



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

التحري المظهري والجزيئي عن حاملات الحديد Siderophores وتحديد
فعاليتها التثبيطية والتآزيرية مع بعض المضادات الحيوية في أنواع من
البكتريا السريرية

هبة قيدار ظاهر مطو العبوزيد
رسالة ماجستير
علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف
الأستاذ الدكتور
محسن أيوب عيسى أحمد العكيدي

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف التحري عن انتاج حاملات الحديد Siderophores وتشخيص انواعها في بعض انواع البكتريا المرضية (*Klebsiella pneumonia* ، *Escherichia coli*) ودراسة قابلية *Staphylococcus aureus* و *Proteus mirabilis* ، *Enterococcus faecalis* مستخلصات حاملات الحديد وحدها وبالتآزر مع المضادات الحيوية على تثبيط نمو بعض انواع البكتريا، فضلا عن التحري عن الجينات المشفرة لحاملات الحديد، كذلك دراسة امكانية تثبيط انتاج حاملات الحديد على المستوى المظهري والجزيئي باستخدام مواد طبيعية (العسل والعكبر) وحماض عضوية (حامض الستريك، وحامض السوربيك) ومستخلصات نباتية كحولية (النعناع والسماق) .

اوضحت النتائج أن جميع العزلات قيد الدراسة كانت منتجة لحاملات الحديد، وأن بعض هذه العزلات كانت منتجة لحاملات الحديد من نوع الكاتيكلات بنسبة 50%، وعزلات أخرى كانت منتجة لحاملات الحديد من نوع الهيدروكسومات بنسبة 35.7% وعزلات اخرى كانت منتجة لحاملات الحديد من نوع الكاربوكسيالات بنسبة 28.5%. وأن قسماً من هذه العزلات كانت منتجة لنوعين من حاملات الحديد. تم استخلاص حاملات الحديد للتحري عن تأثيرها التثبيطي تجاه البكتريا أظهرت النتائج تبايناً واضحاً في نسبة الفعالية التثبيطية لمستخلصات حاملات الحديد المختلفة وكانت اعلاها في حالة كل من مستخلص بكتريا *S. aureus* 4 ومستخلص بكتريا *E. coli* 5 بنسب (84.6%) و(69.2%) على التوالي، تلتها فعالية مستخلص بكتريا *P. mirabilis* بنسبة (61.5%)، وتدرجت بقية مستخلصات حاملات الحديد من البكتريا الأخرى بنسب فعالية تثبيطية أقل تجاه البكتريا المدروسة، ولوحظ من هذه النتائج أيضاً أن جميع العزلات قيد الدراسة كانت ذات حساسية متعددة لأكثر من مستخلص من حاملات الحديد المدروسة ماعدا العزلتين *S. aureus* 3 و *S. aureus* 4 التي كانت حساسة لنوعين من مستخلصات حاملات الحديد فقط.

أجري فحص حساسية العزلات تجاه المضادات الحيوية واطهرت النتائج اختلاف العزلات في نمط حساسيتها ومقاومتها للمضادات الحيوية إذ لوحظ أن جميع العزلات المعوية كانت ذات مقاومة متعددة (MDR) multidrug resistant باستثناء عزلتين *E. coli* 5 و *E. coli* 6 حيث كانتا مقاومتين لنوعين فقط من المضادات الحيوية، وعزلة واحدة فقط هي *E. coli* 3 كانت حساسة لجميع أنواع المضادات الحيوية. أما بالنسبة لعزلات *S. aureus* فقد وجد أن جميع عزلاتها كانت مقاومة لنوع واحد من المضادات باستثناء *S. aureus* 3 كانت مقاومة لنوعين من المضادات الحيوية. بعدها درس التأثير التآزري بين مستخلصات حاملات الحديد والمضادات الحيوية التي أظهرت البكتريا مقاومة لها، وبينت النتائج أن عزلة *E. faecalis* كانت أكثر العزلات تأثراً بعملية التآزر والتي حصلت ما بين مستخلص حاملات الحديد لبكتريا *S. aureus* 4 مع المضاد CFM وبقطر تثبيط بلغ (٢٧ ملم)، بينما كانت العزلة *E. coli* 2 الأقل تأثراً بالفعاليات التآزرية إذ لم تتجاوز اقطار التثبيط فيها (١-٨ ملم) بينما

اظهرت بقية المستخلصات لحاملات الحديد-المضادات الحيوية تأثيراً تآزرياً متبايناً من المتوسط الى القليل حسب نوع العزلات المستخلصة منها ونوع المضادات الحيوية.

تم التحري عن الجينات المشفرة لإنتاج حاملات الحديد باستخدام تقنية PCR في عزلتين من بكتريا *E. coli* تضمنت الجين *entC* المشفر لإنتاج Enterobactin والجين *iucA* المشفر لإنتاج Aerobactin، كما تم التحري عن الجينات المشفرة لإنتاج حاملات الحديد في عزلتين من بكتريا *S. aureus* وهي الجين *sbnE* المشفر لإنتاج staphyloferrin B والجين *sfnaB* المشفر لإنتاج staphyloferrin A، بينت نتائج التحري أن الجين *entC* كان موجود في عزلتي بكتريا *E. coli* بينما وجد الجين *iucA* في عزلة واحدة فقط، وقد اظهرت نتائج التحري أن الجين *sfnaB* كان متوجداً في كلتا عزلتي *S. aureus* والجين *sbnE* كان موجوداً في عزلة واحدة فقط.

تم تحديد قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC وتحت المثبطة الدنيا Sub-MIC للمواد المثبطة المختلفة المستخدمة في اختبارات تثبيط إنتاج حاملات الحديد وظهرت نتائج اختبارات التثبيط على المستوى المظهري أن عسل سنجار والمستخلص الكحولي للسماق تثبط إنتاج حاملات الحديد في عزلتي *E. coli* 1 و *S. aureus* 4، وثبط حامض الستريك إنتاج حاملات الحديد في عزلة *E. coli* 1 فقط، وثبط حامض السوربيك إنتاج حاملات الحديد في عزلة *S. aureus* 4 فقط. واثبتت نتائج التثبيط على المستوى الجزيئي أن معاملة العزلة *E. coli* 1 بالمستخلص الكحولي للسماق وعسل سنجار وحامض الستريك كل على حدة أدت الى اختفاء الجين *iucA* ولم تؤثر على الجين *entC*، كما أظهرت النتائج أن معاملة العزلة *S. aureus* 4 باستخدام المستخلص الكحولي للسماق وعسل سنجار وحامض السوربيك كل على حدة أدت الى اختفاء الجين *sbnE* ولم تؤثر على الجين *sfnaB*. إن اختفاء الجين دليل على أن التثبيط حصل على المستوى الجزيئي.

Abstract

The current study was conducted with the aim of investigating the production of Siderophores and diagnosing their types in some types of pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*) and studying the ability of Siderophores extracts alone and in synergy with antibiotics to inhibit the growth of some type of bacteria, as well to investigate the genes encoding Siderophores, as well as to study the possibility of inhibiting the production of Siderophores at the phenotypic and molecular level by using natural materials (honey and propolis), organic acids (citric acid, sorbic acid) and alcoholic plant extracts (mint and sumac).

The results showed that all the isolates under study were producers of Siderophores, and that some of these isolates were producers of the catecholate type by 50%, other isolates were producers of the type hydroxomas by 35.7%, and other isolates were producers of the type carboxylate by 28.5%. Some of these isolates produced two types of Siderophores.

Siderophores were extracted to investigate their inhibitory effect on bacteria and the results showed a clear variation in the percentage of the inhibitory activity of the different Siderophores extracts, and it was the highest in the case of each *S. aureus* 4 extract and *E.coli* 5 extract with rates of (84.6%) and (69.2%), respectively, followed by *P. mirabilis* extract with a rate of (61.5%), and the rest siderophores extracts from other bacteria with lower inhibition activity rates towards the studied bacteria, and it was also noted from these results that all the isolates under study were highly sensitive to more than two extracts of the studied siderophores except for the two isolates *S. aureus* 3 and *S. aureus* 4 that were sensitive to only two types of siderophores extracts.

The sensitivity test of the isolates towards antibiotics was conducted and the results showed that the isolates differed in the pattern of their sensitivity and resistance to antibiotics. It was noted that all intestinal isolates were multi-resistant (MDR), except for two isolates *E.coli* 5 and *E.coli* 6, which were resistant to only two types of antibiotics, and only one isolate, *E.coli* 3, was sensitive to all types of used antibiotics. As for the *S. aureus* isolates, it was found that all of its isolates were resistant to one type of antibiotic, except for *S. aureus* 3, which was resistant to two types of antibiotics. Then the synergistic effect test was conducted between siderophores extracts and the antibiotics to

which the bacteria showed resistance, the results showed that the *E. faecalis* isolate was the most affected by the synergistic effect, which occurred between *S. aureus* 4 siderophores extract of with the antibiotic CFM, with an inhibition zone reach (27 mm). While the isolate *E. coli* 2 was the least affected by the synergistic activities, as its inhibition zone did not exceed (1-8 mm) while the rest of the of siderophore –antibiotic showed a synergistic effect varying from moderate to slight depending on type of isolates and type of antibiotic.

Genes encoding the production of siderophores were investigated using PCR technology in two isolates from *E. coli*, which included the gene *entC* encoding for the production of Enterobactin and the gene *iucA* encoding for the production of Aerobactin, also the genes encoding for the production of siderophores were investigated in two isolates from *S. aureus*, *sbmE* that encodes for the production of staphyloferrin B and *sfnaB* gene that encodes for the production of staphyloferrin A, the results of the investigation showed that the gene *entC* was present in two isolates of *E. coli*, while *iucA* was found in only one isolate, while the results of the investigation showed that *sfnaB* gene was present in both isolates of *S. aureus* while *sbmE* gene was present in only one isolate.

The minimum inhibitory concentration (MIC) and sub-MIC were determined for the different inhibitors used in the inhibition tests for the production of siderophores. The results of the inhibition tests at the phenotypic level showed that Sinjar honey and alcoholic extract of sumac inhibited the production of siderophores production in *E. coli* 1 and *S. aureus* 4 isolates. While citric acid inhibited the production of siderophores in *E. coli* 1 only, while sorbic acid inhibited the production of siderophores in *S. aureus* 4 only. The results of inhibition at the molecular level showed that treatment of the *E. coli* 1 isolate with alcoholic sumac extract, Sinjar honey and citric acid separately led to the disappearance of the *iucA* gene, while it did not affect the *entC* gene. Sinjar and sorbic acid, each separately, led to the disappearance of the *sbmE* gene, while it did not affect the *sfnaB* gene. As the disappearance of the gene is evidence that the inhibition occurred at the molecular level.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of biology



**Phenotypic and molecular detection of siderophores
and determination of their's inhibitory and
synergistic activity with some antibiotics in clinical
bacterial species**

Hiba Qedar Dhahir Mutou Al-Abozed

M.Sc. Thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Prof. Dr. Muhsin Ayoub Essa Ahmed AL-Ogaïd

2023 A.D.

1445 A.H