الفصل الثاني

الطرق المستخدمة في تقسيم الخمائر
Methods used in yeast classification

(١ , ٢) المورفولوجيا الخضرية Vegetative morphology

تعتبر الخواص المورفولوجية للخمائر ذات أهمية عظيمة في معرفة الوضع التقسيمي. يعتمد التمييز العام بين الخمائر غالباً على الخواص المورفولوجية. فمثلاً وجود أو عدم وجود الهيفات، الصبغات، خواص تكوين الكيس الأسكي، الشكل المورفولوجي للجراثيم الأسكية..الخ ، كلها صفات خاصة بكل جنس وبالتالي تستخدم في علوم التقسيم. كذلك فإن الصفات المورفولوجية لمستعمرات الخميرة لها أهمية عظيمة في علوم التقسيم، لأن تنظيم بناء مستعمرة الخميرة لا يتم اعتباطاً، وإنما لكل جنس من أجناس الخميرة طريقة معينة في بناء المستعمرة أثناء انقسام الخلايا، مما ينتج عنه مستعمرات متخصصة لكل جنس من حيث الملمس وشكل الحافة والسمك..الخ. توضح بعض الخواص المورفولوجية أيضاً ما إذا كانت الخمائر تتبع الفطريات البازيدية أم الفطريات الأسكية. تبدي الخمائر نماذج مختلفة للتكاثر الخضري الذي يسمى أحياناً

Conidiogenesis. وبناء على ماسبق ، يوصي العلماء بشدة أن تؤخذ في الاعتبار الخصائص المورفولوجية الآتية عند إجراء أي دراسة على الخمائر.

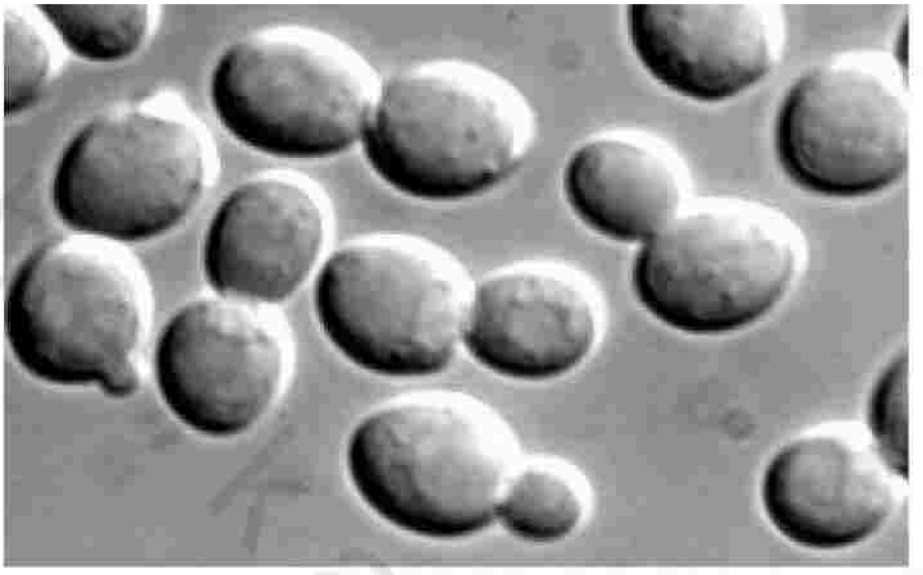
(١ , ١ , ٢) بلاستوكونيديا (تكون البرعم) Blastoconidia (Bud formation)

يتم معظم التكاثر الخضري في الخمائر، عن طريق تكون البلاستوكونيديا أو عملية التبرعم Budding. تتكون البراعم عن طريق تمدد جدار الخلية إلى الخارج لتتكون خلية جديدة تزداد في الحجم حتى تصل إلى حجم الخلية الأصلية ثم تنفصل عندما تصل إلى مرحلة النضج.

ويمكن الحصول على تمييز احتمالي لأجناس الخميرة عن بعضها البعض بملاحظة الأنواع الآتية من طرق التكاثر الخضري :

١- **التبرعم أحادي القطبية Monopolar budding** ، حيث تتكون البراعم في هذا النوع من التبرعم على ناحية واحدة من القطب الطولي للخلية فتأخذ شكل معين، وثابت، ومميز للأجناس المختلفة كما يتضح من الشكل رقم (٢،١) والذي يوضح شكل البراعم في جنس الخميرة *Malassezia*.

٢- **التبرعم ثنائي القطبية Bipolar budding** ، حيث تتكون البراعم على كل من طرفي القطب الطولي للخلية، فتعطي شكل مميز لأجناس معينة من الخميرة ومثال على ذلك براعم الأجناس *Hanseniaspora* و *Nadsonia* (الشكل رقم ٢،٢).



الشكل رقم (٢٠١). التبرعم أحادي القطبية في خمائر جنس *Malassezia*.

المصدر www.biologyimagelibrary.com

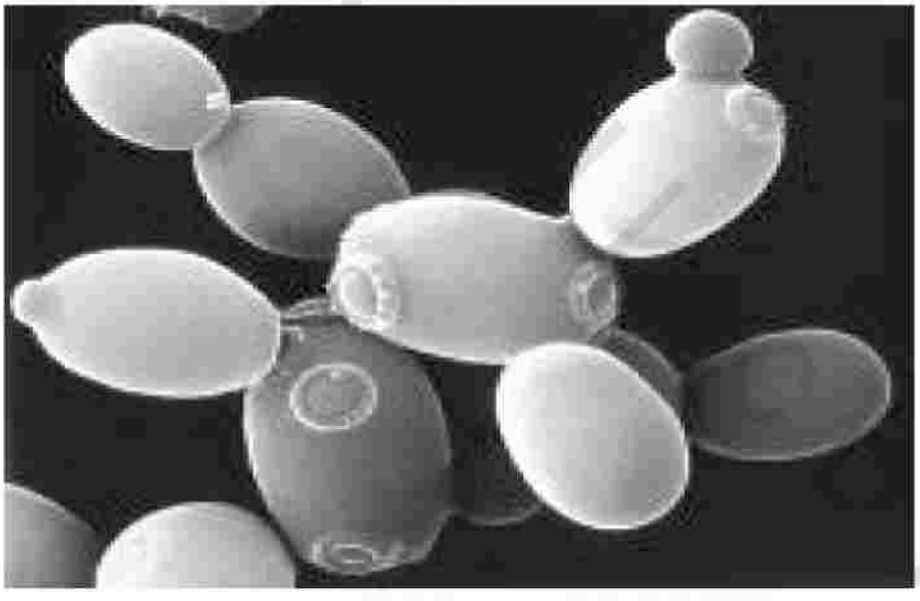
الشكل رقم (٢٠٢). التبرعم ثنائي القطبية في جنس *Hanseniaspora*

المصدر: http://www.investigadores.uncoma.edu.ar

٣- التبرعم متعدد القطبية Multipolar budding ، حيث تنبثق البراعم في هذا النوع من التبرعم من أماكن كثيرة جداً على سطح الخلية ويحدث هذا النوع من التبرعم في كثير من أجناس الخميرة التي لها أهمية اقتصادية وغذائية مثل *أجناس Saccharomyces* و *Kluyveromyces* و *Pachysolen* (الشكل رقم ٢،٣).

يمكن أن يحدث التبرعم من نفس المكان بالنسبة للتبرعم أحادي القطبية، والتبرعم ثنائي القطبية. ويحدث التبرعم في أي مكان بالنسبة للتبرعم متعدد القطبية.

وتتكون البراعم في كثير من الخمائر البازيدية في منطقة محدودة حول محور الخلية. وبصفة عامة فإن البراعم التي تكونها الخمائر البازيدية لها قاعدة ضيقة نسبيا ومثال ذلك براعم أجناس *Cryptococcus* و *Rhodotorula*.



الشكل رقم (٢،٣). التبرعم متعدد القطبية في جنس *Saccharomyces*.

المصدر: www.magma.ca/%7Escimat/yeast.htm

٤- هناك نوع خاص من التكاثر الخضري وهو تكوين البراعم التي تسمى باليستوكونيديا Ballistoconidia ، وهي عبارة عن تكون خلايا على نتوءات صغيرة توجد على سطح الخلية الأصلية البيضاوية أو الكروية في نمو يشبة الشمعة (استرجماتا Sterigmata) ، أو قد يتكون على الهيفا. ويعتبر هذا النوع من التكاثر الخضري، صفة سائدة في الخمائر البازيدية. الخمائر التي تتكاثر بهذه الطريقة ليست متجمعة كلها في مجموعة واحدة أي صف أو رتبة ولكن يوجد أكثر من ٢٢٠ نوع من الخمائر البازيدية في ٣٤ جنساً موزعة في مختلف الصفوف تتكاثر بهذه الطريقة. وقد استخدم وجود أو عدم وجود الباليستوكونيديا للتفرقة بين كثير من أجناس الخمائر البازيدية. قد تتكون الباليستوكونيديا من خلية واحدة تأخذ شكل الكلية، وتعطي شكل مميز جداً (الشكل رقم ٢،٤) للخميرة *Sporobolomyces salmonicolor*.

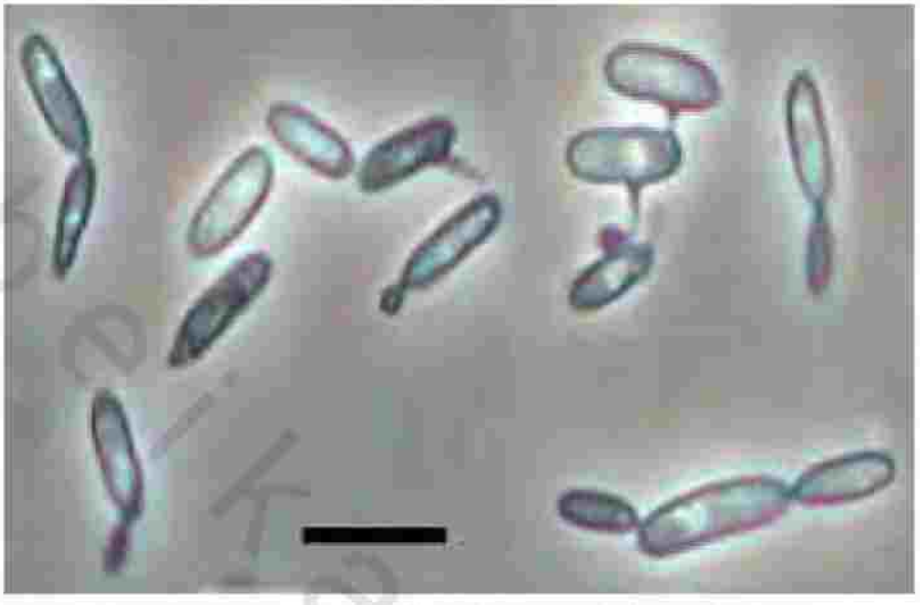
قد تكون الباليستوكونيديا مكونة من خليتين على طرفي الخلية الأصلية بشكل متناسق (الشكل رقم ٢،٥) كما في أجناس *Kockovaella* ، *Sporidiobolus*، *Udeniomyces*، و *Sporobolomyces* ما عدا *Sporobolomyces salmonicolor*. أو قد تأخذ الباليستوكونيديا شكل دوراني متناسق حول الخلية الأصلية كما في معظم أنواع جنس *Bullera*. وبالإضافة لذلك فإن بعض الخمائر البازيدية المكونة للهيفات تكون باليستوكونيديا على الساق المستطيلة التي بها حواجز وذلك إما في طرف الساق (الخلية)، مثل جنس *Kockovaella*، أو في منتصف الساق مثل جنس *Tsuchiyaea* ، والبعض الآخر في أماكن مختلفة مثل جنس *Ballistosporomyces*

الشكل رقم (٢.٤). باليستوكونيديا من خلية واحدة في جنس *Sporobolomyces*.

المصدر: www.doctorfungus.org/Thefungi/Sporobolomyces.htm

(٢,١,٢) الانقسام أو الانشطار Fission

تتكاثر بعض الخمائر بالانفلاق الثنائي (الشكل رقم ٢٠٦) كما يحدث في البكتيريا، حيث تنقسم نواة الخلية إلى نواتين ، ثم تهاجر كل نواة إلى أحد طرفي الخلية ، ثم يتكون جدار جدار عرضي يفصل بينهما، ثم تنفصل الخليتين وتبدأ كل منهما في الانقسام مرة أخرى. وهذا النوع من التكاثر يميز خميرة الجنس *Schizosaccharomyces*.



الشكل رقم (٢٠٥). باليستوكونيديا من خليتين في جنس *Sporobolomyces*.

المصدر : www.crem.fct.unl.pt/.../Slongisc/Micrographs.htm

(٢,١,٣) تكون الكبسولة Capsule formation

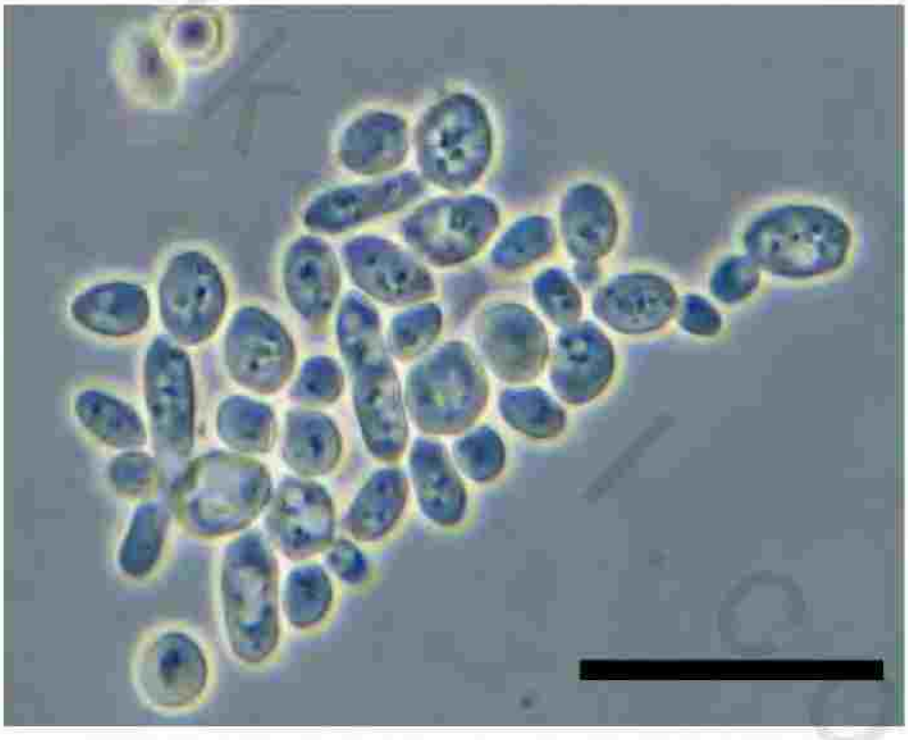
تحيط خلايا بعض الخمائر الممرضة نفسها بكبسولة من المواد عديدة التسكر وتظهر بوضوح عند الفحص الميكروسكوبي ، وهذه الكبسولة تلعب دوراً هاماً في إحداث العدوى ، وتعتبر صفة مميزة لكثير من الأنواع التابعة لبعض الأجناس مثل جنس *Candida* ، وجنس *Cryptococcus* (الشكل رقم ٢٠٧) .

(٢,١,٤) الهيفا ، الهيفا الكاذبة ، الجراثيم الكلاميدية والداخلية

Hyphae, Pseudohyphae, Chlamydospores, and Endospores

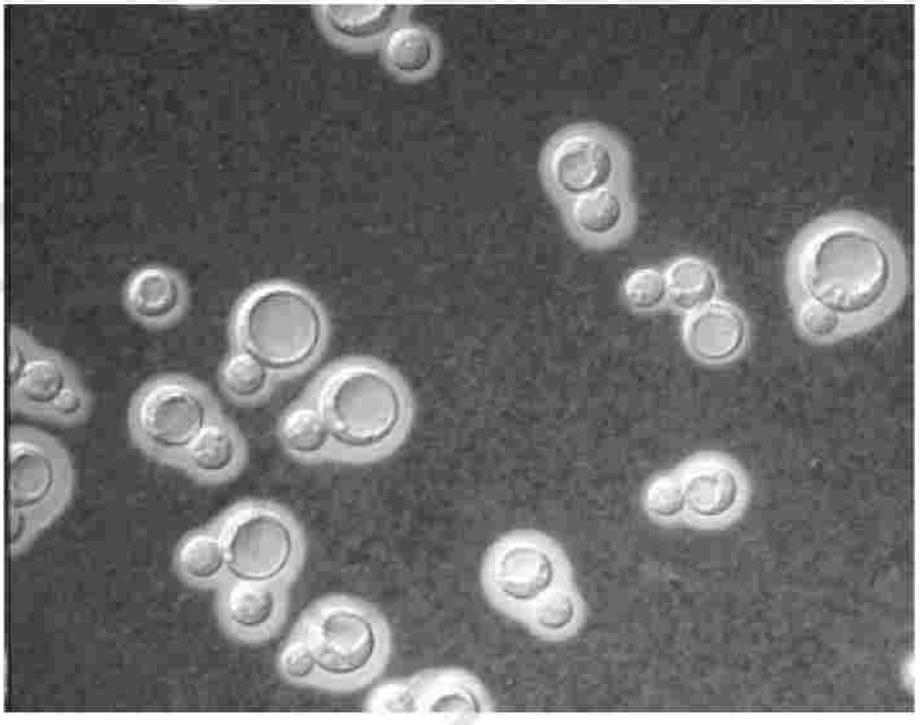
تتكاثر كثير من الخمائر خضريا عن طريق تكوين تكون هيفات حقيقية أو هيفات كاذبة. تظهر الهيفات الكاذبة في شكل بناء واضح حيث تتراص الخلايا بجانب

بعضها البعض مع وجود تقلص عند مناطق الاتصال فتبدو في شكل حلقات متصلة، متفرعة أو غير متفرعة. يوجد أنواع مختلفة من الهيفات الكاذبة تكونها الخمائر حسب نوع الخميرة وتتكاثر الخمائر التي تكون الهيفات الكاذبة بحيث تكون أحدث الخلايا موجودة في طرف السلسلة أو الأفرع ، كما يتضح من الشكل رقم (٢٠٨).



الشكل رقم (٢٠٦). الانشطار (منتصف الصورة) مع التبرعم في الخميرة .

المصدر: next.lbl.gov/photos/main.php?g2_itemId=2459



الشكل رقم (٢،٧). الكبسولة في خميرة *Cryptococcus neoformans*.

المصدر: commons.wikimedia.org/wiki/File:Cryptococcus

أما الهيفا الحقيقة فهي عبارة عن خيط واحد متصل لا تظهر فيه تقلصات كما يتضح من الشكل رقم (٢،٩). ومن اشهر الخمائر التي تكون هيفات كاذبة وهيفات حقيقية ،خميرة Candida albicans .

وبالنسبة للجراثيم الكلاميدية Chlamydospores (الشكل رقم ٢،١٠)، فهي أيضاً إحدى طرق التكاثر الخضري لبعض الخمائر، وهي جراثيم خضريه كامنة ذات جدر سميكة. ويعتبر تكون الجراثيم الكلاميدية صفة مميزة لبعض أنواع جنس

Candida ولذلك فإن الفحص الميكروسكوبي لملاحظة الجراثيم الكلاميدية يعتبر اختبار تشخيصي لخميرة *Candida albicans*.

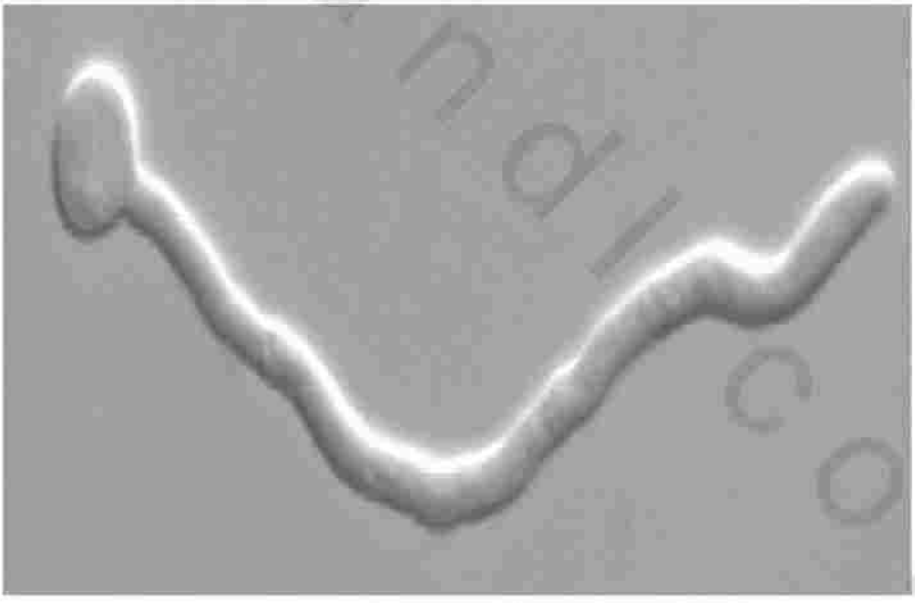
الشكل رقم (٢،٨). الهيفات الكاذبة مع الجراثيم الكلاميدية في خميرة *Candida albicans*.

المصدر: www.kaiscience.com/ph_58-Candida_albicans

أما الجراثيم الداخلية فتتكون أيضاً في بعض الخمائر مثل *Candida* و *Cryptococcus* و *Trichosporon* وهي عبارة عن خلية داخل خلية وتحدث غالباً في مزارع الخمائر التي يتم تركها فترة طويلة دون تجديد.

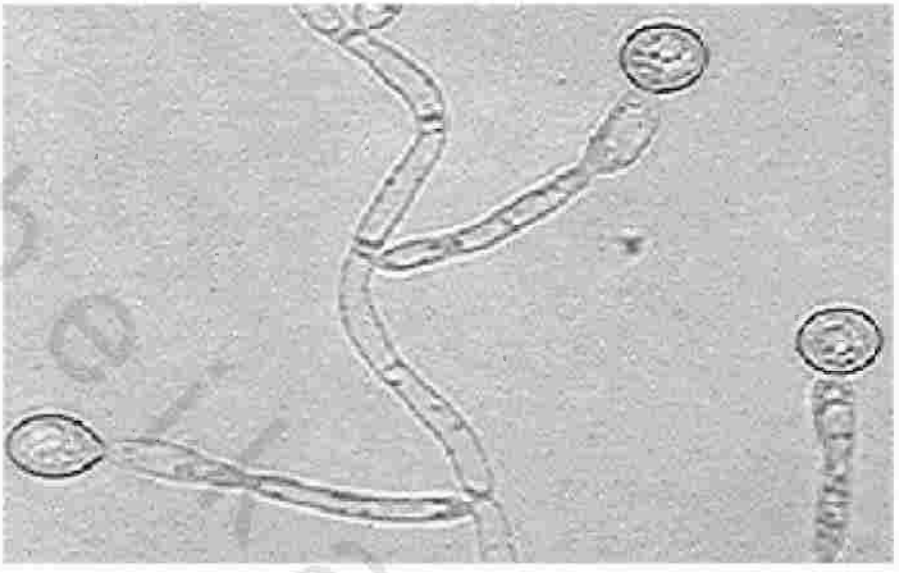
(٢,٢) المورفولوجيا التوالدية Generative morphology

قد تختلف أنواع الخميرة اختلافاً كبيراً بالنسبة لتكاثرها الجنسي. ودورة حياة الخميرة قد تكتمل بخلايا أحادية مجموعة الكروموسوم Haploid أو خلايا ثنائية مجموعة الكروموسوم Diploid أو أحادية-ثنائية. وقد تكون العوامل الذكرية والأنثوية في بعض أنواع الخميرة على نفس الخيط Homothallic وبذلك تتكون أكياس أسكية أو ثمرة بازيدية بدون تزاوج، في حين أنه في بعض الأنواع الأخرى والتي توجد العوامل الذكرية في خلية والعوامل الأنثوية في خلية أخرى Heterothallic فلابد من التقاء خليتين مختلفتين ويحدث تزاوج.



الشكل رقم (٢,٩). الهيفات الحقيقية في خميرة *Candida albicans*.

المصدر: www.abdn.ac.uk/ims/staff/details.php



الشكل رقم (٢،١٠). الجراثيم الكلاميدية في خميرة *Candida albicans*.

المصدر: www.cfidsinsights.com/cfidlk01.htm.

(٢،٢،١) توالدية من نوع Homothallic مثل الخمائر الأسكية Ascomycetes

الخمائر الأسكية الـ Homothallic (الشكل رقم ٢،١١) أي التي توجد العوامل الذكرية والأنثوية معاً على نفس الخيط أو الخلية تكون أكياس أسكية بطرق مختلفة حسب نوع الخميرة. ففي اقتران البرعم مع الخلية الأم فإن نواة البرعم تندمج مع نواة الأم ، وكل منهما تحتوي على نواة أحادية مجموعة الكروموسوم Haploid فيتكون الطور ثنائي مجموعة الكروموسوم Diploid (أي أن النواة تحتوي على مجموعتين مكتملتين من الكروموسومات). ثم يحدث بعد ذلك انقسام ميوزي فينتج عنه جراثيم أسكية

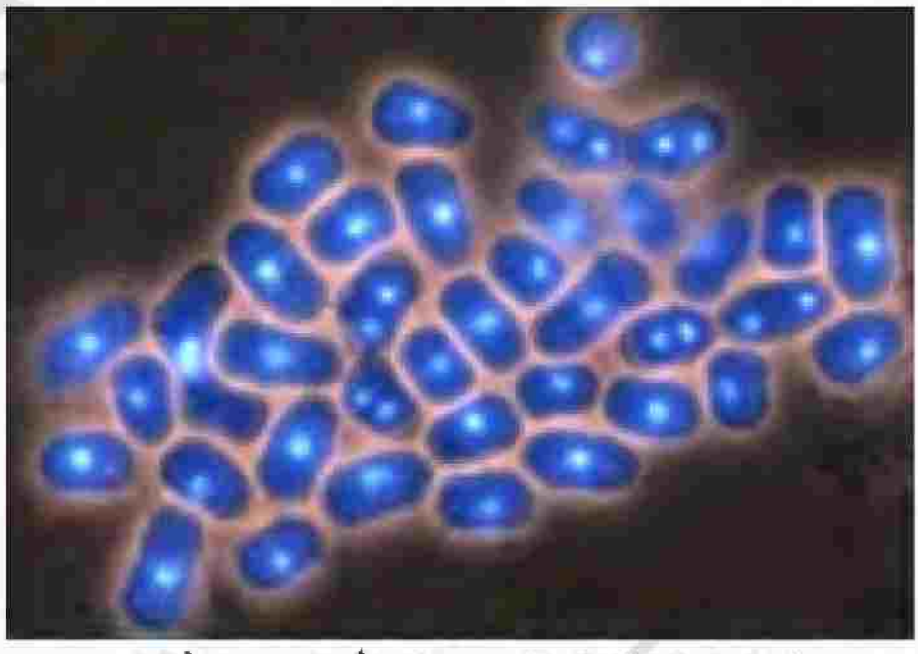
تحتوي نواة كل منها على مجموعة واحدة من الكروموسومات Haploid ، وهذا يميز بعض أنواع الجنس *Debaryomyces* على سبيل المثال.

في أنواع أخرى من الخمائر تندمج أنوية قطع صغيرة من الهيفات والقريبة من الحواجز التي تفصل بين الخلايا ، فتصبح كل قطعة حدث بها الاندماج ثنائية مجموعة الكروموسوم ، ثم يحدث انقسام ميوزي فيتكون من ١ إلى ٤ جراثيم أسكية أو ثمانية جراثيم أسكية، وأحياناً أكثر (الشكل رقم ٢،١٢) ومثال على ذلك أجناس *Saccharomycopsis* ، *Galactomyces* ، و *Dipodascus*.

وبصفة عامة فإن كل من الخلايا أحادية مجموعة الكروموسوم وثنائية مجموعة الكروموسوم قد تتكاثر عن طريق التبرعم ولكن الخلايا ثنائية مجموعة الكروموسوم فقط هي التي تنقسم انقسام ميوزي وتكون أكياس أسكية.

أما بالنسبة للأنواع الـ Heterothallic ، فلابد من تزاوج خليتين كل منهما تحمل عوامل جنسية مختلفة عن الأخرى أي لابد من وجود خلية تحمل العوامل المذكرة وأخرى تحمل العوامل المؤنثة. عندما تختلط هذه الخلايا ببعضها في بيئة مناسبة، فتكون كل من الخلايا التي يطلق عليها خلايا متممة Complementary cells قناة اتصال تنمو في اتجاه الخلية الأخرى، ثم تندمج قناتي الاتصال مع بعضهما وتمر النواة أحادية مجموعة الكروموسوم من خلال قناة الاتصال وتندمج مع النواة الأخرى أحادية مجموعة الكروموسوم، فتتكون نواة جديدة ثنائية مجموعة الكروموسوم. بعد ذلك يحدث انقسام ميوزي وتتكون جراثيم أحادية مجموعة الكروموسوم ، وتصبح إحدى الخلايا الخضرية الأصلية أو كلاهما كيس أسكي (الشكل رقم ٢،١٣)

ومثال على ذلك أجناس الخميرة *Pichia*، و *Zygosaccharomyces*. وقد يحدث هذا النوع أيضاً من التكاثر بين الهيفات.



الشكل رقم (٢٠١١). اقتران البرعم مع الخلية الأم وتكوين جراثيم أسكية .

المصدر: www.nature.com/.../n7135/full/nature05635.html

لا تتطلب الخلايا ثنائية مجموعة الكروموسوم اتصال مع خلايا أخرى قبل أن تكون جراثيم أسكية. في بعض الأنواع مثل خميرة *Saccharomycodes ludwigii*، فإن الجراثيم الأسكية المتكونة قد يحدث بينها قناة اتصال، وهي ما زالت داخل الكيس الأسكي وينتج عن ذلك خلايا ثنائية مجموعة الكروموسوم التي تكون جراثيم أسكية

جديدة. الأكياس الأسكية المتكونة قد تستمر محيطة بالجراثيم الأسكية، وقد تزول، حسب نوع الخميرة.

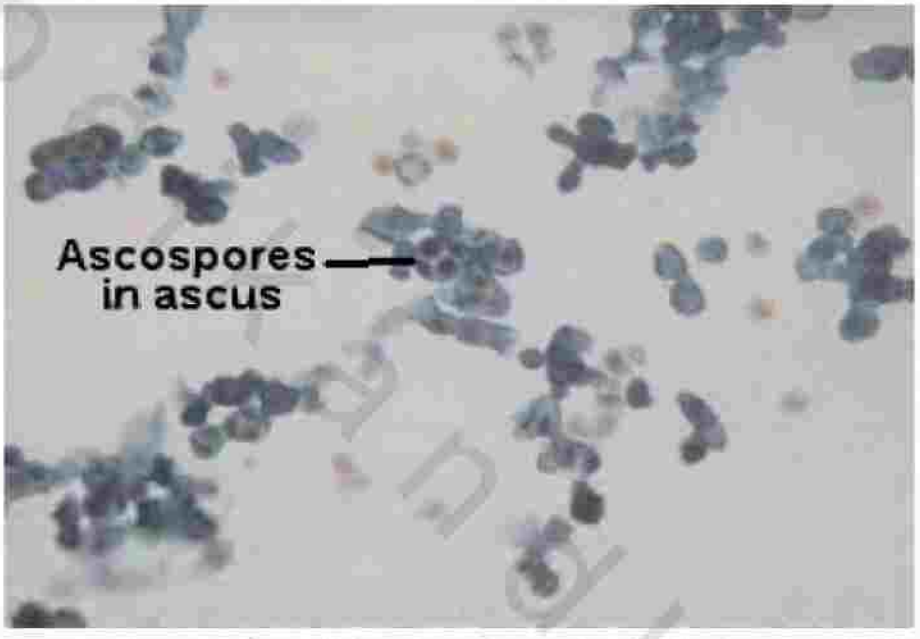
الشكل رقم (٢،١٢). أكياس أسكية تحتوي على ثمانية جراثيم أسكية.

المصدر: www.botany.hawaii.edu/.../wong/BOT135/Lect04.HTM

(٢،٢،٢) توالدية من نوع Dimorphic مثل الخمائر البازيدية Basidiomycetes

كثير من الخمائر البازيدية لها دورات حياة مزدوجة Dimorphic، التي يتبادل فيها طور خميرة Monokaryotic أي تحتوي على نواة واحدة أحادية مجموعة الكروموسوم مع طور هيفا Dikaryotic أي تحتوي على نواتين كل منهما أحادية مجموعة الكروموسوم .

وفي هذا النوع من التكـــاثر والموضـــح في الشكل رقم (٢٠١٤) يتم الاتصال بين الخلايا عن طريق الروابط الخطافية أو الاتصال الخطافي Clamp Connections



الشكل رقم (٢٠١٣). خلية الخميرة (منتصف الصورة) تتحول إلى كيس أسكي بعد تزاوج خليتين.

المصدر: www.botany.hawaii.edu/.../wong/BOT135/Lect04.HTM

ويمكن شرح خطوات هذا النوع من التكاثر كما يلي:

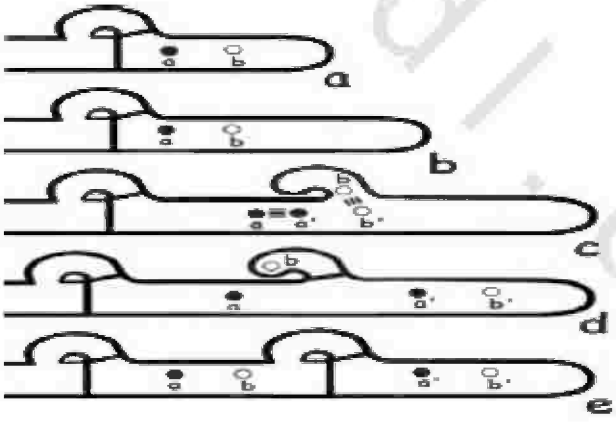
الخطوة a الموضحة بالشكل تبين خلية طرفية في الهيفا تنمـو فقـط في اتجـاه قمـة الهيفا؛ والخطوة b تبين استطالة قمة الهيفا؛ والخطوة c تبين انقسام الأنوية (b تنقـسم إلى

b و b' أما a فتنقسم إلى a و a') وبداية تفرع الهيفا التي ستصبح خطاف اتصال. وتهاجر إحدى الأنوية (b) إلى الخطاف الجديد.

الخطوة d تبين تكون حاجز عند قاعدة الخطاف الذي يحتوي على النواة المهاجرة (b) والأنوية a' و b' تهاجران إلى قمة الهيفا، في حين أن النوية a تبتعد عن القمة.

الخطوة e تبين تكون حاجز تحت الخطاف وتتكون خلية جديدة في قمة الهيفا، ثم يندمج الخطاف مع الخلية المجاورة أو القريبة، وتنطلق النوية b إلى هذه الخلية المجاورة، وبذلك فإن كل من الخلية الطرفية والخلية تحت الطرفية تصبح مزدوجة النواة أي أن كل منهما تحتوي على زوج من الأنوية المنسجمة أو المؤتلفة مع بعضها.

ومجرد رؤية الاتصال الخطافي تحت الميكروسكوب (الشكل رقم ٢،١٥)، يدل على أن الخميرة تتبع الخمائر البازيدية وأن هذا نوع من التكاثر الجنسي.



الشكل رقم (٢،١٤). رسم تخطيطي للاتصال الخطافي.

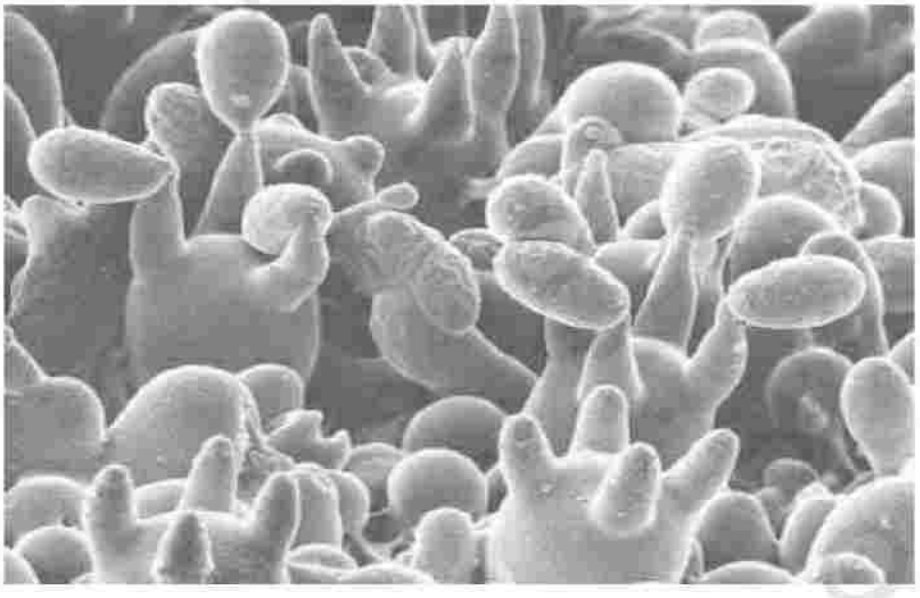
المصدر: www.biology.ed.ac.uk/.../microbes/basidio.htm

الشكل رقم (٢٠١٥). صورة ميكروسكوبية للاتصال الخطافي.

المصدر: www.biology.ed.ac.uk/.../microbes/basidio.htm

والخمائر البازيدية التي تتكاثر بطريقة الاتصال الخطافي يمكن أن تتكاثر أيضاً عن طريق تكوين جراثيم تيليتية Teliospores وذلك مثل أجناس *Sporidiobolus*، *Rhodosporidium*، *Leucosporidium*، و *Cystofilobasidium*. ويمكن التفرقة بين الجراثيم التيليتية والجراثيم الكلاميدية التي تتكون في التكاثر الخضري للخمائر الأسكية والتي سبق الإشارة إليها بواسطة ملاحظة طريقة الإنبات، حيث أن الجراثيم التيليتية تنبت عن طريق تكون البازيديا Basidia (مفردها بازيديوم Basidium)، وكل بازيديوم عبارة عن تركيب صولجاني الشكل ينشأ من خلية طرفية في الهيفا المحتوية على نواتين والمنفصلة عن بقية الميسيليوم بحاجز عرضي كما تم توضيحه سابقاً

(الشكل رقم ٢،١٤). يبدأ البازيديوم ضيقاً ثم يتضخم ويزداد في الاتساع. يحدث اقتران نووي بين نواتي الهيفا (أو البازيديوم) فتتكون نواة ثنائية مجموعة الكروموسوم التي تنقسم انقسام ميوزي لتعطي أربعة أنوية كل منها أحادية مجموعة الكروموسوم. تتكون على قمة البازيديوم أربعة ذنيبات وتنتفخ أطرافها. تنتقل الأربعة أنوية إلى هذه الانتفاخات وتكون كل منها جرثومة أحادية مجموعة الكروموسوم (الشكل رقم ٢،١٦).



الشكل رقم (٢،١٦). البازيديا.

المصدر: www.biology.ed.ac.uk/.../microbes/basidio.htm

الجراثيم التيليتية قد تكون كروية أو ذات زوايا، شفافة أو منتجة لصبغات تعطيها لون معين، سميكة الجدار، مفردة أو في عناقيد صغيرة، وعادة ما تكون ناعمة، غير أن جراثيم بعض الأنواع مثل *Tilletiaria anomala* تكون مغطاة بنتوءات صغيرة.

مما سبق يمكن القول أن الصفات المورفولوجية الخاصة بالتكاثر الخضري بكل أنواعه، التكاثر الجنسي بكل أنواعه ، شكل الخلايا ، شكل الجراثيم ، أعداد الجراثيم..الخ تعطي فكرة احتمالية عن وضع الخميرة التقسيمي وبالتالي لابد من تحديدها بشكل دقيق قبل الدخول في بقية الاختبارات.

(٢,٣) الطرق الفسيولوجية Physiological methods

مازالت الخواص الفسيولوجية هامة في تعريف سلالات الخميرة وفيما يلي نتناول الاختبارات الفسيولوجية المتبعة لتعريف الخمائر:

(٢,٣,١) اختبارات التخمر Fermentation tests

يمكن ملاحظة الاستفادة من السكريات تحت الظروف غير الهوائية بصفة عامة عن طريق تقدير كمية غاز ثاني أكسيد الكربون المتكونة والتي يتم تجميعها في أنابيب درهام. وقد ثار جدل بين العلماء حول أهمية هذه الاختبارات حيث اعتبر البعض أنها غير دقيقة بالنسبة للخمائر المعروفة بأن لها نشاط تخميري بطيء وذلك لأن كمية ثاني أكسيد الكربون الناتجة بواسطة هذه الخمائر لا تتكون بسرعة وبسبب ذلك اعتبرت بعض الخمائر أن ليس لها نشاط تخميري وظل هذا الاعتقاد سائد بالنسبة لبعض أنواع

الخمائر لمدة طويلة. ومع ذلك ما زالت تتبع طريقة تجميع غاز ثاني أكسيد الكربون في أنابيب درهام في تعريف الخمائر وذلك بسبب سهولة القيام بها. يتم أولاً اختبار النشاط التخمري للخميرة باستخدام سكر الجلوكوز، فإذا لم يلاحظ حدوث تخمر لسكر الجلوكوز فلا يكون هناك حاجة لإجراء مزيد من التخمر على السكريات الأخرى لأن الخميرة التي لا تستطيع أن تخمر سكر الجلوكوز لن تستطيع تخمير باقي السكريات.

السكريات المستخدمة في تعريف الخمائر هي الجلوكوز ، الجلاكتوز ، المالتوز ، السكروز ، اللاكتوز ، الرافينوز ، التريهالوز ، والزيلوز. يتم اختبار السكريات عند تركيز ٢٪ (وزن/ حجم) (أو ٤٪ بالنسبة لسكر الرافينوز) في البيئة الأساسية التي تحتوي على ٢٪ (وزن/ حجم) مستخلص خميرة و ٠.٥٪ ببتون وذلك في أنابيب اختبار تحتوي كل أنبوبة على ٣ إلى ٤.٥ مل. توضع أنبوبة صغيرة في كل أنبوبة في وضع مقلوب للتجمع بها فقاعات ثاني أكسيد الكربون المتكونة. يضاف السكر الذي تم تعقيمه منفصلاً إلى البيئة المعقمة والمحتوية أيضاً على دليل أزرق البروميثايمول Bromthymol blue وهو دليل يبين التغير في رقم الـ pH . تلقح الأنابيب بلقاح مكثف من المزرعة المراد اختبارها، ويجب أن يكون اللقاح من مزرعة حديثة النمو. تحضن الأنابيب على درجة حرارة من ٢٥ إلى ٢٨ °م ويتم ملاحظتها كل يومين لمدة أربعة أسابيع. الأنواع المحبة للحرارة المنخفضة تحتاج إلى تحضين على درجة حرارة ١٢ إلى ١٧°م.

(٢,٣,٢) اختبارات تمثيل الكربون Carbon assimilation tests

تمثيل مركبات الكربون يمكن أن يختبر بطريقة النمو في بيئة النمو في أنابيب تحتوي على بيئة سائلة وهي طريق حساسة وتستعمل في التعريف. وفي هذه الطريقة يتم اختبار قدرة الخمائر على النمو في بيئات تحتوي على أي من السكريات الآتية:

١- الهكسوزات أو السكريات السداسية (الجلوكوز، الجلاكتوز، الرامنوز، والسوربوز).

٢- البنتوزات أو السكريات الخماسية (الزيلوز، الليبوز، والأرابينوز).

٣- السكريات الثنائية (السكروز، المالتوز، السلوبيوز، التريهالوز، اللاكتوز، والملوبيوز).

٤- السكريات الثلاثية (الرافينوز، والمليزيتوز).

٥- السكريات المتعددة (النشا الذائب، والإنيولين).

٦- الكحولات (الإريثيرتول Erythritol ، الريبيتول Ribitol ، د-مانيتول D-mannitol، ميثانول ، إيثانول ، جليسرول ، جليكول ، بروبان ١،٢ دايول Propane 1,2 diol، بيوتان ٢،٣ دايول Butane 2,3 diol، جلاكتيتول ، و سوربيتول).

٧- الأحماض العضوية: (السكسينك، الستريك، اللاكتيك، والجلوكونيك).

٨- الجليكوسيدات (ألفا-ميثايل-د-جلوكوسيد α-methgyl-D-glucoside، أربيوتين arbutin ، و ساليسين Salicin).

تتلخص الخطوات العملية لاختبار تمثيل الكربون فيما يلي :

يضاف مصدر الكربون المراد اختبار قدرة الخميرة على تمثيله إلى بيئة نمو الخميرة بتركيز ٠.٥٪ ما عدا سكر الرافينوز الذي يضاف بنسبة ١٪.

يتم ضبط رقم الـ pH بعد ذلك ليكون ٥.٦ ذلك بالنسبة لمصادر الكربون التي يكون مصدرها غير طبيعي مثل الأحماض العضوية.

تعبأ أنابيب اختبار بالماء المقطر بحيث تحتوي كل أنبوبة على ٤.٥ مل وتعقم.

يضاف لكل أنبوبة ٠.٥ مل من محلول السكر المراد اختبار قدرة الخلايا على تمثيله.

تلقح الأنابيب بمعلق الخمائر المراد اختبارها ثم يقاس النمو عن طريق قياس العكارة وذلك بعد التحضين على درجة حرارة ٢٥°م لمدة ٧، ١٤، ٢١، أو ٢٨ يوم. سوف يكون النمو أسرع إذا تم رج الأنابيب لمدة نصف ساعة. تحضن الخمائر المتوقع أنها تحب الحرارة المنخفضة أو التي ثبت في أي اختبار احتمالي أنها محبة للحرارة المنخفضة على ١٢ إلى ١٧ °م.

(٢,٣,٣) اختبارات تمثيل النيتروجين Nitrogen assimilation tests

تستخدم المركبات النيتروجينية التي تشمل النترات، الإيثايل أمين Ethylamine، ل- لايسين L-Lysine،والكادافرين Cadaverine،بشكل روتيني في تعريف الخمائر،وذلك على نفس الأساس المتبع في اختبارات تمثيل الكربون. كما قد تستخدم مواد نيتروجينية إضافية في عملية التعريف مثل النتريت، الكيرياتين Creatine، الكرياتينين Creatinine، والإيميدازول Imidazole.

ومن ناحية أخرى ، وضع كل من Barnett وآخرون (١٩٩٠م) و Kurtzman and Fell (١٩٩٨م) خطوات بسيطة لمعرفة الوضع التقسيمي للخميرة تعتمد على قدرة الميكروبات على تمثيل ٤٣ نوعاً من المواد العضوية كمصدر وحيد للكربون ومقدرتها على تمثيل ٩ مواد نيتروجينية كمصدر وحيد للنيتروجين. فبالنسبة لاختبار النمو على المواد العضوية تلقح أنابيب الاختبار المحتوية على ٥٠ مليمول مادة عضوية و ٠.٦٧٪ بيئة Yeast Nitrogen Base (YNB) وهي بيئة الخميرة المعتمدة على النيتروجين بدون أحماض أمينية بحيث يكون حجم اللقاح ٢ ×١٠٠ خلية / مل. ويقدر تمثيل هذه المواد عن طريق ملاحظة النمو بالعين المجردة.

أما بالنسبة لاختبار قدرتها على تمثيل المواد النيتروجينية فيجب أولاً أن تنمى الخمائر لمدة عشرة أيام على بيئة Yeast Carbon Base (YCB) خالية من النيتروجين بغرض تجويعها للنيتروجين. بعد ذلك تلقح الخمائر الجائعة للنيتروجين في أنابيب اختبار تحتوي على ٥ مليمول مواد نيتروجينية بالإضافة إلى ١.١٧ ٪ من بيئة YCB.

يجرى اختبار أزرق الدايازونيم Diazonium Blue B (DBB) color test للتعرف على الخمائر الأسكية والخمائر البازيدية. أما الخمائر المكبسلة فيتم التعرف عليها من خلال تكون مركبات الأميلويد Amyloid وهي عبارة عن سكريات مختلفة تتكون خارج الخلية. كما يتم فحص خواص أخرى مثل الحساسية لتركيز ٠.٠١٪ و ٠.١٪ سيكلوهيكزاميد cycloheximide، وحامض الخليك كما يلاحظ الشكل المورفولوجي للخلايا ولونها وتكون الخيوط.

(٢,٣,٤) الحاجة إلى الفيتامينات Vitamin requirements

تستخدم اختبارات حاجة الخميرة إلى الفيتامينات في عملية التعريف. وتجرى هذه الاختبارات عن طريق تنمية الخمائر في أنابيب تحتوي كل منها على ٥ مل من بيئة خالية من الفيتامينات فإذا حدث نمو تلقح أنبوبة ثانية من الأولى للحكم على مدى احتفاظ هذه السلالة بخاصية عدم الحاجة إلى الفيتامينات، وإذا لم يحدث نمو تبدأ اختبارات إضافة الفيتامينات المختلفة ويتم الحكم على حاجة الخمائر إلى الفيتامينات من خلال ملاحظة النمو بعد إضافة كل فيتامين.

(٢,٣,٥) اختبارات فسيولوجية أخرى Other physiological tests

يوجد عدد آخر من الاختبارات الفسيولوجية التي قد تسهل عملية تعريف سلالات الخميرة. هذه الاختبارات تشمل الآتي:

أ) مقاومة السيكلوهيكساميد Resistance to Cycloheximide

يجرى هذا الاختبار في بيئة خميرة تحتوي على نيتروجين حيث يضاف ٠.٥ مل من محلول السيكلوهيكساميد ٠.١٪ أو ١٪ والذي تم تعقيمه عن طريق الترشيح إلى ٤.٥ مل من محلول الجلوكوز ٠.٥٪ (وزن/ حجم) في ماء مقطر ليعطي تركيز نهائي من السيكلوهيكساميد قيمته ١٠٠ جزء في المليون أو ١٠٠٠ جزء في المليون على التوالي. يلاحظ النمو بعد التلقيح بالسلالة المراد اختبارها.

ب) النمو في ٥٠٪ جلوكوز Growth on 50% glucose

يتم تلقيح السلالة المراد اختبارها عن طريق التخطيط على أنابيب أو أطباق تحتوي على بيئة آجار- مستخلص الخميرة المحتوية على ٥٠٪ جلوكوز. ويسجل النمو بعد ١-٢ أسبوع من التحضين.

ج) إنتاج حامض الخليك Production of Acetic acid

يتم تلقيح السلالة المراد اختبارها عن طريق التخطيط على أنابيب أو أطباق تحتوي على بيئة آجار-جلوكوز-ببتون- مستخلص الخميرة والمضاف لها ٠.٥٪ (وزن/ حجم) كربونات كالسيوم. ويلاحظ إنتاج حامض الخليك من خلال تكون منطقة رائقة حول المزرعة النامية بعد التحضين.

د) نشاط إنزيم اليوريز Urease activity

توزع بيئة مرق اليوريا Urea R broth، في أنابيب (٠.٥ مل) وتخزن الأنابيب في الفريزر. بعد التلقيح تحضن الأنابيب على درجة حرارة ٣٧°م أو على درجة الحرارة القصوى بالنسبة للسلالات التي لها درجة نمو قصوى أقل من ٣٧°م. يدل تغير اللون إلى أحمر غامق بعد ٤ إلى ٢٠ ساعة من التحضين على نشاط إنزيم اليوريز.

هـ) تفاعل ملح ب ديازونيم الأزرق Diazonium blue B reaction

يجرى هذا الاختبار للتفرقة بين الخمائر الأسكية والخمائر البازيدية، حيث أن الخمائر البازيدية تظهر لون في هذا التفاعل. يذاب قبل الاستعمال مباشرة ملح ب ديازونيم الأزرق ٠.١٪ (وزن/ حجم) في ٠.١ مول حامض الهيدروكلوريك المثلج. تلقح أطباق بتري المحتوية على بيئة آجار-مولت-مستخلص الخميرة بالسلالة المراد

اختبارها وتحضن لمدة تتراوح بين عشرة أيام وثلاثة أسابيع. تضاف قطرات من الملح المحضر طازجاً على المزرعة النامية. يدل تحول لون المستعمرات السريع إلى الأحمر الداكن على تفاعل موجب.

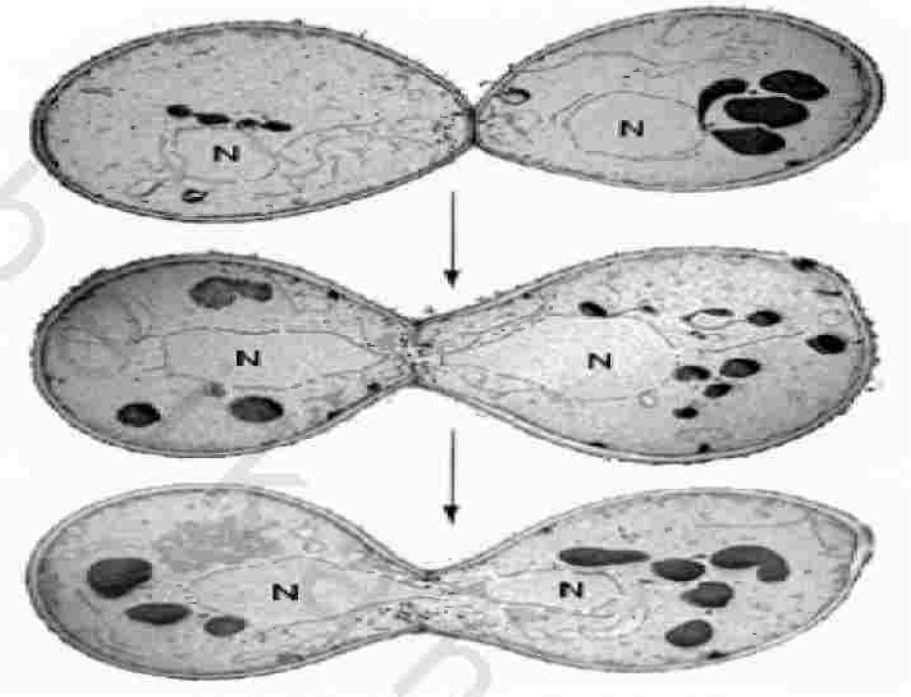
و) إنتاج النشا الخارجي Extracellular starch production

يحضر محلول لوجل Lugol's solution بإذابة اليود (٠.٣٣٪) ويوديد البوتاسيوم (٠.٦٦٪) في ماء مقطر. تضاف نقطة من المحلول إلى المزرعة النامية في أنبوبة اختبار التمثيل والمحتوية على د-جلوكوز. يدل تكون اللون الأزرق الداكن على وجود مركبات تشبه النشا الخارجي. ويستحسن عمل مكررات من هذا الاختبار، ثم يتم الكشف عن مركبات النشا بعد أسبوع وبعد أسبوعين من التحضين.

(٢,٤) التزاوج Mating

(٢,٤,١) تزاوج الخمائر الأسكية Mating of Ascomycetes

يسمح للسلالات أن تنمو لمدة يومين على بيئة أجار-مولت-مستخلص الخميرة. يخلط ملئ عقدة إبرة التلقيح من إحدى السلالات بملئ عقدة إبرة التلقيح من سلالة أخرى وتلقح بيئة أجار-مولت-مستخلص الخميرة طازجة بهذا الخليط ويسمح للمزرعة بالنمو. تفحص المزرعة النامية يوميا تحت المجهر لمدة أسبوع على الأقل، رغم أن التزاوج عادة ما يتم بعد يوم أو يومين من خلط المزارع مع بعضها. تتصل الخلايا المتزاوجة عن طريق أنابيب الاقتران التي عادة ما تكون طويلة بدرجة تكفي لملاحظتها (الشكل رقم ٢،١٧).

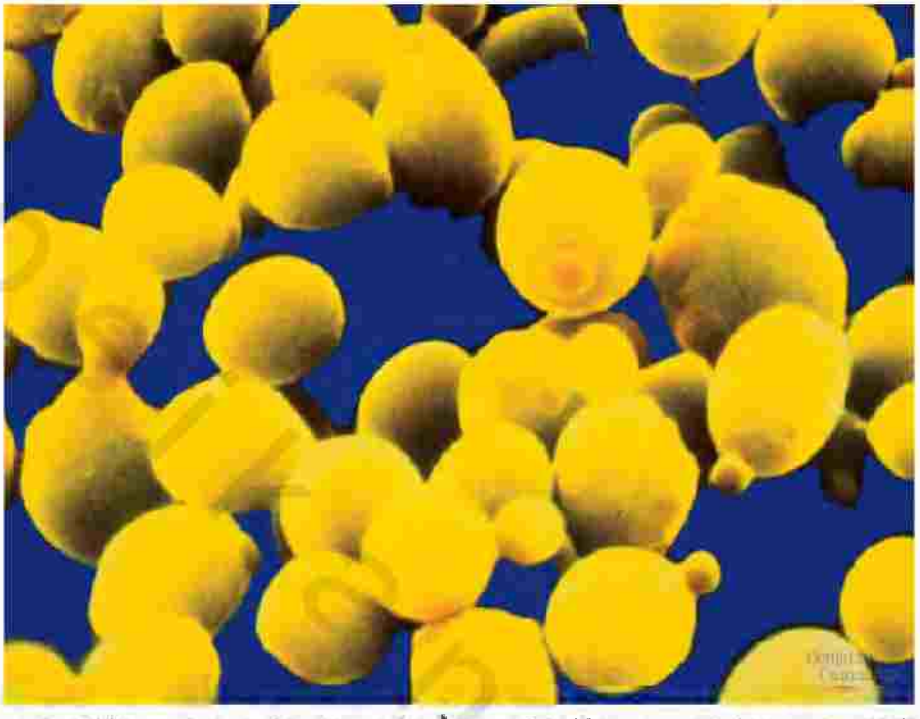


الشكل رقم (٢،١٧). أنبوبة الاتصال تزاوج الخمائر الأسكية.

المصدر: jcb.rupress.org/content/vol151/issue3/cover.shtml

قد تكون أنابيب الاقتران قصيرة جداً وتحتاج إلى مهارة خاصة لملاحظتها. والخلايا المقترنة قد تكون متساوية في الحجم وقد تكون إحداهما أصغر بكثير من الأخرى وتظهر كما لو كانت برعم إذا كانت أنبوبة الاقتران قصيرة (الشكل رقم ٢،١٨).

إذا لم يلاحظ تكون الجراثيم الأسكية بعد حدوث الاقتران ، فيمكن تكرار التجربة باستخدام بيئة غذائية أخرى ، والتي قد تكون أكثر ملائمة لتكوين الجراثيم الأسكية.



الشكل رقم (٢٠١٨). تظهر بعض الخلايا المقترنة وكأنها تكون براعم نظر لصغر إحدى الخلايا وقصر أنبوبة الاقتران.

المصدر: jcb.rupress.org/content/vol151/issue3/cover.shtml

(٢.٤.٢) تزاوج الخمائر البازيدية Mating of Basidiomycetes

يسمح بنمو خليط من سلالات الخميرة معاً ثم تفحص ميكروسكوبياً. وأول دليل على حدوث الاقتران هو ملاحظة تكون أنابيب الاقتران، يليها تكون هيفات الـ Dikaryotic التي تنمو مغمورة تحت سطح الأجار. يدل تكون الـ Clamp connections

الذي سبق شرحه (الشكل رقم ٢،١٥)، الجراثيم التيليتية، و/ أو الـ Basidia (الشكل رقم ٢،١٦) على حدوث التفاعل الجنسي بين الخلايا.

وللكشف عن التزاوج في كل من الخمائر الأسكية والبازيدية ، تستخدم بيئات أجار-الشوفان، أجار-٥٪ مستخلص مولت، أجار-دكستروز البطاطس، أجار-١،٥٪ مستخلص مولت-٠.٠٥٪ مستخلص خميرة-٠.٢٥٪ ببتون.

قد يكون من الصعب أحياناً إنبات الجراثيم التيليتية Teliospores، ولذلك يمكن تنشيط إنباتها عن طريق رفع درجة الحرارة إلى ٥٠-٥٥°م لمدة ٥ أو عشرة دقائق.

(٢،٥) الصبغ النووي Nuclear staining

تلعب الأنوية دوراً هاماً في دورة حياة الخمائر المختلفة. ولذلك فإن معرفة عددها وسلوكها يعتبر هام في تعريف وتقسيم الخمائر. وهناك عدد من الطرق السريعة للحصول على معلومات عن طريق صبغ الأنوية. وأحياناً يكون صبغ الأنوية صعب بسبب الجدر السميكة أو بسبب إنتاج صبغات طبيعية بواسطة الخلايا المراد صبغ نواياتها، ولذلك فإن هناك صبغات خاصة لمثل هذه الحالات مثل صبغة ٤-٦-ثنائي أمينو-٢-إندول الفينول 4-6-diamino-2-phenolindole (DAPI). يمكن تثبيت الخلايا وصبغها على غطاء شريحة زجاجي باستخدام ألبيومين البيض كمادة لاصقة أو مثبتة للخلايا. هناك عدد كبير من طرق الصبغ بالاعتماد على نوع الصبغة والغرض منها كلها هو معرفة سلوك الأنوية من حيث طريقة الانقسام والانتقال من خلية إلى أخرى

حتى يمكن الحصول على معلومات تساعد في تعريف الخمائر. وكمثال لإحدى طرق صبغ أنوية الخمائر نتناول الطريق الآتية :

(٢,٥,١) استخدام صبغة DAPI لصبغ الأنوية Staining Nuclei using DAPI

المحلول الأصلي: تذاب صبغة DAPI بمعدل ١ مجم/ ١مل ماء مقطر وتحفظ في مكان مظلم على درجة حرارة ٤°م.

محلول العمل: ٠،٥ ميكروجرام DAPI/ ١ مل من المحلول المنظم McIlvaine's buffer الذي له درجة pH ٤،٤ وتركيبه كما يلي: ٤٤،١ مل من ٠،٢ مول فوسفات صوديوم مائية تخلط مع ٥٥،٩ مل من ٠.١ مول حامض ستريك.

الطريقة :

١- تعلق الخلايا في ٧٠٪ إيثانول لمدة ٦٠ دقيقة في أنابيب طرد مركزي ١.٥ مل ثم يجرى طرد مركزي.

٢- تغسل الخلايا بعد الطرد المركزي لمدة خمس دقائق باستخدام محلول McIlvaine ثم يجرى الطرد المركزي.

٣- يعاد تعليق الخلايا في محلول العمل من صبغة DAPI لمدة لا تقل عن ثلاث ساعات ثم يجرى الطرد المركزي.

٤- يتم تحضير شرائح من الخلايا المتحصل عليها وفحصها تحت الميكروسكوب لملاحظة الأنوية.

(٢,٦) عزل الحامض النووي DNA isolation

إن الطرق المستخدمة لعزل الحامض النووي بغرض دراسة تقسيم الخميرة يجب أن تكون سريعة وتعطي نتائج يمكن ملاحظتها. وهناك طرق عديدة لعزل الحامض النووي من الخمائر نتناول إحداها فيما يلي:

(٢,٦,١) عزل الحامض النووي بطريقة مارميور المعدلة

Isolation of DNA by a modified Marmur method

لقد تم عزل الحامض النووي DNA من الخمائر بنجاح باستخدام طريقة مارميور المعدلة في كثير من المعامل. تتميز هذه الطريقة بسهولة وبساطة تنفيذها وفيما يلي شرح لخطوات التنفيذ :

تلقح دوارق فرنباخ Fernbach التي يحتوي كل منها على ١٥٠٠ مل من بيئة مرق مانيتول–مستخلص خميرة، بالخمائر المراد عزل الحامض النووي منها.

توضع الدوارق في هزاز دوار (٢٠٠لفة/ دقيقة) ويسمح للخمائر بالنمو لمدة ثلاثة أيام على درجة حرارة ٢٥°م.

تحصد الخلايا عن طريق الطرد المركزي (عادة يتم عمل دورقين لكل سلالة).

تعلق الخلايا في محلول منظم ثم يتم تكسير الخلايا إما عن طريق استخدام جهاز المجنس Homogenizer في وجود خرز زجاجي ذو قطر ٠.٥ مم، أو عن طريق الهضم الإنزيمي.

يضاف لمعلق الخلايا بعد التكسير، بيركلورات الصوديوم Sodium perchlorate، و ساركوسين الصوديوم Sodium sarcosine بحيث يكون تركيزهما في المعلق ١ مول، و ١٪ على الترتيب ، ثم يستحلب الخليط عن طريق الرج مع حجم مماثل من مخلط CIA (يحضر هذا المخلوط من الكلوروفورم و كحول الأيزوأميل Isoamyl alcholo بنسبة ١:٢٤ حجم/ حجم على الترتيب).

تستمر عملية الاستحلاب لمدة ثلاث ساعات في هزاز دوار ثم يتم عمل طرد مركزي. تزال الطبقة العليا المحتوية على حامض الـ DNA بواسطة ماصة، ويتم ترسيب الـ DNA بإضافة ١،٣ حجم من الإيثانول البارد (سالب ٢٠°م).

يتم تجميع الراسب عن طريق الطرد المركزي، ثم إذابته في ٢٠ مل من تحضير SSC (عبارة عن ٢ مجم ألفا–أميليز، و٢مجم من إنزيم Rnase البنكرياسي Pancreatic) ثم يتم التحضين طوال الليل على درجة حرارة الغرفة في هزاز دوار، ثم يضاف ١ مل من البرونيز Pronase، ثم يحضن المحلول لمدة ٤ ساعات أخرى.

يوضع المستحضر في دورق ٣٠٠ مل ويضاف له حجم مماثل من CIA ثم يستحلب لمدة ٣ دقيقة في هزاز دوار ثم تجرى عملية طرد مركزي. تزال الطبقة العليا بواسطة ماصة وتوضع في كأس حيث يتم ظهور خيوط الـ DNA بعد إضافة ١،٣ كحول بارد.

يمكن إذابة الـ DNA المتحصل علية في ٢٠ مل من ٠،٠٠١ مول فوسفات صوديوم ليستعمل فيما بعد.

عند هذه النقطة يمكن الاستمرار في تنقية الـ DNA بواسطة الطرد المركزي الفائق Ultracentrifugation أو بواسطة كروماتوجراف هيدروكسيل أباتيت Hydroxylapatite chromotography.

يتم تحليل الـ DNA المعزول من الخمائر المختلفة لمعرفة محتواه من القواعد النيتروجينية وترتيب هذه القواعد بطرق عديدة. بمقارنة تحليلات الحامض النووي في مختلف الخمائر بالإضافة إلى الصفات الأخرى التي سبق الإشارة إليها يمكن تعريف الخمائر والوصول إلى وضعها التقسيمي.

(٢,٧) المراجع

Abi-Said, D.; Anaissie, E.; Uzun, O.; Raad, I.; Pinzcowski, H. and Vartivarian, S. (1997) The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis*. 24:1122-1128.

Balasubramanian, M. and Glotzer, M. (2004) Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* 14 (18): R806–18.

Barnett, J.; Payne, R. and Yarrow, D. (1990) Yeasts, Characteristics and Identification. Cambridge University Press, New York.

Boekhout, T. and Kurtzman, C. (1996) Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. In: Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook, Wolf, K. (edt), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Fugelsang, K.C., (2007) Zygosaccharomyces, A Spoilage Yeast Isolated from Wine, California Agriculture Technology Institute.

Kawamura D. (1999) Breeding of yeast strains able to grow at 42°C. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 63: 560-562.

Kurtzman, C. and Fell, J. (1998) The *Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam.

Larone, D. (1995) Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Neiman AM (2005) Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 69 (4): 565–84.

Sveiczer, A.; Tyson J. and Novak, B. (2004) Modelling the fission yeast cell cycle. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* .2: 298-307.

Swann, E.; Frieders, E. and McLaughlin, D. (2001) Urediniomycetes In The Mycota – vol VII, Systematics and Evolution, D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin and P.A. Lemke (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp 37-56

Yeong, F. (2005). Severing all ties between mother and daughter: cell separation in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 55 (5): 1325–31.

obeikandl.com