The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of Biology

Detection of *Eikenella corrodens* from Patients with Periodontitis and a Novel Local Study of its Whole Genome Sequence

Mohammed Mahdi Salih Yaseen Aljubouri

Ph.D. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Alrawi

1445 A.H. **2024 A.D.**

Abstract

The current study was designed as the first local study to isolate and diagnose *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) bacteria. It was isolated and purified from the anaerobic bacterial community. The study focused on this bacteria as one of the pathogenic causes of periodontitis in patients visiting the Periodontal Diseases Unit at the College of Dentistry, University of Mosul, and Al-Noor Specialized Dental Center and Specialized Dental Center / left side. A total of 126 samples were collected from the periodontal pocket with a depth of more than 4-5 mm. All samples showed growth of different bacterial species except for two samples (98.4%). *E. corrodens* isolates were identified based on their distinctive gray colony color and their ability to exhibit corrosion, which is a characteristic feature during primary isolation on their specific selective media. Additionally, some biochemical characteristics were investigated using several tests, where the bacteria showed a positive result for oxidase production and negative results for other tests. All bacterial isolates were molecularly diagnosed by relying on the 16S RNA gene, and two strains of *E. corrodens* were recorded in the global, European, and Japanese gene banks under the following names: *Eikenella corrodens* MeAm OQ996282 and *Eikenella corrodens* MeAm2 PP320426. Furthermore, eighteen strains of different bacterial species present in the periodontal pocket environment were recorded. Using the Mega 11 program, a phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method to determine the similarity ratio between the isolated and identified bacterial species in our study. In the next part of this study, several experiments were designed and conducted on *E. corrodens* bacteria. The liquid and solid media were modified and optimized for the transportation, isolation, and diagnosis of these bacteria for the first time locally. Their growth in liquid media was evaluated to determine the best culture medium, which was found to be the Alternative thioglycollate broth. Moreover, Modified Todd-Hewitt Agar Medium (MTHA-2) supplemented with 5% sheep

blood showed the best results in subculturing and reduced incubation time. The study also included the investigation of the corrosion phenomenon of these bacteria using MTHA-1 and MTHA-2 media. Furthermore, the study aimed to explore the biofilm-forming ability of *E. corrodens* and *Streptococcus mitis* bacteria. Both species exhibited a high ability to form biofilms. Chlorhexidine (CHX) and Sodium Hypochlorite (NaOCl) were tested as antibiofilm-forming agents, and both showed high effectiveness. The last part of this study involved the analysis and study of the whole genome of *E. corrodens* bacteria using Illumina Novaseq technology. Previous studies did not address the genetic map, genetic relatedness, and disease-causing genes in the isolates of *E. corrodens*. The complete genome features of *E. corrodens* MeAm were described using the QUAST program and the RAST server. The analysis results showed that the *E. corrodens* genome includes 475 contigs as a final assembly, with lengths ranging from 2003 to 31752. The total genome sequence length was 2,084,465 nitrogen bases, with a GC content of 55.9%. It contained 2,729 protein-encoding sequences and 40 tRNA genes. Additionally, some pathogenic genes of *E. corrodens* MeAm, including antibiotic resistance genes and genes associated with various physiological functions studied.

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية كأول دراسة محلية لعزل وتشخيص بكتيريا *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) حيث تم عزلها وتنقيتها من مجتمع البكتيريا اللاهوائية اذ أولت الدراسة الحالية اهتماما بهذه البكتيريا بوصفها أحد المسببات الممرضة لالتهاب انسجة ما حول الاسنان (Periodontitis) من المرضى المراجعين لوحدة أمراض اللثة في كلية طب الاسنان في جامعة الموصل ومركز النور التخصصي لطب الاسنان والمركز التخصصي لطب الاسنان الايسر. تم جمع 126 عينة من الجيب المتكون في اللثة وبعمق أكثر من 4–5 ملم. أظهرت جميع العينات نموا لأنواع مختلفة من البكتيريا باستثناء عينتين (98.4%)، تم التحري عن بكتيريا *E. corrodens* ثم شخصت مظهريا بالاعتماد على لون المستعمرات التي تظهر باللون الرصاصي المميز فضلا عن امتلاكها لظاهرة (Corrosion) والتي تعمل على تأكل الوسط الزرعي وتكون هذه الظاهرة علامة مميزة عند عند العزل الاولي بنموها على الأوساط الانتخابية الخاصة بها. كذلك تم التحري عن بعض الخصائص الكيموحيوية باستخدام عدة اختبارات، إذ أبدت البكتريا نتيجة موجبة لاختبار انتاج انزيم الاوكسديز وسالبة للفحوصات الأخرى.

تم تأكيد تشخيص جميع العزلات البكتيرية جزيئيا بالاعتماد على 16s RNA gene وسجلت سلالتين من بكتيريا *E. corrodens* في بنك الجينات العالمي والاوربي والياباني تحت الاسمين التاليين *Eikenella corrodens* MeAm2 و *Eikenella corrodens* MeAm OQ996282 PP320426

كما تم تسجيل عشرين سلالة من مختلف الأنواع البكتيرية التي تتواجد في بيئة الجيب المحيط بالسن.

وباستخدام برنامج Mega 11 صممت الشجرة الوراثية بواسطة (Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method) بين هذه الأنواع البكتيرية المعزولة والمشخصة في دراستنا وتحديد نسبة القرابة بينهم.

وفي المحور التالي في هذه الدراسة تم تصميم عدد من التجارب أجريت على بكتيريا *E. corrodens* حيث تم تحوير عدد من الأوساط السائلة والصلبة الخاصة بنقل و عزل وتشخيص هذه البكتريا ولأول مرة محليا ودرست قابليتها على النمو في الأوساط السائلة المحورة لتحديد أفضل وسط زرعي ناقل لها وهو وسطAlternative thioglycollate broth، كما ابدى الوسط المحور

Modified Todd-Hewitt Agar Medium (MTHA-2) بإضافة دم الأغنام 5% الأفضلية في عملية إعادة الاستنبات وكذلك تقليل وقت التحضين.

فضلا عن ذلك تضمن المحور دراسة ظاهرة التاكل (Corrosion) المميزة لهذه البكتيريا باستخدام وسطي MTHA-1 و MTHA-2.

هدفت الدراسة الحالية أيضا الى الكشف عن قابلية نوعي البكتيريا *E. corrodens* وبكتيريا *Streptococcus mitis* على تكوين الاغشية الحيوية واظهر كلا النوعين قدرة عالية على تكوين الاغشية الحيوية، بعدها تم استخدام مادتي Chlorhexidine (CHX)و Sodium Hypochlorite (NaOCl) لاختبار فعاليتها كمواد مثبطة لتكوين الاغشية الحيوية واعطت كلا المادتين فعالية عالية.

تناول الجزء الأخير من هذه الدراسة تحليل ودراسة الجينوم الخاص ببكتيريا *E. corrodens* باستخدام تقنية Illumina Novaseq اذ لم تتطرق الدراسات السابقة الى دراسة الخريطة الوراثية والقرابة الوراثية والجينات المسببة للأمراض في العزلة المحلية لبكتيريا *E. corrodens*. تلاها تم وصف صفات الجينوم الكامل لـ *E. corrodens* MeAm باستخدام برنامج QUAST وخادم RAST. واظهرت نتائج التحليل ان جينوم *E. corrodens* يتضمن 475 متسلسلات متصلة كجمع نهائي، وبلغت هذه التسلسلات بين 2003 و 31752 ، وان طول التسلسل الجينومي الكلي 2،084،465 قاعدة نيتروجينية، ونسبة GC (%) بلغت 55.9 ، وعدد التسلسلات المشفرة للبروتين 2،729 ، و 40 جين tRNA. فضلا عن ذلك، تمت دراسة بعض جينات امراضية *E. corrodens* MeAm بما في ذلك: جينات المقاومة للمضادات الحيوية، وجينات مرتبطة بوظائف فسلجية مختلفة.

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

التحري عن *Eikenella corrodens* من مرضى التهاب ماحول الاسنان ودراسة جديدة محليا لجينومها الكامل

محمد مهدي صالح ياسين الجبوري

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ الدكتورة

أميرة محمود محمد الراوي

1445هـ 2024م