نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۵ : ۷۴-۶۰

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

مقایسه خاصیت آنتی باکتریایی رنگدانه پرودیجیوزین باکتری *سراشیا مارسسنس* و رنگدانه کاروتنوئیدی *رودوتررولا* بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسینتوباکتر بومانی*

زهرا کامیابی[۱] ، بهاره رحیمیان ظریف[۲*]، منصور بیات[۳]

۱-کارشناسی ارشد میکروبیولوژی،گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار،گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۳- استاد تمام، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۳ تاریخ پذیرش:۱۴۰۲/۰۳/۲۱

چکیده

شناسایی ترکیب های ضد میکروبی جدید، راهی برای مقابله با گسترش روز افزون مقاومت باکتری ها است که رنگدانه های باکتریایی، یکی از ترکیب های ضد میکروبی می باشند. بیشترین عامل ایجاد عفونتهای مقاوم به درمان در انسان و حیوان، باکتریهایی مثل *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسینتوباکتر* می باشد. هدف از انجام این تحقیق، مقایسه خاصیت آنتی باکتریایی پیگمان پرودیجیوزین از باکتری *سراشیا مارسسنس* و پیگمان کاروتنوئیدی *رودوتررولا گلوتینیس*، بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسینتوباکتر*، می باشد. بعد از جداسازی باکتریها و شناسایی با استفاده از تستهای افتراقی، استخراج پیگمان *سراشیا مارسسنس*(PTCC:1111) و *رودوتررولا* (PTCC:۵۲۵۶)، از طریق کروماتوگرافی صورت گرفت. جهت ارزیابی اثر رقت های مختلف پیگمان ها بر روی باکتری ها از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای استریل استفاده شد و حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) به روش میکرو دایلوشن براث تعیین شد. چاهک گذاری با حجم های مختلف از رنگدانه ها صورت گرفت. از ۵۰ نمونه زخم سوختگی گرفته شده، ۲۶ نمونه از لحاظ وجود دوباکتری مثبت شدند که همگی آنها نسبت به آنتی بیوتیک کولیستین حساس و نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، ایمی پنم، سفتازیدیم، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. پس از تاثیر هر دو رنگدانه برروی *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین MBC مشاهده شده ۲۵ میکرولیتر µl ، و پس از تاثیر رنگدانه *پرودیجیوزین* بر روی باکتری *آسینتوباکتر* ، بیشترین MBC، ۶/۲۵ میکرولیتر µl و این مقدار برای *رنگدانه کاروتنوئیدی* ۲۵ میکرولیتر µl بوده است. در چاهک گذاری نیز بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به دو رنگدانه بر علیه این دو باکتری، در حجم ۲۰۰ میکرولیتر µl مشاهده شد.

واژه های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، *آسینتوباکتر*، پرودیجیوزین، *سراشیا مارسسنس*، *رودوتررولا*.

*نویسنده مسئول: بهاره رحیمیان ظریف

آدرس: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی ، سنندج، ایران.

پست الکترونیک: Rahimianzarif_b@iausdj.ac.ir

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) دو باکتری مهمی هستند که به عنوان پاتوژن های فرصت طلب در انسان و حیوان بوده و نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها مقاوم هستند (3). این مقاومت آنتی بیوتیکی بالا در این سویه های میکروبی، درمان عفونت ها را بسیار مشکل کرده و به علت طولانی شدن طول درمان، باعث گسترش ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک شده است (۶). *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) بدلیل پیچیدگی زیاد، تولید فرآورده های گوناگون خارج سلولی و عدم اطلاع از چگونگی دقیق بیماری زایی آن، به تدریج اهمیت و جایگاه ویژه خود را در علوم بیولوژی و پزشکی پیدا کرده است (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) از جمله باکتری هایی است که بر روی محیط های معمول رشد کرده و نیاز به مواد مغذی خاصی ندارد (۱۱). *آسینتوباکترها* به خصوص گونه *آسینتوباکتر بومانی* (*Acinetobacter bumannii*) به علت تغییر باکتریهای فلور نرمال و ظهور سویه های مقاوم، یکی از مهم ترین پاتوژن های بالینی محسوب میشود (۳). باکتری *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) که در اوایل قرن بیستم شناخته شده، یک پاتوژن فرصت طلب می باشد که بی رنگ، غیر متحرک، باسیل گرم منفی و ساپروفیتیک (Saprophytic) است (۵). از زمان های قدیم دانشمندان به دنبال ترکیب های طبیعی از گیاهان، جانوران و دیگر منابع برای درمان آنها بوده اند(۱۰). یک نمونه از این ترکیب های طبیعی به دست آمده از میکروارگانیسم ها، رنگدانه های میکروبی می باشند که امروزه توجه بسیاری را به خود جلب کرده است(۱۲).

رنگدانه پرودیجیوزین (Prodigiosin) کاندیدای مهمی در بررسی داروهای ضدسرطانی می باشد. به دلیل رنگ و فعالیت زیستی آن، پرودیجیوزین (Prodigiosin) کاربرد بالقوه ای در صنایع نساجی، رنگ های غذایی و ترکیبات ضد میکروبی دارد (۸). تولید رنگدانه کاروتنوئید توسط گونه های *رودوتورولا* (*Rhodotorula*)، از سال ۱۹۶۳ شروع به بررسی شد و در سال های اخیر در برنامه های کاربردی گسترده ای به عنوان بیوکنترل (Biocontrol)، به منظور کاهش بیماری های گیاهی ناشی از پاتوژن های قارچی شناخته شده اند (۱۸). Chenqiang و جمعی از همکاران بر روی تحقیقی که در سال ۲۰۱۹ در مجله الکترونیکی زیست فناوری به چاپ رسید، به این نتیجه رسیدند که رنگدانه پرودیجیوزین (Prodigiosin) کاربرد زیادی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی دارد (۸).

با توجه به احساس نیاز درمانهای موازی یا جایگزین آنتی بیوتیکی، در این تحقیق، خاصیت آنتی باکتریایی پیگمان پرودیجیوزین (Prodigiosin) باکتری *سراشیا مارسسنس* (*Serratia marcescens*) و پیگمان کاروتنوئیدی *رودوتورولا* (*Rhodotorula*) بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *آسنیتوباکتر* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نمونه گیری:

جامعه آماری مورد مطالعه شامل باکتری های سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و آسنیتوباکتر بومانی (*Acinetobacter bumannii*) می باشد، که ۵۰ نمونه از عفونت ناشی از زخم های سوختگی که بوسیله سوآپ های استریل به طور مستقیم برداشت شد.

کشت نمونه ها:

نمونه ها ی گرفته شده با سوآپ از طریق محیط کشت انتقال دهنده نوترینت براث (Nutrient Broth)، به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شده و بر روی محیط های مک کانکی(Mac Conkey agar) و سیتریماید سی آگار(Cetrimide Agar) و ائوزین متیلن بلو لاکتوز سوکروز آگار (Eosin methylene-blue lactose sucrose agar EMB Agar) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسنیتوباکتر*:

تست های کاتالاز(Catalase) ، اکسیداز(oxidase) ، مصرف اوره (Urease)، تی اس آی (Triple suger iron agar(TSI)، سولفید اندول موتیلیتی (Sulfide Indol Motility)، سیمون سیترات (Simmons Citrate agar)، اکسیداتیو- فرمنتیتو(Oxidative-Fermentative)،رنگ آمیزی گرم(Gram staining) و تست MR (Methyl Red) بر روی هر دو باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*)انجام شد (9 و 15).

آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک با استفاده از روش انتشار از دیسک (Disk agar diffusion method) (DAD) :

آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک، مطابق با استانداردهای موسسه بالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI)، بر روی محیط مولرهینتون آگار بعنوان تعیین میزان مقاومت یا حساسیت باکتری های *سودوموناس* آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)و *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) در برابر بعضی از آنتی بیوتیک ها (شرکت پادتن طب)، از جمله آمیکاسین (µ۳۰g/disk میکروگرم/دیسک)،کولیستین (µg/disk 10میکروگرم/دیسک)، جنتامایسین (µg/disk میکروگرم/دیسک)، ایمی پنم (µg/disk10میکروگرم/دیسک)، سفتازیدیم (µ۳۰g/disk میکروگرم/دیسک) وسیپروفلوکساسین (µg/disk5میکروگرم/دیسک) انجام شد (۳).

کشت باکتری *سراشیا مارسنس marcescens Serratia* و مخمر *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*)

کشت باکتری *سراشیا مارسنس*:

ابتدا باکتری سراشیا مارسنس *marcescens Serratia* که به صورت لیوفیلیزه با کد PTCC 1111 از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شد و پس از تایید توسط آزمونهای تشخیص میکروبی، در محیط BHI کشت داده و سپس جهت کشت باکتری از محیط مولر هینتون آگار Mueller Hinton Agar و پلیت کانت آگار Plate Count Agar استفاده شد.

کشت مخمر *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*):

برای کشت، مخمر *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*) با کد PTCC 5256 ، در محیط دی آر بی سی و سابرو دکستروز آگار (SDA) و سابرو دکستروز براث (SDB) کشت داده شد و محیط های کشت در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند.

استخراج رنگدانه ها

استخراج رنگدانه پرودیجیوزین (Prodigiosin):

محیط کشت حاوی باکتری وپیگمان پرودیجیوزین (Prodigiosin) با سرم فیزیولوژی شستشو یافته و به لوله های فالکون انتقال داده شد، سپس با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس

محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله را با ۳ Mililiter میلی لیتر محلول حاوی الکل اتانول(۹۶ ٪)و ۴٪ اسید کلریدریکMolar ۱ مولار، مخلوط شده و توسط دستگاه شیکر کاملا همگن شده و مجددا با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مایع رویی که حاوی رنگدانه بود، جداسازی و رسوب ته ظرف دور ریخته شد. سپس 250Mililiter میلی لیتر مایع حاوی رنگدانه در دستگاه روتاری(Rotary) قرار گرفت (۲).

استخراج رنگدانه *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*):

برای استخراج رنگدانه کاروتنوئیدی *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*) بعد از شستشوی محیط کشت مخمر و پیگمان، حجم Mililiter ۵ میلی لیتر از حلال آلی دی متیل سولفوکساید Dimethyl sulfoxide(DMSO) که قبلا تا دمای ۵۵ گرم شده بود، به محیط کشت حاوی مخمر اضافه شد و سپس مقدارMililiter ۱ میلی لیتر محلول فسفات سدیمMolar ۰/۰۱ مولار و Mililiter ۵ میلی لیتر دی اتیل اتر به منظور استخراج پیگمان اضافه گردید. بعد از شیک کردن و سانتریفیوژ در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی بدست آمده در دستگاه روتاری قرار گرفته و جذبMililiter ۲۵۰ میلی لیتر پیگمان استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometry) در طول موج ۴۸۸ نانومتر و خوانده شد (۱۶). برای نگهداری بهتر از رنگدانه های استخراجی آنها را در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال قرار دادیم.

در مراحل بعد کروماتوگرافی لایه نازک ، تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کمترین غلظت کشنده باکتری (MBC) و چاهک گذاری انجام گردید.

کروماتوگرافی لایه نازک TLC (Thin Layer Chromatography):

در این روش از یک لایه نازک و یکنواخت سیلیکاژل (Merk Germany) که روی یک پلاستیک سخت، پوشش داده شده بود، به عنوان فاز ثابت استفاده گردید. برای فاز متحرک نیز از یک حلال مایع مناسب کروماتوگرافی (محلول TLC) استفاده شد که نمونه در آن حل شد. با سمپلر µ5l میکرولیتر از هر دو رنگدانه با دو تکرار، به صورت نقطه ای با فاصله ۱cm سانتی متر از پایین، روی لایه جداسازی قرار گرفت. برگه TLC که از قبل توسط محلول TLC اشباع و خشک شده بود، بعد از نمونه گذاری در محلول TLC قرار داده شد. در نهایت فاکتور بازداری (R_f) برای دو نمونه محاسبه گردید (۱۳).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کمترین غلظت کشنده باکتری (MBC):

جهت ارزیابی اثر رقت های مختلف پیگمان ها بر روی باکتری به روش میکرو دایلوشن براث، از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای استریل استفاده شد. در تمامی چاهک ها مقدار µ50l میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth(MHB ریخته و سپس در دو خانه اولµ50l میکرولیتر از پیگمان های مورد نظر وارد شد. با استفاده از سمپلر مولتی چنل رقت سازی انجام و سپس µ50l میکرولیتر از استوک میکروبی که حاوی $1,5\times10^8$ تعداد باکتری بوده که درکل چاهک های مربوط به هر ردیف ریخته شد(به جز ۲ چاهک آخر) که به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته شدند (۳).

چاهک گذاری: از رنگدانه *سراشیا* به مقدار ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۰۲ میکرولیترµl، و از رنگدانه *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*) ۱۰۰، ۱۵۰، ۱۶۰، ۱۷۰، ۱۸۰، ۱۹۰، ۲۰۰ میکرولیتر µl جهت بررسی پس از چاهک گذاری با قطر معین استفاده گردید. سپس نتایج

هاله های عدم رشد بررسی شدند. که این روش از مطالعه TURKAN MUTLU و همکارانش الهام گرفته بود (۱۷).

نتایج:

در این مطالعه، ۵۰ نمونه حاصل از عفونتهای زخم مورد بررسی قرار گرفتند که ۲۴ نمونه نسبت به تشخیص باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* ، منفی و ۲۶ نمونه که حاوی تعداد ۱۵ نمونه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و ۱۱ نمونه باکتری *آسنیتوباکتر بومانی (Acinetobacter bumannii)* بودند، مثبت گزارش شدند.

نتایج کشت نمونه ها

نتایج کشت بر روی محیط ستریماید آگار(Cetrimide Agar)، مک کانکی آگار (MacConkey agar) و ای ام بی آگار(Eosin methylene-blue lactose sucrose agar(EMB AGAR):

پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون نمونه های *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* ، رشد باکتری پیگمان دار در محیط ستریماید آگار نشان از رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بود. هر دو باکتری های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa*)و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter bumannii*)بر روی محیط مک کانکی و ای ام بی آگار رشد کردند و کلنی های صاف و گرد به رنگ قرمز ایجاد شد.

نتایج تست های تاییدی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسنیتوباکتر*

در این مطالعه از ۵۰ نمونه گرفته شده، توسط تست های افتراقی مانند: سیمون سیترات، تریپل شوگر ، SIM، OF، کاتالاز، اکسیداز، مصرف اوره و MR، تعداد ۲۶ نمونه متعلق به باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* جداسازی گردید (جدول ۳).

جدول ۳-نتایج تست های بیوشیمیایی در باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *آسنیتوباکتر*

تست	*سودوموناس آئروژینوزا*	*آسنیتوباکتر*
رنگ آمیزی گرم	منفی	منفی
تریپل شوگر آیرون آگار(TSI)	قلیا/قلیا	قلیا/قلیا
حرکت	مثبت	منفی
اکسیداز	مثبت	منفی
مصرف اوره	مثبت	مثبت

تست	*سودوموناس آئروژینوزا*	*آسنیتوباکتر*
اندول	منفی	منفی
متیل رد	منفی	منفی
رشد در دمای ٤٢ درجه	مثبت	*
H2S	منفی	منفی
رشد در محیط مک کانکی	مثبت	مثبت
رشد در محیط سیتریماید سی آگار	مثبت	منفی

نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی توسط انتشار دیسک

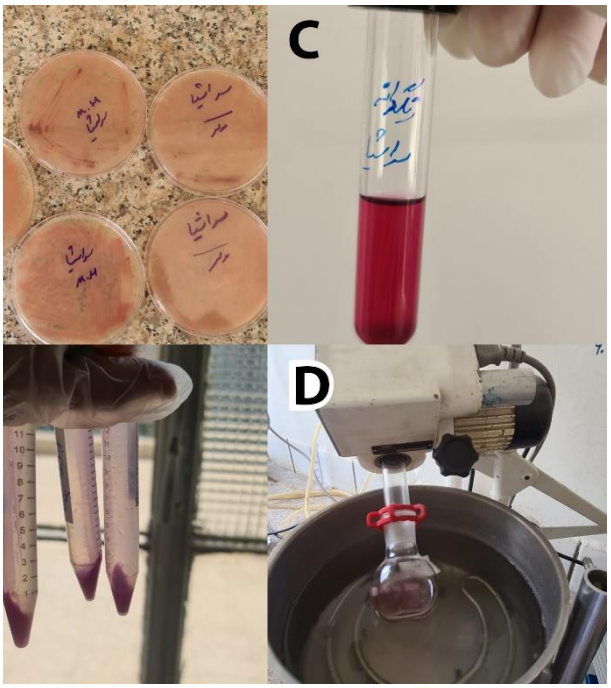
در این مرحله حساسیت سویه به آنتی بیوتیک ها به روش انتشار دیسک دیفیوژن بررسی گردید. در جدول ۴ نتایج حاصل از آن آورده شده است. بر اساس این جدول بیشترین حساسیت در جنس *سودوموناس آئروژینوزا* *Pseudomonas aeruginosa* مربوط به کولیستین بوده و تعداد کمی نسبت به سفتازیدیم (۱۴,۳٪)، آمیکاسین (۷,۱٪)و جنتامایسین (۷,۱٪) حساسیت نشان دادند. جنس *آسنیتوباکتر* *(Acinetobacter)* فقط نسبت به کولیستین حساس بود.

جدول٤- فراوانی مقاومت و حساسیت سویه های جداشده در برابر آنتی بیوتیک ها

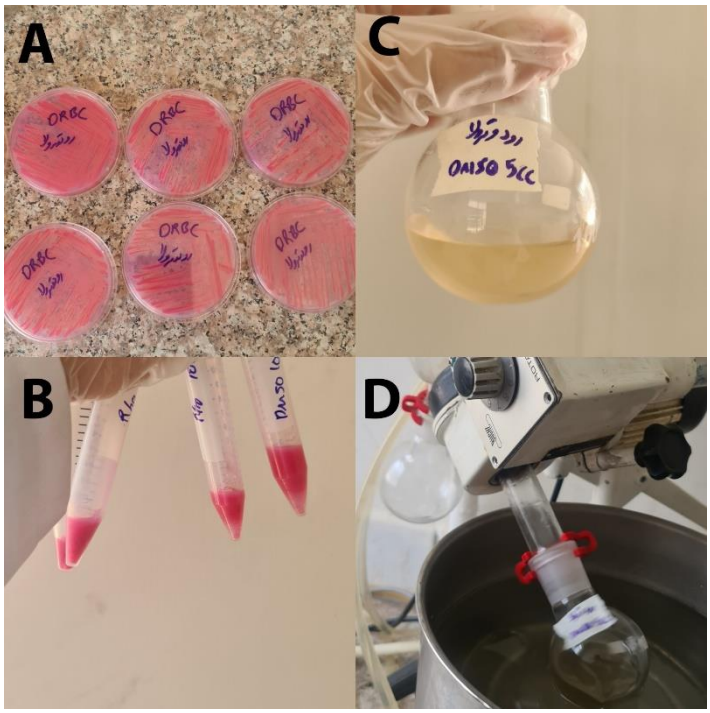
نام آنتی‌بیوتیک	مقاومت و حساسیت باکتریایی	*Pseudomonas aeruginosa* (n = ١٤) فراوانی (درصد)	*Acinetobacter* (n = ١٢) فراوانی (درصد)	کل (n = ٢٦) فراوانی (درصد)
Amikacin	Resistance	١٣ (٩٢/٩)	١٢ (١٠٠/٠)	٢٥ (٩٦/٢)
	Sensitive	١ (٧/١)	٠ (٠/٠)	١ (٣/٨)
Colistin	Resistance	٠ (٠/٠)	٠ (٠/٠)	٠ (٠/٠)
	Sensitive	١٤ (١٠٠/٠)	١٢ (١٠٠/٠)	٢٦ (١٠٠/٠)
Gentamicin	Resistance	١٣ (٩٢/٩)	١٢ (١٠٠/٠)	٢٥ (٩٦/٢)
	Sensitive	١ (٧/١)	٠ (٠/٠)	١ (٣/٨)
Ceftazidime	Resistance	١٢ (٨٥/٧)	١٢ (١٠٠/٠)	٢٤ (٩٢/٣)
	Sensitive	٢ (١٤/٣)	٠ (٠/٠)	٢ (٧/٧)
Imipenem	Resistance	١٤ (١٠٠/٠)	١٢ (١٠٠/٠)	٢٦ (١٠٠/٠)
	Sensitive	٠ (٠/٠)	٠ (٠/٠)	٠ (٠/٠)
Ciprofloxacin	Resistance	١٤ (١٠٠/٠)	١٢ (١٠٠/٠)	٢٦ (١٠٠/٠)
	Sensitive	٠ (٠/٠)	٠ (٠/٠)	٠ (٠/٠)

نتایج حاصل از استخراج رنگدانه ها

بعد از انجام دادن تمامی مراحل استخراج رنگدانه ها برای بدست آوردن یک رنگدانه خالص آن ها در دستگاه روتاری قرار گرفتند. در شکل های ۳ و ۴ مراحل صورت گرفته برای استخراج رنگدانه ها به تصویر کشیده شده است.



شکل ۳ – مراحل مختلف استخراج رنگدانه *سراشیا مارسسنس*(A: شستشوی رنگدانه، B: رسوب بعد از سانتریفیوژ،C: رنگدانه استخراج شده، D: قرار دادن رنگدانه در دستگاه روتاری)



شکل ۴ – مراحل مختلف استخراج رنگدانه *رودوتروla* (A: شستشوی رنگدانه، B: افزودن ترکیبات مختلف، C: محلول رویی بعد از سانتریفیوژ، D: قرار دادن رنگدانه در دستگاه روتاری).

نتایج حاصل از قرائت OD

نتایج حاصل از قرائت OD برای رنگدانه های *رودوتروla* (*Rhodotorula*) و *سراشیا* به ترتیب شامل: ۰/۳۰۳ و ۰/۵۷۷ و نتایج حاصل از خوانش دستگاه اسپکتروفتومتری Spectrophotometry در طول موج ۴۸۸ نانومتر برای رنگدانه های *رودوتروla* (*Rhodotorula*) و سراشیا به ترتیب: ۰/۱۷۵ و ۱/۸۳۸ بودند.

نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک

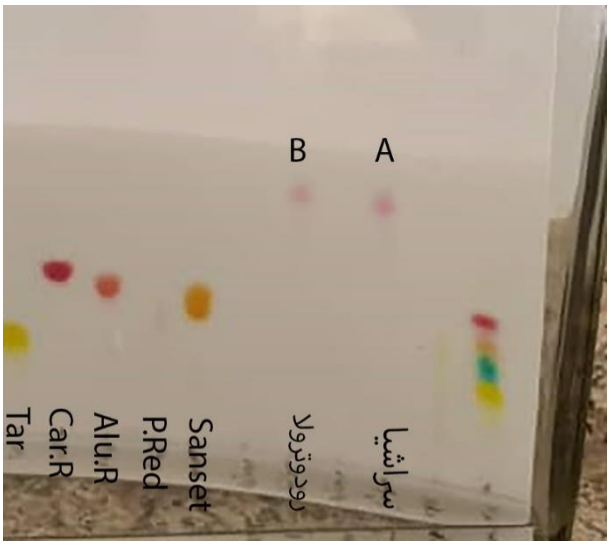
بعد از اینکه کاغذ TLC از محلول TLC اشباع شد و لکه ها به بالای کاغذ منتقل شدند، آن را در هوای آزاد گذاشته تا خشک شد. سپس با استفاده از یک خط کش مقدار فاکتور Rf آن را محاسبه کردیم. Rf به ترتیب

برای پیگمان *سراشیا مارسسنس* و *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*) ۰/۸۲ و ۰/۸۴ بود .

Rf = A/B

فاصله طی شده توسط نمونه = A

فاصله طی شده توسط حلال = B



شکل 5 -

نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک پیگمان *سراشیا مارسسنس* (A) و *رودوتروﻻ* (B)

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کمترین غلظت کشنده باکتری (MBC)

بیشترین MIC مشاهده شده برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*(*Pseudomonas aeruginosa*) در حجم۱۲/۵ میکرولیتر µl از رنگدانه *سراشیا* و *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*)، و برای باکتری *آسنیتوباکتر*(*Acinetobacter*) ۱۲۵ / ۳ میکرولیتر µl از رنگدانه *سراشیا* و ۱۲/۵ میکرولیتر µl از *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*) بوده است . بیشترین MBC مشاهده شده در حجم ۲۵ میکرولیتر µl از هر دو رنگدانه برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) ، و برای باکتری *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) بیشترین MBC مشاهده شده در رنگدانه سراشیا به حجم ۶/۲۵ و برای رودوتروﻻ(*Rhodotorula*) ۲۵ میکرولیتر µlبوده است. (شکل ۶).

در اثرگذاری سینرژیسم دو رنگدانه همزمان با هم بیشترین بیشترین MIC ایجاد شده برای هر دو باکتری در حجم ۶/۲۵ میکرولیتر µl از هر دو رنگدانه و بیشترین MBC برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر µlدیده شد.

جدول ۵- درصد فراوانی MIC و MBC باکتری ها در مقادیر مختلف رنگدانه های *سراشیا* و *رودوتورولا*

	نوع رنگدانه	مقدار رنگدانه بر حسب میکرولیتر	*Pseudomonas aeruginosa*		*Acinetobacter*		کل	
			فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
MBC	رنگدانه *سراشیا*	1.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		3.125	1	7.7	0	0.0	1	4.5
		6.25	2	15.4	4	44.4	6	27.3
		12.5	4	30.8	3	33.3	7	31.8
		25	6	46.2	2	22.2	8	36.4
	رنگدانه *رودوتورولا*	1.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		3.125	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		6.25	0	0.0	3	30.0	3	14.3
		12.5	3	27.3	2	20.0	5	23.8
		25	8	72.7	5	50.0	13	61.9
	سینرژیسم	1.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		3.125	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		6.25	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		12.5	1	100.0	1	100.0	2	100.0
		25	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MIC	رنگدانه *سراشیا*	1.5	1	7.1	0	0.0	1	4.3
		3.125	2	14.3	4	44.4	6	26.1
		6.25	4	28.6	3	33.3	7	30.4
		12.5	7	50.0	2	22.2	9	39.1
		25	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	رنگدانه *رودوتورولا*	1.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		3.125	0	0.0	4	40.0	4	19.0
		6.25	3	27.3	1	10.0	4	19.0
		12.5	8	72.7	5	50.0	13	61.9
		25	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	سینرژیسم	1.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		3.125	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		6.25	1	100.0	1	100.0	2	100.0
		12.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		25	0	0.0	0	0.0	0	0.0

نتایج ارزیابی رنگدانه ها به روش چاهک گذاری:

در این روش از حجم های مختلف رنگدانه *سراشیا* شامل:

۱۵۰ میکرولیتر µl ، ۱۸۰ میکرولیتر µl ، ۱۹۰ میکرولیترµl ، ۲۰۰ میکرولیتر µl و ۲۰۲ میکرولیتر µl و حجم های متفاوت از رنگدانه *رودوتورولا* (*Rhodotorula*) که شامل: ۱۰۰ میکرولیترµl ، ۱۵۰ میکرولیترµl ، ۱۶۰ میکرولیترµl ، ۱۷۰ میکرولیترµl ، ۱۸۰ میکرولیترµl ، ۱۹۰ میکرولیترµl ، ۲۰۰ میکرولیترµl می باشند، بر روی دو باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *آسنیتوباکتر* (*Acinetobacter*) اثرگذاری کردیم (شکل های ۷ و ۸). میانگین هاله های ایجاد شده در چاهک ها

در جدول ۶ ثبت شـده اسـت . اثر سـینرژیسـم هر دو رنگدانه همزمان باهم به حجم ۲۰۰ میکرولیترµl مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۷-نتایج حاصل از چاهک گذاری رنگدانه های *رودوترولا* و *سراشیا مارسسنس* در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

شـکل ۸-نتایج حاصل از چاهک گذاری رنگدانه های *رودوترولا* و *سـراشـیا مارسـسـنس* در باکتری *آسنیتوباکتر*

جدول ٦-میانگین هاله های ایجاد شده در چاهک ها با مقادیر مختلف رنگدانه های *سراشیا* و *رودوترولا* بر روی دو باکتری مورد مطالعه

مقدار رنگدانه‌ها بر حسب میکرولیتر	نوع رنگدانه	*Pseudomonas aeruginosa* (۱۵ = تعداد باکتری) (میانگین هاله ایجاد شده بر حسب میلی متر)	*Acinetobacter* (۱۱ = تعداد باکتری) (میانگین هاله ایجاد شده بر حسب میلی متر)	Total (۲۶ = تعداد باکتری) (میانگین هاله ایجاد شده بر حسب میلی متر)
150	سراشیا	17.000	16.182	16.654
180		18.467	18.455	18.462
190		19.667	19.455	19.577
200		21.000	21.455	21.192
100	رودوترولا	10.000	10.000	10.000
150		16.467	17.273	16.808
160		17.867	18.273	18.038
170		19.000	19.273	19.115
180		20.000	20.364	20.154
190		20.933	21.364	21.115
200		21.933	22.727	22.269
۱۰۰سراشیا+۱۰۰رودوترولا	Synergism	16	17	16.500

بحث:

نتایج تحقیق انجام گرفته نشان می دهد که میزان فراوانی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* در عفونتهای زخم بسیار بالاست و این امر موجب طولانی شدن مدت درمان مدت و دریافت دوزهای مختلفی از انواع آنتی بیوتیک ها برای جلوگیری از گسترش عفونت باکتریایی، و همینطور سبب مقاومت بیشتر باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها می شود.

بیشترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت های ویژه شامل *سودوموناس آئروژینوزا Pseudomonas aeruginosa* و *آسینتوباکتر* می باشد که نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان می دهند. این مقاومت آنتی بیوتیکی بالا در این سویه های میکروبی، درمان عفونت ها را بسیار مشکل و به علت طولانی شدن زمان بستری بیماران، پرهزینه کرده است.

در مقاله مصطفوی زاده و همکارانش، که بر روی الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* جدا شده از بیمارستان کار کردند به این نتیجه رسیدند که همه نمونه ها نسبت به سفازولین، سفپیم، سفتازیدیم، جنتامایسین، کوتریموکسازول حساس بودند (۵).

در این مطالعه از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی می توان گفت باکتری *سودوموناس* آئروژینوزا *Pseudomonas aeruginosa* و *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* ۱۰۰٪ نسبت به آنتی بیوتیک کولیستین حساسیت نشان داده و مقاومت ۱۰۰ ٪ نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم و سیپروفلوکساسین داشته اند. مقاومت های ۹۶,۲٪ و ۹۲,۳٪ به ترتیب متعلق به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم می باشند.

با گسترش روز افزون مقاومت باکتری های بیماریزا به آنتی بیوتیک های موجود که باعث بروز بیماری های گوناگون در انسان و حیوان می شود، شناسایی ترکیب های ضد میکروبی جدید ضروری است. رنگدانه های باکتریایی به عنوان محصولات فعال زیستی، یکی از گزینه های شناسایی ترکیب های ضد میکروبی جدید می باشند. میکروارگانیسم ها جهت تولید محصولات ضد میکروبی جدید مانند رنگدانه مورد توجه قرار دارند . به طور کلی میتوان گفت رنگدانه های تولید شده بوسیله ی میکروارگانیسم ها دارای خواص درمانی از جمله: خواص ضد اکسیدانت، سیتوتوکسیک، ضد لیشمانیا، ضد زخم، ضد ویروسی، آنتی بیوتیکی، ضد توموری و غیره هستند (۱۰). در مطالعه ای که توسط Lapenda و همکاران انجام شده، اثر ضد میکروبی رنگدانه پرودیجوزین (Prodigiosin) باکتری *سراشیا مارسسنس Serratia marcescens* بر روی باکتری های بیماریزای *اشرشیاکلی (Escherichia coli)*، *سودوموناس آئروژینوزا(Pseudomonas aeruginosa)*، *استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus aureus*)، *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)*، *استرپتوکوکوس پیوژنز (Streptococcus pyogenes)* و *انتروکوکوس فیکالیس (Enterococcus faecalis)* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به این صورت بود که باکتری های *اشرشیاکلی*، *آسنیتوباکتر (Acinetobacter)* و *سودوموناس* نسبت به رنگدانه مقاومت نشان دادند (۱۴). در تحقیق انجام شده توسط ما، رنگدانه *سراشیا* با مقادیر مختلف هاله های عدم رشد را در چاهک گذاری، ایجاد کردند که دلیل بر خاصیت

ضـد میکروبی آن بود. مقاله محمود یلمه و همکاران در سال ۹۷ در مورد اثر ضد میکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی اسـتـخـراج شـــده از مـیـکـروکـوکـوس *روزئـوس* (*Micrococcus roseus*) بود که در آن بر اساس نتایج حـاصـــل از قطر هـاله عدم رشـــد باکتری، این رنگدانه کاروتنوئیدی بیشترین قطر هاله برای *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) و کمترین قطر هاله مربوط به *سالمونلا اینتریتیدیس* (*Salmonella enteritidis*) داشته است و همینطور اثر ضـد میکروبی برای باکتری های گرم مثبت مورد آزمون نسبت به باکتری های گرم منفی بیشتر بوده اسـت (7). در پژوهش حاضـر، رنگدانه کاروتنوئیدی از مخمر *رودوتروﻻ گلوتینیس*(*Rhodotorula glutinis*) اسـتخراج شـد، که حسـاسـیت دو باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *آسـنیتوباکتر*(*Acinetobacter*) را نسـبـت بـه این رنگدانه شاهد بودیم.

مقـاله محمود یلمه و همکاران در سـال ۹۷ در مورد اثر ضـد میکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج شـده از میکروکوکوس روزئوس می باشـد که در آن بر اسـاس نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد باکتری، این رنگدانه کاروتنوئیدی بیشـترین قطر هاله برای *باسـیلوس سرئوس* و *لیسـتریا مونوسـیتوژنز* و کمترین قطر هاله مربوط به *سـالمونلا اینتریتیدیس* داشـته اسـت و همینطور اثر ضـد میکروبی برای بـاکتری هـای گرم مثبـت مورد آزمون نسبت به باکتری های گرم منفی بیشتر بوده است (۷).

در پژوهش انجام شـده توسط ما، رنگدانه کاروتنوئیدی از مـخـمـر *رودوتـروﻻ گـلـوتـینیس* (*Rhodotorula glutinis*) استخراج شد، که حساسیت دو باکتری گرم مـنـفـی ســـودومـونـاس *آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)و *آسـنیتوباکتر*(*Acinetobacter*) را نسبت به این رنگدانه شاهد بودیم.

در کل میتوان گفت که بیشـترین میزان MBC مشـاهده شـــده مربوط به مقدار ۲۵ میکرولیترµl از رنگدانه ها و بیشـــترین مقـدارMIC مشـــاهده شـــده مربوط به ۱۲,۵ میکرولیترµl از دو رنگدانه می باشـد. میزان اثرگذاری رنـگـــدانـــه *ســـــراشـــــیـــا* بـــر روی بـــاکـــتـــری *آسـنیتوباکتر*(*Acinetobacter*) با MBC=۶/۲۵ بهتر از *رودوتروﻻ* (*Rhodotorula*) بوده است.

در بررسـی سـینرژیسم دو رنگدانه، MBC مشاهده شده مربوط بـه ۱۲,۵ میکرولیترµl و MIC مشـــاهده شـــده متعلق به ۶,۲۵ میکرولیترµl می باشد .

در مطـالعـه ای کـه بر روی چـاهـک هـای مربوط به دو رنگدانه انجام گرفت مشاهده شد که:

هر چـه میزان حجم رنگـدانه ها در چاهک های مربوطه افزایش پیـدا می کننـد، میانگین اندازه هاله عدم رشـــد باکتری ها هم زیاد می شود.

در سـینرژیســـم هر دو رنگـدانـه کـه بـه مقـدار ۲۰۰ مـیـکـرولـیـتـرµl بـود، در ســـودومـونـاس *آئـــروژیـــنـــوزا*(*Pseudomonas aeruginos*)و *آسـنیتوباکتر*(*Acinetobacter*) به ترتیب میانگین هاله هـای عدم رشـــد ۱۶ و ۱۷ میلی متر می باشـــند. در این حالت اثر سـینرژیسـم، خاصـیت ضـد باکتریایی خود را نشان داد.

نتیجه گیری:

با توجه به میزان شیوع گسترده باکتری های *سودوموناس آئـــروژیـــنـــوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)و *آسـنیتوباکتر*(*Acinetobacter*) ، می توان پیش از شروع درمان با انواع آنتی بیوتیک ها، کشـــت و آنتی بیوگرام انجام گیرد و با توجه به حسـاسـیت آنتی بیوتیکی تجویز دارو صـورت پذیرد و استفاده از رنگدانه های میکروبی

بصورت تلفیقی با آنتی بیوتیک یا خالص پس از بررسی مطالعات تجربی آزمایشگاهی در پروسه درمان استفاده شود.

تشکر و قدردانی:

از ریاست و پرسنل محترم آزمایشگاه مبنا تشخیص و ریاست و کارکنان محترم مجتمع آزمایشگاهی رازی علوم و تحقیقات بی نهایت سپاسگزارم.

منابع

۱. تقی نژاد، ج. ، حسین زاده، م. ، مولایی کهنه شهری، ش.؛ جوان جسور، و.؛ (زمستان ۱۳۹۵)، *مروری به زیست شناسی باکتری سودوموناس آئروژینوزا*، *فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص*، صفحه ۳-۲.

۲. حسینی، ا.؛ فتاحی، ا.؛ هدایتی فرد، م.؛ (آبان ۱۳۹۴)، استخراج رنگدانه پرودی جیوسین از باکتری *سراشیا مارسسنس Serratia marcescens* و بررسی خاصیت ضد میکروبی آن، *مجله علوم و صنایع غذایی ایران*، صفحه ۳.

۳. رجب پور، مجتبی؛ عربستانی، محمد رضا؛ یوسفی مشعوف، رسول؛ علیخانی، محمد یوسف؛ (پاییز ۱۳۹۲)، تعیین MIC سه کلاس مختلف پادزیستی در ایزوله های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان آموزشی شهر همدان ، *مجله میکروب شناسی پزشکی ایران*، دوره ۷، صفحه ۵-۱.

۴. سعیدی، س.؛ عبدالصالحی، م.؛ خدابنده، م.؛ الوندی منش، آ.؛ پور نجف، ا.؛ رجب نیا، ر.؛ (۱۳۹۷)، بررسی کلاس های مختلف اینتگرون و ژن های کد کننده مقاومت به کاربانیم در سویه های *استنیتوباکتر بومانی* جدا شده از نمونه های زخم سوختگی ، *نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز* ، دوره ۷ ، صفحه ۳۳۲-۳۲۳.

۵. مصطفوی زاده، ک.؛ مسگری، آ.؛ دکتر پور احمد، م.؛ (۱۳۹۴)، بررسی شیوع و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *آسنیتوباکتر* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان در سال ۱۳۹۲، *مجله دانشکده پزشکی اصفهان*، دوره ۳۳، صفحه ۲۳۷۴,-۲۳۸۰

۶. نوری طلب، ن.؛ لطیف نیا، م.؛ سمر باف زاده، ع.؛ شمس پور، ن.؛ دکتر طالبی طاهر، م.؛ مصطفوی، ا.؛ فتاحی عبدی زاده، م.؛ (۱۳۹۲)، بررسی فراوانی *پسودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو در بیماران مبتلا به پنومونی وابسته به دستگاه تنفس مصنوعی، *مجله علوم پزشکی رازی*، دوره ۲۰، صفحه ۱۶-۲۳.

۷. یلمه، م.؛ خمیری، م.؛ قائمی، ع .؛ رمضان پور، س.؛ قربانی، م.؛ (پاییز ۱۳۹۷.)، اثر ضدمیکروبی رنگدانه کاروتنوئیدی استخراج شده از *میکروکوکوس روزئوس*، *زیست فناوری دانشگاه مدرس*، دوره ۹، صفحه۵-۲.

۸. Chenqiang Lin, Xianbo Jia, Yu Fang, Longjun Chen, Hui Zhang, Rongbin Lin, Jichen Chen. (2019). Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* FZSF02 in the form of pigment pellets, *Electronic Journal of Biotechnology pigment pellets*, **40:** 58–64.

9. Collier L.Balows A. and Sussman M. 1998. Topley and Wison's microbiology and microbial infections. 9th ed., *Oxford University Press*, Inc, **pp:** 245-1138.

10.El-Batal AI, El-Sayyad GS, El-Ghamry A, Agaypi KM, Elsayed MA, Gobara M.(2017). Melanin-gamma rays assistants for bismuth oxide nanoparticles synthesis at room temperature for enhancing antimicrobial, and photocatalytic activity.

Journal of Photochemistry and Photobiology, **173:** 120-39.
11. Gaceca P. and Russel N.J.(1990). *Pseudomonas* infection and alginate, *Biochemistry Genetics and Pathology*, **pp:**1-25.
12. Hardeep S. Tuli & Prachi Chaudhary & Vikas Beniwal & Anil K. Sharma. (2014). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives, *Journal of Food Science and Technology*, **52:** 4669–4678.
13. Jean Tony Amalya J and Judia Harriet Sumathy V. (2014). Analysis of carotenoid pigments extracted by column chromatography from the leaves and flowers of Peltophorum pterocarpum by thin layer chromatography, *Unique Research Journal of Chemistry*, **02:**11-17.
14. Lapenda JC, Silva PA, Vicalvi MC, Sena KX, Nascimento SC.(2015). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31:** 399-406.
15. Lory S. and tai P.C. 1985. Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa*, *Genetic Approaches to Microbial Pathogenicity*, **118:**53-89.
16. Somayeh Allahkarami, Abbas Akhavan Sepahi, Hedayat Hosseini, Mohamad Reza Razavi.(December 2021). Isolation and identification of carotenoid-producing Rhodotorula sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production, *Biotechnology Reports*, **32:** 2-4.
17. Turkan., M., K , Zerrin., E., Esra., T and Umit., K. (2013). Antioxidant and Antibacterial Effects of Carotenoids Extracted from *Rhodotorula glutinis* Strains, *Asian Journal of Chemistry*; **25:** 42-46.
18.Zhang H, Ma L, Turner M, Xu H, Dong Y, Jiang S. 2009. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chemistry*, **117:**621-6.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 2, Autumn & Winter 2023

Comparison of antibacterial properties of prodigiosin pigment extracted from *Serratia marcescens* and carotenoid pigment *Rhodotorula glutinis* on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*

Zahra Kamyabi[1], Bahareh Rahimian Zarif[2]*, Mansour bayat[3]

1. *1 M.Sc, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran,Iran*
2. *Assistant Professor,Department of Biology, Sanandaj Branch,Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.*
3. *Full Professor, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Received: 14 July 2022 Accepted: 11 June 2023

Abstract

Identifying new antimicrobial compounds is a way to deal with spread of bacterial resistance, which bacterial pigments are one of the antimicrobial compounds. The most common causes of treatment-resistant infections in humans and animals are bacteria such as Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter. The purpose of this research is to compare the antibacterial properties of prodigiosin pigment from Serratia marcescens and carotenoid pigment from Rhodotroella glutinis on Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter. After separating the bacteria and identifying them, by using differential tests, Serratia marcescens (PTCC: 1111) and Rhodotrola (PTCC: 5256) pigments were extracted through chromatography. In order to evaluate the effect of different dilutions of pigments on bacteria, sterile 96-well microplates were used and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MBC) were determined by broth microdilution method. Welling was done with different volumes of pigments. Out of the 50 burn wound samples, 26 samples were positive for the presence of two bacteria, all of which were sensitive to colistin and resistant to gentamicin, imipenem, ceftazidime, amikacin and ciprofloxacin. After the effect of both pigments on Pseudomonas aeruginosa, the highest MBC observed was 25 microliters, and after the effect of prodigiosin pigment on Acinetobacter bacteria, the highest MBC was 6.25 microliters, and this value for carotenoid pigment was 25 microliters. In welling, the largest average diameter of the zone of inhibition related to two pigments against these bacteria was observed in the volume of 200 microliters.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter, Prodigiosin, Serratia marcescens

* *Corresponding author: Bahareh Rahimian Zarif*

Address: Department of Biology, College of Medical sciences, Islamic Azad University,Sanandaj, Iran.

Email: Rahimianzarif_b@iausdj.ac.ir