جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تأثير الذيفان أ المستخلص من السيانوبكتريا *Microcoleus* sp.HI-ES المشخصة بتحليل الجينوم الكامل على البكتريا المرضية ودودة الشمع الكبرى وبذور نبات اللهانة

هبة خليل سعيد يحيى الشكرجي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة /علم الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ

الدكتورة إسراء غانم حازم محمد السماك

الأستاذ المساعد

الدكتور محمد فاضل حميد مجيد حداد

1445هـ

2024 م

الخلاصة:

جمعت (150) عينة سريرية من الإدرار، مسحات الجروح والحروق والخراجات وعينات قشع من مستشفيات في محافظة نينوى تضمنت (السلام التعليمي، ابن سينا التعليمي، الخنساء التعليمي، الجمهوري التعليمي، مركز الموصل التخصصي للحروق والجراحة التجميلية) للمدة من شهر نيسان (2022) ولغاية شهر تشرين الأول (2022).

أظهرت النتائج الخاصة لعزل سلالات البكتريا الممرضة عزل (136) سلالة من أنواع بكتيرية شخصت مظهرياً وجزيئياً بالإعتماد على مورث 16S rRNA شُخصت الى سلالات (33) *Escherichia coli*، (30) *Pseudomonas aeruginosa*، (28) *Enterococcus faecalis*، (17) *Staphylococcus haemolyticus*، (11) *Staphylococcus epidermidis*، (8) *Proteus* spp.، (6) *Serratia* spp.، (3) *Serratia marcescens*، ظهر تفاوت في نسب العزل، إذ سادت عينات الإدرار بنسبة (68)% خاصة النوع *Escherichia coli*، *Enterococcus faecalis* ، *Proteus* spp.، *Serratia* spp. تليها عينات الجروح والحروق والخراجات وبنسبة (63)% إذ سادت الأنواع البكتيرية التابعة *Staphylococcus haemolyticus*، *Staphylococcus epidermidis*، *Pseudomonas aeruginosa*، وأعطت عينات القشع أقل نسبة عزل(5)%.

تم عزل السيانوبكتريا*Microcoleus* sp.HI-ES من المياه العذبة في منطقة سد الموصل وتم تنقيتها عن بقية أنواع السيانوبكتريا بإستخدام وسط BG11 السائل المُدعم بالمغذيات مع إضافة فيتامين B_{12} واللايسوزايم وبإضافة الأكاروز عوضاً عن الأكار للوسط وشُخصت مظهرياً وجزيئياً إعتماداً على المورث 16S rRNA الخاص بها

تم تنقية وتشخيص البكتيريا المتعايشة مع *Microcoleus* sp.HI-ES بالتنمية على وسط الأكار المغذي وشُخصت الى النوعين *Brevibacillus* sp. HI-ES ، *Pseudoxanthomonas* sp. HI-ES مظهرياً وجزيئياً بالإعتماد على مورث 16S rRNA العام.

حُضر وسط إنتقائي مكون من الوسط المغذي السائل المضاف إلى وسطBG11 وبنسبة 1:1 بعد التشخيص الجزيئي للبكتيريا البيئية المتعايشة مع *Microcoleus* sp.HI-ES وتم بعد تحديد التركيز القاتل لكل منها إضافة المضادين الميروبينيم والستربتومايسين بتركيز 1000 مايكروغرام/مل و 500 مايكروغرام/مل على التوالي.

أظهر ذيفان الأناتوكسين المُستخلص من النوع *Microcoleus* sp.HI-ES والمشخص جزئياً وبتقنيات برامج المعلوماتية الحياتية ووكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة تأثيراً واضحاً وملحوظاً على جميع السلالات الممرضة وبأعلى نسبة تثبيطية لنمو النوع*Staphylococcus haemolyticus*، تليها

Escherichia coli ، *Pseudomonas aeruginosa* ،*Proteus* spp.، *Serratia* spp. و *Enterococcus faecalis* على التوالي.

بلغ طول الجينوم الكامل للسيانوبكتريا *Microcoleus* sp. HI-ES 4,671,230 مليون قاعدة نكليوتيدية وبمحتوى GC بنسبة 47.7% مُوزع ضمن 6417 قطعة نكليوتيدية (contig) بقيمة N50 تبلغ 1092. تم إيداع تسلسل الجينوم البكتيري الكامل في بنك الجنات العالمي NCBI وبنك الجينات الأوربي ENA database وبنك الجينات الياباني DDBJ تحت رقم الإنضمام JAPTMT000000000.1.

تم إيداع وتسجيل كامل تسلسل المُورث DNA gyrase subunit A وبطول 2712 قاعدة نكليوتيدية لـ*Microcoleus* sp.HI-ES ، ومورث 23S rRNA وبطول 2908 قاعدة نكليوتيدية، ومورث 16S rRNA وبطول 1500 قاعدة نكليوتيدية في بنك الجينات العالمي NCBI وتحت أرقام الإنضمامOP183180.1، OP179626.1 و OP172860.1 على التوالي.

أظهرت نتائج التحليل الجينومي البكتيري للسيانوبكتريا *Microcoleus* sp. HI-ES أنه يحتوي على 6264 منطقة قابلة للتشفير (CDS) بشكل عام و 1623 منطقة أو جين وظيفي فعلي معروف الوظيفة.

أظهر تحليل الشجرة الوراثية بالإعتماد على كامل المحتوى النكليوتيدي بإستخدام برنامج TYGS أن الأنواع الأكثر قرباً إلى *Microcoleus* sp. HI-ES هي:

Microcoleus asticus IPMA8 (accession no. SRRZ00000000.1), *Microcoleus vaginatus* PCC 9802 (accession no. NZ_CP031740.1), *Microcoleus vaginatus* FGP-2 (accession no. AFJC00000000.1) and *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112 (accession no. CP003614.1). وبقيم 61.7% و 59.8% و 59.8% و 54.5% وعلى التوالي.

أعطت نتائج PCR أن جينوم *Microcoleus* sp. HI-ES يحتوي المورث anaC-gen الخاص بالذيفان الحيوي الأناتوكسين_ أ بطول (366 bp) وإنه بروتيني التركيب وتم الحصول ولأول مرة على المستوى الجزيئي على تسلسل(826) حامض أميني من خلال برامج المعلوماتية الحياتية Bioinformatic، تم إيداع وتسجيل تسلسل جين Anatoxin-a (anaA) وبطول 509 قاعدة نكليوتيدية، في بنك الجينات العالمي NCBI وتحت رقم الإنضمام OQ269664.1، كما أظهر تحليل الشجرة الوراثية لتسلسل القواعد النكليوتيدية لمورث anatoxin-a الموجود في *Microcoleus* sp. HI-ES، أن هذا الجين أقرب إلى تسلسل القواعد النكليوتيدية لمورث anatoxin-a الموجود في الأنواع *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112، *Planktothrix agardhii* stain PCC 7805،

Nostoc sp. و *Aphanizomenon flosaquae* KM1D3 ،*Anabaena cylindrica* PCC 7122 وعلى التوالي TCL240-02.

بينت النتائج أن الأحماض الأمينية في مسار type 1 Polyketide synthase المُنتجة للمادة الفعّالة anatoxin-a لسلالة *Microcoleus* sp. HI-ES لها نسبة تطابق عالية 98% مع الأحماض الأمينية لسلالة *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112.

أظهرت نتائج التحري الحيوي عن تأثير ذيفان الأناتوكسين–أ المُستخلص من *Microcoleus* sp. HI-ES على بذور اللهانة بأنها سامة لإنبات بذور اللهانة بعد سبعة أيام من المعاملة وعند كافة التراكيز الثلاثة المختبرة (0.90،0.45،0.22) مايكروغرام/مل على التوالي، وكذلك سُمية على يرقات الشمع الكبري في الجسم الحي *in vivo* ليرقات الشمع الكبرى *Galleria mellonella* ، إذ أعطى التركيز الأدنى 0.22 مايكروغرام/مل بنسبة قتل (20)% يرقة بعد ساعة من الحقن بالذيفان وأعلى نسبة قتل 80% بعد 24 ساعة من الحقن، في حين أعطى التركيز 0.45 مايكروغرام/مل نسبة قتل(70)% بعد ساعة من الحقن و (100)% بعد 24 ساعة من الحقن، بينما أظهر التركيز الأعلى للذيفان 0.9 نسبة قتل 100% بعد ساعة من الحقن.

أظهرت نتائج المقاطع العرضية لأنسجة *Galleria mellonella* المعاملة بالذيفان الأناتوكسين بعد ساعة من الحقن عند التركيز الأدنى(0.22) مايكروغرام/مل تغيرات نسيجية بسيطة لأنسجة يرقة الشمع الكبرى، في حين أظهر التركيز الأعلى (0.9) مايكروغرام/مل في المقاطع تغيرات نسيجية كالنخر والفجوة الشديدة للخلايا الظهارية العمودية.

أظهرت نتائج حقن الذيفان الحيوي الأناتوكسين أ عند كلا التركيز (0.22, 0.90) مايكروغرام/مل بعد (24) ساعة من الحقن تغيرات نسيجية واضحة حيث لوحظ التدمير والنخر في المعي المتوسط والقصبة الهوائية والجسم الدهني (Fat Body) مع وجود حُطام نخر (ND Necrotic debris) في العمود الفقري للخلايا الظهارية والكأسية وتتسلل أو تتخلل إلى التجويف.

أظهرت نتائج التحري عن الموت المُبرمج apoptosis للهيم اللمفي ليرقة *Galleria mellonella* والمحقونة بذيفان السيانوبكتريا *Microcoleus* sp. HI-ES بعد 24 ساعة من التحضين تحطيم وتلف وتشضي لـ DNA اليرقات إذ أعطت نتائج المعاملة بتركيز (0.9) مايكروغرام /مل تحطم الجينوم لليرقة إلى قطع صغيرة وبحجم يقارب 250 قاعدة نكليوتيدية.

أعطت نتائج تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة لفصل ذيفان الأناتوكسين _أ أنه عبارة عن بروتين بمعدل جريان 0.33 عند وضعها في درجة حرارة المُختبر، وبقعة واحدة ذات معدل جريان 0.3 عندما وضعت في درجة حرارة (4)° م لمدة ساعتين.

Summary

In this study, (150) clinical samples were collected, including samples taken from urine, swabs from wounds, burns, abscesses, and sputum samples from various hospitals in Nineveh Governorate, including Al-Salam Teaching Hospital, Ibn Sina Teaching Hospital, Al-Khansa Teaching Hospital, Al-Jumhuri Teaching Hospital, and the Mosul Specialized Center for Burns and Plastic Surgery for the period of April (2022) until October (2022).

The results of the isolation of pathogenic bacteria showed that (136) isolates of different bacterial species were isolated, including (33) *Escherichia coli*, (30) *Pseudomonas aeruginosa*, (28) *Enterococcus faecalis*, (17) *Staphylococcus haemolyticus*, (11) *Staphylococcus epidermidis*, (8) *Proteus* sp., (6) *Serratia* sp. (3) *Serratia marcescens*. There was a difference in isolation rates depending on the type of samples, as urine samples occupied first place with a rate of (68)%, especially for isolates of the bacteria *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Proteus* sp. *Serratia* sp. Followed by samples taken from swabs from wounds, burns, and abscesses, with a percentage of (63)%, while sputum samples gave the lowest percentage (5%). It was noted that the samples taken from skin swabs from wounds, burns, and abscesses were dominated by bacterial species belonging to *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

The sample of the cyanobacteria *Microcoleus* sp.HI-ES was purified from the rest of the cyanobacteria species using liquid BC11 medium supplemented with nutrients with the addition of vitamin B12 and lysozyme, and by adding agarose instead of agar to prepare solid BC11 medium.

A selective medium was prepared consisting of liquid nutrient medium added to BC11 medium after molecular identification of environmental bacteria commensal with *Microcoleus* sp.HI-ES, which included *Brevibacillus* sp. HI-ES, *Pseudoxanthomonas* sp. HI-ES and the antibodies meropenem and streptomycin were added at concentrations of 1000 µg/ml and 500 µg/ml, respectively.

In the study on the extraction of anatoxin-A produced from *Microcoleus* sp.HI-ES, anatoxin A showed a clear and noticeable effect on all pathogenic isolates with the highest rate of growth inhibition for *Staphylococcus haemolyticus*, followed by *Serratia* sp. , Proteus sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* respectively.

The general primer of the 16S rRNA gene was used to diagnose pathological types including *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, and Proteus sp. *Pseudomonas*

aeruginosa. Primers specific for the 16SrRNA gene were also used to identify the cyanobacteria *Microcoleus* sp.HI-ES at a size of 700 base pairs.

The length of the complete genome of the cyanobacterium *Microcoleus* sp. HI-ES is 4,671,230 million nucleotide bases with a GC content of 47.7% distributed in 6417 contigs with an N50 value of 1092. The complete bacterial genome sequence has been deposited in NCBI, the European GenBank database ENA, and the Japanese GenBank DDBJ under the accession number JAPPTMT000000000.1.

The entire sequence of the DNA gyrase subunit A (gyrA), 2,712 nucleotide bases long, of *Microcoleus* sp.HI-ES, the 23S rRNA gene, 2,908 nucleotide bases long, and the 16S rRNA gene, 1,500 nucleotide bases long, has been deposited and recorded in the NCBI World GenBank under the accession numbers OP183180.1. , OP179626.1 and OP172860.1 respectively.

The results of bacterial genomic analysis of the cyanobacteria *Microcoleus* sp. HI-ES contains 6264 coding regions (CDS) overall and 1623 actual functional regions or genes of known function.

Genetic tree analysis based on the full nucleotide content using the TYGS program showed that the species most closely related to Microcoleus sp. HI-ES are:

Microcoleus asticus IPMA8 (Access No *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112 (Accession No. CP003614.1). With values of 61.7%, 59.8%, 59.8%, and 54.5%, respectively.

PCR results showed that the genome of *Microcoleus* sp. HI-ES contains the anaC-gen gene for the biotoxin Anatoxin_A, with a length of (bp 366) and it has a protein structure. For the first time at the molecular level, a sequence of (826) amino acids was obtained through Bioinformatics programs. The sequence of the (anaA) gene was deposited and recorded. Anatoxin-a, with a length of 509 nucleotide bases, is in the NCBI World GenBank under the accession number OQ269664.1. Genetic tree analysis of the nucleotide base sequence of the anatoxin-a gene found in *Microcoleus* sp. HI-ES, that this gene is closest to the nucleotide base sequence of the anatoxin-a gene found in the species Oscillatoria nigroviridis PCC 7112, *Planktothrix agardhii* stain PCC 7805, Anabaena cylindrica PCC 7122, Aphanizomenon flosaquae KM1D3 and Nostoc sp. TCL240-02 and respectively.

The results showed that the amino acid in the type 1 Polyketide Synthase pathway produced so far, anatoxin-a, by Microcoleus sp. HI-ES has a high match rate of 98% with the amino test of the isolate Oscillatoria nigroviridis PCC 7112.

The results of bioinvestigation showed the effect of anatoxin-A extracted from Microcoleus sp. HI-ES on Lanna seeds was found to be toxic to the germination of Lanna seeds after seven days of treatment and at all three tested concentrations (0.9), 0.45 and 0.22 µg/ml, respectively, as well as toxic to the larvae of the larval wax in vivo. vivo for the greater wax larvae, Galleria mellonella, as the lowest concentration of 0.22 µg/ml gave a larvae kill rate of (20) an hour after injection with the poison, and the highest kill rate of 80% after 24 hours of injection, while the concentration of 0.45 µg/ml gave a kill rate of (70).)% after one hour of injection and (100)% after 24 hours of injection, while the highest concentration of the toxin 0.9 showed a 100% killing rate after one hour and 24 hours of injection, respectively.

The results of cross-sections of Galleria mellonella tissues treated with anatoxin an hour after injection with the poison at the lowest concentration (0.22) micrograms/ml showed minor histological changes in the tissues of the greater wax larvae, while the highest concentration (0.9) micrograms/ml sections showed histological changes such as necrosis and severe cell vacuolation. Columnar epithelium.

The results of the injection of the biotoxin Anatoxin A at both concentrations (0.90 and 0.22) micrograms/ml after (24) hours of injection showed clear tissue changes, as destruction and necrosis were observed in the midgut, trachea, and fat body, with the presence of necrotic debris. ND) in the spines of epithelial and goblet cells and infiltrates or infiltrates into the lumen.

The results of the investigation into apoptosis of the Galleria monella larvae injected with the toxin of the cyanobacterium Microcoleus sp. HI-ES, after 24 hours of incubation, destroyed, damaged, and fragmented the DNA of the larvae. The results of the treatment at a concentration of (0.9) micrograms/ml showed that the genome of the larvae was destroyed into small pieces with a size of approximately 250 nucleotide bases.

The results of the thin layer chromatography technique for separating anatoxin_A revealed that it is a protein with a flow rate of 0.33 when placed at laboratory temperature, and one spot with a flow rate of 0.3 when placed at (4) °C for two hours.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul/ College of Sciences
Department of Biology

The Effect of Anatoxin A Extracted from the Cyanobacterium *Microcoleus* sp.HI-ES, Identified by Whole Genome Sequencing, on Pathogenic Bacteria, Greater Wax Moth, and Seeds of Cabbages

Hiba Khaleel Saeed Yahya Al- Shakarchi

Ph. D. Dissertation

Biology / Microbiology

Supervised By

Prof.Dr.
Essra Ghanim Hazim Mohammed

Assist.Prof.Dr.
Mohammed Fadhil Hameed Majeed

1445 A.H. **2024 A.D.**