

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۹۴-۸۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۲۱

جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌ای از *دیتیریا ماریس* مقاوم به اشعه UV و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه

نرجس زمانیان: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، zamanian_sh@yahoo.com
زهره اعتمادی فر*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: توانایی باکتری‌های مقاوم به اشعه برای بقا در برابر سطوح بالایی از اشعه فرابنفش وابسته به سیستم‌های ترمیم DNA و محصولات متابولیک اولیه و ثانویه است. بیوسنتز رنگدانه، فرصتی برای بقای باکتری در محیط‌های غنی از اشعه را فراهم می‌کند. رنگدانه‌های تولیدشده در برابر اشعه به‌عنوان رنگ‌های غذایی، داروهای ضدسرطان، همچنین به عنوان آنتی‌بیوتیک‌ها و برای اهداف آرایشی استفاده می‌شوند.

مواد و روش‌ها: نمونه خاک شهر امیدیه در بهار سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد و بعد از دو مرحله غربال‌گری اولیه و ثانویه سویه مقاوم به اشعه فرابنفش جداسازی و با روش مولکولی تعیین توالی ژن 16S rRNA شناسایی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه با استفاده از DPPH و قدرت احیاکنندگی رنگدانه نیز با استفاده از کلرید فریک بررسی شد.

نتایج: در پژوهش حاضر، سویه جدید مقاوم به اشعه فرابنفش NM2 جداسازی شد. براساس مقایسه نتایج حاصل از تعیین توالی براساس الگوریتم بلاست در بانک ژنی، جنس و گونه این باکتری با *دیتیریا ماریس* به میزان ۹۹ درصد شباهت نشان داد. استخراج رنگدانه از سویه جداسازی‌شده با متانول و استون به‌عنوان حلال انجام شد. حداکثر جذب نوری برای رنگدانه سویه NM2 در ۴۷۳ نانومتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و توانایی احیاکنندگی رنگدانه با افزایش غلظت رنگدانه افزایش یافت. رنگدانه سویه MM2 غلظت EC₅₀ معادل ۳/۳۰ mg/ml در مهار رادیکال آزاد از خود نشان داد و برای قدرت احیاکنندگی غلظت EC₅₀ معادل ۲۸/۴۶ µg/ml به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: جداسازی منابع طبیعی تولیدکننده رنگدانه با قدرت آنتی‌اکسیدانی زیاد دارای اهمیت است. در مطالعه حاضر، رنگدانه باکتری مقاوم به اشعه فرابنفش در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی از خود نشان داد و رنگدانه این باکتری‌ها نقش مهمی در مقاومت به اشعه فرابنفش ایفا می‌کند. رنگدانه باکتری‌های مقاوم به اشعه ممکن است یک منبع مناسب برای غذاهایی با عملکرد مطلوب آنتی‌اکسیدانی و در صنایع داروسازی باشند.

واژه‌های کلیدی: اشعه فرابنفش، باکتری مقاوم به اشعه UV، *دیتیریا ماریس*، رنگدانه، آنتی‌اکسیدان، DPPH، قدرت احیاکنندگی

* نویسنده مسؤل مکاتبات

مقدمه

اکسیژن، یک اکسیدکننده قوی و یک پذیرنده خوب برای متابولیسم تنفسی است. احیای ناقص اکسیژن می‌تواند گونه‌های فعال اکسیژن شامل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را تولید کند که این ترکیبات تأثیرات مخربی بر بیومولکول‌هایی مانند DNA، RNA، غشای لیپیدی و پروتئین‌ها می‌گذارند و باعث نقص‌های متابولیکی، پیری، جهش و در نهایت مرگ سلول می‌شوند (۱ و ۲). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات نقش مهمی در پیشگیری از سرطان بر عهده دارند. کارتنوئیدها، ویتامین ث، ویتامین ای، سلنیوم و فیتو کیمیکال‌ها از آنتی‌اکسیدان‌های مهم هستند. ارگانیزم‌ها این گونه‌های سمی را به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی از بین می‌برند (۳). آنتی‌اکسیدان‌ها با تحویل دادن یک الکترون به رادیکال‌های آزاد، از گرفتن الکترون به وسیله رادیکال‌ها از بیومولکول‌های دیگر و آسیب‌زدن به آن‌ها جلوگیری می‌کنند (۴). باکتری‌های مقاوم به اشعه به وسیله ترکیبات آنتی‌اکسیدان خود، توانایی مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو و اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده به علت تابش اشعه UV را پیدا می‌کنند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌تواند شامل رنگدانه یا سایر متابولیت‌های اولیه و ثانویه تولید شده در این گونه‌های باکتریایی باشد (۵).

اولین بار جنس *دیتیریا*^۱ را به جای گونه رودوکوکوس *ماریس*^۲، رینی^۳ و همکاران پیشنهاد کردند. این جنس به طور گسترده در طبیعت پراکنده است و تاکنون سیزده گونه از آن شناخته شده است. گونه *دیتیریا ماریس*^۴ را هریسون^۵ از هالیبوت (نوعی ماهی بزرگ و پهن)

جداسازی و تحت عنوان *فلاووباکتریوم ماریس*^۶ نامگذاری کرد. این گونه از خاک، پوست و روده ماهی کپور، گلولای اعماق دریا و رسوب و داینوفلاژل پیرودینیوم *باهامنس*^۷ نیز جداسازی شد. گزارش‌هایی مبنی بر بیماری‌زایی گونه *دیتیریا ماریس* وجود دارد. بمر *ملچیور*^۸ و همکاران اولین مورد تشخیص حضور باکتری در خون (باکتری می) را با استفاده از گونه *دیتیریا ماریس* گزارش کردند. این گونه از نمونه بیوپسی استخوان بیمار در بیمارستان جداسازی و به عنوان عامل عفونت پروتز استخوان ران تشخیص داده شد (۶).

گونه *دیتیریا ماریس*، یک باکتری کوکسی گرم مثبت، هوازی، بدون حرکت، بدون اسپور، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و دارای کلنی‌های موکوییدی است. مهم‌ترین فسفولیدهای موجود در این گونه دیفسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل اینوزیتول مانوزید، فسفاتیدیل اینوزیتول و فسفاتیدیل اتانول آمین است. تمامی سویه‌های جنس *دیتیریا* رنگدانه‌های زرد تا نارنجی دارند؛ اما تنها در برخی از سویه‌های این جنس مانند *دیتیریا ناترونولیمنه HS-1* و *دیتیریا ماریس NIT-D* توانایی تولید رنگدانه کانتاگراتین^۹ گزارش شده است. رنگدانه کانتاگراتین به علت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب، ضدتومور و ضدسرطان کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده است. سورفاکتانت‌های میکروبی ترکیبات فعال سطحی هستند که گروه گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها آن‌ها را سنتز می‌کنند (۷ و ۸). گونه *دیتیریا ماریس* نیز از جمله گونه‌های تولیدکننده سورفاکتانت میکروبی است که این بیوسورفاکتانت‌ها در مقایسه با سورفاکتانت شیمیایی تریتون X-100 بهتر عمل می‌کنند (۹). همچنین این گونه در پاکسازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آلکالین‌دار، یک گونه مؤثر است (۱۰).

۱۶۰ rpm گرماگذاری شد. پس از غنی‌سازی اولیه، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به پلیت‌های TGY آگار منتقل و با میله شیشه‌ای سرکج، در محیط به‌طور کامل پخش شد و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور جوانه‌زنی اسپورها گرماگذاری شد. سپس پلیت‌ها در فاصله ۱۴ سانتی‌متری از لامپ (-CROSSLINKER CL E508.G) با تابش اشعه UVC با طول موج ۲۵۴ nm قرار داده شدند و در معرض ۱۰ ژول اشعه فرابنفش (زمان تابش ۳۰ دقیقه) قرار گرفتند. بعد از اشعه پلیت‌ها، به‌منظور اجتناب از ترمیم وابسته به نور، در داخل فویل آلومینیومی پیچیده شدند و به مدت ۳ تا ۱۰ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از غربال‌گری اولیه، به‌منظور غربال‌گری سویه‌های مقاوم به اشعه فرابنفش کشت شبانه‌ای از سویه‌ها تهیه شد. از باکتری‌های میانه فاز لگاریتمی با کدورت ۵/۰ مک‌فارلند به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت TGY آگار انتقال داده شد و در معرض دوز نهایی ۱۵ ژول اشعه فرابنفش (زمان تابش ۴۵ دقیقه) قرار داده شد. شمارش تعداد کلنی سویه‌ها بر روی محیط TGY آگار انجام شد. سویه‌های با بیشترین میزان شمارش کلنی در مقایسه با شاهد بدون تابش اشعه، به‌عنوان سویه‌های مقاوم به اشعه در نظر گرفته شدند. برای شناسایی سویه جداسازی‌شده از خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی، آزمون‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی استفاده شد (۱۱ و ۱۲).

منحنی رشد باکتری: به‌منظور رسم منحنی رشد، سویه جداسازی‌شده در محیط TGY برات کشت شبانه‌ای تهیه شد و به‌میزان ۱ میلی‌لیتر از آن با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TGY برات تلقیح شد. پس از آن به مدت ۹۶ ساعت در ۱۶۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد،

یکی از علل مقاومت به اشعه و شرایط اکسیداتیو ایجادشده در باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش، وجود رنگدانه در این گونه‌های باکتریایی است (۵). به‌همین منظور جداسازی این منابع طبیعی تولیدکننده رنگدانه‌هایی با قدرت آنتی‌اکسیدانی زیاد و شناسایی ساختمان آن‌ها برای استفاده در صنایع مختلف، مهم است و فرصت‌های مناسبی برای استفاده بشر از باکتری‌های مقاوم به اشعه را در زمینه‌های دارویی، درمانی، غذایی و بیوتکنولوژی فراهم می‌کند (۸). در مطالعه حاضر، یک سویه جدید مقاوم به اشعه فرابنفش دارای رنگدانه، از خاک نفتی منطقه امیدیه در استان خوزستان جداسازی شد. مطالعات ژن 16S rRNA نشان داد این سویه جداسازی‌شده متعلق به گونه *دیتزیا ماریس* است. همچنین این پژوهش اولین گزارش از داشتن مقاومت به اشعه فرابنفش در این گونه است.

مواد و روش‌ها

در انجام این پژوهش از سویه استاندارد باکتریایی *داینوکوکوس رادیودورانس* R1 (*ATCC:13939*) به عنوان یک سویه تأییدشده از نظر داشتن مقاومت زیاد به اشعه یونیزه‌کننده و غیر یونیزه‌کننده و به‌عنوان شاهد برای تأیید آزمایش‌های انجام‌شده، استفاده شد.

جداسازی باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش: نمونه‌های خاک (سطح خاک به ارتفاع ۱-۵ سانتی‌متر) از مناطق مختلف استان خوزستان که در معرض تابش مستقیم نور خورشید قرار داشتند، در بهار ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد. از نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده به‌میزان ۱ گرم به ۵۰ میلی‌لیتر محیط *Tryptone glucose yeast extract* (TGY) برات تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز در آنکوباتور با دور

روی محیط Tryptic soy agar (TSA) کشت داده شد؛ پس از رشد مناسب چندین کلنی درون آب مقطر استریل غوطه‌ور شد. پس از ورتکس نمونه محلول استون سرد ۹۹ درصد و متانول ۹۵ درصد به نسبت ۳ به ۷ به لوله‌ها اضافه شد و نمونه به شدت ورتکس و به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه با دور rpm ۱۶۰ شیکر گذاری شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در ۲ فاز تشکیل شده، فاز زیری حاوی جسم سلولی و فاز رویی حاوی رنگدانه باکتری است. فاز رویی جداسازی و جذب در محدوده ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر با طیف سنج نور مرئی - فرابنفش (Biowave II V1.2) بررسی شد. پس از آن فاز رویی نمونه در پتری دیش استریل تخلیه و در خشک کن ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا محلول استون و متانول آن تبخیر شود. در نهایت نمونه‌ها از ته پتری دیش تراشیده و در یخچال برای آنالیز نگهداری شدند (۱۴ و ۱۵).

میزان به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH^۱ توسط

رنگدانه: توانایی ترکیب با هیدروژن یا الکترون‌دهندگی رنگدانه‌های آزمایش شده به وسیله توانایی بی‌رنگ کردن محلول متانولی DPPH که به‌رنگ بنفش بود، انجام شد. در این اندازه‌گیری که براساس اسپکتروفتومتری انجام شده است، جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی، از رادیکال ۲، ۲ - دی فنیل ۱ - پیکریل هیدرازیل (DPPH) به‌عنوان معرف استفاده شد. رنگدانه استخراج شده به میزان ۰/۰۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل اضافه شد، سپس با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ترکیب شد، به طوری که غلظت نهایی DPPH در محلول ۲ میلی‌لیتری برابر ۰/۱ میلی‌مولار به دست آمد. محلول حاصل وورتکس و به مدت ۳۰ دقیقه

سپس جذب نوری در ابتدا هر ۲ ساعت و بعد از ساعت دوازدهم هر ۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد.

شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده با تعیین

توالی ژن 16S rRNA: استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گرفت. به منظور تکثیر ژن 16S rRNA نیز از دو آغازگر عمومی:

27F (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و
1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

استفاده شد (۱۳). برای آماده‌سازی محصول PCR از master mix 2X آماده شرکت سینا ژن در حجم ۲۵ میکرولیتری استفاده شد. سپس جهت انجام واکنش PCR در طی ۳۰ چرخه واکنش، دماهای ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C برای مرحله دناتوراسیون، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۴°C برای مرحله اتصال و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲°C برای مرحله تکثیر انجام شد. پس از انجام واکنش PCR به منظور اطمینان از تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی، ۴ میکرولیتر از محصول PCR به همراه اندازه نمای DNA 1kb بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. در نهایت محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Macrogen کره ارسال شد. پس از توالی‌یابی قطعه DNA مدنظر، به وسیله پایگاه داده اطلاعات ژنومی NCBI تشابه جنس و گونه سویه جداسازی شده بررسی شد. به منظور تأیید نتایج به دست آمده از بلاست ژنی برای سویه جداسازی شده، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer (6.1) بر پایه روش Neighbor- Joining و با بوت‌استریپ ۱۰۰ تکرار رسم شد.

استخراج رنگدانه: برای استخراج رنگدانه تولیدی

توسط سویه جداسازی شده، ابتدا سویه جداسازی شده بر

شد. افزایش جذب نسبت به محلول بلانک نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی است. هرچه میزان جذب خوانده شده بیشتر باشد قدرت احیاکنندگی نیز بیشتر خواهد بود. آسکوربیک اسید به عنوان نمونه کنترل استفاده شد (۱۶).

مطالعات آماری: ترسیم نمودارها از داده‌های آزمایش‌های فوق با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2010 و تجزیه و تحلیل آماری‌ها در صورت لزوم، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام گرفت. مقایسه میانگین نمونه‌های مختلف با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ و اختلافات میان تکرارها در یک نمونه با رسم Error bars براساس ± 1 Standard Deviation مشخص شد.

نتایج

از میان ۱۰ سویه جداسازی شده در مرحله غربال‌گری اولیه، یک سویه برتر از نظر دارا بودن مقاومت به اشعه فرابنفش و بالاتر بودن شمارش کلنی ($10^3 \times 1/223$) پس از تیمار با ۱۵ ژول اشعه فرابنفش از خاک منطقه امیدیه جداسازی، انتخاب و با نام سویه NM2 نامگذاری شد. سویه جداسازی شده یک باکتری گرم مثبت، کوکسی، هوازی، بدون اسپور کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و دارای کلنی‌های نارنجی بود. منحنی رشد سویه جداسازی شده NM2 در محیط TGY برات رسم شد. سویه NM2 بعد از حدود ۸۴ ساعت و رسیدن به $OD \cong 4$ به انتهای فاز لگاریتمی خود رسیدند (شکل ۱).

در تاریکی قرار داده شد. پس از این مدت جذب اختصاصی در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد در نمونه‌های استخراج شده بررسی شد. قدرت خنثی‌سازی رادیکال آزاد DPPH طبق رابطه ۱ محاسبه شد. گفتنی است در نمونه بلانک، رنگدانه با ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر جایگزین شد (۱۵).

رابطه ۱

$$100 \times [(A_0 - A_1) / A_0] = \text{درصد به دام اندازی رادیکال}$$

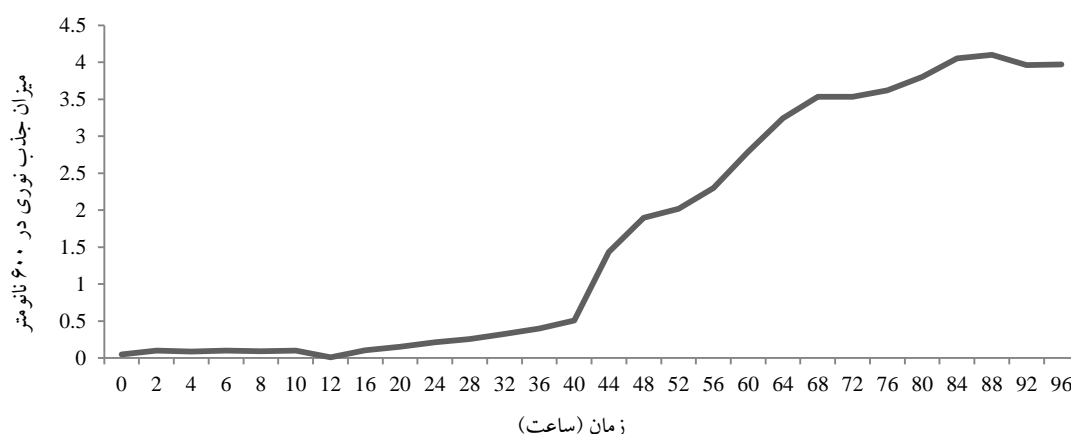
در فرمول ذکر شده، A_0 جذب نوری در طول موج ۵۱۷ مربوط به نمونه بلانک و A_1 جذب نوری مربوط به غلظت ترکیب آنتی‌اکسیدان است. پس از آن غلظتی از نمونه رنگدانه که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰ درصد بود با نمودار محاسبه شد و به عنوان EC_{50} گزارش شد. همچنین ترکیب سنتزی آسکوربیک اسید به عنوان نمونه کنترل، استفاده شد.

بررسی قدرت احیاکنندگی: بررسی قدرت احیاکنندگی رنگدانه استخراج شده با استفاده از کلرید فریک ($FeCl_3$) یا متد اوپایزو^{۱۲} (۱۹۸۶) مشخص شد. رنگدانه به میزان ۰/۵ تا ۱۰ میکروگرم در ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=6.6) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد ترکیب و به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به ۵ میلی‌لیتر از محلول رویی ۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل و ۱ میلی‌لیتر کلرید فریک ۰/۱ درصد اضافه شد و بلافاصله جذب آن در ۷۰۰ نانومتر قرائت

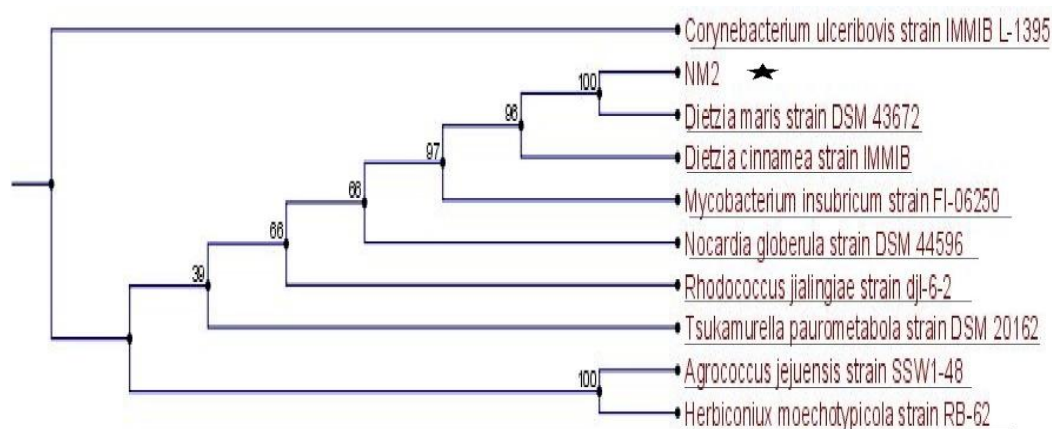
با استفاده از دو حلال متانول و استون انجام شد. استفاده هم‌زمان متانول و استون سبب استخراج طیف گسترده‌تری از رنگدانه‌ها می‌شود. جذب نوری در محدوده ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر رنگدانه دو سویه NM2 و داینوکوکوس رادیودورانس R1 با استفاده از طیف‌سنج نور مرئی-فرابنفش بررسی شد. رنگدانه سویه NM2 بیشترین میزان جذب نوری را در ناحیه ۴۷۳ نانومتر و رنگدانه سویه داینوکوکوس رادیودورانس R1 بیشترین میزان جذب نوری را در ناحیه ۴۷۹ نانومتر از خود نشان دادند.

به‌منظور شناسایی مولکولی سویه جداسازی‌شده قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی ژن 16S rRNA تکثیر و تعیین توالی شد. نتایج بلاست ژنی نشان‌دهنده شباهت مولکولی ۹۹ درصدی و تعلق این سویه جداسازی‌شده به گونه دیتزیا ماریس بود. ترسیم درخت فیلوژنی برای این سویه نتایج به دست آمده از بلاست را تأیید کرد (شکل ۲). درنهایت، این سویه با شماره دسترسی KP222293 در بانک ژنی NCBI تحت عنوان NM2 *D. maris* ثبت شد.

بررسی رنگدانه باکتری با استفاده از طیف‌سنج نور مرئی-فرابنفش: استخراج رنگدانه دو سویه مقاوم به اشعه فرابنفش NM2 و داینوکوکوس رادیودورانس R1



شکل ۱- منحنی رشد سویه NM2 در محیط TGY برات در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰ دور در دقیقه در مدت زمان ۹۶ ساعت



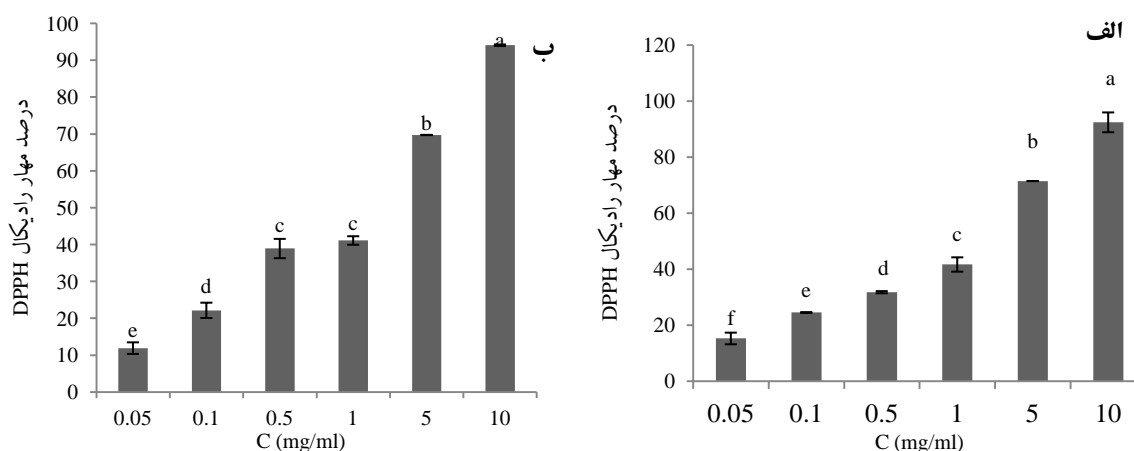
شکل ۲- درخت فیلوژنی سویه جداسازی‌شده NM2 ترسیم‌شده با نرم‌افزار CLC 6.1 بر پایه روش Neighbor-joining با بوت‌استریپ ۱۰۰ تکرار

اسید بود. مطالعات آماری نشان داد افزایش غلظت رنگدانه سویه‌های باکتریایی تأثیر معناداری بر مهار رادیکال آزاد دارد ($P \text{ value} < 0.05$).

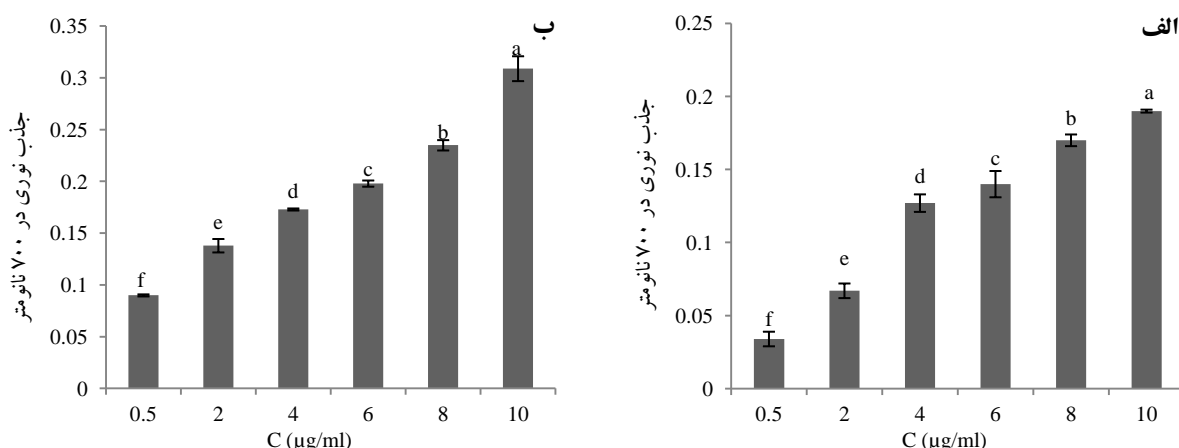
بررسی قدرت احیاکنندگی: احیای آهن سه‌ظرفیتی می‌تواند شاخصی از قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه استخراج شده باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها (عوامل احیاکننده) منجر به احیاء کمپلکسی فری سیانید می‌شوند. نتایج به دست آمده در این بخش نشان داد با افزایش غلظت رنگدانه، قدرت احیاکنندگی نیز افزایش می‌یابد (شکل ۴). همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که افزایش غلظت، تأثیر معناداری بر قدرت احیاکنندگی دارد ($P \text{ value} < 0.05$). معادلات خط برای محاسبه میزان EC_{50} حاصل شد و میزان EC_{50} برای رنگدانه سویه NM2 و داینوکوکوس رادیودورانس R1 به ترتیب در غلظت‌های ۲۸/۴۶ و ۲۰/۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر براساس معادله‌های خط $y = 0.0162x + 0.0388$ و $y = 0.0204x + 0.088$ به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که با توجه به کمتر بودن غلظت EC_{50} در سویه داینوکوکوس رادیودورانس R1، قدرت احیاکنندگی این رنگدانه بیشتر از رنگدانه سویه NM2 است.

میزان به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH: اثر

آنتی‌اکسیدانی رنگدانه سویه جداسازی شده با استفاده از کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (ترکیب ارغوانی) و تبدیل آن به ترکیب دی‌فنیل پیکریل هیدرازین (ترکیب زرد) ارزیابی شد. نتایج به دست آمده در این بخش نشان داد که رنگدانه سویه NM2 دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است و با افزایش غلظت رنگدانه، مهار رادیکال آزاد DPPH با قدرت بیشتری صورت می‌گیرد (شکل ۳-الف). توانایی مهار ۵۰ درصد رادیکال آزاد (EC_{50}) توسط رنگدانه سویه NM2 در غلظت ۳/۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای رنگدانه سویه داینوکوکوس رادیودورانس R1 در غلظت ۳/۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به ترتیب برای سویه NM2 و داینوکوکوس رادیودورانس R1 برحسب معادله‌های خط $y = 7.2657x + 26.149$ و $y = 7.1633x + 26.29$ به دست آمده حاصل شد. توانایی مهار رادیکال آزاد توسط رنگدانه استخراج شده در غلظت‌های بررسی شده نسبت به ترکیب سنتزی آسکوربیک اسید ضعیف‌تر بود؛ اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه برابر قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیب آسکوربیک



شکل ۳- بررسی درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه سویه NM2 (الف) و رنگدانه سویه داینوکوکوس رادیودورانس R1 (ب) در غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر. مقایسه میانگین داده‌ها تحت ANOVA و با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد؛ حروف غیرمشابه در یک سویه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در یک متغیر.



شکل ۴- بررسی قدرت احیای رنگدانه سویه NM2 (الف) و رنگدانه سویه داینوکوکوس رادیودورانس R1 (ب) در غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، مقایسه میانگین داده‌ها تحت ANOVA و با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد؛ حروف غیرمشابه در یک سویه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در یک متغیر

بحث و نتیجه‌گیری

نگرانی برای تغییرات فاکتورهایی مانند آب‌وهوا و یا منشأ تأمین منابع را فراهم می‌کند. داینوکوکوس رادیودورانس R1 یک کارتنوئید مشخص با نام داینوگزانتین تولید می‌کند. این کارتنوئید نسبت به لیکوپن و بتا-کاروتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری دارد. چنگ^{۱۸} و همکاران در سال ۲۰۱۴ تأثیر داینوگزانتین استخراج‌شده از سویه داینوکوکوس رادیودورانس R1 را بر آسیب‌هایی که ترکیب تراکلرید کربن به سلول‌های کبدی موش می‌رساند، بررسی کردند. نتایج آن نشان داد داینوگزانتین یک اثر محافظتی بر سلول‌های کبدی موش دارد؛ این عملکرد حفاظتی به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه فوق است (۱۷).

یکی از معیارها در مشخص کردن ویژگی‌های کارتنوئیدها طیف‌سنجی نور مرئی-فرابنفش است. این طیف‌سنجی اطلاعاتی در زمینه گروه‌های عاملی رنگی فراهم می‌کند (۱۸). لمه^{۱۹} و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند بیشترین طول موج‌های به‌دست‌آمده از

در طبیعت آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد غذایی غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها، از سلول‌ها و بدن انسان در برابر تنش‌های اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند. غذاهای غنی از کارتنوئید از بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های چشمی و انواع سرطان‌ها جلوگیری می‌کنند. گونه‌های باکتریایی توانایی تولید طیف گسترده‌ای از کارتنوئیدها را دارند. اکسیداسیون لیپیدها مقدار زیادی از ترکیباتی مانند مالون‌دی‌آلدید^{۱۳} را تولید می‌کند که سبب تخریب غشای سلول و آسیب به DNA می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها با جلوگیری از واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون لیپیدها از ایجاد این آسیب‌ها در سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. همچنین گزارشاتی از ترکیبات بتا-کاروتن^{۱۴}، آستاگزانتین^{۱۵}، کپزانتین^{۱۶} و بیوکسین^{۱۷} مبنی بر جلوگیری از تکثیر سلول‌های لوکمی K562 با القای آپتوز وجود دارد. استفاده از میکروب‌های غنی از کارتنوئید، مزایای بالاتری در استخراج، کاهش هزینه‌های تولید و نداشتن

رنگدانه داینوگزانتین استخراج شده از سویه دیتزیا ماریس NM2 دارای قدرت داینوکوکوس رادیودورانس R1 با استفاده از حلال متانول در نواحی ۴۷۹، ۵۰۶ و ۴۵۱ نانومتر بود (۱۹). نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که تنها یک ناحیه با بیشترین میزان جذب نوری برای رنگدانه داینوگزانتین در ناحیه ۴۷۹ نانومتر به دست آمد. ونوگوپالان^{۲۰} و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعه بر کروماتوگرام‌های HPLC رنگدانه کانتاگزانتین استخراج شده از سویه دیتزیا K44 مشاهده کردند این رنگدانه دو پیک در ناحیه ۴۶۵/۳ و ۴۷۵ نانومتر دارد که ایزومرهای ترانس آن پیک در ناحیه ۴۷۵ نانومتر و ایزومرهای سیس پیک در ناحیه ۴۶۵/۳ نانومتر دارند (۱۴). بیشترین جذب نوری به دست آمده از رنگدانه سویه دیتزیا ماریس NM2 در ناحیه ۴۷۳ نانومتر قرار دارد. کارتنوئید آلفا کاروتن نیز در نواحی ۴۴۴ و ۴۷۳ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد (۲۰). با توجه به این نتایج نمی‌توان نظر قطعی مبنی بر تولید رنگدانه کانتاگزانتین در سویه NM2 ارائه کرد و برای تعیین دقیق ساختار آن احتیاج به آنالیزهای بیشتر بر این رنگدانه و مطابقت آن با رنگدانه کانتاگزانتین استاندارد است.

رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است. ترکیباتی که با دادن هیدروژن یا الکترون به DPPH باعث احیای این ترکیب ارغوانی رنگ به ترکیب زردرنگ می‌شوند، به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان مطرح می‌شوند. میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیب بررسی شده رابطه مستقیم دارد (۲۱). اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد با DPPH یک روش معتبر و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا است که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش استفاده شد. رنگدانه

استخراج شده از سویه دیتزیا ماریس NM2 دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی زیادی است. هرچه غلظت EC₅₀ کمتر باشد نشان‌دهنده قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در رنگدانه استخراج شده است. قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه سویه دیتزیا ماریس NM2 با قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه داینوگزانتین با توجه به غلظت EC₅₀ برابری می‌کند. در پژوهشی در سال ۲۰۱۳ که ساسیده‌هاران^{۲۱} و همکاران بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه آستاگزانتین در غلظت‌های ۲۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استخراج شده از برخی سویه‌های جنس *اکزیگوباکتریوم* انجام دادند، میانگین درصد رادیکال آزاد DPPH که این رنگدانه‌ها مهار کردند، ۷۲ درصد سنجیده شد (۱۵). با توجه به بیشتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو رنگدانه داینوگزانتین و رنگدانه سویه دیتزیا ماریس NM2 نسبت به رنگدانه آستاگزانتین، نتایج نشان می‌دهد که رنگدانه‌های باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش نسبت به رنگدانه سایر باکتری‌ها قدرت بیشتری دارند. تیان^{۲۲} و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه داینوگزانتین را به وسیله احیای رادیکال DPPH سنجیدند و نشان دادند داینوگزانتین یک محافظت‌کننده قوی در برابر اکسیداسیون پروتئین‌ها است. در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه داینوگزانتین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب برابر با ۲۰ درصد و ۳۹ درصد بود که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه با نتایجی که تیان و همکاران به دست آوردند هم‌خوانی داشت (۲۲). ونوگوپالان و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ با مطالعه قدرت آنتی‌اکسیدانی بر ایزومرهای سیس و ترانس، رنگدانه کانتاگزانتین مشتق شده از سویه K44 در جنس دیتزیا مشاهده کردند ایزومرهای سیس فعالیت مهارکنندگی

جداسازی منابع طبیعی تولیدکننده رنگدانه‌هایی با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا و سپس شناسایی ساختمان آن‌ها و تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی به‌منظور استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف دارویی، درمانی و غذایی مهم است. رنگدانه باکتری‌های مقاوم به اشعه یکی از علل اصلی مقاومت آن‌ها به اشعه و تنش‌های اکسیداتیو است. رنگدانه سویه جداسازی شده *دیتزیا ماریس* با دارا بودن مقاومت به اشعه فرابنفش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیادی از خود نشان دادند. جنس *دیتزیا* و متابولیت‌های آن‌ها می‌تواند اهمیت اقتصادی برای اهداف صنعتی در زمینه کاربردهایی در صنایع دارویی و غذایی داشته باشد. انتظار می‌رود در سال‌های آینده، محصولات زیستی و رنگدانه به‌دست آمده از این ارگانیسم‌ها جایگزین مواد ترکیبات شیمیایی سنتزی استفاده شده در صنعت شود. با وجود توانایی بالای باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش در زمینه تجزیه و تغییر شکل ترکیبات آلی و بالا بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه این گونه‌ها، مطالعات درباره این ارگانیسم‌ها بسیار کم است. نتایج این پژوهش، اطلاعاتی اولیه برای پژوهش‌های بعدی در زمینه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش فراهم می‌کند.

References

- (1) Singh OV., Gabani P. Extremophiles: Radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *Journal of Applied Microbiology* 2011; 110: 851- 61.
- (2) Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 60: 1- 4.

بسیار بالاتری نسبت به ایزومرهای ترانس در مهار رادیکال‌های آزاد، رادیکال‌های سوپراکسید و گونه‌های فعال اکسیژن دارند (۱۴).

احیای آهن فریک به‌عنوان یک ایندکس برای پتانسیل الکترون‌دهی به کار می‌رود. این روش براساس مکانیسم افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش است. در این روش آنتی‌اکسیدان‌ها با پتاسیم‌فری‌سیانید، تری کلرواستیک اسید و کلریدفریک ترکیب می‌شوند و کمپلکس آبی‌رنگی ایجاد می‌کنند که در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. افزایش در جذب نوری نمونه‌ها نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی نمونه است (۱۷). رنگدانه با اهدای تعداد بیشتری الکترون یا اتم هیدروژن واکنش‌های زنجیره‌ای تشکیل رادیکال آزاد را می‌شکند و اکسیداسیون را به تأخیر می‌اندازد (۲۳). با توجه به نتایج به‌دست آمده در ارتباط با میزان قدرت احیاکنندگی، هر دو رنگدانه باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش *داینوکوکوس رادیودورانس* R1 و رنگدانه سویه *دیتزیا ماریس* NM2، قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان دادند؛ اما رنگدانه *داینوگزانتین* در مقایسه با رنگدانه استخراج شده از سویه *دیتزیا ماریس* NM2 قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشت و غلظت EC_{50} به‌دست آمده برای آن پایین و برابر ۲۰/۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. چنگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ قدرت احیاکنندگی رنگدانه *داینوگزانتین* را بررسی کردند و توانایی بالای رنگدانه در احیای یون فریک را نشان دادند (۱۷). میزان قدرت احیاکنندگی رنگدانه *داینوگزانتین* به‌دست آمده در این پژوهش در غلظت‌های بررسی شده با میزان قدرت احیاکنندگی که چنگ و همکاران در همین غلظت‌ها به دست آوردند، هم‌خوانی داشت.

- (3) Huang D., Ou B., Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53 (6): 1841- 56.
- (4) Sarma AD., Mallick AR., Ghosh AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 2010; 1 (3): 185- 92.
- (5) Gabani P., Singh OV. Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 97: 993- 1004.
- (6) Yassin AF., Hupfer H., Schaal KP. *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; 56: 641- 45.
- (7) Nasri Nasrabadi MR., Razavi SH. Enhancement of canthaxanthin production from *Dietzia natronolimnaea* HS-1 in a fed-batch process using trace elements and statistical methods. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2010; 27: 517- 29.
- (8) Gharibzahedi SMT., Razavi SH., Mousavi M. Potential applications and emerging trends of species of the genus *Dietzia*: a review. *Annals of Microbiology* 2014; 64: 421- 9.
- (9) Mohee R., Mudhoo A. Bioremediation and Sustainability: *Research and Applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2012.
- (10) Procopio L., Alvarez VM., Jurelevicius DA., Hansen L., Srensen SrJ., Cardoso JS., et al. Insight from the draft genome of *Dietzia cinnamea* P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012; 101: 289- 302.
- (11) Gholami M., Etemadifar Z., Bouzari M. Isolation a new strain of *Kocuria rosea* capable of tolerating extreme conditions. *Journal of Environmental Radioactivity* 2015; 144: 113- 19.
- (12) Gholami M., Etemadifar Z. Isolation and molecular identification of a new strain of *Microbacterium resistens*, capable of tolerating the extreme condition. *Biological Journal of Microorganisms* 2013; 2 (5): 27- 42.
- (13) Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA., Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74: 2461- 70.
- (14) Venugopalan V., Tripathi SK., Nahar P., Saradhi PP., Das RH., Gautam HK. Characterization of Canthaxanthin Isomers Isolated from a New Soil *Dietzia* sp. and Their Antioxidant Activities. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2013; 23: 237- 45.
- (15) Sasidharan P., Raja R., Karthik C., Ranand kumar Sharma IAP. Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. *Journal of Biochemical Technology* 2008; 4 (4): 632- 5.
- (16) Tsai S-Y., Huang S-J., Mau J-L. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agroclybe cylindracea*. *Food Chemistry* 2006; 98: 670- 7.
- (17) Cheng J., Zhang Z., Zheng Z., Wang L., Tian B., Hua Y. Antioxidative and hepatoprotective activities of deinoxanthin-rich extract from *Deinococcus radiodurans* R1 against carbon tetrachloride-induced liver injury in Mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 13: 581- 6.
- (18) Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H. Carotenoids: handbook. Basel AG, Boston: Springer 2004.
- (19) Lemee L., Peuchant E., Clerc M., Brunner M., Pfander H. Deincoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans* *Tetrahedron* 1997; 53: 919- 26.
- (20) Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* 1995; 9: 1551- 8.

- (21) Brand-Williams W., Cuvelier., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 1995; 28: 25- 30.
- (22) Tian B., Sun Z., Shen S., Wang H., Jiao J., Wang L., et al. Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in Applied Microbiology* 2009; 49: 689- 94.
- (23) Kumaran A., Joel Karunakaran R. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology* 2007; 40: 344- 52.

¹- Dietzia genus

²- *Rhodococcus maris*

³- Rainey

⁴- *Dietzia maris*

⁵- Harrison

⁶- *Flavobacterium maris*

⁷- *Pyrodinium bahamense*

⁸- Bemer-Melchior

⁹- Cantaxanthin

¹⁰- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH)

¹¹- Effective Concentration

¹²- Oyaizu (1986)

¹³- Malondialdehyde

¹⁴- β - carotene

¹⁵- Astaxanthin

¹⁶- capsanthin

¹⁷- bixin

¹⁸- Cheng

¹⁹- Lemee

²⁰- Venugopalan

²¹- Sasidharan

²²- Tian

Isolation and molecular identification of a UV-resistant strain of *Dietzia maris* and antioxidant activity of pigment

Narges Zamanian

MSc. of Microbiology, University of Isfahan, Iran, zamanian_sh@yahoo.com

Zahra Etemadifar*

Associate Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: The ability of radioresistant bacteria to survive high levels of UV radiation has been linked to their strong DNA repair systems and ability to produce primary and secondary metabolic products. The biosynthesis of pigments provides an opportunity for bacteria to live in radiation-rich environment. Recent radiation-responsive pigments are used commercially as food colorants, anticancer drugs, as well as antibiotics and for cosmetic purposes.

Materials and methods: Soil sample of Omidiyeh city was collected during the spring of 2014 and UV-resistant strain was isolated after primary and secondary screening. Then it was identified by molecular methods (16S rRNA gene sequencing). Antioxidant activity of pigment was evaluated by 2,2 -diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) and the reducing power of pigments were analyzed by ferric chloride.

Results: In this present study, new UV-resistant strain NM2 was isolated and by comparison of these 16S rRNA gene sequences to public database using the BLAST, the genus and species of the isolate was identified as *Dietzia maris* with 99% similarity. Extraction of pigment from isolated strain was carried out by methanol and acetone as solvents. The spectrum is characterized by maximum peak at 473 nm for pigment of NM2 strain. Antioxidant activity and the reducing ability of pigments increased by increasing their concentrations. NM2 strain pigment showed EC₅₀ concentration of 3.30 mg/ml for DPPH free radical scavenging activity, and EC₅₀ concentration of 28.46 µg/ml for reducing power.

Discussion and conclusion: Isolation of natural resources of pigment is very important with high anti-oxidant activity. In the current study, pigment of UV-resistant bacteria demonstrated a strong antioxidant activity *in vitro* and pigment of these bacteria could play an important role in UV tolerance. Pigment of UV-resistant bacteria may be an appropriate source for antioxidative-related functional foods and the pharmaceutical industry.

Key words: Ultraviolet radiation, UV-resistant bacteria, *Dietzia maris*, Pigment, Antioxidant, DPPH, Reducing power

* Corresponding author

Received: May 5, 2015 / **Accepted:** September 12, 2015