

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

¹Microbiology Department, Biology & Center of Phylogeny of Organisms Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

²Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Centre (IBRC), Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

Correspondence

Address: Soil Science Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Daneshkadeh Street, Karaj, Iran.
Postal Code: 31587-77871
Phone: +98 (26) 32231787
Fax: -
pourbabaee@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 determined by purification of bands by Thin Layer Chromatography (TLC) and analysis by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Findings Forty-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 2054 μ g/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

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

احمدعلی پوریبائی * 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 میکروارگانیسم‌ها، 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 میکروارگانیسم‌ها 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 ۶۰۰ نانومتر آنالیز شدند. میزان کل کاروتنوئید در طول موج ۴۹۰ نانومتر 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 ۲۰۵۴/۰۵ میکروگرم 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 ۴۹۵ نانومتری با دو شانه در ۵۳۰ و ۴۶۵ نانومتر را به‌عنوان حداکثر جذب نشان داد که مشابه طیف مرئی در نور فرابنفش حاصل از آلفا-باکتریوروبرین بود. جدایه M24، ۹۸٪ با سویه *هالورکولا 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 *هالورکولا 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 ارگانیسم‌ها مانند گیاهان، قارچ‌ها، مخمرها، جلبک‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات آب‌گریز، در غشای فتوسنتزی یا غشای سلولی ارگانیسم‌های 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].

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

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 میلیارد 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 ۱۰۰ میلیون تُن کاروتنوئید تولید می‌کنند. تولید β- کاروتن از قارچ *بلیکسلایا تریسپورا* (*Blakeslea trispora*) و جلبک *دونالیلا سالینا* (*Dunaliella salina*) و نیز تولید آستاگزانتین از مخمر *فافیا رودوزیما* (*Phaffia rhodozyma*) و جلبک *هماتوکوس پلویوالیس* (*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، غیربیماری‌زا بودن این باکتری‌ها و گسترش فراوان در اکوسیستم‌های شور اعم از محیط‌های شور آبی و خشکی، موجب اهمیت صنعتی این میکروارگانیسم‌ها 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، شوره‌ها و رسوبات در ظروف شیشه‌ای در بسته 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 آب مقطر تعیین شد. نمونه‌ها در محل به محیط‌های مایع استریل تلقیح و طی ۱۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

برای جداسازی میکروارگانیسم‌های 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): ۸۱ گرم بر لیتر سدیم کلرید، ۹/۷ گرم بر لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۷ گرم بر لیتر $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۳/۶ گرم بر

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 به همراه ۵۰ سی‌سی آب نمک ۲۰٪ استریل به‌عنوان شاهد و به‌منظور مقایسه میزان کل کاروتنوئید تولیدشده توسط جدایه‌ها، وزن خشک هر جدایه محاسبه شد. برای این امر ۵۰ سی‌سی از محیط کشت آماده‌شده به سل‌های سانتریفیوژ منتقل و با دور ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی دو بار و هر بار با ۵۰ سی‌سی آب نمک ۱۰٪ شسته شد تا مولکول‌های اضافی و بقایای محیط کشت زدوده شود. رسوب سلولی به‌دست‌آمده در ۵۰ سی‌سی آب نمک ۱۰٪ حل و سوسپانسیون حاصله به شیشه ساعت‌های از قبیل توزین‌شده، منتقل شدند. برای خشک‌شدن کامل نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۴ ساعت در فور با دمای 65°C قرار گرفتند^[8]. وزن شیشه ساعت حاوی زیست‌توده خشک باکتری اندازه‌گیری و وزن خشک هر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه شد:

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

استخراج و مقایسه رنگدانه‌های جدایه‌ها: ابتدا آماده‌سازی نمونه‌ها مطابق مرحله قبل انجام گرفت. پس از طی دوره گرماگذاری، ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها در محیط کشت مایع، در ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی و استخراج رنگدانه‌ها از رسوب سلولی براساس روش *وورن* 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 کیف 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 آب نمک 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 آب مقطر شسته شد و پس از شست‌وشو با سولفات سدیم بدون آب کاملاً آبیگری شد. هر نمونه با استفاده از پمپ خلا و حمام بخار آب (در دمای زیر 40°C) تغلیظ شد به‌نحوی که یک میلی‌لیتر عصاره در ارلن تخلیه باقی ماند. عصاره حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر 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.

۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت با دور ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس مایع رویی دور ریخته و رسوب سلولی به مدت ۴ ساعت در دمای 20°C فریز شد. به رسوب فریزشده ۵۰ میلی‌لیتر DMSO اضافه و با ذرات سیلیسی کاملاً مخلوط شد.

لیتر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۲ گرم بر لیتر پتاسیم کلرید، 0.06 گرم بر لیتر NaHCO_3 ، 0.26 گرم بر لیتر سدیم بروماید، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر. 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 میکروارگانیسم‌ها، محیط پیچیده با ترکیب ذکرشده در ادامه و pH برابر با 7.2 تا 7.4 استفاده شد (گرم بر لیتر): ۵ گرم بر لیتر پپتون کازئین، ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر، یک گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر آگار، ۱۶۲ گرم بر لیتر سدیم کلرید، 19.4 گرم بر لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۴ گرم بر لیتر $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، 7.2 گرم بر لیتر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۴ گرم بر لیتر پتاسیم کلرید، 0.12 گرم بر لیتر NaHCO_3 ، 0.52 گرم بر لیتر سدیم بروماید، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر. برای جداسازی حداکثر تعداد باکتری‌های نمک‌دوست رنگدانه‌دار اعم از نمک‌دوست نسبی و اجباری، حدود ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک و ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های مایع به محیط مایع مغذی حاوی ۱۰٪ و ۲۰٪ نمک تام تلقیح شد. فلاسک‌ها به مدت ۷ روز در دمای 37°C گرماگذاری شدند. سپس از هر فلاسک با استفاده از آب نمک ۱۰٪ استریل تا رقت 10^{-4} ، سری رقت تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر 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 30°C و پلیت‌های حاوی ۲۰٪ نمک تام در دمای 37°C به مدت 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 سدیم کلرید (صفر، $2/5$ و 5 ٪) بررسی شد. اگر بهینه رشد سویه، سدیم کلرید 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 37°C مشاهده شد. رنگ آمیزی براساس روش Dussault صورت گرفت^[7]. شکل میکروسکوپی با استفاده از عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی، فعالیت کاتالازی به‌وسیله تولید حباب در محلول ۳٪ هیدروژن پراکسید و آزمون اکسیداز با استفاده از دیسک‌های اکسیداز انجام شد. احیای نیتрат 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 0.5 مک‌فارلند 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 سدیم کلرید 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.

هگزتان: استون به نسبت ۱ به ۲ و ۱ به ۳ انتخاب شدند. زمانی که فاز متحرک تا یک سانتی‌متری 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: به منظور خالص‌سازی رنگدانه اصلی سویه منتخب، روش استفاده از کاغذهای کروماتوگرافی انتخاب شد. برای این منظور عصاره اتری تغلیظ‌شده با پیپت پاستور به صورت یک نوار باریک غلیظ روی خط مبدأ کاغذ رسم‌شده در فاصله ۲ سانتی‌متری لبه پایینی پلیت، گسترانیده شد و کاغذ ۲۰ در ۲۰ سانتی‌متر داخل تانک حاوی n-هگزتان: 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 اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر استون، رنگدانه‌ها از سیلیکا ژل جدا و وارد فاز استونی شدند. پس از سانتریفیوژ، رنگدانه فاز استونی توسط ۲ میلی‌لیتر اتر نفت استخراج شد. برای حذف ناخالصی از رنگدانه اصلی، برای عصاره اتری به دست آمده کروماتوگرافی کاغذی با حلال n-هگزتان: 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 به دست آمده در مرحله قبل، طیف جذبی مرئی در نور فرابنفش گرفته شد. برای این امر ابتدا دستگاه با استون در ناحیه ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر 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 به صورت تحلیلی و توسط دستگاه دارای آشکارساز مرئی مدل k2501 (Knaauer؛ آلمان) در نور فرابنفش در شرایط خاص (فاز متحرک متانول: آب (۸۰:۲۰)، سرعت فاز متحرک 1ml/1min، در طول موج ۴۹۰ نانومتر، دمای ۲۵°C) انجام شد.

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

شناسایی مولکولی جدایه برتر M24: استخراج DNA به وسیله کیت صورت گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 به وسیله نرم‌افزار Mega 5 درخت فیلوژنی با روش اتصال-همسایگی با ضریب بوت استرپ ۱۰۰ رسم شد.

مخلوط حاصله به مدت 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 ۵ میلی‌لیتر استون حل و پس از سانتریفیوژ، فاز استونی رنگی جمع‌آوری شد. عمل عصاره‌گیری با استون دو بار تکرار شد. چنانچه رسوب همچنان رنگی بود، ۵ میلی‌لیتر DMSO به رسوب اضافه و به مدت 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 جدا شدن دو فاز قطبی (پایینی) و فاز غیرقطبی رنگی (بالایی) از آب‌نمک اشباع استفاده شد. در صورت رنگی بودن 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 هم‌دم شوند. دستگاه با اتر نفت در محدوده ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر صفر و طیف جذبی نمونه شاهد در مقابل بلانک اتر نفت خوانده شد. سپس نمونه شاهد به عنوان بلانک دستگاه تعریف و طیف جذبی هر نمونه ثبت شد. در صورت بالا بودن 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]:

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

A: جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای جدایه‌های زرد و ۴۹۳ نانومتر برای سایر جدایه‌ها؛ Volume: حجم کل حلال مصرفی و $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 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 ۱۵۰ میلی‌لیتری، ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه شد. هر ارلن برای یک دوره زمانی در نظر گرفته شد (روزهای صفر تا هشت). ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند (چگالی نوری برابر 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 ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس محتویات ارلن مربوطه سانتریفیوژ و استخراج رنگدانه‌ها براساس روش ذکر شده 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 ۵ سانتی‌متر) برای آنالیز استفاده شد. خط مبدأ در فاصله یک سانتی‌متری لبه پایینی کاغذ رسم شد. از نمونه‌ها توسط یک لوله موئین که نوک آن توسط شعله تیز شده بود روی خط مبدأ نقطه‌گذاری شد. پس از خشک شدن کامل لکه، بلافاصله کاغذ درون تانک حاوی حلال n-هگزتان: استون قرار داده شد. ابتدا نسبت‌های n-هگزتان: استون ۱ به ۱، ۱ به ۲، ۱ به ۳ و ۱ به ۴ آزمایش و در نهایت حلال n-

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

موقعیت ایستگاه	عمق (متر)	pH	شوری	EC (PPT)	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

(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 (به جز 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 A3، A15، M31، M35، M24، M21 و M15 از میان جدایه‌های به دست آمده از بندر ماهشهر در مرحله اول انتخاب شدند و از میان این جدایه‌ها جدایه M24 به دلیل تولید بالای کاروتنوئید و جدایه M35 به دلیل 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 به دلیل نزدیکی باندهای تشکیل شده که امر خالص‌سازی را با مشکل روبه‌رو می‌ساخت از ادامه کار روی این جدایه صرف نظر شد.

یافته‌ها

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

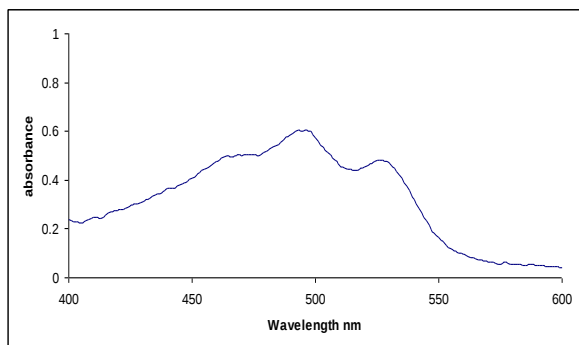
رنگ قرمز- نارنجی در اکثر فلاسک‌ها نمایان شد که حاکی از وجود میکروارگانیزم‌های نمک‌دوست تولیدکننده رنگدانه بود. در فلاسک‌های حاوی محیط مایع مغذی با ۲۰٪ نمک تام پس از ۵ روز گرماگذاری رنگ نارنجی شفاف نمایان شد. اما در فلاسک‌های حاوی ۱۰٪ نمک تام از روز ۱۰، رنگ برخی فلاسک‌ها به نارنجی کم‌رنگ متمایل شد.

از نمونه‌های منطقه خوریات ماهشهر و حوضچه‌های استحصال نمک صنایع پتروشیمی بندر امام خمینی 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 ۵۵۰ نانومتر 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 تأیید کرد (جدول ۲). سایر جدایه‌ها جذب معنی‌داری در مقایسه با سایرین در محیط مایع نشان ندادند، بنابراین از ذکر حداکثر جذب آنها صرف نظر شد.

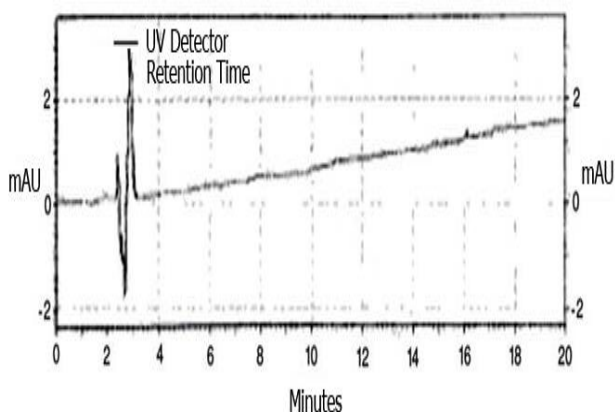
در ایستگاه S1 بندر ماهشهر بیشترین میزان کاروتنوئید در جدایه M31 به میزان ۵۵۱/۴۸ میکروگرم بر گرم مشاهده شد. همچنین در میان جدایه‌های نارنجی- قرمز جدا شده در این ایستگاه جدایه M33 با تولید ۵۰۰/۴۹ میکروگرم بر گرم بیشترین تولید را دارا بود

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

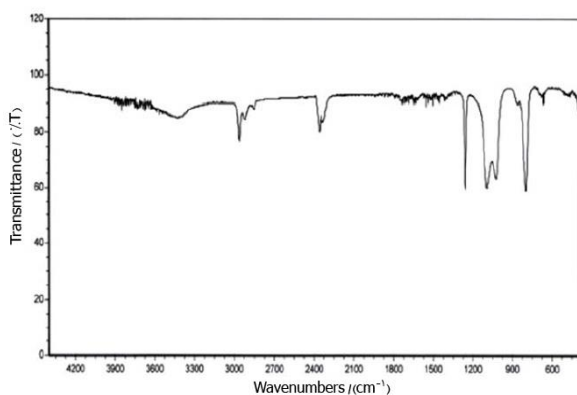


نمودار ۱) طیف جذب مرئی در نور باند ۱ عصاره جدایه M24

وجود رنگدانه باکتریوروبیرین 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

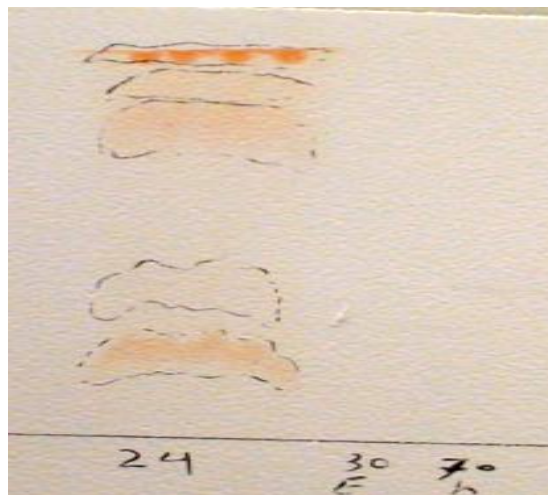


Instrument model=WQF-510 resolution=4 scan=25 times=25

نمودار ۳) طیف FTIR باند ۱ عصاره جدایه M24

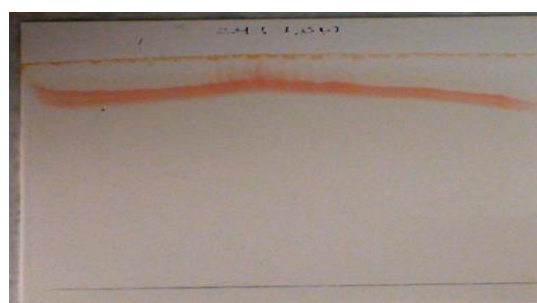
رنگدانه‌های کاروتنوئیدی یک متابولیت اولیه سلولی در جدایه M24 بود (نمودار ۴).

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 ۱، ۲، ۳ و ۶ 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).



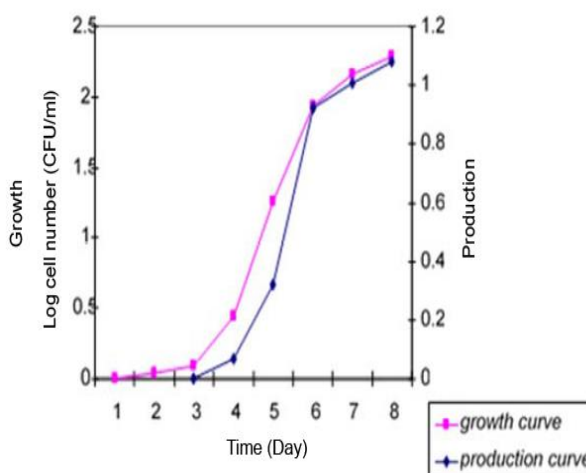
شکل ۲) کروماتوگرافی مرحله دوم جداسازی باندهای جدایه M24، تصویر کاغذ موجود در تانک کروماتوگرافی (بالا) و تصویر باندهای نهایی (پایین)

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.

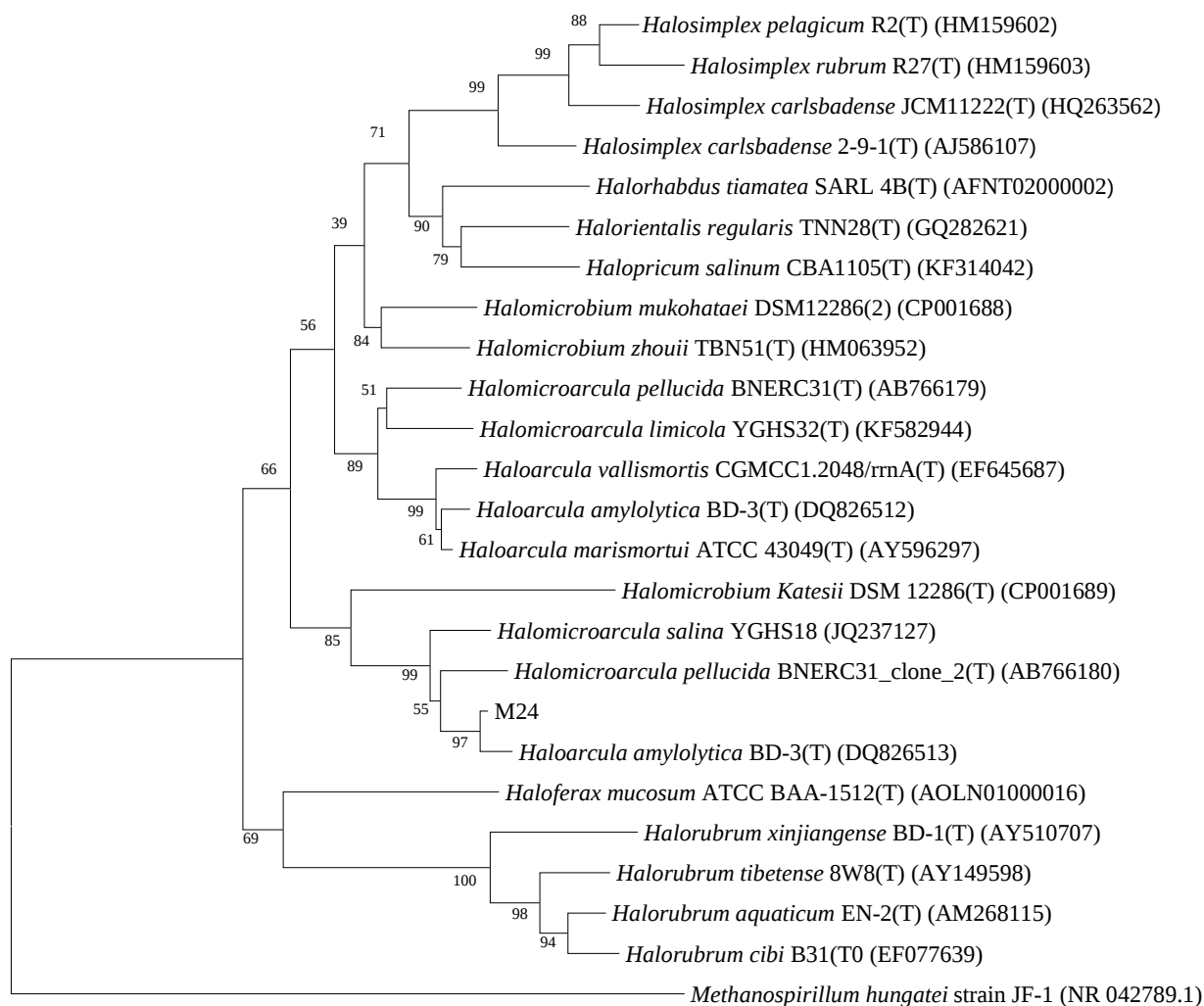
جدول ۴) نتایج صفات فنوتیپیک سویه برتر (M24)

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

سویه M24 قرابت بالایی در حدود ۹۸٪ با تاکسون استاندارد *هالوآرکولا آمیلولیتیکا* BD-3 (Haloarcula amylolytica BD-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.

تولید رنگدانه کاروتنوئیدی توسط جدایه‌های پروکاریوتی اکوسیستم‌های شور ایران و شناسایی جدایه برتر انجام شد. اکوسیستم‌های شور در اکثر نقاط دنیا به‌ویژه مناطق نیمه‌استوایی

با توجه به پتانسیل طبیعت ایران و پراکندگی فراوان اکوسیستم‌های شور و پرشور در آن مطالعه حاضر با هدف مقایسه

با آب و هوای گرم و بارندگی اندک، به وفور وجود دارند. از نظر بیولوژیک محیط‌های شور به دو گروه آبی و خاکی تقسیم می‌شوند. محیط‌های آبی با بیش از 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 میکروارگانیسم‌های 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 امام خمینی بود.

طبق نتایج مطالعه حاضر مناطق نمونه‌برداری در حوزه بندر ماهشهر نمونه‌ای از محیط‌های تالازوهالین بود. خورهای نمونه‌برداری شده در واقع پیش‌روی آب دریا در خشکی بودند که در ارتباط تنگاتنگ با آب خلیج فارس هستند و میزان شوری آنها بین ۱۷ ppm در خور زنگی شرقی و ۱۳۰ ppm 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 امام خمینی از دیگر مناطق نمونه‌برداری شده 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 (سدیم کلرید) 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 ۲۰۰ ppm و pH آن ۷/۶ اندازه‌گیری شد. سطح این حوضچه‌ها در اغلب فصول سال رنگ صورتی مایل به قرمز داشت که نشان‌دهنده وجود میکروارگانیسم‌های 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 (۲۸ جدایه) و کمترین تعداد متعلق به ایستگاه S_3 (۹ جدایه) بود. با در نظر گرفتن 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 انتخاب شده براساس ویژگی‌های کلنی، شکل میکروسکوپی و خصوصیات بیوشیمیایی، ۲۳ جدایه نارنجی، ۸ جدایه صورتی، ۶ جدایه زرد و ۴ جدایه قرمز رنگ بود.

در سال ۱۹۷۹ میلادی و/یا 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 به مدت 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 گرم منفی بودند [14].

آسکر و همکاران مطالعه‌ای روی جمعیت باکتریایی حوضچه‌های استحصال نمک دریا در آل- ملاحات در اسکندریه مصر انجام دادند، در مطالعه آنها ۳۱ باکتری نمک‌دوست اجباری تولیدکننده کاروتنوئید جدا شد که متعلق به خانواده *هالوباکتریاسه* (*Halobacteriaceae*) بودند. میزان کاروتنوئید تولید شده در جدایه‌ها بررسی شد و جدایه TM که بعدها *هالوفرکس الکساندرینوس* (*Haloferax alexandrinus*) نام گرفت، بیشترین تولید را داشت و کانتاگرانترین، به عنوان 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، به عنوان مثال باکتری *هالوباسیلوس هالوفیلوس* (*Halobacillus halophilus*) یک باکتری نمک‌دوست نسبی تولیدکننده کاروتنوئید است. کاروتنوئید این باکتری استر ۴-اوبیک‌اسید-۴ و ۴ دی اپنروسپورن شناسایی شده که مشابه استافیلوگرانترین 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 زرد رنگ و در فاز اسپوری به رنگ نارنجی هستند، این رنگدانه‌ها کاروتنوئیدی گزارش شده‌اند [19].

در سال ۲۰۱۴ کاروتنوئیدهای تولید شده توسط آرکی نمک‌دوست *هالوآرکولا جاپونیکا* (*Haloarcula japonica*) استخراج و خصوصیات شیمیایی آن با روش اسپکتروسکوپیک شناسایی شد. ترکیب شامل ۶۸/۱ مول درصد باکتریوروبرین، ۲۲/۵ مول درصد مونوآنیدروباکتریوروبرین، ۹/۳ مول درصد بیس‌آنیدروباکتریوروبرین و کمتر از ۰/۱ مول درصد ایزوپنتیل-دهیدرووروبرین 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 غربال شده در ایستگاه‌های نمونه‌برداری بندر ماهشهر، ۱۵ جدایه در غلظت کمتر از ۲۰٪ سدیم کلرید بهینه رشد داشتند و ۳۰ جدایه در غلظت بالاتر یا برابر با ۲۰٪ سدیم کلرید 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 ۴۹۳ نانومتر حداکثر جذب را

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*.

نشان دادند که احتمالاً حاوی کاروتنوئیدهای دارای ۱۳ باند دوگانه به‌عنوان کاروتنوئید اصلی بودند. جدایه‌های زردرنگ که در محدوده ۴۵۰ نانومتر 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 M21، M15، 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 ۴۹۵ نانومتر حداکثر جذب را با دو شانه در ۵۳۰ و ۴۶۵ نانومتر 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 دردسترس نبودن 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 *هالو/آرکولا 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.

تأییدیه اخلاقی: 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٪)؛ مهرانوش رسولی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۱۵٪).

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.

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