	0.000															
0.493	0.611	0.397	0.430	0.391	0.413	0.613	0.461	0.616	0.581	0.000														
0.682	0.665	0.490	0.613	0.581	0.692	0.594	0.502	0.529	0.464	0.573	0.000													
0.596	0.478	0.533	0.682	0.699	0.766	0.769	0.617	0.663	0.746	0.663	0.608	0.000												
0.623	0.569	0.699	0.759	0.836	0.756	0.536	0.720	0.693	0.652	0.616	0.711	0.480	0.000											
0.682	0.702	0.845	0.738	0.623	0.779	0.843	0.660	0.672	0.905	0.631	0.651	0.364	0.554	0.000										
0.661	0.579	0.701	0.594	0.756	0.784	0.775	0.719	0.687	0.764	0.728	0.640	0.382	0.549	0.435	0.000									
0.796	0.584	0.788	0.567	0.694	0.763	0.713	0.657	0.785	0.830	0.820	0.578	0.435	0.785	0.567	0.369	0.000								
0.624	0.519	0.575	0.662	0.705	0.634	0.679	0.528	0.581	0.719	0.566	0.608	0.414	0.404	0.467	0.413	0.376	0.000							
0.770	0.539	**0.985**	0.739	0.880	0.829	0.854	0.654	0.760	0.971	0.837	0.772	0.414	0.509	0.487	0.419	0.635	0.452	0.000						
0.724	0.456	0.719	0.612	0.665	0.868	0.884	0.741	0.756	0.896	0.601	0.732	0.405	0.634	0.469	**0.290**	0.507	0.425	0.458	0.000					
0.805	0.468	0.667	0.522	0.975	0.969	0.832	0.729	0.794	0.843	0.697	0.720	0.553	0.438	0.560	0.485	0.487	0.486	0.553	0.492	0.000				
0.582	0.637	0.624	0.740	0.804	0.741	0.827	0.640	0.643	0.720	0.758	0.631	0.548	0.443	0.517	0.524	0.622	0.472	0.577	0.664	0.575	0.000			
0.703	0.468	0.738	0.592	0.602	0.634	0.710	0.643	0.736	0.613	0.514	0.672	0.448	0.437	0.416	0.517	0.625	0.404	0.403	0.365	0.373	0.443	0.000		
0.683	0.703	0.645	0.651	0.709	0.821	0.830	0.702	0.634	0.801	0.636	0.732	0.501	0.458	0.735	0.569	0.683	0.570	0.606	0.580	0.425	0.526	0.426	0.000	

شكل رقم (1) قيم الابعاد الوراثية للعزلات البيئية



شكل رقم (2) المخطط الشجري للعلاقة الوراثية للعزلات البيئية

المصادر

(1) Mahon, C. R .; Lehman, D. C. and Manuselis , G. (**2007**), Text book of diagnostic microbiology.; 3th, ed . sounders , Wlsevier.

(2) Bussalleu, E.; Pinart, M.; yeste, M.; Brize, S.; Sancho, E.; Torner, S. Bone.**(2012**). A PCR technique to detect enterotoxogenic and verotoxogenic *Escherichia coli* in boar semen samples (8): 31- 33.

(3) Environment Agency (**2002**). The microbiology of drinking water part 1 – water quality and public health : methods for the examination of waters and associated materials : 48 Pp .

(4) Ensayef, S.Al-shalchi, sabbar M. (**2009**). Microbial contamination in the operating theaters: a study in a hospital in Baghdad .J. East . medin heal 15(1):219-230.

(5) Turner, S .M. A . Scott – Tucker , L . M . Cooper and I. R. Henderson. (**2006**),Weapons of mass destruction: Virulence factors of the global killer

enterotoxigenic *E . coli* .FEMS Microbiologyv letters 263(1) : 10-20 .

(6) الراشدي, سفانة احمد محمد.(**2014**) .التحري عن بعض جينات الضراوة في عزلات سريرية وبيئية لبكتريا ايشريكيا كولاي المعزولة محليا. رسالة ماجستير كلية العلوم جامعة تكريت.

(7) Collee ,J.G.; Fraser ,A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A . (**1996**) . Macki and mcccartny's partical Medical Microbiology 14th ed. Churchill livingston . U.S.A. Pp:166-170,838-839.

(8) Kayser, F.H, Bienz, K.E, Eckert, J.Zinker agel, R.M.(**2005**) Medical Microbiology. newyork: thieme.

(9) Vandeppitt , J.; Engbaek, K.; Piot, P. and Heuch , C.C.(**1991**).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.world health organization Geneva.

(10) Williams, J.G; Kubelic, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (**1990**). DNA polymorphisms amplified by aribitary primers are useful as genetic markers nucleic acids Res. 18: 6531-6535 .

(11) Nei, M. and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction Endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science, USA. 74, 5269-5273. (Cited by Henry, R.J. (1997).)

(12) Rohlf, F.J. (1993) Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02 Exeter software. Setauket. N. Y.

(13) Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R (1973) Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman co. San Francisco. California

(14) الشواني، طاووس محمد كامل احمد .(**2009**). الدلائل الجرثومية للتلوث الإحيائي وعلاقتها ببعض العوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة عليها لبعض الأنظمة البيئية المائية في محافظة كركوك ، أطروحة دكتوراه ، كلية التربية ، جامعة تكريت.

(15) Brooks, C.F, Carrol , K.C, Butel, J.S and Mores, S.A (**2007**). Jawetz melnick and Adelerg medical microbiology 24th ed. Mc Graw-Hill.U.S.A.

(16) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).(**2011)**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. twenty first informational supplement M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, U.S.A.

(17) Steward, C.D.; Rashed, G.K.; Hubrt, S.S. ;Bddle, G.W Graneu, B.M.; Anderson, G., Gwilliams, B.B.; Brittain, A.O. GmcGrowan, G.E. Gandtenover, F.C. (**2001).** Characterization of clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee.

(18) Rivera-tabia, J.A.(**2003)**. Antbiotic Resistance, Bublic Health Broblem. Anales Medical Hosbl Tal Abc.48,1,.42,47 for clinical lab oratoru
standrs extended sbectum b-lactamase detection methods .J. clin .microbiol 30,8, (128) 64-72.

(19) Jawetz, E.; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A.(**2004**). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology . 23rded. McGraw-Hill com. Singapore.

(20) Mayer, M. S.; Tullu, A.; Simon, C. J.; Kumar, J.; Kaiser, W. J.; Kraft, J. M. and Muehlbauer, W. H. (**1997**). Development of DNA marker for *Fusarium* resistance in Chickpea in: Udupa , S. M. and Wigand, F. (eds). DNA markers and breeding for resistance to Ascochyta blight in Chickpea.

(21) Welsh, J.; McClelland, M. **(1990**). Fingerprint Genomes using PCR with Arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 (24): 7213- 7218.

(22) Taghi, Z.S.; Seyed A. M.; Vahid, K. and Fatemeh, A.K. **(2008**). Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. Braz j. Microbiol; 39 (3): 494- 497.

(23) Wang, M., Sahm DF, Jacoby GA, Zhang Y, and Hooper D.C.(**2004**). Activities of Newer Quinolones Against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Containing the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant qnr. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.48: 1400–1401.

(24) Dalmasso, A.; Fontanella, E.; Piatti, P.; Civera. T.; Rosati, S- and Bottero, M. (2004). Multiplex PCR assay for identification of animal species in feedstuffs. Mole cell probes.; 18: 81- 87.

(25) Vipin, K.; Ravindra k. G., Heena, K.; Yogeshs., Meeta, S. and Surya N. (**2015**). International Journal of Microbiology and Allied sciences (IJOMAS) 2 (1): 17- 22.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة ، 2018 (5) 23

The use of RAPD markers to Detect the genetic diversity of E. coli isolates from Kirkuk city environment

Waa'd M. Raoof [1] , Akeel H. Al-Assie[2] , Shaimaa Monshed Morshed[2]

[1] *College of Pharmacy, University of Tikrit, Tikrit, Iraq*
[2] *Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Tikrit , Iraq*

Abstract

The environmental samples we were collected about 130 samples from the soil and water and were dividing to (71) , (59) water and soil samples resectively.

The growth isolation on the different cultural media was diagnosed from the appearance, microscopically, and cultural characteristics.

The results of the diagnosis for the environmental samples showed that (51) of the isolations refers to *E. coli* bacteria about (45.9%) divvied to 33 isolates from the water by (52.4%) and (18) isolates from the soil by (37.5%).

The ecological isolates was studied against nine antibiotics, broadly the isolates variables wherefrom the resistance of the antibiotic. The highest resistance was to the antibiotic cephalexin which reach to (80.4%).while there was no resistance for antibiotics (Amikacin) and (5.5%) to chloramphenicol

It has been selected 24 clinical isolations, and 24 ecological isolates from *E. coli* isolates depending on here resistance to many of antibiotics. To study the genetic variation for these isolates and the genetic markers it has been used a type of molecular markers which is depending on PCR technical it is: Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), and polymorphism bands then the observed data were enters to the computers for statistical analysis according to NTSYS-PC program, version 2.02 for this kind of the researches.