The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

Mosul University / College of Science

Department of Biology

Relationship of plasmid content with the resistance of enteric pathogenic bacteria to antibiotics, heavy metals and biocides

Sameer Majo Khalaf Ali AL-Tattar

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Muhsin Ayoub Essa

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

Summary

Plasmids play an important role in the process of bacterial evolution, as they contribute to enhance their resistance to antimicrobials and thus pathogenicity by carrying antimicrobial resistance genes. Therefore, their spread among bacterial communities constitutes a serious threat to public health globally.

The current study aimed to determine the role of plasmids in antibiotic, heavy metal, and biocidal resistance in some enteric bacterial isolates (*Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Enterococcus faecalis*) which obtained from the Department of Biology /College of Science/University of Mosul. The study also investigates the distribution and spread of resistance genes of these antimicrobial agents on the chromosome and plasmids of the studied bacteria.

The sensitivity of the studied isolates was tested against 12 types of different classes of antibiotics, different concentrations of five types of heavy metals in the form of salts, and three types of biocides. The results showed that all the isolates were multi-drug resistant, as they recorded the highest levels of resistance against antibiotics (Aztreonam, Cefotaxime, and Cefixime) by a ratio of 100%, while no isolate showed resistance to the antibiotic (Imipenem). Regarding the resistance to heavy metals and biocides, the highest levels of resistance were recorded towards nickel sulfate and the biocide povidone-iodine, while the isolates did not show any resistance towards mercury chloride.

The results of plasmid profiling showed that all isolates contained the plasmid, with an average of three bands for *K. pneumoniae* and one band for the rest of the isolates.

A plasmid curing test using different agents and a sensitivity test of all isolates towards the used antimicrobials after curing were performed to show the relationship of the plasmid with the antimicrobial resistance of these isolates. The results showed the ability of acridine orange to remove plasmids from *E. coli* O157:H7, *E. coli* and *S. marcescens*, and sodium dodecyl sulfate to

remove plasmids from *K. pneumoniae*, while ethidium bromide did not show any curing activity against studied isolates. On the other hand, a significant difference was observed through the results in the patterns of sensitivity towards the used antimicrobials among studied isolates after the curing process, compared to their resistance towards it before curing. The results showed the highest percentage of losing resistance towards antibiotics in the isolate *S. marcescens* down to *E. coli*, which recorded the lowest loss ratio. The same applies to heavy metals, except for that the lowest percentage of loss was in the *K. pneumoniae* isolate, which was also the only isolate that lost its resistance to the used biocides among all the studied isolates.

PCR technique was used to detecting some antibiotic (*bla$_{CTX}$, sul1*), heavy metal (*czcA , ncc*), and biocidal (*qacEΔ1*) resistance genes to showing their presence and distribution on plasmid and chromosome of the studied isolates, as the highest incidence rates of antibiotic resistance genes *bla$_{CTX}$* and *sul 1* were recorded, with a rate of 100%, 80% on the chromosome, and 100%, 100% on the plasmid respectively. While the occurrence of heavy metal resistance genes *czcA* and *ncc* was observed with rates of 100%, 40% on the chromosome, and 80%, 20% on the plasmid respectively, and finally the biocidal resistance gene *qacEΔ1* by 80% on the chromosome, and 100% on the plasmid.

الخلاصة

تلعب البلازميدات دورًا مهمًا في عملية التطور البكتيري، حيث إنها تساهم في تعزيز مقاومتها لمضادات الميكروبات وبالتالي امراضيتها من خلال حمل الجينات المقاومة لمضادات الميكروبات. لذلك فإن انتشارها بين المجتمعات البكتيرية يشكل تهديدًا خطيرًا للصحة العامة على مستوى العالم.

هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد دور البلازميدات في مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة والمبيدات الحيوية في بعض الجراثيم المعوية (*Escherichia coli* O157: H7، *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Serratia marcescens* و *Enterococcus faecalis*) التي تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الموصل ، بالإضافة إلى التحقق من التوزيع و انتشار جينات مقاومة هذه العوامل المضادة للميكروبات على كروموسوم وبلازميد البكتيريا المدروسة.

تم اختبار حساسية العزلات المدروسة تجاه ١2 نوعاً من أصناف مختلفة من المضادات الحيوية ، وتراكيز مختلفة لخمسة أنواع من المعادن الثقيلة على شكل أملاح ، وثلاثة أنواع من المبيدات الحيوية. أظهرت النتائج أن جميع العزلات كانت متعددة المقاومة لمضادات الميكروبات ، حيث سجلت أعلى مستويات المقاومة للمضادات الحيوية (Aztreonam و Cefotaxime و Cefixime) بنسبة ١٠٠٪ ، بينما لم تظهر أي عزلة مقاومة للمضاد الحيوي (Imipenem). فيما يتعلق بمقاومة المعادن الثقيلة والمبيدات الحيوية ، سجلت أعلى مستويات المقاومة تجاه كبريتات النيكل ($NiSO_4$) والمبيد الحيوي بوفيدون اليود (Povidone-Iodine)، بينما لم تظهر العزلات أي مقاومة تجاه كلوريد الزئبق (Hg_2Cl_2).

أظهرت نتائج تنميط البلازميد أن جميع العزلات كانت حاوية على البلازميد بمعدل ثلاث حزم لعزلة *K. pneumoniae* و حزمة بلازميدية واحدة لبقية العزلات.

تم إجراء اختبار تحييد البلازميد باستخدام مواد كيميائية مختلفة واختبار الحساسية لجميع العزلات تجاه مضادات الميكروبات المستخدمة بعد التحييد لإظهار علاقة البلازميد بمقاومة هذه العزلات. أظهرت النتائج قدرة الأكريدين البرتقالي(Acridine Orange) على إزالة البلازميدات من*E. coli* O157:H7 , *E. coli* و*S. marcescens* و Sodium dodecyl sulfate لإزالة البلازميدات من *K. pneumoniae* بينما لم يظهر Ethidium bromide أي فعالية تحييدية ضد العزلات المدروسة. من ناحية أخرى، لوحظ فرق كبير من خلال النتائج في أنماط الحساسية تجاه مضادات الميكروبات

المستخدمة بين العزلات المدروسة بعد عملية التحييد، مقارنة بمقاومتها قبل التحييد، حيث أظهرت النتائج أعلى نسبة فقدان مقاومة تجاه المضادات الحيوية في عزلة *S. marcescens* وصولاً إلـى *E. coli* والتي سجلت أقل نسبة فقدان. وينطبق الشيء نفسه على المعادن الثقيلة ، فيما عدا أن أقل نسبة فقدان مقاومة كانت في عزلة *K. pneumoniae* ، والتي كانت أيضًا العزلة الوحيدة التي فقدت مقاومتها للمبيدات الحيوية المستخدمة بين جميع العزلات المدروسة.

استخدمت تقنية تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR) للكشف عن بعض جينات مقاومة المضادات الحيوية (bla_{CTX}، *sul1*) ، والمعادن الثقيلة (*czcA*، *ncc*) ، و للمبيدات الحيوية (*qacEΔ1*) لإظهار وجودها وتوزيعها على كروموسوم و بلازميد العزلات المدروسة ، إذ سجلت اعلى نسبة انتشار بين الجينات المدروسة لجينات مقاومة المضادات الحيوية bla_{CTX} و *sul 1* بمعدل ١٠٠٪ ، ٨٠٪ على الكروموسوم و ١٠٠٪ ، ١٠٠٪ على البلازميد على التوالي ، بينما لوحظ حدوث جينات مقاومة المعادن الثقيلة *czcA* و *ncc* بمعدل ١٠٠٪ ، و ٤٠٪ على الكروموسوم ، و ٨٠٪ ، ٢٠٪ على البلازميد على التوالي ، وأخيراً جين المقاومة للمبيدات الحيوية *qacEΔ1* بمعدل ٨٠٪ على الكروموسوم ، و ١٠٠٪ على البلازميد.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

علاقة المحتوى البلازميدي بمقاومة البكتريا المرضية المعوية تجاه المضادات الحيوية، المعادن الثقيلة و المبيدات الحيوية

سمير مجو خلف علي التتر

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتور محسن ايوب عيسى العكيدي

١٤٤٤هـ ٢٠٢٣م