

University of Mosul
College of Education
for pure Science
Department of Biology



**Bacterial diversity in the Root Canal of Dental
Caries Patients: A Comparative Study using
Metagenomics Analysis Versus Traditional and
Molecular Characterization of *Streptococcus
sanguinis***

Mohammed Mostafa Ramadan mohammed

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Jassim Fatehi Ali

2025 A.D

1447 A.H

Abstract

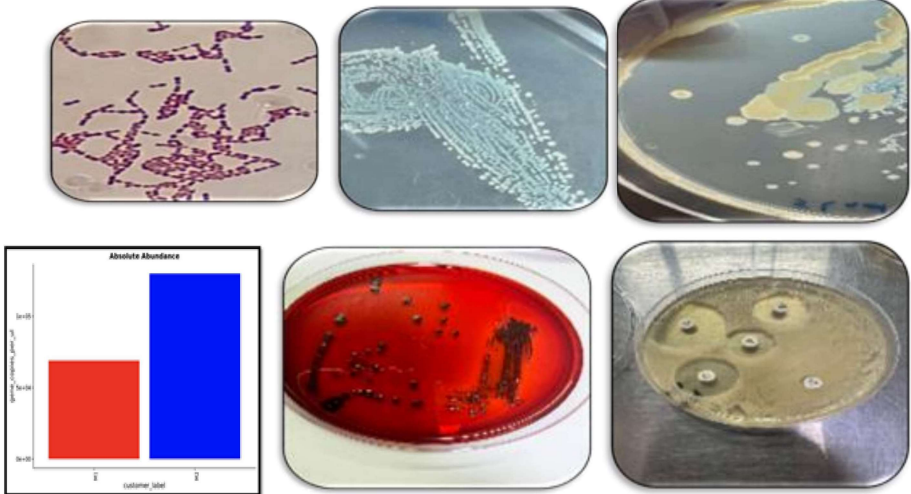
The present study is the first local investigation aimed at characterizing the bacterial diversity of root canals in dental caries patients through comparative analysis of metagenomic, traditional, and molecular identification approaches, with a particular focus on *Streptococcus sanguinis*. Root canal infections significantly contribute to dental caries progression, making it critical to understand the associated microbial community. For traditional and molecular analyses, a total of 50 clinical samples from patients requiring root canal treatment at the Dental Specialized Center/Gulan General Hospital in Douhuk city, Erbil district were collected. Biochemical characterization confirmed typical features of *S. sanguinis* isolates, such as catalase and oxidase negativity, gelatinase negativity, and selective sucrose fermentation. Molecular confirmation through 16S rRNA gene sequencing accurately identified two local isolates submitted to GenBank as *Streptococcus sanguinis* JAMOMOSUL (accession PQ654829) and JAMOMOSUL1 (accession PQ654911), demonstrating 100% sequence homology to global reference strains. Forty-two samples (85%) demonstrated bacterial growth on a novel modified Schaedler agar medium supplemented with hemin and vitamin K. Among these isolates, 19 strains (45.2%) were phenotypically identified as *S. sanguinis* based on distinctive morphological features, including small, round, white to slightly grey colonies.

Antibiotic susceptibility testing provided relevant clinical insights, revealing 100% sensitivity of the *S. sanguinis* isolate to levofloxacin, gentamicin, tobramycin, and vancomycin, while showing 100% resistance to cefixime. Additionally, biofilm formation capacity was assessed on modified Congo Red agar, which showed the high biofilm-forming abilities of *S. sanguinis* as crucial players in biofilm-related root

canal infections. Two specifically selected samples (one healthy and one infected) were subjected to DNA extraction without prior culturing and used directly for metagenomic analysis. We analyzed how information regarding microbial community diversity was obtained from high-throughput metagenomic sequencing on the V3–V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene processed through various bioinformatics pipelines, like DADA2 and QIIME. Using this approach, there was significantly more bacterial diversity and richness present in infected root canals than in healthy controls, and the infected samples were nearly double the number of amplicon sequence variants (296 vs. 162 amplicon sequence variants (ASVs)). A noteworthy finding of increasing anaerobic genera, such as *Prevotella* and *Lactobacillus*, and the first global detection of *Corynebacterium durum* in root canal environments underscores the need for novel taxa in understanding microbial diversity in dental caries. Furthermore, the representative amplicon sequence variants (ASVs) of multiple genera were submitted to NCBI and can be used as a powerful reference dataset for future studies. Phylogenetic analysis conducted using Maximum Likelihood methods proved local *S. sanguinis* isolates to be evolutionarily connected with internationally documented strains while showing genetic diversity that could explain adaptation patterns. The analysis of representative ASVs showed strong evolutionary relationships between different bacterial genera. This validated the taxonomy classification processes.

This study conclusively demonstrates the superiority of metagenomics over traditional and molecular methods in identifying comprehensive microbial communities, thus significantly enhancing diagnostic capabilities and informing effective clinical management strategies in endodontics.

Bacterial diversity in the Root Canal of Dental Caries Patients: A Comparative Study using Metagenomics Analysis Versus Traditional and Molecular Characterization of *Streptococcus sanguinis*
Author: Mohammed Mostafa Ramadan Mohammed Advisor: dr. Jassim Fatehi Ali. Publisher: University of Mosul

| | |
|---|---|
| <p>HIGHLIGHTS</p> <ul style="list-style-type: none"> • First local study comparing metagenomics with traditional root canal analyses. • Accurate identification of <i>S. sanguinis</i> isolates by 16S rRNA and GenBank submission. • Isolates showed resistance to cefixime and high sensitivity to key antibiotics. • Metagenomics revealed greater bacterial diversity in infected root canals. | <p>GRAPHICAL ABSTRACT</p>  |
| <p>Keywords:</p> <p>Root canal infections; <i>Streptococcus sanguinis</i>; Metagenomics; 16S rRNA sequencing; Bacterial diversity; Biofilm formation; Antibiotic susceptibility; Endodontics.</p> | <p>ABSTRACT</p> <p>This study, the first local investigation, characterized bacterial diversity in root canals of dental caries patients by comparing traditional, molecular, and metagenomic methods, focusing on <i>Streptococcus sanguinis</i>. Among 50 clinical samples, 42 (85%) showed bacterial growth, with 19 isolates (45.2%) phenotypically identified as <i>S. sanguinis</i>. Biochemical tests and 16S rRNA sequencing confirmed two local isolates with 100% identity to global reference strains (JAMOMOSUL and JAMOMOSUL1). Antibiotic testing revealed <i>S. sanguinis</i> was highly sensitive to levofloxacin, gentamicin, tobramycin, and vancomycin but resistant to cefixime. The isolates showed strong biofilm-forming ability, highlighting their role in persistent infections. Metagenomic analysis of two samples (healthy vs. infected) revealed significantly greater bacterial diversity in infected canals, nearly doubling the number of amplicon sequence variants (296 vs. 162 ASVs), with an increase in anaerobic genera like <i>Prevotella</i> and <i>Lactobacillus</i>, and the first global detection of <i>Corynebacterium durum</i> in root canals. Phylogenetic analysis confirmed evolutionary relatedness of local <i>S. sanguinis</i> to international strains and validated taxonomic classifications. Overall, metagenomics outperformed traditional and molecular methods, enhancing diagnostic accuracy and guiding effective endodontic treatment strategies.</p> <p>2024 M.Sc. Thesis @Univ. of Mosul, College of Eng., Civ. Eng. Dept. (https://www.uomosul.edu.iq/).</p> |

List of Content

| NO. | Subject | Page |
|---------------------------------------|---|------|
| | Abstract | I |
| | List of Content | IV |
| | List of Tables | X |
| | List of Figures | XII |
| Chapter One/ Introduction | | |
| | Introduction | 1 |
| | The study aimed to: | 4 |
| Chapter Two/ Literature review | | |
| 2.1 | Etiology and Pathogenesis of Dental Caries | 5 |
| 2.1.1 | Causes and Microbial Involvement in Dental Caries | 5 |
| 2.1.2 | Microbial Shifts in the Progression of Caries | 7 |
| 2.1.3 | Bacterial Invasion into the Root Canal System | 8 |
| 2.2 | Root Canal Infections and Bacterial Diversity | 9 |
| 2.2.1 | Classification of Root Canal Infections | 9 |
| 2.2.2 | Microbial Composition in Primary Root Canal Infections | 10 |
| 2.2.3 | Microbial Composition in Secondary and Persistent Root Canal Infections | 10 |
| 2.3 | <i>Streptococcus sanguinis</i> : Key Species in Root Canal Ecology | 11 |
| 2.3.1 | Taxonomy and Historical Perspective | 11 |
| 2.3.2 | Morphological and Growth Characteristics | 12 |

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة، وهي الأولى محلياً، إلى توصيف التنوع البكتيري في قنوات الجذور لدى مرضى تسوس الأسنان من خلال مقارنة بين الطرق التقليدية والجزيئية وتقنيات التحليل الميتاجينومي (Metagenomics)، مع التركيز بشكل خاص على بكتيريا *Streptococcus sanguinis*. تُعتبر إصابات قنوات الجذور عاملاً رئيسياً في تطور تسوس الأسنان، مما يجعل من الضروري فهم المجتمع الميكروبي المصاحب لها. من أجل التحليل التقليدي والجزيئي، جُمعت 50 عينة سريرية من مرضى احتاجوا إلى علاج لقنوات الجذور في المركز التخصصي لطب الأسنان بمستشفى كولان العام في محافظة دهوك، قضاء عقرة. أظهرت 42 عينة (84%) نمواً بكتيرياً على وسط زرع جديد من نوع Schaedler المعدل والمدعم بالهيمين وفيتامين K. من هذه العزلات، تم تشخيص 19 سلالة (45.2%) ظاهرياً على أنها *S. sanguinis*. بناءً على سمات مورفولوجية مميزة مثل المستعمرات الصغيرة، الدائرية، البيضاء إلى رمادية اللون قليلاً.

أكدت الخصائص الكيميائية الحيوية الميزات النموذجية لعزلات *S. sanguinis*، مثل السلبية للكتاليز والأوكسيداز، والسلبية للجلاتيناز، والتخمير الانتقائي للسكروز. التأكيد الجزيئي من خلال تسلسل جين 16S rRNA حدد بدقة عزلتين محليتين تم تقديمهما إلى GenBank على أنهما *S. sanguinis* JAMOMOSUL (رقم الإيداع PQ654829) و JAMOMOSUL1 (رقم الإيداع PQ654911)، والتي تطابقاً تاماً بنسبة 100% مع السجلات المرجعية العالمية، وأظهرت النتائج حساسية عالية لعزلات *S. sanguinis* تجاه مضادات الليفوفلوكساسين (Levofloxacin)، والجنتاميسين (Gentamicin)، والتوبراميسين (Tobramycin)، والفانكوميسين (Vancomycin)، في حين كانت مقاومة لمضاد السيفيكسيم (Cefixime). تؤكد هذه النتائج على أهمية الاستخدام الرشيد للمضادات الحيوية في الممارسة العلاجية لقنوات الجذور، مع التأكيد على اختيار العلاج وفقاً لحساسية المضاد الحيوي. كذلك تم تقييم قدرة البكتيريا على تكوين الأغشية الحيوية (Biofilm) على الوسط المغذي الكونغو الأحمر المعدل (Modified Congo Red agar)، حيث أظهرت النتائج قدرة عالية لـ *S. sanguinis* على تكوين الأغشية الحيوية، والتي تعد عاملاً رئيسياً في التهابات قنوات الجذور المرتبطة بالأغشية الحيوية. بالإضافة إلى ذلك، تم اختيار عينتين (واحدة من قناة جذر سليمة وأخرى مصابة) وأجريت عملية استخلاص الحمض النووي (DNA) مباشرة دون زراعة مسبقة لغرض التحليل الميتاجينومي. تمت دراسة التنوع الميكروبي باستخدام التسلسل عالي الإنتاجية

(High-throughput sequencing) لمنطقة V3–V4 المتغيرة في الجين 16S rRNA وتحليل البيانات باستخدام منصات معلوماتية حيوية مثل DADA2 و QIIME. أظهرت هذه الطريقة وجود تنوع وراثي أكبر بشكل واضح في قنوات الجذور المصابة مقارنة بالقنوات السليمة، حيث تضاعف تقريباً عدد المتغيرات التسلسلية (Amplicon Sequence Variants, ASVs) في العينات المصابة (296 مقابل 162 متغيراً). ومن النتائج المهمة أيضاً ملاحظة ارتفاع في أجناس بكتيرية لا هوائية مثل *Prevotella* و *Lactobacillus*، بالإضافة إلى الكشف الأول عالمياً عن بكتيريا *Corynebacterium durum* في بيئة قنوات الجذور، مما يشير إلى ضرورة دراسة أجناس بكتيرية جديدة لفهم التنوع الميكروبي في تسوس الأسنان بشكل أفضل. كما تم تقديم المتغيرات التسلسلية الممثلة لعدة أجناس بكتيرية إلى قاعدة بيانات NCBI، لتصبح مرجعاً قوياً للدراسات المستقبلية. وأظهر التحليل الوراثي (Phylogenetic analysis) باستخدام طريقة الاحتمالية القصوى (Maximum Likelihood) أن عزلات *S. sanguinis* المحلية مرتبطة تطورياً بالسلالات العالمية الموثقة مع وجود تنوع جيني قد يفسر أنماط التكيف. وأكد تحليل المتغيرات التسلسلية الممثلة صحة إجراءات التصنيف التصنيفي من خلال إظهار ارتباطات تطويرية قوية بين أجناس بكتيرية مختلفة.

تؤكد هذه الدراسة بشكل قاطع تفوق التحليل الميتاجينومي على الطرق التقليدية والجزئية في تحديد المجتمعات الميكروبية بشكل شامل، مما يعزز بشكل كبير من القدرات التشخيصية ويسهم في تطوير استراتيجيات علاجية فعّالة في مجال طب الأسنان وجراحة قنوات الجذور . (Endodontics).



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

التنوع البكتيري في قناة الجذر لدى مرضى تسوس الاسنان :
دراسة مقارنة باستخدام التحليل الميتاجينومي مقابل التشخيص
التقليدي والجزئي لبكتريا *Streptococcus sanguinis*

محمد مصطفى رمضان محمد

رسالة ماجستير

علوم الحياة

باشراف

الاستاذ المساعد

الدكتور. جاسم فتحي علي