جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية علوم البيئة وتقاناتها
قسم علوم البيئة

عزل وتشخيص مظهري وجزيئي لبكتريا *Listeria* spp. من الأغذية والعينات البيئية في محافظة نينوى

هديل لؤي دوري الدوري

رسالة ماجستير
في علوم البيئة

بإشراف

م.د رواء محمود حموشي

1445 هـ
2023 م

الخلاصة

جُمعت 144 عينة من مصادر غذائية وبيئية مختلفة تضمنت الخضار الورقية (كرافس ، لهانة و خس) ، ومنتجات الالبان المحلية (حليب جاموس طازج ، حليب بقر طازج وجبن محلي الصنع) ، ومنتجات اللحم (اللحم المثروم المجمد ، اللحم المثروم غير المجمد ، الصوصج والدجاج) ، وعينات بيئية من تربة المزارع وماء السقي المأخوذ من النهر . زُرعت العينات على الاوساط الزرعية الانتخابية المختلفة وقدرْ التعداد الكلي للبكتريا ولبكتريا القولون في عينات الاغذية وأظهرت النتائج أن أعلى قيمة للتعداد الكلي للبكتريا كانت في عينات الجبن المحلي ($209 * 10^5$ CFU/ml) ؛ في حين كانت أعلى قيمة. لبكتريا القولون ($250 * 10^5$ CFU/ml) في عينة الكرافس. فيما كانت أعلى قيمة للتعداد الكلي للبكتريا من العيناتِ البيئيةِ ($196 * 10^5$ CFU/ml) لعينات تربة المزرعة و ($119 * 10^5$ CFU/ml) لعينات مياه السقي أما التعداد الكلي لبكتريا القولون كانت ($178 * 10^5$ CFU/ml) من عينات التربة الى ($149 * 10^5$ CFU/ml) لعينات ماء السقي . اظهرت نتائج العزل والتشخيص عزل أنواع بكتيرية مختلفة من العينات المدروسة ومن ثم تم تشخيصها اعتماداً على الصفات المظهرية والمجهرية للمستعمرات والخصائص الكيموحيوية وبتقنية VITEK2 والمبينة بالنسب التالية :

Staphylococcus (aureus 29.86%, *saprophyticus* 6.25% , *lentus* 4.86%*), Kocuria kristinae* 9.02%, *Enterococcus (faecalis* 28.4%, *gallinarum* 11.8%, *cassliflavus* 16.6%*), Klebsiella* spp. 13.1% , *Bacillus* spp. 15.2% , *Shigella* spp. 13.8% , *Escherichia coli.* 68.05%, *Proteus* spp. 34.02% , *Salmonella* spp. 9.02% , *Streptococcus* spp. 9.7%. بلغت النسبة المئوية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام 68.75% والسالبة لصبغة كرام 31.25%. بينت نتائج عزل وتشخيص جرثومة الليستريا من العينات قيد الدراسة بإستخدام الوسط الزرعي الإنتقائي Hichrome-listeria selective agar base اذ تم تشخيص 19 عزلة مظهريا ومجهريا وبالفحوصات الكيموحيوية والتشخيص الجزيئي وخضعت لإختبارات الحساسية

للمضادات الحيوية. أظهرت النتائج أن 4 عزلات تعود للنوع *L. monocytogenes* بنسبة (2.7%) و15 عزلة من النوع *L. welshmeri* بنسبة (10.4%) من إجمالي العينات المدروسة. أجري التشخيص الجزيئي الجيني بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لعزلات بكتريا الليستريا لتضخيم القطعة الجينية 16S rRNA (1495 زوج قاعدي) لـ 5 عزلات حيث اعطت جميعها نتيجة موجبة. تمت مقارنة التتابعات النيوكليوتيدية من منطقة الجين 16S rRNA لأربع عزلات مع سلالات عالمية مسجلة في بنك الجينات العالمي (NCBI) و اظهرت النتائج ان عزلة واحدة تعود لـ *L. monocytogenes* و ثلاث عزلات تعود لبكتريا الليستريا من النوع *L. welshmeri* . بلغت نسبة التطابق لتتابع التسلسلات لجين 16S rRNA لبكتريا *L. monocytogenes* (99.17%) مع عزلة اليابان ، وبلغت نسبة التطابق للعزلات البكتيرية الثلاثة لبكتريا *L. welshmeri* بين (96–99%) مع العزلات العالمية في كل من بولندا والصين والبرازيل وتركيا والمانيا. تم تسجيل تتابعات الجين 16S rRNA في بنك الجينات العالمي (NCBI) تحت ارقام الانضمام [OQ378323.1] و لبكتريا *L. welshmeri* الثلاثة تحت ارقام الانضمام [OQ378324.1, OQ378322.1, OQ378325.1]. احتوت العزلات على جينات الضراوة *actA, iap, plcA* ولم تحتوِ على جينات الضراوة *hly, llsx, ptsA*. تباينت نتائج حساسية العزلات التابعة للليستريا تجاه المضادات الحيوية إذ اظهر المضاد الحيوي Erythromycin حساسية البكتريا له فكان أعلى قطر للتثبيط (28) ملم لبكتريا *L. welshmeri* وكانت مقاومتها كبيرة تجاه المضادات الحيوية Ceflexin, Chloramphenicol, Co-Trimozole, Oxacillin, Cephalothin, Pencillin-G. بكتريا *L. monocytogenes* كانت حساسة للمضادات الحيوية المستعملة وخصوصا المضاد الحيوي Tetracycline في حين كانت مقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin .

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

University of Mosul

College of Environmental Sciences

And Technology

Isolation and phenotypic and molecular diagnosis of Listeria spp from food and environmental samples in Nineveh Governorate

By

Hadeel Luay Doori Al-Doori

M.Sc./Thesis

Environmental Sciences

Supervised by

Dr.Rawaa Mahmood Hamoshi

1445 A.H. **2023 A.D.**

Abstract

144 samples were collected from different food and environmental sources, including leafy vegetables (celery, cabbage and lettuce), local dairy products (fresh buffalo milk, fresh cow's milk and local cheese), meat products (frozen minced meat, meat (non-frozen minced meat, sausage and chicken) and environmental samples from farm soil and irrigation water taken from the river. The isolates were purified on different culture media, and the total number of aerobic bacteria and the total number of coliform bacteria were estimated from food, and environmental samples. The results showed that the highest value of the total bacterial count was in the local cheese samples (209 * 10^5 CFU/ml) ; While the highest value for coliform bacteria (250 * 10^5 CFU/ml) was in the celery sample. The highest value for the total bacterial count from the environmental samples was (196 * 10^5 CFU/ml) for farm soil samples and for irrigation water samples (119 * 10^5 CFU/ml). while the total count (for coliform bacteria) was (178 * 10^5 CFU/ml) from Soil samples to (149 * 10^5 CFU/ml) for irrigation water samplesDifferent bacterial species were isolated from the studied samples and identified by phenotypic, microscopic methods and using VITEK2 technique, such as *Staphylococcus (aureus* 29.86% , *saprophyticus* 6.25% , *lentus* 4.86%*), Kocuria (Rothia) kristinae* 9.02% , *Enterococcus (faecalis* 28.4%, *gallinarum* 11.8% , *cassliflavus* 16.6%), *Klebsiella* spp. 13.1% , *Salmonella* spp. 9.02% , *Bacillus* spp. 15.2% , *Shigella* spp. 13.8% , *Escherichia coli.* 68.05% , *Proteus* spp. 34.02% , *Streptococcus* spp. 9.7% . The percentage of Gram-positive bacteria was 68.75% and Gram-negative bacteria was 31.25%. Listeria spp. was isolated from the study samples using selective culture media (Hichrome-Listeria selective agar base). Listeria spp. was diagnosed externally (naked eyes), microscopically, biochemically, molecularly, and underwent antibiotic sensitivity tests. *L. monocytogenes* was identified in 4 samples with a rate of (2.7%) of the total isolates` samples and L. welshmeri was identified in 15 samples with a rate of (10.4%) of the total isolates` samples.

Molecular Genetics Testing of *Listeria spp.* was carried out by extracting DNA from the studied samples, which included meat samples, dairy samples, leafy vegetable samples, and environmental samples, by using a Genomic DNA mini kit, a polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the 16S rRNA gene segment gene (1495 base pairs) for 5 local isolates, all of which gave a positive result. The nucleotide sequences of the 16S rRNA gene region of four isolates were compared with international reference strains registered in the International Gene Bank (NCBI), where the results showed that there is one isolate belonging to *L. monocytogenes* and three to *L. welshmeri*. The *L. monocytogenes* match ratio of the sequence of the 16S rRNA gene was (99.16%) with the Japanese isolate, while the match rate of the same *L. welshmeri* gene for the three isolates of *L. monocytogenes* ranged between (96-99%) with the global isolates in Poland, China, Brazil, Turkey, and Germany. The new 16S rRNA gene sequences of *L. monocytogenes* were registered in the International GenBank under accession number [OQ378323.1], and for the three *L. welshmeri* isolates under accession numbers *iap*, *plcA*, *actA* and did not contain virulence genes *hly*, *IIsx*, *ptsA*. The results of the antibiotics used in the study varied, as the highest diameter of inhibition was (28) mm for the antibiotic Erythromycin at a concentration of (15) micrograms on *L. welshmeri* bacteria, which were resistant to antibiotics, such as Cefalexin, Chloramphenicol, Penicillin-G, Cephalothin, Oxacillin, and Co-Trimoxazole. While the highest inhibition diameter was (25) mm for *L. monocytogenes*, which was resistant to Tetracycline antibiotic and was resistant to Erythromycin.