Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul

College of Science

Department of Biology

Anti-bacterial effect of *Annona squamosa* against *Escherichia hermanii* isolate from different clinical sources

Samaa Mones Saeed Ishac Azzat

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Asst. Prof.

Dr. Aws Ibrahim Sulaiman

1444 A.H **2023 A.D**

Abstract

Two hundred clinical bacterial samples were collected from surgical wounds, burns and urine specimens from patients who admitted to Al-salam General Teaching Hospital, Al-Jumhouri General Hospital and the Specialized Burn Center in Mosul city -IRAQ, during the period from December, 2021 to April, 2022.

Samples were cultured on MacConkey agar free of salt as a selective medium. Only one hundred isolates belong to *Escherichia* spp were identified based on standards biochemical tests.

Several biochemical tests were conducted and it was obtained that only 10 bacterial isolates were suspected to belonging to *Escherichia hermanii.*

To confirm the phenotypic diagnosis, bacterial isolates were diagnosed using API and Vitek 2 compact system. Our results found that only 4 isolates were belonged to *Escherichia hermanii*.

Diagnosis was further confirmed using ABIS software, the result showed 96.1% identity to the species *E. hermanii*.

The genes *Eh, Yli, ERIC, Kpc* and *YP* were used to confirm the diagnosis of *E. hermanii*, two of them failed to amplify a product and only *Eh* gene showed a band in 1401bp. We performed our identification using molecular technique and two isolates belonging to *E. hermanii* were obtained.

After we conducted the sequence test, it became clear that one of the bacterial isolates was belonged to *E. hermanii* and the other was belonged to *E. fergusonii*.

Two new strains were submitted and registered for the first time in the NCBI Global Gene Bank and included the two strains *E. fergusonii* and *E. hermanii* and the following accession numbers were given LC 7742150 and LC 742151 respectively.

Depending on phenotypic and molecular detection, the species showed different antibiotic profiles. The isolates were 100% resistant to the following antibiotics Ampicillin-Amp_{10}, Cefixime-$Cfm_{5,}$ Cefoxitin-$Fox_{30,}$ and Oxytetracyclin-T_{30}, while the resistance rate was 50% for Ciprofloxacin-Cip_{10} and Cefepime-fep_{10}; and 25% of the isolates were resistant for Ceftazidime-Caz_{30}; while 100% of the isolates were sensitive to wards Azithromycin-$Azm_{15,}$ Gentamicin $Gen_{10,}$ and Imipenem-Ipm_{10}. *E. fergusonii* and *E. hermanii* under study were failed to contain carbapenemase enzyme.

The Annona fruit extract showed high effectiveness against *E. hermanii*, Double dilution concentrations (100,50,25,12.5) µg/ml, of Annona fruit extract were prepared then 100µl of each dilute for Annona *squamosa* was added. The effect of a concentration of 100 was the strongest, followed by concentrations of 50, then 25, and there was no effect obtained whene using the concentration 12.5 µg/ml

HPLC result showed that rutin (264.11) ppm was the active substance causing the antibacterial effect.

Result from the analysis of membrane lipid using GC-mass technique showed that most of the lipids found were (Ricinoleic acid:12420143, Glycerin:6814721 ,2 ,4 Dodecadienal, E, E:5915936, Chloromethyl 6-chloroundecanoate:4761461, Ethyl 5-methylhexanonate:3468461, Glycerin:3272473, propane,2-fluoro-2-methyl :3146268, p-Dioxane-2,3-diol:2993346, N, N-Dimethyl-O-(1-methyl-butyl)-hydroxyl:2378662,1-5-Ethyl-tetrahydrofuran-2-yl-3,3-dimethyl:2305938).

Using ERIC-PCR approache, we obtained four bands (766, 495, 293 and 180 bp) from isolate number no. 117, two bands (285 and 173 bp.) from isolate no. 23 and one band 1103 bp from isolate no. 98 depending on GelAnalyzer version 19.1

Using the sequence technique, we were able to differentiate between *E. fergusonii* and *E. hermanii*.

وزارة التعليم العالي والبحث العملي

جامعة الموصل

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص الانواع التابعة لجنس *Escherichia* spp. عدا النوع *E. coli* من مصادر سريرية مختلفة

سماء مؤنس سعيد اسحق عزة

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

أوس إبراهيم سليمان

١٤٤٤هـ

٢٠٢٣ م

الخلاصة:

تم جمع ٢٠٠ عينة بكتيرية من مصادر سريرية من جروح العمليات الحروق والادرار من المرضى القادمين الى مستشفى السلام العام التعليمي، مستشفى الجمهوري العام ومركز الحروق التخصصي في مدينة الموصل للفترة من كانون الأول ٢٠٢١ الى نيسان ٢٠٢٢.

كل العينات جمعت باستخدام وسط MacConkeyالخالي من الاملاح كوسط انتقائي لهذه البكتريا تم جمع ١٠٠ عزله تعود لأنواع *Escherichia* spp. عدا النوع *E. coli* وبعدها انجزنا عدة اختبارات بيوكيميائية ومظهريه وحصلنا بعدها على عشر عزلات بكتيرية تعود للجنس *Escherichia*

لغرض تأكيد تشخيصنا المظهري قمنا بتشخيص هذه العينات باستخدام API واكدنا التشخيص باستخدام تقنية Vitek2 وحصلنا فقط على اربع عزلات تعود للنوع*E. hermanii* كذلك اكدنا التشخيص باستخدام برنامج ABIS واظهرت النتيجة تشخيص بنسبة ٩٦.١٪ للنوع *E. hermanii*

استخدمنا ERIC-PCR للعزلات الأربع وحصلنا على أربع حزم (٧٦٦, ٤٩٥, ٢٩٣ و 180 bps.) بالنسبة للعزلة رقم (١١٧) وحزمتين (٢٨ ,173) بالنسبة للعزلة رقم (٢٣) وحزمه واحده (1103) (للعزلة رقم (٩٨) بينما فشلت في اظهار حزمه للعزلة رقم (21) بالاعتماد على برنامج GelAnalyzer اصدار ١٩.١

استخدمنا ثلاث جينات (Eh,Yli ,Yp) لغرض تشخيص هذه البكتريا جزيئيا وحصلنا على عزلتين فقط يمتلكون هذا الجين عند ١٤٠١bp

بعدها أجرينا اختبار تحديد تسلسل تتابع القواعد النيتروجينية واصبح واضح لدينا ان العزلتين واحده تعود للنوع *E .hermanii* والأخرى للنوع *E. fergusonii*

ولقد تم تسجيل سلالتين محليتين جديدتين لأول مره في بنك الجينات العالمي NCBI وتضمنت السلالتين *E. fergusonii* و *E. hermanii* وتم اعطائهما الأرقام التسلسليه التاليه LC742150 LC 742151, على التوالي

هذه الأنواع أظهرت تأثيرات مختلفة تجاه المضادات الحيوية اذ انها قاومت بنسبة ١٠٠٪ للمضادات (Ampicillin-Amp10,Cefixime-Cfm 5,Cefoxitin-Fox 30, Oxytetracyclin-T30) بينما أظهرت مقاومه بنسبه ٥٠٪ للمضادات(Ciprofloxacin-Cip10 and Cefepime-fep10) و٢٥٪نسبة مقاومه للمضادات (Ceftazidime-Caz30), بينما كانو حساسين بنسبة ١٠٠٪للمضادات (Azithromycin-Azm15,Gentamicin Gen 10,Imipenem-Ipm10).

ولقد فشلت هذه الأنواع في امتلاكها لأنزيم carbapenemase

استخدمت خلاصه ثمرة Annona اذ أظهرت انها ذات تأثير عالي ضد هذه البكتريا اذ أظهرت فعالية بالتراكيز ,100,50,25 ميكروغرام/ مل ضدها بينما التركيز ١٢.٥ ميكروغرام/ مل لم يظهر أي تأثير

لقد وجدنا ان المادة rutin (٢٦٤.١١) هي المادة الأساس الفعالة في هذا النبات ضد هذه البكتريا باستخدام تقنية HPLC

أظهرت لنا نتائج تحليل دهون الغشاء باستخدام تقنية GC-Mass ان اكثر الدهون كانت (Ricinoleic acid, Glycerin, Dodecadienal,E,E , Chloromethyl 6-chloroundecanoate, Ethyl 5-methylhexanonate , Glycerin ,propane,2-fluoro-2-methyl , p-Dioxane-2,3-diol, N, N-Dimethyl-O-(1-methyl-butyl)-hydroxyl,1-5-(Ethyl-tetrahydrofuran-2-yl-3,3-dimethyl