المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (8) العدد (1)
لسنة 2016

عزل وتشخيص المعزز الحيوي الغذائي *Saccharomyces boulardii* باستعمال الطرائق التقليدية ونظام الفايتك2 والطرائق الجزيئية.

رحيم عناد خضير الزيادي
كلية التربية العلوم الصرفة/ جامعة المثنى

عامر عبد الرحمن الشيخ ظاهر
كلية الزراعة/ جامعة بغداد

ماجد حسين الجيلاوي
كلية التقانات الحيوية التطبيقية/ جامعة النهرين

تأريخ استلام البحث: 8/9/ 2015 تأريخ قبول النشر: 13/3/ 2016

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى عزل وتشخيص المعزز الحيوي الغذائي *Saccharomyces boulardii* من ثمار المانغستين (*Garcinia mangostana* L.) بطرائق التشخيص التقليدية والتشخيص الجزيئي للحصول على معززات حيوية غذائية امنه الاستعمال وصحية، اخضعت العزلات فضلا عن عزلتين تجاريتين للاختبارات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية، اذ أظهرت العزلات مستعمرات ذات شكل دائري بلون ابيض مائل إلى الكريمي الباهت عند تنميتها على الوسط الصلب SD وبدت بشكل محدب ذات حواف منتظمة وقوام كريمي لزج، وان الخلايا تمتلك أشكالا بيضوية، او شبه كروية متبرعمة أحيانا، مفردة او متقاربة في تجمعات، وعدم المقدرة على تمثيل الكالاكتوز فضلا عن سكر اللاكتوز ولم تستطع استهلاك نترات البوتاسيوم او النمو بتركيز 0.01% من المضاد الحيوي السايكلوهكسمايد.

كما شخصت باستعمال نظام الفايتك 2 على انها *Saccharomyces cerevisiae* باحتمالية تراوحت بين90– 94%، اذ لا تتضمن بيانات الجهاز *S. boulardii*، ولكون الاختبارات المزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية لا تعطي ادلة كافية وقاطعة للتفريق بين النوعين *S. boulardii* و*S. cerevisiae*، شخص المعزز الحيوي *S. boulardii* جزيئيا باستعمال بوادئ متخصصة تستهدف التسلسل النوعي الخاص بالمنطقة البينية الفاصلة (ITS) للجين الرايبوسومي 5.8S rRNA، واستخلص الدنا المجيني من العزلة *SbR7* التي اظهرت امتلاكها للعديد من صفات المعزز الحيوي والعزلتين التجاريتين، واجري تفاعل تضخيم السلسلة للمنطقة البينية ITS وحددت تعاقبات

القواعد النيتروجينية وتمت مقارنتها مع تعاقباته في دنا سلالات ***S. boulardii*** المتوفرة في بنك الجينات **NCBI** باستعمال برنامج **BLASTn** تبين ان هناك تطابقا للتعاقبات، وان هذه العزلة تتماثل جينيا بنسبة **99%** مع سلالات ***Saccharomyces boulardii*** القياسية المتوافرة في بنك الجينات.

الكلمات المفتاحية: ***Saccharomyces boulardii***، ثمار المانغستين، نظام الفايتك2، **5.8S Rrna**.

المجلد (8) العدد (1)
لسنة 2016

المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

Isolation and Identification of food Probiotic *Saccharomyces boulardii* by using traditional methods, Vitek 2 system and molecular identification methods.

Rahem. AL-Zaiadi
College of Education for Pure Sciences Al- Muthanna University

Amer. AL-Shekdhaher
College of Agriculture University of Baghdad

Majed . AL-Jelaw
College of Applied Biotechnology Al-Nahrain University

Abstract

This study was aimed to isolate and identify *Saccharomyces boulardii* from Mangosteen fruits (*Garcinia mangostana* L.) by traditional and molecular identification methods To get safe and healthy foods probiotics for use, The isolates and two commercial strains were subjected to cultural, morphological and biochemical tests, The colonies of the isolates were spherical, smooth, mucoidal, dull and white to cream colour on SD agar media .The shape of cells was globose to ovoid and sometimes with budding, in a single form or clustered like a beehive. The isolates and two commercial strains were unable to metabolized galactose and lactose , Results shows that all isolates were unable to utilize potassium nitrate and not grow in the presence of (0.01%) cyclohexamide. Also the isolates and two commercial strains were identified by the Vitek 2 identification system, as *S. cerevisiae* with probability 90-94%, Since there are no data in this device includes *S. boulardii.* Because the cultural, morphological and biochemical tests didn't provide sufficient evidence to distinguish between *S. boulardii* and *S. cerevisiae*, the probiotics strains must be identified up to genus and strain levels by internationally accepted methods, So the *SbR7* isolate which shown high probiotic advantages and two commercial strains were diagnosed molecularly by using specific primers targeting sequence for the region (ITS) of the 5.8S rRNA gene Genomic DNA was isolated from *SbR7* Isolate and ITS region of the 5.8S rRNA gene was amplified using PCR. PCR products was

sequenced and compared with the sequence of this region in the DNA of *S. boulardii* available in GenBank (NCBI) using the program BLASTn. Results revealed, this isolate was almost genetically identical (99%) with *S. boulardii* standard strains.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*, Mangosteen fruits, Vitek 2 system, 5.8S rRNA.

المقدمة

شهدت العقود الأخيرة اهتماما علميا وتجاريا متزايدا للتطبيقات الغذائية العلاجية نتيجة لأثارها المفيدة في الوقاية ومعالجة الكثير من الامراض. و يعد المعززات الحيوية احد اكبر قطاعات الأغذية الوظيفية في السوق العالمية، اذ يتوقع ان ترتفع نسبة المبيعات من الأغذية الوظيفية الى 48% لتبلغ 4 بليون دولار عام 2016 مقارنة بمبلغ 2.7 بليون دولار عام 2011، فيما يتوقع ان يتضاعف نصيب الفرد من الانفاق على المعززات الحيوية الغذائية عام 2016، فضلا عن ان سوق الأغذية الوظيفية تمتلك إمكانات كبيرة للنمو والازدهار الذي يرجح حدوثه في التطبيقات الغذائية العلاجية التي لا تشمل الالبان المختمرة ، وتعرف المعززات الحيوية الغذائية على انها احياء مجهرية حية تساعد على إعادة التوازن الميكروبي التكافلي لبيئة الأمعاء مما يعطي فوائد صحية للمضيف (7).

والمعزز الحيوي الغذائي *Saccharomyces boulardii* خميرة استوائية متحملة للحرارة غير ممرضة للإنسان، اذ سجلت ضمن قائمة GRAS (Generally Recognized as Safe) للأحياء المجهرية آمنة الاستعمال (5). عزلها لأول مرة من قشرة ثمار اللتشي lychee (*Litchi chinensis*) عالم الاحياء الفرنسي هنري بولارد Henri Boulard في اندونيسيا عام 1923، وعرفت منذ ذلك الحين تأثيراتها الايجابية الفعالة في الوقاية والعلاج من الاسهال بأنواعه فضلا عن علاج امراض واضطرابات القناة الهضمية الاخرى (29)، ويحتدم الجدل التصنيفي اتجاه *S. boulardii*، اذ صنفت ابتداء على انها أحد سلالات *Saccharomyces cerevisiae* فيما صنفت خارج هذه المجموعة على أساس الترحيل المقارن للبنية الكروموسومية (23)، بيد ان العلاقات التطورية على الأساس الجزيئي وتحليل التعاقبات باستعمال التقنيات الجزيئية سهلت تشخيص *S. boulardii*، كما اظهر التهجين المقارن لمجائن *S. boulardii* و *S. cerevisiae* انها تختلف بوجود ثلاث نسخ للكروموسوم التاسع فضلا عن تغاير عدد نسخ الكروموسومات الفردية، ووفقا لتعليمات منظمتي الغذاء والزراعة(FAO) والصحة العالمية (WHO) تعد الصفات التصنيفية مهمة جدا في اختيار المعزز الحيوي اذ ينبغي تحديد الجنس والسلالة باستعمال طرائق معتمدة دوليا مثل التشخيص المعتمد على النمط الوراثي الذي يكون ذا حساسية وتخصص عاليين لتفسير النتائج والربط بين المجاميع المتقاربة وراثيا لكون الطرائق التقليدية غير كفؤة في تميز الأنواع المتقاربة وراثيا(21)، لذا هدفت هذه الدراسة الى عزل وتشخيص المعزز الحيوي الغذائي

Saccharomyces boulardii من ثمار المانغستين (*Garcinia mangostana* L.) بطرائق التشخيص التقليدية وبنظام الفايتك2 والتشخيص الجزيئي.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:

استعملت الثمار الاستوائية المانغستين (*Garcinia mangostana* L.) المتوافرة في الأسواق المحلية ومصدرها اندونيسيا لعزل المعزز الحيوي *S. boulardii*.

عزل خميرة *S. boulardii*:

عزلت *S. boulardii* من ثمار المانغستين في مختبرات كلية الزراعة جامعة بغداد باستعمال التخافيف العشرية، اذ علق 10 غم من الجزء الداخلي ذي اللون الوردي لقشرة ثمرة المانغستين في 90 مل ماء مقطر، ومزجت جيدا لدقائق عدة باستعمال خلاط كهربائي عقمت اجزاؤه ذات الاحتكاك المباشر مع النماذج. لقح وسط مستخلص الخميرة ببتون دكستروز (YPD) السائل (شركة Hi-Media الهندية) والمعدل أسه الهيدروجيني الى 3.5 بحامض الستريك والمضاف اليه المضاد الحيوي الكلورامفينكول بتركيز 0.025%، بواحد مل من الانموذج وحضن في درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة، ثم اخذت ملء حلقة الناقل الجرثومي loopfull ونشر على وسط السابرويد (SD) الصلب (شركة Hi-Media الهندية)، وحضن في درجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة، بعدها انتقيت المستعمرات المفردة وكرر نشرها (ثلاث مرات) على وسط السابرويد الصلب للتأكد من نقاوتها قبل الاختبارات المجهرية (20).

اجريت اختبارات تحديد خواص العزلة المظهرية والمزرعية للعزلة المحلية فضلا عن عزلتين تجاريتين *SbC1* (شركة Biocodex الامركية) و *SbC2* (شركة *Nutri cology* الامركية)، اذ استعمل وسط السابرويد(SD) الصلب وذلك بتلقيحه بعالق خلايا الخميرة وحضن في درجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة وانتقيت المستعمرات النامية بنقل ملء حلقة الناقل الجرثومي من عالق العزلات الى شريحة زجاجية معقمة، وفحصت الشرائح تحت المجهر الضوئي لملاحظة شكلها والخواص المجهرية.

اجريت الاختبارات الكيموحيوية التي شملت استهلاك مصادر الكربون ومصادر النتروجين و مقاومة السايكلوهكسمايد وفق ما أورده (2؛ 3؛ 11) وعلى التوالي.

تشخيص العزلات باستعمال نظام التشخيص فايتك2 VITEK 2 Compact System:

استعمل نظام التشخيص الالي الفايتك 2 في تأكيد تشخيص عزلات *Saccharomyces* .spp، اذ استعملت عدة التشخيص الخاصة بالخمائر (YST) الحاوية على 46 فحصا تشمل استهلاك المصادر الكربونية والنيتروجينية والفعالية الانزمية و مقاومة المضادات الحيوية (13).

التشخيص الجزيئي:

عزل الدنا المجيني في مختبرات التقانة الجزيئية/ كلية التقانات الحيوية والتطبيقية– جامعة النهرين باستعمال عدة الاستخلاص i-genomics CTB DNA Extraction Mini kit وبحسب ما ورد في تعليمات الشركة الكورية المجهزة (intron Korea). وقيس تركيز ونقاوة الدنا المستخلص قبل عملية التضخيم باستعمال جهاز NanoDrop ND 1000 وطبقا لتعليمات الشركة المجهزة.

اجريت عملية الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز لملاحظة الدنا المستخلص ونواتج عملية التضخيم بفعل تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) أذ استعمل البادئ الذي يستهدف التسلسل النوعي الخاص بالمنطقة البينية الفاصلة (ITS) للجين الرايبوسومي 5.8S rRNA :

(ITS1 الامامي 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

و (ITS4 العكسي 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')(15)

واجري تفاعل تضخيم السلسة لدنا العزلات اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل (10) الذي تضمن دورة واحدة بدرجة حرارة 94 م لمدة 5 دقائق لفك ارتباط شرطي الدنا القالب تبعتها 35 دورة تضمنت ثلاث مراحل أولها إعادة المسخ في كل دورة بدرجة حرارة 94 م لمدة 60 ثانية ثم مرحلة ثانية تسمح لارتباط البادئ بالتسلسل المكمل له بدرجة حرارة 55 م لمدة 60 ثانية والمرحلة الثالثة تمثل بدء عملية تضخيم التسلسل المستهدف بدرجة حرارة 72 م لمدة 60 ثانية بعد ذلك دورة واحدة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 72 م للاستطالة النهائية وأخيرا دورة واحدة بدرجة حرارة 15 م لمدة 5 دقائق لإكمال التضخيم.

حملت نواتج PCR على هلام الأكاروز 2% باستعمال وحدة الترحيل الكهربائي الافقي لتحديد تعاقبات القواعد النيتروجينية في نواتج تفاعلات تضخيم السلسلة للمنطقة البينية للعزلة *SbR7*، ونقيت نواتج التضخيم وارسلت الى شركة (BIONEER) الكورية لغرض

اجراء فحص معرفة التعاقب الخاص بالدنا، وحللت التعاقبات الواردة بوساطة باحث الويب BLASTn باستعمال بنك الجينات عبر شبكة الويب المخزنة في NCBI. وحملت التعاقبات التي أظهرت اعلى تطابقا واقصى قدر من التشابه، باستعمال برنامج ClustalX2.

النتائج والمناقشة

عزلات الخميرة:

أظهرت العزلات التي تم الحصول عليها مستعمرات ذات شكل دائري بلون ابيض مائل إلى الكرمي الباهت عند تنميتها على الوسط الصلب SD وبدت بشكل محدب ذات حواف منتظمة وقوام كرمي لزج، بلغ متوسط حجمها 1–2 مليمتر عند تنميتها بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، جاءت هذه النتائج متفقة مع ما ذكره (20؛ 24) عن الخواص المزرعية لعزلات *S. Boulardii*. فيما بينت الفحوصات المجهرية ان خلايا العزلة المنماة في الوسط SD السائل تمتلك أشكالا بيضوية، او شبه كروية متبرعمة أحيانا، مفردة او متقاربة في تجمعات، يتفق ذلك مع ما ذكره (20) عن الخواص المجهرية لعزلات *S. boulardii*.

الصفات الكيموحيوية:

أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية في (الجدول، 1) ان العزلات *SbR1* - *SbR17* فضلا عن العزلتين التجاريتين *SbC1* و *SbC2* تمتلك المقدرة على استهلاك الكلوكوز والفرئتوز والسكروز والمالتوز والرافينوز والسيليبايوز والمليبايوز، كما بينت النتائج عدم مقدرة العزلات على تمثيل سكر الكالاكتوز، إذ لم تملك العزلة *SbR7* والعزلتان التجاريتان *SbC1* و *SbC2* المقدرة على تمثيل الكالاكتوز مصدرا وحيدا للكربون فضلا عن سكر اللاكتوز، فيما كان هناك تفاوت في استهلاك السليبايوز والمليبايوز، إذ لم تملك العزلتان *SbR2* و *SbR4* المقدرة على استهلاك سكر السليبايوز على عكس باقي العزلات، ومن الجدول تتضح مقدرة جميع العزلات على استهلاك سكر المليبايوز بما فيهم العزلتان التجاريتان باستثناء العزلات *SbR2*، و *SbR4* و *SbR6*، فيما أظهرت جميع العزلات المحلية والعزلتان التجاريتان المقدرة على استهلاك الاسبارجين والببتون وكبريتات الامونيوم، ولم تستهلك نترات البوتاسيوم مصدرا للنتروجين، ولم يكن للعزلات المقدرة على النمو بتركيز 0.01% من المضاد الحيوي السايكلوهكسمايد.

جدول (1) الصفات الكيموحيوية لعزلات *S. boulardii*

الاستهلاك / العزلات	مصادر الكاربون									مصادر النايتروجين				مقاومة السايكلو هكسمايد
	الكلوكوز	الفركتوز	الكالاكتوز	السكروز	المالتوز	اللاكتوز	السيليبايوز	الرافينوز	المليبايوز	نترات البوتاسيوم	اسبارجين	بيتون	كبريتات الامونيوم	
SbR1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR2	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
SbR3	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR4	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
SbR5	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR6	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR7	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR8	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR9	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR11	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR12	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR13	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR14	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR15	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR16	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbR17	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbC1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
SbC2	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

*** + نتيجة موجبة، – نتيجة سالبة.**

جاءت النتائج مشابهة لما ذكره (14) من مقدرة *S. boulardii* على استهلاك الكلوكوز والمالتوز والرافينوز والفركتوز، وما و جده (15؛ 18) في عدم مقدرتها على استهلاك الكالاكتوز.

فيما اتفقت جزئيا مع الدراسات التي اجراها(16؛ 23) للنمط الظاهري وسلوك *S. boulardii* في استهلاك الكالاكتوز، المالتوز والرافينوز، إذ وجدوا ان عزلة واحدة فقط من *S. boulardii* تمكنت من استهلاك الكالاكتوز رغم ان استهلاك الكالاكتوز شائع بين سلالات *S. cerevisiae* لذا يعد مؤشرا غير مقبول للتمييز بين *S. boulardii* و*S. cerevisiae* مؤكدا بذلك ما أورده (22) في دراسة سابقة من ان الاختبارات الكيموحيوية لا تعطي ادلة كافية وقاطعة للتفرق بين نوعين خميرتي *S. boulardii* و*S. cerevisiae*.

تشخيص العزلات بنظام الفايتك Vitek 2 compact system:

انتخبت العزلة *SbR7* لأجراء التشخيص باستعمال نظام الفايتك 2 اعتمادا على الصفات الفسلجية التي اظهرتها في النمو الامثل بدرجة حرارة 37م وتحمل الاس الهيدروجيني المنخفض ومقاومة التراكيز العالية لأملاح الصفراء وعلى الصفات العلاجية (1) ولتأكيد الصفات المزرعية والمظهرية والكيموحيوية اخضعت العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين للتشخيص باستعمال نظام الفايتك 2، وأظهرت النتائج (الجدول، 2) ان العزلات شخصت على انها *S. cerevisiae* بنسب احتمالية تراوحت بين 90– 94% اعتمادا على قابلية العزلات في استهلاك السكريات ومصادر النتروجين والفعالية الانزيمية ومقاومة المضادات الحيوية، ولكون قاعدة بيانات نظام الفايتك 2 تتضمن بيانات *S. cerevisiae* فقط، وللتقارب الشديد بين *S. cerevisiae* و*S. boulardii* فان هذا النظام يشخص العزلات اعتمادا على درجة تقاربها من خميرة *S. cerevisiae* في استهلاك السكريات ومصادر النتروجين والفعالية الانزيمية ومقاومة المضادات الحيوية.

جدول (2) نتائج التشخيص بنظام الفايتك 2 لعزلات *S. boulardii*.

العزلة	التشخيص	الاحتمالية %	دقة التشخيص
SbR7	*Saccharomyces cerevisiae*	93	Very good identification
SbC1	*Saccharomyces cerevisiae*	90	Good identification
SbC2	*Saccharomyces cerevisiae*	94	Very good identification

تمتاز الطرائق التقليدية في اجراء الاختبارات الكيموحيوية تمتاز بالتعقيد نوعا ما واحتياجها الى كميات أكبر من المواد فضلا عن انها اقل دقة وتستغرق وقتا أطول مقارنة باستعمال نظام الفايتك2 (25). وقد ذكر (26) أن هناك اختلافا معنويا في نتائج التشخيص بين الطريقة التقليدية للاختبارات الكيموحيوية ونتائج استعمال نظام الفايتك 2 التشخيصي، فضلا عن أن قرص التشخيص (YST) أظهر دقة عالية في تشخيص الخمائر المهمة وفي مدى واسع من أوساط النمو.

كما أشار (8) الى ان استعمال نظام الفايتك 2 في التشخيص مقارنة بعدة التشخيص Api 20 AUX أظهرت اختلافا معنويا في نتائج التشخيص فضلا عن ان نسبة التشخيص في نظام الفايتك 2 بلغت 98.9%. فيما اكد (4) ان نظام الفايتك 2 يعد احد

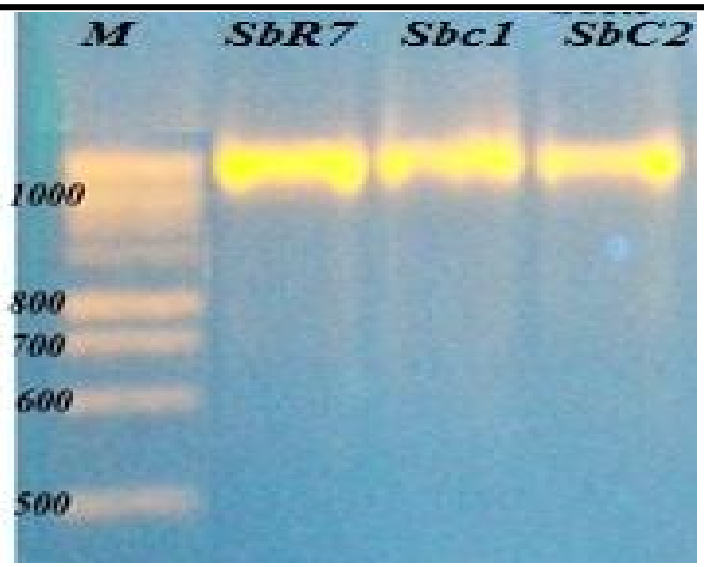
الوسائل السريعة والدقيقة لتشخيص الخمائر حتى وان كانت بإعداد قليلة فضلا عن أن قرص التشخيص الخاص بالخمائر (YST) يحتوي على مضادات الفطريات (Echinocandins وPosaconazole) تحسن دقة التشخيص مقارنة بالطرائق الكيموحيوية، وفي دراستنا الحالية فان النتائج اظهرت ان نظام الفايتك 2 للتشخيص اتسم ببساطته ودقة نتائجه كما انه متاح تجاريا ويختصر وقت التشخيص للخمائر.

ان الاختبارات المزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية لا تعطي ادلة كافية وقاطعة للتفرق بين النوعين *S. boulardii* و*S. cerevisiae*، ولأهمية تشخيص المعزز الحيوي اذ ينبغي تحديد الجنس والسلالة باستعمال طرائق معتمدة مثل التشخيص الجزيئي الذي يكون ذا حساسية وتخصصية عاليتين وفقا لتعليمات منظمتي الغذاء والزراعة(FAO) والصحة العالمية (WHO) (21) اجري التشخيص الجزيئي لتأكيد تشخيص العزلات.

التشخيص الجزيئي:

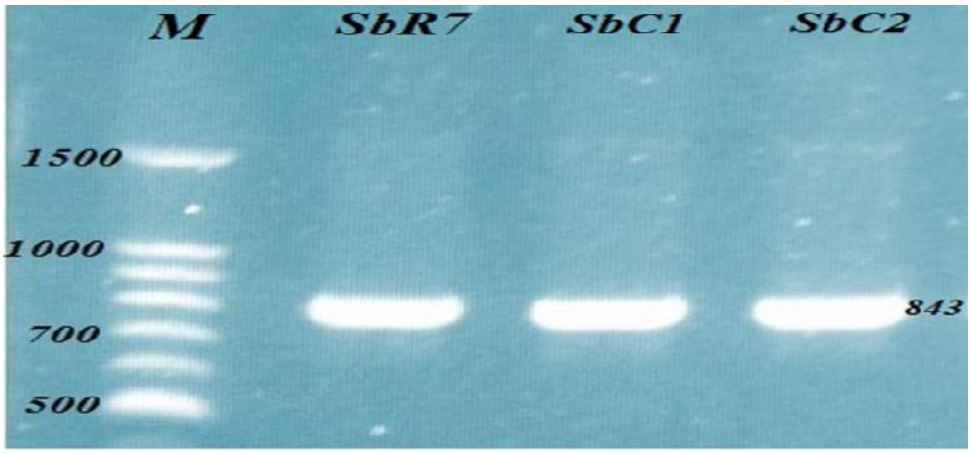
بلغ تركيز الدنا المستخلص للعزلة المحلية *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1* و *SbC2* 10.1 و 9.9 و 11.5 نانوغرام /مايكروليتر على التوالي، فيما بلغت النقاوة 1.85 ، 1.78 و 1.88 على التوالي، ومن قيم التركيز والنقاوة يتبين ان الدنا المستخلص من العزلات كان بنقاوة كافية لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة إذ ان عملية تضخيم السلسلة PCR لا تتطلب كمية كبيرة من الدنا، فضلا عن ان الكمية العالية من الدنا قد تزيد من تكوين نواتج تضخيم غير محددة بينما الكمية القليلة للدنا تقلل دقة التضخيم (12).

أظهر الترحيل الكهربائي للدنا (الشكل 1) نتائج مماثلة، أذ ظهر دنا العزلات بشكل حزم واضحة.



شكل (1) الترحيل الكهربائي لدنا العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1, SbC2* على هلام الأكاروز 0.8% 7فولت/سم،90 دقيقةM: يمثل الدليل الحجمي للدنا 100 – 1500 زوج قاعدة

أظهرت نتائج استعمال البادئات ITS1 و ITS4 بعد الترحيل على هلام الأكاروز (الشكل 2) ظهور حزم واضحة ناتجة عن التضخيم في مسارات العزلات في إشارة لارتباط البادئ الى التسلسل المكمل له في دنا القالب، إذ أظهرت الحزم الناتجة تماثلا في الحجم الجزيئي وقدر الحجم الجزيئي لناتج التضخيم 843 زوج قاعدة تقريبا اعتمادا على الدليل الحجمي، وتعد النتائج مماثلة للحجم المتوقع تقريبا، إذ ان الحجم الجزيئي لناتج التضخيم بلغ 815 زوج قاعدة عند استعمال البادئات نفسها في تضخيم سلسلة دنا *S. boulardii* (10).



شكل (2) الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم القطع البينية ITS1 وITS4 من الجين 5.8S rRNA العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1, SbC2* على هلام الأكاروز 2%، 5 فولت/ سم، 2 ساعة،M: يمثل الدليل الحجمي 100–1500 زوج قاعدة.

اكتسبت تقنية تفاعل تضخيم السلسلة PCR شعبية واسعة نظرا لسهولتها وسرعتها فضلا عن قاعدة البيانات الضخمة والمتاحة نتيجة لتوسع دراسة التعاقبات والتي تسمح بالمقارنة للتحديد السريع وتعريف السلالات (28).

وتعد المنطقة البينية ITS ضمن الجين المحافظ 5.8S rRNA اكثر ملائمة لتشخيص الأنواع والسلالات ويعزى ذلك لإمكانية تحليل النشوء والتطورPhylogenetic للأنواع ذات الصلة الوثيقة والمتقاربة جـــدا باستعمال الفاصل البيني ITS (ITS1 ، ITS4) الممتد بين الرنا الرايبوسومي 18S rRNA والرنا الرايبوسومي 28S rRNA، فضلا عن ان الفاصل البيني ITS يكون محافظا بدرجة كبيرة نتيجة للقيود التطورية القليلة وبالتالي فانه يستعمل بنجاح في تمييز الأنواع وتشخيصها ضمن الجنس الواحد للخمائر وبدقة عالية، ويستعمل بنجاح للتفريق بين الأنواع المتقاربة جدا ضمن جنس *Saccharomyces* إذ يعطي نتائج حاسمة للتشخيص (27).

اجري على نواتج التضخيم تعاقب القواعد النيتروجينية للقطعة البينية ITS للجين 5.8S rRNA بعد ان أرسلت الى شركة BIONEER الكورية الجنوبية. بعدها حللت التعاقبات الواردة (الشكل،3)

» *SbR7* – ITS1- forward

GCAGAGGAGGCTCCCCTTTTTAAACCGGGGTTCTTTTTGTTAGGCGAGAGCTAAGAGCCTTACTGGGGCCAGAA
GAATGAGTGGAGAAGCCCAGCGGGCCTGCGCTTTAATGGCGCGTAATGGCTAGGTTGGAGTTTCCTTCTTGGTA
TTCCAAAAGGGGAAAGATCTCTGTGCTTTTAATATACGACAAATAAAACCGTTTCAATACCACACATTGTGGAG
ATTCATATCTTTGCAACTTTTTCCTTGGGGATTCAAGCAATCGGGCCCCAGAGGGAACAGCCACCAACAAATTTA
TCTATTCATTTTATTTTTCTCAAAACCAAGAATTTTCGTAACTGGAAATTTCAAATATTAAAAACTTTCAACAGCG
TATCTCTTGGTTCCCGCACACATAAAAAACGCAGTGAAACGCCCCACATAATGAAAATTGCCGAATACCCAAAA
TCACGCATCCCCGACAAATCATTGAACCCCTTGATATTTCCTGGGGGCATGCCTCCGCGGAG

» SbR7 – ITS4- reverse

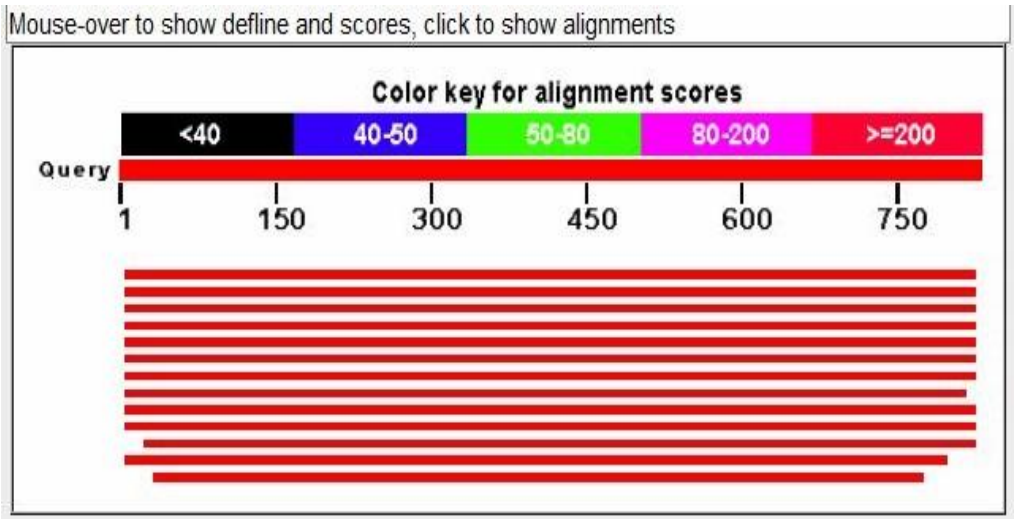
GGGCGTTGGGGACTCCTACCTGGATTTGAGGTCAAACTTTAAGAACATTGTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATC
GATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCA
TTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTT
AACTCCAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCT
GGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCG
CATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTAAAATTTCCA
GTTACGAAAATTCTTGTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAGATAAAATTGTTTGTGTTTGTTACCTCTGGGCCCCG
ATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTAA
TTGTCCTATAACAAAAGCACAGAAATCTCTCACCGTTTGGAATAGCAAGAAAGAAACTTACAAGCCTAGCAAGA
CCGCGCACTTAAGCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAGTAAAAGCTCTCATGCTCTT
GCCAAAACAAAAAAATCCATTTTCAAAATTATTAAATTTCTTTAATGATCCCTCTCCGCCAGGTTCACCCTACGG
AAAGATCC

شكل (3): تعاقب القواعد النيتروجينية لناتج تضخيم المنطقة البينية ITS (ITS4،ITS1) ضمن الجين 5.8S rRNA للعزلة *SbR7* .

اجري تقييم نوعية التعاقبات الواردة، باستعمال CodonCode Aligner® software أذ شذبت التعاقبات لإزالة الأجزاء ذات النوعية المنخفضة والتي تمثلها القمم غير المنتظمة متمثلة بالتعاقبات الأولى 20–60 نيوكليوتيد وأحيانا النيوكليوتيدات الاخيرة، ويعزى تكون هذه الأجزاء الى ازدواج البوادئ او بعض نواتج عملية التضخيم الصغيرة والتي لا تظهر عند الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بعد ذلك استعمل برنامج BLASTn لإيجاد التماثل الجيني، وعند مقارنة تعاقبات القواعد النيتروجينية للمنطقة البينية المذكورة للعزلة *SbR7* مع تعاقباته لمختلف الخمائر المتوافرة في بنك الجينات NCBI باستعمال

برنامج Blast أظهرت النتائج تقارب مع بعض سلالات *S. cerevisiae* القياسية. اما عند مقارنة تعاقبات القواعد النيتروجينية للمنطقة البينية المذكورة للعزلة *SbR7* مع تعاقباته في دنا *S. boulardii* المتوفرة في بنك الجينات NCBI باستعمال برنامج BLASTn فأظهرت النتائج تماثل العزلة *SbR7* مع سلالات *S. boulardii* القياسية وتبين ان هناك تطابقا كبيرا للتعاقبات (الشكل، 4).

أذ بلغت نسبة التماثل الجيني 99% للمنطقة البينية المستهدف للعزلة *SbR7* مع سلالات *S. boulardii* القياسية: AY428861.1، KC254081.1، KC254080.1، KC254079.1، KC254078.1، KC254077.1، KC254076.1، KC254075.1، AY42886.1، FJ4332912.1، GQ376089.1، GQ376088.1 و JQ070086.1 .



ما توصل اليه (6) أذ صنفاها خارج مجموعة *S. cerevisiae* بمقارنة الطرز الوراثية وتحليل تغيرات الاشكال. فيما أضاف (9) ان *S. boulardii* تختلف عن *S. cerevisiae* على المستوى الجيني والفسلجي وكيفية التبويغ والكروموسومات الفردية وأعداد نسخ الجينات وعدم تكوين الهايفات الكاذبة ومقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض، وذكر (15) ان *S. boulardii* تمتلك صفات خاصة منها انتاج عوامل غير بروتينية، وعد هذه العوامل استثنائية خاصة بها لا تنتجها أنواع *Saccharomyces*. كما وجد (19) اختلافا بين نواتج التضخيم للقطعة البينية ITS بين *S. boulardii* و *S. cerevisiae* وذكر ان هذا

الاختلاف يظهر واضحا عند تحليل التعاقب وخلص الى ان هناك تقاربا شديدا بينهما الا انه ليس بالإمكان وضعهما في النوع نفسه.

يستنتج من الدراسة ان طرق التشخيص التقليدية غير كفؤة في تشخيص *S. boulardii* نظرا لتقاربها الكبير مع *S. cerevisiae*. وامكانية تشخيص*S. boulardii* بالطرق الجزئية بتضخيم المنطقة البينية ITS (ITS4،ITS1) للجين الرايبوسومي 5.8S rRNA وتحليل تعاقبات القواعد النيتروجينية واستعمال المعلوماتية الحيوية، إذ أظهرت العزلة *SbR7* تماثلا جينيا بلغ 99% مع سلالات *S. boulardii* القياسية في بنك الجينات.

المصادر

1. الزبادي، رحيم عناد خضير. (2014). عزل وتشخيص وتطفير *Saccharomyces boulardii* وتقييم بعض صفاتها العلاجية . أطروحة دكتوراه. قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية. كلية الزراعة .جامعة بغداد

2. Abosereh, N.; Soliman, E. and Haggran, A. (2011). Effect of intrespecific hybridization between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* on utilization of some carbohydrates. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5 (10): 114-120.

3. Atlas, R. N.; Brown, A. E. and Paks, L. G. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. (1st ed.). Mosby. USA

4. Borghi, B.; Iatta, R.; Sciota, R.; Biassoni, C.; Cuna, T.; Montagna, M. and Morace, G. (2010). Comparative evaluation of the vitek 2 yeast susceptibility test and clsi broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in italy: the gisia3 study. journal of clinical microbiology, p. 3153–3157.

5. Buchl, N.; Hutzler, M.; Mietke-Hofmann, H.; Wenning, M. and Scherer, S. (2010) .Differentiation of probiotic and environmental *saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. J Appl Microbiol 109(3):783–791.

6. Cardinali, G. and Martini, A. (1994). Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the *sensu stricto* group of the genus *Saccharomyces*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 791–797.

7. Caselli, M.; Cassol, F.; Calo, G.; Holton, J.; Zuliani, G. and Gasbarrini, A. (2013). Actual concept of "probiotics": Is it more functional to science or business? World J Gastroenterol. 19(10): 1527-1540.

8. Donald, C.; Edwige, D.; Zubair, H. and Pierre, R. (2009). Evaluation of the auxacolor system for biochemical identification of medically important yeasts. J. Clin. Microbiol. 36(12).: 3726–3727.

9. Edwards-Ingram, L.; Gitsham, P.; Burton, N.; Warhurst, G.; Clarke, I ; Hoyle, D.; Oliver, S. and Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Env Microbiol 73:2458–2467.

10. Fietto, L. R.; Araújo, S.; Valadão, N.; Fietto, G.; Brandão, L.; Neves, G.; Gomes, O.; Nicoli, R. and Castro, M. (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces Boulardii* Can. J. Microbiol. 50: 615–621.

11. Frazier, W. C. (1985). Food Microbiology. Hill Book *Co*.New York.U.S.A.

12. Green, R. M. and Sambrook, J. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual, Fourth Edition. CSHL Press.

13. Hata, D.; Hall, J.; Fothergill, A.; Larone, D. and Wengenack, N. (2007). Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. J. Clin. Microbiol. 45:1087-1092.

14. Hayford, A. E. and Jespersen, L. (2001). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and *MAL* genotyping.J Appl Microbiol. 86:284-294.

15. Khatri, I.; Akhtar, A.; Kaur, K.; Tomar, R.; Prasad, S.; Ramya, T. and Subramanian, S. (2013). Gleaning evolutionary insights from the Genome Sequence of a Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. Gut Pathogens. 5: 30
http://www.gutpathogens.com/content/5/1/30

16. Malgoire, J. Y.; Bertout, S.; Renaud, F.; Bastide, J. M. and Mallie, M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism J Clin Microbiol. 43 (3): 1133-1137

17. McFarland, L. V. (1996). *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. Clin. Infect. Dis. 22: 200–201.

18. Mitterdorfer, G.; Kneifel, W. and Viernstein, H. (2001). Utilization of prebiotic carbohydrates by yeasts of therapeutic relevance. letters in applied microbiology. 33: 251-255.

19. Mitterdorfer, G.; Mayer, H. K.; Kneifel, W. and Viernstein, H. (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *Saccharomyces cerevisiae* using molecular typing techniques. J. Appl. Microbiol. 93: 521–530.

20. Neelayadatchi, C.; Kanimozhi, G. and Sakthivel, K. (2012). *In vitro* studies on the probiotic potential of *Saccharomyces boulardii* isolated from mangosteen. Journal of Biological and Information Sciences. 1(3). Online Open Access.

21. Pommerenke, C.; Musken, M.; Becker, T. and Dotsch, A. (2011). Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas aeruginosa* .Plos. Pathog.6: 1-8.

22. Querol, A.; Fernandez-Espinar, M.; Olmo, M. and Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. Int. J. Food Microbiol. v. 86: 3-10.

23. Rajkowska, K. and. Kunicka-Styczyńska, D. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of probiotic yeasts. Technical University of Lodz, Wolczanska 171/173, 90-924 Lodz, Poland.

24. Saeed, M.; Zahid, S. and Sattar, M. (2013). Isolation, characterization and utilization of *saccharomyces boulardii* as probiotics supplement in apple juice. advances in food and biosciences, Volume 1(1): 112-123.

25. Soliman, N. S. and Aly, S. A. (2011). Occurrence and identification of yeast species isolated from egyptian karish cheese. Journal of Yeast and Fungal Research Vol. 2(4).: 59 – 64.

26. Valenza, G.; Strasen, J.; Schafer, F.; Frosch, M.; Kurzai, O. and Abele-Hor, M.(2008). Evaluation of new colorimetric Vitek 2 yeast identification card by use of different source media. Journal Of Clinical Microbiology, Nov. Vol. 46(11) p. 3784–3787

27. Van der Kuhle, A. and Jesperson, L. (2003). The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of the 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. Syst. Appl.Microbiol. 26: 567- 571

28. Vaughan-Martini, A. (2003). Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine. Int. Microbiol. 6: 175-182.

29. Zbar, N. S.; Nashi, L. F. and Saleh, S. M. (2013). *Saccharomyces boulardii* as effective probiotic against *Shigella flexneri* in mice. Int J Mater Methods Technol. 1:17–21.