Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Diyala

College of sciences

Inhibitory effect of Ag/AgCl nanoparticles produced by *Lactobacillus* spp. against pathogenic bacteria

A Thesis Submitted to the Council of College of sciences, University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biology

By

Abdullah Saad Saab AL-Hamdany

B.Sc. Biology College of sciences
University of Diyala 2016-2017

Supervised by

Dr. Abbas Yaseen Hasan
Assistant Professor

Dr. Zainab Mohammad Nsaif
Professor

1442H **2020AD**

INTRODUCTION

Infectious diseases is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. The world health organization (WHO) and centers for disease control (CDC) have expressed serious concern regarding the increase in the development of multidrug resistance bacteria. Therefore, the antibiotic resistance emergency is one of the most problematic issues in global public health. Antibiotic resistance is associated with the lack of new antimicrobials. This has prompted the researchers worldwide to develop novel and effective antimicrobial compounds and to develop novel delivery and targeting strategies (Singer *et al.* 2016).

Bacteria have developed many ways by which they become resistant to antimicrobials. Among those are enzyme inactivation, decreased cell permeability, target protection, target overproduction, altered target site/enzyme, increased efflux due to over-expression of efflux pumps. Other more complex phenotypes, such as biofilm formation and quorum sensing which are related resistance to antibiotics in bacteria (Davies and Davies, 2010).

Different strategies, such as using of nanostructured materials, are being developed to overcome bacteria resistance. Nanostructured materials can be used to convey antimicrobials, to assist in the delivery of novel drugs or eventually, possess antimicrobial activity by themselves. Additionally, using nanoparticles may avoid drug resistance mechanisms in bacteria and associated with their antimicrobial potential, inhibit biofilm formation. Other strategies, including use of plant-based antimicrobials incombination with nanoparticles to overcome toxicity issues, are also being investigated (Laxminarayan *et al.*, 2013). Coupling nanoparticles and natural-based antimicrobials to inhibit the activity of bacterial efflux pumps; formation of biofilms; interference of quorum sensing; and possibly plasmid curing,

are just some of these strategies to combat multidrug resistant bacteria. However, the use of nanoparticles still a challenge to the therapy and much more research is needed in order to overcome microbial resist to antibiotics. Use of generally recognized as safe (GRAS) microorganisms like *Lactobacillus* spp. and other Lactic Acid Bacteria (LAB) strains were used for the synthesis of silver (Ag) nanoparticles (NPs) (Korbekandi *et al*., 2012). The genus *Lactobacillus* are rod-shaped bacteria and they have many strains are commercially available as probiotics with health-promoting properties. It belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB). One of the new and prospect areas of LAB applications is nanobiotechnology field. Biological methods of nanoparticle synthesis using bacteria have offered an ecologically friendly and reliable alternative to chemical and physical methods Ag NPs are considered as a valuable alternative for ionic silver and have been widely used as an effective bactericidal agent against pathogenic bacteria, including antibiotic resistant strains (Narayanan and Sakthivel 2010).

The main objective of this study:

Biosynthesis of Ag nanoparticles by using local isolates of Lactic acid bacteria and determine the characters, properties and its antibacterial inhibitory effects against multidrug resistance pathogenic bacteria.

These can be established by:

1- Isolation of *Lactobacillus* spp. from the provincial fermented food.

2- Isolation and identification of pathogenic bacteria from different clinical samples in Baqubah Teaching Hospital and Al- Batoul Hospital.

3- Determine the sensitivity of isolated bacteria to classical antibiotics and determine the multidrug resistance antibiotics bacteria.

4- Biosynthesis of Silver nanoparticles (Ag/AgCl NPs) by the CFS (whey) of *Lactobacillus* spp.

5- Study the characteristics of (Ag/AgCl NPs) by using: UV-vis spectroscopy, Atomic force microscope (AFM), Scanning electron microscope (SEM), X-ray Diffraction (XRD) analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

6- Study the antibacterial activity of silver nanoparticles on clinical isolate (*in vitro*) and determination of minimum inhibition concentration (MIC) of Ag/AgCl nanoparticles against clinical isolated of pathogenic bacteria.

الخلاصة

خلال الفترة من تشرين الثاني 2019 إلى كانون الثاني 2020، تم جمع مائتي عينة سريرية (مسحة للجروح والحروق وعينات بول) من المرضى الراقدين في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول في مدينة بعقوبة. تم زراعة العينات على أوساط اكار الدم وماكونكي. وشخصت العزلات البكتيرية باستخدام واساط انتقائية وتفريقية. ثم أجريت اختبارات البايو كيميائية في تأكيد تشخـيص كل من العزلات البكتيرية. اعتمادا على نتائج التشخيصات البايو كيميائية ، الانواع البكتيرية ظهرت كما يلي:

Klebsiella pneumoniae, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and Staphylococcus aureus.

تم اختبار الحساسية لمضادات الميكروبات لجميع العزلات البكتيرية المختلفة نحو 29 عامل للميكروبات باستخدام طريقة الانتشار القرصي وأظهرت النتائج أن العديد من العزلات البكتيرية كانت متعددة المقاومة للمضادات الحياتية (MDR).

تكتسب طريقة التخليق الحيوي للجسيمات النانوية مجالًا مهمًا للغاية نظرًا لفوائدها الاقتصادية والصديقة للبيئة. في الدراسة الحالية، استخدم الراشح الخالي من الخلايا (الشرش) من *lactobacillus* spp. في تخليق الجزئيات النانوية. بكتيريا *lactobacillus* spp. تم عزلها من منتجات الالبان المحلية وتحديدها على انها *lactobacillus* spp. باستخدام وسط زراعة الإثراء الانتقائي De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar). التشخيص المظهري والمجهري والاختبارات البايو كيميائية التي أجريت لتأكيد التشخيص. استخدم الراشح الخالي من الخلايا (الشرش) في التخليق الحيوي للجزئيات النانوية الفضية.

تم توصيف جسيمات الفضة النانوية باستخدام تحليل حيود الأشعة السينية(XRD) الذي يؤكد أن الجسيمات النانوية عبارة عن أنواع مكعبة من الفضة وكلوريد الفضة . معادلة المجالات (البلورية) ، اظهرت اقوى ثلاث قمم، كان حجم الجسيمات المحسوب 17.1 و18.6 نانومتر للفضة و24.3 نانومتر لكلوريد الفضة.

استخدم مجهر القوة الذرية AFM في توصيف الحجم والتضاريس وتوزيع حجم الحبيبات للجسيمات النانوية المُصنَّعة حيوياًAg/AgCl NPs ،حيث كان معدل الحجم لجسيمات الفضة وكلوريد الفضة النانوية 50 نانوميتر. كشف التحليل الطيفي المرئي للأشعة فوق البنفسجية(UV-Vis) عن تكوين جزئيات الفضة النانوية. اظهر التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء(FTIR) مجموعات وظيفية مختلفة من الجسيمات الحيويةُ المسؤولة عن عملية التخفيض والسد. تم استخدام المجهر الإلكتروني (SEM) لتوصيف شكل وحجم الجسيمات النانوية.

فعالية جسيمات الفضة وكلوريد الفضة النانوية ضد الأنواع البكتيرية المتعددة المقاومة التي سبق اختيارها تم تحديدها *عن* طريق الانتشار بالحفر الاكار، لوحظ ان نمو البكتيريا قد تم تثبيط بتركيز 12,500 مايكروغرام/مللتر من جسيمات الفضة وكلوريد الفضة النانوية . كانت تراكيز الجسيمات النانوية (12,500 ; 25,000 ; 50,000 ; 100,000 ميكروغرام / مل) لها أقصى تأثير مثبط ضد بكتريا *S. aureus* (24 ، 28 ، 30 ، 32 ملم) على التوالي وأقل تأثير مثبط ضد بكتيريا *E. coli* (16 ، 21 ، 23 ، 27 ملم) على التوالي بينما تباينت التأثيرات المثبطة للبكتيريا الأخرى (*P. mirabilis* و *S. epidermidis* و *K. pneumoniae* و *P. aeruginosa*) بين البكتيريتين.

أخيرًا ، تم تحديدMIC للجسيمات النانوية Ag / AgCl بواسطة طريقة التخفيف الدقيق. أظهرت النتائج أن MIC لـ Ag / AgCl للأنواع البكتيرية *P. aeruginosa* *P. mirabilis* *S .aureus,S. epidermidis* كان 2500 مايكرو غرام /مللتر بينما MIC للأنواع البكتيرية *E. coli* و *K. pneumonia* *كان 5000* مايكرو غرام /مللتر.