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

عزل وتشخيص خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* من الترب الملوثة بالمشتقات النفطية وتقييم كفائتها في المعالجة الحيوية

سارة إبراهيم احمد هايس

رسالة ماجستير

علوم الحياة/ علم النبات

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة بادية عبد الرزاق ملا عبيدة

١٤٤٤هـ

٢٠٢٣ م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية جمع 20 عينة تربة من حقل نفط باي حسن في محافظة كركوك ومحطة تعبئة K1 النفطية التابعة لمحافظة أربيل / العراق في الفترة بين تأريخ ١٥/ ٦/ 2022 ولغاية ١٥/ ٩/ ٢٠٢٢ . تم الحصول على ١٤٢ عزلة من الفطريات الخيطية والخمائر. شخصت العزلات بالاعتماد على الاختبارات المظهرية والمزرعية والكيموحيوية. واظهرت النتائج عزل 80 عزلة من الفطريات الخيطية وتوزيعها على ٣ أجناس مختلفة *Aspergillus*، *Penicillium* و *Rhizoctonia* عرفت الفطريات *A. niger*، *A. caespitosus*، *A. fumigatus*، *A. nidulans*، *A.parasiticus*، *E.quadrilieata*. وكان الفطر *A. niger* اكثر الفطريات تكرارا في موقعي العزل وصل عدد عزلاته في محطة تعبئة (k1) ٩ عزلات (٥٦.٢٥٪) وعزلة ١٥ (٢٣.٤٣ %) في حقل باي حسن اما الفطر *A. fumigatus* فكان اقلها تكرارا (6.25%) في محطة تعبئة K1. والـ*Rhizoctonia* spp. اقل تكرارا في حقل باي حسن (1.56%) وتفاوتت بقية الفطريات في نسب ظهورها.

كما جرى في الدراسة عزل ٦٢ عزلة محلية من الخمائر تعود الى 8 اجناس *Pichia*، *kazachstania*، *Kloeckera*، *Zygosaccharomyces*، *Geotrichum*، *Saccharomyces*، *Rhodotorula*، *Candida*.

تم دراسة قابلية مقاومة العزلات *R. mucilaginosa* S6 و *S. cervisiae* S3 لـ 16 مضاد حيوي و8 ايونات معادن ثقيلة. أظهرت النتائج بان العزلات المدروسة جميعها كانت مقاومة لـ Ap، Fc،Clin و Ct في حين أنها ابدت حساسية تجاه المضاد الحيوي Ax وكانت النتائج متفاوتة مع بقية المضادات. وأبدت الخمائرمقاومة مطلقة لايونات المعادن الثقيلة $NiSO_4$ و$K_2Cr_2O_7$ ومتفاوتة بالنسبة لبقية المعادن الثقيلة.

اظهرت نتائج عزل وترحيل محتوى الحمض النووي البلازميدي من الخمائر باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز احتواء العزلة *R. mucilaginosa* S6 والعزلة *S. cervisiae* S3 على حمض النووي البلازميدي. تم نجاح تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي للعزلة *R. mucilaginosa* S6 ان المستعمرات المحيدة لم تحمل صفة تحلل المركبات الهيدروكاربونية وهذا يشير الى ان الجينات المسؤولة عن هذه الصفة واقعة على الحمض النووي البلازميدي وأظهرت المستعمرات المحيدة حساسية تجاه المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة المدروسة وبنسب مئوية ١-٩٢٪ عدا $NiSO_4$و$CoCl_2$. كذلك بينت نتائج تحييد العزلة *S. cervisiae* S3 فقدان المقاومة للمضادات الحيوية وبمدى ٣-٩٣٪.

نجحت عملية الاقتران ما بين العزلة الواهبة *R. mucilaginosa* S6 وعزلة *S. cervisiae* S3 المحيدة كمستقبل وبتردد اقتران 2.1×10^{-8}. وأثبتت هذه الدراسة أن الحمض النووي البلازميدي المنتقل من العزلة *R. mucilaginosa* S6 يحمل جينات المقاومة للمضاد الحيوي Er ويحمل الجينات المسؤولة عن تحلل المركبات الهيدروكاربونية وهذا يؤكد بأن المورثات المشفرة لصفة تحلل المركبات الهيدروكاربونية تقع على الحمض النووي البلازميدي.

لتقليل أو إيقاف التهديدات التي تتعرض لها الأنظمة البيئية استغلت العزلة المحلية للخميرة *R. mucilaginosa* S6 الغير المحيدة والمحيدة في تحليل المركبات الهيدروكاربونية (النفط الخام بنوعيه الثقيل والخفيف فضلا عن وقود الحيوي اظهرت نتائج استعمال وسط الاملاح المعدنية Bushnel Haas Medium المجهز بالمركبات الهيدروكاربونية وبنسبة ١٥٪ قدرة عالية للخميرة على تحلل المركبات الهيدروكاربونية واستحلابها في زمن قياسي يصل من ١٠- ٢٠ يوم للنفط الخام بنوعيه و٧-١٠ ايام بالنسبة للوقود الحيوي (الديزل) في حين لم تتمكن العزلة *R. mucilaginosa* S6 المحيدة من تحليل اي من المركبات الهيدروكاربونية، ولوحظ حدوث تغييرات مظهرية في طبقة النفط الخام بنوعيه الثقيل والخفيف والديزل، ابتداء باليوم الخامس من التحضين بدلالة تغير لون الوسط بالكامل الى اللون البني الغامق للنفط والعسلي للديزل وهذا يشير الى بدء حدوث عملية الاستحلاب، ومع استمرار التحضين الى ١٥ يوما لوحظ ظهور حلقة مع فقاعات خفيفة طافية على سطح الوسط الغذائي. كما بينت مخرجات التحلل باستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز – مطياف الكتلة Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) أهم المركبات الكيمياوية الناتجة من تحلل النفط الخام. إذ تبين ان عينة النفط الخام الثقيل المعاملة بمعلق الخميرة مكونة من ٣٤ مركب كيميائي وعينة النفط الخام الخفيف المعاملة بمعلق الخميرة مكونة من ١٩ مركب، اما بالنسبة للوقود الحيوي فقد بينت نتائج احتواء عينة المعاملة ٤٧ مركب، وظهرت المركبات عند أوقات احتباس مختلفة. ان اختفاء بعض المركبات وظهور مركبات ايض ثانوية مختلفة في عينات المعاملة يعود الى قابلية الخميرة على تحليلها الى مركبات ثانوية بسيطة بإمكانها الاستفادة منها كمصدر كاربوني للطاقة.

Summary

The current study included the collection of 20 soil samples from the Bay Hassan oil field in Kirkuk governorate and the K1 oil filling station in Erbil / Iraq during the period between 6/15/2022 and 9/15/2022. A total of 142 isolates were obtained from filamentous fungi and yeasts. Isolates were diagnosed based on phenotypic, culture and biochemical tests.. The results showed the isolation of 80 isolation of fossil fungi and distributed to 3 different races *Aspergillus*, Penicillium and Rhizockonia The fungi A. NIGER, A. Caespitosus, A. Fumigatus, A. Nidulans, A.parasiticus, Emericella Quadrilieta A. The fungus A. Niger was more more and the fungus A. Niger was more more more. The fungi are repeated in the insulation sites. The *Rhizoctonia* SPP. is less frequent in the Bay Hassan field (1.56%) and the rest of the fungi varied in their appearance rates.

Also ٦٢ local yeast isolates belonging to different genera were isolated in the study *Pichia*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Zygosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Candida*. Two Escherichia coli from the Bank of Life Sciences/ College of Science/ University of Mosul/ Iraq were also obtained. The diagnosis was confirmed using Eosin Methylene Blue (EMB) and API 20 E.

The ability to resist isolation has been studied *R. mucilaginosa* S6 and S. Cervisiae S3 for 16 antibiotic and 8 heavy metal ions. The results showed that all the studied insulation were resistant to AP, FC, CLIN and CT while they were allergic to AX antibiotics and the results were varying with the rest of the antibiotics. The yeasts expressed an absolute resistance to heavy metal ions $NiSO_4$ and $K_2Cr_2O_7$ and varying for the rest of the heavy metals. The ability of the *E. coli* bacteria to resist antibiotics and heavy metal ions has been studied. The results showed that two tested E. coli bacterial isolation was resistant (AP, CF, CLIN, CT, ER, FC, STR, RIF, NYS, Pen, AX, ITR, TC and COT) While the isolated (2) isolated from the water is sensitive to the antibiotic Van, the

isolation *E. Coli* Urine (1) isolated from the estate was sensitive to the antibiotic. Sensitive for $CdCl_2$ and $CoCl_2$.

The results of the insulation and deportation of the plasmidic DNA content of yeasts and bacteria using the electrical deportation technology in the Acarose gel contained isolation *R. mucilaginosa* S6, *S. cervisiae* S3 and *E. coli* (1) on the plasma DNA. The neutralization of the plasma DNA content was successful for isolation *R. mucilaginosa* S6 The neutral colonies showed an allergy to antibiotics and heavy minerals studied at 1-92%, except $NiSo_4$ and $CoCl_2$. Also showed the results of neutralization of isolation *S. cervisiae* S3 Loss of antibiotics resistance by 3-93%. The results of neutralization of isolation showed *E. coli* (1) Loss of antibiotics resistance and a range of 7-97% except AX, this is confirmed by gelatinous electrical deportation.

The process of conjugation between the Wahba isolation succeeded *R. mucilaginosa* S6 and the *S. cervisiae* S3 isolation as a future and a frequency of 2.1 x 10-8. This study demonstrated that the plasmidic DNA transmitted from isolation *R. mucilaginosa* S6 carries the genes of the antibiotic resistance and carries the genes responsible for the decomposition of hydrocarbon compounds, in addition to an attempt to associate with the kingdoms between the yeast *R. mucilaginosa* S6, E. coli(1) bacteria (1) As a future. The results showed that the Plasidic DNA bearing the resistance genes of RIF has the ability to move and move from yeast to bacteria and with a frequency of 5.8 x 10-8. The results also showed that the neutral bacteria have the ability to receive and localize the plasmid from the yeast through the process of conjugation, and the colonies resulting from the conjugation expressed the characteristic of the decomposition of hydrocarbon vehicles, and this confirms that the encoded genes of the recipe for decomposition of hydrocarbon vehicles are located on the plasma DNA.

To reduce or stop the threats to the ecosystems, the local isolation of the lying and unusual and associated and bacteria associated with the analysis of hydrocarbon vehicles (crude oil in its heavy and light quality as well as diesel

fuel). The results of the use of Bushnel Haas Medium, equipped with hydrocarbon vehicles, showed 15% high yeast capacity to decompose hydrocarbon vehicles and their embrace in a record time of 10-20 days for crude oil in two types and 7-10 days for biofuels (diesel) While the isolation *R. mucilaginosa* S6 was unable to analyze any of the hydrocarbon vehicles, and appearance changes in the crude oil layer were observed in its heavy, light and diesel quality, starting with the fifth day of incubation, in terms of the full change of the medium color to the dark brown color of the oil and honey of the diesel and this indicates this The initiation of the process of conjunction begins, and with the continuing incubation to 15 days, a loop is observed with light floating bubbles on the surface of the nutritional medium. The outputs of the decomposition using the gas chromatography (GAS Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS is the most important chemical compounds resulting from crude oil decomposition. It was found that the heavy crude oil sample treated with a yeast suspension consisting of 34 chemical compounds and mild treated oil sample treated. With a yeast suspended, it consists of 19 compounds, As for biofuels, the results of the transaction sample contained 47 compounds, and vehicles appeared at different retention times. The disappearance of some vehicles and the emergence of different secondary compounds in the treatment samples is due to the ability of yeast to analyze them to simple secondary compounds that can benefit from them as a carbon source of energy.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Biology

Isolation and identification of *Rhodotorula mucilagenosa* yeast from the contaminated soil with oil derivatives and evaluation of their in bioremediation

Sarah Ibrahim Ahmed Hayes

M.Sc. Thesis

Biology/ Botany

Supervised by

Asst.Prof. Dr.Badia Abdul Razzaq Mulla Obaid

1444 A.H. **2023 A.D.**