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

الفعالية المضادة للبكتريوسين المنقى والمنتج من عصيات *Bacillus* spp. ضد تكوين الغشاء الحيوي لبعض أنواع *Acinetobacter* spp. المعزولة سريرياً وبعض الجراثيم الممرضة الأخرى

آلاء نزار محمود محمد سعيد النجم

رسالة ماجستير

علوم الحياة/ أحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة إسراء غانم حازم السماك

1444هـ 2023م

الخلاصة

جُمعت (215) عينة من مصادرها المختلفة؛ شملت (160) عزلة سريرية (حروق، جروح، قرح القدم السكري، الإدرار، اللوزتين وسائل النخاع الشوكي) تابعة لجنس *Acinetobacter* spp. من كلا الجنسين وبمختلف الأعمار، للمرضى المراجعين والراقدين في مستشفيات الموصل (ابن سينا التعليمي، مركز الموصل التخصصي للحروق والجروح العامة، مستشفى الجمهوري العام)، للفترة من شهر أيلول (2021) ولغاية شهر شباط (2022). كما أستخدمت سلالتين قياسيتين هما النوع *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 والسلالة *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi ATCC6539 إضافة إلى أربع سلالات مشخصة من قسم علوم الحياة /جامعة الموصل Methicillin – Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) و *Klebsiella pneumoniae OP136161* و *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*.

أظهرت النتائج أن (160) عزلة ممرضة أعطت (120) عزلة تابعة للجنس *Acinetobacter* spp. وبأعلى نسبة عزل من الحروق بلغت (85.7%)، الجروح (75.6%)، قرح القدم السكري بنسبة (75%) والإدرار من (UTI) والفشل الكلوي (50%) ومسحة اللوزتين (30.7%)، ومن عينات سائل النخاع الشوكي C.S.F (25%). عزلت العصيات *Bacillus* spp. من التربة (55) عينة من محافظتي نينوى ودهوك بنسبة (52.7%).

انتخبت (11) عزلة من العصيات و(13) عزلة من الـ*Acinetobacter* spp. اعتماداً على الصفات المظهرية (الشكلية والكيموحيوية)، وشخصت أعتماداً على تحديد تتابعات مورثات 16S rRNA إلى 5 سلالات تابعة للنوع AE- *B.subtilis* وسلالتين للنوع AE- *B.cereus* وسلالتين للنوع AE-*B. clausii* وسلالة واحدة فقط للنوع AE- *B.thuringiensis* وسلالة واحدة فقط للنوع AE-*Bacillus* sp. و8 سلالات تابعة للنوع AE- *A.baumannii* و5 سلالات تابعة للنوع AE-*A.junii*، سُجلت 5 سلالات تابعة للنوع AE- *B.subtilis* و AE- *B.cereus* في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (National Center for Biotechnology Information).

وجدت علاقة تطورية لأنواع *Bacillus* spp. وتم الحصول على 5 عناقيد العنقود A لسلالات النوع AE- *B. subtilis* عند نسبة تشابه (100%) والعنقود B لسلالات النوع AE- *B. cereus.* عند نسبة تشابه (99.8 %) والعنقود C لسلالات النوع AE- *B. clausii* عند نسبة تشابه (99.6%) العنقود D لسلالات النوع AE- *B. thuringiensis* عند نسبة تشابه (99.2 %) العنقود E لسلالة النوع AE. *Bacillus sp* عند نسبة تشابه (94.4%) ضم أنواع غير مشخص، حُصل على ثلاث عناقيد للنوع *Acinetobacter* spp. العنقود A لسلالات النوع AE- *A. baumannii* عند نسبة تشابه (98.1%) والعنقود B لسلالات النوع AE- *A. junii*

عند نسبة تشابه (98.2 %) وكذلك تعنقدت نفسهاعند مستوى تشابه (98.7%) ضمن العنقود C وذلك باستعمال برنامج Molecular Analysis Genetic Evolutionary (Mega7) وبأستخدام طريقة التعنقد المعدل غير الموزون Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA). أظهرت الأنواع التابعة لجنس *Bacillus* spp. قدرة على إنتاج البكتريوسين عند التحري الأولي باستخدام طريقة الخطوط المتعامدة Cross Streak method ضد بعض الأنواع البكتيريا الممرضة الموجبة والسالبة لصبغة كرام، بينما أختلف تأثير البكتريوسين من جنس *Bacillus* spp. ضد البكتيريا الممرضة بأستعمال طريقة الانتشار بالحفر، وكان أكثرها كفاءة بالتأثير ضد السلالات *Acinetobacter baumannii*-19AE و*Acinetobacter junii* -20AE و*Acinetobacter baumannii*-22AE.

أظهرت بعض من سلالات *Bacillus* spp. قدرة على إنتاج الطبقة اللزجة على وسط اكار الكونكو الأحمر Congo Red Agar إذ كانت (27.2%) من السلالات شديدة الانتاجية و(18.2%) متوسطة الإنتاجية و(54.5%) غير منتجة ، في حين أظهرت نتائج طريقة الصفيحة المعيارية Microtiter Plate (MTP) أن (9.09 %) من السلالات منتجة للغشاء الحيوي بشدة. إتضح أن سلالات النوع *Acinetobacter* spp. جميعاً شديدة الأنتاج للغشاء الحيوي وبنسبة (53.8%) ومتوسطة الإنتاج للغشاء الحيوي وبنسبة (46.1%) على وسط CRA، وكانت كذلك شديدة الأنتاج بطريقة الصفيحة المعيارية MTP ونسبة (53.8%) ومتوسطة الإنتاج للغشاء الحيوي بنسبة (46.1%).

إستخلص البكتريوسين Bacteriocin وبكفاءة عالية وبوزن (14.2غم/ لتر) من السلالة *Bacillus* sp.-AE في وسط الإنتاجية Synthetic Kl medium بالطريقة المباشرة من طريقة الترسيب، وعند الظروف المثالية في درجة حرارة (37) °م وأس هيدروجيني (7) =pH، وتركيز ملح الطعام NaCl (1%)، وفترة تحضين لمدة يومين.

ظهر التركيز المثبط الأدنى MIC للـ Bacteriocin المستخلص من السلالة *Bacillus* sp.-AE ضد الأنواع البكتيرية مابين (625-2500)مايكرو غرام /سم^3 بينما التركيز ما تحت المثبط الأدنى sub MIC ما بين (312.5-1250) مايكرو غرام /سم^3 بطريقة التخافيف الدقيقة، إذ تغيرت قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي من شديدة الإنتاج إلى غير منتجة بتثبيط التصاقها على الأسطح، في حين تبين أن البكتريوسين ثابت حرارياً ولم يتأثر فعاليته التثبيطية عند درجة حرارة (60)°م لكن فقد فعاليته عند درجات الحرارة (70 ، 80)°م لمدة نصف ساعة.

قُدر محتوى البروتين الكلي للبكتريوسين بطريقة لاوري المحورة للسلالة *Bacillus* sp.-AE بـ(600 ملغرام /سم^3) في ظروف تحضين (24) ساعة ودرجة حرارة (37)°م وأس هيدروجيني pH=(7).

شُخص البكتريوسين المستخلص من السلالة *Bacillus* sp.-AE على أنه مضاد حيوي Lantibiotics من النوع Mersacidin وهو مركب بروتيني يتكون من الـ Peptide؛ إذ كانت قيمة معدل الجريان Rf =0.70 بطريقة كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC، بينما كان الوزن الجزيئي له تقريباً (أقل من5) كيلو دالتون بتقنية الترحيل الكهربائي على أكار الاكريلاميد مع سلفات الصوديوم Sodium Dodecyl sulphate poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE GEL).

Abstract

Two hundred and fifteen(215) samples were collected from different sources. The samples included (160) clinical samples (burns, wounds, diabetic foot ulcers, urine, tonsils and cerebrospinal fluid) to genus *Acinetobacter* spp. from both sexes، different ages, and from out and in patients in various hospitals in Mosul (Ibn Sina Teaching Hospital, Mosul Specialized Center for Burns and General Surgery, Al-Jomhori General Hospital). for the period from September (2021) to February (2022). In addition, two standard strains: *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 and *Salmonella entericaa* subsp. *enterica* ser. Typhi ATCC6539 and four previously diagnosed species were used from the department of Biology / University of Mosul included Methicillin- Resistance *Staphylococcus aureus*(MRSA), *Klebsiella pneumoniae* OP136161, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*.

The results showed that out of (160) pathogenic isolates، (120) isolates belonging to the genus *Acinetobacter* spp. The highest percentage of isolation was from burns (85.7%), wounds (75.6%), diabetic foot ulcers (75%), urine from UTI and kidney failure (50%), tonsils (30.7%), and from samples of cerebrospinal fluid C.S.F (25%). *Bacillus* spp. was isolated from (55) soil samples collected from Nineveh and Dohuk Governorates, with an isolation rate of (52.7%).

Eleven (11) isolates from *Bacillus* spp. and (13) isolates from *Acinetobacter* spp. were selected based on the morphological and biochemical characteristics, and the diagnosis was confirmed based on 16S rRNA gene sequences to (5) strains of *B. subtilis*-AE, two strains of *B. cereus*-AE, two strains of *B. clausii*-AE, one strain only of *B.thuringiensis*-AE, and only one strain of *Bacillus* sp.-AE and (8) strains of *A. baumannii*-

AE and (5) strains of *A. junii*-AE. Five strains of *B. subtilis* –AE and *B.cereus*-AE were given accession numbers in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The evolutionary relationship was determined for *Bacillus* spp. that was organized in (5) clusters: (A) included strains of type *B. subtilis*-AE at similarity ratio (100%), (B) included strains of type *B.cereus*-AE at similarity ratio (99.8%), (C) included strains of type *B. clausii* –AE at similarity ratio (99.6%), (D) included strains of type *B. thuringiensis* –AE at similarity ratio (99.2%), (E) included strains of type *Bacillus sp*.-AE at similarity ratio (94.4%), which indicated that it belongd to another species. *Acinetobacter* spp. were grouped in to three clusters: (A) included strains of type *A. baumannii* –AE a similarity ratio at (98.1%), (B) included strains of type *A. junii* –AE a similarity ratio at (98.2%), (C) included strains of type themselves at a level of similarity of (98.7%), by using (Mega7) Program Molecular Evolutionary Genetic Analysis and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA).Species of *Bacillus* spp. showed the ability to produce bacteriocin upon initial screening using the Cross Streak method against some gram-positive and gram-negative pathogenic bacterial species, while The effect of bacteriocins from *Bacillus* spp. was different against pathogenic bacteria using well diffusion method. The most effective effect was against strains *Acinetobacter baumannii*-19AE, *Acinetobacter junii*-AE20 and *Acinetobacter baumannii*-22AE.

Some strains of *Bacillus* spp. showed the ability to produce a slime layer on Congo Red Agar media as follows: (27.2%) of the strains were highly biofilm producers, (18.2%) were medium biofilm producers and (54.5%) were non-biofilm producers. However the results of the Microtiter Plate method showed (MTP) showed that (9.09%) of the strains were highly biofilm producers. The strains of *Acinetobacter* spp. were shown to be highly

C

biofilm- producers (53.8%) and medium biofilm producers (46.1%) on CRA medium, while the results on the Microtiter Plate method shown (53.8%) to be highly biofilm- producers and (46.1%) moderate biofilm- producers.

Bacteriocin was extracted with high efficiency and weight (14.2 g/L) from *Bacillus* sp.-AE using the Synthetic Kl medium by the direct method than the sedimentation method, under optimum conditions at a temperature (37) °C, a pH =(7), a concentration of NaCl (1%), and two days incubation period.

The lowest inhibitory concentration (MIC) of bacteriocin that was extracted from

Bacillus sp.-AE against pathogenic isolates was between (625-2500) µg/ml, while the sub MIC concentration between (312.5-1250) µg/ml using micro-dilutions method, as its ability to form biofilm was changed from highly productive to non-productive by inhibiting its adhesion on Surfaces. The bacteriocin isolated was found to be thermally stable and its inhibitory activity was not affected at a temperature of (60)°C, while it lost its effectiveness at temperatures (70, 80) °C for half an hour.

The total protein content of bacteriocin was estimated by Lowrey's method for *Bacillus* sp.-AE to give (600) mg / ml under (24) hour in (37)° C and at pH=(7).

The bacteriocin extracted from *Bacillus* sp.-AE was identified as a Mersacidin-type antibiotic. Mersacidin is a protein complex consisting of a peptide; The value of Rf was (0.70) by TLC method, while its molecular weight was approximately less than (5) kDa by Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE GEL).

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

Antibiofilm activity of bacteriocin produced by *Bacillus spp.* against some pathogenic bacteria

A Thesis submitted by

Alaa Nazar Mahmood Mohammed Saeed Al-Najim

M.SC. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised by

Professor

Dr. Essra Ghanim Hazim Alsammak

1444 A.H. **2023 A.D.**