The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of Biology

Some Phenotypic and Genotypic Characterization of *Burkholderia cenocepacia*

Esraa Mohammed Adel Shareef Dallal bashi

Ph.D. Dissertation

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Essra Ghanim Hazim Al sammak

2023 A.D. **1445 A.H.**

Abstract

Four hundred and thirty (430) samples were collected from various sources, including 400 clinical human samples from both sexes with different ages of patients in many different hospitals of Mosul city, 25 from Rhizosphere soil samples, and 5 from infected local market onion during an eight-months, from 1st February 2022 to 1st September 2022.

From 430 samples, the number of samples that did not show any bacterial growth on MacConkey agar was (107)25% (100 clinical, and 7 soil samples) compared to (323)75 % growth samples (300 clinical samples, 18 soil sources, and 5 infected onion samples).

A total of eighty (80) isolates (66 clinical samples and 14 soil sources) were obtained depending on the phenotypic characteristics of cultured isolates on selective Oxidation Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose agar medium (OFPBL) used for primary isolation and diagnosis of *Burkholderia cepacia* complex Bcc.

A selective medium for Bcc was also prepared by adding antibiotics to MacConkey medium to make it more selective for Bcc bacteria under study by adding Polymyxin B, Vancomycin and gentamycin which showed efficiency in isolating and diagnosing these bacteria.

B. cenocepacia isolates have the ability for production virulence factors, including the production of gelatinase, urease enzyme, slime layer, biofilm formation, tyrosinase, DNase, lipase, proteinase, lecithinase, hemolysin production, siderophores, mucoviscosity and swimming and swarming phenomenon at 71%, 71%, 53%, 82%, 29%, 41%, 53%, 29%, 24%, 41%, 100%, 12% and 18% respectively.

Seventy-three (73)17% of isolates belong to *Burkholderia cepacia* group including (60)14% clinical samples and (13)3% soil source isolates using the specific primer PSR1-PSL1 for 16S rDNA gene.

The total percentage of *Burkholderia cenocepacia* isolates obtained was (17)4% isolate including (13)3% clinical samples and (4)1% soil sources. *Burkholderia cenocepacia* clinical isolates included (4) 1% of burns, (3) 0.7% of wounds, (2) 0.5% of diabetic foot ulcers, (1) 0.2% of urine, (1) 0.2% of the sputum, (1) 0.2% of cerebrospinal fluid, (1) 0.2% of blood and (4) 1% of soil sources. It was not isolated from infected onion, ear, eye, and throat swabs. Forty-four 44% of the isolates are female, while 56% belong to male patients.

The sequencing of 16S rDNA and *hisA* gene for selected isolates were compared with the gene sequences of the standard isolates in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) database within the National Center for Biotechnology Information (NCBI), so that the diagnosis confirmed the identification of isolates understudy and showed that (17) isolates belonged to *Burkholderia cenocepacia* bacteria. The GenBank gave accession numbers of similar sequencing isolates of the 16S rDNA gene after analyzed for two (2) clinical strains ES7 and ES25 under the accession number (OQ692097 and OQ692098) and similar sequencing isolates of *hisA* gene for 12 (10 clinical strains and 2 soil strains) from (OQ703918 to OQ703929).

Strains of *Burkholderia cenocepacia* clustered at 99.5 in a phylogenetic tree using *hisA* gene using the MEGA 10 program and the clustering method, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA).

Fifteen (15) at 88% (13 clinical samples and 2 soil sources) of *Burkholderia cenocepacia* strains showed the ability to produce biosurfactants, and about 86% of these isolates had the ability to analyze blood, lipolytic activity at 100%, drop collapse method at 100%, oil dispersion test at 100% and grow on CTAB medium at 100%. The best strain-producing biosurfactant was clinical strain *B. cenocepacia* ES2.

The emulsification index (E_5 and E_{24}) of each 15 *Burkholderia cenocepacia* strains ranged from (21%-50%) for E_5 and 45% to 85% for E_{24}.

The maximum emulsification activity using olive oil as a carbon source were E_5= 50%; E_{24} = 85% by clinical *Burkholderia cenocepacia* ES2 followed by sunflower oil and kerosene (white oil) at E_5= 47%; E_{24} = 69% for each of them while crude oil and glycerol showed an emulsification coefficient at E_5= 36.3 %, 27%; E_{24} = 59%, 50% respectively. However, damaged car oil showed an emulsification coefficient at E_5=21; E_{24}=45 by clinical *Burkholderia cenocepacia* ES9 which was the poorest substrate.

The biosurfactant extracted from 15 strain of *B. cenocepacia* were identified as mono Rhamnolipid by using Thin Layer Chromatography (TLC) with Rf values ranging between 0.65 and 0.94 assumed a glycolipid in nature.

Functional groups of *Burkholderia cenocepacia* biosurfactant strains (clinical ES2 and soil ES10) were confirmed by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), revealing the possible presence of carboxylic, hydroxyl, and carbonyl groups.

Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) was used to determine the chemical compounds found in Rhamnolipid which were fatty acids that included octadecane, hexadecane, tertadecane, and benzene derivatives such as toluene.

الخلاصة

تم جمع (430) عينة من مصادر مختلفة ، ضمنت 400 عينة سريرية من كلا الجنسين بأعمار مختلفة من المرضى المراجعين للعديد من المستشفيات في مدينة الموصل ، و 25 عينة من التربة حول الجذور للعديد من النباتات، و 5 عينات من البصل المصاب من الاسواق المحلية خلال فترة ثمانية أشهر ، من 1 فبراير 2022 إلى 1 أكتوبر 2022.

بلغت نسبة العينات التي لم تظهر أي نمو بكتيري على أجار الماكونكي من اجمالي 430 عينة (107) 25٪ (100عزلة من عينات مرضية ، و 7 عزلات من التربة حول الجذور) مقارنة بـ (323) 75٪ عزلة اظهرت نمو (300 عزلة من عينات مرضية ، 18 عزلة من عينات التربة حول الجذور ، و 5 عزلات من عينات البصل المصابة).

تم الحصول على ثمانين (80) عزلة (66 عزلة من عينات مرضية و 14عزلة من عينات التربة حول الجذور) اعتمادًا على الخصائص المظهرية للعزلات النامية على وسط أكار الانتقائي Oxidation Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose agar medium (OFPBL) الخاص بمجموعة *Burkholderia cepacia* complex Bcc.

تم أيضًا تحضير وسط انتقائي لـ *Burkholderia cepacia* complex Bcc عن طريق إضافة المضادات الحيوية إلى وسط الماكونكي MacConkey لجعله أكثر انتقائية للبكتيريا قيد الدراسة عن طريق إضافة Polymyxin B و Vancomycin و gentamycin والتي أظهرت كفاءة في عزل وتشخيص هذه البكتيريا.

امتازت سلالات *Burkholderia cenocepacia* بقدرتها على إنتاج عوامل ضراوة ، منها الجيلاتينيز gelatinase ، إنزيم اليوريز urease ، انتاج الطبقة الهلامية slime layer ، تكوين الأغشية الحيوية biofilm، والتيروسينيز tyrosinase ، والدنيز DNase ، واللايبيز lipase ، والبروتينيز proteinase ، والليسيثينيز lecithinase ، وإنتاج الهيمولايسين hemolysin ، وجاذبات الحديد siderophores ، واللزوجة المخاطية mucoviscosity وظاهرة العج swarming and swimming إذ بلغت النسب لعدد العزلات المنتجة لها 71٪ ، 71٪ ، 53٪ ، 82٪ ، 29٪ ، 41٪ ، 53٪ ، 29٪ ، 24٪ ، 41٪ ، 100٪ ، 12٪ و 18٪ على التوالي.

تم الحصول على (73) 17٪ تابعة إلى مجموعة *Burkholderia cepacia* منها (60) 14٪ عزلة من عينات مرضية و (13) 3٪ عزلة من عينات التربة حول الجذور باستخدام البادئ الخاص PSR1-PSL1 بالمورث 16S rDNA.

بلغت النسبة الإجمالية لسلالات *B. cenocepacia* التي تم الحصول عليها (17) 4٪ سلالة شملت على (13) 3٪ من العزلات المرضية و (4) 1٪ من عزلات الجذور حول التربة. تضمنت

عزلات *B. cenocepacia* المرضية: (4) 1٪ من الحروق ، (3) 0.7٪ من الجروح ، (2) 0.5٪ من قرح القدم السكرية ، (1) 0.2٪ من الأدرار ، (1) 0.2٪ من القشع ، (1) 0.2٪ من سائل النخاع الشوكي ، (1) 0.2٪ من الدم ، ولم تعزل من مسحات الأذن والعين والحنجرة ومن البصل المصاب. بلغت نسبة العزلات من المرضى الإناث 44٪ و 56٪ من الذكور.

قورنت نتائج تحديد التتابعات للمورث 16S rDNA وجين *hisA* للعزلات المختارة مع تسلسل المورث للعزلات القياسية المثبتة في قاعدة البيانات Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ضمن الـ NCBI؛ اذ أكد التشخيص على انه (17) عزلة تابعة إلى النوع *B. cenocepacia*.

كما سجلت السلالتين السريريتين ES7 و ES25 ضمن بنك الجينات وعند الرقم التسلسلي(OQ692097 و OQ692098) للجين 16S rDNA, كما تم ايضا تسجيل 12 عزلة قياسية (10 عزلات مرضية و عزلتين من الجذور حول التربة) عند الرقم التسلسلي (من OQ703918 إلى OQ703929) للجين *hisA*.

ارتبطت سلالات *B. cenocepacia* عند العنقود A بنسبة تشابه 99.5% باستخدام الجين *hisA* وباستخدام برنامج MEGA10 وطريقة المعدل غير الموزون UPGMA.

أظهرت (15) سلالة من *B. cenocepacia* نسبة 88٪ (13 عزلة مرضية و 2 عزلة من الجذور حول التربة) قدرتها على أنتاج المواد الحيوية الفعالة سطحياً، اظهرت 86٪ منها قدرة على تحلل الدم ، تحلل الدهون بنسبة 100٪، اختبار تشتت النفط بنسبة 100٪، أنهيار القطرة المحورة بنسبة 100٪، والنمو على وسط Cetyl – Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) بنسبة 100٪، ، كما اظهرت السلالة المرضية *B. cenocepacia* ES2 أفضل انتاجية للمواد الحيوية الفعالة سطحياً.

أظهرت سلالات *B. cenocepacia* المنتجة للمواد الحيوية الفعالة سطحياً معامل الاستحلاب من (21٪ –50٪) لـ E5 و 45٪ إلى 85٪ لـ E24 واظهر زيت الزيتون أعلى معامل استحلاب باستخدامه كمصدر للكربون بنسبة (E5 = 50٪ ؛ E24 = 85٪) بوساطة السلالة المرضية *B. cenocepacia* ES2، يليه زيت عباد الشمس والكيروسين (النفط الأبيض) بنسبة E5= 47٪ ؛ E24 = 69 ٪ لكل منهما و أظهر النفط الخام و الكليسرول glycerol معامل استحلاب بنسبة E_5= 36.3 %, 27% ؛ E_{24} = 59%, 50% على التوالي وقد أظهرت السلالة المرضية *B. cenocepacia* ES9 اقل معامل استحلاب باستخدام زيت السيارات المعدوم بنسبة (E5 = 21 ؛ E24 = 45).

شخصت المواد الحيوية الفعالة سطحياً المستخلصة من 15 سلالة من *B. cenocepacia* على أنها سكريات دهنية Glycolipid من نوع الرامنوليبد الأحادي mono Rhamnolipid باستخدام طريقة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC اذ كانت قيم الجريان Rf = 0.65 و 0.94.

تم تحديد المجاميع الفعالة للمواد الحيوية المنتجة من *B. cenocepacia* للسلالتين (ES2) المرضية وسلالة (ES10) المعزولة من الجذورحول التربة بواسطة طيف الأشعة تحت الحمراء (FTIR) ، وتم الكشف عن وجود مجاميع كربوكسيلية، هيدروكسيل وكربونيل و تم تحديد المركبات الفعالة للمركب Rhamnolipid بأستخدام تقنية الأستشراب الغازي لمطياف الكتلة GC MS والتي كانت عبارة عن أحماض دهنية منها Octadecane، Hexadecane، Tertadecane ومشتقات البنزين منها Toluene وغيرها.

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

بعض التوصيف المظهري والجيني لبكتريا *Burkholderia cenocepacia*

اسراء محمد عادل شريف دلاّل باشي

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ الدكتورة

اسراء غانم حازم السماك

1445هـ 2023م