Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):29-38

Comparison of Production of Carotenoid Pigments by Prokaryotic Isolates of Iranian Saline Ecosystems and Identification of Superior Isolate

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Pourbabaee A.A.* *PhD*,
Amoozegar M.A.[1] *PhD*,
Tavakoli S.[1] *MSc*,
Rasooli M.[2] *MSc*

How to cite this article
Pourbabaee A A, Amoozegar M A, Tavakoli S, Rasooli M. Comparison of Production of Carotenoid Pigments by Prokaryotic Isolates of Iranian Saline Ecosystems and Identification of Superior Isolate. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):29-38.

*Soil Science Department, Agricultural Engineering & Technology Faculty , University of Tehran, Iran
[1]Microbiology Department, Biology & Center of Phylogeny of Organisms Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Centre (IBRC), Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

Correspondence
Address: Soil Science Department, College of Agricultur and Natural Resources, University of Tehran, Daneshkadeh Street, Karaj, Iran. Postal Code: 31587-77871
Phone: +98 (26) 32231787
Fax: -
pourbabaei@ut.ac.ir

Article History
Received: February 2, 2016
Accepted: February 5, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims Carotenoids are a vast group of lipid-soluble pigments, which are produced by variety of microorganisms. The aim of this study was to compare the production of carotenoid pigments by prokaryotic isolates of Iranian saline ecosystems and identify superior isolate.

Materials & Methods In this the experimental study, isolates were purified by culture-based methods and carotenoid extracts were analyzed by spectrophotometry in wavelength region of 400nm to 600nm. The total carotenoid content was estimated by spectrophotometry at λ_{max} (490nm). Identity of bands was detremined by purification of bands by Thin Layer Chromatography (TLC) and analysis by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Findings Fourty-three isolates were obtained. Eight isolates were halotolerant bacteria, 8 isolates were moderately halophile, and 27 isolates were extremely halophile. All of the strains were capable of producing carotenoid compounds. Isolate M24 with 2054µg/g production was selected as superior isolate. Thin layer chromatography exhibited 6 colored bands in colored extract of this strain and the most concentrated band was purified. After purification by TLC and HPLC, spectrophotometry in UV range showed two pics at 530nm and 465nm as the highest absorbances, which were similar to UV absorbance of α-bacterioruberin. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence of strain M24 showed that this strain had 98% similarity with Haloarcula amylolytica BD-3.

Conclusion From Iranian Saline Ecosystems, 43 isolates are obtained. Eight isolates are halotolerant bacteria, 8 isolates are moderately halophile, and 27 isolates are extremely halophile. All of the isolates are capable of producing carotenoid compounds. Strain M24 is superior isolate, having 98% similarity with *Haloarcula amylolytica* BD-3.

Keywords Carotenoid; Halophile Prokaryotes; Thin Layer Chromatography; High Pressure Liquid Chromatography; Fourier Transform Infrared Spectroscopy

CITATION LINKS

[1] Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan [2] Carotenoids volume 5: Nutrition and health [3] Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria [4] Carotenoids of an antarctic psychrotolerant bacterium, Sphingobacterium antarcticus, and a mesophilic bacterium, Sphingobacterium multivorum [5] Microbial production of food grade pigments [6] Microbial xanthophylls [7] An improved technique for staining red halophilic bacteria [8] Salinicoccus salitudinis sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil sample [9] The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds [10] Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi) [11] HarvestPlus handbook for carotenoid analysis [12] Ecology of hypersaline microorganisms [13] Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications [14] Isolation of extreme halophiles from seawater [15] Production of canthaxanthin by Haloferax alexandrinus under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction [16] Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey [17] Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey [18] Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium Halobacillus halophilus [19] Carotenoids present in halotolerant Bacillus spore formers [20] Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon Haloarcula japonica [21] Characterization of halophilic C50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

مقایسه تولید رنگدانه کاروتنوئیدی توسط جدایه‌های پروکاریوتی اکوسیستم‌های شور ایران و شناسایی جدایه برتر

احمدعلی پوربابائی* PhD
گروه علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
محمدعلی آموزگار PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، تهران، ایران
سمانه توکلی MSc
گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، تهران، ایران
مهرنوش رسولی MSc
بانک میکروارگانیزم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده
اهداف: کاروتنوئیدها گروه وسیعی از رنگدانه‌های محلول در چربی هستند و به‌وسیله انواعی از میکروارگانیزم‌ها تولید می‌شوند. هدف مطالعه حاضر، مقایسه تولید رنگدانه کاروتنوئیدی توسط جدایه‌های پروکاریوتی اکوسیستم‌های شور ایران و شناسایی جدایه برتر بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر جدایه‌ها با روش‌های مبتنی بر کشت، خالص‌سازی و عصاره کاروتنوئیدی با روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۶۰۰نانومتر آنالیز شدند. میزان کل کاروتنوئید در طول موج ۴۹۰نانومتر به‌دست آمد و در نهایت با روش خالص‌سازی باندها به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک و آنالیز با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه باندهای مورد نظر تعیین هویت شدند.
یافته‌ها: از اکوسیستم‌های بررسی‌شده، تعداد ۴۳ جدایه به‌دست آمد. ۸ جدایه تحمل‌کننده نمک، ۸ جدایه نمک‌دوست نسبی و ۲۷ جدایه نمک‌دوست اجباری بودند. همه سویه‌ها ترکیبات کاروتنوئیدی تولید کردند. جدایه M24 با تولید ۲۰۵۴/۰۵میکروگرم بر گرم به‌عنوان جدایه برتر انتخاب شد. ۶ باند در عصاره رنگی این سویه مشاهده و غلیظ‌ترین باند خالص‌سازی شد. طیف‌سنجی با اسپکتروفتومتر مرئی در نور فرابنفش جذب ۴۹۵نانومتری با دو شانه در ۵۳۰ و ۴۶۵نانومتر را به‌عنوان حداکثر جذب نشان داد که مشابه طیف مرئی در نور فرابنفش حاصل از آلفا-باکتریوروبرین بود. جدایه M24، ۹۸% با سویه *هالوآرکولا آمیلولیتیکا* BD-3 قرابت فیلوژنی داشت.
نتیجه‌گیری: از اکوسیستم‌های بررسی‌شده، تعداد ۴۳ جدایه به‌دست آمد. ۸ جدایه تحمل‌کننده نمک، ۸ جدایه نمک‌دوست نسبی و ۲۷ جدایه نمک‌دوست اجباری هستند. همه سویه‌ها قادرند ترکیبات کاروتنوئیدی تولید کنند. جدایه M24 جدایه برتر است، که ۹۸% با سویه *هالوآرکولا آمیلولیتیکا* BD-3 قرابت فیلوژنی دارد.
کلیدواژه‌ها: کاروتنوئید، پروکاریوت نمک‌دوست، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، دستگاه طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷
*نویسنده مسئول: pourbabaei@ut.ac.ir

مقدمه

کاروتنوئیدها گروه مهمی از ترکیبات فعال زیستی هستند که توسط طیف وسیعی از ارگانیزم‌ها مانند گیاهان، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات آب‌گریز، در غشای فتوسنتزی یا غشای سلولی ارگانیزم‌های فتوتروف و هتروتروف تجمع می‌یابند و مسئول ایجاد رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز در طبیعت هستند[1]. برخی از این ترکیبات به‌علت ساختمان خاص خود، قادرند نور را به‌صورت انتخابی جذب کنند که اصطلاحاً رنگدانه نام دارند[2].

در حال حاضر بیشتر نیاز تجاری کاروتنوئیدها با سنتز شیمیایی تامین می‌شود، اما با اثبات عوارض رنگ‌های سنتزی بر سلامت انسان‌ها مانند آلرژی و بیش‌فعالی در کودکان، گرایش عمومی به سمت منابع طبیعی سوق یافته است؛ به همین سبب قیمت انواع طبیعی کاروتنوئیدها بسیار گران‌تر از محصولات سنتزی است[3].
تنوع ساختاری کاروتنوئیدها موجب تنوع عملکردهای بیولوژیک آنها نیز شده است. تا مدت‌ها از کاروتنوئیدها فقط از نظر رنگ‌دهی و تولید ویتامین A در غذای انسان‌ها و حیوانات استفاده می‌شد. با گسترش مطالعات و شناخت خاصیت آنتی‌اکسیدانی این مواد، مصرف آنها نیز افزایش یافت. امروزه خواص آنتی‌اکسیدانی بالا، نقش ضدسرطانی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی این ترکیبات منجر به استفاده از آنها در زمینه‌های متعددی مانند صنایع غذایی، داروسازی، پزشکی و آرایشی شده است. فروش جهانی کاروتنوئیدها در سال ۲۰۰۰، حدود یک بیلیون دلار بود و این امر حاکی از کاربرد گسترده این ترکیبات در صنایع است[4].
تاکنون بیش از ۶۰۰ نوع ترکیب کاروتنوئیدی در طبیعت شناسایی شده است که تنها تعداد اندکی از آنها به‌صورت تجاری استفاده می‌شوند. گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها مولدین اصلی کاروتنوئیدها در طبیعت هستند و سالانه در حدود ۱۰۰میلیون تُن کاروتنوئید تولید می‌کنند. تولید β- کاروتن از قارچ *بلیکسلیا تریسپورا* (*Blakeslea trispora*) و جلبک *دونالیلا سالینا* (*Dunaliella salina*) و نیز تولید آستاگزانتین از مخمر *فافیا رودوزیما* (*Phaffia rhodozyma*) و جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* (*Haematococcus pluvialis*) که در اروپا، ایالات متحده و اسرائیل انجام می‌شود، نمونه‌هایی از تولید میکروبی کاروتنوئیدها هستند[5].
باکتری‌های نمک‌دوست یکی از گزینه‌های مناسب تولید میکروبی کاروتنوئیدها هستند[6]. داشتن خواص ویژه مانند نیازمندی‌های غذایی ساده، کاهش احتمال آلودگی محیط کشت در غلظت‌های نمکی بالا، آسان‌تربودن فرآیند استخراج رنگدانه‌ها در حضور نمک بالا، غیربیماری‌زابودن این باکتری‌ها و گسترش فراوان در اکوسیستم‌های شور اعم از محیط‌های شور آبی و خشکی، موجب اهمیت صنعتی این میکروارگانیزم‌ها شده است[3].
با توجه به پتانسیل طبیعت ایران و پراکندگی فراوان اکوسیستم‌های شور و پرشور در آن، هدف مطالعه حاضر مقایسه تولید رنگدانه کاروتنوئیدی توسط جدایه‌های پروکاریوتی اکوسیستم‌های شور ایران و شناسایی جدایه برتر بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، مناطق نمونه‌برداری در سواحل جنوب غربی ایران شامل خورهای بندر ماهشهر (خورهای موسی، جعفری و زنگی) و حوضچه‌های استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام‌خمینی بودند. نمونه‌های آب، خاک، شورابه و رسوبات در ظروف شیشه‌ای دربسته جمع‌آوری و تحت شرایط ثابت به آزمایشگاه منتقل شدند. دمای نمونه‌ها در محل و pH آنها در آزمایشگاه اندازه‌گیری و pH نمونه‌های خاک با تهیه سوسپانسیون در آب‌مقطر تعیین شد. نمونه‌ها در محل به محیط‌های مایع استریل تلقیح و طی ۱۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند.
برای جداسازی میکروارگانیزم‌های نمک‌دوست از محیط مایع مغذی با ترکیب ذکرشده با ۱۰% نمک دریا و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۳ استفاده شد (گرم بر لیتر): ۸۱گرم بر لیتر سدیم‌کلرید، ۹/۷گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۷گرم بر لیتر $MgCl_2.6H_2O$، ۳/۶گرم بر

Archive of SID
www.SID.ir

لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۲گرم بر لیتر پتاسیم‌کلرید، ۰/۰۶گرم بر لیتر $NaHCO_3$، ۰/۰۲۶گرم بر لیتر سدیم بروماید، ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب‌مقطر.
برای محیط‌های جامد از محیط با ترکیب نمکی فوق همراه با آگار مغذی و در صورت لزوم از ترکیب ۲۰% نمک دریا استفاده شد.
برای نگهداری میکروارگانیزم‌ها، محیط پیچیده با ترکیب ذکرشده در ادامه و pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ استفاده شد (گرم بر لیتر): ۵گرم بر لیتر پپتون کازئین، ۳گرم بر لیتر عصاره مخمر، یک‌گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰گرم بر لیتر آگار، ۱۶۲گرم بر لیتر سدیم‌کلرید، ۱۹/۴گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۱۴گرم بر لیتر $MgCl_2.2H_2O$، ۷/۲گرم بر لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۴گرم بر لیتر پتاسیم‌کلرید، ۰/۱۲گرم بر لیتر $NaHCO_3$، ۰/۰۵۲گرم بر لیتر سدیم بروماید، ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب‌مقطر.
برای جداسازی حداکثر تعداد باکتری‌های نمک‌دوست رنگدانه‌دار اعم از نمک‌دوست نسبی و اجباری، حدود ۱۰گرم از نمونه‌های خاک و ۱۰میلی‌لیتر از نمونه‌های مایع به محیط مایع مغذی حاوی ۱۰% و ۲۰% نمک تام تلقیح شد. فلاسک‌ها به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. سپس از هر فلاسک با استفاده از آب‌نمک ۱۰% استریل تا رقت 10^{-4}، سری رقت تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰میکرولیتر به سطح پلیت محیط کشت مغذی جامد، حاوی درصد نمکی مناسب تلقیح و سوسپانسیون سلولی با میله شیشه‌ای کاملاً پخش شد. پلیت‌های حاوی ۱۰% نمک تام در دمای ۳۰°C و پلیت‌های حاوی ۲۰% نمک تام در دمای ۳۷°C به‌مدت ۱۴ روز گرماگذاری شدند. کلنی‌های زرد، نارنجی، قرمز و صورتی برای خالص‌سازی انتخاب شدند.

افتراق باکتری‌های نمک‌دوست از باکتری‌های تحمل‌کننده نمک: برای افتراق باکتری‌های تحمل‌کننده نمک از باکتری‌های نمک‌دوست نسبی و مطلق از محیط کشت فاقد نمک آگاردار استفاده شد. سویه‌های دارای رشد، احتمالاً تحمل‌کننده نمک و سویه‌های فاقد رشد در این محیط، نمک‌دوست در نظر گرفته شدند. در مورد سویه‌هایی که در محیط فاقد نمک رشد کردند، رشد بهینه در حضور غلظت‌های سدیم‌کلرید (صفر، ۲/۵ و ۵%) بررسی شد. اگر بهینه رشد سویه، سدیم‌کلرید زیر ۳% بود، تحمل‌کننده نمک و در غیر این صورت نمک‌دوست معرفی می‌شد.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک: خصوصیات ریخت‌شناسی کلنی‌ها روی محیط آگار مغذی حاوی ۱۵% نمک تام بعد از ۷ روز گرماگذاری در دمای ۳۷°C مشاهده شد. رنگ‌آمیزی براساس روش Dussault صورت گرفت[7]. شکل میکروسکوپی با استفاده از عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی، فعالیت کاتالازی به‌وسیله تولید حباب در محلول ۳% هیدروژن‌پراکسید و آزمون اکسیداز با استفاده از دیسک‌های اکسیداز انجام شد. احیای نیترات در محیط ایندول نیترات مدیوم آگار (INM) و مصرف سیترات به‌عنوان منبع کربن در محیط سیمون سیترات آگار (SIM) بررسی شد. آزمون آنتی‌بیوگرام با تلقیح سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵مک‌فارلند در پلیت‌های مولر هینتون آگار و با به‌کارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیک صورت گرفت. لازم به ذکر است تمام این آزمایش‌ها در محیط‌های حاوی ۱۵% نمک تام انجام و در هر آزمایش کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شد. برای بررسی بهینه نمک و محدوده رشد جدایه‌های خالص‌شده، از محیط مایع با غلظت‌های سدیم‌کلرید صفر، ۵، ۱۰، ۱۲، ۲۰، ۲۵ و ۳۰% استفاده شد. پس از بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی کلنی‌ها، ویژگی‌های میکروسکوپی سلول‌ها و صفات بیوشیمیایی، جدایه‌های مشابه حذف و سایر جدایه‌ها برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

مقایسه وزن خشک زیست‌توده جدایه‌ها: برای آماده‌سازی نمونه‌ها از محیط کشت مایع مغذی حاوی ۲۰% نمک تام استفاده شد. در تمامی مراحل یک نمونه حاوی محیط کشت استریل به‌همراه ۵سی‌سی آب‌نمک ۲۰% استریل به‌عنوان شاهد و به‌منظور مقایسه میزان کل کاروتنوئید تولیدشده توسط جدایه‌ها، وزن خشک هر جدایه محاسبه شد. برای این امر ۵۰سی‌سی از محیط کشت آماده‌شده به سل‌های سانتریفیوژ منتقل و با دور ۸۰۰۰g به‌مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی دو بار و هر بار با ۵سی‌سی آب‌نمک ۱۰% شسته شد تا مولکول‌های اضافی و بقایای محیط کشت زدوده شود. رسوب سلولی به‌دست‌آمده در ۵سی‌سی آب‌نمک ۱۰% حل و سوسپانسیون حاصله به شیشه ساعت‌های ازقبل‌توزین‌شده، منتقل شدند. برای خشک‌شدن کامل نمونه‌ها به‌مدت ۲ تا ۴ ساعت در فور با دمای ۶۵°C قرار گرفتند[8]. وزن شیشه ساعت حاوی زیست‌توده خشک باکتری اندازه‌گیری و وزن خشک هر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{وزن خشک شاهد (g)} = \text{وزن شیشه ساعت نمونه شاهد (g)} - \text{وزن شیشه ساعت (g)}$$

$$\text{وزن خشک نمونه (g)} = \text{وزن شیشه ساعت دارای نمونه (g)} - \text{وزن شیشه ساعت (g)} - \text{وزن خشک شاهد (g)}$$

استخراج و مقایسه رنگدانه‌های جدایه‌ها: ابتدا آماده‌سازی نمونه‌ها مطابق مرحله قبل انجام گرفت. پس از طی دوره گرماگذاری، ۵۰میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها در محیط کشت مایع، در ۸۰۰۰g به‌مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی و استخراج رنگدانه‌ها از رسوب سلولی براساس روش *اورن* و همکاران انجام شد[9]. برای این منظور، حلال‌های متانول و استون سرد (۱:۱۷/۷) به رسوب سلولی اضافه شدند. پس از مخلوط‌کردن کامل رسوب با حلال، یک ساعت در دمای یخچال نگهداری شد تا استخراج رنگدانه‌ها کامل شود. سپس مخلوط سانتریفیوژ و عصاره رویی جمع‌آوری شد. چنانچه رسوب سلولی رنگدانه داشت تا به‌دست‌آوردن رسوب کاملاً بی‌رنگ یا کم‌رنگ عمل فوق تکرار شد.
عصاره استونی مربوط به هر نمونه به قیف جداگر منتقل و با اضافه‌کردن اتر نفت (هم‌حجم فاز استونی) رنگدانه‌ها به فاز اتری منتقل شدند. در این مرحله برای جداشدن کامل دو فاز از آب‌نمک اشباع استفاده شد. با جداکردن فاز قطبی پایینی (فاز استونی) فاز اتری حاوی رنگدانه‌ها جمع‌آوری شد. در صورت رنگی‌بودن فاز استونی، تکرار استخراج با اتر نفت صورت گرفت تا رنگدانه‌ها کاملاً به فاز اتری منتقل شوند. برای جداشدن مولکول‌های آب اضافی، عصاره اتری سه بار با آب‌مقطر شسته شد و پس از شست‌وشو با سولفات‌سدیم بدون آب کاملاً آبگیری شد. هر نمونه با استفاده از پمپ خلا و حمام بخار آب (در دمای زیر ۴۰°C) تغلیظ شد به‌نحوی که یک میلی‌لیتر عصاره در ارلن تخلیه باقی ماند. عصاره حاصل در ۱۰میلی‌لیتر اتر نفت حل شد تا حجم حلال تمام نمونه‌ها یکسان باشد.
استخراج رنگدانه‌های جدایه‌های زرد به روش DMSO (دی‌متیل سولفوکساید)[10] و با کمی تغییرات انجام شد. آماده‌سازی نمونه‌ها مطابق مراحل قبل انجام گرفت.
۵۰میلی‌لیتر از محیط کشت با دور ۸۰۰۰g به‌مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ شده، سپس مایع رویی دور ریخته و رسوب سلولی به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰°C- فریز شد. به رسوب فریزشده ۵میلی‌لیتر DMSO اضافه و با ذرات سیلیسی کاملاً مخلوط شد.

www.SID.ir
Archive of SID

مخلوط حاصله به‌مدت یک شب، در دمای اتاق و در محل تاریک گرماگذاری قرار گرفت. پس از طی این مدت مخلوط سانتریفیوژ و فاز DMSO رنگی جدا و جمع‌آوری شد و رسوب در ۵میلی‌لیتر استون حل و پس از سانتریفیوژ، فاز استونی رنگی جمع‌آوری شد. عمل عصاره‌گیری با استون دو بار تکرار شد. چنانچه رسوب همچنان رنگی بود، ۵میلی‌لیتر DMSO به رسوب اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق در محل تاریک گرماگذاری قرار گرفت و دوباره عصاره‌گیری با استون تکرار شد. عصاره‌های رنگی به قیف جداگر انتقال یافت و با اتر نفت (هم‌حجم فاز قطبی) استخراج شد. برای جداشدن دو فاز قطبی (پایینی) و فاز غیرقطبی رنگی (بالایی) از آب‌نمک اشباع استفاده شد. در صورت رنگی‌بودن فاز استونی، عصاره‌گیری با اتر نفت تکرار شد. عمل آبگیری، تغلیظ و یکسان‌سازی حجم نمونه‌ها طبق مرحله قبل صورت گرفت.

طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش عصاره‌ها: طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش نمونه‌ها با دستگاه طیف‌سنج نوری مدل 6505 UV (Jenway؛ انگلستان) ثبت شد. ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق قرار گرفتند تا با محیط هم‌دما شوند. دستگاه با اتر نفت در محدوده ۲۰۰ تا ۶۰۰نانومتر صفر و طیف جذبی نمونه شاهد در مقابل بلانک اتر نفت خوانده شد. سپس نمونه شاهد به‌عنوان بلانک دستگاه تعریف و طیف جذبی هر نمونه ثبت شد. در صورت بالابودن جذب عصاره‌ها (چگالی نوری بیشتر از ۱/۵) رقیق‌سازی با اتر نفت صورت گرفت و میزان جذب در عکس ضریب رقت ضرب شد.

محاسبه میزان کل کاروتنوئید: میزان کل کاروتنوئید هر جدایه طبق فرمول زیر محاسبه شد[11]:

$$\text{Total Carotenoid content } (\mu g/g) = \frac{A \times \text{volume(mL)} \times 10^4}{A_{1cm}^{1\%} \times \text{sample weight(g)}}$$

A: جذب در طول موج ۴۵۰نانومتر برای جدایه‌های زرد و ۴۹۳نانومتر برای سایر جدایه‌ها؛ Volume: حجم کل حلال مصرفی و $A_{1cm}^{1\%}$ ضریب جذب کاروتنوئید در حلال مصرفی است.

رسم منحنی رشد و تولید رنگدانه سویه منتخب: برای رسم منحنی رشد و تولید رنگدانه، از محیط مایع مغذی با ترکیب ۲۰% نمک دریا و pH برابر ۷ استفاده شد. به ۸ فلاسک ۱۵۰میلی‌لیتری، ۳۰میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه شد. هر ارلن برای یک دوره زمانی در نظر گرفته شد (روزهای صفر تا هشت). ۵۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با کدورت معادل ۰/۵مک‌فارلند (چگالی نوری برابر با ۰/۲) به هر ارلن تلقیح شد. ارلن‌ها در دمای ۳۷°C با ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. در هر دوره زمانی ابتدا رشد باکتری براساس روش کدورت‌سنجی با دستگاه طیف‌سنج نوری در طول موج ۶۲۰نانومتر خوانده شد. سپس محتویات ارلن مربوطه سانتریفوژ و استخراج رنگدانه‌ها براساس روش ذکرشده انجام شد. این روند تا روز هشتم ادامه یافت[3].

کروماتوگرافی لایه نازک: ابتدا عصاره‌ها با پمپ خلا و حمام بخار آب (در دمای زیر ۴۰°C) و شرایط تاریکی کاملاً تغلیظ شدند. کاغذهای کروماتوگرافی لایه نازک به ابعاد (۱۵ در ۵سانتی‌متر) برای آنالیز استفاده شد. خط مبدا در فاصله یک‌سانتی‌متری لبه پایینی کاغذ رسم شد. از نمونه‌ها توسط یک لوله موئین که نوک آن توسط شعله تیز شده بود روی خط مبدا نقطه‌گذاری شد. پس از خشک‌شدن کامل لکه، بلافاصله کاغذ درون تانک حاوی حلال n-هگزان:استون قرار داده شد. ابتدا نسبت‌های n-هگزان:استون ۱ به ۱، ۱ به ۲، ۱ به ۳ و ۱ به ۴ آزمایش و در نهایت حلال n-هگزان:استون به نسبت ۱ به ۲ و ۱ به ۳ انتخاب شدند. زمانی که فاز متحرک تا یک‌سانتی‌متری لبه بالایی کاغذ رسید کاغذ از تانک خارج و بلافاصله حدود لکه‌ها و لکه اصلی (لکه‌ای که بیشترین غلظت را داشت) توسط مداد مشخص شد.

خالص‌سازی رنگدانه اصلی سویه‌های منتخب به روش کروماتوگرافی کاغذی: به‌منظور خالص‌سازی رنگدانه اصلی سویه منتخب، روش استفاده از کاغذهای کروماتوگرافی انتخاب شد. برای این منظور عصاره اتری تغلیظ‌شده با پیپت پاستور به‌صورت یک نوار باریک غلیظ روی خط مبدا کاغذ رسم‌شده در فاصله ۲سانتی‌متری لبه پایینی پلیت، گسترانیده شد و کاغذ ۲۰ در ۲۰سانتی‌متر داخل تانک حاوی n-هگزان:استون (۳:۱) قرار گرفت. پس از حرکت فاز متحرک تا نزدیکی لبه بالایی کاغذ، کاغذ از تانک خارج و بلافاصله باند ۱ (از پایین به بالای کاغذ) که ضخامت و غلظت بیشتری نسبت به سایر باندها داشت، با یک تیغ جراحی تیز تراشیده و در لوله فالکن با درب پیچ‌دار جمع‌آوری شد. با اضافه‌کردن ۲میلی‌لیتر استون، رنگدانه‌ها از سیلیکا ژل جدا و وارد فاز استونی شدند. پس از سانتریفوژ، رنگدانه فاز استونی توسط ۲میلی‌لیتر اتر نفت استخراج شد. برای حذف ناخالصی از رنگدانه اصلی، برای عصاره اتری به‌دست‌آمده کروماتوگرافی کاغذی با حلال n-هگزان:استون (۲:۱) نیز انجام شد و باند ۱ حاصله تراشیده و با استفاده از استون رنگدانه از سیلیکاژل جدا شد[11].

شناسایی رنگدانه‌های اصلی: برای شناسایی رنگدانه اصلی در سویه‌های منتخب از عصاره استونی فوق برای طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه استفاده شد.

طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش عصاره استونی: از عصاره استونی به‌دست‌آمده در مرحله قبل، طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش گرفته شد. برای این امر ابتدا دستگاه با استون در ناحیه ۲۰۰ تا ۷۰۰نانومتر صفر، سپس طیف جذبی عصاره استونی فوق در مقابل شاهد خوانده شد[11].

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای رنگدانه اصلی سویه منتخب: برای اطمینان از خلوص عصاره استونی، این روش به‌صورت تحلیلی و توسط دستگاه دارای آشکارساز مرئی مدل k2501 (Knauer؛ آلمان) در نور فرابنفش در شرایط خاص (فاز متحرک متانول: آب (۸۰:۲۰)، سرعت فاز متحرک 1ml/1min، در طول موج ۴۹۰نانومتر، دمای۲۵°C) انجام شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل نور فوریه رنگدانه اصلی سویه منتخب: این طیف برای نمونه با استفاده از پتاسیم‌بروماید و توسط دستگاه مدل WQF-510 (Rayleigh؛ چین) با Scan rate 25 رسم شد[4].

شناسایی مولکولی جدایه برتر M24: استخراج DNA به‌وسیله کیت صورت گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای عمومی 21F با ترادف 5′-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3′ و 1492R با ترادف 5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′ برای تعیین توالی ژن 16S rRNA (با اندازه حدود ۱۵۲۰ جفت باز) انجام و پس از تخلیص فرآورده برای تعیین توالی از طریق شرکت تکاپوزیست به کره جنوبی ارسال شد.

رسم درخت فیلوژنی برای سویه M24: بعد از توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه M24 توالی این سویه با توالی‌های مناسب با نرم‌افزار Clustal 2x هم‌ردیف‌سازی و سپس به‌وسیله نرم‌افزار Mega 5 درخت فیلوژنی با روش اتصال- همسایگی با ضریب بوت استرپ ۱۰۰ رسم شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱) خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناطق نمونه‌برداری در حوزه بندر ماهشهر

موقعیت ایستگاه	عمق (متر)	pH	شوری (PPT)	EC (µs/cm)	T.D.S (mg/lit)	کدورت (NTU)	دمای آب (C°)
S1	۳/۳۰	۷/۷۱	۱۳۰	۱۶۹۰۰۰	۱۲۸۰۰۰	۴۱	۲۲
S2	۱/۳	۷/۸۱	۷۵	۹۹۰۰۰	۷۳۰۰۰	۲۳	۲۱
S3	۲/۴	۸/۲	۱۷	۲۵۶۰۰	۱۶۰۰۰	۱۹/۸	۲۲
S4	۸/۲۰	۷/۶۴	۵۹	۸۰۲۰۰	۵۸۰۰۰	۷	۲۰
S5	۲/۸	۷/۶	۲۰۰	۲۴۹۰۰۰	۱۶۵۰۰۰	۷	۲۰

*موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها: S1 (خور جعفری غربی)، S2 (خور جعفری شرقی)، S3 (خور زنگی شرقی)، S4 (خور موسی)، S5 (حوضچه‌های استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام خمینی)

جدول ۲) نتایج خوانش طیف جذب مرئی در نور فرابنفش عصاره اتری جدایه‌ها به تفکیک ایستگاه‌های نمونه‌برداری

طول موج (نانومتر)	جدایه‌های دارای جذب در ایستگاه ۱	جدایه‌های دارای جذب در ایستگاه ۲	جدایه‌های دارای جذب در ایستگاه ۳	جدایه‌های دارای جذب در ایستگاه ۴	جدایه‌های دارای جذب در ایستگاه ۵
۴۵۰	–	–	M7	–	M6
۴۶۰	–	M8	–	–	–
۴۶۵	M1	–	–	–	–
۴۷۰	–	–	–	M52-M54	–
۴۷۲	–	–	–	–	M22
۴۷۴	–	–	–	–	M21-M37
۴۸۰	M39	–	M36	–	–
۴۸۴	M29	–	–	–	–
۴۸۶	–	–	–	M15	–
۴۹۰	–	M23-M24-M26-M44-M9	–	M35	–
۴۹۱	–	–	–	–	M40-M43
۴۹۲	M31,M32	M20	M19-M33	–	–
۴۹۳	M14	–	–	M25-M28-M30	M10-M11-M12-M18-M16-M27-M34-M38-M45

یافته‌ها

موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌ها به‌ترتیب S1 (خور جعفری غربی)، S2 (خور جعفری شرقی)، S3 (خور زنگی شرقی)، S4 (خور موسی) و S5 (حوضچه‌های استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام‌خمینی) بود (جدول ۱).

رنگ قرمز- نارنجی در اکثر فلاسک‌ها نمایان شد که حاکی از وجود میکروارگانیزم‌های نمک‌دوست تولیدکننده رنگدانه بود. در فلاسک‌های حاوی محیط مایع مغذی با ۲۰% نمک تام پس از ۵ روز گرماگذاری رنگ نارنجی شفاف نمایان شد. اما در فلاسک‌های حاوی ۱۰% نمک تام از روز ۱۰، رنگ برخی فلاسک‌ها به نارنجی کم‌رنگ متمایل شد.

از نمونه‌های منطقه خوریات ماهشهر و حوضچه‌های استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام‌خمینی ۴۳ جدایه نمک‌دوست تولیدکننده رنگدانه جدا شد. پس از غربالگری اولیه براساس ریخت‌شناسی و رشد در محیط‌های شور، ۸ جدایه تحمل‌کننده نمک و ۸ جدایه نمک‌دوست نسبی و ۲۷ جدایه نمک‌دوست اجباری برای مطالعات سایر صفات انتخاب شدند.

جذب در ناحیه نور مرئی ۳۵۰ تا ۵۵۰نانومتر حاکی از وجود ترکیبات رنگی در عصاره‌ها بود. همچنین طیف جذبی با سه باند حداکثر، از ویژگی‌های کاروتنوئیدها بود که وجود ترکیبات کاروتنوئیدی را در عصاره‌ها تایید کرد (جدول ۲). سایر جدایه‌ها جذب معنی‌داری در مقایسه با سایرین در محیط مایع نشان ندادند، بنابراین از ذکر حداکثر جذب آنها صرف‌نظر شد.

در ایستگاه S1 بندر ماهشهر بیشترین میزان کاروتنوئید در جدایه M31 به میزان ۵۵۱/۴۸میکروگرم بر گرم مشاهده شد. همچنین در میان جدایه‌های نارنجی- قرمز جداشده در این ایستگاه جدایه M33 با تولید ۵۰۰/۴۹میکروگرم بر گرم بیشترین تولید را دارا بود (جدول ۳).

عصاره‌های اتری جدایه‌هایی که بیشترین تولید را دارا بودند برای کروماتوگرافی لایه نازک انتخاب شدند. در تمامی کروماتوگرام‌ها سه لکه ظاهر شد و در تمامی آنها (به‌جز جدایه M35) لکه‌ای که کمترین فاز تاخیری (RF) را داشت، دارای بیشترین غلظت نیز بود اما در جدایه M35 لکه‌ای با بیشترین RF غلظت بیشتری نیز داشت.

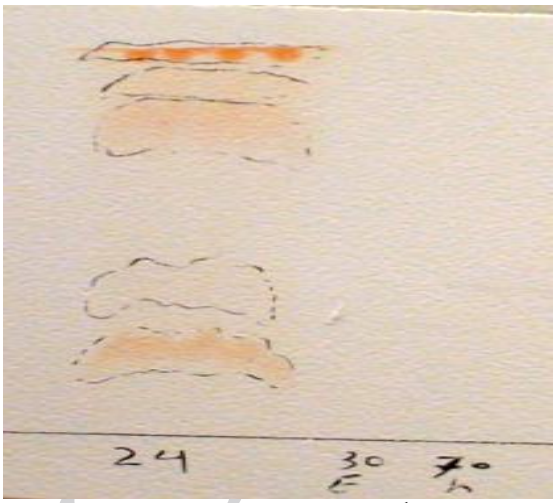
جدول ۳) میزان کاروتنوئید تولیدی توسط جدایه‌های برتر در هر ایستگاه نمونه‌برداری

جدایه	میزان کل کاروتنوئید (میکروگرم بر گرم)	محل جداسازی
M31	۵۵۱/۴۸	خور جعفری غربی- ماهشهر (S1)
M24	۲۰۵۴/۰۵	خور جعفری شرقی- ماهشهر (S2)
M15	۵۴۰/۶۸	خور زنگی شرقی- ماهشهر (S3)
M54	۵۸۸/۹	خور موسی- ماهشهر (S4)
M21	۱۰۵۹/۴۴	حوضچه استحصال نمک- ماهشهر(S5)

با توجه به کروماتوگرام‌های حاصل از مرحله قبل و شباهت RF لکه‌های رنگی عصاره‌های جدایه‌های A15، A3، M35، M31، M24، M21 و M15 از میان جدایه‌های به‌دست‌آمده از بندر ماهشهر در مرحله اول انتخاب شدند و از میان این جدایه‌ها جدایه M24 به‌دلیل تولید بالای کاروتنوئید و جدایه M35 به‌دلیل تمایز در رفتار لکه‌های رنگی نسبت به سایر عصاره‌ها برای مراحل بعدی انتخاب شدند. در جدایه M35 حداقل ۸ ترکیب کاروتنوئیدی تولید شد که این امر بر اهمیت بیوتکنولوژیک این جدایه افزود. اما به‌دلیل نزدیکی باندهای تشکیل‌شده که امر خالص‌سازی را با مشکل روبه‌رو می‌ساخت از ادامه کار روی این جدایه صرف نظر شد.

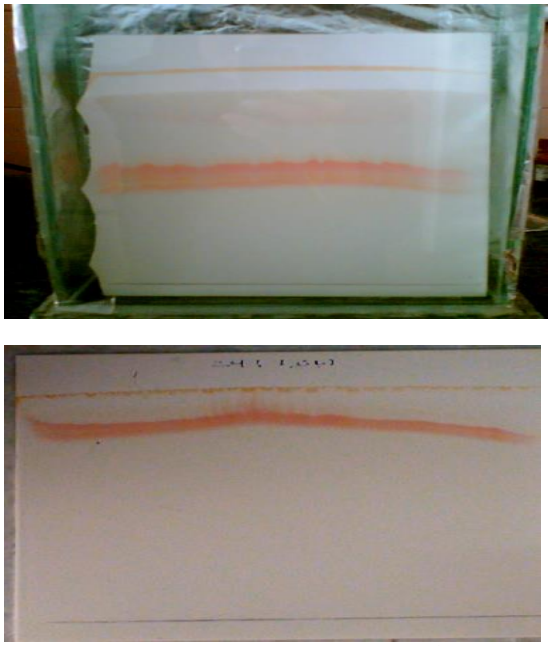
www.SID.ir

از عصاره اتری حاصل از جدایه M24، کروماتوگرافی لایه نازک با حلال استون: n-هگزان (۱:۳ v/v) به عمل آمد. در این مرحله ۶ باند رنگی در کروماتوگرام ظاهر شد که از پایین به بالا شامل باندهای نارنجی پررنگ (باند ۱)، صورتی پررنگ (باند ۲)، نارنجی کم‌رنگ (باند ۳)، صورتی کم‌رنگ (باند ۴)، زرد کم‌رنگ (باند ۵) و زرد پررنگ (باند ۶) بود. در این مرحله باند ۱ تراشیده و برای خالص‌سازی انتخاب شد (شکل ۱).



شکل ۱) کروماتوگرافی مرحله اول جداسازی باند جدایه اتری M24

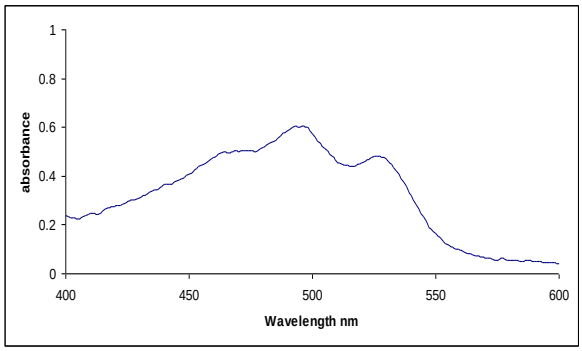
سپس از باند ۱ مرحله اول، کروماتوگرافی لایه نازک با همان حلال مرحله قبل انجام شد. در این مرحله باندهای ۶، ۳، ۲ و ۱ مرحله اول ظاهر شدند. بنابراین در این مرحله باندهای ۴ و ۵ حذف شده، باند ۱ تراشیده و برای مرحله سوم آماده شد (شکل ۲).



شکل ۲) کروماتوگرافی مرحله دوم جداسازی باندهای جدایه M24، تصویر کاغذ موجود در تانک کروماتوگرافی (بالا) و تصویر باندهای نهایی (پایین)

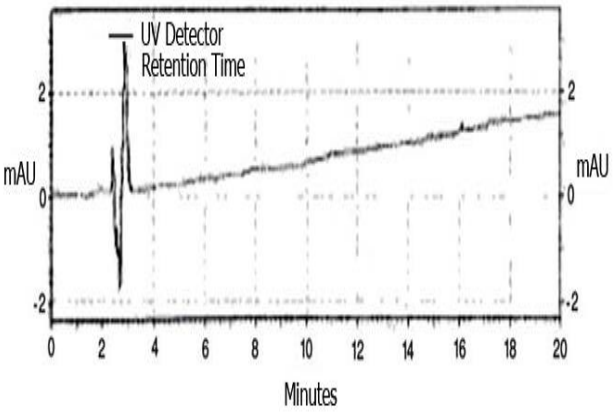
سپس کروماتوگرافی باند ۱ با حلال استون n-هگزان (۱:۲ v/v) انجام گرفت. در این مرحله تنها باند ۱ و ۶ مرحله اول ظاهر شدند. باند ۱ تراشیده شد و برای آنالیزهای شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

طیف جذب مرئی در نور فرابنفش باندهای ۱ عصاره‌های M24 در محدوده ۲۰۰ تا ۶۰۰نانومتر ثبت شد. هر دو طیف در نزدیکی ۴۹۳نانومتر بیشترین جذب را نشان دادند. همچنین دو شانه کوچک یکی در ۵۳۰نانومتر و دیگری در ۴۶۲نانومتر مشاهده شد. طیف جذبی، λ_{max} و شانه‌های پیک در ۵۳۰ و ۴۶۲نانومتر احتمالاً باند ۱ کاروتنوئید باکتریوروبرین یا مشتقات آن را نشان داد (نمودار ۱).

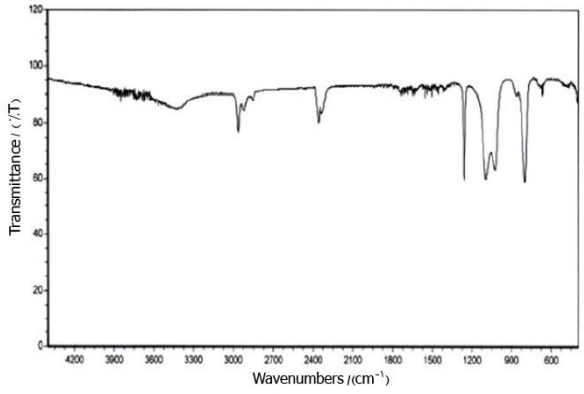


نمودار ۱) طیف جذب مرئی در نور باند ۱ عصاره جدایه M24

وجود رنگدانه باکتریوروبرین در جدایه M24 تایید شد (نمودارهای ۲ و ۳).



نمودار ۲) کروماتوگرام HPLC با آشکارساز مرئی در نور فرابنفش باند ۱ عصاره رنگی جدایه M24



نمودار ۳) طیف FTIR باند ۱ عصاره جدایه M24

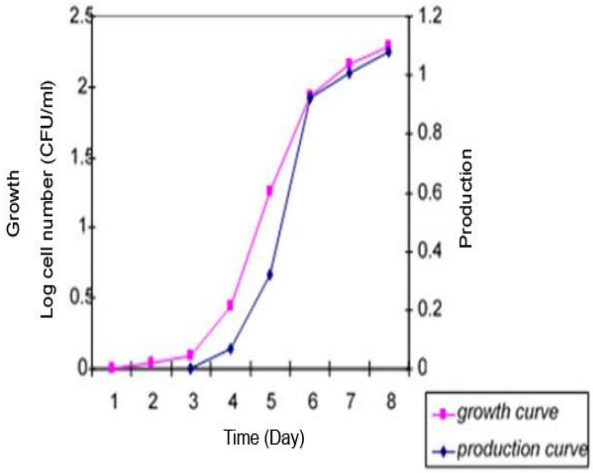
رنگدانه‌های کاروتنوئیدی یک متابولیت اولیه سلولی در جدایه M24 بود (نمودار ۴).

www.SID.ir

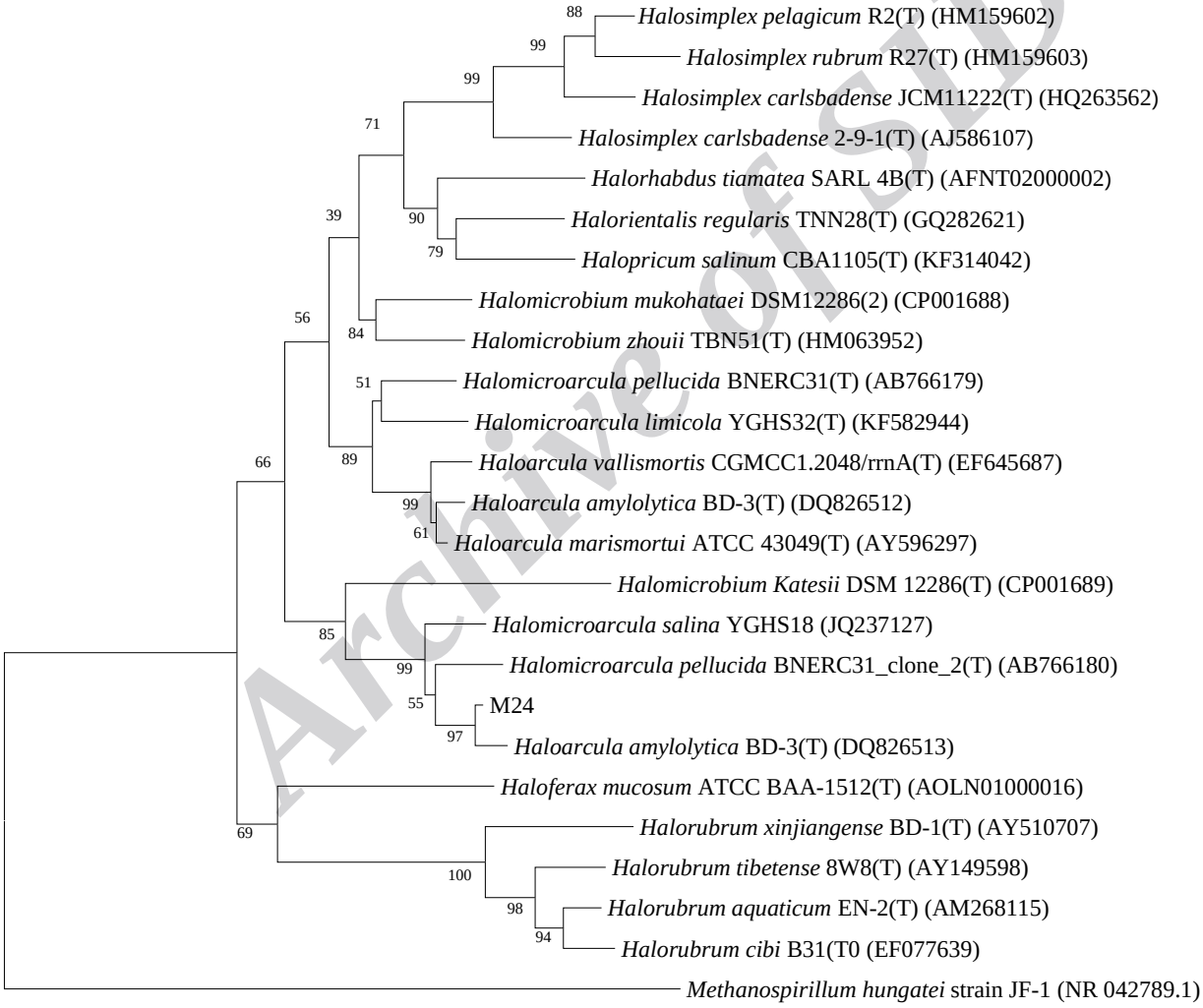
جدول ۴) نتایج صفات فنوتیپیک سویه برتر (M24)

خصوصیات مورفولوژیک کلنی	نارنجی، نرم، محدب، قطر ۳میلی‌متر، کناره صاف
آرایش میکروسکوپی	کوکسی زنجیره‌ای
واکنش گرم	+
کاتالاز	+
اکسیداز	+
محدوده رشد نمک (%)	۸ تا ۳۰
بهینه نمک رشد (%)	۱۲
سیمون سیترات	–
احیای نیترات	+
حساسیت به ریفامپسین ۵میلی‌گرم	مقاوم

سویه M24 قرابت بالایی در حدود ۹۸% با تاکسون استاندارد *هالوآرکولا آمیلولیتیکا* (*Haloarcula amylolytica* BD- BD-3 (3 داشت (جدول ۴؛ شکل ۳) و در بانک ژنی تحت شماره KJ499812 ثبت شد.



نمودار ۴) منحنی رشد و تولید رنگدانه در جدایه M24



شکل ۳) درخت فیلوژنی سویه M24، درخت با روش NJ با ضریب بوت استرپ ۱۰۰ رسم شد که سویه استاندارد Methanospirillum hungatei strain JF-1 به عنوان بیرون گروه انتخاب شد.

بحث

با توجه به پتانسیل طبیعت ایران و پراکندگی فراوان اکوسیستم‌های شور و پرشور در آن مطالعه حاضر با هدف مقایسه تولید رنگدانه کاروتنوئیدی توسط جدایه‌های پروکاریوتی اکوسیستم‌های شور ایران و شناسایی جدایه برتر انجام شد. اکوسیستم‌های شور در اکثر نقاط دنیا به‌ویژه مناطق نیمه‌استوایی

Archive of SID
www.SID.ir

با آب‌وهوای گرم و بارندگی اندک، به‌وفور وجود دارند. از نظر بیولوژیک محیط‌های شور به دو گروه آبی و خاکی تقسیم می‌شوند. محیط‌های آبی با بیش از ۰/۳% شوری جزء آب‌های شور هستند.

محیط‌های آبی پرشور براساس ترکیب یونی به دو گروه تالازوهالین و آتالازوهالین دسته‌بندی می‌شوند. محیط‌های تالازوهالین منشا دریایی دارند و ترکیب یونی آنها مشابه آب دریا است. محیط‌های آتالازوهالین در فاصله دور از دریا قرار گرفته‌اند و ترکیب یونی آنها از آب دریا متفاوت است. کاتیون‌های دوظرفیتی مانند Mg^{2+} و Ca^{2+} یون‌های اصلی این اکوسیستم‌ها هستند[12]. در اغلب محیط‌های پرشور رنگ صورتی مایل به قرمز در سطح شورابه‌ها دیده می‌شود که ناشی از وجود میکروارگانیزم‌های تولیدکننده کاروتنوئیدها است[13]. این امر موجب شده این محیط‌ها از نظر بیوتکنولوژی تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی مورد توجه باشند.

با توجه به موقعیت خاص جغرافیایی ایران و قرارگیری آن در منطقه نیمه‌خشک و فراوانی اکوسیستم‌های شور و پرشور در آن، اهمیت مطالعه این‌گونه محیط‌ها آشکار می‌شود. مناطق نمونه‌برداری در این تحقیق شامل سواحل جنوب غربی ایران (خوری‌های موسی، جعفری و زنگی) و حوضچه‌های استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام‌خمینی بود.

طبق نتایج مطالعه حاضر مناطق نمونه‌برداری در حوزه بندر ماهشهر نمونه‌ای از محیط‌های تالازوهالین بود. خورهای نمونه‌برداری‌شده در واقع پیش‌روی آب دریا در خشکی بودند که در ارتباط تنگاتنگ با آب خلیج فارس هستند و میزان شوری آنها بین ۱۷ppm در خور زنگی شرقی و ۱۳۰ppm در خور جعفری غربی به دست آمد. میزان pH این مناطق نیز بین ۷/۶۴ در خور موسی و ۸/۲ در خور زنگی شرقی متغیر بود. حوضچه‌های ۶ و ۵ استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام‌خمینی از دیگر مناطق نمونه‌برداری‌شده در حوزه بندر ماهشهر بود. این حوضچه‌ها که از آب خور موسی تغذیه می‌شوند برای تولید گاز کلر از نمک آفتابی حاصل از تغلیظ آب دریا (سدیم‌کلرید) استفاده می‌شوند. شوری حوضچه‌های اولیه مشابه خور موسی به دست آمد و بنابراین جمعیت میکروبی آن نیز مشابه جمعیت میکروبی خور موسی بود. نمونه‌برداری از حوضچه‌های ۶ و ۵ انجام شد. شوری این مناطق حدود ۲۰۰ppm و pH آن ۷/۶ اندازه‌گیری شد. سطح این حوضچه‌ها در اغلب فصول سال رنگ صورتی مایل به قرمز داشت که نشان‌دهنده وجود میکروارگانیزم‌های تولیدکننده رنگدانه بود.

در جداسازی اولیه از مناطق نمونه‌برداری در حوزه بندر ماهشهر ۶۱ جدایه نمک‌دوست تولیدکننده رنگدانه جدا شد. بیشترین تعداد جدایه‌ها متعلق به ایستگاه S_5 (۲۸جدایه) و کمترین تعداد متعلق به ایستگاه S_3 (۹جدایه) بود. با درنظرگرفتن میزان شوری این ایستگاه‌ها و اینکه اکثر باکتری‌های نمک‌دوست تولیدکننده پیگمان متعلق به باکتری‌های نمک‌دوست اجباری بودند، این نتیجه قابل تفسیر است. از ۴۵ جدایه انتخاب‌شده براساس ویژگی‌های کلنی، شکل میکروسکوپی و خصوصیات بیوشیمیایی، ۲۳ جدایه نارنجی، ۸ جدایه صورتی، ۶ جدایه زرد و ۴ جدایه قرمزرنگ بود.

در سال ۱۹۷۹ میلادی *والرا* و همکاران طی جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست اجباری از سواحل مدیترانه در جنوب شرقی اسپانیا موفق به جداسازی باکتری‌های رنگدانه‌دار شدند. در مطالعه آنها پلیت‌هایی که از نمونه‌های محیطی در آنها کشت داده شده بود به‌مدت ۷ روز گرماگذاری شد و تنها کلنی‌های غیررنگدانه‌دار رشد کردند. افزایش مدت گرماگذاری تا ۲۰ روز موجب بروز کلنی‌های صورتی- قرمز شد که همگی کوکسی گرم‌منفی بودند[14].

آسکر و همکاران مطالعه‌ای روی جمعیت باکتریایی حوضچه‌های استحصال نمک دریا در ال- ملاهات در اسکندریه مصر انجام دادند، در مطالعه آنها ۳۱ باکتری نمک‌دوست اجباری تولیدکننده کاروتنوئید جدا شد که متعلق به خانواده *هالوباکتریاسه* (*Halobacteriacaea*) بودند. میزان کاروتنوئید تولیدشده در جدایه‌ها بررسی شد و جدایه TM که بعدها *هالوفراکس الکساندرینوس* (*Haloferax alexandrinus*) نام گرفت، بیشترین تولید را داشت و کانتاگزانتین، به‌عنوان کاروتنوئید اصلی شناسایی شد. علاوه بر این کاروتنوئید، بتاکاروتن، ۳- هیدروکسی‌اچینیون و باکتریوروبرین نیز در این باکتری شناسایی شدند[15].

طی مطالعه *بیربیر* و همکاران روی دریاچه نمک Sereflikochisar در مرکز ترکیه، ۳۱ باکتری نمک‌دوست اجباری از این منطقه جدا شد که ۲ کلنی سفید، ۹ کلنی زرد و بقیه صورتی- قرمز بودند[16].

ازکان و همکاران، ۹۵ آرکیای نمک‌دوست اجباری از ۶ منطقه شور در ترکیه جدا کردند که همگی صورتی- قرمز بودند[17].

برخلاف باکتری‌های نمک‌دوست اجباری، تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در باکتری‌های نمک‌دوست نسبی کمتر بررسی شده است، به‌عنوان مثال باکتری *هالوباسیلوس هالوفیلوس* (*Halobacillus halophilus*) یک باکتری نمک‌دوست نسبی تولیدکننده کاروتنوئید است. کاروتنوئید این باکتری استر ۴-اویک‌اسید-۴ و ۴ دی اپونروسپورن شناسایی شده که مشابه استافیلوگزانتین است[18].

دوک و همکاران، ۶ باسیل اسپوردار نمک‌دوست نسبی را از مدفوع انسانی جدا کردند که به گونه‌های اسپوردار *باسیلوس ایندیکوس* (*Bacillus indicus*) بسیار شبیه بودند. کلنی‌های این باکتری در حالت رویشی زردرنگ و در فاز اسپوری به رنگ نارنجی هستند، این رنگدانه‌ها کاروتنوئیدی گزارش شده‌اند[19].

در سال ۲۰۱۴ کاروتنوئیدهای تولیدشده توسط آرکی نمک‌دوست *هالوآرکولا جاپونیکا* (*Haloarcula japonica*) استخراج و خصوصیات شیمیایی آن با روش اسپکتروسکوپیک شناسایی شد. ترکیب شامل ۶۸/۱مول‌درصد باکتریوروبرین، ۲۲/۵مول‌درصد مونوآنیدروباکتریوروبرین، ۹/۳مول‌درصد بیس‌آنیدروباکتریوروبرین و کمتر از ۰/۱مول‌درصد ایزوپنتنیل- دهیدروروبرین و مقادیر کمی از لیکوپن بود[20].

سوی و همکاران آرکی‌های نمک‌دوست موجود در حوضچه‌های استحصال نمک Hangu را بررسی کردند. از بین ۱۰ سویه، ۲ سویه برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد. بالاترین میزان تجمع رنگدانه در pH برابر ۸ بود. آنالیز در محدوده طیف مرئی، کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نشان داد که اصلی‌ترین پیگمان موجود در هر دو سویه پیگمان باکتریوروبرین است[21].

در مطالعه حاضر از ۴۵ جدایه غربال‌شده در ایستگاه‌های نمونه‌برداری بندر ماهشهر، ۱۵ جدایه در غلظت کمتر از ۲۰% سدیم‌کلرید بهینه رشد داشتند و ۳۰ جدایه در غلظت بالاتر یا برابر با ۲۰% سدیم‌کلرید بهینه رشد نشان دادند.

شکل طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش عصاره‌های رنگی جدایه‌ها و محدوده λ_{max} حاکی از ساختار کاروتنوئیدی رنگدانه‌ها است. جدایه‌هایی که در حدود طول موج ۴۹۳نانومتر حداکثر جذب را

Archive of SID
www.SID.ir

نشان دادند که احتمالاً حاوی کاروتنوئیدهای دارای ۱۳ باند دوگانه به‌عنوان کاروتنوئید اصلی بودند. جدایه‌های زردرنگ که در محدوده ۴۵۰نانومتر حداکثر جذب را نشان داده‌اند که احتمالاً مقادیر بالایی کاروتنوئیدهایی با ۱۱ باند دوگانه داشتند[2]. با توجه به شکل طیف جذب مرئی در نور فرابنفش به‌دست‌آمده می‌توان انتظار داشت که باند حاصله احتمالاً خالص و عدم وجود جذب قابل ملاحظه در محدوده نور فرابنفش نشان داد که کاروتنوئید خالص‌شده به شکل ایزومر فضایی ترانس بود.

از دیگر نتایج مطالعه حاضر، کروماتوگرافی لایه نازک، سه لکه رنگی را در تمام جدایه‌های فوق ظاهر کرد. جدایه‌های M15، M21، M24، M31 و M35 به‌ترتیب به‌علت تولید بالای کاروتنوئید و تنوع ترکیبات کاروتنوئیدی انتخاب شدند. این روش وجود ۵ ترکیب کاروتنوئیدی را در جدایه M24 و ۸ ترکیب کاروتنوئیدی را در جدایه M35 نشان داد. با توجه به فاصله بین باندهای رنگی در کروماتوگرام M24 این جدایه برای شناسایی بیشتر رنگدانه اصلی انتخاب شد. منحنی رشد و تولید کاروتنوئید برای جدایه M24 در یک دوره ۸ روزه با بازه زمانی ۱ روز رسم شد[3]. مدت فاز تاخیری سه روز به طول انجامید و تولید کاروتنوئید در روز سوم و همراه با شروع فاز لگاریتمی آغاز شد.

خالص‌سازی کاروتنوئید اصلی (باندی که غلظت بیشتری دارد) جدایه M24 به روش کروماتوگرافی کاغذی انجام شد و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا خلوص باند مورد نظر را اثبات کرد. طیف مرئی در نور فرابنفش باند خالص‌شده در ۴۹۵نانومتر حداکثر جذب را با دو شانه در ۵۳۰ و ۴۶۵نانومتر نشان داد که مشابه طیف مرئی در نور فرابنفش حاصل از آلفا- باکتریوروبرین بود.

پیشنهاد می‌شود برای مقایسه دقیق‌تر جدایه‌ها، شناسایی ساختار شیمیایی تمامی کاروتنوئیدهای جدایه‌های M35 و M24، شناسایی مولکولی سایر سویه‌ها و شناسایی ژن‌های مسئول بیوسنتز کاروتنوئید انجام شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به دردسترس‌نبودن رنگدانه خالص به‌عنوان استاندارد برای شناسایی دقیق ساختار اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

از اکوسیستم‌های شور ایران تعداد ۴۳ جدایه به دست آمد، هشت جدایه تحمل‌کننده نمک، هشت جدایه نمک‌دوست نسبی و ۲۷ جدایه نمک‌دوست اجباری هستند. همه سویه‌ها قادرند ترکیبات کاروتنوئیدی تولید کنند. جدایه M24، جدایه برتر است که ۹۸% با سویه *هالوآرکولا آمیلولیتیکا* قرابت فیلوژنی دارد.

تشکر و قدردانی: از آنجایی که مطالعه اخیر با حمایت مالی شرکت پتروشیمی منطقه ماهشهر انجام شده است، بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی شرکت پتروشیمی آبادان و ماهشهر به‌جهت کمک در نمونه‌گیری و انجام آنالیزهای دستگاهی قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: احمدعلی پوربابائی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰%)؛ محمدعلی آموزگار (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۵%)؛ سمانه توکلی (نویسنده سوم)، نگارنده بحث (۲۰%)؛ مهرنوش رسولی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۱۵%).

منابع مالی: در قالب حمایت از طرح دانشجویی، هزینه این تحقیق توسط بخش HSE شرکت پتروشیمی منطقه ماهشهر تامین شده است.

منابع

1- Asker D, Beppu T, Ueda K. Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;77(2):383-92.

2- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editors. Carotenoids volume 5: Nutrition and health. Berlin: Springer Science & Business Media; 2009.

3- Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. J Biosci Bioeng. 1999;88(6):617-21.

4- Jagannadham MV, Chattopadhyay MK, Subbalakshmi C, Vairamani M, Narayanan K, Rao CM, et al. Carotenoids of an antarctic psychrotolerant bacterium, Sphingobacterium antarcticus, and a mesophilic bacterium, Sphingobacterium multivorum. Arch Microbiol. 2000;173(5-6):418-24.

5- Dufossé L. Microbial production of food grade pigments. Food Technol Biotechnol. 2006;44(3):313-23.

6- Bhosale P, Bernstein PS. Microbial xanthophylls. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;68(4):445-55.

7- Dussault HP. An improved technique for staining red halophilic bacteria. J bacteriol. 1955;70(4):484-5.

8- Chen YG, Cui XL, Li WJ, Xu LH, Wen ML, Peng Q, et al. Salinicoccus salitudinis sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil sample. Extremophiles. 2008;12(2):197-203.

9- Oren A, Rodríguez-Valera F. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. Microbiol Ecol. 2001;36(2-3):123-30.

10- Weber RWS, Anke H, Davoli P. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). J Chromatogr A. 2007;1145(1-2):118-22.

11- Rodriguez-Amaya DB. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. Washington, DC: International Food Policy Research Institute; 2004.

12- Kerkar S. Ecology of hypersaline microorganisms. In: Marine microbiology. National Institute of Oceanography Panaji; 2004. pp. 37-47.

13- Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol. 2002;28(1):56-63.

14- Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Isolation of extreme halophiles from seawater. Appl Environ Microbiol. 1979;38(1):164-5.

15- Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by Haloferax alexandrinus under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;58(6):743-50.

16- Birbir M, Sesal C. Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. Turk J Biol. 2003;27:7-22.

17- Ozcan B, Cokmus C, Coleri A, Caliskan M. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. Microbiology. 2006;75(6):739-46. [Russian]

18- Köcher S, Breitenbach J, Müller V, Sandmann G. Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium Halobacillus halophilus.

Archive of SID
www.SID.ir

Arch Microbiol. 2009;191(2):95-104.
19- Duc, LH, Fraser PD, Tam NK, Cutting SM. Carotenoids present in halotolerant Bacillus spore formers. FEMS Microbiol Lett. 2006;255(2):215-24.
20- Yatsunami R, Ando A, Yang Y, Takaichi Sh, Kohno M, Matsumura Y, et al. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon Haloarcula japonica. Front Microbiol. 2014;5:100.
21- Sui L, Liu L, Deng Y. Characterization of halophilic C50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. Chin J Oceanol Limnol. 2014;32(6):1280-7.

Archive of SID

www.SID.ir