

**Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Mosul/College of science
Department of Biology**



Molecular Detection of Bioactive Actinobacteria Against ESKAPE Bacteria

Maryam Hazim Abduljabbar Othman Alhayali

MSc.Thesis

Biology/Microbiology

Supervised by

Assist.Prof. Dr. Talal Sabhan Salih

1444 A.H.

2022 A.D.

Supervisor Certification

This is to certify that this thesis entitled “ **Molecular Detection of Bioactive Actinobacteria Against ESKAPE Bacteria**” was prepared under my supervision at the Biology Department/ College of Science/ University of Mosul, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Biology /Microbiology.

Signature:

Name: Dr. Talal Sabhan Salih

Date:

Report of the Linguistic Evaluator

I certify that the linguistic evaluation of this thesis “**Molecular Detection of Bioactive Actinobacteria Against ESKAPE Bacteria**” was carried out by me and it is accepted linguistically and in expression.

Signature:

Name: Dr. Salih Abdullah Abdulrahman

Date:

Report of the Director for the Postgraduate Committee

In view of the available recommendations, I forward this thesis for debate by Examining Committee.

Signature:

Name: Dr. Raed Salim Alsaffar

Date:

Report of the Head of Biology Department

In view of the available recommendations, I forward this thesis for debate by Examining Committee.

Signature:

Name: Dr. Raed Salim Alsaffar

Date:

Abstract

Rising levels of antimicrobial resistance is one of the greatest global threats to public health with international attention. *Acinetobacter baumannii*, one of the ESKAPE pathogens, is placed on the top list bacteria leading to nosocomial infections with a wide range of antibiotic resistance for almost all classes of antibiotics including carbapenem.

In this study, 114 samples were collected 42 from soils from different locations north of Iraq and other areas and 75 clinical specimens for swab were collected from patients suffering from respiratory tract infections from Al- Shifa Hospital and two private medical clinics in Mosul city for a period of three months (December 2021 to February 2022).

Using a very restricted approach, the specimens were cultured and purified on HiCrome™ *Acinetobacter* Agar medium, seven clinical *A. baumannii* isolated and confirmed with 44°C on HiCrome™ *Acinetobacter* Agar medium and IMViC then *gyrB* gene sequencing. The *A. baumannii* isolates showed six sequence types (STs) and exhibited different multi-drug/extended-drug resistant (MDR/XDR) regimes. All the *A. baumannii* isolates were resistant to oxacillin, amoxicillin and clindamycin (100%), whereas exhibited various resistance profiles to tetracycline (86%), azithromycin (71%), cefepime (57%). On the other hand, all the isolates were sensitive to imipenem (100%), whereas sensitivity to chloramphenicol, levofloxacin and ceftriaxon was (43%).

The cultural characteristics of 42 of actinobacterial strains were elucidated on International Streptomyces Project media (ISP2-ISP7). ISP-3 and ISP-5 media were chosen as a model media for validation RGB (red green blue) colour digits as a potential differentiation method for actinobacterial strains. Ten of 42 isolates were biologically active against

tested ESKAPE, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas paetica* pathogens when cultured on different ISPs media under the OSMAC (One strain multiple compound) approach. *Streptomyces* sp. strain MT26 was able to inhibit the growth of one clinical *A. buamannii* isolate when cultured on ISP-3 medium after 50 days. Six representative isolates that exhibited antimicrobial activity against all or almost tested bacteria were sequenced using 16S rRNA gene. The sequences were compared with those of other actinobacterial strains that are found in Genbank database to find the best similarity and the close reference strains to our isolates. Five of the sequenced strains have been identified as *Streptomyces* species and one was identified as a rare actinobacterial strain *Lentzea* species. Genbank accession numbers of our nucleotide sequences have been provided and deposited in the NCBI.

The results obtained from the whole genome sequencing (WGS) using Ion Torrent technology, genome annotation using RAST bioinformatics tools and genome mining for biosynthetic gene clusters (BGCs) using AntiSMASH bioinformatics database revealed that the isolate *Streptomyces* MT29 harbor 35 putative BGCs of differential classes of biosynthetic secondary metabolites. Some of these BGCs may be rich sources for new natural compounds that have not been discovered under standard laboratory conditions within the genera of actinobacteria.

الخلاصة

يعد ارتفاع مستويات مقاومة مضادات الميكروبية أحد أكبر التهديدات العالمية للصحة العامة مع الاهتمام الدولي. تم وضع *Acinetobacter baumannii* ، أحد مسببات الأمراض ESKAPE ، حيث توضع على رأس قائمة البكتريات التي تشير الى عدوى المستشفيات , تعتبر مقاومة لمجموعة واسعة من المضادات تقريبا , تقريبا جميع أصناف المضادات بما في ذلك الكاربابينيم.

في هذه الدراسة، تم جمع ١١٤ عينة , ٤٢ عينة من التربة من مواقع مختلفة شمال العراق ومناطق أخرى , ٧٥ عينة سريرية من مسحات من الفم والأنف من المرضى الذين يعانون من التهابات الجهاز التنفسي من مستشفى الشفاء وعيادتين طبيتين خاصتين في مدينة الموصل لمدة ثلاثة أشهر للفترة بين (ديسمبر ٢٠٢١ إلى فبراير ٢٠٢٢) .

باستخدام نهج مقيد للغاية، تم استزراع وتنقية بكتريات المرضيه على HiCrome™ Acinetobacter Agar، وتم عزل سبعة *A. baumannii* السريرية وتأكيدها مع ٤٤ م على وسط الزرع HiCrome™ Acinetobacter Agar واختبار IMVIC وتحليل سلسلة لجين *gyrB*، ظهرت عزلات *A. baumannii* ستة أنواع من التسلسل (STs) وأظهرت مقاومتها للعديد من المضادات (MDR/XDR) ، أظهرت عزلات *A. baumannii* مقاومتها للأوكساسيلين والأموكسيسيلين والكلينداميسين نسبة (١٠٠٪)، في حين أظهرت العديد منها مقاومتها للتتراسيكلين نسبة (٨٦٪)، أزيثروميسين نسبة (٧١٪)، سيفيبيم نسبة (٥٧٪) لكل واحدة منهم . من ناحية أخرى، كانت جميع العزلات حساسة للإيميبينيم (١٠٠٪) ، بينما كانت الحساسية للكلورامفينيكول والليفوفلوكساسين والسيفترياكسون (٤٣٪)

تم توضيح الخصائص الزرعية لـ ٤٢ سلالة مزروعة على أوساط ISPs (ISP2-ISP7). ثم تم اختيار ISP-3 و ISP-5 كوسيلة نموذجية للتحقق من صحة أرقام ألوان RGB كطريقة تمايز محتملة للسلاسل البكتيرية البروتينية. كما تم استخدام بكتريات مرضية قياسية ESKAPE

(K. pneumoniae (E. coli ATCC 25922), (S. aureus ATCC 43300) ATCC 700603 (A. baumannii ATCC 19606) (P. aeruginosa ATCC 27853) , وبكتريات مرضيه (B. subtilis ATCC 23857) P. baetica strain (a390) , كانت عشرة من ٤٢ عزلة أكتينوبترية نشطة حيويًا ضد اختبار ESKAPE و *Bacillus subtilis* و *pseudomonas paetica pathogens* عند استزراعها على اوساط

ISPs تحت نظام سلالة واحدة لعدة مركبات كانت MT26 السلالة قادرة على تثبيط نمو واحدة من العزلات السريرية *A. baumannii*

كانت عشرة من أصل 42 عزله نشطه بايولوجيا ضد اختبار ESKAPE وبكتريات المرضيه *Bacillus subtilis* و *pseudomonas paetica* عند زرعها على أوساط ال ISPs تحت نظام سلالة واحدة لعدة مركبات (OSMAC) كانت العزلة MT 26 لسلاله *Streptomyces* sp. قادرة على تثبيط نمو عزله سريره واحد من *A. baumannii* عند زرعها على وسط

ال ISP3 بعد ٥٠ يوم

كما تمثلت الست عزلات بأظهار نشاط مضاد للميكروبات ضد كل او معظم البكتريات المختبريه المتسلسله بأستخدام جين 16S rRNA تمت مقارنة هذه التسلسلات مع تسلسلات الاكتينو الاخرى الموجودة في قاعدة البيانات لبنك السلالات للعثور على أفضل تشابه وسلالات مرجعيه قريبه لعزلاتنا ,تم التعرف على خمسة من السلالات المتسلسله على أنها انواع *streptomyces* sp. وتم تحديد واحد كسلاله أكتينو نادرة لنوع *Lenteza* حيث قدمت أرقام أنضمام بنك الجينات لتسلسل النكليوتيدات لدينا وأودعت في NCBI

وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها من تسلسل الجينوم بأكمله (WGS) باستخدام تقنية Ion Torrent وتعليق الجينوم بأستخدام أداة RAST للمعلوماتية الحيوية و (genomemining) لمجموعات الجينات الحيوية (BGCs) بأستخدام قاعدة بيانات المعلوماتية الحيوية AntiSMASH ان عزل *Streptomyces* MT29 تضم 35 من BGCs المفترضه لاصناف متميزة لايش ثانوي حيوي . تكون ذات BGCs ربما تكون ذو مصادر غنيه بالمركبات الطبيعيه الجديده لم تكن مكتشفة تحت ظروف مختبريه قياسيه ضمن أجناس البكتريه الاكتينيه



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

التشخيص الجزيئي للبكتريا الخيطية الفعالة الحيوية ضد

جراثيم ESKAPE

مريم حازم عبدالجبار عثمان الحياي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور طلال سبهان صالح

٢٠٢٢ م

١٤٤٤ هـ