مقاله علمی - پژوهشی:

تعیین حداقل غلظت مهاری سولفات روی بر رشد و حداکثر جذب زیستی در پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Candida utilis*

طیب ویسی[۱]، نصراله احمدی فرد[*۱و۴]، بهروز آتشبار کنگرلویی[۲]، امیر توکمه چی[۳]

*n.ahmadifard@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲-گروه اکولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

٤- پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

چکیده

پروبیوتیک‌ها موجودات غیر بیماری‌زا بوده که دارای اثرات مفیدی بر بدن موجودات زنده هستند. همچنین عنصر روی به عنوان یک ریز مغذی دارای خواص مفیدی بوده و برای بدن موجودات زنده ضروری است. پروبیوتیک‌ها و عنصر روی با اثرات هم‌افزایی می‌توانند بر سلامتی موجودات زنده نقش مثبتی داشته باشند. ریز مغذی‌ها با مقادیر کم برای رشد و توسعه موجودات زنده مورد نیاز هستند ولیکن مقادیر زیاد آنها می‌توانند خاصیت سمیت داشته باشند. ریزمغذی‌ها به دو شکل معدنی و آلی در طبیعت یافت می‌شوند که فرم آلی آن سمیت کمتری دارد. باکتری‌ها و قارچ‌ها از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که قادرند مواد معدنی را به فرم آلی تبدیل کنند و خاصیت سمیت آن را کاهش دهند. لذا، در این تحقیق دو پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* و *Candida utilis* انتخاب گردید و توانایی جذب و تجمع ماده معدنی روی و میزان رشد میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از ۹ غلظت مختلف سولفات روی شامل ۰/۰۵، ۰/۲، ۵، ۱۰،۱۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مول بر لیتر استفاده گردید. براساس نتایج، مهار رشد پروبیوتیک *L. acidophilus* و *C. utilis* به‌ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰ و بالاتر از ۵۰ میلی‌مول بر لیتر به‌دست آمد. بیشترین و کمترین میزان جذب روی در *L. acidophilus* به‌ترتیب ۲۳۶۴ و ۴۹۸/۸ قسمت در میلیون و در مخمر *C. utilis* به‌ترتیب ۴۱۸۳۰ و ۱۳۱۷۴ قسمت در میلیون حاصل شد. براساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که هر یک از این دو پروبیوتیک براساس ساختار سلولی دارای ظرفیت‌های خاصی در جذب و تحمل روی هستند. دلیل آن می‌تواند در سازوکار و نحوه عمل و مکانیسم‌های داخل سلولی باشد و باکتری نسبت به مخمر به دلیل وجود دیواره سلولی دارای میزان جذب کمتری است. لذا، باکتری و مخمر انتخابی، از توانایی جذب روی برخوردارند و تحت عنوان پروبیوتیک‌های غنی شده با روی کاربردهای مختلفی در صنعت غذا و دارو دارند.

لغات کلیدی: حداقل غلظت مهاری، سولفات روی، *Lactobacillus acidophilus*، *Candida utilis*

*نویسنده مسئول

مقدمه

اصطلاح پروبیوتیک یک واژه یونانی بوده که به معنی برای زندگی است. پژوهشگران در دهه ۱۹۶۰ اولین بار این واژه را به‌کار بردند و به معنی ترشح مواد به‌وسیله یکسری میکروارگانیسم‌هایی است که رشد سایر میکروارگانیسم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و از این نظر در نقطه مقابل آنتی بیوتیک قرار می‌گیرند (Lilly and Stillwell, 1965). از سویی، پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌هایی که در برقراری تعادل میکروبی روده دخالت دارند نیز تعریف شده‌اند (Parker, 1974). سایرین پروبیوتیک‌ها را فراورده حاوی میکروارگانیسم‌های زنده و مشخص در تعداد کافی می‌دانند که فلور میکروبی را از طریق استقرار در بخشی از بدن میزبان تغییر می‌دهند و بدین‌صورت اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان خواهند داشت (Scherezenmeir and Verse, 2001). به طور کلی، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم های غیربیماری‌زا هستند که در برابر هضم طبیعی مقاومت می‌کنند تا زنده به روده میزبان برسند و در آن‌جا تأثیر مثبتی بر سلامت میزبان داشته باشند (Guarner and Schaafsma, 1998). برخی باکتری‌ها (*Lactobacillus*) و برخی از مخمرها (*Saccharomyces* و *Candida*) به طور گسترده‌ای به عنوان پروبیوتیک، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Buzadzic *et al.*, 2002). در حال حاضر، استفاده از پروبیوتیک‌ها برای محافظت در برابر عفونت‌های روده، بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی موجودات، حفظ تعادل فلور روده، تعدیل سطح کلسترول خون، پیشگیری و مقاومت در برابر تومورهای مختلف مرسوم است (Ren *et al.*, 2011). استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده در حفظ و بهبود وضعیت سلامتی سابقه طولانی دارد و قبل از میلاد مسیح از فراورده‌های تخمیری شیر به عنوان عامل درمان بیماری التهاب معده و روده استفاده نموده‌اند (Bottazzi, 1983). مچنیکوف برنده جایزه نوبل در سال ۱۹۰۰، اولین فرضیه پروبیوتیک‌ها را مطرح کرد که مصرف ماست حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus* منجر به کاهش باکتری‌های تولیدکننده سم در روده و متعاقباً باعث افزایش طول عمر میزبان می‌شود (Metchinkoff, 1907). برخی از سویه‌های باکتری مانند پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* قادرند مواد سمی را به ماده غیر سمی و بی ضرر در طبیعت تبدیل کنند که این سویه از باکتری‌ها در کاهش آلاینده‌های محیط زیست قابل استفاده خواهد بود (Moradi *et al.*, 2021) در دهه ۱۹۳۰ اولین مطالعات بالینی پیرامون پروبیوتیک‌ها انجام پذیرفت و با گذشت زمان مطالعات در نقاط مختلفی از جهان، اهمیت استفاده از پروبیوتیک‌ها را بیشتر نمایان کرد (Kopp-Hoolihan, 2001).

عنصر روی ماده ریزمغذی ضروری برای رشد و سلامت طبیعی انسان و حیوانات است (Arthur and Beckett, 1994). بررسی‌ها نشان می‌دهد که روی ممکن است ایمنی، رشد، عملکرد تولیدمثلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی مقاومت در برابر بیماری‌ها را افزایش دهد (Balcazar *et al.*, 2007). روی با محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های اکسیژن که در طول فعال شدن سیستم ایمنی تولید می‌شوند، در دفاع آنتی اکسیدانی نقش دارد (McKenzie *et al.*, 1998; Guarner and Schaafsma, 1998). روی جزو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیتوزولی است که با تسریع تغییر شکل آنیون سوپراکسید، از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (Szajewska *et al.*, 2007). علاوه‌براین، روی ممکن است ایمنی را تحریک کند (Zabala *et al.*, 2001). روی معدنی در مقادیر مصرف زیاد سمی است و از سوی دیگر، روی آلی به دلیل ویژگی‌های مفید (سمیت کمتر، خوش طعم بودن، جذب و دسترسی بیشتر و آلودگی کمتر محیطی)، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Jin *et al.*, 2000). در شرایط مناسب، پروبیوتیک‌ها می‌توانند مقادیر زیادی از عناصر کمیاب (سلنیوم، روی و مس معدنی) را جمع‌آوری و به ترکیبات آلی تبدیل کنند. از آن‌جایی‌که روی و پروبیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی عمل می‌کنند، ممکن است ترکیب آنها با یکدیگر اثر هم‌افزایی داشته باشد و در این صورت استفاده از آنها به عنوان مکمل در جیره غذایی موجودات زنده می‌تواند اثرات مفیدی بر ایمنی، رشد و بقاء آنها داشته باشند. در علم میکروبیولوژی، حداقل غلظت مهارکنندگی که تحت عنوان تست MIC شناخته می‌شود، کمترین غلظت یک ماده است که رشد

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

قابل مشاهده یک میکروارگانیسم را بعد از یک شبانه روز انکوباسیون مهار می‌کند و دلیل تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی یک ماده هم به منظور جذب زیستی ماده مورد استفاده و تحمل نسبت به آن در میکروارگانیسم‌هاست (Noshad and Alizadeh, 2019). Alizadeh behbahani و همکاران (۲۰۲۱) حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس *Eucalyptus globulus* بر باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس *E. globulus* برای باکتری‌های *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia col*، *Bacillus subtilis*، *Streptococcus pyogenes* و *Staphylococcus aureus* به‌ترتیب ۸، ۶۴، ۶۴، ۳۲، ۱۶ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس *Eucalyptus* نیز به‌ترتیب ۱۶، ۳۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۱۲۸ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه Haghighi و همکاران (۲۰۱۸) حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری *Streptococcus iniae* در برابر ۲ ماده فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل به‌ترتیب ۰/۳۱۲ و ۰/۰۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. بر اساس نتایج کلی، به لحاظ غلظت‌های مهارکنندگی و کشندگی بین تیمارها، تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید و این نتایج حاکی از اثرات مثبت اسانس *Eucalyptus* بر باکتری‌های مورد نظر بود. در مطالعه Nahali و همکاران (۲۰۱۹) جلبک *Dunaliella* با روی معدنی غنی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد که جلبک *Dunaliella salina* قابلیت بالایی برای جذب زیستی سولفات روی دارد. در مطالعه‌ای مخمر *Saccharomyces cerevisiae* با عنصر روی غنی شد و نتایج نشان داد که مخمر توانایی بالایی در جذب روی معدنی دارد و استفاده از این میکروارگانیسم غنی شده در جیره غذایی روتیفر سبب بهبود شاخص‌های رشد، تولید مثل و ترکیبات بدنی آن می‌شود (Nematzadeh *et al.*, 2018). جلبک‌های *Nannochloropsis* و *Isochrysis* به صورت کوتاه‌مدت با غلظت‌های مختلف روی و سلنیوم غیر آلی، غنی‌سازی شدند. بر اساس نتایج، غنی‌سازی در مدت زمان یک‌ساعت سبب جذب روی و سلنیوم تا غلظت‌های ۹۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر شد (Ghaderpour *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای دیگر، مخمر نانوایی با غلظت‌های مختلف روی آلی و معدنی غنی‌سازی شد. نتایج نشان داد که مخمر با هر دو شکل روی معدنی و روی آلی غنی می‌شود ولی روی سولفات کمترین ممانعت رشد را در مخمر ایجاد می‌کند. همچنین محتوای روی بعد از غنی‌سازی در تیمارهای روی سولفات بیشتر از تیمارهای روی ترئونین بود (Sheykhi *et al.*, 2019). در تحقیقی مشابه با تحقیق حاضر، میزان جذب عنصر روی در باکتری‌های لاکتیک اسید بررسی شد. حداقل غلظت بازدارنده نمک‌های روی در بین سویه‌ها متفاوت بود، اما هرگز کمتر از ۱۵ میلی‌مول بر لیتر نبود. هنگامی که در براث MRS حاوی ۱۰ میلی مول $ZnSO_4$ کشت داده شد، همه سویه‌ها قادر به تجمع روی در محدوده ۱۳۵-۱۱ میکرومول در گرم بودند. بیشترین مقدار روی متصل به سلول در *L. acidophilus WC 0203* به‌دست آمد (Leonardi *et al.*, 2013). در پژوهشی دو سویه پروبیوتیک *L. acidophilus* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* با روی معدنی غنی شد. نتایج نشان داد که این سویه‌ها تحمل زیادی در غلظت بالای روی دارند به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را جذب و قادر به تبدیل روی معدنی به آلی هستند (Malyar *et al.*, 2019). در پژوهشی دیگر، دو سویه پروبیوتیک *L. acidophilus* و مخمر *C. utilis* توانایی بالای در جذب سلنیوم و روی از خود نشان دادند به‌طوری‌که میزان جذب سلنیوم ۱۷۳/۳۵ میکروگرم بر گرم و روی ۴/۳۸ میلی‌گرم بر گرم بود (Ren *et al.*, 2011). در پژوهشی دیگر، میزان غنی‌سازی *Lactobacillus plantarum* با سلنیوم و روی بررسی شد و نتایج این پژوهش نشان داد که در بین سیصد جدایه LAB، سویه *L. plantarum* تحمل بالایی در برابر سلنیوم و روی با بیشترین تولید زیست توده و تجمع زیستی سلنیوم و روی نشان داد (Kang *et al.*, 2020). در پژوهشی تجمع زیستی یون‌های روی در سلول‌های *Lacticaseibacillus rhamnosus* تحت تیمار کشت با میدان الکتریکی پالسی بررسی شد. بر اساس نتایج حداکثر تجمع زیستی یون‌های روی در سلول‌های باکتریایی ۲/۸۵ میلی‌گرم بر گرم به‌دست

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

آمده بود (Goral *et al*., 2019). در مطالعه حاضر، جذب زیستی ماده معدنی روی به‌وسیله پروبیوتیک‌های *L. acidophilus* و *C. utilis* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر غلظت‌های مختلف روی بر رشد پروبیوتیک‌های مذکور ارزیابی و در غلظت مهارکنندگی رشد تعیین گردید.

مواد و روش کار

کشت پروبیوتیک‌ها

دو سویه پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (IBRC-M-11321) و *Candida utilis* (IBRC-M-30072) به صورت کشت روی پلیت از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شده و در محیط‌های اختصاصی کشت داده شدند. برای کشت مخمر از محیط YEPD (۴۰ گرم دی گلوکز،۱۰ گرم پپتون و ۵ گرم عصاره مخمر در یک لیتر) در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری با تنظیم pH در سطح ۸/۵ استفاده شده و بعد از اتوکلاو کشت و سپس به مدت ۲۴ ساعت جهت رشد و تکثیر مخمرها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اقدام به گرمخانه‌گذاری شد (Wang *et al*., 2010). برای کشت باکتری *L. acidiphilus* از محیط آبگوشت MRS (مرک، آلمان) (۲۰ گرم در لیتر دی-گلوکز، ۱۰ گرم در لیترپپتون، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم در لیتر عصاره آبجو، ۵ گرم در لیتر سدیم استات، ۲ گرم در لیتر تری آمونیوم سیترات، ۱ میلی‌لیتر توئین ۸۰، ۰/۵۸ گرم بر لیتر منیزم سولفات ۷ آبه، ۰/۰۵ گرم بر لیتر منگنز سولفات ۴ آبه و ۲ گرم بر لیتر فسفات پتاسیم) در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری با تنظیم pH در سطح ۵/۶ استفاده شده و بعد از اتوکلاو کشت و سپس به مدت ۲۴ ساعت جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اقدام به گرمخانه‌گذاری شد (Ren *et al*., 2011).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی روی

پس از تهیه محیط کشت مخمر و باکتری pH محیط‌ها برابر با ۸/۵ و ۵/۶ به‌وسیله HCL و NaOH تنظیم شد. پس از استریل نمودن محیط‌های کشت، برای کشت پروبیوتیک‌ها استفاده شدند. هر دو محیط کشت در دمای ۲۷/۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار، گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از پلیت استریل ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد استفاده شده که برای هر غلظت سولفات روی سه تکرار در نظر گرفته شد (Carlson *et al*., 2004). در هر چاهک ۱۶۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر از مخمر و باکتری با تراکم نیم مک فارلند ($۱/۵×۱۰^۸$ CFU/ml) اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده سولفات روی با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۲، ۱/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر به همه چاهک اضافه گردید. یک چاهک به عنوان کنترل مثبت شامل مخمر و باکتری و یک چاهک به عنوان کنترل منفی فقط حاوی محیط کشت در نظر گرفته شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور و در دمای ۲۷/۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از مشاهده کدورت چاهک‌ها استفاده گردید و طبق تعریف آخرین چاهکی که در آن کدورت مشاهده شده، به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نیز دو چاهک ما قبل چاهک MIC[1] کشت داده شد (Carlson *et al*., 2004).

تعیین میزان جذب روی به‌وسیله پروبیوتیک‌ها

باکتری *Lactobacillus acidophilus* و مخمر *Candida utilis* در ۲ محیط کشت حاوی روی و فاقد روی کشت شدند. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از محیط‌های حاوی پروبیوتیک به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر برداشت شد و با کمک سانتریفیوژ (در دمای ۴ درجه، به مدت ۱۰ دقیقه و ۶۰۰۰ ×g) توده زیستی (مخمر یا باکتری) غنی شده و غنی نشده برداشت شده و به‌وسیله آب مقطر چند مرتبه شسته شد. بعد از برداشت، توده زیستی با نسبت ۱:۱/۵ (w/v) با اسید HNO_3 با غلظت ۱/۴۴ مول بر لیتر دوباره سوسپانسیون شد و به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. مایع رویی

[1] Minimum inhibitory concentration

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

جمع‌آوری و رسوب دو مرتبه با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد. مایع سطحی و آب‌های شستشو دهنده، مخلوط شده و ۰/۱ میلی لیتر از HNO_3 ۱/۴۴ مول بر لیتر به آن اضافه شد. محلول به‌وسیله آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسید و با فیلتر سلولز استات با اندازه ۰/۲۲ میکرومتر (Millex-GV, Millipore) فیلتر شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان روی سنجیده شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از محلول‌های استاندارد ۰/۱۵-۳۰۰ قسمت در میلیون از روی در اسید نیتریک با غلظت ۲۸۸ میلی مول بر لیتر تهیه شد. روی متصل به سلول به صورت قسمت در میلیون بیان شد (Wang *et al.*, 2009).

شمارش سلول‌های پروبیوتیک

پس از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به منظور شمارش سلول‌های پروبیوتیک، ۵۰ میکرولیتر از محتویات هر چاهک به ۹۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده شده و رقت‌های سریال تا 10^{-8} تهیه گردید. سپس از هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط‌های کشت MRS آگار و سابرودکستروز آگار منتقل و به کمک آنس استریل به طور کامل پخش شد. پلیت‌ها به صورت وارونه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از ۴۸-۲۴ ساعت شمارش پرگنه‌ها به‌وسیله دستگار پرگنه‌شمار انجام گرفت و از رابطه ذیل تعداد کلنی محاسبه شد (Saeed *et al.*, 2009):

$$N = \text{تعداد کلنی} * \text{عکس رقت} * 10 = CFU/mL$$

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تمام داده‌های گروه‌بندی شده با استفاده از نرم افزار SPSS 23ارزیابی شد. قبل از انجام آنالیز نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. در صورت عدم نرمال بودن، داده‌ها تبدیل شد. اختلافات آماری از لحاظ معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با آنالیز t جفتی انجام شد.

نتایج

حداقل غلظت مهارکنندگی روی برای مخمر و باکتری به‌ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول به‌دست آمد (جدول ۱، شکل ۱). در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مواجه و بدون مواجه میانگین تعداد پرگنه مخمر به‌ترتیب ۵/۰۵، ۷/۳۸، ۵/۷۱ و ۴/۲۸، ۳/۹۱ و ۴/۸۴ واحد تشکیل‌دهنده پرگنه در میلی‌لیتر به‌دست آمد که تفاوت معنی‌دار با هم داشتند ($p<0.05$). در مورد باکتری نیز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲۵ ساعت بعد از مواجه و بدون مواجه با روی میانگین تعداد پرگنه‌ها به‌ترتیب ۳/۷، ۲/۱، ۴/۸۷ و ۷/۱۹،۵/۳۷، ۶/۵۹ واحد تشکیل‌دهنده پرگنه در میلی لیتر به‌دست آمد که با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند ($p<0.05$) (جدول ۲). برای اطمینان از نتایج به‌دست آمده رشد مخمر و باکتری و جذب روی غلظت‌های مهارکنندگی (۵۰ میلی‌مول بر لیتر)، قبل از مهارکنندگی (۲۵ میلی مول بر لیتر) و بعد از مهارکنندگی (۱۰۰ میلی مول بر لیتر) در نظر گرفته شد و بر اساس نتایج در مخمر میزان جذب روی به‌ترتیب ۱۳۱۷۴، ۴۱۸۳۰ و ۲۵۰۰۴ قسمت در میلیون به‌دست آمد که تفاوت معنی‌دار داشتند ($p<0.05$) (شکل ۲). بر اساس نتایج به‌دست آمده در باکتری میزان جذب روی در غلظت مهارکنندگی (۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر) ۵۴۴، در غلظت قبل از مهارکنندگی (۵۰ میلی‌مول بر لیتر ۲۳۶۴ و در غلظت بعد از مهار کنندگی (۲۰۰ میلی‌مول بر لیتر) میزان جذب روی ۴۹۸/۸ قسمت در میلیون به‌دست آمد که تفاوت معنی‌داری با هم داشتند ($p<0.05$ ؛ شکل ۳).

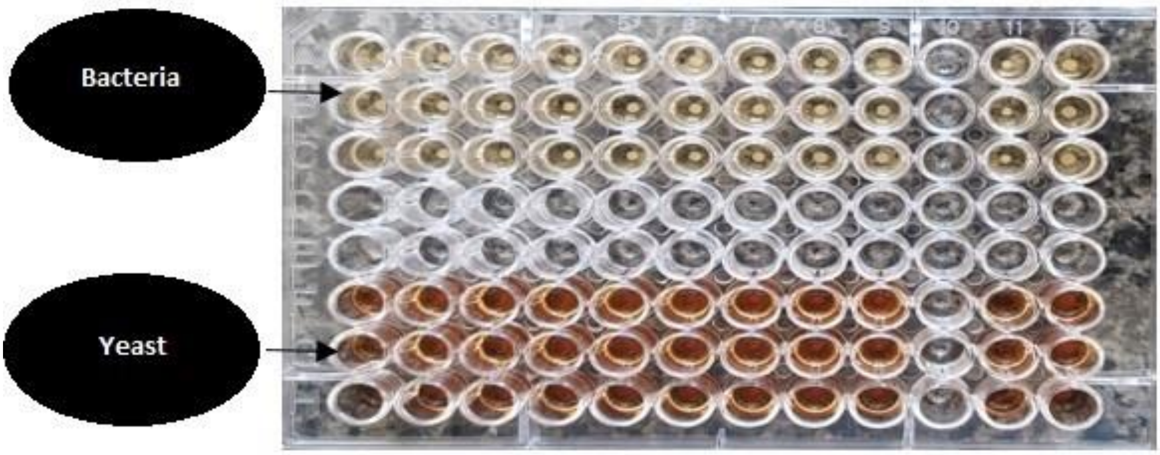
در جدول ۳ میزان همبستگی بین pH و تعداد کلنی در باکتری و مخمر ارائه شده است. بعد از بررسی میزان همبستگی بین پارامترهای مختلف بر اساس نتایج، بیشترین میزان همبستگی بین دو پارامتر تعداد کلنی و pH در دو حالت غنی‌سازی و قبل از غنی‌سازی در باکتری *Lactobacillus acidophilus* و مخمر *Candida utilis* مشاهده شد. در باکتری میزان همبستگی pH و تعداد کلنی در حالت غنی‌شده ۰/۷۵۲ و غنی‌نشده ۰/۶۵۸- و مخمر در حالت غنی‌شده ۰/۰۶۲ - و غنی‌نشده ۰/۱۲۹- مشاهده شد.

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

جدول ۱: بررسی عملکرد رشد و جذب روی کلنی‌های مخمر *Candida utilis* تحت تاثیر pH و زمان

Table 1: Investigating the growth performance and zinc absorption of yeast colonies (*Candida utilis*) under the influence of pH and time

pH	Zinc absorption (ppm)	CFU/mL ($\times 10^7$)	Time	Treatment
3.80	-	4.28	24	Un-enriched Yeast
4.04	-	3.91	48	
3.84	-	4.84	72	
3.33	41830	5.05	24	Enriched Yeast
3.38	13174	7.38	48	
3.51	25004	5.71	72	



شکل ۱: تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی روی در باکتری *L. acidophilus* و مخمر *C. utilis*

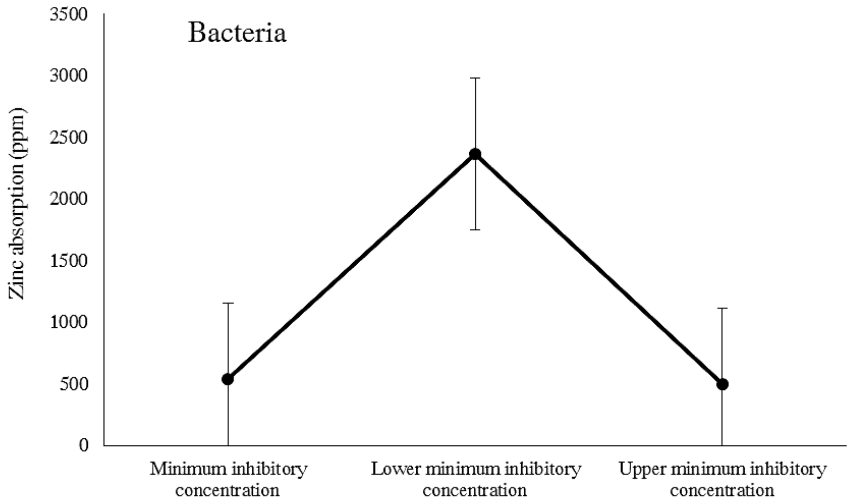
Figure 1: Determination of minimum inhibitory concentration of zinc on *L. acidophilus* and *C. utilis*

جدول ۲: بررسی عملکرد رشد و جذب روی کلنی‌های باکتری *Lactobacillus acidophilus* تحت تاثیر pH و زمان

Table 2: Investigating the growth performance and zinc absorption of bacterial colonies (*Lactobacillus acidophilus*) under the influence of pH and time.

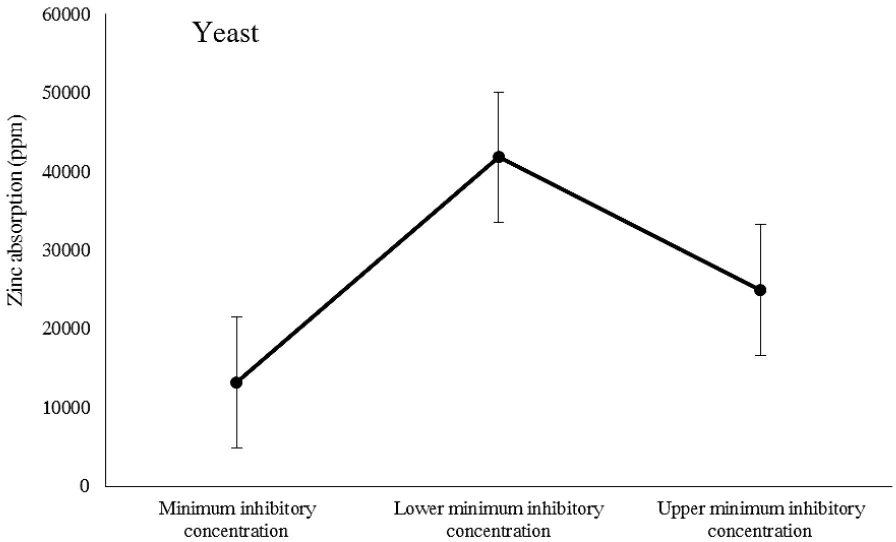
pH	Zinc absorption (ppm)	CFU/mL ($\times 10^7$)	Time	Treatment
3.87	-	7.19	24	Un-enriched Bactria
4.08	-	5.37	48	
3.90	-	6.59	72	
3.73	2364	3.70	24	Enriched Bactria
3.79	544	2.10	48	
3.97	498	4.87	72	

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]



شکل ۲: میزان جذب عنصر روی در باکتری *L. acidophilus* طی سه حالت مختلف تحت تاثیر غلظت محدود کننده

Figure 2: The absorption rate of zinc in *L. acidophilus* during three different conditions under the influence of inhibitory concentration



شکل ۳: میزان جذب عنصر روی در مخمر *C. utilis* طی سه حالت مختلف تحت تاثیر غلظت محدود کننده

Figure 3: The absorption rate of zinc in yeast, *C. utilis,* during three different conditions under the influence of inhibitory concentration

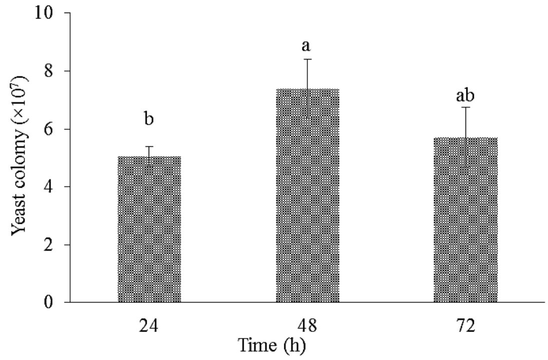
جدول ۳: همبستگی بین pH و تعداد کلنی‌های مخمر *C. utilis* و باکتری *L. acidophilus*

Table 3: Correlation between pH and the number of bacterial *L. acidophilus* and yeast *C. utilis colonies*

	pH	
Probiotic	**Un-enriched**	**Enriched**
Bacteria	-0.685*	0.752**
Yeast	-0.129	-0.062

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

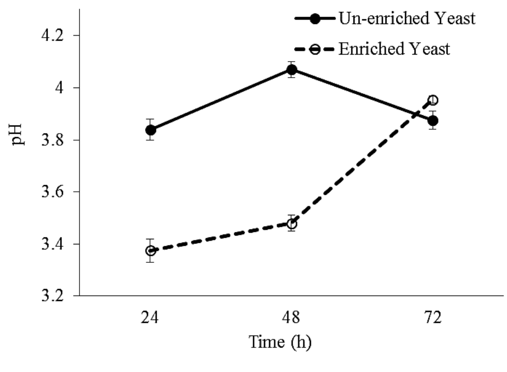
نتایج مربوط به تعداد پرگنه *C. utilis* طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مواجهه در شکل ۴ نشان داده شده است. در مخمرهای غنی‌شده بیشترین تعداد کلنی در زمان ۴۸ ساعت و کمترین مقدار آن در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شده است که بر این اساس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۴: تعداد پرگنه مخمر *C. utilis* در سه زمان مختلف تحت تاثیر غلظت روی محدود کننده

Figure 4: The number of yeast, *C. utilis* cells at three different times under the inhibitory concentration

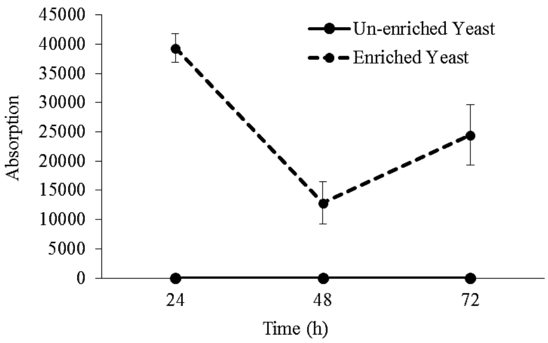
شکل ۵ نتایج رابطه بین زمان و pH در محیط کشت مخمر *C. utilis* غنی ده و غنی‌نشده را نشان می‌دهد. در مخمر غنی‌شده بیشترین میزان pH در ۷۲ ساعت (۳/۹۵) و کمترین آن در ۲۴ ساعت (۳/۳۷) و در مخمر غنی‌نشده بیشترین میزان pH در ۴۸ ساعت (۴/۰۷) و کمترین آن در ۲۴ ساعت (۳/۸) است.



شکل ۵: رابطه بین زمان و pH در مخمر *C. utilis* غنی شده و نشده

Figure 5: The relationship between time and pH in enriched and un-enriched yeast, *C. utilis*

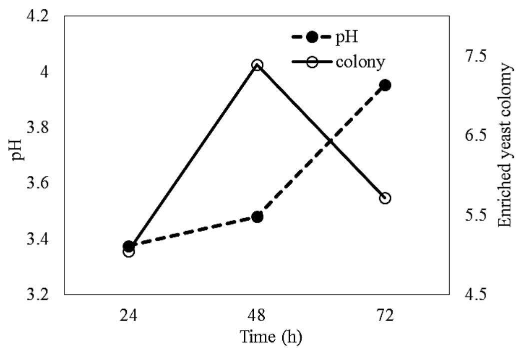
نتایج مربوط به رابطه بین زمان و میزان جذب روی در مخمر *C. utilis* در شکل ۶ نشان داده شده است. در این مخمر بیشترین مقدار جذب روی در زمان ۲۴ ساعت بعد از کشت (۳۹۳۴۰ قسمت در میلیون) و کمترین میزان جذب در ۴۸ ساعت بعد از کشت (۱۲۸۱۳ قسمت در میلیون) مشاهده می‌شود که بر این اساس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۶: رابطه بین زمان و میزان جذب روی در مخمر *C. utilis*

Figure 6: The relationship between time and amount of zinc absorption in yeast *C. utilis*

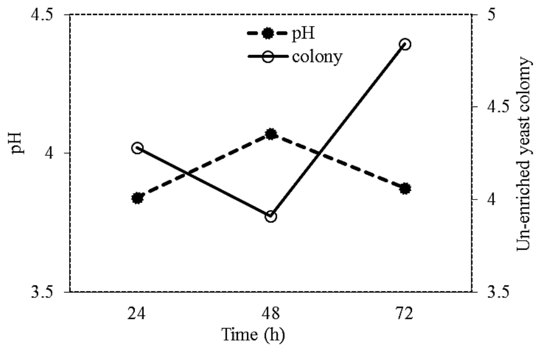
نتایج مربوط به رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در محیط کشت مخمر *C. utilis* غنی شده در شکل ۷ نشان داده شده است. بیشترین تعداد کلنی در زمان ۴۸ ساعت بعد از کشت (۷/۳۸) با pH ۳/۳۸ و کمترین آن در ۲۴ ساعت بعد از کشت (۵/۰۵) با pH ۳/۳۳ مشاهده شده است که بر این اساس بین تیمار ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۷: رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در مخمر *C. utilis* غنی شده

Figure 7: Relationship between time, colony number and pH in enriched yeast

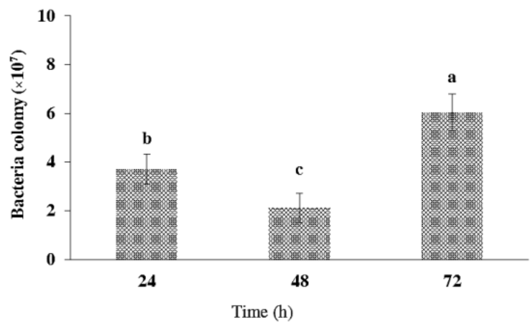
نتایج مربوط به رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در محیط کشت مخمر *C. utilis* غنی‌نشده در شکل ۸ نشان داده شده است. بیشترین تعداد کلنی در زمان ۷۲ ساعت بعد از کشت (۴/۸۴) با pH ۳/۸۴ و کمترین آن در ۴۸ ساعت بعد از کشت (۳/۹۱) با pH ۴/۰۴ مشاهده شده است که بر این اساس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۸: رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در مخمر *C. utilis* غنی نشده

Figure 8: Relationship between time, colony number and pH in unenriched yeast

در شکل ۹ تعداد کلنی باکتری *L. acidophilus* طی زمان‌های ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مواجهه نشان داده شده است. بر اساس نتایج، در مرحله غنی‌سازی بیشترین تعداد کلنی باکتری در زمان ۷۲ ساعت و کمترین مقدار آن ۴۸ ساعت بعد از مواجهه مشاهده شده است که بر این اساس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).

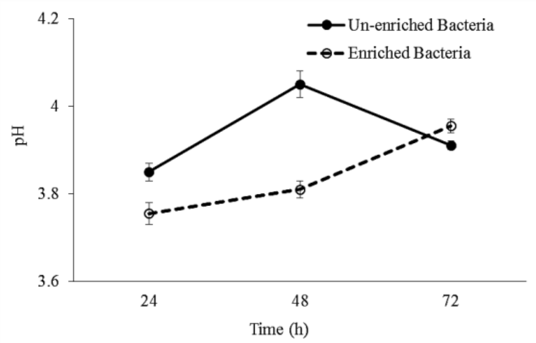


شکل ۹: تعداد کلنی باکتری *L. acidophilus* در سه زمان مختلف تحت تاثیر غلظت روی محدود کننده

Figure 9: The number of bacterial colonies at three different times under the inhibitory concentration

در شکل ۱۰ رابطه بین زمان و pH در باکتری *L. acidophilus* غنی‌شده و غنی‌نشده نشان داده شده است.

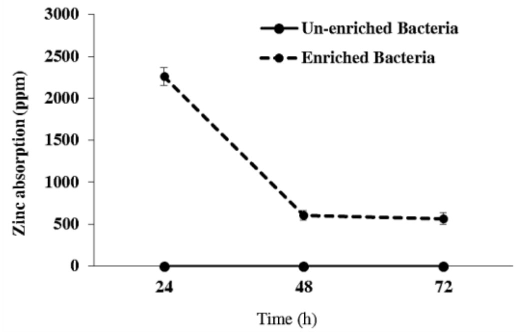
در باکتری‌های غنی‌نشده بیشترین مقدار pH در زمان ۴۸ ساعت و کمترین آن در زمان ۲۴ ساعت قرارگیری در محیط کشت مشاهده شده است. در باکتری‌های غنی‌شده بیشترین مقدار pH در ۷۲ ساعت و کمترین آن در زمان ۲۴ ساعت بعد از کشت است که در دو حالت بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۱۰: رابطه بین زمان و pH در باکتری *L. acidophilus* غنی شده و غنی نشده

Figure 11: Relationship between time and pH in enriched and un-enriched bacteria *L. acidophilus*

نتایج رابطه بین زمان و میزان جذب در باکتری *L. acidophilus* در شکل ۱۱ نشان داده شده است. در باکتری *L. acidophilus* ۲۴ ساعت بعد از کشت بیشترین میزان جذب و در ۷۲ ساعت بعد از کشت کمترین میزان جذب عنصر روی مشاهده شده است که بر این اساس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).

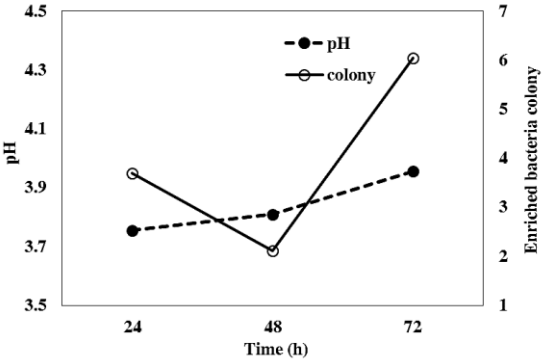


شکل ۱۱: رابطه زمان و میزان جذب روی در باکتری *L. acidophilus* غنی شده و غنی نشده

Figure 11: Relationship between time and amount of zinc absorption in enriched and un-enriched of bacteria *L. acidophilus*

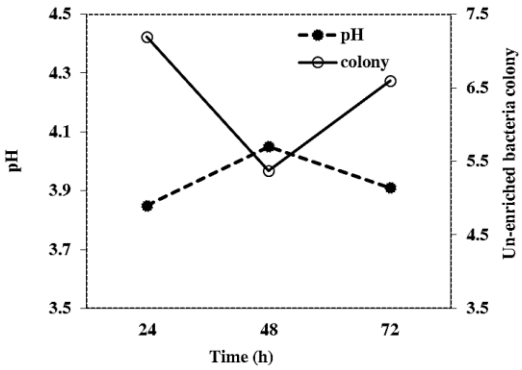
در شکل ۱۲ رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در محیط کشت باکتری‌های غنی‌شده *L. acidophilus* نشان داده شده است. بیشترین تعداد کلنی (۶/۰۴) در زمان ۷۲ ساعت

و در pH ۳/۹۷ و کمترین تعداد کلنی (۲/۱) نیز در زمان ۴۸ ساعت و در pH ۳/۷۹ مشاهده می‌شود.



شکل ۱۲: رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در باکتری غنی شده
Figure 12: Relationship between time, colony number and pH in enriched bacteria *L. acidophilus*

نتایج مربوط به رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در محیط کشت باکتری‌های غنی نشده *L. acidophilus* در شکل ۱۳ نشان داده شده است. بیشترین تعداد کلنی در زمان ۲۴ ساعت بعد از کشت (۷/۱۹) با pH ۳/۸۷ و کمترین آن در ۴۸ ساعت بعد از کشت (۵/۳۷) با pH ۴/۰۸ مشاهده شده است که بر این اساس بین تیمار ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۱۳: رابطه بین زمان، تعداد کلنی و pH در باکتری غنی نشده
Figure 13: Relationship between time, colony number and pH in un-enriched bacteria *L. acidophilus*

بحث

در مطالعه حاضر، تاثیر روی بر میزان رشد و جذب زیستی باکتری *Lactobacillus acidophilus* و مخمر *Candida utilis* بررسی شد. در مخمر *C. utilis* میزان جذب زیستی روی در دامنه ۴۱۸۳۰-۱۳۱۷۴ قسمت در میلیون در نوسان بود. بر اساس نتایج ارتباط معنی‌داری بین میزان جذب روی و حداقل غلظت مهارکنندگی مشاهده نشد. کاربرد استفاده از غلظت مهارکنندگی بررسی میزان تحمل و جذب زیستی موجودات زنده میکروسکوپی از جمله پروبیوتیک‌ها نسبت به مواد مغذی به منظور غنی‌سازی آنها و انتقال این ترکیبات غنی‌شده به موجودات سطوح غذایی بالاتر از طریق اصلاح و تقویت رژیم غذایی آنهاست. بیشترین جذب عنصر روی در مخمر ۲۴ ساعت بعد از مواجه و بیشترین تعداد کلنی ۴۸ ساعت بعد از مواجه مشاهد شد. با افزایش تعداد پرگنه میزان جذب، کمتر گردید و در مقابل با کاهش تعداد پرگنه، میزان جذب افزایش می‌یابد و براین اساس بین میزان جذب و تعداد کلنی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. از نظر زمان مواجه و تعداد پرگنه و میزان جذب ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. غنی‌سازی مواد غذایی، شیوه‌ای برای جبران کمبود ریز مغذی‌هاست تا کمبود مواد مغذی ضروری را به حداقل رسانند یا آن را تحت کنترل درآورند (Malyar *et al.*, 2019). تعداد کلنی‌ها در مخمر غنی‌نشده نسبت به غنی‌شده کمتر بود و بر این اساس، بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. دلیل آن مربوط به تعداد زیاد سلول‌ها و متعاقب آن ظرفیت بالای دیواره سلولی در جذب عنصر روی و جلوگیری از اثرات مخرب آن بر سلول‌هاست که در این حالت تعداد پرگنه‌ها افزایش می‌یابد و بر این اساس تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. گروه‌های کربوکسیلاتی از جمله پروتئین‌ها در مخمرها می‌توانند با روی تشکیل چلات داده و جذب آن را در دیواره سلولی افزایش دهند و ظرفیت تشکیل باند و محل ذخیره‌سازی دیواره سلولی می‌تواند بر جذب و ذخیره‌سازی روی تاثیر بگذارد (Mrvcic *et al.*, 2009). در غلظت قبل از مهارکنندگی میزان جذب روی ۴۱۸۳۰ قسمت در میلیون است که این نشانگر رشد بیشتر سلول‌های مخمر و افزایش ظرفیت دیواره سلولی در ذخیره و جذب روی است و با گذشت زمان و در مرحله مهارکنندگی اثرات مهارکنندگی روی نمایان می‌شود و ظرفیت دیواره سلولی مخمر نیز رفته‌رفته کاهش می‌یابد و با سپری کردن مرحله مهار

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

کنندگی، سلول‌های مخمر بازسازی می‌شوند و دیواره سلولی دوباره آماده دریافت و ذخیره روی می‌گردد. در مرحله بعد از مهارکنندگی و با افزایش رشد سلول‌های مخمر روند جذب روی صعودی شده و به ۲۵۰۰۴ قسمت در میلیون رسیده است. در غلظت بالاتر از مهار کنندگی ممکن است نسبت به غلظت مهارکنندگی و قبل از آن میزان جذب روی افزایش یابد که این بستگی به تعداد سلول‌ها و ظرفیت دیواره سلولی مخمر دارد. بر اساس نتایج می‌توان به این نکته پی برد که بین غلظت مهارکنندگی و میزان جذب روی پیوستگی وجود ندارد. در باکتری *L. acidophilus* میزان جذب روی ۲۳۶۴-۴۹۸/۸ قسمت در میلیون متغیر بود. براساس نتایج به‌دست آمده، ارتباط معنی‌داری بین میزان جذب روی و حداقل غلظت مهارکنندگی مشاهده شد. بیشترین جذب روی در باکتری مورد نظر ۲۴ ساعت بعد از مواجهه به‌دست آمد و بیشترین تعداد پرگنه ۷۲ ساعت بعد از مواجهه مشاهد شد. بر این اساس بین میزان جذب و تعداد پرگنه، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. با گذشت زمان ظرفیت جذب باکتری نسبت به عنصر روی کاهش می‌یابد که بر اساس نتایج، بین زمان در معرض قرار گیری و میزان جذب روی ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. تعداد پرگنه‌ها در باکتری غنی‌نشده نسبت به غنی‌شده بیشتر بود و دلیل آن مربوط اثرات مخرب عنصر روی بر تعداد کلنی باکتری‌های غنی شده است که به دلیل ظرفیت پایین دیواره سلولی در جذب عنصر روی سلول‌ها تخریب شده و از تعداد کلنی‌ها به‌تدریج کاسته شده که بر این اساس تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده گردید. تعداد گروه‌های کربوکسیلاتی از جمله پروتئین‌ها در باکتری‌ها به دلیل تعداد کمتر سلول‌ها و طبیعتاً دیواره سلولی کمتر بسیار پایین است. بنابراین، تشکیل چلات با عنصر روی به‌سختی صورت می‌گیرد و این عامل سبب کاهش جذب دیواره سلولی باکتری می‌شود و تشکیل باند به‌خوبی شکل نمی‌گیرد و اثرات مخرب روی بر کلنی‌ها بیشتر نمایان می‌شود (Poulsen, 1995). در غلظت قبل از مهارکنندگی، میزان جذب روی بیشتر است که این نشانگر رشد بیشتر سلول‌های باکتریایی و افزایش ظرفیت دیواره سلولی در ذخیره و جذب روی حداکثر است و با گذشت زمان و در مرحله مهارکنندگی، اثرات مهارکنندگی روی نمایان می‌شود و ظرفیت دیواره سلولی باکتری نیز رفته‌رفته کاهش می یابد. با سپری کردن مرحله مهار کنندگی، سلول‌های باکتری توانایی بازسازی خود و دیواره سلولی را از دست می‌دهند و ذخیره بیشتر روی با مشکل مواجه می‌شود. پس بر اساس نتایج می‌توان به این نکته پی برد که بین غلظت مهارکنندگی و میزان جذب روی پیوستگی وجود دارد.

Leonardi و همکاران (۲۰۱۳) میزان جذب عنصر روی را در باکتری‌های لاکتیک اسید بررسی کردند. حداقل غلظت بازدارنده نمک‌های روی در بین سویه‌ها متفاوت بود، اما هرگز کمتر از ۱۵ میلی‌مول بر لیتر نبود. هنگامی که در MRS براث حاوی ۱۰ میلی‌مول $ZnSO_4$ کشت داده شد، همه سویه‌ها قادر به تجمع روی در محدوده ۱۳۵-۱۱ میکرو مول در گرم بودند. بیشترین مقدار روی متصل به سلول در *L. acidophilus WC 0203* به‌دست آمد. کشت‌های دسته‌ای با pH کنترل شده از این سویه نشان داد که جذب روی در مرحله رشد شروع شده است، اما بیشتر در طول فاز ثابت رخ می‌دهد. کشت‌های پاستوریزه و زنده مقدار مشابهی از روی را انباشته کردند که نشان می‌دهد یک مکانیسم با واسطه غیر متابولیک در جذب روی دخیل است. این نتایج دیدگاه جدیدی در مورد استفاده خاص از پروبیوتیک‌ها ارائه می‌دهد، زیرا *L. acidophilus WC 0203* می‌تواند به عنوان یک ماتریس آلی برای ترکیب روی فراهمی زیستی روی متصل به *Lactobacillus* مورد بررسی قرار گیرد تا مبنایی در آینده برای بهینه‌سازی مکمل یا تقویت روی ارائه شود. در پژوهش حاضر نیز بیشترین میزان جذب در ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر برای باکتری و ۵۰ میلی‌مول بر لیتر برای مخمر به‌دست آمد به‌طوری‌که جذب در مرحله رشد شروع شد و در طول فاز ثابت، دارای بیشترین مقدار است که با مطالعه Leonardi و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. Malyar و همکاران (۲۰۱۹) دو سویه پروبیوتیک *L. acidophilus* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* را با روی معدنی غنی کردند. نتایج نشان داد که این سویه‌ها تحمل زیادی در غلظت بالای روی دارند به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر را جذب می‌کنند و قادر به تبدیل روی معدنی به آلی هستند. نتایج پژوهش حاضر نیز همسو با

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]

پژوهش Malyar و همکاران (۲۰۱۹) است. در پژوهشی دیگر همسو با پژوهش حاضر، دو سویه پروبیوتیک *L. acidophilus* و مخمر *C. utilis* توانایی بالای در جذب سلنیوم و روی از خود نشان دادند به‌طوری‌که میزان جذب سلنیوم ۱۷۳/۳۵ میکروگرم بر گرم و روی ۴/۳۸ میلی‌گرم بر گرم بود (Ren *et al.*, 2011). در پژوهشی دیگر، میزان غنی‌سازی *Lactobacillus plantarum* با سلنیوم و روی را گزارش کردند که براساس نتایج، در بین سیصد جدایه LAB، سویه *L. plantarum* تحمل در برابر سلنیوم و روی را با بیشترین تولید زیست‌توده و تجمع زیستی سلنیوم و روی نشان داد (Kang *et al.*, 2020). در پژوهش حاضر نیز سویه پروبیوتیک *L. acidophilus* نسبت به تجمع و جذب روی واکنش خوبی نشان داد. در پژوهشی دیگر Goral و همکاران (۲۰۱۹) تجمع زیستی یون‌های روی در سلول‌های *Lacticaseibacillus rhamnosus* تحت تیمار کشت با میدان الکتریکی پالسی را بررسی کردند. بر اساس نتایج، حداکثر تجمع زیستی یون‌های روی در سلول‌های باکتریایی ۲/۸۵ میلی‌گرم بر گرم به‌دست آمده بود. در پژوهش حاضر نیز سلول‌های باکتریایی ظرفیت خوبی برای جذب یون‌های روی از خود نشان دادند. همسو با پژوهش حاضر، در پژوهش Alizadeh behbahani و همکاران (۲۰۲۱) با بررسی اثرات حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس *Eucalyptus globulus* بر باکتری‌ها به این نتیجه دست یافتند که این باکتری‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف این اسانس، واکنش‌های مثبتی نشان می‌دهند. همچنین Nahali و همکاران (۲۰۱۹) با غنی‌سازی جلبک *Dunaliella salina* با روی معدنی نشان دادند که این جلبک از قابلیت بالایی برای جذب زیستی سولفات روی برخوردار است. همسو با پژوهش حاضر، Nematzadeh و همکاران (۲۰۱۸) غنی‌سازی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* را با سولفات روی انجام دادند و به این نتیجه دست یافتند که این مخمر واکنش مثبتی نسبت به جذب روی نشان می‌دهد. عوامل گوناگونی در رشد و جذب سلول‌های مخمر و باکتری از جمله نوع محیط کشت، مدت زمان در معرض قرارگیری، کاربر انجام دهنده، تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده و عوامل محیطی (دما، pH و ...)، می‌تواند تاثیرگذار باشند. ساختار سلولی مخمرها نسبت به باکتری‌ها بسیار پیچیده است و از تعداد سلول‌های زیادی نیز برخوردارند. بنابراین، تعداد دیواره سلولی بیشتری در مخمرها وجود دارد و در این صورت جایگاه ذخیره روی و سایر ترکیبات بالطبع می‌تواند افزایش یابد، ولیکن سلول‌های باکتریایی این خصوصیات را ندارند و میزان جذب روی و سایر ترکیبات در این میکروارگانیسم‌ها نسبت به مخمر بسیار پایین‌تر است.

نتایج حاصل از این پژوهش ظرفیت و تحمل سویه‌های باکتری *L. acidophilus* و مخمر *C. utilis* را در جذب ترکیبات معدنی و کاهش سمیت آنها و تبدیل آنها به ترکیبات آلی و با قابلیت مصرف و اثرگذاری بیشتر، به‌خوبی نمایان کرده است. لذا، در ساخت انواع مختلف جیره‌های غذایی می‌توان از این ترکیبات در کنار یکدیگر به عنوان مکمل استفاده کرد. مطالعه حاضر اولین مطالعه در زمینه تأثیر ماده معدنی سولفات روی به طور هم‌زمان بر فعالیت جذبی پروبیوتیک‌های خوراکی است که از نتایج آن می‌توان با اطلاع از میزان جذب و تبدیل این ماده معدنی به ماده آلی به‌وسیله این پروبیوتیک‌های مفید اقدام به ساخت مکمل‌های غذایی و استفاده از آنها در جیره‌های غذایی انواع موجودات زنده پرورشی و اقتصادی از جمله ماهی‌ها کرد که کمک شایانی به پرورش‌دهندگان می‌کند. علاوه‌برآن، نتایج به‌دست آمده از این تحقیق می‌تواند زمینه تحقیقات بیشتر را در آینده برای استفاده از سایر مواد معدنی و مطالعات تکمیلی جهت تهیه و فرمولاسیون جیره‌های غذایی موجودات زنده فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی، آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

منابع

Alizadeh behbahani, B., Noshad, M. and Sahraiyan, B., 2021. Investigation of the

Ghaderpour, S., Ahmadifard, N., Agh, N., Vahabzadeh, Z. and Estevez, A., 2021. Short-term enrichment of microalgae with inorganic selenium and zinc and their effects on the mineral composition of microalgae and marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture Nutrition*, 27(6):2772–2785. DOI:10.1111/anu.13406

Góral, M., Pankiewicz, U., Sujka, M. and Kowalski, R., 2019. Bioaccumulation of zinc ions in Lactobacillus rhamnosus B 442 cells under treatment of the culture with pulsed electric field. *European Food Research and Technology*, *245*(4), pp.817-824. DOI:10.1007/s00217-018-3219-9

Guarner, F. and Schaafsma, G.J., 1998. Probiotics. *International Journal Food Microbiology*, 1998; 39(3):237–238. DOI:10.1016/S0168-1605(97)00136-0.

Haghighi, M., Pourmolaee, B., Eshraghee, H. and Hamidi M., 2018. In vitro evaluation of the susceptibility of *Streptococcus iniae*, etiological agent of *streptococcusis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to florfenicol and nano-florfenicol. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27 (2):23-31. DOI:10.220092/ISFJ.2018.116693

Jin, L.Z., Marquardt, R.R. and Baidoo, S.K., 2000. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *Journal Science Food Agriculture*, 80:619–624. DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<619::AID-JSFA583>3.0.CO;2-7

minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of *Eucalyptus globulus* essential oil on pathogenic and food-born bacteria. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 110(18):49-57 (in Persian)

Arthur, J.R. and Beckett, G.J., 1994. Newer aspects of micronutrients in at risk groups: metabolic roles for selenium. *Proceeding of the Nutration Society*, 53(3)15–624. DOI:10.1079/PNS19940070

Balcazar, J.L., de Blas, I. and Ruiz-Zarzuela, I., 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97(3):522–527. DOI:10.1017/S0007114507432986.

Bottazzi, V., 1983. Food and feed production with microorganism (Biotechnology). Verlag Chemie 631 P.

Buzadzic, B., Korac, B. and Lazic T., 2002. Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues. *Food Researcher International*, 35(2-3):217–220. DOI:10.1016/S0963-9969(01)00187-9.

Carlson, M.S., Boren, C.A. and Wu, C., 2004. Evaluation of various inclusion rates of organic zinc either as polysaccharide or proteinate complex on the growth performance, plasma, and excretion of nursery pigs. *Journal Animal Science*, 82(5):1359–1366. DOI:10.2527/2004.8251359x.

Kang, S., Li, R., Jin, H., You, H.J. and Ji, G.H., 2020. Effects of Selenium- and Zinc-Enriched *Lactobacillus plantarum* SeZi on Antioxidant Capacities and Gut Microbiome in an ICR Mouse Model. *Antioxidants*, 9(10), 1028. DOI:10.3390/antiox9101028.

Kopp-Hoolihan, L., 2001. Prophylactic and therapeutic role of probiotics: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(2):229-241. DOI:10.1016/S0002-8223(01)00060-8.

Leonardi, A., Zanoni, S., Lucia, M.D., Amaretti, A., Raimondi, S. and Rossi, M., 2013. Zinc Uptake by Lactic Acid Bacteria. *ISRN Biotechnology*, 312917:1-5. DOI:10.5402/2013/312917.

Lilly, D.M. and Stillwell, R.H., 1965. Probiotics, Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147:747-748. DOI:10.1126/science.147.3659.747.

Malyar, R.M., Enayatullah, H., Hou, L.H., Farid, R.A. and Liu, D., 2019. Zinc-enriched probiotics enhanced growth performance, antioxidant status, immune function, gene expression, and morphological characteristics of Wistar rats raised under high ambient temperature. *Biotechnology*, 9(291):1-12. DOI:10.1007/s13205-019-1819-0.

McKenzie, R.C., Rafferty, T.S. and Beckett, G.J., 1998. Selenium: an essential element for immune function. *Immunology Today*, 19:342–345. DOI:10.1016/S0167-5699 (98)01294-8.

Metchinkoff, E., 1907. The prolongation of life, Optimistic studies. Butterworht Heinemann, Lonon. 384 P. DOI:10.1007/978-94-011-2364-8-1.

Moradi, F., Ahmadifard, N. and Tokmechi, A., 2021. The effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on reduction of toxicity of diazinon to *Artemia franciscana* nauplii. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 30(3):25-38. DOI:10.22092/ISFJ.2021.124371

Mrvcic, J., Prebeg, T., Barisic, L., Stanze, D., Bacun-Druzina, V. and Stehlik-Tomas, V., 2009. Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 47(4):381–388.

Nahali, sh., Ahmadifard, N., Agh, N. and Samadi, N., 2019. Enrichment of *Dunaliella salina* and *Artemia parthenogenetica* with Mineral Zinc. *Journal of Oceanography*, 10(39):55-62 (in Persian)

Nematzadeh, K., Ahmadifard, N., Samadi, N., Agh, N. and Ghaderpour, S., 2018. The effects of zinc-enriched Saccharomyces cerevisiae on the growth and mineral composition of marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Aquatic Biology*, 6(2):88-94. DOI:10.22034/ijab.v6i2.443

Noshad, M. and Behbahani, A.B., 2019. Investigation of phytochemical compounds, antioxidant potential and the antimicrobial effect of Bergamot essential oil on some pathogenic strains causing infection in vitro. *Journal of Ilam University of Medical*

Sciences, 26(6):122-32. [in Persian]. DOI:10.29252/sjimu.26.6.122

Parker, R.B., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutration Health*, 29:4-8. DOI:10.014898669

Poulsen, H.D., 1995. Zinc oxide for weanling piglets. Acta Agriculture Scand Section A Animal Science; 45:159–167. DOI:10.1080/09064709509415847.

Ren, Z., Zhiping Zhao, Z., Wang, Y. and Huang, K., 2011. Preparation of Selenium/Zinc-Enriched Probiotics and Their Effect on Blood Selenium and Zinc Concentrations, Antioxidant Capacities, and Intestinal Microflora in Canine. *Biological Trace Element Research*, 141:170–183. DOI:10.1007/s12011-010-8734-x.

Saeed, M., Anjum, F.M., Zahoor, T., Nawaz, H. and Rehman, S.U., 2009. Isolation and fermentation of sourdough. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11:329-332.

Scherezenmeir, J. and De Verse, M., 2001. Probiotics and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 73(2):361S-64S. DOI:10.1093/ajcn/73.2.361s

Sheykhi, F., Ahmadifard, N., Samadi, N. and Nematzadeh, K., 2019. The effect of different concentrations of organic and inorganic zinc on the growth and zinc content in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biological Journal of Microorganism*, 7(28):103-109.

Szajewska, H., Skorka, A. and Ruszczynski, M., 2007. Meta-analysis: Lactobacillus GG for treating acute diarrhea in children. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 25(8):871–881. DOI:10.1111/j.1365-2036.2007.03282.x.

Wang, A.N., Yi, X.W. and Yu, H.F., 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* invitro and its antioxidative effect on growing–finishing pigs. *Journal Application Microbiology*, 107(4): 1140–1148. DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04294.x.

Wang, Z., Zhang, L. and Tan T., 2010. High cell density fermentation of Saccharomyces cerevisiae GS2 for selenium-enriched yeast production. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(6):1836-40. DOI:10.1007/s11814-010-0300-x

Zabala, M.R., Martin, A.L. and Haza, L., 2001. Anti-proliferative effect of two lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of a myeloma cell line. *Letters Applied Microbiology*, 32(4):287–292. DOI:10.1046/j.1472-765X.2001.00910.x.

Determination the minimum inhibitory concentration of zinc sulfate on growth and maximum biosorption in probiotics, *Lactobacillus acidophilus* and *Candida utilis*

Weisi T.[1]; Ahmadifard N.[1,4*]; Atashbar Kangarloei B.[2]; Tukmechi A.[3]

*n.ahmadifard@urmia.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Ecology and Biotechnology, Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
3- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
4- Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Probiotics are non-pathogenic microorganisms that have beneficial effects on living organisms. Also, zinc as a micronutrient has useful properties and is essential for the body of living organisms. Probiotics and zinc can have a positive role in the health of living organisms with their synergistic effects. Small amounts of micronutrients are needed for the growth and development of living organisms, but large amounts of them can be toxic. Micronutrients are found in nature in two forms, inorganic and organic, which the organic form is less toxic. Bacteria and fungi are among the microorganisms that can convert minerals into organic forms and reduce their toxicity. Therefore, in this study, two probiotics, *Lactobacillus acidophilus* and *Candida utilis*, were selected and their ability to absorb and accumulate mineral zinc as well as the growth rate of the microorganisms were investigated. For this purpose, 9 different concentrations of zinc sulfate including 0.05, 0.2, 15, 10, 5, 25, 50, 75, and 100 mmol/l were used. Based on the results, the growth inhibition of *L. acidophilus* and *C. utilis* probiotics was obtained at 100 and above 50 mmol/L, respectively. The highest and lowest amounts of zinc absorption in *L. acidophilus* were 2364 and 498.8 ppm, respectively, and in *C. utilis* were 41830 and 13174 ppm, respectively. Based on the findings of the present study, it can be concluded that each of these two probiotics has specific capacities in zinc absorption and tolerance based on their cellular structure. The reason for that can be in the mechanism and mode of action and intracellular mechanisms and bacteria have a lower absorption rate than yeast due to the presence of a cell wall. Therefore, the selected bacteria and yeast can absorb zinc and they have various applications in the food and drug industry as a zinc-enriched probiotics.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, Zinc sulfate, *Lactobacillus acidophilus*, *Candida utilis*

*Corresponding author

[DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.6.9]