

University of Mosul
College of Education for Pure Science



**Novel Direct Molecular Diagnosis of *Streptomyces*
spp. by Real- Time PCR and Evaluating the Effect of
Some Culture Conditions on their Metabolite
Productivity**

Intsar Hazim Hamed Abed

Ph.D. Thesis
Biology

Supervised By
Assistant Professor
Dr. Jassim Fatehi Ali

2025 A.D

1447 A.H

Abstract

This thesis investigates the isolation, molecular identification, and bioactivity profiling of *Streptomyces* spp. from diverse environments, with a focus on real-time PCR as a rapid and efficient diagnostic tool.

Initially, sixty environmental samples were collected from various sources, including different soil types and moisture-damaged building surfaces (walls, floors and Dust collected from vacuum cleaners), between November 2023 and April 2024. From these samples, eighteen *Streptomyces* spp. isolates were identified using traditional microbiological methods and further confirmed by PCR analysis based on special areas in 16S rRNA gene.

A key highlight of this research is the direct partial detection of *Streptomyces* spp. using real-time PCR. In this approach, sixteen soil samples were subjected to direct DNA extraction without prior culturing. While conventional PCR yielded only one positive result, real-time PCR successfully detected *Streptomyces* spp. DNA in twelve out of sixteen samples. This striking contrast underscores the high sensitivity, specificity, and diagnostic value of real-time PCR for detecting *Streptomyces* spp. directly from environmental samples. The outcome represents a potentially novel application at the national level, offering a faster and more effective alternative to traditional culture-based methods.

Further molecular analysis was carried out through sequencing of selected isolates, and the results were analyzed using the BLAST tool available on the NCBI platform. Two isolates, 12-st and 24-st, exhibited 98% sequence similarity to *Streptomyces pilosus* and *Streptomyces albogriseolus*, respectively. Based on the percentage of identity, both were considered novel strains and were designated as *Streptomyces pilosus* strain IJ82 and *Streptomyces albogriseolus* strain IJ05. The sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers PV022777.1 and PV022778.1, respectively. These findings led to the recognition of two

potentially new *Streptomyces* strains with unique genetic characteristics. Antimicrobial efficacy was assessed for eighteen *Streptomyces* spp. isolates obtained through conventional cultivation methods. Under standard growth conditions, 52.1% of these isolates exhibited inhibitory activity against selected pathogenic bacteria and fungi. Among them, three isolates demonstrated superior antimicrobial activity and were considered potentially novel *Streptomyces* strains with unique genetic characteristics. These top-performing isolates were further cultivated under optimized environmental conditions including changes in temperature, pH, medium composition, and shaker incubation resulting in a significant enhancement of their bioactivity.

Finally, secondary metabolites were extracted from the top three isolates under both standard and optimized cultivation conditions and analyzed using GC-MS. The optimized conditions led to a greater diversity and higher concentration of bioactive compounds. Notably, Octadecen-1-ol, Heptanal, Octadecanoic acid, and 9-(4,5-dihydro-2,4-dimethyl-1H-Imidazole) were detected only under the optimized conditions, and these compounds are known for their antimicrobial, antifungal, and antioxidant properties.

This study confirms the substantial ecological presence and bioactive potential of *Streptomyces* spp., while also underscoring the scientific and diagnostic significance of employing direct real-time PCR as an innovative approach for their detection. This represents a notable advancement in both regional and global microbiological research efforts.

المخلص

تبحث هذه الأطروحة في العزل والتحديد الجزيئي والتنميط الحيوي لـ *Streptomyces* spp. من بيئات متنوعة، مع التركيز على تفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الفعلي كأداة تشخيصية سريعة وفعالة.

في البداية، تم جمع ستين عينة بيئية من مصادر مختلفة، بما في ذلك أنواع التربة المختلفة وأسطح المباني المتضررة من الرطوبة (الجدران والأرضيات والغبار الذي تم جمعه من المكناس الكهربائية)، بين نوفمبر 2023 وأبريل 2024. من هذه العينات، ثمانية عشر عينة *Streptomyces* spp. تم تحديدها باستخدام الطرق الميكروبيولوجية التقليدية وتم تأكيدها عن طريق تفاعل البوليميريز المتسلسل بتضخيم مناطق خاصة في جين 16 SrRNA.

من أبرز ما يميز هذه الدراسة الكشف الجزيئي المباشر عن *Streptomyces* spp. باستخدام تفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الفعلي، حيث تم استخلاص الحمض النووي بشكل مباشر لستة عشر عينة من التربة دون زراعة مسبقة.

أظهر تفاعل البوليميريز المتسلسل التقليدي نتيجة إيجابية واحدة فقط، بينما نجح تفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الفعلي في اكتشاف *Streptomyces* spp. الحمض النووي في اثنتي عشرة عينة. يؤكد هذا التباين المذهل على الحساسية العالية والخصوصية والقيمة التشخيصية لتفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الفعلي للكشف عن *Streptomyces* مباشرة من العينات البيئية. وتمثل النتيجة تطبيقاً جديداً محتملاً على الصعيد المحلي، حيث تقدم بديلاً أسرع وأكثر فعالية من الطرق المختبرية التقليدية.

تم إجراء مزيد من التحليل الجزيئي من خلال تسلسل العزلات المختارة، وتم تحليل النتائج باستخدام أداة BLAST المتوفرة على منصة NCBI. أظهرت عزلتان، 12-st و 24-st تشابهاً في التسلسل بنسبة 98% مع *Streptomyces pilosus* و *Streptomyces albogriseolus*، على التوالي. بناءً على النسبة المئوية للتطابق، تم اعتبار كلاهما سلالات جديدة وتم تصنيفهما على أنهما سلالة *Streptomyces pilosus* IJ82 وسلالة *Streptomyces albogriseolus* IJ05. وأودعت التسلسلات في قاعدة بيانات بنك الجين تحت رقمي الانضمام PV022777.1 و PV022778.1 على التوالي. أدت هذه النتائج إلى التعرف على سلالتين جديدتين محتملتين من *Streptomyces* بخصائص وراثية فريدة.

قيمت الفعالية مضادات الميكروبات لثمانية عشر عينة *Streptomyces* spp. تم الحصول عليها من خلال طرق الزراعة التقليدية في ظل ظروف النمو القياسية، أظهرت 52.1% من هذه العزلات نشاطاً مثبطاً ضد بعض الأنواع المختارة من البكتيريا والفطريات المسببة للأمراض،

أظهرت ثلاث عزلات نشاطا متفوقا مضادا للميكروبات واعتبرت سلالات *Streptomyces* جديدة ذات خصائص وراثية فريدة. تمت زراعة هذه العزلات عالية الأداء في ظل ظروف بيئية محسنة بما في ذلك التغيرات في درجة الحرارة ودرجة الحموضة والتركيب الوسط الغذائي وسرعة الحاضنة الهزاز مما أدى إلى تعزيز كبير لنشاطها الحيوي.

أخيرا، تم استخراج المستقلبات الثانوية من العزلات الثلاثة الأولى في ظل ظروف الزراعة القياسية والظروف المحسنة وتحليلها باستخدام GC-MS، إذ أدت الظروف المثلى إلى تنوع أكبر وتركيز أعلى للمركبات النشطة بيولوجيا. والجدير بالذكر أنه تم اكتشاف Octadecen-1-ol و Heptanal و Octadecanoic acid و (9- dihydro-2,4-dimethyl-1H--4,5) Imidazole فقط في ظل الظروف المثلى، وهذه المركبات معروفة بخصائصها المضادة للميكروبات والفطريات ومضادات الأكسدة.

تؤكد هذه الدراسة الوجود البيئي الكبير والإمكانات النشطة بيولوجيا لـ *Streptomyces* spp. مع التأكيد أيضا على الأهمية العلمية والتشخيصية لاستخدام تفاعل البوليميريز المتسلسل المباشر في الوقت الفعلي كنهج مبتكر لاكتشافها. ويمثل هذا تقدما ملحوظا في جهود البحوث الميكروبيولوجية الإقليمية والعالمية.



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

تشخيص جزئي مباشر جديد لبكتيريا *Streptomyces* spp.
باستخدام تفاعل البوليميريز المتسلسل في الوقت الفعلي وتقييم
تأثير بعض ظروف الاستزراع على إنتاجية مستقلباتها الأيضية

انتصار حازم حامد عبد

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الاستاذ المساعد

الدكتور جاسم فتحي علي