مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره 22، شماره 4، زمستان 91، صفحات 279 تا 287

Original Article

رنگدانه پیوردین به عنوان بیومارکر در شناسایی سودوموناس در مواد غذایی و بهداشتی

آنیتا خنافری[1]، پریچهر داودی راد[2]، صدیقه مهرابیان[3]

[1] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[2] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[3] استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: *Pseudomonas aeruginosa باکتری فرصت طلب بیمارستانی با توانایی تولید رنگدانه‌های فلورسنت چون پیوردین، پیوروبین و غیرفلورسنتی پیوسیانین می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق تحریک تولید رنگدانه پیوردین به عنوان بیومارکر جهت شناسایی سریع باکتری فوق در مواد غذایی و بهداشتی است.*

روش بررسی: *در این تحقیق از غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم جهت تحریک تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین استفاده گردید. تایید نوع رنگدانه براساس بیشینه جذب و حلالیت در آب، اسید استیک و کلروفورم تعیین شد. الگوی رشد باکتری برحسب میزان تولید رنگدانه در شرایط بهینه همزدن، دمایی، نوع محیط کشت، منابع کربن و ازت تعیین گردید. رابطه میزان تولید رنگدانه و تعداد باکتری برحسب توده سلولی و میزان جذب محاسبه شد. ردیابی باکتری برحسب میزان تولید رنگدانه به عنوان بیومارکر در مواد غذایی (ماکارونی، آب سیب) و مواد بهداشتی (مایع دستشویی و ظرف شویی) بررسی و با روش استاندارد مقایسه گردید.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از این تحقیق بیشینه جذب نوری رنگدانه استخراج شده را 403 نانومتر و حلالیت آن را در آب و اسید استیک تایید نمود. غلظت‌های 0/3-0/5mM سولفات کادمیوم سبب تحریک تولید رنگدانه فلورسنت در باکتری شد. بیشینه تولید رنگدانه فلورسنت برحسب توده سلولی در شرایط دور 150rpm، دمای 35 °C ، حضور کادمیوم 0/5 mM، 1% ساکارز و نیترات پتاسیم، 330mgml^{-1} تعیین گردید.*

نتیجه‌گیری: *سرعت ردیابی Pseudomonas aeruginosa در مواد غذایی و بهداشتی آلوده به باکتری برحسب توان تولید رنگدانه فلورسنت با شرایط فوق الذکر از 72 ساعت به 20 ساعت، نسبت به روش استاندارد کاهش نشان داد.*

واژگان کلیدی: *Pseudomonas aeruginosa، پیوردین، بیومارکر.*

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از علل مهم مرگ و میر، اتلاف هزینه و افزایش مدت اقامت بیماران در بیمارستان می‌باشد. یکی از مقاوم‌ترین و شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی موجود تا به امروز که در غالب عفونت ثانویه از علل مهم مرگ و میر در سراسر دنیا معرفی گردیده، باکتری *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد. رشد این باکتری حتی در محلول‌های پزشکی، صابون‌های مایع و مواد ضدعفونی کننده نظیر ساولن و دتول نیز گزارش گردیده است (1).

جنس سودوموناس یکی از گروه‌های بزرگ باکتریایی با بیش از 80 گونه می‌باشد. سودوموناس‌ها انتشار همه جایی داشته و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، دکتر آنیتا خنافری
(**email**: Khanafari_a@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: 90/10/10
تاریخ پذیرش مقاله: 91/6/1

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

قادرند انواع متنوعی از ترکیبات آلی را مورد استفاده قرار دهند (2). رده‌بندی این باکتری‌ها براساس تجانس 16s rRNA، DNA و ویژگی‌های کشتی متداول استوار است. عمده ترین عامل بیماری‌زای انسانی این گروه، *Pseudomonas aeruginosa* محسوب می‌شود واغلب به تعداد کم در فلور طبیعی روده‌ای و روی پوست انسان وجود دارد. قدرت تهاجمی این باکتری محدود بوده و از این نظر عفونت‌های ناشی از آن در میزبان‌های تضعیف شده از نظر ایمنی بروز پیدا می کند. باکتری پس از استقرار، بیماری شدید و تهدید کننده جان بیمار را پدید می‌آورد (3،2).

Pseudomonas aeruginosa باکتری هوازی است که گاهی در حضور نمک‌های نیتراتی، رشد بی‌هوازی در آن مشاهده می-گردد. این باکتری، متحرک با تاژه قطبی، استوانه‌ای شکل با اندازه تقریبی 1/2 میکرومتر می‌باشد و به صورت منفرد یا دوتایی و گاهی در زنجیره‌های کوتاه وجود دارد (4،2). در بسیاری از محیط‌های کشت به سهولت رشد می‌کند. این باکتری توانایی تولید رنگدانه‌های محلول در آب نظیر رنگدانه غیرفلوئورسنتی آبی رنگ بنام پیوسیانین که محلول در آب و کلروفرم می‌باشد، رنگدانه فلوئورسنتی سبز رنگ بنام پیوردین که محلول در آب و استیک اسید است، رنگدانه فلوئورسنتی قرمز تیره پیوروبین و رنگدانه فلوئورسنتی سیاه پیوملانین را دارد. پیوسیانین رنگدانه اختصاصی *Pseudomonas aeruginosa* است و می‌توان آنرا با کلروفرم از محلول‌های آبی جدا کرد. رنگدانه‌های فلورسنتی در سایر گونه ها نیز دیده می‌شود (5،2).

یکی از عوامل شایع ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در زخم‌ها و سوختگی‌ها *Pseudomonas aeruginosa* است که منجر به تولید چرک آبی مایل به سبز می‌گردد. این باکتری در صورتی که وارد مایع مغزی- نخاعی شود، ایجاد مننژیت می‌کند (6). از دیگر بیماری‌های شایع این باکتری می‌توان عفونت دستگاه ادراری، تنفسی، اوتیت خارجی بدخیم در بیماران دیابتی، عفونت چشمی که ممکن است منجر به تخلیه سریع چشم گردد و سپسیس کشنده را نام برد (9-7).

Pseudomonas aeruginosa در صنایع غذایی به ویژه مواد غذایی مایع از قبیل شیر پاستوریزه و آب‌های معدنی و هم چنین در صنایع آرایشی و بهداشتی در فراورده‌های مربوطه از قبیل کرم‌ها، لوسیون‌ها، شامپوها، شوینده‌ها، مایع‌های ظرفشویی و دستشویی آلودگی‌هایی دیده می‌شود (18-10).

نمونه‌های بالینی را اغلب با روش‌های متداول کشت ارزیابی می‌نمایند. تولید پیوسیانین بر روی محیط‌های مناسب نشانه احتمالی از *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد. سویه‌های غیرپیوسیانوژنیک را باید از روی تعدادی از ویژگی‌های شکلی و آزمایش‌های فیزیولوژیکی مورد تأیید قرار داد (2).

مارکرهای زیستی (بیومارکرها)، مولکول‌هایی بیوشیمیایی با توانایی اندازه‌گیری یا آشکار شدن ترکیبات خاص درمحیط یا نمونه بالینی بوده که قادرند نوع عامل آلوده کننده، پیشرفت بیماری و یا حتی تاثیرات درمانی را نیز مشخص کنند (20،19). برای اینکه بتوان مولکولی را بیومارکر نامید و به طور ایده‌آل از آن به عنوان یک نشانگر تشخیصی استفاده کرد که قادربه تشخیص ترکیب مورد نظر در مراحل اولیه شناسایی بوده، اختصاصیت و حساسیت کافی داشته باشد و در تست‌های آزمایشگاهی قابل شناسایی و اعتماد باشد و نمایش دادن آن به نسبت راحت و ارزان باشد (20).

امروزه سنجش و ارزیابی اثر آلودگی بر منابع زیستی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و مطالعات گسترده در این زمینه، سبب گسترش شاخص‌ها (Indicator) جهت شناسایی آلودگی‌های محیطی و زیستی شده است (21). میکروارگانیسم‌ها به دلیل سرعت رشد، گزینه‌های مناسبی جهت معرفی شدن به عنوان بیومارکر می‌باشند.

در صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی برای جستجوی *Pseudomonas aeruginosa* از محیط کشت Fluid Soybean Casein Digest و سپس انتقال پرگنه‌ها به محیط کشت Cetrimide Agar استفاده می‌شود، در صورت رشد چنانچه پرگنه‌ها در زیر نور فرابنفش، فلورسانس متمایل به رنگ سبز نشان دهند، ادامه تشخیص باکتری، با متداول روش‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی انجام می‌شود. برای تعیین گونه باکتری از دو محیط کشت سودوموناس آگار P و سودوموناس آگار F استفاده می‌شود (22).

روش‌های فوق بسیار وقت گیر بوده و حداقل 72-48 ساعت زمان نیاز دارد. بررسی و تحقیق در شناسایی روش‌های ساده که در مدت زمان کوتاه‌تر منجر به شناسایی این باکتری شود می‌تواند مثمر ثمر باشد. لذا با توجه به اهمیت آلودگی مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی به باکتری‌های بیماری‌زایی نظیر *Pseudomonas aeruginosa*، هدف از انجام این تحقیق، تشخیص سریع باکتری مورد نظر در مواد غذایی براساس توان تولید رنگدانه فلورسانس این باکتری به عنوان بیومارکر می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه سوش میکروبی: سوش میکروبی PTTC 1047 *Pseudomonas aeruginosa* از سازمان پژوهش‌های علمی و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

صنعتی ایران تهیه گردید. مشخصات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و خصوصیات بیوشیمیایی باکتری فوق پس از کشت در محیط نوترینت آگار (عصاره مخمر5 گرم، عصاره گوشت 1گرم، کلرید سدیم 5 گرم، آگار 15 گرم و آب مقطر 1 لیتر) و گرمخانه گذاری در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 24-48 ساعت براساس روش‌های متداول میکروبیولوژی مورد بررسی و تایید قرار گرفت.

تهیه کشت تلقیح: از سوش مورد نظر در محیط کشت نوترینت براث (عصاره مخمر5 گرم، عصاره گوشت 1گرم، کلرید سدیم 5 گرم و آب مقطر 1 لیتر) کشت تهیه و در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس جذب نوری نمونه در طول موج 600 نانومتر بر روی 1-0/8 (معادل 5×10^8 CFU/ ml) تنظیم شد و از آن جهت تلقیح استفاده گردید (23،24).

تحریک تولید رنگدانه پیووردین: از نمک سولفات کادمیوم با جرم مولکولی 769/51 گرم بر مول ($CdSO_4. 8H_2O$)، غلظت‌های mM 0/2، 0/3، 0/4 و 0/5 در محیط کشت نوترینت براث تهیه و در دمای °C 121 و فشار 15 پوند به مدت 15 دقیقه سترون گردید. سپس از کشت تلقیح باکتری به نسبت 10% به آن افزوده شد و نمونه ها در دمای ° C 35 به مدت 72 ساعت گرمخانه گذاری و شدت تولید رنگدانه مورد بررسی قرار گرفت (23،24).

تایید نوع رنگدانه: پس از کشت باکتری در محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت‌های مختلف نمک سولفات کادمیوم (0/5-0/2) به مدت 24 تا 18 ساعت، نمونه‌ها در دور g x10000 به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ گردیدند. سپس آزمون‌های تشخیصی زیر جهت تایید نوع رنگدانه بر روی مایع سانتریفوژ شده صورت پذیرفت.

بررسی لاندای ماکزیمم (λ_{max}): بیشینه جذب نوری مایع رویی، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ماوراء بنفش Jenway Genova در طیف 900-200 نانومتر بررسی گردید (25).

حلالیت رنگدانه در آب، اسید استیک و کلروفورم: برای این منظور مایع رویی جدا شده در دسیکاتور خشک گردید. به رنگدانه استخراج شده حلال‌های اسید استیک، کلروفورم، آب و مخلوط اسید استیک و آب با نسبت‌های متفاوت به صورت جداگانه اضافه گردید و حلالیت رنگدانه در هر یک از حلال-های فوق مورد بررسی قرار گرفت (26،27).

بررسی الگوی رشد باکتری و تولید رنگدانه: محیط کشت نوترینت براث با غلظت mM 0/5 نمک سولفات کادمیوم تهیه گردید. پس از سترون کردن محیط کشت، به نسبت 10% از کشت تلقیح به آن افزوده شد. نمونه در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 96 ساعت گرمخانه گذاری گردید و در بازه های زمانی دو ساعته الگوی رشد باکتری با تعیین میزان جذب نوری آن در طول موج 600 نانومتر و الگوی تولید رنگدانه با تعیین میزان جذب نوری براساس λ_{max} تعیین شده، اندازه‌گیری شد (23،24).

بهینه سازی تولید رنگدانه

بررسی تاثیر منابع ازت و کربن: عصاره مخمر به عنوان منبع ازت آلی، نیترات پتاسیم و نیترات سدیم به عنوان منبع ازت معدنی، گلوکز و ساکارز به عنوان منابع کربنی به نسبت 1% به طور جداگانه و توام به محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت mM 0/5 نمک سولفات کادمیوم افزوده شد. پس از سترون سازی محیط کشت، به نسبت 10% کشت تلقیح باکتریایی اضافه گردید. نمونه ها در دمای 35 درجه سانتی گراد به مدت 72 ساعت گرمخانه گذاری گردیدند و شدت تولید رنگدانه برحسب λ_{max} تعیین گردید (27،4).

بررسی اثر هم‌زدن محیط و غلظت‌های نمک نیترات پتاسیم: از کشت تلقیح باکتری به نسبت 10% به محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت mM 0/5 نمک سولفات کادمیوم در حضور و غیاب غلظتهای 1 % و 2% نیترات پتاسیم، افزوده شد. نمونه ها در دمای °C 35 به مدت 72 ساعت در دور شیکر rpm 200-150 گرمخانه گذاری گردیدند و شدت تولید رنگدانه برحسب λ_{max} تعیین گردید. برای مقایسه اثر همزدن در تولید رنگدانه از نمونه شاهد با شرایط گرمخانه گذاری بدون شیکر نیز استفاده گردید (26،27).

اثر نوع محیط کشت: از کشت تلقیح باکتری به نسبت 10% به محیط‌های کشت نوترینت براث، مولر هینتون براث (نشاسته 1/5 گرم، کازئین هیدرولیز شده 17/5 گرم، عصاره گوشت 2 گرم، آب مقطر یک لیتر) و BHI (D-گلوکز 2 گرم، کلرید سدیم 5 گرم، دی سدیم هیدروژن فسفات 2/5 گرم، عصاره مغز و قلب پپتونه 27/5 گرم، آب مقطر یک لیتر) حاوی غلظت mM 0/5 نمک سولفات کادمیوم افزوده شد. نمونه‌ها در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت در دور شیکر rpm 200-150 گرمخانه گذاری گردیدند و شدت تولید رنگدانه برحسب λ_{max} تعیین گردید. برای مقایسه اثر نوع محیط کشت در تولید رنگدانه از محیط های کشت نوترینت

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

براث، مولر هینتون براث و BHI فاقد نمک سولفات کادمیوم به عنوان شاهد نیز استفاده گردید (27،4).

بررسی رابطه بین تعداد باکتری و شدت تولید رنگدانه

شمارش باکتری به دو روش زیر انجام گرفت:

شمارش باکتریها توسط لام نئوبار: جهت تعیین رابطه بین تعداد باکتری‌ها و میزان جذب نوری در زمان مشاهده فلورسنت، از کشت تلقیح باکتری به نسبت 10% به محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم به همراه غلظت 1% نیترات پتاسیم افزوده شد. نمونه در دمای 35 درجه سانتی‌گراد تا زمان رویت رنگدانه فلورسنت گرمخانه گذاری گردید. سپس میزان جذب نوری آن تعیین و توسط لام نئوبار تعداد باکتری شمارش شد (4).

شمارش باکتری‌ها به روش پورپلیت: از کشت تلقیح باکتریایی به نسبت 10% به محیط کشت نوترینت براث حاوی 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم همراه با غلظت 1% نیترات پتاسیم افزوده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای 35 درجه سانتی‌گراد، OD بر اساس λ_{max} بر روی کمترین و بیشترین میزان جذب نوری در شرایط تولید رنگدانه فلورسنت تنظیم گردید. سپس از غلظت‌های فوق رقت‌های سریال 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه و به نسبت 2/5% به محیط کشت نوترینت آگار افزوده و پورپلیت گردید. نمونه‌ها در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری و پرگنه ها شمارش شدند (4).

بررسی آلودگی مواد غذایی با *Pseudomonas aeruginosa* بر اساس تولید رنگدانه فلورسنت:

ماده غذایی جامد و مایع: برای این منظور از ماکارونی به عنوان ماده غذایی جامد و خشک پس از تهیه پودر و از آب سیب پاستوریزه به عنوان ماده غذایی مایع استفاده گردید. سپس هر یک از مواد غذایی فوق به میزان 10% به محیط کشت نوترینت براث همراه با غلظت 10% از کشت تلقیح باکتریایی اضافه گردیدند. نمونه ها به مدت 5 شبانه روز در دمای 35°C گرمخانه گذاری شدند (12). به این ترتیب مواد غذایی بصورت مصنوعی با باکتری آلوده گردید. جهت بررسی آلودگی ماده غذایی به باکتری سودوموناس از نمونه مواد غذایی فوق بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم + ساکارز 1% + نیترات پتاسیم 1% کشت تهیه گردید. نمونه ها در شرایط دمایی فوق گرمخانه گذاری گردیدند و میزان تولید رنگدانه فلورسنت بر اساس زمان بررسی شد (27).

بررسی آلودگی مواد شوینده با *Pseudomonas aeruginosa* بر اساس تولید رنگدانه فلورسنت:

برای این منظور از مایع دستشویی و ظرف شویی به عنوان مواد شوینده استفاده گردید. ابتدا مطابق با روش استاندارد شماره 3978 مایع دستشویی و ظرف شویی در محیط کشت رقیق کننده (پپتون از کازئین 20 گرم، لسیتین سویا 5 گرم، پلی سوربات 20، 40 میلی لیتر وآب مقطر 960 میلی لیتر) رقیق گردید و به آن باکتری سودوموناس به نسبت 10% افزوده گردید. نمونه ها به مدت 5 شبانه روز در دمای 35 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. به این ترتیب مواد شوینده بصورت مصنوعی با باکتری آلوده گردیدند. از نمونه های فوق جهت بررسی میزان تولید رنگدانه فلورسنت توسط باکتری، بر روی محیطهای کشت سیتریماید آگار (پپتون از ژلاتین 20 گرم، کلرید منیزیم 1/4 گرم، پتاسیم 10 گرم، ستیل تری متیل آمونیوم بروماید 0/3 گرم، گلیسیرین 10 میلی لیتر، آگار 13/6 گرم و آب مقطر1 لیتر)، فلوئید سوی بین کازئین دایجست (پپتون از کازئین 17 گرم ، پپتون از سویا 5 گرم، کلرید سدیم 5 گرم، دکستروز 2/5گرم، دی بازیک پتاسیم فسفات 2/5 گرم و آب مقطر 1 لیتر) و هم چنین محیط بهینه سازی شده (نوترین آگار با غلظت 0/5 mM کادمیوم به همراه 1% ساکارز و1% نیترات پتاسیم) کشت تهیه و تحت شرایط فوق مجددا" گرمخانه گذاری گردیدند. میزان تولید رنگدانه فلورسنت بر اساس زمان بررسی شد (29).

یافته‌ها

مطالعه بر روی غلظت‌های مختلف نمک سولفات کادمیوم نشان داد که حضور این نمک در غلظت‌های 0/5 mM، 0/4 و 0/3 باعث تحریک تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین بعد از گذشت 72 ساعت می‌گردد و غلظت‌های کمتر از 0/3 mM باعث توقف تولید رنگدانه می‌شود.

نتایج تایید نوع رنگدانه تولید شده توسط *Pseudomonas aeruginosa* در حضور نمک کادمیوم، بیشینه جذب (لاندای ماکزیمم) رنگدانه تولید شده در شرایط فوق را 403 نانومتر نشان داد. حلالیت رنگدانه استخراج شده در آب و اسید استیک تایید گردید، درحالی که در کلروفورم غیرمحلول بود.

الگوی رشد باکتری و تولید رنگدانه فلورسنت در حضور غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم، نشان دهنده تولید این رنگدانه در فاز رکود پس از گذشت 72 ساعت بود. بیشینه

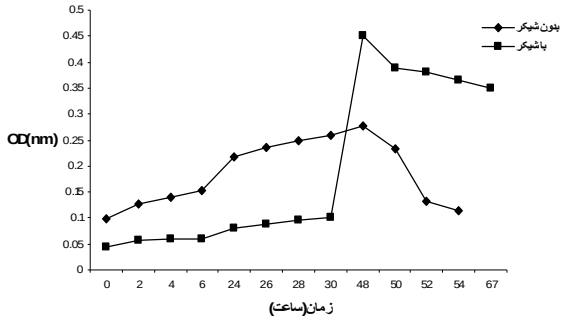
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

میزان رنگدانه فلورسنت استخراج شده $330\ mgml^{-1}$ محاسبه گردید.

بررسی تاثیر عصاره مخمر به عنوان منبع ازت آلی ونیترات سدیم و نیترات پتاسیم به عنوان منبع ازت معدنی در بهینه سازی تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین نشان داد که حضور نیترات پتاسیم به میزان 1% در محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم باعث تحریک تولید رنگدانه فوق در بازه زمانی 48-24 ساعت گردیده که به صورت حلقه‌ای فلورسنت روی محیط قرار می‌گیرد و سپس از بین می‌رود (شکل 1). هم چنین مطالعات نشان دهنده اثر بازدارنده و ممانعت کننده عصاره مخمر و نیترات سدیم در تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین بود.

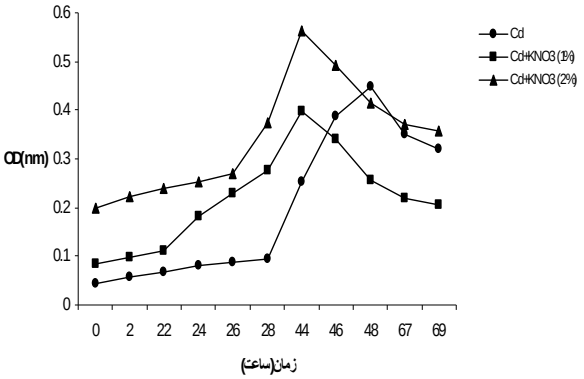
شکل 1- تشکیل حلقه فلورسنت رنگدانه پیوردین در محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم. 1: لوله شاهد، 2: لوله آزمون. تشکیل حلقه فلورسنت در لوله آزمون مشاهده می‌شود.

بررسی اثر ساکارز و گلوکز به عنوان منابع کربن در بهینه سازی تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین نشان داد که حضور قند ساکارز وهم چنین گلوکز به میزان 1% در محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم باعث تحریک تولید رنگدانه فوق بعد از 48 ساعت می‌شوند که در این میان افزودن ساکارز نتیجه افزایش محسوس‌تری را نشان داد. نمودارهای 1 و 2 اثر همزدن را بر تولید رنگدانه پیووردین در حضور غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم نشان می‌دهند. همزدن اثر مستقیم بر میزان و زمان تولید رنگدانه نشان داد.



نمودار 1- اثر همزدن در میزان و زمان تولید رنگدانه فلورسنت پیووردین. میزان تولید رنگدانه در شرایط همزدن پس از 30 ساعت به حداکثر رسید.

کاهش زمان تولید رنگدانه در شرایط توام همزدن و حضور نیترات پتاسیم در محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم مشاهده شد (نمودار 2).



نمودار 2- اثر مضاعف همزدن و حضور نمک نیترات پتاسیم در تولید رنگدانه فلورسنت پیووردین. بهترین میزان تولید رنگدانه در غلظت 1% نیترات پتاسیم و پس از 24 ساعت مشاهده گردید، در حالی که در غلظت 2% رنگدانه فلورسنت بعد از 48 ساعت تولید شد.

بررسی اثر نوع محیط کشت همراه با همزدن در تولید رنگدانه فوق نشان داد که محیط کشت نوترینت براث حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم در شرایط گرمخانه‌گذاری توام با همزدن، تولید رنگدانه فلورسنت را در فواصل زمانی 72-48 ساعت تحریک می‌نماید. محیط کشت مولر هینتون براث و BHI حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم تنها باعث تحریک رشد باکتری شده و تولید رنگدانه فلورسنت را تحریک نمی‌نمایند.

بررسی توام منابع ازت معدنی و منابع قندی در محیط جامد نشان داد که تنها محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم همراه با ساکارز 1% و نیترات پتاسیم 1% بعد از 24 ساعت باعث تحریک تولید

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

رنگدانه فوق می‌شوند، در حالی که در محیط‌های دیگر ذکر شده مدت زمان بیشتری برای ایجاد رنگدانه لازم است.

نتایج حاصل از شمارش باکتری بر اساس کمترین (0/228) و بیشترین (0/397) میزان جذب و براساس رنگدانه فلورسنت ایجاد شده به ترتیب $4/08 \times 10^7 CFUml^{-1}$ و $4/85 \times 10^7 CFUml^{-1}$ تعیین گردید.

نتایج تولید رنگدانه فلورسنت در مواد غذایی (ماکارونی و آب سیب) آلوده به سودوموناس نشان داد که هر دو بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم همراه با ساکارز (1%) و نیترات پتاسیم (1%)، بعد از گذشت 24-20 ساعت باعث تحریک تولید رنگدانه فلورسنت می‌گردند.

بررسی آلودگی مواد شوینده با *Pseudomonas aeruginosa* بر اساس تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط‌های کشت Cetrimide Agar، Fluid Soybean Casein Digest و هم چنین محیط بهینه سازی شده (نوترینت آگار با غلظت 0/5 mM کادمیوم، 1% ساکارز و1% نیترات پتاسیم) نشان داد که مایع دستشویی وظرف شویی آلوده شده، وقتی بر روی محیط بهینه سازی شده، کشت داده می‌شوند باعث تحریک تولید رنگدانه فوق بعد از 24 -20 ساعت می‌شوند، در حالی که در محیط Cetrimide Agar رنگدانه زرد-سبز و در Fluid Soybean Casein Digest رنگدانه زرد –قهوه ای تولید می‌گردد.

بحث

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد و تولید متابولیت‌های مختلف توانایی بالقوه جهت ورود به دنیای زیست فناوری را دارند. یکی از معروف‌ترین این ویژگی‌ها تولید کلنی‌های رنگی است. تولید این رنگدانه‌ها در سیستم‌های تک یاخته‌ای نظیر باکتریوردوپسین، هالوردوپسین و کاروتنوئیدها نوعی مکانیسم محافظتی علیه فرآیندهای فتواکسیداسیون می‌باشد (30). باکتریوردوپسین نوعی رنگدانه پروتئینی هیدروفوبیک با وزن مولکولی تقریبی 27000 دالتون است که در غشاء سیوپلاسمی باکتری‌های ارغوانی یافت می‌شود و به عنوان پروتئین اصلی غشایی این باکتری‌ها محسوب می‌گردد. عملکرد آن به صورت پمپ پروتونی است که نور خورشیدی را به کانال‌های الکتروشیمیایی برمی‌گرداند (31).

رنگدانه‌های میکروبی کاربردهای متعددی در صنایع مختلف دارند. باکتریوردوپسین در تهیه لنزهای بسیار حساس نوری و فیلترهای رنگی مورد استفاده در دوربین های عکاسی و میکروسکوپی کاربرد داشته و نقش به سزایی در حفاظت از اثرات نور و اکسیژن ایفا می‌کند. تولید کاروتنوئیدها تأثیرات مفید گسترده‌ای نظیر کاهش خطر سرطان و نیز بیماری‌های قلبی – عروقی دارند و در میکروارگانیسم‌ها، متابولیسم‌های ثانویه محسوب می‌شوند و در ادامه حیات آنها نقش دارند (30).

استفاده از میکروارگانیسم‌ها بعنوان مارکرهای زیستی قدمتی طولانی دارد. کاهش میزان نورزایی (بیولومینسانس) *Photobacterium phosphoreum* در حضور فلزات سنگین به عنوان بیومارکر از سال 1979 جهت تعیین آلودگی آب به فلزات سنگین به عنوان یک روش استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است (32).

با توجه به سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید شاخص‌های ظاهری نظیر تولید رنگدانه در شرایط خاص محیطی، شناسایی و معرفی گونه‌های خاص میکروارگانیسمی جهت ارزیابی ویژگی‌های محیطی می‌تواند حائز اهمیت باشد. لذا در این راستا، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی القاء تولید رنگدانه پیوردین، جهت ردیابی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در مواد غذایی و شوینده انجام پذیرفت.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن نمک سولفات کادمیوم 0/5 mM به محیط کشت باکتری *Pseudomonas aeruginosa* سبب افزایش رشد و تولید رنگدانه می‌گردد. در غلظت‌های کمتر از 0/2 mM از نمک فوق تولید رنگدانه فلورسنت مهار گردید.

مطالعات نشان می‌دهند که توانایی تولید رنگدانه در میکروارگانیسم‌ها، سبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت به غلظت‌های فلزات سنگین در محیط می‌گردد. یکی از دلایل مقاومت چندگانه استافیلوکوک‌ها را به دلیل توانایی آنها در تولید رنگدانه می‌دانند. رنگدانه در این باکتری‌ها مانند سدی در مقابل نفوذ آنتی‌بیوتیک از خلال دیواره و غشاء سیتوپلاسمی باکتری عمل می‌کند. باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین غالبا رنگی می‌باشند. از چنین باکتری‌های رنگی به عنوان بیوسنسور در شناسایی محیط‌های آلوده به فلزاتی نظیر مس، کادمیوم، آرسنیک، جیوه و نیکل استفاده می‌گردد. از این باکتری‌ها حتی جهت تعیین آلودگی‌های نفتی نیز استفاده می‌شود (33).

مطالعات Doyle و همکاران نشان داد که افزودن نمک کلرید کادمیوم به میزان 80-40 میکروگرم در میلی‌لیتر سبب افزایش رشد میکروارگانیسم‌هایی نظیر *E. coli* و *Bacillus*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

cereus می‌شود، در حالی‌که غلظت‌های فوق بر روی رشد میکروارگانیسم‌هایی نظیر *Lactobacillus acidophilus*، *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus faecalis* و *Aspergillus niger* اثر بازدارندگی رشد دارد. آنها اعلام نمودند که الگوی جذب کادمیوم به میزان قابل توجهی در گونه‌های میکروبی مورد آزمایش متفاوت است (28).

مطالعات Kim-Hien و همکاران در سال 1999 نشان داد که نوع ماده در تحریک تولید بیان پیوردین با مکانیسم‌های متفاوت، نقش اساسی بازی می‌کند. آنها نشان دادند که کادمیوم عامل تحریک کننده تولید رنگدانه پیوردین در PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* با مکانیسم واکنش این فلز سنگین با پروتئین تنظیم کننده Fur می‌باشد که سبب مهار سنتز رنگدانه فوق در شرایط کمبود آهن می‌گردد. درحالی که فلزاتی نظیر جیوه قادر به تحریک تولید پیوردین نمی‌باشند. همچنین ترکیبات دیگر نظیر Methyl viologen با تولید رادیکال‌های آزاد سبب کاهش بیان پیوردین می‌شود (34).

تولید رنگدانه در اکثر میکروارگانیسم‌ها نیازمند محرک محیطی می‌باشد. تولید رنگدانه ملانین در قارچهایی نظیر *C.neoformans* مستلزم حضور ترکیبات فنلی در محیط می‌باشد. کلنی‌های این قارچ در شرایط معمول، سفید تا کرم رنگ می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند که علاوه بر ترکیبات محیطی حضور باکتری‌هایی نظیر *K. aerogenes* می‌تواند سبب تحریک تولید رنگدانه ملانین در این قارچ گردد و به عنوان بیومارکر در محیط جهت شناسایی باکتری فوق قرار گیرد (35،36).

بهترین میزان تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین در غلظت 1% نیترات پتاسیم مشاهده گردید، افزایش غلظت این نمک تا 2% منجر به کاهش تولید رنگدانه شد. حضور نیترات سدیم 1% اثر بازدارنده بر روی تولید رنگدانه نشان داد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بهترین محیط کشت برای تحریک تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین، محیط نوترینت آگار حاوی غلظت 0/5 mM کادمیوم همراه با ساکارز(1%) و نیترات پتاسیم (1%) است. حضور این ترکیبات در محیط نوترینت براث که کشت توام با هم‌زدن باشد نیز نتایجی مشابه دارد، ولی شدت رنگدانه ایجاد شده کم تراز نوترینت آگار بهینه سازی شده است. افزودن عصاره مخمر به عنوان منبع ازت آلی به محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم نیز اثر بازدارندگی بر روی تولید رنگدانه پیووردین را نشان داد.

فرآیندهای صنعتی معمولاً تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی انجام می‌شوند که برای فعالیت رنگدانه‌ها مطلوب و بهینه نیستند. به همین دلیل تعیین بهینه عوامل محیطی مانند نمک و دما اهمیت بسیار زیادی دارند. استفاده باکتری‌ها که توانمندی ویژه‌ای در تولید رنگدانه‌های نوری دارند این امکان را فراهم می‌کند که در غلظت‌های مختلف نمک و دمای متغیر، فعالیت بهینه رنگدانه‌ها تعیین شود (30). حداقل تعداد باکتری جهت تولید رنگدانه فلورسنت پیوردین $CFUml^{-}$ $4/08 \times 10^{71}$ تعیین گردید. رابطه معنی‌داری در $P< 0/05$ بین تعداد باکتری و شدت تولید رنگدانه در حداقل و حداکثر جذب مشاهده نشد.

با توجه به اعلام گزارش‌هایی مبنی بر رشد *Pseudomonas aeruginosa* در محلول‌های پزشکی، صابون‌های مایع و مواد ضدعفونی کننده نظیر ساولن و دتول، دستیابی به روش‌های سریع جهت شناسایی آن از جمله تحریک تولید رنگدانه فلورسنت آن در محیط کشت حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق با استفاده از محیط کشت حاوی غلظت 0/5 mM نمک سولفات کادمیوم همراه با غلظت های 1% ساکارز و نیترات پتاسیم شناسایی این باکتری نسبت به روش‌های متداول از 96-72 ساعت به 24-20 ساعت کاهش یافت.

REFERENCES

1. Amini R, Borzoo, SR, Zandeae M, Comparision study of two solvent isopropyle alcohol 70% and microten 5% on hospital ostotescope microbial contamination; Nursing congress, Hamadan Medical University; 2006; Hamedan, Iran.
2. Malekzadeh F, Editor. Microbiology. Tehran: Tehran University Publication; 2005. [In Persian]
3. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Editors. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. USA: McGraw-Hill Companies inc; 2008.
4. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott, Harley and Klein's Microbiology. 7th ed. New York: McGraw Hill; 2008.
5. Atkins PW. Physical chemistry. 6th ed. Isfahan, Iran: Isfahan University of Technology Publication; 2000. p. 428-30. [In Persian]

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

6. Balows A, Duerden BI, Editors. Mirobiology and microbial infections. New York: Topley and Wilson's;1998. p.103-11.

7. Connell BJ, Tullo A, Morgan PB, Armstrong M. Pseudomonas aeruginosa microbial keratitis secondary to cosmetic coloured contact lens wear. Br J Ophthalmol 2004; 88:1603-604.

8. Noroosi J, Bacteriology. 2nd ed. Iran: Hayan Publication; 2003. p.121 29. [In Persian]

9. Qarah S, Cunha B A, Dua P, Lessnau K. Pseudomonas aeruginosa infections. Retrieved March 13, 2010. Available from http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview.

10. Kitaguchi A, Yamaguchi N, Nasu M. Enumeration of respiring Pseudomonas spp. In milk within 6 hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 2748-52.

11. Munsch-Alatossava P, Alatossava T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. Microbiol Res 2006; 161: 334-46.

12. Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol 1994; 23: 277-94.

13. Dogan B, Boor KJ. Genetic diversityand spoilage potentials among *Pseudomona s*sp. Isolated from fluid milk products and dairyprocessing plants. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 130-38.

14. Kumaresan G, Annalvilli R. Incidence of Pseudomonas species in pasteurized milk. Tamilnadu J Vet Anim Sci 2008; 4:56-59.

15. Gunasekera TS, Dorsch MR, Slade MB, Veal DA. Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA direct probes. J Appl Microbiol 2003; 94**:** 936-45.

16. Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. Int J Food Microbiol 1999; 53:153-58.

17. Valbuena E, Castro G, Lima K, Acosta W, Brinez W, Tovar A. Bacteriological quality of main pasteurized milk brandsdistributed in Maracaibo City, Venezuela. Revista Cientifica 2004; 14: 59 -67.

18. Warburton DW, Bowen B, Konkle A. The survival and recovery of Pseudomonas aeruginosa and its effect upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. Can J Microbiol 1994; 40:987-92.

19. Schulenborg T, Schmidt O, Hall A, Meyer H, Hamacher M, Marcus K. Proteomics in neurodegeneration – disease driven approaches. J Neural Transm 2006, 113: 1055-73.

20. Lakhan SE. Schizophrenia proteomics: biomarkers on the path to laboratory medicine? Diagn Phatol 2006; 1:11.

21. Marie V, Baudrimont M, Boudou A. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (Corbicula fluminea and Dreissena polymorpha) transplanted along a polymetallic gradient. Chemosphere 2006; 65:609-17.

22. Cosmetic products. Specification and test methods- Microbiological, Institute of Standards and Industrial Research of Iran 2001; ISIRI Number 6342:1-21.

23. Hussein H, Sfarag K, Moavad H. Tolerance and uptake of heavy metal by *pseudomonads*. Process Biochemistry 2005; 40:955-61.

24. Kasra Kermanshahi R, Ghazifard A, Tavakoli A. Identification of bacteria resistant to heavy metals in the soil of Isfahan province. Iranian J Sci Technol 2007; 31: A1.

25. Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Functional analysis of a pyoverdine synthetase from Pseudomonas sp. MIS38. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 71:2002-2009.

26. Kandler O, Nobert W, Editors. Bergeys mannual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Springer; 1989.

27. Khanafari A, Hosseini F, editors. Practical microbiology with biochemical functions and color atlas. Tehran, Iran: Poorsina Publication; 1998.

28. Doyle JJ, Marshall RT, Pfander WH. Effects of cadmium on the growth and uptake of microorganisms. Appl Microbiol 1975: 29: 562-64.

29. Cosmetic products. Sanitary guide line and microbiological specifications for creams and lotions. Institute of Standards and Industrial Research of Iran 1996; ISIRI Number 3978: 1-21.

30. Kamekura M, Dyall-Smith ML, Upasani V, Ventosa A, Kates M. Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of Natronobacterium vacuolatum, Natronobacterium magadii, and Natronobacterium pharaonis to

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]

Halorubrum, Natrialba, and Natronomonas gen. nov., respectively, as Halorubrum vacuolatum comb. nov., Natrialba magadii comb. nov., and Natronomonas pharaonis comb. nov., respectively. Int J Syst Bacteriol 1997; 47:853-57.

31. Cahen D. Bacteriorhodopsin. Weizmann Institute of Science 2007; 26: 1-3.

32. Cosmetic products. Water quality- determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Institute of Standards and Industrial Research of Iran 2006; ISIRI Number 9040: 1-21.

33. Bhawsar S. Colorful bacteria. Biotechnology Articles or Industry News 2011; 5: 1-3.

34. Dao KHT, Hamer KE, Clark C, Harshman LG. Pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* exposed to metals or an oxidative stress agent. Ecological Applications 1999; 9: 441–48.

35. Frases S, Chaskes S, Dadachova E, Casadevall A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a Melanin-Like Pigment in *Cryptococcus neoformans* . Appl Environ Microbiol 2006; 72: 1542–50.

36. Sinha S and Mukherjee SK. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. Curr Microbiol 2008; 56: 55-60.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-05-01]