Nanotechnology and image processing as tools for studying escherichia colibiodiversity

Ahmed CHamry Ali BdEl-Hammed

يعتبر عالم الميكروبات اكبر مستودع غير مكتشف للتنوع البيولوجي علي الارض وفهم هذا التنوع واسبابه الرئيسية يفصح عن العلاقات التطورية بين الكائنات ويضع اجابات للاسئلة التي اثيرت من قبل عن العلاقات الميكروبية فيما بينها داخل بيئتها وأيضا فهم الظهور المستحدث لبعض القدرات المرضية الجديدة وتمثل بكتيريا الايشيرشيا كولاي نموذج لدراسة التنوع البيولوجي في البيئات المائية في دراستنا وهي الاكثر دراسة في عالم الميكروبات . بناء علي القاعدة العلمية بأن العوامل البيئية تمارس ضغطا وتأثيرا علي الصفات البيوكيميائية والفسيولوجية والجزيئية علي الانواع التي تحيا فيها نتيجة للتغيير في الخرائط الوراثية لهذه الكائنات , فإن بعض العوامل الفيزوكيميائية للعينات المختارة من مواقع الدراسة ممثلة في مياه الابار , مياه النهر ومياه الصرف تم اختيارها وتقديرها مثل درجة الحرارة , الاس الهيدروجيني , درجة العكارة , الاكسجين الذائب , الاكسجين المستهلك بيولوجيا والاكسجين المستهلك كيميائيا . وتم اختيار هذه العوامل ليعزي اليها انماط التنوع البيولوجي وكانت دائما اعلي قيم تسجل لمياه الصرف لتعطي مؤشرا لدرجة التلوث ومن ثم كثافة التنوع الميكروبي. وعلي الرغم من هذا فإن عدد خلايا الايشيرشياكولاي قد سجل في مياه النهر ليوضح تلوث هذه المياه بالصرف الصحي.تم عزل البكتيريا من عينات المياة بتقنية biolog الانابيب المتعددة القائمة علي التخمر وتم التعريف بطريقتين؛ الاولي : قائمة علي البصمة الايضية والثانية : التحديد الجزئي للتتابع الجيني في rRNA 16s ولكن الطريقة الاخيرة تعطي مجالا اوسع للمقارنة والتحليل لهذا التتابع. وتم وضع تسمية ترمز للعزلات الناتجة طبقا لمواقع الدراسة ممثلة في E.coli-EG1, هناك ان وبما .التوالي علي الصرف ومياه النهر مياه , الابار مياه في E.coli-EG2 and E.coli-EG3, تغيرات متوقعة تحدث للكائنات الحية في بيئة معيشتها لتلائم العوامل المحيطة من جانب وتتطور بالشكل الذي يحفظ لها الاستمرار والبقاء بل والكفاح من اجل البقاء من جانب اخر,هناك نوعان من التطور ؛ الاول قصير الاجل: يستمر لفترات تعتمد علي الظروف المحيطة, والثاني؛ طويل الاجل :يستمر للاجيال المتعاقبة للانواع. وقد تبنت الدراسة عدة وسائل لتتبع التنوع البيولوجي علي المستوي المزرعي, البيوكيميائي والسيرولوجي واختبار القدرة المرضية بصبغة red Congo والحساسية للبكتيريوفاج.ومع هذا تم استخدام الوسائل الجزيئية ممثلة في sequencing DNA وتحليلها.وجاءت تقنية processing Image لتثري البيانات والمعلومة عن هذا التنوع.وقد اوضحت العزلة EG2-coli.E اعلي معدلات نمو علي ثلاثة انواع من بيئات النمو ممثلة في (agar nutrient and TSI,MacConkey) وقد تماشت مع عدد المستعمرات التي تم عدها عند المقارنة بين الثلاثة عزلات.وبالاضافة لهذا فإن القدرة العالية علي عمليات الاكسدة الحيوية التي اتسمت بها هذه العزلة بحكم بيئتها اعطت لها الفرصة علي استهلاك 48 نوع (من 95) من مصادر الكربون بأعلي نسبة بالمقرنة بالعزلات الاخري . وقد تبين من البصمة الايضية ان هناك مجموعات كربونية غير قابلة للاستهلاك.وفيما يخص الصفات الانتيجينية التي ترتبط بالقدرة المرضية من جانب وتميز بين الانواع السيرولوجية المختلفة من جنس الايشيرشياكولاي من جانب اخر فقد تم اجراء اختبار القرابة من عالية درجة علي E.coli-EG1, E.coli-EG3 ان نتائجه بينت والذي Ouchterlony السيرولوجية وعلي النقيض بلنسبة للعزلة EG2-coli.E .وبتعيين حساسية الثلاث عزلات للاصابة بالبكتيريوفاج من خلال اختباري test spot, assay plaque , فقد اوضحت لنتائج تباينات نوعية وكمية من حيث الحساسية حيث استجابت العزلة EG1-coli.E و EG2-coli.E مع وجود تفاوت حيث وجد ان 103 ولقد.الفيروسية للاصابة مقاومة E.coli-EG3 العزلة أظهرت حين في التوالي علي للعزلتين 105 and

اوضح اختبار test agar red Congo قدرة العزلتين E.coli- EG2 و E.coli- EG3 علي الارتباط بالصبغة مما يعني قدرتها المرضية للعائل وعلي النقيض للعزلة E.coli- EG1 التي اوضحت فقدانها لهذه القدرة المرضية.وقد أوضحت الوسائل الجزيئية المعتمدة علي تحديد وتحليل التتابع النيوكليوتيدي هذا التنوع من زوايا اخري تتعلق بالنواحي التطورية ودرجات القرابة. وأظهر التحليل القائم علي المحاذاة بين التتابعات علي وجود قواعد مفقودة في بعض المواقع نتيجة الطفرات بالحذف حتي بلغ هذا التأثير اشده علي العزلة في اختلفت التي والمواقع 57 وعددها التباين مواقع حصر وتم القواعد عدد في الاقصر وهي E.coli-EG 2 -قاعدة واحدة 42 وبناء علي هذه المحاذاة والمقارنة جاءت شجرة القرابة لتوضح ان النسبة بين E.coli عدد مثل اخري صفات وتحددت. E.coli-EG2 للعزلة بالنسبة و93% 97 % كانت E.coli-EG3 و EG1 القواعد كل علي حدة, G+C, T+A , T+A/G+C , G+C % وتعتبر النسبة المئوية لل G+C الاهم في التقسيم والتصنيف للكائنات. وقد توافقت درجة الانصهار مع G+C % بالنسبة للعزلة E.coli EG2- في اعلي قيمها. وباستخدام برامج المعلوماتية الحيوية لدراسة خاصية الحامض النووي المتقطع بواسطة انزيمات القطع فقد وضحت التشابه بين العزلة E.coli-EG1 وE.coli-EG 3 في عدد القطع ولكن اختلفت في الحجم وعلي العكس أظهرت العزلة E.coli-EG 2 سلوكا مغايرا في عدد القطع وأيضا الحساسية لانزيم ECO57MI.وبتطبيق تحاليل وراثة الافراد علي العزلات تحت الدراسة , فقد تم تحديد الانواع المختلفة للطفرات وقياس معدلات التطور في كل موقع علي التتابعات النيوكليوتيدية بعد استقصاء اماكن الحذف, ومن خلالها ايضا تم تقدير احتمالات حدوث الطفرات في كل الشفرات الثلاثية الخاصة بالتتابعات. وعلي الرغم من أن الطفرات والانتقال الافقي للجينات قد شكلا اهم الميكانيكات الدافعة للتطور , فقد تأكد من خلال نظرية التعادل لتفسير التطور الجزيئي أن هناك ميكانيكية drift genetic (التغير في عدد الاليلات لجين معين) قد تزيد, تعادل أو تقلل من تأثير الطفرات في مجموعة من الافراد بناء علي نوع الطفرات وعدد الافراد. وبناء علي اختبار test D s‘Tajima, فقد تم التوصل الي أن drift genetic تعادل تأثير الطفرات من وجود عدد وسطي من الاليلات كما تبين من تساوي كلا من Θ و π.وقد اثبتت الدراسة تقنية processing Image كطريقة جديدة لتوضح هذا التباين علي المستوي التركيبي للخلية الحية. وتعتمد هذه الطريقة علي عدة خطوات منها التصوير بالميكروسكوب الالكتروني النافذ واجراء العمليات علي ال level RBG and level gray ومن ثم اجراء analysis histographic لتحويل الصورة لصورة رقمية. واعطي التحليل الرقمي قيما لكثافات ال pixels من حيث المنتوسط والوسيط والانحراف المعياري وعدد هذه ال pixels . وبين هذا التحليل تباين بين العزلات في التركيبات الخلوية حيث اظهر اعلي قيما -لمعدلات تكوين envelope , fimbrae للعزلة E.coli-EG2 , والسيتوبلازم وسوط الحركة للعزلة E.coli تبني التي القاعدتين احدي Image processing بذلك وتمثل . E.coli-EG3 للعزلة النووي والجسم EG1 عليها نكنولوجيا النانو وهي approach down-top .ولقد تم وضع نموذج لتضاعف في بكتيريا الايشرشياكولاي لنموذج لاوليات النواة وهذا النموذج قد تم التوصل اليه عن طريق processing Image لل image TEM وتبين ان هذا النموذج قد اتفق مع فرضية تضاعف الحامض النووي الثنائي الاتجاه وهذا النموذج هوالاول من نوعه لانه تم استخراجه من image real وليس افتراضي.واختبرت العزلات الثلاثة في قدرتها غلي تكوين جزيئات الذهب في صورته المتناهية الصغر وأوضحت نتائج ايجابية ولكن بمعدلات متباينة وهذا مثال لل approach up-bottom كقاعدة ثانية لتكنولوجيا النانو.تناولت هذه الدراسة التنوع البيولوجي علي عدة مستويات ومن منظورات مختلفة مرتبطة بالناحية التطورية والتقسيمية مع الاخذ في الاعتبار تفسير سلوك العزلات تحت الدراسة من خلال ارتباطها بالبيئة. واكدت معظم الوسائل السلوك المغاير للعزلة E.coli-EG2 والتي ابتعدت عن العزلتين الاخرتيين من الناحية التطورية والذي قد يدعم اعتبارها نوع جديد.ويعزي التنوع البيولوجي لبكتيريا الايشيرشياكولاي في هذه الدراسة الي ظاهرتين وهما الطفرات والانتقال الافقي للجينات او القطع الجينية وقد تم صياغة افتراض لتفسير التنوع البيولوجي لبكتيريا الايشيرشياكولاي كنموذج بالرجوع لنظرية الانتخاب الطبيعي ونموذج التـأثير الجينومي وينص هذا الافتراض علي" يمكن تفسير تطور بكتيريا الايشيرشياكولاي كنموذج لاوليات النواة في ضوء التأقلم بالانتخاب الطبيعي من خلال تراكم الطفرات , التغير في عدد الاليلات الناجمة عنها واعادة التكوين الجينومي حيث ان الافراد ذات الطفرات المرغوبة تكون لديها فرصة افضل للبقاء والعكس بالنسبة للطفرات الغير مرغوبة مع الاخذ في الاعتبار الاصل المنفصل لكل نوع وتطوره نسبيا مع الزمن".