مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (5) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المرضى البالغين المصابين بالتهاب الاذن الوسطى القيحي وتحييد مقاومتها للمضادات الحيوية وايجاد محتواها من G+C%

انتصار عبدالجبار شمخي[1] ، عبدالكريم فتاح عمر[2]

[1]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2]قسم علوم الحياة ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تم جمع 16 عزلة من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب الاذن الوسطى القيحي المزمن للاشخاص البالغين. شخصت هذه الجراثيم باجراء الاختبارات الكيموحيوية وباستخدام نظام API 20E التشخيصي لتأكيد الاختبارات.

اختبرات العزلات لتحديد مقاومتها للمضادات الحيوية الامبسلين، الاموكسلين، السيفوتاكسيم، التتراسايكلين، الرفامبسين، السبروفلاكسين، الاميكاسين، الكلورامفينكول ، الجنتمايسين والترايمثبريم وقد اظهرت مقاومة عالية لاغلب المضادات. استخدمت الحرارة عند درجة 47 م لازالة مقاومة العزلات للمضادات وكانت هذه الطريقة كفوءة في تحييد المقاومة فقد ظهرت نتائج عاليه للتحييد وبعض العزلات اصبحت حساسة.

تم استخلاص الـDNA الكروموسومي للعزلات وحساب محتواها من G+C% واظهرت النتائج بان النسبة المئوية لها اهمية مميزة باعتبارها صفة تشخيصية لتصنيف الكائنات المجهرية فقد كانت النسبة ضمن مدى (66.1- 67.3).

1- المقدمة

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المسببات المرضية الانتهازية (Opportunistic Pathogens) التي نادرا ماتسبب المرض في الأشخاص الأصحاء , ولكنها تشكل خطرا حقيقيا للمرضى الراقدين في المستشفيات , إذ تتمكن من أن تتواجد على أرضية ردهات المستشفيات وصالات العمليات، والأدوات الجراحية وغيرها ,(1).

وهي عصيات سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات متحركة بوساطة سوط واحد قطبي، هوائية لمعظمها القابلية على فرز صبغة البايوسيانين ذات اللون الاخضر والاخضر المزرق فضلاً عن تلون بعضها باللون البني المحمر، ومن الصفات المهمة الاخرى والمميزة لهذه البكتريا هي قابليتها على النمو بدرجة حرارة 40–41 مئوي وعدم قدرتها على النمو بدرجة حرارة 4 مئوي (2). وتعد هذه البكتريا واحدة من المسببات الرئيسية لالتهاب الاذن الوسطى القيحي المزمن حيث يعبر عن حالة المرضى الذين لهم غشاء طبلة مثقوب ناتج عن التهاب الأذن الوسطى الحادّ (Acute Otitis Media, AOM) مع وجود تدفق مستمر لمادّة مخاطية Mucoid material من ستة أسابيع إلى ثلاثة أشهر بالتهاب الأذن الوسطى القيحي المزمن (Chronic Suppurative Otitis Media, CSOM) وتحدث الاصابة نتيجة دخول الممرضات إلى الأذن الوسطى من منطقة الأنف البلعومي أو يحدث بدخول الممرضات مثل *Pseudomonas aeruginosa* الموجودة في الماء عن طريق الثقب الموجود في غشاء طبلة الأذن خلال السباحة والاستحمام.(3).

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* القدرة على مقاومة مدى واسع ومتنوع من المضادات الحيوية ,الشيء الذي جعلها من بين أخطر وأهم المسببات للأمراض التي تصيب الإنسان وكذلك فإن انتشار هذه البكتريا في مختلف مناطق الجسم , وتعرضها المستمر لمضادات الحياة أدى إلى نشوء سلالات تمتاز بصفة تعدد المقاومة للعقاقير (1).

ان قدرة بكتريا *P. aeruginosa* على احداث اصابات متعددة قد يكون نتيجة لقابليتها الكبيرة على انتاج مدى واسع من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية (داخل خلوية) والعوامل خارج الخلوية. فعلى سبيل المثال تمتلك هذه البكتريا عوامل ضراوة مرتبطة بالخلية مثل: الزغب (pili) ، والاسواط أما عوامل الضراوة خارج الخلوية فقد تضم السموم ذات الاوزان الجزيئية المنخفضة التي تفرزها البكتريا مثل: الفينازين (4،2). البلازميد هو عبارة عن حلقة تتكون من خيطين حلزونيين من الـ DNA البكتيري ويعد من العناصر الوراثية خارج الكروموسومية وعادة ما تحمل البلازميدات جينات مسؤولة عن عوامل الضراوة او المقاومة في البكتريا) (6،5).

من الصفات المهمة في الحامض النووي DNA والتي تم تمييزها واصبحت لها اهمية في التصنيف هي النسبة المئوية للكوانين والسايتوسين (G+C%) (7)

ركزت الدراسة على ما يأتي:

1- عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المرضى البالغين المصابين بالتهاب الاذن الوسطى القيحي

2- تحييد المحتوى البلازميدي للبكتريا

3- حساب قيمة G+C% في DNA البكتريا .

2- المواد وطرق العمل

تم الحصول على 14 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المرضى البالغين الوافدين الى مستشفى تكريت التعليمي في استشارية الانف والاذن والحنجرة للفترة من تشرين الثاني2012 ولغاية 31كانون الثاني 2013 ، وقد شخصت البكتريا بعد تنميتها على وسط اكار الدم الحاوي على 5% من دم الانسان

ووسط MacConkey المعقم بالمؤصدة بدرجة 121 مئوية ولمدة 15 دقيقة اعتمادا" على الصفات الشكلية والفحوصات الكيموحيوية .(8) كما استخدم نظام API 20E لاحتوائه على العديد من الفحوصات التأكيدية .(9)

2-1-اقراص المضادات الحيوية Antibiotic disks وتركيزها بالمايكروغرام: استخدمت اقراص المضادات Amikacin **30**، Amoxicillin **30**، Chloramphenicol **30**، Cefotaxime ، Ciprofloxacin **10**، Gentamicin **10** ، Tetracycline **30** ، Refambicin **10** ، Trimethoprim 10 و Ampicillin **10**

2-2 تحضير المحاليل الخزينة للمضادات الحيوية المستخدمة في تجربة التحييد

اتبعت طريقة (10) لتحضير تراكيز مختلفه من المضادات Tetracycline، Ampicillin، Trimethoprim، Amoxicillin و Amikacin وبتراكيز نهائية (15، 25 ، 100، 5 ، 30) على التوالي

2-2-1- وسط المضادات الحيوية

حضر هذا الوسط بإضافة المضاد الحيوي الى وسط اكار مولرهنتون المعقم والمبرد الى درجة حرارة 45- 50 وبالتراكيز النهائية (مايكروغرام/مل) المستخدمة.

2-3- تحييد البلازميدات

استخدام الحرارة كعامل محيد حيث أتبعت طريقة (11) إذ لقح 5 ملليتر من وسط المرق المغذي بمستعمرة جرثومية ثم حضن الوسط مدة 24 ساعة عند 37 Cº أخذ 0.1 ملليتر من المزرعة الجرثومية وأضيف الى 5 ملليتر من وسط المرق المغذي وحضن الوسط عند درجة 47Cº°م مدة 24 ساعة فضلا عن أخذ 0.1 ملليتر من المزرعة الجرثومية نفسها وأضافته الى 5 ملليتر من وسط المرق المغذي وتحضينه في درجة حرارة 37Cº ولمدة 24 ساعة لاستخدامه كنموذج سيطرة. حضرت تخافيف عشرية للمزرعتين الجرثوميتين ونشر 0.1 ملليتر من التخافيف الثلاثة الأخيرة على أطباق الأكار المغذي, حضنت الأطباق في درجة حرارة37Cº ولمدة 24 ساعة. ثم نقلت 100 مستعمرة جرثومية من المستعمرات التي تم معاملتها بالحرارة على أوساط الأكار المغذي التي تمثل ال Master plates وحضنت في درجة حرارة 37Cº ولمدة 24 ساعة. ثم نقلت هذه المستعمرات الى وسط حيوي مناسب, وبعد تحضينه في درجة حرارة 37 Cº ولمدة 24 ساعة تم التحري عن المستعمرات الجرثومية المحيدة التي فشلت في النمو على وسط المضاد الحيوي المستخدم.

2-4 – حساب G+C% للعزلات البكتيرية

2-4-1- استخلاص DNA الكروموسومي

تم عزل (DNA) بأستخدام الطقم الجاهز (Kit) لاستخلاص (DNA) من العينات , حسب Wizard genomic DNA PURIFICATION. Bacterial DNA Kit المنتج من شركة Promega وباستخدام المحاليل الخاصة بالكت .

2-4-1- **حساب تركيز الدنا Estimation of DNA concentration**

يتم حساب تركيز الدنا DNA من قياس الكثافة الضوئية عند 260 nm باستخدام جهاز UV-Visible Spectrophotometer و TE buffer كمحلول سيطرة وحسب المعادلة الاتية :

Unknown µg/ml = 50 µg/ml × Measured A260 nm × Dilution factor (12)

2-4-3- **تحديد نقاوة الدنا DNA Determination of DNA purity**

نقاوة الدنا DNA تقاس من خلال تقسيم قيم الامتصاصية للعينة المخففة عند 260 nm على قيم الامتصاصية عند 280 nm . (13)

2-4-4-قياس درجة الذوبان : Determination of T_m

يتم تخفيف ال **DNA** بالماء المقطر وبدقه وباستخدام حمام مائي قابل للتغيير وبعدة درجات حرارية قيست مقابلها الامتصاصية باستخدام **UV Spectrophotometer** حتى نصل الى درجة الذوبان **(T_m)** .(14)

النسبة المئوية G+C% تقاس من خلال المعادلة التالية:

$$\%G+C = 2.44 (T_m - 69.4)$$ (15).

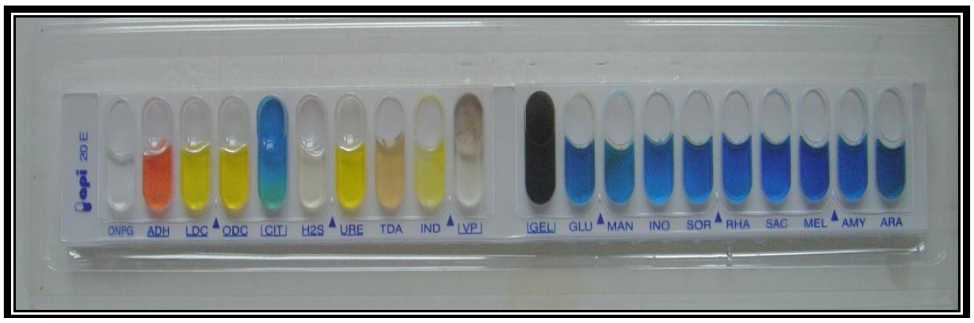
3-النتائج والمناقشة:

تم الحصول على عزلات جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* من حالات التهاب الاذن الوسطى القيحي المزمن وشخصت هذه العزلات مختبريا" بواسطة الاختبارات الكيموحيوية وباستخدام اختبار الـ API 20E التأكيدي حسب طريقة **(9)** وجدول (2) يوضح الاختبارات الكيموحيوية وشكل (1) يبين تشخيص البكتريا بواسطة API 20E.

جدول : (1) الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Ps.aeruginosa*

صبغة كرام	فحص الاوكسيديز	فحص الكاتليز	انتاج الاندول	اختبار احمر المثيل	اختبار الفوكس بروسكور	استهلاك السترات	تحليل اليوريا	النمو على وسط TIA	قابلية الحركة	اختزال النترات	تخمر سكر الكلوكوز	سكروز	مالتوز	لاكتوز
-	+	+	-	-	-	+	-	ق/ ق / H2S / +	+	+	+	-	-	-

(A) Control



(B) *Pseudomonas aeruginosa*

شكل (1) تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بواسطة API20E

مقاومة المضادات الحيوية

اجـري فحـص المقاومـة لعـزلات جرثومـة *Pseudomonas aeruginosa* لعشرة من المضادات الحيوية وكانت النتائج كما مبينة في جدول (2) فقد ابدت البكتريا مقاومة عالية لاغلب المضادات الحيوية المستخدمة.

جدول 2: أعداد ونسب العزلات الجرثومية المقاومة للمضادات الحياتية

عدد عزلات	اعداد ونسب العزلات المقاومة للمضادات الحيوية									
Psedomonas aeruginosa	*AMC*	*AM*	*CTX*	*C*	*CIP*	*AK*	*CN*	*RIF*	*TE*	*TMP*
16	**13** **81.3%**	**13** **81.3**	**12** **75%**	**14** **87.5**	**4** **25%**	**10** **71.4%**	**9** **56.2**	**8** **57.1**	**12** **75%**	**14** **87.5**

AK, Amikacin; AMC, Amoxicillin ; C, Chloramphenicol; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; CN, Gentamicin; TE, Tetracycline; TMP, Trimethoprim , RIF, Refambicin AM: Ambicillin

ان مقاومـة البكتريـا للمضـادات قـد تكـو طبيعيـة او مكتسـبة، تعـزى المقاومة الطبيعية الى افتقار البكتريا للموقع الهدف Target site الذي يعمـل عليـه المضـاد الحيـوي امـا المقاومـة المكتسـبة فتحصـل نتيجـة حـدوث تغيـرات وراثيـة تكسـب البكتريـا صـفة المقاومـة وهـذه قـد تكـون مقاومة الكروموسومية وتكون بحصول اية طفرة او تغيير في موقع ما من الكروموسوم (16) او خارج كروموسومية والتي تكون بسبب عوامل وراثية خارج الكروموسوم موجودة في البكتريا والتي تسمى البلازميدات التي هي عناصر وراثية خارج كروموسومية مكونه من DNA دائري ثنائي الخيط لها القدرة على التضاعف والتوارث بشكل مستقل وثابت عن DNA الكروموسوم (17).

تحييد البلازميدات

لقد تم دراسة القابلية على تحييد البلازميدات في العزلات الجرثومية المدروسة باستخدام الحرارة العاليه وبدرجة 47 م استخدام الحرارة كعامل محيد.

جدول (3): ازالة المقاومة للمضادات الحيوية في عزلات من جرثومة *Ps.aeruginosa* بواسطة تنميتها عند درجة حرارة C°47

العزلات البكتيرية	درجة الحرارة	النسبة المئوية لفقدان المستعمرات البكتيرية مقاومة المضادات الحيوية				
	47	***AK***	***AMC***	***AM***	***TE***	***TMP***
Ps.aeruginosa		***S***	***S***	***S***	***%89***	***%S***
Ps.aeruginosa		***%80***	***S***	***S***	***%77***	***%72***
Ps.aeruginosa		***S***	***%83***	***%78***	***S***	***%88***
Ps.aeruginosa		***%71***	***%88***	***S***	***%87***	***%76***

, AM: Amoxcilline TE: Tetracyclin , TMP Trimethoprim: Amoxicllin, ,AK: Amikacin, AMC:

من الجدول نلاحظ ظهور تحييد واضح للعزلات الجرثومية لاغلب المضادات الحيوية المستخدمة في عملية التحييد فقد تم الحصول على نسبة عاليه لتحييد المقاومة للمضادات AK ، AMC ، AM ، TE و TMP وبعضها فقدت المقاومة كليا"، ان حدوث التحييد لمقاومة المضادات الحيوية باستخدام درجات الحرارة العاليه يعتبر من اكفأ الطرق المستخدمة في عمليات التحييد وممكن ان يكون السبب في هذا الى ان الانزيمات التي تشترك في عملية تضاعف DNA تتاثر بدرجات الحرارة العاليه (18) وتتوافق النتائج التي حصلنا عليها مع نتائج الباحث (19) الذي حصل على افضل تحييد بدرجات الحرارة العالية وكذلك جاءت نتائجنا متفقة مع نتائج الباحث (13).

– تحديد النسبة المئوية G+C % في DNA البكتريا

بعد استخلاص DNA الكروموسومي من العزلات الجرثومية تم اختبار نقاوته وتركيزه لان عند التعامل مع الحامض النووي من المهم جدا" معرفة تركيزه ويكون مدى التركيز بين 5–20 µg/ml لكل عينة بحيث تكون مناسبة لاستخدامها لقياس درجة الذوبان melting temperature.

اما حساب نقاوة الحامض النووي DNA تقاس بواسطة النسبة A_{260}/A_{280} (قياس الامتصاصية عند 260nm مقسمة على الامتصاصية عند 280nm، ونقاوة DNA المناسبة تكون بين 1.7– 2.0 لكن القراءة 1.6 لا تجعل الDNA غير مناسب لاي تطبيق لكن نسبة اقل تشير الى وجود تلوث .(20).

جدول (4): نسب G+C% التي تم تقديرها من من DNA البكتريا

ت	العزلات البكتيرية	A 260	A 280	نقاوة DNA	تركيز DNA	درجة الذوبان Tm	G+C%
1	*Ps.aeruginosa*	0.214	0.138	1.55	10.7	95	62.5
2	*Ps.aeruginosa*	0.222	0.138	1.6	11.1	97	67.3
3	*Ps.aeruginosa*	0.591	0.386	*	*	-	-
4	*Ps.aeruginosa*	0.241	0.131	1.83	12.05	97	67.3
5	*Ps.aeruginosa*	0.220	0.140	1.56	11	97	67.3
6	*Ps.aeruginosa*	0.588	0.139	*	*	*	*
7	*Ps.aeruginosa*	0.223	0.139	1.6	11.15	97	67.3
8	*Ps.aeruginosa*	0.225	0.139	1.6	11.25	96.5	66.1
9	*Ps.aeruginosa*	0.221	0.136	1.62	11.05	95	62.5
10	*Ps.aeruginosa*	0.227	0.137	1.65	11.35	97	67.3
11	*Ps.aeruginosa*	0.231	0.140	1.65	11.55	97	67.3
12	*Ps.aeruginosa*	0.219	0.141	1.55	10.95	97	67.3
13	*Ps.aeruginosa*	0.499	0.341	*	*	*	*
14	*Ps.aeruginosa*	0.239	0.140	1.70	11.95	96.5	66.1
15	*Ps.aeruginosa*	0.236	0.138	1.71	11.8	97	67.3
16	*Ps.aeruginosa*	0.234	0.139	1.68	11.7	97	67.3

* تعني بان العينة ممكن ان تكون ملوثه كون قيمة التركيز او النقاوة ليست ضمن المدى المحدد .

الصفة الفريدة والمميزة التي تم تمييزها من الحامض النووي DNA هو امتلاكه لخاصية تصنيفية مهمة تتمثل بالنسبة المئوية للكوانين والسايتوسين (G+C %).(7) في دراستنا الحاليه هذه القيم النسبة تم تحديدها باستخدام طريقة التفكك الحراري من خلال عملية تسخين DNA بعدة مراحل وقياس الامتصاصية في جهاز ultraviolet spectrophotometer ، درجة الحرارة التي نحصل عليها من قياس الامتصاصية مقابل كل درجة حرارية تسمى درجة الذوبان (melting temperature) او T_m هذه الدرجة لها ارتباط وثيق بمحتوى G+C % للحامض النووي DNA. (22) وهذه القيم G+C % تم الحصول عليها لكل عزله قورنت مع جداول في Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (23) فقد كانت نسبتها 67% اي ان نتائجنا كانت مطابقة لها.

العزلات التي تم تأشيرها بـ(*) لم يتم الحصول على T_m لها والتي لها نقاوة واطئة جدا" وايضا" اظهرت قراءة غير واضحة في جهاز الامتصاصية الفائقة ultraviolet spectrophotometer عند 260 nm لهذا كان من الصعب الحصول على T_m صحيحه وهذا يعود الى وجود تلوث حصل خلال الامتصاصية عند 260 nm او خلل حدث خلال عملية استخلاص DNA.

المصادر

1- Greenwood, D.; Finch, R.; Davey, P. and Wilcox, M. (2007). Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.
2- Choi, J. Y.; C. D. Sifri; B. C. Goumnerow; L. G. Rahme; F. M. Ausubal and S. B. Colderwood. (2002). Identification of Virulence Genes in a pathogenic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational Difference Analysis. J. Microbiology. 184 : 952 – 961.
3- AL-Tallah, M.S. (2000). Microbiology of chronic suppurative otitis media withcholesteatoma. Saudia Medical. J. vol, 21(10);p924-927. 599 -606.

4- Wick, M. J., D. W. Frank, D. G. Storey, and B. H. Iglewski. 1990. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Annu. Rev. Microbiol. 44:335–363.
5- Kaye, K.S.; Cosgrove, S.; Marris, A.; Eliopoules, G.M. and carmeli, y. (2000). Risk factors for emergence of resistance to broad spectrum cephalosporins among *Enterobacter SPP*. J. antimicrob. agent. Chemother., 45(9): 2628-2630.
6- Levy, S. B. (2001). The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. J. Antimicrob. Agents Chemother., 49 (1): 25-30.
7- Johnson, J.L. (1981) Genetic characterization, p. 450472. In: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips (ed.), Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8- Mahon, C.R.; Lehman, D.C.; Manuselis, G.(2007). Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed., Saunders Elsevier, USA.
9- Atlas, R.M. (1995). Principle of microbiology. 1sted.,Mosby-Year book, Inc., St. Louis, U.S.A.
10- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook , J. and Molecular, C. (1982). Alaboratory manual cold spring Harbor Laboratory , New York.
11- Baldwin, J.N. and Strickl and, R.H. (1969). Some properties of the Beta-lactamase genes in Staphylococcus epidermidis. J. Appl. Microbiol., 18: 628-630.
12- Cesarone, C.F.; Bolognesi, C.; Santi, L. (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. NCBI Anal Biochem 100(1):188-97.
13- Radi, R. O; Rahman, F.H. (2010). Study the effects of ethidium bromide, SDS. and elevated temperature on stability of multiple antibiotic resistances plasmid of *Pseudomonas aerugenosa*. Iraq .J .Biotech . 9 (4) :797-811.
14- Garvie, E.I. (1974) Lactic dehydrogenases of strains of the Genus *Leuconostoc*. J Gen Microbiol 58:85-94.
15- de Ley, J. (1969) Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J Bacteriol 101:738-754.
16- Tenover, F. C. and McGowan, J.E.(1996). Reasons for the emergence of antibiotics resistance Am. G. Med. Sci. , 311-9.
17- Mazal. D. and Davies, J. (1999) Intibiotic resistance in microbes. Cell. Mol. Life. 56:742.
18- Kheder, A.K. (2002). Studies on antibiotic resistance by plasmid of *Pseudomonas aerugenosa* . Ph.D. thesis. College of education. University of Salahaddin, Iraq.
19- Ahmed, A. D. (2005) Curing of some Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*Isolates by the Action of Sodium Dodecyl Sulphateand Elevated Temperature, Raf. Jour. Sci., Vol.16, No.7 Biology, Special Issue, pp.34-39,
20- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989) Molecular and laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratories New York.
21- Lozano-A, L.C.; Bautista, M.A.; Dussan-G, J. and Vives-Flórez1, M.J. (2008) DNA Extraction from Heavy oil contaminated Microcosms and Rpob gene PCR Amplification. Actual Biol 30 (88): 7-14.
22- Marmur, J., and Doty, P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J MolBiol 5:109-118.
23- Holt, J.C.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stahley, J.T. and William, S.T. (1994). Bergy's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed., USA.

Isolation and Identification Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* from adelt patients infected of otitis media and Curing of some Antibiotic Resistance and found content of G+C%

Intesar abduljabar shamkhe[1] , Abdul Kareem Fattah Omar[2]
[1] *Biology department , College of Science , Tikrit University, Tikrit , Iraq*
[2] *Biology department , College of Education for women , Tikrit University, Tikrit , Iraq*

Abstract
Sixteen isolate of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from patients infected of otitis mediafor adelt people and diagnosed by biochemical teset and API20E these isolate tested for their resistance to Ampicillin, Amoxillin, Chloramphenicol, Trimethoprime, Tetracyclin, Cephotaxim, Amikacin, Gentamycin, Rifampicin and ciproflaxin. For the removal of the resistance against the antibiotics in our isolates plasmid curing experiment was performed by using physical agent (elevated temperature). The results indicated that high temperature (47°C) was efficient to cure all the plasmids, and some isolates became sensitive to antibiotics. The extraction of chromosomal DNA was done to estimate the mol% of G+C of DNA content to all isolates the results the results showed that it was a taxonomic importance and it was at range (66.1- 67.3%).