



Antimicrobial Activity of Carotenoid Pigments Extracted from *Micrococcus roseus*

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Yolmeh M.^{*1} PhD,
Khamiri M.¹ PhD,
Ghaemi E.² PhD,
RamezanPour S.S.³ PhD,
Ghorbani M.¹ PhD

How to cite this article

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

¹Food Sciences & Technology Department, Food Sciences Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

²Microbiology Department, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

³Plant Breeding & Biotechnology Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

*Correspondence

Address: Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Shahid Beheshti Street, Gorgan, Iran. Postal Code: 4913815739

Phone: -

Fax: +98 (17) 35228573

mahmud.yolmeh@yahoo.com

Article History

Received: April 04, 2017

Accepted: September 21, 2017

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

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

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

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

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

Keywords Pigment; *Micrococcus Roseus*; Antimicrobial; Pathogen

CITATION LINKS

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

اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس

محمود یلمه* PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

مرتضی خمیری PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

عزت‌الله قائمی PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

سیده‌ساناز رمضان‌پور PhD

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

محمد قربانی PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

اهداف: کاروتنوئیدها رنگ‌های پرمصرف در صنعت غذا با منشا گیاهی و میکروبی هستند. هدف مطالعه حاضر ارزیابی اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس (*Micrococcus roseus*) بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر سلول‌های میکروکوکوس روزئوس با سانتریفیوژ ته‌نشین شدند و ۱۰ میلی‌لیتر استون به آنها اضافه و توسط همزن‌نایزر همزن شدند. در ادامه سوسپانسیون همزن، سانتریفیوژ، مایع رویی جمع‌آوری و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی با حجمی برابر از پترولیوم اتر استخراج شدند. محلول‌های رنگی پس از فیلتراسیون، به‌وسیله تغلیظ‌کننده چرخنده تغلیظ شد و سپس به‌وسیله خشک‌کن انجامدادی به حالت پودری درآمد. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به روش انتشار دیسک صورت گرفت و میزان حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) با روش رقت آگار محاسبه شد. به‌منظور تحلیل آماری آزمون توکی و نرم‌افزار آماری Minitab 16 به کار رفتند.

یافته‌ها: رنگ استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس بر رشد تمام باکتری‌های مورد آزمون موثر بود، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *سالمونلا اینتریتیدیس* (*Salmonella enteritidis*) به‌ترتیب بیشترین (۱۲/۴ میلی‌متر) و کمترین (۱۰/۹ میلی‌متر) حساسیت به رنگ استخراج شده در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را داشتند. *سالمونلا اینتریتیدیس* بیشترین MIC (۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را داشت و در غلظت‌های مورد آزمون رنگ استخراج شده، تنها برای میزان MBC *سالمونلا اینتریتیدیس* مشاهده نشد. اثر ضدمیکروبی رنگ استخراج شده بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود.

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

کلیدواژه‌ها: رنگدانه، میکروکوکوس روزئوس، ضدمیکروبی، بیماری‌زا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۳۰

*نویسنده مسئول: mahmud.yolmeh@yahoo.com

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان مواد غذایی و بیماران به دنبال مواد افزودنی طبیعی یا داروهای سنتی در غذاها به جای انواع مصنوعی هستند. گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک منبع مهم از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی شناخته می‌شوند که ممکن است به‌عنوان ماده اولیه برای تولید داروهای جدید مورد استفاده قرار گیرند [1].

اخیراً مطالعات فراوانی درباره جداسازی متابولیت‌های شناخته‌شده

و ترکیبات جدید با ارزش افزوده از میکروارگانیسم‌ها انجام شده است. علاقه بالای شیمیدان‌های ترکیبات طبیعی و میکروبیولوژیست‌ها به مطالعه منابع دارویی مثل برخی میکروارگانیسم‌ها، که می‌توانند منابع فراوانی از متابولیت‌های متنوع را فراهم کنند، [2]، بنابراین در سال‌های اخیر با توجه به تقاضای بالای مواد دارای کاربردهای بالقوه دارویی و یا ارزش اقتصادی بالا به‌عنوان افزودنی‌های غذایی، آرایشی و بهداشتی، دارویی و محصولات شخصی، مطالعه روی فعالیت بیولوژیکی ترکیبات طبیعی مشتق‌شده از میکروارگانیسم‌ها، به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است [3, 4].

کاروتنوئیدها از رنگدانه‌های مهم و پرکاربرد هستند که از منابع گیاهی و میکروبی به دست می‌آیند. این رنگدانه‌ها متعلق به گروه شیمیایی پلی‌ان‌های ایزوپرنوئیدی و محلول در چربی بوده که رنگ زرد-قرمز ایجاد می‌کنند [3, 4]. رنگدانه‌ای مجاز خوراکی و طبیعی با منشا گیاهی مثل بیکسین و نوروبیکسین استخراج شده از دانه گیاه آناثو یا *بیکسا اورلانا* (*Bixa orellana* L.) اشکالات متعددی از قبیل بی‌ثباتی در برابر نور، گرما، pH، حلالیت، کم و اغلب عدم دسترسی آسان در طول سال را در پی دارند. امروزه پژوهشگران به دنبال تولید رنگدانه از میکروارگانیسم‌ها در صنایع مختلف هستند. تولید رنگدانه از میکروارگانیسم‌ها با توجه به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ بیشتر نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری است [5, 6]. چندین میکروارگانیسم تولیدکننده رنگدانه شناخته شده‌اند مانند میکروکوکوس، *باسیلوس موناسکوس پورپورئوس* (*Monascus purpureus*)، رودتورولا و فافیا در طبیعت به‌طور معمول یافت می‌شوند [4]. محرابی و همکاران [7] جداسازی و شناسایی مولکولی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده رنگدانه و سمیت حاد این رنگدانه‌ها را بررسی کردند، طبق نتایج رنگدانه‌های استخراج شده از میکروارگانیسم‌ها در حداکثر دوز خود روی موش‌های مورد آزمون اثر کشنده‌ای ندارند و تغییرات آنزیم‌های کبدی در حداکثر دوز قابل برگشت بوده است. نتایج پژوهش کوماری و همکاران [8] نشان داد که تغذیه موش‌های آلبینو با برنج حاوی رنگ قرمز *موناسکوس پورپورئوس* هیچ گونه اثر سمی‌ایی روی آنها نداشت.

تاکنون بیماری‌هایی با منشا غذایی و عملکرد پایین شیمی‌درمانی‌های مرسوم، به دست آوردن یک کاهش در میزان مرگ و میر در مقابل مشکلاتی مانند سرطان و بیماری‌های ناشی از آلودگی میکروبی، التهاب و حساسیت، یک نیاز اساسی به روش‌های جدید به‌منظور کنترل این بیماری‌ها و مشکلات را نشان می‌دهد [9]. کاروتنوئیدها به‌طور جامع مطالعه شده‌اند و اثرات مفید مختلف آنها بر سلامت انسان تایید شده که می‌توانند از طریق پیش‌سازبودن ویتامین A، اثر ضدالتهابی، ضدمیکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این اثرات مفید را نشان دهند [10-14].

بیماری‌هایی با منشا غذایی مرتبط با مصرف مواد غذایی آلوده به عوامل عفونت‌زا و یا سموم تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود. تخمین زده شده که سالانه ۳۰٪ افراد در کشورهای پیشرفته از بیماری‌هایی با منشا غذایی رنج می‌برند [15]. عصاره‌های طبیعی می‌توانند در بخش‌های مختلف سلولی میکروارگانیسم‌ها از جمله دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، پروتئین‌های غشای باکتری‌ها اختلال ایجاد کرده و یا باعث منعقد و کواگوله شدن محتویات سیتوپلاسم و نشت اجزای سیتوپلاسمی شوند و بدین ترتیب از رشد باکتری‌ها ممانعت کنند [16].

توسط سواب استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار به شکل سطحی کشت داده شد. دیسک‌های استریل با قطر ۶ میلی‌متر در محلول رنگی تهیه شده با غلظت‌های مشخص (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۵ میلی‌گرم بر لیتر) خیسانده و از آنها در سطح پتری‌دیش‌ها استفاده شد، سپس پتری‌دیش‌های تلقیح شده در دمای ۳۷°C قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد [19]. شاهد منفی (پلیت فاقد باکتری) و شاهد مثبت (پلیت بدون رنگ استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس) نیز در نظر گرفته شدند. به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد آنها با قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آغشته به رنگ میکروکوکوس روزئوس دیسک آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین به کار رفتند.

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

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

آزمایش‌ها روی هر کدام از باکتری‌ها در سه تکرار صورت گرفت. از آزمون توکی به منظور بررسی اختلاف میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ استفاده شد و نرم‌افزار آماری Minitab 16 برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها به کار رفت.

یافته‌ها

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

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

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضد میکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس انجام شد.

مواد و روش‌ها

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

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

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

بررسی فعالیت ضد میکروبی: از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار به منظور بررسی اثر ضد میکروبی رنگدانه استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس استفاده شد. بدین ترتیب که از باکتری‌های فعال شده (۲۴ ساعت رشد کرده) سوسپانسیونی معادل با کدورت لوله نیم مک‌فارلند استاندارد ایجاد شد. سپس

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

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

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

باکتری	۰/۵	۱/۵	۲/۵	۳/۵	۵	دیسک آنتی‌بیوتیک*
<i>باسیلیوس سرئوس</i>	۸/۲±۰/۴aD	۹/۱±۰/۷aC	۱۱/۱±۰/۲aB	۱۲/۲±۰/۴aA	۱۲/۴±۰/۶aA	۱۳ پ
<i>لیستریا مونوسیتوژنز</i>	۷/۶±۰/۳abD	۸/۶±۰/۴aC	۹/۴±۰/۴bC	۱۰/۸±۰/۴bcB	۱۲/۰±۰/۳aA	۲۲ پ
<i>اشریشیا کلی</i>	۶/۶±۰/۴cD	۸/۱±۰/۵abC	۸/۷±۰/۳bcC	۱۰/۳±۰/۳cdB	۱۱/۳±۰/۲bA	۱۱ ج
<i>سالمونلا اینتریتیدیس</i>	۶/۱±۰/۲cD	۷/۷±۰/۵cC	۸/۵±۰/۳cC	۹/۸±۰/۲dB	۱۰/۹±۰/۳bA	۱۰ ج
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۷/۴±۰/۲bE	۸/۱±۰/۲bD	۹/۶±۰/۳abC	۱۱/۳±۰/۳bB	۱۱/۵±۰/۳abA	۳۲ پ

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

جدول ۲) حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری توسط رنگ استخراج‌شده از میکروکوکوس روزئوس

باکتری	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	شاهد منفی	شاهد مثبت
<i>باسیلیوس سرئوس</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>لیستریا مونوسیتوژنز</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>اشریشیا کلی</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>سالمونلا اینتریتیدیس</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	+	+	+	+	+	+	-	+

جدول ۳) حداقل غلظت کشنده باکتری توسط رنگ استخراج‌شده از میکروکوکوس روزئوس

باکتری	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
<i>باسیلیوس سرئوس</i>	+	+	+	+	+	-
<i>لیستریا مونوسیتوژنز</i>	+	+	+	+	+	-
<i>اشریشیا کلی</i>	+	+	+	+	+	-
<i>سالمونلا اینتریتیدیس</i>	+	+	+	+	+	-
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	+	+	+	+	+	-

بحث

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضد میکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج‌شده از میکروکوکوس روزئوس انجام شد. در این پژوهش طبق نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری، رنگ استخراج‌شده از میکروکوکوس روزئوس بر رشد همه باکتری‌های مورد آزمون موثر بود بدین‌صورت که در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ بیشترین قطر هاله برای *باسیلیوس سرئوس* (۱۲/۴ میلی‌متر) و پس از آن *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۲/۰ میلی‌متر) و کمترین قطر هاله مربوط به *سالمونلا اینتریتیدیس* (۱۰/۹ میلی‌متر) بود. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) از باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود، در حالی که اختلاف معنی‌داری (به‌جز غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بین باکتری‌های گرم منفی مشاهده نشد ($p > 0.05$).

مقادیر قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجاورت با غلظت‌های مختلف رنگ استخراج‌شده از میکروکوکوس روزئوس اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$)، به‌طوری که با افزایش میزان غلظت رنگ قطر هاله مربوطه افزایش یافت. در حالی که، مقادیر قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* و در مقابل غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر و مقادیر قطر هاله عدم رشد برای باکتری

باسیلیوس سرئوس بین غلظت‌های ۳/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) و در مقابل با سایر غلظت‌های رنگ این اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$). *یومادوی* و *کریشناونی* [22] اثر ضدباکتریایی رنگ تولیدشده توسط میکروکوکوس *لوتئوس* (*M. luteus* 532949KF) را بررسی کردند، طبق نتایج مطالعه آنها این رنگ میکروبی اثرات ضد میکروبی خوبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا* و *سودوموناس* دارد. *مانیمالا* و *موروجسان* [23] فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی رنگ کاروتنوئیدی استخراج‌شده از میکروارگانیزم *اسپوروبولومایسس* (*Sporobolomyces*) ایزوله‌شده از گیاه برنج را بررسی کردند، نتایج آنها نشان داد این رنگدانه علاوه بر داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، اثر ضدباکتریایی بالایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* دارد.

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

- Chidambara Murthy KN, et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality?. Trends Food Sci Technol. 2005;16(9):389-406.
- 4- Frengova GI, Beshkova DM. Carotenoids from rhodotorula and phaffia: Yeasts of biotechnological importance. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009;36(2):163-80.
- 5- Kim CH, Kim SW, Hong SI. An integrated fermentation-separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95. Process Biochem. 1999;35(5):485-90.
- 6- Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Bacterial pigments and their applications. Process Biochem. 2013;48(7):1065-79.
- 7- Mehrabi M, Nazemi A, Nasrollahi A. Isolation and molecular identification of pigment producing microorganisms and acute toxicity of pigments. J Microb Biotechnol. 2011;3(9):19-28. [Persian]
- 8- Kumari HP, Naidu KA, Vishwanatha S, Narasimhamurthy K, Vijayalakshmi G. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. Food Chem Toxicol. 2009;47(8):1739-46.
- 9- Wang M, Tsao R, Zhang S, Dong Z, Yang R, Gong J, et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. Food Chem Toxicol. 2006;44(9):1522-9.
- 10- Hernández-Ortega M, Ortiz-Moreno A, Hernández-Navarro MD, Chamorro-Cevallos G, Dorantes-Alvarez L, Necochea-Mondragón H. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*capsicum annum* L.). J Biomed Biotechnol. 2012;2012:524019.
- 11- Han S, Yang Y. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. Dyes Pigments. 2005;64(2):157-61.
- 12- Siva R, Palackan MG, Maimoon L, Geetha T, Bhakta D, Balamurugan P, et al. Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes. Food Sci Biotechnol. 2011;20(1):7-13.
- 13- Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Shakouri S, Hosseini F. Comparing antibacterial and antioxidant activity of annatto dye extracted by conventional and ultrasound-assisted methods. Zahedan J Res Med Sci. 2015;17(7):e1020.
- 14- Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. Eur J Pharmacol. 2010;648(1-3):110-6.
- 15- Da Silva JPL, De Melo Franco BDG. Application of oregano essential oil against salmonella enteritidis in mayonnaise salad. Int J Food Sci Nutr Eng. 2012;2(5):70-5.
- 16- Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223-53.
- 17- AL-Wandawi H. Carotenoid biosynthesis in *micrococcus luteus* grown in the presence of different concentrations of nicotine. Int J Pure Appl Sci Technol. 2014;24(1):31-41.
- 18- Bhosale P, Gadren R. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2001;55(4):423-27.
- 19- Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. Phytochemistry. 2003;64(3):743-52.
- 20- Manenzhe NJ, Potgieter N, Van Ree T. Compostion

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

طبق نتایج مطالعه حاضر بین باکتری‌های گرم مثبت، لیستریا مونوسیژنر کمترین حساسیت را علیه فعالیت ضد میکروبی رنگ استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس نشان داد، به طوری که مقادیر MIC علیه لیستریا مونوسیژنر با مقادیر MIC علیه سالمونلا اینتریتیدیس و شریشیا کلی یکسان بود. دلیل احتمالی این پدیده وجود لیپوپلی ساکاریدهایی در دیواره سلولی لیستریا مونوسیژنر است که می‌تواند مقاومت باکتریایی را مثل غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی در مقابل عصاره‌های طبیعی افزایش دهد [28].

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

رنگ استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس علاوه بر ایجاد ظاهری مطلوب (رنگی) می‌تواند به عنوان یک جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

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

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

منابع

- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: Natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. Cell Mol Life Sci. 2008;65(19):2979-99.
- Debbab A, Aly AH, Lin WH, Proksch P. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. Microb Biotechnol. 2010;3(5):544-63.
- Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P,

against selected pathogenic, lactic acid and spoilage microorganisms. *J Food Prot.* 2003;66(6):1074-8.

25- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 1998;26(2):118-22.

26- McKeegan KS, Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* 2002;10(10 Suppl):S8-14.

27- Galindo-Cuspinera V. Volatile composition and antimicrobial properties of commercial annatto (bixa orellana l.) extracts, a natural food colorant. Maryland: University of Maryland; 2003.

28- Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.* 1997;153(1):9-29.

and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. *Phytochemistry.* 2004;65(16):2333-6.

21- Yolmeh M, Habibi Najafi MB, Farhoosh R, Hosseini F. Evaluation of the antibacterial activity of annatto dye on some pathogenic bacteria. *Qom Univ Med Sci J.* 2014;8(4):53-7. [Persian]

22- Umadevi K, Krishnaveni M. Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. *Int J Chem Anal Sci.* 2013;4(3):149-52.

23- Manimala MRA, Murugesan R. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. *J Appl Nat Sci.* 2014;6(2):649-53.

24- Galindo-Cuspinera V, Westhoff DC, Rankin SA. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts