

Molecular screening and identification of indigenous bacteria producing carotenoid pigments and comparing their biological effects with pigments extracted from plants (pomegranate, beetroot, and barberry)¹

Neda Chitsaz

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qo.C., Islamic Azad University, Qom, Iran.
Neda.chitsaz2000@gmail.com

Mehrdad Memarian

Department of Microbiology, Qo.C., Islamic Azad University, Qom, Iran (**Corresponding author**).
mehr.memarian@yahoo.com

Ali Javadi

Department of Microbiology, Qo.C., Islamic Azad University, Qom, Iran.
alijavadi1388@gmail.com

Abstract

The use of natural pigments as alternatives to chemical drugs in controlling bacterial growth has attracted much attention. This study aimed to identify indigenous bacteria producing carotenoid pigments and compare the effects of these pigments with those extracted from pomegranate, beet, and barberry plants. Fifty soil samples were collected from different areas of Qom farms. Actinomycetes isolates were selected using SCA-specific culture medium and biochemical methods. Pigment-producing isolates were identified using ISP2 culture medium, and methanol extracts of their plant and bacterial pigments were extracted. The type of bacterial pigment was determined using Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR). The antibacterial and antioxidant effects of bacterial and plant pigments were evaluated. The best isolate was molecularly identified using the 16s rRNA gene identification. The obtained data revealed that the extracted bacterial and plant pigments have significant antioxidant effects, and the bacterial pigment also showed a growth inhibitory effect against pathogens *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with a halo diameter of more than 30 mm. Sequencing of the selected bacteria showed that the obtained isolate has 100% similarity to *Streptomyces gramineus*. This study shows that the carotenoid pigments produced by the native bacteria and evaluated plants have strong antioxidant effects and can be used in therapeutic processes or as food additives. It is suggested that further studies be conducted to identify the active compounds of these pigments and investigate the precise mechanisms of their action.

Keywords: Pigment, Bacteria, Actinomycetes, Isolation, Molecular Identification

¹ Received: 2024/07/02 ; Revised: 2024/09/15 ; Accepted: 2024/11/17 ; Published online: 2024/12/22



غربالگری و شناسایی مولکولی باکتری های بومی تولیدکننده رنگدانه کارتئونیدی و مقایسه اثرات زیستی آنها با رنگدانه های استخراج شده از گیاهان (انار، چغندر و زرشک)^۲

ندا چیت ساز

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. Neda.chitsaz2000@gmail.com

مهرداد معماریان

گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (نویسنده مسئول). mehr.memarian@yahoo.com

علی جوادی

گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. alijavadi1388@gmail.com

چکیده

استفاده از رنگدانه های طبیعی به عنوان جایگزین ها برای داروهای شیمیایی در کنترل رشد باکتری ها توجه زیادی را جلب کرده است. هدف از این پژوهش، شناسایی باکتری های بومی تولیدکننده رنگدانه های کارتئونیدی و مقایسه اثرات این رنگدانه ها با انواع استخراج شده از گیاهان انار، چغندر و زرشک است. تعداد ۵۰ نمونه خاک از مناطق مختلف مزارع شهر قم جمع آوری شد. با استفاده از محیط کشت اختصاصی SCA و روش های بیوشیمیایی جدایه های اکتینومایست انتخاب شدند. جدایه های مولد رنگدانه با استفاده از محیط کشت ISP2 شناسایی و عصاره متانولی رنگدانه های گیاهی و باکتریایی آنها استخراج شد. با استفاده از FT-IR نوع رنگدانه باکتریایی شناسایی شد. اثرات ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی رنگدانه های باکتریایی و گیاهی ارزیابی شد. بهترین جدایه با استفاده از شناسایی ژن 16s rRNA شناسایی مولکولی شد. داده های بدست آمده مشخص کرد که رنگدانه های باکتریایی و گیاهی استخراج شده اثرات ضد اکسیدانی قابل توجهی دارند و همچنین رنگدانه باکتریایی اثر مهارتی رشد علیه پاتوژن های استافیلوکوکوس/اورئوس و/شرشیا کلی با قطر هاله بیش از ۳۰ میلی متر از خود نشان داد. تعیین توالی باکتری منتخب نشان داد که جدایه بدست آمده شباهت ۱۰۰ درصدی به استرپتومایسس گرمیتوس دارد. این پژوهش نشان می دهد رنگدانه های کارتئونیدی تولید شده توسط باکتری های بومی و گیاهان ارزیابی شده، دارای اثرات ضد اکسیدانی قوی هستند و می توانند در فرآورده های درمانی و یا به عنوان افزودنی به مواد خوراکی استفاده شوند. پیشنهاد می شود که مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیبات فعال این رنگدانه ها و بررسی مکانیزم های دقیق اثر آنها صورت گیرد.

واژگان کلیدی: رنگدانه، باکتری، اکتینومایست، جداسازی، شناسایی مولکولی



مقدمه

رنگ‌های (پیگمان‌ها) طبیعی دارای مزایای سلامتی مختلفی از جمله خواص ضد اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی و ضد باکتریایی هستند. رنگ‌های طبیعی از منابع مختلفی از جمله گیاهان، باکتریایی‌ها، حیوانات/حشرات و مواد معدنی به دست می‌آیند. بسیاری از گیاهان حاوی رنگدانه‌های هستند که عامل تولید رنگ‌های طبیعی آنها هستند. افزایش فعلی تولید مواد غذایی صنعتی منجر به افزایش قابل توجهی در میزان ضایعات غذایی شده است. این ضایعات غذایی، به ویژه محصولات جانبی میوه‌ها و سبزیجات، منابع خوبی از رنگدانه‌های طبیعی مانند آنتوسیانین‌ها، بتالین‌ها، کاروتنوئیدها و کلروفیل‌ها هستند که هم رنگی و هم خواص مرتبط با سلامتی دارند. بنابراین بازایی رنگدانه‌های طبیعی از ضایعات غذایی هم به دلایل اقتصادی و هم به دلایل زیست محیطی مهم است. روش‌های مرسوم که برای استخراج رنگدانه‌های طبیعی از ضایعات مواد غذایی استفاده می‌شوند، زمان‌بر، پرهزینه و ناپایدار هستند. علاوه بر این، رنگدانه‌های طبیعی به دماهای بالا و زمان پردازش طولانی مدت حساس هستند که در طی درمان‌های معمولی اعمال می‌شوند (۱). رنگدانه‌های طبیعی امروزه به طور گسترده‌ای به عنوان افزودنی‌های غذایی برای ایجاد رنگ یا بهبود طعم محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این رنگدانه‌ها به دلیل ویژگی‌های متنوع تغذیه‌ای و عملکردی، ترکیبات غذایی قابل توجهی هستند که در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. رنگ بخش اساسی هر ماده غذایی است زیرا بر مقبولیت مصرف کننده از محصولات تأثیر می‌گذارد. اخیراً علاقه مصرف کنندگان به دلیل حاشیه‌های ایمنی بالا به سمت رنگدانه‌های طبیعی به عنوان رنگ‌های خوراکی تغییر یافته است. بسیاری از رنگدانه‌های طبیعی به عنوان ترکیبات زیست فعال با مزایای سلامتی بالقوه شناخته می‌شوند. این ترکیبات کاربردهای مختلفی دارند. در سال‌های اخیر، در صنایع غذایی، کاربرد رنگدانه طبیعی در بسیاری از زمینه‌ها مانند فارماکولوژی و سم شناسی، در صنعت نساجی و چاپ و در صنایع لبنی و ماهی گسترش یافته است، به طوری که تقریباً تمام کلاس‌های اصلی رنگدانه طبیعی حداقل در یک بخش از صنایع غذایی استفاده می‌شود. به دست آوردن رنگدانه‌های قابل استفاده، غیر سمی، سازگار با محیط زیست، ارزان و زیست تخریب پذیر نشان دهنده آینده‌ای است که محققان باید در آن سرمایه گذاری کنند (۲).

رنگ‌های مصنوعی به طور گسترده در صنایع مختلف از جمله مواد غذایی، نساجی، آرایشی و بهداشتی و دارویی استفاده می‌شود. با این حال مشکلات مسمومیت ناشی از رنگدانه‌های مصنوعی باعث تحقیقات شدید در مورد رنگ‌ها و رنگ‌های طبیعی شده است. در میان منابع طبیعی، میکروارگانیسم‌های تولیدکننده رنگدانه پتانسیل امیدوارکننده‌ای برای مقابله با چالش‌های امروزی دارند. علاوه بر این، رنگ‌های طبیعی نه تنها بازارپسندی محصول را بهبود می‌بخشد، بلکه ویژگی‌های دیگری مانند خواص ضد اکسیدانی، ضد سرطانی و غیره را نیز دارند (۳). در سال‌های اخیر پژوهشگران بیشتر به دنبال استفاده از تولیدات میکروارگانیسم‌ها از جمله انواع متابولیت‌ها به علت کاربرد وسیع، تنوع بالا و مزیت دوستدار محیط زیست بودن و قابلیت استفاده در صنایع هستند (۴، ۵). باکتری‌ها به دلایل مختلف رنگدانه تولید می‌کنند. برخی از باکتری‌ها مانند سیانوباکتری‌ها دارای رنگدانه‌های فیکوبیلین برای انجام فتوسنتز هستند. نمونه‌های دیگر برای سوبیه‌های باکتریایی تولید کننده رنگدانه عبارتند از سرتیه



مارسسن^۳ که پرودیوزین تولید می‌کند، استرپتومایسس رنگارنگ^۴ (پرودیگوزین^۵ و اکتینورودین^۶)، کروموباکتور ویولاسوم^۷ (ویلاسین^۸) و تالکالیویبرو ورساتوس^۹ (ناترونوکروم^{۱۰} و کلروناترونوکروم^{۱۱}). این باکتری‌ها را می‌توان از منابع مختلف محیطی مانند آب، خاک، روی گیاه، حشرات و در انسان یا حیوان جدا/کشت/تصفیه کرد (۶).

قربانی و همکاران (۱۳۹۶) به بررسی تأثیر نوع بسته‌بندی، دما و زمان نگهداری بر ویژگی‌های رنگی و بافت سنجی دانه‌های انار آماده مصرف پرداختند. آنها دریافتند که بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده بهترین نوع بسته‌بندی برای حفظ کیفیت دانه‌های انار است (۷). ظهوری و همکاران (۱۳۹۵) در پژوهش خود به مقایسه میزان بازدهی و استخراج ترکیبات رنگی و طبیعی چغندر قرمز با استفاده از روش‌های عصاره‌گیری خیساندن و فراصوت پرداختند. آنها دریافتند که روش فراصوت با حلال آب-تانول بیشترین بازدهی را دارد. این نتیجه نشان می‌دهد که انتخاب روش استخراج مناسب می‌تواند تأثیر زیادی بر میزان و کیفیت رنگدانه‌های استحصال‌ی داشته باشد (۸). چاتوردی و همکاران (۲۰۲۴) به بررسی فعالیت ضد باکتریایی رنگدانه استخراج شده از باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های خاک پرداختند. آنها دریافتند که این رنگدانه‌ها می‌توانند در برابر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا فعال باشند (۹). دیسالو و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی تولید رنگدانه‌های طبیعی و کاربرد آنها در صنایع غذایی، بهداشتی و سایر صنایع پرداختند. آنها تأکید کردند که باکتری‌ها منبع طبیعی رنگدانه‌های متنوع هستند و می‌توانند جایگزین رنگدانه‌های مصنوعی باشند (۲). آگاروال و همکاران (۲۰۲۳) نیز در پژوهش خود به بررسی نقش‌های چندوجهی رنگدانه‌های باکتریایی در بیوتکنولوژی و کاربردهای فارماکولوژیک معاصر پرداختند (۱۰).

رنگ‌های مصنوعی برای دهه‌ها پایه اصلی صنعت رنگدانه بوده‌اند. محققان مشتاق یافتن جایگزینی سازگارتر با محیط زیست و غیر سمی هستند زیرا این رنگ‌های مصنوعی تأثیر منفی بر محیط زیست و سلامت افراد دارند. رنگدانه‌های باکتریایی ممکن است جایگزینی برای رنگدانه‌های مصنوعی باشند. رنگدانه‌های باکتریایی به عنوان متابولیت‌های ثانویه طبقه بندی می‌شوند و عمدتاً به دلیل اختلال در متابولیسم در شرایط استرس‌زا تولید می‌شوند. رنگدانه‌های باکتریایی در حال حاضر به طور گسترده در صنایع دارویی، مواد غذایی، رنگ و نساجی استفاده می‌شود. صنایع داروسازی در حال حاضر از رنگدانه‌های باکتریایی به عنوان جایگزین دارویی برای سرطان و بسیاری از عفونت‌های باکتریایی دیگر استفاده می‌کنند. محبوبیت روزافزون آنها نتیجه کم هزینه، زیست تخریب پذیر، غیر سرطان‌زا و ویژگی‌های مفید برای محیط زیست آنها است (۱۰).

کارتوتوئیدها رنگدانه‌های تتراترپنی هستند که در باکتری‌های فتوسنتزی، برخی گونه‌های باستانی و قارچ‌ها، جلبک‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارند. تا سال ۲۰۱۸ حدود ۸۵۰ کارتوتوئید طبیعی گزارش شده بود. باکتری‌های فتوسنتزی، قارچ‌ها، جلبک‌ها و گیاهان می‌توانند کارتوتوئیدهای جدید را سنتز کنند. کارتوتوئیدها رنگدانه‌های ضروری در اندام‌های فتوسنتزی همراه با کلروفیل‌ها هستند. کارتوتوئیدها همچنین به عنوان محافظ نور، ضد اکسیدان، جذب کننده رنگ و پیش ساز هورمون‌های گیاهی در اندام‌های غیر فتوسنتزی گیاهان عمل می‌کنند. حیوانات قادر به سنتز کارتوتوئیدها

³ *Serratia marcescens*

⁴ *Streptomyces coelicolor*

⁵ Prodigiosin

⁶ Actinorhodin

⁷ *Chromobacterium violaceum*

⁸ Violacein

⁹ *Thiobacillus versutus*

¹⁰ Natronochrome

¹¹ Chloronatronochrome



نیستند، بنابراین آنهایی که در حیوانات یافت می‌شوند یا مستقیماً از غذا جمع می‌شوند یا تا حدی از طریق واکنش‌های متابولیکی اصلاح می‌شوند. بنابراین، کاروتنوئیدهای حیوانی تنوع ساختاری را نشان می‌دهند. کاروتنوئیدها در حیوانات نقش مهمی مانند پیش سازهای ویتامین A، محافظ‌های عکس، ضد اکسیدان‌ها، تقویت کننده‌های ایمنی و کمک به تولید مثل دارند (۱۱).

استفاده از رنگ‌های طبیعی به دلیل کیفیت رنگ‌زای طبیعی به‌دست‌آمده، سازگاری با محیط زیست رنگ‌ها و به حداقل رساندن قابل توجه هزینه‌های فرآوری در حال افزایش است. رنگ‌های طبیعی از قسمت‌های مختلف گیاه مانند پوست، برگ، ریشه، میوه، دانه و گل که حاوی مواد رنگی مانند تانن، فلاونوئیدها، کوئینونوئیدها و غیره است استخراج می‌شود (۱۲). هدف اصلی از انجام این پژوهش غربالگری و شناسایی مولکولی اکتینومیسست‌های بومی تولید کننده رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و مقایسه اثرات زیستی آنها با رنگدانه‌های استخراج شده از گیاهان (انار؛ چغندر؛ زرشک) می‌باشد.

روش کار

جمع آوری نمونه ها

تعداد ۵۰ نمونه خاک به صورت تصادفی از مزارع شهر قم جمع آوری شد. برای جلوگیری از آلودگی با سایر سطوح، نمونه‌های خاک (۱۰۰ گرم) در سه تکرار در عمق ۱۰-۲۰ سانتی‌متر از زیر سایه بان هر گیاه جمع آوری و هر نمونه خاک اجازه داده شد تا در هوا خشک شود، سپس خاک از یک الک ۰.۲ میلی متری الک شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

کشت اولیه نمونه‌ها

با استفاده از روش تهیه رقت سریالی نمونه‌های خاک را تا رقت 10^{-5} آماده سازی کردیم. ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط SCA منتقل و سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. به روش پورپلیت نیز ۱ میلی لیتر از هر رقت را کف پلیت ریخته و روی آن محیط ISP2 و SCA اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در حرارت ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. با توجه به هدف پژوهش برای جداسازی باکتری‌های اکتینومیسست فقط از محیط‌های کشت اختصاصی استفاده شد.

شناسایی اولیه جدایه‌های رشد یافته

بررسی خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی

با استفاده از رنگ آمیزی گرم شکل میکروارگانیسم‌ها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. میکروارگانیسم‌هایی که زیر میکروسکوپ دارای ویژگی‌های اکتینومیسست‌ها (گرم مثبت و آرایش رشته‌ای) بوده را انتخاب و این کلنی‌ها به محیط کشت ISP2 انتقال داده شدند (۱۳).

خصوصیات ماکروسکوپی میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های مختلف آزمایشگاهی حائز اهمیت می‌باشد. در این مرحله کلنی‌های احتمالی که از نظر مورفولوژی با دیگر کلنی‌ها متفاوت بودند و دارای رنگدانه بودند انتخاب شدند. برای این کار میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های ISP2 و SCA کشت داده شدند.

خالص سازی و نگهداری کلنی‌های جدایه‌ها



کلنی‌های تک و احتمالی جدایه‌های بدست آمده مجدداً در محیط SCA استریل کشت داده شد و پس از اطمینان از خالص بودن کشت از نظر ظاهری، باکتری به محیط نگهداری منتقل و برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها، آنها روی محیط TSB کشت داده و به مدت ۱۰ - ۷ روز در دمای ۳۰ - ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و پس از رشد، روی کشت درون لوله‌ها گلیسرول ۲۰٪ استریل ریخته و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد قرار داده شد.

شناسایی اولیه جدایه‌ها

آزمون بیوشیمیایی و افتراقی مطابق با آخرین چاپ کتاب برجی روی کلنی‌های تک و خالص جدایه‌ها شامل تست حرکت، تولید گاز، تجزیه انواع قند و چربی انجام شد (۱۴).

جداسازی اکتینوباکتری مولد رنگدانه

به عنوان بستری برای تخمیر حالت جامد، از برنج شکسته خریداری شده محلی استفاده می‌شود. برای انجام غربالگری اولیه برای جدایه‌های تولید کننده رنگدانه برنج شکسته کاملاً با آب مقطر شسته شده و ۳۰ گرم برنج خرد شده به لیوان اضافه و بطری‌ها بستر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد درون اتوکلاو استریل شد. سه میسلیم اکتینوباکتر (قطر ۵ میلی‌متر) از کشت‌های تازه ۳ روزه روی آگار ISP-2 به داخل بطری تلقیح شدند. هر بطری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز گرماگذاری شد.

استخراج رنگدانه باکتریایی

مطابق روش استاندارد برای استخراج رنگدانه باکتریایی با حلال ابتدا به رسوب باکتری خشک شده ۵ میلی لیتر متانول اضافه و مخلوط شد. رسوب مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در مکان تاریک گرماگذاری شد. این گرماگذاری برای شکستن سلول‌ها و استخراج رنگدانه در نظر گرفته می‌شود. وضعیت تاریک به منظور جلوگیری از تخریب رنگدانه به دلیل کاروتنوئید بودن استفاده می‌شود. رنگدانه‌ها پس از یک ساعت گرماگذاری، با سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا رنگدانه عصاره خام حاصل از استخراج متانولی جدا و به فلاسک تبخیر منتقل شد و با دستگاه روتاری در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد غلیظ شد تا حلال خارج شود. وقتی ۱٪ (v/v) از حجم اولیه باقی مانده و رنگدانه غلیظ شد، داخل پلیت ریخته و در زیر هود بیولوژی به مدت حداقل ۲ ساعت قرار داده شد تا خشک شود. در نهایت رنگدانه خشک شده با تراشیدن جمع آوری و توسط فویل آلومینیومی برای جلوگیری از اکسیداسیون نور پوشیده و سپس لوله حاوی رنگدانه در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۰).

استخراج رنگدانه گیاهی

مطابق روش استاندارد برای استخراج رنگدانه با استفاده از یک حلال مناسب در روش استخراج جامد - مایع، ترکیبات نمونه جامد به دست می‌آیند. برای انتخاب حلال استخراج، ۲۰ گرم میوه خرد شده، در ۲۵ میلی لیتر اتانول و ۲۵ میلی لیتر آب به طور جداگانه، در حال هم زدن روی یک همزن مغناطیسی به مدت سه ساعت خیسانده شد. برای جداسازی نمونه های خرد شده، مخلوط با کاغذ صافی، صاف گردید. عصاره زیر صافی، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد که ۴/۰ میلی لیتر عصاره استخراج شده، با اتانول و آب بطور جداگانه به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد،



سپس ۲۵ میکرولیتر از هر دو عصاره استخراج شده، برداشته و پس از رقیق سازی با ۳ میلی لیتر آب و اتانول بطور جداگانه، جذب آنها اندازه گیری گردید (۱۵).

سنجش اثرات ضد باکتریایی رنگدانه‌ها

اثرات ضد باکتریایی رنگدانه‌ها و جدایه انتخاب شده علیه باکتری‌های *اشرشیا کلی* (ATCC 8739)، *کاندیدا البیکنس* (ATCC 18804)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 10145)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 33591) به روش انتشار در چاهک در محیط مولر هینتون اگر ارزیابی شد. پس از کشت انبوه درون چاهک ۶ میلی متری ۱۰۰ میکرولیتر محلولی رنگدانه متانولی خام ریخته و پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند و نتایج قطر هاله عدم رشد ثبت گردید.

سنجش میزان پایداری رنگدانه‌ها

رنگدانه‌ها به ترتیب در pH دما و قرار گرفتن در معرض نور متفاوت تیمار شدند. برای سنجش پایداری رنگدانه در pHهای مختلف، نمونه روی pH (۲، ۷ و ۱۳) تنظیم شد (با استفاده از 0.01 M HCl و 0.01 M NaOH برای حالت اسیدی و قلیایی). برای پایداری حرارتی، نمونه در ۲۵، ۵۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از شیکر در حمام آب گرماگذاری شد. تغییر رنگ رنگدانه در نور در هر دو شرایط تاریکی و روشنائی به مدت ۴ روز و نظارت روزانه ذخیره شد و تغییرات با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی اثرات ضد اکسیدانی رنگدانه‌ها

جهت آزمایش فعالیت ضد اکسیدانی و اندازه‌گیری میزان توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد توسط متابولیت تولید شده با روش DPPH از ترکیب Diphenyl picrylhydrazyl به روش Tanvir استفاده شد. از ترکیبات ذیل برای این کار استفاده شد؛ ۱- DPPH (diphenyl picrylhydrazyl - ۲ و ۲) (Sigma-Aldrich, USA): برای تهیه DPPH با غلظت ۰/۰۰۴٪، مقدار ۰/۰۰۴ گرم از DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر متانول حل شد.

شناسایی رنگدانه با روش FT-IR

بهترین جدایه تولید کننده رنگدانه برای شناسایی نوع رنگدانه استفاده شد. از دستگاه FT-IR (Rayleigh، چین) برای تعیین ترکیب آلی رنگدانه استخراج شده استفاده شد. برای این منظور از پودر خشک رنگدانه استفاده شد. رنگدانه خشک با KBr مخلوط شده و آنالیز در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ سانتی‌متر در متر مربع با وضوح 8 cm^{-1} انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه مولد رنگدانه

بهترین جدایه تولید کننده رنگدانه انتخاب و برای شناسایی مولکولی استفاده شد. ابتدا کشت ۲۴ ساعته از جدایه مولد رنگدانه در محیط ISP-2 ایجاد شد و سپس با استفاده از روش بویلینگ^{۱۲} استخراج DNA انجام شد (۱۶). واکنش زنجیره ی پلیمرز، با استفاده از پرامیرهای جهانی انجام شد (جدول-۱). ترکیب نهایی واکنش و برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر (PCR) به ترتیب در جدول ۲ و ۳ آورده شده است. پس از انجام آنالیز محصول تولید شده با استفاده ژل آگارز ارزیابی شد و پس از تایید برای توالی

¹² Boiling



یابی به شرکت توپاز ژن (کرج، ایران) ارسال شد. توالی نهایی بدست آمده با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI بررسی و تعیین هویت شد. در نهایت با نرم افزار Mega 7 و با متد Neighbor-joining بر اساس مدل تعداد اختلاف نوکلئوتیدی درختچه فیلوژنتیکی جدایه آنالیز شده رسم شد.

جدول ۱- پرایمرهای جهانی استفاده شده جهت شناسایی جدایه مولد رنگدانه

Primer name	Primer sequence	TM	Size band
27 F	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG- 3'	۵۷°C	۱۵۰۰bp
1492 R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	۵۷°C	

جدول ۲- ترکیب نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

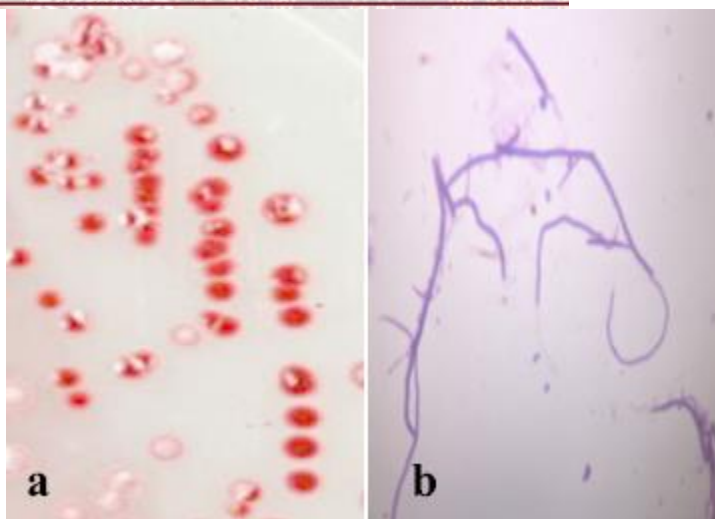
نمونه‌ها	نمونه مجهول (μl)	کنترل منفی (μl)
Master mix	۱۸	۱۸
پرایمر Forward	۱	۱
پرایمر Reverse	۱	۱
آنزیم Taq پلی مراز	۱	۱
DNA	۵	-

جدول ۳- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مراحل	دما (سانتی گراد)	زمان (دقیقه:ثانیه)	چرخه
دناتوره شدن	۹۵	۰۴:۰۰	۱
دناتوره شدن ثانویه	۹۵	۰۰:۳۵	۳۵
آنیلینگ	۵۸	۰۰:۳۵	۱
سنتز یا طویل شدن پرایمر	۷۲	۰۲:۳۰	۱
سنتز یا طویل شدن پرایمر	۷۲	۰۵:۰۰	۱

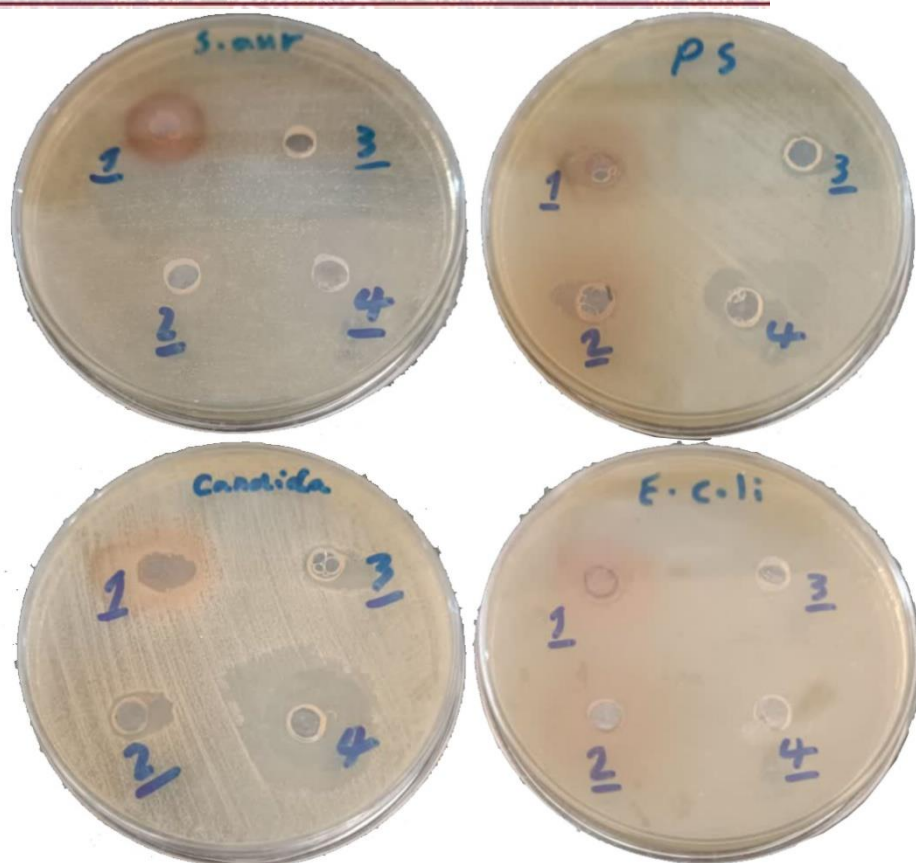
نتایج

در مجموع تعداد ۱۵ جدایه از نمونه‌های خاک بدست آمد. جدایه R2 دارای رنگدانه قرمز جهت ادامه تحقیق انتخاب گردید. شکل ۱- رنگ کلنی و رنگ آمیزی گرم جدایه R2 نمایش داده شده است.



شکل ۱- (a) رنگ کلنی ها، (b) رنگ آمیز گرم جدایه R2

در روش بررسی اثرات ضد باکتریایی رنگدانه به روش انتشار از چاهک فعالیت ضد باکتریایی علیه پاتوژن‌های منتخب با ایجاد هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها و اندازه گیری آن به میلی‌متر بدست آمد. به طوری که چاهک‌های فاقد اثر را صفر، چاهک‌های دارای هاله عدم رشد بین ۶ تا ۱۰ میلی‌متر فعالیت خیلی ضعیف +۱، هاله ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر فعالیت ضعیف +۲، هاله ۱۵ تا ۲۵ میلی‌متر فعالیت متوسط +۳ و هاله بیش از ۲۵ میلی‌متر فعالیت قوی +۴ در نظر گرفته شد. در این روش رنگدانه جدایه **R2** اثرات ضد باکتریایی مناسبی را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* مورد مطالعه نشان داد. هاله عدم رشد عدد بیش از ۳۰ میلی‌متر و اثرات ضد باکتریایی قوی را نشان داد. اثرات ضد باکتریایی بر علیه *کاندیدا آلبیکنس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس* نیز به شکل متوسط مشاهده شد. ولی تمام رنگدانه‌های گیاهی فاقد اثر ضد باکتریایی بودند (شکل-۲).



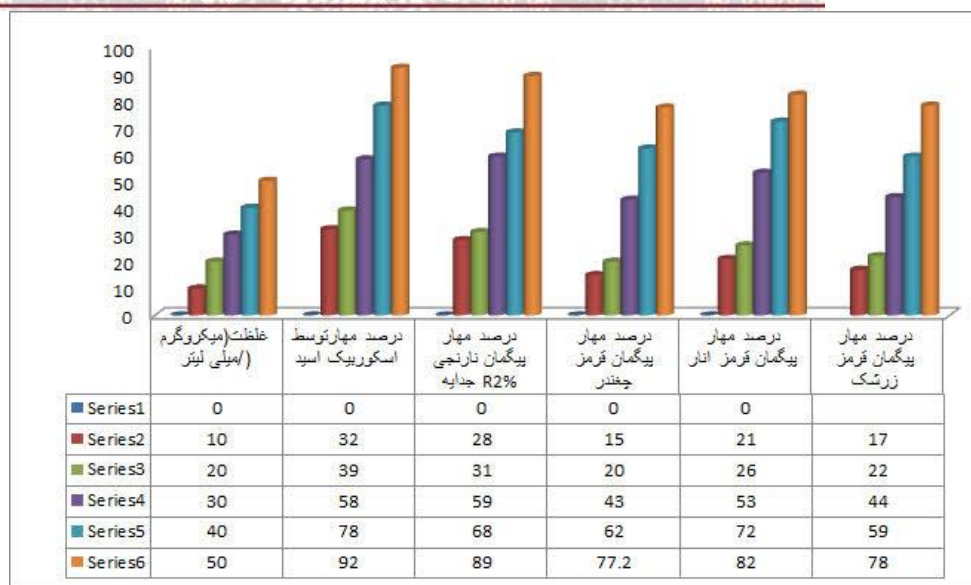
شکل ۲- اثرات ضد باکتریایی رنگدانه‌های گیاهی و جدایه R2 (شماره ۱، رنگدانه انار، شماره ۲ رنگدانه زرشک، شماره ۳ رنگدانه چغندر، شماره ۴ رنگدانه R2)

داده‌های کیفی ارزیابی میزان پایداری رنگدانه‌ها در شرایط مختلف دمایی و نوری متفاوت در شکل ۳- آورده شده است. داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد که رنگدانه‌های استخراج شده در شرایط ارزیابی شده، در pH، دما و قرار گرفتن در معرض نور متفاوت پایدار هستند.



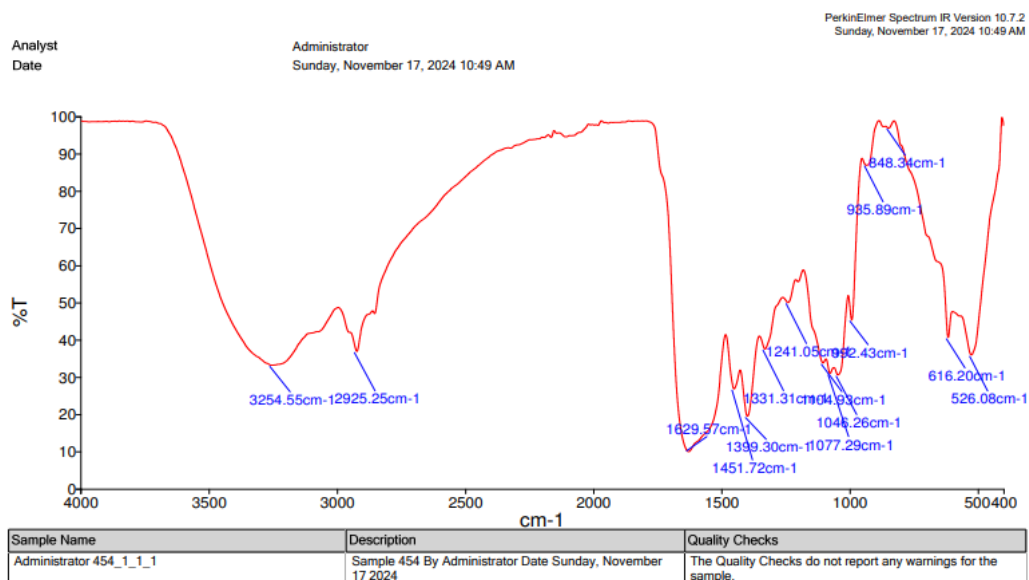
شکل ۳- پایداری رنگدانه‌ها در شرایط مختلف دمایی و نوری

طبق تعریف IC_{50} برحسب $\mu g/mL$ به غلظتی از متابولیت اطلاق می‌شود که در آن ۵۰٪ از رادیکال آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هرچه این غلظت کمتر باشد نشان دهنده این است که ترکیب مورد نظر فعالیت ضد اکسیدانی بیشتری دارد. درصد مهار DPPH رنگدانه‌های مورد نظر در کنار اسکوربیک اسید بدست آمد. در غلظت ۵۰ میکروگرم اسید اسکوربیک ۱۰۰٪ مهار مشاهده شد. در این غلظت ۹۲٪ مهار توسط رنگدانه قرمز جدایه R2 مشاهده شد. در مورد رنگدانه گیاهان نیز ۷۷.۲٪ مهار توسط رنگدانه چغندر، ۸۲٪ مهار توسط رنگدانه انار و ۷۸٪ مهار توسط رنگدانه زرشک مشاهده شد (شکل-۴).



شکل ۴- نمودار اثر مهار کننده گی DPPH توسط آسکوربیک اسید و رنگدانه‌ها

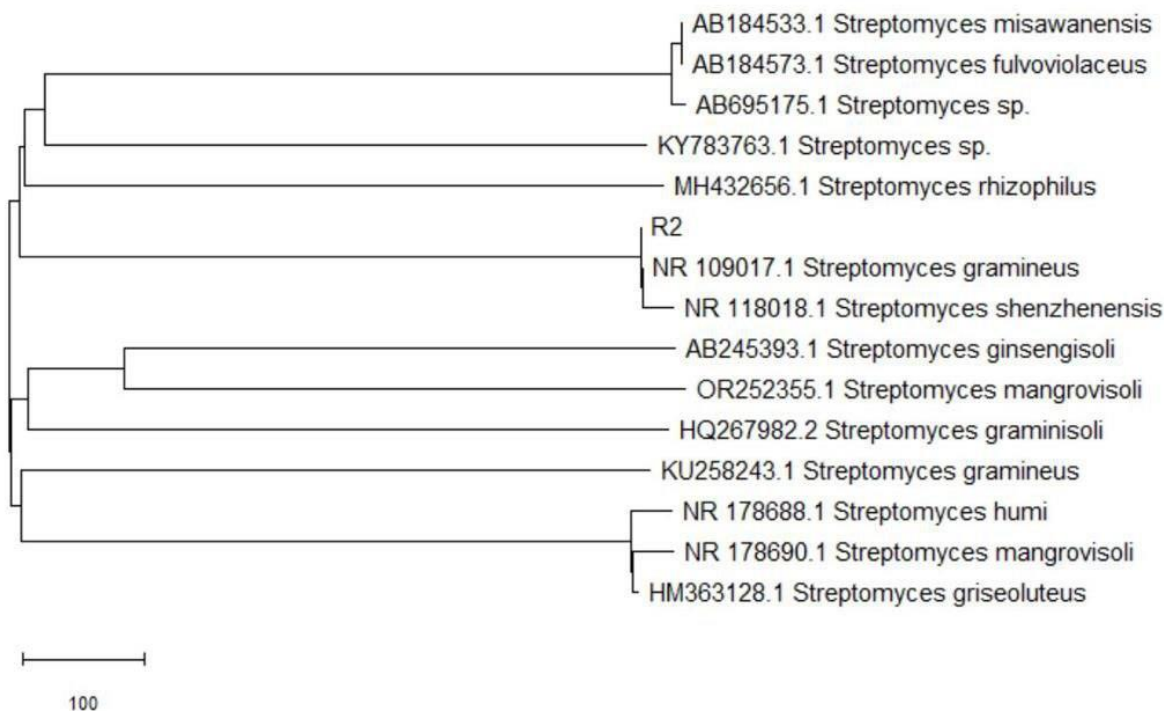
نتایج حاصل از روش FT-IR وجود گروه‌های CH در محدوده ۱۰۴۵.۴۲ و گروه (C=C-) در محدوده ۱۶۳۳.۷۱، گروه CH₃ در محدوده ۲۸۵۶.۵۸ و گروه OH در محدوده ۳۲۷۳.۲۰ را اثبات کرد. تصویر FT-IR نشان دهنده حضور یک کاربنوئید است. رنگدانه استخراج شده از جدایه R2 دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۴۲ نانومتر می باشد (شکل-۵).



شکل ۵- تصویر آنالیز FT-IR رنگدانه استخراج شده جدایه R2



نتایج حاصل از تعیین توالی و درختچه فیلوژنتیک شباهت به خانواده اکتینومیسیت‌ها و جنس/سترپتومیسیت‌ها را نشان می‌دهد. درختچه فیلوژنتیک براساس متد Neighbor Joining به روش اختلاف نوکلئوتیدی رسم گردید که نشان دهند میزان شباهت نوکلئوتید براساس نرم افزار MEGA X می‌باشد. با توجه به اینکه برای این باکتری از پرایمرهای 16srRNA استفاده شد در این شناسایی باکتری شماره R2 با میزان ۱۰۰ درصد به *Streptomyces gramineus* شباهت دارد (شکل-۶).



شکل ۶- درختچه فیلوژنتیک جدایه R2 رسم شده براساس متد Neighbor Joining

بحث

در این پژوهش، باکتری‌های بومی تولید کننده رنگدانه‌های کاروتنوئیدی مورد غربالگری و شناسایی مولکولی قرار گرفتند و اثرات زیستی رنگدانه‌های استخراج شده از این باکتری‌ها با رنگدانه‌های استخراج شده از گیاهان انار، چغندر و زرشک مقایسه شد. تعداد ۵۰ نمونه خاک از مناطق مختلف مزارع شهر قم به صورت تصادفی جمع آوری شد. با استفاده از محیط کشت اختصاصی SCA و روش‌های بیوشیمیایی جدایه‌های اکتینومیسیت جداسازی شدند. جدایه‌های مولد رنگدانه با استفاده از محیط کشت ISP2 شناسایی و عصاره متانولی رنگدانه‌های گیاهی و باکتریایی آنها استخراج شد. با استفاده از FT-IR نوع رنگدانه شناسایی شد. اثرات ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی رنگدانه باکتریایی و گیاهی ارزیابی شد. بهترین جدایه با استفاده از شناسایی ژن 16srRNA شناسایی مولکولی شد. مطابق یافته‌های پژوهش جدایه اکتینومیسیت (R2) توانایی تولید رنگدانه کاروتنوئیدی مطابق آنالیز شناسایی نوع رنگدانه FT-IR با ویژگی ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی با



پایداری بالا در شرایط دمایی، pH و نوری مختلف را دارد. همچنین مشخص شد رنگدانه جدایه بدست آمده توانایی ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی بیشتری از رنگدانه‌های گیاهی آنار، چغند و زرشک مقایسه شده دارد و رنگدانه‌های گیاهی نیز توانایی مشابه‌ای در آنالیزهای انجام شده ندارند.

چاتورودی و همکاران (۲۰۲۴) در پژوهش خود به بررسی فعالیت ضد باکتریایی رنگدانه استخراج شده از باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های خاک پرداختند. آنها دریافتند که این رنگدانه‌ها می‌توانند در برابر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا فعال باشند (۹). این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر در مورد خواص ضد باکتریایی رنگدانه کارتوئیدی جدایه/ستریتومایست همسو است و نشان می‌دهد که باکتری‌های ساکن خاک توانایی تولید رنگدانه‌های کاربردی را دارند.

بررا و همکاران (۲۰۲۳) در پژوهش خود به بررسی رنگدانه‌های طبیعی به عنوان رنگ در محصولات غذایی پرداختند و به ارزیابی آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، کلروفیل‌ها و بتالین‌ها پرداختند. آنها تأکید کردند که صنایع غذایی به دلیل اثرات مضر رنگدانه‌های مصنوعی، استفاده از رنگدانه‌های طبیعی را ترجیح می‌دهند (۱۷). کاریلو و همکاران (۲۰۲۲) نیز در پژوهش خود به بررسی رویکردهای جدید برای بازیابی رنگدانه‌های طبیعی با اثرات بالقوه سلامت پرداختند (۱). این مطالعات نشان می‌دهند که رنگدانه‌های طبیعی، از جمله رنگدانه‌های کارتوئیدی، می‌توانند نقش مهمی در بهبود سلامت انسان داشته باشند.

زرین کوثر و همکاران (۲۰۲۲) در پژوهش خود به تولید خصوصیات و فعالیت ضد باکتریایی رنگدانه از گونه/ستریتومایسس پرداختند. آنها دریافتند که این رنگدانه دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی است (۱۸). پادهان و همکاران (۲۰۲۱) نیز در پژوهش خود به تولید خالص سازی و بهینه‌سازی فرآیند رنگدانه درون سلولی از پانی باسیلوس پرداختند (۱۹). این مطالعات نشان می‌دهند که رنگدانه‌های باکتریایی می‌توانند از منابع مختلفی از جمله/ستریتومایسس و پانی باسیلوس استخراج شوند. در پژوهش حاضر نیز اثرات ضد باکتریایی رنگدانه جدایه/ستریتومایسس بدست آمده بررسی و مشخص شد که اثرات ضد باکتریایی قابل توجه‌ای علیه پاتوژن‌های/استافیلوکوکوس/اورئوس و/اشرشیا کلی دارد.

ناگارجان و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهش خود به استخراج و شناسایی رنگدانه ضد باکتری از سویه *Roseomonas gilardii* YP1 در خاک یرکاد پرداختند. آنها دریافتند که این رنگدانه دارای فعالیت ضد باکتریایی است و می‌تواند به عنوان رنگدانه ضد باکتری بالقوه در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گیرد (۲۰). در پژوهش حاضر نیز اثرات ضد باکتریایی رنگدانه/ستریتومایسس اثبات شد و یافته‌های مشابه در زمینه اثرات ضد باکتریایی هر دو پژوهش نشان می‌دهد که رنگدانه‌های باکتریایی پتانسیل قابل توجه‌ای دارند.

تولی و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهش خود به بررسی رنگدانه‌های باکتریایی به عنوان منابع رنگ طبیعی پرداختند و به بررسی خواص بیولوژیکی و بالینی آنها از جمله فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی پرداختند (۳). کسیری و صفرپور (۲۰۱۵) نیز در پژوهش خود به بررسی عصاره‌های گیاهان به عنوان رنگ‌های طبیعی/ضد باکتریایی در فرآوری منسوجات پرداختند. این مطالعات نشان می‌دهند که رنگدانه‌های طبیعی، از جمله رنگدانه‌های کارتوئیدی، می‌توانند در صنایع مختلف از جمله نساجی نیز کاربرد داشته باشند (۱۲). در پژوهش حاضر نیز رنگدانه کارتوئیدی جدایه/ستریتومایسس بدست آمده توانایی ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی قابل توجه‌ای از خود نشان داد و مشخص می‌شود رنگدانه‌های کارتوئیدی طبیعی قابلیت کاربردی شدن را دارند.

تیواری و کالن (۲۰۱۳) در پژوهش خود به بررسی تکنیک‌های استخراج رنگدانه‌های چغندر قرمز پرداختند و دریافتند که تکنیک‌های استخراج جایگزین مانند فراصوت و آسیاب نانو مزایای بیشتری نسبت به روش‌های سنتی دارند (۲۱). احمد و همکاران (۲۰۱۲) نیز در پژوهش خود به



جداسازی باکتری‌های مولد رنگدانه و مشخص کردن رنگدانه‌های استخراج شده پرداختند. آنها تأکید کردند که استفاده از پسماندهای کشاورزی و صنعتی می‌تواند به کاهش هزینه تولید رنگدانه کمک کند (۶). حسینی و شریفی (۲۰۱۲) نیز در پژوهش خود روش‌های استخراج و پایداری رنگ استخراج شده از رنگدانه‌های زرشک را ارزیابی کردند (۲۲). در پژوهش‌های اشاره شده مشخص شد امکان شناسایی، استخراج و استفاده از رنگدانه‌های طبیعی وجود دارد، در پژوهش حاضر نیز با استفاده از رنگدانه‌های کارتنوئیدی بدست آمده از جدایه باکتریایی *استریپتومایسس* اثرات ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی ارزیابی و تعیین شد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش نشان داد که رنگدانه‌های کارتنوئیدی تولید شده توسط باکتری‌های بومی و گیاهان انار، دارای خواص متعددی از جمله اثرات ضد اکسیدانی قوی هستند و می‌توانند در درمان بیماری‌ها و یا به عنوان افزودنی به مواد خوراکی استفاده شوند. این یافته‌ها امکان توسعه روش‌های جدید برای دستیابی به منابع با ارزش زیستی و طبیعی را فراهم می‌کند. همچنین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیبات فعال این رنگدانه‌ها و بررسی مکانیزم‌های دقیق اثرات درمانی و صنعتی آن‌ها انجام پذیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم به علت همراهی در زمان انجام پژوهش تشکر و قدردانی دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ گونه تعارض منافع در انتشار نتایج این پژوهش ندارند.

حمایت مالی

این پژوهش با کد IR.IAU.QOM.REC.1403.180 مصوب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد و از امکانات و حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد واحد قم استفاده کرده است.

منابع

1. Carrillo C, Nieto G, Martinez-Zamora L, Ros G, Kamiloglu S, Muneke PE, et al. Novel approaches for the recovery of natural pigments with potential health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022;70(23):6864-83.
2. Di Salvo E, Lo Vecchio G, De Pasquale R, De Maria L, Tardugno R, Vadalà R, et al. Natural pigments production and their application in food, health and other industries. *Nutrients*. 2023;15(8):1923.
3. Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of food science and technology*. 2015;52:4669-78.
4. Rasouli A, Aghaei SS, Zargar M. Bio-production of Single-cell Oil by *Rhodococcus Erythropolis* PTCC 1767 Bacterial using Low-cost Carbon Sources. *Journal of Microbial Biology*. 2020;9(35):71-85.



5. Rasouli A, Aghaei SS, Zargar M. Single-cell oil production using low-cost carbon sources by newly isolated Kocuria Y205. Archives of Hygiene Sciences. 2021;10(2):143-54.
6. Ahmad WA, Wan Ahmad WY, Zakaria ZA, Yusof NZ, Ahmad WA, Ahmad WYW, et al. Isolation of pigment-producing bacteria and characterization of the extracted pigments. Application of Bacterial Pigments as Colorant: The Malaysian Perspective. 2012:25-44.
7. Ghorbani M, Sedaghat N, Milani E, Koocheki A. Evaluation of color and texture characteristics of "ready to eat" pomegranate arils during storage and optimization of packaging conditions using response surface methodology (RSM). Journal of food science and technology. 2017;14(66):16-1.
8. Zohouri A, Tabatabaee Yazdi F, Mortazavi SA, Shahidi F. Comparison of efficiency and extraction of color and natural compounds from red beet by maceration and ultrasonic extraction methods. Journal of Food Science & Technology (2008-8787). 2016;13(52).
9. Chaturvedi SB, Mainali S, Chaudhary R. Antibacterial activity of pigment extracted from bacteria isolated from soil samples. BMC Research Notes. 2024;17(1):169.
10. Agarwal H, Bajpai S, Mishra A, Kohli I, Varma A, Fouillaud M, et al. Bacterial pigments and their multifaceted roles in contemporary biotechnology and pharmacological applications. Microorganisms. 2023;11(3):614.
11. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. Journal of natural medicines. 2020;74(1):1-16.
12. Kasiri MB, Safapour S. Exploring and exploiting plants extracts as the natural dyes/antimicrobials in textiles processing. 2015.
13. Metwally RA, El Sikaily A, El-Sersy NA, Ghazlan HA, Sabry SA. Antimicrobial activity of textile fabrics dyed with prodigiosin pigment extracted from marine Serratia rubidaea RAM_Alex bacteria. The Egyptian Journal of Aquatic Research. 2021;47(3):301-5.
14. Parte A, Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 5: the Actinobacteria: Springer Science & Business Media; 2012.
15. Fakhari A, Baghipour S. Extraction of a food colorant from red beet and evaluation of its stability. Journal of color science and technology. 2009;3(4):243-50.
16. Nuanjohn T, Suphrom N, Nakaew N, Pathom-Aree W, Pensupa N, Siangsuepchart A, et al. Actinomycins from Soil-Inhabiting Streptomyces as Sources of Antibacterial Pigments for Silk Dyeing. Molecules. 2023;28(16):5949.



17. Nabi BG, Mukhtar K, Ahmed W, Manzoor MF, Ranjha MMAN, Kieliszek M, et al. Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. Food Bioscience. 2023;52:102403.
18. Kazi Z, Hungund BS, Yaradoddi JS, Banapurmath N, Yusuf AA, Kishore KL, et al. Production, characterization, and antimicrobial activity of pigment from Streptomyces species. Journal of Nanomaterials. 2022;2022(1):3962301.
19. Padhan B, Poddar K, Sarkar D, Sarkar A. Production, purification, and process optimization of intracellular pigment from novel psychrotolerant Paenibacillus sp. BPW19. Biotechnology Reports. 2021;29:e00592.
20. Siddharthan N, Sandhiya R, Hemalatha N. Extraction and Characterization of Antibacterial Pigment from Roseomonas Gilardii YP1 Strain in Yercaud Soil. EXTRACTION. 2020;13(3).
21. Tiwari BK, Cullen PJ. Extraction of red beet pigments. Red beet biotechnology: Food and pharmaceutical applications: Springer; 2012. p. 373-91.
22. Sharifi A, Hassani B. Extraction methods and stability of color extracted from barberry pigments. International Journal of AgriScience. 2012;2(4):327-0.