عزل وتشخيص بعض مسببات الأمراض المنقولة من عينات التربة في محافظة دمشق وريفها

د. بثينة الأشقر

ملخص البحث

تُعد التربة مستودعاً طبيعياً مهماً لمسببات الأمراض المعوية، مما قد يجعل لها دوراً كبيراً في نقل الأمراض المعوية. وتسبب الأمعائيات المنقولة بالتربة العدوى عبر تناول غذاء ملوث بالتربة أو استنشاق غبار تربة ملوث. هدفت هذه الدراسة إلى التحري عن وجود بعض الجراثيم المعوية المنقولة بالتربة وهي الإشيرشيا القولونية، السالمونيلا، والكليبسيلا في عينات تربة جمعت من مناطق مختلفة في محافظتي دمشق وريفها.

تم جمع 62 عينة تربة من تسع مناطق موزعة بين دمشق (بساتين الرازي، شارع بغداد، المهاجرين، باب توما، شيخ محي الدين) وريفها (دير الحجر، يبرود، معلولا، الصبورة). حضرت التخفيفات المتسلسلة من العينات وزرعت على وسط مغذي عام وعلى أوساط انتقائية لعزل الإشيرشيا القولونية والكليبسيلا، و السالمونيلا والشيغيلا، وحضنت الأطباق عند 37°م لمدة 24-48 ساعة. شخصت العزلات بالاختبارات الكيموحيوية، وتم تأكيد التشخيص جزيئياً باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) باستخدام مرئسات خاصة بكل جنس. تراوح اللوغاريتم العشري للتعداد الجرثومي الكلي بين 3.29 و 4.47 CFU/غ تربة، حيث سجلت أعلى القيم في منطقة يبرود (4.47) وأدناها في شارع بغداد ودير الحجر (3.29). أما التعداد على وسط EMB فقد تراوح بين 2.56 و 3.56 CFU/غ، بينما تراوح على وسط SS Agar بين 1.1 و 2.15 CFU/غ. أظهرت النتائج وجود الإشيرشيا القولونية والسالمونيلا والكليبسيلا في جميع المناطق المدروسة بنسب متفاوتة، في حين لم تعزل الشيغيلا في أي من العينات. أكدت نتائج الـ PCR وجود العصابات المتوقعة بأحجامها لكل من الجراثيم المدروسة، وكانت مطابقة بنسبة 100% مع نتائج

الاختبارات الكيموحيوية. تشير النتائج إلى انتشار واسع للجراثيم المعوية الممرضة في ترب مناطق دمشق وريفها، مع تباين في التعدادات بين مناطق الجمع.

الكلمات المفتاحية: الأمعائيات، التربة، الإشيرشيا القولونية، السالمونيلا، الكليبسيلا، تفاعل PCR، تلوث.

Isolation and Identification of Pathogens Transmitted from Soil Samples in Damascus Governorate and Its Countryside

Abstract

Soil is a significant natural reservoir for enteric pathogens, potentially playing a major role in the transmission of enteric diseases. Soil-borne Enterobacteriaceae cause infection through consumption of contaminated food or inhalation of contaminated soil dust. This study aimed to investigate the presence of some soil-transmitted enteric bacteria, namely *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Klebsiella*, in soil samples collected from various areas in Damascus Governorate and its countryside.

Sixty-two soil samples were collected from nine locations distributed between Damascus (Al-Razi Orchards, Baghdad Street, Muhajreen, Bab Touma, Sheikh Muhyi Al-Din) and its countryside (Deir Al-Hajar, Yabroud, Maaloula, Al-Saboura). Serial dilutions were prepared from the samples and cultured on general nutrient agar and selective media for isolation of *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, and *Shigella*, then incubated at 37°C for 24-48 hours. Isolates were identified using biochemical tests, and identification was molecularly confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using genus-specific primers.

The logarithmic total bacterial count ranged from 3.29 to 4.47 CFU/g soil, with the highest value recorded in Yabroud (4.47) and the lowest in Baghdad Street and Deir Al-Hajar (3.29) CFU/g. Counts on EMB agar ranged from 2.56 to 3.56 CFU/g, while counts on SS Agar ranged from 1.1 to 2.15 CFU/g. The results revealed the presence of *E. coli*, *Salmonella*, and *Klebsiella* in all studied areas with varying frequencies, whereas *Shigella* was not isolated from any sample. PCR results confirmed the expected bands for each of the studied bacteria, showing 100% concordance with biochemical test results.

The findings indicate widespread occurrence of pathogenic enteric bacteria in soils of Damascus and its countryside, with variations in counts among sampling areas.

Keywords: Enterobacteriaceae, soil, *Escherichia coli, Salmonella, Klebsiella*, PCR, contamination.

1. المقدمة:

الأمراض المنقولة عبر التربة قد تسببها مجموعة واسعة من الكائنات الحية، ويمكن تقسيمها إلى مجموعتين رئيسيتين: الأولى هي الأحياء الدقيقة التي توجد بشكل طبيعي في التربة وتسبب الأمراض، والثانية هي مسببات الأمراض التي تبقى حية في التربة لفترات طويلة، مما يمكنها من نقل العدوى إلى الإنسان والحيوان والنبات. تتميز التربة باحتوائها على مجتمع ميكروبي حيوي غني وديناميكي، يتأثر بعدة عوامل تشمل الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة، والظروف المناخية، والتفاعلات مع الكائنات الحية الأخرى (نباتية وحيوانية)، بالإضافة إلى الترسيبات المحمولة عبر الهواء أو الماء، وكذلك التدخلات البشرية [1].

هناك عدة مجموعات من الجراثيم المسببة للأمراض لدى البشر، من أبرزها الأمعائيات (Enterobacteriaceae)؛ وهي جراثيم عصوية الشكل، سالبة لصبغة غرام، توجد بشكل شائع في أمعاء البشر والحيوانات، ويُعد الإسهال من أهم أعراض الإصابة بها. تتميز هذه الجراثيم بقدرتها على مقاومة التجميد والتجفيف، وقد تتحمل درجات حرارة مرتفعة نسبياً. كما أن رطوبة التربة، إلى جانب امتصاص جزيئات الطين، يُسهمان في تعزيز بقاء هذه الكائنات المعوية [2].

في بعض الأحيان، يمكن عزل مسببات الأمراض المعوية سالبة الغرام من التربة بدلاً من الماء أو البراز. ونظراً لإمكانية وصول أي كائن حي إلى التربة عبر الماء أو الهواء الجوي، فإن التربة غالباً ما تُعتبر مصدراً رئيسياً للعدوى المنقولة بالمياه. قد تصل هذه المسببات إلى التربة نتيجة التلوث بمياه الصرف الصحي، أو النفايات البشرية والحيوانية. وفي البلدان النامية، يزداد الخطر بسبب استخدام مياه الصرف الصحي المنزلية غير المعالجة في الري الزراعي[3] .

من الممارسات التي تسهم في زيادة دخول كميات كبيرة من الأمعائيات إلى البيئة الترابية: استخدام الفضلات البشرية والحيوانية كأسمدة عضوية، والتخلص غير الملائم من الفضلات البشرية في الحدائق والمنتزهات العامة، خاصة في المناطق التي تفتقر إلى مرافق صحية مناسبة [4]

تتسبب الجراثيم المعوية سنوياً في وفاة ما بين 4 إلى 6 ملايين شخص حول العالم، وتُعد ثاني أكثر أسباب وفيات الأطفال شيوعاً على المستوى العالمي. ويصل المتوسط التقريبي للجراثيم القولونية في التربة إلى حوالي 10^6 وحدة تشكيل مستعمرة لكل غرام، وتشمل أبرزها: السالمونيلا

(*Salmonella*)، الإشيرشيا القولونية (*E. coli*)، الكليبسيلا (*Klebsiella*)، والشيغيلا (*Shigella*) [5].

تنتمي كل من السالمونيلا والشيغيلا إلى عائلة الأمعائيات، وعلى الرغم من أن معظم أفراد هذه العائلة قادرة على تخمير اللاكتوز منتجة غازاً خلال 48 ساعة (وهو ما يُعرف بالجراثيم القولونية بالمعنى الواسع)، إلا أن السالمونيلا والشيغيلا لا تخمران اللاكتوز عادةً، مما يميزهما عن غيرهما من الأمعائيات مثل الإشيرشيا القولونية والكليبسيلا [6].

العديد من سلالات جراثيم الإشيرشيا القولونية المنتشرة داخل الأمعاء غير ضارة ولا تسبب الأمراض؛ ومع ذلك هناك سلالات عديدة تنتج الذيفانات التي يمكن أن تسبب المرض لدى البشر أو الحيوانات والتي قد تكون شديدة في بعض الحالات اعتماداً على صحة المضيف ,[7] إن الإشيرشيا القولونية ذات النمط المصلي O157 السبب الأكثر شيوعاً للإسهال الجرثومي لدى الأطفال في البلدان النامية؛ حيث تتسبب في عدة مئات من ملايين حالات الإسهال وعشرات الآلاف من الوفيات على مستوى العالم كل عام [8]. وسطياً الجرعة المعدية من 10 إلى 100 جرثومة فقط كافية للتسبب في المرض، وهذا ما يُوضح الفوعة العالية نسبياً لهذا النمط المصلي من الإشيرشيا القولونية[7].

إن داء السالمونيلات ينتج عن مجموعة من الجراثيم المتحركة سالبة الغرام من جنس السالمونيلا. يشمل الجنس العديد من الأنواع الجرثومية وقد يحتوي كل نوع العديد من الأنماط المصلية. على سبيل المثال، يحتوي النوع *S. enterica* أكثر من 2500 نوع مصلي مختلف موصوف، بعضها مقيد بالمضيف وبعضها الآخر قد يكون له نطاق مضيف واسع جداً [9] . يظهر داء السالمونيلات كواحد من ثلاثة متلازمات متميزة، حمى التيفوئيد (المعوية)، التهاب الأمعاء؛ وحمى غير تيفوئيدية [10]؛ حيث أن أعراض الحمى التيفية غير نوعية مثل الإسهال أو القيء أو تضيق في التنفس؛ ولكن في بعض الحالات قد يتورم البطن والكبد والطحال يترافق مع بطء نسبي في ضربات القلب [11].

الكليبسيلا جراثيم سالبة الغرام من عائلة الجراثيم المعوية؛ عصوية الشكل. غير متحركة. غير متبوغة. ذات جدار خلوي مكون من عديد السكاكر (polysaccharides). تعد الكليبسيلا من أهم الأنماط الجرثومية الشاغلة للطب السريري والتي تؤدي لظهور أخماج ذات مدى، مثل: ذات

الرئة والتهاب الجهاز البولي وانتان الدم وغيره [12] وقد تم الكشف عن انتشار الأنواع المعندة بشدة من هذه الجراثيم بكل دول العالم مما جعلها تصبح حالة صحية عامة مهددة للحياة [13]. وتعد خيارات الأنظمة العلاجية ضد الكليبسيلا الرئوية المعندة على الأدوية محدودة للغاية، ومما يجعل الأمر أكثر سوءاً عدم قدرة الأدوية الحديثة على إحداث نجاعة كبيرة ضد هذه الجراثيم [14].

تُعد الإشيرشيا القولونية والسالمونيلا والكليبسلا الأكثر شيوعاً للأمراض التي تنتقل عن طريق الأطعمة الملوثة؛ فالسبب الرئيسي لتلوث الخضروات وبعض المحاصيل بهذه الجراثيم هو من التربة [15]. وعلى الرغم من أن الطرائق الرئيسية لانتقال الأمعائيات هي مياه الصرف الصحي الملوثة للطعام أو الماء، لكن أيضاً يمكن أن تبقى الإشيرشيا القولونية والسالمونيلا والكليبسلا في التربة لفترات زمنية طويلة كافية تؤدي إلى الإصابة. ويُعتبر محتوى رطوبة التربة العامل الرئيسي الذي يؤثر على طول فترة بقاء الأمعائيات في التربة؛ حيث يمكن أن تبقى حية في التربة الجافة لمدة 14 يوماً وأطول في التربة الرطبة [16]. وقد أظهر Avery وزملاؤه [17] أنها يمكن أن تعيش على سطح النباتات لمدة تصل إلى 6 أسابيع؛ وفي التربة لمدة 8 أسابيع؛ مع الأخذ بعين الاعتبار رطوبة التربة، ونوع السماد المُستخدم. كما أن السالمونيلا والإشرشيا القولونية والكليبسلا تصل للتربة غالباً عبر الأسمدة المستخدمة في تسميد التربة؛ والتي تبقى قادرة على الاستمرار حتى 231 يوماً مسببة تلوث الخضروات [18].

2. هدف البحث:

تُعد بكتيريا الأمعائيات من المجموعات الجرثومية واسعة الانتشار في البيئات المختلفة، ولا سيما التربة، حيث تلعب دوراً مهماً في الدورات الحيوية للمواد العضوية، كما تمثل في الوقت نفسه مؤشرات حيوية على التلوث البرازي والمخاطر الصحية المحتملة، لذلك تكمن أهمية عزل الجراثيم الممرضة من التربة في حماية الصحة العامة حيث أن اكتشاف المسببات المرضية يساهم في الوقاية من الأمراض التي تنتقل للإنسان والحيوان عبر التربة الملوثة. يتأثر تنوع وازدياد الجراثيم المسببة للأمراض في التربة بشكل رئيسي بالتغيرات في أعداد السكان. لذا يعد تحديد هذه الجراثيم ضروري لفهم طبيعة الأمراض التي تسببها ومن ثم تطوير وسائل السيطرة عليها؛ وتزداد أهمية

ذلك في ظل انتشار التهاب المعدة والأمعاء الذي تسببه بعض جراثيم سالبة الغرام في البلدان النامية، مما يجعل التحقيق من مصادر هذه العدوى إجراءً ضرورياً للصحة العامة؛ وانطلاقاً من هذه الأهمية، هدفت دراستنا إلى التحري عن بعض الجراثيم الممرضة التابعة لفصيلة الأمعائيات التي يمكن أن تنتقل عبر التربة وذلك في عينات مأخوذة من بعض مناطق دمشق وريفها.

3. الطرائق:

1.3 الاعتيان:

تم جمع 62 عينة تربة من مناطق متعددة في محافظتي دمشق وريفها، تراوح وزنها بين 250 و300 غرام، وذلك على عمق 5 سم من سطح التربة باستخدام أداة حفر معقمة، خلال الفترة الممتدة من 27 تشرين الثاني 2018 ولغاية 27 شباط 2019. شملت مواقع الاعتيان في محافظة دمشق: منطقة بساتين الرازي (المزة)، شارع بغداد، المهاجرين، باب توما، وشيخ محي الدين. أما في ريف دمشق، فشملت: دير الحجر، يبرود، معلولا، والصبورة. بعد الجمع، وُضعت العينات في أكياس معقمة، وحُفظت في مبردات تحتوي على الثلج، ثم نُقلت إلى المختبر في أسرع وقت ممكن. أُجري التعداد الميكروبي العام باستخدام وسط الآغار المغذي (Nutrient Agar)، كما تم الكشف عن بعض الجراثيم الممرضة باستخدام أوساط انتقائية تضمنت: وسط EMB لعزل الإشيرشيا القولونية والكليبسيلا، ووسط SS Agar (*Salmonella Shigella* Agar) لعزل السالمونيلا والشيغيلا (PIA, Difco, Sparks, Maryland, USA) [19].

ونظراً لأن هدف الدراسة الرئيس كان التحري الجرثومي عن بعض مسببات الأمراض المعوية، فقد ركزت منهجية العمل على الجوانب الجرثومية. لم يتم ضمن نطاق هذه الدراسة قياس الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة مثل الرطوبة ودرجة الحموضة (pH) والمادة العضوية، وذلك لكونها تقع خارج نطاق الاختصاص الدقيق للبحث الحالي. ومع ذلك، فإن الدراسات المستقبلية قد تفيد في ربط هذه العوامل بالتعداد الجرثومي الذي تم الحصول عليه.

2.3 زرع العينات:

يُؤخذ في أنبوب معقم 10 غ من عينة التربة ويُضاف إلى 90 مل من الماء المقطر المعقم؛ وبذلك نكون حصلنا على التمديد 10^{-1}، وترقم برقم العينة التسلسلي، يُرج المزيج جيداً ليتشكل

معقد متجانس؛ يُؤخذ بعد ذلك 1 مل من التمديد الأول، وتُضاف إلى 9 مل من الماء المقطر والمُعقم ضمن أنبوب 15 مل وترج جيداً، ثم تحضر أربعة تخفيفات أخرى بنفس الطريقة وينتج عن ذلك تمديدات متسلسلة من 10^{-1} إلى 10^{-5} من عينة التربة.

يُؤخذ من كل من التخفيفات السابقة 1 مل ويُزرع على طبق NA وعلى أوساط الزرع الانتقائية، وتُفْرَش بوساطة ماسحة زجاجية معقمة، تُتْرَك الأوساط حتى تتشرب العينة جيداً، يؤخذ 3 مكررات لكل تخفيف، وتحضن الأطباق عند حرارة 37°م لمدة 72 ساعة على الأقل لحين نمو المستعمرات الجرثومية. تم اختيار المستعمرات الجرثومية النقية والمفردة لمتابعة العمل عليها.

3.3 صبغة غرام:

تُجرى صبغة غرام للجراثيم المعزولة للتعرف على شكل الخلايا الجرثومية وتَوَضُّعِها ولونها (تحضير ثلاث مُحضَّرات على الأقل من مستعمرات جرثومية مختلفة)، حيث يُحَضَّر غشاء جرثومي رقيق ومتجانس، ويُلَوَّن الغشاء بنقاط من صبغة الكريستال البنفسجي لمدة 30 ثانية، ثم يُغْسَل بتيار خفيف من الماء، ويُضاف عدة نقاط من محلول الإيودين لمدة 60 ثانية، يتم غسل المحضر بتيار خفيف من الماء، ثم يُعامل المحضر بالكحول الإيتيلي بنسبة 95% لمدة 15 ثانية، ويُغْسَل مباشرة بتيار خفيف من الماء لإيقاف عمل مزيل اللون، ثم يُلَوَّن المحضر بالسفرانين لمدة 15 ثانية، بعد ذلك يُغْسَل بلطف ويُنَشَّف بورق الترشيح؛ ليتم فحصه بوساطة المجهر الضوئي.

4.3 الاختبارات الكيموحيوية:

أجريت سلسلة من الاختبارات الكيموحيوية وفقاً للخصائص الحيوية الكيميائية الواردة في الدليلين المرجعين [20,21]. تُحَضَّر معلقات جرثومية لكافة العزلات المُراد اختبارها، حيث تُؤْخَذ مستعمرات نقية وتحل في 1 مل من المحلول الموقي (Phosphate- Buffered saline PBS) بكثافة تعادل McFarland 0.5، يُؤخذ من هذا المعلق حجم 50 ميكروليتراً لكل مستعمرة نقية ويُضاف إلى حجم 150 ميكروليتراً وسط اختبار لكل بئر من صفيحة الاختبارت الكيموحيوية ذات 96 بئر، حيث كل بئر مسؤول عن تفاعل كيموحيوي معين، وتوضع لصاقات خاصة بالصفائح وتُحضن مدة 24 ساعة في الدرجة 37°م، بعد انتهاء فترة الحضن تُنزع اللصاقة وتُضاف بعض

الكواشف وتُقرأ النتائج بالاستعانة ببرنامج Advanced Bacterial Identification Software (ABIS-online)على موقع Regnum Prokaryotae .

1.4.3. اختبار الكاتالاز: يُستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود أنزيم الكاتالاز الذي تنتجه بعض أنواع الجراثيم، حيث يتم في السلسلة التنفسية لبعض الأنواع إرجاع الفلافوبروتينات وبروتينات حديدي كبريتي لتشكل الماء الأوكسجيني ومركبات تحوي جذور فوق الأوكسيد وهي مركبات سامة يؤدي تراكمها في الخلية إلى الموت ولذلك فإن هذه الأنواع البكتيرية تنتج أنزيماً خاصاً يساعدها على التخلص من هذه المركبات السامة، ويتم إجراء هذا الاختبار بإضافة ماء أوكسجيني ممدد (3%) إلى المزرعة وفي حال ظهور أي فقاعات يُعد التفاعل إيجابياً ويكون سلبياً في حال عدم ظهورها.

2.4.3. اختبار الأوكسيداز: يعتمد هذا الاختبار على قدرة الجراثيم على إنتاج أنزيم الأوكسيداز داخل الخلوي حيث أجري باستعمال شرائح أوكسيداز BL ™DrySlide™ حيث يوضع عليها جزء من المستعمرة باستعمال ابرة الزرع ، يُظهر الاختبار نتيجة موجبة بتغير لون المستعمرات إلى الأرجواني الداكن أو الأزرق خلال 10–30 ثانية.

3.4.3. اختبار الفوكس بروسكاوير VP: هو اختبار لوني يكشف قدرة بعض الجراثيم القدرة على استقلاب حمض البيروفيك المتشكل إلى أسيتيل ميتيل كاربينول (الأسيتوئين) الذي يتحول بوجود الأوكسجين وهيدروكسيد البوتاسيوم 40% إلى دي أسيتيل. يُلَقَّح وسط MR–VP السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18–24 ساعة. يُضاف 120 ميكرولتر من α–نفتول و40 ميكرولتر من KOH 40% بوجود الأكسجين ويُتْرَك في درجة حرارة الغرفة لمدة 10–15 دقيقة. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون مائل إلى الزهري على السطح. ويكون التفاعل سلبياً إذا ظهر لون أصفر على السطح.

4.4.3. إرجاع النترات: يُلَقَّح وسط النترات السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة. يُضاف 20 ميكرولتر من الكاشف A و20 ميكرولتر من الكاشف B. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون أحمر أو زهري بشكل واضح خلال دقائق معدودة. إذا لم يحدث تغير لوني، تُضاف كمية صغيرة من مسحوق الزنك وتُهَزُّ بقوة وتُتْرَك في درجة حرارة

الغرفة لمدة 10–15 دقيقة. يكون التفاعل إيجابياً إذا بقي الوسط عديم اللون. ويكون التفاعل سلبياً إذا عاد لون الوسط إلى الزهري.

5.4.3. اختبار الإندول: يُعد الإندول من المركبات العضوية العطرية متغايرة الحلقة الذي تستطيع أن تنتجه بعض أنواع الجراثيم كناتج لتحطيم الحمض الأميني التربتوفان والذي يتم بواسطة أنزيم التربتوفاناز وينتج عنه أيضاً البيروفات والنشادر. يُلَقَّح وسط النترات السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة. يُضاف 20 ميكرولتر من كاشف Kovacs. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون يتراوح من الزهري إلى الأحمر. ويكون التفاعل سلبياً إذا لم تحدث تغيرات لونية.

6.4.3. نزع زمرة الكربوكسيل من الليزين: يُلَقَّح وسط Lysine decarboxylase بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة بشكل لا هوائي عن طريق تغطية الوسط بطبقة من زيت معدني. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون بنفسجي يبهت تدريجياً ليصبح أصفر بنفسجي. ويكون التفاعل سلبياً إذا ظهر لون أصفر.

7.4.3. نزع زمرة الكربوكسيل من الأُورْنِيثين: يُلَقَّح وسط ornithine decarboxylase بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة بشكل لا هوائي عن طريق تغطية الوسط بطبقة من زيت معدني. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون بنفسجي يبهت تدريجياً ليصبح أصفر بنفسجي. ويكون التفاعل سلبياً إذا ظهر لون أصفر.

8.4.3. حلمهة الأرجينين: يُلَقَّح وسط arginine decarboxylase بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة بشكل لا هوائي عن طريق تغطية الوسط بطبقة من زيت معدني. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون بنفسجي يبهت تدريجياً ليصبح أصفر بنفسجي. ويكون التفاعل سلبياً إذا ظهر لون أصفر.

9.4.3. حلمهة البولة: يُلَقَّح وسط البولة السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون زهري مُحْمَر. ويكون التفاعل سلبياً إذا لم يظهر أي تغير لوني.

10.4.3. استخدام السِّترات: يُلَقَّح وسط السِّترات السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 24-48 ساعة. يكون التفاعل إيجابياً إذا حدث نمو منتشر مع أو

بدون ظهور لون أزرق بروسي Prussian-blue فاقع. ويكون التفاعل سلبياً إذا لم يحدث نمو ولم يتغير اللون الأخضر.

11.4.3. استخدام المالونات: يُلَقَّح وسط المالونات السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 24–48 ساعة. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون أزرق بروسي Prussian-blue. ويكون التفاعل سلبياً إذا أصبح اللون أصفراً أو لم يحدث تغير لوني.

12.4.3. استخدام الطرطرات (Jordan's): يُلَقَّح وسط الطرطرات السائل بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 24–48 ساعة. يكون التفاعل إيجابياً إذا ظهر لون أصفر. ويكون التفاعل سلبياً إذا لم يحدث تغير لوني.

13.4.3. اختبار الحركة: تُلَقَّح المستعمرات المُختارة المأخوذة من زراعة صلبة نقية عمرها 18 ساعة، أو من زراعة سائلة عَكِرة بعمر 4–8 ساعات في وسط الحركة وذلك باستخدام إبرة مستقيمة يوخَز مركز البئر حتى منتصف طوله، ثم يتم الحضن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة. يكون التفاعل إيجابياً إذا انتشر اللون الزهري في الوسط. ويكون التفاعل سلبياً إذا ظهر خط أحمر في موقع الوخز ولم يحدث انتشار.

14.4.3. اختبار حلمهة الجيلاتين: يُلَقَّح وسط الجيلاتين بـ 10 ميكرولتر من المُعَلَّق البكتيري ويُحْضَن في الدرجة 37°م لمدة 18 ساعة. يكون التفاعل إيجابياً إذا تحول الآغار شبه الصلب إلى سائل بعد الحضن في الدرجة 4°م. ويكون التفاعل سلبياً إذا بقي الآغار شبه صلب بعد الحضن في الدرجة 4°م.

15.4.3. اختبارات تخمير السكاكر: تختلف الأنواع البكتيرية في قدرتها على تخمير السكاكر ويستفاد من هذه الاختلافات في تمييز الأنواع عن بعضها ويحتوي الوسط المستعمل في هذا الاختبار على الببتون وبنفسجي البروم كريزول كمشعر و1% من محلول السكر المراد اختباره. يجب مراقبة الاختبار لفترة تتراوح بين 3–5 أيام للحكم على سلبية التفاعل ويتم الكشف عن إيجابية التفاعل بتغير لون الوسط إلى الأصفر. ومن السكاكر المستخدمة في الصفيحة: D-Adonitol وL-Arabinose وCellobiose وDulcitol وGlycerol وD-Glucose وmyo-Inositol وLactose وMaltose وD-Mannitol وD-Mannose وMelibiose وMucate وRaffinose وL-Rhamnose وD-Sorbitol وSucrose وTrehalose وD-Xylose.

5.3 استخلاص الـ DNA الجينومي:

يتم استخلاص الـ DNA الجرثومي باستعمال طريقة فينول–كلوروفورم Phenol-Chloform [22]، حيث يتم بداية استنبات مستعمرة جرثومية معزولة في وسط مغذي عام في الدرجة 37°م، ليلةً كاملةً، ثم يُؤخذ 1.5 مل من المستنبت الجرثومي ويُثفل لمدة 10 دقائق بسرعة 7500 rpm، يُوضع فوق الراسب الجرثومي 467 µl من موقي الـ TE (Tris–EDTA 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5-8.0) ويُضاف 8 µl من الليزوزيم (10 ملغ/مل)، يُرج المزيج جيداً ثم يُترك لمدة ساعة في حمام مائي، في الدرجة 37°م، يُضاف 3 µl من البروتيناز K (20 ملغ/مل)، و30 µl من الـ SDS (10%) ويُحضن المزيج في الدرجة 50°م لمدة ساعة، ثم يُضاف 200 µl من الـNaCl (5 مول)، ويُضاف 750 µl من المزيج فينول–كلوروفورم مع المزج الجيد، ثم يُثفل المزيج بسرعة 13000 rpm لمدة 15 دقيقة، يُضاف إلى الطافي (الحاوي على المادة الوراثية) 450 µl من الإيزوبربانول ويُثفل المزيج بسرعة 13000 دورة/د لمدة 45 دقيقة، ثم يُضاف إلى الراسب 1 مل من الإيتانول 70% لغسل الـ DNA بعد الترسيب بالإيزوبروبانول، وذلك لإزالة الأملاح والملوثات العضوية المتبقية مع المحافظة على ترسيب DNA ومنع جفافه الزائد، إذ أن الإيثانول المطلق (100%) قد يؤدي إلى صعوبة في إذابة DNA لاحقاً، ثم يُثفل المزيج بسرعة 13000 rpm لمدة 5 دقائق في الدرجة 4°م، ثم يُترك الراسب حتى يجف، ثم يُضاف 20 µl من موقي الـ TE ثم ثم قياس تركيز ونقاوة DNA باستخدام جهاز قياس المطيافية النانوي Nanodrop عند طول موجة 280 nm، حيث تعد النسبة 280A/260A بين 1.8–2.0 مقبولة وأن الدنا نظيف بدون شوائب. ويُحفظ الدنا البكتيري بالدرجة −20°م لحين الاستخدام.

6.3 اختبار التفاعل السلسلي للبوليمراز (PCR):

تم إجراء اختبار التفاعل السلسلي للبوليمراز باستخدام مرئسات لمورثات مُحافظة ضمن الجنس والنوع لكل من الإشيرشيا القولونية والكليبسلا والسالمونيلا (الجدول 1)، حيث تم طلب المرئسات من شركة Macrogen (سيؤول، كوريا)، يتضمن التفاعل 2 µl من عينة الـ DNA ذات التركيز 100 ng، و2.5 µl من الموقي ذو التركيز X10، و1.5 µl من $MgCl_2$ ذو التركيز 50

mM، و0.5 µl من النكليوتيدات منقوصة الأوكسجين dNTPs ذات التركيز 10 mM، و0.2 µl من أنزيم البوليميراز Taq DNA polymerase ذو التركيز 5U، و2 µl من المرئسات ذات التركيز 10 µM الجدول (1)، وتُمّم الحجم إلى 25 µl باستخدام الماء المقطر الخالي من النوكلياز Nuclease-Free Water [23]، أجري التفاعل باستخدام جهاز PCR من شركة BioRadالذي يمر بالخطوات الموضحة في الجدول 2

الجدول 1: المرئسات المستخدمة في دراستنا

Bacteria species	Gene	Annealing Tm	Sequence 5`- 3`	Product size (bp)
Kebsiella sp.	*Gyrase A*	60	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	441
			ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	
K. pneumoniae	*16 srDNA*	59	ACCCACTACGGTCGCGTATG	480
			TTTAGCCACGGCAGTAACACC	
Salmonella enterica (*typhimurium*)	*tyv*	58	GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT	615
			TAGCAAACTGTCTCCCACCATAC	
E. coli	*16 srDNA*	55	CAAGACATCATGGCCCTTAC	150
			ACTTCATGGAGTCGAGTTGC	

الجدول 2: مراحل اختبار الـ .PCR

	مراحل التفاعل	درجة الحرارة	الفترة الزمنية
	مرحلة التمسخ البدئي	95°م	3 دقائق
عدد الدورات (35)	مرحلة التمسخ الأولي	95°م	30 ثانية
	مرحلة الالتحام	54-60°م	45 ثانية
	مرحلة الاستطالة	72 °م	1 دقيقة
	مرحلة الاستطالة النهائية	72 °م	10 دقائق

7.3 الرحلان الكهربائي للدنا:

يُضاف 1.5 غ آغاروز لكل 100 مل من المحلول الموقي TE ضمن عبوة زجاجية مع المزج جيداً وتُوضع في الحمام المائي في الدرجة 65°م مع التحريك بلطف حتى زوال جميع بلورات

الآغاروز. تُتْرَك هلامة الآغاروز لتبرد قليلاً ثم يُصَب 25–30 مل في قالب الصب وتُضاف بضع قطرات من مركب الإيتيديوم بروميد مع المزج جيداً، ويُوضَع مشط خاص ضمن الهلامة لعمل آبار، وتُتْرك بعدها مدة 15 دقيقة لتتصلب. يُضاف 2–3 ميكروليتر من صبغة التحميل Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) إلى كل عينة من عينات الدنا باستعمال الماصة الدقيقة. يُغْمَر القالب بالمحلول الموقي TE، باستعمال الماصة الدقيقة يُوضَع في البئر الأول 5 مل واسمة دنا عيارية DNA Marker ذات المجال 10000-100 bp من شركة (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ويُوضَع في البئر الأخير الشاهد السلبي (ماء مقطر + مُرَنِّسات) للكشف عن أي تلوث في مكونات التفاعل، ويُؤْخَذ 10 µl من كل عينة من عينات الدنا (DNA) ليوضع في البئر الخاص بكل عينة. ثم يُؤخذ القالب بعناية ويوضع في جهاز مزود بالأشعة فوق البنفسجية (UV) وموصول بالحاسوب مزود بدوره ببرمجيات خاصة، تمكن من قراءة أحجام العصائب بمقارنتها مع واسمة الدنا [24].

4. النتائج:

يوضح الجدول 3 أن اللوغاريتم العشري للجراثيم في ترب بعض مناطق محافظة دمشق تراوح بين 3.29 و 3.8 CFU/غ تربة، حيث كانت القيمة الأكبر بمنطقة مزة (بساتين الرازي) والأقل بمنطقة شارع بغداد. بينما تراوح بين 3.29 (دير الحجر) و 4.47 (يبرود) في محافظة ريف دمشق (الجدول 3). أما اللوغاريتم العشري للجراثيم النامية على وسط الـ EMB تراوح بين 2.56 (مهاجرين) و 3.4 (بساتين الرازي) و 2.56 (دير الحجر) و 3.56 (معلولا) لمحافظتي دمشق وريفها على التوالي (الجدول 3). بينما تراوح اللوغاريتم العشري للجراثيم النامية على وسط الـS-S Agarبين 1.23 و2.02 لمحافظة دمشق و1.1 و 2.15لمحافظة ريف دمشق؛ حيث كان التعداد الأقل في منطقتي باب توما والصبورة؛ والأكثر في منطقتي شيخ محي الدين ومعلولا لمحافظتي دمشق وريفها على التوالي (الجدول 3).

الجدول 3: التعداد الميكروبي في كل غرام تربة (log_{10} CFU/g) تم جمعها من عدة مناطق لمحافظتي دمشق وريفها.

المحافظة	اللوغاريتم العشري للتعداد الميكروبي على منمي عام	اللوغاريتم العشري للتعداد الميكروبي على EMB	اللوغاريتم العشري للتعداد الميكروبي على S-S Agar
دمشق (34 منطقة)	3.29 – 3.8	2.56 – 3.4	1.23 – 2.02
ريف دمشق (28 منطقة)	3.29 – 4.47	2.56 – 3.56	1.1 – 2.15

ظهرت مستعمرات الإشيرشيا القولونية على وسط الـ EMB سوداء مزرقة، ذات لمعة معدنية خضراء؛ وبعد تلوين مستعمرات نقية نامية بدت تحت المجهر الضوئي بلون زهري (سالبة الغرام)؛ عصوية كخلايا مفردة أو كأزواج. بينما ظهرت السالمونيلا على وسط الـ S-S Agar مستعمرات ذات مركز أسود، وردية اللون بسبب تخميرها للاكتوز، وظهرت تحت عدسة المجهر الضوئي كجراثيم سالبة الغرام، عصوية، غير متبوغة. وظهرت مستعمرات الكليبسلا على وسط الـ EMB مُخاطية، وردية بدون لمعان أخضر معدني؛ وظهرت تحت المجهر الضوئي سالبة الغرام محاطة بمحفظة؛ مفردة أو ثنائيات أو على شكل سلاسل قصيرة جداً عصوية الشكل.

تم انتقاء مستعمرات مفردة وحلها بالموقي PBS للوصول إلى عكارة 0.5 Mcfarland ثم أجري لها اختبارات كيموحيوية باستخدام صفيحة 96 بئر، حيث توضح الجداول4 ، 5، 6 نتائج هذه الاختبارات للإشيرشيا القولونية والسالمونيلا والكليبسلا، على التوالي؛ وبعد إدخال النتائج عبر البرنامج الحاسوبي ABIS-online تبين أن نسبة التشابه كانت94.5% ، 98.7%، 95.6% على التوالي؛ وكانت متوافقة مع دليل بيرجى [20].

يُوضح الجدول 4 أن جراثيم الإشيرشيا القولونية موجبة لكل من: الكاتالاز، والأندول، وأحمر الميتيل، وإرجاع النترات، بينما كانت سالبة: الأوكسيداز، وفوكس- بروسكاير، والسيترات، والبولة، وإنتاجH_2S . وكانت مُخمرة للسكاكر: الغلوكوز، والأرابينوز، واللاكتوز، وغير مُخمرة لسكاكر الفركتوز، والسكاروز، والرافينوز والسيللبيوز.

الجدول 4: نتائج الاختبارات الكيموحيوية للإشيرشيا القولونية.

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Citrate	Acetate	H_2S	Indol	Vp	Mr	Nitrate	Ornithine	Arginine	Oxidase	Catalase	Motility
-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Lactose	Inositol	Glucose	Glycerol	Dulcitol	Cellebiose	Arabinose	Phy-alan	Urea	Gelatine	Esculine	Tartrate
+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
			Fructose	Xylose	Trehalose	Sucrose	Sorbitol	Raffinose	Mannos	Mannitol	Maltose
			-	+	+	-	+	-	+	+	+

بينما كانت السالمونيلا موجبة الكاتالاز، و H_2S، Ornithine-Decarboxylase، أحمر الميتيل، والسيترات، ترجع النترات؛ وسالبة الأوكسيداز، فوكاس–بروسكاير، الأندول، البولة، ومخمرة لسكاكر الأرابينوز، الغلوكوز، المالتوز، المانوز؛ غير مُخمرة للسكاروز، اللاكتوز، الرافينوز (الجدول 5).

الجدول 5: نتائج الاختبارات الكيموحيوية للسالمونيلا.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Motility	Catalase	Oxidase	Arginine	Ornithine	Nitrate	Mr	Vp	Indol	H_2S	Acetate	Citrate
+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Tartrate	Esculine	Gelatine	Urea	Phy-alan	Arabinose	Cellebiose	Dulcitol	Glycerol	Glucose	Inositol	Lactose
-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Maltose	Mannitol	Mannos	Raffinose	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Fructose			
+	+	+	-	+	-	+	+	+			

كانت جراثيم الكليبسلا موجبة الكاتالاز، السيترات، فوكاس–بروسكاير، ترجع النترات، سالبة الأوكسيداز، فوكاس–بروسكاير، أحمر الميتيل، الاندول، H_2S ، ومُخمرة لمعظم السكاكر منها الأرابينوز، الغلوكوز، المالتوز، المانوز، الرافينوز، السكاروز (الجدول 6).

الجدول 6: نتائج الاختبارات الكيموحيوية للكليبسلا.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Motility	Catalase	Oxidase	Arginine	Ornithine	Nitrate	Mr	Vp	Indol	H_2S	Acetate	Citrate
-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Tartrate	Esculine	Gelatine	Urea	Phy-alan	Arabinose	Cellebiose	Dulcitol	Glycerol	Glucose	Inositol	Lactose
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	Mannitol	Mannos	Raffinose	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Fructose			
+	+	+	-	+	+	+	+	+			

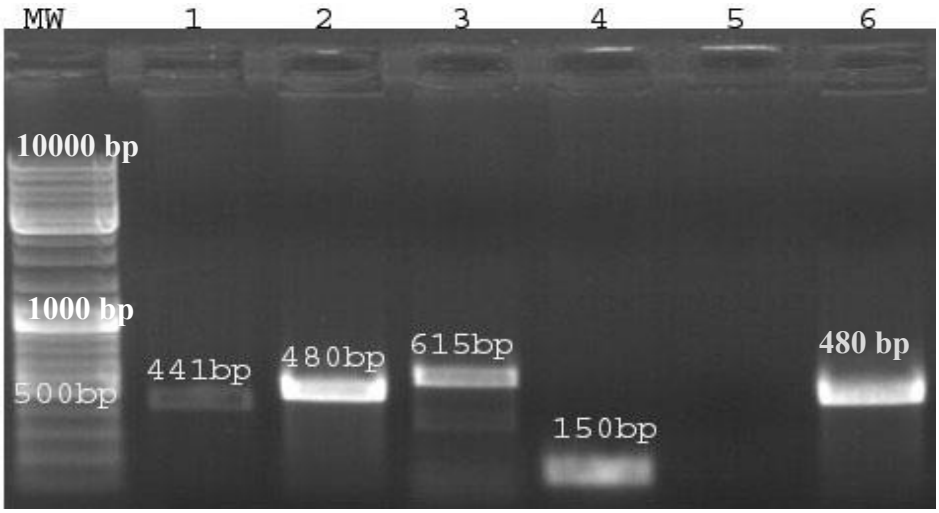
بناءً على تطابق نتائج الاختبارات الكيموحيوية مع الخصائص الواردة في الدليل المرجعي بيرجي للجراثيم المطلوب الكشف عنها، تم اختيار 23 عزلة تمثل الأجناس البكتيرية المدروسة. روعي في الاختيار تمثيل جميع المناطق التي ظهرت فيها هذه الجراثيم، واعتمد اختيار العزلات على نقاوة المستعمرات ووضوح نتائج الاختبارات الكيموحيوية. توزعت هذه العزلات كما يوضح الجدول رقم 7، حيث تم استخلاص DNA منها وقياس تركيزه باستعمال جهاز قياس الطيف النانوي Nanodrop والذي تراوح تقريباً بين (190–285 ng/µl) ومن ثم إجراء تفاعل PCR.

الجدول 7: توزع العزلات الجرثومية المثالية المُختارة للاختبارات اللاحقة.

رقم العزلة	اسم الجراثيم	مصدر العزلة	تركيز DNA المستخلص من العزلات (ng/µl)
E1	الإشيرشيا القولونية	بساتين الرازي	285
E2		بساتين الرازي	233
E3		المهاجرين	205

E4		يبرود	200
E5		يبرود	225
E6		يبرود	223
E7		معلولا	220
E8		معلولا	230
E9		معلولا	220
E10		دير الحجر	185
S1	السالمونيلا	معلولا	199
S2		معلولا	200
S3		معلولا	250
S4		يبرود	274
S5		يبرود	236
S6		شيخ محي الدين	210
S7		شيخ محي الدين	199
S8		بساتين الرازي	245
K1	الكليبسيلا	بساتين الرازي	263
K2		معلولا	255
K3		معلولا	250
K4		يبرود	199
K5		يبرود	210

تم ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة آغاروز 1.5% بوجود الايتيديوم بروماید بتركيز نهائي 0.2–0.5 مكغ/مل عند فولطية 75 v لمدة 45 دقيقة، وأُظهرت العصابات باستخدام أشعة الـ UV عند طول موجة 254 nm والنتائج موضحة في الشكل 1 للأطوال المتوقعة لشدف الدنا والموافقة لأطوال المورثات المحافظة المستخدمة في التفاعل وهي 441 و480 زوج من الأسس لكل من جنس الكلبسيلا والنوع الرئوية على التوالي، و615 و150 زوج من الأسس لكل من السالمونيلا التيفية والإشيرشيا القولونية على التوالي؛ وتجدر الإشارة إلى استعمال جراثيم الكليبسلا الرئوية العيارية بطول 480 زوج من الأسس (تم الحصول عليها من هيئة الطاقة الذرية السورية) كشاهد إيجابي للتفاعل والماء المقطر كشاهد سلبي للـ PCR.



الشكل :1 نواتج الرحلان الكهربائي لهلامة الآغاروز 1.5%: حيث المسارات (1–4): عينة بساتين الرازي؛ 1: جنس الكليبسلا 441 bp، 2: كليبسلا رئوية 480 bp، 3: سالمونيلا تيفية615bp ، 4: الإشيرشيا القولونية 150 bp ؛ 6: عزلة عيارية الكليبسلا الرئوية 480 bp؛ 5: شاهد سلبي (بدون DNA)؛ MW: واسم جزيئي معياري .100–10000bp

وتجدر الإشارة إلى أنه تم إجراء تفاعل الـ PCR على كل المستعمرات الجرثومية التي أُجري عليها الاختبارات الكيموحيوية والتي أظهرت تطابقاً تاماً لجميع العزلات المُختبرة.

5. المناقشة:

تُصنف الأمراض المنقولة عبر التربة إلى خمس مجموعات رئيسية استناداً إلى العوامل المسببة لها، وذلك بهدف تسهيل دراستها والرجوع إليها. تضم هذه المجموعات: الفيروسات، الجراثيم، الطفيليات، الفطريات، والديدان الخيطية (Nematodes)، وكل منها قادر على إحداث العدوى والأمراض.

لقد ثبت أن بعض الأمراض التي تنقلها التربة توجد بنسبة أعلى في الأشخاص في بعض المهن، مثل المزارعين والبيطرين، كما أنها تتأثر بالعوامل المناخية والبيئية والبشرية. لذلك يجب اتخاذ خطوات لتحديد العوامل التي لها أكبر الأثر على حدوث المرض، وبالتالي السماح باتخاذ تدابير أو صياغة سياسة لتقليل الآثار المدمرة والتكاليف الاجتماعية والاقتصادية للأمراض التي تنقلها التربة [25].

تبين في السنوات الأخيرة أن العديد من الدراسات المماثلة لدراستنا اهتمت بالكشف عن انتشار البكتيريا في التربة ففي دراسة وبائية في عام 2023 كشفت أن المحاصيل الزراعية المروية بمياه الصرف الصحي غير المعالجة، أو المحاصيل المأخوذة من تربة مسمّدة بروث الحيوانات كسماد عضوي، كانت سبباً مباشراً لتفشي عدد من الأمراض البشرية البارزة المرتبطة باستهلاك الفواكه والخضروات الطازجة [26]، وكذلك الأمر في دراسة في عام 2008 استطاع الباحثون عزل 80 عزلة من الجراثيم التابعة لفصيلة الأمعائيات من تربة مزارع ألبان وغير ألبان حيث أظهرت النتائج مقاومة عالية للصاد الحيوي التتراسكلين وأن هذه الترب الزراعية تعد مستودعاً مهماً للأمعائيات ومورثات المقاومة [27] إضافة إلى مجموعة الأمعائيات المنتجة لإنزيمات بيتا لاكتاماز واسعة الطيف ESBL [28]. كما استطاع الباحثين في دراسة في عام 2023 من عزل الاشريشيا القولونية من التربة والبيئة الزراعية المرتبطة بالمحاصيل [29].

تعد رطوبة التربة ملائمة لبقاء الأحياء الدقيقة حيث يمكن لها أن تمتز عبر جزيئات التربة؛ كما يُعتقد أن التربة الرطبة تحمي الجراثيم بتكوينها حاجز ضد الطفيليات الميكروبية [30] وبالتالي فإن معدلات بقاء العامل الممرض المعوي أقل في التربة الجافة أو التربة الرملية ذات القدرة المنخفضة على الاحتفاظ بالماء[31].

تجدر الإشارة إلى أن هذه الدراسة لم تتضمن قياس درجة حموضة التربة (pH) في المواقع المدروسة، على الرغم من الدور المعروف لهذا العامل في التأثير على بقاء وانتشار الجراثيم المعوية. فقد أشار [32] إلى أن الرقم الهيدروجيني يؤثر على خصائص امتزاز الجراثيم على جزيئات التربة، إذ أن الجراثيم تموت بمعدل أبطأ في التربة الحمضية لأن امتزازها على جزيئات التربة يزيد، مما يحميها من الظروف البيئية القاسية، إن عدم توفر هذه البيانات يعد إحدى محدوديات الدراسة الحالية.

في دراستنا كانت المناطق الأعلى تعداداً (يبرود، بساتين الرازي، معلولا)، ويعود ارتفاع تعدادها الجرثومي (الكلي والمعوي) على الأرجح إلى مزيج من الرطوبة الملائمة (خاصة في المناطق الزراعية) ودرجة حموضة قريبة من المتعادل، مما يوفر بيئة مثالية لنمو وبقاء الجراثيم، أما المناطق الأدنى تعداداً (شارع بغداد، باب توما، الصبورة): قد يعود انخفاض التعداد فيها إلى انخفاض الرطوبة (في المناطق الحضرية الجافة) و/أو ظروف حمضية غير ملائمة (حمضية أو قلوية) تمنع تكاثر الجراثيم، وخاصة الجراثيم المعوية. يمكن تفسير التباين الملحوظ في التعدادات الجرثومية بين مناطق الدراسة في ضوء الاختلافات في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للتربة، خاصة نوع التربة ومحتواها من الرطوبة والمادة العضوية، حيث تزيد المواد العضوية القابلة للذوبان من قدرة الجراثيم على البقاء حية في التربة؛ وتُفضل درجات الحرارة المنخفضة؛ فقد لُوحظ أن ارتفاع درجة الحرارة من 15 درجة مئوية إلى 40 درجة مئوية، زاد بشكل ملحوظ انخفاض التعداد الميكروبي [6].

يعكس التباين في التعداد الجرثومي في الريف تنوعاً أكبر في الخصائص البيئية واستخدامات الأراضي بين المناطق الريفية، التي تتراوح بين أراضٍ زراعية نشطة وأخرى جافة أو قليلة النشاط، مقارنة بالبيئة الحضرية الأكثر تجانساً في مدينة دمشق.

أما بالنسبة للجراثيم المعوية النامية على وسط EMB، فقد تقاربت القيم بين المحافظتين بشكل لافت، حيث تراوحت في دمشق بين 2.56 (المهاجرين) و 3.4 (بساتين الرازي)، وفي ريف دمشق بين 2.56 (دير الحجر) و 3.56 (معلولا). يشير هذا التقارب إلى انتشار متجانس نسبياً لهذه المجموعة الجرثومية في كامل منطقة الدراسة، متأثرة على الأرجح بعوامل مشتركة مثل النشاط البشري والحيواني المنتشر في كلا المحيطين الحضري والريفي. توافقت نتائجنا مع دراسات حديثة أوضحت أن انتشار *E. coli* في التربة لا يختلف بشكل كبير بين البيئات الحضرية وشبه الحضرية

حيث سجلت نسب وجود متقاربة بلغت حوالي 80% في التربة الحضرية و 76.7% في التربة شبه الحضرية مما يشير إلى أن مصادر التلوث البيئي قد تكون متشابهة في كلا البيئتين. بالمقابل وفي نفس الدراسة وجدت أن نسبة انتشار *E. coli* في مدينة أخرى أقل من الريف بنسبة انتشار 44.7% [33]. كما بينت دراسات أخرى أن نسب وجود *E. coli* في بعض أنواع التربة المختلفة قد تصل إلى 73% في كل من الغابات والمراعي، وهو ما يدل على تقارب واضح في الانتشار بين البيئات المختلفة [34]. بينما يمكن حصول اختلاف في الأنماط الممرضة لنفس النوع الجرثومي بين المدينة والريف حيث تم رصد مستويات أعلى من مقاومة المضادات الحيوية في المناطق الريفية[35].

في المقابل، أظهر التعداد على وسط SS Agar الخاص بالسالمونيلا والشيغيلا تبايناً أكثر وضوحاً، خاصة في ريف دمشق الذي سجل أدنى قيمة مطلقة بين جميع المناطق (1.1 CFU/غ في الصبورة) وأعلى قيمة (2.15 CFU/غ في معلولا)، بينما تراوحت قيم دمشق بين 1.23 (باب توما) و 2.02 (شيخ محي الدين). يعكس هذا التباين حساسية هذه المجموعة الجرثومية للعوامل المحلية الدقيقة (Micro–local factors)، مثل طبيعة التربة، درجة الرطوبة، المحتوى العضوي، ووجود مصادر تلوث محددة كالأنشطة الزراعية أو السياحية أو استخدام الأسمدة العضوية. وفي دراسة مشابهه لنتائجنا أظهرت الدراسات الخاصة بالتربة الزراعية الريفية أن انتشار *Salmonella* يكون عادة أقل من *E. coli* لكنه يبقى مرتبطًا بشكل وثيق بالنشاط الزراعي واستخدام الأسمدة الحيوانية. فقد سجلت جراثيم *Salmonella* انتشار بنسبة 0.418%، بينما بلغت نسبة *E. coli* في نفس التربة 11.3%، مما يؤكد أن التربة الزراعية تمثل خزاناً بيئياً مهماً لجراثيم الأمعائيات، خاصة في المناطق التي تتعرض لملوثات حيوانية[36].

بشكل عام، تشير النتائج إلى أن البيئة الريفية أكثر تبايناً من البيئة الحضرية من حيث الحمل البكتيري في التربة، حيث سجلت أعلى القيم (يبرود) وأدناها (الصبورة) في آن معاً. يبرز هذا التباين أهمية دراسة العوامل البيئية الدقيقة عند تقييم المخاطر الصحية المرتبطة بالتربة، ويؤكد على ضرورة إجراء المزيد من الدراسات التحليلية التي تربط الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة بالحمل الميكروبي، خاصة في المناطق الريفية التي أظهرت التنوع الأكبر.

ومن المعلوم جيداً أن ضوء الأشعة فوق البنفسجية من الشمس يُفقد الأحياء الدقيقة على سطح التربة قدرتها على النمو أو التكاثر، ولكن تلك التي في الطبقات العميقة لا تتأثر، ونظراً لأن عينات التربة في هذه الدراسة جمعت من عمق 5 سم، فإن تأثير الأشعة فوق البنفسجية قد يكون محدوداً على هذه العينات، مما قد يسهم في بقاء الأحياء الدقيقة فيه [37,38] .

تعتمد حركة الأحياء الدقيقة في التربة على درجة التشبع بالماء، إذ تتحرك بسرعة أكبر في التربة المشبعة بالماء، لكن ضمن مسافات محدودة لا تتجاوز بضعة سنتيمترات، مما يعزز في النهاية امتزازها على جزيئات التربة [39]. وقد أظهرت الدراسات أن تلوث المياه الجوفية بالجراثيم والفيروسات يزداد خلال فترات هطول الأمطار الغزيرة، حيث تم الكشف عن وجود جراثيم معوية في الآبار الضحلة والعميقة بالتزامن مع هذه الفترات [40].

استناداً إلى ما تقدم، تم اختيار فصل الشتاء موعداً لجمع عينات التربة في هذه الدراسة، بهدف زيادة احتمالية الكشف عن الجراثيم المعوية في المناطق المختلفة من محافظتي دمشق وريفها.

أظهرت النتائج وجود جراثيم الإشريشيا القولونية، والسالمونيلا، والكليبسيلا في جميع المناطق التي جمعت منها العينات، في حين لم تُعزل جراثيم الشيغيلا في أي منها. ويمكن تفسير هذا التواجد الواسع للجراثيم المعوية بعدة عوامل أهمها تأثير هطول الأمطار حيث ساهمت الأمطار الشتوية في نقل هذه الجراثيم من مصادرها (كالفضلات البشرية والحيوانية، والأسمدة العضوية) عبر الجريان السطحي والتسرب، مما أدى إلى انتشارها في مختلف المواقع المدروسة. أما بالنسبة لغياب جراثيم الشيغيلا عن جميع العينات، فقد يعود إلى حساسيتها العالية للظروف البيئية مقارنة بالأمعائيات الأخرى، أو إلى محدودية مصادر تلوث التربة بهذا الكائن في مناطق الدراسة. ولعل أهم الفروق العملية التي تفسر غياب الشيغيلا في عينات التربة في دراستنا هو انخفاض قدرتها على البقاء خارج المضيف مقارنة بالسالمونيلا، حيث تحتاج الشيغيلا إلى جرعة معدية منخفضة جداً لكنها حساسة للظروف البيئية ولا تبقى حية طويلاً في التربة [4] . كما أن مصدر تلوث التربة بالشيغيلا يقتصر على الفضلات البشرية فقط، بينما تلوث السالمونيلا يمكن أن يحدث من مصادر حيوانية وبشرية متنوعة [3].

لم يتضمن نطاق هذه الدراسة إجراء استبيان حول استخدام الأسمدة العضوية (كالسماد الحيواني أو البشري أو الكومبوست) في مواقع جمع العينات، وذلك لتركيزها الأساسي على الجانب الميكروبيولوجي الكمي. يُعد هذا القصور إحدى محدوديات الدراسة الحالية، خاصة وأن الأسمدة العضوية تُعتبر مصدراً مهماً لتلوث التربة بالجراثيم المعوية.

وقد يكون انخفاض المحتوى العضوي في بعض الترب المدروسة قد عزز من قابلية التربة للجفاف، مما يؤثر بدوره على بقاء الجراثيم وانتشارها [41]. وبذلك يسهم في نشر الأمراض المنقولة بالتربة. وقد أشارت الدراسات إلى أن انخفاض حدوث هذه الأمراض يرتبط بالخطوات المتخذة للحد من تدهور التربة في بعض البلدان [19].

يُوضح الجدول 3 أن تواتر تواجد الإشيرشيا القولونية أكثر من السالمونيلا وقد يكون السبب هو استخدام السماد العضوي في بعض الترب المدروسة فقد لُوحظ أن التربة قد تكون مصدراً جزئياً لجراثيم *E. coli* O157 بسبب قدرتها على التكاثر داخل التربة لذا تم عزل سلالات *E. coli* من طفل مريض كان يلعب في حديقة المنزل[42] ؛ كما أن أولى حالات الإصابة بجراثيم *E. coli* كان مرتبطاً باستخدام فضلات الحيوانات كسماد [43].

. وفي معسكر كشافة اسكتلندي ارتبط تفشي مرض الإشيرشيا القولونية بالتربة قد يكون بسبب روث الأغنام التي كانت ترعى هناك [44]. وفي دراسة أخرى لوحظ أن متوسط تعداد الإشيرشيا القولونية في غرام واحد من التربة أكثر من 10^5 x CFU1 وهو تقريباً متوسط تعداد هذه الجراثيم في المناطق المختبرة في دراستنا [45].

وللأمعائيات قدرة للبقاء فترة طويلة نسبياً في التربة؛ فقد أظهر Feachem وزملاؤه [46] أنه يمكن بقاء الأمعائيات في لمدة تتراوح بين 10−20 يوماً؛ كما أوضح Johannessen وزملاؤه [47] أن يمكن ان تبقى الإشيرشيا القولونية لمدة تتراوح من أربعة إلى ثمانية أسابيع لهذا أوصى أن يتم حصاد المنتجات النباتية بعد 120 يوماً على الأقل من استخدام السماد الطبيعي. وأوضح Islam وزملاؤه (2004) [18] أن السالمونيلا يمكن أن تبقى قيد الحياة في عينات التربة لمدة 203 إلى 231 يوماً. وهناك العديد من الدراسات التي أوضحت أن الكليبسلا (الرئوية و oxytoca) يكن

أن تكون ممرضة للإنسان ولكن أيضاً يكن أن تكون مفيدة من خلال تثبيت الأزوت الجوي في التربة؛ لهذا هذه الجراثيم قد تكيفت للبقاء في التربة .[48,49,50]

في هذه الدراسة تم الاعتماد على تشخيص جراثيم الأمعائيات باستعمال التقانات التقليدية والتي تتضمن العزل المخبري متبوعاً بإجراء مجموعة من الاختبارات الحيوية الكيميائية، والتي تُستخدم للتمييز بين أنواع الأمعائيات المختلفة اعتماداً على خصائصها الاستقلابية، وهذا ما يتوافق مع أغلب الدراسات المرجعية في هذا المجال [51,52]. ومع التطور في التقنيات الجزيئية، أصبحت تقانة PCR أداة أساسية في تأكيد التشخيص المخبري، لما تمتاز به من حساسية ونوعية عاليتين، إذ تسمح بالكشف عن جينات نوعية مثل مورثة *16S rDNA* أو مورثات متخصصة أخرى، مما يسهم في رفع دقة التعرف على الأنواع الجرثومية وتقليل احتمالية الخطأ الناتج عن التشخيص التقليدي [53,54]

بينت نتائج الاختبارات الجزيئية لتأكيد العزلات الجرثومية أن المورثة *16S rDNA* ذات أهمية تصنيفية في تمييز الأمعائيات وخاصة الأيشريشيا الكولونية والكليبسيلا بدقة، إذ تعد هذه المورثة قاعدة تحدد اماكن ارتباط البروتينات الريبوزومية كما أن لها دور في بدء عملية تركيب البروتين، ففي دراسة أجريت في عام 2025 وضحت أن استعمال الأطوال القصيرة من (250–500 bp) يمكن استخدامها في تفاعل PCR وتعطي تحديداً جيداً على مستوى الجنس والنوع البكتيري بما في ذلك الأيشريشيا الكولونية والكليبسيلا [55,56]، وهذا ما يتوافق مع نتائج دراستنا الحالية. أما بالنسبة لتمييز جراثيم الكليبسيلا فقد أعطت بعد الترحيل شدفة بطول441 bp، وهو ما يتوافق مرجعياً مع استخدام المورثة *gyrA* والتي تُشفّر الوحدة الفرعية A من إنزيم DNA gyrase على نطاق واسع كعلامة جزيئية لتصنيف الكلبسيلا وتحديد علاقاتها التطورية. وعلى وجه الخصوص تُعدّ قطعة المورثة *gyrA* التي يبلغ طولها 441 bp من بين أكثر المناطق تضخيماً نظراً لقدرتها العالية على التمييز بين المجموعات التطورية المتقاربة داخل الجنس [57,58].

أما بالنسبة لتمييز أنواع السالمونيلا فقد استخدمت الدراسة تصميم مرئسات مستهدفة لمورثة *tyv* التي ترمز لإنزيم tyvelose epimerase في *Salmonella enterica*. تُنتج هذه البادئات شدفة بطول ~615 bp عند وجود المورثة السّليمة في جراثيم *S. Typhi*، بينما في *S.*

Paratyphi A تُفقد قابلية التكَوّن بسبب طفرة إطارية في tyv، مما يُمكّن من التمييز بين النمطين استناداً إلى طول الشدفة [59] وهذا ما كان متوافقاً مع نتيجة دراستنا حيث ظهرت الشدفة الخاصة بتمييز السالمونيلا بنفس الطول.

تُعد التربة مستودعاً طبيعياً مهماً للجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية، كما تحتوي على مجموعة متنوعة من مورثات مقاومة المضادات الحيوية، والتي تتميز بقدرتها على الانتشار السريع في الأوساط السريرية عبر نقل المورثات الأفقي (Horizontal Gene Transfer)، مما يشكل تهديداً صحياً كبيراً [60].

6.الاستنتاجات والتوصيات:

بناءً على ما تقدم، توصي الدراسة الحالية بضرورة متابعة وتحليل العزلات الجرثومية المقاومة للمضادات الحيوية في ترب مناطق دمشق وريفها في المستقبل القريب، وذلك للكشف عن مدى انتشار هذه المقاومة، وتحديد المخاطر المحتملة على الصحة العامة في ضوء العلاقة الوثيقة بين التربة كمستودع طبيعي للمقاومة والظروف السريرية.

كما يُوصى بإجراء دراسات مستقبلية تشمل تحليلاً فيزيوكيميائياً للتربة (pH، رطوبة، مادة عضوية) بالتزامن مع العد الميكروبي، لفهم أعمق للعوامل البيئية المتحكمة في بقاء وتوزع الجراثيم المعوية في التربة.

بناءً على محدوديات الدراسة الحالية يُوصى في الدراسات المستقبلية إجراء استبيانات ميدانية بالتزامن مع جمع العينات، تشمل معلومات عن استخدام الأسمدة العضوية (النوع، الكمية، وتكرار الاستخدام) في المواقع المدروسة، وذلك لربط هذه الممارسات بالتعداد الجرثومي وفهم مصادر التلوث بشكل أدق.

7.المراجع:

[1] Wang Y, Zhang M, Delgado-Baquerizo M, Li G, Cai J, Pan X, Wang Y, Xiao Y. Long-term grazing effects on soil-borne pathogens are driven by temperature. **Communications Biology**. 2024 Nov 26;7(1).

[2] Michelon W, Peter NRW, Schneider TM, Segalla DC, Viancelli A. Enterobacteria Survival, Percolation, and Leaching on Soil Fertilized with Swine Manure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2023 Mar 28;20(7):5283.

[3] Daly SW, Chieng B, Araka S, Mboya J, Imali C, Swarthout JM, et al. Enteric Pathogens in Humans, Domesticated Animals, and Drinking Water in a Low-Income Urban Area of Nairobi, Kenya. **Environmental Science & Technology**. 2024 Nov 26;58(49):21839–49

[4] Wójcik-Fatla A, Ewelina Farian, Kowalczyk K, Sroka J, Skowron P, Grzegorz Siebielec, et al. Enterobacteriaceae in Sewage Sludge and Digestate Intended for Soil Fertilization. **Pathogens**. 2024 Nov 30;13(12):1056–6.

[5] Leon IM, Auvermann BW, Bush KJ, Casey KD, Pinchak WE, Gizem Levent, et al. Comprehensive Analysis of *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Salmonella enterica*, and Antimicrobial Resistance Determinants in Fugitive Bioaerosols from Cattle Feedyards. **Applied Microbiology**. 2025 Jul 20;5(3):63–3.

[6] Holley RA, Arrus KM, Ominiski KH., Tenuta M, Blank G. *Salmonella* survival in manure-treated soil during simulated seasonal temperature exposure**. Journal of Environmental Quality**. 2006;35:1170–1180.

[7] Altaie HAA, Gdoura Ben Amor M, Mohammed BA, Gdoura R. Detection and Characterization of Escherichia coli and Escherichia coli O157:H7 in Human, Animal, and Food Samples from Kirkuk Province, **Iraq. Microbiology Research.** 2025 Jan 16;16(1):20. https://doi.org/10.3390/microbiolres16010020.

[8] Qadri F, Svennerholm AM ., Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology,

Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**. 2005 Jul 1;18(3):465–83.

[9] Bryan, C, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. **Immunology and Cell Biology**. 2007; 85:112–118.

[10] Lamichhane B, Mawad AMM, Saleh M, Kelley WG, Harrington PJ, Lovestad CW, Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. **Antibiotics**. 2024 Jan 13;13(1):76.

[11] Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Gordon MA. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. **The Lancet**. 2012; 379:2489–2499.

[12] Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Clinical Infectious Diseases.** 2011 Aug 24;53(6):532–40.

[13] Hu Y, Ping Y, Li L, Xu H, Yan X, Dai H. A retrospective study of risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumonia* acquisition among ICU patients. **Journal of Infection in Developing Countries**. 2016;10(3):208–213.

[14] Rafailidis PI, Falagas ME. Options for treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 2014;27(6):479–483.

[15] Osafo R, Balali GI, Amissah-Reynolds PK, Gyapong F, Addy R, Nyarko AA, Wiafe P. Microbial and parasitic contamination of vegetables in developing countries and their food safety guidelines. **Journal of Food Quality**. 2022;4141914.

[16] Allison SD, & Treseder KK. Climate change feedbacks to microbial decomposition in boreal soils. Fungal Ecology. 2011; 4(6):362–374.

[17] Avery LM, Hill P, Killham K, Jones DL. *Escherichia coli* O157 survival following the surface and sub-surface application of human pathogen contaminated organic waste to soil. **Soil Biology & Biochemistry**. 2004;36:2101–2103.

[18] Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. Fate of Salmonella enterica Serovar Typhimurium on Carrots and Radishes Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water. **Applied and Environmental Microbiology**. 2004 Apr;70(4):2497–502.

[19] Hutchison ML, Walters LD, Moore A, Crookes KM, Avery SM. Effect of Length of Time before Incorporation on Survival of Pathogenic Bacteria Present in Livestock Wastes Applied to Agricultural Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. 2004 Sep;70(9):5111–8

[20] Holt JG, Krieg NR. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. 1994; **Lippincott Williams and Wilkin**s, Baltimore.

[21] Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 14th ed. St. Louis (MO): **Elsevier**; 2017.

[22] Wright MH, Adelskov J, Greene AC. Bacterial DNA extraction using individual enzymes and phenol/chloroform separation. **J Microbiol Biol Educ**. 2017;18(2):18.2.48. doi:10.1128/jmbe.v18i2.1348.

[23] Li JW, Shi XQ, Chao FH, Wang XW, Zheng JL, Song N. A study on detecting and identifying enteric pathogens with PCR. **Biomedical and Environmental Sciences**. 2004;17(1):109–120.

[24] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. 2001. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.

[25] Ansingkar VM, & Kulkarni NS. Studies on survival of *Salmonella typhimurium* in phytopathogen damaged and healthy fresh produce. **WebmedCentra**l**.** 2013**.** Retrieved from http://www.webmedcentral.com/article_view/3988.

[26] Stiborova H, Kracmarova M, Vesela T, Biesiekierska M, Cerny J, Balik J, et al. Impact of Long-Term Manure and Sewage Sludge Application to Soil as Organic Fertilizer on the Incidence of Pathogenic Microorganisms and Antibiotic Resistance Genes. **Agronomy**. 2021 Jul 16;11(7):1423.

[27] Velusamy S, Nam HM, Sawant AA, Headrick SI, Nguyen L, Oliver SG. Distribution of Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes and Class 1 Integrons in Enterobacteriaceae Isolated from Dairy and Nondairy Farm Soils. **Microbial Ecology**. 2008 Feb 1;55(2):184–93.

[28] Ben Said L, Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. **International journal of food microbiology**. 2015;203:86–92.

[29] Igbinosa EO, Abeni Beshiru, Igbinosa IH, Cho GS, Charles. Multidrug-resistant extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli from farm produce and agricultural environments in Edo State, Nigeria. **PLoS One.** 2023 Jan 1;18(3):e0282835–5.

[30] Côté C, Quessy S. Persistence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in surface soil following application of liquid hog manure for production of pickling cucumbers. **Journal of Food Protection**. 2005; 68(5):900–905.

[31] Brady NC, & Weil RR. The nature and properties of soils (14th ed.). **Prentice Hall.** 2007.

[32] Aslam A, Kanwal F, Javied S, Nisar N, Torriero AAJ. Microbial biosorption: A sustainable approach for metal removal and environmental remediation. **International Journal of Environmental Science and Technology.** 2025; 22:13245–13276.

[33] Pritom Kumar Pramanik, Hoque MN, Rana ML, Islam MS, Ullah MA, Fahim Haque Neloy, et al. Prevalence and antibiotic resistance of

Escherichia coli in urban and peri-urban garden ecosystems in Bangladesh. **PLoS ONE**. 2025 Feb 6;20(2):e0315938–8.

[34] Dusek N, Hewitt AJ, Schmidt KN, Bergholz PW. Landscape-scale factors affecting the prevalence of Escherichia coli in surface soil include land cover type, edge interactions, and soil pH. **Appl Environ Microbiol**. 2018;84(10):e02714-17. doi:10.1128/AEM.02714-17.

[35] Montero L, Smith SM, Jesser KJ, Paez M, Ortega E, Peña-Gonzalez A, et al. Distribution of Escherichia coli Pathotypes along an Urban–Rural Gradient in Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2023 Sep 6;109(3):559–67.

[36] Diekman CM, Cook C, Strawn LK, Danyluk MD. Factors Associated with the Prevalence of Salmonella, Generic Escherichia coli, and Coliforms in Florida's Agricultural Soils. **Journal of Food Protection**. 2024 May;87(5):100265.

[37] Rokitko PV, Romanovskaya VA, Malashenko YuR, Chernaya NA, Gushcha NI, Mikheev AN. Soil Drying As a Model for the Action of Stress Factors on Natural Bacterial Populations. **Microbiology**. 2003 Nov;72(6):756–61.

[38] Rokitko PV, Romanovskaya VO, Malashenko Y R, Chernaya NA. Effect of UV-radiation and drying on bacterium diversity in soil. **Mikrobiolohichnyi Zhurnal**. 2004;66 (4):68–77.

[39] Wang M, Zhu J, Mao X. Removal of Pathogens in Onsite Wastewater Treatment Systems: A Review of Design Considerations and Influencing Factors. **Water**. 2021 Apr 25;13(9):1190

[40] Kang M, Ve Van Le, Ko SR, Chun SJ, Choi DY, Shin Y, et al. Effect of rainfall in shaping microbial community during Microcystis bloom in Nakdong River, Korea. **The Science of The Total Environment**. 2024 Jun 1;928:172482–2.

[41] Guan TY, Holley RA. Pathogen survival in swine manure environment and transmission of human enteric illness**. Journal of Environmental Quality**. 2003;32:383–392.

[42] Mukherjee A, Cho S, Scheftel J, Jawahir S, Smith K, Diez-Gonzalez F. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from

garden soil recently fertilized with cattle manure. **Journal of Applied Microbiology**. 2006 Aug;101(2):429–36.

[43] Omri (1998). Use of manure, compost and sewage sludge in the December 1997 proposed national organic program. https://www.OMRI.org/USDA.html.

[44] Ogden ID, Hepburn NF, MacRae M, Strachan NJC, Fenlon DR, Rusbridge SM, et al. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. Letters in **Applied Microbiology**. 2002 Feb;34(2):100–4.

[45] Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ. Presence and Growth of Naturalized Escherichia coli in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. **Applied and Environmental Microbiology**. 2006 Jan 1;72(1):612–21.

[46] Feachem GG, Bradley DJ, Garelick H, Mara DD. Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management. 1983. **Wiley**.

[47] Johannessen GS, Bengtsson GB, Heier BT, Bredholt S, Yngvild Wasteson, Liv Marit Rørvik. Potential Uptake of Escherichia coli O157:H7 from Organic Manure into Crisphead Lettuce. **Applied and environmental microbiology.** 2005 May 1;71(5):2221–5.

[48] Anbuselvi S, Harinee C, Kalaivani. Isolation of *Klebsiella* sp from Medical garbage Soil and its Effect in Growth of Chickpea Plant. **International Journal of ChemTech Research**. 2017;10(10):232–235.

[49] Brisse S, Grimont F, Grimont PA. The genus *Klebsiella*. In The prokaryotes, **Springer**. 2006:159–196.

[50] Podschun R, Pietsch S, Holler C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. **Applied and Environmental Microbiology**. 2001 Jul 1;67(7):3325–7.

[51] Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 1985;21(1):46–76.

[52] Prashanthi R, G.K. S, S. K, L. M. Isolation, characterization, and molecular identification of soil bacteria showing antibacterial activity against human pathogenic bacteria. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 2021 Aug 18;19(1).

[53] Wójcik-Fatla A, Ewelina Farian, Kowalczyk K, Sroka J, Skowron P, Grzegorz Siebielec, et al. Enterobacteriaceae in Sewage Sludge and Digestate Intended for Soil Fertilization. **Pathogens**. 2024 Nov 30;13(12):1056–6.

[54] Nakano S, Kobayashi T, Funabiki K, Matsumura A, Nagao Y, Yamada T. Development of a PCR Assay for Detection of Enterobacteriaceae in **Foods. Journal of Food Protection.** 2003 Oct 1;66(10):1798–804..

[55] Ramos J, Vasconcellos L, Costa L. Application and Limitations of 16S rRNA Gene Sequencing for Identifying WHO Priority Pathogenic Gram-Negative Bacilli. Infection and Drug Resistance. 2025 Dec 1;Volume 18:6353–75.

[56] Gupta A, Cooper VS, Zemke AC. Evaluation of V3–V4 and FL-16S rRNA amplicon sequencing approach for microbiota community analysis of tracheostomy aspirates. **mSphere**. 2025 Jul 22;10(8):e00388-25.

[57] Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for Klebsiella pneumoniae phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. **Clinical Microbiology and Infection.** 2004 Oct;10(10):942–5.

[58] Fatima S, Liaqat F, Akbar A, Sahfee M, Samad A, Anwar M, Iqbal S, Khan, S. A., Sadia, H., Makai, W, Khan A. Virulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from clinical samples in Balochistan. **International Wound Journal**. 2021;18(4):510–518. https://doi.org/10.1111/iwj.13550.

[59] Hirose K, Itoh K, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, Ezaki T, Kawamura Y, Tamura K, Watanabe H. Selective amplification of tyv (rfbE), prt (rfbS), viaB, and fliC genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars *typhi* and *paratyphi* A. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002; 40(2): 633–636. https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.633-636.2002.

[60] Ding C, He J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2010; 87:925–941.