

## الاية

قال الله تعالى

((أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ سَخَّرَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ وَالْفُلْكَ تَجْرِي فِي الْبَحْرِ بِأَمْرِهِ وَيُمْسِكُ السَّمَاءَ أَنْ تَقَعَ عَلَى الْأَرْضِ إِلَّا بِإِذْنِهِ إِنَّ اللَّهَ بِالنَّاسِ لَرَّءُوفٌ رَحِيمٌ 65))

سورة الحج الاية (65)

## **Dedication**

To my parents

To my brother and my sister

To my friends

To those helped me in my way

## **ACKNOWLEDGEMENT**

First of all thanks to Almighty Allah for giving me strength and support to complete this research.

I would like to express my deep thanks and appreciation to my supervisor Prof. Humodi Ahmed Saeed for his supervision, suggestion, encouragement and support throughout this dissertation.

Also I would like to express my deep thanks and gratitude to Dr. Elhag Mansour who gave me a lot of his time in solving problems in this work.

Thanks are extended to staff of Research Laboratory, Sudan University of Science and Technology for their help and support.

All thanks my colleagues and friends, for their fruitfully comment

## ABSTRACT

Research for antibiotics has been widely performed for about 50 years and new antibiotics are still being discovered to treat infectious diseases. This analytical study was conducted during the period from May to October 2012. The aim of this study was to evaluate methods of isolation of antibiotic-producer bacteria.

Soil samples were collected from red sea and Kassala state. The samples were inoculated onto nutrient agar enriched with soil extract using the pour and spread plate methods. Bacterial colonies were counted in each method employing several serial dilutions, and the appropriate dilution of bacterial growth was chosen to detect antibiotic-producer bacteria by plate-over-lay method using bacterial clinical isolates and standard strains. Of the broad antibiotic producing bacteria, one isolate was chosen and evaluated against standard organisms and clinical isolates using cup plate diffusion method.

From the result the isolation of antibiotic-producing bacteria revealed that the number of colonies forming units (cfu) /ml was high (50 cfu/ml) when Spread Plate Method was used compared with Pour Plate Method (29 cfu/ml).in dilution $10^4$  Moreover, the Pour Plate Method showed best growth distribution of colonies (16-21 colonies/plate) in dilution  $10^{-5}$  while in Spread Plating method need more dilutions achieve the same distribution and number of colonies

The result showed that the pour plate method was practically better than spread plate method. Yet, both methods were helpful and successful in isolation of various promising antibiotic producer bacteria from soil.

This study concluded that the pour plate method was suitable and superior over the spread plate for isolation of antibiotic-producer bacteria from soil. The study also indicated that the Sudanese soils of various sources are rich with antibiotic producers. Further investigation is warranted to identify the producer, characterize the nature of inhibitor and validate the findings.

## المستخلص

البحث عن المضادات الحيوية تم علي نطاق واسع على نطاق واسع خلال الخمسين سنة الماضية ، ولا تزال مضادات حيوية جديدة يتم اكتشافها لعلاج الأمراض المعدية. وقد أجريت هذه الدراسة خلال الفترة من مايو إلى أكتوبر 2012. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم طرق عزل البكتيريا المنتجة للمضادات الحيوية.

جمعت عينات التربة من البحر الحمر ولاية كسلا في اكياس بلاستيكية معقمة و تم تزييعها في الاجار المغزي مضافا اليه مستخلص التربة. مع استخدام أساليب صب اللوحة وطريقة الانتشار. احصيت المستعمرات البكتيرية التي زرعت في الثلاث التخفيفات الاخيره ، واختير التخفيف الملائم لنمو البكتيريا للكشف عن البكتيريا المنتجة للمضادات الحيوية بواسطة لوحة الإفراط عن طريقة استخدام سلالات قياسية و سريرية. من العزلات البكتيرية المنتجة للمضادات الحيوية واسعة النطاق، قد تم اختيار عزلة واحدة وتقييمها ضد سلالات قياسية و سريرية باستخدام طريقة نشر كأس لوحه.

من النتيجة في البكتيريا المنتجة للمضاد الحيوي اظهرت عدد وحدات التشكيل (cfu) عالي (50cfu/ml) فيطريقة الانتشار مقارنة بطريقة صب اللوحة (29cfu/ml) في التخفيف رقم  $10^4$  . وكذلك طريقة صب اللوحة اعطت افضل توزيع الخلايا عند 16-21 خليه/لوحة في التخفيف رقم  $10^5$  بينما في طريقة الانتشار تحتاج الي عدد اكثر من التخفيف للوصول لنفس التوزيع وعدد الخلايا.

وأظهرت النتيجة أن طريقة صب اللوحة كانت أفضل عمليا من طريقة لوحة الانتشار في اعطاء وحدات أقل مستعمرة تشكيل (cfu) / مل والنسبة، ويحتاج عدد اقل من التخفيف، مع ذلك كانت كل من الطريقتين مفيدة وناجحة في عزل تمنية من البكتيريا الواعده للمضادات الحيوية من التربة.

وخلص الي ان طريقة تغطية اللوحة هي الطريقة المناسبة والافضل من طرقة الانتشار في عزل البكتيريا المنتجة للمضادات الحيوية , وأشارت الدراسة إلي ان التربة السودانيه تعج بالبكتيريا المنتجة للمضادات الحيوية وان اجراء المزيد من الابحاث مطلوب للتأكد من صحة هذه النتيجة.

## TABLE OF CONTENTS

الآية.....	I
Dedication.....	II
Acknowledgement.....	III
Abstract.....	IV
المستخلص.....	V
Table of contents.....	VI
List of tables.....	IX
List of figures.....	X

## CHAPTER ONE

### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

1.1. Introduction .....	1
1.2. Rationale.....	2
1.3. Objectives.....	2
1.3.1. General objective .....	2
1.3.2. Specific objectives .....	2

## CHAPTER TWO

### LITERATURE REVIEW

2.1. History of antibiotics discovery.....	3
2.2. Antibiotics .....	4
2.3. Antibiotic resistance .....	5
2.4. Methods of isolation of antibiotic produce .....	7
2.4.1. Pour plate method .....	8

2.4.2. Spread-plating method.....	8
2.4.3. Settle platesmethod..	8
2.4.4. Membrane filter technique.....	8

### **CHAPTER THREE**

#### **MATERIALS AND METHODS**

3.1. Study design .....	10
3.1.1. Type of study .....	10
3.1.2. Study area .....	10
3.1.3.Study duration.....	10
3.2. Experimental work.....	10
3.2.1. Collection of soil samples.....	10
3.2.2. Pre-treatment of soil .....	10
3.2.3. Preparation of soil extract agar medium.....	10
3.2.4. Preparation of soil dilutions .....	10
3.2.5. Standard bacterial strains.....	11
3.2.6. Clinical bacterial isolates.....	11
3.2.7. Inoculation of culture medium .....	11
3.2.8. Counting of grown colonies .....	11
3.2.9. Isolation and detection of antibiotic producer(s) .....	11
3.2.10. Purification and preservation of cultures .....	11
3.2.11. Confirmatory testing of antibiotic production .....	12
3.2.12. scaling-up of antibiotic producer .....	12
3.2.13. Determination of antibiotic activity .....	12

**CHAPTER FOUR**  
**RESULTS**

4.1. Results.....13

**CHAPTER FIVE**  
**DISCUSSION**

5.1. Discussion.....27

5.2. Conclusion.....28

5.3. Recomendations.....28

**6. References.....29**

**7. Appendices.....33**



## LIST OF TABLES

Table 1. Types of soil samples and their sources.....	18
Table 2. Distributed growth colonies in different samples and calculation parameter by two method.....	19
Table 3. Showed the activity of bacterial product filtrate against clinical isolates.....	24

## LIST OF FIGURE

Figure 1. Inoculation of the soils sample primary inoculated in nutrient Soil extract by pour plate and spread plate method.....	20
Figure 1. Showed the inoculation by spreading plate method.....	21
Figure 1. Produced antibiotic tested against staphylococcus aureus ATCC 29213 by over lay method.....	22
Figure 1. Produced antibiotic tested against <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	23
Figure 1. 23mm in diameter zone of inhibition against <i>E.fecalis</i> .....	26
Figure 1. 18 mm in diameter zone of inhibition against <i>Proteus vulgaris</i> .....	27
Figure 1. 17mm in diameter zone of inhibition against <i>E. coli</i> .....	28
Figure 1. 16 mm in diameter zone of inhibition against <i>Pseudomonas</i> .....	29
Figure 1. 15 mm in diameter zone of inhibition against <i>Serretia</i> .....	30
Figure 1. 12 mm in diameter zone of inhibition against <i>Citrobacters</i> .....	31
Figure 1. 9 mm in diameter Zone of inhibition against <i>S. aureus</i> .....	32