جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية علوم البيئة وتقاناتها
قسم علوم البيئة

دراسة العلاقة بين التلوث بالمعادن الثقيلة ومقاومة المضادات الحيوية لبعض الفطريات والبكتيريا المعزولة من التربة

سنا ربيع قاسم القزاز

رسالة ماجستير
في علوم البيئة

باشراف

الاستاذ المساعد الدكتور
مازن نزار فضل السنجري

الاستاذ المساعد الدكتور
محمد ابراهيم خليل الطائي

1443 هـ

2021 م

الخلاصة

تضمن البحث دراسة الفطريات والبكتيريا المعزولة من الترب الملوثة بالمعادن الثقيلة في المناطق الصناعية والسكنية في مدينة الموصل مركز محافظة نينوى، وتشخيص هذه الكائنات باستعمال تقنية البايولوجي الجزيئي ثم دراسة تأثير التلوث بالعناصر الثقيلة عليها وعلى مقاومتها للمضادات الحيوية. جمعت العينات من اربعة مواقع في المدينة وهي حي البريد وحي سادة وبعويزة وموقعين في المنطقة الصناعية.

تم تحليل عينات التربة وتحضير تخافيف منها ثم زراعة التخافيف على وسطي اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA) لتنمية الفطريات ووسط الآجار المغذي Nutrient agar (N.A) لتنمية البكتيريا. زرعت التخافيف بطريقة الصب بواقع ثلاثة مكررات، ثم اجريت عملية تنقية المستعمرات الفطرية والبكتيرية بالطرائق التقليدية. ولغرض تشخيص هذه المستعمرات النقية بتقنية الـ PCR تمت تنمية مستعمرات الفطريات على وسط مستخلص البطاطا والدكستروز، وتنمية البكتيريا على وسط المرق المغذي (Nutrient broth)، وبالتالي تم تشخيص 9 انواع فطرية اثنان منها اجناس جديدة غير مشخصة تم تسجيلها في بنك الجينات واثنان منها تحوي طفرات جينية تم تسجيل احدها، وخمسة منها فطريات معروفة ومشخصة مسبقا. أما البكتيريا فتم عزل سلالتين جديدتين من جنس الـ*Bacillus* وتسجيلهما في بنك الجينات، وسلالة تحوي جينات جديدة لم يتم تسجيلها من جنس الـ*Staphylococcus* ، من بين اربعة انواع تم تشخيصها.

نميت الفطريات والبكتريا على تراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة المختارة للدراسة وهي الحديد والكادميوم والرصاص والزنك. كانت نتائج تنمية الفطريات مع معدن الرصاص بتثبيط يبدأ من ppm (150–700) لجميع الاجناس عدا جنس *Aspergillus nigar* الذي ابدا مقاومة حتى تركيز ppm 1000. اماالتثبيط بالنسبة لمعدن الزنك فقد بدأ عند ppm (200–700) للاجناس *Penicillium consobrinum , Aspergillus recurvatus , Fungal sp. SANA-5 Aspergillus niveus* و*Aspergillus nigar* ، بينما الاجناس *Aspergillus tubingensis*

Penicillium consobrinum SANA-3, Aspergillus sp E30 , Fungal sp. SANA -4 , ابدت مقاومة حتى تركيز 1000 ppm من المعدن. بينما كانت جميع الاجناس الفطرية مقاومة حتى تركيز 1000 ppm مع معدني الحديد والكادميوم.

نتائج تنمية البكتريا مع معدن الرصاص كانت بتثبيط يبدأ عند تركيز 1400 ppm وبقطر 11 ملم بالنسبة لجنس *Bacillus sp.sanna1* و12 ملم بالنسبة لجنس *Staphylococcus sp* وبتثبيط ابتدا من 1600 ppm وبقطر 12 ملم بالنسبة لجنس *Bacillus cereus* بينما جنس *Bacillus sp.sanna2* فقد ابدى مقاومة حتى تركيز 2000 ppm . اما نتائج التثبيط مع معدن الزنك فقد بدأ التثبيط عند تركيز 100 ppm لجميع الاجناس . في حين أن جميع الاجناس كانت مقاومة حتى تركيز 2000 ppm عند تنميتها مع معدني الحديد والكادميوم.

تم اقلمة الفطريات مع معدن الرصاص، وكان للاقلمة دورا ايجابيا في رفع مستوى المقاومة للاجناس *Penicillium consobrinum SANA-3* و *Aspergillus sp E30* , و *Penicillium consobrinum* . بينما الاجناس *Aspergillus tubingensis* و *Fungal sp. SANA-5*و *Aspergillus niveus* و*Aspergillus recurvatus* لم تتاثر بعملية الاقلمة وتثبطت عند نفس التراكيز. اما جنس *Fungal sp. SANA-4* فقد بدا اكثر حساسية للمعدن بعد الاقلمة . كما تم اختيار معدن الزنك لاقلمة البكتيريا، واظهرت جميع الاجناس المعزولة مقاومة اكبر عند الاقلمة .

تمت تنمية الفطريات والبكتريا مع المضادات الحيوية الفطرية والبكتيرية وملاحظة درجة تاثرها بالتلوث بالمعادن من خلال قياس قطر التثبيط حول المضاد. تم تنمية الاجناس الفطرية بثلاث انماط: بدون معدن، وبوجود معدن الرصاص دون اقلمة الفطر، وفطريات مؤقلمة، كما تم تنمية فطر معزول من بيئة غير ملوثة بالمعادن الثقيلة مع المضاد الفطري، وبينت النتائج أن الاجناس *Penicillium consobrinum SANA-3, , Aspergillus tubingensis Aspergillus sp E30* كانت متوسطة المقاومة، بينما الفطر *Fungal sp. SANA-5* كان مقاوماً بدون معدن الرصاص وفي جميع تراكيز المضاد الفطري، بينما كان حساس مع وجود الرصاص.

بينما الجنس *Alternaria Alternata* المعزول من بيئة غير ملوثة بالمعادن الثقيلة (كمعامل سيطرة) فقد كان حساساً جدا للمضاد وبشكل اكبر بكيثر من الفطريات المعزولة من البيئة الملوثة بالمعادن الثقيلة. اما بالنسبة للبكتيريا، فقد اظهرت النتائج عدم استجابة جميع الاجناس لـ Amoxicillinو Metronidazole فهذه المضادات لاتستهدف هذه الانواع البكتيرية. بكتيريا *sp Staphylococcus* كانت مقاومة لـ Tetracycline وGentamicin و Azithromycin. الجنس *Bacillus sp.sanna2* كانت متوسطة المقاومة مع المضادات Tetracycline و Vancomycin. والجنس *Bacillus cereus* ابدى مقاومة متوسطة مع الـ Gentamicin و Azithromycin.

واخيرا تم حساب مؤشر مقاومة المضادات الحيوية المتعدد MAR للبكتيريا ، وكان مؤشر جنس *Staphylococcus sp* مرتفع جدا وبواقع 0.5 وجنس *Bacillus sp.sanna2* *مرتفع عالي وبواقع 0.3 ، والاجناس Bacillus sp.sanna1 و Bacillus cereus* مرتفع وبواقع 0.2 ، مما يدل على ارتفاع خطر التلوث بالمضادات الحيوية، وان جميع هذه السلالات نشأت من مصادر عالية الخطورة للتلوث.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

University of Mosul

College of Environmental Sciences

And Technology

Study of the relationship between heavy metal contamination and antibiotic resistance of some fungi and bacteria isolated from soil

Sana Rabeea Qasim AlKazaz

M.Sc./Thesis
Environmental Sciences

Supervised by

Assistant Prof. Dr.

Mohammad Ibrahim Khalil AL – Taee

Assistant Prof. Dr.

Mazin Nazar Fadhel Al Sinjary

1443 هـ

2021 م

Abstract

This work involved studying fungi and bacteria isolated from soils contaminated with heavy metals in industrial and residential areas in the city of Mosul, the center of Nineveh Governorate, and diagnosing these organisms using molecular biology technology, then studying the effect of heavy metal pollution on them and their resistance to antibiotics. Samples were collected from four sites in the city: Al Bareed neighborhood, Sada & Baweza neighborhood, and two sites in the industrial area in Mosul city

Soil samples were analyzed and dilutions were prepared, then the dilutions were grown on Potato Dextrose Agar (PDA) medium for the development of fungi and Nutrient agar (N.A) medium for bacterial development. The dilutions were grown by decanting method with three replications, then the process of purifying the fungal and bacterial colonies was carried out using the traditional methods. For the purpose of diagnosing these pure colonies by PCR technique, colonies of fungi were grown on the medium of potato extract and dextrose, and bacteria were grown on the medium of nutritious broth, and thus 9 fungal species were diagnosed, two of them are new undiagnosed genera that have been recorded in the gene bank and two of them contain mutations. One of them was genetically recorded, and five of them are known and previously. diagnosed fungi. As for bacteria, two new strains of the genus Bacillus were isolated and registered in the gene bank, and a strain containing new genes that had not been recorded was from the genus Staphylococcus, among the four types that were diagnosed

Fungi and bacteria were grown on different concentrations of heavy metals selected for study (iron, cadmium, lead, zinc). The results of the development of fungi with lead metal were with inhibition starting from (150-700) ppm for all species except for the genus Aspergillus niger, which showed resistance up to the concentration of 1000 ppm. As for the inhibition for zinc metal, it started at (200-700) ppm for the species Fungal sp. SANA-5 , recurvatus Penicillium consobrinum , Aspergillus Aspergillus niveus و Aspergillus niger whereas genera Aspergillus tubingensis ,Penicillium

consobrinum SANA-3, Aspergillus sp E30 , Fungal sp. SANA -4 showed resistance to a concentration of 1000 ppm of the metal. While all fungal genera were resistant to 1000 ppm concentration with iron and cadmium metals.

The results of growing bacterial with lead metal were inhibition starting at concentration of 1400 ppm with a diameter of 11 mm for Bacillus sp.sanna 1 and 12 mm for Staphylococcus species and with inhibition starting at 1600 ppm with a diameter of 12 mm for Bacillus cereus while Bacillus sp.sanna 2 showed resistance up to 2000 ppm concentration. As for the results of inhibition with zinc metal, inhibition started at a concentration of 100 ppm for all races. While all races were resistant to 2000 ppm when grown with iron and cadmium.

The fungi were acclimatized with lead metal, and the acclimatization had a positive effect in raising the level of resistance to the species Penicillium consobrinum SANA-3, Aspergillus sp E30 and Penicillium consobrinum. While the genera Aspergillus tubingensis and Fungal sp. SANA-5, Aspergillus niveus and Aspergillus recurvatus were unaffected by acclimatization process and were inhibited at the same concentrations. As for the genus Fungal sp. SANA-4 was more sensitive to metal after acclimatization. Zinc metal was also selected for the acclimatization of the bacteria, and all the isolated genera showed greater resistance to localization.

Fungi and bacteria were grown with fungal and bacterial antibiotics, and the degree of their sensitivity to metal contamination was observed by measuring the diameter of the inhibition around the antibody. Fungal species were grown in three ways: without metal, with the presence of lead metal without acclimatization, and acclimatizing fungi, and a fungus isolated from an environment not contaminated with heavy metals with antifungal, and the results showed that the genera Aspergillus tubingensis, Penicillium consobrinum SANA-3, Aspergillus sp E30 was moderately resistant, while Fungal sp. SANA-5 was resistant without lead metal and in all antifungal concentrations, while it was sensitive to lead

While the genus Alternaria Alternata isolated from an environment not contaminated with heavy metals (as a control factor), it was very sensitive to the antibiotic and much more than fungi isolated from the environment contaminated with heavy metals. As for bacteria, the results showed that all genera did not respond to Amoxicillin and Metronidazole, as these antibiotics do not target these bacterial species. sp Staphylococcus bacteria were resistant to Tetracycline, Gentamicin and Azithromycin. The genus Bacillus sp.sanna 2 was moderately resistant to Tetracycline and Vancomycin antibiotics. The genus Bacillus cereus showed moderate resistance to Gentamicin and Azithromycin.

Finally, the multi-antibiotic resistance (MAR) index was calculated for the bacteria, the genus sp Staphylococcus index was very high, 0.5, Bacillus sp.sanna2, 0.3, and Bacillus sp.sanna1 and Bacillus cereus, 0.2, which indicates a high risk of antibiotic contamination. All these strains originated from sources with high-risk of contamination