جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

التحري الجزيئي للبروتينات المعزولة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* وتأثيرها التثبيطي على الفطريات والبكتريا الممرضة للنبات

هبة هادي طه أحمد الدباغ

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ المساعد	الاستاذ المساعد
الدكتورة نجوى ابراهيم خليل البرهاوي	الدكتورة فاتن نوري عبد ملا عبد

١٤٤٤هـ ٢٠٢٢م

الخلاصة

تضّمنت الدراسة الحالية عزل 110 عزلة محلية من الخمائر من أنواع مختلفة من الفواكه والترب ومن أوراق البرتقال في مدينة الموصل ، وكانت أعلى نسبة مئوية للتردّد عائدة لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* ، وشُخِّصت العُزْلات بالاعتماد على الاختبارات المظهرية والمجهرية والكيموحيوية ، وأُكد تشخيص بعضها باستخدام نظام Vitek 2. أمّا بالنسبة لعُزلَتيْ خميرة *S.cerevisiae* فأُكِّد تشخيصهما جزيئيا بوساطة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وباستعمال بوادىء متخصِّصة بالجين Internal Transcribed Spacer(*ITS*) ولوحظ انفصال حزمة واحدة لكل عُزْلة وبحجم 550− 650 زوجاً قاعدياً وعند دراسة تتابع القواعد النتروجينية للحمض النووي DNA لوحظ وجود مواقع للتباين أو التغاير الوراثي عند مقارنتها بالجين *ITS* في موقع NCBI الخاص بالعزلات المشخصة وأُعطيتا الرّمز OM760491 وON168448 على التوالي ، كما شُخِّصَت خميرة *Aureobasidium pullulans* جزيئيا وأُعطيت الرّمز OK614102.1 في بنك الجينات العالمي.

كما تضمَّنت الدراسة أيضاً عزل وتشخيص العديد من الفطريات من أنواع مختلفة من الترب في مدينة الموصل وبلغ عددها 160 عزلة ، وكانت أعلى نسبة مئوية لتردّد الفطريات 26.7% تابعة للفطر *Aspergillus niger*، وأقل نسبة مئوية للتردّد 0.6% لكلٍ من *Bipolaris* sp.، *Fusarium oxysporum*، وكانت تربة نبات الثّوم أعلى الترب بالتنوع الفطري ، إذ عُزِل منها 22 عُزلة ، وأقل تربة بالتنوع الفطري هي تربة الفراولة إذ بلغت عدد العزلات 2 عزلة.

واستخدمت أيضاً في هذه الدراسة عزلات من بكتريا *Agrobacterium* وأُجري لهم اختبار القدرة الإمراضية على أقراص الجزر، إذ لوحظ ظهور الأورام Crown gall على سطح أقراص الجزر لعزلتين من البكتريا المحلية *Agrobacterium tumifaciens* وظهور الجذور الشعرية Hairy roots على أقراص الجزر بعد إصابتها بالبكتريا القياسية *Agrobacterium rhizogenes* . كما أُجري للعزلتين المحليتين نوع *A.tumifaciens* تشخيص جزيئي ، لتأكيد تشخيصهما باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، ولوحظ ظهور حزم مفردة وغير مشتتة . وتم التضخيم باستخدام بواديء متخصِّصة بالجين 16s r RNA ، وظهرت الحزم بحجم 1250 زوجاً قاعدياً لكلتا العزلتين .

أُجري اختبار المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية لعزلتي خميرة *S.cerevisiae* ، وثلاث عزلات من بكتريا *Agrobacterium* قيد الدراسة ، ولوحظ أنّ الخمائر بعزلتيها مقاومة

للمضـــادات الحيويـــة Rifampicin، Tetracycline، Gentamicin، Ciprofloxacin، Roxythrompicin، Erythromycin وCefotaxime وكانت حسّاسة تجاه المضادّ الحيوي Nystatin فقط. وبالنسبة للبكتريا بعزلاتها الثلاثة أظهرت مقاومة للمضادات الحيوية الآتية Rifampicin، Tetracycline، Erythromycin، Ciprofloxacin، Roxythrompicin وNystatin بينما كانت حساسة تجاه المضادين Gentamicin وCefotaxime.

تم إجراء اختبار التضادّ التصالبي بين خميرة *S.cerevisiae* وأنواع من البكتريا المُمْرضة *Agrobacterium* وكانـت النتيجـة أنَّ 2 *S.cerevisiae* أكثـر تـأثيراً فـي البكتريـا مـن 1 *S.cerevisiae*. أمّا من ناحية تأثير راشح خميرة *S. cerevisiae* في الفطريات المُمرضة للنبات لوحظ أن النسبة المئوية للتّثبيط لراشح الخميرة 2 كان أعلى منها لراشح الخميرة 1 على الفطريات المُمْرضة الثلاثة *Alternaria alternata* و*Aspergillus niger* و *Fusarium solani* بنسب تثبيط 65.83، 64.03 و76.83 % على التوالي ، وكان أعلى تـأثيراً لكـلا الراشحين في الفطر *F.solani*.

تبيّن من نتائج تجربة اختبار الصفيحة الدقيقة للراشح الخام لخميرة *S.cerevisiae* على بكتريا *Agrobacterium* بطريقة التخافيف لتحديد التركيز المثبِّط الأدنى Microplate MIC Assay، أنه كلما زاد تركيز الراشح زاد تثبيط بكتريا *Agrobacterium* بأنواعها الثلاثة ، وكان راشـح 2 *S.cerevisiae* أكثـر تـاثيراً فـي البكتريـا مـن راشـح 1 *S.cerevisiae* ، وعنـد تقـدير التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) لراشح خميرة *S.cerevisiae* علـى *Agrobacterium* ، اتضـح انـه التركيـز 6.25 مـايكروغرام / مـل هـو التركيز المثبط الأدنى ، وتُعدّ هذه الدراسة الأولى من نوعها في استخدام خميرة الخبز في تثبيط بكتريا *Agrobacterium* المُمرضة للنبات.

تـمّ الكشـف عـن المـواد الفعّالـة فـي راشـح خميـرة *S.cerevisiae* باسـتخدام جهـاز الكروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العاليHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) واتّخذت شكل منحنيات واضحة ، وقد تكون نوعاً من السموم القاتلة Killer Toxins، لذا أُجري الترحيل الكهربائي لاستخلاص وتشخيص البروتين على هلام بولي أكريل أمايد بطريقة Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) فظهـرت حـزم البـروتين علـى الهـلام وحـدّد البـروتين بالاعتمـاد علـى الـوزن الجزيئي الذي قدر بـ 5 كيلودالتون وتبيّن أنّه من السموم القاتلة نوع K28 التي تفرزها خميرة *S.cerevisiae* واستخدم في الدراسات اللاحقة، كما تم تأكيد هذا السم القاتل باستخدام HPLC بمقارنته بالعينة القياسية.

أمّا عند استخدام البروتين المستخلص في تثبيط الفطريات المُمرضة للنبات ، فلوحظ أنّ النسبة المئوية للتثبيط تزداد كلما زاد التركيز المضاف إلى الوسط وأنّ السُّمَّ المستخلص من 2 *S.cerevisiae* كان له تثبيطاً أعلى من 1 *S.cerevisiae* وأعلى تاثيراً له في الفطر *F.solani* وهذا يتطابق مع النتائج السابقة. وما يتعلّق بتجربة استخدام الصفيحة الدقيقة لتحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) تبيّن أنه التركيز 0.156 مايكروغرام / مل . وباستخدام المعلوماتية الحيوية Bioinformatics في تحليل النتائج تم التعرف على التركيب الذري و الشّكل المتبلور للبروتين ثلاثي الأبعاد باستخدام برنامج Pymol analysis كما تمّ تحديد تسلسل البروتين K28 الذي بدوره يتكوّن من 2040 نيوكليوتيدة تشفر للأحماض الامينية المكونة للبروتين، وبعدها تم ترجمة تسلسل البروتين إلى الأحماض الأمينية التي تكوِّنه .

Abstract

The current study included isolation 110 local isolate of yeasts from different types of fruits, soil and orange leaves in Mosul. High percentage frequency of yeast *Saccharomyces cerevisiae* . The isolates were diagnosed depending on phenotypic, microscopic and biochemical tests. Moreover, the diagnosis of some of them was confirmed by using a Vitek system.The molecular diagnosis of the two isolates of *S. cerevisiae* was confirmed by using Polymerase Chain Reaction (PCR) using specialized primers for the gene Internal Transcribed Spacer (*ITS*). It was observed that one band was separated for each isolate with a size of 550-650 base pairs. When studying the sequence of the nitrogenous bases of DNA the presence variation or heterogeneity when compared with the gene *ITS* In the NCBI and you gave the code OM760491 and ON168448 respectively as well as molecular diagnosed of *Aureobasidium pullulans* and given the code OK614102.1 at the World Genebank.

The study also included isolation and identification 160 fungi isolates from different types of soils in Mosul city and the highest percentage of fungi frequency was 26.7% for the fungus *Aspergillus niger*, and the lowest percentage frequency is 0.6% for each of the *Bipolaris* sp.,*Fusarium oxysporum*,The soil of garlic plant was the highest fungal diversity, were 22 isolates, and the lowest soil with fungal diversity was strawberry soil. So it is arrived two .

Also,isolates of *Agrobacterium* were used in this study and, assay pathogenicity test of it on carrot discs by using an injury method, The tumors appeared on the surface of carrot discs of two isolates of local bacteria *Agrobacterium tumifaciens* , and the appearance of hairy roots on carrot discs after infection with standard *Agrobacterium rhizogenes* .In addition a molecular diagnosis for the two local isolates of *A.tumifaciens*

by using polymerase chain reaction (PCR), The appearance of single and non-dispersed bands .The amplification was using specific primers for gene 16s rRNA and the bands with a size of 1250 base pairs appeared for both isolates.

The assay resistance and sensitivity for antibiotic were performed of the two isolates of *S.cerevisiae* and three isolates of *Agrobacterium* under study, it was noted that two yeasts isolates are resistant to antibiotics Rifampicin, Tetracycline, Gentamicin, Ciprofloxacin, Roxythrompicin, Erythromycin and Cefotaxime , and it was sensitive only for Nystatin antibiotic. The three isolates of *Agrobacterium*, it resistance to the following antibiotics such as Rifampicin,Tetracycline ,Erythromycin ,Ciprofloxacin, Roxythrompicin and Nystatin but sensetive with Gentamicin and Cefotaxime.

The result of test a Cross-antagonism between *S.cerevisiae* with *Agrobacterium* was *S.cerevisiae*2 more effective on bacteria compared with *S.cerevisiae* 1 . On the other hand the test was effect filtrate of *S. cerevisiae* on plant pathogenic fungi it was observed that the percentage of inhibition of *S.cerevisiae* 2 is higher than *S.cerevisiae* 1 on the three pathogenic fungi *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Fusarium solani* with inhibition ratio 65.83, 64.03 and 76.83% Respectively, and the highest effect of both filters was on *F.solani*.

It was observed from the results of the microplate MIC assay of *S.cerevisiae* filtrate on *Agrobacterium* by dilution method to determine the minimum inhibitory concentration as the higher concentration of the filtrate, the greater inhibition three types of *Agrobacterium* , filtrate of *S.cerevisiae* 2 was more effective than filtrate *S.cerevisiae* 1 on bacteria. When estimating the minimum inhibitory concentration (MIC) of *S.cerevisiae* filtrate on *Agrobacterium* , it was found that 6.25 mg / ml is

the minimum inhibitory concentration . This study is the first of its kind to use *S.cerevisiae* to inhibit *Agrobacterium*.

The active substances was detection in the filtrate of *S.cerevisiae* by using a high-performance liquid chromatography HPLC It was shaped like clear curves, which might be a kind of killer toxins Therefore, electrophoresis was performed to extract and characterize the protein on a polyacrylamide gel by method SDS – PAGE,The protein bands appeared on the gel, and determined was k28 which secreted by *S.cerevisiae* depend on molecular weight, which was estimated at 5 kilodalton. It was used in subsequent studies, and the confirmed this toxin by using HPLC which compared with the standard sample.

When using the extracted protein to inhibit plant pathogenic fungi, it was observed that the percentage of inhibition was increasde with the increase of concentration was added to the medium, and the toxin extracted from *S.cerevisiae* 2 a higher inhibition than *S.cerevisiae* 1 and also had a higher effect on *F.solani* and this is correspond with previous results. Regarding the experience of using the microplate MIC assay to determine the minimum inhibitory concentration(MIC). It was found that concentration 0.156 mg / ml. Using bioinformatics In the analysis of the results, were identified the atomic structure and the crystalline shape of the three-dimensional protein by Pymol analysis program and also determined the K28 protein sequence which consists of 2040 nucleotides that code for the amino acids that forming the protein, and then translated protein sequence into the amino acids that forming the protein .

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Molecular investigation of proteins isolated from *Saccharomyces cerevisiae* and their inhibitory effect on pathogenic fungi and bacteria.

Hiba Hadi Taha Ahmed al-Dabbagh

Ph.D. thesis

Biology

Supervised by

Assist, Prof.

Dr. Najwa Ibrahim Khalil Al-Barhawee

Assist. Prof.

Dr. Faten Noori Abed Mula Abed

2022 A.D **1444 A.H**