تنمية مجموعة من البكتريا على الأوساط الزرعية القياسية والأوساط المصنعة محلياً (قشور الباذنجان) ومعرفة التغاير الوراثي بتقنية Finger printing

Developing a group of bacteria on the standard cultural media and the manufactured local medium (Eggplant Aubergine)and detecting the genetic changes by using finger printing technology .

ا.د.رشيد حميد حسن
حذيفة ارحيم علوان
كلية التربية /جامعة سامراء
Rasheed H.Hassan
College of Education/Samarra university
Huthaifa R.Alwan
College of Education/Samarra university

الملخص

اجريت الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية التربية – جامعة سامراء للمدة من 5 ايلول 2016 الى 1 ايار 2017 . وتضمنت استخدام وسط قشور الباذنجان *Solanummelongena* في تنمية الاحياء المجهرية . حيث استخدم خمسة انواع من البكتريا، وهي *Klebsiella pneumoniae* و*Eschrichia coli* و *Staphylococcus aureus*و*Streptococcus pneumonia*.

و*Pseudomonas aeruginosa*. حيث بينت النتائج امكانية تنمية هذهِ المايكروبات على الوسط المصنع .وكان اعلى معدل نمو لبكتريا *Klebsiella pneumoniae*و*Eschrichia coli*و (*Pseudomonas aeruginosa*+++) وتليها بكتريا *S.aureus*(++) و (*S.pneumonia*.+).فضلاًعن استخدام تقنية Finger printing لمعرفة التغيرات الوراثية لبكتريا *K.pneumoniae* و*E.coli* من خلال النتائج بين عدم وجود تغيرات وراثية لهذهِ الانواع مقارنة بالأوساط القياسية .

Abstract

This study has done in the laboratories of the Department of the biological Sciences in the College of Edocation – university of samarra , for the period from September 5 - 2016 to may 1 - 2017 it is included using the medium of *Eggplant Aubergine* (solanum melongena) in the development of microorganism . Five species of bacteria are used ; *Klebsiella pneumoniae, Eschrichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia, Pseudomonas aeruginosa,*,The results showed the possibleity of developing these microorganism on the manutactured medium.The highest growth ratio of bacteria occurred in *Klebsiella pneumonia* , *Eschrichia coli andPseudomonas aeruginosa*(+++),and followed by *Staphylococcus aureus* (++), and followed by *Streptococcus pneumonia*(+). it is also used a Finger printing *K. pneumonia* and E. coli – the results also appeared there are a few changes in these species in comparison with the standard media

المقدمة :

تعتمد تنمية الأحياء المجهرية وخصوصاً البكتريا المرضية والفطريات على استعمال أوساط زرعيه غذائية بسيطة أو معقدة توفر الطاقة اللازمة للفعاليات الحيوية لهذهِ الأحياء (الزيدي ،2000) حيث قادت العديد من الدراسات وخاصة دراسة العالمينPastor و Koch إمكانية تنمية البكتريا بإستخدام أوساط زرعيه مناسبة خارج جسم الكائن الحي (Stanier.,1987) إن عملية تنميه الاحياء المجهرية في المختبر تتطلب توفر جميع الاحتياجات الغذائية التي تحتاجها هذه الكائنات وهذه الاحتياجات موجودة في الأوساط الزرعية (Culturemedia) الداخلة في تكوين مجموعة من المركبات بشكل خليط متوازن من المواد الغذائية التي تحتاجها الأحياء المجهرية بنسب معينة وتسمح بنمو جيد (الزيدي،2000) وتعتبر الاوساط الزرعية الخاصة بتنمية الاحياء المجهرية ذآت أهمية في عزل وتشخيص هذه الاحياء ودراستها (Difco manuall.,1999) إن بداية الاهتمام بهذه الأوساط كان في النصف الثاني من القرن التاسع عشر ولايزال الباحثون حتى الوقت الحاضر يعملون على تخليق او تصنيع أوساط جديده سواء كانت أوساط طبيعية (Synthetic media) او نصف تركيبية (Semi synthetic media) مصنعة (Pirt.,1999;Cruickshank.,1975). إن الاحياء المجهرية تنمو وتتكاثر أينما تتوفر الظروف الملائمة لذآلك من عناصر كبيرة (C,H,O,N,P) ورقم هيدروجيني PH ودرجة حرارة (الخفاجي ،1990) . تقسم الاوساط الزرعية لقسمين رئيسيين :الأوساط الطبيعية (Nutural media) والأوساط التركيبية (Synthetic media) وتستخدم الاوساط الطبيعية على الغالب بتمية الجراثيم متغايرة التغذية (Heterotroph) فهي تتكون من مواد كيميائية وعضوية غير محدد التركيب مثل البروتينات والكاربوهيدرات حيث تحتاج البكتريا إضافة مواد كالدم والمصل والفيتامينات وغيرها من المواد أما الاوساط التركيبية وتستخدم بتنمية الجراثيم ذاتية التغذية (Autotroph) حيث تتكون هذه الاوساط من مواد كيميائية ذآت تراكيز معروفة

(Prescott.,2005;Cruckshank.,1980) وإن التراكيز العالية للمركبات والعناصر الدخلة في تركيب الوسط الزرعي ليس شرط في الحصول على نمو أفضل لأن العديد من المواد ذات تأثير سلبي إذا زاد تركيزها في الوسط الزرعي(الزيدي

،2000) وعند تحضير هذه الاوساط في دراستنا هذهِ تم مراعاة أن تكون كفوءة ومن مواد متوفرة ورخيصة الثمن وبمتناول اليد ولهذا.

هدفت الدراسة الىتنمية انواع بكتيرية مختلفة على الاوساط القياسية (Normal)والاوساط المصنعة (Manufactory) محليا (قشور الباذنجان) ،دراسة التغيرات الوراثية التي يمكن أن تحصل للأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة بتقنية الـ (Finger printing)

المواد وطرائق العمل

تحضير الأوساط الزرعية

حضرت الأوساط الزرعية حسب ماجاء في تعليمات الشركة المصنعة بالإعتماد على التعليمات المثبتة على العبوات الخاصة بالأوساط الزرعية وعقمت بالمؤصدة (Autocluve) بدرجة حرارة 121 مْ وتحت ضغط 15 باوند/انج^2 ولمدة 15 دقيقة ثم صبت بأطباق بتري وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة لغرض التأكد من عدم تلوثها . وحفظت عند درجة حرارة 4 مْ في الثلاجة حتى إستخدامها ، أما الأوساط الزرعية التالية حضرت حسب ماجاء عن (Macfaddin.,2000).

انواع الأوساط الزرعية القياسية التي تم استخدامها في التجربة

وسط أكار الماكونكي MacConkey agae medium

وسط الأكار المغذي Nutrient agar medium

وسط أكار Blood agar medium

وسط بكتريا الزوائف الزنجارية Pseudomonas agar medium

وسط المانيتول الصلب Mannitol salt agar

وسط المثيل الازرق Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

وسط مولرهنتون Muller Hinton Agar Medium

وسط قشور الباذنجان المحلي

حضر هذا الوسط حسب طريقة(السامرائي 2013)، تم وزن 60غم من قشور الباذنجان منزوعة الماء dehydratedمجففة ومطحونة بشكل جيد . وضعت في بيكر وأضيفت لها 1 لتر من الماء المقطر وغليت لمدة 5 دقائق ثم ترك ليبرد ثم رشح بعد ذلك بالشاش والقطن ثم غلي مرة ثانية أيضاً ولمدة5دقائق ثم ترك ليبرد رشح بالشاش والقطن وأكمل الحجم الى 1لتر من الماء المقطر أضيف له 15غم من الأكار لتحويل الوسط الى الحالة الصلبة عقم الوسط بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط1.5 باوند /انج2 ولمدة15 دقيقة ثم ترك ليبرد قليلاً صب بأطباق بتري نظيفة ومعقمة ثم ترك لمدة 24 ساعة في الحاضنة للتأكد من خلوها من التلوث .

تقدير النمو البكتيري بجهاز المطياف الضوئي Spectro photo mete للوسط القياسي Nutrient agar والوسط المصنع قشور الباذنجان عند الطول الموجي 600 nm /24 ساعة.

1- يحضر الوسط الزرعي Nutrient broth بعد عملية التعقيم ويحضر مستخلص قشور الباذنجان*Solanum melongena* بدون اضافة الاكار agar.

2- يوضع في تيوبات Plain tubes معقمة ونظيفة 5مل من المرق المغذي Nutrient broth ومستخلص قشور الباذنجان *Solanum melongena* وتترك في الحاضنة لمدة 24/ ساعة الاجل التاكد من عدم تلوثها .

3- بعد عملية التحضين يتم تلقيح الانابيب Plain tubes الحاوية على المرق المغذيNutrient broth ومستخلص قشور الباذنجان *Solanum melongena* بالبكتريا المستخدمة ولمدة 24/ ساعة لأجل الحصول على نمو .

4- نضع 1مل في Cuvette الخاصة بجهاز المطياف الضوئي من المزرعتين وبواقع ثلاثة مكررات .

5- نضع Cuvette في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer ويثبت مقدار الامتصاصية عند 600 nmويقارن مع Blanck الغير مزروع من الوسطين لمعرفة مقدار وكمية النمو الحاصل وتسجل القراءات .(الطائي ،2008)

الخصائص الجزيئية :Molecular characteristic

تنمية بكتريا الكليبسيلا والاشريكيا القولونية لإستخلاص DNA

حضر وسط الأكار المغذي Nutrient Agar الوسط القياسي ووسط قشور الباذنجان المصنع في دوارق زجاجية نظيفة بإذابة 23غم للوسط القياسي في 1لترمن الماء المقطر ،و60غم للوسط المصنع قشور الباذنجان في 1لتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة وبرد في ظروف المختبر إلى 40 مْ تقريبا، وقسم الوسط في أطباق بلاستيكية معقمة، ثم أخذتمسحة صغيرة بوساطة الناقل من مستعمرة مفردة نقية لكل من عزلة *Klebsiella pneumonia* و *Escherichiacoli* وزرعت بطريقة التخطيط ، ثم حضنت الأطباق في 37مْ لمدة 24 ساعة وبعد الحضانة وظهور النمو،لقح وسط المرق المغذي Nutrient broth السائل الموزع في مجموعة أنابيب اختبار والمعقم بالمؤصدة، بمسحة نشطة من النمو الجديد للأطباق المزروعة سابقا لضمان نقاوة العزلات، ثم حضنت الأنابيب الملقحة في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 37 مْ وسرعة اهتزاز100 دورة. دقيقة$^{-1}$ لمدة 24 ساعة، وبعد الحضانة قيست الامتصاصية بالمطياف عند الطول الموجي 600 نانوميتر لمعرفة أعداد الخلايا التي تكون مناسبة في الحصول على كمية جيدة من المادة الوراثية DNA .

استخلاص الحامض النووي (الدنا): DNA extraction

أجري استخلاص DNA من بكتريا *Klebsiella pneumonia* و*Escherichia coli* وفق طريقة (AL- Samarria T H., 2000) و كما يلي:

1- نقل حجم 1.5 مل من المزروع البكتيري في وسط المرق المغذي ووضع في أنابيب ابندورف بلاستيكية معقمة سعة 2 مل.

2- فصلت الخلايا في أنابيب الابندورف بعملية الطرد المركزي Centerifugation بسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة 5 دقائق لترسيب وتجميع الخلايا والتخلص من الراشح.

3- أعيد تعليق وحل الخلايا المترسبة في أنابيب الابندورف بإضافة 500 مايكرولتر من المحلول المحلل lysis buffer solution والمحضر بتراكيز 40 ملي مولر من مادة Tris - acetate و20 ملي مولر من مادة خلات الصوديوم Sodium - acetate و1 ملي مولر من Ethylene diamine tetra acetic (EDTA) acid مع 1% من مادة Sodium dodecyl sulfate (SDS) وزن/ حجم .

مزج الخليط بلطف لعدة مرات، ثم أضيف 165 مايكروليتر من محلول كلوريد الصوديوم NaCl ٥ مول / لتر، ثم قلبت أنابيب الابندورف رأساً على عقب يدويا عدة مراتٍ لتجانس المزيج، ثم طرد مركزياً بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.

4- نقل الراشح الى أنابيب ابندورف جديدة، ثم أضيف حجم 500 مايكروليتر من الكلوروفورم المبرد، ثم قلبت أنابيب الابندورفات رأساً على عقب يدوياً برفق بما لا يقل عن 50 مرة حتى يصبح المحلول حليبي اللون، ثم طرد المزيج في الأنابيب مركزيا بسرعة 1200 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق.

5- نقلت الطبقه العليا (المائيه) إلى أنابيب ابندورف جديدة أخرى، ثم أضيف الايثانول المبرد بتركيز 95% مع التقليب لترسيب الدنا، وطرد مركزيا بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق والتخلص من الرائق.

6- كررت عملية غسل الراسب في قاع أنابيب الابندورفات بإضافة ايثانول مبرد مخفف بتركيز 70% وطرد مركزيا بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 10دقائق ايضا.

7- بعد التخلص من الايثانول جففت الانابيب بوضعها مقلوبة على ورق نشاف نظيف لضمان زوال الاثر المتبقي للكحول.

8- أذيب الدنا المستخلص والخالي من الكحول الاثيلي في 20 مايكروليتر من Tris buffer EDTA– (TE). قدر تركيز الدنا الناتج ونقاوته باستعمال جهاز المطياف الضوئي Nanodrop في قياس امتصاصية طيف الاشعة فوق البنفسجية للعينات عند الطولين الموجبين 260 و280 نانوميتر. وتم التأكد من نجاح عملية الاستخلاص بترحيل الدنا على هلام الاكروز بتركيز 0.5 % تم حفظ الانابيب في الثلاجة عند 4مْ لحين الاستعمال لاحقا او عند - ٢٠ مْ للحفظ لمده اطول.

ترحيل DNA باستخدام هلام الاكروز

تم خلط 3ml من صبغة التحميل (Intron/korea) مع ٥ ml استخدام الترحيل الكهربائي لتحديد قطع الدنا بعد عملية الاستخلاص وفق Sam brook*et al.*,1989) تم تحضير هلام الاكروز بتركيز 0.5 بإذابة 0.5 غرام من الاكروز

في 100ml من 1XTBE buffer المحضر مسبقا . يسخنالاكاروز حتى الغليان ويترك ليبرد لدرجة 45-50 مْ. يضاف 5ml من محلول صبغة الاثيديوم بروومايد (10 mg/ml) . ويسكب الهلام في الطبق المخصص له بعد تثبيت المشط . ويسكب هلام الاكروز برفق ويترك لمدة ٣٠دقيقة ليتصلب تماما ثم يوضع في خزان ويضاف 1X TBE buffer بكمية بحيث تغطي سطح الهلام ثم يزال المشط برفق لمنع تكون الفقاعات . وتم ترحيل العينات عند تيار كهربائي 7v لمدة من نصف ساعة او الى ان تصل الصبغة الى قرب نهاية الجانب الاخر من الهلام . تم اختبار الهلام على مصدر الاشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 336nm .

تحديد التغايرات في البصمة الوراثية باستخدام الانزيم القاطع

تم تقطيع الدنا باستخدام انزيم Nco1 طبقا لطريقة عمل الشركة المصنعة وحسب الجدول التالي

الحجم	المادة
5 µl	DNA
3 µl	R. E.
1.5 µl	Buffer
µl٥2.	DW
hour١37º **C** /	Temperature/Time

Reaction condition of Restriction Enzyme (Nco I) (500U) **(Biolab/newengland)**

ترحيل الدنا باستخدام هلامboly acrylamide

1- تم تحضير ٣٠% w/v من اكرلمايد – بس اكرلمايد وذلك بوزن ٢٩غم من اكرلمايد و١غم من بس اكرلمايد وذوب في ماء مقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل

2- رشح خليط الاكرلمايد – بس اكرلمايد من خلال استخدام فلتر دقيق (0.45 µn) للحصول على خليط نقي تم حفظ المحلول الاساسي في قنينة معتمة عند٤ مْ

طريقة تحضير هلام الفصل

هلام الفصل المستخدم في هذه التجربة ذات تركيز (٨%) حيث تم اخذ ٤مل اكرلمايد –بس اكرلمايد (٣٠%) واكمل الحجم الى ١٥ مل TEB 0.5X ثم اضيف ١٥٠مايكرو ليتر من ١٠% امونيوم برسلفيت المحضر انياً . و٢٠ مايكروليتر من مادة TEMD ويخلط المزيج جيد وبسرعة لفترة محدودة ويسحب المزيج باستخدام ماصة ويتم صب المزيج بين الوجهين الزجاجيين باستخدام اسرنجة الى ان يصل الى حافة اللوح الزجاجي السفلي ويوضع المشط ويترك يتصلب من ٢٠-٣٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرقة

تحميل العينات

يتم اضافة بفر الترحيل 1X TBE في الخزان الداخلي لحين وصوله الى المشط . يتم رفع المشط ببطء وحذر لمنع تكون فقاعات وتخلط العينات مع حجم مماثل من بفر التحميل ، اومحلول التحميل Loading solution ثم ياخذ ٢٠ مايكروليتر وتحمل على العينة .

ظروف الترحيل الكهربائي

تم اجراء الترحيل الكهربائي باستخدام جهاز Mini-slab gel provided بدرجة حرارة الغرفة باستخدام بفر الترحيل المبرد مسبقاً 1X TEB . باسخدام 100V لمدة ساعتين بعد انتهاء عملية الترحيل ثم نقل الهلام الى حجمين التصبيغ وغمرة في محلول الصبغة 1X TEB مع ١٠٠ مايكروليتر من الاثيديوم بروميد 1mg/ml لمدة ٣٠ دقيقة مع التحريك برفق . تم اجراء ازالة الصبغة بغسل الهلام بتعريضه للاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 336nm وتم تصوير الجل باستخدام Document system.

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت البيانات إحصائيا باستخدام تحليل التباين (F test) (ANOVA) ، وقورنت المتوسطات الحسابية للمعاملات بإستخدام اختبار دانكن متعدد الحدود Duncun Multiple Range بمستوى معنوية ($P< 0.05$) بتطبيق البرنامج الإحصائي Minitab

النتائج والمناقشة

١- كفاءة وسط قشور الباذنجان

اغلب الأحياء المجهرية تتسم بكونها ذات متطلبات غذائية بسيطة .ان احتواء الوسط الجديد على العناصر الاساسية إضافة لمصدر النايتروجين والكاربون والتي تعتبر من اهم المكونات التي تجعل البكتريا قادرة على القيام بالفعاليات الحيوية الأساسية والتكاثر والنمو .ان معدل نمو الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة المستخدمة في الدراسة وكذلك الانواع الفطرية نمت بشكل جيد مقارب واحيانا اعلى في بعض الانواع الفطرية في الوسط المصنع قشور الباذنجان مقارنة بالوسط القياسي ان معدلات النمو الجيدة تفسر احتواء وسط قشور الباذنجان على مكونات اساسية تلائم نمو البكتريا السالبة والموجبة والانواع الفطرية ذات التباين في احتياجاتها الغذائية (Cruickshank.,1975).

ان كمية 60غم من قشور الباذنجان اللازمة لتحضير لتر من الوسط كافية لحدوث نمو مقارب للاوساط القياسية اوساط السيطرة حيث تشيرالنتائج الى ان طريقة تحضير هذا الوسط ملائمة وتحتوي على المصادر الضرورية للفعاليات الحيوية لنمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والفطريات . اضافة الى ان هذا الوسط غير مدعم بأي مادة اضافية في تشجيع نمو البكتريا . و التحليل الكيميائي الذي اجري على قشور الباذنجان يشير الى محتوى جيد من المواد الكاربوهيدراتية والبروتينية بالإضافة الى العناصر الاساسية للنمو

٢- نمو الانواع البكتيرية على الاوساط القياسية والمصنعة بطريقة طيف الامتصاص (Spectrophotometer)

اختبرت الانواع البكتيرية لمعرفة مدى قدرتها على النمو وكفاءة الوسط المصنع للأنواع السالبة والموجبة لصبغة كرام . حيث كان اعلى متوسط أمتصاص لبكتريا *E.coli* ، 0.350 nm للوسط القياسي والوسط المصنع وبكتريا *S.aureus* و*P.aeruginosia* و *S.pnumoniae* بمتوسط امتصاص 0.190 nm وبكتريا *S.pneumoniae*0.128 nm بينت النتائج وجود زيادة في نمو بكتريا *E.coli*على الوسط المصنع عند طيف امتصاص 600nm مقارنة بالانواع البكتيرية الاخرى . وبقية الانواع كانت اقل نمو ومتقاربة فيما بينها من حيث النمو ، اختلاف نمو الانواع البكتيرية يعود لقابلية وقدرة كل بكتريا على النمو ومدا قدرتها على التكاثر وتمثيل المواد الغذائية والعناصر المعدنية ، ان زيادة نمو بكتريا القولونية *E.coli* يعود لأحتياجاتها البسيطة للمواد الغذائية ومتطلبات النمو والتكاثر (Pellet.,1976).

ما متوسط الوسط ، فقد كانت امتصاصية بكتريا *S.aureus*0.204 عند طول موجي nm 600 للوسط القياسي و0.178 للوسط المصنع قشور الباذنجان ،وبكتريا *P.eaeruginosa*0.202 للوسط القياسي و0.164 للوسط المصنع واعطت بكتريا *K.penuomonia* 0.137 للوسط القياسي و0.118 للوسط المصنع وابدت بكتريا *E.coli*0.349 للوسط القياسي و0.352 للوسط المصنع ،أما بكتريا *S.penumoniae* اعطت نمو0.202 للوسط القياسي و0.161 للوسط المصنع .وبينت نتائج معدلات النمو للأنواع البكتيرية *S.aureus* و *P.eaeruginosa* و*S.penumoniae* عدم وجود فروق معنوية عند مستوى $P< 0.05$ اما بكتريا *K.penumoniae* و*E.coli* من خلال معدلات النمو حيث بينت وجود فروق معنوية عند مستوى $P< 0.05$ مع الانواع البكتيرية الأخرى. ان معدلات النمو المتباينة بين الوسطين من حيث الامتصاص دلت على امكانية استخدام مستخلص قشور الباذنجان كوسط لتنمية البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام . ان مستخلص قشور الباذنجان يحتوي على مكونات فعالة وخاصة ومشابهة للمكونات التي يحتويها الوسط القياسي فهو يحتوي على أملاح وبروتينات وعناصر معدنية ساعدت لجعله وسط تنمو علية البكتريا بكفاءة عالية (Dagleish.,2008)

جدول (1) معدل نمو الانواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام على الأوساط القياسية المرق المغذي (Nutrient broth) والأوساط المصنعة مستخلص قشور الباذنجان بجهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)عند طول موجي 600 nm خلال 24 ساعة.

نوع البكتريا	نوع الوسط	الزمن خلال/24 ساعة			متوسط الوسط	متوسط نوع البكتريا
S.aureus	قياسي	0.208	0.203	0.202	0.204	0.191
	مصنع	0.180	0.174	0.180	0.178	B
p.aeruginosa	قياسي	0.200	0.197	0.209	0.202	0.183
	مصنع	0.153	0.184	0.155	0.164	B
k.pnumoniae	قياسي	0.146	0.132	0.132	0.137	0.128
	مصنع	0.116	0.120	0.118	0.118	C
E.coli	قياسي	0343	0.348	0.355	0.349	0.351
	مصنع	0.348	0.348	0.359	0.352	A

S.pneumoniae	قياسي	0.200	0.205	0.201	0.202	
	مصنع	0.195	0.170	0.117	0.161	0.182 B

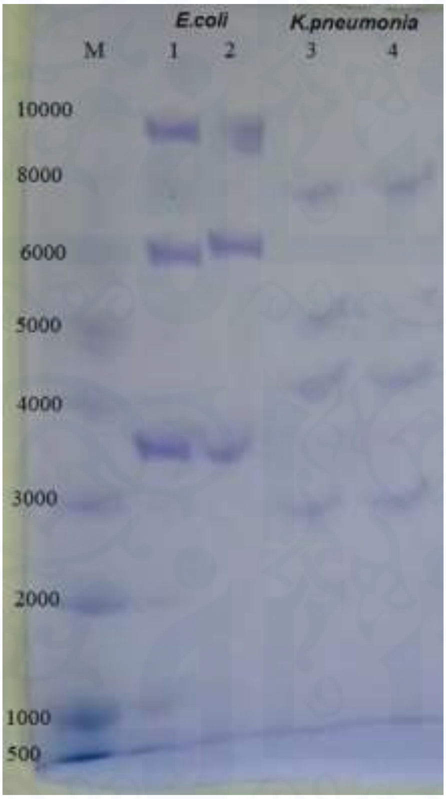
*** الاحرف المتشابهة عامودياً تعني عدم وجود فروق معنوية عند مستوى0.05 >P**

*** الاحرف المختلفة عامودياً تعني وجود فروق معنوية عند مستوى0.05 >P**

3- تاثير الوسط الزرعي على النمط الحزمي

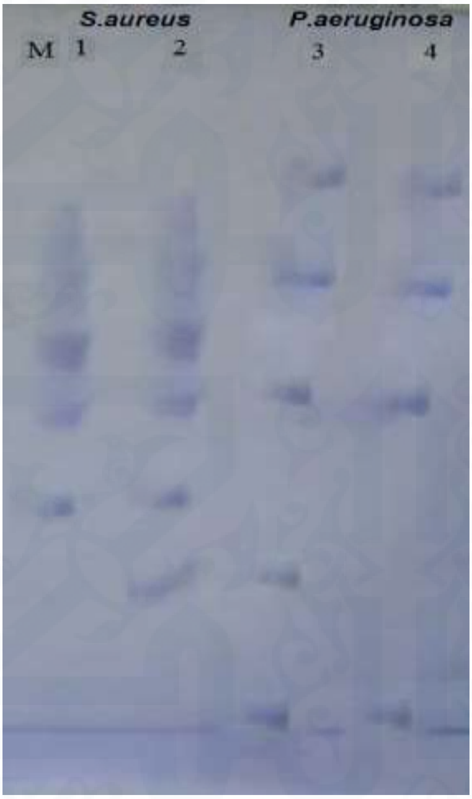
من خلال تنمية بكتريا *Klebsiella penumonia* و *Escherichecoli* على كل من للوسط القياسي والوسط المصنع واستخلاص الدنا والتقطيع بواسطة انزيم (Nco I)والترحيل على هلام البولي اكرلمايد .حيث بينت النتيجة عدم وجود تغير في النمط الحزمي بين كلا الوسطين للنوعين سابقين الذكر. وعلى ذالك فأن هذا الوسط المصنع لا يؤثر على النمط الحزمي لهذه البكتريا عند اجراء فحص البصمة الوراثية Fingerprinting، على نقيض ذلك أظهرت نتائج التقطيع في دراسة جديدة (الدلوش، ٢٠١٧) لبكتريا *Staphylococcus aureus*و *Pseudomonas aeruginosa* المنماة على وسط قياسي ووسط مصنع اخر (النخالة) تبايناً ملحوضاً في النمط الحزمي مما يدل على عدم ثبات نمط البصمة الوراثية عند تغير الوسط لكلا النوعين للبكتريا حيث ظهرت حزمة جديدة لبكتريا *Staphylococcus aureus* على الوسط المصنع بحجم pb ٢٠٠٠ تقريبا ، مما يدل على ظهور موقع قطع جديد على الوسط المصنع . واختفت حزمة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على الوسط المصنع ، بحجم2400 pb تقريباً، مما يدل على إختفاء موقع القطع في تلك المنطقة . وهنا نستنتج ان تغير نوع المغذيات والظروف البيئية لعدة انواع بكتيرية يؤدي الى تغير النمط الحزمي عند إجراء تحليل البصمة الوراثية . ومن هنا لايمكن

تعميم النمط الحزمي لأنه يتغير بتغير الوسط الزرعي ويعد خاص لمجموعة البكتريا قيد الدراسة في ظروف التجربة المحددة . مثال على ذلك تحليل البصمة الوراثية التي اجريت من قبل(AL- Samarria T H. *etal*., 2000)على بكتريا*Pseudomonas aeruginosa* . وحسب علمنا تعد هذه النتجة الاولى من نوعها حيث لم يتم التطرق سابقا الى تأثير مكونات الوسط الزرعي على نتائج التغاير في النمط الحزمي عند اجراء تجارب البصمة الوراثية للبكتريا .



شكل (١) نمط التقطيع الحزمي بأستخدام انزيم (Nco 1) لبكتريا *E.coli* و *K. Pneumonia* للوسط القياسي والمصنع .

٣،١ الوسط القياسي Nutrint agar ٤،٢ الوسط المصنع قشور الباذنجان .



شكل (٢) نمط التقطيع الحزمي بأستخدام انزيم (Nco 1) لبكتريا *S,aureus* و *P.aeruginosa* للوسط القياسي والمصنع .

٣،١ الوسط القياسي Nutrint agar ٤،٢ الوسط المصنع من نخالة الحنطة. (الدلوش، ٢٠١٧)

٥- المصادر:

- **الخفاجي** ، زهرة محمود. (١٩٩٠). التقنية الحيوية .جامعة بغداد وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .دار الحكمة للطباعة والنشر .
- **الدلوش** ، صباح جمال صباح.(٢٠١٧) تنمية مجموعة من الفطريات والبكتريا على الالقياسية والاوساط المصنعة من نخالة الحنطة وفحصها جينيا بتقنية Finger brinting . رسالة ماجستير قيد الدراسة ، كلية التربية جامعة سامراء .
- **الزيدي** ، حامد مجيد .(2000) . علم الأحياء المجهرية . جامعة بغداد . وزارة التعليم العوالبحث العلمي . دار الحكمة للطباعة والنشر .
- **السامرائي** ، ياسمين حميد جاسم محمد. (2013). دراسة كيميائية حياتية لأنتج أوساط غذائيةزرعية ميكروبية من مصادر نباتية محلية ودراسة أهم المكونات الكيمائية لها . رسالة ماجستير. كلية التربية . جامعة سامراء .
- **الطائي** ، محمد ابراهيم (2008) دراسة مدى تحمل بكتريا Rizobium Leguminosarum bv.viciae مجلة التربية والعلم – مجلد 21 العدد ٤كلية علوم البيئة وتقاناتها ،جامعة الموصل.

- **Cruickshank**,R.;Duguid.,J.P.;Marmion.,B.P.and.Swain.R.H.(1980).Medical Microbiology (The practice of medical microbiology) 12th ed. Churchill Livingstone , England.
- **Cruickshank, J.P.** Medical Microbiology12th .VOL.2.Edinburgh London and New York. Published by Churchill Livingstone (1975).
- **Difco,.** Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical laboratory Procedures. 9th-ed. Difco laboratories incorporated, Detroit, Michigan, (1999).
- **Macfaddin** , J.F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3ed ed. The Williams and Wilkins-Baltimor USA. PP. 51- 482.
- **Al-Samarrai** ,T. H., and Schmid,J.(2000). A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in applied microbiology*, 30(1): 53-56.

- **Stanier**, R.Y.; Ingrahm, J.L.; Weelis.M.L., and Painter, P.R" General Microbiology".5th ed. MacMillan Education LTD. London. (1987).
- **Pirt,** S.,I. principle of Microbe and Cell Cultivation. Blackweel. Scientific Publication , Oxford ,London.1999.
- **Al-Samarrai** ,T. H., and Schmid,J**.**(2000). A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in applied microbiology*, 30(1): 53-56.
- **Prescott** ,L .M .Hearley ,J.P.Klein,D.A.Microbiology.W.M.C.New York. Brown publisher, (2005) Published by Difco Laboratories Inc., Detroit.
- **Pellet**, P.L and Shadarevian, S. Food Composition-2-nd-ed. American university of beriut , beriut , Lebanon.(1976).
- **Dagleish**,M.P. ;Barley,J.J; Finlayson, R.J and Foster,G.*Brucella ceti* associated pathology in the testicle of harbour prorpoise.J.ofComparative pathology , 139(1) 54-59 (2008).
- **Sambrook**, Joseph ,Edword F.Fritsch, and tom Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. No . Ed.2.Cold spring harbor laboratory press,(1989).