ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):321-327

Characterization of Physiological, Morphological and Optimum Growth Rate of Saccharomyces Strains Isolated from Intestinal Flora of Domestic Rain Bow Trout Fish from Urmia City

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Rahimi S.*[1] *MSc,*
Manaffar R.[1] *PhD,*
Bagheri A.[1] *MSc*

How to cite this article
Rahimi S, Manaffar R, Bagheri A. Characterization of Physiological, Morphological and Optimum Growth Rate of Saccharomyces Strains Isolated from Intestinal Flora of Domestic Rain Bow Trout Fish from Urmia City. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 321-327.

[1]Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

Correspondence
Address: Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Shahid Beheshti Street, Urmia, Iran
Phone: +98 (44) 33440295
Fax: +98 (44) 33440295
s.rahimi888@yahoo.com

Article History
Received: April 21, 2015
Accepted: December 4, 2017
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Saccharomyces yeast genus has a wide application in biotechnology that several studies on this subject are performed. They have also known as a dietary supplement in breeding all kinds of creatures in particular for aquatics. Species of this genus are considered as probiotics, as well as a lot of beneficial effects on growth are creatures and Yeasts can be cultured in a variety of waste and cheap substrates, including hydrocarbons and petroleum. So finding an Appropriate and inexpensive culture media for optimal growth of yeast is important. In the present study, along with the study of Saccharomyces species diversity as intestinal flora of domestic rainbow trout flora, optimum growth conditions the strains of Saccharomyces cerevisiae was studied in different culture media as YPD, YPAD, YPG, YPAC, and DM. This research not only emphasized the diversity of Saccharomyces cerevisiae strains as an intestinal flora in domestic fishes, but also revealed the optimum growth of yeasts in YPAD media.

Keywords Optimum growth; Intestine flora; Rainbow trout; Culture Media; Yeast; Saccharog myces cerevisiae

CITATION LINKS

[1] Development of innovative biodegradable films based on biomass of Saccharomyces ... [2] Yeast as a model eukaryote in toxinology: A functional genomics approach to studying the molecular basis of action of ... [3] Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection ... [4] The effect of Saccharomyces strain and fermentation conditions on production ... [5] Effect of probiotic (Saccharomyces cerevisiae CNCM I-1079) on blood parameters, growth and health of neonatal ... [6] Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish ... [7] Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (Salmo gairdneri) and turbot ... [8] Hyperuricemia and urate nephropathy in urate ... [9] Screening of autolytic yeast strains for production of ... [10] Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's ... [11] Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch ... [12] Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation ... [13] Lead (II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of ... [14] Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during ... [15] Effects of the level of sugarcane molasses on growth and carcass performance of Caribbean ... [16] High-cell-density fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae KV-25 using ... [17] Production of baker's yeast using date ... [18] Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection ... [19] Apoptosis- triggering effects: UVB-irradiation and Saccharomyces ... [20] First report of Kazachstania sp. intestinal flora of cultured Rainbow ... [21] Influence of the diet on the microbial diversity of faecal andgastrointestinal contents in gilthead sea bream (Sparus aurata) ... [22] Variation in Microbial Identification System accuracy for yeast identification depending on commercial ...[23] Polycistronic expression of a β-carotene biosynthetic pathway in Saccharomyces ... [24] Identification of Candida albicans and Candida dubliniensis Species Isolated from Bronchoalveolar Lavage Samples Using Genotypic and Phenotypic ... [25] Citric acid production by Candida species grown on a soy-based crude ... [26] CHROMagar Candida as the Sole Primary Medium for Isolation of Yeasts and ... [27] Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in Saccharomyces ... [28] Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast Saccharomyces ... [29] Immobilizing yeast β-glucan on zinc-layered hydroxide nanoparticle improves innate immune response ... [30] A theoretical evaluation of growth yields of ... [31] Sporulation synchrony of Saccharomyces cerevisiae grown in various ... [32] The role of dietary ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بهینه رشد سویه‌های ساکارومایسس جداشده از فلور روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی شهرستان ارومیه

ساناز رحیمی* MSc
پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
رامین مناف‌فر PhD
پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
آرزو باقری MSc
پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده
مخمرهای جنس *ساکارومایسس سرویزیه* امروزه کاربردهای وسیعی در بیوتکنولوژی داشته که مطالعات متعددی در این باره صورت گرفته است. از آنها به‌عنوان مکمل غذایی در پرورش انواع موجودات به‌ویژه آبزیان استفاده می‌شود. گونه‌های این جنس حتی به‌عنوان پروبیوتیک نیز مطرح هستند که اثرات مفید زیادی در رشد موجودات دارند و می‌توانند در انواع سوبستراهای ضایعاتی ارزان‌قیمت و دردسترس از جمله هیدروکربن‌ها و مواد نفتی نیز پرورش یابند. بنابراین یافتن محیط کشت مناسب و ارزانقیمت برای افزایش رشد بهینه مخمرها حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر ضمن بررسی تنوع گونه‌های مخمر ساکارومایسس شناسایی‌شده فلور روده ماهیان قزل‌آلای پرورشی شهرستان ارومیه، بهینه شرایط رشد و پرورش این گونه‌ها در محیط‌های کشت مختلف شامل YPAC،YPG،YPAD،YPD و DM مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق ضمن تاکید بر تنوع سویه‌ای مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه* نشان داد که این مخمرها بهترین رشد را در محیط YPAD دارند که می‌تواند نیازهای اولیه رشد آنها را تامین کند.

کلیدواژه‌ها: بهینه رشد، فلور روده، ماهی قزل آلا، مخمر، محیط کشت، *ساکارومایسس سرویزیه*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۳
*نویسنده مسئول: s.rahimi888@yahoo.com

مقدمه

مخمر جنس ساکارومایسس جزء مخمرهای تک‌سلولی از شاخه قارچ‌ها محسوب می‌شود. مشهورترین عضو این خانواده *ساکارومایسس سرویزیه* است که کاربردهای بسیار متنوعی نیز دارد[1]. به‌دلیل دارابودن خصوصیات ویژه ژنتیکی، این موجود مدل بسیار مناسبی برای مطالعات زیست‌پزشکی شامل سرطان‌شناسی، داروسازی، سم‌شناسی و ژنتیک انسانی است. *ساکارومایسس سرویزیه* ممکن است به‌عنوان عامل ضدآکنه و درمان پریشانی و برخی بیماری‌های روده‌ای، همچنین در مطالعات مرگ سلول آپوپتوتیک مورد استفاده قرار گیرد[2]. استفاده از مخمرهای دستکاری‌شده نیز نشان داده است که مخمر ساکارومایسس باعث بالابردن عکس‌العمل‌های تدافعی،ایمنی و رشد می‌شود[3]. همچنین سویه‌های مختلفی از این گونه مخمری یافت شده است که کاربردهای متفاوت و مهمی را دارند. به‌عنوان نمونه سویه مخمری ساکارومایسس سرویزیه CNCME 1079 (به‌عنوان پروبیوتیک در سلامت گوساله‌های هلشتاین) و سویه *ساکارومایسس سرویزیه* 70424 در تولید محصولات تخمیری مورد بررسی قرار گرفته‌اند[4, 5]. مطالعات انجام‌شده نشان داده است که دو شاخه مختلف از مخمرهای تک‌سلولی در روده آبزیان مختلف یافت می‌شوند که شامل الف) آسکومیتا که در میان آنها مهم‌ترین خانواده ساکارومایسس است و ب) بازیدیومیکوتا که شامل مخمرهای رودوتورولا، است[6]. بر این اساس مخمرهای روده ماهیان قزل‌آلا می‌توانند به‌صورت دائمی در مخاط روده ماهی رشد کنند[7] که این ویژگی می‌تواند به ساختار سطح سلولی سلول‌ها[8] و حتی سویه‌های مختلف این مخمرها ربط داده شود[7, 8].

تحقیقات متمادی انجام‌شده برای یافتن محیط کشت مناسب و ارزان‌قیمت برای افزایش رشد بهینه مخمرها نشان داده که ملاس چغندر یا نیشکر می‌تواند به‌عنوان بهترین محیط غذایی کارخانجات تولید مخمر باشد[9]، اما به‌دلیل کمبود منابع نیتروژنی؛ افزودن نمک‌های آمونیوم یا اوره به‌همراه عناصر منیزیم، فسفات و ویتامین‌های مختلف می‌تواند موجب رشد سریع مخمرها شود[10, 11].

بررسی به‌عمل‌آمده نشان داده است که حضور سموم مختلف و فلزات سنگین در محصولات زراعی چغندر قند یا نیشکر می‌توانند روی رشد مخمر تاثیر بگذارند[12, 13]. وجود این عوامل مخرب در کنار افزایش قیمت ملاس، موجب کاهش استفاده از ملاس برای کشت گونه‌های مختلف مخمر شده است[14, 15]. محیط‌های غذایی که جدیداً مورد بررسی قرار گرفته‌اند شامل مخلوط ملاس با عصاره قوی ذرت (۲۰:۸۰)، ضایعات زراعی متفاوت[16] یا مواد دیگری مانند آب خرما[17] یا منابع مازاد زراعی مانند ملاس چوب هستند. محیط کشت YPD یا YEPD نیز می‌تواند برای پژوهش‌های کاربردی که نیازمند محیط کشت مایع مخمری است (همانند بیان پروتئین و کلونینگ)، مورد استفاده قرار گیرد. ترکیب این محیط کشت غنی به‌خوبی تعریف شده است، با این حال برخی گونه‌های جهش‌یافته در محیط YPD به‌طور متفاوتی رشد می‌کنند[18]. سرعت رشد کلنی آن در محیط کشت سریع بوده و در طول ۳ روز کلنی بالغی از آن مشاهده می‌شود. از ویژگی‌های مورفولوژیکی کلنی *ساکارومایسس سرویزیه* روی محیط SDA می‌توان به داشتن کلنی‌های نرم، مرطوب به رنگ سفید تا کرم‌رنگ اشاره داشت[19].

در طی این تحقیق سعی شد ضمن اشاره به تنوع مخمرهای جنس ساکارومایسس در روده ماهیان قزل‌آلای پرورش شهرستان ارومیه بهینه شرایط رشد و ویژگی‌های اختصاصی سویه‌های شناسایی‌شده مورد بررسی دقیق قرار گیرد. هدف از این کار بررسی امکان کشت آزمایشگاهی هر یک از این سویه‌ها است که در صورت لزوم بتوان برای استفاده به‌عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

الف) شناسایی تنوع مخمرهای جنس ساکارومایسس در فلور روده ماهیان قزل‌آلا: در این تحقیق سویه‌های مخمری جنس ساکارومایسس جداشده از فلور روده ماهیان قزل‌آلای شهرستان ارومیه با روش‌های میکروبی و مولکولی شناسایی شد[20]. بدین‌منظور پس از جمع‌آوری نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل محتویات روده به کمک پنس استریل از روده خارج و با استفاده از سرم فیزیولوژیکی رقت‌های مختلفی از آن تهیه شد. رقت‌های تهیه‌شده در پلیت‌های استریل جداگانه با دو روش پورپلیت و کشت سطحی استریک در محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) و در دمای ۲۵°C به‌مدت ۴۸-۲۴ساعت کشت داده شدند[21, 22]. سپس کشت مجدد روی محیط کشت مایکوزیل‌آگار (SCC) با روش کشت سطحی

استریک در دمای ۲۵°C به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ساعت انجام شد[19]. در نهایت شناسایی دقیق مخمرها به‌وسیله رنگ‌آمیزی گرم نمونه‌ها محقق شد[23]. شناسایی جنس مخمرها با استفاده از دو محیط کشت کروم‌آگارکاندیدا (CHA) و کورن‌میل‌آگار (CMA) صورت گرفت[19, 24].

ب) بررسی میکروسکوپی و مورفولوژیک سویه‌های جنس ساکارومایسس: بررسی مورفولوژیکی سویه‌ها در محیط‌های کشت SDA و CHA [19] و بررسی میکروسکوپی آنها پس از کشت در محیط مایکوزیل‌آگار و رنگ‌آمیزی گرم نمونه‌ها انجام شد[23]. نهایتاً پس از کشت سویه‌ها در محیط CMA به بررسی میکروسکوپی سودوهایف‌های کلنی‌های رشدیافته در این محیط پرداخته شد[19, 24].

پ) تهیه محیط‌های کشت اختصاصی مخمر: برای بررسی رشد اپتیمم سویه‌های مخمری ساکارومایسس کشت آنها در محیط‌های کشت مخمری به نام‌های ییست پپتون دکستروز آگار (YPD)، ییست پپتون آدنین همی سولفات دکستروز آگار (YPAD)، ییست پپتون گلیسرول (YPG)، ییست پپتون استات دکستروز آگار (YPAC) و دیاتوم‌مدیا (DM) صورت پذیرفت[6, 18, 25] (جدول ۱).

ج) روش کشت در محیط‌های کشت مایع و آنالیز آماری: پس از ایزوله‌نمودن کلنی‌های مخمر از باکتری‌ها، کشت اولیه آنها در محیط SDA صورت پذیرفت و به‌منظور بررسی بهینه رشد مخمر از محیط کشت مایع غنی برای کشت مخمرها استفاده شد[26]. نهایتاً بیومس مخمری با سانتریفیوژ جداسازی شد. سپس حجم ثابتی از سویه‌های مخمری پس از شمارش اولیه آنها توسط لام نئوبار، در محیط‌های کشت اختصاصی مختلف با ۳ تکرار برای هر محیط کشت پرورش داده شدند. مدت آزمایش ۷۲ساعت بوده و در این مدت نمونه‌ها درون شیکر انکوباتور در دمای ۲۷°C نگهداری شدند. در انتهای دوره تعداد سلولها با استفاده از لام شمارش نئوبار شمارش شده و آنالیز آماری میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه تست دانکن از بسته نرم‌افزاری SPSS 16 صورت پذیرفت.

جدول ۱) محیط‌های کشت اختصاصی مخمر

محتویات محیط‌های کشت (گرم بر لیتر)	YPD	YPAD	YPAC	YPG	DM
عصاره مخمر ۱%	۱۰	۱۰	۲۰	۱۰	–
پپتون ۲%	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	–
دکستروز (گلوکز) ۲%	۲۰	۲۰	–	–	–
آدنین‌همی‌سولفات ۰/۰۰٤ %	–	۰/۰٤	–	–	–
گلیسرول ۳%	–	–	–	۰/۰۳	–
استات‌پتاسیم ۱%	–	–	۱۰	–	–
کلسیم‌نیترات ٤ آبه	–	–	–	–	۲۰
پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات	–	–	–	–	۱۲/٤
منیزیم‌سولفات ۷ آبه	–	–	–	–	۲۰
سدیم‌هیدروژن‌کربنات	–	–	–	–	۱۵/۹
سدیم‌آهن (II) اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستات	–	–	–	–	۲/۲۵
سدیم‌اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستات	–	–	–	–	۲/۲۵
اسیدبوریک	–	–	–	–	۲/٤۸
منگنز (II) کلرید ٤آبه	–	–	–	–	۱/۳۹
آمونیوم‌هپتامولیبدات ٤ آبه	–	–	–	–	۱
سیانوکوبالامین	–	–	–	–	۰/۰٤
تیامین‌هیدروکلراید	–	–	–	–	۰/۰٤
بیوتین	–	–	–	–	۰/۰٤

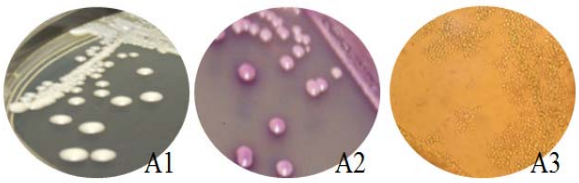
یافته‌ها

با توجه به یافته‌های این تحقیق سویه‌های مختلفی از جنس مخمری ساکارومایسس به نام‌های *ساکارومایسس سرویزیه* سویه LN، *ساکارومایسس سرویزیه* سویه YG3-1 و *ساکارومایسس سرویزیه* از محتویات فلور روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با روش‌های کشت اختصاصی میکروبی شناسایی شد و در انواع محیط‌های کشت اختصاصی مخمری مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی سویه‌های مخمری: نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه‌های مخمری در جدول ۲ و شکل‌های ۱، ۲ و ۳ ارایه شده است. اما در بررسی میکروسکوپی، سویه‌ها بیومتری متفاوتی نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی به‌عمل‌آمده از کلنی‌های مخمری سویه‌های ساکارومایسس در محیط کشت SDA، ارایه شده است (شکل ۴).

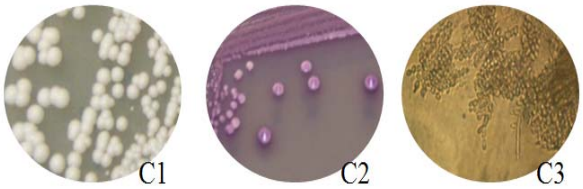
جدول ۲) بررسی خصوصیات مورفولوژی و میکروسکوپی کلنی‌های مخمری

شکل میکروسکوپی کلنی‌ها در محیط CMA	**حالت و شکل ظاهری کلنی‌ها در محیط SDA**	**رنگ کلنی‌ها در محیط CHA** ٤۸ساعت	۲٤ساعت	**رنگ کلنی‌ها در محیط SDA**	**نام سویه مخمر**
توده‌های بلاستوکونیدی بدون شاخه	کروی، درشت و مرکز کلنی برجسته، کناره‌ها مشخص، نرم و براق	بنفش	سفید و صورتی	سفید	*ساکارومایسس سرویزیه*
توده‌های بلاستوکونیدی بدون شاخه	کروی، درشت و مرکز کلنی برجسته و کناره‌ها مشخص، موکوسی و نرم	بنفش	صورتی و بنفش	سفید تا کرم رنگ روشن	*ساکارومایسس سرویزیه* سویه YG3-1
توده‌های بلاستوکونیدی بدون شاخه	کروی، درشت و سطح برآمده و صاف، کناره‌ها مشخص و خمیری و کدر رنگ	بنفش	صورتی و بنفش	سفید مایل به کرم رنگ	*ساکارومایسس سرویزیه* سویه LN

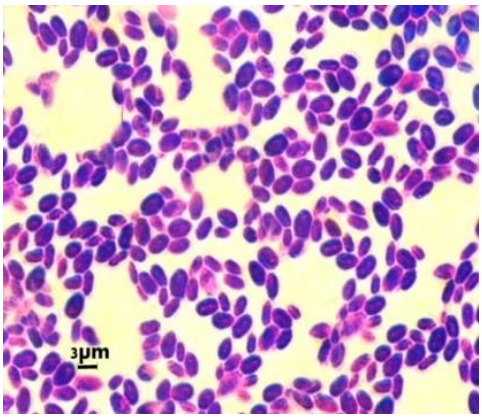


شکل ۱) ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی سویه *ساکارومایسس سرویزیه* سویه YG3-1 در محیط های کشت اختصاصی به‌ترتیب: SDA (A1، CHA (A2، CMA (A3

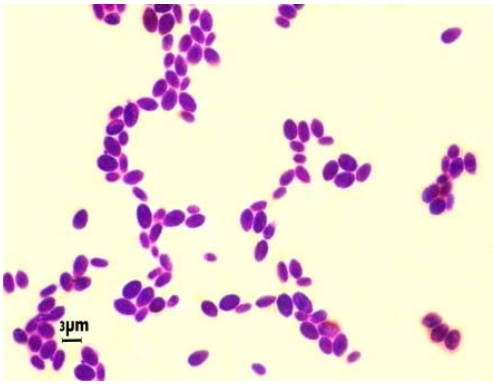
شکل ۲) ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی *ساکارومایسس سرویزیه* سویه LN در محیط‌های کشت اختصاصی به‌ترتیب: SDA (B1، CHA (B2، CMA (B3



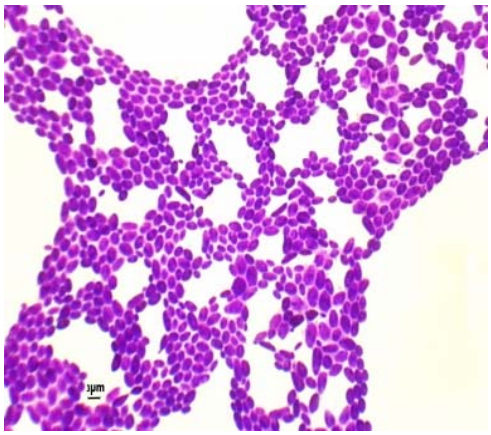
شکل ۳) ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی سویه *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط‌های کشت اختصاصی به‌ترتیب: C1) SDA، C2) CHA، C3) CMA



S.cerevisiae strain YG3-1



Saccharomycescerevisiae



S.cerevisiae strain LN

شکل ٤) بررسی بیومتری کلنی‌های مخمری توسط میکروسکوپ نوری

بررسی رشد سویه‌های مخمری: بررسی رشد سویه‌های فوق پس از کشت در محیط‌های کشت اختصاصی مخمر با دو روش اندازه‌گیری وزن خشک بیومس و روش مستقیم با شمارش با لام نئوبار انجام شد. نتایج حاصل از مقایسه تاثیر محیط‌های کشت مخمری در ذیل ارایه شده است:

جدول ۳ نتایج حاصل از بررسی رشد سویه *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط‌های کشت اختصاصی را نشان می‌دهد. براساس این نتایج بهترین رشد در محیط کشت YPAD دیده شد که اختلاف معنی‌داری بین تعداد سلول‌های این سویه مخمری در محیط کشت فوق با بقیه محیط‌های کشت وجود داشت ($p<0.05$؛ نمودار ۱.

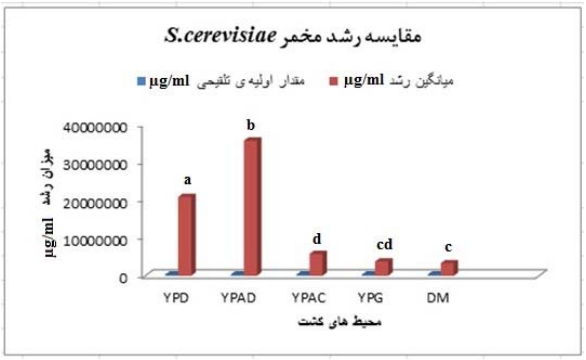
جدول ٤ نتایج حاصل از بررسی رشد سویه ساکارومایسس سرویزیه سویه LN در محیط های کشت اختصاصی را نشان می دهد. براساس این نتایج بهترین رشد در محیط کشت YPAD دیده شد که اختلاف معنی داری بین تعداد سلول های این سویه مخمری در محیط کشت فوق با بقیه محیط های کشت وجود داشت ($p<0.05$، نمودار۲).

پس از کشت سویه *ساکارومایسس سرویزیه* سویه YG3-1 بررسی رشد آن در محیط‌های کشت اختصاصی صورت پذیرفت (جدول ۵). براساس این نتایج بهترین رشد در محیط کشت YPAD دیده شد که اختلاف معنی‌داری بین تعداد سلول‌های این سویه مخمری در محیط کشت فوق با بقیه محیط‌های کشت وجود داشت $p<0.05$؛ نمودار ۳).

جدول ۳) میانگین آماری تعداد مخمر سویه *ساکارومایسس سرویزیه* رشدیافته در انواع محیط‌های کشت اختصاصی

محیط‌های کشت	تعداد اولیه تلقیحی (میکروگرم/میلی‌لیتر)	میانگین رشد (میکروگرم/میلی‌لیتر)
YPD	۳۱۰۰۰۰	$۲۰\times۱۰^{۶}\pm۰/۵\times۱۰^{۶}$ a
YPAD	۳۱۰۰۰۰	$۳۵\times۱۰^{۶}\pm۱\times۱۰^{۶}$ b
YPAC	۳۱۰۰۰۰	$۵\times۱۰^{۶}\pm۰/۱\times۱۰^{۶}$ d
YPG	۳۱۰۰۰۰	$۳\times۱۰^{۶}\pm۰/۱\times۱۰^{۶}$ cd
DM	۳۱۰۰۰۰	$۳\times۱۰^{۶}\pm۰/٤\times۱۰^{۶}$ c

اعداد در هر ستون با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($p>0.05$).

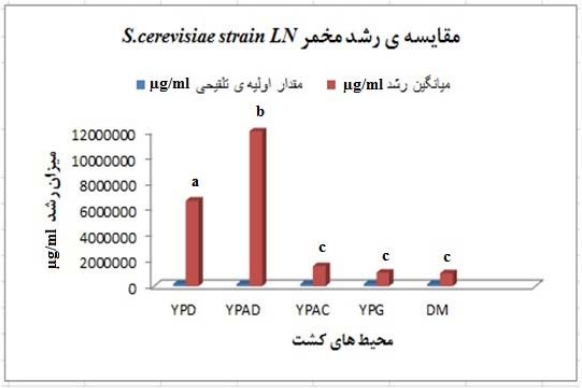


نمودار ۱) مقایسه رشد سویه *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط‌های کشت اختصاصی پس از ٤٨ساعت

جدول ۴) نتایج رشد سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* سویه LN در انواع محیط‌های کشت

محیط‌های کشت	مقدار اولیه تلقیحی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
YPD	۱٦٥۰۰۰	$٦\times۱۰^{۶}\pm۰/۰۵\times۱۰^{۶}$ a
YPAD	۱٦٥۰۰۰	$۱۲\times۱۰^{۶}\pm۰/۲\times۱۰^{۶}$ b
YPAC	۱٦٥۰۰۰	$۱\times۱۰^{۶}\pm۰/۱\times۱۰^{۶}$ c
YPG	۱٦٥۰۰۰	$۱\times۱۰^{۶}\pm۰/٤\times۱۰^{۶}$ c
DM	۱٦٥۰۰۰	$۰/۹\times۱۰^{۶}\pm۰/۰۵\times۱۰^{۶}$ c

اعداد در هر ستون با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند ($p>0.05$).

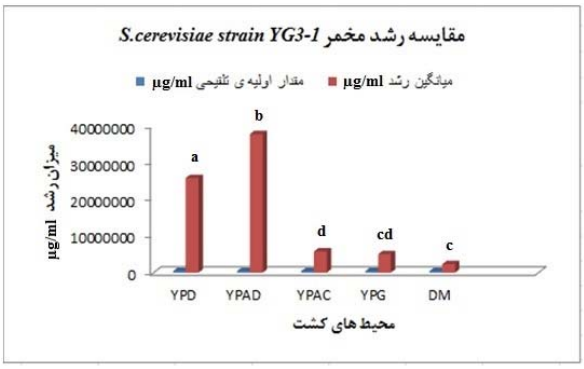


نمودار ۲) مقایسه رشد سویه *ساکارومایسس سرویزیه* سویه LN در محیط‌های کشت اختصاصی پس از ۴۸ساعت

جدول ۵) نتایج رشد سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* سویه YG3-1 در انواع محیط‌های کشت

محیط‌های کشت	مقدار اولیه تلقیحی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میانگین رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
YPD	٤١٥٠٠٠	۲۵×۱۰^۶±۰/۱×۱۰^۶a
YPAD	٤١٥٠٠٠	۳۷×۱۰^۶±۱×۱۰^۶b
YPAC	٤١٥٠٠٠	۵×۱۰^۶±۰/٤×۱۰^۶d
YPG	٤١٥٠٠٠	۵×۱۰^۶±۰/۵×۱۰^۶cd
DM	٤١٥٠٠٠	۲×۱۰^۶±۰/۱×۱۰^۶c

اعداد در هر ستون با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند (p>۰/۰۵).



نمودار ۳) مقایسه رشد *ساکارومایسس سرویزیه* سویه YG3-1 در محیط‌های کشت اختصاصی پس از ۴۸ساعت

بحث

مخمر جنس ساکارومایسس یکی از پرکاربردترین مخمرهای مورد استفاده در صنایع مختلف بوده که مطالعات وسیعی در این باره صورت گرفته است[27]. از جمله مهم‌ترین ویژگی‌هایی که این مخمر دارد، دارابودن خاصیت پروبیوتیکی است که در صنعت آبزی‌پروری و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دیواره این مخمر حاوی چهار ماکرومولکول عمده شامل مانوپروتئین، بتا (۱-۳) گلوکان، بتا (۱-۶) گلوکان و کیتین بوده که توسط پیوندهای کووالان به هم متصل شده‌اند. در مورد مانوپروتئین‌ها مشخص‌شده که این مولکول‌ها نقش مهمی را در فرآیند اتصال مخمر به مخمر دیگر یا به سطوح مثل بافت‌های انسان، ماتریکس غذایی و تجهیزات پزشکی ایفا می‌کند[28]. مخمر منبع تجاری مهمی به‌منظور به‌دست‌آوردن بتا-گلوکان‌ها، به‌عنوان محرک سیستم‌های ایمنی ماهیان است. در حال حاضر از گلوکان به‌طور گسترده‌ای به‌منظور تحریک و تقویت سیستم ایمنی ماهی استفاده می‌شود[29]. ادامه این تحقیقات نشان داد که سلول لیوفیلیزه‌شده *ساکارومایسس سرویزیه* قادر است در مقایسه با ترکیبات استخراج‌شده از دیواره مانند بتاگلوکان، مانوپروتئین و کیتین پاسخ‌های ایمنی را بیشتر تقویت نماید. بنابراین، این گونه برای اهداف مختلف بیوتکنولوژیکی بسیار مهم و باارزش است. بنابراین کشت آن در مقیاس وسیع برای اهداف ذکرشده بسیار مهم و حائز اهمیت است.

با توجه به این که سویه‌های متنوعی از این جنس در اهداف متنوع بیوتکنولوژیکی در محیط‌های کشت اختصاصی کشت داده می‌شوند بنابراین برای رسیدن به این اهداف بایستی سویه‌ها در مقیاس وسیعی کشت داده شوند. با توجه به این که هر سویه از نظر شرایط تغذیه‌ای منحصربه‌فرد است، پس یافتن محیط کشت مطلوبی که اپتیمم رشد سویه در آن محقق می‌شود، ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون این بررسی صورت نگرفته است بنابراین یافته‌های این تحقیق گام مهمی در پیشبرد اهداف محققین بر خواهد داشت.

مطالعات پیشین انجام‌شده روی کشت مخمرهای مختلف با استفاده از محیط‌های کشت نشان داده است که سویه‌های مختلف مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نیازهای غذایی مختلفی از نظر منابع کربنی شامل گلوکز، گلیسیرول و اتانول دارند[30, 31].

براساس مطالعات انجام‌شده در سال ۱۹۹۳ تنها مخمرهای گزارش‌شده در فلور روده آبزیان کاندیدا و *ساکارومایسس سرویزیه* بودند[32]. اما گونه غالب مخمر در آبزیان آب شور و آب شیرین مخمر قرمز رنگ رودوتورولا است، در حالی که بیشتر تحقیقاتی که در مورد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته است نشان می‌دهد که مخمر *دباریومایسس هنسنی* (*Debaryomyces hansenii*) فلور غالب است. اما سایر محققین اظهار داشتند که مخمرهایی مثل کاندیدا، *ساکارومایسس سرویزیه* و لوکوسپوریدیوم فلور غالب روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هستند[6]. با توجه به این که تاکنون ویژگی‌های دقیق مورفولوژی و میکروسکوپی سویه‌های مخمری در محیط‌های کشت اختصاصی بررسی نشده است، در این تحقیق به این موارد پرداخته شد.

تحقیق حاضر نشان داد که شکل، رنگ، حاشیه و سطح کلنی‌ها در محیط‌های کشت مختلف با یکدیگر متفاوت بوده و این تفاوت‌ها را می‌توان در بررسی میکروسکوپی سویه‌ها در محیط‌های کشت اختصاصی نیز مشاهده نمود. با توجه به تنوع سویه‌های مختلف جنس ساکارومایسس یافت‌شده به‌عنوان فلور روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اپتیمم شرایط رشد این مخمرها در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. این نتیجه حاصل شد که سویه‌های فوق در خصوص استفاده از انواع مختلف محیط‌های کشت، اپتیمم رشد را در محیط YPAD دارند. به نظر می‌رسد با توجه به نیازهای رشد، وجود عصاره مخمر و پپتون در محیط‌های کشت برای رشد بهینه مناسب بوده اما کافی نیستند زیرا این مواد به‌طور مشترک در محیط‌های کشت YPD، YPG و YPAC موجودند (جدول ۱). تامین انرژی مورد نیاز از گلوکز برای رشد و تکثیر سلول‌های مخمر در دو محیط کشت YPD و YPAD در دسترس است اما به نظر می‌رسد تنها عامل موفقیت محیط کشت YPAD برای پرورش موفق سویه‌های مخمری فوق حضور آدنین‌همی‌سولفات موجود در محیط کشت YPAD باشد. بنابراین با توجه به نتایج رشد و نیازهای غذایی سویه‌های مخمری به نظر می‌رسد بین منابع کربنی (گلوکز و استات)، گلوکز به‌عنوان منبع اصلی کربن برای تامین انرژی نسبت به منابع غیرکربنی (گلیسرول) ارجح‌تر بوده و برای رشد به حضور عناصر کمیاب موجود در محیط کشت معدنی (DM) نیاز چندانی ندارند.

نتایج تحقیق فوق امکانات ساده‌ای برای کشت این سویه فراهم آورد که می‌تواند در آینده برای کشت انبوه این گونه از مخمرها در صنایع بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار گیرد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به تنوع گونه‌ای و سویه‌ای مخمرهای روده ماهیان قزل‌آلا و عدم دسترسی به تمامی محیط‌های کشت اختصاصی مخمری اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در آینده استفاده از مخمرهای پروبیوتیک شناسایی‌شده در این تحقیق به‌منظور استفاده در آبزیان دیگر و تثبیت خواص پروبیوتیکی آنها و بررسی اثر سایر مخمرهای فلور روده روی سلامت و بیماری‌زایی آبزیان مطالعه شود. همچنین استفاده از محیط‌های کشت غنی و اختصاصی دیگر و بررسی رشد بهینه تمام گونه‌های مخمری دردسترس، مطالعه شود.

نتیجه‌گیری

این تحقیق نهایتاً توانست دیدگاه جالبی را به دنیای مخمرهای تک‌سلولی فلور روده ماهیان قزل‌آلا باز نماید. غیر از تنوع غیرقابل پیش‌بینی کشف‌شده در خصوص این مخمرها، همچنین نتایج ارزشمند بررسی امکان کشت این مخمرها در محیط‌های کشت ساده آزمایشگاهی می‌تواند در آینده زمانی که کاربردهایی برای این دسته از مخمرها تعریف شود، مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر، حاصل اجرای طرح پژوهشی مصوب دانشگاه ارومیه است. از همکاری کارشناسان محترم پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه دانشگاه ارومیه ، آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی ارومیه، گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد واحد ارومیه و مرکز بهداشت شماره ٦ ارومیه که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تقدیر و تشکر می‌نماییم.

تاییدیه‌اخلاقی: نویسندگان مقاله "بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بهینه رشد سویه‌های ساکارومایسس جداشده از فلور روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی شهرستان ارومیه، با اعلام موافقت خود مبنی بر ارسال این مقاله به نشریه زیست‌فناوری تربیت‌مدرس تهران تعهد می‌نماییم که این مقاله در زمان ارسال برای این نشریه در هیچ نشریه ایرانی یا غیرایرانی در حال بررسی نبوده تا تعیین تکلیف قطعی در این نشریه برای هیچ نشریه ایرانی یا غیرایرانی دیگری ارسال نخواهد شد و خانم *ساناز رحیمی* را از نویسندگان به‌عنوان نویسنده رابط معرفی نموده و وکالت تام ایشان در کلیه امور مرتبط با این مقاله (به‌ویژه انجام اصلاحات احتمالی) نزد نشریه زیست‌فناوری تربیت مدرس را می‌پذیریم.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ساناز رحیمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰%)؛ رامین مناف‌فر (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۰%)؛ آرزو باقری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰%)

منابع مالی: با توجه به این که این پژوهش، طرح مصوب دانشگاه ارومیه بوده است بنابراین تمامی امکانات مالی آن توسط این دانشگاه در بخش مطالعات دریاچه ارومیه، زیر نظر دکتر *رامین مناف‌فر* در اختیار اینجانبان قرار گرفته است.

منابع

1- Delgado JF, Sceni P, Peltzer MA. Salvay AG, De La Osa O, Wagner GR. Development of innovative biodegradable films based on biomass of Saccharomyces cerevisiae. Innovative Food Sci Emerg Technol. 2016;36. 83-91.

2- Mattiazzi M, Petrovič U, Križaj I. Yeast as a model eukaryote in toxinology: A functional genomics approach to studying the molecular basis of action of pharmacologically active molecules. Toxicon. 2012;60(4):558-71.

3- Siwicki AK, Anderson DP, Rumsey GL. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet Immunol Immunopathol. 1994;41(1-2):125-39.

4- Sohrabvandi S, Mousavi SM, Razavi SH, Malganji Sh, Khosravi Darani K, Mortazavian SA. The effect of Saccharomyces strain and fermentation conditions on production of Ma-al-Shaeer. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013;8(3):179-87. [Persian]

5- Mohammadi GR, Mohri M, Ahmadi A. Effect of probiotic (Saccharomyces cerevisiae CNCM I-1079) on blood parameters, growth and health of neonatal Holstein calves. Iran J Anim Sci Res. 2010;2(1):19-32. [Persian]

6- Gatesoupe FJ. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. Aquaculture. 2007;267(1-4):20-30.

7- Andlid T, Juárez RV, Gustafsson L. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (Salmo gairdneri) and turbot (Scophtalmus maximus). Microb Ecol. 1995;30(3):321-34.

8- Vázquez-Juárez R, Andlid T, Gustafsson L. Cell surface hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. Colloids Surf B Biointerfaces. 1994;2(1-3):199-208.

9- Pozo-Dengra J, Martínez-Rodríguez S, Martínez-Gómez AI, Heras-Vázquez FJL, Rodríguez-Vico F, Clemente-Jiménez JM. Screening of autolytic yeast strains for production of l-amino acids. Enzym Microb Technol. 2006;40(1):46-50.

10- Oura E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism. Biotechnol Bioeng. 1974;16(9):1197-212.

11- Woehrer W, Roehr M. Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. Biotechnol Bioeng. 1981;23(3):567-81.

12- Aksu Z, Dönmez G. Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of Candida tropicalis. Process Biochem. 2005;40(7):2443-54.

13- Skountzou P, Soupioni M, Bekatorou A. Lead (II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. Process Biochem. 2003;38(10):1479-82.

14- Arshad M, Khan ZM, Khalil-ur-Rehman, Shah FA, Rajoka MI. Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. Lett Appl Microbiol. 2008;47(5):410-4.

15- Xandé X, Archimède H, Gourdine JL, Anais C, Renaudeau D. Effects of the level of sugarcane molasses on growth and carcass performance of Caribbean growing pigs reared under a ground sugarcane stalks feeding system. Trop Anim Health Prod. 2010;42(1):13-20.

16- Vu VH, Kim K. High-cell-density fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae KV-25 using molasses and corn steep liquor. J Microbiol Biotechnol. 2009;19(12):1603-11.

17- Beiroti A, Hosseini SN. Production of baker's yeast using date juice. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2007;23(4):746-50.

18- James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics. 1996;144(4):1425-36.

19- Behzadi P, Behzadi E. Apoptosis- triggering effects: UVB-irradiation and Saccharomyces cerevisiae. Maedica (Buchar). 2012;7(4):315-8.

20- Bagheri A, Manaffar R, Rahimi S. First report of Kazachstania sp. intestinal flora of cultured Rainbow trout. J Mar Sci Technol. 2016;14(4):65-74. [Persian]

21- Silva FC, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ. Influence of the diet on the microbial diversity of faecal andgastrointestinal contents in gilthead sea bream (Sparus aurata) andintestinal contents in gold¢sh (Carassius auratus). FEMS Microbiol Ecol. 2011;78(2):285-96.

22- Kellogg JA, Bankert DA, Chaturvedi V. Variation in Microbial Identification System accuracy for yeast identification depending on commercial source of Sabouraud dextrose agar. J Clin Microbiol. 1999;37(6):2080-3

23- Beekwilder J, vanRossu HM, Koopman F. Polycistronic expression of a β-carotene biosynthetic pathway in Saccharomyces cerevisiae coupled to β-ionone production. J Biotechnol. 2014;192(Part B):383-92.

24- Kianipour S, Ardestani ME, Dehghan p. Identification of Candida albicans and Candida dubliniensis Species Isolated from Bronchoalveolar Lavage Samples Using Genotypic and Phenotypic Methods. Adv Biomed Res. 2018;7:66.

25- West TP. Citric acid production by Candida species grown on a soy-based crude glycerol. Prep Biochem Biotechnol. 2013;43(6):601-11.

26- Murray MP, Zinchuk R, Larone DH. CHROMagar Candida as the Sole Primary Medium for Isolation of Yeasts and as a Source Medium for the Rapid-Assimilation-of-Trehalose Test. J Clin Microbiol. 2005;43(3):1210-12.27- Van 27- Mulders SE, Christianen E, Saerens SM, Daenen L, Verbelen PJ, Willaert R, et al. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res. 2009;9(2):178-90.

28- Lagorce A, Hauser NC, Labourdette D, Rodriguez C, Martin-Yken H, Arroyo J, et al. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2003;278(22):20345-57.

29-Velazquez-Carriles C, Macias-Rodríguez ME, Carbajal-Arizaga GG. Immobilizing yeast β-glucan on zinc-layered hydroxide nanoparticle improves innate immune response in fish leukocytes. Fish Shellfish Immunol. 2018;82:504-13.

30- Verduyn C, Stouthamer AH, Alexander Scheffers W, Van Dijken JP. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek. 1991;59(1):49-63.

31- Fast D. Sporulation synchrony of Saccharomyces cerevisiae grown in various carbon sources. J Bacteriol. 1973;116(2):925-30.

32- Bardócz S. The role of dietary polyamines. Eur J Clin Nutr. 1993;47(10):683-90.