



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

قدرة أنواع من *Streptomyces* المعزولة من الترب الملوثة  
بالهيدروكربونات والمحددة تتابعات مورثاتها على إنتاج مواد حيوية  
فعالة سطحياً ومضادات حيوية

نادية حسين وعد الحياي

أطروحة دكتوراه  
علوم الحياة / احياء مجهرية

بإشراف  
الاستاذ الدكتورة  
إسراء غانم حازم السماك

## الخلاصة

جمعت (80) عينة من مصادر مختلفة، ضمت 50 عينة تربة منها ترب ملوثة بالهيدروكربونات وأخرى غير ملوثة، عزلت منها (25) عزلة تابعة لجنس *Streptomyces* وبنسبة (72%) من التربة غير الملوثة و(28%) من التربة الملوثة. جمعت (30) عينة ممرضة (حروق، جروح، خراجات) عزلت منها (10) عزلات تعود الى النوع *Staphylococcus aureus* وبنسبة (33.33%) وعزلتين تعودان الى النوع *Pseudomonas aeruginosa* وبنسبة 6.66% ابتدأت مدتها من اب 2017 الى شباط 2018.

انتخبت 13 عزلة وشخصت اعتماداً على الصفات الشكلية والاختبارات الكيموحيوية والايضية إضافة الى تحديد تتابعات مورث rDNA 16s الى 8 سلالات تابعة للنوع *Streptomyces rochei* و2 سلالة تابعة للنوع *Streptomyces misionensis* و3 سلالة تابعة للنوع *Streptomyces sp.* انتخبت 11 سلالة و تعقدت في ثلاثة عناقيد A و B و C ضمن المخطط الشجري التطوري باستعمال برنامج Mega 7 وطريقة UPGMA ، إذ تعقدت 8 سلالات تابعة للنوع *Streptomyces rochei* في العنقود A وعند نسبة تشابه (99.7%) مما يؤكد انها سلالات عائدة الى النوع نفسه ، في حين تعقدت سلالتان تابعة للنوع *Streptomyces misionensis* عند نسبة تشابه (99.2%) ضمن العنقود B، تعقدت سلالة تابعة لـ *Streptomyces sp.* ضمن العنقود C مما يدل انها تعود الى نوع اخر غير مشخص.

كما شخصت الانواع الاخرى المعزولة سريراً الى مستوى النوع بالاعتماد على الصفات الشكلية و الاختبارات الكيموحيوية والايضية، إضافة الى تحديد تتابعات مورث rDNA 16s لـ 4 سلالات تابعة للنوع (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA) والمشخصة أنها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية خاصة الميثيسلين واختبار API لسالتين تابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa*. تم ايجاد العلاقة التطورية للسلالات الاربعة التابعة للنوع MRSA باستعمال برنامج MEGA 7 وطريقة UPGMA إذ تعقدت السلالات الاربعة عند مستوى تشابه (94.2%) مما يؤكد انها سلالات عائدة للنوع نفسه.

أظهرت الانواع التابعة لجنس *Streptomyces* قدرة على إنتاج المواد الحيوية الفعالة سطحياً باستعمال أوساط التحري الاولي باجراء اختبار تشتت النفط والذي أبدى كفاءة عن اختباري انهيار القطرة المحورة ومعامل الاستحلاب.

تفاوت تأثير المواد الحيوية الفعالة سطحياً والمنتجة من أفراد جنس *Streptomyces* ضد سلالات MRSA و *Pseud.aeruginosa* والفطر *Aspergillus niger* وخميرة الـ *Candida albicans* وذلك باستعمال طريقة الانتشار بالاقراص والانتشار بالحفر، وكان اكثرها كفاءة السلالة *Streptomyces rochei* 19 و *Streptomyces misionensis* 30 .

اعطت السلالتان 19 و 27 التابعتان للنوع *Streptomyces rochei* والسلالة 30 التابعة للنوع *Streptomyces misionensis* افضل انتاجية لمعرفة الظروف المثلى لزيادة الانتاجية، اذ اعطت

السلالتان 19 و30 أفضل إنتاجية عند درجة حرارة 45 م°، وتركيز ملحي (6%) بوجود مستخلص الخميرة بوصفه مصدراً للنتروجين وزيت الزيتون بوصفه مصدراً للكربون ومدة تحضين 7 ايام وعند اس هيدروجيني 7 للسلالة 19 واس هيدروجيني 5 للسلالة 30. في حين أعطت السلالة 27 اعلى إنتاجية عند درجة حرارة 37 م° و تركيز ملحي (1%)، واس هيدروجيني متعادل وبعد مدة تحضين 5 أيام. اثبت استعمال زيت الزيتون كفاءة في إنتاج المواد الحيوية الفعالة سطحياً من استعمال الكليسيرول وزيت السيارات المعدوم وزيت الطعام المستعمل (زيت دوار الشمس).

أتضح عدم سمية المواد الحيوية الفعالة سطحياً والمستخلصة من السلالة *Streptomyces rochei* لقدرة نمو بذور الالهانة *Brassica oleracea* عند التركيز 1، 5 و50 ملغم/سم<sup>3</sup>. شخّصت المواد الحيوية الفعالة سطحياً المستخلصة من السلالات الثلاث (19، 27، 30) الى بيتيدات دهنية Lipopeptides باستعمال تقنية الطبقة الرقيقة للفصل TLC والاستشراب الغازي لمطياف الكتلة GC-mass ومن أهم مركباتها Octanoic acid، Hexanedioic acid, bis (2-ethylhexyl) ester و Silane cyclohexyldimethoxymethyl التي قد تُعزى لها الفعالية السطحية.

أظهرت 13 سلالة تابعة لجنس *Streptomyces* ضمن النوع *Streptomyces rochei* و *Streptomyces misionensis* قدرة على إنتاج المضاد الحيوي ضد MRSA في حين أبدت 3 سلالات فقط 1، 19، 27 والتابعة للنوع *Streptomyces rochei* قدرة على إنتاج المضاد الحيوي ضد النوع *Pseudomonas aeruginosa*.

اعطت السلالة 19 *Streptomyces rochei* أفضل إنتاجية عند استعمال مستخلص الخميرة بتركيز 2 غم/لتر، 1% كليسيرول، عند اس هيدروجيني متعادل وتركيز ملحي (3%) ومدة تحضين 7 أيام في درجة حرارة 37 م°.

شخص المضاد الحيوي المنتج من السلالة 19 *Streptomyces rochei* باستعمال تقنية TLC أنه تابع الى مجموعة Macrolides فقد أعطى معامل جريان Rf بحدود 0.92.

## Abstract

Eighty samples were collected from different sources, which included 50 hydrocarbon contaminated and not contaminated soil samples, (25) isolates of the genus *Streptomyces* were collected from (72%) of non-contaminated soils and (28%) of hydrocarbon contaminated soils. Thirty samples that cause diseases (burns, wounds, abscesses) were collected, of which (10) isolates belonging to the genus *Staphylococcus*, with 33.33%, and two isolates belonging to the genus *Pseudomonas* with 6.66%, for the period from August 2017 to February 2018.

Thirteen isolates were diagnosed based on morphological, biochemical and physiological tests in addition to the sequences of 16s rDNA of 8 strains belongs to *Streptomyces rochei*, 2 strains to *Streptomyces misionensis* and 3 strains to *Streptomyces* sp. 11 strains were selected and clustered in three clusters A, B and C within the tree of phylogenetic analysis, by using Mega 7 program and the UPGMA method, 8 strains of *Streptomyces rochei* were grouped in Cluster A at similarity rate (99.7%) which confirms that they are strains of the same species, while Two strains of *Streptomyces misionensis* were clustered at % (99.2) within cluster B, and 1 strain of *Streptomyces* spp. Within Cluster C, which indicates that it belongs to another undiagnosed species.

Other species were also diagnosed clinically to the species level depending on the morphological, biochemical and physiological characteristics, in addition to 16s rDNA genes for 4 strains of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were diagnosed and by using API test 2 strains were diagnosed as *Pseudomonas aeruginosa*. The evolutionary relationship of the four strains of MRSA were found by using MEGA 7 program and the UPGMA method, the four strains were

clustered at a similarity level of (94.2%), which confirms that they are strains of the same species.

Streptomyces strains showed ability to produce biosurfactant by using primary productive media and oil dispersion test which showed efficacy from the modified drop collapsed and emulsification coefficients.

The Streptomyces strains showed different abilities to produce biosurfactant against MRSA strains, *Pseud. aeruginosa*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* by using discs and wells diffusing methods, while the strain *Streptomyces rochei* 19 and *Streptomyces misionensis* 30 showed high efficacy against positive and negative bacteria as well as fungi and yeast.

The strains *Streptomyces rochei* 19 and 27 and *Streptomyces misionensis* 30, gave the best productivity of biosurfactant, were selected to find out the optimal conditions for productivity. The strain 19 and 30 gave the best productivity at a temperature of 45 °C, (6%)NaCl, in the presence of yeast extract as a source of nitrogen and olive oil as a carbon source, the incubation time is 7 days and at pH 7 of strain 19 and pH 5 of strain 30. While strain 27 gave the highest yield at 37 ° C, (1%) NaCl, neutral pH, after 5 days of incubation.

The use of olive oil has been proven efficient in the production of biosurfactant from the use of glycerol, utilized motor oil and edible oil (sun flower).

The surfactants which were produced from *Streptomyces rochei* 19 were non-toxic to the potential growth of *Brassica oleracea* seeds at 1, 5 and 50 mg / cm<sup>3</sup>.

The Biosurfactant produced from the three strains (19, 27, 30) were diagnosed as lipopeptides by using thin layer technique TLC and GC-

**University of Mosul**  
**College of Science**



**The Ability of some Streptomyces Isolated from Soil  
Contaminated with Hydrocarbons Known their  
Sequences of Genes to Produce Biosurfactants and  
Antibiotics**

**Nadia Huseein Waad Al-Healy**

Ph.D. Thesis

**Biology / Microbiology**

Supervised By

**Professor**

**Dr. Essra Ghanim Al-Sammak**

1442 A.H.

2020 A.D.