جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

التشخيص الكيموحيوي والجزيئي لأنواع محلية من جنس *Streptomyces* ودراسة فعاليتها المضادة للأحياء المجهرية

هنا فوزي حسين النقيب

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

المدرس

الدكتورة صفاء إسماعيل رشيد العبيدي

1442هـ 2021م

الخلاصــة

تضمنت الدراسة الحالية الحصول على (154) عزلة تابعة الى جنس الـ *Streptomyces* من عينات ترب جمعت من بعض مناطق شمال العراق، وشخصت العزلات مبدئياً اعتماداً على القوام الجلدي والمظهر الطباشيري والمخاطي والشمعي واعطائها رائحة الارض الرطبة. وأكد التشخيص باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية لملاحظة شكل العزل الأرضي والهوائي وترتيب سلاسل الأبواغ. وتم ملاحظة كثافة النمو وألوان الغزل الأرضي والهوائي والقدرة على إنتاج صبغة الميلانين للعزلات على ستة أوساط زرعية، والتي أظهرت الواناً مختلفة.

درست قدرة العزلات على إنتاج المضادات الحيوية ضد أنواع بكتيرية موجبة وسالبة لصبغة كرام وهي *Escherichia coli* و *Proteus vulgaris* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae*.وكذلك ضد أنواع من الفطريات الممرضة للنبات *Candida albicans* و *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* و *Alternaria alternata*.أظهرت (104) عزلة قدراتها على إنتاج المضادات الحيوية واختيرت خمسة فقط للدراسة التي اعطت أعلى فعالية تثبيطية ضد الأنواع البكتيرية والفطرية.

شخصت العزلات (5) المنتخبة على أنها تعود على الأغلب الى أنواع *Streptomyces* وهي *S. luteus* MU_1 و *S. thermocarboxydus* MU_2 و *S. griseorubens* MU_3 و *S. albogriseolus* MU_4 و*S.deccanensis* MU_5 اعتمادا على الصفات المجهرية والشكلية والكيموحيوية وحساسيتها للمضادات الحيوية.

تمت عملية الفصل والتعرف على المضاد الحيوي المنتج بواسطة المذيب العضوي خلات الاثيل. وأظهرت العزلات الأربعة قيد الدراسة بقعة واحدة على لوح كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC). وقد اختلف قيمة معدل الجريان (*Rating flow* (R_F) وبلغت (0.82) للـ *S. luteus* MU_1 و*S. deccanensis* MU_5 و(0.64) *S. thermocarboxydus* MU_2 و(0.7) *S. albogriseolus* MU_4 وتم قياس طيف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية UV للمضاد الحيوي إذ بلغت ذروة الامتصاص للـ *S. luteus* MU_1 و *S. deccanensis* MU_5 (286) نانوميتر وتبين بأنها تعود الى مجموعة المايكروليد Macrolied. وبالنسبة للنوع *S. albogriseolus* MU_4- (290) نانوميتر وهي ايضا على الأغلب تعود الى مجموعة مضادات المايكروليد. وبلغت ذروة الامتصاص لل *S. thermocarboxydus* MU_2 (300) نانوميتر وعلى هذا الاساس شخص المضاد الحيوي على انه يعود الى مجموعة مضادات Polyene.

أجري التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة باستخدام التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR وأدى الى ظهور ثمان حزم من الـ DNA الجينومي المنقى من العزلات البكتيرية المحلية المنتجة للمضاد الحيوي بحجم واحد يتراوح ما بين (1000–900) زوج قاعدة.

حدد تسلسل القواعد النيتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصصSpecific PCR لعينات الـ DNA المنقاة لخمسة عزلات محلية منتخبة.وأظهرت نتائج التحليل باستخدام برنامج DNA Blast / NCBI وجود تتطابق مع السلالات القياسية المسجلة في بنك الجينات. ومن خلال تحميل نتائج Specific PCR الى البرنامج DNA Blast / NCBI ثم التأكد من أنواع جنس الـ *Streptomyces* المنتخبة والتي شخصت بالاختبارات الكيموحيوية والمظهرية والمجهرية بأنها تعود لنفس الأنواع التي شخصت باستخدام تقنيةDNA Sequencing وكانت أنواع جنس *Streptomyces* هي: *S. luteus* MU_1 و *S. thermocarboxydus* MU_2 *S. griseorubens* MU_3 و*S. albogriseolus* MU_4 و *S. deccanensis* MU_5

اما فيما يخص العزلة السادسة فسجلت باسم الباحثة وأعطي لها رقم خاص (LC582221.1) في بنك الجينات.

Abstract

The present Study includes the isolation of (154) isolates belonging to Actinomycetes, samples were collected from different regions of Iraq north soils.

The Isolates were identified tentatively on the basis of morphology (chalky, leathery, mucoidy, waxy appearance)of colonies and production of moist earthy odor.

The identification was confirmed by using slide culture technique ,observing substrate , aerial mycelium and arrangement of spore chains. Growth density colors of aerial and substrate mycelium and capabilty to produce melanin after culturing the isolates on six agar media. The isolates showed different colors.

The isolates were extensively studied for their antimicrobial activity against Gram positive and negative bacteria including *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and *klebsiella pneumoniae* and antifungal activity against *Candida albicans, Rhizoctonia solani, Alternaria alternata* and *Fusarium solani*.

(104) of the isolates showed cability to produce antibacterial activity. only five of the isolates were selected as showed strong antibacterial and antifungal activity.

The selected Five isolates were identified to belong to the genus *Streptomyces* these are *S. luteus* MU_1, *S. thermocarboxydus* MU_2, *S. griseorubens* MU_3, *S. albogrsieolus* MU_4 and *S.decanensis* MU_5. depending on the basis of microscopical, antibacterial activity, morphological , biochemical characteristics and their Sensitivity to antibiotics.

Isolation and Identification of the antibiotics were done by organic solevant ethyl acetate the five isolates showed a single spot appeared on (TLC) thin layer Chromatography plate. It was noticed that *Rating flow* (R_f)for the *S. luteus* MU_1 was (0.82) and for *S.decanensis* MU_5, *S. thermocarboxydus* MU_2 was (0.64) and for *S. albogrsieolus* MU_4 was (0.7) The ultra Violet (UV) Spectrum of the antibiotics produced by *S. luteus* MU_1, *S.decanensis* MU_5 Showed absorbance peak at (286) nm which belongs to macrolide antibiotics group. while the absorbance peak of *S. albogrsieolus* MU_4 was (290) nm which belongs to macrolide antibiotics group. while the absorbance peak of *S. thermocarboxydus* MU_2 was (300) um, on this basis the antibiotics was identified belongs to polyene antibiotics group.

molecular identification of the isolated bacteria were carried out using specific PCR and showed (8) bands of purified genomic DNA from local bacterial isolates of similar Size ranging (900-1000) bp.

The sequence of the nitrogenous bases for the specific PCR were determined for five chosen local isolates. the results were analyzed using DNA Blast / NCBI program revealed that there is a similarity with standard strains recorded in the Gene Bank.

by uplood in the results of specific PCR to DNA Blast / NCBI program The selected *Streptomyces* genus were confirmed, which were diagnosed by biochemical, morphological and microscopic tests were belongs to the same species that were diagnosed using the DNA Sequencing technology were the species of the genus *Streptomyces*, *S. luteus* MU_1, *S. thermocarboxydus* MU_2, *S. griseorubens* MU_3, *S. albogrsieolus* MU_4 and *S.decanensis* MU_5. the sixth isolated was registered for the researcher and given a special number (LU582221.1) in the Gene Bank.

University of Mosul
College of Education for
Pure Science

Biochemical and Molecular Identification of local Species for *Streptomyces* genus and Studying their Antimicrobial Activity

Hana Fawzi Hussein Al-Naqib

M.Sc. Thesis
Biology

Supervised by
Lec.

Dr. Safaa Ismail Rashid Al-Obaidi

2021 A.D 1442 A.H