Improving the Production of an Antibiotic Analogue to Cycloserine from the Local Isolate *Streptomyces species* by using some Mutagenic Methods

A Thesis
Submitted to the
College of Science- University of Basrah
IN Partial Fulfillment of the Requirements for
The Degree of Master of Science
IN Biotechnology

BY

Yessar A. D. AL-Harbah

Supervised by

Asst.Prof. Kawthar H. Mehdi

2006

Summary:

This study was designed to improve the production of the antibiotic cycloserine analogue from the local isolate *Streptomyces species*.

It has been verified that the strain retained its genetic and morphological properties, and that no changes occurred in the properties of bacteria during the preservation period.

The strain has also demonstrated its ability to produce the antibiotic in primary screening against the standard strains *Staphylococcus aureus* (NCTC6571),*Bacillus subtilus*(PC1219), *Escherichia coli* (NCTC5933), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC10031) .

The antibiotic has been extracted, purified and identified by subjecting it along with the standard antibiotic to melting point (MP) , solubility , chemical color test, UV and IR irradiation in addition to biological tests including the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against standard strains positive and negative for Gram staining in addition to the clinical isolate *Staphylococcus aureus* . LD50 has reached to 5200 mg/kg.

The optimal conditions for producing the antibiotic were determined and it was found out that incubation for 7 days at (28) C˚ at (200) rpm with pH= (7) and 5% volume of inoculum size have yielded optimum production of the antibiotic.

The fermentation medium has also been modified by the addition of Magnesium sulfate and potassium di-hydrogen sulfate and amino acid serine (5% gm/L).

The ability of the strain to produce the antibiotic has been genetically modified through exposing the strain to ultraviolet ray, the strain *St. sp*.u2 gave the best production has been chosen and exposed to chemical mutagen nitrosoguanidine (NTG) and the best strain was selected *St. sp*. u2n5.

The production of antibiotic by the wild strain *St.sp*. was compared to *St.sp*.u2 and *St.sp*.u2n5 by strains under the similar conditions and the results were 1, 2 and 10 gm/L respectively. The above diagnostic tests have been preceded for the antibiotic produced after mutation to verify its chemical identity.

تحسين انتاج المضاد الحياتي شبيه السايكلوسيرين من العزلة المحلية *Streptomyces species* باستخدام بعض طرائق التطفير

رسالة مقدمة

الى كلية العلوم – جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علوم الحياة

(تقنية حيوية)

من قبل

يسار عبد الحسين الحربة

بكالوريوس علوم حياة

ذي الحجة كانون الثاني 2006

المستخلص :-

تضمنت هذه الدراسة عزل مضاد حياتي شبيه بالسايكلوسيرين Cycloserine فعال ضد البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام ، من بكتريا الستربتومايسيس *Streptomyces species* المعزولة محليا من قبل Mehdi (1997) .

تم التاكد من احتفاظ السلالة *St. sp.* بصفاتها الوراثية والمظهرية بالاعتماد على دراسة الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيميوحيوية(Mehdi,1997) ،فقد اظهر التشخيص المظهري والكيميوحيوي للعزلة عدم وجود اي تغيير يعود الى فترة الحفظ ، كما اظهرت السلالة قدرتها على انتاج المضادات الحياتية تجاه كل من البكتريا القياسية *Staphylococcus aureus* (NCTC6571)، *Bacillus subitilus* (PC1219)، *Escherichia coli* (NCTC5933) و *Klebsiella pneumonea* (ATCC 10031) .

استخلص المضاد الحياتي المنتج وتم التاكد من نقاوته باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) و الورقية (PC).

شخص المضاد المستخلص كونه شبيه السايكلوسيرين من خلال اخضاعه والمضاد الحياتي القياسي لاختبار الانصهار (MP) ، والذائبية ،و الاختبارات اللونية فضلا عن طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) وطيف الاشعة فوق البنفسجية (UV).

اجريت على المضاد الحياتي المستخلص فحوصات حيوية تضمنت قياس التركيز المثبط الادنى (MIC) ضد عزلات بكتيرية قياسية موجبة وسالبة لملون كرام فضلا عن عزلة*aureus* *Staphylococcus* المعزولة من مصدر سريري، وتم دراسة التاثير السمي للمضاد المنتج من خلال تحديد الجرعة النصفية القاتلة (LD50) حيث بلغت الجرعة بحدود (5200) ملغم / كغم .

درست الظروف المثلى لانتاج المضاد الحياتي في الوسط التخمري حيث وجد ان افضل درجةحرارة لانتاج المضاد هي (28) م ، وافضل اس هيدروجيني (pH=7) و سرعة رج (200) دورة / دقيقة ، اما افضل حجم لقاح فكان (5%) .

كما تم تحسين الوسط التخمري باضافة كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، وكذلك اضافةالحامض الاميني السيرين (D-serine) بنسب (5%) غرام/لتر .

وقد تم تحسين انتاج السلالة البرية *St. sp.* وراثيا ، من خلال تعريضها للاشعة فوق البنفسجية وللفترات (5, 10, 15) دقيقة ، وتم اختيار افضل سلالة منتجة للمضاد بالاعتماد على طريقة Overlay ، واطلق عليها *St.sp.*u2، بعد ذلك تم تعريض هذه السلالة للمطفر الكيميائي النيتروسوكواندين (NTG) وبتراكيز (700, 400, 100) مايكروغرام / مل و اختيرت السلالة *St.sp.*u2n5 كونها افضل سلالة منتجة للمضاد الحياتي . و تم مقارنة انتاج المضاد الحياتي في الظروف نفسها للسلالة البرية *St. sp* والسلالة المطفرة بـ(UV) *St.sp.*u2 والسلالة المطفرة بـ (NTG) *St.sp.*u2n5 وكانت النتائج (10, 2, 1) غرام / لتر على التوالي ، وقد اجريت الفحوصات التشخيصية الكيميائيةالمذكورة اعلاه للمضاد الحياتي المنتج بعد التطفيرللتاكد من هويته الكيميائية .