Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 1, 2021 (191-202)

Diagnosis of Local Isolates of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Biochemical Methods

Haitham A. Aljader [*1], Zena W. Al-jader [2]

[1, 2] Department of Biology, College of Education for pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [1*] haithamaljader@gmail.com, [2] dr.zena.algader@uomosul.edu.iq

(Received July 30, 2020; Accepted October 18, 2020; Available online March 01, 2021)

DOI: 10.33899/edusj.2020.127840.1096, © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

In this study 10 local isolates of yeast *Saccharomyces* were obtained from the local markets of Mosul. The Isolates were diagnosed by morphological and cultural characters in addition to biochemical tests. the results of the tests showed that they belong to the *Saccharomyces cerevisiae* type. Local isolates were tested for resistance to 8 different types of antibiotics and 5 salts of heavy metals. all isolates were resistant to each of Chloramphenicol, Ampicillin, Tetracycline and Streptomycin at 100%. As for the Erythromycin antibiotic most of the local isolates were resistant except for the isolates (SY4, SY5, SY6) As well as Amoxicillin all isolates were resistant except for (SY4). While the isolates showed sensitivity to Nystatin at 80% and for Flagyl at 90%. The isolates also showed resistance to all Zinc chloride ($ZnCl_2$), Nickel chloride ($NiCl_2$) and Cobalt chloride ($CoCl_2$) at 100%, as for mercury chloride($HgCl_2$) all isolates were resistant except for (SY2) which showed sensitivity to it. sensitivity of the isolates was clear to Cadmium chloride $CdCl_2$ except for the isolates (SY3, SY9, SY10).

Key words: *Saccharomyces*, Biochemical test, Yeasts

تشخيص عزلات محلية من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بالطرق الكيموحيوية

هيثم عبدالاله الجادر و [2] زينة وجيه الجادر [*1]

قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل, الموصل, العراق

الخلاصة

تم في هذه الدراسة الحصول على 10 عزلات محلية من الخميرة *Saccharomyces* من الاسواق المحلية لمدينة الموصل. شخصت العزلات باستخدام الصفات المظهرية والزرعية بالاضافة الى الاختبارات الكيموحيوية واظهرت نتائج الاختبارات انها تعود الى النوع *Saccharomyces cerevisiae.* اختبرت مقاومة العزلات المحلية لـ 8 انواع مختلفة من المضادات الحيوية و 5 أملاح من المعادن الثقيلة وكانت جميع العزلات مقاومة لكل من كلورامفينيكول (Cm) ، امبسيلين (Ap) ، تتراسيكلين (Tc) والستربتوميسين (Str) وبنسبة 100% اما المضاد الحيوي ايرثروميسين (Ery) فكانت اغلب العزلات المحلية مقاومة باستثناء العزلات (SY6,SY5,SY4) وكذلك بالنسبة للمضاد الاموكسيلين (Am) كانت جميع العزلات مقاومة باستثناء العزلة (SY4). في حين ابدت العزلات حساسية للنيستاتين (Nys) وبنسبة 80% وللفلاجيل (Fla) 90%. اظهرت العزلات مقاومة لكل من كلوريد الزنك

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

($ZnCl_2$) ، كلوريد النيكل ($NiCl_2$) وكلوريد الكوبلت ($CoCl_2$) بنسبة 100% اما كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) كانت جميع العزلات مقاومة باستثناء العزلة (SY2) التي اظهرت حساسية له. كانت حساسية العزلات واضحة لكلوريد الكادميوم ($CdCl_2$) باستثناء العزلات (SY10,SY9,SY3)

الكلمات المفتاحية: *Saccharomyce scerevisiae* ، الاختبارات الكيميوحيوية ، الخمائر.

المقدمة

خميرة الـــ *Saccharomyces. cerevisiae* هي نوع من الفطريات وحيدة الخلية تعمل على تحليل السكر لتتغذى عليه وتنقسم مرة اخرى ، والخميرة مصدر غذائي مهم يحتوي على كمية كبيرة من البروتينات وكذلك الكثير من المعادن مثل الزنك ، الكروم ، الحديد و الالياف ولذا تم الاعتماد على الخميرة في اغراض اخرى غير الاطعمة عمليا المكتشف لطبيعة الخمائر هو العالم الفرنسي لويس باستور حيث ارجع ظاهرة التخمر في دراسته الى هذه الكائنات الصغيرة واثبت انه بدونها لا يحدث تخمر. تعود خميرة الخبز الى قسم الفطريات الكيسية الاولية Ascomycota والتي تنقسم الى رتب عديدة منها رتبة Saccharomycetales وتعرف هذه الرتبة بالفطريات الكيسية والتي تضم عائلة Saccharomycetaceae ومنها جنس الـــ *Saccharomyces*. ومن مميزات الخميرة ايضا ان لها القابلية للتعديل الوراثي وتستخدم هذه الخميرة بشكل دائم كنموذج في ابحاث الفطريات التي تشمل الوراثة الجزيئية او تحليل الحامض النووي الـــ DNA. جدار الخلية (cell wall) معقد التركيب حيث تتكون الطبقة الخارجية من المانان المختلط بالفسفور بدرجات مختلفة حسب نوع الخميرة ، الطبقة الوسطى تتكون من بيتا – كلوكان الذائب ، اما الطبقة الاخيرة فهي التي تعطي صلابة وشكل مميز لخلية الخميرة كما يحتوي الجدار ايضا على البروتينات ذات التركيب المعقد (1) ان جدار خلية الخميرة ليس مكونا خاملا فهو حصن تصنعه الخلية لنفسها ، كما ان مهمة جدار الخلية ليست مجرد تنفيذ لأوامر مكونات اخرى فعلى الرغم من ان الغشاء السايتوبلازمي للخلية هو الذي يتحكم في مرور المواد من والى الخلية الا ان جدار الخلية هو الذي يقرر ما اذا كان المنتج الخارج من الخلية يصل الى الوسط الخارجي او تبقى محجوزة في منطقة ما قبل البروتوبلازم (المنطقة بين جدار الخلية والغشاء السيتوبلازمي). اما من ناحية الاضرار التي تسببها الخمائر فان لها القدرة على التسبب في الكثير من الامراض عند توفر الفرصة لها ، علما ان الغالبية العظمى من الخمائر غير ممرضة. كما ان للخميرة *S. cerevisiae* القدرة على ان تستعمر السطوح المخاطية للإنسان مسببة العديد من الاصابات الفطرية في الاشخاص ضعيفي المناعة ، واهم ما يفرق السلالات المرضية لهذا النوع هو قدرتها على النمو بدرجة حرارة 42 م ويمكن ان تزداد الاصابة بها وتشتد ضراوتها اذا رافقت الاصابة وجود امراض اخرى. استخدمت الخمائر لإنتاج الايثانول بغرض استخدامه كوقود حيث ان تواجدها يعتبر ميسرا على مدار السنة، وعموما الخمائر المستخدمة لإنتاج الكحول تخضع لمعايير تعتمد على قدرتها للاستفادة من المواد الاولية ومعدل النمو ومعدل التخمير وقدرتها على النمو عند pH منخفض ودرجة حرارة مثلى ومدى مقاومتها للظروف الغير مناسبة وكذلك عدم وجود نواتج وسطية غير مرغوب بها (2).

اهداف البحث

ويهدف البحث على جمع عزلات من الخميرة من مصادر مختلفة وتشخيصها مزرعيا وكيموحيويا واختبار حساسيتها لعدد من المضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة.

مواد وطرائق العمل

جمع العينات: Samples Collection

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

تم جمع العينات من مصادر مختلفة من مدينة الموصل من الفاكهة التي تبدو عليها آثار التعفن على غلافها الخارجي وكذلك التي تعاني من تخمر داخلي ومنقوع الشعير (النخالة المضاف الى الطحين).

العزل والتشخيص Isolation and Identification

زرعت العينات على وسط Sabouraud Dextrose Agar (SDA) المحضر من 4 غم دكستروز (Dextrose) ، 1 غم ببتون (pepton) و1.7 غم اكار (Agar) ، اذيبت المكونات في 90 مل من الماء المقطر وضبط الـــ (pH) عند 5.6 ثم عقم بجهاز المعقام ، اذيب السكر في 10 مل من الماء المقطر وعقم بالترشيح، بعد ان برد الوسط الى 55 م° اضيف اليه السكر وصب في اطباق. وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 28 م° لمدة 48 ساعة. وشخصت بالاعتماد على المواصفات المظهرية والكيموحيوية.

كما استخدم وسط العزل Yeast Pepton Glucose agar (YPG) المحضر من 1 غم مستخلص الخميرة (yeast extract) ، 0.5 غم ببتون (pepton) ، 0.2 غم سكر الكلوكوز (Glucose) و 1.2 غم من الاكار (Agar). هذه المكونات اذيبت باستثناء سكر الكلوكوز في 90 مل من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني (pH) عند 7.2 وعقم الوسط ثم اذيب سكر الكلوكوز في 10 مل من الماء المقطر واضيف الى الوسط بعد ان عقم بالترشيح ، برد الوسط الى 50–55 م° وصب في اطباق بتري (3).

الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Testes

اختبار تخمر السكريات:

تم تحضير وسط التخمر بإذابة 4.5 غم مستخلص الخميرة (yeast extract) ، 7.5 غم ببتون (pepton) في 860 مل من الماء المقطر. اذيب 0.1 غم من صبغة المثيل الاحمر (Matheyl red) في 100 مل من الماء المقطر واخذ منه 40 مل واضيف الى باقي المكونات ، صب الخليط في دوارق مخروطية بواقع 90 مل لكل دورق ثم عقمت بالمعقام. تم اذابة 2 غم من كل سكر في 10 مل من الماء المقطر واضيف الى الدورق بعد تعقيمه بالترشيح. محتويات كل دورق صبت في انابيب اختبار معقمة ومعلمة برقم السكر والعينة بواقع 10 مل لكل انبوبة. تم استخدام 9 انواع مختلفة من السكر وهي (مالتوز ، رامينوز ، لاكتوز ، سكروز ، مانوز ، ارابينوز ، كلاكتوز ، كلوكوز وزايلوز). تم نقل مستعمرات نامية بعمر 48 ساعة حضانة الى الانابيب المعلمة برقم العينة ونوع السكر الحاوية على وسط التخمر ووضعت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 28 م° لمدة 10–12 يوم مع ملاحظة العينات كل 24 ساعة (4)

اختبار مقاومة وحساسية الخميرة المحلية للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة

لمعرفة مدى مقاومة وحساسية العزلات للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة تم استخدام وسط (YPG)، بعد ان برد الوسط الى درجة 55–60 م° تم اضافة المضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة المعقمة بالترشيح وبالتراكيز المبينة بالجدول (1). زرعت العينات بطريقة التخطيط وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 28 م° وسجلت النتائج(5).

الجدول (1): المضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة المستخدمة في دراسة حساسية عزلات الخميرة *S.cerevisiae*

المضادات الحيوية وأملاح المعادن الثقيلة	الرمز	المحلول الخزين مل/ملغم	التركيز النهائي مل/ميكروغرام	ألمذيب
كلورامفينيكول	Cm	5	100	كحول مطلق إيثانول
أمبيسيلين	Ap	20	100	إيثانول 70%
نيستاتين	Nys	5	50	DMSO
إيرثروميسين	Er	10	100	كحول مطلق إيثانول
أموكسيلين	Ax	5	100	ماء مقطر
تتراسيكلين	Tc	10	100	إيثانول 50%
ستربتوميسين	Str	20	100	ماء مقطر
فلاجيل	Fla	5	50	ماء مقطر

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	50	100	ماء مقطر
كلوريد الكادميوم	$CdCl_2$	50	100	ماء مقطر
كلوريد الزنك	$ZnCl_2$	50	100	ماء مقطر
كلوريد النيكل	$NiCl_2$	50	100	ماء مقطر
كلوريد الكوبلت	$CoCl_2$	100	100	ماء مقطر

اختبار تحلل النشأ

تم تحضير الوسط بإذابة 2.8 غم من الاكار المغذي (Nutrient Agar) و 0.3 غم من النشأ في 100 مل من الماء المقطر ثم عقم بالمعقام. بطريقة التخطيط زرعت العينات ، بعد 24 ساعة حضانة بدرجة حرارة 28 م° اخذت العينات للاختبار بإضافة بضع قطرات من محلول الايودين بدرجة حرارة المختبر. سجلت النتائج بعد مرور من 1-3 دقيقة من اضافة الايودين (6).

اختبار تحلل الجيلاتين

في 100 مل من الماء المقطر تم تحضير الوسط بإذابة 12 غم جيلاتين (Gelatin) ، 0.5 غم ببتون (pepton) و 0.3غم مستخلص لحم البقر (beef extract). عقم الوسط ثم صب في انابيب اختبار ووضعت بشكل مائل لكي تتصلب ، تم نقل المستعمرات النامية الى انابيب الاختبار وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 28 م°. في حالة تحلل الوسط توضع الانابيب في الثلاجة بدرجة 4 م° لنصف ساعة بعدها سجلت النتائج (7).

اختبار الكتاليز

اخذت المستعمرات النامية على وسط العزل (YPG) بعمر 48 ساعة وفرشت على شريحة زجاجية ثم اضيف اليها 1-2 قطرة من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز 3% وسجلت النتائج (8).

اختبار تحمل حامض الخليك الثلجي بتركيز 1%

حضر الوسط من اذابة 1 غم التربتون (Trypton) ، 1 غم مستخلص الخميرة (yeast extract) و2 غم اكار في 50 مل من الماء المقطر وعقم بالمعقام. كما تم اذابة 2 غم كلوكوز (Glucose) في 50 مل من الماء المقطر وعقم بالترشيح ، مزج الخليطان واضيف 1 مل من حامض الخليك الثلجي وصب في اطباق بتري (9) زرعت العينات على الاطباق وحضنت بدرجة 28 م° لمدة 48 ساعة بعدها سجلت النتائج.

اختبار انتاج الامونيا من اليوريا

تم استخدام وسط (Christensen's Urea Agar) والمحضر كالاتي في 90 مل من الماء المقطر تم اذابة 0.1 غم سكرالكلوكوز (Glucose) ، 0.1 غم ببتون (pepton) ، 0.5 غم ملح الطعام (NaCl) ، 0.2 غم فوسفات احادي البوتاسيوم (KH_2PO_4)، 0.0012 غم صبغة الفينول الاحمر (phenol red) و 2 غم اكار (Agar). ضبط الاس الهيدروجيني (pH) عند 6.8 ثم عقم. بعد ان برد الوسط تم اضافة 10 مل من محلول اليوريا بتركيز 20% والمعقم بالترشيح (10) ثم نقلت العينات الى الوسط وفرشت عليه وحضنت بدرجة حرارة 25 م° لمدة 5 أيام مع مراقبة العينات كل 24 ساعة وسجلت النتائج.

اختبار تأثير اختلاف درجات الحرارة على النمو

استخدم في هذا الاختبار وسط (SDA) اخذت العينات وزرعت بطريقة التخطيط على الوسط وحضنت بدرجات حرارية مختلفة هي 23 ، 28 ، 37 و 45 م° لمدة 48 ساعة بعدها سجلت النتائج.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

اختبار استهلاك الكحول كمصدر كاربوني

تم اجراء الاختبار باستخدام وسط (YPG) الخالي من السكر والمدعم بـــ 8% كحول اثيلي مطلق ، زرعت العينات بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 28 م° لمدة 48 ساعة بعدها سجلت النتائج (11).

اختبار تحمل اقصى اجهاد

نميت العزلات على اطباق بتري الحاوية على وسط (YPG) عند درجة حرارة 37 م° لـ 72 ساعة ، بعدها اخذت المستعمرات النامية وزرعت على وسط (YPG) المدعم بـ 8% كحول اثيلي مطلق وحضنت بدرجة 28 م° لمدة 72 ساعة ، المستعمرات النامية زرعت على وسط (YPG) والحاوي على 20% سكر الكلوكوز وحضنت تحت نفس الظروف السابقة بعدها اخذت المستعمرات النامية وزرعت على وسط (YPG) الحاوي على 20% سكر السكروز وحضنت بنفس الظروف وسجلت النتائج (12).

اختبار النمو على وسط خال من فيتامين الثايمين–HCl.

لإتمام هذا الاختبار حضر وسط MMA بأذابة 5 غم كبريتات الامونيوم ($(NH_4)_2SO_4$) ، 0.1 غم فوسفات احادي البوتاسيوم (KH_2PO_4) ، 0.05 غم كبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4$) و 20 غم اكار (Agar) في لتر من الماء المقطر واضيف اليه 5 مل من سكر الكلوكوز بتركيز 20% المعقم بالترشيح. زرعت العينات وحضنت بدرجة حرارة 25 م° لمدة 4 أيام. تم قياس كثافة النمو للخميرة النامية عند طول موجي 580 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer (13).

النتائج والمناقشة

تشخيص العزلات المحلية Diagnosis of Local Isolates

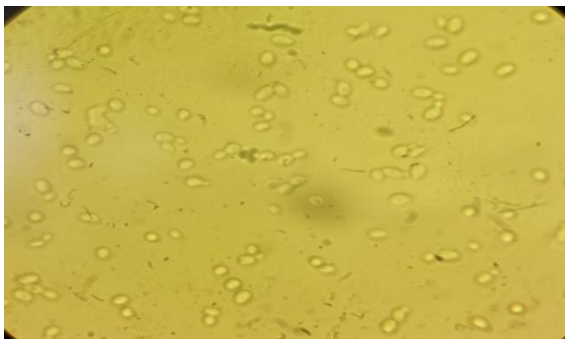
تم الحصول على 10 عزلات محلية من خميرة *S. cerevisiae* من بين 72 عزلة والتي تم عزلها من مصادر مختلفة من الفواكه والخضراوات وشخصت بشكل مبدئي بالاعتماد على الشكل الخارجي Morphology للمستعمرات ، فكانت المستعمرات بالوان متباينة ما بين الابيض والكريمي ذات حواف ملساء واسطح ناعمة لماعة ،يتراوح قطر المستعمرة ما بين (2–8) ملم، كما تعتبر رائحتها المميزة صفة مهمة في التشخيص المظهري من خلال ملاحظة المستعمرات النامية على وسط YPG بعمر 48 ساعة ، (شكل 1). وهذا ما توصل اليه Lathar *et al.* (14) من حيث الشكل الخارجي للمستعمرات وتباين الالوان عندما عزل 17 نوعا من الخمائر من انواع مختلفة من الفواكه وكذلك ماحصل عليه Mokhtari *et al.* (15) حيث شخصت 166 عزلة تعود الى اجناس مختلفة من الخمائر تم الحصول عليها من التفاح والحمضيات.

الشكل(1): الشكل المظهري لمزارع لعزلات المحلية للخميرة *S. cerevisiae*

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

التشخيص المجهري Microscopic Diagnosis

فحصـت عينات الخميرة المحلية باسـتخدام المجهر الضـوئي وبالقوة (10 ، 40 ، X100) ولوحظ فيها الخلايا الاحادية المفردة ، كروية او بيضوية الشكل كما امكن رؤية الخلايا المتبرعمة ، كما في الشكل (2).وهذا يطابق ما وصفه Hammo (16) من حيث شكل الخلايا الاحادية المفردة اضافة الى كونها موجبة لصبغة كرام.



الشكل (2): أشكال خلايا الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* تحت المجهر بقوة تكبير X 100

الاختبارات الكيموحيوية لعزلات الخميرة المحلية Biochemical tests of local Yeast isolates

بعد الحصول على العزلات المحلية للخميرة وتشخيصها من حيث الفحص المجهري والشكل الخارجي للمستعمرات تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية وكالاتي:-

اختبار تخمر السكريات Sugars fermentation tests

بينت النتائج ان جميع العزلات كانت قادرة على تخمير السكريات (كلوكوز ، سكروز ، مالتوز ، مانوز و كلاكتوز) وبنسبة 100% حيث تغير لون الوسـط من اللون الاحمر الى اللون الاصـفر دلالة على تخمر السـكر في حين لم تتمكن جميع العزلات وبنسـبة 100% من تخمير سـكر اللاكتوز. ان عدم قدرة العزلات على تخمير سـكر اللاكتوز تعتبر صـفة مميزة للخميرة *S. cerevisiae* وذلك بسبب غلق الاوبيرون operon او الجين المسؤول عن استهلاك سكر اللاكتوز او لعدم قدرتها على انتاج انزيم β –galactosidase والذي يعمل على تكسـير اللاكتوز الى كلوكوز و كلاكتوز لتتمكن الخميرة من اسـتهلاكه كمصـدر كاربوني (4) اما سـكر الزايلوز فكانت معظم العزلات قادرة على تخميره باسـتثناء العينات (SY4,SY3,SY2,SY1) وكذلك بالنسـبة لسـكر الرامينوز الذي تمكنت اغلب العزلات من تخميره ماعدا العزلات (SY10,SY3,SY2,SY1) في حين ان سـكر الارابينوز لم تتمكن العزلتين (SY4,SY1) فقط من تخميره بينما تمكنت بقية العزلات من ذلك. هذه النتائج تتفق مع ما توصـل اليه Mpofu *et al.* (17) عندما جمع 16 عزلة من الخميرة *S. cerevisiae* ووجد ان اغلب العزلات كانت قادرة على تخمير (الكلوكوز ، كلاكتوز ، سكروز و الرامينوز) وغير قادرة على تخمير اللاكتوز كما موضح في الجدول (2).

الجدول (2): قدرة عزلات الخميرة *S. cerevisiae* على تخمير انواع مختلفة من السكر

العينات	السكريات								
	مالتوز	رامينوز	لاكتوز	سكروز	مانوز	أرابينوز	كلاكتوز	كلوكوز	زايلوز
SY1	+	-	-	+	+	-	+	+	-
SY2	+	-	-	+	+	+	+	+	-
SY3	+	-	-	+	+	+	+	+	-
SY4	+	+	-	+	+	-	+	+	-
SY5	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

+	+	+	+	+	+	-	+	+	SY6
+	+	+	+	+	+	-	+	+	SY7
+	+	+	+	+	+	-	+	+	SY8
+	+	+	+	+	+	-	+	+	SY9
+	+	+	+	+	+	-	-	+	SY10

+ وجود نمو و– لا يوجد نمو

حساسية عزلات الخميرة *S. cerevisiae* للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة

Sensitivity of local Yeast isolates *S. cerevisiae* for Antibiotic and Heavy metals

اظهرت نتائج الجدول (3) تباين العزلات المحلية للخميرة في مدى مقاومتها للمضادات الحيوية فقد اظهرت العزلات مقاومتها لكل من كلورامفينيكول (Cm) ، امبسيلين (Ap) ، تتراسيكلين (Tc) والستربتوميسين (Str) وبنسبة 100% اما المضاد الحيوي ايرثروميسين (Ery) فكانت اغلب العزلات المحلية مقاومة باستثناء العزلات SY6, SY5, SY4 وكذلك بالنسبة للمضاد الاموكسيلين (Am) كانت جميع العزلات مقاومة باستثناء العزلة SY4. اما بالنسبة للمضادات الحيوية الفطرية فقد اظهرت العزلات حساسية للنيستاتين (Nys) عند التركيز النهائي 50 ميكروغرام / مل وبنسبة 80% من المجموع الكلي للعزلات المحلية باستثناء العزلتين SY8, SY3 وكذلك الحال بالنسبة للفلاجيل (Fla) حيث كانت نسبة حساسية العزلات المحلية 90% عند التركيز النهائي 50 ميكروغرام /مل. تعود قدرة النيستاتين لقتل الجراثيم او تثبيط نموها الى تفاعله مع الاغشية الخلوية مسببا اضرارا للخلية مما يؤدي الى تغيير في نفاذية الخلية الانتقائية ، اما بالنسبة لفعالية الفلاجيل فتعود لامتلاكه مجموعة nitro الخاصة بالميترونيدازول والتي تختزل كيميائيا بواسطة حوامل Ferrodoxin و Ferrodoxin–Linked metabolic process والناتج من تلك العملية هو المسؤول عن افساد التركيب الحلزوني للـ DNA وبالتالي احباط تصنيع الحمض النووي (5). في دراسة لـ Venables و Russel (18) اجريت على الخميرة لوحظ ان النيستاتين عند التركيز 5–10 ميكروغرام / مل يعمل كمبيد فطري للخميرة *S. cerevisiae* بينما بعض انواع العزلات المحلية كانت اكثر مقاومة للنيستاتين عند تركيز اكثر من 50 ميكروغرام / مل. وفي دراسة اخرى لـ Goldman (19) ذكر فيها ان الخميرة *S. cerevisiae* حساسة جدا لكل من النيستاتين والفلاجيل عند التركيز 50 ميكروغرام / مل عند عزل 16 عينة كانت واحدة منها فقط مقاومة للفلاجيل وثلاثة للنيستاتين.

كما يتضح من الجدول (3) ان جميع العزلات المحلية للخميرة*S. cerevisiae* كانت مقاومة لكل من كلوريد الزنك ($ZnCl_2$) ، كلوريد النيكل($NiCl_2$) وكلوريد الكوبلت ($CoCl_2$) بنسبة 100% وكذلك كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) كانت جميع العزلات مقاومة باستثناء العزلة SY2 التي اظهرت حساسية له. حساسية العزلات كانت واضحة لكلوريد الكادميوم ($CdCl_2$) باستثناء العزلات SY10, SY9, SY3 والتي ابدت مقاومة له وتمكنت من النمو في الوسط. ان وجود الكادميوم او املاحه في بيئة الخمائر يؤدي الى استثارة الاستجابة للحرارة او بيروكسيد الهيدروجين ، وهذه الاستجابة متخصصة جدا حيث ان هناك 32 جين يتم حثها عند المعاملة بالكادميوم والتي تساهم في تصنيع الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت واللازمة لتصنيع انزيم الكلوتاثايون Glutathione enzyme وهذا الانزيم يسيطر على تركيز العناصر بعملية الاقتناص او الاحتجاز (20) تتفق هذه النتائج مع Paulo (21) والذي جمع 52 عزلة كانت جميعها مقاومة لكلوريد الزنك والكوبلت وتتباين في مدى مقاومتها لكلوريد الرصاص ، وان 40 عزلة من اصل 52 كانت حساسة لكلوريد الكادميوم.بينما تتعارض مع ما ذكره Lee و Ueom (22) واللذان اشارا الى قدرة الخميرة *S. cerevisiae* على النمو في وسط حاوي على الكادميوم وبتركيز نهائي 60 ميكروغرام / مل بعد ان جمع 16 عزلة منها 15 عزلة كانت قادرة على النمو في الوسط.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

الجدول(3): حساسية العزلات المحلية للخميرة *S. cerevisiae* للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة

المضادات الحيوية وأملاح المعادن	الرمز	التركيز النهائي ug/ml	عزلات الخميرة قيد الدراسة									
			SY1	SY2	SY3	SY4	SY5	SY6	SY7	SY8	SY9	SY10
كلورامفينيكول	Cm	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
أمبسيلين	Ap	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
نيستاتين	Nys	50	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
إيرثروميسين	Ery	100	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
أموكسيلين	Ax	100	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
تتراسيكلين	Tc	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ستربتوميسين	Str	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
فلاجيل	Fla	50	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
كلوريد الزئبق	$HGCl_2$	100	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
كلوريد الكادميوم	$CdCl_2$	100	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
كلوريد الزنك	$ZnCl_2$	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
كلوريد النيكل	$NiCl_2$	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
كلوريد الكوبلت	$CoCl_2$	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R = مقاوم و S =حساس

تحلل النشأ Starch Hydrolysis Test

اظهرت النتائج عدم قدرة العزلات على تكوين مركبات الاميلود كما لم تتمكن من تحليل النشـــأ. يكشـــف عن قدرة الاحياء المجهرية على تحليل النشأ باستخدام اليود حيث يغمر سطح المستعمرات بكمية مناسبة منه، وان ظهور هالة شفافة حول المستعمرة النامية يدل على قدرتها على تحليل النشـــأ مما يؤكد افرازها لأنزيم الاميليز ، في حالة عدم ظهور الهالة فهذا يعني عدم قدرة الخميرة *S. cerevisiae* على تحليل النشأ. ان عدم مقدرة الخميرة *S. cerevisiae* على تحليل النشأ يعود الى ان النشأ مادة كربوهيدراتية عبارة عن نوعين من الوحدات الاولى هي اميلوز Amylose والتي تكون بشـــكل ســـلاســـل مســـتقيمة من الكلوكوز والثانية هي اميلوبكتين Amylopectin ذات السلاسل المتفرعة من الكلوكوز ولكي تتمكن الخميرة بصورة خاصة والاحياء المجهرية بصورة عامة من تحليل النشأ فلا بد لها ان تكون قادرة على افراز انزيم الفا وبيتا اميليز لكسر سلاسل الاميلوز المستقيمة وكذلك يجب ان تكون قادرة على افراز انزيم glucosidase 1-6 لكسر سلاسل الاميلوبكتين المتفرعة ، بالإضـافة الى كميات كبيرة من انزيمات الطاقة وهذا ما مفقود فعلا في الخميرة *S. cerevisiae* (6). هذه النتائج متوافقة مع Kakhaya (23) والذي اشار في دراسته لخميرة *S. cerevisiae* ان جميع العينات الـــ 30 كانت غير قادرة على تحليل النشأ ، وتتفق ايضا مع Neama (6) والذي اشار الى عدم مقدرة الخميرة *S. cerevisiae* على تحليل النشأ وتكوين مركبات الاميلود

تحلل الجيلاتين Gelatin Liquefaction Test

اظهرت نتائج هذا الاختبار عدم قدرة جميع العزلات على تحليل الجيلاتين ، ويعزى الســـبب الى عدم قدرة الخميرة *S. cerevisiae* على انتاج انزيم الجيلاتينيز Gelatinase enzyme الذي يعمل على تحليل بروتين الجيلاتين المكون الاســـاســـي للوسط (7). هذه النتائج تتفق مع Mac Faddin (8) الذي درس قدرة مجموعة من الخمائر على تحليل الجيلاتين من ضمنها كانت 7 عزلات لخميرة الـ *S. cerevisiae* والتي اثبتت عدم قدرتها على تحليل وسط الجيلاتين ، وكذلك تتفق مع Jahan *et al.* (24) والذي بحث عن قدرة الاحياء المجهرية (فطريات وبكتريا) على انتاج انزيم الجيلاتينيز وذكر ان الخميرة *S. cerevisiae* غير قادرة على انتاج هذا الانزيم.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

انتاج الكتاليز Catalase Test

بينت نتائج الاختبار قدرة جميع العزلات على تحرير انزيم الكتاليز وبنسبة 100%. يستدل على النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية بسبب تحلل البيروكسيد الى غاز الاوكسجين وماء. تتفق هذه النتائج مع Barros *et al.* (25) والذين اشاروا فيها الى قدرة العديد من الخمائر على انتاج انزيم الكتاليز بعد اختبار 23 عينة 9 منها تعود لجنس الـ *Saccharomyces*. وتتطابق ايضا مع Jonson (26) والذي ذكر في دراسته قدرة الخميرة *S. cerevisiae* على تحليل البيروكسيد الى ماء وغاز الاوكسجين.

قدرة الخميرة على تحمل حامض الخليك الثلجي 1%

بينت النتائج ان جميع العينات وبنسبة 100% كانت غير قادرة على النمو في وسط حاوي على حامض الخليك الثلجي بنسبة 1%. ويعزى السبب في تحمل الخميرة *S. cerevisiae* لحامض الخليك الثلجي الى اختلاف السلالات او وجود طفرة على المستوى الجيني الخاص بالجينات المسؤولة عن تحمل الحامض الثلجي وفي احدى الدراسات اجري من خلالها تحليل الجينوم الكيميائي لتحديد حوالي 650 جينا مسؤولا عن تحمل الخميرة *S. cerevisiae* لحامض الخليك الثلجي بالإضافة الى ان تجميع هذه الجينات المقاومة للحامض تستند الى وظيفتها البيولوجية المشتركة في النسخ واستقراء الرقم الهيدروجيني pH واستقلاب الكربوهيدرات وتصنيع جدار الخلية والتكوين الحيوي للميتوكوندريا والرايبوسومات واستيعاب مختلف العناصر الغذائية خاصة البوتاسيوم والكلوكوز والاحماض الامينية (9). تتفق هذه النتائج مع Potampulha و Loureio – Dias (27) واللذان وجدا ان عزلة واحدة من اصل 10 عينات تم اختبارها كانت لها القدرة على النمو في وسط حاوي على 1% حامض الخليك الثلجي ، وكذلك الحال بالنسبة الى Hammo (16) الذي ذكر ان 15 عزلة من اصل 73 عينة من الخميرة *S. cerevisiae* كانت متحملة لحامض الخليك الثلجي بنسبة 1% واستطاعت النمو في الوسط الحاوي عليه ، وفي دراسة Ubaidh *et al* (28) على مجموعة من الخمائر وجد ان الخميرة *S. cerevisiae* كانت قادرة على النمو في وسط حاوي على 1% حامض الخليك الثلجي وهذا ما يتعارض مع نتائج البحث.

انتاج الامونيا من اليوريا Production of Ammonia from Urea Test

اظهرت النتائج عدم قدرة جميع العزلات المحلية على تحليل اليوريا اذ لم يتغير لون الوسط من الاصفر الى اللون الوردي. ويعود السبب في عدم وقدرة العزلات على تحليل اليوريا وانتاج الامونيا الى افتقارها لأنزيم اليوريز Urease enzyme (29). هذه النتيجة تتفق مع Aryal (30) والتي ذكر فيها ان 36 عينة من الخميرة S. cerevisiae مختلفة المصادر لم تكن قادرة على تحليل اليوريا وتغيير لون الوسط.

تأثير اختلاف درجات الحرارة على النمو Test the effect of temperature differences on growth

تشير النتائج الى قدرة العزلات على النمو في مدى واسع من درجات الحرارة حيث ابدت العزلات نموا ضعيفا عند درجة حرارة 23 م° لمدة 48 ساعة وكذلك الحال عند 37 م° ، بينما كان افضل نمو في درجة حرارة 28 م° لمدة 48 ساعة في حين لم يظهر اي نمو عند درجة حرارة 45 م°. ان لاختلاف درجات الحرارة تأثير على معدل النمو للخميرة فتأثيرها اما مثبط او محفز او قاتل ، ففي درجة الحرارة المنخفضة والتي تتراوح ما بين (0–10) م° تبقى انزيمات الخميرة في حالة سكون نسبي فلا يحدث تمثيل غذائي لكن مع ارتفاع درجات الحرارة الى الدرجة المثلى (27–29) م° يبدأ نشاط انزيمات التمثيل الغذائي على اشده ، ان ارتفاع درجات الحرارة الى ما فوق (44) م° تعمل على تغيير طبيعة السيتوبلازم وما يحتويه من بروتينات وانزيمات. ترتبط سمة التحمل الحراري ارتباطا وثيقا ببنية غشاء الخلية وتحديدا محتوى الدهون فيها كما قد يخضع لتحكم العديد من الجينات ، وعلى الرغم من تحديد البعض منها الا ان الكشف عنها بالكامل لا يزال قيد الدراسة (31). تتطابق هذه النتائج مع ما ذكره Khafaji(2) في دراسته عن المجالات المختلفة لاستخدام الخميرة *S. cerevisiae* اشار فيها الى ان الدرجة المثلى لنمو خميرة الخبز تتراوح ما بين (26–30)

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

م° وتبقى ساكنة عند درجة حرارة (4–6) م° وغير قادرة على تحمل درجة الحرارة المرتفعة 45 م°. وتختلف في قدرتها على التكيف مع درجة الحرارة باختلاف سلالاتها.

قدرة الخميرة على استهلاك الكحول كمصدر كاربوني

اثبتت النتائج قدرة الخميرة *S. cerevisiae* على استهلاك الكحول الأثيلي المطلق كمصدر كاربوني ذي التركيز 8% وبنسبة 100%. ان التخمر هو المسار الرئيسي لإنتاج الطاقة مع ذلك عندما يصبح الكلوكوز شحيحا او معدوما فانه يتم استخدام الإيثانول الناتج اثناء التخمر كمصدر كاربوني (11) وهي عملية تتطلب التحول في نشاط بعض الجينات ، حيث ينتج عن تحول التمثيل الغذائي المتخمر الى التمثيل الغذائي غير التخطيطي اعادة برمجة ضخمة للتعبير الجيني لاستخدام الكحول (الايثانول) كمصدر تغذية. فقد لوحظ زيادة التعبير عن العديد من الجينات عند التحول في التغذية من السكر الى الكحول ولعل العنصر الاساسي في تنظيم هذه العملية هو انزيم SnF1 Kinase ويتم استثارة هذا الانزيم تحت ظروف انخفاض الكلوكوز مما يؤدي الى تنشيط عدد من الجينات التي تحتوي على بروتينات تستجيب للكحول كمصدر كربوني ومن هذه البروتينات RdS2، SiP4، Cat8، 1Mig (32). تتفق هذه النتائج مع Turcotte *et al.* (11) والذين ذكروا ان للخميرة *S. cerevisiae* قدرة على استهلاك الكحول كمصدر كربوني ضمن تراكيز 13% فما دون وما زاد عن هذا التركيز فهو ساما بالنسبة للخميرة ، وكذلك تتفق مع نتائج Broach (32) والذي ذكر انه في حال غياب السكر فان للخميرة القدرة على استهلاك الكحول كمصدر كربوني على ان لا تتجاوز نسبته 15% في الوسط ، وبين انه من اصل 22 عينة واحدة منها فقط لم تتمكن من النمو في تركيز 10% من الكحول الاثيلي معللا السبب الى احتمال حدوث طفرة او انها من سلالة اخرى غير قادرة على استهلاك الكحول عند فقدان السكر.

القدرة على تحمل عوامل الاجهاد

من الجدول (4) اظهرت النتائج قدرة العزلات على تحمل درجة حرارة 37 م° لمدة 72 ساعة حضانة على وسط YPG وبنسبة 100% ، كما كانت العزلات قادرة على النمو في وسط حاوي على 8% كحول اثيلي مطلق تحت ظروف 28 م° و 72 ساعة حضانة وبنسبة 100% ، في حين ان العزلات (SY5,SY2,SY1) لم تكن لها القدرة على تحمل الازموزية العالية لسكر الكلوكوز والسكروز بتركيز 20%. تعود قدرة الخميرة *S.* cerevisiae لتحملها لعوامل الاجهاد الى تركيبها الجيني حيث يحدد 251 جين قدرة الخميرة على تحمل عوامل الاجهاد (12). تتفق هذه النتائج وبشكل كبير مع نتائج CHI (33) والذي جمع 53 عينة كانت 48 منها متحملة لدرجة حرارة 37 °م وإيثانول مطلق بتركيز 9% بينما كانت 42 عينة قادرة على تحمل الازموزية العالية للكلوكوز وبتركيز 200 غم/لتر

الجدول (4): قدرة العزلات المحلية للخمير *S.* cerevisiae على تحمل عوامل الاجهاد

العينات	عوامل الإجهاد			
	°درجة حرارة 37 م حضانة 72 ساعة	كحول 8% °درجة حرارة 28 م حضانة 72 ساعة	20% كلوكوز °درجة حرارة 28 م حضانة 72 ساعة	20% سكروز °درجة حرارة 28 م حضانة 72 ساعة
SY1	+	+	-	-
SY2	+	+	-	-
SY3	+	+	+	+
SY4	+	+	+	+
SY5	+	+	-	-
SY6	+	+	+	+
SY7	+	+	+	+
SY8	+	+	+	+
SY9	+	+	+	+
SY10	+	+	+	+

+ وجود نمو و– لا يوجد نمو

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

النمو على وسط خال من فيتامين الثايمين– HCl

دلت النتائج قدرة جميع العزلات المحلية قيد الدراسة من النمو على الوسط الخال من الفيتامين وبنسبة 100%. حيث كانت كثافة النمو (O.D) ما بين (0.694–0.924) للعزلات SY1, SY4, SY5, SY6, SY7 بينما باقي العزلات كانت كثافة النمو تتراوح بين (1.003–1.486) وهي العزلات SY2, SY3, SY8, SY9, SY10. اشار Shi–An و Feng–Yan (34) اللذان جمعا 30 عزلة من الخميرة *S. cerevisiae* ان قسما منها استطاع النمو والقسم الآخر لم يتمكن من النمو ، في دراسة لـ Hammo (16) بينت ان 9 عينات من اصل 73 عزلة تمكنت من النمو على وسط خال من فيتامين الثايمين–HCl.

الاستنتاجات

امكانية عزل الخميرة *Saccharomyces* من الاسواق المحلية لمدينة الموصل من الفواكه التي تبدو عليها اثار التعفن. ان الخميرة قيد الدراسة كانت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية وحساسة للمضادات الفطرية النيستاتين والفلاجيل ومقاومة ايضا لأملاح المعادن الثقيلة كلوريد الزنك ($ZnCl_2$) ، كلوريد النيكل ($NiCl_2$) وكلوريد الكوبلت ($CoCl_2$) وكلوريد الزئبق($HgCl_2$) العزلات كانت اكثر حساسية لكلوريد الكادميوم ($CdCl_2$) كما انها غير قادرة على تخمير سكر اللاكتوز بينما لها القدرة على تخمير عدد كبير من السكريات.وان هذه العزلات لها القدرة على النمو في مدى واسع من درجات الحرارة والقابلية العالية على تحمل عوامل الاجهاد والكحول بتركيز 8% و ليس لها الامكانية على تحليل الجيلاتين والنشأ واليوريا.

المصادر

1. Brisha J. Z., Yeasts, King Saud University ,Riyadh, M.Sc. thesis, Saudi Arabia (In Arabic) (2012).
2. Khafaji Z. M., Microbial biotechnology (partial orientations). Institute of genetic engineering and biotechnology, University of Baghdad, Ph.D. thesis (In Arabic) (2018).
3. Atlas R. M.; Brown A. E. and Parks L. C.," Laboratory Manual Experimental Microbiology". Mosby – Year Book, Inc. 17(3) pp 283-289 (1995).
4. Kourkoutas, Y.; Dimitropoulou, S.; Marchant, R. and Banat, I. M. (2001). Whey liquid waste of dairy industry as raw material for fermentation with the thermophilic KlyveromycesmarxianusI MB3. J. Environ. Sci. Tech; 7:226-233.
5. Dar N., Isolation and Characterization of Heavy Metals Resistant yeast from Industrial Effluents and their Use in Environmental Cleanup. Ph. D. Thesis Punjab. Univ. Lahore. Pakistan(2004).
6. Neama A., Biochemical tests used in the identification. College of education for pure sciences ،Diyala University (In Arabic) (2013).
7. Al-Jazi H. How to make gelatin. Assiut University, Egypt (2018).
8. Mac Faddin, Biochemical tests for Identification of Medical bacteria Macro – and micronutrient in alkaline soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal. ،8; 195-207(1980).
9. Mira N. P.; Becker J. and Sa – Correia I.,: J. of integrative Biology ،14(5); 587-601 (2010).
10. Christensen‘s, W. B., J. Bacteriol., 52:461-466(1946).
11. Turcotte B.; Liang X. B.; Robert F. and Soontorngun N., Transcriptional regulation of nonfermentabl carbon utilization in boding yeast. FEMS yeast Res. 10: 2-13(2011).
12. Huang C. J.; Lu M. Y.; Chang Y. W. and Li W. H. Experiment Evolution of yeast for High – Temperature Tolerance. Biodiversity research center, Academic Sci., Taipei, Taiwan (2018).
13. Van der Walt J. P., Criteria and methods used in classification. In J. Lodder (ed) ،The Yeast – A taxonomic study ،2ed ed. ،pp 34 – 113 North – Holland Pupl. Co. Amsterdam / London(1970).
14. Lathar P. K.; Sharma A. and Thakur I., Journal of Yeast and Fungal Research ،1 (8):146-151(2010).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

15. Mokhtari M.; Etebarian H.; Mirhendi S. H. and Razavi M., Arch. Biol. Sci., Belgrade,63 (1) 7:9-88(2011).
16. Hammo B. Y. N. S., Diagnostic and Molecular Genetic study for Yeast of Genus Saccharomyces Isolated from Different Sources in Mosul City, Ph. D. Thesis. College of Education. University of Mosul(2013).
17. Mpofu A.; Kock J. L. F.; Pretorious E. E.; Pohl, C. H. and Zvauya ،R., Journal of Sustainable Development in Africa. ،10(3):88-101(2008).
18. Venables P. and Russel A. D., Antimicrob. Agents. Chemother. 7(2) 121- 127(1975).
19. Goldman E., Practial Handbook of Microbiology ،2nd Ede. E. Goldman and L. Green (CRC Press) (2008).
20. Al-Khafaji A. R. S. A., Gel electrophoresis. College of Science for girls, Babylon University. Master thesis (In Arabic) (2016).
21. Paulo A., Brazilian Journal of Microbiology ،print version ISSN(2013).
22. Lee K. and Ueom J., Bull. Korean Chem. Soc. ،22(5): 514- 518(2001).
23. Kakhaya T. I., Dar Al-Maarefa ،Syria.(in Arabic) (2009).
24. Jahan N.; Azmuda N. and Khan R., Bangladesh J. Microbiol., 24(1); 65-66(2007).
25. Barros M. H.; Da Cunha F. M.; Oliveira G. A. and Kowaltowski,A. J., Mech ،Ageing Dev. ،131; 494-502 (2015).
26. Jonson E., Biotechnology, Springer, Berlin (2012).
27. Potampulha M. E. and Loureio – Dias M. C., Appl. Microbiol.Biotechnol. ،34(3):375-380(1990).
28. Mulla Ubaidah B. A. J., Isolation ،diagnosis and study of some types of yeast *Rhodotorula* in terms of genetics and molecular efficiency in producing β- carotene. Ph.D. Thesis, College of Education, University of Mosul (in Arabic) (2017).
29. Hammoud J. S., Anbar Journal of agricultural Sciences, Vol. 10 (1) (2012).
30. Aryal S., Urease test – principle. Media,Austin Community College,Austin University (2018).
31. Pataro C.; Santos A.; Correa S. R.; Morais P. B.; Linardi V. R. and Rosa C.A., Rev. Microbiol.,29: 104-108 (1998).
32. Broach J., Genetic Science Journals. U.K.,193; 33-165(2012).
33. CHI Z., J. Ind. Microbiol, Biotechnol (2013).
34. Shi-An and Feng-Yan, Journal of Microbiology, Beijing, China Vol. 6 (3), (2008).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/