



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

وعد محمود روؤف¹، عقيل حسين العاصي²، شيماء منشد مرشد²

¹كلية الصيدلة، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

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

الملخص

جمعت 130 عينة بيئية من التربة والماء (71) عينة ماء و (59) عينة تربة، شُخّصت العزلات النامية بعد زرعها على الأوساط الزرع الخاصة وملاحظة الصفات المظهرية والمجهريّة. أظهرت نتائج بأن 51 عزلة تعود إلى *E.coli* بنسبة 45.9%، وبواقع 33 عزلة من الماء بنسبة 52.4% و 18 عزلة من التربة بنسبة 37.5% . تُرِست 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 cephalixin 80.4%، بينما لم تظهر العزلات البيئية أي مقاومة لمضاد Amikacin ومقاومة بنسبة 5.5% لمضاد Chloramphenicol وقد انتخبت 24 عزلة بيئية من عزلات *E.coli* اعتماداً 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 الـ RABD مع ثلاث بوادئ عشوائية ومن ثم ترجيلها على هلام الأكاروز وقد أظهرت هذه البادئات حزماً "متماثلة المواقع Monomorphic bands، وحزماً 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.

معلومات البحث

تاريخ الاستلام: 2018 / 4 / 30

تاريخ القبول: 2018 / 1 / 14

الكلمات المفتاحية: العزلات

البيئية، جرثومة *E.coli*، تقنية RAPD

المراسلة مع:

الاسم: شيماء منشد مرشد

البريد الإلكتروني:

رقم الهاتف:

المقدمة

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 ايشريشيا القولون في تواجدها الدائم والمميز في الامعاء (اي في البراز) ، وقابليتها على 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

تتواجد الاشرشيا القولونية 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

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 - دوميذ - 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 وتخمرها لسكر اللاكتوز على وسط اكاد الماكونكي ، وظاهرة العج (Swarming) كما درست صفات الخلايا البكتيرية عن طريق الفحص المجهرى وذلك بعد تصيبغها 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 الاشريكية 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 بالميكروغرام $\mu\text{g}/\text{disc}$	قطر منطقة التثبيط القياسية بلملم			الشركة المصنعة
				حساسة >	متوسطة الحساسية	مقاومة <	
1	Ampicillin	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	Chloramphenicol	C	30	17	16-14	13	
9	Trimethoprim	Tmp	5	16	15-11	10	

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

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 مسببات 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 (5)(U.T.I). 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 الحيوية ثم اجراء دراسة جزيئية بتقنية (RAPD-PCR) لتحديد التنوع الوراثي لها.

المواد وطرائق العمل

اولاً: جمع العينات:

جمعت 130 عينة بيئية من التربة بواقع 59 عينة من بيئة (تربة المزارع والحدائق والترب الملوثة ببراز الانسان والحيوان) واما عينات الماء فقد تضمنت 71 عينة (بحيرة ، بركة، ساقية، شط) وذلك من مناطق مختلفة من داخل مدينة كركوك . وقد استخدمت انابيب مطببة - معقمة (Sterial plane tubes) وشملت المناطق البيئية من مدينة

ثالثاً : تفاعلات الـ RAPD

اخذت عينات DNA -24 عزلة (*E.coli*) ببينية لاجراء اختبار (RAPD) عليها ، وتم اجراء تفاعلات الـ (RAPD) بالاستناد على (10)

البيانات المستخدمة في الدراسة (Primer selection)

النتائج والمناقشة

أولاً: العزل:

عزلت جرثومة *E.coli* من التربة (ترب الحدائق – الأماكن العامة – المستشفيات – الأرصفة) بواقع 18 عزلة ونسبة 35.3% بينما عزلت من الماء بواقع 33 عزلة 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 البكتيريا 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 اعتماداً على الصفات الزرعية والفحص المجهري والفحوصات الكيموحيوية اذ تم تمييزها على اوساط تشخيصية مختلفة تتمثل بوسط اكار مأكوني وعلى وسط اكار الدم ووسط اكار الايوسين ازرق الميثيلين وتبين ان جميع العزلات تعود لبكتيريا *E.coli* (15).

2- اختبار حساسية عزلات بكتيريا *Escherichia coli* المعزولة

بيئياً للمضادات الحيوية

درست حساسية عزلات بكتيريا *E.coli* والبالغ عددها 24 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 اعتماداً على قطر منطقة التثبيط المحيطة بأقراص هذه المضادات ومن ثم مقارنتها مع الجداول القياسية الواردة في (16) وقد تبين ان العزلات البيئية لجرثومة *E.coli* في حساسيتها للمضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة الحالية، كما موضح بالجدول رقم (3) :

جدول رقم (2) يوضح البوادي ، وتسلسلها والشركة المنتجة (Alpha

DNA) وبتكرين 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 مايكروليتر .

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 و2 مايكروليتر من كل بادئ الى الانبوية 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 مسح 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 :-

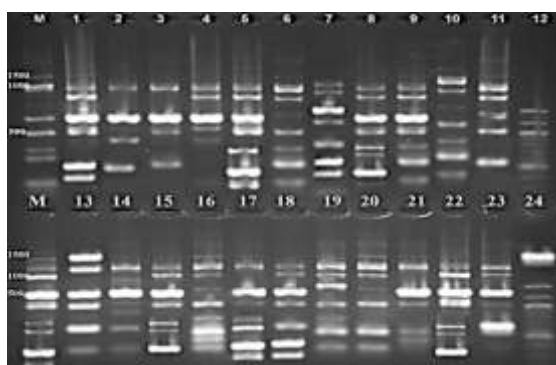
تم حساب معامل البعد الوراثي وكذلك معامل التشابه ما بين الأصناف المدروسة باستخدام معامل Nei's 72 (11)، ثم أجري التحليل العنقودي (Cluster analysis) وتم رسم مخطط البعد الوراثي ما بين المدخلات باستخدام طريقة: (12) The unweighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA). أجريت كل التحاليل الإحصائية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

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

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

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 البادئ OPI-06

2:البادئ OPI-16:

يتبين من خلال نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPI-16 للعينات البيئية 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.

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 البكتيريا 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 الرئيسية لظهور المقاومة المتعددة هو الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية دون الاعتماد على إجراء فحص الحساسية لها مما يزيد من فرص تكيف البكتيريا 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 الدفع الفعال Efflux pump وإنتاج أنزيمات التي تسهم في مقاومة العديد من أنواع المضادات الحيوية (19).

كشف التباين الوراثي:

تفاعلات الRAPD:

لدراسة التباين الوراثي بين العزلات البيئية ضمن العزلات المقاومة للمضادات الحيوية والبالغ عددها 24 عزلة، تم استخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال (RAPD).

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

1_البادئ OPI – 06 :

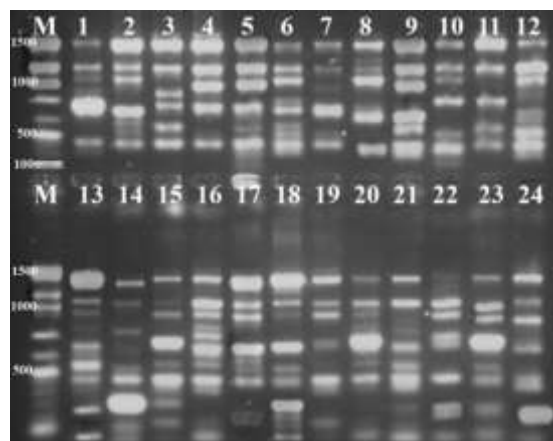
اظهرت نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPI – 06 للعزلات البيئية فقد اظهر هذا البادئ (14) موقعا للحزم تراوحت احجامها الجزيئية ما

مميزة فريدة وحزم ظهرت في عينات وغابت في عينات أخرى وكانت هذه الحزم بكل أنواعها مختلفة في أحجامها الجزيئية فكل هذه النتائج تدل على كم التباين الوراثي بين العينات المدروسة إذ أن حجم القطعة المتضاعفة من الأساس المعتمدة في مؤشرات RAPD والذي يستند الى بعد بين مواقع ارتباط البادئ على شريط سلسلة ال DNA القالب إذ أن البادئ يرتبط بمواقع مكملة له وبناء شريط جديد يمتد الى ان يستوقفه موقع ارتباطي آخر 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 سكر ارتباطه بهذه المواقع في كل دوره ليضيف قطعة دنا جديدة تعمل قالباً في الدورة اللاحقة (21) وبما ان تلك المواقع منتشرة على المجين بشكل عشوائي وتتأثر بالتغيرات الوراثية الناتجة عن الطفرات التلقائية او المستحثة التي تحدث فإن ذلك ينعكس على البعد بين موقع وآخر 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) نيوكليوتيد في الثانية لكل جزيئية انزيم إذ يضيف القواعد عند نهاية.

واوضحت النتائج التي حصلنا عليها التباين في الاحجام الجزيئية للحزم الناتجة إذ يمثل حجم الحزمة البعد بين موقع وآخر 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 فإن اختلاف المسافة بين موقع وآخر 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، إذ انها تؤثر على حجم الحزم المتضاعفة. ان اختلاف عدد الحزم الناتجة باختلاف العينات يبدو منطقياً بسبب التغير في تسلسل الدنا للعزلات إذ ان التفاوت في اعداد الحزم الناتجة يعود الى اختلاف ترتيب القواعد النروجينية في الانماط الوراثية للعينات المدروسة وهذه النتيجة تتسجم مع دراسات عديدة في هذا المجال منها (22) (25).

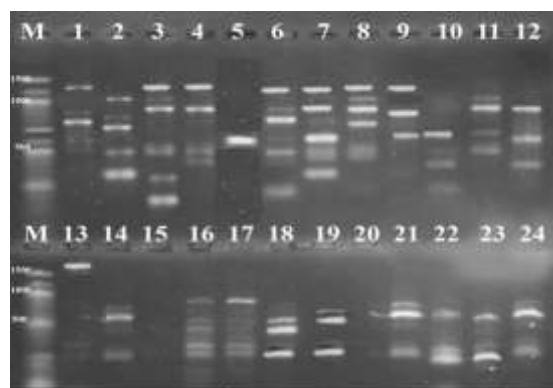
لقد اظهرت نتائج تحليل البعد الوراثي ان ناتج عملية تحليل RAPD PCR تعتمد على نوع البادئ المستعمل وبوجود بادئات مختلفة تنتج انماط مختلفة من الحزم ايضاً، ان الاختلاف في هذه الحزم واعدادها واحجامها الجزيئية هو الذي يحدد حجم التباين الوراثي بين العزلات ان



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

3_البادئ OPD-03 :

اظهرت نتائج تفاعلات ال RAPD للبادئ OPD-03 للعينات البيئية فقد اظهر هذا البادئ (14) موقعاً تراوحت احجامها الجزيئية ما بين (200-1300) 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 للعينه 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 رحيماءه، 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 البادئ OPD-03

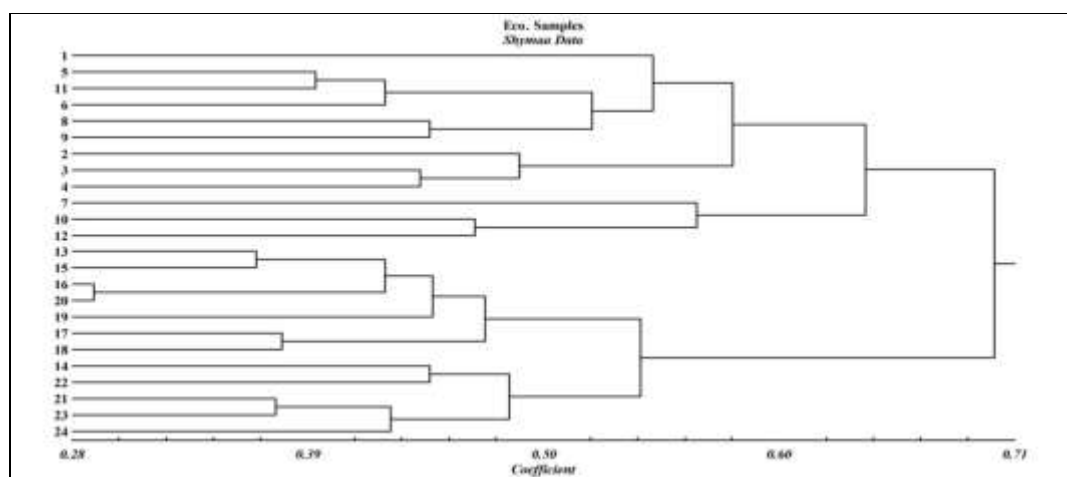
اظهرت البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة تبايناً وراثياً واضحاً بين العزلات المدروسة حيث نلاحظ ظهور حزمة رئيسة عامة وحزم

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

تراوحت قيمة البعد الوراثي للعينات البيئية ما بين (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 رحيماء 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.

[illegible]

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 Microbiology letters 263(1): 10-20.

(6) الراشدي، سفانة احمد محمد. (2014). التحري عن بعض جينات الضراوة في عزلات سريرية وبائية ليكتريا ايشريشيا 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 mccartny'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) Vandepitt, 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 arbitrary 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 Adelerger 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). Antibiotic Resistance, Public 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) Dalmaso, 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.

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

Waa'd M. Raoof¹, Akeel H. Al-Assie², Shaimaa Monshed Morshed²

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 cephalixin 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.