جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

الكشفُ الجزيئي عن الزوائفِ المتألقةِ وجينات الضراوة من حليبِ الأبقارِ والجبن وأسطح الحلمات

أحمد حمدي أحمد المتيوتي

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الصحة العامة البيطرية

إشراف

الأستاذ الدكتورة

منتهى غازي حسن

صفر 1446 هـ

آب 2024 م

الخلاصة

يسهم حفظ الحليب ومنتجاته في درجة حرارة التبريد إلى تعرضه للفساد الميكروبي والناجم عن نمو بعض أنواع الزوائف وأبرزها الزوائف المتألقة *Pseudomonas fluorescens* لكونها من الجراثيم المحبة لدرجة حرارة التبريد psychrotroph وتمتلك قابلية إحداث الفساد بفعل الإنزيمات التي تحلل البروتينات والدهون مثل إنزيم البروتيز وإنزيم اللايبيز خلال مُدَّة الخزن. لذا هدفت الدراسة الحالية إلى الكشف عن مدى وجود جراثيم الزوائف المتألقة في حليب الأبقار الخام ومنتجاته في الجبن والأسطح المحيطة له؛ إذ جمعت 200 عينة توزعت بواقع 50 عينة لكل من حليب الأبقار الخام والجبن المحلي و50 مسحة من أسطح حلمات الضرع وخزانات الحليب من مناطق مختلفة في محافظة نينوى، أجري العد الكلي للزوائف على عينات الحليب لثلاث فترات زمنية شملت اليوم الأول لجمع العينة وبعد مرور ثلاثة أيام وستة أيام للحليب المحفوظ بدرجة حرارة التبريد. شخصت الزوائف المتألقة اعتمادًا على الخصائص المظهرية فضلًا عن التشخيص الجزيئي بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن وجود الجين *16srRNA*. وأظهرت نتائج الدراسة وجود جراثيم الزوائف المتألقة في عينات الدراسة بنسبة عزل كلية بلغت (24.5%) وكانت أعلى نسبة لعزل الزوائف المتألقة في حليب الأبقار الخام وبنسبة (38%) ومن عينات الجبن بنسبة (20%)، بينما عزلت الزوائف المتألقة من أسطح حلمات الضرع بنسبة (22%) ومن خزانات الحليب بنسبة (18%) وكان معدل العدد الكلي للزوائف في حليب الأبقار لليوم الأول (4.4) لوغاريتم وحدة تكوين المستعمرة لكل مل وبعد حفظ الحليب بدرجة حرارة الثلاجة لمدة ثلاثة أيام وستة أيام (6.3) و(7.4) لوغاريتم وحدة تكوين المستعمرة لكل مل على التوالي . وكُشِف عن ضراوة عزلات الزوائف المتألقة والمعزولة من حليب الأبقار والجبن ومن أسطح حلمات الضرع وخزانات الحليب من حيث قدرتها على إنتاج إنزيم البروتيز وإنزيم اللايبيز اعتمادًا على بعض جينات الضراوة متمثلة بكل من *aprX* و*lipM*، واستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل؛ إذ سجلت جينات *aprX* أعلى نسبة وجود في عزلات الزوائف المتألقة المعزولة من أسطح حلمات الضرع وبنسبة (81.8%) وسجل أعلى نسبة لوجود جين (33.3%) *lipM* لعزلات الزوائف المتألقة المعزولة من خزانات الحليب دلالة على ضراوة هذه العزلات. فضلًا عن الكشف عن قابلية الزوائف المتألقة المعزولة من عينات الدراسة على تكوين الأغشية الحيوية اعتمادًا على وجود جينات *adnA* و*fliC* إذ أظهرت النتائج أن عزلات الزوائف المتألقة المعزولة من خزانات الحليب تمتلك الجين *adnA* وبنسبة (100%)، وأقل نسبة لوجود هذا الجين في

عزلات الزوائف المتألقة المعزولة من الجبن وبنسبة (40%) بينما كانت جميع عزلات الزوائف المتألقة سالبة لوجود جين *fliC*.

أظهرت نتائج التحليل التتابعي للجين *16srRNA* تطابق تسلسل الجينات المثبتة في قاعدة بيانات (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool والموجودة في الموقع الإلكتروني للمركز الوطني للمعلومات (NCBI) National Center For Biotechnology Information وقد سُجِّل ست عشرة عزلة جرثومية من جراثيم الزوائف المتألقة توزعت بواقع اربع عزلات جرثومية لكل من الجبن وأسطح حلمات الضرع وحليب الأبقار وخزانات الحليب وحصلت العزلات على الرقم المعرف بالتسجيل Gene Bank Accession Number (PP727372, PP727373, PP727374, PP727375, PP727376, PP727377, PP727378, PP727379, PP727380, PP727381, PP727382, PP727383, PP727385, PP727386, PP727387. PP7273784, على التوالي ومن خلال تحليل شجرة النشوء الجيني لهذه العزلات مع العزلات العالمية المسجلة في بنك الجينات لوحظ وجود تقارب العزلات المحلية فيما بينها مع العزلات المسجلة في بنك الجينات والمعزولة من كولومبيا وتايوان والصين والهند ونيجيريا.

استنتجت الدراسة تواجد جراثيم الزوائف المتألقة في حليب الأبقار الخام بنسبة اعلى من تواجدها في الجبن وأسطح حلمات الضرع وقدرتها العالية على انتاج إنزيم البروتيز فضلا عن امتلاك عزلات الزوائف المتألقة قابلية على تكوين الغشاء الحيوي الأمر الذي يزيد من ضراوتها وزيادة خطورتها على صحة المستهلكين للحليب ومنتجاته.

University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Molecular Detection of *Pseudomonas fluorescens* and its Virulence genes from Cow's Milk, Cheese and Teat Surfaces

Ahmed Hamdi Ahmed Al-Mtewty

MSc/Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Public Health

Supervised by

Professor

Dr. Muntaha Ghazi Hasan

2024 A.D **1446 A.H**

Abstract

Preserving milk and its products at cooling temperatures contributes to its exposure to microbial spoilage resulting from the growth of some species of *Pseudomonas*, the most important of which is *Pseudomonas fluorescens* because it is a psychotropics bacteria that favorite cooling temperatures and have the ability to cause spoilage by enzymes that hydrolyze proteins and fats such as protease and lipase enzyme during the storage period. The current research aims were to detect the presence of *Pseudomonas fluorescens* in raw cows milk, cheese and surrounded surfaces in Mosul city, where two hundred samples were collected from different regions in Nineveh governorate, distributed by 50 samples for each of the milk, cheese, teat surfaces and milk tanks. *Pseudomonas* counts in raw milk were done over three periods including (0,3,6 days) of milk preserved at refrigeration temperatures 4^{o}C. *P. fluorescens* was detected based on phenotypic characteristics, as well as the molecular detection using the polymerase chain reaction technique to detect the presence of the *16SrRNA* gene. The results of the research showed the total recovery of *P. fluorescens* in all samples were (24.5%) and the higher recovery rate from raw cow milk was (38%), cheese (20%). *P. fluorescens* was recovered from teat surfaces with a rate of (22%) and from milk tank (18%). The total count of *pseudomonas* in cow milk was (4.4) Log CFU/ml at the 0 day and after storage for three and six days counts reach to (6.3) (7.4) Log CFU/ml respectively. Also, the virulence factors of *P. fluorescens* isolates were detected depending on their abilities to produces protease and lipase enzymes represented by both of *aprX* and *lipM* genes, *aprX* gene revealed higher percentage. In *P. fluorescens* isolates from teat surfaces was at a rate of (81.8%) while higher percentage of *lipM* gene was (33.3%) in *P. fluorescens* isolates from milk tank indicating their virulence as well as the

detection of *P. fluorescens* ability to form biofilms depending on the presence of *adnA* and *fliC* genes. Our results revealed the presence of *adnA* gene in (100%) of pseudomonas isolates from milk tank and low percentage of the presence of *adnA* gene in *P. fluorescens* isolates from cheese (40%), whereas all isolates of *P. fluorescens* were negative to the presence of *fliC* gene. Sequencing analysis of the *16SrRNA* gene showed a 100% match with the sequence of genes in the database (BLAST), which is available on the website according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI), sixteen bacterial isolates from the cheeses, teat surfaces, milk and milk tank, four strains to each of them were registered with the accession numbers (PP727372, PP727373, PP727374, PP727375, PP727376, PP727377, PP727378, PP727379, PP727380, PP727381, PP727382, PP727383, PP7273784. PP727385, PP727386, PP727387) respectively.

By analyzing the phylogenetic tree of each of these sixteen isolates, it was noted the similarity between these two local isolates with each other and with the rest of the isolates registered in the Genome Bank which was isolated from Colombia, Taiwan, China, India and Indonesia.

The study concluded presence of *P. fluorescens* in cows' raw milk in high ratio compared to cheese and teat surfaces, these strains possess a higher ability to produce protease enzyme and higher virulence genes to form biofilms which increased their risk on consumers health.