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

تثبيط انزيمات الضراوة المنتجة من بكتريا العنقوديات الذهبية المعزولة من مصادر مختلفة

امنة يعرب حميد عبدالله البكري

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف
الأستاذ الدكتور
محسن أيوب عيسى أحمد العكيدي

1444هـ
2022 م

الخلاصة

اجريت الدراسة الحالية بهدف التحري عن انزيمات عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وإمكانية تثبيط هذه الانزيمات باستخدام المستخلصات الكحولية والزيوت الأساسية لعدد من النباتات والتحري عن حصول التثبيط على المستوى المظهري والجزيئي، جمع لهذا الغرض 65 عينة خلال الفترة من شهر تشرين الأول 2021 إلى غاية شهر كانون الاول 2021، توزعت بين مصادر مرضية (50 عينة شملت عينات قشع، ادرار، مسحات جلدية ودم) ومصادر بيئية (15 عينة شملت عينات تربة، ماء وهواء) اجريت عليها الفحوصات التشخيصية المجهرية والزرعية الكيموحيوية اللازمة فضلاً عن التشخيص بجهاز الفايتك Vitek2، كما درس مدى مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة.

تم الحصول على (20) عزلة بكتيرية من كافة العينات المدروسة تابعة إلى المكورات العنقودية الذهبية وبنسبة عزل بلغت 100%، توزعت بين 13 عزلة (65%) من مصدر مرضي و7 عزلات (35%) من مصدر بيئي. هذه العزلات جميعاً أظهرت حساسية مطلقة لكل من مضادات أميكاسين، جينتامايسين، نيتروفيورانتوين، فانكومايسين بنسبة 100% وبنسب أقل لبقية المضادات، بالمقابل أظهرت النتائج أن هناك تبايناً في نسبة مقاومة العزلات تجاه المضادات التالية الأريثرومايسين بنسبة 55%، الأمبيسيلين 45%، التتراسيكلين 40%، وتدرجت في مقاومتها بنسب أقل لبقية المضادات المدروسة.

أوضحت النتائج ان جميع العزلات المدروسة باختلاف مصادر عزلها كانت منتجة لانزيمات الضراوة (مابين 2– 6 انزيمات) بما فيها العزلات البيئية وقد تباينت نسب انتاج كل نوع من انزيمات الضراوة من قبل العزلات كانت أعلى نسبة انتاج لكل من إنزيم الليسيثينيز والليبييز بنسبة 95%، بينما كانت 90% من العزلات منتجة لإنزيم البروتييز وإنزيم اليوريز بنسبة 80%، ثم الهيمولاسين بنسبة 60%، واخيراً بيتا لاكتاميز بنسبة 55%.

انتخبت في الدراسة الحالية خمسة نباتات وهي نبات القرفة والزنجبيل والنعناع وقشور الرمان وبذور العنب للتحري عن قدرة مستخلصاتها الكحولية وزيوتها الأساسية في تثبيط انزيمات الضراوة المدروسة وتم تحديد قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC وتحت المثبطة الدنيا Sub-MIC لهذه الزيوت والمستخلصات وبينت نتائج اختبارات التثبيط المظهري ان زيت القرفة أظهر تثبيطاً على انزيمي الليسيثينيز والليبيز واليوريز، أما المستخلص الكحولي للقرفة فقد ثبط انزيمات الهيمولاسين والبيتا لاكتاميز والليبيز، واظهر زيت النعناع تثبيطا لكل من انزيم هيمولاسين والبروتييز والليبيز بينما مستخلصه الكحولي ثبط انزيمي الليسيثينيز والبروتييز، اما المستخلص الكحولي لقشور الرمان فقد ثبط انتاج انزيمي البروتييز والليسيثينيز والهيمولاسين، بينما ثبط زيته انتاج البروتييز، كما كان للمستخلص الكحولي للزنجبيل تأثيرُ تثبيطي في انزيمي الهيمولاسين والليبيز، وثبط زيت بذور العنب انتاج انزيم البروتييز فقط .

اختيرت جينات ثلاثة انزيمات ضراوة كانت الاكثر عرضة للتثبيط في اختبارات التثبيط المظهري لدراسة تثبيطها على المستوى الجزيئي شملت الجين *blaZ* المشفر لانتاج انزيم بيتا لاكتاميز و *hlA* المشفر لانتاج انزيم الهيمولاسين و *lip1,lip2* المشفران لانتاج انزيم الليبيز، بينت نتائج التحري الجزيئي عنها انها موجودة على DNA الكروموسومي لكافة العزلات المدروسة عدا الجين *lip1* فلم يكن موجودا في أحدى العزلات. اظهرت نتائج التثبيط الجزيئي ان المعاملة باستخدام زيت القرفة ادى إلى اختفاء الجين *lip1* في جميع العزلات أما *lip2* فقد اختفى في أحدى العزلات وظهر في عزلة أخرى، ولم يؤثر مستخلص القرفة الكحولي في الجين *blaZ* المشفر لانزيم بيتا لاكتاميز أما *hlA* فقد اختفى في أحدى العزلات وظهر في عزلة أخرى، كما ادت المعاملة بالمستخلص الكحولي لقشور الرمان إلى اختفاء الجين *hlA* في العزلات المدروسة، دلالة على أن التثبيط حصل على المستوى الجزيئي.

Abstract

The current study was conducted with the aim of investigating the virulence factors enzymes possessed by *Staphylococcus aureus* and the possibility of inhibiting these enzymes by using alcoholic extracts and essential oils of some plants and investigating this inhibition at the phenotypic and molecular level. For this purpose, 65 samples were collected during the period from October 2021 until December 2021, distributed between pathologenic sources (50 samples that included sputum samples, urine, skin and blood swabs) and environmental sources (15 samples that included soil, water and air) microscopic, cultural and biochemical diagnostic tests were conducted as well as the diagnosis with Vitek2 system. isolates resistance to various antibiotics also studied.

Twenty bacterial isolates were obtained from all studied samples belonging to *S. aureus* with an isolation rate of 100%, distributed between 13 isolates (65%) from a pathologenic source and 7 isolates (35%) from an environmental source. All of these isolates showed highly sensitivity to amikacin, gentamicin, nitrofurantoin, and vancomycin at 100% and lower rates than the rest of the antibiotics. In contrast, there was a discrepancy in the percentage of isolates resistant to erythromycin by 55%, ampicillin 45%, tetracyclines 40%, and in lower resistance rates to the rest studied antibiotics.

The results showed that all studied isolates, were producers of virulence enzymes (between 2-6 enzymes), including environmental isolates. The production rate of each type of virulence enzymes varied by the isolates, and the highest production rate was for lecithinase and lipase by 95%, while 90% of the isolates produced protease and urease by 80%, then hemolysin by 60%, and finally beta-lactamase by 55%.

Five plants were selected in the current study, which is cinnamon, ginger, mint, pomegranate peels and grape seeds to investigate the ability of their alcoholic extracts and essential oils to inhibit the studied virulence enzymes.

Cinnamon oil showed inhibition of lecithinase, lipase and urease enzymes, while the alcoholic extract of cinnamon inhibited hemolysin, beta-lactamase and lipase, and peppermint oil showed inhibition of both hemolysin, protease and lipase, while its alcoholic extract inhibited lecithinase and proteolytic. For pomegranate peels, the production of protease enzymes, lecithinase and hemolysin were inhibited, while its oil inhibited the production of protease, and the alcoholic extract of ginger had an inhibitory effect on hemolysin and lipase, and grape seed oil inhibited the production of protease only.

The genes of three virulent enzymes that were most likely inhibited in the phenotypic inhibition tests, were selected to study their inhibition at the molecular level, they included *blaZ* gene, which encodes for the production of beta-lactamase, and *hlA*, which encodes for the production of hemolysin, and *lip1, lip2*, which encodes for the production of lipase. All studied genes were exist at the chromosomes of all studied isolates except *lip1* gene was not present in one of the isolates. The results of molecular inhibition showed that treatment with cinnamon oil led to the disappearance of the *Lip1* gene in all isolates, while *Lip2* disappeared in one isolate and appeared in another. The alcoholic cinnamon extract did not affect *blaZ* gene while *hlA* disappeared in one isolate and appeared in another, and treatment with the alcoholic extract of pomegranate peel led to the disappearance of the *hlA* gene in the studied isolates, indicating 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

Inhibition of virulence enzymes produced by *Staphylococcus aureus* isolated from different sources

Amina Yarub Hameed Abdullah AL-Bakry

M.Sc. Thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Prof. Dr. Muhsin Ayoub Essa Ahmed AL-Ogaidy

2022 A.D. **1444 A.H**