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

الخصائص الكيموحيوية والجزيئية لصبغة Prodigiosin المستخلصة من بكتريا *Serratia marcescens*

فاطمة رياض محمد محمود الطوى

رسالة ماجستير

علوم الحياة/ أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة غادة عبدالرزاق محمد إبراهيم الطائي

1445 هـ **2023 م**

الخلاصة

تعد *Serratia marcescens* بكتريا عصوية، متحركة وسالبة لصبغة كرام، تنتمي إلى العائلة المعوية، وهي بكتريا لاهوائية اختيارية يُمكنها التواجد والعيش في بيئات مختلفة. هدفت الدراسة الى استخلاص صبغة البروديجيوسين (prodigiosin) من بكتريا *S. marcescen* والتحري عن خصائصها الكيموحيوية والجزيئية.

جُمِعَت 190 عينة، تضمنت 160 عينة مرضية، و 30 عينة بيئية للمدة من شهر أيلول ولغاية شهر شباط لعام 2022-2023، توزعت العينات المرضية المأخوذة من مستشفى الموصل العام والمستشفى الجمهوري بين 30 عينة جروح، و 80 عينة إدرار، و50 عينة حروق، أما العينات البيئية فقد أخذت من ترب حدائق مناطق جغرافية مختلفة من محافظة نينوى للتحري عن وجود بكتريا *S. marcescens*.

شخصت بكتريا *S. marcescens* مظهريا وجزئيا وبالاختبارات الكيموحيوية. باستخدام مورث *16SrRNA* بتقنية الـ PCR وإجراء عملية التحليل التتابعي للقواعد النتروجينية ومقارنتها في المركز الوطني للتقانات الحياتية (NCBI).اذ تم الحصول على عشرة عزلات تابعة لبكتريا *S. marcescens* بنسبة 5.3% توزعت بين ثمان عزلات من مجموع 160 عينة مرضية بنسبة عزل مقدارها 5% كان منهما عزلتان(S1 من القثطرة البولية و S2 من الادرار) فقط منتجة لصبغة prodigiosin، كما حصل على عزلتين(S3 و S4) من 30 عينة تربة بنسبة 6.7%.

استخدمت في هذه الدراسة أوساط تركيبية لتعزيز إنتاج صبغة البروديجيوسين لجميع العزلات العشرة، تضمن وسط مرق لوريا– برتاني مع إضافة مسحوق كل من بذور السمسم، وفستق الحقل، وجوز الهند، فضلا عن نخالة الحنطة، وكذلك استخدم وسط الأملاح الأساس مع إضافة مواد كيميائية ولأول مرة عالميا شملت مادة البولي اثيلين كلايكول (PEG) وحامضي الفولك والاسكوربيك.

أظهرت نتائج تعزيز إنتاج الصبغة تفوق العزلات البيئية على العزلات المرضية في كل من الوسطين، وأعطى مسحوق بذور السمسم المضاف للوسط أعلى قيمة لإنتاج الصبغة، ثم تلاها فستق الحقل، ونخالة الحنطة، بينما أخفق جوز الهند تماما في إنتاج صبغة البروديجيوسين لجميع العزلات العشرة. أما بالنسبة لنتيجة استخدام وسط الأملاح الأساس فقد أعطت مادة

PEG زيادة مذهلة لإنتاج الصبغة تجاوزت في إحدى العزلات على 1000 وحدة/خلية، تلاها حامض الفولك، بينما أحتل حامض الاسكوربيك المرتبة الأخيرة في تعزيزه لإنتاج الصبغة.

تم الحصول على خمسة مستخلصات ابتداءً من الدقيقة 2.0 ولغاية 5.6 من صبغة البروديجيوسين بتقنية الكروماتوكرافي السائل عالي الأداء التحضيري Preparative-HPLC لاستخدامها في التطبيقات المختلفة، وظهرت الصبغة بلون احمر عند الدقيقة 2–3.

تم التحري عن المورثات المسؤولة عن انتاج الصبغة في كل من العزلات المنتجة وغير المنتجة للصبغة من خلال إجراء الكشف عن وجود أو غياب بعض موروثات بنائهاعن طريق تقنية Multiplex PCR وهي كل من (*pigA*،*pigC*، *pigF*، *pigL*، *pigN*)،وأظهرت النتائج أن العزلات الست غير المنتجة للبروديجيوسين كانت فاقدة للمورثين *pigC*، و *pigN* اللذين يشفران البروتينات الضرورية الداخلة في البناء الحيوي للصبغة ولولاهما لا يمكن أن يكتمل التركيب الكيميائي الكامل للبروديجيوسين، فضلا عن ذلك تم التحري عن وجود المورثين*cueR* و *copA* المعروفين بأنهما يحيطان بمنظومة البروديجيوسين في سلالات *S. marcescens* ATCC 274 القياسية.

لوحظ ان صبغة البروديجيوسين المستخلصة من بكتريا *S. marcescens* كان لها تأثير تثبيطي واضح على نمو جميع البكتريا المرضية المختبرة، وأنها تفوقت على المضاد الحيوي Rifampicin في تأثيرها على الانواع المرضية *Acinetobacter baumannii*، *Aerococcus viridans*، *Burkholderia cepacia*، *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli*.

أظهرت النتائج كفاءة البروديجيوسين في النشاط المضاد للأكسدة للصبغة من خلال ازاحة الجذور الحرة لمادة 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH).

أظهرت صبغة البروديجيوسين المستخلصة من *S. marcescens* ثباتية نسبية عند الدالة الحامضية (2،4،6)، بينما قل لونها الأحمر كلما زادت القاعدية، كما بقيت الصبغة ثابتة الى حد 80°م، إلا أن ثباتيتها انخفضت بشكل كبير عند تعرضها لحرارة 100°م، اعطت هذه الثباتية للصبغة دور ايجابي في مجال التلوين.

ABSTRACT

Serratia marcescens is a motile, Gram-negative bacillus bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. It is a facultative anaerobic bacterium that can exist and live in various environments. The study aimed to extract the pigment prodigiosin from *S. marcescens* and investigating its biochemical and molecular properties.

One hundred ninety (190) samples were collected, including 160 clinical and 30 environmental samples, for the period from September to February 2022-2023. The clinical samples were taken from Mosul General Hospital and Al-Jamhouri Hospital were distributed among 30 wound samples, 80 urine samples, and 50 burn samples. As for the environmental samples, they were taken from soil of gardens of different geographical regions of Nineveh Governorate to investigate the presence of *Serratia marcescens.*

S. marcescens bacteria was identified phenotypically, molecularly, and by biochemical tests. Using the 16S rRNA gene by PCR technology and performing the process of sequential analysis of the nitrogenous bases and comparing them at the National Center for Life Technology (NCBI). Ten isolates belonging to the bacterium *S. marcescens* were obtained at a rate of 5.3%, distributed among eight isolates from a total of 160 pathological samples, with an isolation rate of 5%. Only two isolates (S1 from urinary catheter and S2 from urine) produced the prodigiosin pigment, and two isolates (S3 and S4) were obtained from 30 soil samples, at a rate of 6.7%.

Synthetic media were used in this study to enhance the production of prodigiosin pigment, including Luria-Bertani broth medium with the addition of seed powder of each sesame, peanut, coconut, as well as wheat bran, as well as the base salts medium was used with the addition of chemical materials, and for the first time in the world it included polyethylene glycol (PEG), folic acid and ascorbic acid.

The results of enhancing the production of the pigment showed the superiority of the environmental isolates over the clinical isolates in both media, and the sesame seed powder added to the medium gave the highest value for the pigment production, followed by the peanut and wheat bran, while the coconut completely failed in the production of the

prodigiosin pigment. As for the result of using the base salts medium, PEG gave an amazing increase in the production of the pigment, which more than 1000 units/cell in one of the isolates, followed by folic acid, while ascorbic acid ranked last in enhancing the production of the pigment.

Five extracts were obtained from minute 2.0 to minute 5.6 of prodigiosin pigment using Preparative-HPLC technology for use in various applications. The pigment appeared red at minute 2-3.

The genes responsible for pigment production were investigated in both pigment-producing and non-pigment-producing isolates by detecting the presence or absence of some of their structural genes using Multiplex PCR technology, namely (*pigA, pigC, pigF, pigL, pigN*). The results showed that the six isolates that did not produce prodigiosin were missing the two genes, *pigC and pigN*, which encode the necessary proteins involved in the biosynthesis of the pigment, and without them, the full chemical synthesis of prodigiosin could not be completed. In addition, the presence of the genes *cueR* and *copA*, which are known to surround the prodigiosin in the genetic operon of *S. marcescens* ATCC 274 standard strains.

It was noted that the prodigiosin pigment extracted from *S. marcescens* bacteria had a clear inhibitory effect on the growth of all pathogenic bacteria tested, and that it was superior to the antibiotic Rifampicin in its effect on pathogenic species *Acinetobacter baumannii, Aerococcus viridans, Burkholderia cepacia, Enterococcus faecalis, and Escherichia coli.*

The results showed the efficiency of prodigiosin in the antioxidant activity through the removing of the free radicals of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH).

The prodigiosin pigment extracted from *S. marcescens* showed relative stability at pH (2, 4, 6), while its red color decreased as its alkalinity increased. The pigment also remained stable up to 80°C, but its stability decreased significantly when exposed to temperature 100°C, this stability of the pigment gave a positive role in the field of coloring.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Mosul University/ College of Science
Department of Biology

Biochemical and molecular properties of prodigiosin pigment extracted from *Serratia marcescens* bacteria

Fatima Riyadh Mohammad Mahmoud Al-Tawa

M.Sc. Thesis

Biology/ Microbiology

Supervised by

Assist. Prof.

Dr. Ghada Abdulrazzaq Mohammad Ibrahim Al-Taee

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