The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul / College of Science Department of Biology

Morphological and Molecular Investigation of some Bacteria Isolated from Infected Root Canals and their Susceptibility to Chitosan nanoparticles and Titanium dioxide nanoparticles

Eman Abdul-Aziz Mustafa Abdul-Kareem

Ph.D. Dissertation

Biology / Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Alrawi

2025A.D. **1446 A.H.**

Abstract

Root canal infections are polymicrobial and exhibiting a high diversity of bacteria, so knowing the composition of bacterial community in infected root canals is crucial for improving treatment plans that not only control infections by getting rid of pathogens but also prevent reinfections, 140 samples were taken from infected root canals of patients attending the Conservative Treatment Department, Teaching Hospital of the College of Dentistry at Mosul University, Al-Noor – Specialist Dental Center, the Specialist Dental Center/left side, as well as a few private clinics, the patients included 81 females and 59 males, ages ranging from 13 to 65 years on average. Bacterial isolates were traditionally and molecularly diagnosed depending on the 16Sr RNA gene. The most predominant bacteria were facultative and obligate anaerobes, including *Streptococcus, Enterococcus, Staphylococcus, Neisseria, Veillonella, Actinomyces* and *Prevotella*. A novel approach, metagenomic next-generation sequencing of 16S rRNA amplicons was used for the first time locally to evaluate the infected root canals microbiota composition and to compare bacterial communities between primary and secondary root canal infections. The microbial variation of primary endodontic infection sample was significantly lower than that of the secondary the endodontic infection sample. *Porphyromonas endodontalis* (17.3%) was the most predominant species in primary infected root canal followed by *Bacteroides sp.* (16.8%), *Oribacterium sp.*33056 (15.8%), *Rikenellaceae;g-NA;s-sp.*14537 (14.0%) and *Pyramidobacter piscolens* (11.6%) while the predominant microbiota from the secondery root canal sample were *Paenibacillus;s*-NA (39.0%), *Tannerella forsythia* (6.1%), *Porphyromonas endodontalis* (5.9%), *Brevibacterium casei*(3.4%), Peptostreptococcus anaerobius-stomatis (2.8%). Additionally, as-yet uncultured bacteria that are difficult to cultivate or so far impossible to cultivate have been detected for the first time locally in root canal samples for example: *Olsenella, Diaster, Solobacterium, Treponema, Selenomonas* and *Megasphaera* in addition, many phylotypes which regarded to the family Synergistetes and Lachnospiraceae. Forty five isolated strains were recorded in global, European, and Japanese gene banks. Three strains: *Enterococcus faecalis* MuAm (JAUZTE000000000.1), *Actinomyces oris* EmAm22 (PP939687.1) and

Prevotella buccae EmAm54 (PQ482425.1) were selected for the study. A phylogenetic tree was created using the Mega 11 program, utilizing the Maximum Likelihood method to find the similarity ratio between each of these selected strains with the most closely related strains. The next part of our study included the first local whole-genome sequence analysis of the most predominant bacteria in infected root canals *E.faecalis* MuAm by using Illumina Novaseq technology. The complete genome features were described using the QUAST program and the RAST server. This analysis includes the genetic map, genetic relatedness and diseases –causing genes in this locally strain. Whole genome included 183 contigs with lengths ranging from 215-125.416, this strain's total genome sequence length was 2,635,835 bp, with low GC content of 37.73%. A total of 2,498 protein- encoding sequences, 59 ribosomal RNA genes and 52 transfer RNA genes, the whole genome contained *tetM, efrA, dfrE, efrA and vanT* antibiotic resistance genes, several virulence genes including *SrtA, ace, cCF10, EIrA, cOB1, cad, camE, ebpA, ebpC, tpx, espfs, efaAfs* and *gelE* neither plasmids nor pathogenicity islands were detected. Molecular detection of Enterococcal Surface protein (*esp)* gene was performed for all *E.faecalis* isolates by using PCR assay. 87% of *E. faecalis* isolates were carried *esp* gene. The ability of the selected strains to form biofilms was tested by using Congo red agar and microtitreplate methods. Chitosan nanoparticles solutions(Cs-NPs) and Titanium dioxide nanoparticles solutions(TiO2-NPs) were investigated as antimicrobial and anti-biofilm materials against the previously selected strains, the MICs values have been determined and both nanoparticle solutions have anti-biofilm activities against the selected strains. The last part of this study involved an application of Nanotechnology in the endodontic field of dentistry by in vitro study as a root canal irrigation. After being infected with *E. faecalis* EmAm strain, 30 human lower premolars were treated with nanoparticles solutions, Cs-NPs (2.5 mg\ml), TiO2-NPs (650µg\ml) and routine endodontic irrigations CHX (2%) and NaOCl (5.25%), colony forming units were utilized to compare between the antimicrobial effect of traditional and new medications, both tested nanoparticles' treatments were successful with superiority of the Cs-NPs .

الخلاصة

ان التهابات قنوات جذور الاسنان تكون متعددة الميكروبات و تظهر تنوعًا كبيرًا من البكتيريا، لذا فان معرفة تكوين المجتمع البكتيري في قنوات الجذور المصابة امر بالغ الاهمية لتحسين خطط العلاج التي لا تتحكم في هذه الالتهابات عن طريق التخلص من مسببات الأمراض فقط ولكن أيضًا تمنع عودتها. تم أخذ 140 عينة من قنوات جذور الاسنان المصابة من المرضى المرتادين الى قسم العلاج التحفظي والمستشفى التعليمي بكلية طب الأسنان في جامعة الموصل، ومركز طب الأسنان النور التخصصي، ومركز طب الأسنان التخصصي / الجانب الايسر، بالإضافة إلى عدد من العيادات الخاصة، وتضمن المرضى 81 أنثى و 59 ذكرًا تتراوح أعمارهم بين 13 إلى 65 عامًا في المتوسط. تم تشخيص العزلات البكتيرية تقليديا و جزيئيًا اعتمادًا على جين 16S rRNA. كانت البكتيريا الأكثر سيادة و التي تم تشخيصها في قنوات الجذر هي البكتيريا اللاهوائية الاختيارية والإلزامية متضمنة *Streptococcus* تلاها جنس *Enterococcus* ثم *Staphylococcus, ,Veillonella, Neisseria, .Actinomyces* و *Prevotella*.

تم استخدام نهج جديد، وهو التسلسل الجيني للجيل القادم لامبليكونات جين *16SrRNA* لاول مرة محليا لتقييم التركيب الميكروبي لقنوات الجذور المصابة ومقارنة المجتمعات البكتيرية بين الاصابات الاولية والثانوية لقنوات الجذور و كان التباين الميكروبي في قناة الجذر المصابة الاولية اقل بشكل كبير من التباين الميكروبي في قناة الجذر المصابة الثانوية حيث كانت (*Porphyromonas endodontalis*) 17.3٪ هي الانواع الاكثر وفرة في قناة الجذر المصابة الاولية تلاها الجنس (*Bacteroides sp.*) 16.8 % ثم الجنس 15.8% (*Oribacterium sp.*) ثم 14.0% (*Rikenellaceae sp.*) و (*Pyramidobacter piscolens*) 11.6% في حين ان البكتريا السائدة في العينة الثانية والتي اخذت من التهاب لب السن الثانوي كانت (*Paenibacillus*; *sp.*) 39% تلاها النوع 6.1% (*Tannerella forsythia*) ثم النوع (*Porphyromonas endodontalis*) 5.9% و (*Brevibacterium casei*) 3.4% و (*ptostreptococcus anaerobius-stomatis*) 2.8% وللمرة الاولى محليا تم الكشف عن البكتريا غير القابلة للزراعة لحد الان اما لصعوبة زراعتها او استحالة زراعتها متواجدة في قنوات الجذور مثل *Olsenella*، *Diaster*، *Solobacterium* و *Megasphaera* بالاضافة الى العديد من الانماط الجينية التي تنتمي الى عائلة *Synergistetes* و *Lachnospiraceae*.

تم تسجيل خمسة واربعون سلالة من أنواع مختلفة من البكتيريا المعزولة من بيئات قنوات الجذور المصابة في بنوك الجينات العالمية والأوروبية واليابانية. وتم اختيار ثلاثة من السلالات البكتيرية التي تم تسجيلها تحت الأسماء التالية: *Enterococcus faecalis* MuAm (JAUZTE000000000.1) و

Prevotella buccae EmAm 54 و*Actinomyces oris* EmAm22 (PP939687.1) (PQ482425.1) لغرض الدراسة وتم إنشاء شجرة تطورية لكل سلالة باستخدام برنامج Mega 11، وباستخدام طريقة أقصى احتمالية لإيجاد نسبة التشابه بين هذه السلالات المختارة والسلالات الاكثر ارتباطا بها.

تضمن المحور التالي من الدراسة تحليل تسلسل الجينوم الكامل للبكتيريا الاكثر سيادة في قنوات الجذر المصابةMuAm *Enterococcus faecalis* لاول مرة محليا باستخدام تقنية Illumina Novaseq. وتم وصف سمات الجينوم الكاملة باستخدام برنامج QUAST وخادم RAST. حيث تضمن التحليل الخريطة الوراثية والقرابة الوراثية والجينات المسببة للامراض في هذه السلالة المحلية.احتوى الجينوم الكامل لسلالة MuAm *E.faecalis* على 183 تسلسلات متصلة باطوال تراوحت بين215–125.416 زوجا قاعديا كما اشارت نتائج تحليلنا للجينوم الكامل لهذه السلالة بان طول التسلسل الجينومي الكلي 2،635،835 زوجًا قاعديًا، مع محتوى GC منخفض بنسبة 37.73٪. و كان عدد التسلسلات المشفرة للبروتين 2498 فضلا عن59 جين*RNA* ريبوسومي و52 *tRNA* جين ناقل، احتوى الجينوم الكامل ايضا على جينات مقاومة المضادات الحيوية *tetM* و*efrA* و*dfrE* و*efrA* و*vanT*، والعديد من جينات الضراوة بما في ذلك *SrtA* و*ace* و*cCf10* و*EIrA* و*cOB1* و*cad* و*camE* و*ebpA* و*ebpC* و*tpx* و*espfs* و*efaAfs* وgelE، ولم يتم الكشف عن البلازميدات أو الجزر المسببة للأمراض.

تم إجراء الكشف الجزيئي عن جين *esp* لجميع عزلات *E.faecalis* باستخدام اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل، وكانت 87% *من العزلات* تحمل هذا الجين. تم اختبار قدرة السلالات المنتخبة على تكوين الاغشية الحيوية باستخدام طرقCongo red agar و microtitreplate من ثم تم التحقق من قدرة محاليل الجسيمات النانوية الكيتوسان وثاني اوكسيد التيتانيوم كمواد مضادة للبكتريا ومواد مضادة للأغشية الحيوية ضد السلالات المنتخبة سابقًا و تم تحديد قيم التراكيز المثبطة الادنى حيث اظهر كلا النوعين من المحاليل النانوية نشاطا جيدا مضادا للاغشية الحيوية . شمل المحور الأخير من هذه الدراسة تطبيقات علم النانو في مجال طب الاسنان لري قناة الجذر داخل المختبر. حيث تم معاملة ثلاثين ضرسا سفليا بشريا باستخدام محاليل الجسيمات النانويةCs-NPs (2.5 mg\ml), TiO2-NPs (650µg\ml)ومحاليل الري التقليدية CHX (2%) (NaOCl (5.25% بعد اصابتها بالسلالة البكتيرية EmAm *E.faecalis* و تم استخدام طريقة CFU\ml للمقارنة بين التأثير المضاد للميكروبات للأدوية التقليدية والجديدة وكان كلا علاجي الجسيمات النانوية المختبرة ناجحين مع تفوق نتائج محاليل الكيتوسان النانوية Cs-NPs .

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

التحري المظهري والجزيئي عن بعض انواع البكتيريا المعزولة من قنوات الجذور المصابة ومدى حساسيتها لجسيمات الكيتوزان النانوية وجسيمات ثاني أكسيد التيتانيوم النانوية

ايمان عبدالعزيز مصطفى عبدالكريم

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ الدكتورة

اميرة محمود محمد الراوي

1446هـ **2025م**