P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :24-35

دراسة التباين الجزيئي للعزلات المرضية لبكتريا الزوائف الزنجارية لجينات phzM , pvdE, toxA 16srRNA الخاصة بالضراوة والصفات التشخيصية

احمد محمد يوسف* احمد محمد تركي** احمد عبد الجبار سليمان***

*وزارة الصحة – دائرة صحة الانبار
**جامعة الانبار – كلية العلوم
***جامعة الانبار – مركز دراسات الصحراء

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٠٠/٠٠/٢٠١٣
تاريخ القبول: ٦/٥/٢٠١٤
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127584

الكلمات المفتاحية:
PCR,
antibiotic resistance,
Pseudomonas aeruginosa.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة الحالية جمع ٤٣٨ عينة سريرية من مستشفى الرمادي التعليمي العام و ٥٠ عينة من التربة خلال المدة الممتدة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية أشباط ٢٠١٥ للتحري عن وجود بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وقسمت العينات حسب مصدر عزلها الى ٤٠ عينة من الحروق و الجروح و الأدرار و من التهابات الأذن و ١٠ عينة من التربة. أجري فحص أختبار الحساسية لجميع العزلات البكتيرية المنتخبة والبالغ عددها ٥٠ عزلة أتجاه ١٢ نوع من المضادات الحيوية بطريقة الأنتشار على الأطباق وكانت جميع العزلات المنتخبة من الحالات المرضية مقاومة لثلاثة أنواع من هذه المضادات وبنسبة ١٠٠% وهي Amoxicilline , Ampicillin , Penicillin في حين تباينت هذه العزلات في مقاومتها لبقية المضادات الحيوية. كما أبدت العزلات المنتخبة من التربة حساسية عالية أتجاه جميع هذه المضادات وبنسبة ١٠٠% ماعدا مضادين Ampicillin , Penicillin وبنسبة ٦٠ % و ٧٠ % على التوالي.كما تم التحري عن التباين الجزيئي لهذه العزلات في جينات الضراوة وتم تاكيد التشخيص باستخدام الملعم الجزيئي 16srRNA بعد ان تم تصميم البرايمرات الخاصة لكل جين من جينات عوامل الضراوة والجينات التشخيصية لهذه العزلات البكتيرية بأستخدام البادئات , pvdE , 16s rRNA , tox A , phzM أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاگاروز أمتلاك جميع عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على جينات عوامل الضراوة واحتوت بعض الجينات على تغايرات في بعض القواعد مقارنة بالموجود في موقع NCBI في حين تم تاكيد التشخيص باستخدام 16SrRNA.

المقدمة

في مملكة البكتريا قسم *Pseudomonas* تصنف بكتريا ورتبة Scotobacteria وصنف Gracillicutes ضمن عائلة Pseudomonadalas Pseudomonadacea وتضم٢٩ نوع حرة المعيشة وممرضة انتهازية للإنسان والحيوان والنبات. حيث يوجد نظامين لتصنيف الكائنات التي تعود إلى هذه العائلة النظام الأول يعتمد على الصفات المظهرية إما النظام الثاني فيعتمد على وفقا لهذا النظام قسمت هذه rRNA و DNA التشابه بين ———— العائلة إلى خمسة مجاميع هي (group1, group2, group3, group 4, group5) ووضع هذا النظام على يد الباحث (1). تعد بكتريا الزوائف Pseudomonas عصوية سالبة لملونة كرام يتراوح حجمها بين (٠.٥–١) مايكرو متر عرضا و (١.٥– ٥) مايكرو متر طولا" ومنتظمة بشكل خلايا مفردة أو سلاسل قصيرة على شكل عصيات مستقيمة أو منحنية متحركة بواسطة سوط قطبي واحد مفرد أو سوطين وفي بعض الأحيان تكون الأسواط غير قطبية ويعد عدد الأسواط وترتيبها من الصفات. الأساسية لتصنيف الأجناس التي تعود إلى

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science
E-mail address:

مجموعة Pseudomonas (٢). تعد بكتريا Pseudomonas aeruginosa من الأنواع المهمة سريريا" لأنها ذات أمراضية متعددة وتعتمد على عدد واسعاً من عوامل الضراوة وتكون لها القدرة على استهداف طائفة واسعة وهذا بسبب قدرتها على التنوع الأيضي مسببة بذلك التهابات ذات الرئة والتهابات العظام والتهابات الجلد والجهاز الهضمي و انتان الدم والتهاب بطانة القلب وأخماج الجروح والحروق (٣).وتعد بكتريا الزوائف الزنجارية انتهازية ذات ضراوة عالية وتزداد الإصابة بها لدى المرضى الذين يعانون من نقص في بعض الآليات الدفاعية او المرضى الذين يتعاطون جرعات مستمرة من الأدوية المثبطة للمناعة مثل مرضى السرطان ومرضى زراعة الكلى وغيرها بالإضافة إلى مرضى الحروق الشديدة وإصابات الأطفال الخدج (٤). تمتلك العديد من السلالات التابعة لبكتريا الزوائف الزنجارية عوامل ضراوة virulence factors متعددة تساهم في قدرة هذه البكتريا على التغلب على الوسائل الدفاعية لخلايا المضيف وتحطيم الخلايا والقدرة على تحليلها و الاستفادة من المواد الناتجة في النمو و التكاثر ومن هذه العوامل هي الإنزيمات و الذيفانات و الصبغات وكذلك تملك هذه البكتريا الأهداب و الاسواط التي تلعب دورا مهما في التصاق البكتريا بخلايا المضيف وأحداث الإصابة. ومن أهم الإنزيمات التي تنتجها بكتريا الزوائف الزنجارية هي أنزيمات البروتيز proteases enzymes التي تحفز تفاعلات التحلل المائي التي تحطم جزيئات البروتين إلى أحماض آمينية وتحلل الآصرة الببتيدية في مواقع مختلفة ان التطور الكبير الذي حدث خلال العقدين الماضيين في استعمال التقنيات الجزيئية أدى إلى التعرف على الجينوم أو ما يسمى بالموروث والذي يمثل جميع المادة الحاملة للمعلومات الوراثية الخاصة لكل خلية أي يمثل جميع الجينات الوراثية الموجودة في الخلية وهي تمثل كل الجينات الموجودة في الكروموسوم أو البلازميد (٥). هذا الجينوم يحتوي على العديد من الجينات النوعية والمتخصصة والتي يعتقد أنها تسهل عملية تكييف هذه البكتريا للمتغيرات البيئية وبالتالي تعطيها الصفات المناسبة لتكيف هذه البكتريا داخل الجسم الحي وبالتالي إحداث الإصابة (٦). تمتلك البكتريا أكبر تسلسل لأزواج القواعد النتروجينية حيث تمتلك بكتريا Ps. aeruginosa أكثر من ٦ ملايين زوج قاعدي ، وبما يقارب ٥٥٠٠ جين. بينما بكتريا E. coli 4.6 مليون زوج قاعدي وما يقارب ٤٢٠٠ جين. يدل هذا العدد الكبير من الجينات أن للبكتريا القابلية على التكيف في بيئات عديدة ، وقد لوحظ أيضاً أن لها القابلية على التغاير المظهري والذي يؤدي إلى تقسيم المجتمع البكتيري على مجاميع تعبر عن مركبات السطح المختلفة ، وبهذه الستراتيجية تمكن البكتريا من الهروب من الدفاعات المناعية للمضيف (٧).

المواد وطرائق العمل

- جمع العينات : تم جمع (٤٣٨) عينة من حالات مرضية مختلفة شملت (الإدرار ، الحروق ، الجروح ، التهابات الإذن) من مستشفى الرمادي التعليمي العام وللفترة من تشرين الاول ٢٠١٤ ولغاية شهر شباط ٢٠١٥ وتم جمع (٥٠) عينة من التربة شملت مواقع مختلفة.
- تشخيص العزلات البكتيرية المنتخبة:أجريت الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتماد على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا (٨ و ٩) اضافة الى استخدام نظام (أبي ٢٠ للعائلة المعوية API 20) واخير تم استخدام التشخيص الكيموحيوي باستخدام جهاز Vitek 2 system.
- اختبار حساسية المضادات الحياتية: أُجري اختبار مقاومة المضادات الحياتية بطريقة الأقراص وحسب ما مذكور (١٠) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية التي هي قيد الدراسة للمضادات الحياتية باستخدام مجموعة من أقراص المضادات الحياتية المجهزة من قبل شركةoxoid البريطانية.

٤- استخلاص وتنقية الدنا الجينومي Extraction and purification of genomic DNA

استخلصت عينات دنا الجينومي للعزلات البكتيرية البالغ عددها ٥٠عزلة بكتيرية باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتريا المنتج من شركةGeneaid ذي الرقم التسلسلي GBB101

تفاعلات الـ PCR (تقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم البلمرة ال DNA)

أ- المحاليل المستخدمة في تفاعلات ال PCR

١-البادئات Primers :

يبين الجدول (١) البادئات النوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة والتي تستهدف جينات الهدف (pvdE,phzM , toxA , 16srRNA) وفقاً لما ذكر (١١) والتي جُهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من شركة (BIONEER)، وقد تمت إعادة تذويبها بحجم من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات الشركة

للحصول على محلول خزين لكل بادئ بتركيز (Pmol/µl١٠٠) ثم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة حرارة – ٢٠ مْ.

جدول (١) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

اسم البادئ	تسلسل القواعد 5→3	حجم ألجين المستهدف bp
phzM-F phzM–R	ACGATCATGC GGGTTTCCAT GCGAATTGAC CAAGGCCATC	454
toxA–F toxA–R	TTCCCAGGTAT CGTCGAGGT GGTAACCAGC TCAGCCACAT	297
16srRNA-F 16srNA-R	GAGAGAGGG CAACTCGCTAC ACAACCTGCT GGACTATCGC	188
pvdE-F pvdE-R	TCACTGGCTTCG TGATGGTC CGATGTCACCTT GGGCGATA	288

phzM البرايمر الخاص بصبغة البايوسيانين ، toxA البرايمر الخاص بصبغة الذيفانات الخارجية ، 16srRNA البرايمر المستخدم كجين تشخيصي ، pvdE البرايمر الخاص بصبغة البايوفردين.

٢ – محلول Robust Hotstart Ready mix :

استخدم هذا المحلول المجهز من قبل شركة (Kapa) بقوة (2X) المتكون من المحلول المنظم لعمل أنزيم البلمرة PCR والنيوكليدات منقوصة الأوكسجين dNTPs وأنزيم بلمرة الدنا buffer Taq DNA.

٣ – الدليل ألحجمي Marker :

استعمل دليل الدنا ألحجمي DNA Lader بحجم (100 Pb) زوج قاعدي والدليل 1Kbp والمجهز من شركة Kapa)) إذ تم استعماله كمؤشر لحجم قطع الدنا التي يمكن إن تظهر بعد إجراء تضاعف البلمرة المتسلسلة (PCR) حيث في البداية تم ترحيل الدنا الجينومي على هلام الاكاروز مع استخدام الدليل ألحجمي 1Kbp للتأكد من وجود الدنا لكل من العينات المستخدمة.

النتائج والمناقشة

١- العزل والتشخيص

بعد اجراء الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من مستشفى الرمادي التعليمي تم تشخيص ٤٠ نوع من البكتريا المرضية و ١٠ انواع من البكتريا المعزولة من التربة وذلك اعتمادا على الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام ApiE20 وكذلك

أ-التحري عن الجينات الضراوة باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل :

حضر مزيج التفاعل الرئيسي غير الحاوي على DNA المستخلص من العزلات البكتيرية لعمل تفاعلات الPCR تحت ظروف معقمة لكل جين من جينات الضراوة المستخدمة , toxA , 16rRNA) phzM , pvdE) وكل واحد من هذه الجينات على حدا. وتم تحضير مزيج التفاعل ٥٠ عينة DNA من هذه البكتريا بالاضافة الى ذلك تم اضافة عينة سيطرة سالبة لها مع البادئات التي من المفترض ان تعطي نتيجة سالبة لهذا النوع البكتيري ليصبح عدد العينات الكلية ٥١ عينة ثم وزع محلول التفاعل الرئيسي على انابيب ابندروف سعة ٠.٢ مللتر وبحجم ٢٢ مايكروليتر لكل عينة بعدها اضيف الى كل انبوبة ٣ مايكروليتر من DNA الخاص بكل عينة ليصبح الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر باستثناء السيطرة لا يضاف لها DNA. بعدها ادخلت في جهاز المبلمر الحراري باستعمال البرنامج المناسب وكما مبين في جدول (٢). ثم بعد ذلك حمل في هلام الاكاروز والمحضر بتركيز ١.٥% للكشف عن وجود الجينات.

أنتخب على ضوء نتائج تفاعل البلمرة التسلسلي للجينات ثم أنتخبت عزلة واحدة من كل جين وأرسلت الى أختبار Sequence لمعرفة تتابع القواعد النتروجينية لكل جين.

جدول رقم (٢) برنامج جهاز المبلمر الحراري الخاص بمزيج تفاعل الـ PCR للبادئات المستخدمة

الخطوات الرئيسية	عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة (م)
المسخ الأولي للـ DNA	1	5 min.	95
مسخ DNA القالب	——	45 Se.	93
ارتباط البادئ في القالب DNA	30	30 Se.	58 حسب نوع البادئ المستخدم
أستطالة البايئات المرتبطة	1	7 min.	72
الأستطالة النهائية	1	7 min.	72

استخدام جهاز الـ Vitek2. اذ اظهر الفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام بانها عصيات سالبة لصبغة كرام تنتظم بشكل سلاسل قصيرة غير مكونة للأبواغ ولا تمتلك كبسولة كما أستخدم نظام Api– E 20 لزيادة التأكيد لتشخيص هذه البكتريا ، أذ يعد هذا النظام من الاختبارات الكيموحيوية المهمة لتشخيص العائلة المعوية وبكتريا Pseudomonas وظهرت أن جميع العزلات المدروسة تعود إلى بكتريا

Pseudomonas aeruginosaعند مقارنة النتائج مع الدليل الخاص بهذا النظام. ولتأكيد هذا التشخيص بشكل نهائي وقاطع للعزلات البكتيرية المدروسة تم أستخدام جهاز الفايتك وظهرت أن هذه العزلات تعود إلى بكتريا الزوائف الزنجارية وبنسبة تشخيص ٩٤ – ٩٨ % وبحسب نوع العزلة ، ويعد هذا التشخيص ممتازاً وأستناداً الى نتائج التشخيص الزرعي والمجهري والاختبارات الكيموحيوية وأستخدام نظام Api – 20 E وأستخدام جهاز الفايتك حصلنا على ٥٠ عزلة تعود إلى بكتريا Pseudomonas aeruginosa وبشكل تشخيصي غير قابل للشك لذا فقد ظهرت في هذه الدراسة التي تم عزل هذه البكتريا من مصادر مختلفة سواء كانت حالات مرضية أو تربة تشابه في سلوكها اتجاه الاختبارات المظهرية والزرعية والكيموحيوية المستخدمة في تشخيص هذه البكتريا

– أختبار حساسية العزلات البكتيرية لبكتريا *Ps. aeruginosa* للمضادات الحيوية :

أجري أختبار حساسية عزلات بكتريا Pseudomona aeruginosa للمضادات الحيوية بطريقة الأنتشار حول الأقراص (كاربي – باور) في تحديد مدى حساسية أو مقاومة هذه العزلات البكتيرية أتجاه ١٢ نوع من المضادات الحيوية أعتماداً على قطر التثبيط للمنطقة المحيطة بأقراص المضادات ومقارنتها بأقطار التثبيط القياسية الواردة في (CLSI 2013) أذ يوضح جدول (٣) العدد الكلي للعزلات البكتيرية المختبرة وعدد العزلات البكتيرية الحساسة والمقاومة والمتوسطة للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

أوضحت النتائج أن معظم العزلات البكتيرية كانت مقاومة لأغلب المضادات الحيوية وهي نسبة مرتفعة للمقاومة وتكون متوقعة بالنسبة للعزلات المأخوذة من الحالات المرضية وهذا يكون متأتي من الأستخدام العشوائي والمفرط للمضادات الحيوية وبدون أستشارة طبية فضلاً عن أمكانية أمتلاك هذه العزلات البكتيرية الى آليات المقاومة المختلفة وتطويرها لهذه الآليات ضد أغلب المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج (١٢) على العكس من ذلك نجد أن العزلات التي عزلت من التربة قد أبدت حساسية عالية أتجاه المضادلات الحيوية المستخدمة في الدراسة عكس العزلات المرضية ، لذا كان الهدف من أجراء أختبار الحساسية والمقاومة للعزلات لمعرفة مدى تأثير هذه المضادات للعزلات البكتيرية بالمقارنة بالعزلات المستحصل عليها من التربة.

جدول (٣) تأثير المضادات الحيوية المختلفة أتجاه بكتريا Pseudomona aeruginosa

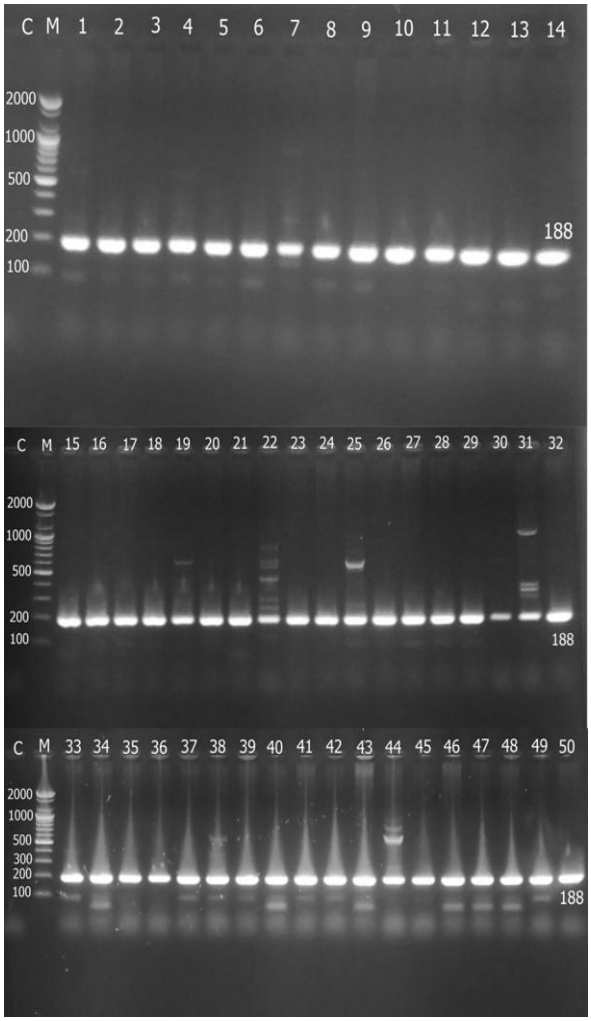
ت		1	2	3	4	5	6	7	8	9
موقع العزلات	أسم المضاد	Tobromycin	Chloromphicol	Amikacin	Cefotaxime	Penicillin	Ampicillin	Tetracycline	Amoxicillin	Naldixic acid
الجروح	R	1	9	2	8	10	10	10	10	10
	I	2	1	3	2	0	0	0	0	0
	S	7	0	5	0	0	0	0	0	0
مسحات الأذن	R	1	8	3	10	10	10	10	10	10
	I	2	2	2	0	0	0	0	0	0
	S	7	0	5	0	0	0	0	0	0
الأدرار	R	2	4	1	9	10	10	10	10	8
	I	0	4	1	0	0	0	0	0	2
	S	8	2	8	1	0	0	0	0	0
الحرق	R	3	6	2	7	10	8	10	5	10
	I	0	2	2	2	0	2	10	5	0
	S	7	2	6	1	0	0	0	0	0
التربة	R	0	0	0	0	4	3	0	0	0
	I	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	S	10	10	9	10	5	6	10	10	10

10	Vancomycin	3	2	5	4	2	4	3	1	6	4	2	4	0	0	10
11	Streptomycin	8	2	0	7	3	0	6	4	0	7	3	0	0	0	10
12	Ciprofloxcin	3	3	4	3	2	5	3	1	6	4	1	5	0	0	10

S: Sensitive I: Intermediate R: Resistance.

– الكشف عن جين16srRNA لبكتريا *Pseudomona aeruginosa* :

تم أجراء اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA باستخدام البادئ المستخدم للجين 16srRNA 188 bp الذي يقع في المنطقة الكروموسومية ، اذ ان هذا الجين يؤكد تشخيص هذه البكتريا التي تعود الية وبعد أجراء تفاعل **PCR**وترحيل نتائج هذا التفاعل على هلام الآگاروز بتركيز ١.٥ % وفحصه بالأشعة فوق البنفسجية ظهرت حزم ذات حجم جزيئي 188زوجاً قاعدياً للعزلات البكتيرية الخمسين مما يعني وجود الجين المستهدف لهذه العزلات صورة (١). في حين ظهرت العزلات التي تحتوي الأرقام (٢٥ ، ٣١ ، ٤٤) تحمل أكثر من نسخة لهذا الجين مما يؤكد نتائج التشخيص بالطرق الأعتيادية المظهرية مع الطرق الجينية من أن هذه العزلات تعود الى بكتريا ***Pseudomona aeruginosa***. ومن خلال النتائج وجد أن صفة هذا ألجين هي صفة سائدة في كل سلالات بكتريا الزوائف الزنجارية مما يعني أن هذا البكتريا تمتلك الجين الحامل للشفرة الوراثية الخاصة لصفة تشخيص هذه البكتريا 16srRNA وبذلك تشير هذه النتائج إلى أن هذا ألجين يعد جيناً تشخيصياً لهذه البكتريا من خلال تطابق نتائجه مع نتائج الفحوصات الروتينية التشخيصية وبذلك يتم الاستغناء عنها واستخدام هذا ألجين في تشخيص هذه البكتريا توفيراً للوقت والجهد والدقة العالية المتحصل عليها في تشخيص هذه البكتريا، إذ يعد التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية مهماً وذو نتائج وحساسية دقيقة جداً في مجال التشخيص، إذ أن التشخيص عن طريق الاختبارات الكيموحيوية يمكن من خلالها الحصول على نتائج ايجابية كاذبة لهذا وجهت الدراسة الحالية إلى استخدام الاختبارات الجزيئية من خلال التضخيم الجزيئي لجين 16srRNA ونتائجنا هذه جاءت متوافقة مع ما جاء به (١٣) حيث وجد ان جميع العينات المدروسة تحتوي ألجين 16s rRNA ومن خلال ما تقدم يعد التشخيص الجزيئي باستخدام 16srRNA مثالياً ويعطي نتائج دقيقة جداً لتشخيص العزلات البكتيرية إضافة إلى الاختصار في الوقت الجهد الذي تتطلبه عملية التشخيص الاعتيادي ، اذ توجد هناك ثلاثة جينات رايبوسومية 16srRNA ، 23srRNA ، 5srRNA يعد جين 16S rRNA تاريخياً هو الأكثر استخداماً لغرض التشخيص وذلك لقدرته العالية على أمتلاك عدد من النسخ الجينية المعتدلة التي تعود الى الجنس البكتيري الذي يمتلكه اذ تم العثور على جميع هذه الجينات في جميع أنواع البكتريا حتى المتعرضة منها للطفرات وذلك لأن جين 16srRNA يحتوي على بروتينات فريدة من نوعها تعطي معلومات أو إرشادات عن أي بكتريا تحتويها والتي تسهل في النهاية تشخيص هذه الأجناس البكتيرية العائدة لها.



صورة (١) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلية لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ 16s rRNA على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥

M % : الدليل الحجمي bp 188 C , : معامل السيطرة السالبة ، 50 – 1
: أرقام العزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

ومن خلال النتائج التي ظهرت في الصورة (١) لمنطقة التشفير لجين 16s rRNAوحجم 188 زوج قاعدي تم إرسال عينة من منطقة التشفير لهذا ألجين ولعزلة بكتيرية من العزلات الخمسين.

وأظهرت نتائج تطابق في تسلسلات بعد أجراء المقارنة مع بنك المعلومات وبحسب الموقع www.ncbi.nlm.gov ضمن الرقم التعريفي reflnc002516.2 ونقطة نجاح 6264404 وبنسبة توقع صفر كما في الشكل (١).

وجاءت نتائج هذه الدراسة متطابقة مع نتائج التشخيص في استخدام الاختبارات الكيموحيوية واستخدامها Api20E واستخدام جهاز الفايتك في تشخيص هذه العزلات أذ أظهرت نتائج التشخيص الأولي لهذه العزلة بأستخدام التشخيص الجزيئي تطابق عالي بلغ تقريباً ٩٩%. أذ يعد التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية مهم وذو حساسية عالية وذو نتائج دقيقة في مجال التشخيص أذ أن التشخيص عن طريق الأختبارات الكيموحيوية يمكن من خلاله الحصول على نتائج أيجابية كاذبة لهذا توجهنا في الدراسة الحالية الى أستخدام الأختبارات الجزيئية من خلال التضخيم الجزيئي لجين 16s rRNA ثم أستهدفت الى أجراء تحديد تباينات القواعد النتروجينية للقطع الناتجة من الجين التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية ، أذ وجدت هذه التتابعات تطابق جيني عالي لهذه العزلات المشخصة. أن وجود هذه العزلات المعزولة من مصادر مرضية مختلفة وتربة تعود الى بكتريا الزوائف الزنجارية بوساطة أستخدام التشخيص الجزيئي لجين 16srRNA نتائجنا هذه جاءت متوافقة مع ما وجده(١٤) في تشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من الحالات المرضية بوساطة جين 16s rRNA. وان الحزم التي ظهرت في هذه الدراسة تمثل الجينات المشفرة لهذا الجين وهذه النتيجه تتوافق مع ما توصل الية (١٥) من ان وجود هذا الجين كان متطابقا جينيا مع العزلات المستخدمه في التشخيص،،في حين كانت نتائج دراسة (١٦) متوافقه مع نتائج الدراسة الحالية اذ وجد أن هذا الجين استخدم في تشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية في حين شخص الباحث (١٧) ومن خلال ما تقدم نجد ان استخدام الجين 16s rRNA مثاليا من خلال التتابعات الخاصة به والتي اظهرت تطابقا في تسلسلاته واعطت نتائج دقيقة لهذا التشخيص من خلال قدرتها العالية على امتلاك نسخ جينية معتدلة تعود لهذا الجنس البكتيري والتي تسهل في النهاية تشخيص هذه البكتريا بدقة عالية واختصارا للوقت والجهد.

Pseudomonas aeruginosa chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of Matches: 1
Features:
16S rRNA-processing protein RimM
Query 1
GAGAGAGGGCAACTCGCTACGCGGGATGCAGATCTCGTAACC GGTGAAGGTGCGGGCCTC 60
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4196405
GAGAGAGGGCAACTCGCTACGCGGGATGCAGATCTCGTAACC GGTGAAGGTGCGGGCCTC 4196464

Query 61
TTCGCGATCGTCGAGCCCCTTGAGCTTGGCGGCCAGGACCTT GCCATGCAGGCGCCCCCT 120
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4196465
TTCGCGATCGTCGAGCCCCTTGAGCTTGGCGGCCAGGACCTT GCCATGCAGGCGCCCCCT 4196524

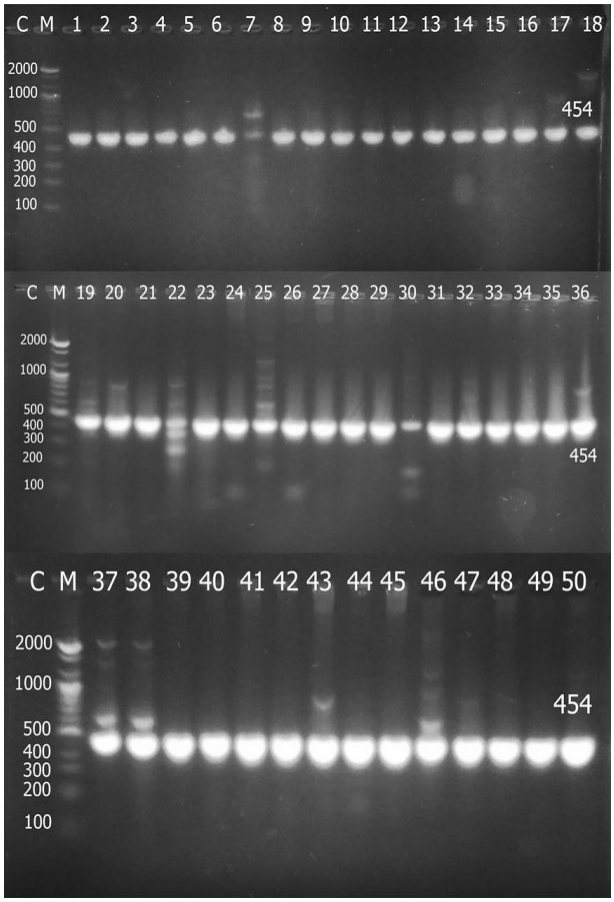
Query 121
GACCAGCTCGGCCTGCCGAATCTCGCCGTCGCGCCGGAGCG TCCAGCGGCGATAG 175
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4196525
GACCAGCTCGGCCTGCCGAATCTCGCCGTCGCGCCGGAGCG TCCAGCGGCGATAG 4196579

شكل (١) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين 16SrRNA

– الكشف عن جين phzM السؤول عن صبغة البايوسيانين في بكتريا *Pseudomona aeruginosa* :

لمعرفة فيما أذا كان هذا الجين موجود ومسؤول عن صفة ظهور صبغة البايوسيانين أستعمل البادىء phzM ذو الوزن الجزيئي ٤٥٤ زوج قاعدي وأظهرت الصورة (2) أحتواء جميع العزلات على الجين المسؤول عن أنتاج صبغة البايوسيانين ، أذ أن هذه العزلات أظهرت تبايناً في صفة أنتاجها للصبغة التي كشف عنها بالطرق الأعتيادية بأستخدام وسط King A أذ أن قسماً هذه العزلات لم تنتج هذه الصبغة بشكل كامل والقسم الآخر تباين في أنتاج هذه الصبغة من حيث شدتها

وقلتها في الوسط ومنه أنعكس هذا التباين على وجود هذا الجين في هذه العزلات التي أظهرت تبايناً واضحاً في صفاتها المظهرية ومحتواها من هذا الجين أذ وجد هذا الجين في جميع العزلات ماعدا العزلات ٢٢، ٢٣ ، ٢٦ في حين لم تظهر الصفة المظهرية لأنتاج الصبغة في قسم من هذه العزلات الحاوية على الجين على الرغم من أحتوائها على الجين ، وهذا التباين في الصفات المظهرية والجينية قد يكون عائد الى طبيعة المنطقة الجغرافية أو البيئية التي عزلت منها البكتريا والتي بدورها تؤثر بنوع العامل الوراثي وجين الكائن المجهري أضافة الى أن طبيعة المنطقة والتوزيع الجغرافي للعزلات ونوع ومكان جمع النموذج تؤثر على فعالية الجين في هذه البكتريا، وهذا يتوافق مع ما توصل الية الباحث (١٨) الذي وجد ان نسبة وجود الجين phzM في العزلات المرضية 100% وكذلك تتفق نتائجنا نوعا ما مع ما توصل الية (١٩) الذي توصل الى ان نسبة هذا الجين في العزلات المختلفة لبكتريا الزوائف الزنجارية 84% في حين تختلف نتائج دراستنا مع ما توصل الية (٢٠) الذي اشار الى ان نسبة هذا الجين 36% في العزلات التابعة لبكتريا ***Pseudomona aeruginosa***.



صورة (2) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلية لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ phzM على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % M

: الدليل الحجمي C 454 bp , : معامل السيطرة السالبة ، 50 – 1:
أرقام العزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

اوضحت نتائج التشفير الخاصة لصبغة البايوسيانين لبكتيريا الزوائف الزنجارية تطابقا بنسبة ٩٧% في التسلسلات مع بنك المعلومات www.ncbi.nlm.gov ذو الرقم التعريفي refINC 002516.2 شكل (٢) ولكن وجود طفرات في التسلسل ادى الى اختفاء الصبغة في بعض السلالات التي ارسلت للتتابعات على الرغم من وجود هذا الجين في جميع عزلات هذه البكتيريا ولكن عند الكشف المظهري لم تظهر هذه الصبغة في بعض العزلات وعند ارسالها لفحص التتابعات وجد نسبة تطابق عالية لوجود هذا الجين.

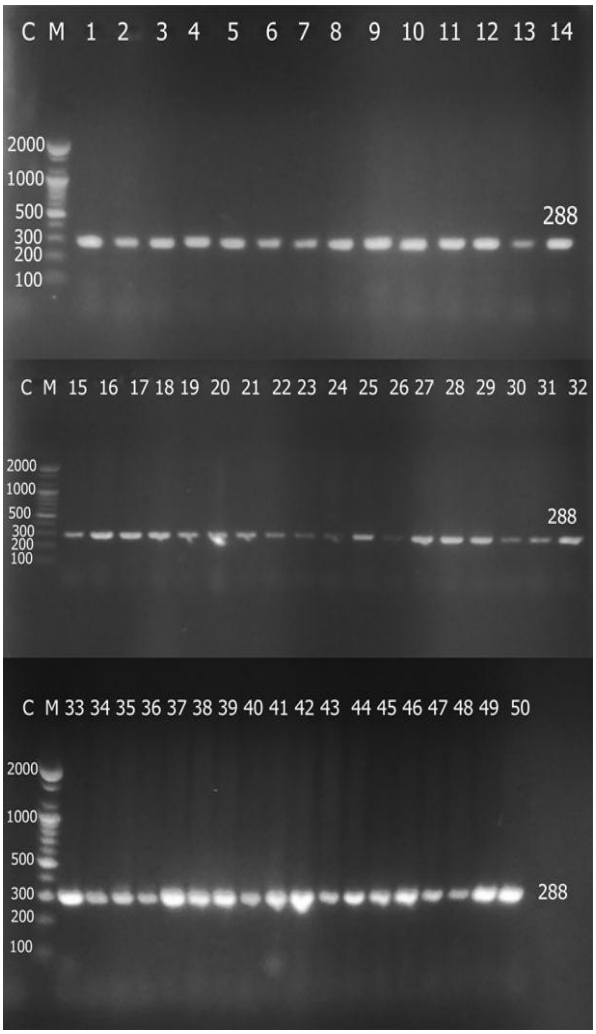
Pseudomonas aeruginosa chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of Matches: 1
Features:
phenazine-specific methyltransferase
Query 1 ACGATCATGC-GTTGGCCATCGGCAGGTCGACGATCCGCTCCACCGCGAAGCC GCCGCGC 59
Sbjct 4712111 ACGATCATGCGGGTTTCCATCGGCAGGTCGACGATCCGCTCC ACCGCGAAGCCGCCGCGC 4712170
Query 60 CCGAGCAGGTCGACCACCTCCTCGGTGGTGCGGTGACGGCC AGCGCAGGCCATGAACAGG 119
Sbjct 4712171 CCGAGCAGGTCGACCACCTCCTCGGTGGTGCGGTGACGGCC AGCGCAGGCCATGAACAGG 4712230
Query 120 TGCACGTGGGAGAGCACCGACATCGGCGACGGCTCGCTGGC CGAGATGGTCCGCTCG--- 176
Sbjct 4712231 TGCACGTCCCAGAGCACCGACATCGGCGACGGCTCGCTGGC CGAGATGGTCCGCTCGATC 4712290
Query 177 ACCACCACCCGGCCGTCGCCGGCCATCGCCTCGCGGCAATT GCCGAGCAATCGGAGGCTG 236

Sbjct 4712291
ACCACCACCCGGCCGTCGCCGGCCATCGCCTCGCGGCAATT
GCCGAGCAACCGCAGGCTG 4712350
Query 237
GCGGCTTCGTCCAGATCGCCGATGATCCGCGACAGCAGGTAG
ATATCGCCGTTGGACGGC 296
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4712351
GCGGCTTCGTCCAGATCGCCGATGATCCGCGACAGCAGGTAG
ATATCGCCGTTGGACGGC 4712410
Query 297
ACCTCTTGCAGCATGTCGCCGCCCACCAGGCTGACGCGCTCC
CCTGCCAACAGGCTGGAA 356
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4712411
ACCTCTTGCAGCATGTCGCCGCCCACCAGGCTGACGCGCTCC
CCTGCCAACAGGCTGGAA 4712470
Query 357
AGGTTGTCGCGGGCCACGCCGAGGGAACCCTCGCGGTCGAG
CATCACGCCCCGGGCGCTG 416
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4712471
AGGTTGTCGCGGGCCACGCCGAGGGAACCCTCGCGGTCGAG
CATCACGCCCCGGGCGCTG 4712530
Query 417 GGCTCGGCCTGCAGGATGGCCTTGGTCAATTCGC
450
||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4712531
GGCTCGGCCTGCAGGATGGCCTTGGTCAATTCGC 4712564

شكل (٢) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين phzM

– الكشف عن جين pvdEالمسؤول عن صبغة البايوفردين في بكتريا :*Pseudomona aeruginosa*

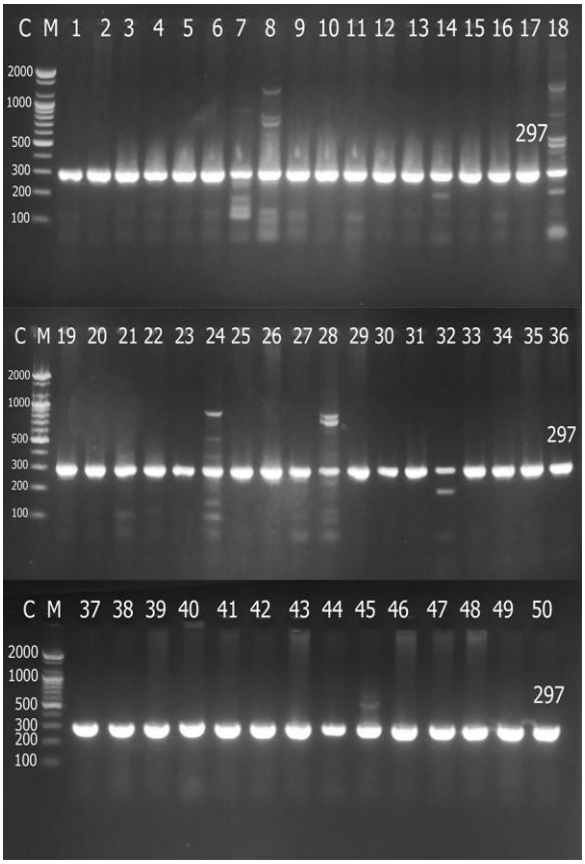
تم في هذه الد راسة البادىء pvdE ذو الحجم ٢٨٨ زوجاً قاعديا بأستخدام تفاعل PCR أذ أظهرت النتائج بعد الترحيل الكهربائي لهذا الجين على هلام الأگاروز ١.٥ % وفحصه بالأشعة فوق البنفسجية ظهور حزم الجين لكل العزلات وحسب حجمها الخاص البالغ ٢٨٨ صورة (٣) وباستعمال الخواص الجزيئية يمكن تمييز السلالات البكتيرية من خلال أمتلاكها لهذا الجين أذ أنه يمكن بهذه الطريقة أثبات وجود أي صفة لآي عزلة بكتيرية على العكس منه بالصفات المظهرية حيث تباينت هذه العزلات مظهرياً. لم تحتوي قسم من هذه العزلات على صبغة البايوفردين عند الكشف عنها مظهرياً في الوسط الزرعي King B بينما كان هذا الجين موجود في جميع العزلات وبهذا يمكن أستعمال الطرق الجزيئية لتمييز هذه السلالات البكتيرية من خلال أملاكها لهذه الجينات ويمكن أيضاً تشخيص أي نموذج بسهولة وسرعة فائقة على أنه يحتوي او لا يحتوي على هذه الصبغة ، من خلال تحديد او الكشف عن الجين المسؤول عن صفة أنتاج هذه الصبغة ، كما تعد هذه الطريقة سهلة ودقيقة للتمييز بين العزلات البكتيرية وكذلك تمييزها عن الفحوصات الروتينية التي تحتاج الى جهد ووقت طويل للكشف عن الصفات المظهرية ، ومن خلال ماتقدم نجد أن هناك عدم تطابق نتائج الأختبارات المظهرية التي أجريت للكشف عن وجود هذه الصفة مع نتائج الأختبارات الجينية التي أجريت للكشف عن وجود هذا الجين المسؤول عن هذه الصفة والذي ظهر في جميع العزلات البكتيرية ، غير أنه مظهرياً قسم من هذه العزلات لم تظهر وجود هذه الصفة ، وهذا جاء متوافقاً مع ما وجده (١٩) الذي اشار ان 5% من عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية المسببة لاتهابات المجاري البولية تكون غير منتجة لصبغة البايوفردين على الرغم من وجود الجين المسؤول عن انتاج الصبغة ، كما جاءت نتائجنا متوافقة نوعا ما مع ما حصل علية (٢٠) الذي توصل الى ان جميع العزلات المدروسة تحتوي على جين pvdE المسؤول عن الصبغة ولكن 25% من هذه العزلات غير منتجة للصبغة عند اختبار .لم ترسل العينات لكشف التتابعات للجين الخاص لصبغة البايوفريدين لعدم وجود تباينات في عملية التضاعف.



صورة (٣) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلية لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ pvdE على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % M : الدليل الحجمي C 288 bp , : معامل السيطرة السالبة ، 50 – 1: أرقام العزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

– الكشف عن جين tox A في بكتريا*Ps. aeruginosa* :

في هذه الدراسة ومن خلال أستخدام التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA وبأستخدام البادىء A tox ذو الحجم ٢٩٧ زوج قاعدي وبعد أجراء التفاعل وترحيل ناتج هذا التفاعل على هلام الآگاروز بتركيز ١.٥ % وفحصه بالأشعة الفوق البنفسجية ظهرت حزم هذا الجين في جميع العزلات البالغة خمسين عزلة ، وكذلك ظهرت حزم لأكثر من نسخة لهذا الجين ذو الوزن الجزيئي ٢٩٧ زوج قاعدي من العزلات البكتيرية التي تحمل رقم ٧ ، ٨ ، ١٨ ، ٢٤ ، ٢٨ ، ٣٢ مما يعني وجود هذا الجين في هذه العزلات بقوة صورة (٤) وهذا الأختلاف في تواجد هذا الجين طبيعي لكون أن تركيب هذا الجين يختلف من بكتريا الى أخرى وبحسب أختلاف أنواعها وأماكن عزلها لوجود تغايرات في تركيب هذه البكتريا وقد تصل نسبة هذا التغاير بالنسبة للنوع الواحد من البكتريا الى ٩٩ % من تسلسل الأحماض النووية وبالمقابل فأن هذه الشفرات الوراثية وتسلسل القواعد النتروجينية تختلف من بكتريا الى أخرى وبالتالي فأن البادىء المستعمل ينتج أكثر من حزمة من هذا الجين وجاءت نتائج دراستنا مقاربة الى ما توصل الية (٢١) حيث وجد ان 92% من العزلات تمتلك الجين toxA ووجد (٢٢) ان نسبة هذا الجين في عينات الحروق بلغت 97% بينما نسبتها في عينات الجروح 90% وهذا يتفق نوعا ما مع نتائج هذه الدراسة.



صورة (٤) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلية لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ toxA على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % M : الدليل الحجمي C 297 bp , : معامل السيطرة السالبة ، 50 – 1: أرقام العزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

اوجدت نتائج الدراسة ان مقدار التطابق لبكتريا الزوائف الزنجارية الخاصة بجين toxA كانت بمقدار ٩٦% عند مقارنتها مع بنك المعلومات www.ncbi.nlm.gov و ذو الرقم التعريفي reflNC 002516.2 والشكل (٣) يوضح نتائج التتابعات الخاصة لهذا الجين التي اظهرت وجود بعض التتابعات قد انعكست على امراضية هذه البكتريا في مختلف اماكن الاصابة لذا تم اختيار هذه العزلات التي

اظهرت طرز مختلفة لتضاعف وارسلت لكشف التتابع وجاءت نتائج دراستنا الحالية مطابقة مع ما توصل الية (٢٣) وان هذه العزلات تابعة لسلالة البكتيرية PAO1. في حين كانت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما وجدة (٢٤) في تشخيص هذا الجين العائد لبكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من الحالات المرضية المختلفة.

Pseudomonas aeruginosa chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of
Matches: 1
Features:
exotoxin A
Query 1
TTCCCAGGTATCGTCGAGGTTGCAGCGCTGCTGGGCGAGGTA
GTTGTAGACCCCGTCCAG 60
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1241763
TTCCCAGGTATCGTCGAGGTTGCAGCGCTGCTGGGCGAGGTA
GTTGTAGACCCCGTCCAG 1241822
Query 61
CGGGTCGAGCAGGCACAACCGATTGCCGCTGGCCCATTCGCT
CCAGCGCTTTTCCCGGCG 120
||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1241823
CGGGTCGAGCAGGCACAACACCTTGCCGCTGGCCCATTCGCT
CCAGCGCTTTTCCCGGCG 1241882
Query 121
CGGCTGGGCCTGGGCCATGACCACGCTGACCCCGGCATGGC
TGATGGCGAGCGT---CTG 177
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct 1241883
CGGCTGGGCCTGGGCCATGACCACGCTGACCCCGGCATGGC
TGATGGCGAGCGTCGGCTG 1241942
Query 178
CATCTCGTTGCTCTCGTGCGCCCTGACGAAGAAGGTGGCATC
GCGCGCCAGCTTCGCCAG 237
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1241943
CATCTCGTTGCTCTCGTGCGCCCTGACGAAGAAGGTGGCATC
GCGCGCCAGCTTCGCCAG 1242002
Query 238
CAACTCGTCGCCCATCTCGATGGTGTAAAGATCGGCGACATGT
GGCTGAGCTGGT 292
|||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1242003 CAACTCGTCGCCCATCTCGATGGTGT--
AGATCGGCGACATGTGGCTGAGCTGGT 1242055

شكل (٣) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين toxA

المصادر

1- Palleroni,N. J. (2003). Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus Pseudomonas : a personal view. Microbiology. 149(1): 1-19.

2- Aman Gupta, Vanashika Sharma, Ashish Kumar Tewari, Vipul Surender Kumar Sharma and Chakresh Kumar Jain. (2013). Comparative Molecular docking 130 analysis of DNA Gyrase subunit A in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Bioinformation, 9 (3) : 116-120.

3- Mahesh C. Sahu, Debasmita Dubey, Shakti Rath, Nagen K. Debata, Mala, B. R. ; Aparna , M ; Tasnkala , Mohini ; S. Ghatge and Vadanti ,V.D□.(2012).Molecular and Biotechnological aspects of Microbial proteases.Microbiolo.and Molcular Biology Reviews.VOL 62(3) :597 -635.

4- Prithiviraj , B. ; Bais , H. ; Weir , T. ; Suresh , B. ; Najarro, E. ; Dayakar , B. ; Schweizer , H. and Vivanco , J. (2005) Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicytic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and caenor habditis elegans. infect immune , 73 (9) : 5319 – 28.

5- AL-Gilawy, M. H. ; Al-Dulaimy, H. M. and Al-Aubaidy, A. M. (2011). Term in genetic engineering , pp: 54-55.

6- Ochman, H. ; Lerat, E. and Daubin , V. (2005). Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1:6595-6599.

7- Caballero , A.; Moreau, J.M.; Engel, L.S.; Marquart, M.E.; Hill, S.H. and O'Callaghan, R.(2001). Pseudomonas aeruginosa proteaseIV enzyme assays and comparison to other Pseudomonas protease. Anal. Biochem. 290 (2): 330-337

Pseudomonas aeruginosa PAK. J. Bacterial 172: 389-396.

17- Stover C.K.,Pham X.Q.,Erwin A.L.,P. Hikey.(2000).Complete genome sequence of Ps. Aeruginosa PAO1 an opportunistic pathogon. Nature , 406(6799).

18- Shirley Finnan , John P. , Fergal O Gara and Boyd E. (2004). Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolate from cystic fibrosis patients and the hospital enveronment. Microbiol P.5783-5792.

19- Aline Maria ,Mariana Carman and Ani Irown. (2013). Virulence markers in Pseudomonas aeruginosa isolates from hospital acqured infection occurred in patients with underlying cardiovasular disease.Biol. vol.18.N.6.

20- Hossein Esameili1 , Ali Khanjari and Fatemeh Gholami. (2015). Detection and characterization of Escherichia coli O157:H7 from feral pigeon in Qom province, Iran. Journal of Tropical Disease : 5(2) 116- 118..

21- Hui Shi,Quoclinh Trinh,Wentao Xu and Kunlum Huang. (2012).Auniversal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic Pseudomonas aeruginosa. Biotechnol 95:1579-1587.

22- Nibin VS,aslani MM and Sharafi Z. (2012). Molecular indentification and detection of virulence genes among Pseudomonas aeruginosa isolated from different infections origins.

23- Gendrin C. conteras. C. and S. Bouillot (2012). Structural basis of cytotoxity mediated by the type III secetion toxin Exou from Pseudomonas aeruginosa plos pathog. 8(4), el 1002637.

24- Vasil ML. ,Chamberlain C and Grant CR.(2007). Molecular studies of Pseudomonas aeruginosa exotoxin Agene. Immun 52: 538-548.

8- Baron ,E.J. and Finedgold , S.M. (1990) Diagnostic microbiology. 8th ed. Mosby –Year – Book. Inc. Missouri. USA.

9- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stalyt, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey`s manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Publication. 9th ed. London, New York.

10- Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuck, C.C.(1991).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO., Geneva. , PP: 78-110.

11- Arif,Sehand K. and Salih, layla I.F. (2010). Identification of Different Categories of Diarrheagenic Escherichia coli in Stool Samples by Using Multiplex PCR Technique. J. Medical Sciences. 2(5): 237-243.

12- Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada. J Antimicrob Chemother ;57:666–72.

13- Wathiq Abbas Al-Daraghi and Zaid Husamuldeen (2013). Detection of ExotoxinA gene in Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples. J. Al-Nohrain vol. 16(2).

14- Abbas Ali Fooledi ,Abdoulreza and Reza Nourani. (2012). Evaluation of the pathogensis of Pseudomonas aeruginosa flagellum befor and after flagellar gene knockdown by SiRNA.

15- Shuang – Hong chen , Rhi – youg chen , Xiong – Lixu and Wei – Bin Xiao. (2011). Microarray analysis and phenotypic response of Pseudomonas aeruginosa PAO1 under hyperbaric oxyhelium condition.

16- Totten , P. A., Lara, J.C., and Lory , S. (1990) characterization of the type a flagellin gene from

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :24-35

Molecular Variation Study of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for 16SrRNA,pvdE, toxA, and phzM Genes Related with Virulence and Characterization Features.

Ahmed M. Yuosif Ahmed M. Turkey Ahmed A. Suliaman

E.mail:

Abstract:-

This study includes collection of 438 clinical samples from Ramadi Educational Hospital and 50 of soil samples in period from Nov. 2014 to Feb. 2015, to isolate Pseudomonas aeruginosa and the resulted isolates were divided into 40 clinical isolates form burns, wounds , urine and ear inflammation, and 10 from soil.Antiobiotic sensitivity test were done against 12 antibiotic discs for all 50 selected isolates by disc diffusion method, and the results indicated that all clinical isolates were resistance to three types of antibiotics(Penicillin, Ampicillin, Amoxicilline) while they varied in their resistance to other antibiotics. The soil isolates were 100% sensitive to all antibiotics except for penicillin and ampicillin were resistance with 60%and 70% respectively.

Also the molecular variation for these isolates for virulence factors were detected and the characterization of bacteria was confirmed by checking 16SrRNA gene, after the specific primers were designed for each gene of virulence which included pvdE, toxA, and phzM also specific primer for 16SrRNA was designed. The results showed that the characterization of bacteria was confirmed by 16SrRNA gene detection and sequence and the isolates contain the virulence genes had some polymorphism in comparison with those in NCBI.