



Scan online to view this article

**Application of phenazine pigment of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to prepare colored paper and candle**  
Maliheh Najafi<sup>1</sup>, Mahboobeh Nakhaei Moghaddam<sup>2\*</sup>, Mahboobeh Najafi<sup>1</sup>,  
Ehsan Yousefi<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** Microorganisms are more important than other sources in dye production because microorganisms have advantages such as rapid growth, higher yields, and easier extraction. Natural pigments are healthier than chemical types and their use is useful in various industries. The aim of this study was to isolate and extract the pyocyanin pigment from *Pseudomonas aeruginosa* isolates in order to preparation of colored paper and candle.

**Material and Methods:** In this study, sampling was performed from different hospital environments in order to isolate *P. aeruginosa*. Environmental isolates of *P. aeruginosa* were identified using morphological features and differential biochemical methods. Confirmatory identification was performed by tracing the *pbo1* gene using colony PCR. After extracting pyocyanin pigment with chloroform, finally, the produced pyocyanin was used to prepare colored paper and candle and the optical stability of pyocyanin was investigated.

**Results:** From 43 environmental samples collected, 15 isolates of *P. aeruginosa* were identified and confirmed by molecular method. The mean of optical absorption (OD<sub>520</sub>) of pyocyanin after extraction was 0.488. Staining of paper and candle with the extracted pyocyanin was successful and the optical stability of pyocyanin was favorable.

**Conclusion:** Due to the rapid growth of bacteria and the possibility of its mass production in a short time and based on the results of this study, bacterial pigments can be used in various industries, including paper industry, and replaced by chemical dyes.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Phenazine, *pbo1* gene, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Email: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

## کاربرد پیگمان فنازین ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا

## برای تهیه کاغذ و شمع رنگی

ملیحه نجفی<sup>۱</sup>، محبوبه نخعی مقدم<sup>۲\*</sup>، محبوبه نجفی<sup>۱</sup>، احسان یوسفی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** میکروارگانیسم ها نسبت به سایر منابع در تولید رنگ، اهمیت دارند، زیرا میکروارگانیسم ها مزایایی از جمله رشد سریع، بازدهی بالاتر و استخراج راحت تر دارند. رنگدانه های طبیعی سالم تر از انواع شیمیایی هستند و استفاده از آن ها در صنایع مختلف مفید است. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و استخراج پیگمان پیوسیانیین از ایزوله های محیطی سودوموناس آئروجینوزا به منظور تهیه کاغذ و شمع رنگی بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه، به منظور جداسازی سودوموناس آئروجینوزا، نمونه برداری از محیط های مختلف انجام شد. ایزوله های محیطی سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از ویژگی های مورفولوژی و روش های بیوشیمیایی افتراقی شناسایی شدند. شناسایی تأییدی از طریق ردیابی ژن *pbo1* با روش کلنی Polymerase Chain Reaction انجام شد. پس از استخراج پیگمان پیوسیانیین با کلروفرم، در نهایت از پیوسیانیین تولیدی برای تهیه کاغذ و شمع رنگی استفاده و ثبات نوری پیوسیانیین بررسی شد.

**یافته ها:** از ۴۳ نمونه محیطی جمع آوری شده، تعداد ۱۵ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا شناسایی و با روش مولکولی تأیید شد. میانگین جذب نوری ( $OD_{520}$ ) پیوسیانیین سودوموناس آئروجینوزا بعد از استخراج ۰/۴۸۸ بود. رنگ آمیزی کاغذ و شمع با پیوسیانیین استخراج شده موفقیت آمیز و ثبات نوری پیوسیانیین مطلوب بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به رشد سریع باکتری ها و امکان تولید انبوه آن در مدت زمان کوتاه و بر اساس نتایج تحقیق حاضر، می توان از پیگمان باکتری ها در برخی صنایع از جمله صنعت کاغذ استفاده و آن ها را جایگزین رنگ های شیمیایی کرد.

**واژگان کلیدی:** سودوموناس آئروجینوزا، فنازین، ژن *pbo1*، Iau Science.

## مقدمه

رنگ های مصنوعی مشکلات زیست محیطی و بهداشتی قابل توجهی را ایجاد کرده اند. در مقابل، رنگدانه های میکروبی سازگار با محیط زیست هستند و در صنایع نساجی، به عنوان رنگ های خوراکی، آنتی اکسیدان ها، شاخص های زیستی و

## نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

پست الکترونیکی: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳

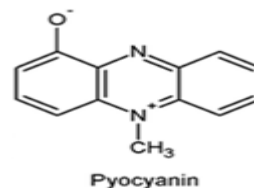
عوامل ضد میکروبی و ضد سرطان استفاده می شوند (۱). مواد شیمیایی حاصل از منابع نفتی و پتروشیمی از طریق فرآیندهای شیمیایی خطرناک تولید می شوند که بسیاری از آن ها تهدیدی برای محیط زیست و سلامت انسان به شمار می روند. برخی از عوارض این رنگ ها شامل اثرهای سرطان-زایی، تضعیف سیستم ایمنی، ایجاد آلرژی و کهیر، اختلال های رفتاری و بیش فعالی در کودکان، رتینوپاتی، آسیب های کبدی و اختلال در متابولیسم لیپیدها و آسم است (۲). در سال های اخیر به توسعه فناوری مواد اولیه در رنگرزی سازگار با محیط زیست، تجدیدپذیر، پایدار و ایمن توجه فراوانی شده است. استفاده از مواد طبیعی فاقد حساسیت-

در سودوموناس آئروجینوزا دو نسخه اختصاصی از اپرون بیوسنتز پیوسیانین (*pbo*)، به نام  $phz A_1 B_1 C_1$  (*phzI*) و  $phz A_2 B_2 C_2 D_2 E_2 F_2 G_2$  (*phzII*) و  $D_1 E_1 F_1 G_1$  وجود دارد. این دو اپرون ۹۸/۳ درصد در سطح DNA به صورت همولوگ هستند، ولی در ناحیه پرموتور متفاوت اند. علاوه بر این، دو ژن دیگر به نام های *phz S* و *phz M* نقش اساسی در مسیر بیوسنتز پیوسیانین دارند (۱۳، ۱۴). اثرهای مضر رنگ های مصنوعی و مواد شیمیایی مورد استفاده در زمان رنگ آمیزی ما را بر آن داشت تا در مورد تهیه رنگ جایگزین با استفاده از منابع طبیعی تلاش کنیم. بنابراین، با توجه به اهمیت حفاظت از محیط زیست و نقش پیگمان های زیستی در کاهش آلودگی های زیست محیطی، هدف از انجام این تحقیق، استخراج پیگمان پیوسیانین از ایزوله های محیطی سودوموناس آئروجینوزا به منظور تهیه کاغذ و شمع رنگی بود.

## مواد و روش ها

**جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی سودوموناس آئروجینوزا**  
برای جمع آوری ایزوله های محیطی سودوموناس آئروجینوزا نمونه برداری توسط سوآب استریل از نواحی شامل سرویس بهداشتی، صابون، حمام، خاک، دستگاه دیالیز و ساکشن و سطح وسایل در منزل و یا بیمارستان انجام گرفت و سوآب داخل محیط نوترینت براث استریل انداخته شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و انکوباسیون شبانه آن ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و شرایط هوازی، انتقال با روش کشت ایزوله روی محیط ائوزین متیلن بلو آگار و ستریماید آگار انجام گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. سپس کلونی های مشکوک، جداسازی و خالص سازی شدند. شناسایی بیوشیمیایی باکتری های سودوموناس آئروجینوزا جدا شده با استفاده از رنگ آمیزی گرم و آزمایش های بیوشیمیایی مرسوم (اکسیداز، کاتالاز، متیل رد، اوره، کشت در محیط های TSI آگار، SIM، سیمون سترات، محیط OF و کشت در محیط ستریماید آگار (شکل ۲) و رشد در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  انجام شد (۱۵).

زایی، غیر سمی و دوست دار محیط زیست در صنعت حائز اهمیت است (۳). تاکنون بیش از ۱۵۰۰ ماده رنگزای طبیعی مورد بررسی و شناخت قرار گرفته اند (۴). امروزه به دلیل افزایش روز افزون مخاطرات ناشی از فرآورده های نفتی و پساب های سمی ناشی از آن، پتانسیل های فراوان طبیعت و زیست گونه ها و همچنین با ظهور موضوع های مختلف مرتبط با استفاده بیش از حد از پیگمان های مصنوعی نظر محققان را به خود جلب کرده اند و تحقیقات گسترده ای در مورد رنگ های طبیعی در سال های اخیر آغاز شده است. از جمله منابع عظیم و متنوع طبیعی، میکروارگانیسم ها هستند. فرآورده های تولیدی توسط میکروارگانیسم ها طیف گسترده ای دارند. میکروارگانیسم ها به دلیل توانایی در تولید رنگ ها، آنزیم ها، داروها و تجزیه و تبدیل مواد شیمیایی، جایگزین مناسبی برای آینده ی بدون نفت هستند. تولید پیگمان های زیستی از باکتری ها، به دلیل سرعت رشد بالا، قابلیت تولید انبوه، پایین بودن هزینه تولید، بازده بالا، ثبات و پایداری بالا و سهولت پردازش فرآورده های پایین دستی یک روش مناسب برای جایگزینی رنگ های شیمیایی است (۸-۵). در حال حاضر حجم گسترده ارتباطات فرهنگی، اقتصادی، اجتماعی و تبادل اطلاعات سبب افزایش مصرف کاغذ و محصول های کاغذی شده است؛ از این جهت صنعت کاغذ و صنایع مرتبط به آن در دنیای کنونی جایگاه ویژه ای دارد (۹). سودوموناس آئروجینوزا یک باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی و باسیلی شکل و یکی از ارگانیسم های با ارزش تجاری است که بسیاری از سویه های آن مسئول تولید رنگدانه های محلول در آب مانند پیوسیانین (آبی)، پیووردین (زرد-سبز)، پیوروبین (قرمز) و پیوملانین (قهوه ای) هستند (۱۰-۱۳). پیوسیانین (ان-متیل، ال-هیدروکسی فنازین) از نظر شیمیایی در گروه فنازین ها قرار دارد. فنازین ها ترکیب های هیدروسیکلیک نیتروژن دار هستند (شکل ۱) (۱۲، ۱۳).



شکل ۱. ساختار پیوسیانین



شکل ۲. رشد یکی از ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا در محیط ستریماید آگار

### شناسایی مولکولی سودوموناس آئروجینوزا

جهت تأیید باکتری های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه های محیطی و ردیابی ژن تولید پیگمان از روش کلنی PCR و آغازگرهای ژن *pboI* (Sinaclon, Iran) مطابق با جدول ۱ استفاده شد. با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی و داده های موجود در پایگاه NCBI استخراج توالی دقیق ژن *pboI* صورت پذیرفت. ابتدا توالی کامل ژن

*pboI* براساس سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (سودوموناس آئروجینوزا *PAO<sub>1</sub>* و Accession no=AF005404) در نظر گرفته شد و سپس با نرم افزار 7 oligo پرایمرهای مناسب برای تکثیر بخشی از ژن ها طراحی شدند. جهت اطمینان از صحت توالی های استخراج شده، ارزیابی آن ها با استفاده از جعبه ابزار BlastN در پایگاه NCBI انجام شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن *pboI* در ایزوله های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه های محیطی

| توالی آغازگر پیشرو (۵'→۳') | توالی آغازگر پیرو (۵'→۳') | طول محصول PCR (جفت باز) |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| CGCTCGGGATCGCTTCTG         | GGACGCCTGACGCTGATC        | ۴۰۰                     |

مخلوط واکنش کلنی PCR برای تکثیر ژن *pboI* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۰/۲ mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر منیزیم کلرید (۰/۲ mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پیرو (۰/۲۵ Pmol/μl)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq پلی مراز (۱/۲ unit/μl) (Sinaclon, Iran)، ۳ میکرولیتر بافر واکنش گر (۱ X)، ۱ کلنی از باکتری و ۱۷/۵ میکرولیتر آب مقطر آماده شد. کلنی PCR توسط ترموسایکلر (Kyrattec, Kore) و مطابق با چرخه های دمایی زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه، اتصال در دمای ۵۸°C به مدت ۱ دقیقه، بسپارش در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسپارش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه. محصول های واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (CinnaGen, Iran) به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز (Interlab, Italy) شدند. سپس نمونه های رانده شده در ژل توسط دستگاه فرابنفش لومیناتور

(Caution, EEC) مشاهده و در نهایت از باندها با استفاده از دستگاه ژل داگ (Kimiagene, Iran) عکس گرفته شد (۱۶). از سودوموناس آئروجینوزا با شماره استاندارد ATCC 1074 (تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

### استخراج پیوسیانین سودوموناس آئروجینوزا

مقدار ۲۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون سودوموناس آئروجینوزا ( $OD_{620} = 0.1$ ) رشد یافته در محیط لوریا برتانی (LB, Merck, Germany) به ۲۵ میلی لیتر محیط گلیسرول آلانین (GA, Merck, Germany) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (دمای ۳۷°C) با سرعت ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد. در مرحله بعد، نمونه ها با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma, USA) شدند. مایع رویی جمع آوری و از فیلتر با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. به ۷/۵ میکرولیتر از مایع رویی فیلتر شده، مقدار ۴/۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه و ۱۰ مرتبه،

ظرفیت بالاتر پیگمان استفاده شد. رنگ با استفاده از حلال کلروفرم استخراج و به منظور تغلیظ، ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  گذاشته شد. از ۲۵ میلی لیتر محیط GA که سودوموناس *آئروجینوزا* در آن تولید پیگمان پیوسیانین کرده بود، ۱۸ میلی لیتر محلول رنگ جدا شد که ۴ میلی لیتر از آن برای رنگ آمیزی کاغذ مورد استفاده قرار گرفت. به این صورت که کاغذ در بشر حاوی محلول قرار داده شد و بعد از ۱۰ دقیقه، کاغذ از بشر خارج و در دمای محیط خشک شد. از لایه آبی شده به پارافین مذاب اضافه گردید. بعد از مدتی پارافین در دمای اتاق می بندد و یک شمع با رنگ پیگمان باکتری تهیه می شود.

### بررسی ثبات نوری پیگمان

ثبات نوری کاغذ رنگ آمیزی شده مطابق استاندارد ISO 105/B02 توسط دستگاه ثبات نوری (Ress Sanj, Iran) اندازه گیری شد (۱۸).

## یافته ها

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی ایزوله های سودوموناس *آئروجینوزا* از نمونه های محیطی و ردیابی ژن مولد پیگمان بر اساس نتایج آزمون های بیوشیمیایی در جدول ۲، تعداد ۱۵ ایزوله سودوموناس *آئروجینوزا* از نمونه های محیطی جمع آوری شد.

جدول ۲. نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت تشخیص سودوموناس *آئروجینوزا*

| آزمایش | گرم     | اکسیداز | کاتالاز | تخمیر قندها | اندول | حرکت | رشد در محیط ستریماید در دمای $37^{\circ}\text{C}$ | متیل رد | اوره آز | سیتراتاز |
|--------|---------|---------|---------|-------------|-------|------|---------------------------------------------------|---------|---------|----------|
| نتیجه  | باسیل G | +       | +       | -           | -     | +    | +                                                 | -       | -       | +        |

سودوموناس *آئروجینوزا* بعد از استخراج با ۳ تکرار در جدول ۳ آمده است.

همان طوری که در جدول ۵ مشخص است، در میان ایزوله های محیطی سودوموناس *آئروجینوزا*، ایزوله ۲ و ۱۱ بیش ترین میزان تولید پیوسیانین و ایزوله ۱۰ کم ترین مقدار تولید پیگمان را بر اساس جذب نوری در طول موج  $520\text{nm}$  داشتند.

هر مرتبه به مدت ۲ ثانیه ورتکس شد. این مرحله برای هر ایزوله ۳ بار تکرار شد. کلروفرم در ته لوله قرار می گیرد و به علت اینکه پیوسیانین در کلروفرم حل می شود، به آبی متمایل به سبز تغییر رنگ می دهد. سانتریفیوژ نمونه ها پس از تغییر رنگ با سرعت  $10000\text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار ۳ میلی لیتر از لایه آبی رنگ جمع شده در ته لوله (مخلوط کلروفرم و پیوسیانین) به لوله جدید منتقل و به منظور اسیدی شدن مخلوط، مقدار  $1/5$  میلی لیتر اسید کلریدریک  $0.2\text{M}$  به آن اضافه و ورتکس شد (تغییر رنگ آبی به صورتی). سپس، نمونه ها با سرعت  $10000\text{ rpm}$  به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ و مقدار ۱ میلی لیتر از مایع صورتی رنگ به کووت منتقل و جذب آن در طول موج  $520\text{nm}$  نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. این آزمایش به طور مشابه، برای تمامی ایزوله ها و سویه استاندارد سودوموناس *آئروجینوزا* ATCC 1074، ۳ بار تکرار شد. در نهایت غلظت پیوسیانین با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۷).

$$\text{غلظت پیوسیانین (میکروگرم در میلی لیتر)} = \text{OD}_{520} \times 17.072 \times 1/5$$

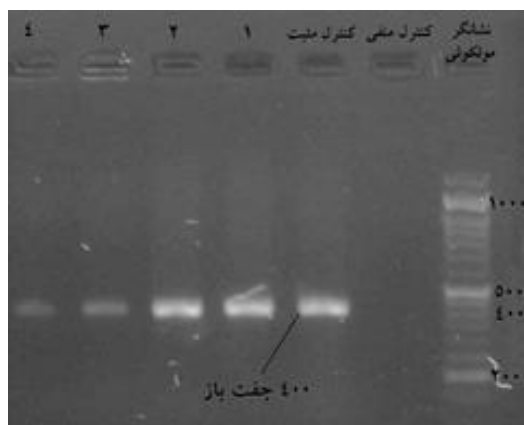
تهیه کاغذ و شمع رنگی با استفاده از پیگمان پیوسیانین استخراج شده

از پیوسیانین تولید شده در محیط GA برای تهیه کاغذ و شمع رنگی استفاده شد. برای این منظور از ایزوله های با

نتایج کلنی PCR وجود ژن *pbo1* را در تمامی ۱۵ ایزوله سودوموناس *آئروجینوزا* جدا شده تایید کرد. در شکل ۳، ژل الکتروفورز محصول کلنی PCR تعدادی از ایزوله ها در کنار نشانگر ۵۰ جفت بازی نشان داده شده است.

### استخراج پیوسیانین سودوموناس *آئروجینوزا*

پیوسیانین سودوموناس *آئروجینوزا* بعد از استخراج در شکل ۴ نشان داده شده است. میانگین جذب نوری پیوسیانین



شکل ۳. ژل الکتروفورز محصول کلنی PCR بعد از تکثیر ژن *pbo1* تعدادی از ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا (۱-۴: نمونه‌ها)



شکل ۴. پیوسیانین سودوموناس آئروجینوزا بعد از استخراج

جدول ۳. جذب نوری ( $OD_{520}$ ) پیوسیانین استخراج شده از ایزوله‌های محیطی سودوموناس آئروجینوزا

| بakteri    | جذب نوری پیوسیانین بعد از استخراج |           |           |
|------------|-----------------------------------|-----------|-----------|
|            | تکرار اول                         | تکرار دوم | تکرار سوم |
| استاندارد  | ۰/۵۰۲                             | ۰/۵۰۱     | ۰/۵۰۷     |
| ایزوله ۱   | ۰/۵۰۰                             | ۰/۴۹۸     | ۰/۵۰۲     |
| ایزوله ۲   | ۰/۷۲۱                             | ۰/۷۲۲     | ۰/۷۲۴     |
| ایزوله ۳   | ۰/۴۹۰                             | ۰/۴۹۲     | ۰/۴۹۰     |
| ایزوله ۴   | ۰/۵۳۹                             | ۰/۵۳۸     | ۰/۵۴۰     |
| ایزوله ۵   | ۰/۲۵۰                             | ۰/۲۵۲     | ۰/۲۵۴     |
| ایزوله ۶   | ۰/۳۸۸                             | ۰/۳۸۷     | ۰/۳۴۰     |
| ایزوله ۷   | ۰/۳۸۲                             | ۰/۳۸۰     | ۰/۳۸۳     |
| ایزوله ۸   | ۰/۳۱۰                             | ۰/۳۰۹     | ۰/۳۱۲     |
| ایزوله ۹   | ۰/۶۷۰                             | ۰/۶۷۵     | ۰/۶۷۳     |
| ایزوله ۱۰  | ۰/۲۴۱                             | ۰/۲۴۳     | ۰/۲۴۰     |
| ایزوله ۱۱  | ۰/۷۰۴                             | ۰/۷۰۳     | ۰/۷۰۵     |
| ایزوله ۱۲  | ۰/۳۵۸                             | ۰/۳۵۹     | ۰/۳۴۱     |
| ایزوله ۱۳  | ۰/۵۵۰                             | ۰/۵۵۲     | ۰/۵۵۴     |
| ایزوله ۱۴  | ۰/۶۵۴                             | ۰/۶۵۳     | ۰/۶۵۵     |
| ایزوله ۱۵  | ۰/۶۶۱                             | ۰/۶۶۵     | ۰/۶۶۷     |
| میانگین    | ۰/۴۹۵                             | ۰/۴۹۵     | ۰/۴۷۴     |
| میانگین کل | ۰/۴۸۸                             |           |           |



شکل ۵، کاغذها و شمع رنگ آمیزی شده با پیگمان پیوسیانین تولید شده توسط ایزوله های محیطی سودوموناس *آئروجینوزا* را نشان می دهد. ثبات رنگ کاغذ بعد از رنگ آمیزی با پیوسیانین مطلوب تعیین شد.



شکل ۵. کاغذها و شمع رنگ آمیزی شده با پیگمان پیوسیانین

## رنگ آمیزی کاغذ و تهیه شمع با پیگمان پیوسیانین و بررسی ثبات نوری پیوسیانین

پیگمان پیوسیانین هستند (۲۰). در این مطالعه، بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی و مولکولی (ردیابی ژن *pbo1* ژن اپرون بیوسنتز پیوسیانین) تعداد ۱۵ ایزوله سودوموناس *آئروجینوزا* از نمونه های محیطی جدا و شناسایی شد. در مطالعه Higgins و همکاران در سال ۲۰۱۸، مشابه با تحقیق حاضر از ژن *pbo* (*phz1* و *phz2*) برای شناسایی سودوموناس *آئروجینوزا* استفاده کردند (۱۴). در میان ایزوله های محیطی سودوموناس *آئروجینوزا*، توانایی تولید پیگمان در ایزوله های مختلف، بر اساس جذب نوری در طول موج ۵۲۰ nm، با یکدیگر و با سویه رفرنس متفاوت بود. Khan و همکاران در سال ۲۰۱۹، مشابه با تحقیق حاضر از سودوموناس *آئروجینوزا* PAOI KCTC 1637 پیگمان پیوسیانین استخراج کردند (۲۱). نتیجه رنگ آمیزی کاغذ و شمع با پیوسیانین مطلوب و قابل قبول بود. میزان تولید پیگمان در ایزوله های مختلف متفاوت بود که می توان با شناسایی ایزوله های با پتانسیل تولید بیشتر و بهینه سازی شرایط محیطی، میزان استخراج رنگ را افزایش داد. در تحقیق حاضر نیز، در میان ایزوله های مختلف مورد آزمایش، میزان تولید پیگمان در ایزوله ۲ بیش تر از سایرین و سویه رفرنس بود که می تواند به عنوان سویه برتر برای تولید رنگ معرفی شود.

## بحث

پیگمان ها به طور وسیعی در تهیه غذا، پوشاک، اسباب بازی کودکان، رنگرزی و صنایع دیگر به کار می رود. به این دلیل که رنگ دهنده های شیمیایی مشکلاتی را برای انسان و محیط زیست ایجاد می کنند، تحقیقات متعددی برای دسته یابی به محصول های مطمئن و پیگمان های طبیعی از منابع طبیعی انجام شده است. مدافعان محیط زیست معتقدند که رنگ های طبیعی از لحاظ کیفی دارای جایگاه بالاتری بوده و به دلیل طیف رنگی گسترده ای که دارند، چشم نوازتر هستند. همچنین، سازگاری این دسته از رنگ ها با طبیعت و قابلیت تجزیه پذیری آن ها از اهمیت بالایی برخوردار است. رنگ های طبیعی به دلیل تنوع بالا و آسان بودن تولید مورد توجه قرار گرفته اند (۱۹). رنگدانه های میکروبی به دلیل سرعت رشد بالای میکروب ها و امکان تولید انبوه این رنگدانه ها اهمیت دارند (۵). در این رابطه بر آن شدیم تا تولید رنگ از ایزوله های محیطی سودوموناس *آئروجینوزا* که تحقیقات در مورد جنبه کاربردی آن کم بود و رنگدانه تولیدی نیز رنگ زیبایی داشت، مورد مطالعه قرار دهیم. در همین رابطه، Nowroozi و همکاران گزارش کردند که سودوموناس هایی که دارای ژن های *phzM* و *phzS* هستند، قادر به تولید

در مطالعه‌های گذشته، پیشینه‌ای در جهت تهیه کاغذ و شمع رنگی با پیگمان‌های سودوموناس *آئروجینوزا* یافت نشد. مشابه با پژوهش حاضر، در مطالعه‌های گوناگون از پیگمان‌های باکتریایی در صنایع مختلف از جمله رنگریزی لباس، صنایع غذایی و دارویی و محصول‌های آرایشی به-عنوان رنگ‌زا استفاده شده است (۲۲،۲۳). در تحقیق DeBritto و همکاران در سال ۲۰۲۰، پارچه‌های پنبه‌ای را با پیوسیانین استخراج شده از سودوموناس *آئروجینوزا* رنگ-آمیزی کردند که همانند تحقیق حاضر، ثبات رنگ تأیید شد (۱۱). Jissa و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از پیگمان تولید شده توسط گونه‌های *سریشیا* اقدام به رنگ‌آمیزی لاستیک، کاغذ، منسوجات و پلاستیک نمودند و بیان کردند که پیگمان استخراج شده خاصیت رنگریزی دارد و همانند تحقیق حاضر، ثبات رنگ با آزمایشات مربوطه تأیید شد (۲۴). Heydari و همکاران در سال ۱۳۹۳، پتانسیل جذب پرتوی فرابنفش توسط رنگدانه جداسازی شده از قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* به‌منظور استفاده در ترکیب‌های ضد آفتاب را بررسی نمودند. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که پیگمان‌های جداسازی شده از قارچ‌های *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* محافظت خوبی را در مقابل اشعه ماورای بنفش از خود نشان داده‌اند. همچنین در زمینه بررسی تنوع رنگ، در بین گونه‌های قارچی مورد ارزیابی پیگمان‌های زرد و مشکی بهترین جذب اشعه را دارا بودند. بنابراین می‌توان از این پیگمان‌های طبیعی به‌جای ترکیب-های شیمیایی در کرم‌های ضد آفتاب استفاده نمود (۲۵). در تحقیق حاضر با استخراج پیوسیانین، کاغذ و شمع رنگ-آمیزی شد که مزایای استفاده از پیگمان باکتری‌ها، رشد سریع، محیط کشت ارزان و تنوع رنگ در رنگدانه‌ها است. محققین نشان داده‌اند که پیگمان قارچ‌هایی مثل *پنی‌سیلیوم* و *موناسکوس* را می‌توان استخراج نمود و در صنایع چرم، پارچه، کاغذ و رنگ استفاده کرد (۲۶). سودوموناس *آئروجینوزا* توانایی تولید رنگدانه‌های محلول در آب نظیر رنگدانه غیر فلئورسنتی آبی رنگ یا پیوسیانین که محلول در آب و کلروفرم است، رنگدانه فلئورسنتی سبز رنگ به نام پیوردین، رنگدانه فلئورسنتی قرمز تیره پیوروبین و رنگدانه فلئورسنتی سیاه پیوملانین را دارد. پیوسیانین رنگدانه اختصاصی سودوموناس است و می‌توان آن را با کلروفرم از محلول‌های آبی جدا کرد. اغلب این رنگدانه‌ها دارای عملکردهای زیستی مهمی از جمله فعالیت آنتی‌بیوتیکی،

ضد قارچی و ضد توموری هستند (۲۷). رنگ حاصله برخلاف باکتری مولد آن خاصیت بیماری‌زایی نداشت، بلکه همان‌طوری‌که ذکر شد می‌تواند خاصیت ضد میکروبی داشته باشد.

در سال‌های اخیر توجه زیادی به پیگمان‌های میکروارگانیزم‌ها و مسیرهای بیوسنتز آن‌ها شده است. میکروارگانیزم‌هایی هم‌چون قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌توانند یک منبع با ارزش برای تولید مواد رنگی باشند و با طیفی گسترده به‌کار روند. تولید رنگ‌های مصنوعی شاید از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد، اما رنگ‌های مصنوعی با چالش‌هایی از جمله وابستگی به منابع نفتی غیرقابل احیا، سمیت محیطی، مسائل بهداشتی و عدم بازیافت رو به‌رو هستند. در حالی که رنگ‌های طبیعی مصرف شده می‌توانند بازیافت شده و هیچ بوی نامطبوعی ندارند. بنابراین جستجوی منابع طبیعی که از لحاظ زیست‌محیطی هم سازگار باشند، برای تولید مواد رنگی یک نیاز ضروری است (۲۸). در تحقیق حاضر با پیگمان طبیعی پیوسیانین کاغذ رنگ‌آمیزی شد، ولی با تحقیقات بیش‌تر برای تعیین ساختار پیگمان‌ها و حذف گروه‌های سمی پیگمان‌ها می‌توان از آن‌ها در صنایع مختلف استفاده نمود.

پیگمان‌های طبیعی از دو منبع مهم گیاهان و میکروارگانیزم‌ها حاصل می‌شوند. تولید پیگمان از میکروارگانیزم‌ها با توجه به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیش‌تری است. بسته به نوع ترکیب‌ها، آن‌ها عملکردهای متفاوت و متنوعی برای میزبان دارند. به‌طور مثال عمل حفاظتی در برابر فتواکسیدان‌های کشنده مثل کارتنوئیدها و عملکرد حفاظتی در برابر استرس‌های محیط مثل ملانین‌ها را دارند و به‌عنوان کوفاکتور در کاتالیز آنزیم‌ها مثل فلاوین‌ها شرکت دارند (۲۹).

## نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ایزوله‌های محیطی سودوموناس *آئروجینوزا* در تولید رنگ طبیعی کارآیی داشتند و رنگ تولیدی، از ثبات مطلوبی نیز برخوردار بود. رنگ حاصل، ضمن خوش رنگ بودن و سازگاری با محیط زیست، دارای منبع طبیعی و خطرهای کم‌تری در مقایسه با



رنگ‌های شیمیایی است. با توجه به رشد سریع باکتری‌ها و امکان تولید انبوه آن در مدت زمان کوتاه و براساس نتایج تحقیق حاضر، می‌توان از پیگمان پیوسیانین به‌عنوان یک رنگ طبیعی برای رنگ‌آمیزی کاغذ و شمع استفاده و آن را جایگزین رنگ‌های شیمیایی نمود. همچنین نتایج نشان داد که ردیابی ژن *pbo* در *سودوموناس آئروجینوزا* با روش کلنی PCR و پرایمر طراحی شده در این تحقیق، می‌تواند باعث صرفه‌جویی در وقت، مواد و هزینه شود و احتمال آلودگی حین کار را نیز کاهش می‌دهد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد جهت فراهم آوردن امکانات پژوهشی برای انجام این تحقیق ابراز می‌دارند.

1. Rao MPN, Xiao M, Li WJ. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1113.
2. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med.* (Maywood). 2002; 227: 5-20.
3. Kasiri MB and Safapour S. Natural dyes and antimicrobials for green treatment of textiles. *Environ Chem Lett.* 2014; 12: 1-13.
4. Ghaffarzadeh and Edrisi M. A review on natural pigments and the extraction methods. *JSCW (J Stud Color World)* 2016; 6: 63-82. [In Persian]
5. Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang C, Xing X, Lou K, Zhang Z, Li Y, Zhang G, Bi J, Su Z. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China *Biochem Eng J.*; 2009.43:135-141.
6. Harasym J, and Bogacz-Radowska L. Colorants in foods-from past to present. *Nauki Inz Technol.* 2016; 3:21-35.
7. Mehrad B, Ravanfar R, Licker J, Regenstein JM, Abbaspourrad A. Enhancing the physicochemical stability of  $\beta$ -carotene solid lipid nanoparticle (SLNP) using whey protein isolate. *Food Res Int.* 2018; 105:962-969.
8. Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Int J Food Sci Tech.* 2015; 52: 4669-4678.
9. Ghaffarzadeh-Mollabashi O, Sharari M, Alebrahim MT. Investigation on the possibility of producing the pulp and paper from weeds. *IJWP.* 2017; 8: 241-251. [In Persian]
10. Doosti M, Faghihi MHO, Ramazani A, Saini MR. Comparison of conventional culture methods and Polymerase Chain Reaction (PCR) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Isfahan Med Sch.* 2012; 30:780-786.
11. DeBritto S, Gajbar TD, Satapute P, Sundaram L, Lakshmikantha RY, Jogaiah S, Ito S. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Sci Rep.* 2020; 10: 1542.
12. Blankenfeldt W, Parsons JF. The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 2014; 29: 26-33.
13. Raji El Feghali P, NawasT. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. *MOJ Toxicol.* 2018; 4: 417-422.
14. Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P, Camara M. Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 252.
15. Brown A, Horobin A, Blount DG, Hill PJ, English J, Rich A, Williams PM, Pritchard DI. Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Med Vet Entomol.* 2012; 26: 432-439.
16. Cao M, Fu Y, Guo Y, Pan J. *Chlamydomonas (Chlorophyceae)* Colony PCR. *Protoplasma.* 2008; 235: 107-110.
17. Kandasamy S, Khan W, Evans F, Critchley AT, Prithivira B. A product of *ascophyllum nodosum* enhances immune response of *caenorhabditis elegans* against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mar Drugs.* 2012; 10: 84-105.

18. Wojciechowski K, Szadowski J. Spectrophotometric investigation and ppp- Mo calculations of some phenylazophthalimide dyes. *Dyes Pigments*. 1991; 16: 35-56.
19. Cho YJ, Park JP, Hwang HJ, Kim SW, Choi JW, Yun JW. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Lett Appl Microbiol*. 2002; 35: 195-202.
20. Nowroozi J, Akhavan Sepahi A, Rashnonejad A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of Pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. *cell J*. 2011; 14: 7-18.
21. Khan F, Manivasagan P, Lee JW, Pham DTN, Oh J, Kim YM. Fucoidan-stabilized gold nanoparticle-mediated biofilm inhibition, attenuation of virulence and motility properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mar Drugs*. 2019; 17: 208.
22. Malik K, Tokkas J, Goyal S. Microbial pigments: a review. *Int J Microbial Res Technol*. 2012; 1:361-365.
23. Kumar-Samanta A, Agarwal P. Application of natural dyes on textile. *Indian J Fiber Text Res*. 2009; 34: 384-399.
24. Jissa GK, Soorej MB, Beena PS, Chandrasekaran M. Marine bacteria as source of pigment for application as dye in textile industry. *Internatl Conf Biodiv Conserv Mgt*. 2008; 743-744.
25. Heydari N, Kazemipour M, Khaleghi M. The potentiality of UV absorption by isolated pigments from *Penicillium* and *Aspergillus* for using sunscreen compounds. *JMW*. 2014; 7: 18-25.
26. Venil CK, Velmurugan P, Dufossé L, Renuka Devi P, Veera Ravi A. Fungal pigments: potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. *J Fungi*. 2020; 6(2):68.
27. Hamad MNF, Marrez DA, El-Sherbieny SMR. Toxicity evaluation and antimicrobial activity of purified pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biointerface Res Appl Chem*. 2020; 15: 6974 – 6990.
28. Mehrabi M, Nazemi A, Nasrollahi A. Isolation and molecular identification of pigment producing microorganisms and acute toxicity of pigments. *J Microbial Biotechnology*. 2011; 3: 19-28.
29. Baker R, Tatum J. Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. *J Ferment Bioeng*. 1998; 85: 359-361.

