جامعة الموصل
كلية العلوم

التصنيف الجزيئي للانواع التابعة لعائلة Micrococcaceae المعزولة من بيئات مختلفة ودراسة صفاتها المظهرية والبايوكيميائية

محسن علي احمد سلطان البياتي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

باشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة اسراء غانم حازم السماك

1440هـ **2018 م**

الخلاصة

جمعت 154 عينة من مصادر مختلفة خلال الشهرين اذار ونيسان من عام 2013، وتمثلت بعينات جلدية من اشخاص اصحاء ومن مرضى الثلاسيميا واخرين مصابين بحروق وعينات من الهواء والماء والتربة والاغذية المتخمرة، وكان عدد العزلات الموجبة للزرع والتابعة لعائلة Micrococcaceae هي 66 عزلة، وكانت نسبة العزل من الاصحاء 100 %، ومن عينات التربة 53.8 %، ومن مرضى الثلاسيميا 44.2 %، اعقبها نسبة 8.3 % من الهواء ومن ثم مرضى الحروق بنسبة عزل 3.2 % من عدد العينات التي تم جمعها، في حين لم تسجل اي نسبة عزل من الماء او الاغذية المتخمرة.

انتخبت 57 عزلة لإجراء الاختبارات المظهرية والكيموحيوية وتشخيصها مظهرياً. احتل النوع *Kocuria rhizophila* نسبة 33.3 %من الانواع المشخصة، والنوع *Micrococcus luteus* بنسبة 22.8% ثم النوع *Micrococcus yunnanensis* بنسبة 12.2 %. والنوع *Kocuria palustris* بنسبة 7% ، في حين كان الجنس Citricoccus بنسبة 5.2 %، وقد تساوت الانواع *Kocuria carniphila* و *Kocuria halotolerans* و *Kocuria marina* و *Kocuria polaris* بنسبة 3.5 % لكل منها، وكانت ادنى النسب لنوع *Kocuria atrinae* بنسبة 1.7 %.

وعبر التصنيف العددي، تم ايجاد نسب التشابه بين السلالات مظهريا باعتماد طريقة الربط المنفرد للمجاور الاقرب باستخدام معامل التشابه البسيط والحصول على شجرة تصنيف مظهرية مؤلفة من ستة عشر عنقوداً رئيساً. توزع النوع *M. luteus* على ستة عناقيد رئيسة، بينما توزعت سلالات النوع *K. rhizophila* على اربعة عناقيد رئيسة، والنوع *M. yunnanensis* على عنقودين ، والنوع *K. palustris* على عنقودين ايضا. اما جنس Citricoccus فقد توزع على ثلاثة عناقيد رئيسة، والنوع *K. marina* على عنقودين منفصلين وكذلك النوع *K. halotolerans* والنوع *K. carniphila* توزع كل منها على عنقودين منفصلين، اما الانواع *K. polaris* و *K. atrinae* و *M. endophyticus* كل في عنقود منفصل.

وجرى تاكيد التشخيص المظهري باعتماد التشخيص الوراثي المعتمد على المورث 16S rRNA، إذ انتخبت 18 سلالة واجري عليها تحليل تتابعات مورثها 16S rRNAمن قبل شركة Microgene Laboratory/ USA بالاتجاهين الامامي والعكسي، وقورنت تتابعاتها مع تتابعاتِ سلالاتٍ مرجعية مسجلةٍ لدى المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية National Center Biotechnology Information (NCBI) باستخدام برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) لتشخيص السلالات ، واظهرت 20 سلالة تتابعات طويلة ونتائج جيدة ونسب تشابه تراوحت ما بين 92–97 % مع السلالات المرجعية، وعولجت التتابعات لهذه السلالات ببرنامج Molecular Evolutionary Genetics Analysis

(MEGA 5.22) لتقدير نسبة التشابه بين السلالات قيد الدراسة والتي اجتمعت في ستة عناقيد رئيسة، اربعة منها تمثلت بأنواع تابعة لجنس Kocuria واثنان تابعان لجنس Micrococcus وقد توافقت هذه العناقيد مع التصنيف المظهري، وقد تم الحصول على رقم تسلسل خاص لإحدى عشرة سلالة ادخلت ضمن الـNCBI كسلالة مرجعية.

ولزيادة تأكيد التصنيفين السابقين حلل نمط حزم البروتين الكلي لـ 57 سلالة، وعولجت ببرنامج Core Laboratory Image Quantification Software (CLIQS v.1) حيث اعطت 86 حزمة مختلفة الوزن الجزيئي، وقد اجتمعت السلالات في اثنا عشر عنقودا، واتفقت بعض العناقيد مع طرق التصنيف المظهري والوراثي واختلفت عناقيد اخرى سواء مع التصنيف المظهري او الوراثي او كليهما.

تم تأكيد عائدية الاجناس المشخصة لعائلة Micrococcaceae عبر تحليل انواع الاحماض الامينية في الجدار الخلوي لـ 48 سلالة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الورق Paper Chromatography، والتي اكدت احتواء جميع جدرها الخلوية على الاحماض الامينية Alanine و Lysine و Glutamic acid و Glycine وخلوها من Diaminopeimelic acid . وكانت أفضل الطرق التشخيصية طريقة تحليل تتابع المورث 16S rRNA ومن ثم الطرق المعتمدة على الاختبارات المظهرية ونمط حزم البروتين الكلي للخلايا.

University of Mosul
College of Sciences

Molecular Taxonomy of Species Related to Micrococcaceae Isolated from Different Sources and Studying Their Phenetic and Biochemical Characters

Mohsen Ali Ahmed Sulttan Al Bayatee

Ph. D. Thesis
Biology/Microbiology

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Essra Ghanem Al-Sammak

1440 A.H **2018 A.D.**

Abstract

One hundred and fifty four samples were collected in March and April 2013 from different sources including skin samples from patients of thalassemia, burns and healthy persons, and from air, water, soils and fermented foods. Sixty six isolates related to Micrococcaceae were obtained. The highest rate of isolation was 100 % from healthy persons, then from soil 53.8 %, thalassemia patients 44.2 %, air 8.3 % and from burned skin 3.2%, no isolate were obtained from water or fermented food samples.

Fifty seven isolate were identified using morphological and biochemical tests, to their genus and species, the species *Kocuria rhizophila* occupied 33.3 % of identified species, then *Micrococcus luteus* 22.8 %, *Micrococcus yunnanensis* 12.2%, *Kocuria palustris* 7%, *Citricoccus* spp. 5.2 %, and 3.5 for each species of *K. carniphila, K. halotolerans, K. marina, K. polaris,* but the lowest rate was 1.7 % for *K. atrinae.*

Phenetic analysis using numerical taxonomy were carried out using morphological and biochemical characters, the ratios of similarity were found among isolates by nearest neighbor linkage with simple matching method and the phenetic dendrogram was graphed. the dendrogram consisted of sixteen main clusters, distributed as following, the *M. luteus* positioned in six clusters, *K. rhizophila* in four clusters, *M. yunnanensis* in two clusters, *K. palustris* in two clusters, *Citricoccus* in three clusters, *K. marina* in two clusters, *K. halotolerans* in two clusters, *K. carniphila* in two clusters, and each of *K. polaris, K. atrinae, M. endophyticus* had its' own cluster.

The morphological identification was confirmed by 16S ribosomal DNA gene sequencing analysis for eighteen isolates by Microgene Laboratory/USA for front and reverse strands of the gene. The obtained sequences compared with reference

strains' sequences at National Center Biotechnology Information using Basic Local Alignment Search Tool for identification depending on similarity rate between the reference and unknown strains. the isolates gave good results and the similarity rate ranged from 92-97 %. These isolates subjected to Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.22) software to create the evolutionary dendrogram which clustered in six clusters, four of them were occupied by *Kocuria* spp., two clusters for *Micrococcus* spp.. These clusters agreed with phenetic dendrogram and identification. Eleven strains accepted by NCBI and each of them has an accession No.

To confirm the two earlier methods, the whole cell protein bands profile was analyzed for 57 strains and treated with Core Laboratory Image Quantification Software (CLIQS v. 1), to obtain 86 bands and the result was built as dendrogram containing twelve clusters. Some clusters agreed with phenetic and genetic (evolutionary) clustering patterns, while others agreed or disagreed with phenetic or evolutionary clustering pattern.

For more conformation for three identification methods, the cell wall amino acid compositions were analyzed by paper chromatography, and found the alanine, lysine, glutamic acid and glycine but not diaminopeimelic acid as the main amino acid in cell wall structure. This result confirms the isolates relatedness to Micrococcaceae. The best method for identification among them was 16S rRNA gene sequence analysis, then the biochemical tests and whole cell protein bands profile.