جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

تاثير مستخلصات اطوار الذبابة الزرقاء Blue bottle Fly *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae) في نمو بعض انواع البكتيريا المرضية

غزوان ثامر خضير الراشدي

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الاستاذ

الدكتور **عطاالله فهد مخلف**

١٤٤٣ هـ **٢٠٢٢ م**

الخلاصة

شهدت العقود الاخيرة انتشار عدد كبير من السلالات البكتيرية الممرضة والمقاومة للمضادات الحيوية التركيبة. فكان التوجه العام للمختصين القيام بدراسات مستفيضة لإنتاج مضادات حيوية جديدة من انسجة نباتية او فطرية لكبح جماح تطور هذه البكتيريا المرضية، قد انتج الكثير من هذه المضادات الحيوية من المركبات المستخلصة من النباتات والفطريات، ولكنها لا تخلو بطبيعة الحال من التاثيرات الجانبية فضلا عن ان البكتيريا ستكون مقاومة لهذه المضادات الحيوية في نهاية المطاف؛ فكان لابد من البحث عن بدائل حقيقية لاكتشاف مضادات حيوية طبيعية جديدة من انسجة حيوانية وكائنات متعايشة بشكل مباشر مع هذه البكتيريا المرضية والمقاومة ، فوقع الاختيار على عائلة الذباب الازرق – Calliphoridae Blue bulte Fly بالتحديد *Calliphora vomitoria* الذبابة الزرقاء، وقد جرى في هذه الدراسة معرفة تاثير مستخلص اطوار الذبابة الزرقاء (اليرقة ، العذراء ، الكاملة) وافرازاتها اليرقية و تثبيط نمو اربعة انواع من البكتيريا الممرضة هي الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* والسالبة لصبغة كرام *Pseudomonus aeruginosa* ، *Klebsiella pnuemuoniae* و *Escherichia coli* ، و استخلاص المركبات الفعالة المثبطة لنمو هذه الانواع من البكتيريا بطريقة مبتكرة جديدة بالاعتماد على القطبية بوصفها نقطة جوهرية في عملية الاستخلاص ؛ وقد اعتمدت هذه الدراسة استخلاص المركبات الفعالة من انسجة اطوار الذبابة الزرقاء بخمسة مذيبات عضوية حسب تسلسل القطبية وهي Hexane، Chloroform ، Acetone، Ethanol، Water، مع استعمال المضاد الحيوي Ceftriaxone (CRO) مجموعة ضابطة ايجابية، وقيست درجة تثبيط نمو البكتيريا بالانتشار بالاقراص ، وقد اظهر التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية لمستخلص اليرقة الناتج من المذيب Chloroform على بقية المذيبات الاخرى في التركيز 25 ملغم / مل في تثبيط نمو البكتيريا بانواعها الاربعة فكان (15.2، 15.5، 16.5 و14.8) ملم *S. aureus*، *K. pnuemuoniae*، *E. coli* و *P. aeruginosa* على التوالي، يليه مستخلص الهكسان ثم الاستون فالمستخلص الكحولي واخيرا المائي في درجة تثبيط نمو البكتيريا، اما في التركيز(50)ملغم /مل، كان اعلى درجة تثبيط لنمو البكتيريا لمستخلص اليرقة الناتج من Chloroform ايضا، مع الاختلاف في درجة تثبيط

انواع البكتيريا الاربعة فكان (30.8 ، 26.5، 22.5 و21.5) ملم *P. aeruginosa*، *S. aureus*، *E. coli* و *K. pnuemuoniae* على التوالي، وتفوق مستخلص Chloroform لطور اليرقي على المضاد الحيوي Ceftriaxone (CRO) ، ظهرت فروق معنوية واضحة بين مستخلص الهكسان اليرقي على مستخلص الاستون والمستخلص الكحولي والمائي في هذا التركيز، و كان لمستخلص Chloroform اليرقي سيادة تامة ايضا في التركيز 100ملغم / مل على بقية المستخلصات الاخرى في تثبيط نمو البكتيريا اذ بلغت(42.8 ، 35.5، 36.4، 36.3) ملم *P. aeruginosa*، *S. aureus*، *E. coli* و *K. pnuemuoniae*على التوالي، و لم يكن هناك فروق معنوية واضحة لجميع التراكيز في تثبيط نمو البكتيريا بين مستخلص اليرقة ومستخلص العذراء للتركيز و نوع المذيب العضوي ، ما عدا فرقا معنويا لمستخلص Chloroform للعذراء ضد بكتيريا السالبة *P. aeruginosa* في التركيز 25 ملغم /مل اذ بلغ 26.2 ملم، وكان اقرب تثبيط له ضد البكتيريا الموجبة *S. aureus* 17.5 ملم عند نفس التركيز، اعلى تثبيط على الاطلاق كان لمستخلص Chloroform للعذراء عند (100) ملغم / مل حيث بلغ(44.4، 40.5، 36.4 و 32.6) ملم *P. aeruginosa*، *S. aureus*، *K. pnuemuoniae* و *E. coli* على التوالي، لقد تغلب مستخلص اليرقة والعذراء معنويا وبشكل واضح جدا على مستخلص الكاملة عند ثبات نوع المذيب وتركيز المستخلص فسجل اعلى تثبيط لمستخلص Chloroform لانواع البكتيريا عند التركيز(100) ملغم / مل،(24.5، 24.4، 22.2 و 22.0) ملم *S. aureus* ، *P. aeruginosa*، *K. pnuemuoniae* ، *E. coli* و على التوالي.

وبعد اجراء عملية الطرد المركزي للافرازات اليرقية افراز/اخراج (العمر الثالث) المصابة بالعدوى البكتيرية وغير المصابة حصلنا على محلولين ، محلول اعلى (Upper ligyid) ملون ومحلول اسفل (Lower ligyid) رائق، و اجرى اختبار الانتشار بالاقراص على سلالتين من انواع البكتيريا نفسها سلالة حساسة واخرى مقاومة للمضادات الحيوية و تفوق معنويا المحلول الرائق في التراكيز(50 و100)ملغم/مل، في تثبيط نمو البكتيريا على المحلول الملون للبكتيريا الحساسة غير المصابة بالعدوى فكان اعلى تثبيط سجل للبكتيريا السالبة *P.aeruginosa* 32.2 ملم اما الحساسة المصابة بالعدوى فاعلى تثبيط كان لبكتيريا *K.pneumoiae* (36.0) ملم، قلت نسب التثبيط للسلالات المقاومة فقد كان اعلى نسبة تثبيط لبكتيريا *P.aeruginosa*

17.8)ملم، غير المصابة بالعدوى، اما المصابة المقاومة فكان اعلى تثبيط لنوع البكتيريا نفسه *P.aeruginosa* 22.8 ملم، ولم يكن هناك فروقات معنوية واضحة بين الطورين في مضادة السلالات المقاومة.

فصلت المركبات الفعالة وشخصت بواسطة تقانة (كروماتوغرافيا الغاز – مطياف الكتلة) GCMS، من مستخلص اطوار الذبابة الزرقاء وقد شخص (15) مركبا من مستخلص اليرقة ستة مركبات منها نشطة بيولوجيا فعالة في تثبيط نمو البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية هي Nitro-2-propanone، n- hexadecanoic acid ، oleic acid ، Oxacycloheptadec-8-en-2-one، Acetic acid و Octadecadienal ، و كانت كل المركبات المستخلصة من طور العذراء بدون استثناء مثبطة لنمو البكتيريا بانواعها، و من اهم هذه المركبات النشطة بيولوجيا والموجودة حصرا في مستخلص نسيج العذراء هي 2 ،3- Hexanediol و(N-2-Oxoethyl)، فضلا عن المركبات الفعالة المستخلصة من الذبابة الزرقاء الكاملة الذي كان اقل نشاطا في تثبيط نمو البكتيريا و ظهر في مستخلص الكاملة مركب Glyceraldehyde الذي ادى الى نتيجة سلبية في تثبيط نمو البكتيريا بانواعها ، واجريت اختبارات التحليل الطيفي للمركبات الفعالة على مستخلص اطوار الذبابة الزرقاء IR Spectroscopy وحددت مجموعة من المجاميع الفعالة ضمن مستخلصات الاطوار الثلاثة .

Summary

In the last decades , large number of pathogenic bacterial strains that are resistant to synthetic antibiotics. The general tendency of specialists was to conduct extensive studies to produce new antibiotics from plant or fungal tissues to curb the development of these pathogenic bacteria. Many of the present antibiotics have side effects. Besides, bacteria will eventually become resistant to these antibiotics; It was necessary to search for real alternatives to discover new natural antibiotics from animal tissues and organisms directly coexisting with these pathogenic and resistant bacteria.

Extracts of immatures (larva, pupa, and adult) blue fly, *Calliphora vomitoria* and their larval secretions/ excretions were inhibited growth of four pathogenic bacteria, Gram positive *Staphylococcus aureus* gram-negative; *Pseudomonus aeruginosa, Klebsiella pnuemuoniae* and *Escherichia coli*. By relying on polarity as a core point in the extraction process. This study was relied on the extraction of active compounds from the immature tissues using five organic solvents according to their polarity sequence, namely Hexane, Chloroform, Acetone, Ethanol and Water. The standard drug Ceftriaxone (CRO) were used as a positive control group, the degree of bacterial growth inhibition was measured by disc diffusion method. The larval extract by Chloroform solvent evokes high significant inhibition in relation to the standard drug, and extracts with the (hexan, acetone, ethanol and water) solvents at the concentration 25 mg/ml, with growth inhibiting diameters, 16.5, 15.5, 15.2 and 14.8 mm for *S. aureus, K. pnuemuoniae, E. coli* and *P. aeruginosa* respectively. The application with concentrations 50 and 100 mg/ ml gives the context results, (30. 8, 26.5 , 22.5 and 21.5 mm) (42.8 , 35.5 , 36. 4 and 35.3 mm) for the above marker bacteria respectively. There were no significant differences in bacterial growth inhibition between larval and pupal extracts for the same extracted solvent, except for pupal extract with chloroform against *P. aeruginosa* and S. aureus at the concentration 25 mg/ml. the growth inhibition with pupal Chloroform extract at 100 mg/ml were 44.4, 40.5, 36.4 and 32.6 mm for *P. aeruginosa, S. aureus , K. pnuemuoniae* and *E. coli* respectively, larva and pupa extract significantly and very clearly outperformed adult extract at the stability of solvent type and extract concentration. So that, the

inhibition of Chloroform extract of adult at the concentration 100 mg/ml were 24.5, 24.4, 22.2 and 22.0 mm for *S. aureus , P. aeruginosa, K. pnuemuoniae, E. coli*, and respectively.

After centrifugation of the third instar larval E/ S either infected (cannibalized infected larvae) nor uninfected bacteria, two colored upper phases and a clear lower phase were obtained. The disc proliferation test was conducted on two strains of the same bacteria; A sensitive strain and another antibiotic-resistant. Clear phase was significantly difference at the concentrations 50 and 100 mg/ml, in inhibiting the growth of bacteria over the colored phase for sensitive and resistant bacteria. The highest recorded inhibition of *P.aeruginosa* - negative bacteria - was 32.2 mm. While for sensitive bacteria, the highest inhibition was for *K. pneumoiae* 36.0 mm, the inhibition ratios for the resistant strains decreased, as the highest inhibition of *P. aeruginosa* bacteria was 17.8 mm, the uninfected one, while for the resistant one, the highest inhibition was for the same type of *P. aeruginosa* 22.8 mm, and there were no significant differences between the both phases against the strains resistant strains.

The active compounds were separated and identified by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) test, from the extract of blue fly instars, where 15 compounds were identified from the caterpillar extract, six of which are biologically active and effective in inhibiting the growth of antibiotic-resistant bacteria, namely Nitro-2-propanone, n-hexadecanoic acid, oleic acid, Oxacycloheptadec-8-en-2-one, Acetic acid and Octadecadienal, all the compounds extracted from the pupal stage without exception inhibited the growth of bacteria of all kinds. 3-Hexanediol and (N-2-Oxoethyl), as well as the active compounds extracted from the adult blue fly, which was less active in inhibiting the growth of bacteria as it appeared in the extract of the adult compound Glyceraldehyde, which led to a negative result in inhibiting the growth of all kinds of bacteria, as well as tests were conducted Spectroscopic analysis of the active compounds on the extracts of the blue fly phases IR Spectroscopy and a group of active groups were identified within the three phases extracts.

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Effect of extracts of Blue bottle Fly *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae) phases on the growth of some pathogenic bacteria

Ghazwan Thamer Khudair Al Rashidi

Ph.D Thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr. **Atallah Fahd Mukhlif**

2022 A.D. **1443 A.H.**