وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم حياة

التأثير التآزري للـ Bacteriocinودقائق الزنك النانوية المصنعة بايولوجيا من *Enterococcus faecium*على تعبير جين *rsbA* في *Proteus mirabilis*المعزولة من قسطرة الادرار.

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

سراب محمد مهدي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى (2021)

بإشراف

أ.م.د. عدوية فاضل عباس

أ.م.د. ميس عماد أحمد

1446هـ **2024م**

Ministry of Higher Education
And Scientific Research

The University of Diyala

Collage of Education for Pure Sciences

Biology Department

Synergistic of biosynthesized Bacteriocin and Zinc Nanoparticles from *Enterococcus faecium* on *rsbA* gene expression in *Proteus mirabilis* isolated from Catheter Urine.

A Thesis Submitted to The

Council of College of Education for Pure Science/university of Diyala as a Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of M.Sc.in Biology

By

Sarab Mohammed Mahdi

B.Sc.in Biology / College of Education for Pure Sciences / University of Diyala (2021)

Supervised By

Assist.Prof. Dr. Adawia Fadhil Abbas

Assist. Prof.Dr. Mais Emad Ahmed

2024A.D **1446A.H**

1. Introduction

Proteus mirabilis is frequently implicated in the occurrence of a range of human infections encompassing wounds, gastrointestinal tract, and the urinary system (Chakkour *et al*.,2024)The most common clinical manifestations of *Proteus* infection are urinary tract infections (UTIs), in general, UTIs are more common in individuals aged 20 to 50 years and most common in women of this age group. *P. mirabilis* is particularly recognized for its association with infections in the catheterized urinary tract, termed Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTIs) with the highest incidence in elderly patients (Werneburg, 2022).

One of the leads reasons Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTIs) to this *P. mirabilis* of ability to swarm across catheters made of silicone , posing risks for catheterized patients. (Chakkour *et al* ., 2024) . *rsbA* gene plays an important role in initial and stabilization of swarming, and appearing of pathogenic in urinary tract infection, in other words, *rsbA* act as a positive or negative regulator in swarming (Hajar Naseri *et al* ., 2018). *Proteus* accounts for 1% to 2% of all UTIs (*E. coli* being the most common), while in hospital-acquired UTIs, *Proteus* accounts for 5%. Complicated UTIs (i.e., secondary to catheterization) have an even higher association with *Proteus* infection at 20% to 45%. (Jamil *et al*, 2023)

Enterococcus faecium is a *Lactic acid* bacterium genus (LAB) occurring in a wide variety of environments, probably because of its ability to tolerate a wide range of pH and temperatures, in addition to its capacity to metabolise a wide spectrum of carbohydrates (Franz *et al* , 2024). *Enterococcus faecium* produces antibacterial substances such as organic acids and bacteriocins which more antimicrobial activity. Also can produce enterocins, an antimicrobial peptides with activities against pathogens, (García- Vela *et al*, 2023).Bacteriocins are biologically active peptides that act as inhibitory

substances related microorganisms to the producing strains but are inherently resistant to their own. These active peptides are known as primary antimicrobial metabolites(Fugaban *et al* , 2021)

Green synthesis of metal oxide Nano Particles has gained a great interest since it is clean, eco-friendly approach and their wide range of applications in biotechnology and medical field (Devi *et al*, 2023).

Metal oxide nanoparticles are of great interest due to their extraordinary properties compared to their bulk counterparts owing to two primary factors: The subject of interest is related to the phenomena of surface effects and quantum effect (Joudeh *et al*, 2022). Nowadays nanotechnology have employed to improve antimicrobials that can target virulence factors without disturbing mammalian cells. Metal NP synthesis using microorganisms has represented a novel alternative to chemical and physical approaches as antibacterial, antioxidant.(Noor and Mais , 2024)

Given the importance Biosynthesis of Nanoparticles and its effect on pathogenic bacteria. She came this study aims to.Biosynthesis of zinc oxide using Bacteriocin-like Inhibitory Substance and evaluation of its effect on *rsbA* gene expression in *P. mirabilis* and cytotoxicity on lymphocytes,this is done through.

1-Isolation and identification of both *P. mirabilis* and *E. faecium* using VITEK 2 system

2-Biosynthesis and characteristics of Zinc Oxide Nanoparticles from *E.faecium* isolated from the gums of healthy people

3- Detection of *rsbA* gene in *P.mirabilis* isolated from catheter urinary

4-Estimation the effec of ZnO-NPs on gene expression and cytotoxicity assay

الخلاصة

جمعت (200) عينة في المدة ما بين شهري أيلول وكانون الأول 2023، أذ تم جمع (150) عينة من قسطرة البول من مستشفيات اليرموك التعليمية في بغداد، و(50) مسحة من لثة الأشخاص الأصحاء.

زرعت عينات قسطرة البول مباشرة على أطباق أكار ماكونكي وأكار الدم. وكان عدد العينات التي أعطت نمواً 110 (73.3%) عينة، في حين كان عدد العينات التي لم يحدث لها نمو40 (26%) عينة.

زرعت عينات من لثة الأشخاص الأصحاء في مرق MRS. ثم على أجار MRS أظهرت 40(80%) عينة نموًا إيجابيًا بينما لم يحدث نمو في 10 (20%) عينة.

أظهرت نتائج التشخيص باستخدام بطاقة الجرام السالبة (GN-Card) و (GP-Card) لجهاز Vitek 2 Compact أن35 (31.8 %)عزلة كانت *P. mirabilis* ، و9 (22.5%) عزلة كانت *E.faecium*.

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية باستخدام جهاز Vitek 2. تم اختيار المضادات الحيوية من مجموعات مختلفة وهي الأكثر شيوعًا في علاج التهابات المسالك البولية، بما في ذلك levofloxacin، Imipenem، Cefoxitin، Ampicillin، Piperacillin. أظهرت النتائج تباينًا واضحًا في حساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المستخدمة. أظهرت جميع عزلات البكتيريا *P.mirabilis* والتي بلغ عددها 30 عزلة مقاومة بنسبة (100%) للمضادات الحيوية Cefoxitin وAmpicillin، بينما كانت مقاومتها للمضادات الحيوية الأخرى متفاوتة.

زرعة جميع عزلات *P.mirabilis* على أكار الدم للتحقق من قدرتها على الانثيال ، وأظهرت النتائج من بين (35) عزلة، أظهرت (10) عزلات قدرة على الأنثيال بعد 24-48 ساعة من الحضانة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية

في الفحص الأولي لـ *E. faecium* المنتجة لمثبطات شبيهة بالباكتيريوسين باستخدام طرق انتشار بئر الأجار (AWD) وقرص ورق الترشيح (FPD). أظهرت نتائج كلتا الطريقتين أن أربع عزلات فقط من *E. faecium* (E.5 و E.20 و E.3 و E.11) أعطت نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد *E. faecium* وكانت العزلة E.20 هي الأفضل، وهذا يعتمد على نتائج طريقة FPD، كما كانت هذه الطريقة أفضل من طريقة AWD.

لتعزيز النمو أضيف (1%) من الجلوكوز ومستخلص الخميرة إلى الوسط وكان أفضل مصدر للكربون والنيتروجين على التوالي بدرجة حموضة 5 عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 72 ساعة والجدير بالذكر أن مناطق التثبيط التي لوحظت تراوحت بين (15 – 24) ملم.

صُنعت جسيمات أكسيد الزنك النانوية بطريقة بيولوجية من مادة مثبطة شبيهة بالبكتيريا (BLIS) لبكتيريا *E. faecium* المعزولة من لثة الأشخاص الأصحاء حيث أظهرت النتائج أن الرواسب البيضاء تمثل أول ملاحظة بصرية لجسيمات أكسيد الزنك النانوية

شخصت جسيمات أكسيد الزنك النانوية باستخدام العديد من الاختبارات حيث كشف طيف الأشعة فوق البنفسجية المرئية عن ذروة الامتصاص لجسيمات أكسيد الزنك النانوية المخلقة حيويًا عند 267 نانومتر وأظهر المجهر الذري للقوة (AFM) متوسط حجم جسيمات أكسيد الزنك النانوية المخلقة حيويًا والذي كان حوالي 69.83 نانومتر. أكدت أطياف XRD تكوين ZnO-NPs من خلال الكشف عن ثلاث قمم بارزة. أظهر تحليل الأشعة السينية المشتتة للطاقة (EDX) وجود الزنك في ZnO-NPs. أظهرت صور FESEM أن الجسيمات كانت متماسكة بأشكال مختلفة في الصور عند قوة تكبير 500 X و 2000 X.

أختبر نشاط ZnO-NP ضد *E.feacium* (20,5,3) المعزولة من تسوس الأسنان. تم الحصول عليها جاهزة ومشخصة من (قسم علوم الحياة في كلية العلوم / جامعة بغداد) و*P. mirabilis* (1,7,26) بتركيزات متفاوتة من ZnO-NPs (1000،500 ،250 ،125 ، و 62.5 ميكروجرام / مل) أظهرت النتائج أن التركيز كان أعلى فعالية على بكتيريا *E. faecium* عند 1000 ميكروجرام / مل بينما التركيز (250، 125، 62.5) ميكروجرام / مل لم يكن له تأثير على العزلات (3،5). أما بالنسبة لبكتيريا *P. mirabilis*، فقد كان لجميع التركيزات تأثيراً على العزلات الثلاثة، باستثناء التركيز 62.5 ميكروجرام/مل، حيث تبين أن ZnO-NPs لها تأثير أكبر على عزلات *P. mirabilis*

أظهرت نتائج اختبار السمية الخلوية انخفاض بسيط في حيوية الخلايا الليمفاوية البشرية المعالجة بجسيمات نانوية من ZnO المصنعة بيولوجيًا. تشير هذه النتائج إلى أمكانية استخدام هذه الطرق كبديل قابل للتطبيق للطرق الفيزيائية الأخرى المرتبطة حاليًا بالسمية البيئية.

كُشف عن جين *rsbA* بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل لعشر عزلات من *P. mirabilis* ووفقًا للتسلسل (M1-M10) تحتوي جميع العزلات العشر على الجين، أختيرت هذه العزلات بسبب ظاهرة الأنثيال وحالة مقاومتها للأدوية المتعددة (MDR).

كان التركيز المثبط دون الحد الأدنى (sub-MIC) لجسيمات أكسيد الزنك النانوية 125 ميكروجرام/مل، وتم تحديده باستخدام طريقة التخفيف الدقيق ضد *P. mirabilis*

تم استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي لتحديد التغيرات في التعبير عن جين *rsbA* لعزلتين بعد التعرض لجسيمات أكسيد الزنك النانوية عند تركيز مثبط دون الحد الأدنى (125 ميكروجرام/مل). تم تقليل التعبير عن جين *rsbA* بشكل كبير في العزلة الأولى، بينما تم زيادة التعبير عن جين *rsbA* في العزلة الأخرى. والسبب وراء التغيير في النتائج هو قوة العزل على أحداث ظاهرة الانثيال.