عزل *Saccharomyces boulardii* من ثمار المانغستين(*Garcinia mangostana* L.) وتشخيصها جزيئيا ودراسة مقدرتها على خفض مستوى الكوليسترول وتثبيط بكتريا *E. coli 0157:H7*

د.عامر عبد الرحمن الشيخ ظاهر د. ماجد حسين الجيلاوي *رحيم عناد خضير الزيادي

كلية الزراعة/ جامعة بغداد كلية التقانات التطبيقية/ جامعة النهريين كلية العلوم الصرفة/ جامعة المثنى

***البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث**

المستخلص

أجريت هذه الدراسة لتقييم مقدرة المعزز الحيوي *Saccharomyces boulardii* بعد عزله من ثمار المانغستين وتشخيصها جزيئيا باستعمال بوادئ متخصصة تستهدف التسلسل النوعي الخاص بالمنطقة البينية الفاصلة (ITS) للجين الرايبوسومي 5.8S rRNA على خفض مستوى الكوليسترول في الوسط المحور وتثبيط بكتريا*E. coli 0157:H* ، 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 كريمي لزج، بلغ متوسط حجمها 1–2 مليمتر عند تنميتها في درجة حرارة37م لمدة 24 ساعة، وتمتلك خلايا *S. boulardii* أشكالا بيضوية، او شبه كروية متبرعمة أحيانا، مفردة او متقاربة في تجمعات. استخلص الدنا المجيني من العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1* و*SbC2* 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. وأظهرت العزلة المحلية*SbR7* و العزلة التجارية*SbC2* فعالية في خفض نسبة الكولسترول في مدتي الحضن24 و 48 ساعة في درجة حرارة37 م، اذ بلغت النسبة 23.89،21.69% و53.90،49.47% وعلى التوالي. كما أظهرت العزلة*SbR7* والعزلة التجارية *SbC2*فعالية تثبيطية اتجاه بكتريا *E. coli 0157:H7* اذ بلغ قطر هالة التثبيط 18 ملم لكليهما.

المقدمة

المعزز الحيوي *S. boulardii* سلالة خميرة استوائية متحملة للحرارة غير مرضية للإنسان اذ سجلت ضمن قائمة GRAS للأحياء المجهرية الامنة الاســـتعمال (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 استعمال 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 طرق معتمدة دوليا (Pommerenke *et al.*, 2010).

يرتبط المستوى العالي للكولسترول في بلازما الدم مع خطر الإصابة بأمراض القلب والشرايين فضلا عن سرطان القولون، وقد أدى الوعي الصحي الغذائي لدى المجتمعات الى التركيز على الجوانب الصحية في الاغذية والاهتمام بالمنتجات الغذائية المدعمة بالمعززات الحيوية لأثارها الايجابية (Syal and Vohra., 2013). ان خفض 1% من مستوى الكولسترول يمكن ان يخفض امراض الشرايين بمستوى 2-3 % (Pereira and Gibson, 2002). وقد تعزى فعالية خفض الكولسترول الى استهلاكه خلال النمو والبناء (Dilmi- Bouras, 2006).

وتعد الفعالية التثبيطية اتجاه الاحياء المجهرية المرضية الانتهازية التي تخترق الغشاء المعوي من مميزات المعززات الحيوية العلاجية سيما حقيقية النواة (*S. boulardii*) . (Boirivant and Strober, 2007). فيما ذكر Etienne-Mesmin *et al.*, (2011) ان بكتريا *E.coli* O157: H7 تنتج سموم الفيرو المشتق من كون هذه السموم تسبب تأثيرات إمراضيه خلوية على خلايا الفيرو المشتقة من كلية القرود الخضراء الافريقية وقد يطلق عليها المنتجة لسموم الشيكا لتطابق سمومها الخلوية من الناحية التركيبية البنائية والمناعية مع سموم الشيكا المنتجة من بكتريا *Shigella dysenteria* ذات النمط لمصلي 1، فضلا مقدرتها على الارتباط الوثيق للخلايا الطلائية المعوية لذا ارتبطت هذه البكتريا بحالات تفشي اوبئة كثيرة ومن الامراض المرتبطة بها وأوضح الفعالية التضادية المباشرة لخلايا*S. boulardii* اتجاه البكتريا المعوية *E. coli* في ظروف محاكاة للجهاز الهضمي للإنسان واشار الى ان استخدامها يحد من بكتريا *E. coli* O157:H7 التي تصل الى الأمعاء الدقيقة والقولون.

طرائق العمل

عزلت *S. boulardii* من ثمار المانغستين 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) المعقم في درجة حرارة 121م وضغط 1.5جو لمدة 15 دقيقة 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 السابروويد (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 السابروويد الصلب للتأكد من نقاوتها قبل الاختبارات المجهرية (Neelayadatchi *et al.*, 2012).

استخدم وسط السابروويد(SD) الصلب لتحديد خواص العزلة المظهرية وذلك بتلقيحه بعالق خلايا الخميرة وحضن في درجة حرارة37م 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 والمجهرية.

التشخيص الجزيئي لعزلات *S. boulardii*

عزل الدنا المجيني باستعمال عدة الاستخلاص i-genomics CTB DNA Extraction Mini kit وحسب ما ورد في تعليمات الشركة المجهزة (intron Korea).

قيس تركيز ونقاوة الدنا المستخلص قبل عملية التضخيم وفق المعادلة الاتية:

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

تركيز DNA نانوغرام/مايكروليتر =الامتصاص الضوئي(260 نانوميتر)× 50 مايكروغرام/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 في درجة حرارة94 م لمدة 5 دقائق لفك ارتباط شريطي الدنا القالب تبعتها 35 دورة تضمنت ثلاث مراحل أولها إعادة المسخ في كل دورة في درجة حرارة94 م لمدة 60 ثانية ثم مرحلة ثانية تسنح لارتباط البادئ بالتسلسل المكمل له في درجة حرارة55 م لمدة 60 ثانية والمرحلة الثالثة تمثل بدء عملية تضخيم التسلسل المستهدف في درجة حرارة72 م لمدة 60 ثانية بعد ذلك دورة واحدة لمدة 5 دقائق في

درجة حرارة72 م للاستطالة النهائية وأخيرا دورة واحدة في درجة حرارة15 م لمدة 5 دقائق لإكمال التضخيم. حملت نواتج PCR على هلام الأكاروز. ولتحديد تعاقبات القواعد النيتروجينية في نواتج تفاعلات تضخيم السلسلة للمنطقة البينية للعزلات، نقيت نواتج التضخيم وارسلت الى شركة (BIONEER) الكورية لغرض اجراء فحص معرفة التعاقب الخاص بالدنا. حللت التعاقبات المحصل عليها 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.

تخفيض الكولسترول *Reduction of cholesterol*

اختبرت مقدرة العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين(*SbC1* شركة *Biocodex* الامريكية و *SbC2* شركة *Nutri cology* الامريكية) على خفض الكولسترول بتلقيح الوسط السائل المحور (من قبلنا)المكون من 50% YPDو50 % بلازما الدم المحتوي على 235 mg /dL كولسترول بالعزلات(1% حجم / حجم)، وتم الحضن في درجة حرارة37 م لمدة 24 ساعة، نبذ الوسط بعد 24 و48 ساعة بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة. واتبعت الطريقة التي اوردها Khan *et al.* (2009) في تقدير مستوى الكولسترول في الوسط المحور (طريقة لونية إنزيمية Enzymatic Colorimetric Method) وباستعمال العدة ECCH-100 المجهزة من شركة BioAssay Systems– الولايات المتحدة الأميركية .

تثبيط بكتريا *Escherichia coli 0157:H7*

اجري الاختبار طبقا لما اوردة Santina *et al.* (2009) أذ زرعت العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين بشكل خط عمودي على وسط الاكار المغذي 2% كلوكوز (المحضر بإذابة 2.3 غم من الاكار المغذي(شركة Hi-Media الهندية) و2 غم كلوكوز في 100 مل ماء مقطر) وحضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 72 ساعة، زرعت في اليوم الثالث بكتريا *Escherichia coli 0157:H7* بشكل خط عمودي على خط نمو العزلات واعيد الحضن في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وقيست مناطق التثبيط.

النتائج والمناقشة

استعملت ثمار المانغستين (*Garcinia mangostana* L.) مصدرا للعزل (شكل1) بعد ان زرعت نماذج العزل على الوسط YPD السائل ، كررت عملية تلقيح الوسط السائل بعالق العزلات وإعادة نشر العالق بعد حضنه في الظروف الملائمة لنمو *S. boulardii* على الوسط الصلب YPD لضمان الغربلة التي تمكن من الحصول على عزلات نقية.

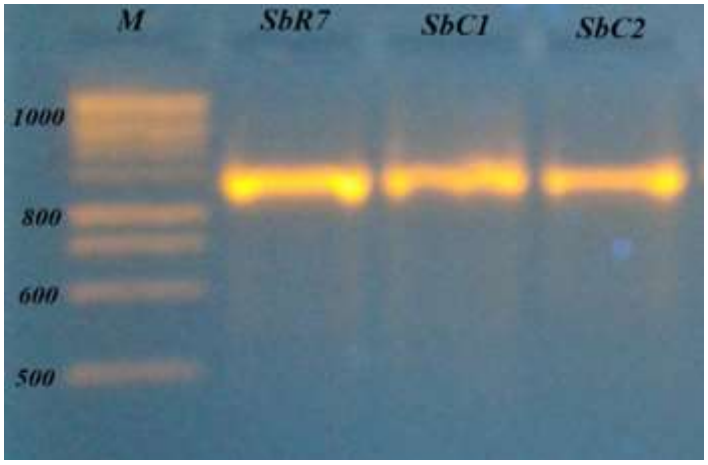
شكل (1) مقطع عرضي لثمرة المانغستين

أظهرت العزلة المحلية SbR7 والعزلتين التجاريتين 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، بلغ متوسط حجمها 1–2 مليمتر عند تنميتها في درجة حرارة37 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 *Saccharomyces boulardii*

التشخيص الجزيئي

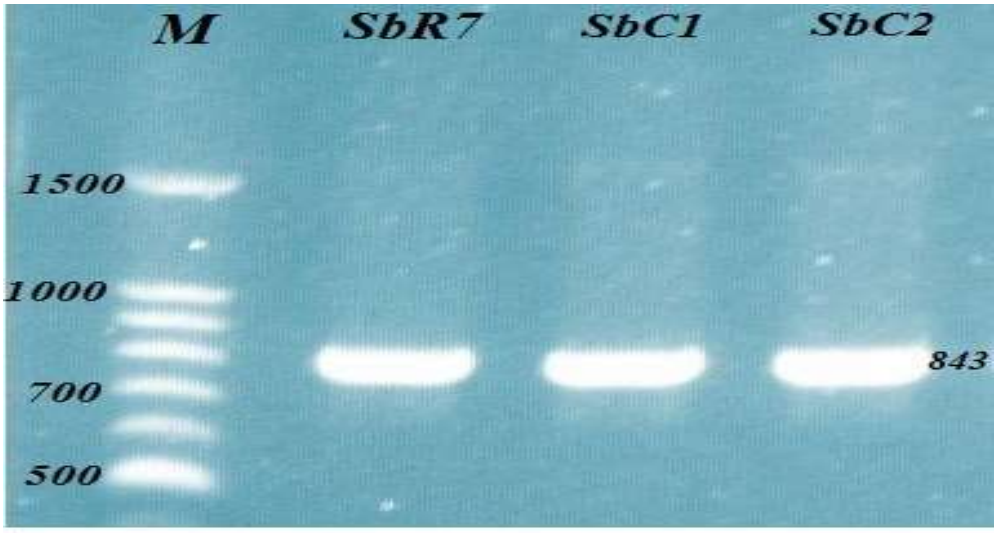
أجريت عملية استخلاص الدنا للعزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين بنجاح، أذ بلغ تركيز الدنا المستخلص 10.1 ، 9.9 و 11.5 نانوغرام /مايكروليتر وعلى التوالي فيما بلغت النقاوة 1.85 ، 1.78 و 1.88 وعلى التوالي. ومن قيم التركيز والنقاوة يتبين ان الدنا المستخلص من العزلات كان بنقاوة كافية لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة 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).

يظهر الشكل (2) الترحيل الكهربائي للدنا باستعمال وحدة الترحيل الكهربائي الافقي نتائج مماثلة أذ ظهر دنا العزلات بشكل حزم واضحة.



شكل (2) 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 للسلالات المعزولة باستعمال البادئات التي تستهدف التسلسل النوعي للجين المحافظ 5.8S rRNA ضمن المنطقة البينية ITS بالاعتماد على البرنامج الموصوف من قبل Fietto, *et al* (2004). أظهرت نتائج استعمال البادئات ITS1 و ITS4 بعد الترحيل على هلام الأكاروز(الشكل 3) 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).



شكل (3) الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم القطع البينية ITS1 وITS4 من الجين5.8S Rrna العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1, SbC2* على هلام الأكاروز 2%، 5 فولت / سم،2 ساعة،M: يمثل الدليل الحجمي 100-1500 زوج قاعدة.

تعد 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 جـــدا 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 Aa Kuhle *et al*, 2003). اجري على نواتج التضخيم

تحليل التعاقبات بعد ان أرسلت الى شركة BIONEER الكورية الجنوبية (شكل 4). 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.

» *SbR7* – ITS1- forward

GCAGAGGAGGCTCCCCTTTTTAAACCGGGGTTCTTTTTGTTAGGCGAGAGCTAAGAGCCTTACTGGGGCCAGAA
GAATGAGTGGAGAAGCCCAGCGGGCCTGCGCTTTAATGGCGCGTAATGGCTAGGTTGGAGTTTCCTTCTTGGTA
TTCCAAAAGGGGAAAGATCTCTGTGCTTTTAATATACGACAAATAAAACCGTTTCAATACCACACATTGTGGAG
ATTCATATCTTTGCAACTTTTTCCTTGGGGATTCAAGCAATCGGGCCCCAGAGGGAACAGCCACCAACAAATTTA
TCTATTCATTTTATTTTTCTCAAAACCAAGAATTTTCGTAACTGGAAATTTCAAATATTAAAAACTTTCAACAGCG
TATCTCTTGGTTCCCGCACACATAAAAAACGCAGTGAAACGCCCCACATAATGAAAATTGCCGAATACCCAAAA
TCACGCATCCCCGACAAATCATTGAACCCCTTGATATTTCCTGGGGGCATGCCTCCGCGGAG

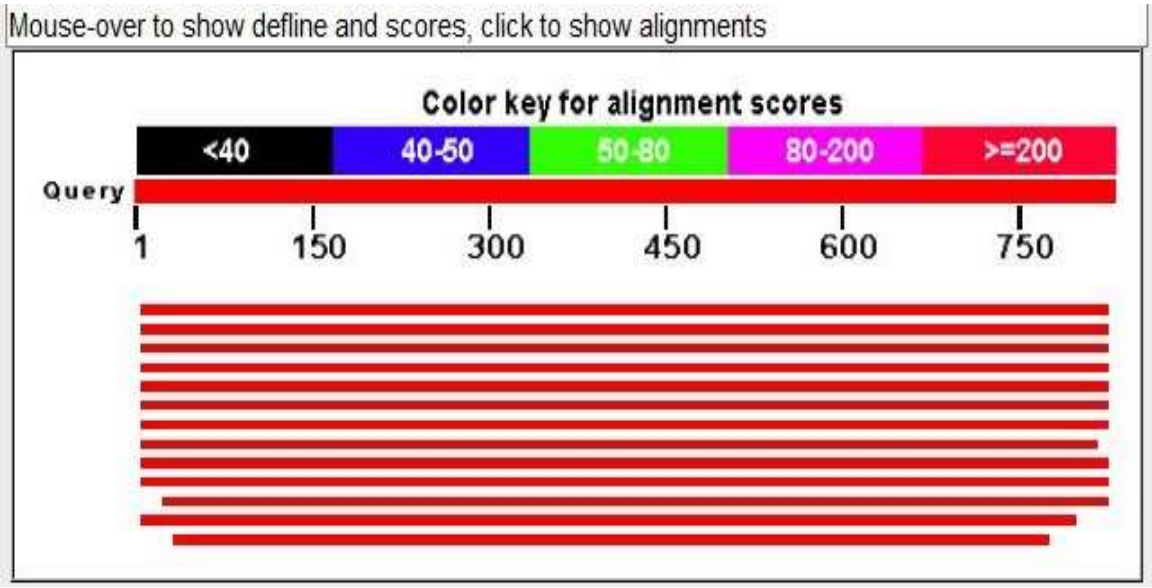
» SbR7 – ITS4- reverse

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

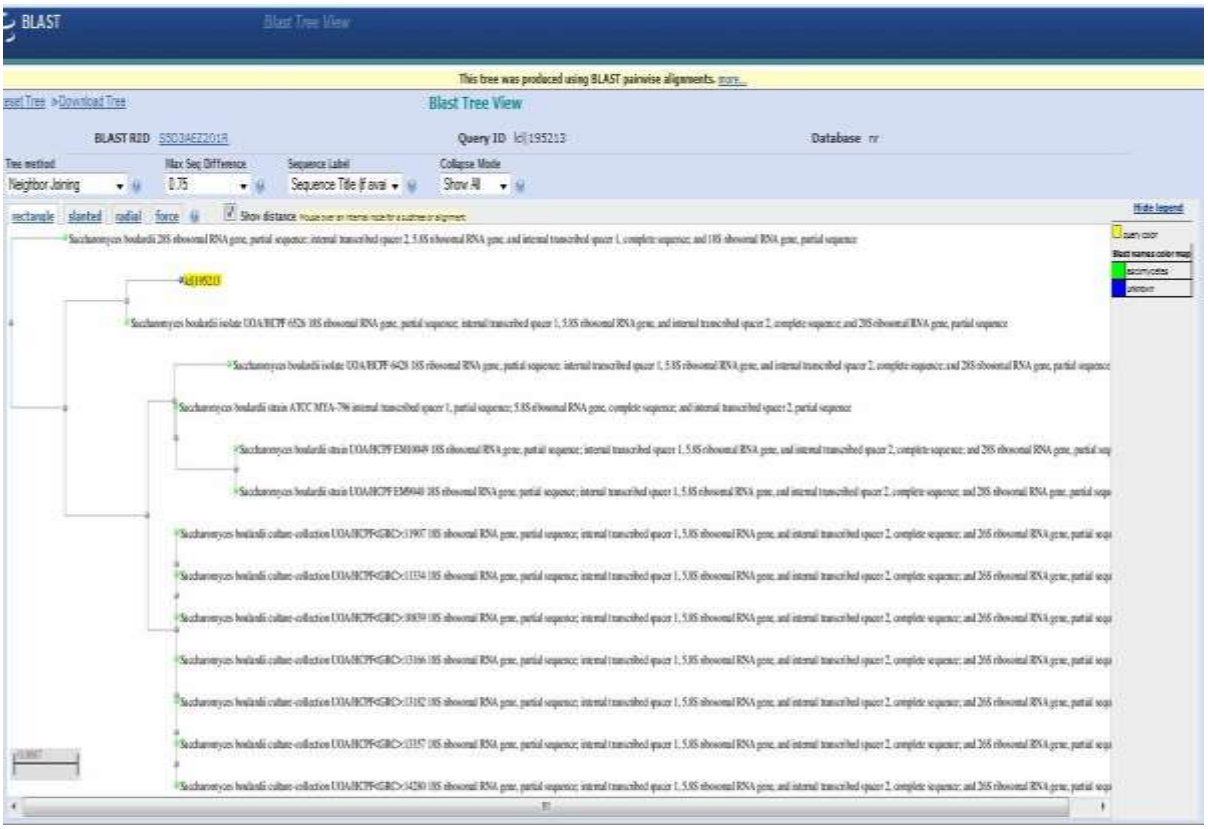
شكل (4) تسلسل القواعد النيتروجينية لناتج تضخيم المنطقة البينية ITS (ITS1،ITS4) ضمن الجين 5.8S rRNA للعزلة *SbR7*

قيمت نوعية التعاقبات الواردة، باستعمال CodonCode Alig. وعند 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 5). أذ بلغت نسبة التماثل الجيني 99% للمنطقة البينية المستهدف للعزلة *SbR7* مع سلالات *S. boulardii* القياسيةAY428861.1، KC254076.1 ،KC254077.1 ،KC254078.1،KC254079.1،KC254080.1،KC254081.1، JQ070086.1 و GQ376088.1 ،GQ376089.1،FJ4332912.1،AY42886.1،KC254075.1 ويبين الشكل (6) علاقة العزلة *SbR7* مع سلالات *S. boulardii* القياسية.

صنف McFarland(1996) *S. boulardii* 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*.



شكل(5) تماثل تعاقبات القواعد النيتروجينية للمنطقة البينية ITS1 و ITS4 للجين 5.8S rRNA للعزلة *SbR7* مع تعاقباته في *S. boulardi* في بنك الجينات



شكل (6) العلاقة بين العزلة *SbR7* وسلالات *S. boulardii* القياسية المتوافرة في بنك الجينات

تخقيض الكولسترول

أظهرت النتائج شكل (7) تفاوتا في مقدرة العزلات على استهلاك وتخفيض مستوى الكولسترول في الوسط المحور YPD-Plasmaتبعا للعزلة ومدة الحضن وأظهرت العزلة التجارية *SbC1* افضلية في نسبة تخفيض الكولسترول خلال مدة الحضن 24 ساعة، أذ بلغت نسبة التخفيض 23.89 % مقارنة بالعزلة المحلية *SbR7* والعزلة التجارية *SbC2* أذ بلغت النسبة المئوية لتخفيض الكوليسترول لهما 21.69 و19.30% وعلى التوالي. فيما أظهرت العزلة المحلية افضلية في خفض نسبة الكولسترول في مدة الحضن 48 ساعة في درجة حرارة37 م، اذ بلغت النسبة 53.90 % مقارنة بالعزلتين التجاريتين *SbC1* و*SbC2* اللتان بلغت نسبة التخفيض لهما 49.47 و52.72 % وعلى التوالي. وتعد هذه النتائج واعدة أذا ما علمنا ان خفض 1% من مستوى الكولسترول يمكن ان يخفض امراض الشرايين بمستوى 2–3 % (Pereira and Gibson, 2002). وقد تعزى فعالية خفض الكولسترول الى استهلاكه خلال النمو والبناء (Dilmi-Bouras, 2006). وأشار Kourelis *et al.* (2010) الى ان تركيز الكولسترول او الاشكال المختلفة للكولسترول الذائب المستعملة في الفحوصات المختبرية قد تؤثر في قابلية استهلاك*S. boulardii*

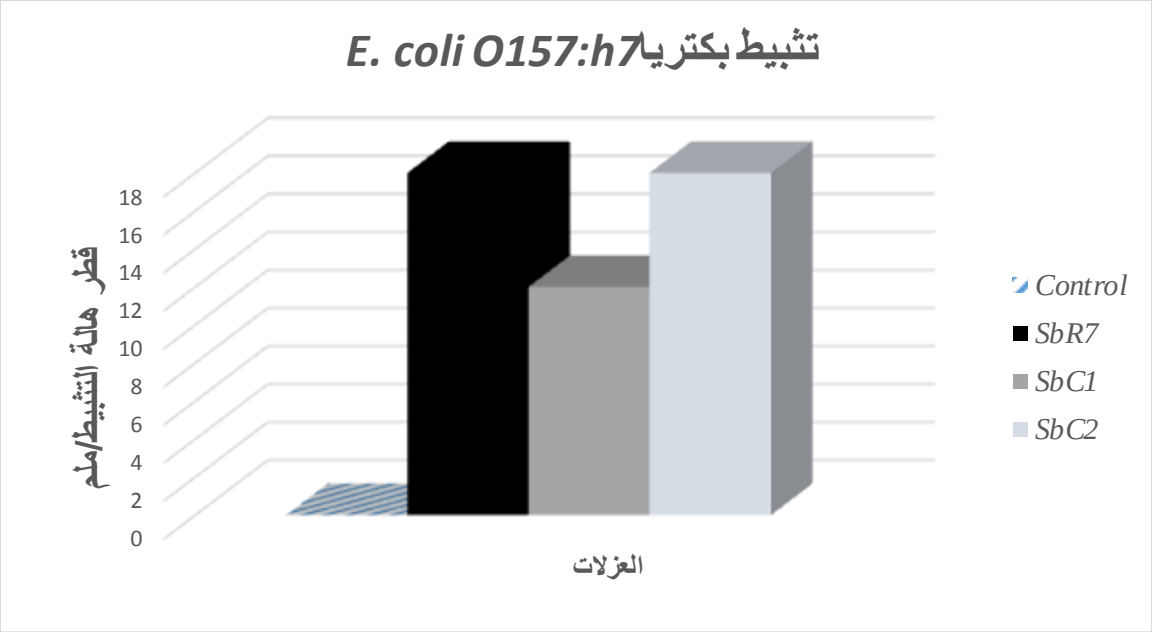
للكولسترول، وأضاف ان دراسة قابلية *S. boulardii* على خفض الكولسترول تظهر جلية في الدراسات البحثية في الأنظمة الحية.

شكل (7) النسبة المئوية لتخفيض الكولسترول للعزلة المحلية والعزلتين التجاريتين في الوسط المحور (YPD-Plasma) بعد مدة حضن 24 و 48 ساعة في درجة حرارة 37م.

تثبيط بكتريا *Escherichia coli 0157:H7*

بينت النتائج في الشكل (8) ان العزلة *SbR7* والعزلتين التجاريتين *SbC1* و *SbC2* تمتلك فعلا تضاديا اتجاه البكتريا *E. coli O157:H7*. واظهرت العزلتان *SbR7* و *SbC2* افضل فعالية تضادية إذ بلغ قطر هالة التثبيط 18 ملم لكلاهما فيما بلغ قطر هالة التثبيط للعزلة التجارية *SbC1* 12 ملم. تعد الفعالية التثبيطية اتجاه الاحياء المجهرية المرضية الانتهازية التي تخترق الغشاء المعوي من مواقع مختلفة من مميزات المعززات الحيوية العلاجية سيما حقيقية النواة (*S. boulardii*) (Boirivant and Strober, 2007). ذكر Gedek (1999) ان جدار خلايا *S. boulardii* يظهر مقدرة للارتباط ببكتريا *Escherichia coli* وبكتريا*S. enterica* serovar Typhimurium المستوطنتين للأمعاء. فيما وضح Etienne-Mesmin *et al.* (2011) الفعالية التضادية المباشرة لخلايا*S. boulardii* اتجاه البكتريا المعوية *E. coli* في ظروف محاكاة للجهاز الهضمي للإنسان واشار الى ان استخدامها يحد من بكتريا *E. coli* O157:H7 التي تصل الى الأمعاء الدقيقة والقولون وبين آلية التضاد بما يلي:

- التنافس بين *S. boulardii* وبكتريا*E. coli* O157:H7 على المغذيات.
- التغير الذي تحدثه *S. boulardii* في الظروف الفيزيوكيميائية لبيئة الأمعاء.
- انتاج العوامل المثبطة مثل البروتيزات.



شكل (8) الفعالية التثبيطية للعزلات اتجاه بكتريا *E. coli* O157:H7

Isolate *saccharomyces boulardii* from mangsteen fruits (*Garcinia mangostana* L.), molecular identify and study its ability to reduce the level of cholesterol and inhibition of *E. coli* O157:H7 bacteria

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

Abstract

This study was conducted 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 its ability to reduce the level of cholesterol and inhibition of *E. coli* O157:H7. The results shown that colonies were with a round shape and colored white to creamy pale when grown at the solid SD and YPD media. They were convex smooth edges, sticky and averaged size of 1-2 mm when grown at 37 ˚C for 24 hours. Microscopic examine revealed that their cells an oval, or semi-spherical buds sometimes, single or close

in clusters. 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 BLASTn program. Results revealed, this isolate was almost genetically identical (99%) with *i* standard *S. boulardi* strains. The ability in cholesterol reduction in modified culture media during 24 and 48 hrs. of incubation is shown by *SbR7* and *SbC1* isolates and the reduction percentages were 21.69, 23.89% and 53.90, 49.47% respectively. Isolates *SbR7* and *SbC2* shown antagonistic activity toward *E. coli O 157:117*, in which inhibition zone was 18 millimeter for booth.

المصادر:

- **Boirivant, M., and Strober, W.(2007).** The Mechanism of Action Probiotic. Curr Opin Gastroenterol. 2007 Nov;23(6):679-92.
- **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.
- **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.
- **Dilmi-Bouras, A. (2006).** Assimilation (*in vitro*) of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 13: 49-53.
- **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
- **Etienne-Mesmin, L.; Livrelli, V.; Privat, M.; Denis, S.; Cardot, G.; 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, Feb. 2011, p. 1127–1131.
- **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.
- **Gedek, T.(1999).**Adherence of *Escherichia coli* serogroup 0 157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. Mycoses. 42(4):261-4.
- **Green, R. M. and Sambrook, J. (2012).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition. CSHL Press.
- **Khan, A.; Gallo, R.M.; Renukaradhya, G.J.; Du, W.; Gervay-Hague, J. and Brutkiewicz. R.R. (2009).** Statins Impair CD1d-Mediated Antigen Presentation through the Inhibition of Prenylation Masood. J. Immunol. 182: 4744 – 4750.
- **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.
- **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.
- **Pereira, D.I. and Gibson, G.R. (2002).** Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* Isolated From The Human Gut. J. Appl. & Environ. Microbiol. 68, 9: 4689–4693.
- **Pommerenke, C.; Musken, M.; Becker, T. and Dotsch, A. (2010).** Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas aeruginosa* .Plos. Pathog.6 : 1-8.
- **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
- **Santina, M.; Luigi, M.; Consolazione, M.; Vivia, B.; Renato, F. and Angelina L.(2009).**Antagonistic interaction between psychrotrophic cultivable bacteria isolated from Antart Antartic sponges: A preliminary analysis. Res Microbiol; 160: 27-37.
- **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.; 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.