

اثر باکتری‌کشی و موتاسیون‌زایی نور UV و نقش غشاء‌های محافظت‌کننده در جلوگیری از نفوذ UV

• محبت‌علی نادری شهاب

عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران

• مریم جبلی

کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران

• علی اشرف جعفری

عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران

• سارا امیری

کارشناس مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی

Email: naderishahab@rifr-ac.ir

چکیده

به منظور بررسی اثر پرتو UV-C در از بین بردن باکتری فاقد اسپور، باکتری و قارچ اسپورزا از غلظت‌های متفاوت پرتو UV استفاده گردید. تعیین مناسب‌ترین غلظت UV-C در ایجاد موتاسیون در باکتری‌ها و اثر بازدارندگی غشاء‌های مختلف از نفوذ نور UV-C نیز مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های *E. coli* و *Bacillus thuringiensis* در معرض غلظت‌های متفاوت پرتو نور UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفتند. تیمارهای UV از غلظت بسیار کم (1 J/m^2) تا غلظت بیشتر از 60 kJ/m^2 در زنده‌مانی و ایجاد تغییرات در جمعیت باکتری‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. باکتری *B. thuringiensis* در مقایسه با *E. coli* مقاومت قابل توجهی در مقابل پرتو UV از خود نشان داد. غلظت‌های حدود 200 J/m^2 اثری در کاهش جمعیت *B. thuringiensis* نداشت. اثر بازدارندگی نور یاد شده از حدود 260 J/m^2 شروع و در 3000 J/m^2 زنده‌مانی سلول‌ها تا کمتر از $1 \log$ کاهش یافت. در باکتری *E. coli* غلظت 170 J/m^2 باعث کاهش زنده‌مانی باکتری تا حدود $5 \log$ گردید. جهت حذف ۱۰۰٪ باکتری‌ها نیاز به غلظت بالای UV می‌باشد. اسپور و قارچ *Penicillium sp.* در مقایسه با باکتری‌ها، مقاومت بسیار زیادی در مقابل پرتو UV از خود نشان داد. به طوری که برای کنترل قارچ و اسپور نیاز به غلظت‌های بیشتر از 18000 J/m^2 می‌باشد. در بررسی اثر غشاء‌ها یا پوشش‌های مختلف در جلوگیری از نفوذ نور UV-C مشخص گردید پلاستیک LDPE حاوی مواد ضد UV و شیشه، به طور ۱۰۰٪ از نفوذ UV جلوگیری می‌نمایند. لیکن پلاستیک‌های LDPE فاقد مواد ضد UV با ضخامت‌های مختلف تأثیر قابل توجهی در بازدارندگی نفوذ نور UV ندارند. ضخامت‌های حدود ۶ میکرون LDPE تفاوتی با شاهد (بدون محافظ) نداشت. تابش نور UV با غلظت 88 J/m^2 باعث ایجاد موتاسیون در *E. coli* و پیدایش کلنی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفامپین گردید. لیکن پرتو UV تأثیری در ایجاد باکتری موتانت *B. thuringiensis* با عدم توان اسپورزایی نداشت.

کلمات کلیدی: مقاومت به ریفامپین، *Bacillus thuringiensis E. Coli*، موتاسیون، باکتری انرژی نور ماوراء بنفش

Pajouhesh & Sazandegi No 79 pp: 80-92

UV radiation effect on bacterial mortality and mutation, as well as evaluation of various shields on UV-blockage

By: M. A. Naderi Shahab, M. Jebelly and A.A. Jafari Members of Scientific Board of, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran Iran

S. Amiri, Expert of Agricultural Biotechnology Research Institute

In order to investigate the effect of UV-irradiation on mortality of spore vegetative and producing bacterium and fungus, various doses of UV-irradiation was applied. Optimum dose of UV-C irradiation on mutation induction in bacteria, as well as effect of various shields on UV-blockage, was investigated. The *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* bacteria exposed to various doses of 254 nm. UV radiation Effects of lowest doses, (11J/m²), and highest doses of UV irradiation on survival of bacterial cells evaluated. *B. thuringiensis* compare to that of *E. coli*, exhibited high level of tolerance against the UV irradiation. 200 J/m² of UV irradiation did not have adverse effect on *B. thuringiensis*, however, survival cells of the bacterium decreased from 260 J/m², and number of survival cells fall bellow Log₁ at 3000J/m². In *E. coli*, UV irradiation dose of 170 J/m², decreased number of survival cells up to 5log. Spores and micellium of penicillium fungi, in compare to those of the bacteria, showed a high level of tolerance to UV irradiation. At 18000 J/m², few survival colonies of the fungi observed on solid medium. The effect of various shields on penetration of UV was investigated. Anti - UV Low Density Poly Ethylene (LDPE) and 1mm thick glass, completely prevented penetration of UV beam. However, ordinary LDPE shields, having various thickness, did not have significant effect on penetration of UV beam. In this relation, 6μl LDPE did not have effect on penetration of UV beam. 88 J/m² UV irradiation caused mutation on *E. coli* bacterium and rifampin resistant colonies achieved. However, 480 J/m² UV irradiation did not produce mutated *B. thuringiensis* cells, with characteristic of disable to produce bacterial spores.

Keywords: Mutation, UV-C, *E. coli*, *B. thuringiensis*, Rifampin resistance, Anti-UV shields**مقدمه**

قسمت‌های حساس ژنوم صورت گیرد، موجب مرگ سلول می‌گردد. پرتو نور UV باعث تغییر T=C یا پیریمیدین دایمر در tRNA تعدادی از اسیدهای آمینه و پیدایش سوش‌های موتانت پروتوتروف می‌گردد (۶). نور UV در میکروارگانیسم‌ها باعث خسارات اکسیداتیو در DNA یا پروتئین و یا صدمات ناشی از اکسیداسیون نوری (Photo - oxidation) می‌گردد. لذا آنزیم‌های پراکسیداز یا تجزیه‌کننده پراکسید هیدروژن (H₂O₂) توان زنده‌مانی باکتری‌ها در مقابل نور UV را افزایش می‌دهد (۷). تابش نور UV در باکتری موجب فعال شدن ژن‌های متعددی می‌گردد که این ژن‌ها در تولید انواع پروتئین‌ها و آنزیم‌های ترمیم‌کننده خسارات ناشی از پرتو UV نقش دارند (۸، ۱۰).

در پاسخ به صدمات وارده به DNA، تعداد زیادی از ژن‌های کدکننده آنزیم‌ها و به ویژه ژن *recA*، کدکننده آنزیم کلیدی *recA* فعال می‌گردد. اهمیت منحصر بفرد این ژن در جلوگیری از بروز موتاسیون به اثبات رسیده است (۲۹). پرتو UV موجب خساراتی از قبیل Cyclobutane Primidine Dimers (CPDs) و همچنین Photoproducts (۴-۶) در DNA می‌گردد. مکانیسم Photoreactivation که در آن آنزیمی بنام Photolyase باعث از بین رفتن CPDs از طریق جذب و انتقال انرژی نور مرئی به صورت الکترون به CPDs و تخریب آن از طریق β-elimination می‌گردد، یکی از مکانیزم‌های مؤثر در ترمیم خسارات وارده به DNA می‌باشد (۹، ۲۵). مکانیزم کمپلکس پروتئینی گسترده‌ای به نام Repairoosome که حاصل

طول موج نور نامرئی ماورای بنفش بین ۴۰۰-۴۰ نانومتر (۳-۳۰ ev) متغیر است. در تقسیم‌بندی‌ها، دامنه نور UV عمدتاً در ۳ دامنه: ۴۰۰-۳۲۰ (UV-A)، ۳۲۰-۲۹۰ (UV-B)، ۲۹۰-۲۲۰ (UV-C) قرار می‌گیرد. طیف‌های ۱۹۰-۲۲۰ بنام FarUV و ۴۰-۱۹۰ بنام Vacuum UV نامیده می‌شود که این طول موج‌ها در آتمسفر وجود ندارند (۱۶)، طبقه‌بندی طیف‌های UV توسط کمیسیون بین‌المللی پرتوها شامل (۲۲) UV-A (۳۱۵-۴۰۰ nm)، UV-B (۲۸۰-۳۱۵ nm)، UV-C (۱۰۰-۲۸۰ nm) می‌باشد (۱۶). بیشترین اثرات سوء بیولوژیکی نور ماورای بنفش در میکروارگانیسم‌ها مربوط به UV-C و به ویژه طول موج ۲۵۴ نانومتر می‌باشد. پرتو UV با این طول موج در غلظت‌های بالا موجب نابودی و در غلظت‌های کم باعث تغییرات ژنتیکی در موجود زنده می‌گردد. دلیل این امر، انرژی نسبتاً زیاد و حداکثر جذب نوری اسیدهای نوکلئیک در محدوده این طول موج می‌باشد. قرار گرفتن موجودات به ویژه میکروارگانیسم‌ها در معرض پرتو نور ماورای بنفش با طول ۲۵۴ نانومتر موجب تغییراتی در توالی DNA میکروارگانیسم می‌گردد که ماهیت این تغییرات ممکن است در مقیاس چند نوکلئوتید و یا گسترده‌تر در سطح ژنوم و یا کروموزوم باشد. تغییرات در سطح چند نوکلئوتید موجب تغییرات جزئی شامل حذف (Deletion)، جایگزینی (Substitution) و یا اضافه شدن (Insertion) نوکلئوتید می‌گردد. در صورتی که تغییرات در ژن‌های ساختاری و

اکسیداسیون پلی‌مرها می‌باشد. نوع و ترکیب پلی‌مرها تعیین‌کننده مقدار جذب پرتو UV و در نتیجه درجه تجزیه‌پذیری این پلی‌مرها است. جذب پرتو UV توسط پلی‌مر، تولید رادیکال آزاد مانند پروکسیدها و ملکول‌های با الکترون‌های جفت‌ناپذیر می‌نماید.

این رادیکال‌ها باعث تجزیه ماده پلی‌مری از طریق واکنش‌های متعدد اکسیداسیونی می‌شوند که نتیجه آن، تغییرات فیزیکی و شیمیایی مانند تغییر رنگ، تغییر شفافیت، شکنندگی و غیره در پلی‌مر می‌گردد. جلوگیری یا کاهش تخریب پلی‌مرها از طریق مکانیسم‌هایی مانند کاهش جذب UV توسط بعضی از ملکول‌های پلی‌مری (Quenching)، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها و مکانیزم کاهش جذب پرتو UV امکان‌پذیر می‌باشد (۴، ۱۳، ۲۳).

مواد محافظت‌کننده در مقابل پرتو UV شامل UV-Absorbers یا جذب‌کننده نور ترکیبات UV-Stabilizers، UV و مواد کاهش‌دهنده جذب نور UV با استفاده از ترکیبات مختلف می‌باشد. مواد UV-absorbers، نور UV را جذب نموده و در قالب طول موج بلند مانند طول موج گرمایی از خود ساطع می‌نمایند. این تغییر از طریق مکانیزم Keto-enol-tautomerism صورت می‌گیرد. مواد جذب‌کننده UV شامل Benzotriazoles، Benzophenones، Benzozates و Oxanilides، Salicylates و گاه Oxanilides و سایر ترکیبات می‌باشند (۴، ۲۳).

مکانیسم عمل UV-stabilizers، مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانتی و وجود گروه آمین در ساختمان آنهاست. این مواد که Hindered Amin (HALS) Light Stabilizers نامیده می‌شوند، با پراکسیدها و سایر رادیکال‌های آزادی که در اثر تابش نور UV ایجاد گردیده‌اند واکنش داده و باعث صرف (Scavenging) این رادیکال‌ها و در نهایت باعث خنثی شدن اثر تخریبی آن‌ها می‌گردند (۴).

مکانیسم دیگری که در کاهش خسارت پرتو UV استفاده می‌گردد، کاربرد ترکیباتی مانند ارگانونیکل‌ها می‌باشد. بعضی از ملکول‌های پلی‌مری به‌طور انتخابی نور UV را جذب و انرژی تهییج شده قابل توجهی تولید می‌نمایند که منجر به تولید بعضی از رادیکال‌های آزاد مانند Nitroxyl و پراکسیدها می‌گردد. مواد کاهش‌دهنده انرژی مخرب رادیکال‌ها که (Quenchers) نامیده می‌شوند، قادر به جذب و کاهش انرژی تهییج شده (Quenching) گردیده و تشکیل رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهند.

UV موجب Crosslink مواد پلی‌مری غیر اشباع می‌گردد. افزایش وزن مولکولی پلی‌مرهای غیر اشباع از طریق ایجاد واکنش شیمیایی بین مواد پلی‌مری و ماده Crosslink (یا Photoinhibitor) که قبلاً به آن‌ها اضافه گردیده اکسیژن رادیکال و سایر رادیکال‌های ناشی از نور UV را خنثی می‌نماید. این رادیکال‌ها با مونومرها و الیگومرهای ماده اصلی (که در اینجا استرهای اکریلیک غیر اشباع هستند) ایجاد واکنش نموده که در اثر آن مواد با وزن مولکولی خیلی سنگین و مقاوم در مقابل تابش اشعه ایجاد می‌گردد (۴، ۲۳).

مواد و روش‌ها

باکتری و سوش: در این تحقیق از دو گونه باکتری شامل *Escherichia coli* سوش DH5 α ، گرام منفی و *Bacillus thuringiensis*، سوش Kurstaki، گرام مثبت، مولد اسپور و قارچ *Penicillium sp* استفاده

فعالیت بیش از ۱۰ ژن مستقل می‌باشد (۲۵) نیز باعث جبران ضایعات وارده به DNA می‌گردد.

مقاومت خارق‌العاده باکتری *Deinococcus radiodurans* به طیف کشنده پرتو UV و تشعشعات یونیزه‌کننده و سایر مواد شیمیایی مضر به DNA (۱)، مربوط به ژن‌های (UV endonuclease) *mtcA*، *mtcB*، α - و ژن‌های دیگری بنام (UVendonuclease - β *uvsD*)، *uvsE* و *uvsC* بوده و این دو گروه Prymidine dimmer را شناسایی و آن‌ها را اصلاح می‌نمایند (۲۴، ۲۷). در باکتری *E. coli*، ژن *uvrA* در حفاظت از باکتری در مقابل تابش نور UV نقش دارد (۲۹). پیش تیمار نمودن باکتری با پرتو UV باعث افزایش مقاومت باکتری در مقابل نور UV می‌گردد که این موضوع در باکتری (*Moraxella - Acinetobacter*) و باکتری *Deinococcus radiodurans* به اثبات رسیده (۲۶). عامل مقاومت باکتری به نور UV حضور ژن‌های *uvrA1* و *uvrA2* و *uvrE* و *recA* گزارش گردید. با اینکه در *E. coli* بیش از ۴۰ ژن در ترمیم ضایعات پرتو UV دخیل هستند، لیکن آنزیم‌های *RecA*، *LexA* و *RecA*، *LexA* DNA تک رشته‌ای نقش اساسی در ترمیم DNA دارند (۲، ۳، ۱۸).

یکی از روش‌های انتخاب باکتری‌های موتانت، بررسی مقاومت باکتری در مقابل آنتی‌بیوتیک ریفامپین (*Rifampin*) می‌باشد. پرتو UV باعث بوجود آمدن موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفامپین می‌گردد (۱۱). این آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های نرمال، به آنزیم RNA پلی‌مراز متصل و مانع از ساخت و امتداد (Elongation) رشته RNA در مرحله ۲-۳ نوکلئوتیدی شده و طولانی شدن آن را متوقف می‌کند. مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک، ایجاد موتاسیون در *Beta subunit - RNA Polymerase* (rPOB) می‌باشد (۳۰). مکانیسم مقاومت به این آنتی‌بیوتیک به تغییرات در سطح ژنوم باکتری بر می‌گردد. موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفامپین در *E. coli* و بعضی از باکتری‌ها، بدلیل ایجاد تغییرات در ژن RNA پلی‌مراز و در نتیجه تغییر در محل اتصال ریفامپین به این آنزیم بوجود می‌آید. موتاسیون در ژن rPOB این امکان را به باکتری می‌دهد تا در مقابل آنتی‌بیوتیک مقاومت نماید. مشخص گردیده عامل مقاومت، ایجاد تغییرات در نواحی محدودی از ساب یونیت β رخ می‌دهد و این تغییرات در ۳ گروه I، II، III قابل طبقه‌بندی است (۲۰، ۱۷، ۱۹، ۲۰، ۲۲، ۳۱). برای محاسبه و تعیین نسبت موتانت‌ها در آزمایشات پرتوتابی با اشعه UV، اغلب از روش پیشنهادی (۱۴) *Luria* و *Delbruk* استفاده می‌شود.

در مقایسه با سلول، اسپور باکتری *B. sphaericus* مقاومت بیشتری در مقابل این پرتو UV دارند. اسپور این باکتری در غلظت‌های $675 J/m^2$ به‌طور کامل از بین نرفته و درصدی از اسپورها قادر به زنده‌مانی در این شدت نور بودند (۵). اسپورهای معمولی، اسپورهای جوانه زده و در حال جوانه‌زنی *Encephalitozoon* که در معرض غلظت‌های $200 J/m^2$ پرتو UV قرار گرفتند کاهش ناچیزی (در حدود $3 \log$) نشان دادند که این کاهش قابل توجه نمی‌باشد. در ارزیابی مقاومت سلول‌های نرمال، حساس باکتری *E. coli* به UV، مشخص گردید، سوش نرمال، غلظت $40 J/m^2$ پرتو UV را به خوبی تحمل می‌نماید، ولی موتانت‌های حساس، در $40 J/m^2$ به کلی از بین می‌روند (۱۱).

در رابطه با اثرات فیزیکی شیمیایی پرتو UV در پلی‌مرها، نور UV حاصل از تشعشعات خورشیدی یا سایر منابع مولد پرتو UV، آغازگر

سانتی گراد (*E. coli*) و ۳۰ درجه سانتی گراد (*B. thuringiensis*) منتقل گردیدند. به ترتیب پس از ۱۲ و ۱۶ ساعت، تعداد کلنی‌های هر یک از پتری‌های مربوط به تیمارهای فاصله و مدت زمان پرتو UV شمارش گردید. آنالیز آماری: تعداد سلول‌های زنده با احتساب تعداد کلنی‌ها و در تراکم زیاد با مقایسه بین پتری‌های پرتو دهی شده مورد آزمایش و پتری‌های شاهد رقیق شده که در آن‌ها تعداد سلول‌ها با ضریب مشخص رقیق شده بودند، مورد مقایسه قرار گرفتند و براساس آن تعداد سلول در پتری‌های پرتو تابشی شده تخمین زده شد. با توجه به عدم نرمال بودن داده‌ها و غیریکنواختی واریانس، تبدیل لگاریتمی داده‌ها انجام و با استفاده از نرم افزار Excell داده‌های تجزیه شده به صورت نمودار نشان داده شد. بمنظور مقایسه بین تیمارهای UV، اشتباه استاندارد (se) میانگین‌ها محاسبه و به صورت Error bar در بالای آن‌ها رسم گردید.

اثر غشاهای مختلف بر نفوذ نور UV: محلول باکتری همانند آنچه در بالا توضیح داده شد بر روی محیط جامد LB پخش گردید. غشاهای پلاستیکی با ضخامت‌های ۶، ۱۲، ۱۰۶، ۲۱۲ میکرون متر، غشاء محافظ UV با ضخامت ۲۰۰ میکرون و شیشه به ضخامت ۱ میلی‌متر بر روی پتری‌ها گذاشته و با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر به مدت ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۴، ۵۰۸ و ۱۰۱۶ ثانیه تحت تأثیر نور UV قرار گرفتند. غلظت نور UV به ترتیب ۱۲۰، ۲۴۰، ۴۸۰، ۹۶۰، ۱۹۲۰، ۳۸۴۰، ۷۶۸۰، ۱۵۳۶۰، ۳۰۷۲۰ و ۶۱۴۴۰ J/m² محاسبه گردید. با توجه به اینکه غشاء ضد UV و شیشه، بطور کامل از ورود UV جلوگیری و در این تیمارها باکتری‌ها همانند تیمار شاهد رشد نموده بودند، داده‌های این تیمارها در آنالیز وارد نگردید. لذا داده‌های بدست آمده از دو فاکتور ضخامت غشاء LDPE معمولی و غلظتی پرتو UV به تفکیک برای هر یک از باکتری بصورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. به طوری که فاکتور اول (غشاء) دارای ۵ سطح و فاکتور دوم (غلظت UV) دارای ۱۱ سطح مختلف بود. تعداد تکرار در هر یک از تیمارها دارای ۳ تکرار بود. پتری‌ها پس از پرتو تابشی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (*E. coli*) و ۳۰ درجه سانتی گراد (*B. thuringiensis*) به ترتیب به مدت ۱۲ و ۱۶ ساعت قرار داده شدند.

آزمایش مقاومت موتانت‌های *E. coli* به ریفامپین: محیط کشت LB حاوی ۶۰ میلی گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپین تهیه گردید. به هر پتری ۲۰ میکرولیتر باکتری کشت شده (حدود ۱۰^۶ سلول) اضافه، با spreader شیشه‌ای بر روی محیط کشت پخش گردید. پتری‌ها به مدت ۱۶ ثانیه در معرض لامپ UV که با سطح محیط کشت ۴۰ سانتی‌متر فاصله داشتند قرار گرفتند. غلظت UV معادل ۸۸ J/m² بود. پتری‌ها پس از پرتو تابشی به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

تعداد کلنی‌ها در پتری شاهد (محیط LB آگار فاقد ریفامپین) پس از پرتو تابشی حدود ۱۲۵ کلنی در هر پتری شمارش گردید. لذا تعداد کلنی‌های زنده مانده در ۸۰ پتری پرتو تابشی شده به طور تخمینی ۱۰۰۰۰ = ۱۲۵ × ۸۰ محاسبه گردید. لذا در پتری‌های حاوی ریفامپین کلاً ۱۰۰۰۰ عدد سلول زنده پس از پرتو تابشی وجود داشت. تعداد سلول‌های زنده مانده در محیط LB+Rif که قادر به تشکیل کلنی بودند، تعداد ۳ کلنی بود که در این صورت نسبت موتانت‌ها $\frac{۳}{۱۰۰۰۰}$ یا ۳×10^{-۴} محاسبه گردید. کلنی‌های موتانت رنگ‌آمیزی و بررسی مجدد گردیدند که نتایج بررسی‌ها نشان داد

گردید. هر دو باکتری از بخش میکروارگانیزم‌ها و ایمنی زیستی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی تأمین گردید.

غشاء: غشاهای پلاستیکی بدون محافظ UV از نوع (Low Density Polyethylene (LDPE با ضخامت‌های کم شامل ۶ و ۱۲ میکرون و ضخیم شامل ۱۰۶ و ۲۱۲ میکرون از بازار تهیه گردید. غشاء پلاستیکی LDPE دارای ماده Ethylene Vinyl Acetate (EVA) محافظ UV به ضخامت ۲۰۰ میکرون از شرکت Polysun Co- شیراز، تهیه گردید.

دستگاه مولد UV: دستگاه مولد نور UV، ساخت شرکت UV-P، پرتابل، ۶ وات، با طول موج ۲۵۴ نانومتر (UV-C).

رنگ‌آمیزی اسپور: جهت بررسی اسپور در باکتری *B. thuringiensis* رنگ‌آمیزی اسپور و سلول‌های رویشی از روش (۲۱) Schaeffer - Fulton استفاده گردید.

محیط کشت: محیط کشت هر دو گونه باکتری محیط LB با ۱/۵٪ آگار انتخاب گردید.

کشت باکتری: یک لوب از استوک باکتری برداشته و بر روی محیط جامد LB تلقیح گردید. پتری حاوی باکتری *E. coli* در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و باکتری *B. thuringiensis* در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد به ترتیب به مدت ۱۲ و ۱۶ ساعت قرار داده شدند. از باکتری‌های کشت شده به داخل شیشه ۲۰ میلی لیتری در بدار حاوی ۱۰ میلی لیتر LB مایع، تلقیح گردید. شیشه‌های حاوی باکتری‌ها بر روی شیکر اوربیتال با ۲۸۰ دور در دقیقه در داخل انکوباتور با ۳۷ درجه سانتی گراد (*E. coli*) و ۳۰ درجه سانتی گراد (*B. thuringiensis*) به ترتیب بمدت ۱۲ و ۱۶ ساعت قرار داده شدند. به منظور بررسی میزان باکتری در محیط کشت، اقدام به رقیق‌سازی به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ بار گردید (serial dilution). تعداد تقریبی سلول‌ها در پتری با درجه رقت ۱۰۰۰۰ برابر شمارش گردید. تعداد سلول در ۱ میلی لیتر کشت باکتری *E. coli* حدود ۱۰^۸ سلول و در باکتری *B. thuringiensis* حدود ۱۰^۷ × ۵ سلول محاسبه گردید.

اثر فاصله از منبع نوری و مدت زمان تابش نور UV: با استفاده از پپیپتور استریل، مقدار ۲۰ میکرولیتر از باکتری کشت شده بر روی پتری حاوی LB جامد قرار داده و با شیشه spreader استریل به طور یکنواخت بر روی محیط کشت پخش گردید. تعداد سلول منتقل شده *E. coli* به هر پتری حدود ۲ × ۱۰^۶ و *B. thuringiensis* حدود ۱۰^۶ عدد محاسبه گردید. پتری‌ها بلافاصله در زیر لامپ پرتابل UV با فواصل ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ سانتی‌متر قرار داده شدند. هر یک از فواصل به عنوان یک تیمار و در هر تیمار ۳ عدد پتری دیش در نظر گرفته شد.

مدت زمان قرار گرفتن پتری‌ها در زیر نور به ترتیب عبارت بود از شاهد (بدون پرتو دهی)، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ و ۱۰۲۴ ثانیه بود. به منظور کمی کردن تیمارهای آزمایش، شدت تابش پرتو UV (J/m²/s) و غلظت نور UV (J/m²) از طریق اندازه‌گیری سطح تابش لامپ (۶ وات) UV و محاسبه وات بر مترمربع (W/m²)، شدت تابش بر حسب J/m²/s بدست آمد. با در نظر گرفتن رابطه $W/m^2 = J/m^2/s$ ، غلظت پرتو UV بر مبنای J/m² از طریق ضرب J/m²/s در مدت زمان تابش بر حسب ثانیه، محاسبه گردید.

پتری‌های مربوط به هر تیمار پس از پرتو دهی به انکوباتور ۳۷ درجه

می‌دهد. لیکن به‌طور ۱۰۰٪ باعث از بین رفتن باکتری نشد و بلکه تعداد اندکی باکتری (بین ۱۰-۱ کلنی) در تیمارهای بیشتر از 200 J/m^2 زنده می‌مانند. مانند حضور این تعداد اندک می‌تواند فرآیند استریل نمودن را دچار اشکال نماید و لذا به‌منظور کنترل کامل باکتری تا سطح ۱۰۰٪ نیاز به غلظت‌های بالا (به‌عنوان مثال تا 1000 J/m^2) می‌باشد. وجود تعداد اندکی کلنی در غلظت‌های بالا می‌تواند به دلیل ایجاد موتاسیون و پیدایش کلنی‌های مقاوم در مقابل پرتو UV باشد که در بررسی‌های صورت گرفته توسط سایرین نیز گزارش گردیده است (۱۲، ۲۶).

باکتری *B. thuringiensis* تحمل بیشتری در مقابل پرتو UV نشان داد (شکل ۲). به‌طوری‌که باکتری تا 240 J/m^2 مقاومت بود. لیکن در غلظت 260 J/m^2 جمعیت باکتری به کمتر از $0.5 \log$ کاهش یافت. در کلیه تیمارها در غلظت‌های بالاتر از 260 J/m^2 کاهش جمعیت باکتری تا کمتر از $1 \log$ می‌باشد که مشاهده می‌گردد غلظت UV به‌طور چشمگیری بیشتر از غلظت بکار رفته در باکتری *E. coli* می‌باشد. از بین رفتن ۱۰۰٪ این باکتری در غلظت‌های بیش از 3000 J/m^2 امکان‌پذیر می‌باشد. نتایج آزمایشات نشان داد که کاهش باکتری تا حدود $3-2 \log$ در غلظت‌های پائین (حدود $1040-480 \text{ J/m}^2$) به سادگی امکان‌پذیر می‌باشد، لیکن کاهش جمعیت تا زیر $1 \log$ انرژی بیشتری لازم داشته و برای حذف کامل (۱۰۰٪) باکتری غلظت‌های بسیار بالا لازم می‌باشد. دلیل نیاز به غلظت‌های بسیار بالا برای کنترل این باکتری می‌تواند مقاومت ذاتی باکتری (*Bacillus*) و وجود اسپورهای باکتری باشد که برای کنترل اسپور نیاز به غلظت‌های بسیار می‌باشد. بررسی‌های صورت گرفته در باکتری *B. sphaericus* نشان‌دهنده زنده‌مانی درصدی از باکتری در غلظت‌های 675 J/m^2 می‌باشد (۱۲). در باکتری *Deinococcus radiodurans* غلظت 300 J/m^2 در صد ناچیزی از جمعیت باکتری را کاهش داد. با اینکه در غلظت‌های 1500 J/m^2 جمعیت باکتری به‌طور چشمگیری کاهش یافت، لیکن درصدی از باکتری‌ها در این غلظت زنده ماندند (۲۶). عامل مقاومت به نور UV در این باکتری عمدتاً مربوط به فعالیت ژن‌های *uvrA2*، *uvrA1*، *uvrE* و *recA* گزارش گردید.

مقاومت بسیار بالای باکتری *B. thuringiensis* می‌تواند به دلیل تحمل این باکتری به شرایط بسیار سخت و استرس‌های شدید محیطی باشد که به‌طور طبیعی مقاومت بالایی را در باکتری ایجاد نموده است. تحمل شرایط سخت سرمایی، گرمایی، کمبود غذا، تحمل در مقابل تابش خورشید و پرتوهای خارج از دامنه نور مرئی، این توان را به باکتری داده تا در مقابل شرایط نامناسب از خود تحمل بیشتری نشان دهد که بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققین نیز گویای این موضوع می‌باشد. شکل ۳ تفاوت تحمل باکتری *E. coli* و *B. thuringiensis* به غلظت‌های 48 J/m^2 و 96 J/m^2 پرتو UV را نشان می‌دهد. این تصاویر گویای کاهش شدید جمعیت باکتری *E. coli* در غلظت‌های یاد شده و برعکس عدم کاهش جمعیت *B. thuringiensis* در غلظت‌های مشابه می‌باشد.

اثر غشاء‌های مختلف در جلوگیری از اثر نور UV: از بین غشاءها (پوشش‌های) استفاده شده، شیشه و پلاستیک LDPE حاوی ۵٪ مواد ضد UV، از ورود نور UV به‌طور کامل جلوگیری نمودند. به‌طوری‌که حداکثر غلظت بکار رفته (61440 J/m^2) تأثیری در کاهش جمعیت باکتری‌های *E. coli* و *B. thuringiensis* نداشت (شکل ۴، تصویرهای a و b). نتایج فوق،

که کلنی‌های یاد شده *E. coli* می‌باشند.

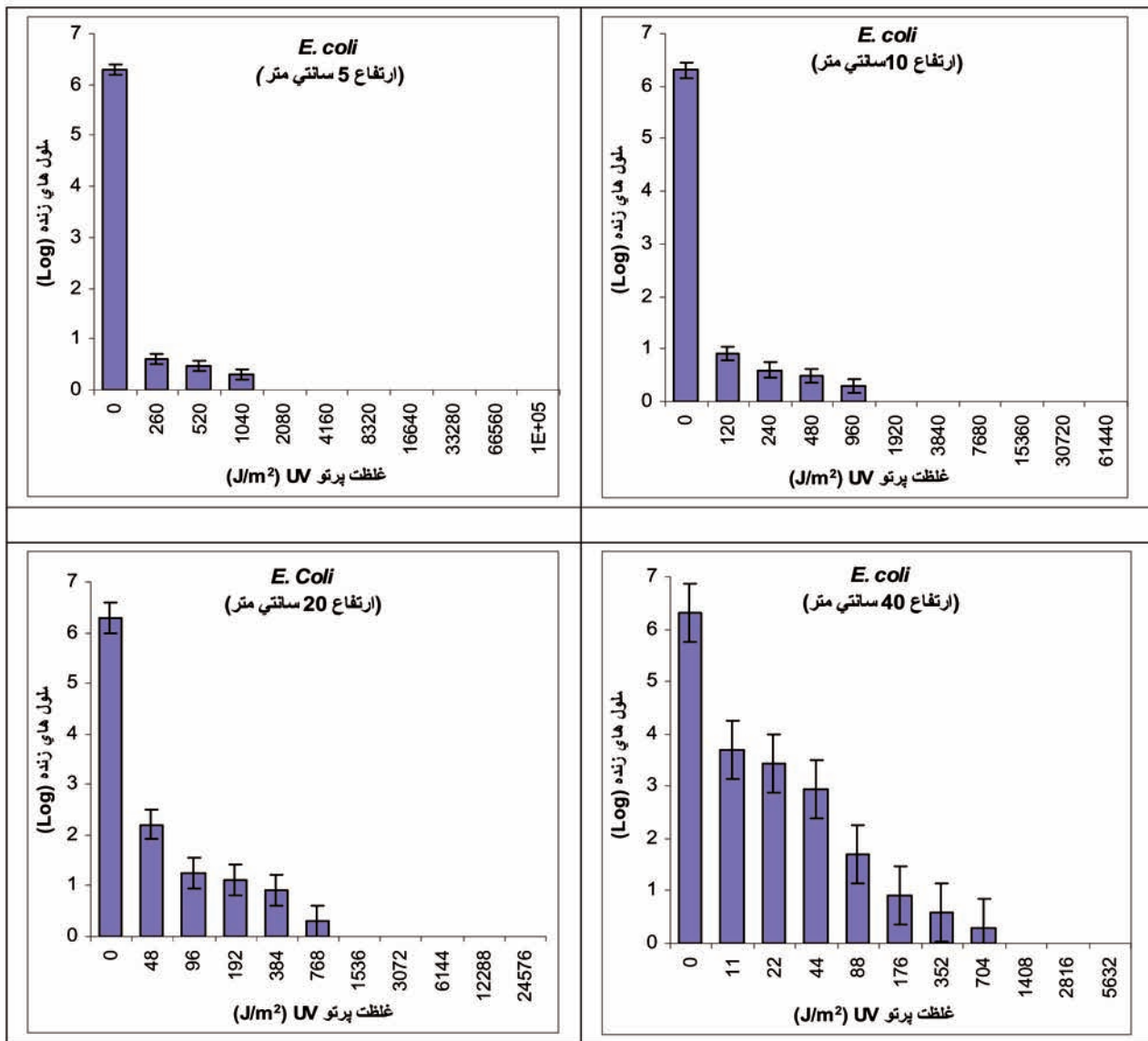
کلنی‌های موتانت در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپین کشت و بر روی شیکر ارییتال با ۲۸۰ دور در دقیقه داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کلنی‌های موتانت در حضور آنتی‌بیوتیک ریفامپین بخوبی رشد نمودند (شکل ۷).
در باکتری *B. thuringiensis* پتری‌ها بمدت ۸ ثانیه در معرض پرتو لامپ UV با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. غلظت پرتو UV معادل 480 J/m^2 بود.

لازم به توضیح است که آزمایشات مربوط به موتاسیون *B. thuringiensis* و بخشی از *E. coli* در آزمایشگاه ژنتیک ملکولی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور انجام گردید.

کنترل اسپور و قارچ پنی‌سلیم توسط پرتو UV: به‌عنوان اطلاعات تکمیلی، اسپور قارچ *Penicillium sp.* از محیط کشت آلوده جدا و پس از محلول‌سازی آن در آب استریل، ۲۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت MS جامد پخش گردید. پتری‌های تلقیح شده در معرض نور UV به ترتیب ۱۸۰۰، ۱۸۰۰۰ و ۷۲۰۰۰ ژول بر مترمربع قرار گرفتند. تیمار بدون پرتو دهی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، تعداد تکرارهای آزمایش شامل ۳ تکرار بود. پس از اعمال تیمارها، پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از ۳ روز وضعیت رشد قارچ در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری

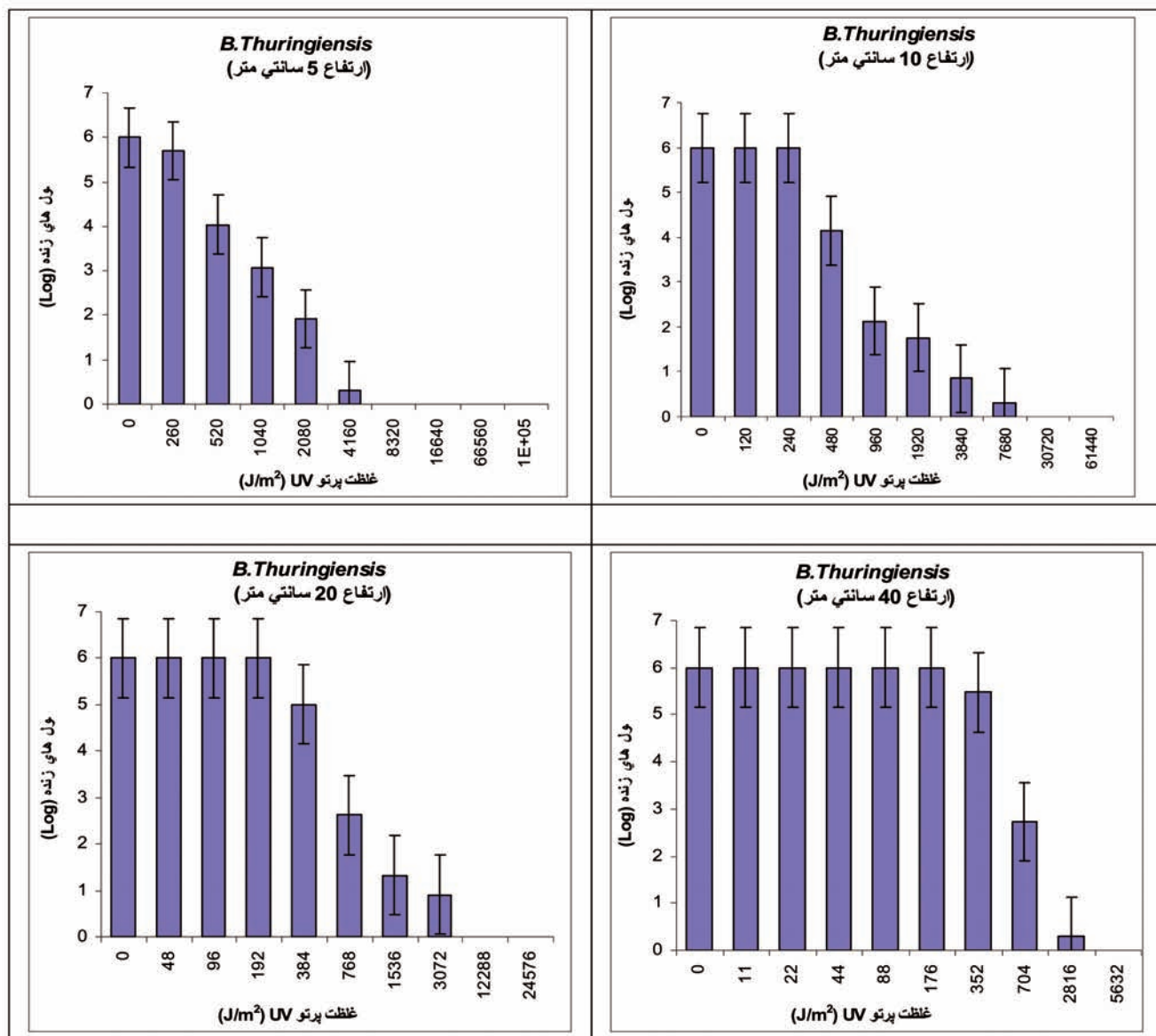
اثر غلظت UV بر زنده‌مانی باکتری: اثر غلظت‌های مختلف پرتو UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر (UV-C) بر زنده‌مانی باکتری‌های *B. thuringiensis* به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. در باکتری *E. coli* (شکل ۱)، با افزایش غلظت UV در کلیه شدت نورها که با تغییر ارتفاع تابش تنظیم گردید، زنده‌مانی باکتری کاهش یافت. تعداد باکتری در پتری شاهد $6.3 \log$ بود با افزایش غلظت UV از حداقل غلظت (11 J/m^2) روند کاهش تعداد سلول‌ها شیب ملایم داشته و در غلظت بالاتر از 88 J/m^2 تعداد باکتری‌های زنده به کمتر از $1 \log$ کاهش یافت. در غلظت بالاتر از 176 J/m^2 تعداد اندکی کلنی در پتری‌ها مشاهده گردید و در غلظت بالاتر از 704 J/m^2 به‌طور کلی رشد باکتری توسط نور UV کنترل گردید. در شدت نورهای شدید (ارتفاع ۵ سانتی‌متر که از شدت نور $130 \text{ J/m}^2/\text{s}$ برخوردار بود) در اولین تیمارها (260 J/m^2)، تعداد باکتری حدود $5 \log$ کاهش و به زیر $1 \log$ رسید. در تیمارهای ۵۲۰ و 1040 J/m^2 که غلظت‌های بسیار بالایی می‌باشند، شاهد زنده‌مانی ۱ تا ۲ کلنی در این تیمارها بودیم. در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۰ و ۱۹۲ ژول بر مترمربع زنده‌مانی بیش از $5 \log$ کاهش داشت. نتیجه اینکه، در غلظت‌های بالاتر از 200 J/m^2 زنده‌مانی سلول‌ها به کمتر از $1 \log$ کاهش یافت. در بررسی زنده‌مانی باکتری در مقابل پرتو نور UV توسط Ivancic-Bace و همکارانش (۱۱) مشخص گردید باکتری *E. coli* غلظت 40 J/m^2 را بخوبی تحمل نموده و کاهش جمعیت باکتری در این غلظت ناچیز می‌باشد. نتایج حاصل از آزمایشات این بررسی نیز حاکی از آن است که غلظت‌های کم تأثیر قابل توجهی در کاهش جمعیت باکتری ندارند لیکن غلظت حدود 200 J/m^2 به‌طور چشمگیری جمعیت باکتری را کاهش



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف پرتو UV (J/m²/s) که با شدت‌های مختلف از ارتفاع ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ سانتی‌متری به باکتری E. coli پرتودهی شد. log زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف نشان‌دهنده اثر افزایش انرژی بر کاهش زنده‌مانی سلول‌ها می‌باشد. در غلظت‌های بیشتر از ۲۰۰ J/m²، زنده‌مانی سلول‌ها بیش از ۵ log کاهش نشان داد.

محسوس‌ی با غشاء ۶ میکرونی ندارد. لیکن در باکتری‌هایی که با غشاء‌های ۱۲، ۱۰۶ و ۲۱۲ میکرون پوشیده شده بودند، جمعیت آن‌ها به ترتیب log ۲/۵، ۲، ۱/۵ بود. در غلظت ۲۴۰ J/m²، کاهش جمعیت باکتری در غشاء‌های ۲۱۲، ۱۰۶، ۱۲ میکرون بیشتر از سایرین بود. در ۴۸۰ J/m² جمعیت باکتری‌های زنده به کمتر از ۱ log رسید که نشان‌دهنده تأثیر ناچیز غشاء‌ها با ضخامت‌های مختلف در زنده‌مانی باکتری‌ها بود. در غلظت ۹۶۰ J/m² تعداد ناچیزی باکتری در پتری‌هایی که با پوشش ۱۰۶ و ۲۱۲ میکرون مشاهده گردید و در غلظت ۱۹۲۰ فقط در پتری‌هایی که با غشاء ۲۱۲ میکرون پوشیده شده بودند تعدادی کلنی مشاهده گردید. نتایج فوق نشان دادند با اینکه شیشه و LDPE ضد UV، از نفوذ نور UV به‌طور کامل جلوگیری نمودند، لیکن پلاستیک‌های معمولی تأثیر چندانی در محافظت

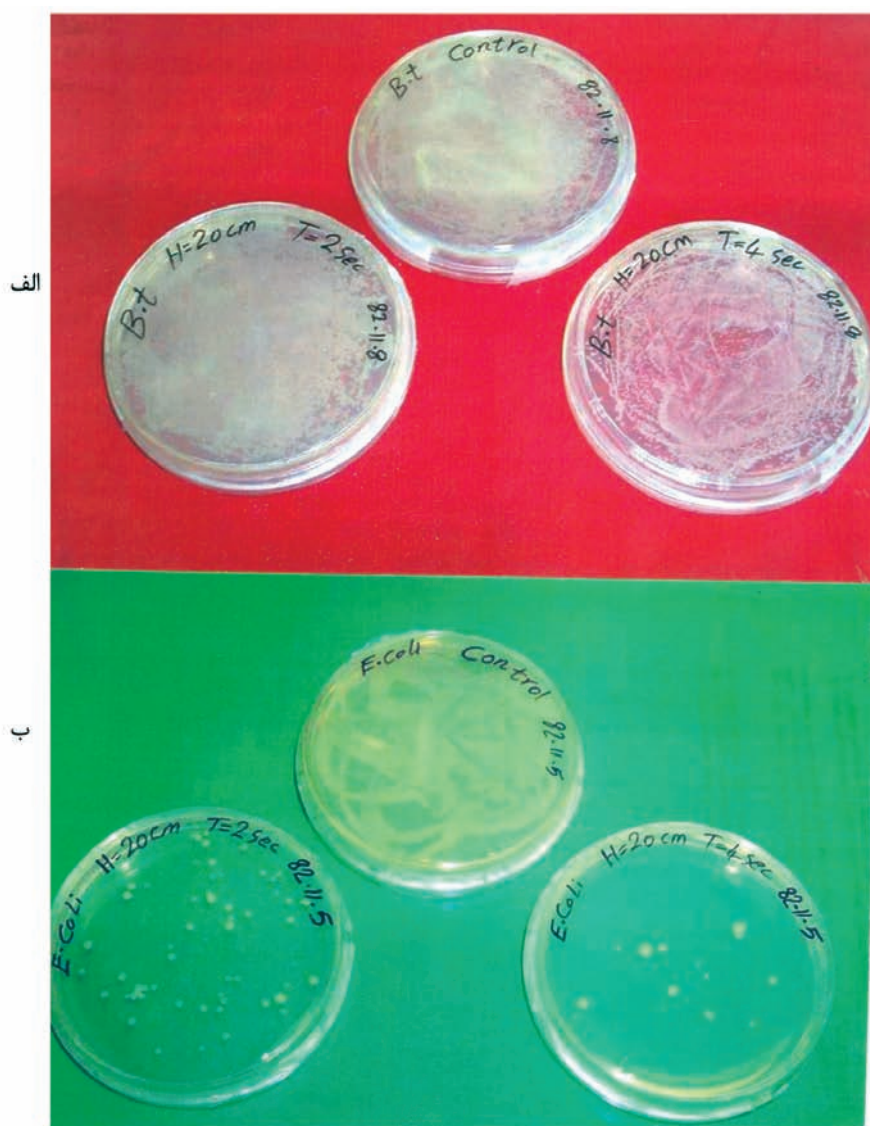
نشان‌دهنده عدم نفوذ نور UV-C از پوشش‌های یاد شده می‌باشد و لذا این پوشش‌ها بخوبی می‌توانند از نفوذ نور UV جلوگیری نمایند. در مقایسه با پوشش‌های یاد شده، پوشش پلاستیکی LDPE معمولی با ضخامت ۱۰۶ میکرون، تأثیر قابل ملاحظه‌ای در جلوگیری از نفوذ نور UV نداشت، به‌طوری‌که جمعیت باکتری‌ها پس از پرتوتابی و به دلیل نفوذ پرتو UV به شدت کاهش نشان دادند (شکل ۴ عکس‌های c و d).
اثر پوشش‌های مختلف LDPE (به استثناء غشاء ضد UV) با ضخامت‌های مختلف در جلوگیری از آثار کشندگی UV و زنده‌مانی باکتری‌ها در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. جمعیت باکتری E. coli (شکل ۵ - الف) بدون پوشش محافظ در مقابل ۱۲۰ J/m² پرتو UV بیش از ۵ log کاهش و جمعیت آن به زیر ۱ log رسیده که تفاوت



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف پرتو UV (UV (J/m²/s) که با شدت‌های مختلف از ارتفاع ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ سانتی‌متری به باکتری *B. thuringiensis* پرتودهی شد. log زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف حاکی از اثر افزایش انرژی بر کاهش زنده‌مانی سلول‌ها می‌باشد. در این باکتری، غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰۰ J/m² باعث کاهش ۵ log در زنده‌مانی سلول‌ها گردید که نشان‌دهنده مقاومت بالای این باکتری در مقابل نور UV می‌باشد.

به‌طور کلی از بین رفتند. در تیمار ۱۵۳۶۰ J/m² تعداد اندکی کلنی در پوشش‌های ۱۰۶ و ۲۱۲ میکرون LDPE مشاهده گردید. نتایج فوق‌گویی تأثیر ناچیز پوشش LDPE در جلوگیری از نفوذ پرتو UV می‌باشد و این پوشش‌ها عملاً تأثیر چندانی در جلوگیری از عبور نور UV ندارند. استفاده از موادی از نوع UV-stabilizers با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی که در ساختمان آن‌ها گروه آمین وجود دارد و اصطلاحاً Hindered Amin Light Stabizers (HALS) نامیده می‌شوند (۱۳)، در مواد پلی‌مری باعث واکنش با پراکسیدها و سایر رادیکال‌های آزاد که در اثر تابش UV ایجاد گردیده‌اند، شده و ضمن جلوگیری از نفوذ UV، باعث مصرف رادیکال‌های آزاد (Scavenging) و خنثی شدن آثار مخرب رادیکال‌ها می‌گردد. ترکیباتی

از نور UV نداشتند. به ویژه اینکه ضخامت‌های ۱۲ و ۶ میکرون تفاوت چندانی با شاهد (بدون پوشش محافظتی) نداشتند. در باکتری *B. thuringiensis* تا غلظت ۲۴۰ J/m² تفاوتی بین تیمارها (غشاءهای مختلف) ملاحظه نگردید (شکل ۵ پائین). لیکن در غلظت ۴۸۰ J/m²، تعداد باکتری‌ها در تیمار شاهد و LDPE با ضخامت ۶ میکرون مقداری کاهش ولی پتری‌هایی که با غشاءهای ۱۲، ۱۰۶ و ۲۱۲ میکرون LDPE پوشیده شده بودند کاهش نشان ندادند. ولی در تیمارهای ۹۶۰، ۱۹۲۰ و ۳۸۴۰ J/m² کاهش ملاحظه شد. این کاهش در غشا ۲۱۲ میکرون LDPE کمتر از سایر تیمارها بود. در غلظت ۷۶۸۰ J/m² کمتر از ۱ log کلنی در زیر پوشش‌ها به چشم می‌خورد. لیکن در تیمار شاهد سلول‌ها



شکل ۶- اثر نور UV در کنترل قارچ پنی سیلیوم

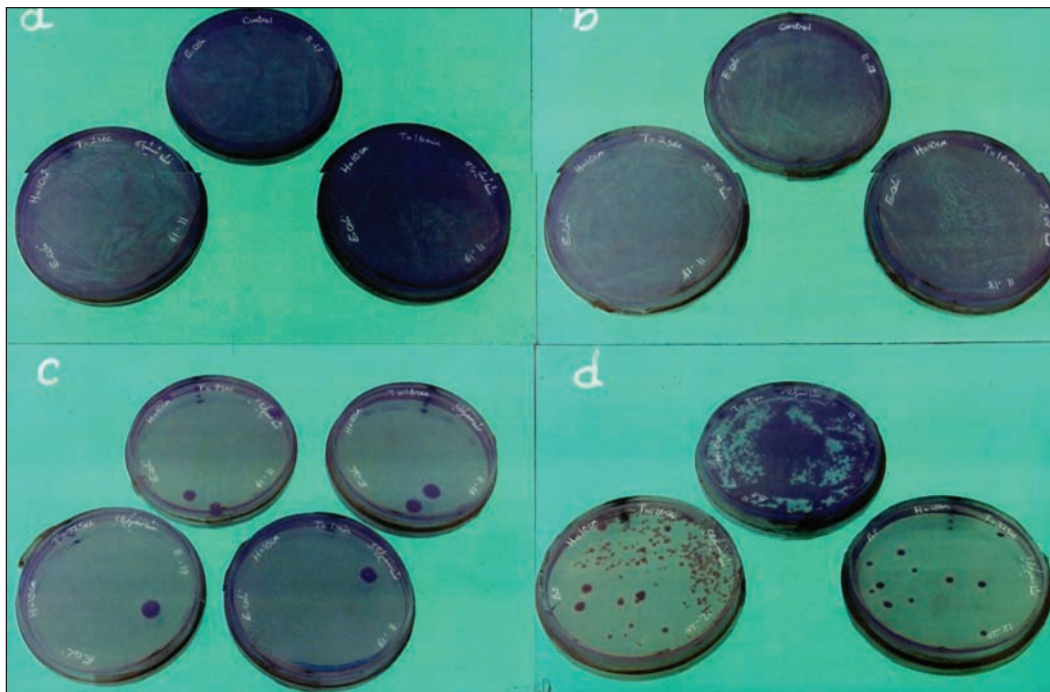
قارچ مولد اسپور در مقابل پرتو UV و کسب اطلاعات تکمیلی و مقایسه آن با باکتری‌ها، اقدام به کشت قارچ *Penicillium sp* و انجام آزمایشات پرتودهی با نور UV گردید (شکل ۶).

پرتو UV با غلظت 1800 J/m^2 تأثیر چندانی در کنترل قارچ نداشت (شکل ۶ عکس b). لیکن غلظت 18000 J/m^2 بشدت باعث جلوگیری از رشد قارچ (شکل ۶ عکس c) گردید. در عین حال حدود ۳-۴ کلنی در این غلظت مشاهده شد. غلظت 72000 J/m^2 به‌طور کامل باعث از بین رفتن قارچ و اسپور گردید (عکس d). در مقایسه با باکتری‌های *B. thur* و *E. coli* *ingiensis* ملاحظه می‌گردد که قارچ اسپورزا مقاومت بسیار بالایی در مقابل نور UV از خود نشان داد. بر اساس نتایج این آزمایش، به‌منظور کنترل قارچ و اسپور، نیاز به انرژی بسیار زیادی می‌باشد که این انرژی در مقایسه با باکتری‌های مقاوم مثل باسیلوس‌ها بسیار بالا می‌باشد. در همین رابطه، Marshal و همکارانش (۱۵) نیز گزارش نمودند برای غیر فعال نمودن

مانند ارگانونیکل‌ها باعث تقلیل (Quenching) اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد می‌گردند (۴). این مواد قادر به کاهش انرژی تهییج شده در اثر رادیکال‌های آزاد می‌گردند. مکانیسم دیگری که باعث جلوگیری از نفوذ نور می‌گردد استفاده از مواد جذب کننده UV یا UV-Absorbers می‌باشند که نور UV را جذب و در قالب نور با طول موج بلند مانند مادون قرمز از خود ساطع می‌نمایند این مواد شامل Benzotriazoles، Benzophenones، Benzooates و گاه Oxanilides و Salicylates می‌باشند. در جلوگیری از نفوذ و کاهش اثرات مخرب نور UV بر پلیمرها، اغلب از هر سه مکانیسم به صورت توأماً استفاده می‌گردد.

در این آزمایش، غشاء LDPE حاوی مواد ضد UV به‌طور کامل از نفوذ نور UV جلوگیری نمود. لیکن غشاءهای LDPE فاقد مواد ضد UV، تأثیر بسیار ناچیزی در جلوگیری از نفوذ این نور داشت.

اثر نور UV در کنترل قارچ پنی سیلیوم: به‌منظور اطلاع از عکس‌العمل



۲: زنده‌مانی باکتری‌ها در مقابل پرتو UV. الف، اثر پرتو UV با غلظت‌های ۴۸ و ۹۶ J/m^۲ بر جمعیت باکتری *B. thuringiensis* و اثر همان غلظت‌ها بر کاهش جمعیت باکتری *E. coli* (ب).

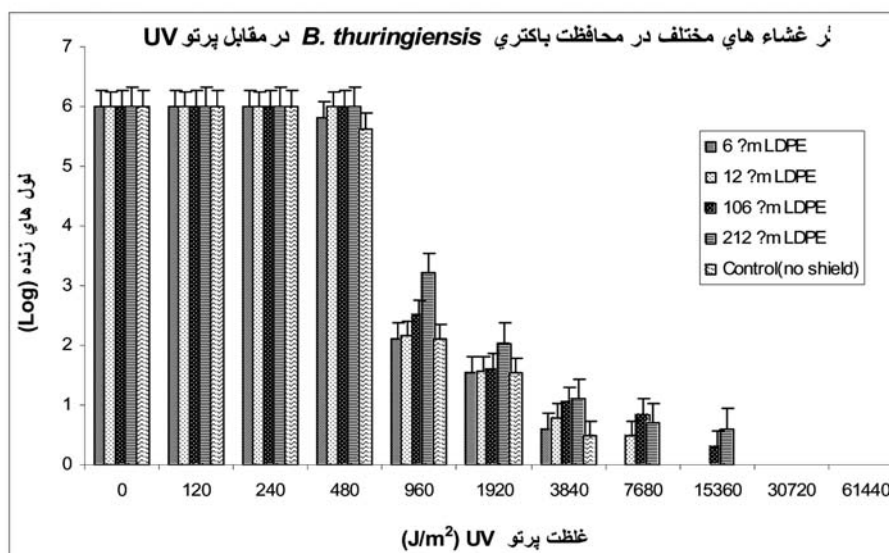
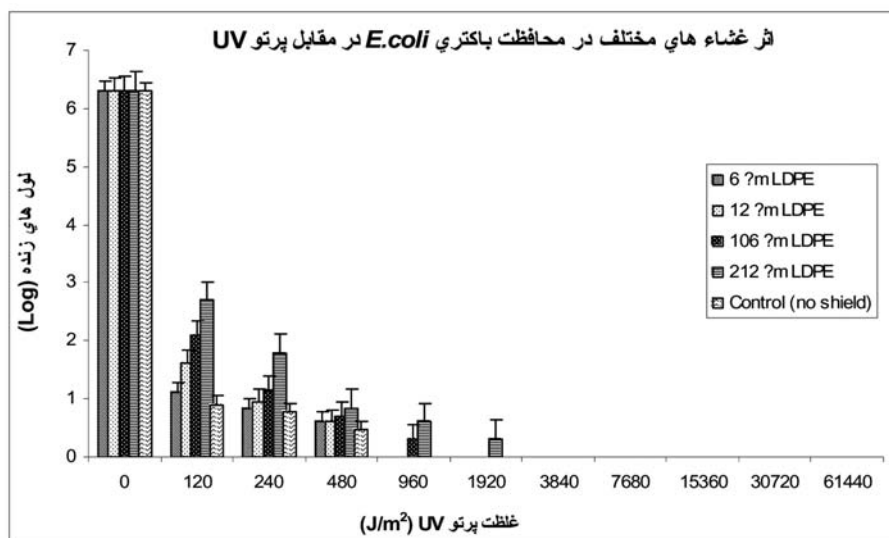
اسپور از طریق پرتو UV نیاز به انرژی زیادی در مقایسه با سلول می‌باشد. اثر موتاسیون‌زایی نور UV: باکتری‌های *E. coli* که بر روی محیط فاقد ریفامپین کشت و در معرض ۸۸ J/m^۲ پرتو UV قرار گرفتند، زنده‌مانی باکتری‌ها در هر پتری حدود ۱۲۵ عدد بود که در مقایسه با شاهد (بدون پرتو تاب) حدود ۴ log کاهش در زنده‌مانی مشاهده شد. نسبت موتاسیون در سلول‌های پرتو تاب شده با صفت مقاومت به ریفامپین $10^{-3} \times 3/3$ بود که از نسبت بالایی برخوردار بودند. غلظت UV اعمال شده در این آزمایش (۸۸ J/m^۲) از انرژی نسبتاً بالایی برخوردار بود و لذا زنده‌مانی سلول‌ها کم و احتمال ایجاد موتاسیون به دلیل دریافت غلظت بالای UV توسط باکتری‌ها، زیاد بود. غلظت UV بکار رفته در آزمایشات انجام شده توسط دیگران متفاوت می‌باشد. به‌عنوان نمونه، Zahardka و همکارانش (۳۲) از غلظت ۴۰ J/m^۲، Ivancic – Bace و همکارانش (۱۱) از غلظت ۵۰ J/m^۲ و Web و Turner از غلظت ۳۰ J/m^۲ در ایجاد جهش در *E. coli* استفاده کردند. این در حالی است که در بعضی از آزمایشات از غلظت‌های بسیار پائین با زنده‌مانی بالا نیز استفاده می‌گردد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که غلظت ۸۸ J/m^۲ غلظت مؤثر با کارآمدی بالا برای ایجاد موتاسیون در باکتری *E. coli* می‌باشد.

باکتری‌های موتانت حاصل از پرتو تاب با ۸۸ J/m^۲ نور UV، در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپین بخوبی رشد نمودند (شکل ۷). عامل ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک یاد شده ایجاد تغییرات در ژن کد کننده RNA پلی‌مراز می‌باشد که در نتیجه این تغییرات امکان اتصال ریفامپین به آنزیم RNA پلی‌مراز فراهم نمی‌آید و لذا این امکان برای باکتری فراهم می‌آید تا در حضور آنتی‌بیوتیک رشد نماید (۲۲). این تغییرات در سطح ژنوم باکتری صورت می‌گیرد و موتاسیون در Beta

subunit آنزیم RNA پلی‌مراز رخ می‌دهد. لذا مکانیسم مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در سطح ژنوم باکتری است (۳۰). این تغییرات در ۳ گروه I و II و III در نواحی محدودی از ساب‌توینت β قابل طبقه‌بندی است (۲۰، ۳۱). نتایج حاصله نشان می‌دهد باکتری پرتو تاب شده با نسبت بسیار بالایی در مقابل آنتی‌بیوتیک ریفامپین مقاومت نشان دادند که حاکی از جهش بالای باکتری و توان مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌باشد. از طرفی، چون موتاسیون در سطح ژنوم صورت می‌گیرد، لذا انتقال آن به نسل‌های بعدی پایدار بوده و این جهش در نسل‌های بعدی نیز پایداری خود را حفظ می‌ماند. کشت متوالی باکتری و حفظ مقاومت به ریفامپین در کشت‌های متوالی تأیید کننده اظهارات فوق می‌باشد.

غلظت UV بکار رفته در این آزمایش غلظت مناسبی برای ایجاد جهش در باکتری *E. coli* بود. زیرا بدلیل بالا بودن غلظت UV، احتمال جهش در باکتری‌های زنده‌مانده بالا می‌باشد. در غلظت‌های پائین، با اینکه تعداد سلول‌های زنده‌مانده افزایش می‌یابد، لیکن نسبت سلول‌های جهش نیافته نیز بالا می‌رود و دستیابی به سلول‌های موتانت به نسبت زیادی کاهش می‌یابد. لذا غلظت یاد شده که پس از انجام آزمایشات مقدماتی متعدد بدست آمد، بنظر غلظت مناسبی جهت پرتو تاب و تولید سوش‌های موتانت در باکتری *E. coli* می‌باشد. افزایش غلظت UV از مقدار پیشنهادی (J/۸۸ m^۲) به شدت تعداد سلول‌های زنده‌مانده را کاهش و نسبت سلول‌های موتانت را دچار نوسان می‌نماید.

در باکتری *B. thuringiensis* که هدف از موتاسیون دستیابی به سلول‌های فاقد توان اسپورزایی بود، سلول‌ها با غلظت ۴۸۰ J/m^۲ نور UV پرتو تاب و به مدت ۳ هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اسپورزایی در آن‌ها صورت گیرد. سپس اقدام به رنگ‌آمیزی و بررسی

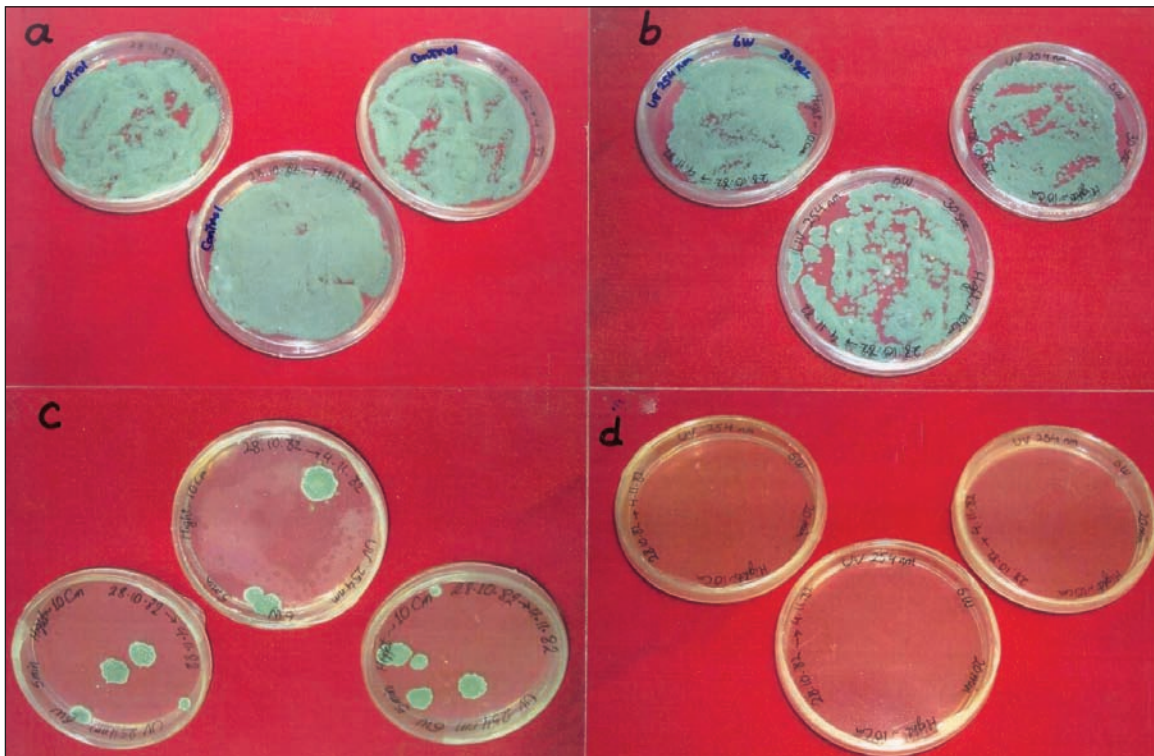


شکل ۴: اثر بازدارندگی نور UV بوسیله غشاهای مختلف. تصویر (a) پتری‌های حاوی *E. coli* با شیشه ۱ میلی‌متری پوشیده و سپس

با غلظت‌های 120 J/m^2 و 61440 J/m^2 پرتو تابشی شدند. تصویر (b)، باکتری *B. thuringiensis* با پوشش شیشه‌ای و با همان غلظت‌ها پرتو تابشی شدند. تصویر (c)، باکتری *E. coli* پس از پوشش با پلاستیک LDPE با ضخامت ۱۰۶ میکرومتر با غلظت‌های ۴۸۰، ۹۶۰، ۱۹۲۰ و 3840 J/m^2 نور UV پرتو تابشی شدند. تصویر (d)، باکتری *B. thuringiensis* با همان پلاستیک پوشش و با غلظت‌های ۴۸۰، ۹۶۰ و 1920 J/m^2 نور UV پرتو تابشی شدند (در رابطه با مدت زمان تابش و غلظت UV به مواد و روش‌ها مراجعه گردد).

بسیار کمتری نسبت به باکتری گرم مثبت *B. thuringiensis* دارد که این تفاوت در برابر پرتو نور UV به دلیل مقاومت بالای *B. thuringiensis* به استرس‌های محیطی و ساختار تکاملی باکتری باشد. جهت از بین رفتن ۱۰٪ باکتری نیاز به غلظت بسیار بالای UV می‌باشد. این در حالی است که برای کاهش زنده‌مانی باکتری $5 \log$ نیاز به غلظت‌های بسیار کمی می‌باشد. در صورتی که هدف استریل کردن و حذف کامل باکتری باشد، باید از غلظت‌های بالا استفاده نمود. این غلظت در باکتری *E. coli* تا حدود 1000 J/m^2 و در باکتری *B. thuringiensis* حدود 3000 J/m^2 می‌باشد. دلیل دیگر مقاومت بالای باکتری اخیر به پرتو UV می‌تواند

لام‌ها گردید. با اینکه با صرف وقت بسیار زیاد، تعداد زیادی از کلنی‌های زنده‌مانده از پرتو UV مورد بررسی قرار گرفتند، لیکن کلنی فاقد اسپور مشاهده نگردید. در این بررسی بیش از ۱۰۰۰۰۰ باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت، لیکن همان‌گونه که اشاره شد نتیجه‌ای در بر نداشت. با توجه به اینکه اسپورزایی یکی از مراحل طبیعی و پیچیده در *Bt* می‌باشد، فرایندهای بسیار زیادی درگیر این امر می‌باشند و در نتیجه تعداد زیادی ژن با یکدیگر کار می‌کنند تا سلول رویشی اسپورزایی نماید، لذا دستیابی به سویه موتانت فاقد اسپور مشکل می‌باشد. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، باکتری *E. coli* در مقابل نور UV مقاومت



شکل ۵: اثر پوشش‌های مختلف در جلوگیری از آثار کشندگی پرتو UV و زنده‌مانی باکتری در غلظت‌های مختلف UV (J/m^2). شکل بالا باکتری *E. coli* و شکل پائین باکتری *B. thuringiensis* (پوشش‌های LDPE ضد UV و شیشه بدلیل جلوگیری از ۱۰۰٪ نفوذ نور UV، داده‌های این دو تیمار وارد تجزیه آماری نگردید و در نتیجه این دو تیمار در شکل نشان داده نشدند).

در مقابل آنتی‌بیوتیک ریفامپین، با نسبت بسیار بالا جهش نشان داده و کلنی‌های مقاوم ایجاد می‌گردد. در حالی که *B. thuringiensis* در غلظت حدود $480 J/m^2$ تحت تأثیر قرار نگرفت. با اینکه *E. coli* به راحتی و با نسبت بالا به ریفامپین مقاومت نشان داد لیکن در *B. thuringiensis* هیچ‌گونه سلول جهش یافته فاقد توان تولید اسپور بدست نیامد. البته مقاومت به ریفامپین که مقاومتی در سطح ژنوم می‌باشد به آسانی در باکتری ایجاد می‌گردد. در سایر باکتری‌ها مانند باکتری‌های کند رشد (Slow growing bacteria) از قبیل باکتری *M. tuberculosis* از سال‌ها قبل مقاومت به ریفامپین گزارش گردیده است.

منابع مورد استفاده

- 1- Agostini J.J., Carroll D. and Minton K.W. 1996; Identification and characterization of *uvrA* a DNA repair gene of *Deinococcus radiodurans*. Journal of Bacteriology. 178 (23): 6759-6765.
- 2- Amundsen S.K., Taylor A.F. and Smith G.R. 2000; The RecD subunit of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme inhibits RecA loading, homologous recombination, and DNA repair. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 7399-7404.
- 3- Arnold D.A. and Kowalczykowski S.C. 2000; Facilitated loading of RecA protein is essential to recombination by RecBCD

بدلیل اسپورزایی این باکتری باشد. در مقایسه با باکتری‌های مورد آزمایش، قارچ *Penicillium sp* از مقاومت بسیار بالایی در مقابل نور UV برخوردار می‌باشد. به طوری که برای از بین بردن قارچ و اسپور آن، نیاز به غلظت‌های بالاتر از $18000 J/m^2$ می‌باشد که نشان‌دهنده تفاوت فاحش ارگانسیم‌های مختلف در مقابل پرتو نور UV می‌باشد. لذا در استریل نمودن قارچ‌ها، باید از غلظت‌های بسیار بالای UV استفاده نمود. در غیر این صورت امکان آلودگی مجدد به دلیل وجود تعداد بسیار اندک اسپور زنده وجود خواهد داشت.

تأثیر غشاء‌ها یا پوشش‌های مختلف در جلوگیری از نفوذ نور UV متفاوت بوده به طوری که شیشه به راحتی از نفوذ نور UV به‌طور کامل جلوگیری می‌نماید. غشاء LDPE ضد UV نیز از نفوذ UV جلوگیری می‌نماید. لیکن پلی‌مرهای LDPE فاقد مواد بازدارنده یا مواد ضد UV قادر به جلوگیری از نفوذ نور UV نبوده، حتی در ضخامت‌های بالا تأثیر جزئی در جلوگیری از نفوذ نور UV دارند. افزودن مواد ضد UV از قبیل UV-absorbers، UV-stabilizers، و Quenchers باعث جلوگیری از تخریب پلی‌مر و نفوذ نور UV می‌شود، ضروری است با آگاهی از نحوه عمل مواد افزودنی ضد UV، نسبت به انتخاب آن‌ها اقدام نمود. در عین حال پلی‌مرهای LDPE که در ساخت آن‌ها از مواد ضد UV استفاده شده، براحتی از نفوذ نور UV جلوگیری می‌نمایند.

باکتری *E. coli* در مقایسه با باکتری *B. thuringiensis* غلظت کمتری از UV برای جهش نیاز دارد. *E. coli* پرتوتابی شده به راحتی



شکل ۷: کلنی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفاکسیمین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی محیط LB آگار (الف). همان کلنی‌ها در محیط LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (ب) کشت شدند. ارلن سمت چپ LB فاقد باکتری می‌باشد.

repair-deficient *Bacillus subtilis* biosimetry strains. Applied and Environmental Microbiology, 69: 683-685.

16- Mckinlay A.F., Driscoll C.M.H., Meara J.R., Pearson A.J., Saunders R.D. and Stather J.W. 2002. Advice on protection against ultraviolet radiation. Documents of the NRPB, 13: 1-35.

17- Maughan H., Galeano B. and Nicholson W.L. 2004; Novel rpoB mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: Global effects on growth competence, sporulation and germination. Journal of Bacteriology, 186: 2481-2486.

18- Morimatsu K. and Kowalczykowski S.C. 2003; RecFOR proteins load RecA protein on to gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: A universal step of recombinational repair. Molecular. Cell. 11: 1337-1347.

enzyme. Journal of Biological Chemistry. 275: 12261-12265.

4- Audry A.L., Hamid H.S. and Torikai A. 2001; Effect of climate change and UV-B on materials. Photochem. Photobiol. Sci. 2: 68-72.

5- Burke, Jr W.F., McDonald K.O. and Davidson E.W. 1983; Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. Applied and Environmental Microbiology, 46: 954-956.

6- Bockrath R., Ruiz-Rubio, M. and Bridges B.A. 1987; Specificity of mutation by UV light and delayed photoreversal in umuC - defective *Escherichia coli* K-12: A targeting intermediate at pyrimidine dimers. Journal of Bacteriology, 169: 1410-1416.

7- Eisenstark A. 1989; Bacterial genes involved in response to near - ultraviolet radiation. Advances in Genetics, 26: 99-147.

8- Eisenstark A. 1998; Bacterial gene products in response to near ultraviolet radiation. Mutation Research, 422: 85-95.

9- Friedberg E.C., Walker G.C. and Sied W. 1995; DNA repair and mutagenesis. American Society of Microbiology, Washington DC.

10- Gong L., Takamaya K. and Kjelleberg, S. 2002; Role of Spo-T-dependent ppGpp accumulation in the survival of light - exposed starved bacteria. Microbiology. 148: 559-570.

11- Ivancic-Bace I., Valsic I., Salaj-Smic E. and Brcic-Kostic K. 2006; Genetic evidence for the requirement of RecA loading activity in

SOS induction after UV irradiation in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 188: 5024-5032.

12- Keller L., Thompson T.L. and Maxy R.B. 1982; UV light-induced survival response in a highly radiation resistant isolates of moraxella - acinetobacter group. Applied and Environmental Microbiology, 43: 424-429.

13- Lee R.E., Papazoglou E., Jhonson B. and Kim J.W. 2001; The chemistry and science of stabilization. Additives, March 18-21.

14- Luria S.E. and Delbruk M. 1943; Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics, 28: 491-511.

15- Marshal M.M., Hayes S., Moffet J., Sterling C.R. and Nicholson W.L. 2003; Comparison of UV inactivation of spores of three encephalitozoon species with that of spores of two DNA

- 19- Nicholson W.L. and Maughan H. 2002; The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 184: 4936–4940.
- 20- Ovchinnikov Y.A., Monastyrskaya G.S., Guriev S.O., Kalinina N.F., Sverdlov E.D., Gragerov A.I., Bass I.A., Kiver I.F., Moysieieva E.P., Igumnov V.N., Mindlin S.Z., Nikiforov V.G. and Khesin R.B. 1983; RNA polymerase rifampin resistance mutation in *Escherichia coli*: Sequence changes and dominance. *Molecular and General Genetics*, 190: 344–348.
- 21- Schaeffer A.B. and Fulton M.D. 1933; A simplified method for staining endospores. *Science*. 77: 194-194.
- 22- Severinov K., Soushko M., Goldfarb A. and Nikiforov V. 1993; Rifampicin region revisited. New rifampicin – resistant and streptolydigin – resistant mutants in the Beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 14820–14825.
- 23- Sliney D.H. 2001; UV Light & Vision. *J. Photochem. Photobiol*, 64: 166–175.
- 24- Sweet D.M. and Moseley B.E.B. 1976; The resistance of *Micrococcus radiodurans* to killing and mutation by agents which damage DNA. *Mutation Research*, 34: 175–186.
- 25- Takao M., Yonemaso R., Yamamoto J. and Yasui A. 1996; Characterization of a UV endonuclease gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and its bacterial homolog. *Nucleic Acids Research*, 24 (7): 1267–1271.
- 26- Tanaka M., Narumi I., Funayama T., Kikuchi M., Watanabe H., Matsunaga T., Nikaido O. and Yamamoto K. 2005; Characterization of pathways dependent on the *uvrE*, *uvrA1* or *uvrA2* gene product for UV resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*, 187: 3693–3697.
- 27- Tempest P.R. and Moseley B.E.B. 1980; Defective excision repair in a mutant of *Micrococcus radiodurans* hypermutable by some monofunctional alkylating agents. *Molecular and General Genetics*, 179: 191–199.
- 28- Turner M.A. and Webb R.B. 1981; Comparative mutagenesis and interaction between near – ultraviolet (405 nm) and far – ultraviolet (254 nm) radiation in *Escherichia coli* with differing repair capabilities. *Journal of Bacteriology*, 142: 410–417.
- 29- Vireling S., Weber T., Wohleben W. and Muth G. 2001; Evidence that an additional mutation is required to tolerate insertional inactivation of the *Streptomyces lividans* *recA* gene. *Journal of Bacteriology*, 183 (14): 4374–4381.
- 30- Vogler A.J., Busch J.D., Percy – Fine S., Tipton – Hunton C. Smith K.L. and Keim. P. 2002; Molecular analysis of rifampin resistance in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (2): 511–513.
- 31- Xu M., Zhou Y.N., Goldstein B.P. and Jin J.D. 2005; Cross – resistance of *Escherichia coli* RNA polymerase conferring rifampin resistance to different antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 187: 2783–2792.
- 32- Zahradka K., Simic S., Buljubasic M., Petranovic M., Dermic D. and Zahradka D. 2006; *sbc B15* and *βbcB* mutation activate two types of RecF recombination pathways in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188: 7562-7571.



Archive of SID