Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Optimization of Production Conditions of Natural Antibacterial Violacin Pigment from *Janthinobacterium lividum*

Farnaz Khaksar[1,2], **Garshasb Rigi**[1,2*]

[1] Dept of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Dept of Industrial Biotechnology, Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 05 December 2020
Revised: 01 December 2021
Accepted: 03 January 2022
Published Online: 23 July 2022

**** Correspondence to:***
Garshasb Rigi
Dept of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
Email: garshasbiotech@sku.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: *Janthinobacterium. lividum* (*J. lividum*) is a bacterium that can produce a secondary metabolite with antimicrobial properties called violacein. Violacein is produced in this bacterium under special conditions, such as food stress, lack of oxygen, changes in pH or ambient temperature, and even in the presence of a chemical. Bacteria use these production factors as agents for greater survival. This pigment can be used to dye hospital textiles with antibacterial properties. This study aimed to determine the appropriate conditions for the maximum production of violacein pigment by bacteria to save production time and cost.

Material & Methods: In this study, the effects of different treatments were tested quantitatively and qualitatively to achieve the best conditions for the production of violacein by *J. lividum*. Other evaluations included the effect of aeration on the production of color biofilm, the effect of temperature on the production of violacein, glycerol concentration test and its effect on pigment production, the effect of glycerol, sodium sulfate, tryptophan, meat extract and peptone on production optimization, optimization in a solid and liquid medium and color spectrum, and violet dye resistance at different pHs. The SPSS software and t-test were used for quantitative analysis and comparison of the treatments.

Findings: It was found that a culture medium containing meat extract (0.3%) and peptone (0.5%), glycerol (1%), and tryptophan (1%) on a solid culture medium containing nutrient agar was selected as the best culture medium for the production of violacein. The amount of biomass and dye production in the solid medium was twice that in the liquid medium. The optimum condition for the production of violacein pigment in this strain included pH 7 and a temperature of 25 °C. The purple color of this pigment was stable for a long time (24 h) at acidic pH (up to pH 11).

Discussion & Conclusion: Modified nutrient agar solid culture medium was introduced for optimal production of violacein. Optimal bacterial culture conditions (temperature 25 °C and pH 7) were obtained for the best pigment production. It can be concluded that natural dyes can replace harmful chemical dyes if produced in a product with high efficiency and quality. In this study, the production of violacein with more efficacy was tried through the enhancement and improvement of culture medium composition and maintenance of the optimal production conditions.

Keywords: Antibacterial, Hospital textiles, Microbial biotechnology, Secondary metabolites

➢ **How to cite this paper**

Khaksar F, Rigi G. Optimization of Production Conditions of Natural Antibacterial Violacin Pigment from *Janthinobacterium lividum*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(3): 29-43.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بهینه‌سازی شرایط تولید رنگ‌دانهٔ طبیعی و ضدباکتری ویولاسئین از باکتری *Janthinobacterium lividum*

فرناز خاکسار[۱،۲]، گرشاسب ریگی[۱،۲*]

[۱]گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲]گروه بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

نویسنده مسئول:

گرشاسب ریگی

گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: garshasbiotech@sku.ac.ir

چکیده

مقدمه: باکتری *Janthinobacterium. lividum* قادر به تولید متابولیت ثانویه با خاصیت ضدمیکروبی تحت عنوان ویولاسئین است. ویولاسئین در این باکتری در شرایط ویژه‌ای همچون استرس غذایی، کمبود اکسیژن، تغییرات pH و یا دمای محیط حتی وجود یک مادهٔ شیمیایی تولید می‌شود. باکتری‌ها از این عامل‌های تولیدی به‌عنوان عملگری برای بقای بیشتر استفاده می‌کنند. این رنگ‌دانه برای رنگ‌آمیزی منسوجات بیمارستانی با خاصیت آنتی باکتریال می‌تواند کاربرد داشته باشد. هدف از این مطالعه تعیین شرایط مناسب برای بیشینهٔ تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین توسط باکتری، به‌منظور صرفه‌جویی در وقت و هزینهٔ تولید است.

مواد و روش ها: در این مطالعه اثر تیمارهای مختلف به‌صورت کمی و کیفی، برای دستیابی به بهترین شرایط تولید ویولاسئین توسط باکتری J. lividum آزمایش شد. اثر هوادهی بر تولید بیوفیلم رنگی، اثر دما بر میزان تولید ویولاسئین، آزمایش غلظت گلیسرول و اثر آن بر تولید رنگ‌دانه، بررسی اثر گلیسرول، سولفات سدیم، تریپتوفان، عصارهٔ گوشت و پپتون در بهینه‌سازی تولید، بهینه‌سازی در محیط جامد و مایع و بررسی طیف رنگی و مقاومت رنگ ویولاسئین در pHهای مختلف بررسی گردید. برای مقایسهٔ کمی تیمارها از نرم‌افزار آماری SPSS و روش مقایسهٔ آماری T-Test استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد عصارهٔ گوشت و ۰/۵ درصد پپتون، ۰/۱ درصد گلیسرول و ۱ درصد تریپتوفان روی محیط کشت جامد حاوی نوترینت آگار، به‌عنوان بهترین محیط کشت برای تولید انتخاب گردید. میزان تولید بیومس و رنگ در محیط جامد دو برابر محیط مایع بود. pH مطلوب ۷، در تنها دمای مناسب برای تولید رنگ ویولاسئین در این سویه ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد بود. رنگ بنفش به‌دست‌آمده از این رنگ‌دانه در pHهای اسیدی به مدت طولانی (۲۴ ساعت) پایدار بوده است. این پایداری تا pH =11 وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: محیط کشت جامد نوترینت آگار تغییریافته برای تولید بهینه و دو برابری ویولاسئین معرفی گردید. شرایط بهینهٔ کشت باکتری (دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و pH برابر ۷) برای بهترین تولید رنگ‌دانه به‌دست آمد. از نظر کیفی می‌توان گفت، رنگ‌های طبیعی درصورتی‌که در یک محصول با قابلیت تولید با بازدهی و کیفیت بالا به‌کار روند، می‌توانند جایگزین این دسته از مواد رنگی شیمیایی مضر شوند. در این تحقیق، با افزایش و بهبود ترکیب محیط کشت و حفظ شرایط بهینهٔ تولید، نسبت به تولید ویولاسئین با بازدهی بالاتر اقدام شد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌باکتریال، بیوتکنولوژی میکروبی، متابولیت ثانویه، منسوجات بیمارستانی

استناد: ریگی، گرشاسب؛ خاکسار، فرناز. بهینه‌سازی شرایط تولید رنگ‌دانهٔ طبیعی و ضدباکتری ویولاسئین از باکتری *Janthinobacterium lividum*. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، شهریور ۱۴۰۱؛۳۰(۳): ۴۳-۲۹.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مقدمه

باکتری *جانتینوباکتریوم لیویدوم* (*Janthinobacterium lividum*) برای اولین بار از پوست یک نوع سمندر جداسازی شد. این سویه از راستهٔ پروتئوباکترها و خانوادهٔ اگزالوباکتریاسه ها است (۳-۱). باکتری *J. lividum* گرم منفی، متحرک و آئروبیک (هوازی) است. در سلول‌های جوان این باکتری، فلاژل منفرد قطبی در سر سلول دیده‌شده است (۴). کلنی‌ها روی محیط کشت حالت محدب و گرد دارند. این سویه حاوی فسفولیپیدهای فسفاتیدیل اتانول آمین، فسفاتیدیل گلیسرول و دی فسفاتیدیل گلیسرول به‌عنوان لیپیدهای قطبی است. درصد G+C ژنوم این باکتری ۶۷-۶۱ درصد است (۵).

باکتری *J. lividum* قادر به تولید متابولیت ثانویه با خاصیت ضدمیکروبی تحت عنوان ویولاسئین است. درواقع، متابولیت‌های ثانویهٔ میکروبی ترکیباتی هستند که در میکروارگانیسم‌ها در شرایط ویژه‌ای تولید می‌شوند. این شرایط بیشتر به علت استرس غذایی، کمبود اکسیژن، تغییرات pH و یا دمای محیط حتی وجود یک مادهٔ شیمیایی ایجاد می‌گردد. متابولیت‌های ثانویه را همچنین می‌توان با القاکننده‌های زیستی و غیرزیستی تولید کرد و باکتری‌ها از این عامل‌های تولیدی به‌عنوان عملگری برای بقای بیشتر استفاده می‌کنند (۶).

باکتری *J. lividum* قادر به تولید دو نوع متابولیت ثانویه با خاصیت ضدمیکروبی است که شامل ویولاسئین و ایندول ۳-کربوکساندهید است. این دو ماده خاصیت ضدمیکروبی، ضدقارچ و ضدویروسی دارند (۷). از میان این دو مادهٔ ذکرشده، ساختمان ویولاسئین از ۳ بخش ساختاری تشکیل‌شده است که شامل ۵-هیدورکسیل اندول، ۲- اوکسواندول و ۲- پیرواندول است که در آب نامحلول است و در هنگام تشکیل، به‌سرعت به‌صورت یک ذره یا توده در سلول ظاهر می‌شود (۸). ویولاسئین یک مولکول هیدروفیلیک است که بیوسنتز آن با ال- تریپتوفان آغاز می‌گردد و با آنزیم‌های VioA، VioB، VioE، VioD و VioC کاتالیز می‌شود و تحت کنترل اپرون vioABCDE قرار دارد (۷).

متابولیت‌های ثانویه می‌توانند از لحاظ بیولوژیکی فعال باشند و یک مزیت رقابتی میان گونه‌های رقیبشان داشته باشند؛ بنابراین، اغلب خواص دارویی دارند که توسط بسیاری از این متابولیت‌های ثانویه نشان داده می‌شوند (۹). ویولاسئین ویژگی‌های بیولوژیکی مختلفی مانند فعالیت درمانی بالقوه روی سلول‌های سرطانی دارد که این اثر روی چندین لاین سلولی سرطانی بررسی‌شده است. این ترکیب سایتوتوکسیسیتی در IC50 دارد که این امر عمدتاً در غلظت‌های کمتر از میکرومولار بوده است (۲).

مطالعه‌ای نشان داد که ویولاسئین مانع از رشد باکتری های گرم منفی و گرم مثبت می‌شود. ویولاسئین و دئوکسی ویولاسئین خواص آنتی باکتریایی نشان داده‌اند. مشخص شد که حساس‌ترین باکتری *کلبسیلا پنومونیه* با قطر هالهٔ ۵۳/۵ میلی‌متر و *باسیلوس سابتسلیس* با قطر هالهٔ ۲۱ میلی‌متر و *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر ۲۹/۵ و *اشریشیاکلای* با قطر ۲۶ میلی‌متر بوده است. فعالیت ضدباکتریایی نشان داده است که پاسخ یکنواخت میان سویه‌های باکتری وجود ندارد؛ زیرا تفاوت حساسیت به تفاوت در دیوارهٔ سلولی آن‌ها نسبت داده‌شده است؛ اما با این حال، تأثیر معنی‌داری در فعالیت ضدمیکروبی مشاهده‌شده است. تأثیر ویولاسئین بر سویه‌های گرم مثبت مانند *باسیلوس مگاتریوم*، *باسلوس لیکنی فورمیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و باکتری های گرم منفی مثل *سودوموناس آئروژینوزا* نشان می‌دهد که در غلظت بالای رنگ دانهٔ بنفش همهٔ باکتری‌ها کشته می‌شوند (۸).

ویولاسئین کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف مانند صنایع دارویی، غذایی، آرایشی، بهداشتی و نساجی دارد. علاوه بر این، فعالیت‌های بیولوژیکی آن طیف گسترده‌ای از تحقیقات علمی را فراهم می‌کند. عمده مشکل این رنگ‌دانه آب‌گریز بودن آن است که باعث ضعیف بودن فعالیت زیستی این رنگ‌دانه می‌شود (۱۰,

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۴۳-۲۹

۱۱). این رنگ‌دانهٔ بنفش در آب نامحلول است؛ اما در استون، اتانول، متانول و بوتانول حل می‌گردد و بیشینهٔ جذب آن ۵۸۵ نانومتر است. این رنگ‌دانه قابلیت رنگرزی الیاف طبیعی و مصنوعی را دارد (۱۰).

ازآنجاکه منسوجات بستر مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌کنند، به‌ویژه درصورتی‌که رطوبت مناسب فراهم باشد؛ بنابراین، نگرانی‌های فراوانی در افراد دربارهٔ بهداشت لباس‌ها وجود دارد و به همین علت، تحقیقات بسیاری در ارتباط با تولید پارچه‌های ضدمیکروبی آغاز شده است (۱۲). از سال ۲۰۰۰ که شیراتا و همکاران نخ ابریشم را با ویولاسئین رنگ کردند، این پرسش به وجود آمده است که می‌توان از این رنگ‌دانه برای رنگرزی الیاف طبیعی و مصنوعی استفاده کرد یا نه (۵). یک مطالعهٔ پیشین نشان داده است که این رنگ‌دانه قابلیت تولید با استفاده از منابع جایگزین را دارد و به‌صورت اقتصادی قابل‌تولید است و مؤلفه‌های بهینه‌سازی در کشت غوطه‌وری آن انجام‌شده است؛ همچنین این رنگ‌دانه در محیط مایع و جامد قابلیت تولید دارد و به‌سبب افزایش اکسیژن در فرمانتور، میزان تولید از فلاسک بالاتر بوده است (۱۳).

در پژوهش‌های پیشین، شرایط لازم برای بهینه‌سازی تولید متابولیت ثانویهٔ ویولاسئین در باکتری *J. lividum* و برخی شرایط به‌صورت تک‌عامل بهینه‌شده است و در پی آن، میزان تولید رنگ‌دانه در آن افزایش‌یافته است (۱۶-۱۴، ۵)؛ اما اثر این عامل‌ها در میان کنش با همدیگر بررسی نشده است و از سویی، بدیهی است که امروزه در رنگرزی منسوجات، به استفاده از رنگ‌های طبیعی بسیار توجه می‌شود. این رنگ‌ها علاوه بر اینکه به‌آسانی از طریق میکروارگانیسم‌ها تولید می‌گردند و امکان کشت در محیط کشت‌های ارزان قیمت و یا حتی پسماندها را دارند، دارای خواص ویژه‌ای هم هستند.

این رنگ‌های طبیعی درصورتی که در یک محصول با قابلیت تولید با بازدهی و کیفیت بالا به‌کار روند، می توانند جایگزین این دسته از مواد رنگی شیمیایی مضر شوند. با توجه به همهٔ موارد یادشده و اهمیت موضوع، تهیهٔ محیط کشت بهینه‌شده و با شرایط مناسب تولید رنگ‌دانه هدف این تحقیق است؛ به‌عبارت‌دیگر، هدف از این مطالعه تعیین شرایط مناسب برای بیشینهٔ تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین توسط باکتری برای صرفه‌جویی در وقت و هزینهٔ تولید است.

مواد و روش ها

سویه و محیط‌های کشت موردنیاز برای تولید رنگ‌دانه و ارزیابی‌های میکروبیولوژیک: سویهٔ استاندارد *Janthinobacterium lividum* با کد ATCC 12473، به صورت آمپول لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (/http://irost.org/ptcc) خریداری شد. این گونه، کلنی براق و گرد و بنفش‌رنگی دارد. از محیط‌های کشت نوترینت براث و آگار، TSB (تریپتون سوی براث) و آگار و مولر هینتون آگار استفاده گردید (۶).

برای تولید محیط کشت نوترینت براث، از این محیط کشت که حاوی ۳ گرم عصارهٔ گوشت، ۵ گرم پپتون، ۱ لیتر آب مقطر در pH برابر ۰/۲ ± ۶/۸، بود، ۸ گرم از پودر آن در یک لیتر آب مقطر حل گردید و برای تهی نوترینت آگار، به ترکیبات بالا ۱۵ تا ۲۰ گرم پودر آگار اضافه شد (۶). برای تهیهٔ محیط کشت TSB نیز ۳۰ گرم پودر TSB شامل ۱۷ گرم کازئین، ۳ گرم سویا، ۵ گرم سدیم کلراید، ۲/۵ گرم دی پتاسیم هیدروژن سولفات و ۲/۵ گرم گلوکز در pH برابر ۷/۳±۰/۲ در یک لیتر آب مقطر حل گردید و برای تهیهٔ محیط کشت TSA (تریپتون سوی آگار)، به هر لیتر محیط کشت TSB مقدار ۱۵ تا ۲۰ گرم آگار اضافه شد (۶).

محیط کشت مولر هینتون آگار یک محیط کشت غیرانتخابی و غیرافتراقی است که قابلیت کشت سویه‌های متنوعی را به منظور کشت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و آزمایش‌های آنتی بیوگرام دارد. ۳۸ گرم از پودر مولر هینتون آگار محتوی ۲۰ گرم عصارهٔ گوشت، ۱۷ گرم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

کازئین هیدرولیزشده و ۱ گرم نشاسته در pH برابر ۷/۴±۰/۲ در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید و اندکی حرارت داده شد تا آگار آن ذوب شود. همهٔ محیط‌های یادشدهٔ بالا برای استریل شدن به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو گردید (۶).

بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت: ازآنجاکه تولید رنگ توسط باکتری در اواخر دورهٔ رشد انجام می‌شود و افزایش می‌یابد، می‌توان با تغییراتی در محیط کشت باکتری یا با ایجاد شرایطی، روند کشت این میزان را افزایش داد. برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه لازم است بیشینهٔ تولید رنگ‌دانه توسط باکتری به دست می‌آید.

بهینه‌سازی در محیط مایع؛ اثر هوادهی بر تولید بیوفیلم رنگی J. lividum: برای بررسی عامل اکسیژن و هوادهی به محیط مایع بر روند رشد سویهٔ *J. lividum*، ۱۲ عدد ارلن ۲۵۰ سی‌سی تهیه شد که حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت نوترینت براث بود. این محیط‌ها روی pH=7 تنظیم و استریل گردید. در مرحلهٔ تلقیح سویه، به همهٔ ارلن‌ها ۱ درصد سوسپانسیون باکتری افزوده شد که غلظت نیم مک‌فارلند داشت تا میزان سویهٔ تلقیحی در همهٔ ارلن‌ها مساوی باشد؛ سپس ارلن‌ها به‌صورت تصادفی به دو دسته تقسیم گردید و دستهٔ اول در انکوباتور شیکردار و دستهٔ دوم را در انکوباتور بدون شیک قرار داده شد. انکوباتورها روی دمای ۲۵ درجه تنظیم گردید و به مدت یک هفت انکوبه شد. پس از پایان این فرایند، ارلن‌ها خارج و مقایسه گردید (۷).

اثر دما بر میزان تولید ویولاسئین: با وجود تأثیر دمایی که مقالات بیان‌شده بود، به علت اختلاف فراوانی که در همهٔ ارجاعات نسبت به شرایط کشت مثل هوادهی وجود داشت (۸)، تأثیر دما در کشت دوباره بررسی شد. بدین منظور، ۲ عدد پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت چمنی داده و یکی از آن‌ها در انکوباتور ۲۵ درجه و دیگری در انکوباتور ۳۰ درجه قرار داده شد. پس از یک هفته انکوباسیون، هر دو پلیت بررسی گردید (۸).

آزمایش غلظت گلیسرول و اثر آن بر تولید رنگ‌دانه: ۶ عدد فالکون ۱۵ سی‌سی برداشته و داخل آن‌ها حدود ۵ سی‌سی محیط نوترینت براث ریخته شد و به ۳ دسته تقسیم گردیدند. هر دسته شامل ۲ فالکون بود که دستهٔ اول حاوی ۱ درصد گلیسرول، دستهٔ دوم ۲ درصد گلیسرول و دستهٔ سوم ۳ درصد گلیسرول بود. به فالکون‌ها ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون تلقیح و در انکوباتور ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مرحله، فالکون ها ورتکس گردید تا بیوفیلم در آنجا اندکی حل شود؛ سپس به هر فالکون ۱۰ درصد محیط کشت اتانول اضافه شد و مجدداً ورتکس گردید و جذب آن‌ها در دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (۹, ۱۰, ۱۲). تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در نرم افزار SPSS vol.22 صورت گرفت و معناداری داده‌ها در مقایسهٔ داده‌ها با استفاده از آزمون T-Test انجام گردید.

بررسی اثر گلیسرول، سولفات سدیم و تریپتوفان در بهینه‌سازی تولید: ۸ عدد ارلن حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. هر ارلن بر اساس جدول شمارهٔ ۱، حاوی گلیسرول، سولفات منیزیم و تریپتوفان بود.

جدول شمارهٔ ۱. ترکیبات ارلن‌ها برای بررسی اثر گلیسرول، سولفات سدیم و تریپتوفان در بهینه‌سازی تولید

شمارهٔ ارلن	محیط نوترینت براث	۱ درصد گلیسرول	۱ درصد سولفات منیزیم	۱ درصد تریپتوفان
۱	*			
۲	*	*		
۳	*		*	
۴	*			*
۵	*	*	*	
۶	*	*		*
۷	*		*	*
۸	*	*	*	*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۴۳-۲۹

pH همهٔ ارلن‌ها روی ۷ تنظیم شد و به آن‌ها یک درصد سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم مک‌فارلند تلقیح گردید. ارلن‌ها به مدت یک هفته در انکوباسیون ۲۵ درجه بدون شیک قرار گرفتند. پس از پایان فرایند انکوباسیون، همهٔ ارلن‌ها برای بررسی‌های کمی به‌کار رفتند و میزان تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین در آن‌ها به‌دست آمد. به‌اندازهٔ یکسان به همهٔ ارلن‌ها ۱۰ درصد حجم محیط کشت اتانول اضافه گردید و آن‌ها به مدت یک ساعت شیک شدند.

تریپتوفان یک اسید آمینهٔ حساس به دما است که استریل کردن آن به همراه سایر مواد در انکوباتور به تخریب ساختار این ماده منجر می‌شود؛ بنابراین، برای این ماده به‌صورت جداگانه، پس از خارج کردن محیط استریل‌شده از اتوکلاو، در کنار شعله و با حفظ شرایط آسپتیک زیر هود لامینار، تریپتوفان موردنیاز در آب مقطر حل گردید و سپس روی حرارت ملایم هم‌زده و با سرنگ و فیلتر سرسرنگی به محیط اضافه شد. باید توجه داشت که میزان آب مقطر اضافه‌شده به محیط از قبل در نظر گرفته‌شده بود و زمان تهیهٔ محیط کشت، از میزان آب مقطر استفاده‌شده کسر گردید و بعداً جبران شد. برای کنترل pH این محیط، با استفاده از سمپلر در کنار شعله نمونه‌برداری گردید و کاغذ pHسنج با این نمونه آغشته شد. تغییر رنگ حاصله میزان pH را مشخص می‌کرد (۱۳،۱۴). تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SPSS vol.22 صورت گرفت و معناداری داده‌ها در مقایسهٔ داده‌ها با استفاده از آزمون T-Test انجام شد.

بهینه‌سازی در محیط جامد: محیط کشت حاوی نوترینت آگار بر اساس دستورالعمل تهیه گردید. این محیط در ۵ ارلن تقسیم شد. ارلن شمارهٔ ۱ به‌عنوان شاهد، تنها حاوی محیط نوترینت آگار بود. ارلن شمارهٔ ۲ علاوه بر نوترینت آگار، حاوی ۱ درصد نمک سولفات منیزیم بود. به ارلن شمارهٔ ۳ با استفاده از سمپلر، ۱ درصد گلیسرول اضافه شد و تریپتوفان ارلن شمارهٔ ۴ پس از خروج از اتوکلاو، در شرایط آسپتیک و با استفاده از فیلترهای سرسرنگی استریل‌شده به محیط افزوده گردید. ارلن شمارهٔ ۵ شامل نوترینت آگار، نمک سولفات منیزیم ۱ درصد و گلیسرول ۱ درصد بود که اتوکلاو شد و پس از خروج، با فیلتر سرسرنگی تریپتوفان به آن اضافه و پیش از سرد شدن محیط درون پلیت‌ها توزیع گردید. پس از بسته شدن محیط درون پلیت، با استفاده از سوآپ استریل سطح پلیت کشت چمنی داده شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. مدت‌زمان انکوباسیون یک هفته بود (۱۵،۱۶).

روش استخراج رنگ؛ استخراج رنگ از محیط کشت براث: برای استخراج رنگ از سویهٔ *J. lividum* کشت‌شده در محیط براث، پس از کشت باکتری و پایان زمان انکوباسیون، به مدت یک هفته با رسیدن جذب به بالاترین نقطه در ۵۷۵ نانومتر عملیات استخراج انجام گرفت. برای استخراج رنگ از محیط مایع ابتدا لازم بود محیط کشت از بیوفیلم جدا شود که در محیط کشت شناور بود. البته با افزایش زمان کشت، این بیوفیلم ساختارش از بین می‌رود و یک‌دست و یک‌تکه مشاهده نمی‌شود و حتی ممکن است رنگ محیط به بنفش برود که این نشانهٔ کهنه شدن محیط است. در این صورت، برای استخراج رنگ به سانتریفوژ با دور بالاتر نیاز است (۱۷).

ارلن‌های حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت نوترینت براث غنی‌شده بودند. این ارلن‌ها با ۱ درصد باکتری تلقیح و یک هفته بدون شیک انکوبه گردید. بیوفیلم رنگی ایجادشده در سطح محیط، برای استخراج رنگ‌دانه به‌کار رفت. با رسیدن جذب به میزان مطلوب، ارلن‌ها خارج شد و داخل فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم گردید و درون دستگاه سانتریفوژ قرار گرفت. این فالکون‌ها با دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و رسوب حاصل برداشته و سوپرناتانت دور ریخته شد (۱۸،۱۹).

طبق روش رفرنس، به‌ازای هر گرم توده ۱۰ برابر الکل اضافه گردید و استخراج صورت گرفت. گفتنی است که الکل استفاده‌شده اتانول است. به رسوب حاصل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

۵۰ سی‌سی الکل اتانول اضافه شد و ورتکس گردید؛ سپس ارلن‌ها به حمام سونیک انتقال داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه با توان ۴۰ هرتز سونیکیشن گردید. در مرحلهٔ بعد، دوباره محلول داخل ارلن در فالکون‌های مخصوص دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار تقسیم شد و فالکون‌ها پیش از قرار دادن در دستگاه با ترازو وزن گردید و فالکون‌های هم‌وزن دوبه‌دو روبه‌روی هم درون روتور دستگاه چیده و درب آن بسته و تنظیمات دستگاه ازجمله اطلاعات مربوط به نوع روتور، میزان گشتاور ۱۳۰۰۰ و زمان ۱۵ دقیقه و دمای ۹ انجام شد (۱۳).

استخراج رنگ از محیط کشت جامد: برای استخراج رنگ از بیومس میکروبی حاصل از کشت سویه روی محیط نوترینت آگار در پلیت‌های یک‌بارمصرف، پس از پایان دورهٔ انکوباسیون، پلیت‌ها خارج و با استفاده از یک اسپاچول بیومس سطحی محیط که کاملاً رنگی و قطور بود، برداشته و درون یک ظرف شیشه‌ای مسطح مثل پلیت شیشه‌ای ریخته شد. بیومس برداشتی از سطح پلیت‌ها حالت خمیری داشت و میزان رطوبت آن بسیار کمتر از حالت کشت مایع بود و درواقع، یک مرحله سانتریفوژ در این حالت حذف و مقدار تودهٔ رنگی به‌دست‌آمده بسیار بیشتر بود. این ظرف شیشه‌ای برای خشک شدن توده و از بین رفتن رطوبت، درون آون با دمای ۶۰ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از آن، ظرف خارج و تودهٔ خشک‌شدهٔ کف ظرف شیشه‌ای تراشیده و داخل یک هاون ریخته شد. با استفاده از هاون بیومس به دست‌آمده به‌خوبی ساییده گردید؛ سپس به‌ازای هر گرم پودر بیومس ۱۰ سی‌سی اتانول خالص به ارلن اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه با توان ۴۰ هرتز در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و سونیکیشن انجام گردید. این محلول‌ها به فالکون‌های مخصوص سانتریفوژ یخچال‌دار منتقل شد و مانند آنچه در مرحلهٔ استخراج مایع انجام شده بود، سانتریفوژ گردید و محلول رنگی از رسوب سفیدرنگ جدا شد (۱۹).

مقایسهٔ میزان تولید رنگ در محیط مایع و جامد و روش تعیین غلظت رنگ: برای سنجش غلظت رنگ‌دانه در محلول از ضریب خاموشی (Extinction Coefficient) استفاده گردید (۲۰). ضریب خاموشی عددی است که برای هر ترکیب منحصربه‌فرد است و با محاسبهٔ آن می‌توان نوع و خلوص آن ترکیب را ارزیابی کرد. با استفاده از ضریب خاموشی رنگ ویولاسئین و میزان جذب خوانده‌شده اسپکتوفتومتری در طول‌موج ۵۸۵، میزان غلظت رنگ حاصل در کشت جامد ۰/۲۴۳ و در محیط کشت مایع ۰/۰۵ بود.

ضریب خاموشی: $A=\varepsilon.B.C$

A. جذب خوانده‌شده؛ ε. ضریب خاموشی؛ B. قطر کووت؛ C. غلظت رنگ

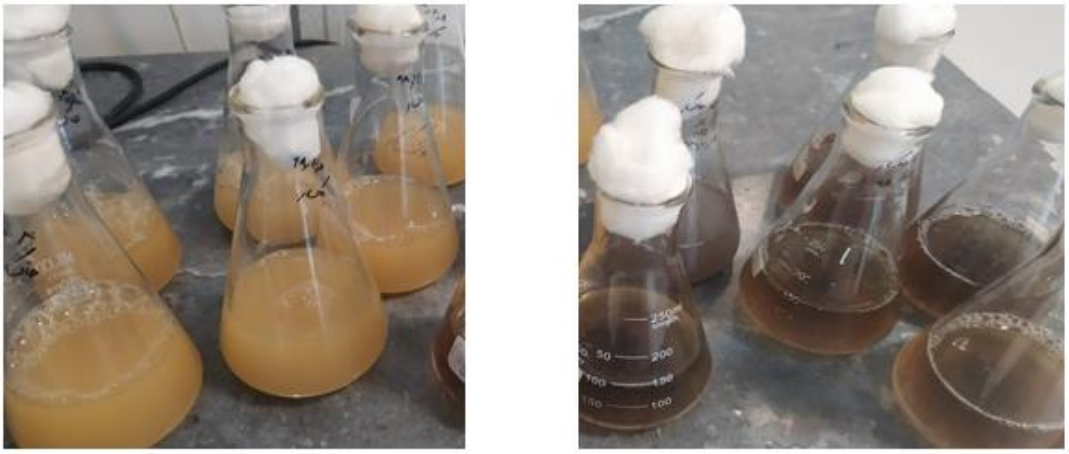
بررسی طیف رنگی و مقاومت رنگ ویولاسئین در pHهای مختلف: در بررسی‌های انجام‌گرفته برای تونالیتهٔ رنگ ویولاسئین و مقاومت این رنگ در برابر تغییرات pH که در فرایند رنگرزی امری مهم محسوب می‌شود، این روش صورت گرفت. بدین‌سان غلظت برابر از محلول رنگی ویولاسئین تهیه شد. این محلول حاوی رنگ‌دانهٔ ویولاسئین و الکل اتانول به‌عنوان حلال بود؛ سپس در ۱۴ لوله توزیع گردید. لوله‌ها از ۱ تا ۱۴ شماره‌گذاری شد. با استفاده از دستگاه pHسنج و محلول ۱ مولار NaoH و Hcl، pH لوله‌ها تنظیم گردید. لوله‌ها به‌ترتیب چیده شد و تغییرات تونالیتهٔ رنگ از حالت اسیدی تا بازی بررسی گردید. علاوه بر این، برای بررسی مقاومت رنگ ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفت و دوباره تغییرات رنگ بررسی شد (۱۰).

یافته ها

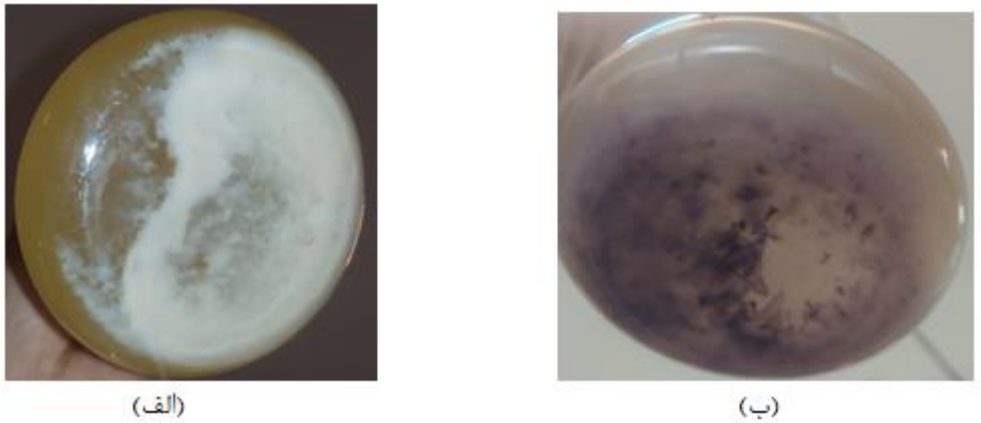
بهینه‌سازی در محیط مایع؛ اثر حذف هوادهی در روند تولید بیوفیلم رنگی از باکتری و تولید ویولاسئین: برای بررسی اثر هوادهی رشد بیشتر و تولید بالاتر رنگ‌دانه، پس از دورهٔ انکوباسیون، دو دسته ارلن مشاهده گردید که همان‌گونه که در شکل شمارهٔ ۱ دیده می‌شود، ارلن‌های دستهٔ الف در حالت شیکر انکوباتور قرار

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۴۳-۲۹



شکل شمارهٔ ۱. ارلن‌های کشت داده‌شده در شیکر انکوباتور و در حالت بدون شیک و بررسی اثر هوادهی در تولید رنگ‌دانه



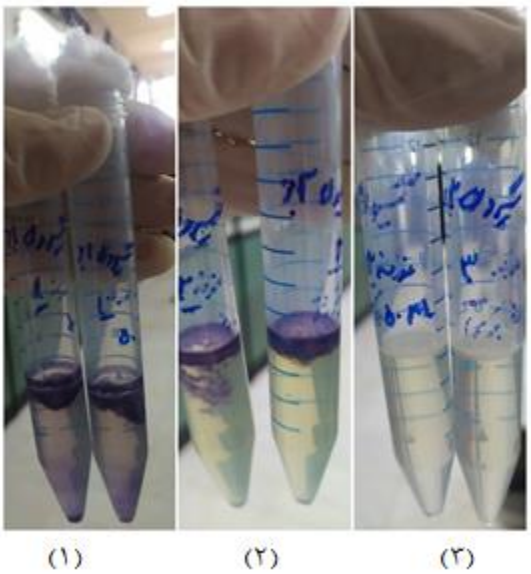
شکل شمارهٔ ۲. پلیت‌های کشت داده‌شده در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (الف) و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد (ب) برای بررسی اثر دما در تولید رنگ‌دانه

داشته‌اند که تنها منجر به افزایش کدورت در محیط شده است و رنگ‌دانه‌ای مشاهده نشد. در ارلن‌های دستهٔ ب که در انکوباتور ساده قرار داده‌شده بودند و هوادهی نداشتند، بیوفیلم رنگی تشکیل‌شده است. با توجه به اینکه تولید شدن یا نشدن رنگ‌دانه در اثر هوادهی، از نظر کیفی قابل‌ردیابی و اثبات است، تجزیه‌وتحلیل آماری مدنظر قرار نگرفت.

اثر دما بر میزان تولید ویولاسئین: با توجه به اختلافاتی که در میزان دمای مناسب و اثر آن بر تولید رنگ‌دانه وجود داشت، در دو پلیت انکوبه‌شده در انکوباتور ۲۵ و ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد پس از یک هفته مشاهده شد که در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد با وجود رشد اندکی که در سطح پلیت مشاهده گردید؛ اما رنگ‌دانه‌ای تولید نشده بود (شکل شمارهٔ ۲ الف)؛ اما در پلیت دوم که در انکوباسیون ۲۵ درجه انکوبه شده بود، کلنی‌های بنفش‌رنگ قابل‌مشاهده بود (شکل شمارهٔ ۲ ب). با توجه به اینکه تولید شدن یا نشدن رنگ‌دانه از نظر کیفی قابل‌ردیابی و اثبات است، تجزیه‌وتحلیل آماری مدنظر قرار نگرفت.

نتایج اثر غلظت گلیسرول بر تولید رنگ‌دانه: دربارهٔ اثر غلظت گلیسرول بر تولید رنگ‌دانه مشاهده شد که میزان غلظت گلیسرول در فالکون‌های مربوطه متفاوت بود و به‌ازای هر غلظت ۲ فالکون استفاده گردید تا در صورت بروز خطا قابل‌تشخیص باشد؛ بنابراین، فالکون شمارهٔ ۱ حاوی ۱ درصد، فالکون شمارهٔ ۲ حاوی ۲ درصد و فالکون شمارهٔ ۳ حاوی ۳ درصد گلیسرول بودند. همان‌گونه که در شکل شمارهٔ ۳ مشاهده می‌شود، بیوفیلم تشکیل‌شده در هر ۳ دسته وجود دارد؛ اما قطر این بیوفیلم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]



شکل شمارهٔ ۳. بررسی اثر غلظت گلیسرول بر روند تولید بیوفیلم رنگی

در فالکن‌های شمارهٔ ۱ بیشتر از شمارهٔ ۲ است و قطر بیوفیلم در فالکن شمارهٔ ۳ بسیار نازک‌تر و کمتر است، علاوه بر اینکه رنگ‌دانهٔ بنفش در آن دیده نمی‌شود. معناداری این نتایج با آزمون T-Test در سطح ۵ درصد نیز تأیید گردید. در این دسته حتی کدورت محیط هم به‌شدت سایرین نیست و شفاف‌تر است. این فالکون‌ها به مدت یک هفته در یخچال قرار گرفتند و دیده شد که فالکون شمارهٔ ۱ بیشتر از سایرین حاوی بیوفیلم بود و رنگ در محیط کشت پخش گردید و محیط رنگی ایجاد شد.

بنابراین طبق نتایج به‌دست‌آمده، بهترین غلظت گلیسرول برای تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین، محیط نوترینت براث حاوی یک درصد گلیسرول است.

بررسی اثر گلیسرول، سولفات سدیم و تریپتوفان در بهینه‌سازی تولید: برای این آزمایش، ارلن‌های استفاده‌شده تا ۸ شماره‌گذاری شده بودند. این ارلن‌ها طبق مقادیر اعلامی در جدول شمارهٔ ۳ حاوی گلیسرول، سولفات منیزیم و تریپتوفان به‌عنوان عوامل مؤثر در بهینه‌سازی محتویات محیط کشت تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین انتخاب‌شده بودند. پس از کشت سویه و پایان انکوباسیون، طبق نتایج مندرج در جدول شمارهٔ ۳، اعداد به‌دست‌آمده ۸ برابر شدند. به علت کدورت بالای محلول‌های رنگی حاصل، دستگاه اسپکتوفتومتر عدد واقعی را در جذب ۵۸۵ نانومتر نمایش نمی‌داد؛ بنابراین، محلول رنگی تا یک‌هشتم

جدول شمارهٔ ۲. نتایج اسپکتوفتومتری محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف گلیسرول

	فالکون شمارهٔ ۱	فالکون شمارهٔ ۲	فالکون شمارهٔ ۳
جذب	۲/۶۴	۱/۹۸	۰/۹۵

جدول شمارهٔ ۳. نتایج اسپکتوفتومتری محیط کشت مایع بهینه‌سازی‌شده با گلیسرول، سولفات منیزیم و تریپتوفان

شمارهٔ ارلن	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
جذب	۰/۵۷	۱/۵۶	۰/۸۹	۱/۷۴	۱/۶۱	۲/۵۲	۱/۸۵	۲/۶۰
میزان رنگ رقیق‌شده	۰/۰۰۷	۰/۰۲۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۲۳	۰/۰۲۱	۰/۰۳۴	۰/۰۲۵	۰/۰۳۵
میزان رنگ	۰/۰۵۶	۰/۱۶۹۶	۰/۰۹۶	۰/۱۸۴	۰/۱۶۸	۰/۲۷۲	۰/۲	۰/۲۸

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۴۳-۲۹

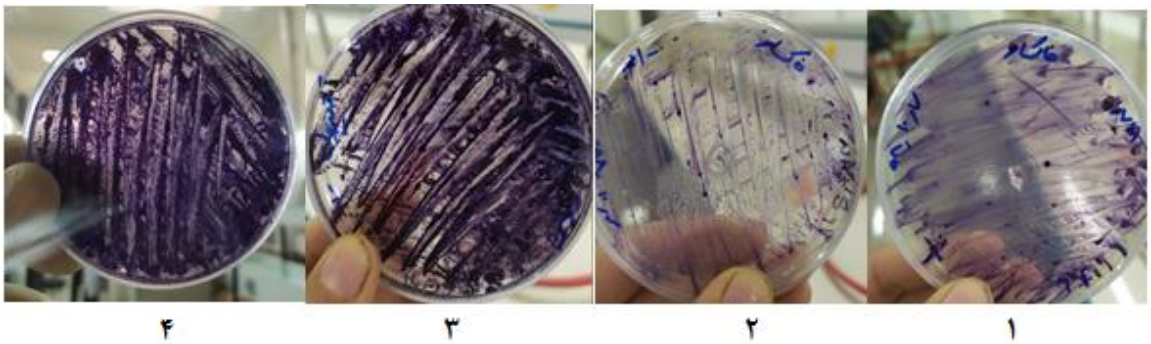
رقیق شد. بر اساس این، اعداد به‌دست‌آمده در فرمول ضریب خاموشی رنگ‌دانه ویولاسئین قرار داده شد و میزان رنگ تولیدی مشخص گردید؛ سپس اعداد در ۸ ضرب شدند تا رقت اصلی به‌دست آید. طبق این اعداد، نمک سولفات منیزیم برخلاف انتظار، تأثیر چشم‌گیری در روند تولید نداشت و استفادهٔ آن به‌تنهایی و حتی به همراه گلیسرول و تریپتوفان میزان تولید رنگ را افزایش فراوانی نداد و نسبت به گلیسرول و تریپتوفان، در روند بهینه‌سازی ضعیف عمل کرد؛ اما استفاده از تریپتوفان به‌عنوان محرک بسیار قوی و مناسب توانسته بود میزان تولید را حدوداً ۳ برابر افزایش دهد. در ارتباط با گلیسرول هم به‌عنوان یک منبع کربن اضافه توانستیم میزان تولید را افزایش دهیم. علاوه بر این، با نداشتن تأثیر چشمگیر سولفات منیزیم، استفاده از گلیسرول و تریپتوفان نیز بسیار مؤثر بود و حتی در ارلن ۸ مشاهده شد که میزان تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین و تودهٔ رنگی سلولی حدوداً ۵ برابر افزایش‌یافته است. معناداری این نتایج با آزمون T-Test در سطح ۵ درصد نیز تأیید شد.درنهایت، از محیط کشت نوترینت براث آماده ۸ گرم در یک لیتر استفاده گردید و به‌ازای هر ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت نوترینت براث، ۱ گرم پودر تریپتوفان، ۱ سی سی گلیسرول و ۱ گرم سولفات منیزیم به‌کار رفت. از ترکیبات این محیط بهینه‌سازی‌شده نسبت به میزان مصرف و مقدار محیط موردنیاز نسبت گرفته شد (جدول شمارهٔ ۴).

بهینه‌سازی در محیط جامد: همسو با نتایج بهینه‌سازی در محیط جامد، در شکل شمارهٔ ۴ مشاهده می‌گردد که میزان و رشد در محیط نوترینت آگار مناسب، ولی تولید رنگ‌دانه بسیار ضعیف است. در پلیت شمارهٔ ۲ که حاوی سولفات منیزیم است، دیده می‌شود که تأثیر چندانی در افزایش تولید و حتی افزایش رشد باکتری نداشته است؛ اما وجود گلیسرول در پلیت شمارهٔ ۳ نشان‌دهندهٔ تأثیر فوق‌العادهٔ این ماده در روند تولید ویولاسئین است. در پلیت شمارهٔ ۴ نیز از تریپتوفان به‌عنوان محرک در تولید بیشتر ویولاسئین استفاده شد که میزان بیشتر رنگ کلنی‌ها و تیره‌تر بودن آن‌ها نمایان است. گفتنی است که محیط استفاده‌شده برای تلقیح حاوی غلظت ۱۰۸ ×۱/۵ سلول باکتری *جانتینوباکتریوم لیویدوم* بوده است.

چون طبق استاندارد نیم مک‌فارلند عمل کرده و میزان غلظت باکتری تلقیح شده در همهٔ پلیت‌ها یکسان بوده

جدول شمارهٔ ۴. ترکیبات محیط کشت بهینه‌سازی‌شده برای تولید رنگ

ردیف	ترکیبات	مقدار
۱	محیط کشت نوترینت براث	۸ گرم
۲	تریپتوفان	۱ درصد
۳	گلیسرول	۱ درصد
۴	سولفات منیزیم	۱ درصد
۵	آب مقطر	۱ لیتر
۶	pH	۷/۴ ± ۰/۲



۴ ۳ ۲ ۱

شکل شمارهٔ ۴. بررسی اثر محیط کشت جامد بهینه‌سازی‌شده با گلیسرول، سولفات منیزیم و تریپتوفان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

شکل شمارهٔ ۵. تأثیر بهینه‌سازی محیط بر میزان تولید بیومس میکروبی

است، استفادهٔ هم‌زمان گلیسرول و تریپتوفان در محیط کشت جامد افزایش چند برابر تولید سلول را بیان می‌کند که از این محیط برای تولید رنگ‌دانه در این پروژه استفاده‌شده است. سولفات منیزیم برخلاف تحقیقات پیشین، در محیط جامد هم تغییرات مطلوبی ایجاد نکرد؛ بنابراین، برای تولید استفاده نشد و از دستورالعمل بهینه‌سازی حذف گردید.

با توجه به میزان تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین در محیط مایع، بهینه‌سازی محیط کشت در محیط جامد هم مثل مایع انجام شد که مشاهده گردید میزان تولید در محیط جامد نسبت به محیط مایع از بازدهی بالاتر و کیفیت بیشتری برخوردار است (شکل شمارهٔ ۵). البته برای جداسازی بیومس از سطح آگار نسبت به جداسازی توده از محیط مایع با سانتریفوژ در دور بالا اقدام شد که این روش به‌آسانی انجام می‌شود؛ اما در حجم‌های بالا فرایند طولانی‌مدتی است. در میان محیط‌های جامد، نوترینت آگار بهینه‌شده با یک درصد گلیسرول و تریپتوفان بهترین و بیشترین تودهٔ بیومس رنگی را تولید کرد. از هر ۸ پلیت در این حالت، حدود ۲ گرم بیومس با رطوبت پایین برداشت شد که نسبت به محیط مایع این میزان چشمگیر است.

استخراج رنگ: روش‌های مختلفی برای استخراج رنگ‌دانهٔ طبیعی از میکروارگانیسم‌ها وجود دارد که بسته به نوع ترکیب رنگ‌دانه، این روش‌ها متفاوت‌اند. علاوه بر این، نوع ارگانیسم نیز در نحوهٔ استخراج بسیار مؤثراست. بهترین حلال برای استخراج رنگ‌دانهٔ ویولاسئین طبق ارجاعات و مطالعات پیشین اتانول بیان‌شده بود که در این روش استفاده گردید و پس از انحلال رنگ‌دانه در این حلال الکلی، از عصارهٔ سلول استخراج انجام گرفت.

استخراج رنگ از محیط کشت براث: طبق آنچه بیان شد، رنگ‌دانهٔ استخراج‌شده از کشت مایع پس از ۲ مرحله سانتریفیوژ، درنهایت، با برداشت محلول رنگی و فاز سوپرناتانت به‌دست آمد. این محلول رنگی قابلیت استفاده به‌صورت مایع را دارد. علاوه بر این، با جداسازی حلال به‌صورت پودر نیز قابلیت مصرف دارد.

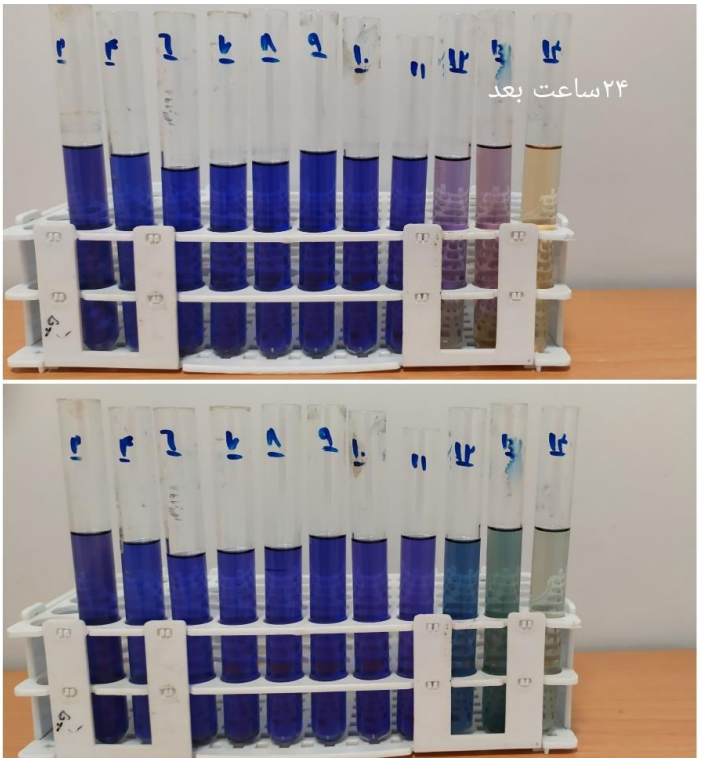
استخراج رنگ از محیط کشت جامد: در استخراج رنگ‌دانه از محیط جامد، ازآنجایی‌که بیومس میکروبی از سطح پلیت جمع‌آوری می‌شود، میزان رطوبت بسیار کمتری دارد و به سانتریفیوژ و جداسازی سویه از محیط کشت نیاز نیست؛ بنابراین، تنها یک مرحله در این روش سانتریفیوژ انجام شده است. علاوه بر این، در این روش میزان بیومس به‌دست‌آمده بیشتر بود و به حدود ۱۰-۵ گرم بیومس رنگی از هر پلیت رسید. این بیومس با خشک شدن و حذف رطوبت اضافی و استفاده از روش‌های فیزیکی طبق آنچه در بخش قبل بیان گردید، قابلیت ساییده شدن و قرار گرفتن در یک فشار بیشتر برای شکستن دیوارهٔ سلولی و حساس کردن آن را دارد. در این روش، استفاده از اولتراسونیک بسیار مؤثر بود و رسوب به‌دست‌آمده به هیچ رنگی آغشته نبود و کاملاً رنگ از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۴۳-۲۹

عصاره خارج‌شده بود. پس از پایان اولتراسونیک، محلول رنگی به‌دست‌آمده که تودهٔ سفیدرنگی است، درواقع همان باکتری‌های کشته‌شده‌ای بودند که رنگ‌دانهٔ خود را از دست داده‌اند. این رسوب با یک مرحله سانتریفیوژ از محلول رنگی جداسازی شد.

بررسی تغییرات رنگ ویولاسئین در pHهای مختلف: تغییر رنگ برای رنگ ویولاسئین استخراج‌شده از باکتری *J. lividum* در pHهای ۲ تا ۱۴ بررسی گردید. شکل شمارهٔ ۶ تغییر رنگ حاصله را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، در pHهای اسیدی ۲ الی ۶ رنگ به فام بنفش و در pHهای قلیایی بالاتر از pH=10 به رنگ مایل به آبی و سرمه‌ای است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، تغییرات رنگی محسوسی در pH کمتر از ۱۰ دیده نشد و مشخصاً رنگ ویولاسئین در برابر تغییرات pH مقاومت داشت و تغییرات رنگ در سطح بنفش باقی می‌ماند؛ اما هنگامی‌که بیش از ۲۴ ساعت در pH قرار گرفت، مشاهده گردید که رنگ در pH بالاتر از ۱۰ که تغییر کرده بود، از حالت سرمه‌ای خارج و به رنگ زرد درآمد. بر اساس این، رنگ ویولاسئین پس از گذشت ۲۴ ساعت، در pH قلیایی بالاتر از ۱۰ تخریب می‌شود؛ اما تغییرات رنگ در pH قلیایی کمتر از ۱۰ و حتی در حالت اسیدی اندک و یا ثابت است.



شکل شمارهٔ ۶. تغییرات رنگ ویولاسئین در pHهای مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

طیف خواص بیولوژیکی این ماده بسیار بالا است و اثرگذاری آن بر باکتری‌ها، قارچ و ویروس، اهمیت این ماده را صدچندان کرده است (۷). امروزه استفاده از چنین مواردی که به کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر شوند و بتوانند سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را از بین ببرد، بسیار حائز اهمیت است (۲۱،۲۲).

طرح‌هایی هم برای افزایش بازدهی و تولید بالاتر ویولاسئین انجام‌شده که با بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط تولید شروع گشته است (۲۲) که در این طرح نیز ما با افزایش و بهبود ترکیب محیط کشت و حفظ شرایط بهینهٔ تولید، به تولید ویولاسئین با بازدهی بالاتر اقدام کرده‌ایم.

در مطالعه‌ای، از منابع ازت آلی و نیترات پتاسیم به‌عنوان ازت معدنی و از سولفات منیزیم به‌عنوان نمک

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

معدنی و از گلوکز و ساکارز به‌عنوان منبع کربن برای بهینه‌سازی استفاده شد که به این نتیجه رسیدند که منابع کربن و ازت استفاده‌شده اثر فراوانی در بهینه‌سازی نداشتند؛ اما وجود سولفات منیزیم اثر بسیاری داشت (۱۵).

اثر استفاده از گلیسرول به‌عنوان منبع کربن اضافی، بر تعداد CUF باکتری‌ها و افزایش تولید ویولاسئین در این نمودار قابل‌مشاهده است. همان‌طور که دیده می‌شود، در این نمودار اثر مهاری گلوکز و تحریکی گلیسرول نمایش داده‌شده است. در این بررسی میزان تولید اگزو پلی ساکارید مؤثر در ایجاد حالت بیوفیلمی، در صورت وجود گلیسرول، هشت برابر بیشتر از منبع گلوکز بود (۲۳). در مطالعهٔ حاضر، مصرف میزان ۱ درصد گلیسرول به‌عنوان مقدار بهینه در تولید بیشتر ویولاسئین در کنار سایر شرایط کشت توصیه گردید.

علاوه بر گلیسرول که نوعی منبع کربن اضافی در محیط کشت محسوب می‌شود، استفاده از غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز مثل گلیسرول در افزایش تولید ویولاسئین مؤثر بوده است. این آنتی‌بیوتیک به‌عنوان یک عامل تنش‌زا در محیط به‌شمار می‌آید (۲۳).

در مطالعهٔ دیگری، سویهٔ *J. lividum* برای بررسی تأثیر دما بر میزان رشد باکتری و متعاقباً رنگ‌دانهٔ تولیدشده، در محدودهٔ ۳۵-۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد کشت داده شد و مشخص گردید که دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد بهترین و مناسب‌ترین دما است که بیشترین بازدهی را از نظر میزان تودهٔ سلولی و رنگ‌دانهٔ تولیدی دارد و به طورکلی، دمای ۲۵-۲۰ درجه برای رشد مناسب و ۳۵-۳۰ درجه دمای مهاری محسوب می‌شود (۱۵). در تحقیق حاضر مشخص شد که در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، با وجود رشد اندکی که در سطح پلیت مشاهده گردید، ولی رنگ‌دانه‌ای تولید نشده بود؛ اما در پلیت دوم که در انکوباسیون ۲۵ درجه انکوبه شده بود، کلنی‌های بنفش‌رنگ قابل‌مشاهده بود.

در مطالعه‌ای برای یافتن بهترین pH با استفاده از بافر محدودهٔ ۹-۵ تغییرات در محیط کشت ایجاد شد و همان‌طور که مشاهده می‌شود، بهترین pH برابر ۷ و میزان تولید ویولاسئین ۳/۸ برابر بیشتر از pHهای ۶ و ۸ است و در pHهای ۵ یا ۹ میزان رشد باکتری کم و رنگ‌دانه‌ای مشاهده نگردید؛ بنابراین، بهترین pH برای تولید ویولاسئین ۷ است (۲۴). در مطالعهٔ حاضر آزمون پایداری رنگ‌دانه در برابر pH بیانگر این بود که pH مطلوب ۷، در تنها دمای مناسب برای تولید رنگ ویولاسئین در این سویه ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد است. پس از آن، رنگ‌دانه استخراج و پودر رنگ تهیه شد؛ همچنین در محلول‌ها و طی فرایند بهینه‌سازی، غلظت رنگ تولیدی هم به‌دست آمد و بررسی گردید. آزمون پایداری رنگ‌دانه در برابر pH هم بررسی شد. رنگ بنفش حاصل از این رنگ‌دانه در pHهای اسیدی به مدت طولانی پایدار بود. این پایداری تا pH=11 وجود داشت و پس از آن، مشخصاً ساختار رنگ تخریب و شکسته شد و با برگشت pH، قادر به بازیابی رنگ اولیه نخواهیم بود.

میزان تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین از سویهٔ *J. lividum* در شرایط بهینه در کشت به‌طور میانگین در این طرح، ۰/۲۴ گرم بر لیتر است. این میزان تولید در محیط‌های کشت جامد و در محیط کشت مایع بدون شیک در ابعاد صنعتی که میزان تولید بالاتر در حجم کمتر از محیط کشت، از لحاظ ابعاد اقتصادی ارزیابی می‌شود، اهمیت دارد و تلاش بر این خواهد بود که این میزان حتی از مقدار به‌دست‌آمده نیز بیشتر باشد و میزان بهینه‌تری از رنگ‌دانه تولید و برای استفاده مصرف گردد.

در تحقیق حاضر در نتیجهٔ آزمایش‌های هوادهی مشاهده شد که بیوفیلم‌هایی که در سطح قرار داشتند و به دیواره‌های ارلن شیشه‌ای متصل بودند، با تکان دادن آن از شیشه کنده و در محیط رها می‌شدند. در صورت کهنه شدن کشت، بیوفیلم‌ها از حالت چسبندگی و یک‌تکه بودن خارج و رنگ‌دانه در محیط پخش می‌گردید؛ بنابراین طبق این رویداد، هوادهی برای افزایش رشد و میزان کدورت سویه در محیط مناسب بود؛ اما برای تولید رنگ‌دانه توصیه نمی‌شود. درواقع، نبودِ هوادهی این سویهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۴۳-۲۹

هوازی به‌نوعی شرایط تنش‌زا برای باکتری به‌شمار می‌آید و به ایجاد بیوفیلم رنگی و اتصال آن به سطح شیشه‌ای ارلن و سطح رویی ارلن و تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین توسط این سویهٔ باکتریایی و تولید رنگ‌دانهٔ ویولاسئین منجر می‌گردد.

علاوه بر این، روش‌های استخراج رنگ عادی به بررسی بیشتر نیاز دارد و لازم است اصلاح گردد؛ زیرا استفاده از سانتریفوژ و چندین مرتبه الکل از لحاظ زیستی و ایمنی نادرست است و بار زیست‌محیطی خواهد داشت. در این طرح، در بخش استخراج رنگ‌دانه سعی بر این شد که روش‌های جدیدِ استخراج بررسی و استفاده گردد. خشک کردن بیومس میکروبی جمع‌آوری‌شده از سطح پلیت‌های بهینه‌شده و پس از آن، برداشت این بیومس و خشک نمودن و سپس اضافه کردن روش‌های فیزیکی مانند ساییدن این بیومس خشک‌شده و پس از آن، اولتراسونیک مراحل استخراج را کاهش داد.

البته بررسی‌هایی هم برای کشت در محیط مایع انجام شد و مشاهده گردید که برای تشکیل بیوفیلم رنگی، محیط بدون شیک باید انکوبه گردد؛ در غیر این صورت، با افزایش کدورت در محیط کشت، میزان رنگ تولیدی اندک و روند تولید بیوفیلم رنگی طولانی‌تر خواهد بود؛ اما با وجود این، میزان تولید بیومس و رنگ در محیط جامد از محیط مایع بسیار بیشتر بود.

متابولیت‌های ثانویه پس از رشد میکروارگانیسم‌ها شروع به تولید می‌کنند. تولید رنگ‌دانه در محیط‌های کشت پایه در حالت براث و آگار بررسی شد و برای افزایش بازدهی تولید، از شرایط بهینهٔ تولید استفاده گردید. نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی ۰/۳ درصد عصارهٔ گوشت و ۰/۵ درصد پپتون، ۱ درصد گلیسرول و ۱ درصد تریپتوفان روی محیط کشت جامد حاوی نوترینت آگار، به‌عنوان بهترین محیط کشت برای تولید انتخاب شد. در مواردی از سولفات منیزیم نیز برای بهبود محیط کشت و تولید رنگ استفاده گردید که تغییر چشمگیری در میزان تولید رنگ نداشت.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در انجام این مطالعه همکاری نموده اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع در اجرای این پژوهش وجود نداشته است.

References

1. Valdes N, Soto P, Cottet L, Alarcon P, Gonzalez A, Castillo A, et al. Draft genome sequence of *Janthinobacterium lividum* strain MTR reveals its mechanism of capnophilic behavior. Stand Genomic Sci 2015;10:1-10. doi: 10.1186/s40793-015-0104-z
2. Pauer H, Hardoim CCP ,Teixeira FL, Miranda KR, Barbirato DdS, Carvalho DPd, et al. Impact of violacein from *Chromobacterium violaceum* on the mammalian gut microbiome. PloS one 2018; 13:e0203748. doi: 10.1371/journal.pone.0203748
3. O'Brien K, Perron GG, Jude BA. Draft genome sequence of a red-pigmented *Janthinobacterium sp.* native to the Hudson Valley watershed. Genome Announc 2018;6:e01429-17. doi: 10.1128/genomeA.01429-17
4. Baricz A, Teban A, Chiriac CM, Szekeres E, Farkas A, Nica M, et al. Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. Sci Rep 2018;8:1-12. doi: 10.1038/s41598-018-33691-6
5. Ferro P, Vaz-Moreira I, Manaia CM. Betaproteobacteria are predominant in drinking water: are there reasons for concern? Crit Rev Microbiol 2019;45:649-67. doi: 10.1080/1040841X.2019.1680602
6. Schloss PD, Allen HK, Klimowicz AK, Mlot C, Gross JA, Savengsuksa S, et al. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. DNA Cell Biol 2010;29:533-41. doi: 10.1089/dna.2010.1020
7. Woodhams DC, LaBumbard BC, Barnhart KL, Becker MH, Bletz MC, Escobar LA, et al. Prodigiosin, violacein, and volatile organic compounds produced by widespread cutaneous bacteria of amphibians can inhibit two Batrachochytrium fungal pathogens. Microb Ecol 2018; 75: 1049-62 doi: 10.1007/s00248-017-1095-7
8. Rokade MT, Pethe AS. Isolation, identificatio, extraaction and production of antibacterial violacein pigment by psychrotrophic bacterium MTR17 strain. J Glob Biosci 2017;6:5077-83. doi: 10.1155/2015/465056
9. Jones JA, Toparlak ÖD, Koffas MA .Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. Curr Opin Biotechnol 2015;33:52-9. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.013

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]

10. Arif S, Batool A, Khalid N, Ahmed I, Janjua HA. Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. RSC adv 2017;7:4468-78. doi: 10.1039/C6RA25806A
11. Khaksar F, Rigi G, Mirdamadian SH. Creation of a violacein pigment hybrid with silver and titanium dioxide nanoparticles to produce multifunctional textiles with antimicrobial properties. Nanomed Res J 2021;6:60-72. doi: 10.22034/nmrj.2021.01.007
12. Khairy M, Kamal R, Mousa M. Anti-microbial and methylene blue dye adsorption properties of cotton fabrics modified with TiO2, Fe, Ag-doped TiO2, and graphene oxide nanomaterials. Textile Res J 2021:00405175211066148. doi: 10.1177/00405 175211066148
13. Palukurty MA, Darsi GM, Somalanka SR. Effect of Aeration on Growth and Production of Violacein by Chromobacterium violaceum using a Bubble Column Reactor. 2019; 47, 777-780. doi: 10.3390/antiox11050849
14. Masuelli L, Pantanella F, La Regina G, Benvenuto M, Fantini M, Mattera R, et al. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. Tumor Biol 2016;37:3705-17. doi: 10.1007/s13277-015-4207-3
15. Kanelli M, Mandic M, Kalakona M, Vasilakos S, Kekos D, Nikodinovic-Runic J, et al. Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties. Front Microbiol 2018;9:1495. doi: 10.3389/fmicb.2018.01495
16. Choi SY, Lim S, Yoon K-h, Lee JI, Mitchell RJ. Biotechnological Activities and Applications of Bacterial Pigments Violacein and Prodigiosin. J Biol Eng 2021;15:1-16. doi: 10.1186/s13036-021-00262-9
17. Kim Y, Choi J. Dyeing properties of microbial prodiginine from *Zooshikella rubidus* for silk fabrics. Fiber Polym 2015;16:1981-7. doi: 10.1007/s12221-015-5211-3
18. Uddin F. Environmental hazard in textile dyeing wastewater from local textile industry. Cellulose 2021;28:10715-39. doi: 10.1007/s10570-021-04228-4
19. Aye AM, Bonnin-Jusserand M, Brian-Jaisson F, Ortalo-Magné A, Culioli G, Nevry RK, et al. Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Microbiol 2015;161:2039-51. doi: 10.1099/mic.0.000147
20. Subramanian P, Gurunathan J. Differential production of pigments by Halophilic bacteria under the effect of salt and evaluation of their antioxidant activity. Appl Biochem Biotechnol 2020;190:391-409. doi: doi: 10.1007/s12010-019-03107-w
21. Sadowska JM ,Genoud KJ, Kelly DJ, O'Brien FJ. Bone biomaterials for overcoming antimicrobial resistance: Advances in non-antibiotic antimicrobial approaches for regeneration of infected osseous tissue. Materials Today 2021: 136-54. doi: 10.1016/j.mattod.2020.12.018
22. Gulzar T, Farooq T, Kiran S, Ahmad I, Hameed A. The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology. Elsevier 2019; 1-20. doi: 10.1016/C2017-0-01957-2
23. Wu X, Kazakov AE, Gushgari-Doyle S, Yu X, Trotter V, Stuart RK, et al. Comparative Genomics Reveals Insights into Induction of Violacein Biosynthesis and Adaptive Evolution in Janthinobacterium. Microbiol Spectr 2021;9:e01414-21. doi: 10.1128/Spectrum.01414-21
24. Kuzyk SB, Pritchard AO, Plouffe J, Sorensen JL, Yurkov V. Psychrotrophic violacein-producing bacteria isolated from Lake Winnipeg, Canada. J Great Lakes Res 2021; 47: 715-24. doi: 10.1016/j.jglr.2020.04.008

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-08-16]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.2.5]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.29]