https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en
Biological Journal of Microorganism
12rd Year, Vol. 12, No. 46, Summer 2023 pp. 1-12
Received: 01.01.2022 Accepted: 25.06.2022

(Research Paper)

A Study of Antimicrobial Effects of Pyocyanin Pigment of *Pseudomonas aeruginosa* Strains isolated from Environmental Sources against Bacteria Cause of Urinary Tract Infections

Faezeh Bahrami
Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, f.bahrami7070@gmail.com
Farzaneh Hosseini*
Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran., hosseinimicrobiology@gmail.com
Abbas Akhavanesepahy
Department of Microbiology, Faculty of Bioscience, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran., akhavansepahy@gmail.com

Abstract

Introduction: Today, the treatment has been more difficult because the resistance of human opportunistic pathogens including the urinary tract infections bacteria increased against a wide range of antibiotics.

Materials and Methods: In this study, *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from environmental surfaces and then the presence of a gene related to pigment biosynthesis was confirmed by PCR. Pyocyanin pigment was extracted by chloroform and its purity was confirmed by the TLC method. Bacteria causing urinary tract infections including *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. and *Klebsiella* sp. were collected and the antimicrobial effect of this pigment was investigated by disk placement and well-diffusion methods on each of the above bacteria.

Results: The results of this study showed that the highest sensitivity to pyocyanin pigment extract was related *to Staphylococcus saprophyticus* and *Enterococcus* sp. in disk placement and well-

*Corresponding Author

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.131793.1435

diffusion methods. The diameter of the growth inhibition zone without considering the effect of chloroform for both bacteria was 4 and 2 mm in the disk placement method and 4 and 3 mm in the well-diffusion method, respectively. Therefore, pyocyanin pigment had a greater antimicrobial effect on gram-positive bacteria than gram-negative bacteria.

Discussion and Conclusion: In this study, pigment-producing bacteria were isolated from environmental surfaces due to their lower probability of pathogenicity for humans than strains isolated from clinical samples that have been used in most studies for pigment extraction. Therefore, these strains can be a better option for extracting pyocyanin pigment as an antimicrobial matter that can be replaced with antimicrobial agents and synthetic antibiotics.

Keywords: *Pseudomonas Aeruginosa*, Pyocyanin, Urinary Tract Infection

https://bjm.ui.ac.ir
زیســـــت‌شناســـــی میکروارگانیســـــم‌هـــــا
ســال دوازدهــم، شــماره ۴۶، تابســتان ۱۴۰۲، صــفحه ۱ - ۱۲
تـاریخ دریافـت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱ تـاریخ پـذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی رنگدانه پیوسیانین *سودوموناس آئروژینوزا* ایزوله‌شده از سطوح محیطی علیه باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری

فـــــائزه بهرامـــــی: کارشـناس ارشـد گـروه میکروبیولـوژی، دانشـکدهٔ علـوم زیسـتی، دانشـگاه آزاد اسـلامی، واحـد تهـران شـمال، تهـران، ایـران، f.bahrami7070@gmail.com

فرزانـــــه حســـــینی*: اسـتادیار گـروه میکروبیولـوژی، دانشـکدهٔ علـوم زیسـتی، دانشـگاه آزاد اسـلامی، واحـد تهـران شـمال، تهـران، ایـران، hosseinimicrobiology@gmail.com

عبـاس اخـوان سـپهی: استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران، akhavansepahy@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه با افزایش مقاومت پاتوژن‌های فرصت طلب انسانی ازجمله باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها درمان آنها دشوارتر شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از سطوح محیطی، جداسازی و سپس وجود ژن مربوط به بیوسنتز رنگدانه با روش PCR تأیید شد. رنگدانه پیوسیانین توسط کلروفرم، استخراج و خلوص آن با روش TLC تأیید شد. باکتری‌های عامل عفونت ادراری شامل *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا* جمع‌آوری شدند و اثر ضدمیکروبی این رنگدانه با روش‌های دیسک‌گذاری و چاهک‌گذاری روی هریک از باکتری‌های فوق بررسی شد.

نتایج: نتایج به دست‌آمده از این تحقیق نشان دادند بیشترین حساسیت نسبت به عصاره رنگدانه پیوسیانین مربوط به *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و جنس *انتروکوکوس* در روش های دیسک گذاری و چاهک گذاری بوده است. قطر

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.131793.1435

هاله عدم رشد بدون احتساب تأثیر کلروفرم برای هر دو باکتری در روش دیسک‌گذاری به‌ترتیب ۴ و ۲ میلی‌متر و در روش چاهک‌گذاری ۴ و ۳ میلی‌متر بود؛ بنابراین، رنگدانه پیوسیانین روی باکتری‌های گرم مثبت اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه باکتری مولد رنگدانه، به دلیل احتمال بیماری‌زایی کمتر آن برای انسان نسبت به سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی که در بیشتر مطالعات برای استخراج رنگدانه از آنها استفاده شده، از سطوح محیطی جداسازی شده است؛ بنابراین، این سویه‌ها می‌توانند گزینه مناسب‌تری برای استخراج رنگدانه پیوسیانین به‌عنوان یک ماده ضدمیکروبی قابل جایگزین با مواد ضدمیکروبی و آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک باشند.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، پیوسیانین، عفونت ادراری

مقدمه

دستگاه ادراری به‌طور طبیعی فاقد هرگونه میکروارگانیسم است و زمانی عفونت ایجاد می‌شود که هریک از انواع باکتری، ویروس، قارچ و انگل‌ها به دستگاه ادراری حمله کنند و باعث عفونت شوند (۱و ۲). عفونت دستگاه ادراری[1] یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است که به‌عنوان دومین عامل عفونت در بدن انسان شناخته شده است (۳). شیوع این عفونت براساس سن و جنس متفاوت و به‌طور واضحی به‌دلایل تفاوت‌های آناتومیکی، در زنان بیشتر از مردان است (۴).

مقاومت روزافزون باکتری‌ها به عوامل ضدمیکروبی مشکل عمده در سراسر جهان است. با توجه به اینکه باکتری‌ها جهش می‌یابند و با کسب ژن‌های جدید خود را با شرایط مختلف سازگار می‌کنند، در برابر آنتی‌بیوتیک‌های جدید مقاومت کسب می‌کنند (۵ و ۶).

تولید رنگدانه‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه توسط میکروارگانیسم‌ها با توجه به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، وابسته‌نبودن به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ بیشتر نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری است (۷). مطالعات قبلی نشان داده‌اند متابولیت‌های ثانویه باکتریایی و به‌ویژه رنگدانه‌ها در درمان بیماری‌های مختلف اهمیت زیادی دارند و همچنین دارای خواص و فعالیت‌های ضدسرطانی، سرکوب‌کنندهٔ سیستم ایمنی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی (۸)، سایتوتوکسیک، ضدلیشمانیا، ضدزخم، ضدویروسی و ضدتومور هستند (۹ و ۱۰).

ازجمله باکتری‌های تولیدکنندهٔ رنگدانه به *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] (استافیلوزانتین، زرد طلایی)، *سودوموناس آئروژینوزا*[3] (پیوسیانین، سبز آبی)، *سراشیا مارسسنس*[4] (پرودیجیوسین، قرمز) و ... می‌توان اشاره کرد (۱۱).

سودوموناس آئروژینوزا یکی از بیشترین پاتوژن‌های تهدیدکنندهٔ زندگی و یک میکروب فرصت‌طلب بیمارستانی است که باعث ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها ازجمله عفونت‌های زخم و سوختگی، عفونت‌های تنفسی و آماس گوش میانی و ... می‌شود

(۱۲).

عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم به‌علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است درنهایت به مرگ منجر شود. این باکتری باسیل گرم منفی، اکسیداز مثبت و متحرک است و یک تا سه فلاژل قطبی دارد. این باکتری به‌جز مواقعی که در حضور نیترات رشد می‌کند و آن را به نیتریت احیا می‌کند، هوازی اجباری است (۱۳). *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت، رنگدانه‌های متعددی تولید می‌کند که عبارت‌اند از رنگدانه پیوسیانین، رنگدانه پیووردین، رنگدانه پیوروبین و پیوملانین. کلنی آن بوی خاص شبیه انگور یا گل یاس دارد که دلیل آن وجود ماده‌ای به نام آمینواستوفنن است (۱۴).

پیوسیانین یک رنگدانه فنازین سبز آبی محلول در آب است که توسط محیط‌های کشت فعال *سودوموناس آئروژینوزا* در مقادیر زیادی تولید می‌شود. پیوسیانین (N-متیل-۱-هیدروکسی فنازین)[۵]، فعالیت آنتی‌بیوتیکی علیه دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها دارد (۱۵ و ۱۶).

سدیلات[۶] نخستین‌بار در سال ۱۸۵۰ حضور لکه‌های آبی - سبز روی لباس جراحان را مورد توجه قرار داد؛ اما به علت اصلی آن پی نبرد تا آنکه فوردوس[۷] در سال ۱۸۶۰ موفق به استخراج این رنگدانه از باکتری شد و ماده به‌دست‌آمده را پیوسیانین نامید. لوک[۸] در سال ۱۸۶۲ این لکه‌های رنگی را در ارتباط با عفونت‌ها اعلام کرد و اظهار داشت عناصر میله‌ای شکلی را در این چرک‌های آبی - سبز مشاهده کرده است. گسارد[۹] در سال ۱۸۸۲ باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را جدا کرد و آن را *باسیلوس پیوسیانوس*[۱۰] نامگذاری کرد؛ درحالی‌که مدتی بعد، در سال ۱۸۸۹، چارین[۱۱] نقش بیماری‌زایی این باکتری را در حیوانات با اهمیت اعلام کرد (۱۷،۱۸).

چندین مطالعه روی خواص ضدمیکروبی رنگدانه پیوسیانین صورت گرفته است و نشان‌دهندهٔ اثرات ضدمیکروبی این رنگدانه بر بیشتر آنها بوده که در بیشتر موارد باکتری مولد رنگدانه از نمونه‌های بالینی جداسازی شده است (۲۳- ۱۹،۱۲). هدف از تحقیق حاضر نیز جداسازی و شناسایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از سطوح محیطی به‌دلیل احتمال بیماری‌زایی کمتر آنها برای انسان نسبت به سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی، استخراج رنگدانه پیوسیانین و بررسی اثر ضدمیکروبی این رنگدانه علیه باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری (*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*[۱۲]، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس*[۱۳] و جنس *کلبسیلا*[۱۴]) بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و جداسازی باکتری از سطوح محیطی: ابتدا سوآب مرطوب‌شده با آب مقطر استریل به سطوح مختلف ازجمله درب، پنجره، نرده، آسانسور و کف راهروهای دو بیمارستان در تهران کشیده شد. سپس هر سوآب جداگانه درون محیط BHI براث[۱۵] (مرک، آلمان) استریل دارای ضدقارچ سیکلوهگزیماید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت. لوله‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸- ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از این مدت و مشاهده کدورت، نمونه‌ها روی محیط نوترینت آگار و بلاد آگار کشت داده شدند و در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۲ نمونه از ۸ نمونه روی محیط نوترینت آگار و بلاد آگار رشد کردند که کلنی‌های سبز رنگ *سودوموناس آئروژینوزا* روی محیط نوترینت آگار گرد با لبه‌های نامنظم،

برجسته و مات و روی محیط بلاد آگار بزرگ‌تر با لبه‌های مضرس، سطح صاف و با همولیز بتا بودند. سپس روی محیط سیتریماید آگار کشت داده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از این مدت، کلنی‌هایی که محیط را به رنگ سبز درآورده بودند روی محیط BHI آگار کشت داده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سویه‌ای برای ادامه کار استفاده شد که رنگ سبز بیشتری تولید کرده بود.

مشخصات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و خصوصیات بیوشیمیایی براساس روش‌های متداول میکروبیولوژی بررسی و تأیید شدند (۲۴). سپس برای تأیید باکتری های جداسازی‌شده، از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* PTTC 1707 تهیه‌شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد.

تهیه کشت تلقیح: سویه جداسازی‌شده در محیط BHI براث تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به مدت ۳ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی دو بار شسته شد و با محیط BHI براث مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمد تا زمانی که OD_{600} معادل ۱-۰/۸ شود و از آن به‌عنوان کشت تلقیح استفاده شد (۲۵) .

تولید و استخراج رنگدانه پیوسیانین: از کشت تلقیح باکتری به نسبت ۱۰ درصد به محیط BHI براث اضافه شد و نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان دوره انکوباسیون، بیومس *سودوموناس آئروژینوزا* با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه به دست آمد (۲۶). پیوسیانین از سوپرناتانت با استفاده از حلال کلروفرم و طبق روش توضیح داده شده توسط کاکس[16] استخراج شد (۲۷)؛ سه بار پی‌درپی ۰/۲ حجم از کلروفرم به ۱ حجم از سوپرناتانت سبز رنگ حاصل از کشت باکتری درون قیف دکانتور، اضافه و به خوبی تکان داده شد. پیوسیانین پس از کلروفرم به درون HCl ۰/۱ نرمال استخراج شد و سپس به این محلول اسیدی قرمز تیره – قهوه‌ای NaOH ۰/۴ مولار اضافه شد تا زمانی که رنگ به آبی تغییر کرد و پیوسیانین آبی رنگ دوباره به داخل کلروفرم استخراج شد. بعد از ۵ بار تبدیل اسید به باز pH لایه اسیدی با کمترین مقدار NaOH ۰/۴ مولار روی ۷ تنظیم شد.

سنجش رنگدانه پیوسیانین: سنجش میزان پیوسیانین براساس اندازه‌گیری جذب پیوسیانین در ۵۲۰ نانومتر در محلول اسیدی قرمز – قهوه‌ای توسط اسپکتروفتومتر UV Visible انجام و غلظت رنگدانه برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر طبق معادله زیر گزارش شد که ۱۷/۰۷۲ ضریب ثابت است (۲۸):

غلظت پیوسیانین (میکروگرم/میلی‌لیتر) $= OD_{520} \times 17/072$

خالص‌سازی پیوسیانین توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): کروماتوگرافی لایه نازک[17] انجام شد؛ به‌طوری‌که صفحات در تانک شیشه‌ای[18] حاوی حلال‌های متانول و کلروفرم با حجم ۱:۱ (حجم / حجم)[19] قرار گرفتند که به‌عنوان فاز مایع بودند (۲۹)؛ درنهایت R_F اندازه‌گیری شد. همچنین برای تأیید رنگدانه پیوسیانین سبز آبی محلول در کلروفرم جذب آن در ۵۲۰ نانومتر بررسی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): سویه‌های استاندارد و ایزوله‌شده *سودوموناس آئروژینوزا*

تولیدکنندهٔ پیوسیانین به‌طور جداگانه در محیط BHI براث، تلقیح و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس DNA رسوب‌های به‌دست‌آمده از آنها با کیت گرم منفی استخراج DNA ساخت شرکت انتقال سامانه‌های زیست - مولکولی (ایران)[۲۰] استخراج شد.

برای انجام PCR از مسترمیکس[۲۱] شرکت امپلیکون[۲۲] (دانمارک)، دستگاه مولتی‌سایکلر اپندورف شرکت کایراتک[۲۳] استرالیا و پرایمرهای ساخت شرکت متابیون اینترنشنال[۲۴] استفاده شد. پرایمرها به‌صورت لیوفلیزه در فریزر و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای آماده‌کردن پرایمرها از آب PCR استفاده شد. رقیق‌کردن پرایمرها طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مراحل آماده‌سازی روی یخ (۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. توالی پرایمرها و طول قطعات ژنی در جدول ۱ آمده است.

میکروتیوب‌های حاوی مواد PCR برای هر دو نمونه استاندارد و ایزوله‌شده داخل دستگاه ترموسایکلر گذاشته شدند و طبق جدول ۲ به آنها برنامه داده شد.

پس از پایان فرایند PCR برای دیدن تکثیر قطعات مدنظر، الکتروفورز انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها و طول قطعات ژنی استفاده‌شده

منبع	محصول PCR (bp)	توالی پرایمرها (5'→3')	ژن
نورورزی و همکاران (۲۱)	۳۱۳	PHZP F=AACTCCTCGCCGTAGAAC PHZP R= ATAATTCG AATCTT GCTG CT	Phenazine- specific methyl transferase (*phzM*) *سودوموناس آئروژینوزا*

جدول ۲- زمان‌بندی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *phzM*

چرخه‌های دمایی PCR	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه	-
واسرشت	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۰
اتصال	۵۲	۳۰ ثانیه	۳۰
سنتز	۷۲	۴۵ ثانیه	۳۰
چرخه نهایی	۷۲	۵ دقیقه	-

جمع‌آوری باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری: سویه‌های جداشده *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا* از نمونه‌های ادرار میانی افراد مبتلا به عفونت‌های ادراری بعد از جمع‌آوری از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر تهران و تعیین هویت ازطریق آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد برای سنجش اثر ضدمیکربی استفاده شدند (۳۰ و ۳۱).

سنجش اثر ضدمیکروبی رنگدانه پیوسیانین: اثر ضدمیکروبی رنگدانه با دو روش دیسک‌گذاری و چاهک‌گذاری[۲۵] بررسی شد:

در روش دیسک‌گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه سویه‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا* ($۱/۵\times۱۰^{۸}$سلول / میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه در محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شد و در هر پلیت سه دیسک شامل دیسک ۳۰ میکرولیتری عصاره رنگدانه

پیوسیانین (به این صورت که ۳۰ میکرولیتر از عصاره رنگدانه به دیسک‌ها تلقیح شد و بعد از تبخیر حلال آن در شرایط استریل با یک پنس استریل روی محیط قرار گرفت)، دیسک حلال تنها (۳۰ میکرولیتر کلروفرم) و دیسک آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم (به عنوان استاندارد) با فاصله یکسان قرار داده شدند (۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری). قطر هریک از هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد (۳۲).

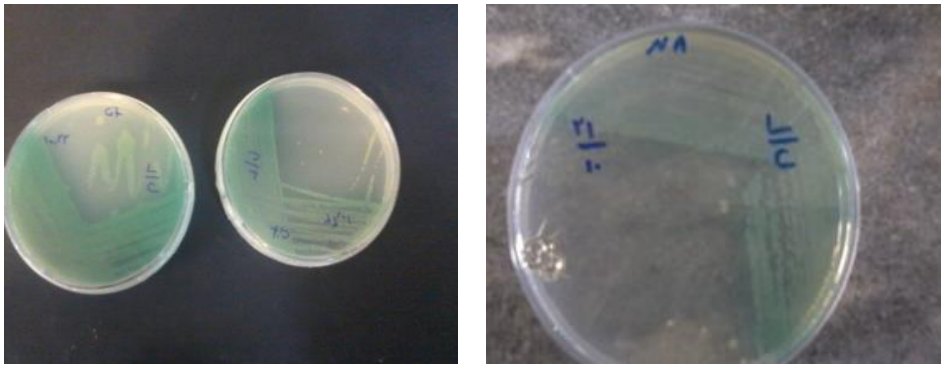
در روش چاهک‌گذاری (۲۲)، چاهک‌ها برای هریک از سویه‌های آزمایش‌شده به‌طور جداگانه یک بار با ۵۰ میکرولیتر از عصاره رنگدانه پیوسیانین و یک بار با ۵۰ میکرولیتر کلروفرم به‌عنوان شاهد پر شدند. بعد از گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت مهار رشد به‌صورت یک منطقه روشن در اطراف چاهک مشخص شد.

همه آزمایش‌های مربوط به روش‌های دیسک‌گذاری و چاهک‌گذاری سه بار تکرار شدند و میانگین اعداد در نظر گرفته شد.

نتایج

تولید و استخراج رنگدانه پیوسیانین: نتایج حاصل از جداسازی، تخلیص و تشکیل کلنی‌های سبز رنگ باکتری روی محیط‌های کشت نوترینت آگار و سیتریماید آگار در شکل ۱ آمده‌اند. محیط کشت BHI براث تلقیح‌شده بعد از ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به رنگ سبز درآمد که نشان‌دهندهٔ تولید رنگدانه بود. در اثر استخراج پیوسیانین در کلروفرم در لایه اسیدی کریستال‌های فنازین تشکیل شدند (شکل ۲). میزان غلظت رنگدانه پیوسیانین براساس سنجش لایه اسیدی در OD_{520} برابر با ۵/۱۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

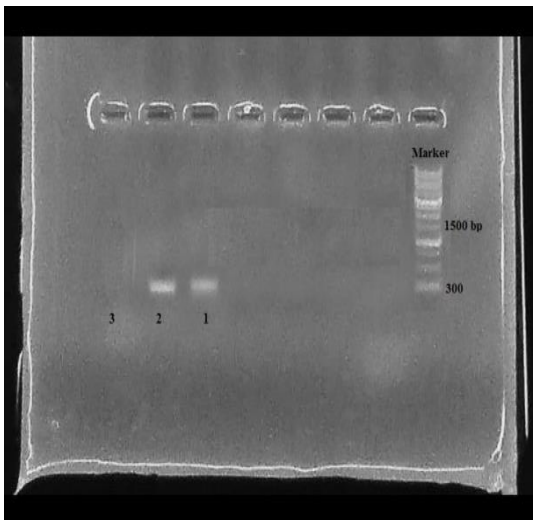
رنگدانه آبی رنگ پیوسیانین در روش TLC، به‌صورت یک لکه پر رنگ با میزان R_F ۰/۷۵ روی صفحات سیلیکا ژل نمایان شد. علاوه بر این، میزان جذب رنگدانه پیوسیانین محلول در کلروفرم در OD_{520} یک پیک را ثبت کرد که تأییدی بر خلوص رنگدانه بوده است.



شکل ۱- نتایج حاصل از جداسازی و تخلیص کلنی‌های سبز رنگ *سودوموناس آئروژینوزا از راست به چپ* روی محیط‌های نوترینت آگار و سیتریماید آگار

شکل ۲- نتایج حاصل از استخراج رنگدانه پیوسیانین *سودوموناس آئروژینوزا* (از چپ به راست به‌ترتیب سوپرناتانت کشت *سودوموناس آئروژینوزا* بعد از ۷۲ ساعت، لایه اسیدی حاوی کریستال‌های فنازین، رنگدانه پیوسیانین محلول در کلروفرم)

نتایج استخراج DNA و PCR: سویه جداسازی‌شده و سویه استاندارد (به‌عنوان کنترل مثبت) *سودوموناس آئروژینوزا* برای حضور ژن مربوط به تولید رنگدانه پیوسیانین بررسی شدند. نتایج حاصل از تکنیک PCR برای قطعه ۳۱۳ جفت‌باز[۲۶] مربوط به ژن *phzM* به دست آمد (شکل ۳).



شکل ۳- محصول PCR ژن *phzM* به اندازه bp ۳۱۳ (۱: سویه جداسازی‌شده، ۲: سویه استاندارد به‌عنوان کنترل مثبت، ۳: کنترل منفی)

نتایج حاصل از دیسک‌گذاری عصاره رنگدانه به‌عنوان ماده ضدمیکروبی در جدول ۳ آمده‌اند.

نتایج حاصل از چاهک‌گذاری رنگدانه (۵۰ میکرولیتر) علیه باکتری‌های عامل عفونت ادراری (*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا*) در جدول ۴ آمده‌اند.

جدول ۳- نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد برای رنگدانه پیوسیانین (۳۰ میکرولیتر رنگدانه با غلظت ۵/۱۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان ماده ضدمیکروبی، کلروفرم به‌عنوان شاهد (۳۰ میکرولیتر) و آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم به‌عنوان استاندارد علیه باکتری‌های عامل عفونت ادراری (*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا*) در محیط مولر هینتون آگار در روش دیسک‌گذاری

ایزوله‌های باکتری	رنگدانه پیوسیانین (mm)	کلروفرم (mm)	ایمیپنم (mm)
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۱۲	۸	۱۵
اشرشیاکلی	۱۰	۱۰	۱۴
جنس *انتروکوکوس*	۱۲	۱۰	۱۷
جنس *کلبسیلا*	۱۱	۱۰	۱۲

جدول ۴- نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد چاهک‌ها برای رنگدانه پیوسیانین (۵۰ میکرولیتر) به‌عنوان ماده ضدمیکروبی و کلروفرم به‌عنوان شاهد (۵۰ میکرولیتر) علیه باکتری‌های عامل عفونت ادراری (*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا*) در محیط مولر هینتون آگار

ایزوله‌های باکتری	رنگدانه پیوسیانین (mm)	کلروفرم (mm)
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۱۲	۸
اشرشیاکلی	۹	۸
جنس *انتروکوکوس*	۱۴	۱۱
جنس *کلبسیلا*	۱۱	۱۰

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند رنگدانه پیوسیانین استخراج‌شده از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* روی باکتری‌های گرم مثبت اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشته که با سایر مطالعات انجام‌شده در ایران و سایر کشورها مطابقت داشته است. در این تحقیق برای استخراج رنگدانه پیوسیانین از سویه وحشی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که از سطوح محیطی جداسازی شده بود، از محیط کشت BHI براث استفاده شد که یک محیط پایه مغذی است؛ درنهایت، بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان ۵/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگدانه پیوسیانین در محیط کشت براث تولید شد. در سایر تحقیقات از محیط‌های مختلف دیگر استفاده شده است. در مطالعه نوروزی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بعد از جداسازی سویه وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* از منابع بالینی و محیطی، برای تولید رنگدانه از محیط مولر هینتون براث استفاده شده که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۴ میلی‌گرم بر لیتر رنگدانه پیوسیانین تولید شده است (۲۱). در مطالعه کاکس و همکاران در سال ۱۹۸۶ از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 15692 استفاده شده است و برای تولید رنگدانه محیط گلیسرول - آلانین به کار رفته که بعد از ۳۰ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگدانه پیوسیانین تولید شده است (۲۷). در مطالعه ایسار[۲۷] و همکاران در سال ۱۹۹۰ سویه وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 استفاده شده است که برای تولید حداکثر میزان رنگدانه پیوسیانین، محیط سودوموناس براث[۲۸] استفاده شده که بعد از ۲۰-۱۶ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۶/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگدانه پیوسیانین تولید شده است (۲۸). در مطالعه ساها و همکاران در سال ۲۰۰۸ بعد از جداسازی سویه وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* از دهانه رودخانه Vellar، برای تولید رنگدانه از محیط نمک معدنی استفاده شده که بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگدانه پیوسیانین تولید شده است (۱۹). در مطالعه ال-فولی[۲۹] و همکاران در سال ۲۰۱۵ از سویه‌های وحشی جداسازی‌شده از نمونه‌های محیطی و بالینی (ادرار) استفاده شد که بیشترین بازده تولید رنگدانه پیوسیانین مربوط به سویه جداسازی‌شده از نمونه ادرار در محیط کشت نوترینت براث همراه با گلیسرول، بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برابر با ۵/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۶). در تحقیق حاضر

از محیط BHI براث استفاده شد که یک محیط پایه غنی است و مشاهده شد رنگدانه پیوسیانین پس ۷۲ ساعت انکوباسیون، تولید شد که این نتایج مطابق با بررسی‌های ساها و همکاران در سال ۲۰۰۸ و بینگ[۳۰] و همکاران در سال ۱۹۷۹بود (۱۹و ۳۳). در این مطالعه بعد از خالص‌سازی جزئی رنگدانه پیوسیانین با روش TLC، میزان R_f در تانک حاوی حلال‌های متانول و کلروفرم برابر با ۰/۷۵ به دست آمد که نزدیک با مطالعات بارون[۳۱] و همکاران در سال ۱۹۸۱ بود که مقدار R_f در همین تانک برابر با ۰/۷۳ گزارش شد (۱۶).

تولید ترکیبات با خاصیت آنتی‌بیوتیکی توسط *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان یک فاکتور اصلی در کنترل بسیاری از پاتوژن‌ها تأیید شده است. در این تحقیق اثر ضدمیکروبی رنگدانه پیوسیانین استخراج‌شده با غلظت ۵/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری‌های عامل عفونت ادراری (*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *اشرشیاکلی*، جنس *انتروکوکوس* و جنس *کلبسیلا*) سنجیده و دریافت شد این رنگدانه با دو روش دیسک‌گذاری و چاهک‌گذاری روی باکتری‌های فوق اثر ضدمیکروبی داشته است. گفتنی است این رنگدانه در روش چاهک‌گذاری بیشترین تأثیر را روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (با قطر هاله عدم رشد ۱۲ میلی‌متر) و جنس *انتروکوکوس* (با قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر) نسبت به دو باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* و جنس *کلبسیلا* نشان داد. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات قبلی مطابق بود. قاضی و همکاران در سال ۲۰۲۱ روی پیوسیانین خالص‌شده از ایزوله‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* کار کرده‌اند که باعث افزایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در برابر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا شده بود و مشاهده شد پیوسیانین در غلظت‌های کم، اثر هم‌افزایی با برخی از آنتی‌بیوتیک‌هایی دارد که فعالیت‌هایی را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* نشان نمی‌دهند. مشاهده شد وقتی سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک‌اسید با ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پیوسیانین مخلوط شدند *اشرشیاکلی* به آنها حساس شد و وقتی نالیدیکسیک‌اسید با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پیوسیانین مخلوط شد *استافیلوکوکوس اورئوس* به آن حساس شد (۱۲). احمد محمد و همکاران در سال ۲۰۱۷ روی فعالیت ضدمیکروبی پیوسیانین *سودوموناس آئروژینوزا* برای مهار پاتوژن‌های دستگاه ادراری کار کرده‌اند که در آن پیوسیانین باعث ممانعت از رشد میکروب‌های جداشده از ادرار (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*[۳۲]، *اشرشیاکلی* و *سیتروباکتر فروندی*[۳۳]) در اطراف چاهک‌ها شد؛ اما تأثیری بر رشد *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنز*[۳۴] نداشت و همچنین در غلظت‌های بالاتر (۷۵ و ۱۰۰ درصد) بازده بیشتری نسبت به غلظت‌های کمتر (۲۵ و ۵۰ درصد) دارد (۲۳). در مطالعه نوروزی و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی اثر ضدمیکروبی رنگدانه پیوسیانین علیه سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌ها، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای هاله عدم رشد بزرگ‌تری (۲۱، ۱۵/۵، ۱۴ میلی‌متر) نسبت به *اشرشیاکلی* (۱۹، ۱۴، ۱۲ میلی‌متر) بود (۲۱). در مطالعه بارون و همکاران در سال ۱۹۸۱ روی اثر ضدمیکروبی رنگدانه پیوسیانین علیه سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ‌ها، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای هاله عدم رشد برابر با ۱۵ میلی‌متر و *اشرشیاکلی* دارای هاله عدم رشد برابر با ۱۳ میلی‌متر بود (۱۶).

تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهند رنگدانه پیوسیانین، اثر ضدمیکروبی بر هر دو گروه از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته است؛ درنتیجه، این رنگدانه می‌تواند در آینده جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌های موجود باشد؛ بنابراین، بررسی‌های بیشتری برای بازدهی بالاتر مقدار رنگدانه ازطریق بهینه‌سازی شرایط تولید و استخراج و نیز خالص‌سازی بیشتر رنگدانه با روش‌های دقیق‌تر لازم است. همچنین استفاده از سویه‌های مولد رنگدانه‌های میکروبی که احتمال بیماری‌زایی آنها برای انسان کمتر از سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی است که اکثراً مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارند، در میزان به‌کارگیری آنها برای بررسی‌های مختلف در زمینه‌های دارویی و بیوتکنولوژی مؤثر خواهد بود.

سپاسگزاری

از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و کارشناسان آزمایشگاه دانشکده علوم زیستی برای راهنمایی‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Astal ZE. Increasing ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in the Gaza Strip. *Singapore Medical Journal* 2005; 46 (9): 457-60.

(2) Barnett BJ., Stephens DS. Urinary tract infection: An overview. *The American Journal of the Medical Sciences* 1997; 314 (4): 245-9.

(3) Beyene G., Tsegaye W. Bacterial uropathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern in Jimma University specialized hospital, southwest Ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Sciences* 2011; 21 (2): 141-6.

(4) Brunicardi F., Billiar T., Andersen D. *Schwart's principles of surgery*. 8th Ed. USA: McGraw–Hill; 2005.

(5) Stamm WE., Norrby SR. Urinary tract infections: Disease panorama and challenges. *International Journal of Infectious Diseases* 2001; 183 (1): 1-4.

(6) Renuka K., Kapil A., Kabra SK., Wig N., Das BK., Prasad VV., Chaudhry R., Seth P. Reduced susceptibility to ciprofloxacin and *gyra* gene mutation in North Indian strains of *Salmonella enterica serotype Typhi* and *serotype Paratyphi A*. *Journal of Microbial Drug Resistance* 2004; 10 (2): 146-53.

(7) Mizukami H., Konoshima M., Tabata M. Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochem* 1978; 17 (1): 95-97.

(8) Korkina LG. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Journal of Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)* 2007; 53 (1): 15-25.

(9) Joshi VK., Attri D. Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products. *Journal of Natural Product Radiance* 2006; 5(4): 289-96.

(10) Gupta C., Garg AP., Prakash D., Goyal S., Gupta S. Microbes as potential source of biocolours. *Pharmacology Online* 2011; 2: 1309-18.

(11) Kamla M., Jayanti T., Sneh G. A review on microbial pigment. *International Journal of Microbial Resource Technology* 2012; 1 (4): 361-5.

(12) Ghazi D., Kahya HF. Purified pyocyanin from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* enhances antibiotic sensitivity against some pathogenic bacteria. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology* 2021; 15 (1): 999-1007.

(13) Motaghi B., Mojafipour S. Outer membrance protein D gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its role in antibiotic resistance. *Journal of Advanced Biomedical Sciences* 2016; 5 (4): 501-7.

(14) Dosti M., Haj Ojagh Faghihi M., Ramazani A., Saini MR. Comparison of convertional calture methods and polymerase chain reaction (PCR) for specific detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Isfahan Medical School* 2012; 30 (192): 780-6.

(15) Liang H., Li L., Dong Z., Surette MG., Duan K. The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *Journal of Bacteriology* 2008; 190 (18): 6217- 27.

(16) Baron SS., Rowe JJ. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1981; 20 (6): 814-20.

(17) Buchanan RE., Gibbons NE. *Bergey s manual of determinative baccenology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1974: 141-219.

(18) Collier L., Balows A., Sussman M. *Tapley and Wilson s Microbiology and microbial infections*. 9th Ed. New York: Oxford University Press Inc; 1998: 245-1138.

(19) Saha S., Thavasi R., Jayalakshmi S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Research Journal of Microbiology* 2008; 3 (3): 122-8.

(20) Sweedan EG. Study the effect of Antibiotics on pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin as Antibiotic against different pathogenic bacteria. *Journal of University of Anbar for Pure Science 2010*; 4 (1): 15-8.

(21) Nowroozi J., Akhavan Sepahi A., Rashnonejad A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. *Cell Journal* 2012; 14 (1): 7-18.

(22) Pattnaik S. Susceptibility of *Klebsiella* sp. isolated from septicemia patients to water soluble pigments of *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus* sp. isolated from hospital campus soil. *Journal of Pharmacy Research* 2012; 5 (2): 1088-90.

(23) Mohammed TA., Almahde MA. Antimicrobial activity of pyocyanin for inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract pathogens. *Asian Journal of Medicine and Health* 2017; 4 (4): 1-9.

(24) Garrity MG., Bell JA., Lilburn T. *Pseudomonales* In*: Bergy´s manual of systematic bacteriology*. (Brenner DJ., Krieg NR., Staley JT (editors). 2nd Ed. USA: Springer; 2005.

(25) Mandri T., Lin J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms n Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6 (1): 23-7.

(26) El-Fouly MZ., Sharaf AM., Shahin AA., El-Bialy HA., Omara AM. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 2015; 8 (1): 36-48.

(27) Cox CD. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infection and Immunity* 1986; 52 (1): 263-70.

(28) Essar DW., Eberly L., Hadero A., Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology* 1990; 172 (2): 884-900.

(29) Girard G., Barends S., Rigali S., VanRij ET., Lugtenberg BJ., Bloemberg GV. Pip, a

novel activator of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Journal of Bacteriology* 2006; 188 (23): 8283-93.

(30) Mohammadi S., Ramazanzade R., Zandi S., Rouhi S., Mohammadi B. Determination of prevalence of isolated bacteria from urinary tracts and antibiotic resistant pattern of them in Tohid hospital of Sanandaj (2013-2014). *Zanko Journal of Medical Sciences* 2015; 16 (50): 55-62.

(31) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. M100-S23. 2013; 130-34.

(32) Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 1966; 45 (4): 493-6.

(33) Byng GS., Eustice DC., Jensen RA. Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 1979; 138 (3): 846-52.

[1]- Urinary Tract Infection
[2]- *Staphylococcus aureus*
[3]- *Pseudomonas aeruginosa*
[4]- *Serratia marcescens*
[5]- *N*-methyl-1-hydroxyphenazine
[6]- Sedillot
[7]- Fordos
[8]- Luck
[9]- Gizzard
[10]- *Bacillus Pyocyaneus*
[11]- Charrin
[12]- *Staphylococcus saprophyticus*
[13]- *Enterococcus* sp.
[14]- *Klebsiella* sp.
[15]- Brain- Heart Infusion broth
[16]- Cox
[17]- Thin Layer Chromatography (TLC)
[18]- jar
[19]- vol/vol
[20]- Molecular Biological System Transfer (MBST)
[21]- MASTER MIX
[22]- Ampliqon
[23]- Kyratec
[24]- Metabion international
[25]- well-diffusion
[26]- base pair (bp)
[27]- Essar
[28] Pseudomonas broth (PB)
[29]- El-Fouly
[30]- Byng
[31]- Baron
[32]- *Staphylococcus epidermidis*
[33]- *Citrobacter freundii*
[34]- *Candida albicans*