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 *دیتزیا ماریس* مقاوم به اشعه UV و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه

نرجس زمانیان: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، zamanian_sh@yahoo.com
زهرا 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 *دیتزیا ماریس* به میزان ۹۹درصد 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 mg/ml ۳/۳۰ در مهار رادیکال آزاد از خود نشان داد و برای قدرت احیاکنندگی غلظت EC_{50} معادل µg/ml ۲۸/۴۶ 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، *دیتزیا ماریس*، رنگدانه، آنتی‌اکسیدان، DPPH، قدرت احیاکنندگی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

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 درنهایت 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 کمیکال‌ها از آنتی‌اکسیدان‌های مهم هستند. ارگانیسم‌ها این گونه‌های سمی را به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی از بین می‌برند (۳). آنتی‌اکسیدان‌ها با تحویل‌دادن یک الکترون به رادیکال‌های آزاد، از گرفتن الکترون به‌وسیله رادیکال‌ها از بیومولکول‌های دیگر و آسیب‌زدن به آن‌ها جلوگیری می‌کنند (۴). باکتری‌های مقاوم به اشعه به‌وسیله ترکیبات آنتی‌اکسیدان خود، توانایی مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو و اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن ایجادشده به‌علت تابش اشعه UV را پیدا می‌کنند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌تواند شامل رنگدانه یا سایر متابولیت‌های اولیه و ثانویه تولیدشده در این گونه‌های باکتریایی باشد (۵).

اولین بار جنس *دیتزیا*[1] را به‌جای گونه *رودوکوکوس ماریس*[2]، رینی[3] و همکاران پیشنهاد کردند. این جنس به طور گسترده در طبیعت پراکنده است و تاکنون سیزده گونه از آن شناخته شده است. گونه *دیتزیا ماریس*[4] را هریسون[5] از هالیبوت (نوعی ماهی بزرگ و پهن) جداسازی و تحت عنوان *فلاووباکتریوم ماریس*[6] نامگذاری کرد. این گونه از خاک، پوست و روده ماهی کپور، گلولای اعماق دریا و رسوب و داینوفلاژل *پیرودینیوم باهامنس*[7] نیز جداسازی شد. گزارش‌هایی مبنی بر بیماری‌زایی گونه *دیتزیا ماریس* وجود دارد. بمر ملچیور[8] و همکاران اولین مورد تشخیص حضور باکتری در خون (باکتریمی) را با استفاده از گونه *دیتزیا ماریس* گزارش کردند. این گونه از نمونه بیوپسی استخوان بیمار در بیمارستان جداسازی و به‌عنوان عامل عفونت پروتز استخوان ران تشخیص داده شد (۶).

گونه *دیتزیا ماریس*، یک باکتری کوکسی گرم مثبت، هوازی، بدون حرکت، بدون اسپور، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و دارای کلنی‌های موکوئیدی است. مهم‌ترین فسفولیپدهای موجود در این گونه دیفسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل اینوزیتول مانوزید، فسفاتدیل اینوزیتول و فسفاتیدیل اتانول آمین است. تمامی سویه‌های جنس *دیتزیا* رنگدانه‌های زرد تا نارنجی دارند؛ اما تنها در برخی از سویه‌های این جنس مانند *دیتزیا ناترونولیمنه HS-1* و *دیتزیا ماریس NIT-D* توانایی تولید رنگدانه کانتاگزانتین[9] گزارش شده است. رنگدانه کانتاگزانتین به‌علت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب، ضدتومور و ضدسرطان کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده است. سورفاکتانت‌های میکروبی ترکیبات فعال سطحی هستند که گروه گسترده‌ای از میکرو ارگانیسم‌ها آن‌ها را سنتز می‌کنند (۷ و ۸). گونه *دیتزیا 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).

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 *دایئوکوکوس رادیودورانس* R1 *(ATCC:13939)* به عنوان یک سویه تأییدشده از نظر داشتن مقاومت زیاد به اشعه یونیزه‌کننده و غیریونیزه‌کننده و به‌عنوان شاهد برای تأیید آزمایش‌های انجام‌شده، استفاده شد.

جداسازی باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش: نمونه های 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 جمع آوری شد. از نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده به‌میزان ۱ گرم به ۵۰ میلی‌لیتر محیط *Tryptone glucose yeast* extract (TGY) براث تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ روز در انکوباتور با دور ۱۶۰rpm 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 به‌مدت ۲ تا ۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور جوانه‌زنی اسپورها گرماگذاری شد. سپس پلیت‌ها در فاصله ۱۴سانتی‌متری 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 به‌مدت 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 باکتری های 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 TGYبراث کشت شبانه‌ای تهیه شد و به‌میزان ۱ میلی‌لیتر از آن با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TGY براث تلقیح شد. پس از آن به‌مدت ۹۶ ساعت در ۱۶۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد،

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 جداسازی‌شده با تعیین توالی ژن 16S rRNA: استخراج DNA به‌روش جوشاندن انجام گرفت. به‌منظور تکثیر ژن 16S rRNA نیز از دو آغازگر عمومی:

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

استفاده شد (۱۳). برای آماده‌سازی محصول PCR از master mix 2X آماده شرکت سینا ژن در حجم ۲۵میکرولیتری 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 به‌همراه اندازه نمای DNA 1kb بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد الکتروفورز شد. درنهایت محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Macrogen کره ارسال شد. پس از توالی‌یابی قطعه DNA مدِنظر، به‌وسیله پایگاه داده اطلاعات ژنومی NCBI تشابه جنس و گونه سویه جداسازی‌شده بررسی شد. به‌منظور تأیید نتایج به‌دست‌آمده از بلاست ژنی برای سویه جداسازی‌شده، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer (6.1) برپایه روش Neighbor- Joining و با بوت‌استریپ ۱۰۰تکرار رسم شد.

استخراج رنگدانه: برای استخراج رنگدانه تولیدی توسط سویه جداسازی‌شده، ابتدا سویه جداسازی‌شده بر 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 ۹۹درصد و متانول ۹۵درصد به نسبت ۳ به ۷ به لوله ها اضافه شد و نمونه به شدت ورتکس و به‌مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه با دور ۱۶۰ rpm شیکرگذاری شد. سپس نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm 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 پتری‌دیش استریل تخلیه و در خشک‌کن ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا محلول استون و متانول آن تبخیر شود. درنهایت نمونه‌ها از ته پتری‌دیش تراشیده و در یخچال برای آنالیز نگهداری شدند (۱۴ و ۱۵).

میزان به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH[1] توسط رنگدانه: توانایی ترکیب با هیدروژن یا الکترون‌دهندگی رنگدانه‌های آزمایش‌شده به‌وسیله توانایی بی‌رنگ‌کردن محلول متانولی DPPH که به‌رنگ بنفش بود، انجام شد. در این اندازه گیری که براساس اسپکتروفتومتری انجام شده است، جهت بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی، از رادیکال ۲، ۲ ـ دی فنیل ۱ ـ پیکریل هیدرازیل (DPPH) به‌عنوان معرف استفاده شد. رنگدانه استخراج‌شده به میزان ۰/۰۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر آب دوبارتقطیر استریل اضافه شد، سپس با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ترکیب شد، به‌طوری‌که غلظت نهایی DPPH در محلول ۲میلی‌لیتری برابر ۰/۱ میلی‌مولار به دست آمد. محلول حاصل وورتکس و به‌مدت ۳۰ دقیقه

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

رابطه ۱

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

در فرمول ذکرشده، A_0 جذب نوری در طول موج ۵۱۷ مربوط به نمونه بلانک و A_1 جذب نوری مربوط به غلظت ترکیب آنتی اکسیدان است. پس از آن غلظتی از نمونه رنگدانه که دارای درصد مهار رادیکالی ۵۰درصد بود با نمودار محاسبه شد و به‌عنوان[11] EC_{50} گزارش شد. همچنین ترکیب سنتزی آسکوربیک اسید به‌عنوان نمونه کنترل، استفاده شد.

بررسی قدرت احیاکنندگی: بررسی قدرت احیاکنندگی رنگدانه استخراج‌شده با استفاده از کلرید فریک ($FeCl_3$) یا متد اویاایزو[12] (۱۹۸۶) مشخص شد. رنگدانه به‌میزان ۰/۵ تا ۱۰ میکروگرم در ۱ میلی‌لیتر آب دوبارتقطیر استریل به‌همراه ۲/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=6.6) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱درصد ترکیب و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۰درصد 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 دوبارتقطیر استریل و ۱ میلی‌لیتر کلرید فریک ۰/۱درصد اضافه شد و بلافاصله جذب آن در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. افزایش جذب نسبت به محلول بلانک نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی است. هرچه میزان جذب خوانده‌شده بیشتر باشد قدرت احیاکنندگی نیز بیشتر خواهد بود. آسکوربیک اسید به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد (۱۶).

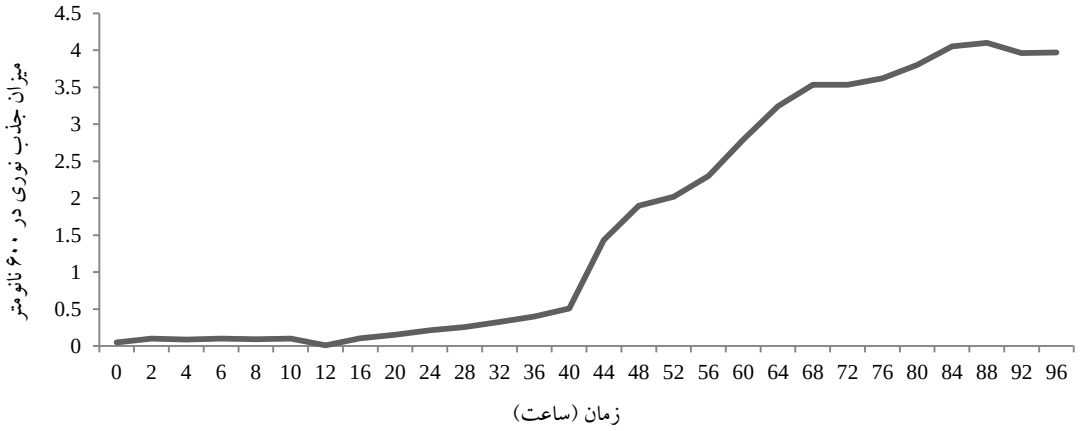
مطالعات آماری: ترسیم نمودارها از داده‌های آزمایش‌های فوق با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2010 و تجزیه و تحلیل آماری‌ها درصورت لزوم، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام گرفت. مقایسه میانگین نمونه‌های مختلف با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ و اختلافات میان تکرارها در یک نمونه با رسم Error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

نتایج

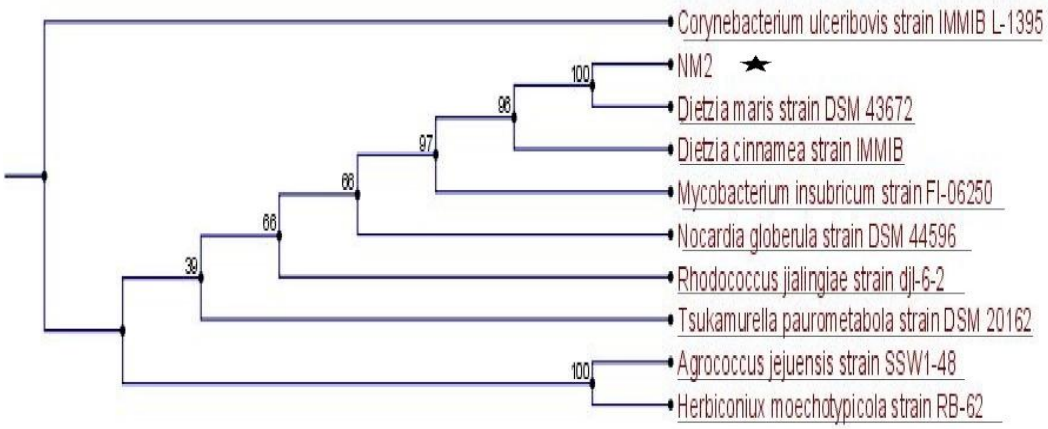
از میان ۱۰ سویه جداسازی‌شده در مرحله غربال‌گری اولیه، یک سویه برتر از نظر دارابودن مقاومت به اشعه فرابنفش و بالاتربودن شمارش کلنی ($۱/۲۲۳ \times ۱۰^{۳}$CFU/ml) پس از تیمار با ۱۵ ژول اشعه فرابنفش از خاک منطقه امیدیه جداسازی، انتخاب و با نام سویه NM2 نامگذاری شد. سویه جداسازی‌شده یک باکتری گرم مثبت، کوکسی، هوازی، بدون اسپور کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و دارای کلنی‌های نارنجی بود. منحنی رشد سویه جداسازی‌شده NM2 در محیط TGYبراث رسم شد. سویه NM2 بعد از حدود ۸۴ ساعت و رسیدن به $OD \cong 4$ به انتهای فاز لگاریتمی خود رسیدند (شکل ۱).

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

بررسی رنگدانه باکتری با استفاده از طیف‌سنج نور مرئی- فرابنفش: استخراج رنگدانه دو سویه مقاوم به اشعه فرابنفش NM2 و *دایئوکوکوس رادیودورانس* R1 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 *دایئوکوکوس 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 *دایئوکوکوس رادیودورانس* R1 بیشترین میزان جذب نوری را در ناحیه ۴۷۹ نانومتر از خود نشان دادند.



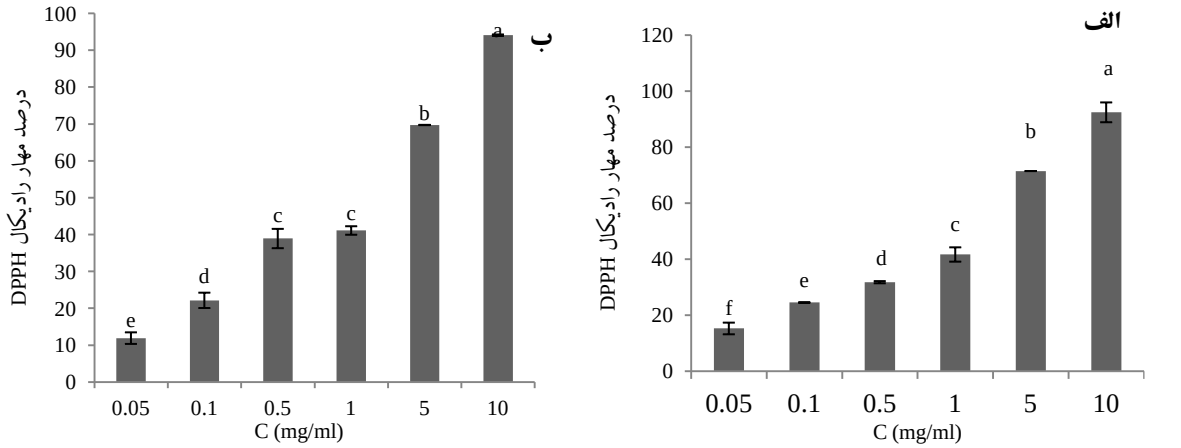
شکل ۱- منحنی رشد سویه NM2 در محیط TGYبراث در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰ دور در دقیقه در مدت‌زمان ۹۶ ساعت



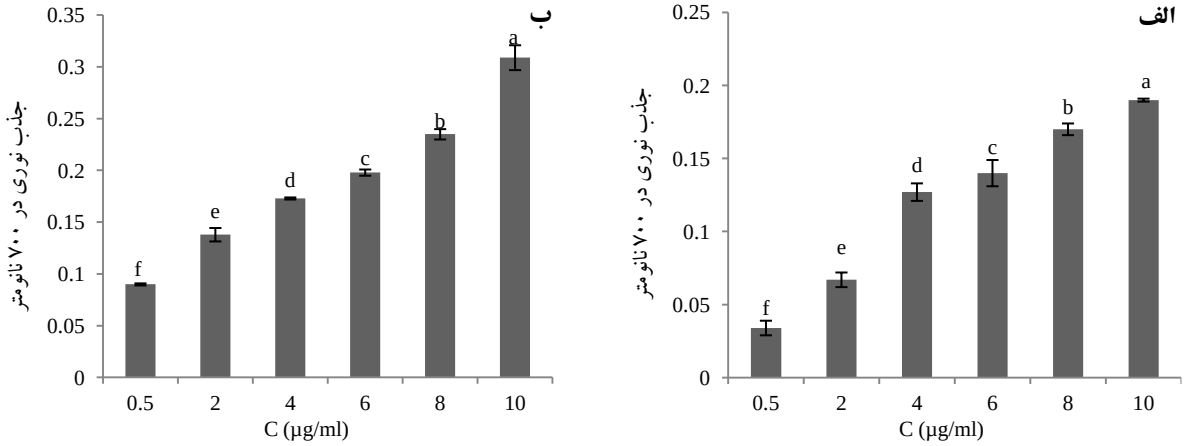
شکل ۲- درخت فیلوژنی سویه جداسازی‌شده NM2 ترسیم‌شده با نرم‌افزار CLC 6.1 برپایه روش Neighbor-joining با بوت‌استریپ ۱۰۰ تکرار

میزان به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH: اثر آنتی‌اکسیدانی رنگدانه سویه جداسازی‌شده 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 به‌دست‌آمده 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 ۵۰درصد 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، به‌ترتیب برای سویه NM2 و *داینوکوکوس رادیودورانس* R1 برحسب معادله‌های خط $y = 7.1633x + 26.29$ و $y = 7.2657x + 26.149$ به‌دست آمده حاصل شد. توانایی مهار رادیکال آزاد توسط رنگدانه استخراج‌شده در غلظت‌های بررسی‌شده نسبت به ترکیب سنتزی آسکوربیک اسید ضعیف‌تر بود؛ اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه برابر قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیب آسکوربیک اسید بود. مطالعات آماری نشان داد افزایش غلظت رنگدانه سویه‌های باکتریایی تأثیر معناداری بر مهار رادیکال آزاد دارد ($P\ value < 0.05$).

بررسی قدرت احیاکنندگی: احیای آهن سه‌ظرفیتی می‌تواند شاخصی از قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه استخراج‌شده باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها (عوامل احیاکننده) منجر به احیاء کمپلکسی فری‌سیانید می‌شوند. نتایج به دست‌آمده 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 ($P\ value < 0.05$). معادلات خط برای محاسبه میزان EC_{50} حاصل شد و میزان EC_{50} برای رنگدانه سویه NM2 و *داینوکوکوس رادیودورانس* R1 به‌ترتیب 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 کمتربودن غلظت EC_{50} در سویه *داینوکوکوس رادیودورانس* R1، قدرت احیاکنندگی این رنگدانه بیشتر از رنگدانه سویه NM2 است.



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 ۵درصد؛ حروف غیرمشابه در یک سویه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در یک متغیر.



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

بحث و نتیجه‌گیری

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 مالون‌دی‌آلدهید[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 بیکسین[۱۷] مبنی بر جلوگیری از تکثیر سلول‌های لوکمی K562 با القای آپپتوز وجود دارد. استفاده از میکروب‌های غنی از کارتنوئید، مزایای بالاتری در استخراج، کاهش هزینه‌های تولید و نداشتن نگرانی برای تغییرات فاکتورهایی مانند آب‌وهوا و یا منشأ تأمین منابع را فراهم می‌کند. *دینوکوکوس 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 *دینوکوکوس رادیودورانس* R1 را بر آسیب‌هایی که ترکیب تتراکلریدکربن به سلول‌های کبدی موش می‌رساند، بررسی کردند. نتایجِ آن نشان داد داینوگزانتین یک اثر محافظتی بر سلول‌های کبدی موش دارد؛ این عملکرد حفاظتی به‌علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه فوق است (۱۷).

یکی از معیارها در مشخص‌کردن 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

رنگدانه داینوگزانتین استخراج‌شده از سویه *داینوکوکوس رادیودورانس* R1 با استفاده از حلال متانول در نواحی ۴۷۹، ۵۰۶ و ۴۵۱ نانومتر بود (۱۹). نتایج به‌دست‌آمده 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 پیکی در ناحیه ۴۷۵ نانومتر و ایزومرهای سیس پیکی در ناحیه ۴۶۵/۳ نانومتر دارند (۱۴). بیشترین جذب نوری به‌دست‌آمده 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، به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان مطرح می‌شوند. میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیب بررسی‌شده رابطه مستقیم دارد (۲۱). اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد با DPPH یک روش معتبر و مقرون‌به‌صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا است که در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش استفاده شد. رنگدانه استخراج‌شده از سویه *دیتزیا ماریس* NM2 دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی زیادی است. هرچه غلظت EC_{50} کمتر باشد نشان‌دهنده قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در رنگدانه استخراج‌شده است. قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه سویه *دیتزیا ماریس* NM2 با قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه داینوگزانتین با توجه به غلظت EC_{50} برابری می‌کند. در پژوهشی در سال ۲۰۱۳ که ساسیدهاران[۲۱] و همکاران بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه آستاگزانتین در غلظت‌های ۲۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استخراج شده از برخی سویه‌های جنس *اگزیگوباکتریوم* انجام دادند، میانگین درصد رادیکال آزاد DPPH که این رنگدانه‌ها مهار کردند، ۷۲درصد سنجیده شد (۱۵). با توجه به بیشتربودن 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 به‌وسیله 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 به‌ترتیب برابر با ۲۰درصد و ۳۹درصد بود که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه با نتایجی که تیان و همکاران به دست آوردند هم‌خوانی داشت (۲۲). ونگوپالان و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ با مطالعه قدرت آنتی‌اکسیدانی بر ایزومرهای سیس و ترانس، رنگدانه کانتاگزانتین مشتق‌شده از سویه K44 در جنس دیتزیا مشاهده کردند ایزومرهای سیس فعالیت مهارکنندگی

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 جذب‌نوری 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 به‌دست‌آمده 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 استخراج‌شده از سویه *دیتزیا ماریس* NM2 قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشت و غلظت EC_{50} به‌دست‌آمده 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 به‌دست‌آمده در این پژوهش در غلظت‌های بررسی‌شده با میزان قدرت احیاکنندگی که چنگ و همکاران در همین غلظت‌ها به دست آوردند، هم‌خوانی داشت.

جداسازی منابع طبیعی تولیدکننده رنگدانه‌هایی با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا و سپس شناسایی ساختمان آن ها و تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی به‌منظور استفاده از آن ها 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 جداسازی‌شده *دیتزیا ماریس* با دارابودن 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 به‌دست‌آمده از این ارگانسیم‌ها جایگزین مواد و ترکیبات شیمیایی سنتزی استفاده‌شده در صنعت شود. با وجود توانایی بالای باکتری‌های مقاوم به اشعه فرابنفش در زمینه تجزیه و تغییر شکل ترکیبات آلی و بالابودن 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.

(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 *Agrocybe 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. Deinoxanthin: 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]- ß- 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 EC_{50} concentration of 3.30 mg/ml for DPPH free radical scavenging activity, and EC_{50} 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