



جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

الوصف الجزيئي لببتيد العقد الجذرية الغنية بالسستين لبعض النباتات البقولية وفعاليتها المضادة للبكتريا المرضية متعددة المقاومة للأدوية

أريان محمد حامد اسماعيل الزبيدي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ

الدكتورة نجوى إبراهيم خليل البرهاوي

٢٠٢٦ م

١٤٤٧ هـ

الخلاصة:

يُعد استخدام المركبات النباتية الطبيعية كبداًل في معالجة البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة توجهاً علمياً بالغ الأهمية، لما تمتلكه هذه المركبات من فعالية حيوية وآليات عمل متعددة تسهم في الحد من تطور المقاومة للأدوية، فضلاً عن دورها في تحقيق مكافحة حيوية مستدامة وأمنة لمسببات الأمراض البشرية. لذلك أُجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية- قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الموصل، بهدف عزل وتشخيص ببتيديات العقد الغنية بالسستين Nodule Cysteine-Rich Peptide (NCRP) من أربعة نباتات بقولية هي الباقلاء و الجت و البرسيم الأبيض و الفاصوليا (*Vicia faba* L. ، *Medicago sativa* L. ، *Trifolium repens* L. و *Phaseolus vulgaris* L.)، وتقييم فعاليتها كمركبات حيوية واعدة في تثبيط البكتيريا الممرضة المقاومة للأدوية المتعددة.

لعزل وتشخيص ببتيديات NCRP ، تم تعريض العقد الجذرية للموجات فوق الصوتية Ultra-sonication، ثم عُولمت بتقنية الترحيل الكهربائي للهلام متعدد الأكريلاميد Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ، والذي أظهر وجود حزم بروتينية واضحة بوزن جزيئي يقارب 60 كيلودالتون. وأكّدت نتائج جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)، وجود أربع قمم مميزة للببتيديات المعزولة من الأنواع النباتية الأربعة، مع اختلاف تراكيزها. بينما أوضحت المحاذاة بين تسلسلات الأحماض الأمينية أن الببتيديات تتميز ببنية خطية تبدأ غالباً بالميثيونين، وتحتوي على مقاطع غنية بالأحماض الكارهة للماء، مع حفظ واضح لبقايا السستين المسؤولة عن تكوين الروابط ثنائية الكبريت التي تمنح الببتيديات استقراراً عالياً. وأظهر التحليل النسبي للأحماض الأمينية وفرة عالية من الأحماض القاعدية اللايسين Lys والارجنين Arg ، ونسباً معتدلة من الأحماض الكارهة للماء، مما يعكس

مرونة الببتيدات وطبيعتها موجبة الشحنة. ووفق التحليل التطوري، كان أقرب الأنواع لبعضها هما *M. sativa* L. و *T. repens* L.، يرتبط هذان النوعان بشكل أبعد بنبات *V. faba* L. في حين كان *P. vulgaris* L. الأكثر بُعداً، وأبرزت النمذجة ثلاثية الأبعاد وجود مزيج من حلزونات ألفا وصفائح بيتا ومناطق مرنة، مع توزيع واضح للمناطق القطبية وغير القطبية على السطح البروتيني.

تم تشخيص خمسة أنواع بكتيرية مُمرضة (*Proteus*، *Pseudomonas aeruginosa*)، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Acinetobacter baumannii*، *mirabilis*) مقاومة للادوية المتعددة من 25 عزلة بكتيرية تم الحصول عليها من مستشفى الحروق والجروح ومستشفى السلام التعليمي العام في مدينة الموصل، اعتماداً على الصفات التقليدية ونظام VITEK®2 .

لتقييم التأثير التثبيطي للببتيدات NCRs مختبرياً، أظهرت ببتيدات العقد الغنية بالسستين الأربعة (NCR1، NCR2، NCR3، و NCR4، العائدة لنبات الباقلاء، الجت، البرسيم الابيض، والفاصوليا، على التوالي) نشاطاً مثبطاً متفاوتاً ضد البكتريا المختبرة باستخدام طريقة الانتشار بالحفر وبالأقراص وباستخدام ستة تخافيف مختلفة. بشكل عام كانت بكتيريا *P. aeruginosa* و *A. baumannii* و *P. mirabilis* الأكثر مقاومة للببتيدات، بينما أظهرت *E. coli* و *S. aureus* حساسية أعلى. وفي اختبار أطباق المعايرة الدقيقة Microtiter plates، حققت الببتيدات نسب تثبيط مرتفعة؛ متفوقة على المضادات الحيوية المستخدمة للمقارنة. بينما أظهرت قيم MIC و MBC طيفياً، تأثير الببتيدات الأولى NCR1 والثالثة NCR3 والرابعة NCR4 كانت متطابقة تقريباً في ثلاث سلالات سالبة لصبغة كرام: *P. aeruginosa* و *P. mirabilis* و *E. coli*. من جانب آخر، لوحظ تفاوت واضح في هذه القيم بالنسبة لكل من *A. baumannii* و *S. aureus*. وكانت البكتريا بشكل عام أكثر حساسية للببتيد الثاني NCR2 المعزول من نبات الجت بدلالة انخفاض قيم هذين التركيزين، من ناحية أخرى، بينت الدراسة اختلاف النتائج بين القياس البصري والطيفي، وهو أمر متوقع نظراً لاختلاف حساسية الطريقتين. وفيما يتعلق بتكوين الأغشية الحيوية، لوحظ أن تأثير الببتيدات كان غير ثابت؛ إذ تراوح بين التحفيز والتثبيط بحسب التركيز ونوع البكتريا، مع تسجيل أعلى تحفيز للببتيد الرابع المعزول من العقد الجذرية لنبات الفاصوليا تجاه *S. aureus* عند التركيز 1.6 ميكروغرام/مل. وأظهرت الدراسات المظهر الشكلي بالمجهر الإلكتروني الماسح

Scanning Electron Microscope (SEM) وبشكل عام أنَّ الخلايا البكتيرية الممرضة غير المعاملة كانت ذات شكل طبيعي و سطح ناعم وسليم، في حين بدت الخلايا المعاملة بتشوهات واضحة، تضمنت انبعاجات، تشققات، انتفاخات، انهيار الجدار الخلوي، وفقدان محتوى الخلية، وهو دليل مباشر على التأثير السلبي المدمر لببتيدات NCR على الغشاء. وظهرت بكتيريا الرايزوبيوم التعايشية بحالة سليمة مقارنة بالخلايا المعاملة التي أظهرت سطحاً خشناً متضرراً.

عند تقييم نشاط ببتيـد NCR2 داخل الجسم الحي، باستخدام جروح الجرذان المصابة ببكتيريا *S. aureus* و *P. aeruginosa*، أثبت الببتيد NCR2 فعالية أعلى من Erythromycin و Ciprofloxacin؛ إذ حقق الشفاء الكامل خلال 17 يوماً، وكان التركيز المنخفض 6.25 ميكروغرام/مل أكثر فاعلية من التركيز المرتفع. كما انخفضت أعداد البكتيريا في الجروح بصورة أكبر مقارنة عند المعاملة بالمضادات الحيوية، مع تأثير متقارب على البكتيريا الممرضة التي تصيب نبات الجت الموجبة والسالبة لصبغة كرام، وعند التحليل الاحصائي تبين ان النتائج مطابقة للنتائج المختبرية وذات تأثير معنوي عند نسبة احتمال (p 0.05).

شُخِّصت البكتيريا المتعايشة مع نبات الجت باستخدام بادئ الجين *16S rRNA*، وأظهرت النتائج مطابقة بنسبة 94% مع العزلة *Sinorhizobium meliloti* strain G3L3، وسُجِّلَت العزلة الجديدة تحت الاسم *Sinorhizobium meliloti* strain AN بالرقم الدولي PX490820.1 في بنك الجينات. وكُشِفَ جزيئياً عن امتلاك هذه البكتيريا لجينات *yejB*، *lpsB*، و *poH1* التي تؤدي دوراً في حمايتها من تأثير ببتيـدات NCR في العقد الجذرية لنبات الجت ومن ثم تمايزها الى شكل البكتريويد المثبت للنتروجين الجوي.

Abstract

The use of natural plant compounds as alternatives in treating multi-antibiotic resistance bacteria is a highly important scientific trend, given the biological activity and multiple mechanisms of action these compounds possess that contribute to reducing the development of resistance, as well as their role in achieving sustainable and safe biological control of human pathogens. Therefore, study was conducted in the Molecular Genetics Laboratory, Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, with the aim of isolating and characterizing cysteine-rich peptides (NCRs) from the root nodules of four legume plants: broad beans, white clover, alfalfa, and broad beans (*Vicia faba* L., *Medicago sativa* L., *Trifolium repens* L., and *Phaseolus vulgaris* L.), and evaluating their efficacy as promising bioactive compounds in inhibiting multidrug-resistant pathogenic bacteria.

After ultrasonication of the root nodules, they were treated with polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), which revealed the presence of distinct protein bands with a molecular weight of approximately 60 kDa. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) results confirmed the presence of four distinct peaks in the peptides isolated from the four plant species, with varying concentrations. Amino acid sequence alignment revealed that the peptides have a linear structure, often starting with methionine, and contain hydrophobic acid-rich segments. Cysteine residues, responsible for disulfide bond formation, were also clearly conserved, contributing to the peptides' high stability. The relative analysis of amino acids showed a high abundance of the basic amino acids lysine (Lys) and arginine (Arg), and moderate proportions of hydrophobic acids, reflecting the peptides' flexibility and positively charged nature. Phylogenetically, the closest related species were *M. sativa* L. and *T. repens* L., while *V. faba* L. was the most distantly related, and *P. vulgaris* L. the most distant. Three-dimensional modeling highlighted a mixture of alpha helices, beta sheets, and flexible regions, with a clear distribution of polar and nonpolar areas on the protein surface.

Five pathogenic bacterial species (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) were identified as multidrug-resistant from 25 bacterial isolates obtained from the Burns

and Wounds Hospital and Al-Salam General Teaching Hospital in Mosul, based on traditional characteristics and the VITEK®2 system.

To evaluate the Inhibitory Effect of NCR Peptides *in Vitro*, the four cysteine-rich nodal peptides (NCR1, NCR2, NCR3, and NCR4, belonging to *Vicia faba*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens*, and *Phaseolus vulgaris* respectively) showed inhibitory activity against the tested bacteria using the pitting and disc diffusion methods, and at six different dilutions. Overall, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *P. mirabilis* were the most resistant to the peptides, while *E. coli* and *S. aureus* showed higher sensitivity. In microtiter plates, the peptides achieved high inhibition rates. Spectroscopic MIC and MBC values showed that the effects of the first NCR1, third NCR3, and fourth NCR4 peptides were almost identical in three Gram-negative strains: *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, and *E. coli*. However, a clear difference in these values was observed for *A. baumannii* and *S. aureus*. The bacteria were generally more sensitive to the second NCR2 peptide, as evidenced by the lower values of these two concentrations. On the other hand, the study revealed a discrepancy between the results obtained through optical and spectroscopic measurements, which are expected to be given the different sensitivities of the two methods. Regarding biofilm formation, the effect of the peptides was observed to be inconsistent, fluctuating between stimulation and inhibition depending on the concentration and bacterial species. The highest stimulation of peptide four against *S. aureus* was recorded at a concentration of 1.6 µg/ml. Scanning Electron Microscopy (SEM) morphological studies generally showed that untreated bacterial cells had a normal shape and a smooth, intact surface, while treated cells exhibited clear deformities, including indentations, cracks, bulges, cell wall collapse, and loss of cell contents. This is direct evidence of the destructive effect of NCR peptides on membrane integrity. Furthermore, symbiotic Rhizobium bacteria appeared unaffected compared to the treated cells, which displayed a rough, damaged surface.

While evaluating NCR2 peptide activity *in Vivo* by treating wounds of rats infected with *S. aureus* and *P. aeruginosa*, the NCR2 peptide demonstrated greater efficacy than Erythromycin and Ciprofloxacin, achieving complete healing within 17 days. The lower concentration (6.25 µg/ml) was more effective than the higher concentration. Bacterial counts in the wounds were also reduced more significantly compared to the antibiotics, with similar effects on both Gram-positive and Gram-

negative bacteria. Finally, statistical analysis showed that the results matched the laboratory results with a significant effect at p value equals to 0.05.

The bacteria symbiotic with alfalfa were identified using 16SrRNA primers. The results showed a 94% match with the isolate *Sinorhizobium meliloti* strain G3L3. The new isolate was registered as *Sinorhizobium meliloti* strain AN with the international number PX490820.1 in GenBank. It was also revealed that these bacteria possess the genes *yejB*, *lpsB*, and *poH1*, which play a role in protecting them from the effects of NCR peptides in the root nodules of alfalfa plants and then differentiating them into the form of atmospheric nitrogen-fixing bacteriophage.

University of Mosul
College of Education
for Pure Science



**Molecular Characterization of Nodule
Cysteine-Rich Peptides from Legume Plants and
Their Antimicrobial Activity Against
Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria**

Aryan Mohammed Hamid Ismail Al-Zubaidy

Ph.D. Thesis
Biology

Supervised by
Prof.

Dr. Najwa Ibrahim Khaleel Al-Barhawee

2026 A.D

1447 A.H