البيئات المتطرفة في المملكة العربية السعودية كمصادر لأكتينوميسيتات جديدة ذات أنشطة مضادة للميكروبات

إعداد
لينا أحمد باحمدين

إشراف
أ.د ماجدة محمد علي

المستخلص

في الآونة الأخيرة، أصبحت هناك حاجة ملحة لاكتشاف عقاقير حديثة نتيجة ظهور كائنات حية دقيقة مسببة للأمراض المعدية ومقاومة للأدوية. بالإضافة إلى ذلك، هناك احتياج مستمر للإنزيمات ذات الخصائص الفعالة في مجال الصناعة. اتجهت الدراسات البحثية إلى عزل بكتيريا الأكتينوميسيتات من البيئات المتطرفة لاكتشاف مركبات طبيعية نشطة بيولوجيًا وتجنب إعادة عزل السلالات المعروفة. لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى عزل الأكتينوميسيتات من أربع بيئات متطرفة مختلفة في المملكة العربية السعودية وهي: المنطقة القاحلة، والكهوف، والبيئة البحرية، والينابيع الحارة. اعتمادًا على الشكل الظاهري المميز للأكتينوميسيتات، تم الحصول على ٥٤ عزلة مختلفة باستخدام بيئة آجار نترات النشا. اشتملت عزلات الأكتينوميسيتات على ٢٢عزلة من تربة المنطقة القاحلة، و١٢عزلة من تربة الكهوف، و٧عزلات من عينات البحر، و١٣عزلة تم الحصول عليها من تربة ومياه الينابيع الحارة. تمت دراسة بعض الصفات الظاهرية والفسيولوجية والبيوكيميائية لجميع العزلات. ولوحظ أن العزلات ML52،ML53،ML54 التي تم الحصول عليها من الرواسب البحرية مقاومة لمجموعة واسعة من المضادات الحيوية. كما تم تعريف جميع العزلات باستخدام تحليل 16S rRNA. وأوضحت النتائج أن معظم العزلات (٩٠,٧٥٪) انتمت إلى أنواع تابعة للجنس *Streptomyces* spp.، ولقد لوحظ أن *Streptomyces mutabilis* هو النوع السائد بنسبة ١٦,٦٧٪ حيث تم عزله من جميع البيئات المتطرفة الأربعة. وتم تعريف عزلة واحدة تم الحصول عليها من المنطقة القاحلة بانتمائها إلى الجنس *Lentzea*، ووجد تشابه بين هذه العزلة والنوع *Lentzea albidocapillata* بنسبة ٩٩٪، كما تم عزل سلالتين من تربة الكهف تابعة لجنس نادر *Amycolatopsis*. ولم يتم الوصول إلى تعريف للعزلتين AL3 وAL7. بالإضافة إلى تعريف عزلات منطقة الينابيع الساخنة باستخدام 16S rRNA، تم أيضًا استخدام بعض برامج المعلوماتية الحيوية bioinformatics في تعريف هذه العزلات. كما تمت دراسة مقدرة جميع العزلات المختارة على إنتاج بعض الإنزيمات المهمة وإنتاج المضادات الحيوية. فيما يتعلق بالكشف عن النشاط الإنزيمي للعزلات، لوحظ أن البيئات المتطرفة الأربعة مصادر جيدة لعزل الأكتينوميسيتات المنتجة لإنزيم الكيراتينيز، والجيلاتينيز، والكيتينيز، والليبيز. بينما كان إنتاج إنزيمي الأميليز والبروتيز من الأكتينوميسيتات المعزولة من المنطقة القاحلة والكهوف أفضل

نـسبيًا من تلك المعزولة من منطقة الينابيع الحارة والبيئة البـحرية. خضعت جـميع العزلات لاختبار قـدرتها على إنـتاج المضاد الميكروبي بـواسطة قـياس قطر منطقة التثبيط ضد أنـواع مختارة من البـكتيريا الممرضة Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* وكانت العزلات التالية: العزلة AL3التي تـم الحصول عليها من المنطقة الجافة، والعزلـة CL24 *Streptomyces* المعزولة من منطقة الكهف، والعزلةML51 *Streptomyces mutabilis* المعزولة من البيئة البحريـة من أكثر السلالات نشاطًا في إنـتاج المضادات الحيويـة، حـيث أظهرت هـذه العزلات نـشاط ميـكروبي ضد جـميع الأنـواع البـكتيريـة المختبرة الموجبة لصبغة جرام. وقـد سجلت العزلة AL3أكبر منـاطق تثبيط بمقـدار ١١، ١٣، ١٥ مم ضد بـكتيريا *S. aureus*، MRSA، *E. faecalis*، على التـوالي. تـم استخلاص الـمادة الـخام للعزلـة AL3 باستـخدام مذيب أسيتات الإيثيل وتـم تجفيفها تحت ضغط منخفض، وأظهر المستخلص نـشاط ملحوظ ضد البـكتيريـا المختبرة *E. faecalis*. كما تـم تنقية المادة الفعالة باستخدام طريـقة الـفصل الكروماتـوجـرافيTLC-bioautography. تـعتبر الأكتينوميسيتات البحريـة مصدرًا واعـدًا لاكـتشاف المضادات الحيـوية الجديدة حيث أظهرت معظم السلالات (٧١,٤٣٪) نـشاط ميـكروبي ضد نـوع واحـد على الأقـل من البكتيريـا المختبـرة *S. aureus*, MRSA, *E. faecalis*, or *E. coli* بينما سجلت الأكتينوميسيتات الأخرى المعزولة من بيئات الكهوف والمنطقة القاحلة والينابيع الحارة أقل نسبة نشاط ميكروبي ٤١,٦٧٪ و٣٦,٣٦٪ و ٢٣,٠٨٪، على التوالي. لقد لوحظ أن الأكتينوميسيتات المتواجدة في الظروف البيئية القاسية منتجة بشكل واضح للمضادات الحيوية وبعض الإنزيمات المهمة. لذلك، لا بد من الاستمرار في دراسة البيئات المتطرفة المختلفة في المملكة العربية السعودية لعزل المزيد من الأكتينوميسيتات التي تمتلك مركبات جديدة ذات أهمية بيولوجية.

Extreme Habitats of Saudi Arabia as Sources of Novel Actinomycetes with Antimicrobial Activities

By

Lina Ahmed Bahamdain

Supervised By

Prof. Dr. Magda Mohamed Aly

Abstract

Recently, there is an urgent need for new drugs due to the emergence of multidrug-resistant pathogenic microorganisms that cause infectious diseases. Also, the demand for industrial enzymes with novel properties is urgently needed. Isolation and exploitation of actinomycetes from extreme habitats have increased leading to discover of potent bioactive natural compounds and avoid re-isolation of known strains. The present study was aimed to isolate actinomycetes from four different unexplored extreme habitats of Saudi Arabia, arid area, caves, marine, and hot spring environments. A total of 54 actinomycetes were isolated on starch nitrate agar based on their distinct morphological appearance. Out of the total isolates, 22 isolates were obtained from arid area soils, 12 isolates were isolated from caves soils, 7 isolates were obtained from marine samples, and 13 isolates were recovered from hot spring soil and water samples. All isolates were examined and characterized using morphological, physiological, and biochemical characters. The isolates ML52, ML53, and ML54 obtained from marine sediments were resistant to a wide variety of antibiotics. The identification of the isolates was confirmed using 16S rRNA. Sequences analysis of 16S rRNA of all isolates revealed that most of them (90.75%) belonged to the genus *Streptomyces* spp. It was noticed that *Streptomyces mutabilis* was the dominant species (16.67%) and was recovered from the four examined extreme habitats. Only one isolate, obtained from arid area, belonged to genus *Lentzea*, and it was most closely related to the type species of *Lentzea albidocapillata* (99% similarity). Also, two cave isolates were found to be members of the rare genus *Amycolatopsis*. Sequencing of 16S rRNA of isolates AL3 and AL7 illustrated that these two isolates were considered as uncultured bacteria. The sequences of the isolates obtained from hot spring region were further studied using some bioinformatics programs. All the selected actinomycete isolates were analyzed for some important enzymes production as well as antibacterial activity. Regarding screening for enzymes activity, all four extreme habitats were considered good sources

for actinomycetes that produced keratinase, gelatinase, chitinase and lipase. However, amylase and protease production were relatively showed better in arid area and cave actinomycetes. The antibiotic production was determined by agar plug method using different types of tested bacterial pathogens, *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, and *Escherichia coli*. The very active isolates were the uncultured isolate AL3 obtained from arid area, *Streptomyces* CL24 isolated from cave region, and *Streptomyces mutabilis* ML51 isolated from marine environment where they showed antibacterial activity against all tested Gram-positive bacteria. The isolate AL3 recorded the largest inhibition zone diameters of 11.0±0.5, 13.0±0.5, and 15.5±0.5 mm against *S. aureus*, MRSA, and *E. faecalis*, respectively. The crude antibacterial agent of the isolate AL3 was extracted using ethyl acetate and dried under reduced pressure. The obtained extract showed antibacterial activity against *E. faecalis* using agar well-diffusion method and the active material was purified using TLC-bioautography technique. Marine actinomycetes are considered the promising source for antibiotics discovery as most isolates (71.43%) showed antibacterial activity against at least one of the tested bacteria (*S. aureus*, MRSA, *E. faecalis*, or *E. coli*). Other actinomycetes isolated from caves, arid area, and hot spring ecosystems revealed less antibacterial activity 41.67%, 36.36% and 23.08%, respectively. In conclusion, actinomycetes grown under extreme conditions were clearly produced antibiotics and important enzymes. Thus, such bioprospecting needs to be continued both in the same areas as well as from other unique ecological environments of Saudi Arabia to isolate more actinomycetes with novel bioactive compounds.