جمهورية العـــراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسيـــة كلية العلوم

قســم علوم الحياة

عزل وتشخيص البكتريا القولون E.COLI في مياه الاسالة في محافظة القادسية

بحث مقدم الى كلية العلوم / قسم علوم الحياة في جامعة القادسية

كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

تقدم به الطالب

فيض كريم عبد

بإشراف

م.م ضحى مهدي جابر

1440هـ 2019م

بسم اللّه الرحمن الرحيم

﴿ (10) يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا اذْكُرُوا نِعْمَتَ اللَّهِ عَلَيْكُمْ إِذْ هَمَّ قَوْمٌ أَن يَبْسُطُوا إِلَيْكُمْ أَيْدِيَهُمْ فَكَفَّ أَيْدِيَهُمْ عَنكُمْ ۖ وَاتَّقُوا اللَّهَ ۚ وَعَلَى اللَّهِ فَلْيَتَوَكَّلِ الْمُؤْمِنُونَ (11) ﴾

صدق الله العلي العظيم

الآية 11المائدة .السورة

الاهداء

الى الرسول الاعظم محمد صل الله عليه واله وسلم

الى اهل بيت النبوة ومعدن العلم وموضع الرسالة ومختلف الملائكة

الى والدي العزيز ..ووالدتي العزيزة ...حباً واحتراماً

الى اخوتي ، واخواتي ... فخراً واعتزازاً

الى طلبة العلم ... نهدي هذا الجهد المتواضع

شكر وتقدير

الحمد لله والشكر له بما من علينا به من نعمة والصلاة والسلام على خير خلقه

الامين محمد وآلة الاطهار واصحابه الغر الميامين

اتقدم بجزيل الشكر والتقدير والامتنان الى

استاذتي م.م . ضحى مهدي جابر

على ما بذلته من جهد ووقت لغرض الاشراف على بحثي ومتابعتُها لي

بآرائُها القيمة وافكارها الجميلة، فجزاها الله خير الجزاء

كما اتقدم بخالص الشكر والتقدير الى جميع الاساتذة المحترمين مني لكلية العلوم / قسم علوم الحياة جامعة القادسية واخيراً اشكر جميع اصدقائي الذين لم يبخلوا علي بجه

الخلاصة Summary

جمعت عينات الدراسة من محطات تعبئة مياه الاسالة في محافظة الديوانية خلال الفترة من تشرين الاول 2018 ولغاية كانون الثاني 2019 ، شملت 30 عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في مركز المحافظة الديوانية ، و 15 عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الحمزة ، 15 عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء عفك ، 24عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الشامية وذلك لغرض التحري عن بكتريا القولون *E.coli* الملوثة لتلك المياه ، حيث تم استخدام الفحوصات المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية .

اظهرت النتائج تلك الاختبارات ان 3 عينات من مياه الاسالة من اصل 84 عينة وبنسبة عزل 3.5% اعطت نتائج موجبة من خلال نموها على الأوساط الانتخابية والتفريقية وتخمرها لسكر اللاكتوز .

من جهة اخرى بينت نتائج البحث ان اعلى نسبة عزل للبكتريا كانت من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الحمزة وبنسبة 2(2.3%) واقل نسبة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الشامية وبنسبة عزل 1(1.2%) في حين لم تسجل محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في مركز المحافظة الديوانية وقضاء عفك أي تلوث ببكتريا القولون (0%)

ومن خلال البحث ، أظهرت النتائج تلوث مياه الاسالة في بعض المناطق ببكتريا القولون *E.coli* التي قد يكون مصدرها فضلات الانسان ممايدلل عدم كفاءة تلك المحطات .

1. المقدمة :

تتعرض المياه وخاصة مياه الشرب للعديد من مصادر التلوث واغلب تلك المصادر تأتي من فضلات الانسان ومياه المجاري تحتوي فضلات الانسان على بكتريا القولون وجودها في مياه الشرب دليل على التلوث البرازي .

تعد بكتريا القولون المسبب الرئيسي لخمج المسالك البولية وتعد العصيات السالبة لصبغة غرام من اكثر الممرضات الموجودة في المسالك البولية. وان افراد العائلة المعوية وفي مقدمتها ، E.coli المسبب الرئيسي لـ 90% من اخماج المسالك البولية (AL .shehabi . 1998 . makady et al .2005)

يصاب الانسان بهذه الجرثومة عن طريقين هما اصابه خارجية المنشأ (Exogenous) اي يكون مصدرها الانسان نفسه الامعاء مثلاً (Smith ,1981)

تملك جرثومة *E.coli* تركيباً متضدياً معقداً . حيث يكون من ثلاث انواع رئيسية من المستضدات (Antigens) حيث يكون بعض مستضداتها مقاومة للحرارة (Heat- Stable like) حيث يدعى بالمستضد الجسمي (Somatic Antigen) والبعض احمر حيث يكون حساساً للحرارة (Heat-labile like) وهو المستضد المحفضي (Capsular Antigen) واما النوع الثالث هو المستضد الذي يدعى بالمستضد السوطي (Flageilar antigen) كما ان اغلب الاغماج بسبب جرثومة *E.coli* مكون ناتجة عن التعرض الى المستضدين الجسمي والمحفظي (Doyle al,1996) كما تمتلك جرثومة E.coli عوامل كثيرة تساعدها على احداث الاصابة حيث تعرف هذه العوامل بعوامل الفوعة (virulence Factor) حيث تشمل (i) عوامل الاتصاق . خمل النوع الاول نوع (s) نوع (p) نوع (Fic) ، (ii) الذيقانات (عامل التنحر السمي . عامل تحلل الدم . متعدد السكريد الشحمي)

(iii) انتاج الانزيمات (الفوسفاتي القلوي الحال الدهون الحال للبروتيات الحال لسليوز) (ir) انظمة اقتصاد الحديد وميكانيكية مقاومة الامصال والغزو (Rebcca and Elizabeth, 2005) حيث تساعد هذه العوامل الجراثيم على استعمار سطوح المضيف واضعاف او تخريب دفاعات المضيف حيث هذه تساعد على غزو وانتشار الخلايا الجرثومية لخلايا انسجة المضيف مما يؤدي هذا للامراض السريرية (Maureui,2007)

الهدف من الدراسة :

نظراً لانتشار العديد من الامراض وحالات الاسهال لدى المواطنين فقد هدفت الدراسة للتحري عن بكتريا القولون *E.coli* في المياه الاساله المتداولة في اغلب البيوت العراقية وتحقق الهدف من خلال

1- التحري عن بكتريا القولون في مياه الاساله
2- تشخيص بكتريا القولون مظهرياً وفسلجياً

2. استعراض المراجع Literature Review

2 . 1: الخصائص العامة لجرثومة E.coli

وصفت جرثومة *E.coli* لاول مرة عام 1885م من قبل الطبيب الالماني Theodor Escherich اذ عزلت من ابرز اطفال اصحاء وحديثي الولادة كجرثومة قولون متعايشة ولهذا فقد عدت غير مرضية (Non – Pathogenic) متعايشة في الامعاء الغليظة (Neil etal,1994) وفي عام 1884 تمكن العالم Escherich من عزلها من ادرار فتيات شابات مصابات باخماج المجاري البولية (Urinary Tact jnfection /Uti) (Sussman ,1985) وفي عام 1935 عرفت سلالات من جرثومة **E.coli** بدورها في الانتشار الاسهال بين الاطفال (Conway ,1995)

تظهر جرثومة **E.coli** على هيئة عصيات صغيرة الحجم (1.3-0.5) مايكرو متر سالبة الصبغة غرام حيث توجد بشكل منفرد او بهيئة ازواج وتنمو في ظروف لا هوائية اختيارية (Facultative anaerobic) (Madigan et al,2006) وتتحرك هذا بواسطة الاسواط المحيطية (Peritichous Flagella) غير مكونة من السيورات (Non –spore foruning) وهذه تمتلك بعض سلالاتها .

المحفظة (Capsule) (Hollet et al, 1994) حيث تستطيع النمو في درجات حرارة تتراوح ما بين (15-45)م° الا ان درجة حرارة المثلى لنموها هي (37°) (Fotador et al 2005) تظهر مستعمرات جرثومية **E.coli** المرضية على وسط ايوسين المثلين الازرق الصلب ذات بريق اخظر معدني (Green metali sheen) (brooks et al ,2004)

كما ان لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز فتظهر مستعمراتها بلون وردي على وسط الماكونكي الصلب (N.ester al et ,1998)

تعطي جرثومة **E.coli** نتيجة موجبة للعديد من الاختيارات الكيمو حيوية مثل اختيار الكاتليز (Catalasetest) واختيار الاندول (Inidoltest) واختيار احمر المثيل (Methel Citrate test) واختيار الفوكس برسكاور (Vages Proskar test) تمتلك الجرثومة القابلية على اختزال النترات الى نتريت وتحلل الجيلاتين بينما لا تمتلك القابلية على انتاج انزيم اليوريز وانتاج كبريتيد الهيدروجين H,S .(Macfaddin , 2000)

2-2- تصنيف جرثومة *E.coli* Classification of

تعود جرثومة ***E.coli*** وفقا لنظام لينايوس في التصنيف الى شعبة Proteo bacteria صنف Gammaprotabactria رتبة Enterobacteriales العائلة المعوية Enterobactreria جنس Escherichia النوع *Escherichia Coli* (2010 trivedi et al) اقتراح Kaffman (1940) نظاماً تصنيفاً خاصاً لتصنيف جرثومة **E.coli** يعتمد على الخصائص المستضديه اذ تمتلك جرثومة **E.coli** ثلاث انواع من المستضدات هي المستضد الجسمي (Somatic antigen) ويدعى O.Ag والمستضد السوطي (Flagellar antigen) ويدعى H.Ag والمستضد المحفظي (Capsular antigen) ويدعى K.Ag .

يتم الكشف عن هذا المستضدات باختبار التلازن Agglntination test (2004 , Brooks et al) يطلق على المستضد الجسمي ايضاً مستضد جدار الخلية (Cell wall antigen) (Feng et al , 2005) اما مستضد المحفظة فهو عبارة عن عديد السكريد (Polysaccharide) والذي يخطي المستضدات الجسمية (Enrlichet al , 2005) بينما يتكون المستضدة السوطي من بروتين من نوع خاص يدعى بروتين Flagellin (Anjnum et al ,2003) فقد تم وصف اكثر من (56) مستضداً سوطياً (A-H) عائداً لجرثومة **E.coli** (Blanco et al ,2006) فيما حدد (176) نمطاً مصلياً خاص بالمستضد (O-Ag) (al , 2006 stnutz et) كما حدد (80) نمطاً مصلياً للمستضد المفصلي (K-A) (Eklund et al , 2005) يعد المستضد (O-Ag) احد اكثر المكوناتالمتغيرة على سطح الخلية الجرثومية ويعود ذلك الى الاختلاف في ترتيب انواع السكريات الداخلية في تركيب وحدة (O-Unit) والى الروابط بين وحدة O ونتيجة لذلك اصبح المستضد (O-Ag) الاساس الرئيسي في التصنيف المصلي للجراثيم السالبة لصبغة غرام (Reeves and wans , 2002) فيكون المستضد -O (Ag) من سلاسل متصدر السكريد Polysaccharide مرتبطة مع لب متعدد السكريد الشحمي Lipopolys accharide وهو شائع في الجراثيم السالبة لصبغة غرام (Eisenstein and azaleznik.2009) صنفت جرثومة **E.coli** الممرضة للمسالك البولية **(E.coli** , Uropathaogenic) **بالاعتماد على المستضد** (**O**-Ag) الى المجموعات التالية :-

O83, O75, O25, O22, O21, O18, O16, O15, O8, O8, O7, O6, O4, O2, O1

.(Abe,et al , 2008 , yamaroto , 2007)

2-3- السلالات الممرضة الجرثومية Pathogenic starins of E.coli

تعد جرثومة **E.coli** نبيت طبيعي Normal flora تستوطن امعاء الانسان والحيوان كما قد تتواجد في التربة والمياه السطحية (water surface) كما وقد تمتلك بعض سلالات **E.coli** القابلية على احداث العديد من الاخماج للانسان والحيوان (Belanger al,2011) فهي مسؤولية على اخماج الجهاز الهظمي (Gastrointestnal in fection) واخماج المسالك البولية (Curinary tract infection) واخماج اخرى منها فقر الدم والسحايا (Sepsis /Meningitis) (Russo and Johnuson , 2003)

2-3-1 جرثومة E.coli المعوية السمية Enterotoxigenic E.coli (ETEC)

يمتاز هذا النمط بكونة الاكثر شيوعاً بين انماط **E.coli** كما انه قد يكون هو المسبب الرئيسي لإسهال الاطفال والمسافرين (Traveler's Diarrhoea) (oliveira et al , 2007) اذ قد يسبب هذا المرض من النمط الاسهال المائي الحاد (Acute watery Diarrhea) والذي قد يؤدي الى الجفاف عند الاطفال الرضع ويمتلك هذا النمط القابلية على انتاج الذيفانات المعوية (Enterotoxins) من النوع الثابت للحرارة (Heat stable Toxin/ST) والنوع الحساس للحرارة.

2-3-2- جرثومة E.coli المعوية الغازية Enteroinvasive E.coli (EIEC)

حيث يمتاز هذا النمط بقدرته على غزو الخلايا المبطنة للأمعاء الغليظة ويسبب الاسهال الدموي الاخراجي للإنسان ، ويعد الانسان المضيف الرئيسي لها (vieira et al ,2007) ان الجرعة المخصصة لنمط (EIEC) وهو (10^6) خلية كافية لأحداث المرض في الانسان عن طريق مهاجمة الخلايا الظهارية المخاطية المبطنة للمعي وقدرتها على الانتشار من خلية الى اخرى (Authors , 2002). حيث تميز هذا النمط بظهور دم مخاط في براز الاشخاص المصابين (Donnenberg , 2002)

3-3-3- جرثومة E.coli المعوية المتجمعة :Enter aggregative E.coli (EAEC)

يمتاز هذا النمط بعدم انتاجية للذيقانات المعوية (entero toxins) بنوعيها الثابت للحرارة (ST) والحساس للحرارة (LT) (Bdisen et al ,2009) ويكون التصاقة هذا النمط بالخلاية الطلانية المبطنة للامعاء من النوع المتجمع

(Aggre gative Adhesion) (et al ,2005 Jekins) تملك هذا النمط العديد من عوامل الفوعة التي تساعد على الالتصاق بالخلايا المخاطية المبطنة للامعاء الدقيقة (Lguchi et al , 2009) وان امراضية الجرثومة تحدد عن طريق المستضد الجسمي (O-Ag) والمستضد السوطي (H-Ag) (Huyashi et al ,1999)

4-3-2- جرثومية E.coli المعوية النزقية Enter hemorrhagic E.coli (EHEC)

يطلق على هذا النمط ايضاً (VTEC) Verotoxin Producing لانتاج ذيقان (Verotoxin) وهي تسمية مرادفة لمصطلح Shiga torin producing E.coli/STEC وذلك لان الذيقات المنتج من هذا النمط يكون مماثل وراثياً وتركيباً وظيفياً مع ذيقات (shigatoxin) الجرثومة Shigella olysenteriae (Bette lheim , 2003) حيث تبدأ اعراض الاصابة بنمط (EAEC) بالاسهال غير دموي (Nonbloody ohiarrhea) ومغص بطني (Abdominal Crump) ثم تتطور الاعراض بعدها ليصبح الاسهال دموياً والذي يعد التشخيص الرئيسي للاصابة (Cruskin – 2000)حيث يمتاز هذ النمط باحداث حالتي مرضتين هما التهاب القولون النزفي (Hemorrhagic Colitis /HC) ومتلازمة فرط يوريا الدم الانحلالي (hemolytic Uremic sydrom/Hus) (Kliegman et al , 2006) ويسبب هذا النمط للاسهال الحاد (Acute and Persistent diarrhen) للاطفال الرضع بدون حمى وقيء فضلاً عن دورها في احداث اسهال المسافرين (Venacchio et al , 2006)

2-3-5- جرثومة E.coli المنتشرة الملتصقة .Diffusely Adherent E.coli (DAEV)

حيث يمتاز هذا النمط بقدرته على الالتصاق على خلايا الانسان الطلائية نوع 2- Human 2- tlFp /2 Type / (Epithelial) . كما لها القابلية على الالتصاق والانتشار بصورة واسعة على الخلايا الظهارية للامعاء و الاغشية المخاطية للقولون مسببة تحطم الانسجة الظهارية وحدوث خلل في افراز السوائل والاملاح وبالتالي تسبب الاسهال عند الاطفال (Poitrinean et al , 1995) وتملك هذا النمط نوعين من الخمج من النوع Dr ، A والتي تساعد الالتصاق (Betis et al , 2003).

2-4- عوامل الضراوة

2-4-1- عوامل الالتصاق Adhesion Factors

يمثل الالتصاق الجرثومي خطوة مهمة من خطوات حدوث المرض اذا يعد التصاق جرثومة E.coli بالخلاية الطلانية (Epithelial cell) الخطوة الاولى لتطور الاصابة (Boisem et al , 2009) تعرف عوامل الالتصاق بانها تراكيب كبيرة تمتد من سطح الخلية البكتيرية وتفاعل مع مستقبلات خاصة على خلايا المضيف اذا ان اللواحق تفاعل بطريقة خاصة متكاملة مشابهة لما يحدث في خصوصية تفاعل الانزيم –المادي الاساس وكذلك تفاعلات الضد والمستضد (Prescott et al ,2005) حيث تمتلك الممرضات الجرثومية التي تصيب سطوح الخلايا الطلائية نوع واحد من العوامل اللاصقة او عدة انواع وتلعب دوراً مهماً في مراحل مختلفة من الاصابة (wult et al 2000)

2-4-1-1- الخمل Fimbriae

تمتاز هذا الجرثومة E.coli بوجود تراكيب مشابهة للاسواط اقصر طولاً وتستند على سطح الخلية الجرثومية وقد سميت هذه بالزوائد الخمل (Fimbriae) هي عبارة عن زوائد بروتية رقيقة تبرز من سطح الخلية الجرثومية (Tiba et al , 2008) اكتشف الخمل لاول مرة في اواخر عام 1940 في الجرثومة السالبة لصبغة غرام لاسيما افراد العائلة المعوية (Entero bacteria ceae) (Sauer et al , 2004) وفي عام 1968م تم اكتشاف الحمل في الجراثيم الموجبه لصبغة غرام مثل جرثومة (Corynebacterium renale) (Ta – Lhal and sohneewind , 2004) وجراثيم Actina myes , Ruminecoccus, Clostridium العديد من انواع جرثومة (Streptococcus) (Telford et al – 2006) يتراوح طول الحمل من 1.5-0.5 نانوميتر وعرضها 0.2 – 0.25 نانومتر وعددها من 100 – 300 كل خلية جرثومية (Martinet el al ,2000) وقد يلعب الحمل دوراً مهماً في الارتباط

الاولي بالخلايا الطلائية (le-Bouguenec el al ,2001) حيث ترتبط الحمل بالمستقبلات ذات طبيعة كربوهيدراتية موجودة على خلايا المنتقلة (Capitani el al , 2006) تمتلك الجراثيم الحاملة لهذا النمط القدرة على احداث تلازن كريات الدم الحمراء .

وقد تملك الجراثيم الموجبة لصبغة غرام نوعين من الحمل هما النوع لاول وهي حمل رقيق يتراوح اطوال شعيراته ما بين 70-500 نانوميتر وعرض 1-2 نانوميتر تتواجد على سطوح جرثومية S.gordniio , S. salvarius اما النوع الثاني فيتراوح طوله 0.3 – 3 نانوميتر وعرضه 3 -10 نانوميتر وتنشر على سطوح الجرثومة Corynebacterium SPP S. pneumoniae للحمل وظائف اخرى بالاضافة الى الالتصاق بانسجة المضيف فهي تلعب دوراً مهماً في عملية نقل DNA وفي تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm Formation) او تجمع الخلايا (Laggregation cell) وغزو خلايا المضيف (Host cell invasion) وكذلك في الحركة (Motility) (Anderson et al , 2004) تملك جرثومة E.coli ثلاثة انواع رئيسية الحمل صنعت اعتماداً على فاعليتها في احداث التلازن الدموي ومقاومتها للمانوز Mannose – Resistuut Haemagglutination.

3. المواد وطرائق العمل Materials and methods

1-3: المـــواد Materials

1-1-3: الأجهــزة والأدوات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية

جدول(3-1) الأجهزة والمعدات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية المستخدمة في البحث

ت	أســـــــم الجـــهـاز	
1	مؤصده	**Autoclave**
2	ميزان حساس	**Sensitive balance**
3	كاميرا رقمية	**Digital camera**
4	مجهر ضوئي	**light microscope**
5	مسخن حراري	**Hot plate**
6	حمام مائي	**Water bath**
7	جهاز تقطير	**Distiller**
8	حاضنة	**Incubator**
9	مازج	**Vortex mixer**
10	كابينة الزرع المجهري	**Laminar flow cabinet**
11	ثلاجة	**Refrigerator**
12	الناقل الزرعي القياسي	**Standard wire loop (1µ)**
13	دورق مخروطي	**Conical flasks**
14	اطباق بتري	**Disposable Petri dishes**
15	شرائح زجاجيه وغطاء شريحة	**Slides and cover slides**
16	أنابيب إختبار	**Test tube**
17	كليسيرول	**Glycerol**
18	المثيل الأحمر	**Methylred ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)**
19	الاكار	**Agar- Agar**
20	كاشف كوفاكس	**Kovac' s reagent**
21	صبغة گرام	**Gram stain**

2-1-3: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

جدول (3-2): الأوساط الزرعية الجاهزة المستخدمة في البحث

الاوساط الزرعية	الغرض	المنشأ
ماء الببتون Pepton water	استعمل للكشف عن حلقة الاندول	
وسط السيمون ستريت Simmons citrate agar	استعمل للكشف عن البكتريا المخمرة للسترات بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون	
وسط اكار الماكونكي MacConkey agar	استعمل بوصفه وسطا انتخابيا للبكتريا السالبة لصبغة غرام وللتفريق بين المستعمرات المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز	
وسط الاكار المغذي Nutrient agar	وسط تنمية عام	
وسط المرق المغذي Nutrient broth	استعمل لتنشيط وادامة العزلات البكتيرية	
وسط المثيل الاحمر و فوكس بروسكاور Methyl red vogas–Proskaour	استعمل للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الاستيل مثيل كاربون	
وسط الايوسين الأزرق Eosin methylene blue	استخدم لتفريق بكتريا *E .coli* عن البكتريا المعوية الأخرى.	
وسط كلكلر Kligler's iron agar	استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وكذلك قابليتها على تخمير سكريات الكلوكوز واللاكتوز.	

3-2: طرائق العمل Procedures

3-2-1: طرائق التعقيم Sterilization methodes

عُقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية بجهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة(121) مْ وضغط (15) باوند/أنج^2 لمدة (15) دقيقة. بينما عُقمت الزجاجيات المستعملة في الفرن الكهربائي (Oven) بدرجة حرارة (168) مْ ولمدة ساعة ونصف

3-2-2: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

3-2-2-1: لأوساط الزرعية الجاهزة Ready culture media

حُضرت الأوساط الزرعية الجاهزة بحسب تعليمات الشركات المصنعة كما في الجدول (3-2) بعد تحضير الأوساط تم تعقيمها بواسطه المؤصدة ، ثم صبت في اطباق بتري أو انابيب اختبار ، ثم حفظت بدرجة4 مْ لحين الاستعمال (MacFaddin, 2000) .

3-2-2-2: الاوساط الزرعية التركيبية Structural culture media

3-2-2-2-1: وسط اختبار الحركة Motility media

حُضّر الوسط بإذابة 0.4% غرام من مسحوق الاكار مع 13 غرام من المرق المغذي في 1 لتر، صب في انابيب وعقم بالمؤصدة ، استخدم لاختبار حركة البكتريا (Isenberg & Garcia , 2004).

3-2-2-2-2: وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور

حُضّر الوسط بإذابة 5 غرام من الببتون و5 غرام K_2HPO_4 في لتر واحد من ماء مقطر ،عقم الوسط بالمؤصدة ثم أضيف إليه 50 مل من محلول 10% كلوكوز والذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة ، استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربونيل (Macfaddin, 2000).

3-2-3: جمع العينات Collection of specimens

تضمنت الدراسة الحالية جمع 84 عينة من محطات تعبئة مياة الاسالة في محافظة الديوانية خلال الفترة من تشرين الأول 2018 ولغاية كانون الثاني 2019 ، بواقع 30 عينة من محطات تعبئة مركز المحافظة و 15 عينة من محطات قضاء عفك ، و15 عينة من محطات قضاء الحمزة و 24 عينة من محطات قضاء الشامية ،حفظت العينات في علب خاصة معقمة ،وبعدها نقلت الى المختبر لغرض زراعها وتشخيصها ، اذ زرعت في اطباق بتري حاوية على وسط الاكار المغذي ووسط الماكونكي ووسط الايوسين- ازرق المثلين الصلب بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة37 م ولمدة 18- 24ساعة لغرض تشخيص البكتريا النامية على الأوساط (MacFaddin, 2004) .

4-2-3: تشخيص البكتريا المعزولة Identification of isolated bacteria

1-4-2-3: الخصائص الزرعية

شُخصت مستعمرات البكتريا مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية لها من حيث شكل وحجم ولون المستعمرات. حيث ظهرت بمستعمرات وردية مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط اكار الماكونكي وذات لون اخضر لماع على وسط الايوسين الأزرق (Macfaddin,2000).

2-4-2-3: الخصائص المجهرية

تمت دراسة الخصائص المجهرية للخلايا البكتيرية من خلال اجراء صبغة كرام ، إذ أخذت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط الاكار المغذي بوساطة عروة ناقل معقم (Loop full) ، ووضعت على شريحة زجاجية مع بضع قطرات ماء معقم ثم فرشت الخلايا وتركت لتجف ، وثبتت بإمرارها على اللهب ثلاث مرات بصورة سريعة وصبغت بصبغة غرام ، وتمت ملاحظة شكل الخلايا وتجمعها بفحصها تحت المجهر الضوئي (Forbes *et al*.,2007).

3-4-2-3: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

وتشمل مجموعة اختبارات أهمها :

1-3-4-2-3: الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامـي على الوسط الزرعي بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من 3% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) المحظر في الفقرة،إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

2-3-4-2-3: الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة للكشف (Collee *et al*., 1996).

3-3-4-2-3: اختبار قابلية الحركة Motility test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة (Finegold and Martin, 1982).

4-3-4-2-3: الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 18 – 24 ساعة، عندها أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 1979).

5-3-4-2-3: اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة عندها تم اضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض (Collee *et al*., 1996).

6-3-4-2-3: اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة بعد ذلك تم إضافة 1 مليليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان

ظهور اللون الوردي خلال 2 –5 دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال 30 دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

7-3-4-2-3: اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

تم تخطيط مائل وسط السيمون ستريت ببكتريا السالمونيلا وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م ولمدة 18 -24 ساعة ، تغير الوسط من الأخضر الى الأزرق دليل على إيجابية التفاعل (Macfaddin, 2000).

8-3-4-2-3: اختبار كلكلر – ايرون Kligler-iron test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الكلكلر الصلب المائل بمستعمرة نقية بطريقة الطعن والتخطيط ثم حضنت بدردجة 37م لمدة 24 ساعة .ثم تقرأ المتغيرات اللونية في قعر وقمة الوسط الزرعي كما موضح ادناه.

القعر/السطح المائل	**اللون**
حامضي/قاعدي	اصفر/احمر
حامضي/حامضي	اصفر/اصفر
قاعدي /قاعدي	احمر/احمر
انتاج H_2S	راسب اسود

5-2-3: حفظ العزلات البكتيرية

1-5-2-3: الحفظ قصير الأمد Short – Period preservation

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة 37 مº لمدة 24 ساعة، ثم حفظت في درجة 4 مº، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات كل شهر، (Forbes *et al.*, 2007).

2-5-2-3: وسط الحفظ طويل الأمد Long – Period preservation

حضر الوسط بإضافة 15% من الكليسيرول إلى المرق المغذي المحضر بإذابة 1.5غرام من الوسط في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالمؤصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة 56 مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة

وحفظ في 4 مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - 20 مْ (Forbes *et al.*, 2007) .

4. النتائج

4-1.عزل وتشخيص بكتريا القولون *E.coli*

اثبتت نتائج الدراسة عائدية 3عزلات الى بكتريا القولون من اصل 84 عينة مأخوذة من محطات تعبئة مياه الاسالة ، ثم شخصت العزلات البكتريا من خلال دراسة الخصائص المظهرية والمجهرية ثم اكدت النتائج باختبارات كيموحيوية وكما يلي:

4-1-1: خصائص الزرعية Cultural characteristic

تكون ذات مستعمرات وردية على اكار الماكونكي **MacConkey agar** نتيجة لتخمرها سكر اللاكتوز كما في الشكل (4-1) ، كما اظهرت النتائج ان مستعمرات البكتريا دائرية ملساء ذات بريق معدني اخضر Green metalic sheen على وسط ايوسين-ازرق المثلين **Eosin methylene blue** كما في الشكل (4-2) .

الشكل 4-1 يمثل مستعمرات بكتريا القولون على وسط اكار الماكونكي **MacConkey agar**

الشكل (4-2) مستعمرات بكتريا القولون على وسط Eosin methylene blue

4-1-2: الخصائص المجهرية **Microscopic characteristic**

تكون البكتريا بشكل عصيات صغيرة سالبة لصبغة كرام ذات لون وردي غير مكون للسبورات بعد اجراء صبغة كرام .

4-1-3: الفوحصات الكيموحيوية Biochmical Test

الفحوصات الموجبة

1- اختبار الكاتليز وذلك من خلال تكون فقاعات هوائية عند إضافة بروكسيد الهيدروجين للمستعمرة البكتيرية الموضوعة على الشرائح الزجاجية
2- اختبار الحركة من خلال ملاحظة انتشار النمو خارج حدود الطعنة
3- اختبار احمر المثيل من خلال تكون اللون الأحمر بعد إضافة الكاشف للمزروع البكتيري وهذا دليل على التحلل الكامل للسكريات وإنتاج حامض

4- تخمر الكلوكوز واللاكتوز والمانتول .

5- موجبة لاختبار الاندول من خلال تكوين حلقة الاندول الحمراء نتيجة تحلل الحامض الاميني الترتيوفان وتكوين حلقة الاندول

6- تنمو على وسط Triple sugar iron اكار الحديد الثلاثي ويكون نموها A/A مع انتاج غاز CO_2 .

الفحوصات السالبة

1- سالبة لاستهلاك السترات لعدم قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الأزرق.

2- سالبة لفحص الاوكسديز وفوكس بروسكور .

جدول (4-1) الاختبارات الكيموحيوية لجميع عزلات بكتريا *E-coli*

الاختبارات	E-coli
الكتاليز	—
الاوكسديز	—
فوكاس بروسكور	—
الاندول	+
احمر المثيل	+
استهلاك سترات	—
الحركة	+
تخمر الكلوكوز	+
تخمر اللاكتوز	+

4. 2: توزيع عزلات بكتريا الـ *E.coli* حسب الموقع الجغرافي

شخصت 3 عزلات من بكتريا القولون (بنسبة عزل 3.5% من مجموع 84 عينة)التي جمعت من محطات تعبئة مياه الاسالة في محافظة الديوانية خلال الفترة من تشرين الاول 2018 ولغاية كانون الثاني 2019 ، شملت 30 عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في مركز المحافظة الديوانية ، و 15 عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الحمزة ، 15 عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء عفك ، 24عينة من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الشامية ،حيث أظهرت نتائج الدراسة ان اعلى نسبة عزل للبكتريا كانت من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الحمزة وبنسبة 2(2.3%) تليها محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الشامية وبنسبة عزل 1(1.2%) في حين لم تسجل محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في مركز المحافظة الديوانية وقضاء عفك أي تلوث ببكتريا القولون (0%) كما موضح في الجدول (4-2) .

جدول (2-4) الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا القواون *E.coli* حسب الموقع الجغرافي

الموقع الجغرافي	العدد الكلي للعينات	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
محطات مركز المدينة	30	0	%0
محطات قضاء الحمزة	15	2	%2.3
محطات قضاء عفك	15	0	%0
محطات قضاء الشامية	24	1	%1.2
المجموع	84	3	%3.5

5. المناقشة

5-1: عزل وتشخيص بكتريا *E.coli*

تعد بكتريا القولون ***E.coli*** من الفلورا الطبيعية للجهاز الهضمي لجسم الانسان وعادة ما تسكن القولون بأعتبارها حميدة التعايش(Yan and Polk ,2004) .

شخصت 3 عزلات من بكتريا القولون (بنسبة عزل 3.5% من مجموع 84 عينة)التي جمعت من محطات تعبئة مياه الاسالة في محافظة الديوانية خلال الفترة من تشرين الاول 2018 ولغاية كانون الثاني 2019 ، وبعد ان شخصت الأنواع البكتيرية قيد الدراسة تشخيصا اوليا من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية ، ظهرت بكتريا *E.coli* بشكل مستعمرات وردية على وسط اكار الماكونكي MacConkey Agar نتيجة لتخمرها لسكر اللاكتوز متوسطة الحجم بينما تكون ذات بريق معدني اخضر على وسط الايوسين الأزرق (MacFaddin ،2000)

كما اظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا بكتريا *E.coli* تكون بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات ، وهذا متفق مع Holt وجماعته (1994).

بالنسبة للختبارات الكيموجيوية ، فقد أظهرت النتائج في الجدول (4-1) فحصا سالب للاوكسديز حيث يعتمد اختبار انزيم الاوكسيديز على امتلاك البكتريا للسايتوكروم C اوكسيديز الضروري لعملية تنفس الخلايا حيث يعمل على تحفيز نقل الالكترونات ، حيث لاتمتلك معظم العزلات القابلية على انتاج انزيم الاوكسيديز وبالتالي فأن بكتريا القولون تسلك مسارات أخرى تستخدم في عملية التنفس هي سايتوكروم bd وسايتوكروم bo3 (Abramson et al, 2000).

في حين اعتمد اختبار الكاتليز على وجود انزيم الكاتليز في الخلايا البكتيرية التي لها القابلية على انتاج بروكسيد الهيدروجين ومنها بكتريا القولون التي أعطت نتائج موجبة لهذا الاختبار حيث يعتبر بروكسيد

الهيدروجين سام للخلايا حيث يعمل الانزيم على تحلل البروكسيد الهيدروجين الى ماء و H_2 و O_2 (Abramson et al, 2000) .

يعزى قابلية بكتريا ***E.coli*** على إعطاء نتيجة موجبة لفحص الاندول الى انتاج انزيم Tryptophanase الذي يعمل على تحويل الحامض الاميني التربتوفان ضمن مكونات الوسط الى الاندول اذ ان استخدام كاشف كوفاكس (حامض الهيدروكلوريك و كحول الاميل) يودي الى تكوين حقلة الاندول الحمراء وذلك لان كحول الاميل لايذوب بالماء وانما يعمل على تلوين الطبقة الدهنية في الجزء العلوي (Macfaddin,2000).

أظهرت جميع العزلات نتيجة إيجابية لاختبار احمر المثيل وذلك لان البكتريا تخمر سكر الكلوكوز ويكون الناتج النهائي ثلاث احماض مايزيد من حموضة الوسط وخفض PH=4.4 مما يؤدي الى تغير لون الكاشف للون الأحمر (Macfaddin,2000) .

كما أعطت جميع العزلات فحصا سالبا لفوكس بروسكور وكذلك سالبة لاستهلاك السترات مما يشير الى عدم قابلية البكتريا على استهلاك السترات (عدم امتلاكها انزيم Citrate dismutase) كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الأزرق بينما تعزى قابلية العزلات على النمو على وسط السيمون ستريت الى قابليتها على استخدام املاح الامونيا كمصدر وحيد للنتروجين حيث يتم انتاج هيدروكسيد الامونيوم مما يؤدي الى ارتفاع قاعدية الوسط وإعطاء نتيجة ايجابيه للاختبار (Harley ,2005)

وكذلك تنمو على وسط Triple sugar iron اكار الحديد الثلاثي ويكون نموها A/A مع انتاج غاز CO_2 نتيجة لتخمرها لسكر اللاكتوز وسكر الدكستروز . كما تمتلك البكتريا القدرة على الحركة بأسواط من النوع المحيطي وهذه النتائج مطابقة مع Holt وجماعتة (1994) و Collee وجماعتة (1996).

2-5: توزيع عزلات بكتريا الـ *E.coli* حسب الموقع الجغرافي

بينت النتائج الموضحة في الجدول (4-2) ان بكتريا القولون حققت نسب تواجد (3.5%) في محطات تعبئة مياه الاسالة في محافظة الديوانية وهذة النتيجة اقل من العديد من الدراسات كما في دراسة Hassan (2008) التي اجراها في مدينة الناصرية حيث بين ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت (48.8%). ودراسة Khurana وجماعته (2002) فقد عزلت فيها هذه البكتريا بنسبة (33.3%) وكانت هذه النتيجة ايضا اعلى من النتيجة الحالية .في حين اظهرت دراسة كاظم وخلف (2012) ان نسبة عزل هذه البكتريا كانت (11.85%) .

من جهة اخرى أظهرت نتائج الدراسة ان اعلى نسبة عزل للبكتريا كانت من محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الحمزة وبنسبة 2(2.3%) تليها محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في قضاء الشامية وبنسبة عزل 1(1.2%) في حين لم تسجل محطات تعبئة مياه الـ الاسالة في مركز المحافظة الديوانية وقضاء عفك أي تلوث ببكتريا القولون (0%) .

قد يعود سبب خلو محطات تعبئة المياه في مركز المحافظة من التلوث ببكتريا القولون الى الرقابة الصحية واتباع الإجراءات الصحية السليمة ، اما الاختلاف في نسب العزل قد يعود الى عدد المحطات المشمولة في الدراسة وكذلك النظافة الشخصية للعاملين بتلك المحطات

الاستنتاجات Conclusions

1- تلوث مياه الاسالة ببكتريا القولون *E.coli* التي قد يكون مصدرها فضلات الانسان والحيوان وهذا يدلل على التلوث البرازي لتلك المياة .

2- خلو محطات تعبئة مياه الاساله في مركز المحافظة وقضاء عفك من التلوث البكتيري .

3- التحري المظهري قد يكون غير كافٍ الا ان النتائج تكون اكثر ايجابية باستخدام اختبارات اكثر كفاءة .

التوصيات Recommendations

1. الاهتمام بالنظافة الصحية لمحطات تعبئة المياه الصالحة للشرب
2. ضرورة اجراء المسح الدوري لمحطات تعبئة وتحلية المياه لتحديد مصادر التلوث البكتيري والاهتمام بالنظافة الشخصية للعاملين .
3. ضرورة استعمال طريقة التخطيط على وسط Chrom Agar في تشخيص بكتريا القولون وذلك لسهولة الأستعمال والسرعة في اعطاء النتائج.
4. التوسع في دراسة بكتريا القولون من الناحية الوراثية ، واستخدام تقنيات أكثر تطوراً في العزل والتشخيص كتقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) للتميز بين العزلات المرضية والغير مرضية كفحوصات توكيدية من خلال اعتماد بادئات نوعية اخرى مثل الجينات المشفرة لبعض عوامل الضراوة.

المصادر References

Blanco,J.E.; Abe , C.M.; Salvador , F.A. ; Falsetti , I.N. ; Vieira, M.A. ; Blanco, J.; , R.T. and Gomes, T.A. Blanco, M.;Machado, A.M.; Elias,W.P.;Hernandes (UPEC) strains may carry virulence (2008). Uropathogenic Escherichia coli coli. FEMS Immunol Med Microbiol properties of diarrhoeagenic E. Abraham S.N.; goguen,J. ; perklemm,D. ; and Beachey,E.H. .52(3):397–406. by Identification of two Ancillary subunits of E.coli type – 1Fimbriae (1987) . products using Antibodies aginest synthetic oligopeptides of Fim Gene .J.Bacteriology .Dec. P. 5530 – 5536 .

M. ; Abramson, J.; Riistama, S. ; Larsson, G. ; Jasaitis, A. ; Svensson-Ek, (2000). The Laakkonen, L. ; Puustinen, A.; Iwata S. ; and Wikstrom,M. coli and Its Ubiquinone Structure of the Ubiquinol Oxidase from Escherichia Binding Site. J. N. S. B. 7:910-917.

Bevanger, L. and Afset , J.E. ; Bruant, G.; Brousseau, R. ; Harel, J. ; Anderssen, E. ; gene linked with diarrhoea due to Bergh, K. (2006). Identification of virulence Escherichia coli by DNA microarray analysis and atypical Enteropathogenic Microbiol. 44(10):3703-3711 . PCR. J. Clin.

urinary tract Ahmed , S.M. and Swedlund , S . (1998). Evaluation andtreatment of 1573-1580. infection in children .J. Am. Fam. Physician. 57(7):

cell size and Akerlund , T. ; Nordström, K. and Bernander , R. (1995). Analysis of -phase batch cultures of DNA content in exponentially growing and stationary 6797. Escherichia coli. J.Bacteriol.177:6791–

Jordan Al-shehabi , A . A.(1998). Human pathogenic microorganisms . 1st ed . Book .Centre company. 332- 341 .

Uropathogenic Alteri , C.J. and Mobley, H.L. (2007). Quantitative profile of the growth in human urine . during Escherichia coli outer membrane proteome Infect.Immun. 75:2679-2688.

of Escherichia Ananias,M. and Yano,T.(2008). Serogroups and virulence genotypes Journal of Medical and coli isolated from patients with sepsis. Brazilian Biological Research.41: 877-883.

andHultgren, Anderson, G.G.; Palermo, J.J.; Schilling, J.D.; Roth ,R. ; Heuser, J. pods in urinary tract infections. S.J.(2003). Intracellular bacterial biofilm like Science.J. 301:105-107.

P. ; Roversi , Anderson, K. L.; Billington , J . ; Pettigrew, D. ; Cota, E. ; Simpson, P.N.; Medof,M .E.; Smith, R. ی P.; Chen, H. A. ; Urvil ,P.;du Merle,L.;Barlow, C.; Lea, S. M. and Matthews , S.(2004).An A.; Nowicki, B.;Le Bougu_nec, model for assembly, architecture, and function of the Dr atomic resolution adhesins. Mol. Cell., 15: 647–657.

Biological Andra, B.S.; Klaus,B.;Harald, L.;Anthony, P.M.and Ulrich,S.(2000). shape of their lipid A activities of lipopolysaccharide are determined by the portion. Eur. J.Biochem. 267:2008-2013.

Woodward, M. J. Anjum, M. F.; Lucchini,S.; Thompson,A.; Hinton,J.C.D.and reveals the phylogenomics of (2003). Comparative genomic indexing Immun. 71:4674-4683. Escherichia coli pathogens.Infect.

,G.B. and Ansaruzzaman , M. ; Bhulyan , N.A. ; Begum , Y.A. ; Kuhn, I. ;Nair Escherichia coli from Sack, D.A.(2007). Characterization Enterotoxigenic phenotyping profiling . J. Med. diarrhoeal patients in Bangladesh using Microbiol .56:217-222