جامعــة الموصــل
كلية العلوم

التقييم البكتريولوجي والجزيئي لتأثير بعض الدقائق النانوية على فعالية المضادات الحيوية

بيمان على كريم محمد

اطروحة دكتوراه في أختصاص

علوم الحياة/ علم الاحياء المجهرية

باشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة إسراء غانم حازم السماك

1436هـ **2015م**

جامعــة الموصــل
كلية العلوم

التقييم البكتريولوجي والجزيئي لتأثير بعض الدقائق النانوية على فعالية المضادات الحيوية

اطروحة تقدمت بها الطالبة

بيمان على كريم محمد

الى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات

درجة الدكتوراه فلسفة في اختصاص

علوم الحياة/ الاحياء المجهرية

باشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة إسراء غانم حازم السماك

1436هـ **2015م**

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية جمع مئتان وعشر نموذجا من مرضى يعانون من حالات مرضية مختلفة (أخماج المجاري البولية, الجروح ,القيح, الحروق وأخماج اللوزتين) والذين يراجعون مستشفى رزكاري التعليمي و روزئاوا في مدينة اربيل من الفترة آذار 2013 الى أيلول 2013. زرعت النماذج على أوساط زرعية مختلفة وأعطت (179) عزلة أي بنسبة (85.2%) وإستناداً الى الصفات المزرعية والشكلية والتفاعلات الكيمياء الحياتية وبإستخدام نظام ال API-20E واختبار API-Staph تم تشخيص65 (36.3%) س

تم إختبار حساسية العزلات لأثنى عشر مضاد حيوي وأظهرت العزلات تباينا من حيث مقاومتها للمضادات الحيوية وأبدت أغلب العزلات مقاومة عالية لمضادي Ampicillin و Amoxicillin ومقاومة متوسطة للمضادات الحيوية Gentamicin، Erythromycin، Doxycyclin، Chloramphenicol و Co-Trimoxazole في حين أظهرت أغلب العزلات حساسية للمضادات الحيوية Ciprofloxacin، Cefotaxime، Cephalothin، Ceftriaxone، Nitrofurantoin وحددت التراكيز المثبطة الدنيا (MIC) وتراوحت مابين(8-512) مايكروغرام/مل للعزلات المقاومة لمضادي Ampicillin و Amoxicillinفي حين تراوحت قيم MIC للعزلات حساسة للمضاد الحيوي Nitrofurantoin مابين(1-32) مايكروغرام/مل ماعدا بعض العزلات التابعة للنوعين *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* أذ كانت مقاومة لمضاد Nitrofurantoin.

وحددت التراكيز المثبطة الدنيا للدقائق النانوية AgNPs ذ و حجم (20,90)nm وتراوحت مابين (325-2600) مايكروغرام/مل,أوكسيد الزنك النانوي ZnONP ذو الاحجام (20,30,50~150) كانت بين (81.25-2600) مايكروغرام/مل وثنائي أوكسيد التيتانيوم TiO_2NP ذو الاحجام (10,50,100)nm كانت (40.6-2600) مايكروغرام/مل للعزلات كافة.

وجدت الدراسة تأثيرا تآزريا للمضادات الحيوية مع الدقائق النانوية، وأظهرت النتائج فعالية جيدة في تثبيط النمو البكتيري لسلالات مقاومة للمضادات الحيوية حيث أزداد معدل قطر منطقة التثبيط عند مزج المضادات مع الدقائق النانوية وبأحجامها المختلفة مما أعطى للمضاد Erythromycin أعلى نسبة تثبيط عند مزجه مع AgNPs ذي حجم 90nm بزيادة قطر الحفر (22ملم) وتليه المضاد Ampicillin بزيادة (12 ملم) وثم المضاد Co-Trimoxazole بزيادة (11 ملم) ضد النوع *Staphylococcus aureus* في حين اعطى المضادCephalothin عند مزجه مع AgNPs ذي حجم 20nmضد النوع *Escherichia coli* زيادة (14ملم) كما اعطى Amoxicillin عند مزجه معZnO NP ذي حجم 30 nm زيادة (10) ملم ، وكذلك اعطى مضاد الـAmpicillin اعلى نسبة عند مزجه معZnO NP ذي حجم 50nm بزيادة (5ملم) ضد النوع *Klebsiella pneumonia*، كما وتأثر

النوع *Proteus mirabilis* وبزيادة (12ملم)عند مزج مضاد Co-Trimoxazole مع AgNPs ذي حجم 20nm في حين أظهر المضاد Ceftriaxoneعند مزجه معZnO NP ذي حجم 20nm زيادة (11ملم) ضد النوع *Pseudomonas aeruginosa* .

عرضت العزلات لفحص سلسلة التفاعلات البلمرة باستخدام البادئات الخاصة للتحري عن جين *ampC* المسؤول عن انتاج أنزيم البيتالاكتاميز من نوع *AMPc* و جين bla_{CTX} المسؤول عن انتاج البيتالاكتاميز من نوع CTX، وقد أظهرت النتائج وجود تباين في المحتوى الجيني للأنواع البكتيرية المختلفة حيث وجد الجين*ampC* في جميع العزلات قيد الدراسة والتابعة للنوع *Escherichia coli* بحجم الجزئي 191bp وأعطت 5 عزلات تابعة للنوع *Staphylococcus aureus* و3 عزلات لكل من النوع *Klebsiella pneumoniae* والنوع *Proteus mirabilis* نتيجة موجبة ولم يظهر الجين في النوع *Pseudomonas aeruginosa* .أما الجين bla_{CTX} فقد ظهر بحجم الجزئي 701 زوج قاعدي في4 عزلات تابعة للنوع *Klebsiella pneumoniae* وعزلتين تابعة للنوع *Escherichia coli* وعزلة واحدة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* في حين لم يظهر الجين في النوعين *Staphylococcus aureus* و*Proteus mirabilis*.

لوحظ تغايراً بسيطاً في بعض القواعد النتروجينية عند مقارنة نتائج تتابعات القواعد النتروجينية للجيني *ampC* و bla_{CTX} (ضمن المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية National (NCBI) Center Biotechnology Information ، وذلك باستخدام برنامج Basic Local (BLAST) Alignment Search Tool) حيث ترجمت نتائج تتابعات القواعد النتروجينية للجيني *ampC* و bla_{CTX} قيد الدراسة الى أحماض أمينية وذلك بأستخدام نفس البرنامج وقد وجد تغاير بشكل طفرات من نوع Transversion.

University of Mosul
College of Science

Bacteriological and Molecular Assessment of the effect of some Nanoparticles on the effectiveness of antibiotics

Payman Ali Kareem Mohammed

Ph.D. Thesis
In
Biology / Microbiology

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Essra Ghanem Hazem AL-Sammak

2015 A.D. **1436 A.H.**

University of Mosul
College of Science

Bacteriological and Molecular Assessment of the effect of some Nanoparticles on the effectiveness of antibiotics

Ph. D. Thesis Submitted By

Payman Ali Kareem Mohammed

To

The Council of College of Science/ University of Mosul in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Essra Ghanem Hazem AL-Sammak

2015 A.D. **1436 A.H.**

Abstract

This study was included Two hundred ten samples were collected from patients which suffering from different medical cases(urinary tract infections, wounds, pus, burns and tonsils) admitted to Rizgary Teaching Hospital and Rozhawa Hospital in Erbil City from March 2013 to September 2013. The samples were cultured on different culture media and (179) samples were gave bacterial growth by rate 85.2% and according to the colony morphology, biochemical reactions and by the use of API-20E system and API-Staph, 65 (36.3%) *Escherichia coli, 42* (23.5%) *Staphylococcus aureus,* 33 (18.4%) *Klebsiella pneumonia, 24* (13.4%) *Pseudomonas aeruginosa*, 15 (8.4%) *Proteus mirabilis* species isolates were identified.

The sensitivity of the bacterial isolates to different antibiotics was performed. There was a variation in the resistance of the isolates and showed most isolates were high sensitive to Ampicillin and Amoxicillin while showed moderate resistance to Gentamicin،Erythromycin،Doxycyclin ،Co-Trimoxazole, Chloramphenicol, whereas other isolates were sensitive to Ciprofloxacillin, Cefotaxime, Cephalothin, Ceftriaxone and Nitrofurantoin and MIC values were determined for to Ampicillin and Amoxicillin ranged between (8-512) µg/ ml for resistance isolates while the MIC for the sensitive isolates to Nitrofurantoin were (1-32) µg/ ml, except for some isolates such as *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were resistant to Nitrofurantoin.

The minimum inhibitory concentrations for AgNPs sizes (20, 90nm) were determined between (325-2600) µg/ ml, the zinc oxide ZnO NP sizes (20, 30, 50 ~ 150nm) were (81.25-2600) µg/ ml and titanium dioxide TiO2 NP sizes (10, 50,100nm) were (40.6-2600) µg/ml for all isolates.

The study showed synergistic effect of antibiotics with Nanoparticles and These results indicate that highly efficient for bacterial inhibition of antibiotic resistant strains, which increased the inhibition zone when mix antibiotics with different

sized of Nanoparticles ,and gave the Erythromycin highest percentage for inhibition by increased 22mm when mixed with AgNPs a size 90 nm against *Staphylococcus aureus*, also Ampicillin increase to 12 mm ,followed by Co-Trimoxazole increase to11mm against *Staphylococcus aureus* while the Cephalothin when mixed with AgNPs 20 nm gave 14mm against *Escherichia coli* , whereas the Ampicillin recorded (11mm) when mixed with ZnO NP size 30 nm, the Ampicillin when mixed with ZnO NP 50nm increase the inhibition zone to(5 mm) against *Klebsiella pneumonia* ,the *Proteus mirabilis* affected to up (12 mm) when mix Co-Trimoxazole with AgNPs 20 nm, while the Ceftriaxone gave(11mm)when mixed with ZnO NP 20nm against *Pseudomonas aeruginosa*.

All isolates exposed to Polymerase chain reaction by using special Primers to investigating *ampC* gene responsible for the production of Beta Lactamase enzyme type (AMPc) and *blaCTX* gene which responsible for the production of Beta Lactamase type (CTX) and explained These results variation of both gene content for isolates, The *ampC* gene at191bp was found in all isolates belong to *Escherichia coli* , 5 isolates of *Staphylococcus aureus* and 3 isolates of each of *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis,* but not appears in *Pseudomonas aeruginosa* . while the *blaCTX* gene at 701bp was appeared in 4 isolates of *Klebsiella pneumoniae*, as well as 2 isolates *Escherichia coli* and one isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, while don't appear in *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis* .

When comparing the sequencing of nitrogenous bases of *ampC* and *blaCTX* genes(by the National Center Biotechnology Information (NCBI), using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program) were noticed, Translated as the sequencing of nitrogenous bases for both *ampC* and *blaCTX* genes under this study into amino acids using the same program and declared some Variations as Transversion mutations.