NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/44 , 2021

Scan online to view this article

Application of phenazine pigment of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to prepare colored paper and candle

Maliheh Najafi[1], Mahboobeh Nakhaei Moghaddam[2*], Mahboobeh Najafi[1], Ehsan Yousefi[2]

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_{520}) 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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۴ - پاییز ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

کاربرد پیگمان فنازین ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* برای تهیه کاغذ و شمع رنگی

ملیحه نجفی[۱]، محبوبه نخعی مقدم[۲*]، محبوبه نجفی[۱]، احسان یوسفی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: میکروارگانیسم‌ها نسبت‌به سایر منابع در تولید رنگ، اهمیت دارند، زیرا میکروارگانیسم‌ها مزایایی از جمله رشد سریع، بازدهی بالاتر و استخراج راحت‌تر دارند. رنگدانه‌های طبیعی سالم‌تر از انواع شیمیایی هستند و استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف مفید است. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و استخراج پیگمان پیوسیانین از ایزوله‌های محیطی *سودوموناس آئروجینوزا* به‌منظور تهیه کاغذ و شمع رنگی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، به‌منظور جداسازی *سودوموناس آئروجینوزا*، نمونه‌برداری از محیط‌های مختلف انجام شد. ایزوله‌های محیطی *سودوموناس آئروجینوزا* با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژی و روش‌های بیوشیمیایی افتراقی شناسایی شدند. شناسایی تأییدی از طریق ردیابی ژن *pbo1* با روش کلنی Polymerase Chain Reaction انجام شد. پس از استخراج پیگمان پیوسیانین با کلروفرم، در نهایت از پیوسیانین تولیدی برای تهیه کاغذ و شمع رنگی استفاده و ثبات نوری پیوسیانین بررسی شد.

یافته‌ها: از ۴۳ نمونه محیطی جمع‌آوری شده، تعداد ۱۵ ایزوله *سودوموناس آئروجینوزا* شناسایی و با روش مولکولی تأیید شد. میانگین جذب نوری (OD_{520}) پیوسیانین *سودوموناس آئروجینوزا* بعد از استخراج ۰/۴۸۸ بود. رنگ‌آمیزی کاغذ و شمع با پیوسیانین استخراج شده موفقیت‌آمیز و ثبات نوری پیوسیانین مطلوب بود.

نتیجه‌گیری: با توجه‌به رشد سریع باکتری‌ها و امکان تولید انبوه آن در مدت زمان کوتاه و بر اساس نتایج تحقیق حاضر، می‌توان از پیگمان باکتری‌ها در برخی صنایع از جمله صنعت کاغذ استفاده و آن‌ها را جایگزین رنگ‌های شیمیایی کرد.

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

مقدمه

رنگ‌های مصنوعی مشکلات زیست محیطی و بهداشتی قابل‌توجهی را ایجاد کرده‌اند. در مقابل، رنگدانه‌های میکروبی سازگار با محیط زیست هستند و در صنایع نساجی، به‌عنوان رنگ‌های خوراکی، آنتی‌اکسیدان ها، شاخص‌های زیستی و عوامل ضدمیکروبی و ضد سرطان استفاده می‌شوند (۱). مواد شیمیایی حاصل از منابع نفتی و پتروشیمی از طریق فرآیندهای شیمیایی خطرناک تولید می‌شوند که بسیاری از آن‌ها تهدیدی برای محیط زیست و سلامت انسان به‌شمار می‌روند. برخی از عوارض این رنگ‌ها شامل اثرهای سرطان-زایی، تضعیف سیستم ایمنی، ایجاد آلرژی و کهیر، اختلال-های رفتاری و بیش فعالی در کودکان، رتینوپاتی، آسیب‌های کبدی و اختلال در متابولیسم لیپیدها و آسم است (۲). در سال‌های 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-

نویسنده مسئول:
گروه زیست‌شناسی، 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

زایی، غیر سمی و دوست‌دار محیط زیست در صنعت حائز اهمیت است (۳). تاکنون بیش از ۱۵۰۰ ماده رنگ‌زای طبیعی مورد بررسی و شناخت قرار گرفته‌اند (۴). امروزه به‌دلیل افزایش روز افزون مخاطرات ناشی از فرآورده‌های نفتی و پساب‌های سمی ناشی از آن، پتانسیل‌های فراوان طبیعت و زیست‌گونه‌ها و هم‌چنین با ظهور موضوع‌های مختلف مرتبط با استفاده بیش از حد از پیگمان‌های مصنوعی نظر محققان را به خود جلب کرده‌اند و تحقیقات گسترده‌ای در مورد رنگ‌های طبیعی در سال‌های اخیر آغاز شده است. از جمله منابع عظیم و متنوع طبیعی، میکروارگانیسم‌ها هستند. فرآورده‌های تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها طیف گسترده‌ای دارند. میکروارگانیسم‌ها به‌دلیل توانایی در تولید رنگ‌ها، آنزیم‌ها، داروها و تجزیه و تبدیل مواد شیمیایی، جایگزین مناسبی برای آینده‌ی بدون نفت هستند. تولید پیگمان‌های زیستی از باکتری‌ها، به‌دلیل سرعت رشد بالا، قابلیت تولید انبوه، پایین بودن هزینه تولید، بازده بالا، ثبات و پایداری بالا و سهولت پردازش فرآیندهای پایین‌دستی یک روش مناسب برای جایگزینی رنگ‌های شیمیایی است (۸-۵). در حال حاضر حجم گسترده ارتباطات فرهنگی، اقتصادی، اجتماعی و تبادل اطلاعات سبب افزایش مصرف کاغذ و محصول‌های کاغذی شده است؛ از این جهت صنعت کاغذ و صنایع مرتبط به آن در دنیای کنونی جایگاه ویژه‌ای دارد (۹). *سودوموناس آئروجینوزا* یک باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی و باسیلی شکل و یکی از ارگانیسم‌های با ارزش تجاری است که بسیاری از سویه‌های آن مسئول تولید رنگدانه‌های محلول در آب مانند پیوسیانین (آبی)، پیووردین (زرد-سبز)، پیوروبین (قرمز) و پیوملانین (قهوه ای) هستند (۱۳-۱۰). پیوسیانین (ان- متیل، ال- هیدروکسی فنازین) از نظر شیمیایی در گروه فنازین‌ها قرار دارد. فنازین‌ها ترکیب‌های هیدروسیکلیک نیتروژن‌دار هستند (شکل ۱) (۱۲،۱۳).

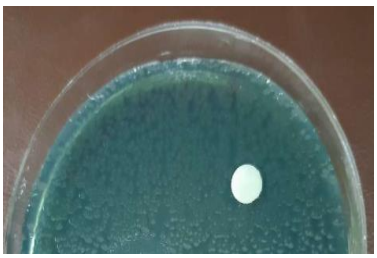
شکل ۱. ساختار پیوسیانین

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

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی *سودوموناس آئروجینوزا*

برای جمع‌آوری ایزوله‌های محیطی *سودوموناس آئروجینوزا* نمونه‌برداری 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 نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و انکوباسیون شبانه آن‌ها در دمای ۳۷°C و شرایط هوازی، انتقال با روش کشت ایزوله روی محیط ائوزین متیلن‌بلو آگار و ستریماید آگار انجام گرفت و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس کلونی‌های مشکوک، جداسازی و خالص‌سازی شدند. شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزای* جدا شده با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی مرسوم (اکسیداز، کاتالاز، متیل رد، اوره، کشت در محیط‌های TSI آگار، SIM، سیمون سیترات، محیط OF و کشت در محیط ستریماید آگار (شکل ۲) و رشد در دمای ۴۲°C) انجام شد (۱۵).



شکل ۲. رشد یکی از ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* در محیط ستریماید آگار

شناسایی مولکولی *سودوموناس آئروجینوزا*

جهت تأیید باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزای* جدا شده از نمونه‌های محیطی و ردیابی ژن تولید پیگمان از روش کلنی PCR و آغازگرهای ژن *pbo1* (Sinaclon, Iran) مطابق با جدول ۱ استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی و داده‌های موجود در پایگاه NCBI استخراج توالی دقیق ژن *pbo1* صورت پذیرفت. ابتدا توالی کامل ژن *pbo1* براساس سایت، http://www.ncbi.nim.nih.yov (*سودوموناس آئروجینوزا* PAO_1 و Accession no=AF005404) در نظر گرفته شد و سپس با نرم‌افزار oligo 7 پرایمرهای مناسب برای تکثیر بخشی از ژن‌ها طراحی شدند. جهت اطمینان از صحت توالی‌های استخراج شده، ارزیابی آن‌ها با استفاده از جعبه ابزار BlastN در پایگاه NCBI انجام شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن *pbo1* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزای* جدا شده از نمونه‌های 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 *pbo1* 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 (۲/۵ Pmol/µl)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq پلی‌مراز (۱/۲ unit/µl) (Sinaclon, Iran)، ۳ میکرولیتر بافر واکنش‌گر (۱ X)، ۱ کلنی از باکتری و ۱۷/۵ میکرولیتر آب مقطر آماده شد. کلنی PCR توسط ترموسایکلر (Kyratec, Kore) و مطابق با چرخه‌های دمایی زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به‌مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵°C به‌مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه، اتصال در دمای ۵۸°C به‌مدت ۱ دقیقه، بسپارش در دمای ۷۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسپارش نهایی در دمای ۷۲°C به‌مدت ۷ دقیقه. محصول‌های واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (CinnaGen, Iran) به‌مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز (Interlab, Italy) شدند. سپس نمونه‌های رانده شده در ژل توسط دستگاه فرابنفش لومیناتور (Caution, EEC) مشاهده و در نهایت از باندها با استفاده از دستگاه ژل داک (Kimiagene, Iran) عکس گرفته شد (۱۶). از *سودوموناس آئروجینوزا* با شماره استاندارد ATCC 1074 (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های 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} =۰/۰۱) رشد یافته در محیط لوریا برتانی (LB, Merck, Germany) به ۲۵ میلی‌لیتر محیط گلیسرول آلانین (GA, Merck, Germany) تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (دمای ۳۷°C) با سرعت rpm ۲۰۰ گرماگذاری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma, USA) شدند. مایع رویی جمع‌آوری و از فیلتر با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. به ۷/۵ میکرولیتر از مایع رویی فیلتر شده، مقدار ۴/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و ۱۰ مرتبه،

هر مرتبه به‌مدت ۲ ثانیه ورتکس شد. این مرحله برای هر ایزوله ۳ بار تکرار شد. کلروفرم در ته لوله قرار می‌گیرد و به علت اینکه پیوسیانین در کلروفرم حل می‌شود، به آبی متمایل به سبز تغییر رنگ می‌دهد. سانتریفیوژ نمونه‌ها پس از تغییر رنگ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار ۳ میلی‌لیتر از لایه آبی رنگ جمع شده در ته لوله (مخلوط کلروفرم و پیوسیانین) به لوله جدید منتقل و به‌منظور اسیدی شدن مخلوط، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار به آن اضافه و ورتکس شد (تغییر رنگ آبی به صورتی). سپس، نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ و مقدار ۱ میلی‌لیتر از مایع صورتی رنگ به کووت منتقل و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. این آزمایش به طور مشابه، برای تمامی ایزوله‌ها و سویه استاندارد *سودوموناس آئروجینوزا* ATCC 1074، ۳ بار تکرار شد. در نهایت غلظت پیوسیانین با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۷).

غلظت پیوسیانین (میکروگرم در میلی‌لیتر) = OD_{520} × ۱۷/۰۷۲ × ۱/۵

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 ایزوله‌های با ظرفیت بالاتر پیگمان استفاده شد. رنگ با استفاده از حلال کلروفرم استخراج و به منظور تغلیظ، ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C گذاشته شد. از ۲۵ میلی‌لیتر محیط GA که *سودوموناس آئروجینوزا* در آن تولید پیگمان پیوسیانین کرده بود، ۱۸ میلی‌لیتر محلول رنگ جدا شد که ۴ میلی‌لیتر از آن برای رنگ‌آمیزی 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 می‌بندد و یک شمع با رنگ پیگمان باکتری تهیه می‌شود.

بررسی ثبات نوری پیگمان

ثبات نوری کاغذ رنگ‌آمیزی شده مطابق استاندارد ISO 105/B02 توسط دستگاه ثبات نوری (Ress Sanj, Iran) اندازه‌گیری شد (۱۸).

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی ایزوله های *سودوموناس آئروجینوزا* از نمونه‌های محیطی و ردیابی ژن مولد پیگمان

بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۲، تعداد ۱۵ ایزوله *سودوموناس آئروجینوزا* از نمونه‌های محیطی جمع‌آوری شد.

جدول ۲. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص *سودوموناس آئروجینوزا*

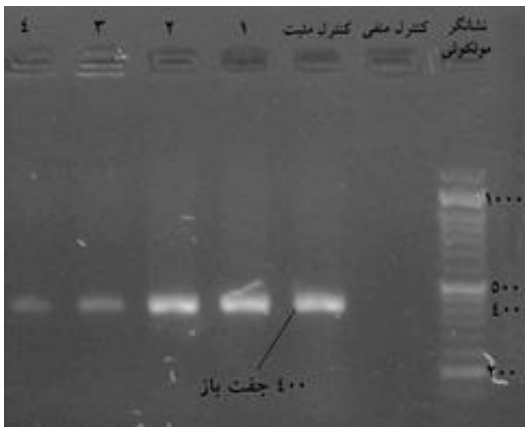
آزمایش	گرم	اکسیداز	کاتالاز	تخمیر قندها	اندول	حرکت	رشد در محیط ستریماید در دمای ۳۷°C	متیل رد	اوره‌آز	سیتراتاز
نتیجه	باسیل G	+	+	-	-	+	+	-	-	+

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

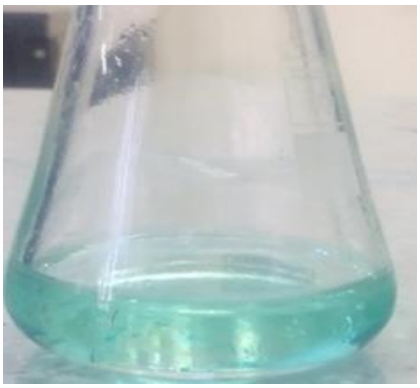
استخراج پیوسیانین *سودوموناس آئروجینوزا*

پیوسیانین *سودوموناس آئروجینوزا* بعد از استخراج در شکل ۴ نشان داده شده است. میانگین جذب نوری پیوسیانین *سودوموناس آئروجینوزا* بعد از استخراج با ۳ تکرار در جدول ۳ آمده است.

همان‌طوری 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 کم‌ترین مقدار تولید پیگمان را بر اساس جذب نوری در طول موج ۵۲۰nm داشتند.



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



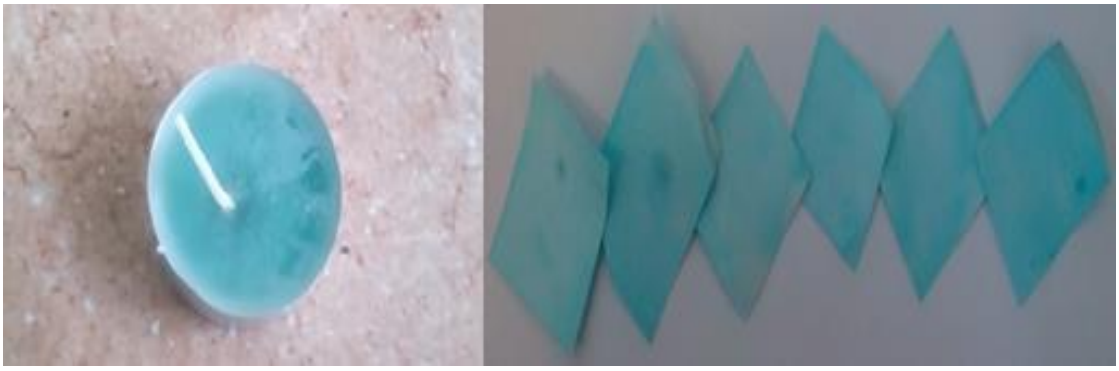
شکل ۴. پیوسیانین *سودوموناس آئروجینوزا* بعد از استخراج

جدول۳. جذب نوری (OD_{520}) پیوسیانین استخراج شده از ایزوله‌های محیطی *سودوموناس آئروجینوزا*

باکتری	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		

رنگ‌آمیزی کاغذ و تهیه شمع با پیگمان پیوسیانین و بررسی ثبات نوری پیوسیانین

شکل ۵، کاغذها و شمع رنگ‌آمیزی شده با پیگمان پیوسیانین تولید شده توسط ایزوله‌های محیطی *سودوموناس آئروجینوزا* را نشان می‌دهد. ثبات رنگ کاغذ بعد از رنگ-آمیزی با پیوسیانین مطلوب تعیین شد.



شکل ۵. کاغذها و شمع رنگ‌آمیزی شده با پیگمان پیوسیانین

بحث

پیگمان‌ها به‌طور وسیعی در تهیه غذا، پوشاک، اسباب بازی کودکان، رنگرزی و صنایع دیگر به‌کار می‌رود. به این دلیل که رنگ‌دهنده‌های شیمیایی مشکلاتی را برای انسان و محیط زیست ایجاد می‌کنند، تحقیقات متعددی برای دست-یابی به محصول‌های مطمئن و پیگمان‌های طبیعی از منابع طبیعی انجام شده است. مدافعان محیط زیست معتقدند که رنگ‌های طبیعی از لحاظ کیفی دارای جایگاه بالاتری بوده و به‌دلیل طیف رنگی گسترده‌ای که دارند، چشم‌نوازتر هستند. هم‌چنین، سازگاری این دسته از رنگ‌ها با طبیعت و قابلیت تجزیه‌پذیری آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. رنگ‌های طبیعی به‌دلیل تنوع بالا و آسان بودن تولید مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۹). رنگدانه‌های میکروبی به‌دلیل سرعت رشد بالای میکروب‌ها و امکان تولید انبوه این رنگدانه‌ها 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 سودوموناس‌هایی که دارای ژن‌های *phzM* و *phzS* هستند، قادر به تولید پیگمان پیوسیانین هستند (۲۰). در این مطالعه، بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (ردیابی ژن *pbo1*، ژن اپرون بیوسنتز پیوسیانین) تعداد ۱۵ ایزوله *سودوموناس آئروجینوزا* از نمونه‌های محیطی جدا و شناسایی شد. در مطالعه Higgins و همکاران در سال ۲۰۱۸، مشابه با تحقیق حاضر از ژن *pbo* (*phz1* و phz_2) برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* استفاده کردند (۱۴). در میان ایزوله‌های محیطی *سودوموناس آئروجینوزا*، توانایی تولید پیگمان در ایزوله‌های 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* *PAO1* KCTC 1637 پیگمان پیوسیانین استخراج کردند (۲۱). نتیجه رنگ‌آمیزی کاغذ و شمع با پیوسیانین مطلوب و قابل قبول بود. میزان تولید پیگمان در ایزوله‌های مختلف متفاوت بود که می‌توان با شناسایی ایزوله‌های با پتانسیل تولید بیش‌تر و بهینه‌سازی شرایط محیطی، میزان استخراج رنگ را افزایش داد. در تحقیق حاضر نیز، در میان ایزوله‌های مختلف مورد آزمایش، میزان تولید پیگمان در ایزوله ۲ بیش‌تر از سایرین و سویه رفرنس بود که می تواند به عنوان سویه برتر برای تولید رنگ معرفی شود.

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 رنگرزی لباس، صنایع غذایی و دارویی و محصول‌های آرایشی به‌عنوان رنگ‌زا استفاده شده است (۲۲،۲۳). در تحقیق DeBritto و همکاران در سال ۲۰۲۰، پارچه‌های پنبه‌ای را با پیوسیانین استخراج شده از *سودوموناس آئروجینوزا* رنگ‌آمیزی کردند که همانند تحقیق حاضر، ثبات رنگ تأیید شد (۱۱). Jissa و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از پیگمان تولید شده توسط گونه‌های *سراشیا* اقدام به رنگ‌آمیزی لاستیک، کاغذ، منسوجات و پلاستیک نمودند و بیان کردند که پیگمان استخراج شده خاصیت رنگرزی 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 ترکیب‌های شیمیایی در کرم‌های ضد آفتاب استفاده نمود (۲۵). در تحقیق حاضر با استخراج پیوسیانین، کاغذ و شمع رنگ‌آمیزی 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 فلوئورسنتی آبی رنگ یا پیوسیانین که محلول در آب و کلروفرم است، رنگدانه فلوئورسنتی سبز رنگ به نام پیوردین، رنگدانه فلوئورسنتی قرمز تیره پیوروبین و رنگدانه فلوئورسنتی 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 میکروارگانیسم‌ها و مسیرهای بیوسنتز آن‌ها شده است. میکروارگانیسم‌هایی 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 مقرون‌به صرفه باشد، اما رنگ‌های مصنوعی با چالش‌هایی از جمله وابستگی‌به منابع نفتی غیرقابل احیا، سمیت محیطی، مسائل بهداشتی و عدم بازیافت رو به‌رو هستند. در حالی‌که 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 میکروارگانیسم‌ها حاصل می‌شوند. تولید پیگمان از میکروارگانیسم‌ها با توجه‌به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی‌به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ نسبت‌به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیش‌تری است. بسته‌به 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 توجه‌به 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 آن‌را 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.

منابع

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-Radomska 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 β-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, Agaruval 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.