الصفات الفسلجية للمعزز الحيوي *Saccharomyces boulardii* المعزول من ثمار المانغستين(*Garcinia mangostana* L.) والمشخص جزيئيا.

ماجد حسين الجيلاوي عامر عبد الرحمن الشيخ ظاهر رحيم عناد خضير الزيادي
كلية التقانات التطبيقية/جامعة النهريين كلية الزراعة/ جامعة بغداد كلية العلوم الصرفة/ جامعة المثنى

الخلاصة :
تم في هذه الدراسة في مختبرات كلية الزراعة جامعة بغداد ومختبرات كلية التقانات الحيوية التطبيقية في جامعة النهرين خلال عام 2012-2013 اذ تم عزل المعزز الحيوي *Saccharomyces boulardii* من ثمار المانغستين المستوردة من اندونيسيا ومصدرها الأسواق المحلية وتشخيصها جزيئيا باستعمال بوادئ متخصصة تستهدف التسلسل النوعي الخاص بالمنطقة البينية الفاصلة (ITS) للجين الرايبوسومي 5.8S rRNA ودراسة صفاتها الفسلجية التي شملت النمو في درجات حراره مختلفة وتحمل الاس الهيدروجيني المنخفض والتراكيز العالية لأملاح الصفراء. بينت النتائج ان المستعمرات ذات شكل دائري بلون ابيض مائل إلى الكريمي الباهت عند تنميتها على الأوساط الصلبة SD و YPD وبدت بشكل محدب ذات حواف منتظمة وقوام لزج، بلغ متوسط حجمها 1-2 مليمتر عند تنميتها بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، وإن الخلايا تمتلك أشكالا بيضوية، او شبه كروية متبرعمة أحيانا، مفردة او متقاربة في تجمعات، ودرجة الحرارة المثلى للنمو هي 37 م. واظهرت العزلة مقاومة للاس الهيدروجيني المنخفض 1.0 حتى 3 ساعات وتحملا للتراكيز العالية من املاح الصفراء 3% بعد 3 ساعات من الحضن في هذا التركيز مقارنة بالعزلتين التجاريتيين، استخلص الدنا المجيني من العزلة *SbR7* واجري تفاعل تضخيم السلسلة للمنطقة البينية ITS وحددت تعاقبات القواعد النيتروجينية وعند 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.

Physiological Properties From Probiotic *Saccharomyces boulardii* that isolates from Mangosteen fruits and diagnosed molecularly

Majed H. AL-Jelawi Amer A. AL-Shekdhaher Rahem E.AL-Zaiadi

Abstract :
This study was conducted in to isolate *Saccharomyces boulardii* from Mangostin fruits and diagnosed molecularly by using specific primers targeting sequence for the region (ITS) of the 5.8S rRNA gene. As well as studied growth at different temperatures, resist to low pH and high concentrations of bile salts. The results shown that colonies were with a round shape and colored white to creamy pale when grown at the solid SD medium. They were convex smooth edges, sticky and averaged size of 1-2 mm when grown at 37 $^{\circ}$C for 24 hours. Microscopic examine revealed that their cells an oval, or semi-spherical buds sometimes, single or close in clusters, and the optimum temperature for growth was 37 ^{o}C. The isolate shown resistance to low pH (1.0) up to 3 hrs, tolerance to high concentrations of bile salts (3%) even after 3 hrs. Genomic DNA was isolated from *SbR7* Isolate and ITS region of the 5.8S rRNA gene was amplified using PCR.PCR

ISSN 2072-3875

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.

المقدمة :

المعزز الحيوي *S. boulardii* سلالة استوائية متحملة للحرارة غير مرضية للإنسان اذ سجلت ضمن قائمة GRAS للأحياء المجهرية الامنة الاستعمال (Buchl *et al.*, 2010). عزلها لأول مرة من قشرة ثمار اللتشي lychee (*Litchi chinensis*) عالم الاحياء الفرنسي هنري بولارد Henri Boulard في اندونيسيا عام 1923 واظهرت منذ ذلك الحين تأثيرات إيجابية وفعالة في الوقاية والعلاج من الاسهال بأنواعه فضلا عن امراض واضطرابات القناة الهضمية (Zbar *et al.*, 2013). ويحتدم الجدل التصنيفي اتجاه *S. boulardii*، اذ صنفت ابتداء على انها أحد أنواع جنس*Saccharomyces cerevisiae* فيما صنفت خارج هذه المجموعة على أساس الترحيل المقارن للبنية الكروموسومية (Rajkowska and Kunicka-Styczyńska, 2009).

بيد ان دراسة 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، وفقا لتعليمات منظمتي الغذاء والزراعة(FAO) والصحة العالمية (WHO) تعد الصفات التصنيفية مهمة جدا في اختيار المعزز الحيوي اذ ينبغي تحديد الجنس والسلالة باستعمال طرق معتمدة دوليا مثل التشخيص المعتمد على النمط الوراثي الذي يكون ذا حساسية وتخصصية عاليتين لتفسير النتائج والربط بين المجاميع المتقاربة وراثيا لكون الطرق التقليدية غير كفؤة في تميز الأنواع المتقاربة وراثيا(2010 Pommerenke *et al.*,).

طرائق العمل :

عزلت *S. boulardii* من ثمار المانغستين المستوردة من اندونيسيا ومصدرها الأسواق المحلية في مختبرات كلية الزراعة جامعة بغداد(2012) باستعمال التخافيف العشرية، اذ علق 10 غم من الجزء الداخلي ذي اللون الوردي لقشرة ثمرة المانغستين في 90 مل ماء مقطر، ومزجت جيدا لعدة دقائق باستعمال خلاط عقمت اجزاؤه ذات الاحتكاك المباشر مع النماذج. لقح وسط YPDالسائل (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، 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. أنتقيت المستعمرات المفردة وكرر نشرها (ثلاث مرات) على وسط السابرويد الصلب للتأكد من نقاوتها قبل الاختبارات المجهرية (Neelayadatchi *et al.*, 2012).

اجري تحديد خواص العزلة المظهرية، اذ استخدم وسط السابرويد الصلب وذلك بتلقيحه بعالق خلايا الخميرة وحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة لوحظ شكل المستعمرات النامية، اللون، الحجم، حواف المستعمرات والارتفاع عن سطح الوسط وطبيعة النمو فيما نقل ملء حلقة الناقل الجرثومي من العالق الى شريحة زجاجية معقمة، فحصت الشرائح تحت المجهر الضوئي لملاحظة شكلها وفحص الخواص المجهرية.

النمو بدرجات حرارة مختلفة :

لقح 100 مل من YPDالسائل بمزارع اليوم السابق للعزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين (1% حجم / حجم)، وحضنت بدرجات حرارة 28، 37، 42.5 م لمدة 24 – 48 ساعة، قدرت الاعداد الحية بعدها بالزرع على الوسط YPDالصلب بطريقة العد المباشر(Narayanan *et al.*, 2012) .

ISSN 2072-3875

مقاومة انخفاض الرقم الهيدروجيني :

لقح الوسط YPD السائل بالعزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين (1% حجم / حجم) ، وحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 12 ساعة ، اجري النبذ المركز بسرعة 4000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4 م لمدة 10 دقائق ، فصل الراسب عن الراشح وغسل الراسب بمحلول الفوسفات الدارئ (المحضر بإذابة 8 غم NaCl ، 0.2 غم KCl، 0.2 غم KH_2PO_4 و1.15 غم من K_2HPO_4 في 950 مل ماء مقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى(7) ثلاث مرات ، بعدها علق الراسب في محلول الفوسفات الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 3، 2و1، حضنت المعاملات بدرجة حرارة 37 م لمدة 3 ساعات قدرت الاعداد الحية للخلايا كل ساعة بطريقة العد المباشر (Rajkowska and Styczynska, 2010).

مقاومة التراكيز العالية لأملاح الصفراء

لقح 100 مل من الوسط YPD السائل المضاف الية املاح الصفراء بتراكيز 1، 2، 3 % بمزارع اليوم السابق للعزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين (1% حجم / حجم) وحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 3 ساعات قدرت الاعداد الحية للخلايا كل ساعة بطريقة العد المباشر(Narayanan *et al.*, 2012).

التشخيص الجزيئي لعزلات *S. boulardii*

عزل الدنا المجيني في مختبرات كلية التقانات الحيوية والتطبيقية في جامعة النهرين(2013) باستعمال عدة الاستخلاص i-genomics CTB DNA Extraction Mini kit وحسب ما ورد في تعليمات الشركة المجهزة (intron Korea).

قيس نقاوة وتركيز الدنا المستخلص قبل عملية التضخيم وفق المعادلة الاتية:

$$\text{نقاوة الدنا} = \frac{\text{الامتصاص الضوئي (260 نانوميتر)}}{\text{الامتصاص الضوئي (280 نانوميتر)}}$$

تركيز DNA نانوكرام/مايكروليتر=الامتصاص الضوئي(260 نانوميتر)× 50 مايكروكرام/مل

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 GCT TAT TGA TAT GC-3') (Khatri *et al.*, 2013)

واجري تفاعل تضخيم السلسة لدنا العزلات اعتمادا على البرنامج الموصوف من قبل Fietto *et al* (2004) الذي تضمن دورة واحدة بدرجة حرارة 94 م لمدة 5 دقائق لفك ارتباط شريطي 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*، نقيت نواتج التضخيم وارسلت الى شركة (BIONEER) الكورية لغرض اجراء فحص معرفة التعاقب الخاص بالدنا. حللت التعاقبات الواردة بواسطة 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:

استعملت ثمار المانغستين (*Garcinia mangostana* L.) مصدرا للعزل (شكل1) بعد ان نميت نماذج هذه العزلات على الوسط YPD السائل المضاف اليه المضاد الحياتي الكلورامفينكول وحامض الستريك، كررت عملية تلقيح الوسط السائل بعالق العزلات وإعادة نشر العالق بعد حضنه في الظروف الملائمة لنمو *S. boulardii* على الوسط

ISSN 2072-3875

الصلب YPD والمضاف اليه المضاد الحياتي الكلورامفينكول وحامض الستريك لضمان الغربلة التي تمكن من الحصول على عزلات نقية.

شكل (1) مقطع عرضي لثمرة المانغستين

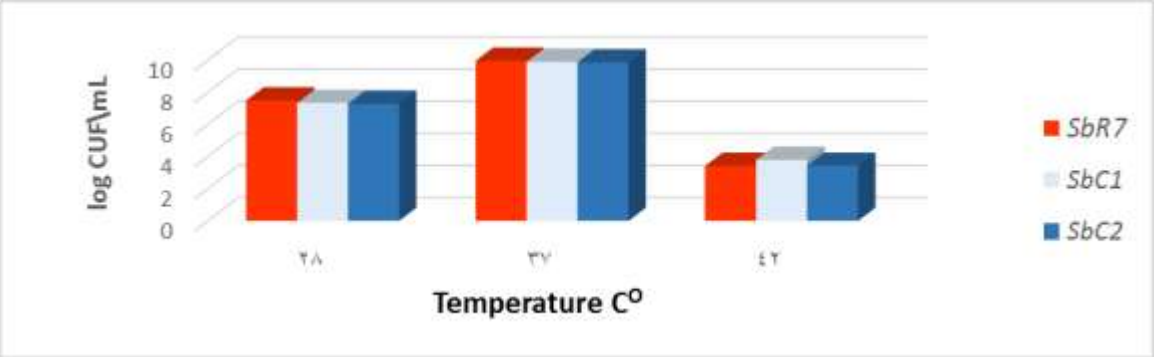
أظهرت العزلة المحلية مستعمرات ذات شكل دائري بلون ابيض مائل إلى الكريمي الباهت عند تنميتها على الوسط الصلب SD وبدت بشكل محدب ذات حواف منتظمة وقوام كريمي لزج، بلـغ متوسط حجمها 1-2 مليمتر عند تنميتها بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، جاءت هذه النتائج متفقة مع ما ذكره Neelayadatchi *et al.* (2012) و Saeed *et al*(2013) 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 Neelayadatchi *et al.* (2012) عن الخواص المجهرية لعزلات *S. boulardii*.

النمو بدرجات حرارة مختلفة :

يوضح الشكل (2) نمو عزلة *S. boulardii* المحلية مقارنة بالعزلتين التجاريتين بدرجات حرارة 28، 37 و 42 م، أذ أظهرت النتائج افضلية واضحة لنمو العزلات بدرجة حرارة 37 م مقارنة بدرجة الحرارة 28 م فيما كان النمو بطيئا وضعيفا بدرجة حرارة 42 م، ويلاحظ من النتائج ان العزلات *SbR7* ، *SbC1* و *SbC2* أظهرت أفضلية للنمو بدرجة حرارة 37م أذ بلغ لوغاريتم الاعداد الحية 9.96، 9.90 و 9.86 و.م.م/مل وعلى التوالي، لذا بالإمكان القول ان العزلات أظهرت نموا أسرع بدرجة حرارة 37 م.

ذكر Fietto (2004) ان *S. boulardii* تظهر نموا أسرع من *S. cerevisiae* W303 بدرجة حرارة 37 م وهي درجة حرارة الجسم أذ تعطي هذه الخاصية ميزة مهمة لاستعمال *S. boulardii* معززا حيويا أذ تمتلك بهذه الدرجة الحرارية زمن جيل أقصر فضلا عن المقدرة على التنافس مع الاحياء الممرضة في النظام البيئي للجهاز الهضمي. فيما وجد Graffs *et al* (2008) ان عزلات *S. boulardii* تظهر أفضل نمو في مدى حراري ما بين درجة حرارة 30 – 37 م. وجاءت هذه النتائج في نفس السياق الذي ذكره Rajkowska and Kunicka-Styczyńska (2010) من أن عزلات المعزز الحيوي *S. boulardii* تظهر نموا امثل بدرجة حرارة 37 م مقارنة بدرجات الحرارة .

ISSN 2072-3875



شكل(2) نمو عزلات *S. boulardii* بدرجات حرارية مختلفة

مقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض :

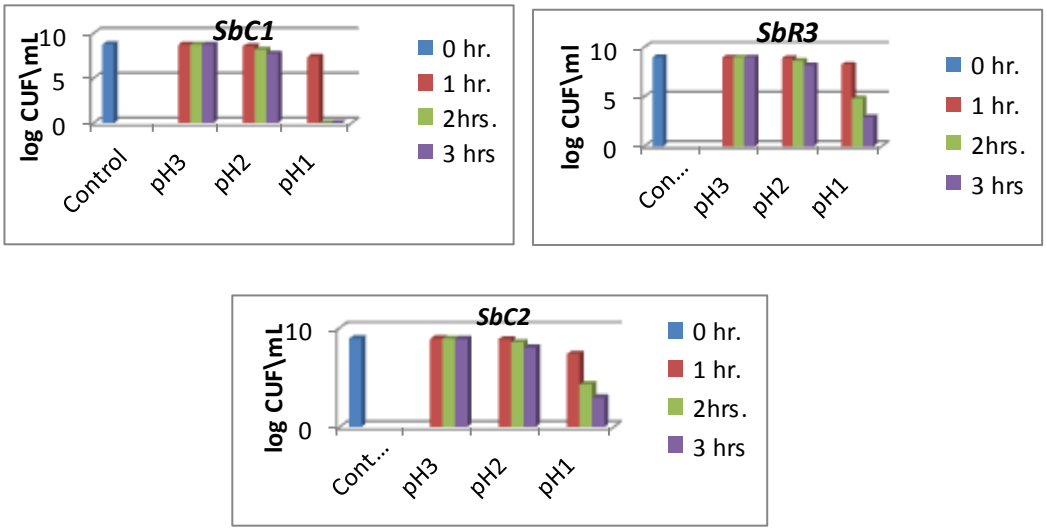
بينت النتائج في الشكل (3) ان العزلة المحلية والعزلتين temperature التجاريتين أظهرت مقاومة للاس الهيدروجيني 3.0 خلال فترة الحضن 1، 2 و3 ساعة، كذلك بينت النتائج مقاومة العزلة المحلية والعزلتين التجاريتين للاس الهيدروجيني المنخفض 2.0 خلال مدة الحضن 1 ،2 و3 ساعة، وأظهرت العزلة المحلية *SbR7* مقدرة لتحمل الاس الهيدروجيني 2.0 بعد 3 ساعة مقارنة بالعزلتين التجاريتين أذ بلغت قيمة الانخفاض في لوغاريتم الاعداد الحية 0.71 و.م.م/مل. اما في الاس الهيدروجيني 1.0 فأظهرت النتائج مقدرة العزلة المحلية*SbR7* والعزلة التجارية *SbC2* فقط من المقاومة والنمو أذ بلغ الانخفاض في لوغاريتم الاعداد الحية 5.55 و5.95 و.م.م/مل وعلى التوالي، فيما لم تتمكن العزلة التجارية *SbC1* من النمو ويتضح من النتائج ان العزلة *SbR7* أظهرت افضلية واضحة في مقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض مقارنة بالعزلتين التجاريتين *SbC1* و*SbC2*.

تعد المقدرة على مقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض احدى المعايير الرئيسية لاختيار سلالات المعززات الحيوية لتتمكن من الوصول الى الأمعاء الدقيقة وتحمل الاس الهيدروجيني المتطرف في المعدة وممارسة فعلها العلاجي (Çakır, 2003).

جاءت هذه النتائج موافقة لما توصل اليه Graffs *et al.* (2008) من أن عزلات *S. boulardii* لها المقدرة على مقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض 1.0. وقد ذكر Fietto *et al.* (2004) وجود بعض البروتينات التي يتم التعبير عنها في خلايا *S. boulardii* في البيئة الحامضية المتطرفة ناتجة عن تأثيرات ايضية تعطيها المقاومة الفسيولوجية العالية للظروف الحامضية، وأشار لعدم وجود هذه البروتينات في *S. cerevisiae* . فضلا عن ان خلايا *S. boulardii* طورت اليات جزيئية للاستجابة لهذه الظروف قادت الى تطورات مهمة في تمثيل هذه الخلايا وعدم تأثر أغشيتها الخلوية.

فيما أشار Edwards-Ingram, *et al.* (2007) الى ان نسبة البقاء لخلايا *S. boulardii* اكبر مقارنة ببقاء *S. cerevisiae* عند الاس الهيدروجيني 2.0 وعزى مقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض الى ارتفاع تعبير جينات الاستجابة للظروف المتطرفة (*HSP26*، *SSA3*، *SED1*، *HSP42*، *HSP78* و *PBS2*) مقارنة بباقي الجينات فضلا عن وجود نسخ ثلاثية(Trisomy) لبعض الكروموسومات مثل الكروموسوم التاسع . وقد وجد Cascio *et al.* (2013) بعد مرور 6 ساعات في اس هيدروجيني 2.5 تمكن خلايا *S. boulardii* من الحفاظ على فعالية بلغت أكثر من 70% وعند استعماله اس هيدروجيني 1.5 وجد ان 8% من الخلايا احتفظت بفعاليتها

ISSN 2072-3875

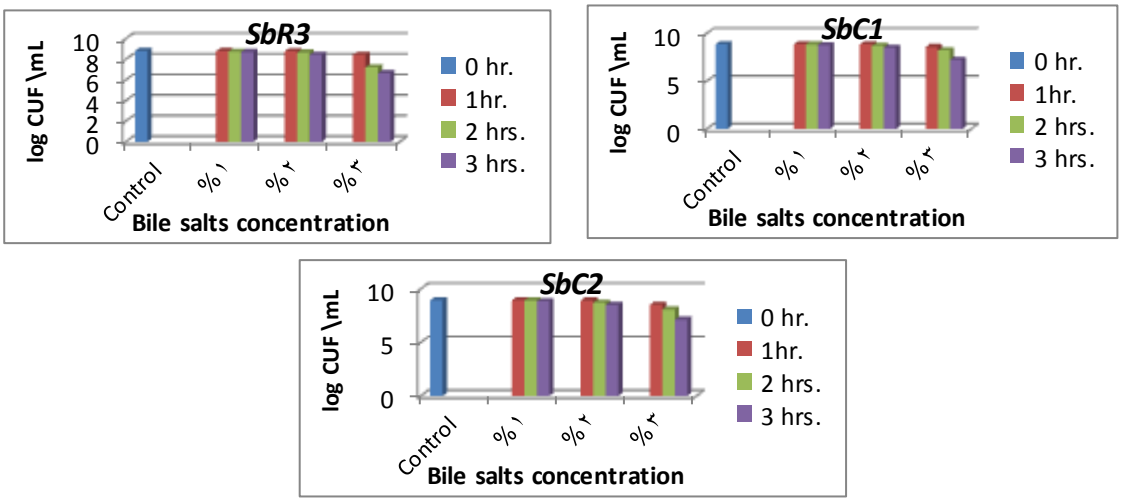


شكل (3) لوغاريتم الاعداد الحية للعزلات في اس هيدروجيني 1 و2 و3 ومدة حضن 1و 2 و3 ساعة في درجة حرارة 37م

مقاومة التراكيز العالية لأملاح الصفراء :

أظهرت جميع العزلات (الشكل 4) مقاومة واضحة عند استعمال 1 و2 و3 % من املاح الصفراء ولمدد الحضن 1، 2 و3 ساعة و أظهرت العزلة المحلية *SbR7* والعزلة *SbC1* عدم تأثرهما عند تركيز 1% وافضلية في تحمل التراكيز العالية من املاح الصفراء مقارنة بالعزلة التجارية *SbC2*.

من الخصائص المهمة للأحياء المجهرية لتكون معززات حيوية هي قابليتها على التحمل والبقاء في تراكيز الامعاء الدقيقة من املاح الصفراء، لذا فان تحمل التراكيز العالية لأملاح الصفراء يعد احد المتطلبات الأساسية للمعززات الحيوية (Syal and Vohra , 2013).



شكل(4) لوغاريتم الاعداد الحية للعزلات في تركيز 1و2 و3 % املاح الصفراء ولمدة الحضن 1و2 و3 ساعة في درجة حرارة 37 م.

وعلى الرغم من ان التركيز الفسيولوجي لأملاح الصفراء في الأمعاء الدقيقة 0.2 – 2.0 % فأن هذا التركيز يستعمل في الدراسات البحثية للكشف وإيجاد السلالات المقاومة لأملاح الصفراء وهذا ما يوفر

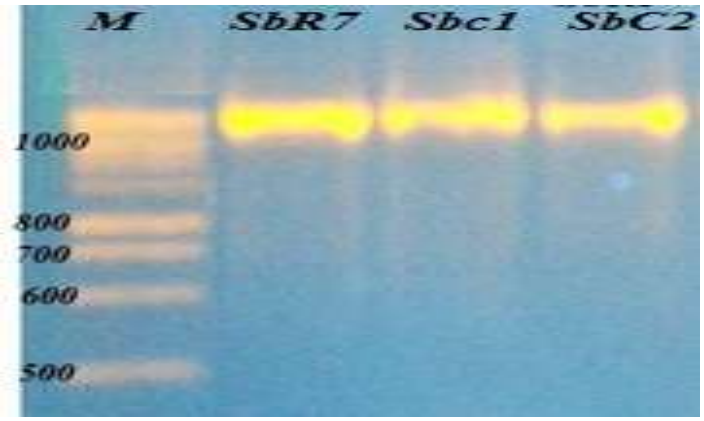
ISSN 2072-3875

ميزة لهذه السلالات عند استعمالها في الأنظمة الحية *in vivo* (Gunn, 2000). تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Van der Kuhle *et al.* (2005) من ان *S. boulardii* تظهر مقاومة جيدة لأملاح الصفراء، و ما توصل اليه Sourabh *et al.* (2011) في دراسة مختبرية بان أنواع جنس *Saccharomyces* متحملة جيدة للاس الهيدروجيني المتطرف والتراكيز العالية من املاح الصفراء . وقد ذكر Kourelis *et al.* (2010) ان *S. boulardii* لها القابلية على مقاومة ظروف القناة الهضمية والبقاء نشطة أيضيا وهذا من الأمور الواجب توفرها في المعززات الحيوية لتظهر تأثيراتها المفيدة.

التشخيص الجزيئي

أجريت عملية استخلاص الدنا للعزلات بنجاح، أذ بلغ تركيز الدنا المستخلص للعزلة المحلية*SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1* و *SbC2* 10.1 ، 9.9 و 11.5 نانوكرام /مايكروليتر وعلى التوالي فيما بلغت النقاوة 1.85 ، 1.78 و 1.88 وعلى 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 القلية للدنا تقلل دقة التضخيم (Green and Sambrook, 2012).

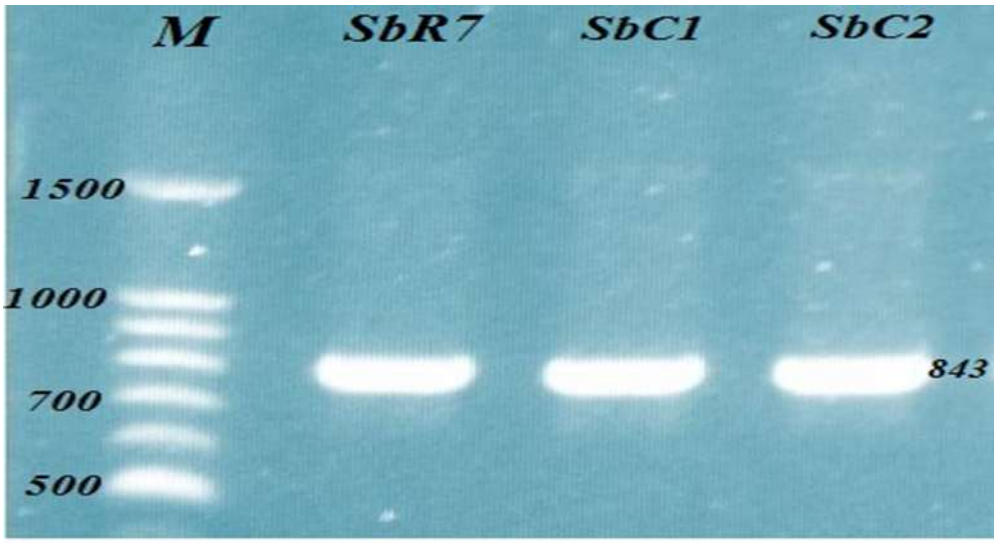
أظهر الترحيل الكهربائي للدنا (الشكل 5) نتائج مماثلة أذ ظهر دنا العزلات بشكل حزم واضحة.



شكل (5) الترحيل الكهربائي لدنا العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1, SbC2* على هلام الأكاروز0.8% 7فولت/سم،90 دقيقةM: يمثل الدليل الحجمي للدنا 100 - 1500 زوج قاعدة

اجريت التفاعلات التضاعفية لسلسة الدنا للعزلات باستعمال البادئات التي تستهدف التسلسل النوعي للمنطقة البينية ITS للجين المحافظ 5.8S rRNA بالاعتماد على البرنامج الموصوف من قبل Fietto, *et al* (2004). أظهرت نتائج استعمال البادئات ITS1 و ITS4 بعد الترحيل على هلام الأكاروز (الشكل 6) 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* (Fietto *et al.*,2004).

ISSN 2072-3875



شكل (6) الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم القطع البينية ITS1 وITS4 من الجينrRna 5.8S 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 (Vaughan-Martini, 2003).

وتعد المنطقة البينية ITS ضمن الجين المحافظ 5.8S rRNA اكثر ملائمة لتشخيص الأنواع والسلالات ويعزى ذلك لإمكانية تحليل النشوء والتطور(Phylogenetic) للأنواع ذات الصلة الوثيقة والمتقاربة جـــــــدا 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 (Van der Kuhle *et al*, 2003).

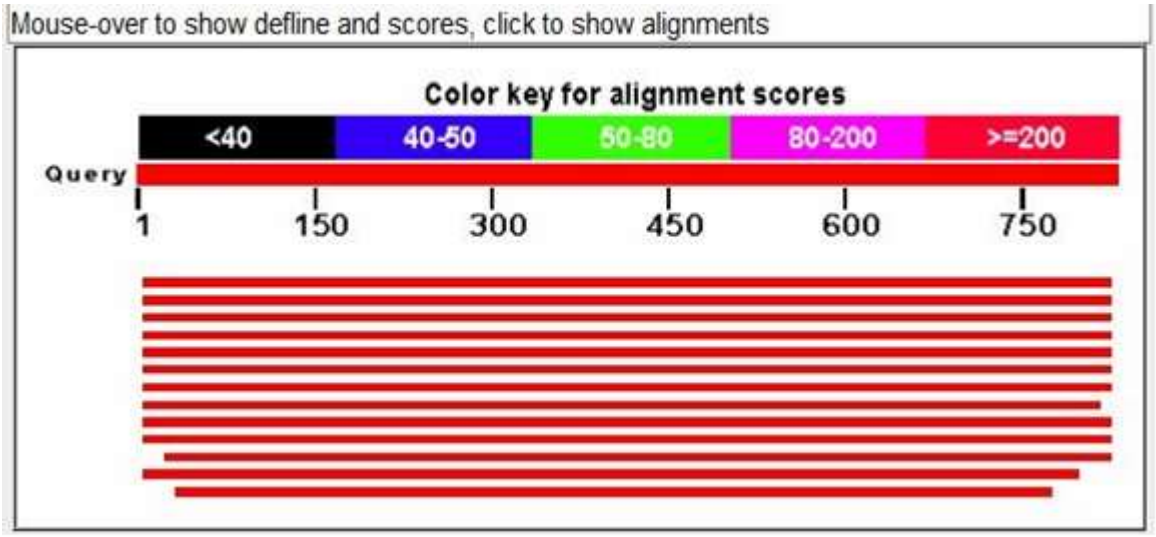
اجري على نواتج التضخيم تعاقب القواعد النيتروجينية للقطعة البينية ITS للجين 5.8S rRNA بعد ان أرسلت الى شركة BIONEER الكورية الجنوبية. بعدها حللت التعاقبات الوارده (الشكل 7)

» *SbR7* – ITS1- forward
GCAGAGGAGGCTCCCCTTTTTAAACCGGGGTTCTTTTTGTTAGGCGAGAGCTAAGAGCCTTACTGGGGCCAGAA
GAATGAGTGGAGAAGCCCAGCGGGCCTGCGCTTTAATGGCGCGTAATGGCTAGGTTGGAGTTTCCTTCTTGGTA
TTCCAAAAGGGGAAAGATCTCTGTGCTTTTAATATACGACAAATAAAACCGTTTCAATACCACACATTGTGGAG
ATTCATATCTTTGCAACTTTTTCCTTGGGGATTCAAGCAATCGGGCCCCAGAGGGAACAGCCACCAACAAATTTA
TCTATTCATTTTATTTTTCTCAAAACCAAGAATTTTCGTAACTGGAAATTTCAAATATTAAAAACTTTCAACAGCG
TATCTCTTGGTTCCCGCACACATAAAAAACGCAGTGAAACGCCCCACATAATGAAAATTGCCGAATACCCAAAA
TCACGCATCCCCCGACAAATCATTGAACCCCTTGATATTTCCTGGGGGCATGCCTCCGCGGAG
» SbR7 – ITS4- reverse
GGGCGTTGGGGACTCCTACCTGGATTTGAGGTCAAACTTTAAGAACATTGTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATC
GATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCA
TTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTT
AACTCCAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCCCT
GGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCG
CATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTAAAATTTCCA
GTTACGAAAATTCTTGTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAGATAAAATTGTTTGTGTTTGTTACCTCTGGGCCCCG
ATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACTCCACAGTGTGTTGTATTGAAACGGTTTTAA
TTGTCCTATAACAAAAGCACAGAAATCTCTCACCGTTTGGAATAGCAAGAAAGAAACTTACAAGCCTAGCAAGA
CCGCGCACTTAAGCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGTCTTCTTGCCCAGTAAAAGCTCTCATGCTCTT
GCCAAAACAAAAAAATCCATTTTCAAAATTATTAAATTTCTTTAATGATCCCTCTCCGCCAGGTTCACCCTACGG
AAAGATCC

شكل (7) تعاقب القواعد النيتروجينية لناتج تضخيم المنطقة البينية ITS (ITS4،ITS1) ضمن الجين 5.8S rRNA للعزلة *SbR7*

ISSN 2072-3875

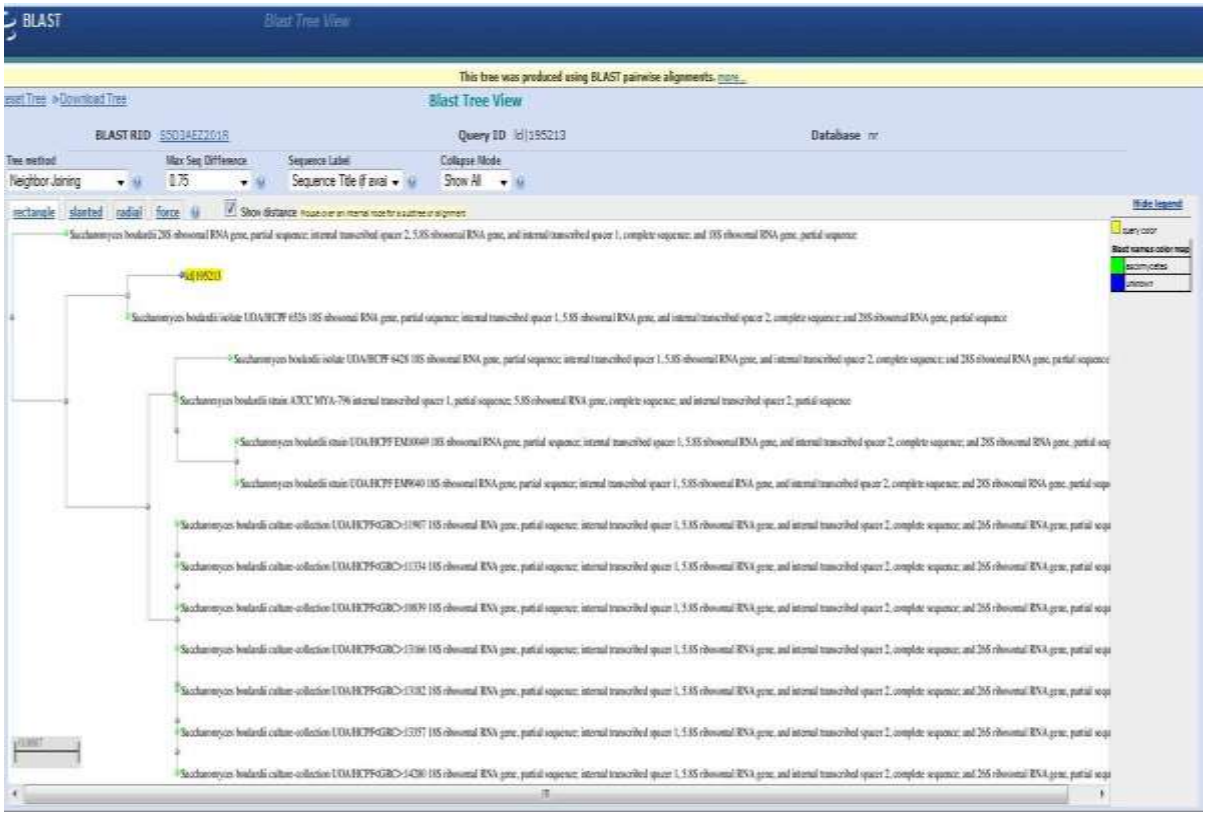
اجري تقييم نوعية التعاقبات الواردة، باستعمال CodonCode Aligner® software أذ شذبت التعاقبات لإزالة الأجزاء ذات النوعية المنخفضة والتي تمثلها القمم غير المنتظمة متمثلة بالتعاقبات الأولى 20 -60 نيوكليوتيد وأحيانا النيوكليوتيدات الاخيرة، ويعزى تكون هذه الأجزاء الى ازدواج البوادئ او بعض نواتج عملية التضخيم 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 (شكل 8).



شكل (8) تماثل تعاقبات القواعد النيتروجينية للمنطقة البينية ITS (ITS4،ITS1) للجين 5.8S rRNA للعزلة *SbR7* مع تعاقباته في *S. boulardi* في بنك الجينات

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 ويبين الشكل (9) علاقة العزلة *SbR7* مع سلالات *S. boulardii* القياسية.

ISSN 2072-3875



شكل(9) العلاقة بين العزلة *SbR7* وسلالات *S. boulardii* القياسية المتوافرة في بنك الجينات

صنف *S. boulardii* (1996)McFarland على انها نوع جديد من جنس *Saccharomyces*، مؤكدا ما توصل اليه Cardinali and Martini (1994) أذ صنفاها خارج مجموعة *S. cerevisiae* بمقارنة الطرز الوراثية وتحليل تغيرات الاشكال. فيما أضاف Edwards-Ingram *et al.*(2007) ان *S. boulardii* تختلف عن *S. cerevisiae* على المستوى الجيني والفسيولوجي وكيفية التبويغ والكروموسومات الفردية وأعداد نسخ الجينات وعدم تكوين الهايفات الكأذبة ومقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض. وذكر Khatri et al. (2013) ان *S. boulardii* تمتلك صفات خاصة منها انتاج عوامل غير بروتينية وعد هذه العوامل استثنائية خاصة بها لا تنتجها أنواع *Saccharomyces*. وتعد المنطقة البينية ITS ضمن الجين المحافظ 5.8S rRNA اكثر ملائمة لتشخيص الأنواع والسلالات ويعزى ذلك لإمكانية تحليل النشوء والتطور(Phylogenetic) للأنواع ذات الصلة الوثيقة والمتقاربة جـــــــدا باستعمال الفاصل البيني ITS (ITS1 ، ITS4) الممتد بين والوحدة الرايبوسومية 18s rRNA والوحدة الرايبوسومية 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 (Van der Kuhle *et al*, 2003). فقد وجد Mitterdorfer *et al.* (2002) 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.

المصادر:

Buchl, N.; Hutzler, M.; Mietke-Hofmann, H.; Wenning, M. and Scherer, S. (2010). Differentiation of Probiotic and Environmental

ISSN 2072-3875

Saccharomyces Boulardii by Encapsulation in Microspheres. Pharmaceut Res 25(6):1290–1296

Green, R. M. and Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition. CSHL Press.

Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. Microbes Infect. 2:907–913.

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

Kourelis, A.; Kotzamanidis, C.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Scouras, ZG.; Tzanetakis, N. and Yiangou, M. (2010). Preliminary Probiotic Selection of Dairy and Human Yeast Strains. J Biol Res Thessaloniki 13:93–104

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

Mitterdorfer, G.; Kneifel, W. and Viernstein, H.(2002). Utilization of Prebiotic Carbohydrates by yeasts of Therapeutic Relevance. Letters in Applied Microbiology 2001, 33, 251-255.

Narayanan, R.; Reddy, K. and Jyothi, C.(2012). Evaluation of Probiotic Potential of Stress Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* and De-*Saccharomyces cerevisiae* Strains in Animal Feed. J Appl Microbiol 109(3):783–791.

Çakır, I. (2003). Determination of some probiotic properties on *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Ankara University Thesis of Ph.D*.

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.

Cascio, V.; Gittings, D.; Merloni, K.; Hurton, M.; Laprade, D. and Austriaco. N. (2013) S-Adenosyl-L-Methionine protects the probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*, from acid-induced cell death. BMC Microbiology , 13:35.

Edwards-Ingram, L. ;Gitsham, P.; Burton, N.; Warhurst, G.; Clarke, I; Hoyle, D.; Oliver, SG. and Stateva, L.(2007). Genotypic and Physiological Characterization of *Saccharomyces boulardii*, the Probiotic Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Env Microbiol 73:2458–2467

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.

Graffs, S.; Hussain, S.; Chaumeil, JC. and Charrueau, C. (2008).Increased Intestinal Delivery of Viable

ISSN 2072-3875

Western Himalayas For Probiotic Attributes. Journal Of Yeast And Fungal Research Vol. 2(8), Pp. 117 - 126, 8 September, 2011.

Syal, P. and Vohra, A. (2013). Probiotic Potential of Yeasts Isolated From Traditional Indian Fermented Foods. International Journal of Microbiology Research. ISSN: 0975-5276 & E-ISSN: 0975-9174, Volume 5, Issue 2, 2013, pp.-390-398.

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.

Van der Kuhle, A.; Skovgaardij, and Jaspersen, L. (2005). *In vitro* Screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* and food borne *Sachharomyces cerevisiae* straits. Intl. J. Food Microbiol., 101: 29-39.

Vaughan-Martini, A. (2003). Reflections on the Classification of Yeasts for Different end-users in Biotechnology, Ecology and Medicine. *Int. Microbiol.* 6, 175-182.

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.

velopment of Economically Viable Media for Maximum Growth. J Food Process Technol 3:178. doi:10.4172/2157-7110.1000178

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.

Pommerenke, C.; Musken, M.; Becker, T. and Dotsch, A. (2010). Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas aeruginosa* .Plos. Pathog.6 : 1-8.

Rajkowska, K. & Kunicka-Styczyńska, A. (2010) Probiotic Properties of Yeasts isolated from chicken feces and kefirs. Polish Journal of Microbiology The Polish Society of Microbiologists :59(4):257-263

Rajkowska, K. and. Kunicka-Styczyńska, (2009). Phenotypic and Genotypic Characterization of Probiotic Yeasts. Technical University of Lodz, Wolczanska 171/173, 90-924 Lodz, Poland.

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, Issue 1, ISSN: 2507-4521

Sourabh, A.; Kanwar, S. and Sharma, P.(2011). Screening Of Indigenous Yeast Isolates Obtained From Traditional Fermented Foods of

ISSN 2072-3875