ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):565-570

Antimicrobial Activity of Carotenoid Pigments Extracted from *Micrococcus roseus*

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Yolmeh M.*[1] *PhD*,
Khamiri M.[1] *PhD*,
Ghaemi E.[2] *PhD*,
RamezanPour S.S.[3] *PhD*,
Ghorbani M.[1] *PhD*

How to cite this article
Yolmeh M, Khamiri M, Ghaemi E, RamezanPour S S, Ghorbani M. Antimicrobial Activity of Carotenoid Pigments Extracted from *Micrococcus roseus*. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):565-570.

ABSTRACT

Aims Carotenoids are pigments widely used in the food industry. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of pigment extracted from *Micrococcus roseus*.

Materials & Methods In this experimental study, *Micrococcus roseus* cells were settled by centrifugation, and 10ml acetone was added and they were homogenized by homogenizer. Then, homogenized suspension was centrifuged, the supernatant was collected, and carotenoid pigments were extracted with equal volume of petroleum ether. After filtration of pigmented solution, the solution was concentrated by rotary evaporator and, then, it was converted to powder by freeze dryer. Antimicrobial activity was evaluated by disc diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined, using the agar dilution method. For statistical analysis, Tukey test and Minitab 16 statistical software were used.

Findings Pigment extracted from *Micrococcus roseus* influenced the growth of all tested bacteria; *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis* had the highest (12.4mm) and lowest (10.9mm) sensitivity, respectively, to pigment extracted from *Micrococcus roseus* in 5mg. *Salmonella enteritidis* had the highest MIC (64mg/mL) between the tested bacteria, but MBC was not observed for *Salmonella enteritidis* at the tested pigment extracted from *Micrococcus roseus* concentrations. The antimicrobial effect of extracted pigment on gram-positive bacteria was higher than gram-negative bacteria.

Conclusion The extracted pigment from *Micrococcus roseus* is natural and has antimicrobial activity. The antimicrobial effect of extracted pigment on gram-positive bacteria is higher than gram-negative bacteria.

Keywords Pigment; Micrococcus Roseus; Antimicrobial; Pathogen

CITATION LINKS

[1] Terpenoids: Natural inhibitors of NF-kappaBsignaling with anti-inflammatory and anticancer ... [2] Bioactive compounds from marine bacteria and ... [3] Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial ... [4] An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment ... [5] Marker-assisted selection as strategy for increasing ... [6] Bacterial pigments and their... [7] Isolation and molecular identification of pigment producing microorganisms and acute toxicity ... [8] Safety evaluation of Monascus purpureus red mould rice in albino ... [9] Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from ... [10] Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper ... [11] Antimicrobial activity of wool fabric treated with ... [12] Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of ... [13] Comparing antibacterial and antioxidant activity of annatto dye extracted by conventional and ultrasound-assisted ... [14] Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain ... [15] Application of oregano essential oil against salmonella ... [16] Essential oils: Their antibacterial properties and potentional ... [17] Carotenoid biosynthesis in micrcoccus luteus grown ... [18] Production of β-carotene by a mutant of Rhodotorula ... [19] Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species ... [20] Compostion and antimicrobial activities of volatile ... [21] Evaluation of the antibacterial activity of annatto dye on some ... [22] Umadevi K, Krishnaveni M. Antibacterial activity of pigment produced from Micrococcus ... [23] In vitro antioxidant and antimicrobial activity ... [24] Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected ... [25] Antimicrobial properties of plant essential oils and ... [26] Microbial and viral drug resistance ... [27] Volatile composition and antimicrobial properties of commercial ... [28] A review of Listeria monocytogenes ...

[1]Food Sciences & Technology Department, Food Sciences Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Microbiology Department, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
[3]Plant Breeding & Biotechnology Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

Correspondence
Address: Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Shahid Beheshti Street, Gorgan, Iran. Postal Code: 4913815739
Phone: -
Fax: +98 (17) 35228573
mahmud.yolmeh@yahoo.com

Article History
Received: April 04, 2017
Accepted: September 21, 2017
ePublished: December 21, 2018

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

اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس*

محمود یلمه* PhD
گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
مرتضی خمیری PhD
گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
عزت‌الله قائمی PhD
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
سیده‌ساناز رمضان‌پور PhD
گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
محمد قربانی PhD
گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده
اهداف: کاروتنوئیدها رنگ‌های پرمصرف در صنعت غذا با منشا گیاهی و میکروبی هستند. هدف مطالعه حاضر ارزیابی اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* (*Micrococcus roseus*) بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر سلول‌های *میکروکوکوس روزئوس* با سانتریفیوژ ته‌نشین شدند و ۱۰میلی‌لیتر استون به آنها اضافه و توسط هموژنایزر هموژن شدند. در ادامه سوسپانسیون هموژن، سانتریفیوژ، مایع رویی جمع‌آوری و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی با حجمی برابر از پترولیوم اتر استخراج شدند. محلول‌های رنگی پس از فیلتراسیون، به‌وسیله تغلیظ‌کننده چرخنده تغلیظ شد و سپس به‌وسیله خشک‌کن انجمادی به حالت پودری درآمد. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به روش انتشار دیسک صورت گرفت و میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) با روش رقت آگار محاسبه شد. به‌منظور تحلیل آماری آزمون توکی و نرم‌افزار آماری Minitab 16 به کار رفتند.
یافته‌ها: رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* بر رشد تمام باکتری‌های مورد آزمون موثر بود، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *سالمونلا اینتریتیدیس* (*Salmonella enteritidis*) به‌ترتیب بیشترین (۱۲/۴میلی‌متر) و کمترین (۱۰/۹میلی‌متر) حساسیت به رنگ استخراج‌شده در غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را داشتند. *سالمونلا اینتریتیدیس* بیشترین MIC (۶۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را داشت و در غلظت‌های مورد آزمون رنگ استخراج‌شده، تنها برای میزان MBC *سالمونلا اینتریتیدیس* مشاهده نشد. اثر ضدمیکروبی رنگ استخراج‌شده بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود.
نتیجه‌گیری: رنگ استخراج شده از *میکروکوکوس روزئوس*، رنگی با منشا طبیعی است و فعالیت ضدمیکروبی دارد. اثر ضدمیکروبی آن بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است.
کلیدواژه‌ها: رنگدانه، *میکروکوکوس روزئوس*، ضدمیکروبی، بیماری‌زا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰
*نویسنده مسئول: mahmud.yolmeh@yahoo.com

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان مواد غذایی و بیماران به دنبال مواد افزودنی طبیعی یا داروهای سنتی در غذاها به جای انواع مصنوعی هستند. گیاهان و میکروارگانیزم‌ها به‌عنوان یک منبع مهم از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی شناخته می‌شوند که ممکن است به‌عنوان ماده اولیه برای تولید داروهای جدید مورد استفاده قرار گیرند[1].
اخیراً مطالعات فراوانی درباره جداسازی متابولیت‌های شناخته‌شده و ترکیبات جدید با ارزش افزوده از میکروارگانیزم‌ها انجام شده است. علاقه بالای شیمیدان‌های ترکیبات طبیعی و میکروبیولوژیست‌ها به مطالعه منابع دارویی مثل برخی میکروارگانیزم‌ها، که می‌توانند منابع فراوانی از متابولیت‌های متنوع را فراهم کنند، [2]، بنابراین در سال‌های اخیر با توجه به تقاضای بالای مواد دارای کاربردهای بالقوه دارویی و یا ارزش اقتصادی بالا به‌عنوان افزودنی‌های غذایی، آرایشی و بهداشتی، دارویی و محصولات شخصی، مطالعه روی فعالیت بیولوژیکی ترکیبات طبیعی مشتق‌شده از میکروارگانیزم‌ها، به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است[2, 3].
کاروتنوئیدها از رنگدانه‌های مهم و پرکاربرد هستند که از منابع گیاهی و میکروبی به دست می‌آیند. این رنگدانه‌ها متعلق به گروه شیمیایی پلی‌ان‌های ایزوپرنوئیدی و محلول در چربی بوده که رنگ زرد- قرمز ایجاد می‌کنند[3, 4]. رنگدانه‌ای مجاز خوراکی و طبیعی با منشا گیاهی مثل بیکسین و نوروبیکسین استخراج‌شده از دانه گیاه آناتو یا *بیکسا اورلانا* (*Bixa orellana* L.) اشکالات متعددی از قبیل بی‌ثباتی در برابر نور، گرما، pH، حلالیت، کم و اغلب عدم دسترسی آسان در طول سال را در پی دارند. امروزه پژوهشگران به دنبال تولید رنگدانه از میکروارگانیزم‌ها در صنایع مختلف هستند. تولید رنگدانه از میکروارگانیزم‌ها با توجه به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ بیشتر نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری است[5, 6]. چندین میکروارگانیزم تولیدکننده رنگدانه شناخته شده‌اند مانند میکروکوکوس، باسیلوس، *موناسکوس پورپورئوس* (*Monascus purpureus*)، رودوتورولا و فافیا در طبیعت به‌طور معمول یافت می‌شوند[4]. *محرابی* و همکاران[7] جداسازی و شناسایی مولکولی میکروارگانیزم‌های تولیدکننده رنگدانه و سمیت حاد این رنگدانه‌ها را بررسی کردند، طبق نتایج رنگدانه‌های استخراج‌شده از میکروارگانیزم‌ها در حداکثر دوز خود روی موش‌های مورد آزمون اثر کشنده‌ای ندارند و تغییرات آنزیم‌های کبدی در حداکثر دوز قابل برگشت بوده است. نتایج پژوهش *کوماری* و همکاران[8] نشان داد که تغذیه موش‌های آلبینو با برنج حاوی رنگ قرمز *موناسکوس پورپورئوس* هیچ گونه اثر سمی‌ایی روی آنها نداشت.
تاکنون بیماری‌هایی با منشا غذایی و عملکرد پایین شیمی‌درمانی‌های مرسوم، به دست‌آوردن یک کاهش در میزان مرگ و میر در مقابل مشکلاتی مانند سرطان و بیماری‌های ناشی از آلودگی میکروبی، التهاب و حساسیت، یک نیاز اساسی به روش‌های جدید به‌منظور کنترل این بیماری‌ها و مشکلات را نشان می‌دهد[9]. کاروتنوئیدها به‌طور جامع مطالعه شده‌اند و اثرات مفید مختلف آنها بر سلامت انسان تایید شده که می‌توانند از طریق پیش‌سازبودن ویتامین A، اثر ضدالتهابی، ضدمیکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این اثرات مفید را نشان دهند[10-14].
بیماری‌هایی با منشا غذایی مرتبط با مصرف مواد غذایی آلوده به عوامل عفونت‌زا و یا سموم تولیدشده توسط میکروارگانیزم‌ها ایجاد می‌شود. تخمین زده شده که سالانه ۳۰% افراد در کشورهای پیشرفته از بیماری‌هایی با منشا غذایی رنج می‌برند[15]. عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلولی میکروارگانیزم‌ها از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای باکتری‌ها اختلال ایجاد کرده و یا باعث منعقد و کواگوله‌شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین‌ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند[16].

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به اثرات مضر آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی و از سوی دیگر اهمیت بالای یافتن مواد آنتی‌بیوتیکی با منشا طبیعی هدف از این مطالعه، معرفی رنگ استخراج شده از *میکروکوکوس روزئوس* (*Micrococcus roseus*) به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی با منشا طبیعی و تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد و حداقل غلظت باکتری‌کشی آن علیه چند باکتری بیماری‌زای شاخص شامل *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (*Salmonella enteritidis*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) بود.

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر باکتری‌های مورد نیاز شامل *میکروکوکوس روزئوس* (PTCC 1411)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 1163)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (PTCC 1709)، *اشریشیا کلی* (PTCC 1763) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431) از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران (PTCC)، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. کلیه محیط کشت‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

شرایط تولید رنگ: یک لوپ باکتری *میکروکوکوس روزئوس* از کشت آگار به یک ارلن حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر محیط GPY (یک‌گرم گلوکز، ۱۰گرم پپتون، و ۶گرم عصاره مخمر) برای تهیه مایه تلقیح انتقال داده شد. ۱۰میلی‌لیتر از مایه تلقیح تهیه‌شده به ارلن حاوی ۲۰۰میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیکیس‌سوی‌براث (TSB)، عصاره مخمر، گلوکز و فسفات انتقال و در دمای ۳۰°C و دور ۱۸۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۴۸ساعت گرم‌خانه‌گذاری و سپس این ارلن در دمای ۳۰°C و دور ۱۸۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۷۲ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. مقدار pH طی گرم‌خانه‌گذاری به کمک محلول‌های ۲مولار سود و ۲مولار اسیدکلریدریک روی ۷ تنظیم شد[17].

استخراج رنگ: محیط کشت حاوی *میکروکوکوس روزئوس* پس از دوره گرم‌خانه‌گذاری (۷۲ساعت) در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۲۰دقیقه سانتریفیوژ و مایه رویی دور ریخته شد و سلول‌های باکتریایی ته‌نشین‌شده با آب مقطر شست‌وشو و دوباره سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۲۰دقیقه) شدند. میزان ۱۰میلی‌لیتر استون به سلول‌های باکتریایی به دست‌آمده اضافه و سوسپانسیون حاصل به کمک هموژنایزر مدل D500 (Scilogex؛ ایالات متحده) هموژن شد، در ادامه سوسپانسیون هموژن سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری شد. رنگدانه‌های کاروتنوئیدی با حجمی برابر از پترولیوم اتر استخراج و سپس محلول‌های رنگی پس از فیلتراسیون، به‌وسیله تغلیظ‌کننده چرخان مدل re301 (هیدولف؛ آلمان) تغلیظ شد و عصاره تغلیظ‌شده به‌وسیله خشک‌کن انجمادی به حالت پودری درآمد[18].

بررسی فعالیت ضدمیکروبی: از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولرهینتون‌آگار به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی رنگدانه استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* استفاده شد. بدین‌ترتیب که از باکتری‌های فعال‌شده (۲۴ساعت رشد کرده) سوسپانسیونی معادل با کدورت لوله نیم مک‌فارلند استاندارد ایجاد شد. سپس توسط سواپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشته و در محیط کشت مولرهینتون‌آگار به شکل سطحی کشت داده شد. دیسک‌های استریل با قطر ۶میلی‌متر در محلول رنگی تهیه‌شده با غلظت‌های مشخص (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۵میلی‌گرم بر لیتر) خیسانده و از آنها در سطح پتری‌دیش‌ها استفاده شد، سپس پتری‌دیش‌های تلقیح‌شده در دمای ۳۷°C قرار گرفتند و پس از ۲۴ساعت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد[19]. شاهد منفی (پلیت فاقد باکتری) و شاهد مثبت (پلیت بدون رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس* روزئوس) نیز در نظر گرفته شدند. به‌منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد آنها با قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به رنگ *میکروکوکوس روزئوس* دیسک آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین به کار رفتند.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC)**:** حداقل غلظت بازدارنده از رشد در واقع کمترین غلظتی است که در نتیجه آن کاهش یا بقا یکسان در میزان زنده‌ماندن تلقیح وجود دارد. برای این منظور از روش رقت آگار استفاده شد، بدین‌ترتیب که محلول رنگی استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* را با محیط کشت مولرهینتون‌آگار مخلوط نموده و باکتری‌ها به‌صورت پورپلیت کشت داده شدند و بعد از ۲۴ساعت انکوباسیون در ۳۷°C، رشد باکتری‌ها بررسی شد به‌نحوی که اولین پتری‌دیشی که باکتری در آن نتوانست رشد کند به‌عنوان کمترین غلظت بازدارنده از رشد در نظر گرفته شد[20]. غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* به کار رفت. ۰/۵میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی برابر استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند استفاده شد. یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و فاقد باکتری به‌عنوان شاهد منفی (بیانگر عدم وجود آلودگی) و یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت و باکتری مورد نظر به‌عنوان شاهد مثبت (بیانگر قدرت رشد باکتری) نیز استفاده شد[20].

تعیین کمترین غلظت کشنده باکتری (MBC)**:** برای تعیین کمترین غلظت کشندگی نیز از روش رقت آگار استفاده شد، با این تفاوت که از پتری‌دیشی که به‌عنوان MIC در نظر گرفته شده، در محیط نوترینت‌براث کشت فرعی انجام شد و در صورت عدم مشاهده رشد در محیط مغذی، غلظت MBC با غلظت MIC برابر خواهد بود و اما در صورت مشاهده رشد باکتری در محیط کشت مغذی، از باکتری‌های رشد کرده در این محیط به محیط کشت مولرهینتون‌آگار حاوی رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* با غلظت‌های بیشتر، کشت فرعی داده شد و غلظتی از این رنگ میکروبی که در آن رشد باکتری مشاهده نشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* برای تعیین MBC استفاده شد[21].

آزمایش‌ها روی هر کدام از باکتری‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

از آزمون توکی به‌منظور بررسی اختلاف میانگین‌ها در سطح $p<0/05$ استفاده شد و نرم‌افزار آماری Minitab 16 برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها به کار رفت.

یافته‌ها

رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* بر رشد باکتری‌های مورد نظر اثر داشت و هاله عدم رشد در آنها تشکیل شد. هر چند قطر هاله در باکتری‌های مختلف، متفاوت بود (جدول ۱).

رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* اثر بازدارندگی بر رشد

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری‌های مورد آزمون داشت، بدین‌صورت که *باسیلوس سرئوس* و دو باکتری *اشریشیا کلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* به‌ترتیب کمترین (۱۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین (۶۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) غلظت بازدارنده از رشد را نشان دادند (جدول ۲).

کمترین میزان MBC برای *باسیلوس سرئوس* (معادل غلظت MIC) و بیشترین میزان MBC (۶۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای *لیستریا* مونوسیتوژنز و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد اما برای میزان MBC *سالمونلا اینتریتیدیس* مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۱) قطر هاله عدم رشد باکتری توسط رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* بر حسب میلی‌متر

باکتری	قطر هاله عدم رشد باکتری (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۰/۵	۱/۵	۲/۵	۳/۵	۵	دیسک آنتی‌بیوتیک*
باسیلوس سرئوس	۸/۲±۰/۴^{aD}	۹/۱±۰/۷^{aC}	۱۱/۱±۰/۲^{aB}	۱۲/۲±۰/۴^{aA}	۱۲/۴±۰/۶^{aA}	۱۳ پ
لیستریا مونوسیتوژنز	۷/۶±۰/۳^{abD}	۸/۶±۰/۴^{aC}	۹/۴±۰/۴^{bC}	۱۰/۸±۰/۴^{bcB}	۱۲/۰±۰/۳^{aA}	۲۲ پ
اشریشیا کلی	۶/۶±۰/۴^{cD}	۸/۱±۰/۵^{abC}	۸/۷±۰/۳^{bcC}	۱۰/۳±۰/۳^{cdB}	۱۱/۳±۰/۲^{bA}	۱۱ ج
سالمونلا اینتریتیدیس	۶/۱±۰/۲^{cD}	۷/۷±۰/۵^{cC}	۸/۵±۰/۳^{cC}	۹/۸±۰/۲^{dB}	۱۰/۹±۰/۳^{bA}	۱۰ ج
استافیلوکوکوس اورئوس	۷/۴±۰/۲^{bE}	۸/۱±۰/۲^{bD}	۹/۶±۰/۳^{abC}	۱۱/۳±۰/۳^{bB}	۱۱/۵±۰/۳^{abA}	۳۲ پ

*پ) دیسک آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، ج) دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (حروف بزرگ غیرمشابه در یک ردیف و حروف کوچک غیرمشابه در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۹۵% می‌باشد)

جدول۲) حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس*

باکتری	حداقل غلظت بازدارنده از رشد (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	شاهد منفی	شاهد مثبت
باسیلوس سرئوس	+	+	+	_	_	_	_	+
لیستریا مونوسیتوژنز	+	+	+	+	+	_	_	+
اشریشیا کلی	+	+	+	+	+	_	_	+
سالمونلا اینتریتیدیس	+	+	+	+	+	_	_	+
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	_	_	_	+

جدول۳) حداقل غلظت کشنده باکتری توسط رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس*

باکتری	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸
باسیلوس سرئوس	+	_	_	_	_
لیستریا مونوسیتوژنز	+	+	+	_	_
اشریشیا کلی	+	+	+	+	_
سالمونلا اینتریتیدیس	+	+	+	+	+
استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	_	_

بحث

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* انجام شد.

در این پژوهش طبق نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری، رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* بر رشد همه باکتری‌های مورد آزمون موثر بود بدین‌صورت که در غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ بیشترین قطر هاله برای *باسیلوس سرئوس* (۱۲/۴میلی‌متر) و پس از آن *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۲/۰میلی‌متر) و کمترین قطر هاله مربوط به سالمونلا *اینتریتیدیس* (۱۰/۹میلی‌متر) بود. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) از باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود، در حالی که اختلاف معنی‌داری (به‌جز غلظت ۱/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بین باکتری‌های گرم منفی مشاهده نشد ($p>0/05$).

مقادیر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجاورت با غلظت‌های مختلف رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$)، به‌طوری که با افزایش میزان غلظت رنگ قطر هاله مربوطه افزایش یافت. در حالی که، مقادیر قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* و در مقابل غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵میلی‌گرم بر لیتر و مقادیر قطر هاله عدم رشد برای باکتری *باسیلوس سرئوس* بین غلظت‌های ۳/۵ و ۵میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$) و در مقابل با سایر غلظت‌های رنگ این اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$).

یومادوی و *کریشناونی*[22] اثر ضدباکتریایی رنگ تولیدشده توسط *میکروکوکوس لوتئوس* (*M. luteus* 532949KF) را بررسی کردند، طبق نتایج مطالعه آنها این رنگ میکروبی اثرات ضدمیکروبی خوبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، کلبسیلا و سودوموناس دارد. *مانیمالا* و *موروجسان*[23] فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی رنگ کاروتنوئیدی استخراج‌شده از میکروارگانیزم اسپوروبولومایسس (Sporobolomyces) ایزوله‌شده از گیاه برنج را بررسی کردند، نتایج آنها نشان داد این رنگدانه علاوه بر داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، اثر ضدباکتریایی بالایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* دارد.

طبق نتایج مطالعه حاضر حداقل غلظت بازدارنده از رشد برای رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* علیه همه باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمون مشاهده شد. نتایج حاصل از رقت آگار جهت تعیین MIC نشان داد که رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* بر رشد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی اثر بیشتری داشت، غلظت‌هایی که از رشد *باسیلوس سرئوس* ممانعت کرد، به‌جز غلظت ۶۴میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، از رشد *سالمونلا اینتریتیدیس* ممانعت ایجاد نکرد. *گالیندو* و همکاران[24] در مورد عصاره کاروتنوئیدی (۲/۸% نوربیکسین)، *یلمه* و همکاران[21] در مورد رنگ آناتو و *اسمیت‌پالمر* و همکاران[25] نیز در مورد عصاره‌های طبیعی به نتیجه مشابه‌ای دست یافتند. دلیل احتمالی آن حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی است. لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی، می‌توانند مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره یا اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی شود[26]. بین باکتری‌های گرم مثبت، *باسیلوس سرئوس* بیشترین حساسیت را به رنگ استخراج‌شده از

Archive of SID
www.SID.ir

میکروکوکوس روزئوس داشت، به‌طوری که کمترین میزان MIC و MBC را بین باکتری‌ها داشت که این موضوع در نتایج *گالیندو* و همکاران در مورد اثر عصاره ۲/۸% نوربیکسین بر باکتری‌های بیماری‌زا نیز مشاهده شد[27].

طبق نتایج مطالعه حاضر بین باکتری‌های گرم مثبت، *لیستریا مونوسیتوژنز* کمترین حساسیت را علیه فعالیت ضدمیکروبی رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* نشان داد، به‌طوری که مقادیر MIC علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* با مقادیر MIC علیه *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشریشیا کلی* یکسان بود. دلیل احتمالی این پدیده وجود لیپوپلی‌ساکاریدهایی در دیواره سلولی *لیستریا مونوسیتوژنز* است که می‌تواند مقاومت باکتریایی را مثل غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی در مقابل عصاره‌های طبیعی افزایش دهد[28].

غلظت‌های به کاررفته از رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* اثر کشنده‌ای بر همه باکتری‌های گرم مثبت و نیز *اشریشیا کلی* داشت اما اثر کشندگی علیه *سالمونلا اینتریتیدیس* مشاهده نشد که نشان‌دهنده مقاومت بیشتر *سالمونلا اینتریتیدیس* نسبت به سایر باکتری‌های مورد آزمون بود. *گالیندو* و همکاران[23] نیز اثر کشنده عصاره ۲/۸% نوربیکسین بر *سالمونلا تیفی موریوم* مشاهده نکردند. مقادیر MIC و MBC برای رنگ مورد آزمون علیه *باسیلوس سرئوس* یکسان مشاهده شد.

رنگ استخراج‌شده از *میکروکوکوس روزئوس* علاوه بر ایجاد ظاهری مطلوب (رنگی) می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

رنگ استخراج شده از *میکروکوکوس روزئوس*، رنگی با منشا طبیعی است و فعالیت ضدمیکروبی دارد. این رنگ هم بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و هم باکتری‌های گرم منفی موثر است و اثر ضدمیکروبی آن بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

سهم نویسندگان: محمود یلمه (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰%)؛ مرتضی خمیری (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ عزت‌الله قائمی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)؛ سیده‌ساناز رمضان‌پور (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)؛ محمد قربانی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۲۰%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

منابع

1- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: Natural inhibitors of NF-kappaBsignaling with anti-inflammatory and anticancer potential. Cell Mol Life Sci. 2008;65(19):2979-99.

2- Debbab A, Aly AH, Lin WH, Proksch P. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. Microb Biotechnol. 2010;3(5):544-63.

3- Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Chidambara Murthy KN, et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality?. Trends Food Sci Technol. 2005;16(9):389-406.

4- Frengova GI, Beshkova DM. Carotenoids from rhodotorula and phaffia: Yeasts of biotechnological importance. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009;36(2):163-80.

5- Kim CH, Kim SW, Hong SI. An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment by Serratia sp. KH-95. Process Biochem. 1999;35(5):485-90.

6- Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Bacterial pigments and their applications. Process Biochem. 2013;48(7):1065-79.

7- Mehrabi M, Nazemi A, Nasrollahi A. Isolation and molecular identification of pigment producing microorganisms and acute toxicity of pigments. J Microb Biotechnol. 2011;3(9):19-28. [Persian]

8- Kumari HP, Naidu KA, Vishwanatha S, Narasimhamurthy K, Vijayalakshmi G. Safety evaluation of Monascus purpureus red mould rice in albino rats. Food Chem Toxicol. 2009;47(8):1739-46.

9- Wang M, Tsao R, Zhang S, Dong Z, Yang R, Gong J, et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. Food Chem Toxicol. 2006;44(9):1522-9.

10- Hernández-Ortega M, Ortiz-Moreno A, Hernández-Navarro MD, Chamorro-Cevallos G, Dorantes-Alvarez L, Necoechea-Mondragón H. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (capsicum annuum L.). J Biomed Biotechnol. 2012;2012:524019.

11- Han S, Yang Y. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. Dyes Pigments. 2005;64(2):157-61.

12- Siva R, Palackan MG, Maimoon L, Geetha T, Bhakta D, Balamurugan P, et al. Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes. Food Sci Biotechnol. 2011;20(1):7-13.

13- Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Shakouri S, Hosseini F. Comparing antibacterial and antioxidant activity of annatto dye extracted by conventional and ultrasound-assisted methods. Zahedan J Res Med Sci. 2015;17(7):e1020.

14- Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. Eur J Pharmacol. 2010;648(1-3):110-6.

15- Da Silva JPL, De Melo Franco BDG. Application of oregano essential oil against salmonella enteritidis in mayonnaise salad. Int J Food Sci Nutr Eng. 2012;2(5):70-5.

16- Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potentional applications in foods, a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53.

17- AL-Wandawi H. Carotenoid biosynthesis in micrcoccus luteus grown in the presence of different concentrations of nicotine. Int J Pure Appl Sci Technol. 2014;24(1):31-41.

18- Bhosale P, Gadren R. Production of β-carotene by a mutant of Rhodotorula glutinis. Appl Microbiol Biotechnol. 2001;55(4):423-27.

19- Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. Phytochemistry. 2003;64(3):743-52.

20- Manenzhe NJ, Potgieter N, Van Ree T. Compostion

Archive of SID

www.SID.ir

and antimicrobial activities of volatile components of Lippia javanica. Phytochemistry. 2004;65(16):2333-6.
21- Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Farhoosh R, Hosseini F. Evaluation of the antibacterial activity of annatto dye on some pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci J. 2014;8(4):53-7. [Persian]
22- Umadevi K, Krishnaveni M. Antibacterial activity of pigment produced from Micrococcus luteus KF532949. Int J Chem Anal Sci. 2013;4(3):149-52.
23- Manimala MRA, Murugesan R. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from Sporobolomyces sp. isolated from natural source. J Appl Nat Sci. 2014;6(2):649-53.
24- Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid and spoilage microorganisms. J Food Prot. 2003;66(6):1074-8.
25- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol. 1998;26(2):118-22.
26- McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. Tends Microbiol. 2002;10(10 Suppl):S8-14.
27- Galindo-Cuspinera V. Volatile composition and antimicrobial properties of commercial annatto (bixa orellana l.) extracts, a natural food colorant. Maryland: University of Maryland; 2003.
28- Low JC, Donachie W. A review of Listeria monocytogenes and listeriosis. Vet J. 1997;153(1):9-29.

Archive of SID

www.SID.ir