

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



**Genetic characterization of biphenyl degrading
bacteria isolated from environmental and clinical
sources in Mosul city**

Raghda Mohammed Subhi Taha Alzubaidy

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Rayan Mazin Faisal Al-Obaidy

1444 A.H

2023 A.D.

Abstract

This study involved the isolation and molecular identification of biphenyl degrading bacteria isolated from 100 stool samples and 55 soil samples collected from different sources in Nineveh governorate during the period September 2021 to February 2022. For this purpose, biphenyl degraders were isolated from soil samples incubated in DSMZ minimal media containing biphenyl as a sole source for carbon and energy. Results showed that 16.4% of the samples showed positive results by forming turbidity in DSMZ broth medium and forming colonies on DSMZ agar containing biphenyl and not on negative control plates, while 83.6% of the samples did not contain biphenyl degrading organisms. Results also showed that the samples with the highest source of biphenyl degraders was Mishraq sulfur station soil (33.33%) followed by sewage soil (28.57%), on the other hand no biphenyl degraders were isolated from oil refinery soils, agricultural soils and garden soils. Isolates were diagnosed based on their cultural characteristics and 16S rRNA gene sequence, submitted to NCBI and given the initials RM. A total of 9 biphenyl degrading isolates were identified from both Gram positive and Gram negative bacteria. Five isolates were Gram positive that included two *Rhodococcus pyridinivorans* strains, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. and *Microbacterium barkeri* and three isolates were Gram negative that included *Extensimonas perlucida*, *Pseudomonas luteola* and *Achromobacter* sp. Our results introduced for the first time worldwide the ability of *E. perlucida* to use biphenyl as a sole source for carbon and energy.

Throughout analysis of 100 stool sample we did not detect the ability of an *Enrrobacteriaceae* member to degrade biphenyl.

The growth rate of the nine biphenyl degraders under study was identified by growing the strains individually in DSMZ broth medium and measuring the absorbance OD₆₀₀ at different time points. Growth rates varied with different strains reflecting the efficiency of their enzymes in degrading biphenyl. The

II

growth rate (doubling time) was 24.79 hours for *E. perlucida* RM1, 17.05 hours for *Rh. pyridinivorans* RM2, 17.69 hours for *Rh. rhodochrous* RM3, 16.80 hours for *Rhodococcus* spp. RM4, 19.43 for *Rhodococcus* spp. RM5, 19.65 for *Achromobacter* sp. RM6, 16.48 hours for *M. barkeri* RM7, 16.93 for *Rh. pyridinovorans* RM8 and 16.99 for *P. luteola* RM9. Duplication of the strains on DSMZ containing biphenyl as a sole source for carbon and energy provides another proof for the ability of the strains under study to metabolize biphenyl.

Six different primers were used to identify the presence of biphenyl degrading genes in the isolates under study. The primer BPHD-f3 and BPHD-r1 was used to amplify a 524bp DNA fragment from the Rieske non-heme iron dioxygenase gene expected to be used in the initial step of biphenyl degradation. Our results showed that 5/9 (55.55%) of our biphenyl degrading strains amplified this fragment indicating the presence of this gene in these biphenyl degrading strains. The second set of primers (Rieske_f and ARHD2R) was used to target the 382bp fragment that represents the Rieske cofactor of the biphenyl dioxygenase. Throughout nine isolates only *E. perlucida* amplified the 382bp target providing a second proof that the biphenyl dioxygenase used by this strain is a Rieske type dioxygenase. The third set of primers (C23O-f and C23O-r) was used for amplifying the gene encoding the ring cleavage enzyme (meta cleavage dioxygenase) used to convert 2,3-dihydroxybiphenyl to the yellow intermediate, HOPDA. This primer was capable of amplifying a 469bp fragment from this gene in 2/9 (22.22%) indicating the presence of this gene as a component of the biphenyl degradation pathway genes. The fourth set of primers (DOalpha-2 and DOalpha-3) was designed to target angular dioxygenase genes involved in the first step of aromatic hydrocarbon degradation other than biphenyl. Interestingly, our results showed that *E. perlucida* and *Pseudomonas luteola* RM9 contains an angular dioxygenase gene that is probably involved in degrading other aromatic compounds besides biphenyl.

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جزيئي للبكتريا التي لها القدرة على تحليل المركب الاروماتي ثنائي الفينيل Biphenyl من 55 عينة تربة تم جمعها من مصادر مختلفة في محافظة نينوى للفترة من ايلول 2021 ولغاية شباط 2022. لهذا الغرض تم عزل البكتريا المحللة للـ Biphenyl من عينات التربة بعد تنميتها على الوسط الغذائي الادنى DSMZ الحاوي على الـ Biphenyl كمصدر وحيد للكربون والطاقة. بينت النتائج ان 16.4% من عينات كانت موجبة لتحليل الـ Biphenyl من خلال انتاجها للعكارة على وسط DSMZ السائل وقدرتها على تكوين مستعمرات على وسط اكار DSMZ الحاوي على الـ Biphenyl وعدم قدرتها على تكوين مستعمرات على اطباق السيطرة، بينما 83.6% من العينات لم تحوي على بكتريا محللة للـ Biphenyl. أظهرت النتائج ايضا بأن اعلى نسبة عزل للبكتريا المحللة للـ Biphenyl كانت من تربة حقل مشراق للكبريت (33.33%) يليها عينات من تربة المجاري (28.57%)، من جهة اخرى لم نتمكن من عزل بكتريا محللة للـ Biphenyl من غينات التربة المأخوذة من مصافي النفط و التربة الزراعية و ترب حدائق المنازل. تم تشخيص العزلات البكتيرية استنادا الى صفاتها الزرعية وتسلسل النيوكليوتيدي للمورث 16S rRNA وتم تسجيل السلالات في بنك الجينات التابع للمركز الوطني لمعلومات النفاة الحيوية واعطيت الرموز RM. تم تشخيص 9 عزلات محللة للـ Biphenyl والتي تبين انها تعود الى اجناس بكتيرية موجبة وسالبة لصبغة كرام. خمسة عزلات من العزلات المعزولة كانت تعود الى اجناس موجبة لصبغة كرام تمثلت بعزلتين من بكتريا *Rhodococcus pyridinivorans* و *Rhodococcus rhodochrous* و *Rhodococcus* sp. و *Microbacterium barkeri* وثلاث عزلات سالبة لصبغة كرام شملت *Extensimonas perlucida* و *Pseudomonas luteola* و *Achromobacter* sp. نتائجا اوضحت وللمرة الاولى عالميا قدرة النوع *Extensimonas perlucida* على استهلاك الـ Biphenyl كمصدر وحيد للكربون والطاقة.

تم تحديد معدل النمو للعزلات المحللة للـ Biphenyl قيد الدراسة من خلال تنميتها بشكل منفصل على وسط DSMZ السائل وقياس الامتصاصية عند طول موجي 600 نانوميتر بفترات زمنية مختلفة، اختلفت معدلات النمو باختلاف العزلات مبينة اختلاف كفاءة الانزيمات الداخلة في المخطط الايض للـ Biphenyl. كانت معدل النمو (زمن التضاعف) لبكتريا *E. perlucida* RM1 24.79 ساعة ولبكتريا *Pyridinivorans* RM2 17.05 ساعة ولبكتريا *Rh. rhodochrous* RM3 17.69 ساعة ولبكتريا *Rhodococcus* spp. RM4 16.8 ساعة ولبكتريا *Rhodococcus* spp. RM5 19.43 ساعة ولبكتريا *Achromobacter* sp. RM6 19.65 ساعة ولبكتريا *M. barkeri* RM7 16.48 ساعة ولبكتريا *Rh. pyridinivorans* RM8 16.93 ساعة ولبكتريا *P. luteola* RM9 16.99 ساعة. أن تضاعف العزلات قيد الدراسة على وسط DSMZ الادنى والحوي على مركب الـ Biphenyl

ب

كمصدر وحيد للكربون والطاقة يقدم دليلا اخر على قدرة السلالات قيد الدراسة على تحليل ال-Biphenyl.

استخدم ستة انواع مختلفة من البوادي للتحري عن بعض المورثات المسؤولة عن تحليل ال-Biphenyl في العزلات قيد الدراسة. استعمل البادئ BPHD-f3 و BPHD-r1 في تضخيم المنطقة 524 زوج قاعدة من المورث Rieseke non-heme iron dioxygenase والمتوقع استخدامه في الخطوة الاولى من المسار الايضي لتحليل ال-Biphenyl. بينت نتائجنا بأن 5/9 (55.55%) من العزلات المحللة لل-Biphenyl ضخمت المورث مما يدل على امتلاكها لهذا المورث. البادئ الثاني (Rieseke_f and ARHD2R) استعمل لتضخيم المنطقة 382 زوج قاعدة والتي تمثل منطقة ارتباط العامل المساعد Rieseke cofactor للمورث Rieseke non-heme iron dioxygenase، من خلال فحص 9 عزلات قيد الدراسة *E. perlucida* هي البكتريا الوحيدة التي ضخمت هذا المورث معطية دليل ثاني على أن المورث المستعمل في الخطوة الاولى للمسار الايضي لل-Biphenyl هو من نوع Rieseke type dioxygenase. المجموعة الثالثة من البوادي (C23O-f and C23O-r) استخدمت لتضخيم المورث المسؤول عن خطوة فك الحلقة الاروماتية (meta cleavage enzyme) والمستعمل لتحويل المركب 2,3-dihydroxybiphenyl الى المركب الوسطي اصفر اللون المعروف مختصرا بـ HOPDA، هذا البادئ نجح في تضخيم الجزء 469 زوج قاعدة من هذا المورث في 2/9 (22.22%) مؤشرة على وجود هذا المورث كأحد المكونات الرئيسية للمسار الايضي لتحليل ال-Biphenyl. المجموعة الرابعة من البوادي (DOalpha-2 and DOalpha-3) تم تصميمها لملاحقة الهدف المتخصص بالمورثات زاوية الهدف والتي تشترك في الخطوة الاولى من المسار الايضي لتحلل انواع اخرى من المركبات الاروماتية عدا ال-Biphenyl. مثيرا للاهتمام بينت نتائجنا بأ كل من *E. RM1* و *P. luteola* RM9 احتوت على البروتين الزاوي angular dioxygenase والتي ربما يشترك في تحليل مركبات اروماتية اخرى بجانب ال-Biphenyl.



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

التوصيف الوراثي للبكتريا المحللة للبايفينايل المعزولة من مصادر بيئية
وسريرية في مدينة الموصل

رغده محمد صبحي طه الزبيدي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور ريان مازن فيصل العبيدي