------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 1، ص1-12،2011------

اختبار قابلية محتوى الـ DNA البلازميدي في الجراثيم المعزولة من اخماج الجروح والحروق على الحركة والانتقال من خلال عملية الاقتران

يسرى عبد الرزاق عبد الله **خالد دحام احمد**

قسم علوم الحياة

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 16/ 2 / 2010 ؛ تاريخ القبول 20 / 9 / 2010)

الملخص

تم الحصول على 30 عزلة من الجراثيم المسببة لاخماج الجروح والحروق من مستشفيات مدينة الموصل. شخصت هذه العزلات بدراسة الصفات الشكلية والمزرعية والاختبارات الكيماحيوية حيث تبين بأنها تعود إلى جراثيم *Klebsiella* spp. و*Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و*Enterobacter aerogenes*. اجري الاقتران الجرثومي بين الأنواع أعلاه مع السلالة المختبرية *E.coli* JM83 ونجحت فقط محاولتان هما : سلالة JM83 تسلك سلوك خلايا مستلمة مع كلٍ من *S.aureus* (واهبة) و*P.aeruginosa* (واهبة) وبتردد اقتران 0.091×10^{-8} و 0.17×10^{-7} على التوالي. فضلا عن ذلك فقد اجري الاقتران بين عزلة *E. coli* محيدة بالحرارة بوصفها عزلة مستلمة مع العزلات التي فشلت في جميع محاولات الاقتران أعلاه ونجحت محاولة واحدة بين العزلة المحيدة وجرثومة *Ent. aerogenes* وبتردد اقتران 0.14×10^{-7}. انتقل في المحاولات أعلاه الـ DNA البلازميدي مانح المقاومة لبعض المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة. حفزت عملية الاقتران بالأشعة فوق البنفسجية في المحاولات التي فشلت فيها الاقتران في الحالة الطبيعية. قياس تركيز محتوى الـ DNA البلازميدي في الخلايا المقترنة والمستلمة دعمت نتائج الاقتران.

الكلمات الدالة: DNA البلازميدي، اخماج، الاقتران.

Testing the Ability of Plasmid DNA Content in Bacteria Isolated from Wound and Burn Infections for Mobilization and Transfer Through Conjugation

Yousrah A. Al-Razaq **Khalid D. Ahmad**

Department of Biology
College of Education
Mosul University

ABSTRACT

Bacterial isolates from burn and wound infections were obtained from Mosul city hospitals. These isolates were identified depending on the basis of their morphological, cultural characteristics and biochemical tests. The results showed that they belonged to *klebsiella* spp. *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Enterobacter aerogenes.* Conjugation between these bacteria and the laboratory *E.coli* (JM83) strain were carried out. Two crosses succeeded. They were, JM83 strain acting as a recipient with each of *S.aureus* (donar) and *P.aeruginosa* (donar) with exconjugant frequency of 0.091×10^{-8} and 0.017×10^{-7} respectively. In addition, cross between cured *E.coli* isolate as recipient with the bacteria that fail to conjugate with JM83 strain were performed and only one cross succeeded which is between cured *E.coli* and *Ent-aerogenes* with conjugation frequency 0.014×10^{-7}. In all these crosses the plasmid DNA encoding resistance to some antibiotics and heavy metals were transferred from donar to recipient bacteria through conjugation. Conjugation process was induced by ultraviolet light in those trials that fail to occur. Plasmid DNA concentrations in transconjugant and recipient bacterial cells support the occurrence of conjugation.

Keywords: Plasmid DNA**,** Infections**,** Conjugation.

المقدمة

يعد الخمج احد المضاعفات الخطيرة في مرضى الحروق والجروح، ومن الأحياء المجهرية الـشائعة في اخماج الجروح والحروق هي:

Staphylococcus aureus ، *Streptococcus* spp. ، *Proteus* spp. ، *Klebsiella pneumonia* ، araerobes والجراثيم اللاهوائية (Lari *et al.*, 1998). أظهرت دراسة (عبد الباقي ، 2001) على الجـراثيم المعزولة من الجروح الخمجية بان الجراثيم الموجبة لصبغة كرام كانت بنسبة 43% وشكلت الجراثيم السالبة لصبغة كرام نسبة 56.98% أي كانت الجراثيم السالبة لصبغة كرام هي الأكثر شيوعا وكانت نسبة جرثومة *S. aureus* 29.05% تلتهـا *P. aeruginosa* 27.93 % ثـم *Proteus mirabilis* و *Streptococcus pyogenes* بنسبة 5.85% وكانت *S. aureus* و *P. aeruginosa* الأكثر شيوعا.

تنتقل المقاومة للمضادات الحيوية من جنس إلى آخر في الجراثيم بواسطة انتقـال المـادة الوراثيـة خارج الكروموسومية أي البلازميدات بـالاقتران الجرثـومي وهـذه العمليـة تحـصل فـي العديـد مـن الأجناس و بضمنها معظم أجناس الجراثيم السالبة لصبغة كرام ومنها العائلة المعويـة Enterobacteriaceae (Chinedum *et al*., 2005). يكون الاقتران أحادي الاتجاه من واهب إلى مستلم وتتطلب عمليـة الاقتـران وجود عامل الخصوبة F-plasmid في الجراثيم الواهبة الذي تحوي على مورثات مسؤولة عن تشفير بروتين يدعى Pilin والذي يدخل في تكوين الشعيرات الموجودة على سطح الخلية الجرثومية الواهبة والتـي تلعـب دورا مهما في عملية الاقتران من خلال حدوث عملية التماس بين الخلايا الواهبة والمستلمة. أشار الباحثـان (Tradif and Grant,1983) في دراستهما للاقتران إلى انتقال بلازميدات المقاومة التي تعود إلى مجـاميع عدم التوافق FI، I_{α}، J، M، T، X بين *E. coli* و *P. aeruginosa* والتي تشفر لمقاومـة Carbenicillin، Streptomycin، Kanamycin، Tetracyclin، Neomycin. ودرست استقرارية هذه البلازميدات من خلال تنميتها في المرق المغذي الخالي من المضادات الحيوية ونميت بدرجة 37°م لمدة 72 ساعة.

في دراسة (2006) Bartoloni *et al*., على السلالات المتعايشة في الأمعـاء لجرثومـة *E. coli* لـ 3174 من الأطفال الأصحاء وجد أن هناك طرازين مظهريين للمقاومة المتعددة وهي الأكثر شيوعا الطراز الأول هو المقاومة للمضادات Ampicillin، Tetracycline، Methprim والطـراز الثـاني Ampicillin، Tetracycline، Methprim، Chloramphenicol، وجميعها يمكن أن تنتقل بواسـطة الاقتـران، إذ درس الاقتران لـ 78 جرثومة مع السلالة المختبرية *E. coli*: JM58 ولوحظ نجاح الاقتران في 37 عزلـة منهـا 27 عزلة لوحظ فيها انتقال جميع مورثات المقاومة المدروسة.

المواد وطرائق العمل

عزل الجراثيم وتشخيصها Isolation and Identification of bacteria

عزلت العينات من الجراثيم المسببة لخمج الجروح والحروق من مستشفيات مدينة الموصل لفتـرة 4 اشهر في سنة 2006، وتم تشخيصها. واستخدمت الأوساط وهي: وسط اكـار المغـذي والمـرق المغـذي والايوسين ازرق المثيلين (Oxoid) وكذلك وسط اكار الماكونكي (HIMEDIA)، وسط اكـار الـدم، اكـار اليوريا (Merck) وأجريت الاختبارات البايوكيمياوية لتشخيص هذه العزلات وفـق (1996) Colle *et al*., و(1997) , Delost و (1997) Koneman *et al*., و (1994) Baron *et al*.. أما سلالة *E. coli* المختبرية K_{12} (سلالة JM83) فقد زودنا بها مشكوراً الدكتور خالد دحام احمد / قسم علوم الحيـاة / كليـة التربيـة / جامعة الموصل.

حـضرت المحاليـل الخزنيـة للمـضادات الحيويـة والمعـادن الثقيلـة وفـق طريقـة (Puhler and Timmis, 1979) واستخدمت بالتراكيز النهائية (بالمايكرو غرام/مل) ومن هـذه المـضادات

والمعـادن الثقيلـة هـي Amikacin (Ak) 25 و Ampicillin (Ap) 50، Cephalexin (Cn) 50، Chloramphenicol (Cm) 10 ، Erythromycin (Er) 15 ، Nalidixic acid (Nal) 50، Rifampicin (Rif) 50، Streptomycin (Sm) 50 ، Tetracycline (Tc) 50 وكذلك المعادن الثقيلة منها كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) ، كلوريد النيكل ($NiCl_2$)، وكلوريد الكوبلت ($CoCl_2$) بتركيز نهائي 25.

الاقتران الجرثومي Bacterial Conjugation

أجـرى الاقتـران بـين العـزلات الجرثوميـة قيـد الدراسـة وكـل مـن سـلالة JM83 وعزلة *E. coli* (المحيدة بالحرارة) وفق طريقة Cox *et al.*, (1969) والاقتران اجـري وفـق طريقـة Olsen *et al.*, (1992) ولوحظت نتائج الاقتران ثم نقيت المستعمرات المقترنـة علـى الوسـط الحـاوي المضادات الحيوية المستخدمة بوصفها علائم وراثية وأجريت الاختبارات التشخيصية الـشكلية والمزرعيـة والكيموحيوية لتحديد جنس المستعمرات المقترنة واحتسب تردد الاقتران (Salle, 1973).

فضلا عن ذلك شععت العزلات الجرثومية المستخدمة بوصفها عزلات واهبة فـي عمليـة الاقتـران بالأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 260 nm التي تستخدم بوصفها عزلات واهبة في عملية الاقتـران حسب طريقة Dobrazanski, (1968) وRajcher ولوحظت نتائج الاقتران بعد تنقيتها علـى الأوسـاط ثـم اختبرت هذه المستعمرات لتحديد جنسها واحتسب تردد الاقتران.

عزل الـ DNA البلازميدي Plasmid DNA Isolation

تم عزل محتوى الـ DNA البلازميدي من الخلايا المقترنة والخلايا المـستلمة سـلالة JM83 وفـق طريقة Doly وBirnboim, (1979) ، ولتقدير تركيز الـ DNA البلازميدي المنقى من العزلات الجرثومية استخدمت الطريقة المستخدمة من قبل (Brown, 1997) .

النتائج والمناقشة

جمع العزلات الجرثومية وتشخيصها Collection and Diagnosis of the Bacterial Isolates

بعد الحصول على 30 عزلة من الجراثيم المسببة لاخماج الجروح والحروق استوجب تشخيصها لأنها غير مشخصه مسبقا حيث تم إجراء الاختبارات التشخيصية الشكلية والمزرعيـة والكيموحيويـة فظهـرت (46.7%) 14 عزلة من بين 30 عزلة بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام، مخمرة للاكتـوز علـى وسط الماكونكي وبشكل مستعمرات مخاطية كبيرة. أما نتائج الاختبارات الكيموحيوية فتشير إلى كونها تعود إلى جرثومة *Klebsiella spp*. كما أن (20%) 6 عزلات ظهرت بشكل عصيات مستقيمة سالبة لصبغة كرام غير مخمرة للاكتوز، ونمت بدرجة 42°م فظهرت بلون اخضر مزرق على وسط الاكار المغذي وتدل هـذه الاختبارات الشكلية وكذلك الكيموحيوية على أنها جرثومة *P. aeruginosa*. بينما (13.3%) 4 عزلات كانت

بشكل عصيات قصيرة وسالبة لصبغة كرام، مخمرة للاكتوز مستعمراتها وردية اللون محدبة دائريـة علـى وسط الماكونكي وكانت سوداء اللون ببريق معدني اخضر على وسـط الايوسـين ازرق المثيلـين وتـدل الاختبارات هذه على أنها جرثومة *E. coli*. أضف إلى ذلك (13.3%) 4 عزلات موجبة لصبغة كرام كروية بشكل تجمعات شبيهة بعنقود العنب، نمت على وسط اكار المانيتول والملح مسببة اصفرار الوسط وتدل جميع هذه الاختبارات على كونها جرثومة *S. aureus*. ظهرت (6.6%) 2 عزلة سالبة لـصبغة كـرام، مخمـرة للاكتوز، غير مخاطية وتدل الاختبارات الكيموحيوية على أنها *Ent. aerogenes*. حيث تم تشخيص العزلات وفق Collee *et al.*, (1996) وDelost, (1997) وKoneman *et al.*, (1997) .

من النتائج أعلاه يمكن ملاحظة أن أنواع جرثومة *Klebseilla spp*. شكلت النسبة الأكبر من العزلات وبواقع (46.7%) 14 عزلة وتلتها جرثومة *P.aeruginosa* بنسبة مئوية (20%) 6 ثم عزلات جرثـومتي *E.coli* و *S. aureus* بالنسبة المئوية نفـسها (13.3%) 4 و أخيـرا جرثومـة *Ent. Aerogenes* بواقـع (6.6%) 2 . تتفق نتائجنا مع ما جمعته من أنواع الجراثيم الباحثة النائب، (2008) ولكن تختلف من حيـث النسب. إذ جمعت (137) عزلة من الجراثيم المعزولة من الجروح الخمجية ومن مناطق مختلفة من الجـسم في مستشفى الزهراوي التعليمي في مدينة الموصل حيث شكلت جرثومة *P. aeruginosa* النسبة الأكبر ثـم تلتها جرثومة *S. aurues*، واقل نسبة شكلتها جرثومة *Pr. mirabilis*.

وكذلك دراسة الباحث Dhar *et al.*, (2007) على اخماج الحروق في الهند حيث شكلت جرثومـة *S.epidermidis* النسب الأعلى (56.4%) 62 عزلة من اصل 110 عزلة تلتها *S.epidermidis* بواقـع 15 عزلة اي بنسبة (13.63%) ثم جرثومة *P. aeruginosa* بواقع 20 عزلة (18.1) وجرثومة *E.coli* بواقـع 10 عزلات (9.09%) وأخيرا جرثومة *Klebsiella* ثلاث عزلات (2.72) هذه النتائج تختلف عـن النتـائج التي تم الحصول عليها والاختلاف يعود إلى بيئة المستشفى من حيث استخدام المطهرات والمعقمات الكفوءة في المستشفيات العالمية.

الاقتران الجرثومي Bacterial Conjugation

1- الاقتران بين العزلات الجرثومية قيد الدراسة وسلالة JM83

بعد اختبار مقاومة العزلات الجرثومية المستخدمة وسلالة JM83 للمضادات الحيوية المستخدمة حيث تم اختيار العلائم الوراثية بين الجراثيم اجري الاقتران بين العزلات الجرثومية والسلالة المختبريـة. نقيـت المستعمرات المقترنة على نفس الأوساط الحاوية على المضادات الحيوية التي اسـتخدمت بوصـفها علائـم وراثية وأجريت عليها الاختبارات الشكلية والمزرعية والكيماحيوية لمعرفـة نـوع المـستعمرات المقترنـة واحتسب تردد الاقتران. الجدول (1) يوضح نتائج عملية الاقتران الجرثومي.

الجدول 1: الاقتران الجرثومي للعزلات الجرثومية مع السلالة المختبرية JM83.

السلالة الواهبة مع الصفات الوراثية	السلالة المستلمة مع الصفات الوراثية	الصفات الوراثية للمستعمرات المقترنة	تردد الاقتران
S.aureus	JM83	JM83	9.1×10^{-10}
$Clin^S\ Er^R$	$^-Clin^R\ Er^S$ Lac	$Er^R\ Clin^R\ ^-Lac$	
aeruginosa .P	JM83	JM83	1.7×10^{-8}
$^-Nm^R$ Lac	$^-Nm^S$ Lac	$^-Nm^R$ Lac	
.Klebsiella spp	JM83	-	-
$^+Er^R\ Sm^S$ Lac	$^-Er^S\ Sm^R$ Lac		
aerogenes .Ent	JM83	-	-
$^+Cp^R$ Lac	$^-Cp^S$ Lac		
coli .E	*coli* JM83 *.E*	-	-
$^+Nm^R$ Lac	$^-Nm^S$ Lac		

يلاحظ من الجدول (1) بان عملية الاقتران قد حدثت بين مجاميع من الجـراثيم الموجبـة والـسالبة لصبغة كرام. إذ تم انتقال صفة المقاومة للمضاد الحيوي Er لجرثومة *S. aureus* إلى السلالة JM83 وبتردد اقتران 0.019×10^{-8} . نميت هذا المستعمرات المقترنة على أوساط غذائية حاوية على المضادات الحيويـة والمعادن الثقيلة Cf، Cm، Cp، Na، Nm، Rif، Tc، $HgCl_2$، $NiCl_2$، $CoCl_2$ كلاً على حده لان العزلـة الواهبة *S.aureus* مقاومة لهذه المضادات والمعادن الثقيلة أما سلالة JM83 فهي حساسة . وأشارت النتـائج إلى نمو هذه المستعمرات المقترنة بعد التحضين لمـدة 48-24 سـاعة وبدرجـة حـرارة 2±37°م علـى المضادات Cf، Cm، Tc، $NiCl_2$ فقط وهذا ربما يدل على ان البلازميد مانح المقاومة للخلية المستلمة لهـذه المضادات واقعة على جزيئة الـ DNA البلازميدي المنتقل نفسها. إن النتيجة التي تم الحصول عليها كانـت محيره لنا لان الاقتران قد جرى بين جراثيم موجبه وسالبه لصبغة كرام لذا أعيدت التجربة أكثر مـن مـره للتأكد من حدوث العملية وقد حصلنا على نفس النتائج . إن عملية الاقتران الجرثومي يمكـن أن تحـدث إذا توفرت الشروط المطلوبة لحدوثها ومنها التماس بين الجراثيم المقترنة وتكوين جـسر سـايتوبلازمي بينهـا وكذلك وجود ما يسمى mob gene في البلازميد. هذا الجين يشفر بروتين يمكن أن يقطـع احـد شـريطي البلازميد في تسلسل bom على نفس ألجزيئه وبذا ينتقل شريط ال DNA المقطوع من الخلية الواهبة إلـى الخلية المستلمة (Puhler and Timmis, 1979) .

من الجدول يتبين أيضا أن تردد الاقتران كان واطئا في هذه الحالة التي تم بها الاقتران وهذا ربما يعود إلى صعوبة حصول الاقتران بين السلالات الموجبة والسالبة . من النتـائج يمكـن القـول أن الـ DNA

البلازميدي المنتقل عن طريق عملية الاقتران من عزلة *S. aureus* إلى سلالة JM83 يحمل مورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية Er ، Cf ، Cm ، Tc والمعدن الثقيل $NiCl_2$.

إن هذه النتائج تتفق مع ما أشارت إليه الباحثة Courvalin , (1994) في دراستها عن الاقتران الجرثومي بين الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام إلى أن الاقتران ولكونه آلية لانتقال المادة الوراثية ذات مدى مضيف واسع إذ انتقلت مورثات المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام Erythromycin، Tetracycline من جرثومة *S. aureus* إلى جرثومتي *E. coli*، *Klebsiella pneumoniae* .

أما الاقتران بين العزلة الواهبة *P. aeruginosa* وسلالة الـ JM83 المستلمة فكانت النتيجة انتقال صفة المقاومة للمضاد Nm من جرثومة *P. aeruginosa* إلى السلالة JM83 وبتردد اقتران 0.17×10^{-7} بعد مدة تحضين 24 ساعة فقط. نميت هذه المستعمرات المقترنة على أوساط غذائية حاوية على المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة Ak، Ap، Cm، Cf، Cp، Er، Nm، Rif، Tc، $NiCl_2$، $CoCl_2$ كل على حدا لان العزلة الواهبة *P.aeruoginosa* مقاومة لهذه المضادات والمعادن الثقيلة أما سلالة الـ JM83 فهي حساسة تجاهها، أوضحت النتائج نمو هذه المستعمرات المقترنة بعد التحضين لمدة 24 ساعة وبدرجة $37\pm2^{\circ}$م على أوساط حاوية على Cf ، Cm ، Er ، $CoCl_2$ ، $NiCl_2$ ، إن الـ DNA البلازميدي الحاوي على المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة أعلاه قد انتقلت عن طريق عملية الاقتران إلى السلالة JM83.

من الجدول أيضا يتبين أن الاقتران لم يحصل بين باقي العزلات الجرثومية المحلية المـذكورة فـي الجدول مع السلالة JM83 والسبب يرجع إلى أن الاقتران يتطلب ظـروف مختبريـه مثلـى منهـا وجـود البلازميدات الاقترانية القادرة على نقل مورثات مانحة المقاومة محمولة على البلازميدات القابلة للتحريك أي نقص في العوامل التي تساعد في حصول عملية الاقتران.

أشار الباحث Shukla *et al.* (2006) في دراستهم الى حصول الاقتران الجرثومي بين جرثومة *Klebsiella pneumoniae* ذات المقاومة المتعددة مع سلالة *E. coli* K12 المختبرية باستخدام المضادين الحيويين Nalidixic acid و Cefotaxime، كعلائم وراثية لبيان وجود المقاومة بواسطة انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف التي تشفر لها بلازميدات اقترانية والتي تنتشر بين الجراثيم سالبة لصبغة كرام وتسبب ظهور الجراثيم ذات المقاومة المتعددة للمضادات.

قام الباحث Ahmad, (2006) باختبار قابلية انتقال البلازميدات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في الأنواع الجرثومية *Ent. cloacae*، *Salmonella*، *K. oxytoca*، *E. coli*، *Morganella morganii* المعزولة من المرضى المصابين بالإسهال، أظهرت النتائج أن البلازميدات في الأنواع الجرثومية الأربعة الأولى والتي تمنح المقاومة للـ Ap، Cm، Gm، Er، Tc، وكذلك للمعادن الثقيلة (كلوريد الزئبق، كلوريد

الكادميوم ونترات الفضة) لها المقدرة على الانتقال إلى السلالة المختبرية JM83 بواسطة الاقتران مانحةً هذه السلالة المقاومة للمضادات أعلاه بعد أن كانت حساسة تجاهها.

الاقتران الجرثومي ما بين العزلات الجرثومية والعزلة المحيدة

تم إجراء عملية التحييد بالحرارة المرتفعة 42°م لجرثومة *E. coli* المعزولة من اخماج الجروح والحروق . اجري الاقتران بين أنواع أخرى من العزلات الجرثومية مع العزلة المحيدة ونقيت المستعمرات المقترنة على نفس الوسط وأجريت عليها الاختبارات الشكلية والمزرعية والكيمياحيوية لمعرفة نوع المستعمرات المقترنة واحتسب تردد الاقتران وكما موضح بالجدول رقم (2) .

الجدول 2: الاقتران الجرثومي بين العزلات الجرثومية والعزلة المحيدة بالحرارة.

السلالة الواهبة مع الصفات الوراثية	السلالة المستلمة مع الصفات الوراثية	الصفات الوراثية للمستعمرات المقترنة	تردد الاقتران
Ent. aerogenes	*E. coli*	*E. coli*	1.4×10^{-8}
$Rif^S\ Cm^R$	$Cm^S\ Rif^R\ Lac^+$	$Cm^R\ Rif^R\ Lac^-$	
Klebsiella spp.	*E. coli*	-	-
$Er^R\ Cp^S$	$Er^S\ Cp^R$		
E. coli	*E. coli*	-	-
$Cp^S\ Ak^R$	$Cp^R\ Ak^S$		

يبين الجدول (2) حصول الاقتران بين جرثومتي *Ent.aerugenes* مع العزلة *E.coli* المحيدة حيث تم الحصول على مستعمرات مقترنة مقاومة للمضادات الحيوية مما يدل على حصول عملية الاقتـران وانتقـال البلازميد المانحة للمقاومة للمضاد Cm. نميت كذلك هذه المستعمرات المقترنة على أوسـاط حاويـة علـى المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة التي هي بالأصل مقاومة لهـا العزلـة الواهبـة Ap، Cf، Er، $HgCl_2$، $NiCl_2$، $CoCl_2$ كلا على حده إذ حضنت هذه الأوساط بدرجة حرارة 37±2°م لمدة 24-48 ساعة وكانـت النتيجة نمو هذه المستعمرات على الأوساط الحاوية على المضادات والمعادن الثقيلة نفسها أعلاه مـا عـدا ، $NiCl_2$ وبذلك يكون الـ DNA البلازميدي يمتلك القابلية على الحركة والانتقال عن طريق عملية الاقتـران إلى العزلة المحيدة .

الاقتران المحفز بالأشعة فوق البنفسجية **Conjugation Induced by UV Rays**

اجري الاقتران الجرثومي المحفز بالأشعة فوق البنفسجية ما بين العزلات الواهبة التـي فـشلت فـي إظهار عملية الاقتران بينها وبين سلالة JM83 والعزلة *E. coli* المحيدة من المحاولات التي أجريت نجحـت محاولتان لعملية الاقتران ما بين *E.coli* واهبة ذات علائم وراثية هي (Tc^R, Lac^+) وسلالة JM83 (مستلمة) ذات صفات وراثية (Tc^S, Lac^-). تم الحصول على المستعمرات المقترنة ذات صفات وراثيـة (Tc^R, Lac^-) *E. coli* JM83 بعد إجراء الاختبارات الشكلية والمزرعية والاختبـارات البايوكيميائيـة وبتـردد اقتـران 0.027×10^{-5}. حيث تم انتقال صفة المقاومة للمضاد Tc من جرثومـة *E. coli* إلـى الـسلالة المختبريـة JM83، وللتأكد من أن عملية الاقتران الجرثومي بين *E. coli* والسلالة JM83 قد تضمنت انتقـال مقاومـة للمضادات أخرى فقد نميت هذه المستعمرات المقترنة على أوساط غذائية حاوية على المـضادات الحيويـة والمعادن الثقيلة Ak، Ap، Cf، Cm، Er، Nal، Nm، Rif، $HgCl_2$، $CoCl_2$، $NiCl_2$ كلاً على حـدْ، لان العزلة الواهبة *E. coli* مقاومة لهذه المضادات والمعادن الثقيلة أما السلالة JM83 حساسة تجاهها. والنتيجـة كانت نمو هذه المستعمرات المقترنة بعد التحضين لمدة 48-24 ساعة على الأوساط الحاوية على Ap، Cf، Cm، $HgCl_2$ فقط مما يمكن أن نستنتج بان الـ DNA البلازميدي المنتقـل مـن عزلـة *E. coli* إلـى السلالـة JM83 يحمل مورثات مانحة للمقاومة للمضادات الحيويـة والمعـادن الثقيلـة هـي Ap، Cf، Cm، $HgCl_2$.

من النتائج يتضح أن فقط جرثومة *Klebsiella* spp. لم تنجح في عملية الاقتران مع السلالة JM83 والعزلة المحيدة والسبب ربما يعود إلى وجود السكريات المتعددة المخاطية التي تعد عائقا أمام عملية الاقتران وكذلك لعدم تكامل متطلبات الاقتران والظروف المثلى.

لاحظ الباحثان (Wood and Walmsley ,1969) إن تعريض الخلايا الواهبـة للإشـعاع ومنهـا الأشعة السينية X-Ray يزيد من الاقتران إذ درسا الأشعة السينية و فوق البنفسجية و α-particles وتأثيرها على الاقتران إذ أن الاقتران الجرثومي يتكون من ثلاث مراحل الازدواج بين الخلايـا الواهبـة والمـستلمة وانتقال جزء من الـ DNA الخلية الواهبة إلى المستلمة وتكامل المعلومات الوراثية المنتقلـة مـع الخلايـا المستلمة وتؤثر هذه الأشعة بشكل مختلف على هذه المراحل ويختلف التأثير عند تعريض الخلايا الواهبـة أو تعريض الخلايا المستلمة للأشعة وتعمل على زيادة إعادة التوليف Recombination بـين القطعـة الداخلـة وكروموسوم الخلية المستلمة.

بعدها تم عزل محتوى الـ DNA البلازميدي من العزلات المقترنة واحتسب تركيز الـ DNA البلازميدي كما جاء في المواد وطرائق العمل. والجدول (3) يوضح تركيز DNA البلازميدي في العزلات الجرثومية المقترنة والمستلمة.

الجدول 3: تركيز DNA البلازميدي في العزلات الجرثومية المقترنة والمستلمة.

العزلات الجرثومية	تركيز الـ DNA البلازميدي مايكروغرام/مل
سلالة JM83	0.08
محيدة *E. coli*	0.02
JM83 مقترنة Er^R $Clin^R$ lac^-	1.3
JM83 مقترنة $Nm^R lac^-$	1.06
JM83 مقترنة Tc^R lac^-	1.91
محيدة *E. coli* Cm^R Rif^R lac^+	1.13

من الجدول (3) يتبين ان هناك زيادة ملحوظة في تركيز محتوى DNA البلازميدي المعزول في الانواع الجرثومية المقترنة مقارنة بتركيزه في سلالة JM83 والعزلة المحيدة *E. coli*، تراوحت تلك الزيادة في تركيز محتوى الـ DNA البلازميدي في العزلات الجرثومية المقترنة والناتجة من عملية الاقتران بين العزلات الجرثومية والسلالة المختبرية JM83 بمدى (13.25-23.88) ضعف عما هو موجود في السلالة المختبرية JM83 بينما كان مقدار الزيادة في محتوى الـ DNA البلازميدي في العزلات الجرثومية المقترنة نتيجة عملية الاقتران بين العزلات الجرثومية والسلالة المحيدة بمدى (5.65-8.2) ضعف عما هو موجود في السلالة المحيدة. إن هذه النتائج تؤكد وتدعم حصول عملية الانتقال للـ DNA البلازميدي من العزلات الجرثومية إلى السلالة المختبرية والمحيدة حيث هناك زيادة ملحوظة في الخلايا المستلمة وتدعم نتائج عملية الاقتران. أضف إلى ذلك فان الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لل DNA البلازميدي في الخلايا المقترنه ومقارنتها مع المحتوى البلازميدي في الخلايا الواهبة والمستلمة يمكن أن يعطي دليلا آخر لحدوث عملية الاقتران .

استطاع Cabrera *et al.*, (1997) عزل 41 عزلة من جراثيم *P. aeruginosa* من عدوى المستشفيات في الفلبين والتي كان 53.66% منها تمتلك مقاومة متعددة للمضادات (أكثر من 3 مضادات) وقام الباحث بإجراء الاقتران الجرثومي والذي كان بتردد 6.0×10^{-3} إلى 1.6×10^{-5} ثم تم تحييد المستعمرات المقترنة بالاكردين البرتقالي واستخدمت طرائق عدة لاستخلاص البلازميد منها. ومن ثم رحل كهربائيا بالاكاروز وكانت البلازميدات تعود إلى مجموعة عدم توافق P2 بوزن جزيئي 280 ميكادالتون تقريبا.

المصادر العربية

النائب، عبد الله محمد. (2008). التأثير التثبيطي لمستخلصات نبات الكركديه ونبات الـسماق والمـضادات الحيوية في بعض أنواع الجراثيم. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

عبد الباقي، إنعام عبد المنعم (2001). التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية في بعض أنـواع الجـراثيم المعزولة من الجروح المخمجه، رسالة ماجستير، كلية التربية ، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Ahmed, K. D. (2006). Determination of transposition property of Neomycin, Streptomycin and Trimethoprim resistance gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *J. Raf. Sci.,* **17**(10), 8-15.

Baron, E.J.; Peterson, L. R.; Finegold, S. M. (1994). "Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology". 9th edn., Mosby-year Book, Inc., St. Louis, U.S.A. pp. 95-98.

Bartoloni, A.; Pallecchi, L.; Benedetti, M.; Fernandez, C.; Vallejos, Y.; Guzman, E.; Liz Villagran, A.; Mantella, A.; Luccjetti, Ch.; Bartalesi, F.; Strohmeyer, M.; Falkenberg, T.; Kronvall, G.; Gotuzzo, E.; Paradisi, F.; Rossolini, G.M. (2006). Multidrug-resistance commensal *Escherichia coli* in children, *J. Peru and Bolivia. Emerg. Infect. Dis.,* **12**(6), 907-913.

Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. *J. Nucleic Acid Res*., **7,** 1513-1524.

Brown, T.A. (1997). "Gene Coloning": An introduction. 3rd edn., Champan and Hall, London, pp. 81-89 .

Cabrera, E.C.; Halos, S.C. ; Velmonte, M.A. (1997). Antibiograms serotypes and R plasmids of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J. Microbiol. Infect. Dis.,* **26(**3**)**, 121-128.

Chinedum, Ch.S.; Abdullah, N.; Siang, T.W.; Wan, H.Y. (2005). Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from gastrointestinal tract of chicken. *J. Microbiol.,* **43(**3**)** , 251-256.

Collee, J. G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P.; Simons, A. (Eds). (1996). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology". 14th edn., Churchill Livingsotne, Edinburgh, England. pp. 120-123.

Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiolic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Agents Chemother*., **38**(7), 1447-1451.

Cox, M. F.; Baldwin, J. N.; Strickland, R. H. (1969). Some properties of the β-lactamase gene in *Staphylococcus epidermidis* . *J. Appl. Microbiol.,* **18(**4), 628-630.

Delost, M.D. (1997). "Introduction to Diagnostic", Textbook and Workbook. Mosby-year Book, Inc., St. Louis, Missouri, U.S.A. pp. 230-237.

Dhar, S.; Saraf, R.; Singh, K.; Raina, Bh. (2007). Microbiological profile of chronic burn wounds among patients admitted in burn unit. *J. Med. Education and Res.,* **9**(4), 182-185.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W. M.; Scheckenberger, P.C.; Winn, W.C. (1997). "Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology" 5th edn., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A. pp. 85-90.

Lari, R.; Bahrami, H.H.; Alaghehbandan, R. (1998). Pseudomonas infection in Tohid Burn Center, Iran. *J. Burns*. **24,** 637-641.

Olsen, J. E.; Brown, D. J.; Baggesen, D. L.; Bisgaard, M. (1992). Biochemical and characterization of *Salmonella entrica* serovar berta, and comparison of methods for typing. *J. Epidemiol. Infect.,* **108,** 243-260.

Puhler, A.; Timmis, K.N. (1979). "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance". Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherland. pp. 265-272.

Rajchert, Trazpil, M.; Dobrzanki, W.T. (1968). Influence of mutagenic agents on the integration of the F episome in the chromosome of *Escherichia coli* K_{12} F^{+}**.** *J. Gen. Microbiol.,* **54**, 47-57.

Salle, A. J. (1973). " Fundamental Principles of Bacteriology". 7th edn., McGraw-Hill Book Company, New York, U.S.A. pp. 330-342.

Shukla, O. P.; Rai, U.N.; Dubey, S.; Mishra, K. (2006). Bacterial resistance: a tool for remediation of toxic metal pollutant. Interantl**.** *J. Soc. Environ. Bot.,* **12**(2), 8-14.

Tradif, G.; Grant, R.B. (1983). Transfer of plasmids from *Escherichia coli* to *Pseudomonas aeruginosa* characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mutant with enhanced reciptient ability for enterobacterial plasmids. *J. Antimicrob. Agents Chemother*., **24**(2), 201-208.

Wood, Th. H.; Walmsley, R.H. (1969). Conjugation in *Escherichia coli* R-12 and its modification by irradiation*. J. Biophysical*., **9,** 391-420.