استعمال العلاقة المناعية لتحديد نوع وجنس خميرة *Saccharomyces cerevisiae* المعزولة من الفواكه المحلية وتقييم فعالية مستخلصها الخام تجاه بعض أنواع البكتريا المرضية

أ.د.رغد اكرم عزيز
قسم العلوم، كلية التربية الاساسية، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق
ragaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

مستخلص البحث:
امكن الحصول على 5 عزلات للخمائر من بعض انواع الفواكه التالفة، والتي اخضعت لعمليات تنقية متعددة لحين التأكد من نقاوتها مجهريا، ثم عرضت إلى الغربلة الأولية لتحديد العزلات التي تمتلك كثافة نمو عالية، وبينت النتائج تميز العزلة (Y1) من خلال ملاحظة كثافة النمو على الوسط Yeast extract peptone dextrose المستعمل باختلاف درجة حرارة الحضن، ولغرض تشخيص العزلة المنتخبة المستحصل عليها من مرحلة الغربلة الاولية، اجريت الاختبارات المتعلقة بالخواص المظهرية والمزرعية باستعمال الوسط ذاته فضلا عن الخواص الفسلجية والاختبارات الكيميوحيوية والتي اظهرت جميعها انتماء العزلة Y1 لخميرة *S. cerevisiae* نتيجة تطابق النتائج المستحصل عليها مع عدد من المراجع العلمية (المفاتيح التشخيصية) في هذا المجال، كما بينت نتائج التشخيص الخميرة بجهاز Vitek ان العزلة قيد الدراسة تنتمي لخميرة *S. cerevisiae*، وبين فحص الانتشار المناعي المزدوج لعزلة الخميرة Y1 والمصل المضاد لها وجود علاقة مناعية، إذ لوحظ أن عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة كان (8/1)، كما لوحظ وجود تفاعل مناعي مشترك بين عزلة الخميرة المحلية Y1 والخميرة التجارية مع المصل المضاد لعزلة خميرة Y1 والذي يشير الى تطابق المحددات المستضدية بين كل من الخميرة المحلية Y1 والخميرة التجارية، كما بينت النتائج وجود فعالية تثبيطية لراشح الخميرة المحلية Y1 ضد البكتريا المعوية المرضية المعزولة من عينات لبراز الأطفال دون سن الخامسة والمصابين بالإسهال الدموي والمائي الحاد، اذ بلغت اقطار منطقة التثبيط لـ 100 مايكرولتر (1ملغم/ مللتر) من راشح خلايا هذه الخميرة 21 و18 و16 ملم لكل من بكتريا *Escherichia coli* و*Salmonella typhimurium* و*Shigella flexneri*.

الكلمات المفتاحية: بكتريا مرضية، خميرة *Saccharomyces cerevisiae*، سموم قاتلة، عزل وتشخيص الخميرة، فعالية تثبيطية.

المقدمة:
شهدت العقود الأخيرة من القرن الماضي تطوراً ملحوظاً في مجالات التقانة الأحيائية، وقد اكتسبت الأحياء المجهرية أهمية واسعة؛ لاستعمالها في إنتاج العديد من المواد التي تستعمل في مجلات مختلفة بسبب إنتاجيتها العالية وسهولة تنميتها وتوافرها على مدار السنة وإمكانية استغلالها في إنتاج اكثر من مادة مهمة (Alsoufi and Aziz, 2017a)، وجاءت خميرة *Saccharomyces cerevisiae* في مقدمة هذه الأحياء المجهرية والتي استغلت بشكل كامل لاجل الاستفادة منها، إذ تعد هذه الخميرة منجماً للمواد الحيوية التي تنتج في جميع أنحاء العالم (Hu *et al.*, 2019)، اذ تستعمل بالدرجة الأساس في صناعة الخبز وهذه الميزة أعطتها صفة الأمان من الناحية التغذوية كونها لا تنتج مواد سامة قد تتداخل مع المواد الحيوية المنتجة منها، وتستخدم هذه الخميرة في إنتاج الكحول، الكليسيرول، البروتين أحادي الخلية الذي يستخدم في تغذية الإنسان والحيوان على حد سواء، مجموعة فيتامين B، الايركوستيرول، الانزيمات والبروتينات القاتلة فضلا عن العديد من المواد

الحيوية الاخرى التي لها استعمالات متعددة في المجالات التطبيقية (Aziz *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2025).تعود هذه الخميرة الى صنف Ascomycetes ورتبة Endomycetalels وعائلة Saccharomycetaceae جنس *Saccharomyces* نوع *cerevisiae*، وتوجد في الطبيعة على سطوح الاثمار الناضجة والاوساط السكرية والتربة، وتحتاج الخميرة الى العديد من المتطلبات الاساسية لتوفير الطاقة اللازمة لبناء المكونات الخلوية لاجل النمو والتكاثر والتي تضم الكاربون والاوكسجين والنتروجين والهيدروجين والفوسفور والكبريت، والجزيئات الكبيرة مثل البروتين والسكريات المتعددة والحوامض النووية والدهون، فضلا عن الايونات اللاعضوية مثل البوتاسيوم والمغنيسيوم، بينما تؤدي العناصر النزرة دورا مهما في الفعاليات الحيوية والتركيبية لخلية الخميرة التي تنمو بأفضل صورة بمدى من درجات الحرارة يتراوح بين 20 الى 30م، واس هيدروجيني بين 4 الى 6 (Alsoufi and Aziz, 2017b; Walker, 1999).

يعد الشكل المظهري لمستعمرة الخميرة النامية على الاوساط الصلبة من اهم الخواص المميزة للتعرف الى جنس الخميرة المنتقاة من خلال ملاحظة شكل المستعمرة وطبيعة نموها، اذ تتميز خميرة *S. cerevisiae* بتكوينها مستعمرات ذات لون كريمي وقوام لزج تظهر بشكل محدب ذو حافات منتظمة (Levin 2005)، ولا يعطي الشكل المظهري جزما قاطعا بنوع الكائن، اذ يجب ان تجرى الفحوصات المجهرية للتأكد منها بشكل قاطع، فقد تظهر بعض الخمائر تشابها في شكل المستعمرة الخارجي الا انه يمكن تمييزها بوساطة الفحوصات المجهرية من خلال قياس حجم الخلايا وملاحظة الشكل المميز لها، لذا فأن الفحوصات المظهرية يمكن من خلالها التعرف على الجنس الخاص بالخميرة دون نوعها (Aziz *et al.*, 2014a)، ولا يمكن اعتماد الفحوصات المظهرية كأساس ثابت لتحديد نوع الخميرة المراد الحصول عليها، لذا تجرى الفحوصات الفسلجية والكيميائية الحيوية والتي تشكل مع الفحوصات المظهرية مفاتيح تشخيصية لتحديد جنس ونوع الخميرة، وتعد فحوصات تمثيل مركبات الكاربون والنتروجين من اهم الفحوصات التي تجرى لهذا الغرض، كما يعد اختبار تمثيل وتخمير السكريات احد الفحوصات الاساس التي يتم من خلالها استعمال انواع عدة من هذه السكريات مثل الكلوكوز والكالاكتوز والمالتوز والسكروز واللاكتوز والرافينوز والتريهالوز والزايلوز، واحيانا قد لا يعطي احد الاختبارات دليلا قاطعا في تحديد نوع الخميرة، لذا يتم اللجوء الى استعمال اختبار اخر لتأكيد النتيجة (Barnett *et al.*, 2000)، ومن خلال البحوث والدراسات المنجزة في هذا المجال وبالنظر لوجود اختلافات جوهرية بين اجناس وانواع الخمائر يمكن من خلالها التفريق فيما بينها انتجت بعض العدد التشخيصية والمتوافرة بصورة تجارية لاجل تشخيص بعض الانواع المهمة من الخمائر مثل عدة Analytical Profile Index (API) Strips، ونظام التحليل الالي (BCCM / Allev 2.00) فضلا عن دراسات تشخيص الخواص المناعية ممثلة بالدراسات المصلية كالتلازن والترحيل الكهربائي المناعي والتألق المناعي المجهري والخواص الجزيئية للخمائر كدراسة تتابع شريط DNA وتحديد محتواه من نسبة القواعد النتروجينية (Boekhout and Kurtzman, 1996). تمتلك خميرة الخبز القدرة على افراز بروتينات متخصصة تعرف بالبروتينات القاتلة Killer proteins اثناء فترة نموها والتي تستعملها في تثبيط او تأخير نمو الكائنات المجهرية الاخرى المرافقة لها في وسط النمو (Alsoufi and Aziz, 2017b)، لذا اتجهت الانظار نحو استثمار هذه المادة الحيوية في تثبيط الاحياء المجهرية المرضية وإطالة العمر الخزني للغذاء نظرا لان انتاجها يتم من قبل خميرة الخبز التي تعد مصدر آمن للاستهلاك فضلا عن عدم تسجيل أي حالة تسمم في منتجات هذه الخميرة (Alsoufi and Aziz, 2022; Alsoufi and Aziz, 2017a)، لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى الحصول على عزلة محلية من الخميرة وتنقيتها وتشخيصا على مستوى الجنس والنوع الاعتماد على الخواص المظهرية والمزرعية والكيميائية الحيوية والتاكد منها باستعمال

تقنية Vitek ومن ثم التشخيص المناعي واختبار فعالية راشح الخميرة على نمو البكتريا المرضية المعوية.

المواد وطرائق العمل

مصادر العزل

شملت الدراسة جمع عينات مختلفة من بعض انواع الفواكه التالفة (برتقال ويوسفي و كيوي و نارنج و كريب فروت) المتوافرة في الاسواق المحلية لتكون مصادر لعزل الخميرة المستهدفة بالدراسة.

خميرة الخبز التجارية

استعملت خمير من نوع Saf-instant ذات المنشأ التركي والتي تم الحصول عليها من الاسواق المحلية.

العزل

وضع 1 غم من مصادر العزل المنتخبة في انبوبة اختبار حاوية على 10 مللتر من ماء البيتون وخلطت باستعمال المازج لمدة 1 دقيقة، ثم اجريت تخافيف عشرية متسلسلة للعينات بماء البيتون ونقل 0.1 مللتر من التخافيف المناسبة الى سطح الوسط الجاهز Yeast extract peptone dextrose (YEPD) ذي اس هيدروجيني 5.5 في اطباق بتري معقمة وحضنت بدرجة حرارة 25م لمدة 48 ساعة، بعدها التقطت مستعمرات الخميرة النامية بصورة منفردة بوساطة حلقة المالئ وخططت على سطح الوسط ذاته في اطباق بتري جديدة؛ كررت العملية لمرات عدة بهدف الحصول على عزلات نقية والتأكد من نقاوتها باستعمال الفحص المجهري، وجرى حفظ العزلات المنتقاة وادامتها بتخطيطها على الوسط ذاته بهيئة اوساط صلبة مائلة وحضنها بدرجة حرارة 25م لمدة 48 ساعة، ثم حفظها في الثلاجة وتنشيطها شهريا بمكررات عدة لكل عزلة طيلة مدة البحث (Al-Obiday and Al-Soufi, 2009).

الغربلة الاولية

خططت عزلات الخمائر على الوسط الجاهز YEPD الصلب ذي اس هيدروجيني 5.5 وحضنت بدرجات حرارة 20 و25 و30 و35 و40م مع متابعة النمو لمدة 72 ساعة لانتخاب العزلة الاكفأ على النمو (Al-Soufi and Al-Obiday, 2007b).

تشخيص العزلة

الخواص المظهرية والمزرعية

اجريت اختبارات عدة لتحديد خواص العزلة المظهرية والمزرعية، اذ درست باستعمال الوسط الجاهز YEDP الصلب ذي اس هيدروجيني 5.5، وذلك بتلقيح الوسط بعالق خلايا الخميرة وحضنت بدرجة حرارة 30م لمدة 48 ساعة ثم فحص حجم الخلايا مجهريا وجرى حساب حجم ما لايقل عن 20 خلية باستعمال شريحة Stage Micrometer وملاحظة شكل المستعمرات وطبيعة النمو (Barnett *et al.*, 2000).

الخواص الفسلجية والكيموحيوية

اجريت اختبارات عدة شملت تخمر الكربوهيدرات وتمثيل الكاربون والنتروجين والنمو في وسط خالي من الفيتامينات وانتاج الحامض وانتاج الامونيا والاستر والنمو بدرجات حرارة مختلفة ومقاومة المضاد الحيوي السايكلوهكسمايد والنمو في اوساط حاوية على تراكيز عالية من السكر وتحمل كلوريد الصوديوم (Aziz *et al.*, 2014a).

التشخيص بجهاز Vitek

استعمل جهاز Vitek2 compact system لغرض التأكد من تشخيص الخميرة قيد الدراسة من خلال العدة التشخيصية الخاصة بالجهاز واتبعت خطوات التشخيص وفق تعليمات شركة Biomerieux الفرنسية المنتجة للجهاز.

التشيخص المناعي المصلي

انتاج مضاد لعزلة الخميرة

استعمل في هذه التجربة ارنبان ذكور بيضاء اللون نيوزلندية لغرض تحضير مصول مضادة، اذ جرى مزج 1 مللتر من عالق خلايا الخميرة التجارية ذي تركيز 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر مع 1 مللتر من Freund's Complete Adjuvant المجهز من شركة Sigma، بعدها حقن الخليط المستحلب في مناطق عدة من عضلة باطن الفخذ، وبعد مرور 21 يوما على هذه الجرعة اعطيت جرعة منشطة اخرى وذلك بمزج 1 مللتر من عالق خلايا الخميرة بالتركيز ذاته مع 1 مللتر من Freund's Incomplete Adjuvant، وجرى حقن المستحلب في مواضع عدة من جلد ظهر الحيوان (Garvey *et al.*, 1977).

فصل مصل الارانب

سحبت نماذج الدم من الارانب بعد مرور 10 ايام على الحقنة الاخيرة وجرى تحضير المصل وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Garvey *et al.* (1977) من خلال جمع 5 مللتر من دم الحيوان المستحصل عليها من عضلة القلب في انبوبة اختبار باستعمال ابرة قياس 20، بعدها وضعت الانبوبة بشكل مائل في درجة حرارة 25م لمدة ساعة واحدة لتخثر الدم، وثم ازيل الالتصاق بين الخثرة وجدار الانبوبة بوساطة ابرة ثم تركت في الثلاجة لمدة 24 ساعة لكي تتقلص الخثرة وينفصل المصل، بعدها اجريت عملية النبذ المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق ثم سحب المصل ونقل الى انبوبة اخرى وجرى اعادة عملية النبذ المركزي كما مر سابقا لترسيب بعض الكريات الباقية، بعدها نقل السائل الرائق الى انبوبة اخرى وجرى حفظ النماذج في الثلاجة بعد اضافة 10 مايكرولتر من 10% ازايد الصوديوم لكل 1 مللتر من المصل.

فحص الانتشار المناعي المزدوج

استعملت الطريقة التي قام بوصفها Johnston and Thorpe (1982) لقياس فعالية المصل المحضر عن طريق اذابة 1 غم من الاكاروز في 100 مللتر من محلول Phosphate Buffer Saline (PBS) ثم التسخين الى درجة حرارة 90م مع التحريك الى ان يصبح المحلول بشكل رائق، بعدها برد الهلام الى درجة حرارة 56م ثم سكب بهدوء على صفيحة زجاجية نظيفة وجافة ذات ابعاد 2.4×7.5 سم موضوعة بشكل مستو وترك للتصلب، وجرى عمل 6 حفر دائرية تحيط حفرة مركزية قطر كل منها 4 مللتر في الهلام المتصلب بوساطة المثقب والقالب المجهز من شركة LKB، وحضرت تخافيف مضاعفة من المصل باستعمال محلول PBS بنسب من 2:1 لغاية 64:1 وجرى توزيعها في الحفر المحيطة بمقدار 10 مايكرولتر لكل حفرة، ووضع في الحفرة المركزية 10 مايكرولتر من المستضد (عالق خلايا الخميرة) بتركيز 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر في حالة قياس المعيار للضد، اما في حالة معرفة العلاقة المناعية بين عزلة الخميرة المحلية وخميرة الخبز التجارية فقد وضع في الحفرة الوسطية 10 مايكرولتر من الضد وفي الحفر الجانبية وضع 10 مايكرولتر من عالق خلايا الخميرة المحلية والخميرة التجارية بتركيز 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر، وتم وضع الزجاجة في Humid Chumber بدرجة حرارة 25م الى اليوم التالي، اذ لوحظ وجود خطوط ترسيبية بيضاء اللون بين الحفرة المركزية والحفر المحيطة بها، بعدها وضعت الزجاجة في صحن يحوي على محلول PBS لغسل الهلام من الضد والمستضد الغير منتشر

واستبدل المحلول خمس مرات خلال يومين بدرجة حرارة 25م، ثم اخرجت الزجاجة من المحلول وجرى وضع طبقات عدة من ورق الترشيح عليها، اذ كانت الورقة الاولى التي تلامس الهلام مرطبة مسبقا بالماء، ثم وضع ثقل مقداره 1 كغم موزع بصورة متساوية، وبعد مرور 15 دقيقة استبدلت الاوراق الرطبة (عدا الورقة الاولى) بأوراق جافة واعيد الكبس مرات عدة حتى اصبح الهلام طبقة رقيقة جدا تشبه الغشاء، ثم غمرت الزجاجة لمدة 10 دقائق بمحلول صبغة Comassie Briliant Blue (R-250)، وغسلت اولا وازيلت الصبغة الزائدة بغمرها بمحلول ازالة الصبغة المحضر بخلط (الكحول الاثيلي:حامض الخليك:الماء المقطر) بنسبة (45:5:50) (حجم/حجم/حجم) على التوالي لمرات عدة حتى اصبحت ارضية الزجاجة شفافة، ثم غسلت بالماء وجففت باستعمال ورق الترشيح.

العزلات البكتيرية المرضية

استعملت في هذه الدراسة 9 عزلات بكتيرية وكانت من عينات لبراز الأطفال دون سن الخامسة والمصابين بالإسهال الدموي والمائي الحاد، وقد حصل على عينات قيد الدراسة من مختبرات مستشفى الطفل المركزي في محافظة بغداد للفترة من 26/ 9/ 2024 الى 29/ 1/ 2025، وجرى تنقية هذه العزلات بتكرار الزرع ومن ثم تشخيصها بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية والكيميائية الحيوية وحسب ما جاء من قبل Goldman and Green (2015) فضلا عن التشخيص باستعمل جهاز Vitek2 compact system لغرض التأكد من جنس ونوع هذه البكتريا المرضية.

تقدير البروتين

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Bradford (1976) في تقدير البروتين (ملغم/ مللتر) في رواشح خميرة *S. cerevisiae* Y1.

تحضير راشح خلايا خميرة *S. cerevisiae* Y1

حضر راشح خلايا العزلة Y1 وفقا للطريقة المتبعة من قبل Alsoufi and Aziz (2017b) وذلك من خلال تنمية هذه الخلايا في ظروف نمو مثالية من خلال تلقيح 100 مللتر من الوسط YEGP السائل ذي اس هيدروجيني 5.5 الموضوع في دورق حجمي بسعة 205 مللتر بخلايا الخميرة، ثم حضن الوسط الملقح بحاضنة هزازة بدرجة حرارة 30م وسرعة 125 دورة/ دقيقة لمدة 24 ساعة، تلاها اجراء النبذ المركزي المبرد بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4م والتخلص من الراسب الذي يمثل خلايا الخميرة وجمع الرائق الذي يمثل راشح الخمير المحتوي على البروتينات القاتلة وتعقيمه بوساطة مرشح 0.2 مايكرومتر، وجرى تجفيف الرائق المرشح تحت التبريد بجهاز التجفيد.

تقييم التأثير التثبيطي لراشح خلايا خميرة *S. cerevisiae* Y1 ضد البكتريا المعوية

استعملت طريقة الانتشار بالحفر للكشف عن الفعالية التثبيطية لراشح خلايا خميرة *S. cerevisiae* Y1 وفقا للطريقة التي قام بوصفها Gupta (1996) من خلال نقل 100 مايكرولتر من العالق البكتريا المرضية المحضر (10^5 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر) الى سطح وسط مولر هنتون الصلب ونشره بوساطة ناشر زجاجي ثم ترك الاطباق لتجف تحت التعقيم في كابينة الزرع المختبري بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة، بعد ذلك عملت في الوسط حفر بقطر 5 مليمتر بوساطة الثاقب الفليني ثم ملئت بـ 100 مايكرولتر (1ملغم/ مللتر) من راشح خميرة *S. cerevisiae* Y1 المجفد، تلا ذلك ترك الاطباق لتجف تحت التعقيم في كابينة الزرع المختبري بدرجة حرارة الغرفة لمدة 60 دقيقة ثم حضنها بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء فترت الحضن تم تقدير أقطار مناطق التثبيط حول الحفر بالمسطرة، اذ قدرة بالملمتر وقورنت مع معامل السيطرة كما جاء في Skipper and Bussey(1977).

النتائج والمناقشة

العزل والغربلة

جرى الحصول على 5 عزلات للخمائر من الفواكه التالفة المستحصل من الأسواق المحلية، وتم اخضاعها لعمليات تنقية متعددة على الوسط الصلب YEPD لحين التأكد من نقاوتها مجهريا، ثم عرضت إلى الغربلة الأولية باستعمال الوسط ذاته، من خلال حضنها بدرجات حرارة 25 و30 و35 و40م لتحديد العزلات التي تمتلك كثافة نمو عالية، ويشير (الجدول 1) إلى تميز العزلة (Y1) من خلال ملاحظة كثافة النمو على الوسط المستعمل باختلاف درجة حرارة الحضن.

تشكل عمليات العزل والغربلة الخطوة الأساس لتحديد كفاءة العزلات على النمو، إذ تعد عملية اختيار مصادر العزل من أهم الخطوات الواجب مراعاتها لغرض الحصول على العزلات المطلوبة، بينما تعد عملية الغربلة الأولية مفتاحا مهماً لغرض التفريق بين العزلات في قدرتها على النمو في أوساط غذائية معتمدة، فضلا عن الحصول على عزلة ذات نقاوة عالية جدا نتيجة تعريضها لخطوات عدة تهدف إلى التخلص من كل ما يثير الشك بجنس هذه العزلة (Aziz *et al.*, 2014b; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007a)، وعليه فقد تباينت مصادر العزل المعتمدة للحصول على خميرة *S. cerevisiae*، إلا إن اغلب الدراسات اشارت إلى عزل الخميرة من الفواكه التالفة، فقد أشار Boekhout and Kurtzman (1996) الى امكانية عزل الخميرة من الفواكه، واكد ذلك كل من (Al-Obiday and Al-Soufi, 2009; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007a; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007b).

جدول (1): الغربلة الأولية لعزلات الخمائر المحلية المنتخبة.

ت	مصدر العزلة	رمز العزلة	كثافة النمو				
			م(20)	م(25)	م(30)	م(35)	م(40)
1	برتقال	Y1	+	++++	+++++ +	++++	+
2	يوسفي	Y2	+	++	+++	++	+
3	كيوي	Y3	+	+	++	+	-
4	نارنج	Y4	+	+	++	+	-
5	كريب فروت	Y5	+	+	++	+	-

*** (-): عدم وجود نمو**

*** (+): وجود نمو وعدد العلامات يتناسب طردياً مع كثافة النمو**

تشخيص العزلة Y1

اجريت العديد من الاختبارات لغرض تشخيص العزلة المنتخبة المستحصل عليها من مرحلة الغربلة الاولية، وقد اشتملت هذه الاختبارات على الخواص المظهرية والمزرعية، الخواص الفسلجية والاختبارات الكيميوحيوية فضلا عن اختبار الخواص المصلية، وقد أظهرت النتائج الموضحة في (الجدول 2) انتماء العزلة Y1 لخميرة *S. cerevisiae* نتيجة تطابق النتائج المستحصل عليها مع عدد من المراجع العلمية (المفاتيح التشخيصية) في هذا المجال (Barnett, *etal*, 2000; Kreger-van Rij, 1984).

الخواص المزرعية

أظهرت العزلة Y1 مستعمرات ذات شكل دائري بلون ابيض مائل إلى الكريمي الباهت عند تنميتها على الأوساط الصلبة PDA وYEPD وبدت بشكل محدب ذات حافات منتظمة وقواماً كريمياً (لزج) بلغ متوسط حجمها (1 - 2) مليمتر عند تنميتها بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة.

اتفقت هذه النتائج مع ما أشار إليه Boekhout and Kurtzman (1996) الى ان خميرة *S. cerevisiae* تظهر في الأوساط الزرعية الصلبة بشكل مستعمرات ذات لون ابيض مائل إلى الكريمي وسطح محدب تمتلك قواماً لزجاً، و أوضح كل من (Aziz *et al.*, 2014a; Al-Obiday and Al-Soufi, 2009; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007a; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007b).

الخواص المظهرية

بينت الفحوصات المجهرية لعزلة الخميرة Y1 المنماة في الوسط السائل YEPD إن الخلايا تمتلك أشكالاً بيضوية، دائرية يبلغ حجمها (4 - 6) مايكرومتر طولا و(2.5 - 4.5) مايكرومتر عرضا ذات نواة واضحة تحوي بعضها على براعم في اكثر من طرف من الخلية.

أشارت المراجع العلمية إلى ان حجم خميرة *S. cerevisiae* يتباين حسب عمر الخلية، إذ يبلغ طول خلية الخميرة الصغيرة ما بين 2 الى 3 مايكرومتر في حين يتراوح طول الخلايا الكبيرة ما بين 20 الى 50 مايكرومتر بينما يتراوح عرض الخلايا ما بين 1 الى 10 مايكرومتر وانها تمتلك أشكالا بيضوية أو دائرية أو ليمونية عند رؤيتها تحت المجهر (Barnett *et al.*, 2000; Boekhout and Kurtzman, 1996)، وقد اتفقت النتائج المستحصل عليها مع ما أشار إليه كل من (Aziz *et al.*, 2014a; Al-Obiday and Al-Soufi, 2009; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007a; Al-Soufi and Al-Obiday, 2007b) من ان مستعمرات خميرة *S. cerevisiae* تظهر في الأوساط الصلبة بأشكال دائرية، بيضاء أو كريمية اللون، ذات حافات منتظمة وسطح محدب.

الخواص الفسلجية والاختبارات الكيميوحيوية

أخضعت العزلة Y1 إلى مجموعة من الاختبارات التأكيدية للتأكد بكون تلك العزلة تمثل خميرة *S. cerevisiae* (الجدول 2) اعتماد على قدرتها في تخمير وتمثيل مصادر الكاربون المختلفة وتمثيل مركبات النتروجين وقدرتها في إنتاج الحامض وتكوين رائحة الاستر المميزة وإمكانيتها في تحليل اليوريا واستهلاك النترات فضلا عن عدم قدرتها في النمو في تراكيز منخفضة من المضاد الحيوي Cyclohexamide وقدرتها في النمو بدرجات حرارة منخفضة وقابليتها في تحمل ضغوط تناضحية مختلفة. جاءت النتائج متفقة مع ما أشارت إليه المصادر المعتمدة في تصنيف خميرة *S. cerevisiae*، من خلال قدرتها في استهلاك سكر التريهالوز الرافينوز والسكروز والكلوكوز والكالاكتوز وحامض السكسينك والخليك واللاكتيك وكبريتات وفوسفات الأمونيوم الأحادية والكليسيرول الكحول الاثيلي وإنتاج الحامض من الكلوكوز وإنتاج الاستر وعدم قدرتها في إنتاج الأمونيا من اليوريا وعدم نموها بوجود تركيز 1 ملغم من المضاد الحيوي Cyclohexamide (Barnett, *et al*, 2000; Kreger-van Rij, 1984).

جدول (2): الخواص الفسلجية والكيميوحيوية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* Y1.

ت	نوع الاختبار		نتيجة الاختبار
1	تخمر وتمثيل مركبات الكاربون		
أ	السكريات	كلوكوز	+
		سكروز	+
		مالتوز	+
		فركتوز	+
		كالاكتوز	+
		انيولين	+
		تريهالوز	+
		رافينوز	+
		لاكتوز	-
		نشأ ذائب	-
		سيلوبايوز	-
		ملیبایوز	-
ب	الحوامض العضوية	حامض التارتاريك	+
		حامض اللاكتيك	+
		حامض السكسنيك	+
		حامض الخليك	+
جـ	الكحولات	الكحول الاثيلي	+
		د.سوربيتول	+
		د.مانيتول	+
		كليسيرول	-
2	تمثيل مركبات النتروجين	فوسفات الامونيوم	+
		كبريتات الامونيوم	+
		بيكاربونات الصوديوم	+
		ببتون	+
		نترات البوتاسيوم	-
		نتريت الصوديوم	-
3	انتاج الحامض من الكلوكوز		+
4	انتاج الاستر		+
5	مقاومة السايكلوهكسمايد		-
6	انتاج الامونيا من اليوريا		-
7	النمو في وسط خال من الفيتامينات		-
8	النمو بدرجات حرارية مختلفة	25°C	±
		30°C	++
		35°C	+

		40°C	±
9	النمو في اوساط ذات ظغوط تناضحية عالية		
أ	النمو في الاوساط السكرية	النمو في 40% كلوكوز	+
		النمو في 50% كلوكوز	±
		النمو في 60% كلوكوز	-
ب	النمو في الاوساط الملحية	النمو في 5% كلوريد الصوديوم	+
		النمو في 7.5% كلوريد الصوديوم	±
		النمو في 10% كلوريد الصوديوم	-

* **(-): عدم وجود نمو.**
** **(±): نمو ضعيف.**
*** **(+): وجود نمو وعدد العلامات يتناسب طردياً مع كثافة النمو.**

تشخيص الخميرة بجهاز Vitek

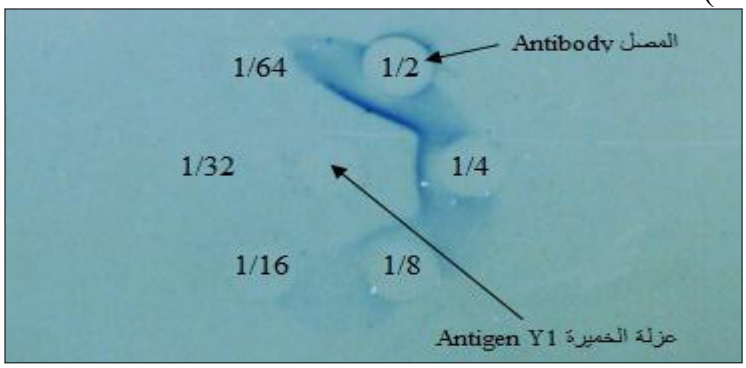
أظهرت نتائج الفحص لعزلة خميرة *S. cerevisiae* Y1 باستعمال جهاز Vitek2 compact system انها تنتمي لخميرة *S. cerevisiae*.

الفحوصات المصلية

فحص عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة

يبين (الشكل 1) فحص الانتشار المناعي المزدوج Double Immune Diffusion test لعزلة خميرة *S. cerevisiae* Y1 والمصل المضاد لها بعد حقن الارانب وانتهاء مدة الحقن، إذ تم تقدير عيارية المصل التي تمثل أعلى تخفيف يصله المصل دون حصول نتيجة سالبة و الذي يدعى بالمعيار Titer، وقد لوحظ أن عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة كان (8/1).

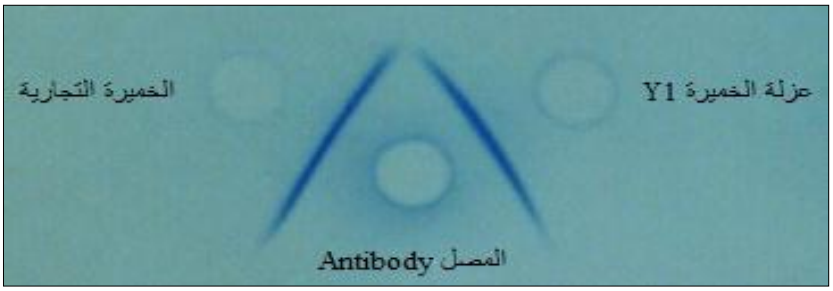
تمتلك الأحياء المجهرية صفة استضدادية لامتلاكها وزنا جزيئيا عاليا وحملها محددات مستضدية متعددة، وتعرف المستضدات بصورة عامة بأنها مادة بروتينية لها قابلية تحفيز الجهاز المناعي وإنتاج الأجسام المضادة لها عند حقنها في مضيف ملائم وتتفاعل معها بسلوك ملحوظ (Boekout and Kurtzman, 1996).



شكل (1): فحص الانتشار المناعي المزدوج لتقدير عيارية المصل المضاد لعزلة الخميرة Y1 *Saccharomyces cerevisiae*.

العلاقة المناعية بين عزلة الخميرة والخميرة التجارية مع المصل المضاد

استعمل فحص الانتشار المناعي المزدوج لعزلة الخميرة المحلية والخميرة التجارية مع المصل المضاد لعزلة خميرة Y1 (الشكل 2) وذلك للكشف عن العلاقة المناعية بين العزلة المحلية والخميرة التجارية مع المصل المضاد، إذ يلاحظ وجود تفاعل مناعي مشترك (Cross reaction) بين الأنموذجين مع ذلك المصل وهذا يشير إلى امتلاك خميرة *S. cerevisiae* Y1 لنفس المحددات المستضدية على الرغم من اختلاف مصدر العزل والبيئة التي تعيش فيها.



شكل (2): العلاقة المناعية بين عزلة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* Y1 وخميرة الخبز التجارية (اختبار الانتشار المناعي المزدوج).

عزل وتشخيص البكتريا المرضية

تم الحصول على 9 عزلات بكتيرية من عينات لبراز الأطفال دون سن الخامسة والمصابين بالإسهال الدموي والمائي الحاد، وقد تم تثبيت الصفات الزرعية للمستعمرات وكذلك الصفات المجهرية للخلايا البكتيرية ومن ثم تشخيصها باستعمال جهاز Vitek2 compact system، وقد تبين من خلال النتائج ان 4 عزلات منها تعود لبكتريا *Escherichia coli* و3 لبكتريا *Salmonella typhimurium* و2 لبكتريا *Shigella flexneri* وكما هو مبين في (الجدول 3).

جدول (3):عدد عزلات البكتريا المعوية المعزولة من عينات لبراز الأطفال دون سن الخامسة والمصابين بالإسهال الدموي والمائي الحاد.

العزلات البكتيرية المرضية	العدد	النسبة (%)
Escherichia coli	4	44.44
Salmonella typhimurium	3	33.33
Shigella flexneri	2	22.22
المجموع	9	100≈99.99

التأثير التثبيطي لراشح خلايا الخميرة

قدر التأثير التثبيطي لراشح خلايا خميرة *S. cerevisiae* Y1 المعزولة محليا من البرتقال باستعمال طريقة الانتشار بالحفر، وبينت النتائج المستحصل عليها (الجدول، 4) التأثير التثبيطي 100 مايكرولتر (1ملغم/ مللتر) من راشح خلايا هذه الخميرة تجاه البكتريا المرضية قيد الدراسة.

جدول (4)
التأثير التثبيطي لراشح خلايا خميرة *S. cerevisiae* Y1 تجاه البكتريا المرضية المعوية.

العزلات البكتيرية المرضية	قطر مناطق التثبيط (ملم)
Escherichia coli	21
Salmonella typhimurium	18
Shigella flexneri	16

يلاحظ من النتائج المشار اليها في اعلاه قدرة راشح خلايا خميرة *S. cerevisiae* Y1 المعزولة محليا من البرتقال على تثبيط البكتريا المرضية المعوية المسببة للاسهال، اذ بينت الدراسات ان خميرة *S. cervisiae* لها القدرة في انتاج مواد بروتينية تعمل في تثبيط البكتريا المرضية (Alsoufi *et al.*, 2017a)، ويعود السبب في تباين استجابة البكتريا للتثبيط بوساطة راشح الخميرة الى الاختلاف في عدد مستقبلات السم الموجود على الجدار الخلوي لتلك البكتريا (Aziz *et al.*, 2014b)، وذلك يتفق مع ما تم الاشارة اليه من قبل تبريره من قبل Lessard *et al.* (2009) الذي تمكن من استعمال راشح الخميرة بنجاح ضد بكتريا *E. coli* O157، وعلل تلك الفعالية الى ان المواد المثبطة الموجودة في الراشح تعمل على تغليف السموم الجرثومية وتمنع وصولها الى المستقبلات في الخلايا المعوية، واكد Etienne-Mesmin *et al.* (2011) ان لراشح خميرة الخبز القدرة على معالجة بكتريا *E. coli* O157 من خلال منع البكتريا من الالتصاق على الخلايا المعوية ومعادلة السموم التي تنتجها، كما وأكدت دراسات عدة تلك الفعالية للمواد المثبطة المنتجة من قبل الخميرة وقدرتها في تثبيط مسببات الإسهال والعمل على تقليل عدد مستقبلات السموم في الأمعاء فضلا عن انواع البكتريا الاخرى المسببة لتلف وفساد الاغذية (Alsoufi and Aziz, 2022; Alsoufi and Aziz 2017b; Aziz *et al.*, 2014a; Badia *et al.*, 2012)، ويتضح مما تقدم ان لخميرة *S. cervisiae* فعالية تثبيطية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام، وقد يعزى ذلك الى قدرتها على أنتاج مواد مثبطة ذات طبيعة بروتينية حامضية قاتلة شبيهة بالبكتريوسينات التي تفرزها البكتريا ذات فعل متخصص في تحطيم أغشية البلازما للخلايا الحساسة مسببة في فقدان محتوياتها الخلوية فضلا عن تثبيط انتقال الأحماض الامينية، وقد يعزى التأثير التثبيطي للخميرة من خلال انتاجها للسموم القاتلة التي تثبط نمو البكتريا الاختبارية، وان أقطار مناطق التثبيط تتناسب طرديا مع تركيز المستخلص اذ تزداد أقطار التثبيط بازدياد تركيز المستخلص (Hamel *et al.*, 2020; Aziz *et al.*, 2014a; Qamar *et al.*, 2001).

المصادر

Al-Obiday, H. M. and Al-Soufi, M. A. (2009). Production of glucose-6-phosphate dehydrogenase from locally isolated yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC1 2-isolation, screening and identification. *Iraq Journal of Agricultural Research.* 14(4): 124-133.

Al-Soufi, M. A. and Al-Obiday, H. M. (2007a). Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) that purified from locally isolated yeast *Saccharomyces cerevisiae* Sc1. *Journal of Tikrit University for Agricultural Sciences.* 7(1): 13-30.

Al-Soufi, M. A. and A-Obiday, H. M. (2007b). Production of glucose-6-phosphate dehydrogenase from locally isolated yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC1 1-optimization of enzyme production conditions. *Iraq Journal of Agricultural Research*, (Special Issue). 12(4): 131-142.

Alsoufi, M. A. and Aziz, R. A. (2017a). Extending shelf life of fruits by using some microorganisms biological products. *International Journal of Molecular Biology: Open Access.* 2(5): 00032.

Alsoufi, M. A. and Aziz, R. A. (2017b) Use killer toxin extracted from bakery yeast for extending shelf life of fruits. *Pakistan Journal of Biotechnology.* 14(1): 23-27.

Alsoufi, M. A. and Aziz, R. A. (2022). Use of biopreservation technique to increase shelf life for some types of meat. *Bioscience Research.* 19(2): 1133-1138.

Aziz, R. A., Al-Soufi, M. A. and Ateia, A. M. (2014a). Purification and determination of some proteins inhibitors properties that produced from bakery yeast and study their activity against some types of bacteria that cause diarrhea. 1st International Scientific Conference, Cihan University. Erbil-Kurdistan Region, Iraq.

Aziz, R. A., Al-Soufi, M. A. and Ateia, A. M. (2014b). Study of bakery yeast extract activity on some enteric bacteria that isolated from some hospital in Baghdad city. *Journal of the College of Basic Education*. 20(82): 143-166.

Badia, R., Brufau, M. T., Guerrero-Zamora, A. M., Lizardo, R., Dobrescu, I., Martin-Venegas, R., Ferrer, R., Salmon, H., Martinez, P. and Brufau, J. (2012). β-Galactomannan and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* modulate the immune response against *Salmonella enterica* serovar typhimurium in porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(3): 368-375.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.

Boekhout, T. and Kurtzman, C. P. (1996). *Principles and Methods Used in Yeast Classification and an Overview of Currently Accepted Yeast Genera*. *In Nonconventional Yeast in Biotechnology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.

Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J. M., Alric, M. and Blanquet-Diot, S. (2011). Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157: H7 in a dynamic

gastrointestinal model. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(3): 1127-1131.
Garvey, J. S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. (1977). *Methods in Immunology*. 3rd., Banjamin, Inc., London.
Goldman, E. and Green, L. H. (2015). *Practical Handbook of Microbiology*. 3rd ed., Taylor and Francis Group.
Gupta, S. (1996). *The Short Text Book of Pediatrics*. 7th ed., Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
Hamel, A. H., Salman, J. A. and Aziz, R. A. (2020). Study the inhibition activity of purified bacteriocin from local isolation *Lactococcuslactis* ssp. *lactis*against some pathogenic bacterial species isolated from clinical samples. *Iraqi Journal of Market Research and Consumer Protection*. 12(2): 34-49.
Hu, Y., Zhu, Z., Nielsen, J. and Siewers, V. (2019). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* cells for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Open Biology*. 190049.
Johnstone, A. P. and Thorpe, R. (1982). *Immunochemistry in Practice*. Blackwell Scientific Publications. USA.
Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. North Holland Pub. Co. Amsterdam .
Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., Matte, J. J., Goulet, J. and Fairbrother, J. M. (2009). Administration of pediococcus acidilactici or *Saccharomyces cerevisiae* boulardii modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *Journal of Animal Science*. 87: 922-934.
Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69(2): 262-291.
Qamar, A., Aboudola, S., Warny, M., Michetti, P., Pothoulakis, G., Lamont, J. T. and Kelly, C. P. (2001). *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immunorespons to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infection and Immunity*. 69(4): 2762-2765.
Skipper, N. and Bussey, H. (1977). Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *Journal of Bacteriology*. 129(2): 668-677.
Walker, G. M. (1999). *Yeast Physiology and Biotechnology*. 3rd ed., John Wiley and Sons, Inc. New York.
Wang, Z., Qi, X., Ren, X., Lin, Y., Zeng, F. and Wang, Q. (2025). Synthetic evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for biomanufacturing: Approaches and applications. *mLife*. 4(1): 1-16.

Using immunological relationship to identify the species and genus of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from local fruits and evaluating the effectiveness of its crude extract against some types of pathogenic bacteria

Raghad Akram Aziz
Department of Science, College of Basic Education, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq.
ragaad.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

Abstract
Five yeast isolates were obtained from spoiled fruits and subjected to multiple purification processes until their purity was confirmed microscopically. Then, they were subjected to primary screening to identify the isolates with high growth density. The results showed that isolate (Y1) were distinguished by observing the growth density on the medium used with different incubation temperatures. To diagnose the selected isolate obtained from the primary screening stage, tests related to phenotypic, cultural, physiological, and biochemical characteristics were conducted, all of which showed that isolate Y1 belonged to *Saccharomyces cerevisiae*, as the results obtained matched several scientific references (diagnostic keys) in this field. The results of yeast diagnosis using the Vitek device also showed that the isolate under study belongs to *S. cerevisiae*. The immunodiffusion test of the yeast isolate showed that Y1 and its antiserum have an immunological relationship, as it was noted that the titer of the antiserum to the yeast isolate was (8/1). Cross-reactivity was observed between the local yeast isolate Y1 and the commercial yeast with the antiserum to the Y1 yeast isolate, which indicates the identity of the antigenic determinants between both the local yeast Y1 and the commercial yeast. The results also showed the presence of inhibitory activity of the local yeast filtrate Y1 against pathogenic enteric bacteria isolated from stool samples of children under five years of age who were infected with acute bloody and watery diarrhea, as the diameters of the inhibition zone for 100 µL (1 mg/mL) of the filtrate of these yeast cells reached 21, 18, and 16 mm for each of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Shigella flexneri*.

Keywords: Inhibition activity, killer toxins, pathogenic bacteria, Saccharomyces cerevisiae, yeast isolation and identification.