زهرة محمود الخفاجي
Saturday, December 18, 2010
12:18 AM

تأثير الظروف المختلفة في عيوشية الخلايا والفعالية التثبيطية لخميرة *Saccharomyces boulardii* ضد البكتريا المعوية المرضية

*زهرة محمود الخفاجي** *ثريا خليل ابراهيم*** *مها طارق القاضي****
*ريم فالح عبد الحميد****

تاريخ قبول النشر 7 /2/ 2006

الخلاصة
استخدمت في هذه الدراسة عزلات بكتريا الاختبار المتمثلة بجنس*Escherichia coli* , Shigella spp *Salmonella* ودرس تاثيرها التثبيطي بخميرة Saccharomyces boulardii وتحت ظروف مختلفة. تم تنمية الخميرة في ظروف تهوية جيدة ودرس تاثيرها التثبيطي على عزلات الاختبار النامية في اوساط سائلة (البروث المغذي) لمدة 24 ساعة واخرى نامية لمدة 24 ساعة ومحفوظة في الثلاجة لمدة اسبوع وكانت الخلايا الفتية لعزلات الاختبار اشد تاثرا من المزارع القديمة وكذلك اكثر تأثرا من المزارع النامية على اوساط صلبة وبعمر 24 ساعة . درس تأثير تنمية الخميرة بظروف هوائية واخرى قليلة التهوية وتاثيرها على مزارع فتية لعزلات الاختبار وكانت المزارع الهوائية اشد تاثيرا في عزلات الاختبار .
درس تاثير تركيز الخلايا في اوساط سائلة ولم يكن بالامكان زيادة تركيز الخلايا عن الدورة اللوغارتمية التاسعة (10^9 خميرة/مللتر من عالق الخلايا) نظرا لكبر حجم خلايا الخميرة. . درس تاثير التجميد على عيوشية الخلايا النامية في وسط GS(المحضرمن خلاصة الكلوتين الذائبة ومضاف اليها كمية مكافئة من نقيع بذور الذرة) ووسط GS 2% المشابه للوسط المذكور ولكن بإضافة 2 غم كلوكوز لكل 100 مللتير (السائلة) . لم يكن هناك تاثيرا كبيرا لعملية التجميد على عدد الحي للخلايا في الوسطين وان كان هناك بعض الانخفاض ولكن بدون فروق معنوية حيث لم يزد الفرق عن نصف دورة لوغاريتمية .

كلمات مفتاحية : خميرة ،*Saccharomyces boulardii* ، *Shigella* ، مقاومة المضادات الحيوية

المقدمة

زاد انتشار استعمال الخميرة العلاجية *Saccharomyces boulardii* في انحاء مختلفة من العالم كاحياء علاجية Probiotics [1].وتستعمل بشكل خاص في علاج الاسهال الذي يعقب استعمال المضادات الحيوية والاسهالات المتكررة والمزمنة العائدة لاسباب مختلفة [2] خاصة التي تصيب الاطفال ، وهناك بعض التقارير التي تشير الى عدم جدواها في كبار السن [4,3] .
وأشارت العديد من الدراسات الى ان خميرة *S.boulardii* تعد العلاج الملائم لمنع الاسهال الناتج من تاثير البكتريا *Clostridium difficile*[5] التي تسبب حوالي (25-30%) من الاسهالات التي تعقب استعمال المضادات الحيوية [6] ، وتشير الاحصائيات الى ان (1 -3) أشخاص لكل 100000 شخص يصابون بهذه البكتريا بعد استعمال المضادات الحيويه وترتفع النسبه الى شخص واحد لكل 100 شخص في المستشفيات[7]وتعود الية توليدها للاسهال الى انتاج السموم (B,A) وعند استعمال خميرة *S.boulardi*i تفرز أنزيم protease الذي يفكك السم A وكذلك تؤثر في تدمير مستلماته على سطوح الخلايا المبطنه للامعاء وتقلل من حدوث التعقيدات التي تسببها *Cl.difficile* واكثرها شده (Pseudomembranous colitis)PMC [8,6,5]
وتستعمل خميرة *S.boulardii* لمضادة انواع اخرى من الاحياء مثل *Shigella* و *Salmonella* والضروب المرضيه من بكتريا *Escherichia coli* مثل *E. coli* O157:H7 [10,9] بالاضافه الى تاثيرها على بعض الطفيليات الخطرة مثل *Entamoeba histolytica* [7] كما وجد انها تعطل تاثير سموم الكوليرا [12,11] . ولذلك تستعمل لعلاج اسهالات المسافرين في مختلف الجهات سواء افريقيا او الشرق الادنى والاوسط [15,14,12] . واستعملت هذه الخميرة في علاج الاصابات الناتجه عن التغذيه الخاصه مثل الاشخاص اللذين يغذون بالانابيب [1] ويمتد استعمالات هذه الخميره الى عالم الحيوان حيث تقلل الخميره من الاصابات في الدواجن عند اعطاءها قبل الترحيل حيث تقضي على البكتريا المهدده لتجارة الدواجن وهي *Salmonella* وبكتريا *Campylobacter*.[16]

*معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد/ العراق
**مركز الربيع للبحوث الزراعية والغذائية/الهيئة العامة للبحث والتطوير الصناعي/وزارة الصناعة

Unfiled Notes Page 1

استهدفت الدراسة الحالية دراسة جوانب مختلفة من تاثير خميرة *S.boulardii* في البكتريا المرضية خارج الكائن الحي (*In vitro*) .

المواد وطرائق العمل :

تم الحصول على خميرة *Saccharomyces boulardii* تحت الاسم التجاري للمستحضر Ultra-Levure رقم الوجبة 6598 من مختبرات Biocodex/فرنسا .

بكتريا الاختبار : شملت بكتريا مسببه للاسهال في الاطفال زودت من قبل مختبرات مدينة صدام الطبيه /قسم الاطفال , وموضحة بعض صفاتها في الجدول (1) .

الأوساط الغذائية :وسط المرق المغذي Nutrient broth, والاكر المغذي Nutrient agar من شركة Oxoid.

النتائج والمناقشة :

يوضح جدول (1) بعض مواصفات بكتريا الاختبار المستعملة في الدراسة والمعزولة من حالات اسهال عند الاطفال والمشخصه في مختبرات مدينة صدام الطبية /قسم الاطفال.

يستعمل مستحضر Ultra- Levure الحاوي على 56.5 ملغم مزروع مجفد لخميرة *S.boulardii* لعلاج العديد من الاعراض خاصة الاسهال بعد حله في ماء بارد او دافيء للبالغين والاطفال وكذلك يستعمل للاطفال الرضع مع سائل الرضاعة . ومن الاعراض التي يستعمل لها المستحضر حسب ارشادات الشركة المنتجة هي الاسهال المرافق اوالذي يعقب استعمال المضادات الحيوية والتهاب القولون والامراض المسببة عن *Candida)* (Candidosis وانواع الاسهال الاخرى والتهاب الامعاء والقولون [1] .

جدول(1): بعض مواصفات بكتريا الاسهال المستعمله كعزلات اختبار لدراسة الفعالية التثبيطية لخمير *S.boulardii*

المواصفات والتشخيص				رقم العزله
التشخيص/ *Salmonella*	الاصابة /اسهال	خروج الاطفال	وسط العزل /*SS	1
التشخيص/ *Shigella*	الاصابة /اسهال	خروج الاطفال	وسط العزل/ *SS	4A
التشخيص / *E.coli*	الاصابة /اسهال	خروج الاطفال	وسط العزل/ **Mac	5
التشخيص/ *Salmonella*	الاصابة /اسهال	خروج الاطفال	وسط العزل /*SS	**Sal_1**
التشخيص/ *Salmonella*	الاصابة /اسهال	خروج الاطفال	وسط العزل /*SS	Sal_2
التشخيص/ *Salmonella*	الاصابة /اسهال	خروج الاطفال	وسط العزل /*SS	**Sal_L**

* وسط SS agar *Salmonella* , *Shigella*

** Mac وسط MacConkey agar

وسط GS(خلاصة الكلوتين الذائبة المضاف لها كمية مكافئة من ماء نقع بذور الذرة) وGS الحاوي على 2% كلوكوز حضر وفق دراسة سابقة وبأس هيدروجيني 6.5 ± 0.2 [17] .

وسط السابروید (Sab) سواء السائل او الصلب محضر وفق المراجع الخاصة(18) وبأس هيدروجيني6.5 ±0.2 .

طرائق العمل :

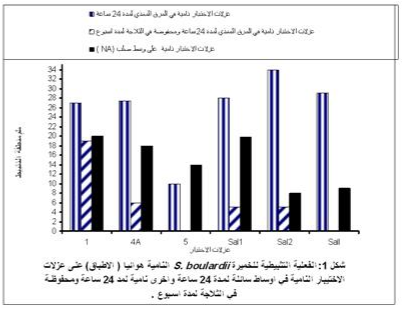
تقدير عدد الخلايا الحي : تم وفق الطرق المتبعه في هذا المجال [19] .

تقدير الفعالية التثبيطيه : تم باستعمال طريقة التخطيط المتعامد Cross streaking [20] حيث تزرع الخميرة بشكل خط متصل على الوسط الغذائي الصلب ثم تحضن لثلاثة ايام بدرجة حرارة 37م ثم تزرع بكتريا الاختبار بشكل متعامد على خط نمو الخميرة وتحضن الاطباق مرة ثانية بدرجة حرارة 37م لليوم الثاني وتقاس منطقة التثبيط .

في هذا الجزء من الدراسة تم استعمال بعض العزلات المسببة للاسهال في الاطفال (جدول1) لدراسة تاثير بعض ظروف التنمية سواء للخميرة او العزلات الاختبار .

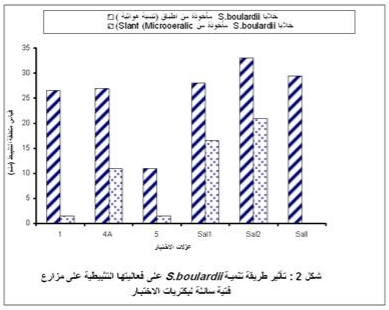
نمو العزلات الاختباريه : تم دراسة تضاد خميرة *S.boulardii* في اطباق تحت ظروف تهوية جيدة مع بكتريا اختبار ماخوذه من مائلات (Slants) مخزونه في الثلاجة وكذلك اجري التضاد مع نفس عزلات الاختبار النامية في اوساط غذائية سائلة لمدة 18-24 ساعة بالاضافة الى استعمال مزارع سائلة لعزلات الاختبار مكتملة النمو ومحفوظة في الثلاجة لمدة اسبوع والنتائج موضحة في الشكل (1) .

Unfiled Notes Page 2



شكل 1: الفعالية التثبيطية للخميرة *S. boulardii* النامية هوائيا (الاطباق) على عزلات الاختبار النامية في اوساط سائلة لمدة 24 ساعة واخرى نامية لمدة 24 ساعة ومحفوظة في الثلاجة لمدة اسبوع .

ويلاحظ بصورة عامة ان اكثر مزارع عزلات الاختبار تاثرا" هي المزارع الفتية ويقل تأثر العزلات بشكل كبير عند استعمال مزارع قديمة وهذا يعود بشكل اساسي الى حصول تغيرات في التراكيب الخارجية لسطوح الخلايا والذي من المحتمل ان تؤدي الى تدمير المستلمات التي تؤثر بواسطتها الخميرة على الخلايا ويلاحظ من الشكل ايضا" انه عند استعمال مزارع عزلات الاختبار الصلبه يكون تاثرها اقل من المزارع السائلة الفتية وهذا يعود الى التغير الحاصل في التراكيب الخارجية لسطوح الخلايا حيث وجد ان العوامل القاتلة لخميرة *S.cerevisae* اكثر تاثيرا" في الخلايا وهي الطور اللوغاريتمي ,وقد وجد ان سلالات خميرة الخبز القاتلة لغيرها من الخمائر تقوم بعمل ثقوب في اغشية الخلايا مؤدية الى اضطراب انتاج الطاقة (ATP)والتي يعتقد ان لخميرة *S.boulardii* تاثير مشابه له[22,21] . وهذا ماتثبته النتائج التي تم الحصول عليها حيث ان خميرة *S.boulardii* تقتل الخلايا دون تماس[23] اما تاثير ظروف التنمية في خميرة *S.boulardii* فيبين الشكل(2) الذي درست فيه الفعالية التثبيطية للخميرة المنماة في ظروف هوائية لها تاثير كبير على قابليتها في انتاج المواد المثبطة التي يعتقد ان لها طبيعة بروتينية والتي ينشط تخليقها تحت الظروف الهوائية في الاحياء المجهرية [24] ولظروف نمو الخمائر وحالتها الفسلجية المسبقة له تاثير في مستقبل فسلجة الخلايا[25,24] ويقل تأثير الخمائر عند اخذها من مزارع نامية على Slants تحت ظروف قليلة التهوية .



شكل 2 : تأثير طريقة تنمية *S.boulardii* على فعاليتها التثبيطية على مزارع قتية ساكنة لبكتريات الاختبار

ولغرض إنتاج مستحضرات من خميرة *S.boulardii* لابد في البداية من تركيز الخلايا في وحدة الحجم ولهذا الغرض نميت الخميرة في اوساط GSووسط GS الحاوي على 2% كلوكوز تحت الظروف الهوائية (استعمال المزارع المهزوزة) وتم حصد الخلايا لـ10 مللتر من المزروع بالطرد المركزي بسرعة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم تم التخلص من الرائق العلوي اما راسب الخلايا فتم تعليقة في 1 مللتر من محلول الملح الفسلجي وقدرت فيه عدد الخلايا والنتائج موضحه في جدول (2) .

جدول(2) : تركيز خلايا خميرة *S.boulardii* النامية في اوساط غذائية مختلفة بالطرد المركزي

المعاملة	عدد الخمائر الحية/ مللتر من الوسط كلوكوز GS 2%	GS
عدد الخلايا في الوسط قبل التركيز	1.4×10^{8}	8.13×10^{7}
عدد الخلايا بعد الفصل بالطرد المركزي(10)مللتر من الوسط وتعليق الراسب من 1 مللتر من محلول الملح الفسلجي	1.11×10^{9}	9.0×10^{8}
عدد مرات التركيز	8	11

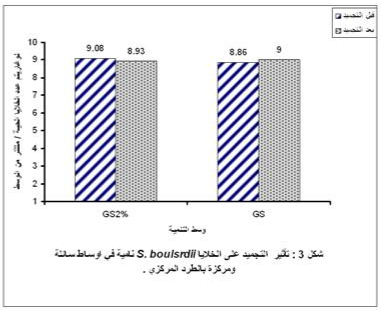
يلاحظ من الجدول انه لايمكن زيادة تركيز الخمائر عن اكثر من 10^{9} وحدة تكوين المستعمرات(CFU/ ml) لكل مللتر او عدد الخمائر / مللتر من الوسط وذلك لان الخمائر كبيرة الحجم مقارنة بالبكتريا ولايمكن تركيزها اكثر حيث ان وجود مثل هذه الاعداد العالية في وحدة الحجم يمكن ان تؤثر في فعاليات الخلايا بتاثير ظاهرة تحسس الزحام او النصاب Quorum sensing كما يحصل في المزارع البكتيرية [25] اما الاختلاف الملاحظ في الجدول يبين الخلايا وعدد مرات التركيز يعود الى اختلاف حجم الخلايا نظرا" لاختلاف تركيب الاوساط الغذائية فوسط GS 2 % يحوي على تراكيز عالية من السكريات التي تؤدي الى زيادة النواتج العرضية والذي يؤثر بدوره على عيوشية الخلايا وحجمها [25,24] .

تاثير التجميد في عيوشية خلايا خميرة *S.boulardii* : يعتبر التجفيد Lyophilization

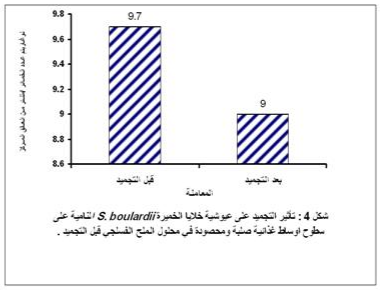
Unfiled Notes Page 3

من اهم طرق حفظ الخلايا الحية [26] , وفي بداية عملية الحفظ المستعملة في انتاج المستحضر المستعمل في هذه الدراسة , تم تعريض الخلايا للتجميد لدراسة تاثيره على عيوشية الخلايا ولذلك نميت الخلايا في وسط GSووسط GS 2% السائل وفصلت خلايا 10 مللتر من كل وسط بالطرد المركزي وعلقت الخلايا الراسبة بمللتر واحد من محلول الملح الفسلجي وقدر العدد الحي فيه ثم حفظت بدرجة حرارة –20 م لمدة اربعة ايام ,ثم تم تحديد عدد الخلايا الحية فيها والنتائج موضحة في الشكل(3) ويتضح من الشكل ان عملية التجميد لم تؤثر بشكل كبير على عيوشية الخلايا في كلا النوعين من الاوساط . وذلك لان وجود الخلايا باعداد كبيرة يؤدي الى انطلاق مكونات بعض الخلايا بعد موتها حيث تعمل كمواد حافظه للخلايا من تاثير التجميد [27,26].

ونظرا" لصعوبة عمليات فصل الخلايا من المزارع السائلة بالطرد المركزي لذلك نميت الخلايا على سطوح اوساط غذائية صلبة وحضنت بحرارة 37 م لمدة 48 ساعة ثم حصدت باستعمال محلول الملح الفسلجي ثم قدر العدد الحي فيه ثم جمدت الخلايا بدرجة حرارة –20 م لمدة اربعة ايام ثم قدر عدد الخلايا الحي في النماذج المجمدة كما موضح في الشكل (4) ويلاحظ ان عملية التجميد لاتؤدي الى انخفاض الاعداد(92.8 %) وذلك للتاثير الحامي الذي يوفره تعداد الخلايا العالي في وحدة الحجم ضد تاثير التجميد على الخلايا .



شكل 3 : تأثير التجميد على الخلايا *S. boulsrdii* نامية في اوساط سائلة ومركزة بالطرد المركزي .



شكل 4 : تأثير التجميد على عيوشية خلايا الخميرة *S. boulardii* النامية على سطوح اوساط غذائية صلبة ومحصودة في محلول الملح الفسلجي قبل التجميد .

المصادر :

1.McFarland,L.V. and Bernasconi,P. 1993. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innoratine biotheraputic agent . Microbiol. Ecol . 6:157-171 .

2.McFarland,L.V.Surawicz,C.M.,Greenberg,R.N.,Elmer,G.W.,Moyer,S.A., Bowen ,M.K.E. and Cox,J.L.1995 . Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* Compared with placebo. astroenteral. 90:439- 448 .

3.Lewis,S.J., Potts,L.F.and Barry,R.E. 1998.The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic –related diarrhea in elderly patients .J.Infect. 46:171-174 .

4.Elmer,G.W.and McFarland,L.V.1998. Comment on the lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-related diarrhea in elderly patients .J. Infect. Dis.37:307-308 .

5.Corthier, G., Jouvert,S. and Castex , F.1992. Effect of oral Saccharomyces boulardii treatment on the activity of *Clostridium difficile* in mouse digestive tract . Toxicol.30 : 1583-1589.

6. Solana-de-Lope,J., Aguilera,E., Vinageras,J.H .and Perez- Manauta,J. 1997. Pseudomembranous colitis : Report of four cases . Rev. Gastroenteral. Mex. 62:113-116 .

7.Reink,C.M.and Messick ,C.R.1994. Update on *Clostridium difficile* induced colitis,Part 1. Am.J.Hosp. Pharm. 51:1771-1781 .

8.Czerucka,D. , Nano,J.L., Bernasconi, P. and Rampal,P.1991 .Response of the IRD intestinal epithelial cell line to *Clostridium difficile* toxins A and B in rats. Gastroenterol .Clin . Biol. 15:22-27 .

9.Gedek.B.R.1999. Adherence of *Escherichia coli* serogroup 0157 and the *Salmonella typhimurium* mutant

DT104 to the surface of Saccharomyces boulardii .Mycoses . 42:261-264 .

10. Rodrigues, A.C., Nardi,R.M., Bambirra,E.A.,Vieira,EC. and Nicoli,J.R.1996. Effect of Saccharomyces boulardii against experimental oral infection with Salmonella tyjphimurium and Shigella flexneri in convential and gontobiotic mice.J.Appl.Bacteriol. 81:251-256.

11. Dias,R.S., Bambirra,E.A., Silva, M.E. and Nicoli , J.R. 1995 .Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. Braz .J .Med .Biol. Res.28:323-325 .

12. Plein,K. and Hotz, J. 1994 .Theraputic effect of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohns disease with special respect to chronic diarrhea – a piolt study . Z. Gastroenterol. 31 : 129-134..

13. Kirchhelle , A.,Fruhwein,N. and Toburen,D.1996 . Tretment of presistent diarrhea with *S.boulardii* in returning travelers:Results of a prospective study. Fortsch.Med. 114:136-140 .-

14. Kollaritsch,H.,Holst,H.,Grobara,P. andWiedermann,G.1993.Preventio n of travelers diarrhea with *Saccharomyces boulardii* . Results of placebo controled double – blind study .Fort .Med. 111:152-156 .

15. Scarpignato,C .and Rampal,R. 1995.Prevention and treatment of travelers:Aclinical pharmacological approach. Chemotherapy. 41 syppl. 1:48-81 .

16. e,J.E., Bailey,J.S., Cox,N.A. and Stern,N.J.1997. Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress .Poult.Sci.76:1227-1231.

17. الخفاجي ، زهرة محمود ، ثريا خليل ابراهيم ، مها القاضي وريم فالح عبد الحميد . 2001 استعمال مخلفات صناعة نشأ الذره لتنمية الفطريات . تحت النشر.

18. BBL –Manual of Products and Laboratory Procedures 1973. Division of Becton , Dickinson & Comp . USA .

19. Harrigan ,W.F. and McCance, M.E.1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press:London&New York

20. Gillies,R.R. and Govan,J.R.1966 . Typing of *Pseudomonas aeuroginosa* by pyocin production .J.Path.Bact.91:339-345 .

21. Depane,R.,Barros,P.,Gascon,S., Ramos,S. and Lazo,P.S. 1980 .Primary effects of yeast killer toxin . Biochem. Biophy .Res .Comm.96:544-550 .

22. Depane , R., Barros,P., Gascon,S., Laza,P.S.and Ramos,S.1981. The effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae* J. Biol.Chem. 256: 10420-10425.

23. Wood , D.R.and Bevan , E.A.1968 .Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae* J.Gen. Microbiol . 56:115-126 .

24. الخفاجي ، زهرة محمود . 1987 . الفعاليات الحيوية للبكتريا . جامعة بغداد . مطابع جامعة الموصل/العراق . ص568 .

25. Walker, G.M. 1999.Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons : Chichester, &New York .

26. Hunter-Cevera, J. and Belt,A. 1996.Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry .Academic Press:San Diego& New York .

27. الخفاجي , زهرة محمود . 1990 . التقنية الحيوية . جامعة بغداد . مطابع جامعة الموصل/العراق .ص 886.

Effect of Different Conditions on Viability and Antagonistic Activity of *Saccharomyces boulardii* on Enteric Pathogenic Bacteria

*Zahra M.Al-Khafaji** *Thuria K.Ibrahim***
*Maha T.AL-Qadi** *Reem F.Abdul-Hameed***

*Genetic Engineering& Biotechnology Institute for Post-graduate Studies /Univ. of Baghdad / IRAQ
**AL-Rabee Center for Agriculture & Food Research / Ministry of Industry

Abstract:

In this part of programme , different bacterial isolates mainly *Salmonella* spp, *Shigella* spp and *Escherichia coli* were used for antagonism with *Saccharomyces boulardii* under different conditions . *S.boulardii* was grown under aerobic conditions and antagonized with young overnight nutrient broth cultures of test bacterial isolates and other kept in refrigerator for a week after full growth . Young cultures were more susceptible to antagonistic effect of yeast compared to old cultures and on isolates grown on solid medium for 24 hr. *S.boulardii* grown under aerobic and microaerobic conditions and antagonized with overnight broth cultures of test bacterial isolates , The results revealed that aerobic cultures of yeast had more inhibitory effect on test isolates .Concentration of yeast cells from liquid media GS(prepared from soluble fraction of gluten and mixed with equal volume of corn steep water and GS2%) was found not to be exceeded 10^9 yeast cell/ ml of suspension due to the large size of yeast cells .Effect of freezing on viability of yeast cells grown in GS and GS2% was negligible and there was no significant differences since the difference was less then half log cycle .