جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

عزل وتشخيص ودراسة بعض أنواع الخميرة *Rhodotorula* من الناحية الوراثية والجزيئية وكفائتها في انتاج β-carotene

بادية عبدالرزاق جمال ملاعبيدة

أطروحة دكتوراه
علوم حياة / علم النبات

بإشـراف

الأستاذ المساعد
الدكتورة رافعة قادر جرجيس

الأستاذ المساعد
الدكتور رعد حساني سلطان

1438هـ
2017م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية جمع 251 عزلة محلية من الخمائر خلال ثلاثة اشهر مصادر نباتية مختلفة في مدينة الموصل/العراق. شخصت العزلات بالاعتماد على الاختبارات المظهرية والمزرعية والكيموحيوية وجرى تأكيد التشخيص باستخدام اختبار الـ API 20C. واظهرت النتائج أن الخمائر تعود الى الأنواع التالية: *Candida albicans*1، *Candida lusitaniae*، *Candida magnolia*، *Candida pelliculosa*، *Cryptococcus albidus*، *Cryptococcus humicola*، (*Rhodotorula minuta*) = *Cytobasidium minuta*، *Kleockera apiculata*، *Kodamaea ohmeri*، *Rhodotorula glutinis*، *Rhodotorula graminis*، *Rhodotorula mucilaginosa* 1، *R. mucilaginosa* 2، *Saccharomyces cerevisiae* ، *Stephanoascus ciferrii*. كما تم الحصول على 5 عزلات من جرثومة *Escherichia coli* من خروج الاطفال الرضع في مستشفى الزهراوي التعليمي في مدينة الموصل/العراق وشخصت اعتمادا على الاختبارات الكيموحيوية.

بينت نتائج استخلاص صبغة البيتا-كاروتين بأن الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 كانت العزلة الافضل انتاجا (10.25غم/لتر). درست التأثيرات التطفيرية لكل من المطفر الكيميائي N-methyl-Ń-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) والمطفر الفيزيائي الأشعة فوق البنفسجية القصيرة الموجة Short Wave Ultraviolet (UV) على حيوية عزلات الخميرة واظهرت النتائج زيادة شدة القتل في جميع العزلات مع زيادة مدة التعريض للـ UV وكانت الخميرة *Cyto. minuta* BA78 اكثر تأثرا، إذ بلغت نسبة شدة القتل 100% عند فترة تشعيع 20 دقيقة. اما المطفر الكيميائي (MNNG) وبالتركيز 0.2 ملغم/مل فكان اقصى تأثير له في شدة القتل على الخميرة *Cyto. minuta* BA78، إذ بلغت 36.13%. أظهرت نتائج دراسة الدمج بين MNNG والـ UVC أن شدة القتل ازدادت بعد التطفير بـ 0.2 ملغم/مل من المطفر MNNG وزيادة فترة التعريض 20 دقيقة. ان اقصى التأثيرات كان مع الخميرة *Cyto. minuta* BA78 إذ وصلت شدة القتل الى 100%. كذلك اثر التطفير بالدمج بـ 0.2 ملغم/مل من MNNG والتعريض للـ UV لمدة 10 دقائق على انتاجية صبغة البيتا- كاروتين، حيث بلغ اقصى انتاج 11.45 ملغم/لتر للعزلة *R. mucilaginosa* BA61.

تم دراسة قابلية مقاومة العزلات *Cyto minuta* BA78، *R. glutinis* BA83 ، *R. graminis* BA1 ، *R. mucilaginosa* BA58، *R. mucilaginosa* BA75، *R. mucilaginosa* BA61 و *S. cervisiae* BA179 لـ 20 مضاد حيوي و8 ايونات معادن ثقيلة. أظهرت النتائج بان جميع العزلات المدروسة كانت مقاومة لـ Ax، Ap، Cf، Clin، Nm، Rif، Str

وTm وحساسة للمضاد الحيوي Ct. وتباينت مقاومة الخمائر تجاه ايونات المعادن الثقيلة ما عدا الـ $CuSO_4$، إذ كانت جميع العزلات المدروسة مقاومة له. بعد التطفير بالـ MNNG والـ UV أظهرت النتائج ان جميع العزلات المدروسة مقاومة لـ Ap، Cd، Cf، Clin، Ls، Pen، Str و Tm ومقاومة لأيونات المعادن الثقيلة $ZnSO_4$، $CuSO_4$ و $HgCl_2$. تم دراسة قدرة بكتريا الـ *E. coli* على مقاومة المضادات الحيوية وايونات المعادن الثقيلة. أظهرت النتائج ان جميع العزلات مقاومة لـ Ap، Cf، Clin، Ct، Er، Fcz، Kc، Ls، Nys، Pen، Tc، Tm وVan وحساسة لـ Cm وNm في حين كانت جميع العزلات مقاومة لـ $PbCl_2$ وحساسة لـ $NiCl_2$ و $CoCl_2$.

اظهرت نتائج عزل وترحيل محتوى الحمض النووي البلازميدي من الخمائر باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز احتواء العزلة *R. mucilaginosa* BA61 والعزلة *S. cervisiae* BA179 على حمض النووي البلازميدي، اما بقية عزلات الخمائر فلم يثبت احتواؤها على بلازميدي. تم نجاح تحييد محتوى الحمض النووي البلازميدي للعزلة *R. mucilaginosa* BA61. ان المستعمرات المحيدة تحمل صفة انتاج صبغة البيتا– كاروتين وان الجينات المسؤولة عن هذه الصفة تقع على الكروموسوم لعدم حدوث تحييد. أظهرت المستعمرات المحيدة حساسية تجاه المضادات الحيوية المدروسة وبنسب مئوية 16–80% عدا Ap، Er، Ls وVan. كذلك بينت نتائج تحييد العزلة *S. cervisiae* BA179 فقدان المقاومة للمضادات الحيوية وبمدى 15–92%. اظهرت نتائج تحييد العزلة *E . coli* BA252 فقدان المقاومة للمضادات الحيوية وبمدى 15– 23% ماعدا Tm، Er وLs وهذا ما اكده الترحيل الكهربائي الهلامي.

نجحت عملية الاقتران ما بين العزلة الواهبة *R. mucilaginosa* BA61 وعزلة *S. cervisiae* BA179 المحيدة كمستقبل وبتردد اقتران 0.65×10^{-8}. وأثبتت هذه الدراسة أن الحمض النووي البلازميدي المنتقل من العزلة *R. mucilaginosa* BA61 يحمل جينات المقاومة للمضاد الحيوي Gm ولكنه لا يحمل الجينات المسؤولة عن انتاج صبغة البيتا– كاروتين، فضلا عن ذلك اجريت محاولة للاقتران عبر الممالك بين الخميرة *R. mucilaginosa* BA61 كواهب وبكتريا *E. coli* 252 كمستقبل. اظهرت النتائج بأن الحمض النووي البلازميدي الحامل لجينات المقاومة للـ Rif له القابلية على الحركة والانتقال من الخميرة الى البكتريا وبتردد اقتران 3.05×10^{-8}. كذلك بينت النتائج بأن البكتريا المحيدة لها القابلية على استقبال وتوطين البلازميد من الخميرة عبر عملية الاقتران، غير أن المستعمرات الناتجة من الاقتران كانت لا تحمل صفة انتاج صبغة البيتا– كاروتين وهذا يؤكد بأن المورثات المشفرة لصفة انتاج الصبغة تقع على الحمض النووي الكروموسومي.

استعملت تقنية التضخيم العشوائي RAPD للتحري عن التباين الوراثي بين انواع جنس *Rhodotorula* باستعمال ستة بادئات عشوائية. أظهر البادئ BAD1 القدرة على الارتباط بالعديد من المواقع ضمن الحمض النووي للعزلات المذكورة في حين كان للبادئ M13 قدرة ضعيفة في الارتباط. تم تحديد وجود وحجوم الحزم، واظهرت النتائج بأن العزلتين *R. mucilaginosa* BA61 و*R. mucilaginosa* BA58 الاقرب ضمن المجموعة الرئيسية، بينما ابتعدت العزلتان *R. glutinis* BA83 و *R. graminis* BA1 بمجموعة ثانوية منفصلة على الرغم من التقارب الواضح بينهما وهذا ما بدا واضحا خلال التحليل العنقودي Culaster analysis للمجاميع الزوجية، الذي بدوره جاء توكيدا لما ظهر ضمن الفحوصات التقليدية المظهرية، فضلاً عن الاختبارات الكيموحيوية.

Summary

The present study included isolation of 251 local isolates of yeasts for three months from different plant sources in Mosul city/Iraq. The isolates was identification according to morphological, cultural and biochemical tests. And confirmed using by API 20 C test. The results revealed that the yeasts belong to the following species: *Candida albicans* 1, *Candida lusitaniae*, *Candida magnolia*, *pelliculosa Candida*, *albidus Cryptococcus*, *Cryptococcus humicola*, *Cytobasidium minuta* = (*Rhodotorula minuta*), *Kleockera apiculata*, *Kodamaea ohmeri*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula mucilaginosa* , *Rhodotorula mucilaginosa* 1, *R. mucilaginosa* 2, *Saccharomyces cerevisiae*, *Stephanoascus ciferrii*. Also five strains of *Escherichia coli* was isolated from collected stools of infants in Al-Zahrawi Teaching Hospital in Mosul city/Iraq, that identified according to the biochemical tests.

The results of β-carotene pigments extraction productive strain (10.25 g/l). The mutational effects was examined for each of chemical mutagen MNNG and physical mutagen UV on the viability of yeast strains. The results showed increase of irradiation period with UV and the yeast *Cyto. minuta* strain BA78 the most affected, which killing intensity reached to 100% with the irradiation period 20 min. The chemical mutagen 0.2 mg/ml has the maximum killing intensity effect on the yeast *Cyto. minuta* strain BA78, which reached to 36.13%. The results of combination effects of MNNG and UV study revealed that the killing intensity increased after mutagenesis with 0.2 mg/ml of MNNG and increasing UV period to 20 min. The maximum effect was with the *Cyto. minuta* strain BA78, which killing intensity reached to 100%. Also combination mutagenesis with 0.2 mg/ml of

MNNG and irradiation to UV for 10 min effect on β-carotene pigment productivity, which reached maximum to 11.45 g/l for the yeast *R. mucilaginosa* strain BA61. The ability of the strains *R. mucilaginosa* BA58, *R. mucilaginosa* BA75, *R. mucilaginosa* BA61, *R. glutinis* BA83, *Cyto. minuta* BA78 and *S. cervisiae* BA179 for resistance of 20 antibiotics and 8 the heavy metals ions was studies. Results showed that all the studied strains was resistant to Ax, Ap, Cf, Clin, Nm, Rif, Str and Tm and sensitive to Ct. Variant resistance of the isolated yeasts against of different heavy metals ions with exception for Cu SO_4, which all the studied strains was resistant. After mutation with MNNG and UV, results revealed that all the strains was resistant to Ap, Cd, Cf, Clin, Ls, Pen, Str and Tm and resistant to $ZnSO_4$, $CuSO_4$ and $HgCl_2$. The ability of the *E. coli* strains for resistance of antibiotics and heavy metals ions was studied. Results showed that all the strains resistant to Ap, Cf, Clin, Ct, Er, Fcz, Kc, Ls, Nys, Pen, Tc, Tm and Van and sensitive to Cm and Nm, whereas all the strains were resistant to $PbCl_2$ and sensitive to $NiCl_2$ and $CoCl_2$. Results of study of isolation and gel electrophoresis of plasmid DNA content from the studied yeasts by gel electrophoresis technique revealed that *R. mucilaginosa* strain BA61 and *S. cervisiae* strain BA179 containing plasmid nucleic acid, their was no proof of plasmid nucleic acid content with other strains.

Curing of plasmid DNA for the *R. mucilaginosa* BA61 was succeed. The curred colonies was bearing β-carotene pigment production characteristic and the genes responsible for this characteristic laid on the chromosome, as long as, the curing did not occur. The curred colonies showed sensitivity against the studied antibiotics with percentage ranged 16-80% with exception with Ap, Er, Ls and Van. Also results of curing of the yeast *S. cervisiae* strain BA179 losing of antibiotic resistance with the range 15-92%. Results of curring of *E. coli* BA252 strain revealed losing of antibiotic resistance with

percentage 15-23%, with exception with the Tm, Er and Ls and this confirmed by gel electrophoresis.

There was success conjugation s between donor strain *R. mucilaginosa* BA61 and curred *S. cervisiae* BA179 as recipient with conjugation frequency 0.65×10^{-8}, this study proved that the transferred plasmid nucleic acid from *R. mucilaginosa* BA61 bearing Gm antibiotic genes, but not genes responsible for β-carotene pigment production, as well as, two attempts of conjugation was done through kingdoms between *R. mucilaginosa* BA61 as a donor and *E. coli* BA252 as recipient. Results revealed that plasmid nucleic acid bearing Rif resistance genes has the ability of mobilization and transferation from the yeast to bacteria with conjugation frequency 3.05×10^{-8}. Results also showed that the curred bacteria has the ability of receiving and stability of plasmid from the yeast by conjugation, whereas the resulting colonies was not bear production of the β-carotene pigment characteristic and this confirm that the genes coding for pigment production characteristic laid on chromosomal nucleic acid.

DNA amplification RAPD technique was used for searching about genetic variation between species of *Rhodotorula* by using six random primers. The BAD1 primer showed ability to attach with many nucleic acid positions of the mentioned strains, whereas M13 primer have the weak attachment. Band presence and sizes was determined. Results revealed that the strains *R. mucilaginosa* BA61 the nearest in the main group, whereas the two strains *R. glutinis* BA83 and *R. graminis* BA1 was to move away in second separated group although the clear to approach one another. This was clear through cluster analysis of marital totals. This result confirm results of traditional morphological examinations, as well as, biochemical test.

University of Mosul
College of Education
for Pure Sciences

Isolation and Identification and Study of Some *Rhodotorula* Species from Genetic and Molecular Aspects and Their Efficiency in β-Carotene Production

Badia Abdul Razzaq Jamal Malla Obaida

Ph.D.Thesis
in
Biology/Botany

Supervised By

Assistant Professor
Dr. Rafaa Qader Jirjees

Assistant Professor
Dr.Raad Hassani Sultan

2017 A.D **1438 A.H.**