جامعة بني سويف

كلية الصيدلة

Beni suef University

Faculty of Pharmacy

الملخص العربى والإنجليزي لرسالتى الماجستير والدكتوراة

المقدم من د/ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي

(المدرس بقسم الميكروبيولوجيا والمناعة بكلية الصيدلة جامعة بني سويف)

قائمة الأبحاث المشتقة من رسالتي الماجستير والدكتوراة

1) Mohamed A. Ramadan, Alaa M. Shawky, Aml E. Saafan and Eman A. Elgebaly (2009): Factors affecting biodegradation of low concentration 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Nile water by the *Pseudomonas sp*. MA-100. Egypt. J. Biotechnol.

2) Eman El-Gebaly, Tamer Essam, Shabaan Hashem and Rehab A. El-Baky (2012): Effect of Levofloxacin and Vitamin C on Bacterial Adherence and Preformed Biofilm on Urethral Catheter Surfaces. J .Microb. Biochem .Technol. 4:6

د/ ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي

مدرس بقسم الميكروبيولوجيا والمناعة

كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

رئيس القسم **عميد الكلية**

Master Thesis Abstract

By: Eman Abd El Aziz Ahmed El-Gebaly

Synthetic chemicals are beneficial and necessary part of life in anymodern society. Over four billions of Kg of pesticide products enter ourenvironment annually. These chemicals induced considerable environmental pollution and human health problems as a result of their persistence, tòxicity and transformation into hazardous metabolites. While environmental pollution has been attracting increasing concern in recent years on a world level, the quantity of agrochemicals used in Egypt had been increasing dramatically. To understand the potential environmental concern, we have to know and predict the fate of these chemicals in the environment. Degradation of these chemical pollutants might result from biotic and abiotic activities. However the most significant route for degradation of natural and synthetic chemicals is through the action of living microorganisms (biodegradation reactions).

Pollution has induced rapid evolution of specific biodegradative pathways in terrestrial and aquatic bacteria. Some xenobiotic compounds are however, foreign or new to the microbial systems and hence are degraded very slowly or not at all. Methods for enhancement of such degradation and means for encouraging proliferation of specific microbial strains capable of degradation has received considerable attention for maximizing the activity of such strains in the environment.

Halogenated aromatic compounds constitute a large group of chemicals responsible for environmental pollution. Amongst this group, 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid) is a chlorinated phenoxyacetate herbicide which has been used to eradicate Ward El-Nil in the water ways of the river Nile. Its use had been banned for many years as a result of its carcinogenic and teratogenic effect. However, residual amounts of it had been detected in the aquatic systems at low concentrations.

The present study was conducted to explore the possibility of isolation of active microbial strains from contaminated sites able to degrade 2,4-D in different aquatic ecosystems (Nile water, irrigation water, lake water and sewage). The main objective of this research is studying biodegradation of low concentrations of 2,4-D in Nile water samples and determining factors that might enhance the degradation process. These factors include inoculum density, addition of inorganic nutrients, supplementation with second carbon sources, inoculation with mixed culture, cell immobilization and adaptation of the organism to low substrate concentration. So inoculation of natural ecosystems with microorganisms capable of metabolizing low concentrations of chlorinated aromatic pollutants could be a promising means of destroying these compounds.

د/ ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي
مدرس بقسم الميكروبيولوجيا والمناعة
كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

رئيس القسم **عميد الكلية**

الملخص العربي

لرسالة الماجستير المقدمة من الصيدلي/ ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي

تعتبر المواد الأروماتية الهالوجية مواد كيميائية واسعة الانتشارومسئولة عن التلوث البيئى نتيجة لكثرة استخدامها في الزراعة والصناعة. هذه المواد هي مواد مسب بة ل لسرطان ومحدثة ل لطفرات الجينية. بالرغم من أن هذه المواد قد تمر بتكسير ضوئى واكسدة كيميائية، إلا أن التكسير الميكروبي هو العملية الرئيسية التي تؤثر على بقاء ومصير هذه المواد في البيئة. من بين هذه المواد ٢,4 - داى كلورو فينوكسى أسيتيك أسيد)٢,4 - د(, مركب شائع الاستخدام كمضاد ل لحشائش. وحيث أن هذا المركب قد منع إستخدامه منذ عدة سنوات نتيجة لأضراره الخطيرة على البيئة والإنسان لذا فإنه المركب موجود في البيئات المائية ولكن بتركيزات منخفضة م ما يؤدي إلى بقاؤه لفترات طويلة في البيئة في هذه الدراسة تم فصل عد د من العزلات)١٧ عزلة(من البكتريا من عينات بيئية)تربة وماء(باستخدام تقنية التشبع، باستعمال وسط يحتوى على)٢,4 - د(كمصدر وحيد ل لكربون.

وباستخدام التحليل الطيفى تم قياس القدرة التكسيرية لتلك العزلات عن طريق قياس ال)٢,4 -د(المتبقى في الوسط بدون تكسير. وقد وجد أن من بين تلك العزلات التي تم فصلها والتي أثبت ت قدرة كبيرة في عملية تكسير ال)٢,4 - د(ثلاث عزلات من جنس السودوموناس و الكورينباكتيريم و الأسينتوباكتر. عند إضافة كل منهم بكثافة خلوية قدرها ١٠٣ خلية / مل إلى محلول أملاح يحتوى على ١٠ مكجم/مل من ال ٤،٢. علي تكسير كل ال ٢,4 - د الموجود في الوسط في خلال ١٠ساعات وبكتريا الكورينباكتيريم و -د فإن بكتريا السودوموناس لها القدرة الأسينتوباكترفي خلال ١٢ ساعة من الإحتضان. وبزيادة تركيز ال ٤،٢ - د إلى 40 مكجم/مل لوحظ إنخفاض القدرة التكسيرية ل لعزلات الثلاثة مع زيادة فترة التأقلم. وقد وجد أن إضافة البكتريا إلى محلول ملحى له تركيز أيونى هيدروجينى متعادل)٨,6(يعطى أعلى قدرة تكسيرية حيث لوحظ إطالة فترة التأقلم وإنخفاض القدرة التكسيرية في الوسط الحامضى أو القاعدى وجد أيضا أن درجة حرارة تحضين ٣٠ درجة منوية هي الأنسب لإعطاء

أقصى قدرة تكسيرية لكل من السودوموناس والكؤرينباكتيريم والأسينتوباكتر. تم دراسة التكسير الحيوى الطبيعي ل ل ٢,4 - د في بيئات مائية مختلفة)ماء النيل، ماء الرى ، ماء البحيرة، ماء المجارى(و وجد أن ماء المجارى أعطت أسرع معدل لتكسير المركب. إضافة كل من السودوموناس و الكورينباكتيريم و الأسينتوباكتر إلى تلك البيئات المائية)معقمة وغير معقمة(حفز تكسير ١٠مكجم/ مل بطريقة ملحوظة عند دراسة تكسير ال ٤٢ د بتركيز منخفض)١ مكجم/مل (في ماء النيل و ذلك عن طريق تحديد المتبقي ال ٢,4 د باستخدام تقنية إتش بي ال سي . وجد أن بكتريا السودوموناس اظهرت أعلى قدرة في تكسير)1 مكجم/مل (لقد قامت بتكسير المركب كلية في خلال 6 ساعات من التحضين. و بخفض تركيز ال ٤٢ د إلى ه. و ٢٠,. مكجم / مل وجد آن معدل التكسير قد زاد حتي تركيز 1. مكجممل ثم بدا هذا المعدل في التناقص مرة أخري بعد هذا التركيزووجود ٢,4 د بتركيز منخفض في عينات ماء النيل يعوق تكسيره الحيوي بالبكتريا و هذا يتطلب دراسة التقنيات المختلفة التي عن طريقها يمكن تحفيز تكسير ١ مكجممل من ال ٤٢ د باستخدام بكتريا السودوموناس. فعند إضافة المثبطات البيولوجية)مضاد ل لفطريات و مضاد ل لطفيليات(إلي ماء النيل وجد آن معدل التكسير قد زاد حيث أنه في خلال أول ساعتين من التحضين وجد آن ٨٠ % من ال ٤٢ د قد تم تكسيره مقارنة ب 40 % في غياب المثبطات البيولوجية. و عند وجود السودوموناس بكثافة خلوية عالية)٣x٠خليةمل (وجد اختفاء فترة التأقلم و تم تكسير كل ال ٢,4 د الموجود في الوسط خلال 3 ساعات. و بدراسة تأثير إمداد ماء النيل بأملاح عضوية و غير عضوية وجد أن إضافة نترات الأمونيوم كمصدر ل لنيتروجين و) فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين ، فوسفات ثنائي البوتاسيوم أحادي الهيدروجين(كمصدر ل لفسفور قد أدي إلي اختفاء المركب نهائيا من عينة ماء النيل خلال ساعة واحدة من التحضين. و عند إضافة ملح السترات أو الفينول أو ملح الأوكسالات كمصدر ثانى ل لكربون فإن السودوموناس قامت بتكسير ٨٠ % ، ٩٠ % ، 95 % من ال ٤٢د على الترتيب في خلال أول ساعة من التحضين مقارنة ب ١٠% في العينات الخالية من هذه الأملاح. وجد أيضا أن زرعة بكتيرية مكونة من كل من السودوموناس و الأسينتوباكتر لها القدرة على تكسير ٨٠ % ال ٢,4 د الموجود في ماء النيل في خلال الساعة الأولي من التحضين. بتثبيت خلايا السودوموناس علي

حبيبات من الكربون النشط لوحظ اختفاء ال ٤٢د الموجود في الوسط نهانيا في خلال 4 ساعات. من خلال نتائج الدراسة نتوقع أن العزلات التي تم فصلها قد تكون مفيدة في الحيوية للبيئات المائية التى لوثت بمركبات أروماتية كلورونية مثل ال 2,4-د

د/ ايمان عبد العزيز أحمدالجبالي

مدرس بقسم الميكروبيولوجيا والمناعة
كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

رئيس القسم **عميد الكلية**

PhD Thesis Abstract

By: Eman Abd El Aziz El Gebaly

"Effect of levofloxacin alone and in combination with a non-antimicrobial agent on biofilm formation of uropathogenic strains on ureteral stents"

Indwelling urinary catheters are commonly used for bladder drainage in patients with urinary obstruction. The most frequent complication of urinary catheter use is a urinary tract infection (UTI). About 80% of UTIs are associated with urinary catheters.

Bacteria are irreversibly attached to the surface of urethral catheters and encapsulated in a self-produced polymeric matrix forming microbial communities known as biofilms which can be the source of persistent infections.

Biofilms are hardly eradicated and even high doses of antimicrobials have a limited success biofilm removal due to poor penetration of antibiotics, reduced growth rates and local alterations in the biofilm environment that impair the activity of antibiotics. This study was conducted to study the prevalence of microbial infections in patients undergoing urethral catheterization in the department of urology at Beni-Sweef university hospital, the incidence of resistance of the isolated microorganisms and the ability of the isolated microorganisms to form biofilm at different time intervals. Also the effect of levofloxacin, vitamin-C each alone and in combination on the inhibition of biofilm formation on catheter surfaces was studied.

In the present work, 150 strains were isolated from catheter segments of 115 patients at the day of catheter removal. *E. coli*

was the most prevalent microorganism (30%) followed by *Staphylococcus spp.* (15.3%), *Pseudomonas spp.* (14%), *Citrobacter spp*. (11.3%), *Enterobacter spp.* (6.7), *Proteus mirabilis*. (6%), both *Klebsiella spp.* and *Morganella morganii* (5.3%) and *Providencia spp.* (4%).

Almost 73.9 % of the total number of *Staphylococcus spp.* was isolated from mixed culture, followed by *Enterobacter spp.* (70%), *Providencia spp.* (66.7%), *Pseudomonas spp.* (52.4%), *Klebsiella spp.* (50%), *E. coli* (40 %), and *Citrobacter spp.* (23.5%) and *Proteus mirabilis* (11%). All *Morganella morganii* isolates were isolated in pure culture.

The resistance pattern to levofloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, nitrofurantoin, aztreonam, cefipime, imipenem, ceftriaxone, gentamycin and amoxycillin/clavulanic acid revealed that the highest incidence of resistance to levofloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin was shown by *E. coli* (86-91%). Also the highest incidence of resistance to nitrofurantoin and gentamycin was shown by *Proteus mirabilis* (100%) and to aztreonam by *Staphylococcus spp*. (100%). Imipenem showed the least percentages of resistance where all *E.c oli, Klebsiella spp., Citrobacter spp., Enterobacter spp., Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* were sensitive to it. While amoxicillin/clavulanic acid showed the highest percentage of resistance.

Biofilm production by the recovered isolates showed that 41% of the isolates showed to be strong biofilm formers, 28% showed moderate biofilm forming ability and 22% were weak or non biofilm producers. *E. coli* had the highest extent of biofilm

formation (60%) followed by *Proteus mirabilis* (55%), *Pseudomonas spp. (*52%), *Klebsiella spp*. and *Enterobacter spp*. (50%) *Citrobacter spp*. (42%) and *Morganella morganii* (25%).

A dose related decrease in biofilm formation was observed by both levofloxacin and vitamin-C. This was detected by a decrease in the optical density of the biofilm layer on microtiter plates and the number of viable cells attached to the catheter surfaces in comparison to controls. The results showed that LEV/VIT-C combinations at 0.5MIC/100 mg/ml and 2MIC/100 mg/ml have the highest inhibitory effect on the initial adherence (up to 98.5%) and the pre-formed biofilm (up to 93.5%).

The inhibitory effects of the tested agents were also verified by (SEM). The scanning electron micrographs showed the morphological changes of the tested organisms upon treatment with levofloxacin and vitamin-C. They also showed that the decrease in the extent of biofilm formation in the presence of the tested agents. *E. coli* and *Klebsiella spp.* were tested for the presence of both *mrkD* and *fimH* genes responsible for adherence and it was found that that not all strains which are positive for *mrkD* gene are positive for *fimH* gene. Also all *E. coli* strains detected by TCP as biofilm producers were positive for *mrkD*. All the five *Klebsiella spp*. showed to be positive for *mrkD* gene.

د/ ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي

مدرس بقسم الميكروبيولوجيا والمناعة

كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

رئيس القسم **عميد الكلية**

الملخص العربي

لرسالة الدكتوراة المقدمة من الماجستير/ ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي

تأثير مركب الليفوفلوكساسين بمفرده ومتحدا مع مركب غير مضاد للجرثومات على تكوين الغشاء الحيوى من الجرثومات الممرضة للمجارى البولية على قسطرة الحالب

تعتبر قسطرات الجهاز البولى هى الاكثر استخداما فى حالات امراض الحالب ولكن عند ادخال تلك القسطرات فى المرضى فانها تكون عرضة لتكوين الغشاء الحيوى على السطحين الداخلى والخارجى منها وكلما زادت مدة تركيبها داخل المريض كلما زادت قدرة الميكروبات على تكوين الغشاء الحيوى مما يترتب عليه الاصابة بعدوى المسالك البولية.

الغشاء الحيوى عبارة عن مجموعة من الخلايا الميكروبية التى تنمو على السطح وتقوم بغمس نفسها فى كمية من البولى سكاريد الذى تفرزه مما يؤدى الى انسداد تام للقسطرة. وقد وجد ان الغشاء الحيوى له قدرة فائقة على مقاومة المضادات الحيوية حيث ان الميكروبات المكونة للغشاء الحيوى لها القدرة على الالتصاق والنمو على سطح القسطرات برغم وجود جرعات عالية جدا من المضاد الحيوية وتعتبر مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية والمركبات الكيميائية الأخرى من أخطر المشكلات التى نواجها فى مجال استخدام القسطرات البولية.

هذه الدراسة اجريت للتعرف على مدى انتشار العدوى فى المرضى الذين اجريت لهم تركيبات القسطرات البولية فى قسم المسالك البولية بالمستشفى الجامعى ببنى سويف، مدى مقاومة الميكروبات المعزولة لمجموعة من المضادات الحيوية، قدرة الميكروبات المعزولة على تكوين الغشاء الحيوى خلال 12، 24، 48 ساعة ودراسة تأثير كل من مركبات الليفوفلوكساسين وفيتامين-ج كل بمفرده وتأثيرهما معا على منع تكوين الغشاء الحيوى على أسطح القسطرات.

وقد تم تجميع 150 عينة من 115 مريض قاموا بتركيب القسطرات وقد اظهرت هذه الدراسة أن سلالة الاى كولاى هى أكثر السلالات المعزولة (30%) ويتبعها الاستافيلو كوكاى (15,3%)، سلالات السودوموناس (14%)، سلالات الستروباكتر (11,3 %)، الانتيروباكتر (6,7%)، البروتياس ميرابيليز (6%)، سلالات الكليبسيللا والمورجانيللا مورجانى (5,3 %) وأخيرا سلالات البروفيدينشيا (4%).

وبدراسة مدى مقاومة الميكروبات لبعض المضادات الحيوية وجد أن أعلى نسبة مقاومة لليفوفلوكساسين والسيبروفلوكساسين والأوفلوكساسين كانت بالاى كولاى (86-91%) . أيضا أعلى معدل للمقاومة لمركب النيتروفيورانتوين والجنتاميسين وجد بواسطة البروتياس ميرابيليز (100%)، الأزتريونام بالاستافيلوكوكاى (100%). وقد وجد أن مركب الايميبينيم له أقل معدل للمقاومة حيث أن معظم السلالات أظهرت حساسية له للاميبينيم وعلى العكس الأموكسيسيللين/ كلافيولانيك اسيد أظهر أعلى نسبة مقاومة.

وبدراسة مدى قدرة السلالات على تكوين الغشاء الحيوى وجد ان 41% من السلالات أظهرت قدرة عالية على تكوين الغشاء الحيوى، 28% أظهرت قدرة متوسطة أما 22% كانت ضعيفة أو منعدمة القوة فى تكوينها للغشاء الحيوى.

وجد ايضا أن الاى كولاى كانت أعلى سلالة فى قدرتها العالية على تكوين الغشاء الحيوى حيث أن 60% منها أظهرت أعلى قدرة على تكوين الغشاء الحيوى يليها البروتياس ميرابيليز (55%) ، سلالات السودوموناس (52%)، الكليبسيللا والانتيروباكتر (50%) والستروباكتر (42%) والمورجانيللا مورجانى (25%).

بدراسة تأثير كل من مركب الليفوفلوكساسين وفيتامين-ج كل على حده ومتحدين معا على تكوين الغلاف الحيوى وجد انخفاض ملحوظ فى معدل التصاق الخلايا وفى معدل تكوين الغشاء الحيوى. ووجد أن هذا الانخفاض مرتبط بتركيز كل من الليفوفلوكساسين وفيتامين-ج وهذا الانخفاض لوحظ عن طريق الانخفاض فى كثافة الطيف الضوئى لطبقة الغشاء الحيوى على أطباق الميكروتيتر وأيضا الانخفاض فى عدد الخلايا البكتيرية الملتصقة على أسطح القسطرات بالمقارنة بالعينات الغير معالجة.

وقد وجد أيضا أن مركب الليفوفلوكساسين وفيتامين-ج معا لهما القدرة الأكبر على تقليل الالتصاق فى البداية بمعدل يصل الى 98,5% من العينات الغير معالجة وهما أيضا الأعلى تأثيرا على الغشاء الحيوى مكتمل النضج بمعدل يصل الى 93,5% من العينات الغير معالجة.

وقد تم أيضا التعرف على تاثير تلك المركبات على التصاق الخلايا البكتيرية على قطع القسطرة باستخدام الميكروسكوب الالكترونى الماسح وقد اظهرت الصور مدى الاستجابة والتغيير فى شكل الميكروبات فى وجود المركبات المستخدمة كما أوضحت مدى الانخفاض فى كمية الغشاء الحيوى المتكون فى وجود هذه المركبات.

وبدراسة وجود الجينات المسئوله عن تكوين الشعيرات من النوع 1 والنوع 3 للالتصاق باسطح القسطرات فى كل من الايشريشيا كولاى والكليبسيللا اثبت وجود جين ال mrkD فى 14 عينى ايشريشيا كولاى من 18 عينة ووجوده فى 5 عينات الكليبسيللا التى تم اختبارها . ولكن جين ال

fimH اثبت وجوده فقط فى 4 عينات ايشيريشيا كولاى من 12 عينـة وعينـة كليبسـيللا واحـدة فقط.

د/ ايمان عبد العزيز أحمد الجبالي

مدرس بقسم الميكروبيولوجيا والمناعة

كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

رئيس القسم **عميد الكلية**