جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

التشخيص الجزيئي لعدد من *Paenibacillus spp.* والتحري عن تأثيرها في السيطرة على اصابات البكتيرية الجلدية في الجرذان المختبرية

رنا خالد احمد غايب الطريا

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الاستاذ	الاستاذ المساعد
الدكتورة أديبة يونس شريف النعمان	الدكتورة نجوى ابراهيم خليل البرهاوي

١٤٤٣هـ ٢٠٢٢ م

الخلاصة

تهدف الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص بكتريا *Paenibacillus sPP.* من أنواعٍ مختلفة من اللبن الرائب المحلي بمدينة الموصل ، جمعت 80 عينة لبن وبواقع 20 عينة لكل نوع من اللبن والتي شملت لبن الاغنام ، الابقار ، الجاموس ، الماعز ، وتم الحصول منها على 10 عزلات لبكتريا *Paenibacillus sPP.* وبنسبة 12.5% من المجموع الكلي للعينات قيد الدراسة ، توزعت العزلات البكتيرية بواقع 5 عزلات من لبن الاغنام و 2 عزلتين من لبن الابقار و3 عزلات من لبن الجاموس وبنسب مئوية بلغت 50% ، 20% ، 30% على التوالي ، الا أنه لم يتم الحصول على اية عزلة من لبن الماعز.

شخصت العزلات البكتيرية بالاعتماد على الفحوصات الشكلية والاختبارات الكيموحيوية، وتم تأكيد تشخيصها بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وباستخدام الجين 16S rRNA ، تم تحديد نوع وسلالة العزلات بإرسالها الى مركز MBC ، تم التعرف على تسلسل القواعد النيتروجينية للجين 16S rRNA الخاصة ببكتريا *Paenibacillus sPP.* ، وبعد مقارنتها مع نظائرها المصَّنفة عالمياً على موقع NCBI تم تشخيص (3) انواع مختلفة من جنس بكتريا *Paenibacillus sPP.* ، نوعان منها كانت مشخصة ومسجلة في بنك الجينات باسم *Paenibacillus lautus* و *Paenibacillus ginsengagri* ، اما النوع الثالث فقد تم تشخيصه وتسجيله عزلة محلية جديدة في بنك الجينات ضمن الدراسة الحالية تحت اسم *Paenibacillus sp.RAN*.

كما تم التأكد من تشخيص بعض انواع البكتريا المرضية المعزولة من الاصابات الجلدية للإنسان والتي تم الحصول عليها من المختبرات البحثية لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة الموصل والتي شملت , *Kocuria kristinae* *Staphylococcus haemolyticus* , *Staphylococcus aureus* , *Klebsiella pneumonia* , *Escherichia coli* , *pseudomonas aeruginosa* للتأكد من نقاوتها وحيويتها ، كما أختُبِرت حساسيتها لـ (7) انواع من المضادات الحيوية ، وقد اظهرت استجابات متباينة لهذه المضادات الحيوية ، وبنسب مقاومة مختلفة تراوحت بين (14% – 100%) لكل من المضاد الحيوي Ciprofloxacin و Bacitracin على التوالي ، فيما اظهرت حساسية بنسبة تراوحت بين (75% – 100%) لكل من المضاد الحيوي Spiramycin و Amikacin على التوالي.

تم فصل الراشح البكتيري من الانواع الثلاثة لبكتريا *Paenibacillus sPP.* وقد اظهرت النتائج تأثيرات عالية وبجميع التراكيز تقريباً وكان ذلك واضحاً من خلال اقطار مناطق التثبيط

التي تم قياسها وتدوينها ، اظهرت البكتريا *P.aeruginosa* استجابة عالية وبقطر تثبيطي (25) ملم لراشح بكتريا *Paenibacillus ginsengagri* عند التركيز (200) ملغم / سم^3 ، تلتها البكتريا *S.haemolyticus* اظهرت اعلى استجابة وبقطر تثبيطي (24.3) ملم لراشح بكتريا *Paenibacillus lautus* عند التركيز(100) ملغم / سم^3. كما كان لاستجابات العزلات البكتيرية المرضية تجاه الرواشح البكتيرية فروقاً معنوية واضحة عند مستوى احتمالية ($p < 0.01$) .

أستُخدِم الراشح البكتيري لبكتريا *Paenibacillus sPP.* بأنواعه الثلاثة وبتراكيزه المختلفة لدراسة تأثيره لإنتاج الغشاء الحيوي Biofilm من قبل البكتريا المرضية قيد الدراسة ، وقد كان للرواشح الثلاثة تأثيرات متباينة في تثبيط قابلية البكتريا المرضية على تكوين الغشاء الحيوي وبفروق معنوية واضحة عند مستوى احتمالية ($p < 0.01$).

اظهر راشح بكتيريا *Paenibacillus ginsengagri* تأثيرات جيدة في معالجة الجروح المصابة تجريبياً بنوعي البكتريا *P.aeruginosa* و *S.aureus* داخل الجسم الحي In vivo خلال (14) يوماً من التجربة مقارنة مع مجموعات الجرذان المصابة غير المعاملة ومجموعة الجرذان المعالجة بالمضاد الحيوي Amikacin ، وذلك بدلالة انخفاض اعداد المستعمرات البكتيرية النامية على وسط الاكار المغذي،

كما بينت النتائج أن للراشح البكتيري للنوع *Paenibacillus ginsengagri* تأثيراً واضحاً في تحفيز الاستجابة المناعية في الجرذان التجريبية وذلك من خلال الزيادة الحاصلة في نسب التعداد الكلي والتفاضلي لخلايا الدم البيضاء.

كما أظهرت النتائج وجود فروقٍ معنوية واضحة في تحفيز الاستجابة المناعية المتمثلة بزيادة معدلات معامل البلعمة بالنسبة لمجاميع الجرذان المعاملة بالراشح البكتيري مقارنة مع المجاميع غير المعاملة.

تم تشخيص المركبات الداخلة في تكوين كل راشح بكتيري للأنواع الثلاثة من بكتريا *Paenibacillus* وذلك باستخدام تقنية (GC-MS) ، أظهرت النتائج أن كلاً من راشح بكتريا *Paenibacillus lautus* وراشح بكتريا *Paenibacillus ginsengagri* يحتوي على (28) و (24) مركباً كيميائياً على التوالي ، أما راشح بكتريا *Paenibacillus sp.RAN* فيحتوي على (29) مركباً كيميائياً.

Abstract

The current study has aims to isolate and diagnose *Paenibacillus sPP.* bacteria from different types of local yogurt in the city of Mosul. eighty Yogurt samples were collected, includes (20) samples of yogurt (sheep, cows, buffaloes and goats), 10 isolates of *Paenibacillus sPP.* were obtained from them. (12.5%) of the total population of the samples under study, the bacterial isolates were distributed by (5) isolates from sheep's yogurt, two isolates from cow's yogurt, and (3) isolates from buffalo yogurt with percentages of (50%, 20%, 30%), respectively. However, There is no isolate bacteria from goat's yogurt.

Bacterial isolates were diagnosed based on morphological and biochemical tests, and their diagnosis was confirmed by (PCR) using the 16S rRNA gene of the bacteria. In order to decide on the strain type and the isolates, the bacterial isolates were sent to MBC. the sequence of nitrogenous bases of the 16S rRNA gene of *Paenibacillus sPP.* was identified, and after comparing it with its globally classified analogues on the NCBI website, (3) different types of *Paenibacillus sPP.* were diagnosed, two of which were diagnosed and registered in the genebank as *Paenibacillus lautus* and *Paenibacillus ginsengagri*, and the third type was diagnosed and registered as a new local isolate in the genebank within the current study under the name *Paenibacillus sp.RAN*.

It was also confirmed the detection of some types of pathogenic bacteria isolated from human skin infections obtained from the research laboratories of the Department of Biology Sciences at the College of Education for Pure Sciences at the University of Mosul, which included *K. kristinae*, *S.haemolyticus*, *S.aureus*, *K.pneumonia*, *E. coli,* and *P. aeruginosa* to ensure its purity and vitality, and its sensitivity to (7) types of antibiotics was tested. They showed different responses to these antibiotics, with different resistance rates ranging between (14% - 100%) to the two antibiotics Ciprofloxacin and Bacitracin respectively. While it showed a sensitivity ranged between (75% - 100%) to the antibiotics Spiramycin and Amikacin, respectively.

The bacterial filtrate was separated from the three types of *Paenibacillus sPP. . P. aeruginosa* showed a high response with an inhibitory diameter of (25) mm to the filter of *Paenibacillus ginsengagri* at the concentration (200) mg / cm3, followed by *S.*haemolyticus, which showed the highest response and inhibitory diameter (24.3) mm to the

filtrate of *Paenibacillus lautus* at concentration (100) mg / cm3. The responses of pathogenic bacterial isolates to bacterial infiltrates had clear significant differences at the probability level ($p < 0.01$).

The bacterial filtrate was used for *Paenibacillus sPP.* bacteria with its three types and with different concentrations to investigate the production of Biofilm by the pathogenic bacteria under study. The three filters had different effects in inhibiting the susceptibility of pathogenic bacteria to biofilm formation with significant differences at the probability level ($p < 0.01$).

The bacterial filtrate of *Paenibacillus ginsengagri* showed good effects in the treatment during (14) days of treatment. The experiment compared with the untreated infected groups of rats and the group of rats treated with the antibiotic Amikacin, in terms of the low numbers of bacterial colonies developing on the agar nutrient medium. The results also showed that the concentration (200) mg/cm3 of the bacterial filtrate had a greater effect on inhibiting the growth of *P.aeruginosa* bacteria, while the concentration (100) mg/cm3 of the bacterial filtrate had a greater effect on the growth of *S.aureus* bacteria.

The results also showed that the bacterial filtrate of *Paenibacillus ginsengagri* had a clear effect in stimulating the immune response in experimental rats through the increase in the percentages of total and differential white blood cell counts. The results also showed clear significant differences in stimulating the immune response represented by an increase in phagocytic coefficient rates for groups of rats treated with bacterial infiltrate compared to untreated groups.

The compounds included in the composition of each bacterial filtrate of the three types of *Paenibacillus sPP.* bacteria were diagnosed using the technique of (GC-MS). The results showed that the filtrate of *Paenibacillus lautus* and the filtrate of *Paenibacillus ginsengagri* contain (28) and (24) chemical compounds, respectively, while the filtrate of *Paenibacillus sp.RAN* contains (29) chemical compounds.

University Of Mosul

College Of Education

For Pure Science

Molecular diagnosis for some of *Paenibacillus spp.* And investigation on effects for skin bacterial infections control in experimental rats

Rana Khalid Ahmed AL-Tareea

PH.D Thesis

Biology

Supervised By

Prof.
Dr.Adeeba Younis Shareef Alnuaman

Assist. Prof.
Dr.Najwa Ibraheem Khaleel Albarhawi

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