P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :80-89

العلاقة بين النمط الوراثي باستعمال تقنية BOX-PCR والازالة الحياتية للرصاص بوساطة بكتريا *Klebsiella pneumoniae*.

نهاد محمد حامد * احمد محمد تركي** حارث جبار فهد*** محمود مصطفى المهداوي **

*مديرية تربية الانبار
** جامعة الانبار – كلية العلوم
*** جامعة بغداد – كلية العلوم

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

DOI: 10.37652/juaps.2015.127608

الكلمات المفتاحية:
النمط الوراثي،
BOX-PCR،
الازالة الحياتية،
رصاص،
Klebsiella pneumoniae.

الخلاصة:

اختبرت الحالة الايضية لبكتريا *K. pneumoniae* و تأثيرها في الازالة الحياتية للرصاص حيث بينت النتائج وجود فروق معنوية عالية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ بين الخلايا الحية والخلايا المقتولة بالحرارة ،حيث كانت نسبة الازالة الحياتية للخلايا الحية (57.0 ±3.4) ملغم / لتر/ساعة ، بينما للخلايا الميتة (21.6 ± 2.5) ملغم / لتر . امكن اعادة ايونات الرصاص الممتزة باستعمال عدة محاليل غسل ، كان محلول (0.1M EDTA) الاكفاء اذ تم استرجاع (63.9 ± 5.6) ملغم/ لتر/ساعة ، وتمكن محلول (Na_2CO_3) من استرجاع (35.9 ± 2.6) ملغم/ لتر/ ساعة ، أما محلول (HCL) 0.1 M فقد استرجع (21.8 ± 2.6) ملغم/ لتر/ ساعة . بينت النتائج وجود فروق معنوية عالية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ بين محاليل الغسل. تم استخلاص الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية. كما تم اجراء تجربة لمعرفة العلاقة بين التنميط الوراثي والازالة الحياتية بطريقة البصمة الوراثية BOX – PCR و بينت النتائج ظهور ثلاث انماط وراثية وبنسبة تشابه 53 % وهي C1 و C2 و C3 فكانت نسبة التشابه للمجموعة الاولى 52 % والثانية 60 % والثالثة 100 % . أن نسبة الإزالة الحياتية لم تعتمد على نمط وراثي معين.

المقدمة

إن أهم الاسباب لحدوث التلوث البيئي هو من جراء فعاليات الإنسان التي تعد من أهم المخاطر المحتملة التي تهدد التوازنات الطبيعية نتيجة الإضافات الغير المرغوب فيها الي مكونات البيئة الطبيعية من غير المرغوب به في محيطنا كنتيجة مباشرة أو غير مباشرة لتدخل الإنسان (هوجز، 1989). أن اضافة المواد الكيميائية المتنوعة وخصوصا الفضلات لمياه الصرف الصحي الي الماء والهواء والتربة يؤدي الي حدوث تغيرات كبيرة في نقاوتها بسبب امتزاجها بالمواد الكيمائية (١) . وبصورة عامة فان التلوث البيئي يقصد به كل تغير كمي أو نوعي في مكونات البيئة الحية أو غير الحية بحيث لا تستطيع الأنظمة البيئية استيعابه مما يؤدي الي حدوث اختلال في توازنها (٢).

جنس *Klebsiella* يعود إلى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) وسميت بهذا الاسم نسبة إلى مكتشفها الألماني الأصل (Klebs) في القرن التاسع عشر (3) . بكتريا *K. pneumoniae* هي بكتريا عصوية الشكل ، سالبة لصبغة كرام ، غير متحركة وهي أهم اجناس بكتريا *Klebsiella* وهي عصيات صغيرة الحجم وتظهر تحت المجهر ذات حافات سميكة حيث ان حافاتها ذات تحدب نحو الخارج وذات نهايات مدورة (4) . تستعمل تقنية BOX PCR للتعرف على الطرز الوارثية ومدى التشابه و التباين بين العزلات المختلفة للبكتريا عند المقارنه بين العزلات المعزولة من بيئات مختلفة بطريقة البصمة الوراثية (5)

طرائق العمل

* Corresponding author at Anbar Education Directorate
.E-mail address:

جمع العينات:

جمعت العينات بوساطة عبوات زجاجية معقمة سعة (١) لتر إذ تم إدخال العبوة داخل حوض مياه وحدة المعالجة لمياه الصرف الصحي لمستشفى الرمادي العام إلى عمق(١٠- ١٥) سم، بعد ذلك فتح غطاء العبوة لملئها بمياه وحدة المعالجة ثم أغلقت العبوة وهي داخل المياه، وتم جمع خمس عينات كل خمس عشرة يوم وبواقع ثلاثة مكررات لكل عينةً. كما تم جمع نماذج من الادرار والقشع والحروق والتربة وبواقع مكررين لكل نموذج.

عزل وتشخيص العزلات البكتيرية:

أخذ قسم من العينة ومزج جيداً ثم نقل منه بوساطة ناقل معقم (Loop) وزُرع على أوساط الاغار المغذي وأغار الماكونكي وأغار الدم المعقمة، حضنت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة (٣٧) م لمدة (٢٤) ساعة.

اجريت الفحوصات المجهرية و المزرعية والاختبارات الكيموحيوية اعتمادا على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا شخصت المستعمرات النامية (6) . كما تم تأكيد التشخيص باستعمال نظام API 20 للعائلة المعوية وكذلك استعمل نظام Vitec 2 لتأكيد التشخيص.

تجربة الامتزاز الحياتي

تهيئة الخلايا البكتيرية:

نميت الخلايا البكتيرية المعزولة في وسط مرق نقيع الدماغ والقلب(Brain heart infustion broth)، وحضنت لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة (٣٧)مْ في حاضنة هزازة (١٠٠دورة/ دقيقة)، ثم جمعت الخلايا النامية بترسيبها بجهاز المنبذة بسرعة (٣٥٠٠ دورة /دقيقة) لمدة ٣٠ دقيقة، ثم غسلت الخلايا بالماء المقطر اللايوني المعقم (Deionized distilled water (DDW)) ثلاث مرات، بعدها علقت الخلايا بحجم معين من (DDW). اخذ ١ مل من عالق الخلايا وجفف في الفرن بدرجة (١٠٠) مْ لغرض استخراج الوزن الجاف (7) .

تحضير محلول الرصاص القياسي:

حضر محلول الرصاص بتركيز (١٠٠٠٠) ملغم/لتر وذلك بوزن (٠.٠٨)غم من نترات الرصاص $Pb(NO3)2$ واذيب في (٥٠٠) مل من الماء المقطر منزوع الشوارد المعقم والذي استخدم بوصفه محلولاً خزينأ (Stock solution) وتم ضبط الاس الهيدروجيني للمحلول بحدود ٤، عقم هذا المحلول بالترشيح (8).

تهيئة المازات الحياتية :

استخدمت العزلات البكتيرية كمازات حياتية لاختبار قدرتها على الامتزاز الحياتي للرصاص من المحاليل المائية. نميت الخلايا البكتيرية في وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infustion broth) باستخدام الحاضنة الهزازه بسرعة ١٨٠ دورة/ دقيقة لمدة(٢٤) ساعة وعند درجة حرارة (٣٧) م، ثم جمعت الخلايا باستخدام المنبذة المبردة بسرعة ٥٠٠٠دورة/ دقيقة لمدة (٣٠) دقيقة، ثم غسلت الخلايا بالماء المقطر منزوع الشوارد المعقم ثلاث مرات، بعد ذلك جمعت الخلايا في انابيب معقمة واعيد تعليقها في حجم معين من الماء المقطر منزوع الشوارد واخذ (١) مل من العالق وجفف بالفرن بدرجة (١٠٠)م لغرض استخراج الوزن الجاف(9).

الحسابات

لحساب حجم الخلايا البكتيرية المضافة إلى محلول الرصاص لغرض أعطاء تركيز نهائي في المحلول مقداره ٠.٥ ملغم (وزن جاف)/مل وحسب المعادلات الاتية (١٠):

الحجم (مل) = ١٠/الوزن الجاف لـ ١ مل من العالق (ملغم) . . ..(١).

التركيز الاساس (ملغم/لتر) = ((٢٠- الحجم المأخوذ)× تركيز السيطرة) /٢٠ ....(٢).

التركيز الممتز (ملغم/لتر)= التركيز الأساس- التركيز المتبقي . ...(٣).

تقدير التركيز المثبط الأدنى Estimation of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

اعتمادا على طريقة التخفيف بالأنابيب التي وصفت من قبل CLSI (٢٠١٣) وتم تحضير تراكيز مختلفة من الرصاص تراوحت بين (٥٠٠-٦٠٠٠ ميكروغرام/مل) أضيفت إلى الوسط الذائب من مولر هينتون السائل . تمت إضافة المعلق البكتيري المحضر وبكميه (١٠ مايكروليتر) . تم إضافة العالق البكتيري المساوئ الي عكارة ٠.٥ مكفارلاند القياسية الى كل أنبوبة باستثناء السيطرة. في حين احتوت أنبوبة السيطرة الموجبة على البكتريا ومرق المولر هنتون بدون الرصاص . تم حضن الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حراره ٣٧ م . بعد ذلك تم قراءة النتائج بالمقارنة بين السيطرة ألموجبه والسالبة . وعد التركيز الذي يظهر النمو بعد سلسلة عدم النمو هو التركيز المثبط الادنى.

دور الحالة الايضية في الامتزاز الحياتي

الغرض من التجربة لمعرفة هل أن الامتزاز الحياتي للرصاص بوساطة العزلة عملية معتمدة على الايض الخلوي أم انها عملية امتزاز فيزوكيمائي غير معتمدة على الايض الخلوي، وتم ذلك عن طريق قتل الخلايا؛ إي إيقاف النشاط الايضي الخلوي ثم اختبار قابلية الخلايا المقتولة على امتزاز الرصاص من المحاليل المائية، إذ تم قتل الخلايا البكتيرية للعزلة المستعملة عن طريق غلي العالق البكتيري بوساطة حمام مائي(١٠٠) م لمدة (٩٠) دقيقة، ثم استعملت طريقة العمل نفسها المستعملة مع الخلايا الحية.

استرجاع الرصاص الممتز من الخلايا :

تهدف هذه التجربة الى استرجاع الرصاص الممتز من قبل جدران الخلايا البكتيرية وذلك بغسل المازات الحياتية ببعض محاليل الغسل المناسبة مثل: محلول كاربونات الصوديوم (NaCO3) بتركيز (0.1)M، ومحلول حامض الهيدروكلوريك المخفف (HCl) بتركيز (0.1)M، ومحلول EDTA بتركيز (0.1)M.

بعد ان تمت عملية التماس بين المازات الحياتية للعزلة والعنصر ،غسلت الخلايا المحملة بالرصاص بهذه المحاليل ومزجت جيداً مع محلول الغسل وحضنت عند درجة حرارة (٤٠)م لمدة ساعة واحدة، ثم رسبت بالطردالمركزي المبردة وقيس تركيز الرصاص في الطافي بوساطة المطياف الذري اللهبي (١٠). وحسب تركيز الرصاص المسترجع حسب المعادلة الآتية (٦).

دراسة الطرز الوراثية بتقنية BOX-PCR

استخلصت عينات الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية البالغ عددها ١٣عزلة بكتيرية باستعمال نظام تنقية ال DNA (Genomic DNA Mini Kit, Geneaid, Thailand) وقيست نقاوة وتركيز الدنا باستعمال جهاز النانو دروب(Nano drop) .

الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الأكاروز Agarose gelحضرت المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي بحسب ما ورد في (11و تم تقدير الحجم الجزيئي لقطع الدنا بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي القياسي (1kb DNA Ladder). قدرت الأوزان الجزيئية للدنا اعتمادا على المسافات التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام (1.5% agarose) والتي تتناسب عكسيا مع أوزانها الجزيئية وباستعمال قطع من الدنا معروفة الوزن الجزيئي هي الدلائل الحجمية (Markers) إذ استعمل الدليل 1kb DNA) .

تفاعل السلسلة المتبلمر:

تم استعمال طريقه BOX PCR لأجراء التجربة للحصول علي المظهر الجيني ولمعرفه التباين في المقاومة الجينية بين العزلات المختلفة لبكتريا K. pneumoniae ومعرفه التباينات الجينية المختلفة عند المقارنة بين العزلات المعزولة من بيئات مختلفة بطريقة البصمة الوراثية (12).

تهيئة واختيار البادى

تم استعمال البادى (ʼ٥- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG ʼ٣) في تجربة PCRBOX اعتمادا علي ألطريقه المصممة من قبل Mungloo- Rujubaliet وجماعته ٢٠١٣، تكون حالة البادىء المصنعة من قبل الشركة المنتجة بهيئة مجففه ومجمده ومهياه عند استعماله للحصول على تركيز نهائي من ١٠٠picomole / ميكرولتر عن طريق إذابة في الماء المقطر اللايونى وتخزينها في الفريزر حتى استعمالها وفقا لتعليمات الشركة المصنعة.

تضخيم البادى :

يتم وضع ال DNA المستخلص والبادىءPCR premix المحفوظ عند درجة حراره ٤ م سويا في انبوبة خاصة ويمزجان جيدا في جهاز المازج ثم يتم فصله فى جهاز النبذ المركزي لضمان نزول المحتويات إلي أسفل الانبوبة . تم اختيار التفاعل الامثل لاجراء تجربة تفاعل السلسلة المتبلمر، تم اختيار الحجم المناسب من العينه (٢٠ مايكروليتر) وشملت ٥ مايكروليتر من البادىء بتركيز (10picomole\ml) و ٦ مايكروليتر من قالب الدنا (50 ng/ml) بعدها يتم تكملة الحجم بماء مقطر لاايوني . السيطرة السالبة تحتوى جميع المواد ماعدا الدنا ويتم اضافة الماء المقطر بدلا من قالب الدنا. مزجت انابيب تفاعل PCR جيدا و وضعت في المكان النهائي لجهاز ال PCR ويتم ضبط درجة الحرارة وعدد الدورات .الجدول ١ يبين البرنامج المستخدم .

التحليل الاحصائي:

حللت النتائج احصائياً باستعمال تحلبل التباين ANOVA بنظم SPSS. والفرق المعنوي الأصغر LSD.

جدول ١: خطوات البرنامج المستعمل فى تفاعلات BOX-PCR

الخطوات الرئيسية	عدد الدورات	المدة	درجة الحرارة

95°C	(4min)	1	Initial denaturation
94°C	(30sec)	30	Denaturation
92°C	(30 sec)		Denaturation
50°C	(1min)		Annealing
65°C	(4min)		Extension
65°C	(8min)	1	Final extension

النتائج و المناقشة

تم اختيار ١٣ عزلة بكتيرية تعود لنوع K. pneumoniae والتي عزلت من بيئات مختلفة وبواقع عزلتين لكل بيئة ومثلت هذه البيئات الإدرار والتربة والماء والقشع والحروق والجروح . وبعد أجراء عملية الامتزاز وجد أن تركيز الرصاص الممتز يختلف من عزلة الى اخرى وكما هو موضح في الجدول (٢) حيث كانت العزلةK3 المعزولة من التربة هي ألعزلة الأكفاء في امتزاز الرصاص وبنسبة ازالة بلغت (12.8±65.1) ملغم/ لتر/ساعة بينما كانت العزلة K9 المعزولة من الادرار الأقل في امتزاز الرصاص وبنسبة إزالة بلغت (7.8±28.8) ملغم/ لتر/ ساعة .وقد يعزى السبب في ذلك إلي زيادة عدد المواقع الفعالة الرابطة للرصاص.

ومن خلال ما تقدم نجد ان قدرة العزلات البكتيرية في امتزاز الرصاص من المحاليل المائية قد اظهرت تبايناً كبيراً وفروقات معنوية عالية عند مستوى ٠.٠٥ ≥P في قابلية العزلات البكتيرية المختلفة على امتزاز الرصاص من محاليله المائية . هذا وقد اتفقت النتائج مع (١٣) مع نتائج العزلة K9 في ازالة كمية الرصاص بحدود ٢٥.٠ ملغم/ لتر . وفي دراسة أجراها (١٤) تباينت قدرة البكتريا K. pneumoniae في إزالة معدن الزنك والكادميوم وأكد قدرة هذه البكتريا في إزالة المعادن لامتلاكها ايونات متعددة تمكنها من تكوين معقدات بين الايونات القاعدية والحامضية الموجودة في جدار الخلية . اكد Saini وجماعته ٢٠١٣ أن للبيئة التي تعزل منها البكتريا دور كبير في إزالة سمية المعادن الثقيلة فعند عزل بكتريا K.pneumoniae من مخلفات الدباغة ووجد ان لها قدره عاليه على امتزاز الرصاص.

جدول(٢) قدرة العزلات البكتيرية في امتزاز الرصاص من المحاليل المائية

ت	رقم العزلة	أسم العزلة	رمز العزلة	كمية الإضافة مايكروليتر	تركيز محلول السيطرة (ملغم/لتر)	تركيز المحلول للاساس (ملغم/لتر)	الكمية المتبقية	الكمية الممتزة
١	N 7	SOIL	K2	0.02	110.6	107.8	51.0	56.0
			K3	0.03	110.6	108.9	45.3	63.5
٢	N8	Water	K4	0.02	110.6	107.8	53.6	54.1
			K5	0.02	110.6	107.4	54.3	54.8
٣	N9	Sputum	K6	0.04	110.6	109.2	54.3	33.4
			K7	0.02	110.6	107.8	74.3	36.2
٤	N10	Urine	K8	0.02	110.6	107.8	66.6	41.2
			K9	0.02	110.6	107.8	81.6	26.1
٥	N11	Burn	k10	0.03	110.6	108.7	74.0	34.7
			K11	0.02	110.6	107.8	62.6	45.1
٦	N12	Wound	K12	0.02	110.6	107.8	66.0	41.8
			K13	0.02	110.6	107.8	47.3	60.4

LSD= 10.6 P<0.05

ان الاختلاف في قابلية العزلات علي امتزاز المعدن قد يعزى الي وجود الشحنات السالبه الموجوده في الوسط مما يودى الي ارتباطها مع المعدن أو نتيجة التنوع الإحيائي أو اختلاف سمية المعادن (١٥). أن احتواء البكتريا *K. pneumoniae* علي المحفظة أو الكبسولة في الجدار الخارجي للبكتريا ساهم وبشكل كبير في زيادة عملية الإزالة الحياتية (16). اكد (٦) وجود تنوع واسع في قابلية الإحياء المجهرية على امتزاز الايونات المعدنية، وذكر أنها لا تتحدد بمجموعة تصنيفية معينة فالتنوع يمتد ليشمل الأفراد التابعة للجنس الواحد، وهذا ما لوحظ

في هذه الدراسة بالنسبة للنوع *K. pneumoniae*. وأوضح (16) أن التركيب الكيميائي المتباين للخلايا المجهرية سبب رئيس لاختلاف السعة الامتزازية بين الأنواع المختلفة وحتى بين الخلايا المختلفة للنوع نفسه. في حين ذكر (١٧) أن الخلايا البكتيرية الموجبة يتركب جدارها من جزيئات متشابهة وتحتوي على عدد أقل من المجاميع الفعالة الرابطة للأيونات، بينما تكون جدران الخلايا البكتيرية السالبة أعقد تركيبياً وكيميائياً وحاوياً على جزيئه عديد السكر يد ألشحمي Lipopolysaccharide(LPS) لذلك فأن لها سعة امتزازية اكبر . كما بينت النتائج الموضحة فى جدول (٣) وجود اختلافات بين العزلات البكتيريه العائده الى بكتريا *K . pneumoniae* التى انتخبت من بيئات اخرى شملت التربه والماء والقشع والادراروالجروح والحروق فى تحملها للتركيز المثبط الادنى.

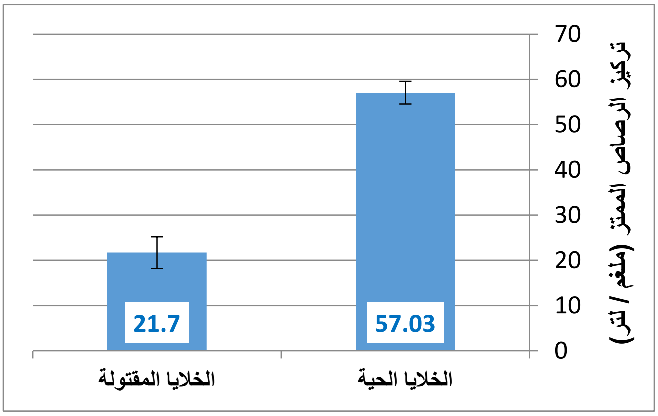
جدول (٣) التراكيز الدنيا المثبطة للرصاص لعزلات مختلفة من ***Klebsiellapneumoniae***

ت	رقم العزله	اسم العزلة	رمزالعزلة	تركيز MIC
١	N7	SOIL	K2	3200
			K3	3200
٢	N8	Water	K4	3100
			K5	3100
٣	N9	Sputum	K6	3200
			K7	3200
4	N10	Urine	K8	3200
			K9	3300
5	N11	Burn	K10	3700
			K11	3600
6	N12	Wound	K12	3600
			K13	3800

وهذه النتائج تتفق مع ماتوصل إليه الباحث (١٨) ان لبكتريا *K. pneumoniae* قدرتها على تحمل تراكيز من الرصاص بسبب قدرتها العالية على تكوين غشاء bio–films.ولم تتفق النتائج مع (١٩) عند دراسته لتحمل البكتريا لمجاميع مختلفة من المعادن الثقيلة فقد بين ان البكتريا تحملت تركيزا من الرصاص مقداره ٧٠٠ ملغم / لتر. وفي دراسة اجراها (٢٠) عند استخدامه لبكتريا K. pneumonia عند إزالة معدن الزرنيخ حيث تحملت البكتريا تركيز مقداره ٣٧٠ ملغم / لتر ويعود السبب في ذلك إلي اختلاف الطبيعة الجينية في مقاومة المعادن وكذلك طبيعة التركيب البروتينى للاغشيه الخلوية لهذه البكتريا. أن اختلاف قابليات العزلات المختلفة في تحملها للتراكيز العالية من العناصر الثقيلة يعزى الى اختلاف طبيعة السطح الخلوي البكتيري والى الاختلاف الفسلجي للعزلات المأخوذة (21).

دور الحالة الايضية للمازات الحياتية في عملية الامتزاز الحياتي

تبين النتائج الموضحة في الشكل (١) الحالة الايضية للمازات الحياتية حيث بينت النتائج وجود فروق معنوية عالية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$ بين الخلايا الحية والخلايا المقتولة بالحرارة، حيث كانت نسبة الازالة الحياتية للخلايا الحية (57.0 ±3.4) ملغم / لتر، بينما للخلايا الميتة (21.6 ± 2.5) ملغم / لتر .



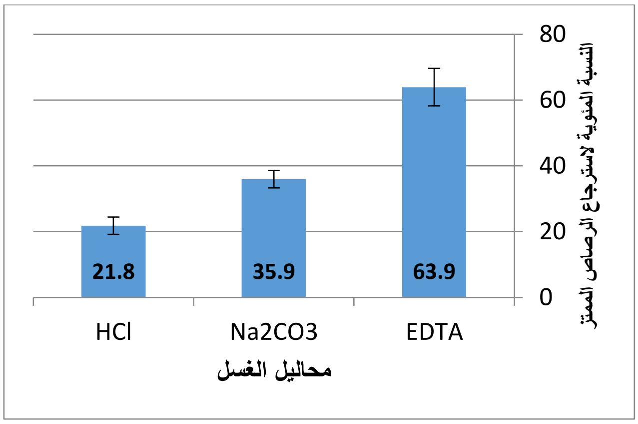
شكل (١) تأثير الحالة الأيضية للخلايا في تركيز الرصاص الممتز بوساطة العزلة *K. pneumoniae*

والسبب في ذلك هو أن الإزالة الحياتية للرصاص اعتمدت بشكل كبير على الحالة الايضية وبمعنى أخر أنها تحتاج إلي طاقة كي تتم وأنها ليست عملية ارتباط فيزيوكيميائية بل تمتد إلى ابعد من ذلك وقد تشترك فيها آليات ارتباط أخرى مثل ارتباطها بالبروتينات الجامعة للايونات، فعند قتل الخلايا البكتيرية انخفضت الفعالية الحياتية للإزالة وأثرت وبشكل فاعل علي المجاميع الفعالة على الجدار الخلوي وهذا أدى الى عدم الارتباط بأيونات الرصاص بصورة طبيعية . لم تتفق النتائج مع (٢٢) عند استخدام الخلايا الميتة *Micrococcus* فى ازالة معدن الرصاص اذ كانت نسبة الازالة ٧٩.٢%،ان قدرة الخلايا الميتة على ازالة المعادن الى تجمعها بجزيئات صغيرة وانخفاض الكثافة والقدرة الميكانيكية وبالنتيجة تكون ذات قوة وصلابة قليلة .لا تتفق النتائج مع ماجاء به كل من (٦) و (٢٣) اذ لم يلحظ وجود فروقات معنوية في تركيز العناصر الممتزة عند ايقاف النشاط الايضي للخلايا. بينما أشار كل من (٢٤) إلى أن الامتزاز بوساطة الخلايا الميتة لل ***Saccharomyces cervisiae***حدثت بالية الانجذاب الكهربائي

الساكن في حين الخلايا الحية للخميرة نفسها امتزت الايوناتحيوياً بالية اكثر تعقيداً شملت تبادلاً أيونيا واصطفافاً لايونات العنصر داخل الفجوات الخلوية.

استرجاع الرصاص الممتز :

لغرض معرفة قدرة هذه العزلة على الاحتفاظ بالرصاص وكفاءة محاليل الغسل في استرجاع الرصاص الممتز من قبل هذه العزلة واحتفاظها بها في الجدار الخلوي لها واوضحت النتائج قدرة محاليل الغسل المستعملة في استرجاع الرصاص الممتز من العزلة البكتيرية ***K. pneumoniae***(شكل٢).



شكل (٢) قدرة محاليل الغسل لأسترجاع الرصاص الممتز بوساطة العزلة *K. Pneumonia* P<0.05 LSD=86.0

حيث أظهرت النتائج وجود فروق معنوية عالية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$،إذ وجد أن محلول (0.1M EDTA) هو المحلول الأفضل في عملية استرجاع الرصاص الممتز من محلولي HCl و Na_2CO_3 آذ بلغت نسبة استرجاعه للرصاص (63.9± 5.6) ملغم / لتر/ساعة من التركيز الممتز ، بينما محلول HCl بلغت نسبة استرجاعه لمحلول الرصاص (35.0 ± 2.65) ملغم / لتر/ساعة، بينما محلول Na2Co3 بلغت نسبة الاسترجاع (21.8 ± 2.63) ملغم / لتر/ساعة . وتتفق النتائج مع ماذكره (٢٥) كون محلول EDTA محلول ملائم لاسترجاع الرصاص من قشرة السرطان، وتم استعمال هذه القشرة بعد الاسترجاع سبع مرات دون أن يلاحظ فروق معنوية في السعة الامتزازية . وتتفق النتائج مع ما توصل أليه فهد ١٩٩٤ في كون محلول EDTA هو الأكفأ واسترجع 93.5% من تركيز الثوريوم الممتز من قبل بكتريا *Bacillus sp* استرجع 98.87% من الثوريوم الممتز بوساطة فطر *Rhizopus*sp. لم تتفق الدراسة الحالية مع نتائج الباحث (٢٦) حيث وجد ان محلول HCl يعد المحلول الافضل لاسترجاع الرصاص من خلال استخدامه *Utriculariaaurea* لاستخلاص الرصاص .بينما لا تتفق النتائج مع دراسة(26) وجد فيها أن محلول (HNO_3) هو المحلول الأفضل لاسترجاع الرصاص من خلال بكتريا *Agrobacterium tumifacient* . ولا تتفق النتائج مع دراسات محلية أخرى وجد فيها محلول HCl هو المحلول الأفضل في استرجاع العنصر الممتز (٢٧).

أن السبب في قدرة محلول EDTA في استرجاع الرصاص الممتز هو أن هذا المحلول يعد من العوامل الكلابية (Chelating agents) وبذلك يعمل على فك الارتباط مابين الرصاص وسطوح الخلايا البكتيرية، والذي يعتبر ضعيفاً قياساً مع قوة ارتباط هذه الايونات مع EDTA (٦). ونستنتج من هذا كله ان ايونات العناصر ترتبط بالمجاميع الحامضية وعند خفض قيم الاس الهيدروجيني يؤدي الى فقدان ايونات العناصر واستبدالها بالبروتونات، اضافة الى ذلك ان هناك اليات اخرى للامتزاز وهي التبادل الايوني وهذا ما اثبته الاسترجاع بمحلول كاربونات الصوديوم . وبمعنى اخر ان عملية استرجاع الرصاص يمكن ان تلخص عملية الامتزاز الحيوي تحدث بسطح الخلية نتيجة عمليات فيزوكيميائية او تبادل ايوني، كما يمكن الاستفادة من العناصر المسترجعة بوصفها مادة اولية تدخل في الصناعات مرة ثانية وتعد هذه مهمة من الناحية الاقتصادية من خلال اعادة استخدام العناصر الممتزة مرة ثانية في كافة المجالات الصناعية (15).

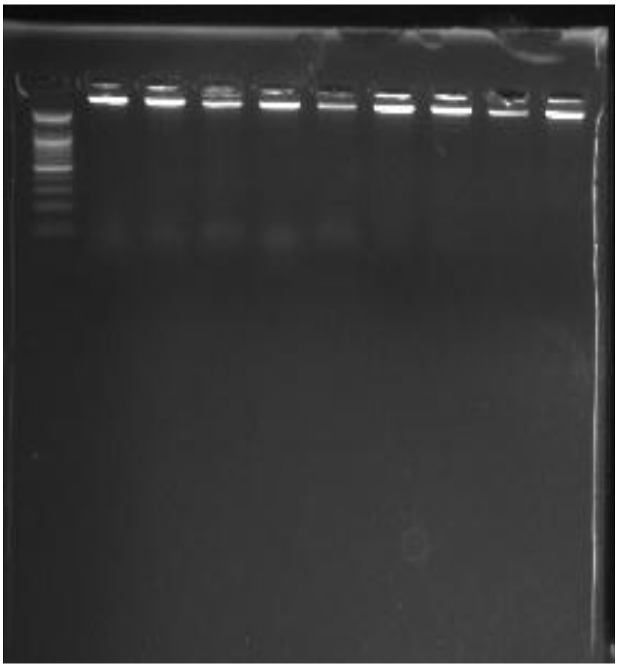
يتفق نتائج تأثير الفعالية الايضية مع نتائج MIC فقد تبين أن الإزالة الحياتية تعتمد على الطاقة،وهنا لاحظنا انه كلما زاد تركيز MIC زادت كمية الإزالة الحياتية،كون التركيز المثبط الادنى ارتبط بالحالة الايضية للخلية،فكلما زادت كمية التحمل زادت قدرة البكتريا علي ازالة الرصاص من المحلول المائي . اى ان الامتزاز حصل بالية تعتمد على الطاقة وهي الية التجميع الحياتي (Bioaccumulation)، وليس الادمصاص الفيزيوكيميائي .

وأجمالا يمكن أن نفسر نتائج هذه الدراسة إلى أن العزلة الأكثر مقاومة قامت بربط ايونات العنصر بجدارها وسمحت له أن يدخل إلى داخلها وبالتالي قامت بامتزاز كميات كبيره من هذا العنصر ، وعلى العكس من ذلك فالبكتريا ذات المقاومة الأقل ارتبط بها العنصر بكميات اقل ومن ثم استطاعت امتزاز معدلات اقل من مثيلاتها ذات المقاومة

الأعلى، أو من خلال استخدام ايونات هذه العناصر مستقبلات للالكترونات في عمليات التنفس المختلفة.

استخلاص الـ DNA من العزلات البكتيرية :

تم استخلاص الـ DNA لجميع عزلات *K.pneumoniae* التي انتخبت كافضل عزلات في مقاومتها للرصاص والبالغ عددها ١٣ عزلة وبعد ترحيل الـ DNA المستخلص على هلام الاكاروز اظهرت النتائج وجود الحزم وبشكل واضح في جميع العزلات والبالغ عددها ١٣ عزلة منتخبة وجد ان جميع العزلات البكتيرية قد اعطت حزم لـ DNA اكثر من ١٠٠٠٠ الاف زوج قاعدي (شكل١).



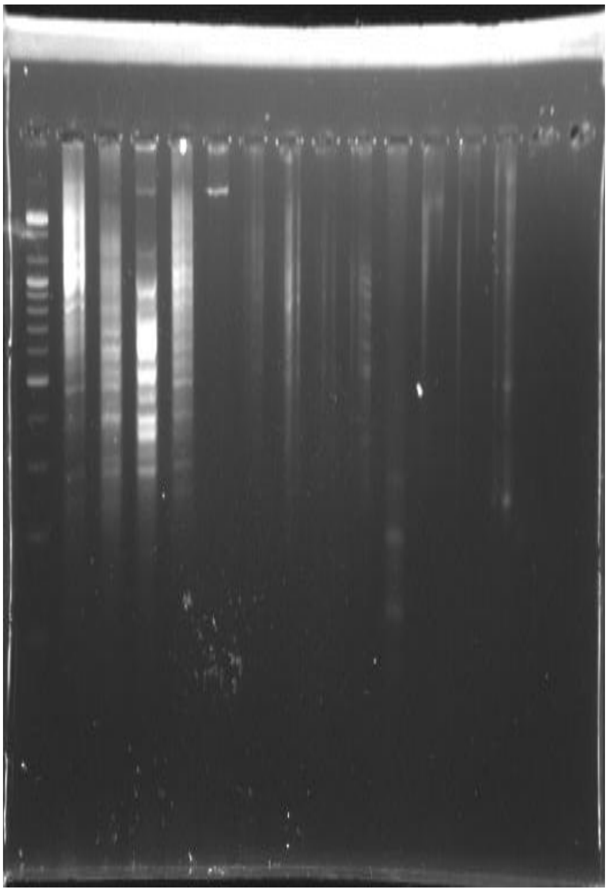
شكل (١) الدنا الجينومي لعزلات K. pneumoniaeمفصول على هلام الاكاروز تركيز ١% بفولتية ٧٥ فولت لمدة ساعة مصبوغ ببروميد الايثيديوم. مدرج الدنا ١٥٠٠ زوج قاعدي

تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص من العزلات البكتيرية

تم قياس تركيز الـ DNA ونقاوته للعزلات البكتيرية المنتخبة كافضل عزلات مقاومة للرصاص باستخدام جهاز Nano drop . واظهرت النتائج ان نقاوة الـ DNA تراوحت بين (٠.٨٧ – ١.٨٨) بينما تراوح تركيز الـ DNA ما بين (٢٥.٢ – ١٠٥.٩) نانوغرام / مايكروليتر.

العلاقة بين التنميط الوراثي والإزالة الحياتية :

تم تحديد البصمة الوراثية بطريقة BOX–PCR لتقييم مدى الارتباط بين النمط الوراثي والامتزاز الحياتي، حيث تم أجراء تجربة التنميط الوراثي لثلاثة عشر عزلة بكتيرية تعود لنوع *K. pneumoniae* ومن بيئات مختلفة . تم استخدام البادي المتخصص لتشخيص جينات المقاومة التي تكون موجودة في هذه العزلات من خلال استهداف العناصر المتكررة في جينوم العزلات المختلفة وتم استعمال البصمة الوراثية التي تعطي اكثر من جين واحد . وتم اجراء اختبار تضاعف سلسلة الـ DNA باختبار تفاعل السلسلة المبلمر مع مزيج التفاعل وبعد ترحيل الناتج على هلام الاكاروز بتركيز ١.٥% وفحصة بالاشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم الناتجة من التضاعف واظهرت وجود العديد من الجينات في جميع العزلات البكتيرية وكما تباينت هذه العزلات في احتوائها للجينات من حيث وجود قسم منها في عزلات وخلو عزلات اخرى منها (شكل٢).

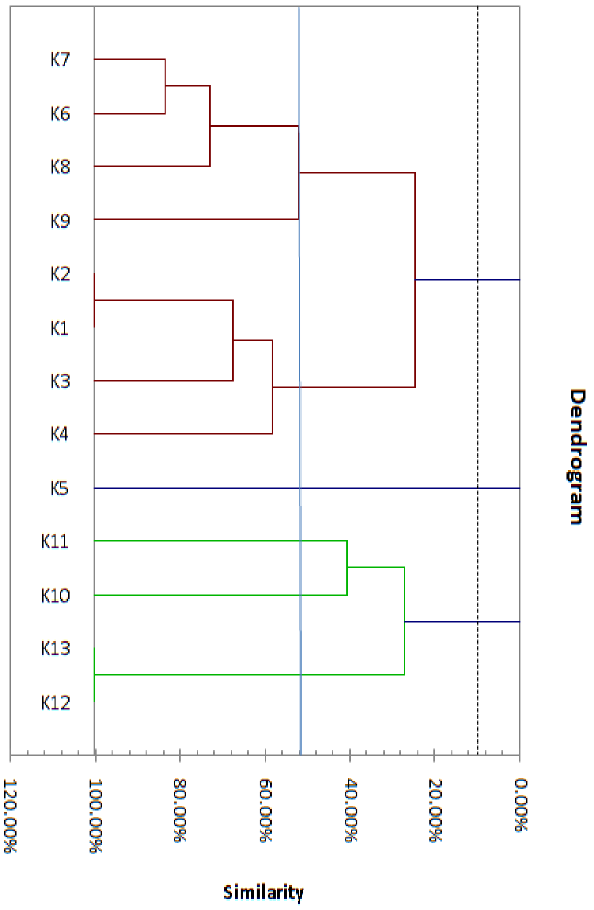


شكل 2: الرحلان الكهربائي لدنا ١٣ عزلة من *K. pneumoniae*بوجود مدرج الدنا ١٥٠٠ زوج قاعدي.

وقد تم تحليل البيانات التي تظهر في الشكل 4استخدام البرنامج الإحصائي المحوسب وتم الحصول على ٣ مجموعات معينة C1 و C2 و C3 من البكتريا المعزولة ***K. pneumonia***.وكان مستوى التشابه ٥٢ % (شكل 2).وكشف تحليل البيانات عن عدم

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :80-89

ارتباط التنميط الجيني بقابلية العزلات على القيام بعملية الامتزاز الحياتي.



شكل (٣) الشجرة الوراثية لثلاثة عشر عزلة من بكتريا *K. pneumonia*

ومن خلال ملاحظة الشكل (٣) يمكن أن نقسم العزلات إلى ثلاث أنماط وراثية بنسبة تشابه 52 % حيث شملت المجموعة الأولي العزلات البكتيرية K7 و K6 و K8 و K9 وبنسبة تشابة 52% أما المجموعة الثانية فشملت k1 و k2 و k3 و k4 وبنسبة تشابه بلغت 60 % أما المجموعة الثالثة فشملت العزلات k12 و k13 وبنسبة تشابة 100% أما العزلات k5 و k11 و k10 فلم تنتظم في مجموعه محدده أن نسبة الإزالة الحياتية للرصاص لم تعتمد على نمط وراثي معين، فقد توزعت نسبة الازالة من العالي إلي الواطي،في النمط الوراثي الواحد فمثلا في المجموعة الاولي كانت نسبة الإزالة للعزلتين k7 و k6 هي (36.2 ± 4.0)ملغم / لتر و (56.1 ± 4.9)ملغم/ لتر على التتابع بينما العزلتين k8 و k9 كانت نسبة الازالة على التتابع هي (43.8 ± 1.7) ملغم/ لتر و (28.8 ± 7.8)ملغم/ لتر. اما المجموعة الثانية فكانت نسبة الإزالة متقاربة لجميع العزلات k1 و k2 و k3 و k4 فتراوحت بين (62.2 ± 28.9)ملغم/ لتر و(59.5 ± 6.6)ملغم/ لتر و(65.1 ± 12.8) ملغم/ لتر و(56.8 ± 4.0)ملغم/ لتر/ على التتابع. أما المجموعة الثالثة فكانت نسبة التشابة ١٠٠ % وشملت العزلتين k12 و k13 حيث كانت نسب الازالة الحياتية (44.5 ± 8.3) ملغم/ لتر و(63.2 ± 5.5) ملغم/ لتر على التتابع. أما العزلات التي لم تنتظم في مجموعة فهي k5 و k11 و k10 فكانت نسبة الازالة مختلفة (56.2 ± 4.0)ملغم/لتر(47.8 ± 1.7)ملغم/ لتر و(36.5 ± 4.0)ملغم/ لتر.

المصادر :

1. Al-Garni, Saleh M.(2005). Biosorption of lead by Gram-ve capsulated and non-capsulated bacteria. Biological Sciences Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University, ISSN 0378-4738 = Water SA Vol. 31 No. 3 July 2005.
2. Abbas ,s. Zaghum. MehwishRiaz, NaseemRamzan, M. Tariq Zahid,Farah R. Shakoori, Mohd. Rafatullah.(2014). Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. UniversitiSainsMalaysia,Penang, Malaysia. Brazilian Journal of Microbiology 45, 4, 1309-1315 (2014
3. Brooks, G.F.; Butel, J.S.;Carroll,K.C. and Morse, S.A .(2007). Jawetz ,Melnick, and Medical microbiology. 24th ed. McGraw-Hill.p:254-255. New York.
4. Egbebi,A.O and Famurewa ,O.(2011). Heavy Metal Resistance among Kelbsiella Isolates in Some Parts of Southwest, Nigeria. 2College of Science, Engineering and Technology, Osun State Univeristy, Osogbo, Nigeria. Asian Journal of Medical Sciences 3(5): 183-185, 2011ISSN: 2040-8773.
5. Ilhan, S.; Cabuk, A.; Filik ,C. and Caliskan ,F.(2004). Effect of Pretreatment on biosorption of heavy meatals by fungal biomass. Turkya univ.J.Sci.5(1).
6. Mohamed,M. Rehab .(2015). Biosorption of zinc and cadmium by Klebsiella pneumonia KM609983 isolated from Sohag, Egypt. Department of Botany, Faculty of Science, Sohag University,. Global Advanced Research Journal of Microbiology (ISSN: 2315-5116) Vol. 4(2) pp. 018-026, February, 2015

7. Munoz, A.J. a, E. Ruiz a, H. Abriouel b, A. Galvez b, L. Ezzouhri c, K. Lairini c, F. Espinola .(2012)Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewatersIdentification and evaluation of its potential for biosorption. Chemical Engineering Journal 210 (2012) 325–332
8. Mungloo-Rujubai,S.K.; Issck,M.I.and and Fakim, Y.J.(2013). Study of Klebsiella pneumonia isolates with ESBL activity,from ICU and Nurseries, on the island of Mauritius .jcmb.halic.edu.tr.10(1):39-51
9. Naja , G . ,Diniz , V . and Volesky ,B . (2005) . Predicting metal biosorption performance .International biohydrometallurgy symposium , cape town , South Africa .
10. Rani, M. Johncy , B. Hemambika*, J. Hemapriya and V. Rajesh Kannan.(2010). Comparative assessment of heavy metal removal by immobilized and dead bacterial cells: A biosorption approach. Rhizosphere Biology Laboratory, Department of Microbiology, School of Life Sciences, Bharathidasan University. African Journal of Environmental Science and Technology Vol. 4(2), pp. 077-083, February, 2010
11. Rekha, D.; Kumar, J.D.; Jayaraj, B.;Lingappa, Y. and Chiranjeevi, P.(2007). Nickle(II) determination by spectrophotometry coupled with preconcentration technique in water and alloy samples. Bull-kovean. Chem. Soc. 28:373-378.
12. Saini, Anish . Rohini Kumar M., KarthikSenan, Shakti Sagar, Vivekanandan K. E. and Jabez Osborne W.(2103). Remediation of lead (Pb) by a novel Klebsiella sp. isolated from tannery effluent of Ranipet, Vellore district. , Faculty of Marine Sciences, Annamalai University, Parangipettai - 608502, Tamil Nadu, India. African journal of biotechnology. Vol.12(32) pp .5069 -5074.
13. Sarhan, O. A. (2004). Study of Biosorption of some heavy metal ions by local isolates of Zoogloearemigera. M. Sc. Thesis College of Science, Baghdad University, Iraq.
14. Shamim , Saba And A . Rehmem.(2012). Cadmiam Resistanse And Accumulation Potential Of Klebsiella Pneumonia Strain CBL_1 Isolated From Industrial Wastewater Of Klen. University Of The Panjab, pakestan. J. Zool Vol.44 (1).PP. 203_208, 2012.
15. Vacchio, A.; Fionoli, C. and Disimine, D. 1998. Heavy metal biosorption by bacterial cells. Fresenius.J. Anal. Chem. 361:338-342.
16. Vijayarghavan, k.; Jean, J.; Palanivelu, K and Velan, M.(2005).Removal of nickel(II) ions from aqueous solution using crab shell particles in apacked bed up-floe column . Journal of Hazardous Material. 113:223-230.
17. Yoonaiwong ,w.; Pair at Kaewsarn1 and Pradubnprayoon. (2011).Biosorption of lead and cadmium ions by non-living aquatic crophyte, Utriculariaaurea . Department of Agriculture and Environment SurindraRajabhat University Surin, Thailand .environ,21(6),369-374.
18. Avery, S. V and Tobin, J. M. (1992).Mechanisms of strontium uptake by laboratory brewing strains of Sccharomysescerevisiae, Applied and Environ. Microbiol. 58: 3883-3889.
19. Volesky, B. and Naja, G. (2005). Biosorption: Application stratigies. http:// www. biosorption. Mcgill. Ca / Publication / gn6. Ibs. Pdf.
20. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergay's Manual of determinative Bacteriology 9th. ed Williams and Wilkins. Baltimor, U.S.A.
٢١. هوجز، لورانت(1989). التلوث البيئي،ترجمة: محمد عمار الراوي و عبد الرحيم عشير، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، بيت الحكمة للطباعة و النشر.
٢٢. قاصد، وعد عماد الدين. (2006). استخدام خلايا بكتيريا Eenterobacterssp المقيدة في ازالة الرصاص من البيئة المائية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.
٢٣. عبد الكريم، علا سالم. (2006) . الازالة الحيوية للخارصين بوساطة الجدار الخلوي البكتيري لبكتيريا Bacillus subitils. رسالة ماجستير ، كلية العلوم، جامعة بغداد.
٢٤. علي، لطيف حميد (1987) . التلوث الصناعي . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل، صفحة 143- .179,331
٢٥. الرمضاني، مازن اسماعيل (1997). تحدي البيئة والصراع بين الشمال والجنوب. ام المعارك (11): 118.
٢٦. **فهد، حارث جبار** (١٩٩٤) . دراسة كفاية عزلات مختلفة من الاحياء المجهرية في امتزاز الثوريوم من المحاليل المائية . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد .
٢٧. محمود، محمود باسل (٢٠٠٥) . الازالة الحيوية للكروم من مياه المخلفات الصناعية . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

The relationship between genotype using BOX-PCR technique and lead bioremoval by *Klebsiella pneumoniae*

Nuhad M. Hamed Ahmed M. Turkey Harith J. Fahad Mahmood M. Al-Mahdawi

E.mail:

Abstract

The effect of metabolic status on lead bioremoval byKlebsiella pneumoniae were tested. The results revealed a significant differences (P<0.05) between live and dead (killed by heat) cellsas the bioremoval reached 57.0 ± 3.4 and 21.6 ± 2.5, respectively. Bioremoved lead ions were recovered (P<0.05) using three different washing solutions, 0.1M EDTA was the most efficient since it recovered about 63.9 ± 5.6 mg/ml, while Na2CO3 was able to recover 35.9 ± 2.6 mg/ml; whereas 0.1M HCl recovered 21.8 ± 2.6 mg/ml. genomic DNA was extracted from different isolates of K. pneumoniae in order to study the relationship between genotype using BOX-PCR and bioremoval of lead. Three clusters were detected C1, C2, and C3 with similarity percentages reached 52, 60, and 100%. What's more, bioremoval did not depend on particular genotype