جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

الكشف عن المضادات الحيوية المنتجة من بكتريا *Streptomyces* sp. المعزولة محلياً والمشخصة جزيئياً

عمر فيصل غازي

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بأشراف

المدرس

الدكتورة صفاء اسماعيل رشيد العبيدي

1443 هـ

2021 م

الخلاصة:

تناولت الدراسة الحالية جمع (50) عزلة بكترية تابعة لجنس *Streptomyces* لشهري آب وايلول لعام 2020 من ترب بعض مناطق شمال العراق. وشخصت بإلاعتماد على مظهرها الطباشيري والمخاطي والقوام الجلدي وأعطائها رائحة الأرض الرطبة، وجرى التأكد من التشخيص بالاختبارت الكيموحيوية و بتقنية الزرع على الشريحة الزجاجية لملاحظة شكل الغزل الهوائي والأرضي وترتيب السبورات، وتم ملاحظة كثافة النمو والوان الغزل والقدرة على انتاج الصبغات الخارجية للعزلات المنتخبة .

أجريت الأختبارات لبيان قدرة العزلات على إنتاج المضادات الحيوية ضد أنواع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وهي *Staphyloccus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* *Staphlococcus lentus* ، *Esherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* وكذلك لنوعين من الفطريات الممرضة *Aspergillus niger* ، *Candida albicans* أظهرت أغلب العزلات قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية، أختيرت (10) عزلات فقط للدراسة الحالية. شخصت العزلات المنتخبة على أنها تعود إلى أنواع *Streptomyces* وهي *S.gancidicus MU1* و *S. werraensis MU2* و *S.griseorubens MU3* و *S.thermocarboxyus MU4* و *S.cyaneus MU5* و *S.misisonensis MU6* و *S.bellus MU7* و *S.parvulus MU8* و *S.labedae MU9* و *S.variabilis MU10*
أعتماداً على الصفات المجهرية والزرعية والكيموحيوية.

تمت عملية الفصل للتعرف على المضاد الحيوي المنتج بوساطة المذيب العضوي خلات الأثيل وأظهرت العزلات العشرة قيد الدراسة بقعة واحدة لكل عزلة على لوح الفصل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وقد اختلفت قيمة معدل الجريان Rating Flow (Rf) مابين 0.32 بالنسبة للعزلة MU6 و 0.72 بالنسبة للعزلة MU3 في حين تراوحت قيمة معدل الجريان للعزلات الأخرى بين هذين الرقمين. أجري التشخيص الجزيئي للعزلات البكترية قيد الدراسة بإستخدام التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR وأدى إلى ظهور (11) حزمة من الـ DNA الجينومي المنقى من العزلات البكترية المحلية المنتجة للمضاد الحيوي بحجم واحد تراوح ما بين (1000-900) زوج قاعدة .حدد تسلسل القواعد النتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR لعينات DNA المنقاة لعشرة عزلات محلية منتخبة و أظهرت نتائج التحليل بإستخدام برنامج

DNA Blast / NCBI وجود تطابق مع السلالات القياسية المسجلة في بنك الجينات ومن خلال تحميل نتائج Specific PCR إلى برنامج DNA Blast / NCBI تم التأكد من أنواع جنس الـ *Streptomyces* المنتخبة والتي شخصت بالاختبارات الكيموحيوية والمظهرية والمجهرية بأنها تعود لنفس الأنواع التي شخصت باستخدام تقنية DNA Sequencing اما فيما يخص العزلة الحادي عشر فقد سجلت بأسم الباحث واعطيت لها رقم خاص (LC595768.1) في بنك الجينات.

أختيرت خمس عزلات والتي اعطت أعلى إنتاجية ضد كائنات الأختبار من العزلات العشر المنتخبة وتم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) للمضاد الحيوي المنتج وبينت النتائج أن العزلات الخمس واقعة ضمن المجاميع التابعة للالكانات والكينات والامينات والاميدات والكحولات والالديهايدات أضافة إلى الكلوريد الحامضي. تم تحليل العزلات الخمسة باستخدام GC-MS لمعرفة وتشخيص المركبات الفعالة، إذ أظهرت اربع عزلات (MU3- MU4- MU5- MU9) من الخمس المنتخبة وجود المركب cis-13-Octadecenoic acid بنسبة مختلفة وهو من المركبات المضاد للسرطانات و أظهرت العزلات الخمس وجود مركبات أخرى مختلفة مضادة للألتهابات ومضادات فطرية ومضادات أكسدة ومركبات خافضة للكوليسترول ومبيدات.

Abstract

The current study dealt with the collection of (50) bacterial isolates belonging to the genus Streptomyces for the months of August and September of the year 2020 from the soils of some regions of northern Iraq. It was diagnosed by relying on its chalky and mucous appearance, leather texture and giving it the smell of wet earth, and the diagnosis was confirmed by biochemical tests and by culture technique on the glass slide to observe the shape of the air mycelia and ground mycelia and the arrangement of the spores. The density of growth, yarn colors and the ability to produce external pigments for the selected isolates were observed.

The tests were conducted to show the ability of the isolates to produce antibiotics against types of Gram-positive and Gram-negative bacteria Which *Staphyloccus aureus ، Pseudomonas aeruginosa ، Staphlococcus lentus ، Escherichia coli* As well as for two types of pathogenic fungi *Aspergillus niger، Candida albicans* Most of the isolates showed their ability to produce antibiotics, only (10) isolates were selected for the current study. The selected isolates were identified as belonging mostly to *Streptomyces* species which *S.gancidicus MU1 ، S. werraensis MU2، S.griseorubens MU3، S.thermocarboxyus MU4، S.cyaneus MU5، S.misisonensis MU6، S.bellus MU7، S.parvulus MU8، S.labedae MU9، S.variabilis MU10* Depending on the microscopic, agronomic and biochemical characteristics

The separation process was carried out to identify the antibiotic produced by the organic solvent ethyl acetate. The ten isolates under study showed one spot for each isolate on the thin layer chromatography (TLC) separation plate. The value of the rate of flow (Rf) Flow Rating varied between 0.32 for isolate MU6 and 0.72 for isolate MU3, while the value of the rate of flow for other isolates ranged between these two numbers. Molecular diagnosis of the bacterial isolates under study was carried out using Specific PCR, which resulted in the showed (8) bands of purified genomic DNA from local bacterial isolates producing the antibiotic, with one size ranging between (1000-900) base pairs. The sequence of nitrogenous bases for the products of the specific replication reaction was

determined by Specific PCR for the purified DNA samples of ten selected local isolates, and the results of the analysis using the program DNA Blast / NCBI showed a match with the standard strains registered in the Gene bank. By uploading the results of Specific PCR to the DNA Blast / NCBI program, it was confirmed that the selected Streptomyces genus, which were diagnosed by biochemical, morphological and microscopic tests, belong to the same species that were diagnosed using DNA Sequencing technology. As for the eleventh isolate, it was registered in the name of the researcher and was given a special number (LC595768.1) in the Gene bank.

Five isolates were selected, which gave the highest productivity against the test organisms from the ten selected isolates, and the infrared (IR) spectrum of the produced antibiotic was measured The results showed that the five isolates are located within the dependent groups alkane –alcohols – amines –ketones and acid chloride. The five isolates were analyzed using GC-MS to identify and characterize the active compounds, as four isolates (MU3- MU4- MU5- MU9) from the five selected showed the presence of cis-13-octadecenoic acid in a different proportion, which is one of the anti-cancer compounds. The five isolates showed the presence of various other anti-inflammatory compounds, anti-fungals, antioxidants, cholesterol-lowering compounds and pesticides.

University of Mosul
College of Education for
Pure Science

Detection of antibiotics produced by *Streptomyces* sp. Isolated locally and molecularly diagnosed

Omar Faisal Ghazi

M.S.c. Thesis

Biology

Supervised by

Lec.

Dr. Safaa Ismail Rashid Al-Obaidi

2021 A.D **1443 A.H**