مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۴، مهر و آبان ۱۳۹۷(شماره پی در پی۱۲۹)

اثر ضد میکروبی رنگدانه باکتری سراشیا مارسنس بر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک جمع‌آوری شده از زخم سوختگی

الهام معظمیان[1*]، امیر امامی[2]

[1] باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.[2] مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۵/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: با گسترش روزافزون مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های موجود، شناسایی ترکیب‌های ضدمیکروبی جدید ضروری است. رنگدانه‌های باکتریایی به عنوان محصولات فعال زیستی، یکی از گزینه‌های شناسایی ترکیب‌های ضدمیکروبی جدید می‌باشند. میکروارگانیسم‌ها جهت تولید محصولات میکروبی جدید مانند رنگدانه مورد توجه قرار گرفته‌اند.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۷ ایزوله باکتری رنگدانه‌دار از نمونه‌های محیطی خاک چند ناحیه متفاوت از استان فارس جداسازی شد. این باکتری‌ها دارای رنگدانه‌های قرمز، زرد و سبز بودند. سویه‌ها با رنگ کلنی متفاوت انتخاب و جهت استخراج رنگدانه از حلال متانول برای رسوب رنگی باکتریایی و مخلوط متانول و آب برای رنگدانه‌های ترشحی استفاده گردید. عملکرد ضد میکروبی رنگدانه‌ها پس از تغلیظ و خشک کردن با روش سنجش دیسک دیفیوژن و ماکرودایلوشن بر روی کلبسیلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداسازی شده از نمونه های بالینی زخم سوختگی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت میکروارگانیسم دارای رنگدانه با خاصیت ضد میکروبی با روش مولکولی شناسایی و تخلیص رنگدانه با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک ارزیابی گردید. داده‌ها با از آزمون تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با توجه به مورفولوژی کلنی‌های رنگدانه دار جداسازی شده در محیط‌های مختلف و انجام تست‌های بیوشیمیایی وجود باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا، سراشیا مارسنس، انتروباکتر ساکازاکی، فلاوباکتر میزوتای، میکروکوکوس لوتئوس و استافیلوکوکوس آرئوس* به تأیید رسید. نتایج نشان داد که درصد فراونی کلبسیلا ۸/۵ درصد بود. از ۱۷ ایزوله کلبسیلای جداسازی شده، ۱۲ ایزوله به طور کامل به تمامی‌آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم و ۶ ایزوله دارای حساسیت به آنتی‌بیوتیک ایمیپنم بودند. کلیه ایزوله‌های کلبسیلا به صورت باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک مشاهده گردید. با ارزیابی اثر رنگدانه‌های باکتریایی، رنگدانه قرمز باکتری *سراشیا مارسنس* دارای اثر مهاری رشد بر روی باکتری *کلبسیلای* مقاوم به چند دارو بود.

نتیجه‌گیری: میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از منابع محیطی حاوی یک ذخیره بسیار متنوع از رنگدانه‌ها هستند که در آن می‌توان ساختارهای مختلف رنگدانه با خواص ضدمیکروبی گوناگون را جستجو کرد. مطالعه حاضر حاکی از آن است که رنگدانه باکتری سراشیا مارسنس در از بین بردن ایزوله‌های کلبسیلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌توانند مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی: نمونه زخم سوختگی، رنگدانه باکتری‌ها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کلبسیلا

نویسنده مسئول: الهام معظمیان، شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
Email: elhammoazamian@gmail.com

مقدمه

کلبسیلا یک باکتری گرم منفی، غیر متحرک، کپسول دار، تخمیر کننده لاکتوز و میله‌ای شکل است که باعث ایجاد عفونت‌های مجاری تنفسی و زخم بیمارستانی می‌شود(۱). در چند سال اخیر روشن شده است که کلبسیلاها عفونت‌های بسیاری را در موارد مختلف باعث شده‌اند و اهمیت این گروه از ارگانیسم‌ها به عنوان عامل عفونت جدی در بیماران بستری شده بیمارستانی پذیرفته شده است. قابلیت این ارگانیسم در ایجاد بیماری به علت کاسته شدن دفاع میزبان در نتیجه اعمال جراحی پیچیده و طولانی و همین‌طور مصرف داروهای متفاوت رو به ازدیاد می‌باشد. معمول‌ترین شرایطی که به وسیله باکتری *کلبسیلا* بیرون از بیمارستان ایجاد می‌شود پنومونی به فرم برونشیت است. درصد مرگ می‌تواند نزدیک ۱۰۰ درصد در افرادی به اعتیاد به الکل و باکتری می‌باشد. علاوه بر پنومونی، *کلبسیلا* هم‌چنین می‌تواند عفونت‌هایی را در مجرای ادراری، مجرای پایینی صفراوی و محل‌های زخم‌های جراحی ایجاد کند(۲).

رنگدانه‌ها نقش مهمی را در فرآیندهای مولکولی و فیزیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها مانند؛ فتوسنتز، بقا در مقابل آسیب اکسیداتیو و مقاومت به اشعه UV بازی می‌کنند. در طی سال‌ها رنگدانه‌ها به عنوان ابزار تاکسونومی[1] جهت شناسایی و دسته‌بندی جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها استفاده شده‌اند(۳). تنوع رنگدانه‌ها به خاطر تفاوت‌ها در ساختار ترکیب‌های شیمیایی و حضور کروماتوفورهای خاص در آن‌ها است. میکروارگانیسم‌های رنگدانه‌دار توجه‌های جامعه علمی را به خاطر نقش آنها در مطالعه‌های تاکسونمی و پتانسیل بیوتکنولوژیک در فرآیندهایی مانند تخمیر و مهندسی بیو فرآیند به خود جلب کرده‌اند(۴).

بیان رنگدانه‌ها می‌تواند به وسیله تعدادی از فاکتورهای محیطی شامل؛ در دسترس بودن اکسیژن، شرایط تغذیه‌ای، دما، سن کلنی و تنوع سویه تحت تأثیر قرار بگیرد. به عنوان مثال، *آرتروباکتر آتروسیانوس*[2] زمانی که در ۲۴ درجه سلسیوس رشد کند تولید رنگدانه آبی می‌کند، اما هیچ تولید رنگدانه‌ای در ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده نمی‌شود(۵).

انواع گسترده‌ای از بیماری‌ها و مشکلات پزشکی تهدیدی جدی برای انسان‌ها هستند که از زمان‌های قدیم دانشمندان به دنبال ترکیب‌های طبیعی از گیاهان، جانوران و دیگر منابع برای درمان آنها بوده‌اند. اگرچه فرآیند یافتن درمان‌های مؤثر علیه بیماری‌های کشنده مشکل است، تحقیق‌های گسترده‌ای برای ترکیب‌های زیست فعال طبیعی قبلاً نتایج موفقیت‌آمیزی داشته‌اند. جداسازی و شناسایی ترکیب‌های طبیعی خاص باعث پیشرفت طب شده و جدایه‌ها می‌توانند برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده شوند و مواد سمی که می‌توانند برای اهداف غیر درمانی استفاده شوند جداسازی گردند. از نظر

1-Taxonomy
2-*Arthrobacter atrocyaneus*

آماری، حداقل ۵۰ درصد از داروهای موجود که برای درمان بیماری‌های انسان استفاده می‌شوند از محصولات طبیعی که بیشتر آنها از ارگانیسم‌های خاکی تولید شدند، به دست آمدند(۶). یکی از این ترکیب‌های طبیعی به دست آمده از میکروارگانیسم‌ها رنگدانه‌های میکروبی هستند که توجه زیادی را امروزه به خود جلب کرده‌اند. به طور کلی می‌توان گفت رنگدانه‌های تولید شده به وسیله میکروارگانیسم‌ها دارای خواص درمانی از جمله؛ خواص ضد اکسیدانت[۱]، سیتوتوکسیک[۲]، ضد لیشمانیا[۳]، ضد زخم، ضد ویروسی، آنتی‌بیوتیکی، ضد توموری و غیره هستند(۸ و۷). به طور مثال رنگدانه ویولاسین[۴] تولید شده به وسیله *کروموباکتریوم‌ویولاسیوم*[۵] دارای فعالیت‌های درمانی از جمله فعالیت آنتی‌بیوتیکی علیه میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو است. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر ضد میکروبی رنگدانه میکروارگانیسم‌ها بر روی ایزوله‌های کلبسیلای مقاوم به چند دارو که از نمونه‌های زخم سوختگی جداسازی شده‌اند، می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از نمونه‌های زخم ۲۰۰ نمونه در فصل بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۹۴ به صورت مقطعی جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها از آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان شهید فقیهی شیراز جمع آوری گردید و به منظور جداسازی باکتری کلبسیلای مقاوم به چند دارو مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مسایل اخلاق پزشکی و حقوق بیماران بر اساس معاهدات بین‌المللی و نظرات کمیته منطقه‌ای اخلاق پزشکی رعایت گردید.

۵۰ نمونه خاک جنگلی از مناطق مختلف واقع در غرب استان فارس شامل؛ مناطق قلات، مرودشت، کازرون، نورآباد و آباده جمع‌آوری شد. با محلول نرمال سالین ۹/. درصد از یک گرم خاک سوسپانسیون و سریال رقت 10^{-7} تا 10^{-10} تهیه شد و بر روی محیط نوترینت آگار به صورت سفره‌ای کشت داده شدند. بعد از کشت، محیط در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در جای تاریک انکوبه شد. سپس کلنی‌هایی که بیشترین شدت رنگ را داشتند انتخاب شدند.

جداسازی و شناسایی کلبسیلا و باکتری‌های رنگدانه‌دار با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، جهت شناسایی کلنی باکتری‌های رشد کرده در ابتدا باکتری‌ها از نظر مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، تولید رنگدانه در محیط مولر هینتون اگار قبل از تست‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج تست‌های ذکر شده، تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، رشد بر روی سیترات، تولید اندول، تریپل شوگر آیرون آگار، متیل رد، ووگز پروسکوئر، اورنیتین دِکربوکسیلاز، فنیل آلانین دآمیناز، اوره آز، اکسیداسیون فرمانتاسیون،

1-Anti-oxidant
2-Cytotoxic
3-Anti- Leishmanial
4-Violacein
5-*Chromobacterium Violaceum*

دی‌ـ ان‌ـ آز[1] و هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و پنی‌سیلین، تخمیر در محیط مانیتول سالت آگار و کوآگولاز به جهت شناسایی باکتری‌های تولید کننده رنگدانه و کلبسیلا انجام شد(۹).

با توجه به فراوانی باکتری *کلبسیلا* در عفونت‌های بیمارستانی الگوی مقاومت دارویی این ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفتند تا در ادامه مطالعه از نظر تأثیر رنگدانه‌های جداسازی شده مورد بررسی قرار گیرند. از باکتری‌های *کلبسیلای* شناسایی و تعیین هویت شده سوسپانسیون میکروبی به غلظت نیم مک فارلند تهیه و تلقیح با سواب پنبه‌ای استریل بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار با روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی بائر[2] بر اساس استاندارد موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالینی[3] ۲۰۱۴ با سه بار تکرار صورت گرفت. آنتی بیوتیک‌ها شامل آمیکاسین[4](۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم[5] (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین[6] (۳۰ میکرو گرم)، سفتریاکسون[7](۳۰ میکرو گرم)، سیپروفلوکساسین[8] (۳۰ میکرو گرم)، ایمیپنم[9] (۱۰ میکرو گرم)، پیپراسیلین ـ تازوباکتام[10](۱۰۰×۱۰ میکرو گرم)، آمپی‌سیلین ـ سولباکتام[11](۱۰×۱۰ میکرو گرم)، سفپیم[12] (۳۰ میکرو گرم)، سفالوتین[13] (۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین[14] (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین[15] (۳۰ میکرو گرم)، باسیتراسین[16] (۰/۰۴ میکروگرم) و فلوکونازول[17] (۵۰ میکرو گرم) مارک مست[18] کشور آمریکا استفاده گردید.

چند کلنی باکتری رنگدانه‌دار به محیط مولر هینتون براث انتقال داده و تا زمان تغییر رنگ محیط به رنگ جدایه مورد نظر نگهداری شدند. بعد از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری محیط ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شده تا سلول‌های باکتری‌ها ته نشین شوند. مایع رویی و سلول‌های باکتری ته نشین شده جداسازی گردید. جداسازی رنگدانه از رسوب باکتری با استفاده از متانول ۹۵ درصد به نسبت ۱ به ۵ دوبار حل گردید. محلول حاصل را با دستگاه ورتکس هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. این عمل را تا زمانی که تمام سلول‌های باکتری بی‌رنگ شوند ادامه داده شد. مایع روی حاوی رنگدانه را از رسوبات باکتری جدا کرده و دوباره با اتیل استات عمل استخراج انجام شد. در ارتباط با رنگدانه‌های ترشحی مایع رویی جمع‌آوری

1-DNase
2-Kirby Baur
3-Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI)
4-Amikacin (AN)
5-Ceftazidime (CAZ)
6-Gentamycin (GM)
7-Ceftriaxon (CRO)
8-Ciprofloxacin (CP)
9-Imipenem (IMP)
10-Piperacillin-Tazobactam (PTZ)
11-Ampicillin- Sulbactam(SAM)
12-Cefepime(CPM)
13-Cephalothin(CF)
14-Penicillin(P)
15-Vavcomycin(V)
16-Bacitracin
17-Fluconazole
18-Mast

شده و با استفاده از مخلوط متانول و آب استخراج انجام گردید. با استفاده از دستگاه تبخیر کننده چرخان در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد عمل تغلیظ‌سازی انجام شد. رنگدانه‌های تغلیظ شده به پتری دیش‌های شیشه‌ای انتقال داده شد و به مدت ۳ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. غلظت نهایی رنگدانه استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج حد فاصل ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد(۱۱).

جهت سنجش خلوص رنگدانه به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک[1](TLC) از کاغذ سیلیکا ژل ($60F_{254}$، مرک[2]) و حلال اتیل استات[3] استفاده شد. در این روش ابتدا به وسیله لوله موئینه مقداری از عصاره هر رنگدانه بر روی کاغذ سیلیکا ژل قرار داده شد. سپس کاغذها در تانک کروماتوگرافی با مخلوطی از حلال ۸۰ درصد اتیل استات و ۲۰ درصد هگزان قرار داده شد. بر اساس خاصیت مویینگی وقتی حلال در کاغذ بالا می‌رود، رنگدانه را نیز با خود حرکت می‌دهد. در نهایت برای هر رنگدانه باید فقط یک لکه در کاغذ ظاهر شود که خلوص آن را نشان می‌دهد(۱۱).

روش دیسک دیفیوژن آگار جهت سنجش فعالیت ضد میکروبی رنگدانه های استخراج شده انجام شد. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از عصاره ی متانولی رنگدانه استخراج شده از هر باکتری بر روی دیسک‌های کاغذی وات من[4] (قطر ۰/۵ سانتی‌متر) تلقیح شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری‌های کلبسیلای جداسازی شده دارای مقاومت چند دارویی در محیط مولر هینتون براث را بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح کرده و با سواب استریل به صورت سطحی کشت داده شد. سپس دیسک های آغشته به عصاره های رنگدانه‌های استخراج شده را به فاصله ۱ سانتی‌متر بر روی محیط قرار داده و از دیسک‌های کاغذی آغشته به متانول به عنوان کنترل استفاده شد. محیط‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری کرده و در نهایت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد(۱۱).

حداقل غلظت ممانعت کنندگی رنگدانه‌های[5] استخراج شده به وسیله روش رقیق‌سازی ماکرو[6] با سه بار تکرار انجام شد. عصاره رنگدانه‌های استخراج شده به صورت جداگانه در دی متیل سولفوکساید ۳۰ درصد حل شدند تا محلول ۱۰ درصد به دست آید. حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) این رنگدانه‌ها علیه جدایه‌های کلبسیلای دارای مقاومت چند دارویی، جداسازی شده از نمونه‌های بالینی زخم سوختگی سنجیده شد. در این پژوهش جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده از روش رقت‌های متوالی در لوله آزمایش برای رنگدانه در دامنه بین ۰/۲۵ــ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه رنگدانه طوری عمل شد که غلظت عصاره ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و به صورت رقت‌های

1-Thin Layer Chromatography
2-Merk $60F_{254}$
3-Ethyl Acetate
4-Whatman
5-Minimun Inhibitory Concentration(MIC)
6-Macro dilution

سریالی تا ۱۰ رقت در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی محیط مایع انجام شد. سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه، در محیط استریل مولر هینتون براث آماده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر باکتری با غلظت جداگانه تحت شرایط استریل به هر کدام از لوله‌های استریل درپیچ دار حاوی ۱ میلی‌لیتر از ترکیب رنگ‌دانه اضافه شد تا حجم نهایی به ۲ میلی‌لیتر برسد. محیط کشت بدون نمونه رنگ‌دانه و محیط‌های دیگر بدون میکروارگانیسم‌های تست به عنوان کنترل استفاده شدند. محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و نتیجه تست به وسیله کدورت در محیط مشخص شد(۱۲).

جهت تعیین حداقل غلظت باکتریسیدال[1] رنگ‌دانه‌های جداسازی شده، مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر لوله تست MIC در مرحله قبل که عدم رشد باکتری در آن مشاهده شده بود بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت عصاره‌ای که هیچ‌گونه رشد قابل مشاهده‌ای را بر روی محیط نشان ندهد به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

جهت شناسایی مولکولی از آنالیز ژن 16S rDNA جدایه‌ها استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری(سیناژن) صورت گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر بوده و ۱۰۰ نانوگرم از هر نمونه DNA، ۵ میکرولیتر بافر10X، کلرید منیزیم ۲ میلی‌مولار، dNTP و ۱۰ پیکومول از هر پرایمر رفت 27F (5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) و برگشت 1492R (5-GGTTACCTTGTTACGACTT- 3) و ۱/۲۵ واحد از آنزیم Taq پلیمراز ترکیب شد. شرایط انجام واکنش شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل؛ ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد(۱۳). سپس ۱۰ میکرولیتر محصولPCR در ژل آگاروز ۳ درصد الکتروفورز گردیده و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. سپس ژل‌ها در زیر دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مورد مطالعه قرار گرفتند. در نهایت محصول واکنش جهت تعیین توالی به شرکت توپاز ژن ارسال گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS و آزمون تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۷ ایزوله باکتری تولید کننده رنگ‌دانه به رنگ‌های قرمز، سبز، زرد، سیاه و نارنجی جداسازی شد.

1- Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

تعیین هویت بیوشیمیایی باکتری‌های رنگدانه‌دار با توجه به مورفولوژی کلنی‌های رنگدانه‌دار جداسازی شده در محیط‌های مختلف و انجام تست‌های بیوشیمیایی وجود باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا، سراشیا مارسنس، انتروباکتر ساکازاکی، فلاوباکتر میزوتای، میکروکوکوس لوتئوس و استافیلوکوکوس آرئوس* به تأیید رسید. نتایج تست‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ گردآوری شده است.

از کل ۲۰۰ نمونه بالینی زخم سوختگی مورد بررسی، ۱۷ نمونه(۸/۵ درصد) مشکوک به کلبسیلا جداسازی شد. با توجه به مورفولوژی باکتری‌ها بر روی محیط‌های کشت و انجام تست‌های بیوشیمیایی وجود گونه‌های کلبسیلا به اثبات رسید. بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، باسیل گرم منفی که تست‌های بیوشیمیایی به صورت تریپل شوگر آیرون آگار اسید بر اسید، بدون گاز و تولید دی سولفید هیدروژن، سیترات مثبت، تحرک منفی، اوره آز منفی، متیل رد منفی، ووگزپروسکوئر مثبت، اورنیتین دکربوکسیلاز منفی، فنیل آلانیت دی آمیناز منفی، اکسیداز منفی مشاهده گردید. تست آنتی‌بیوگرام کلبسیلای جداسازی شده از نمونه‌های بالینی، از ۱۷ ایزوله کلبسیلای جداسازی شده، ۱۲ ایزوله به طور کامل به تمامی آنتی بیوتیک‌ها مقاوم و ۶ ایزوله دارای حساسیت به آنتی بیوتیک ایمیپنم بودند. به منظور انجام مراحل بعد فقط ایزوله هایی که به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند در نظر گرفته شدند و بقیه از آزمایش خارج شدند. پاسخ ایزوله‌ها به مقاومت آنتی‌بیوتیکی به صورت مشابه مشاهده گردید که ۱۶-۱۴≤ مقاوم و ۴≤ حساس ثبت گردید(تصویر ۱).

نتایج حاصل از استخراج و خالص‌سازی رنگدانه، کلنی‌های *سودوموناس آئروژینوزا، سراشیا مارسنس، انترو باکترساکازاکی، فلاوباکتر میزوتای، میکروکوکوس لوتئوس و استافیلوکوکوس آرئوس* بر روی محیط مولر هینتون آگار به ترتیب دارای رنگدانه‌های سبز ـ آبی، قرمز، زرد، زرد، زرد و زرد بودند. نتایج استخراج رنگدانه‌ها به وسیله حلال آلی متانول و تغلیظ به وسیله دستگاه تبخیر کننده در تصویر ۲ نشان داده شده است.

سنجش محلول رنگدانه به وسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک، در تمامی رنگدانه‌ها فقط یک لکه رنگی بر روی کاغذ کروماتوگرافی لایه نازک نمایان شد و این موضوع بیانگر حضور یک ترکیب خالص می‌باشد. در هنگام اسپری وانیلین باز هم فقط لکه رنگدانه نمایان شد که نشان دهنده خلوص بالای رنگدانه استخراج شده است(تصویر ۳).

از میان رنگدانه‌های سبز ـ آبی، قرمز و زرد جداسازی شده از باکتری‌های مختلف تنها رنگدانه قرمز *سراشیا مارسنس* فعالیت ضد باکتریایی را علیه باکتری‌های *کلبسیلا* با قطر هاله ۱۴≤ نشان داد(تصویر ۴).

پاسخ ۱۲ ایزوله کلبسیلاهای مقاوم به دارو در برابر غلظت‌های متفاوت رنگدانه نسبتاً مشابه بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد رنگدانه سراشیا

مارسنس بر باکتری کلبسیلا ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی باکتریایی، حداقل غلظتی از رنگدانه است که باعث جلوگیری از رشد ۹۹/۹ درصد از رشد باکتری‌ها می‌شود. نتایج MBC رنگدانه در برابر باکتری کلبسیلا با غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل گردید.

نتایج شناسایی مولکولی باکتری‌های رنگدانه‌دار دارای فعالیت ضدمیکروبی بعد از استخراج DNA باکتری،PCR انجام گردید که نتایج حاصل از آن در تصویر ۵ آمده است.

نتایج تعیین توالی سویه به دست آمده انجام گردید. تعیین توالی دو طرفه با هر دو پرایمر انجام و در نهایت تعیین ترادف نمونه‌ها به صورت توالی‌یابی کامل انجام گردید و آنالیز داده‌ها از سایت NCBI نشان داد که نمونه باکتری *سراشیا مارسنس* مشابه باکتری *سراشیا مارسنس* سویه FF6 با ۱۰۰ درصد شباهت مشاهده گردید.

جدول ۱: تست های بیوشیمیایی باکتری‌های رنگدانه دار جداسازی شده

تست	سودوموناس آئروژینوزا	سراشیا مارسنس	انتروباکتر ساکازاکی	فلاوباکتر میزوتای	میکروکوکوس لوتئوس	استافیلوکوکوس آرئوس
رنگ آمیزی گرم	−	−	−	−	+	+
تریپل شوگر آیرون اگار	Alk/Alk بدون گاز و H_2S	Acid/Acid بدون گاز و H_2S	Acid/Acid تولید گاز بدون H_2S	Alk/Alk بدون گاز و H_{2S}	×	×
موتیلیتی	+	+	+	-	×	*
سیترات	+	+	+	+	×	×
اوره آز	-	-	-	-	×	+
لیزین دکربوکسیلاز	-	+	-	×	×	×
اکسیداتیو-فرمنتیتیو	اکسیداتیو مثبت فرمنتیتیو منفی	×	×	اکسیداتیو منفی فرمنتیتیو منفی	اکسیداتیو مثبت فرمنتیتیو منفی	اکسیداتیو مثبت فرمنتیتیو مثبت
اکسیداز	+	-	-	+	+	-
کاتالاز	×	×	×	×	+	+
کوآگولاز	×	×	×	×	×	+
ژلاتیناز	+	×	×	-	×	×
اندول	×	-	-	×	×	×
DNase	×	+	-	×	×	+
متیل رد	×	-	-	×	×	×
ووگزپروسکوئر	×	+	+	×	×	×
اورنیتین دکربوکسیلاز	×	+	+	×	×	×
فنیل آلانین دی آمیناز	×	-	-	×	×	×
پنی سیلین	×	×	×	R	×	×
ونکومایسین	×	×	×	S	×	×
باسیتراسین	×	×	×	×	S	×
کلنی روی MHA	کلنی سبز آبی	کلنی قرمز	کلنی زرد	کلنی زرد	کلنی زرد	کلنی زرد

*عدم انجام تست

جدول ۲: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی رنگدانه سراشیا مارسنس بر باکتری کلبسیلا

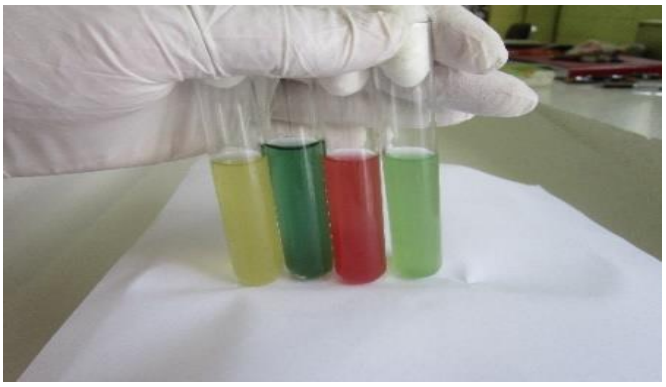
کلبسیلا	غلظت رنگدانه قرمز سراشیا مارسنس (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)										
	۵۰۰۰	۴۰۰۰	۳۵۰۰	۳۰۰۰	۲۵۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰۰	۷۵۰	۵۰۰	۲۵۰
MIC	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
MBC	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+

-: عدم رشد باکتری

+: باکتری رشد یافته

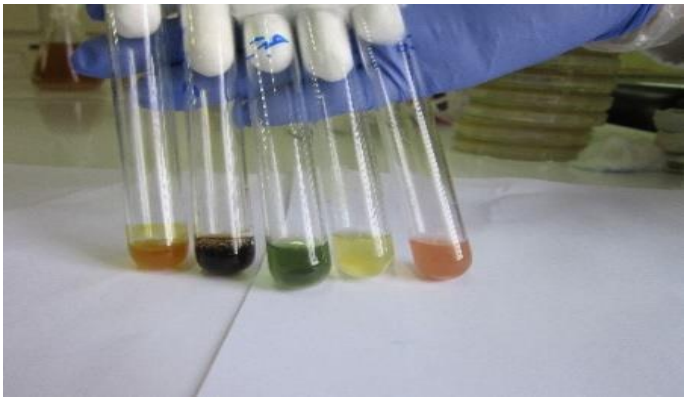
تصویر ۱: تست آنتی بیوگرام برای جدایه های کلبسیلای جداسازی شده از نمونه های بالینی زخم سوختگی

الف

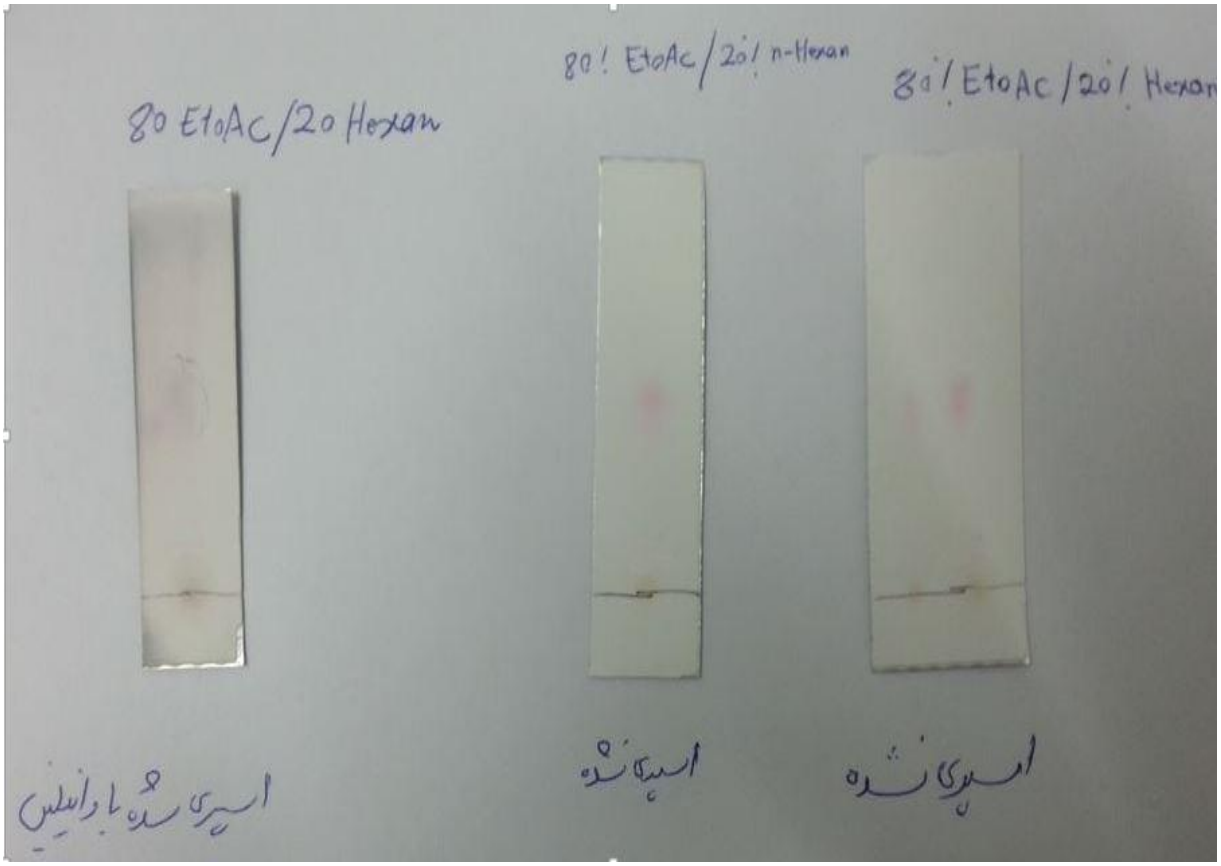


ب

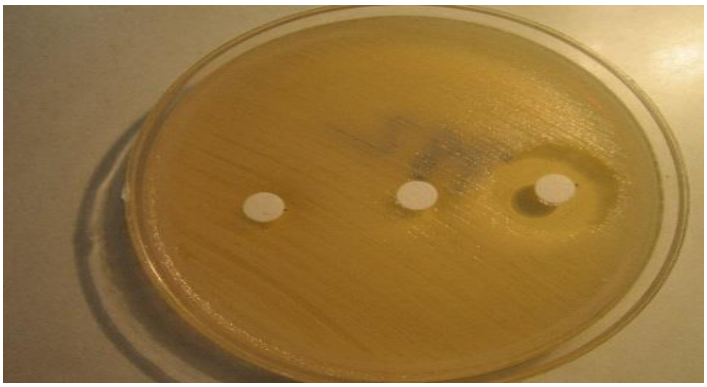
ج



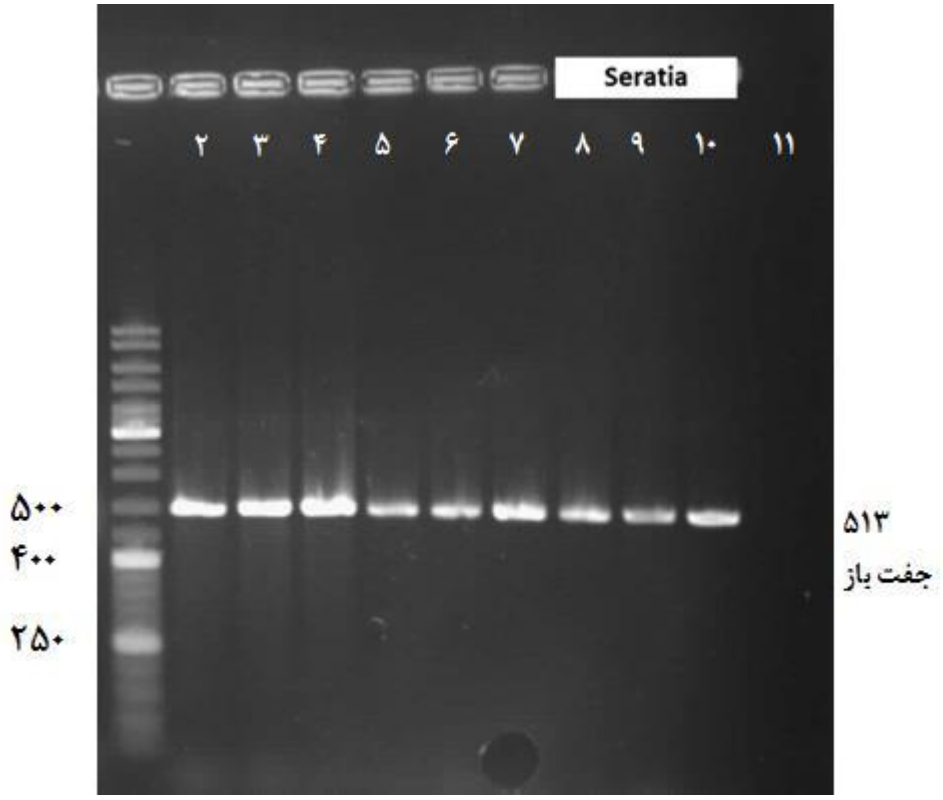
تصویر ۲: استخراج رنگدانه به وسیله حلال آلی متانول. الف: کشت باکتری های رنگدانه دار در محیط مولر هینتون براث، ب: استخراج رنگدانه به وسیله متانول و رسوب سلول‌های باکتری در ته لوله آزمایش، ج: رنگدانه‌های تغلیظ شده به وسیله تبخیر کننده چرخان



تصویر ۳: نتایج کروماتوگرافی لایه نازک. A. کروماتوگرافی لایه نازک برای رنگدانه قرمز سراشیا مارسسنس با حلال ۸۰ درصد اتیل استات و ۲۰ درصد هگزان بدون اسپری وانیلین در سمت چپ و همراه با اسپری وانیلین درسمت راست



تصویر ۴: . اثر ضدمیکروبی رنگدانه سراشیا مارسسنس بر روی کلبسیلای جداسازی شده از نمونه های بالینی، دیسک اول از سمت چپ دیسک خام، دیسک وسط حاوی متانول و دیسک سمت راست حاوی عصاره رنگدانه است.



تصویر ۵: ژل الکتروفورز محصول PCR. از سمت چپ ستون اول مارکر ۵۰ جفت بازی شرکت سیناژن. ستون دوم تا دهم نمونه ژن سراشیا مارسنس و ستون یازدهم کنترل منفی.

بحث

بـروز روزافـزون مقاومـت دارویـی در بـین گونه‌های میکروبی مختلف که باعث بروز بیماری‌هـای گوناگون در انسان می‌شـوند امـروزه بـه یـک نگرانـی جهانی تبدیل شده است. این مسئله افزایش نرخ مرگ و میر، دوره بستری شدن و هزینه‌های درمـان را بـرای

بیماران به ارمغان آورده است. دلایل مختلفی باعث بروز این پدیده می‌شوند، که مهم‌ترین آن‌ها استفاده بی‌رویه از داروهای ضد میکروبی به وسیله خود بیماران و یا تجویز بی‌رویه و غیر اصولی آن‌ها به وسیله پزشکان است. امروزه کشورهای گوناگون در سراسر جهان به دنبال یافتن مواد طبیعی با خاصیت ضد میکروبی هستند تا بتوان با جایگزین کردن آن‌ها با داروهای ضدمیکروبی که اکثر میکروارگانیسم‌ها به آن‌ها مقاومت نشان می دهند بر این پدیده غلبه کرد. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر ضدمیکروبی رنگدانه میکروارگانیسم‌ها بر روی ایزوله‌های کلبسیلای مقاوم به چند دارو که از نمونه‌های زخم سوختگی جداسازی شده‌اند، می‌باشد.

جوامع میکروبی خاک یکی از پیچیده‌ترین، متنوع‌ترین و مهم‌ترین مجموعه‌ای از ارگانیسم‌ها در بیوسفر هستند. این ارگانیسم‌ها منبع مهمی برای جستجوی عوامل ضد میکروبی جدید و مولکول‌هایی با اهمیت بیوتکنولوژی مانند رنگدانه‌های میکروبی که می‌توانند به عنوان رنگ‌های طبیعی و همچنین عوامل ضدمیکروبی از آنها استفاده شود(۱۴).

جنس کلبسیلا دارای گونه های مختلف است که براساس خصوصیات بیوشیمیایی طبقه‌بندی می‌شود. تشخیص دقیق گونه‌های کلبسیلا به منظور مطالعه‌های اپیدمیولوژیکی و پیدا نمودن منبع و طریقه انتشار این میکروارگانیسم، بسیار مهم است(۱۲). با این که گزارش‌های زیادی در مورد عفونت قسمت‌های مختلف بدن و همچنین مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های بیمارستانی، به وسیله بعضی از این گونه‌ها، ارایه گردیده، ولی با وجود این هنوز ارتباط بین گونه‌های مختلف کلبسیلا و خواص کلینیک و پاتولوژیک آنها مشخص نیست(۱۸-۱۵).

مقاومت دارویی کلبسیلاها با روش استاندارد کربی بوئر معلوم شد. در این مطالعه، همچنین نتایج به دست آمده از آنتی‌بیوگرام با ۱۲ آنتی‌بیوتیک، مقاومت بالایی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های به کار برده شده، نشان می‌دهد که البته در این میان باید برای آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم استثناء قائل شد، زیرا سویه‌های جمع‌آوری شده، حساسیت خوبی نسبت به این آنتی‌بیوتیک نشان دادند، به طوری که این حساسیت برای ایمی‌پنم ۹۸ درصد بوده است. نتایج به دست آمده به وسیله امین و همکاران در پاکستان حساسیت به نالیدیکسیک اسید ۵۷/۵ درصد و ایمی‌پنم ۹۲/۵ درصد را نشان می‌دهد(۱۹). در حالی که نتایج به دست آمده در اردن بیانگر تفاوت بسیار با نتایج حاضر و سایر محققین بوده است، به طوری که مقاومت به امیکاسین۳۸ درصد، سفتازیدیم۵۷ درصد و نالیدیکسیک اسید۳۳/۶ درصد بوده است، ولی ایمی‌پنم همچنان به عنوان یک آنتی‌بیوتیک مؤثر در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه با ۹۰/۹ درصد اثردهی داشته است(۲۰).

در بررسی نتایج حاصل از این پژوهش و مقایسه با سایر گزارش‌ها، اختلافاتی در بعضی موارد نیز به چشم می‌خورد که می‌توان علت آن را امکان خطا در حین انجام آزمایش دانست. زیرا در تأثیر

صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی باکتری و تعیین فرم‌های حساس و مقاوم باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی نکاتی مانند؛ نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مصرفی، عمق و ترکیب‌های محیط کشت نقش عمده‌ای داشته و قادر هستند آمار مقاومت را دستخوش تغییرات کاذب نمایند. به عنوان مثال نازک بودن محیط کشت، حساسیت آنتی‌بیوتیک را به طور کاذب افزایش می‌دهد و اصولاً عمق ۴ میلی‌متری برای این منظور توصیه شده است. علاوه بر این توزیع سویه‌های مقاوم در مناطق جغرافیایی می‌تواند به دلیل شرایط اقلیمی، مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک در آن منطقه باشد(۲۱ و ۴،۱۳).

در سال ۲۰۱۴ دانشمندان هندی اثر ضدباکتریایی رنگدانه‌های قرمز، صورتی، آبی، سبز، زرد و غیره را که از باکتری‌های مختلف *فلاوباکتریوم، باسیلوس، اشرشیا کلی، سودوموناس* و *زانتاموناس* جداسازی کردند بر روی گونه‌های استاندارد باکتریایی بیماری‌زای گرم مثبت و منفی *استافیلوکوکوس آرئوس، ویبریو کلرا، شیگلا فلکسنری، سالمونلا تیفی، باسیلوس سرئوس* مورد بررسی قرار دادند(۲۲). از میان رنگدانه‌های سبز- آبی، قرمز و زرد مورد استفاده در مطالعه حاضر فقط رنگدانه قرمز *سراشیا مارسنس* دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه *کلبسیلا* بود که این مسئله با تحقیق گوسوامی و بهووال و مطالعه کیم و همکاران که نشان دادند رنگدانه قرمز پرو دیجیوزین دارای خاصیت ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی است، یکسان بود(۲۴ و ۲۳).

لاپندا و همکاران در تحقیق خود متوجه شدند که رنگدانه قرمز سراشیا فاقد اثر ضد میکروبی بر علیه اسینتوباکتر است(۲۵). این یافته در تضاد با تحقیق حاضر است که در آن رنگدانه قرمز باعث ایجاد هاله عدم رشد درکشت *اسینتوباکتر* با مقاومت چند دارویی شد. این مسئله قدرت بالای رنگدانه قرمز جداسازی شده در این تحقیق را نسبت به کار لاپندا و همکاران نشان می‌دهد. همانند با تحقیق حاضر میخائیل و یوسیف گزارش کردند که رنگدانه *سراشیا مارسنس* دارای اثر ضد باکتریایی علیه کلبسیلا است(۲۶). درسال ۲۰۱۴ دانشمندان هندی که بر روی اثر مهارکنندگی رنگدانه قرمز بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های استاندارد کار می‌کردند خاصیت مهارکنندگی علیه *کلبسیلا* و *کاندیدا* گزارش کردند. هیچگونه اطلاعاتی مبنی بر مقاومت دارویی در این گونه‌ها گزارش نشده بود(۲۷).

سورش و همکاران اثر ضد میکروبی رنگدانه قرمز رنگ باکتری هالواکتیباسیلوس آلکالیفیلوس[1] بر روی باکتری‌های آستافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی با ناحیه ممانعت از رشد ۱۴ و ۱۶ گزارش نمودند(۲۸).

لپندا و همکاران اثر ضدمیکروبی رنگدانه پیوجیوسین باکتری سراشیا مارسنس را بر روی

1-Halolactibacillus alkaliphilus

باکتری‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی، سودوموناس ائروجینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، اسینتوباکتر، استرپتوکوکوس پیوژنز و انتروکوکوس فیکالیس مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که باکتری‌های اشریشیا کلی، اسینتوباکتر و سودوموناس نسبت به رنگدانه مفاومت نشان دادند. حداقل غلظت مهار رشد برای دیگر باکتری‌ها در رنج ۴-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند(۲۹) که نسبت به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر غلظت کمتری می‌باشد که می‌توان علت را به شرایط محیطی باکتری سراشیا مارسنس نسبت داد.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اثر ضد میکروبی رنگدانه‌های مختلف به دلیل تفاوت ساختاری آن‌ها متفاوت است. هم‌چنین این مسئله به خصوصیات گونه‌های مختلف میکروبی دارای الگوی مقاومت نیز بستگی دارد به طوری که مثلا یک رنگدانه ممکن است بر روی یک باکتری در یک کشور اثر مهارکنندگی داشته باشد و بر روی همان باکتری در جایی دیگر فاقد اثر مهارکنندگی باشد که در نتایج این مطالعه نیز مشهود می‌باشد. دانشمندان بر این باورند که خاصیت ضد میکروبی رنگدانه قرمز *سراشیا مارسنس* در نتیجه توانایی در عبور از غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها و ظرفیت آن برای مهار آنزیم‌های هدف، مانند DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ است، که رشد سلولی را متوقف می‌کند(۳۰ و ۲۶). هم‌چنین میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از منابع محیطی حاوی یک ذخیره بسیار متنوع از رنگدانه‌ها هستند که در آن می‌توان ساختارهای مختلف رنگدانه با خواص ضد میکروبی گوناگون را جستجو کرد. بنابراین تحقیق‌های بیشتر در این زمینه، از جمله آنالیز رنگدانه و ارزیابی مکانیسم اثر به شفاف شدن هر چه بیشتر تنوع و اثر رنگدانه‌های میکروبی منجر می‌شود و می‌تواند افق روشنی را در تولید داروهای ضد میکروبی در صنایع داروسازی باز کند.

نتیجه‌گیری

رنگدانه باکتریایی از جمله رنگدانه باکتری سراشیا مارسنس می‌توانند به صورت بالقوه دارای خاصیت ضد میکروبی باشند، اما میزان مهارکنندگی این رنگدانه‌ها با توجه به انواع و ساختار مختلف آن‌ها و هم‌چنین نوع میکروارگانیسم مورد اثر بسیار متفاوت است، به طوری که ممکن است از دو ساختار متفاوت از یک رنگدانه اثر مهارکنندگی کاملاً متفاوتی را بر روی یک میکروارگانیسم یکسان نشان دهند. حتی یک رنگدانه می‌تواند اثرات مختلفی، از مهار کامل رشد تا عدم مهار رشد، بر روی دو گونه یکسان باکتریایی، اما با الگوی مقامت دارویی متفاوت داشته باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان واحد شیراز به دلیل حمایت‌های مالی از این طرح تحقیقاتی کمال تشکرو قدردانی را دارند.

REFERENCES

1.Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 915-24.
2.Ryan KJ, Ray CG. Sherris medical microbiology. 4th ed. McGraw Hill 2004; 1: 8385-8529.
3.Saha S, Thavasi R, Jayalakshmi S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. Res J Microbiol 2008; 3(3): 122-8.
4.Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. Journal Bacteriol 2005; 187: 1825–32.
5.Gupta C, Prakash D, Gupta S. Functional foods enhanced with microbial antioxidants. Acad J Nutr 2013; 2(2): 10-8.
6.El-Batal AI, El-Sayyad GS, El-Ghamry A, Agaypi KM, Elsayed MA, Gobara M. Melanin-gamma rays assistants for bismuth oxide nanoparticles synthesis at room temperature for enhancing antimicrobial, and photocatalytic activity. J Photochem Photobiol B 2017; 173: 120-39.
7.Joshi VK, Attri D. Solid state fermentation of apple pomace forthe production of value added products. Natl Prod Rad 2006; 5(4): 289-96.
8.Gupta C, Garg AP, Prakash D, Goyal S, Gupta S. Microbes aspotential source of biocolours. Pharmacology Online 2011; 2: 1309-18.
9.Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM press; 2011; 8: 15.
10.Archin T, Afzalian E, Kargar M, Ghasemi Y. Molecular Identification of SHV, TEM, CTX-M β lactamases Genes and Antibiotics Resistance Pattern of k. Pneumoniae Isolates Collected from ICU Patients of Namazi Hospital, Shiraz, Iran. Armaghane Danesh, YUMSJ 2016; 18(10): 816-24.
11.Muhammad AR, Basheer AER, Ahmed FM, Mohammed A, Abdurehman A, Omar El, et al. Intra-pleural colistin methanesulfonate therapy for pleural infection caused by carbapenem-resistant *acinetobacter baumannii*: A successful case report. Infect Dis Rep J 2014; 6(3): 5413.
12.Velu RK, Priya KA, Satheesh S, Ashokkumar B, Varalakshmi P, Selvakumar G, et al. Microbiological research in agroecosystem management. Antifouling activity of Prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST. India: Springer; 2013; 11-21.
13.Moazamian E, Bahador N, Azarpira N, Rasouli M. Anti-cancer parasporin toxins of new *bacillus thuringiensis* against human colon (hct-116) and blood (ccrf-cem) cancer cell lines. Curr microbial 2018; 75(8): 1090-1098.
14.Mamunur Rashid MD, Fakruddin MD, Mohammad Mazumdar R, Kaniz F, Chowdhury A. AntiBacterial Activity of Pigments IsolatedFrom Pigment Forming Soil Bacteria. BJPR 2014; 4(8): 880-94.
15.Forbes BA. Baily and scott's diagnostic microbiology. Baltimor: Mosby; 1998; 509-26.
16.Hamburger H, Nilsson L, Claesson B, Karnell P, Larsson M, Reylander E, et al. New species-related MIC breakpoints for early detection of development of resistance among gram-negative bacteria in swedish intensive care units. Antimicrob Chemotherapy 1999; 44(5): 611-9.
17.Khaneja M, Naprawa J, Kumar A, Piecuch S. Successful treatment of late-onset infection due to resistant Klebsiellapneumoniae in an extremely low birth weight infant using ciprofloxacin. J Perinatol 1999; 19(4): 311-4.
18.Al Shara MA. Emerging antimicrobial resistance of Klebsiella pneumonia strains Isolated from Pediatric Patients in Jordan. The New Iraqi Journal of Medicine 2011; 7(2): 29-32.
19.Soltan Dalal MM, Miremadi SA, Sharify Yazdi MK, Rastegar Lari A, Rajabi Z, Avadis YS. Antimicrobial resistance trends of klebsiella spp. isolated from patients in imam khomeini hospital. Tehran University of Medical Sciences 2013; 6(4):275-81.
20.Parker MT. Hospital acquired infections: Guidelines to laboratory methods. Copenhagen: WHO Regional Publication European; 1978; 35.
21.Salehi Gatabi A, Zaboli F. Antibiotic resistance pattern and existence of beta-lactamase shv, tem, ctx-m genes in esbl-producing klebsiella strains in the clinical samples in Babol, Iran. Armaghane-danesh, YUMSJ 2016; 21(1): 71-83.
22.Stratchounski LS, Kozlov RS, Rechedko GK, Stetsiouk OU, Chavrikova EP. Antimicrobial resistance patterns among aerobic gramnegativebacilli isolated from patients in intensive careunits: results of multi-center study in Russia. Clin Microb Infection 1998; 9(4): 497-507.
23.Rashid MM, Fakruddin M, Mazumdar RM, Kaniz F, Chowdhury MA. Anti-bacterial activity of pigments isolatedfrom pigment-forming soil bacteria. British J Pharma Res 2014; 4(8): 880-94.

24.Goswami B, Bhowal J. Identification and characterization of xtracellular red pigment producing bacteria isolated from soil. Int J Curr Microbiol App Sci 2014; 3(9): 169-76.
25.Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. Microbial Research Journal 2014; 169(4): 262-78.
26.Lapenda JC, Silva PA, Vicalvi MC, Sena KX, Nascimento SC. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. World J Microbiol Biotechnol 2015; 31(2): 399-406.
27.Mekhael R, Yousif SY. The role of red pigment produced by *serratia marcescens* as antibactrial and plasmid curing agent. J Duhok Univ 2009; 12(1): 268-74.
28.Sumathi C, MohanaPriya D, Swarnalatha S, Dinesh MG, Sekaran G. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. The Sci World J 2014; 290327.
29.Suresh M, Renugadevi B, Brammavidhya S, Iyapparaj P, Anantharaman P. Antibacterial activity of red pigment produced by halolactibacillus alkaliphilus msrd1--an isolate from seaweed. Appl Biochem Biotechnol 2015; 176(1): 185-95.
30.Lapenda JC, Silva PA, Vicalvi MC, Sena KX, Nascimento SC. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from Serratia marcescens UFPEDA 398. World J Microbiol Biotechnol 2015; 31(2): 399-406.
31.Kumar A, Vishwakarma HS, Singh J, Dwivedi S, Kumar M. Microbial pigments: production and their applications in various industries. I Journal Pcbs 2015; 5(1): 203-12.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Antimicrobial effect of *Serratia marcescens* Pigment on the Multi-Drug Resistance Klebsiella Pneumoniae Isolates from Burn Wounds

Moazamian E[1*], Emami A[2]

[1]Young Research and Elite Club, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, [2]Burn & Wound Healing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 9 Marc 2018 Accepted: 17 Aug 2018

Abstract

Background and Aim:With respect to the increasing of antibiotic resistance in pathogenic bacteria, identification of new antimicrobial compounds is necessary. Bacterial pigments as bioactive products are one of the agents for identifying new antimicrobial agents. Microorganisms have been considered for the production of new microbial products such as pigments.

Methods: In the present research, a total of 37 pigmented bacterial strains were obtained from soil samples of different regions of Fars province, Iran. These strains contained a wide variety of pigmentation including: red, yellow and green. Strains with different pigmentation were selected for further studies. Pigments were extracted by methanol-water or methanol for secreted and non-secreted pigments, respectively. In order to evaluate the antibacterial activity of pigments, disc diffusion and macrodilution assay were used on MDR *Klesiella* isolated from clinical samples. Finally, microorganism with anti-bacterial pigment was identified by molecular method.

Results: Based on the morphology of isolated pigment colonies in different environments and carrying out biochemical tests, the presence of bacteria such as, *Pseudomonas aeroginosa, Serratia marcescens, Enterobacter sakazakii, Flavobacter mizutaii, Micrococcus luteus and Staphylococcus aureus* were identified. The total frequency of *Klebsiella* isolates was 8.5%. Of the 17 isolated isolates, 12 isolates were completely resistant to all antibiotics, and six isolates were sensitive to the imipenem antibiotic.
All of *Klebsiella* isolates were multi drug resistance. A Red pigment from *Serratia marcessence* was the most potent and showed inhibitory effects on MDR *Klebsiella*.

Conclusion: Isolated microorganisms from environmental resources contained a very diverse collection of pigments, where different pigment structures with different antimicrobial properties can be searched. The present study indicated that bacterial pigments can be effective against MDR *Klebsiella* isolates.

Key words: Burn wound samples, Bacterial pigments, antibiotic resistance, *Klebsiella.*

[*]**Corresponding author**: **Moazamian E,** Young Research and Elite Club, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
Email: elhammoazamian@gmail.com

Please cite this article as follows:
Moazamian E, Emami A. Antimicrobial effect of *Serratia marcescens* Pigment on the Multi-Drug Resistance Klebsiella Pneumoniae Isolates from Burn Wounds. Armaghane-danesh 2018; 23(4): 499-515