جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

التوصيفُ الجزيئيُّ لبكتريا *Bacillus subtilis* المعزولةِ من التربةِ ودراسةُ تأثيرها المضادِ للبكتريا المرضية

سارة صالح سليمان الربيعي

رسالة ماجستير

علوم حياة

بإِشراف

الاستاذ المساعد

الدكتورة نجوى إِبراهيم خليل البرهاوي

١٤٤٣هـ ٢٠٢٢م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية جمع 25 عينة من الترب المحيطية بجذور النباتات في مدينة الموصل (حاوي يارمجة وحي الطيران في الجانب الأيمن من المدينة، وحي الزهور في الجانب الايسر من المدينة) للفترة من 1-11الى 25-12/ 2020.

عزلت منها 10 عزلات وشخصت مظهرياً ومجهرياً فضلاً عن الاختبارات البايوكيميائية على أنها *Bacillus subtilis*، واختير منها ثلاثة عزلات اطلق عليها Sar3, Sar2, Sar1 وأُجري لها اختبار حساسية لعشرة أنواع من المضادات الحيوية وأظهرت تأثيرًا متباينًا عليها، إذ كانت مقاومة لمضادين حيويين هما: Amoxicillin, Cefixime وحساسة لثمانية مضادات حيوية أُخرى وهي: Bacitracin, Ampicillin, Penicillin, Streptomycin, Gentamycin, Amikacin, Tetracyclin, Azithromycin.

أُجري التشخيص الجزيئي باستخدام عملية الترحيل الكهربائيElectrophoresis لعينات DNA المستخلصة من العزلات الثلاثة المنتخبة وعينة الـ DNA المستخلصة من البكتيريا القياسية *Bacillus subtilis*السلالة البرية BB1، وظهرت ثلاثة حزم من الـ DNA الجينومي ذات احجام متساوية وكبيرة وهي (1550، 1550، 1445 bp) كونها قطعت مسافات قصيرة وقريبة من حفر هلام الاكاروزوكانت مساوية تقريبا لحجم الـ DNA الجينومي للسلالة البرية *B. subtilis* BB1 ، مما يؤكد تشخيص العزلات المحلية الثلاثة (Sar3،Sar2, Sar1) على مستوى الجنس والنوع انها بكتيريا *B. subtilis*.

كما نتج عن تفاعل البلمرة التضاعفي المتخصص Specific Polymerase Chain Reaction (PCR) وبالاعتماد على الجين 16S rRNAالخاص ببكتيريا *B. subtilis* ، وجود حزمة واحدة مضخمة لكل عزلة من موقع محدد للـ DNA الجينومي المستخلص من العزلات الثلاثة من البكتريا قيد الدراسة وذلك نتيجةً للتفاعل التضاعفي والمتخصص للبادئ 16S rRNA الخاص ببكتيريا *B.subtilis* مع عينات DNA التي ظهرت باحجام كبيرة ومتساوية وقدر حجمها الكلي بـ 1550، 1550 و 1445قاعدة نتروجينية على التوالي ، ومقاربة في حجمها مع حجم حزمة العزلة القياسية *B.subtilis* السلالة BB1 1522قاعدة نتروجينية، بدلالة قياسها مع الدليل الحجمي DNA Ladder.

عند استخدام تقانة تتابع الحمض النووي DNA sequencing لتحديد تسلسل القواعد النتروجينية في قطع DNA النقية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص لبكتيريا *B.subtilis* والخاصة بالجين 16S rRNA، اظهرت نتائج التحليل باستخدام برنامج DNA BLAST وجود تشابه مابين العزلة القياسية البرية *B.subtilis* strain BB1 المسجلة في بنك الجينات

والعزلات المحلية الثلاثة Sar3،Sar2,Sar1 وبنسبة 98.19 ، 98.13 و 94.61% على التوالي، لذلك ظهرت العزلتين Sar2 و Sar1 في اقصى الجزء العلوي والسفلي من الشجرة التطورية وبينهما وقعت العزلة الثالثة Sar3.

كما تم اختبار التأثير التضادي للعزلات البكترية قيد الدراسة بطريقة الانتشار بأَقراص الاكار Agar Diffusion method وأَظهرت النتائج عدم حدوث أي تأثير تثبيطي لهذه البكتريا ضد الأَنواع البكتيرية المرضية الخمسة *Stphylococcus aureus*، *Stphylococcus haemolyticus*، *Eschericha coli, Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa*، بينما كان لرواشح المزارع البكتيرية الثلاثة المخففة نصفياً 200، 100، 50 ملغم /سم^3 وغير المخففة، بطريقة الانتشار في الحفر Agar Well Diffusion method فعالية تثبيطية متفاوتة تجاه نمو البكتريا المرضية بأَنواعها الخمسة واكثر تاثيرا على البكتيريا الموجبة لصبغة كرام قياسا بتاثيره الاقل على البكتيرياالسالبة لصبغة كرام.

من خلال الكشف بجهاز GC-MSعن مواد الأيض الثانوي لراشح بكتريا *Bacillus subtilis* (Sar1) الَّتي تم اختيارها لكونها مطابقة وبنسبة 98.19% مع البكتريا البرية *Bacillus subtilis* الواردة في بنك الجينات القياسية ، تبين انها مكونة من 33 مادة كميائية حسب عدد القمم الناتجة بعد حقن الراشح في جهاز GC، وعندما أُدخلت هذه المعلومات في جهاز MS تم تشخيصها باسمائها مع حساب الوزن الجزيئي لها وكمية ما تشغله من مساحة كنسبة مئوية ضمن الراشح المستخدم قيد الدراسة.

Abstract

The current study included 25 samples of the soils surrounding to plant roots in the city of Mosul (Hawi Yarmoja and Al-Tayaran neighborhood on the right side of the city, and Al-Zohour neighborhood on the left side of the city from 1-11 to 25-12-2020.

Ten isolates were isolated and identified morphologically and microscopically as well as biochemically as *Bacillus subtilis*.The sensitivity test of the three selected isolates named Sar1, Sar2 and Sar3 was conducted on ten types of antibiotics and it showed a different effect on them, as they were resistant to two antibiotics (Amoxicillin, Cefixime), and sensitive to eight other antibiotics, which are (Bacitracin, Ampicillin, Penicillin, Streptomycin, Gentamycin, Amikacin, Tetracyclin and Azithromycin).

Molecular diagnosis was carried out using electrophoresis of DNA samples extracted from the three selected isolates and DNA sample extracted from wild *B. subtilis* strain BB1. Three bundles of genomic DNA of equal and large sizes appeared, as they traveled short and close distances from the wells of the agarose gel and were approximately equal to the size of the genomic DNA bundles of the wild strain Bacillus subtilis BB1, confirming the diagnosis of the three local isolates (Sar1, Sar2 and Sar3) at the genus and species level that they are *B. subtilis* bacteria.

The Specific Polymerase Chain Reaction (PCR), based on the 16S rRNA gene of *Bacillus subtilis*, resulted in the presence of one amplified band for each isolate from a specific site of the genomic DNA extracted from the three isolates of the bacteria understudy as a result of the replication and specific reaction of the 16S rRNA primer which specific for *B. subtilis* with DNA samples that appeared in large and

equal sizes and its total size was estimated at 1550, 1550 and 1445 nitrogen bases, respectively, and its size was close to the size 1522 nitrogen base of the standard isolate *B. subtilis* strain BB1, as measured by the DNA Ladder.

When using DNA sequencing technology to determine the sequence of nitrogenous bases in pure DNA fragments of the specific replication reaction products of *B. subtilis* specific to the 16S rRNA gene, the results of the analysis using the DNA BLAST program showed a similarity between the wild standard isolate *B. subtilis* strain BB1 recorded in the GeneBank and the three local isolates Sar1,Sar2, Sar3 and at a rate of 98.19, 98.13 and 94.61%, respectively, therefore, Sar2 and Sar1 isolates appeared at the extreme upper and lower part of the phylogenetic tree, and between them the third Sar3 isolate occurred.

The inhibitory effect of the bacterial isolates understudy was also tested by the agar diffusion method, and the results showed that there was no inhibitory effect of these bacteria against the five pathogenic bacterial species: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus haemolyticus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae,* and *Pseudomonas aeruginosa*. The three, diluted (200, 100, 50) mg/ml and undiluted, by the Agar Well Diffusion method, had varying inhibitory activity against the growth of pathogenic bacteria of its five types and were more influential on gram-positive compared to its negative effect on the stain.

By detecting by GC-MS, the secondary metabolites of *B. subtilis* (Sar1) filtrate, which was selected because they are identical with a percentage of 98.19% to *Bacillus subtilis* bacteria contained in the standard GeneBank, they consisted of 33 chemical substances according to the number of peaks produced after injecting the filtrate into the GC, and when this information was entered into the MS, it was diagnosed by its names with the calculation of its molecular weight and the amount of space it occupies as a percentage within the filter used understudy.

University of Mosul
College of Education for
Pure Science

Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Isolated from Soil and Studing its Antibacterial Effect on Pathogenic Bacteria

Sarah Salih Sulaiman Mahmood Al-Rubaie

M. Sc. Thesis
Biology

Supervised by
Assit.Prof.
Dr. Najwa Ibrahim Khaleel Al-Barhawi

2022A. D. **1443A. H.**