مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۲، تابستان ۹۷، صفحات ۱۰۴ تا ۱۱۶

Original Article

DOI: 10.29252/iau.28.2.104

نقش پیگمان‌های استخراجی از باکتری‌های جدا شده از محیط بر روی میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از بیماران دیابتیک

نوشین ناهید[۱]، نیما بهادر[۲]، نعمت ا...رزمی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران؛ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۲]ادانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۳]دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *دیابت یکی از مهم‌ترین بیماری‌های متابولیک در جهان است که به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریهای دخیل می‌تواند باعث ایجاد زخم در اندام تحتانی و قطع عضو شود. هدف از مطالعه حاضر، استخراج رنگدانه‌های تولید شده توسط باکتری‌های محیطی و بررسی اثر آنها بر روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دخیل در عفونت زخم پای دیابتیک بود.*

روش بررسی: در این پژوهش، باکتری‌های غالب در ایجاد عفونت زخم پا جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی شدند و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به دنبال آنالیز آماری ارزیابی شد. سپس باکتری‌های تولید کننده رنگدانه از محیط جداسازی شدند و اثر حلال‌های مختلف بر روی استخراج پیگمان توسط تکنیک کروماتوگرافی لایه‌نازک انجام پذیرفت. در پایان، اثر پیگمان بر باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ارزیابی شد و سویه‌ها توسط آزمون مولکولی شناسایی شدند.

یافته‌ها: *بیشترین میزان باکتری جداشده از زخم، اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس آرئوس بودند. نتایج حاصل از آنتی بیوگرام بیانگر آن است که اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر جدایه‌های گرم مثبت مشابه و برای جدایه‌های گرم منفی مروپنم و ایمی پنم از حساسیت بیشتری برخوردارند. از میان رنگدانه‌های استخراج‌شده، ۴ پیگمان دارای خاصیت ضد باکتریایی جزیی بر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند که بر اساس تکنیک مولکولی، Brachybacterium sp. IARI-ABL-35,Brachybacterium nesterenkovii strain DSM 9573,Brevundimonas sp. NeomS2D Kocuria sp. YIM 75764 شناسایی شدند.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس خواص بیولوژیکی رنگدانه‌های باکتریایی استخراج شده، می‌توان از آنها درزمینه‌های مختلف پزشکی و درمانی استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *آنتی بیوگرام، پیگمان‌های باکتریایی، دیابت، عفونت باکتریایی، کروماتوگرافی لایه نازک.*

مقدمه

دیابت نوعی بیماری متابولیکی با عوارض متعدد است و عفونت زخم پا یکی از عوارض اصلی دیابت است که می‌تواند منجر به گانگرن و حتی قطع عضو شود که البته بار مالی، روحی و روانی این مسئله را نیز باید مدنظر داشت. برآورد شده است که تا سال ۲۰۳۵ شیوع جهانی دیابت به ۶۰۰ میلیون نفر افزایش یابد که متاسفانه ۶۰ درصد این افراد در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند (۱، ۲). تشخیص عفونت زخم پای دیابتی مسئله مهم و گسترده‌ای است و علت به وجود آمدن زخم و تولید عفونت می‌تواند علاوه بر عوامل عدم کنترل قند خون که به دنبال آن منجر به مشکلات ایسکمی و نوروپاتیک در بیمار می‌شود، به دلیل کاهش پاسخ‌های ایمنی در بیماران دیابتیک و همین‌طور مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های دخیل در زخم باشد (۳،۴). برای اینکه بتوان عفونت زخم پای دیابتی را درمان کرد، باید نوع عفونت و عوامل درگیر کننده زخم را

آدرس نویسنده مسئول: شیراز، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی (**email**:bahador@iaushiraz.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۲/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۶/۱۲

شناخت تا بتوان داروی موثر بر درمان را به موقع تجویز کرد (۵). در تحقیقات بی‌شماری مشخص شده است انواع باکتریهای هوازی و بی وهوازی موثردر ایجاد عفونت زخم پای دیابتیک اکثرا مقاوم به آنتی بیوتیک هستند (۶). جهت مقابله و درمان مناسب، مطالعات فراوانی بر بررسی خاصیت آنتی‌بیوتیکی رنگدانه باکتری‌های جداسازی شده از خاک بر عفونت به اثبات رسیده است و مشخص شده که با در نظر گرفتن خالص‌سازی و بدست آوردن خاصیت ضد باکتریایی رنگدانه‌ها بتوان راهی برای مقابله با باکتری‌های پاتوژن به دست آورد. مطابق تحقیقات فراوانی که بر زخم و عفونت زخم دیابتی انجام شده است، ایجاد بیوفیلم ناشی از حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دلیل قانع‌کننده‌ای برای قطع عضو بیمار است (۷). لذا ازآنجایی‌که ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، امروزه مشکل اصلی جهت درمان عفونت زخم دیابتیک و از مسائل مهم در پزشکی بالینی محسوب می‌شود، تحقیقات در جهت یافتن آنتی‌بیوتیک جدید که بتواند پاسخگوی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشد، هدف اصلی محققان است. بنابراین متابولیت‌های ثانویه باکتریایی، ازجمله پیگمان‌ها نظر بسیاری از محققان را به خود جلب کرده تا بتوان از آن‌ها در جهت درمان و مقابله با بسیاری از میکروارگانیسم‌های پاتوژن استفاده کرد(۷). به‌خوبی ثابت‌شده است که تولید آنتی‌بیوتیک توسط باکتری، هم به لحاظ کیفی و هم از لحاظ کمی، ممکن است به شرایط محیط کشت نیز وابسته باشد. به‌خصوص، اضافه کردن ترکیبات طبیعی غذایی به محیط کشت باکتری یا استفاده از روش‌های بیان ژن می‌تواند باعث افزایش تولید رنگدانه، حتی فراتر از انتظار باشد. به‌عنوان‌مثال محیط‌های کشت حاوی اسیدهای چرب اشباع، به‌خصوص محیط کشت مایع حاوی بادام‌زمینی، یک انتخاب بهتر و مناسب برای افزایش دادن تولید رنگدانه پرودی جیوسین حدود ۴۰ برابر(حدود ۳۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) در سراشیا مارسسنس است (۸) .از آنجایی که زخم‌های عفونی پای دیابتی درگیر با باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک شایعترین علت آمپوتاسیون است و درمان باید بر اساس کشت‌های بافتی والگوی مقاومت میکروبی انجام پذیرد، ارزیابی متابولیت‌های مؤثر در مقابله با باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک نیز معقول به نظر می‌رسد. بنابراین تحقیق حاضر به بررسی نقش پیگمان‌های استخراجی از باکتریهای جدا شده از محیط (خاک و هوا) بر روی میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از بیماران دیابتیک و نیز به بررسی بهینه سازی شرایط تولید رنگدانه توسط باکتری می‌پردازد.

مواد و روشها

جمع‌آوری باکتری‌های تولیدکننده پیگمان از نمونه‌های خاک و هوا

در این پژوهش توصیفی- مقطعی، تعداد ۴۰ نمونه خاک از عمق ۵ سانتی متری خاک و اطراف ریشه گیاهان از فروردین تا اردیبهشت ۱۳۹۵، جمع‌آوری شدند. پس از رقیق سازی نمونه‌های خاک (10^{-3} تا 10^{-1})، میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت نهایی محیط کشت منتقل و به طور یکنواخت پخش شد (۹). ازآنجایی‌که میکروارگانیسم‌های تولیدکننده پیمگان در هوا به‌مراتب بیشتر یافت می‌شوند، تعداد ۴۰ نمونه از هوای مناطقی مانند محوطه داخلی دانشکده علوم، محوطه باز دانشگاه آزاد شیراز، محوطه بسته بیمارستان نمازی بخش داخلی و بیمارستان تخصصی امام رضا و محوطه باز بیمارستان نمازی جمع آوری شدند. برای این منظور با استفاده از محیط کشت نوترینت آگاردرب پلیت ها به مدت نیم ساعت در مناطق مذکور باز نگه داشته و تمامی پلیت‌ها به صورت برعکس در انکوباتور دمای ۳۰ درجه سیلسیوس به مدت ۷۲- ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و به دنبال آن تشخیص باکتری‌ها بر اساس مرفولوژی کلنی، تولید پیگمان، خصوصیات خاص هر کلنی (بر اساس رنگ رنگدانه)، موکوئیدی بودن باکتری صورت گرفت و پس از آن جدایه‌های تولید کننده پیگمان خالص شدند (۱۰، ۱۱).

بهینه‌سازی شرایط تولید پیگمان باکتریایی

رشد در دماهای مختلف

با توجه به اهمیت خالص‌سازی جدایه‌ها و تولید پیگمان، یکی از مهم‌ترین شرایط بهینه‌سازی، نگه‌داری ارگانیسم در دماهای مختلف و ارزیابی بهترین دما جهت تولید پیگمان به شمار می‌آید. بر همین اساس نمونه‌های خالص‌شده پس از کشت بر روی محیط کشت نوترینت آگار به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دماهای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و نیز دمای یخچال گرمخانه گذاری شدند و از نظر شدت رنگ تولیدشده توسط باکتری ارزیابی شدند (۱۲).

استفاده از محیط کشت بادام‌زمینی

جهت تغلیظ و ترغیب باکتری برای تولید رنگدانه بیشتر، کلنی‌های خالص‌سازی شده به محیط ساختگی peanut seed agar منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اپتیمم برای هر یک از جدایه‌ها که از آزمون قبلی تعیین شده بودند، انکوبه و پس از زمان مذکور برای ادامه آزمون‌ها مورداستفاده قرار گرفتند (۱۳، ۱۴). ۸ کلنی رنگی از میان کل

کلنی‌های رنگی تولیدشده انتخاب و شماره‌گذاری (1N,2N,3N,4N,4AN,6N,9N,10N) شدند و تحت شرایط دمایی مناسب قرار گرفتند.

شکستن دیواره سلول و استخراج پیگمان‌ها

جهت شکستن دیواره سلول باکتری‌های حاوی پیگمان و استخراج رنگدانه‌ها به میزان یک گرم از ۸ کلنی رنگی باکتریایی به‌طور جداگانه درون یک لوله شیشه‌ای حاوی ۵ میلی‌لیتر حلال متانول ۹۹/۸٪، ریخته و به مدت ۱۸ ساعت با دورrpm ۲۰۰ ورتکس شد. بعدازاینکه پیگمان به حلال وارد شد، به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد تا باقیمانده سلول‌های باکتری متلاشی‌شده از محیط خارج شود. عمل سانتریفیوژ و استفاده از حلال متانول تکرار شد تا رسوب ته‌نشین شده کاملاً بی‌رنگ شود. سپس توسط سمپلر، حلال رویی جمع‌آوری و درون ظرف کوچک شیشه‌ای درب دار ریخته شد. برای به دست آوردن میزان قابل‌توجهی از رنگدانه-های استخراج‌شده این عمل چهار بار تکرار شد (۱۵).

تعیین حداکثر جذب نوری پیگمان‌ها توسط اسپکتروفتومتر

جهت آنالیز پیگمان‌های استخراج‌شده، از طیف‌سنجی UV-visible استفاده شدکه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، نقاط ماکزیمم جذب پیگمان‌ها در ناحیه طول موج‌های ۶۰۰- ۳۳۰ نانومتر اسکن شده و با طیف حاصل و نقاط ماکزیمم جذب به‌دست‌آمده از پیگمان‌های باکتری‌های مشخص شده و مشتقات نزدیک آن در حلال متانول، در منابع موجود مقایسه شدند (۱۶).

بررسی تخلیص پیگمان‌ها و ارزیابی حلالیت پیگمان‌ها با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC)

پس از استخراج اولیه، به‌منظور تعیین سنجش خلوص پیگمان‌ها از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) استفاده شد. برای انجام این کار، از سلیکاژل فیکس شده روی صفحات پلی اتیلن استفاده شد. به‌منظور انجام کروماتوگرافی، ابتدا محلول حاوی پیگمان که در متانول حل شده بود توسط لوله مویین برداشته شده و به فاصله یک سانتی‌متری از انتهای صفحه سلیکاژل قرار داده شد و بلافاصله درون تانک کروماتوگرافی که دارای حجمی از حلال‌های استون و اتیل استات، اسید استیک، متانول، آب، اتانول به ترتیب با نسبت‌های برابر ۵ میلی‌لیتر (V/V) از هرکدام از حلال‌ها به مدت تقریباً ۲۰ دقیقه قرار داده شد. پس‌ازاینکه حلال به انتهای صفحه TLC رسید و لکه‌ها به‌طور کامل از یکدیگر تفکیک شدند، پلیت از تانک کروماتوگرافی خارج و مدتی در دمای محیط قرار داده شد تا خشک شود. پس از کروماتوگرافی لایه‌نازک جهت پی بردن به خالص بودن رنگدانه‌ها و بررسی RF، صفحات سلیکاژل قرارگرفته روی پلی اتیلن توسط دستگاه UV موردبررسی قرار گرفتند (۱۵). جهت تعیین RF، مقدار مسافتی را که جسم از خط شروع تا وسط لکه طی کرده است اندازه گرفته به مسافتی که حلال پیموده تقسیم شد (۱۷).

شکل ۱. نمونه زخم پای دیابتیک نمونه گیری شده

جمع‌آوری نمونه از زخم پای بیماران دیابتی

در این پژوهش توصیفی- مقطعی، نمونه گیری بر روی ۲۳ بیمار دیابتی مبتلابه زخم در ناحیه تحتانی پا انجام پذیرفت. نمونه‌ها طی سه ماه اردیبهشت تا تیر ماه ۱۳۹۵ از مراکز درمانی بیمارستان شهید فقیهی شیراز، نمازی شیراز و کلینیک دیابت پردیس با اخذ رضایت کامل از بیمار و به تصویب کمیته اخلاق وزارت بهداشت و علوم پزشکی، از بیماران رده سنی دیابتی بین ۳۹ تا ۸۳ سال، با میانگین سنی ۵۹ سال جمع‌آوری شد. شایان ذکر است که درجه زخم افراد با توجه به نظر پزشک متخصص از درجه ۲ تا درجه ۵، مطابق طبقه‌بندی واگنردر نظر گرفته شد. جداسازی باکتری‌های دخیل در عفونت زخم پای دیابتی، از طریق آسپیراسیون توسط سرنگ استریل از عمیق‌ترین قسمت ضایعه، یا با عبور سواب موجود در نرمال سیلین استریل در لوله به عمق ضایعه و یا از لبه ضایعه نمونه تهیه شد (شکل ۱). سپس نمونه‌ها به محیط کشت‌های بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو آگار منتقل شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و پس از زمان مذکور نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت شناسایی فنوتیپی و تشخیصی باکتری‌ها، پس از مشاهده مورفولوژی باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط کشت بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو آگار و نیز بررسی

قدرت همولیز توسط باکتری‌ها، تست‌های اولیه شناسایی، شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست اکسیداز و رشد بر روی محیط‌های کشت سیمون سیترات، متیل رد ووژ پروسکوئر، اوره آز، تست داکسی ریبونوکلئاز، رشد بر روی محیط مانیتول سالت آگار، تریپل شوگر آیرون آگار، تست سولفید، ایندول، موتیلیتی و ارزیابی حساسیت باسیتراسین برای جدایه‌های گرم مثبت یا منفی انجام پذیرفت (۱۸).

بررسی الگوی آنتی بیوتیکی باکتری‌های دخیل در عفونت زخم پای دیابتیک

جهت بررسی میزان مقاومت و حساسیت باکتری‌های موجود در زخم به آنتی‌بیوتیک‌ها، از روش انتشار دیسک در محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت با استفاده از جداول استاندارد و مرجع ارائه‌شده (CLSI) ، با توجه به غلظت استاندارد نیم مک فارلند، کشت و گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انجام پذیرفت. سپس قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و مقاومت یا حساسیت باکتری‌ها نسبت به هر آنتی‌بیوتیک تعیین شد. برای حصول اطمینان از دقت تست آنتی بیوگرام، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله عدم رشد پس از سه تکرار به‌عنوان قطر نهایی ثبت شد (۱۹).

ارزیابی اثرات ضد میکروبی پیگمان‌های استخراج‌شده بر نمونه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک

جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی پیگمان‌ها، سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از زخم دیابتیک را به‌طور جداگانه در محیط کشت نوترینت براث کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده، سپس به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از آن را با نیم مک فارلند (که غلظت آن معادل با $1/5 \times 10^8$ باکتری در میلی‌لیتر) مقایسه کرده و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس با روش انتشار چاهک با قطر ۳ میلی‌متر برروی محیط مولر هینتون آگار توسط کرک بورر استریل میزان ۲۰ µL از حلال‌های حاوی پیگمان را درون چاهک ریخته و چاهکی در مرکز پلیت به‌عنوان کنترل منفی ایجاد کرده و به همان میزان حلال متانول افزوده، پس از مدتی که حلال تبخیر و پیگمان‌ها جذب شد، پلیت‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و فعالیت ضد باکتریایی پیگمان-ها بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین و نتایج ثبت شد (۹). جهت ارزیابی و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده، الگوی آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های گرم منفی در سطح معنی‌داری ۹۹٪ ($P<0/01$) به کمک نرم‌افزار SPSS 21 و توسط آزمون فریدمن آنالیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای جدایه‌های گرم مثبت از از آزمون ناپارامتری فریدمن نیز استفاده شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه با خاصیت آنتی‌بیوتیکی

در این مرحله، باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه که بیشترین اثر ممانعت کنندگی از رشد باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از زخم دیابتیک را از خود نشان دادند به روش مولکولی با استفاده از تکنیک PCR شناسایی شدند. استخراج DNA ژنومی ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن به انجام رسید و محلول حاوی DNA به دست آمده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای PCR مورداستفاده قرار گیرد. در این تحقیق به دلیل مشخص نبودن دقیق جنس و گونه باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه از پرایمر یونیورسال شرکت ماکروژن استفاده شد. آزمایش PCR در مخلوط واکنشی به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۱/۶ میکرولیتر ddH20، ۵ میکرولیتر، 10X buffer، ۴ میکرولیتر MgCl2، ۲ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر پرایمر یونیورسال با توالی مشخص در جدول (۱)، ۵ میکرولیتر Template، ۰/۴ میکرولیتر DNA polymerase tag صورت گرفت. سپس واکنش در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ دقیقه (دناتوراسیون اولیه) و ۳۰ دور، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، و ۲۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش یک دور در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه قرار گرفت. سپس ۴۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه پرایمر فوروارد برای تعیین توالی جهت شناسایی مولکولی بر اساس

جدول ۱. توالی پرایمر یونیورسال استفاده‌شده

Primers	Sequence (5' to 3')	Product length
F	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	1506bp
R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	

F:Forward; R:Reverse

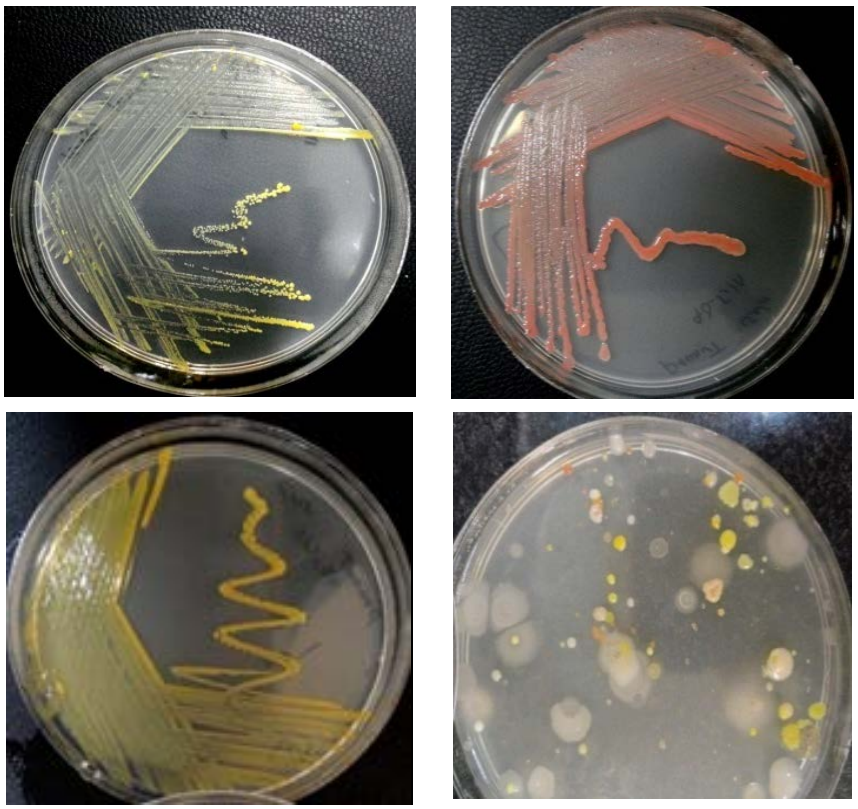
16SrRNA به شرکت ماکروژن (WWW.macrogen.com) کره جنوبی ارسال شدند و پس از دریافت نتایج تعیین توالی، هر نمونه توسط نرم‌افزار Chromas(version 2.33) مشاهده و بررسی شدند و سکانس‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار Chromas به وسیله بانک‌های اطلاعاتی موجود در NCBI بررسی و جنس و گونه باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه مورد نظر مشخص شد.

یافته‌ها

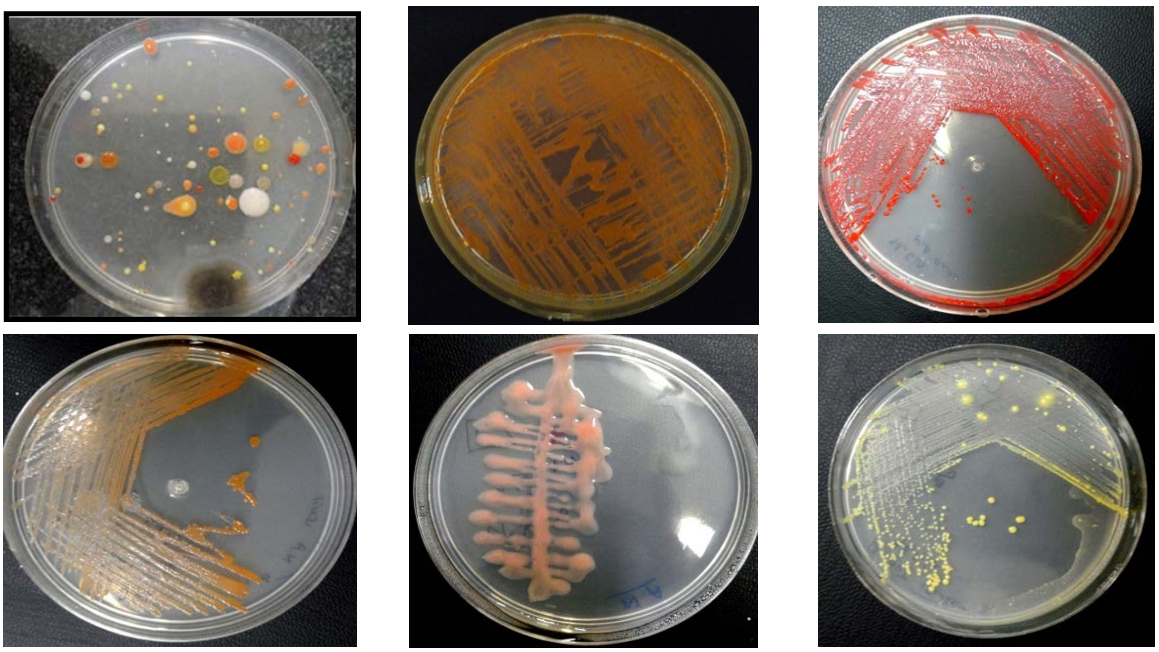
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از بین جدایه‌های خاک تنها سه جدایه (شکل ۲) توانایی تولید پیگمان به رنگ‌های زرد تیره ، زرد فسفری و گل بهی - صورتی را داشتند. درحالی که، کلنی‌های جدا شده از هوا شامل ۵ نمونه بودند که ازنظر رنگ، قوام و مورفولوژی با یکدیگر متفاوت بودند (شکل ۳). کلنی‌های انتخابی به رنگ‌های زرد، زرد-نارنجی، صورتی موکوئیدی، نارنجی پررنگ و قرمز مشاهده شدند. درمجموع ۸ جدایه‌های باکتریایی که توانایی تولید پیگمان داشتند، توسط تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین جدایه‌ها، یک‌سویه گرم منفی و ۷ سویه گرم مثبت ارزیابی شدند. ۵ جدایه‌ها گرم مثبت مورفولوژی کوکسی را از خود نشان دادند، درحالی‌که بقیه جدایه‌ها به‌صورت کوکوباسیل و یکی از جدایه‌ها به صورت باسیل مشاهده شدند. شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده از نمونه‌های محیطی در جدول ۲ آورده شده است.

بررسی اثر دماهای مختلف جهت تولید پیگمان بیانگر آن بود که از بین جدایه‌ها، تنها سویه شماره ۶ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توانایی تولید پیگمان را داشت، در حالی که سویه‌های 2N، 3N، 4N و4AN بهترین وضعیت رنگی پیگمان خود را در دمای ۳۷ درجه نشان دادند (جدول ۳).

ازآنجایی‌که بادام‌زمینی به‌عنوان یک ماده مغذی حاوی عناصر فلزی ، ویتامین و اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع است و معمولاً اسیدهای چرب اشباع‌شده به‌عنوان بهترین منبع کربن برای افزایش تولید رنگ بسیاری از رنگدانه‌های باکتریایی به کار برده می‌شود، همانطور که در شکل ۴ نشان داده‌شده است، باکتری در حضور این ترکیب توانایی تولید پیگمان‌های رنگی با شدت رنگ بیشتری را داشت.



شکل۲ . باکتری‌های تولیدکننده پیگمان جداشده از خاک



شکل ۳. باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه جداشده از هوا

جدول ۲. شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده از نمونه‌های محیطی

آزمون‌ها / شماره ایزوله‌ها	گرم و مورفولوژی	کاتالاز	اکسیداز	TSI	Simon citrate	SIM	MR	VP	Urease	Dnase	MSA
زردتیره (2N)	کوکسی مثبت	+	-	Alk/Alk بدون گازو H2s	-	حرکت جزئی اندول-	-	-	-	-	-
زرد- نارنجی (3N)	کوکوباسیل مثبت	+	-	Acid/Alk H2Sبدون گاز و	-	حرکت جزئی اندول-	+	-	+	-	-
زرد- فسفری (4N)	کوکسی مثبت	+	-	Acid/Acid بدون گازو H2s	-	حرکت + اندول-	+	-	-	-	-
نارنجی کم‌رنگ (4AN)	کوکوباسیل مثبت	+	-	Alk/Alk H2s بدون گازو	-	حرکت جزئی اندول-	-	-	-	-	-
قرمز (6N)	کوکسی مثبت	+	-	Acid/Alk بدون گاز و H2S	-	بدون تحرک اندول-	+	-	+	-	-
صورتی موکوئیدی (9N)	کوکسی مثبت	+	-	Alk/Alk بدون گازو H2s	-	بی‌تحرکت اندول -	-	+	-	-	-
گلبهی- صورتی (10N)	کوکسی مثبت	+	-	Alk/Alk بدون گازو H2s	-	بی‌تحرک اندول-	+	-	-	-	-
نارنجی تیره (1N)	باسیل (منفی)	+	-	Alk/Alk بدون گازو H2s	+	حرکت جزئی و اندول-	-	-	+	-	-

TSI: تریپل شوگر آیرون آگار،SIM: سولفید ایندول موتیلیتی،MR: متیل رد، VP: ووژپروسکوئر، MSA:مانیتول سالت آگار

استخراج پیگمان‌ها

۸ جدایه به‌دست‌آمده از نمونه‌های محیطی، طیف رنگی متفاوتی از زرد کم‌رنگ تا قرمز را از خود نشان دادند که در

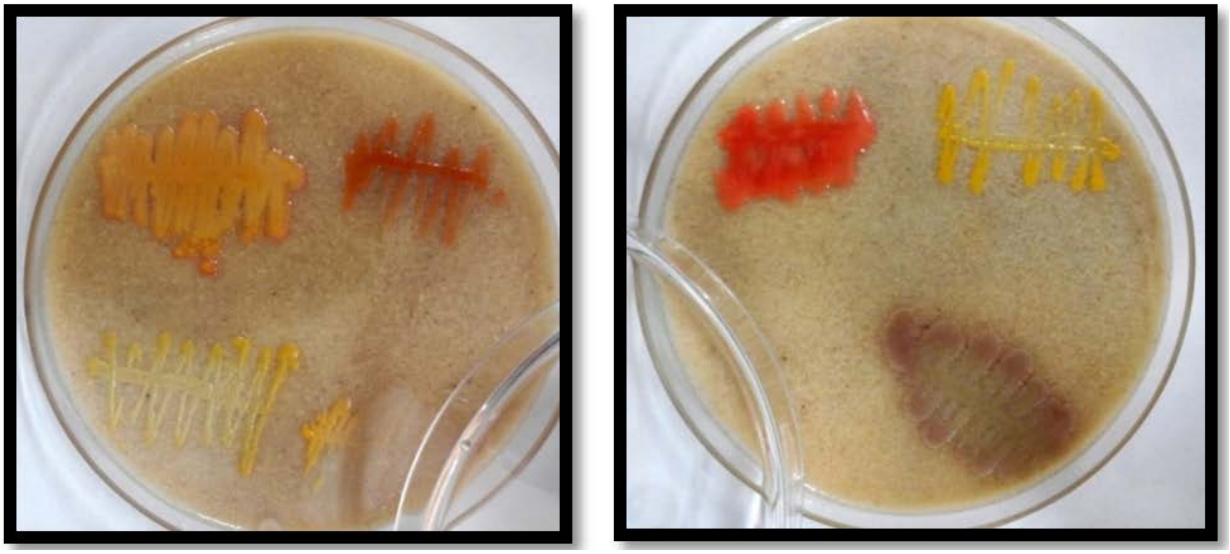
ظروف شیشه‌ای درب‌دار جهت ارزیابی اثرات ضد میکروبی، قرار داده شدند (شکل ۵).همچنین حداکثر جذب نوری هر یک از رنگدانه ها در جدول ۴ مشخص شده است.

بعد از انجام تکنیک TLC و بررسی توسط دستگاه UV (جدول ۵)، نتایج بیانگر آن بود که هگزان و آب حلال مناسبی برای استخراج پیگمان‌هانیستند. در واقع، هر چه مقدار RF به دست آمده بیشتر باشد، آن حلال برای استخراج رنگدانه بهتر است. پس با توجه به جدول ۵، به ترتیب اتیل استات، اتانول، استیک اسید و استون حلال‌های مناسب جهت استخراج پیگمان محسوب می‌شوند و هگزان و آب حلال مناسب جهت استخراج نیستند.

جدول۳ . اثر دماهای مختلف بر رشد و تولید رنگدانه‌های باکتریایی(درجه سلسیوس)

	شماره رنگدانه	1N	2N	3N	4N	4AN	6N	9N	10N
میزان رشد و تولید پیگمان در شرایط دمایی	دمای۴°C	-	-	-	-	-	++++	-	-
	دمای ۲۵ °C	++	++	++	++	+++	+++	++	++
	دمای۳۰ °C	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	دمای۳۵ °C	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	دمای۳۷ °C	+++	++++	++++	++++	++++	+	+	+

-: عدم تولید پیگمان + : ضعیف، ++ : متوسط، +++ : خوب، ++++ : عالی



شکل ۴. ارزیابی تولید رنگدانه در محیط کشت حاوی بادام زمینی

شکل ۵. رنگدانه های استخراج‌شده از جدایه‌ها در حلال متانول ۹۹/۸ درصد

معرفی میکروارگانیسم‌های جدا شده از زخم پای بیماران دیابتی

بعد از جداسازی باکتری‌های دخیل در عفونت زخم پای دیابتی و انجام آزمون‌های تشخیصی مذکور بر روی جدایه‌ها (جدول ۶)، نوع باکتری، تعداد و درصد باکتری‌های دخیل در عفونت مشخص شدند. از بین جدایه‌ها، اشرشیاکلی با ۳۰/۷۶٪ به‌عنوان باکتری گرم منفی و استافیلوکوکوس آرئوس با ۲۱/۷۳٪ به‌عنوان باکتری گرم مثبت، بیشترین سویه‌های جداسازی شده و پروتئوس ولگاریس کمترین میزان باکتری جداسازی شده از عفونت زخم پای دیابتیک بود.

تعیین الگوی آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه زخم پای بیماران دیابتیک

نتایج به دست آمده از تست آنتی بیوگرام نشان داد که بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به داروهای تتراسایکلین و تری متوپریم- سولفامتاکسازول مقاوم بودند، این در حالی است که باکتری‌های گرم مثبت بیشتر به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند. در بین جدایه‌های به دست آمده از زخم پای بیماران دیابتیک، حساس‌ترین سویه گرم مثبت مربوط به ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (NA10) و مقاوم‌ترین آن مربوط به ایزوله استرپتوکوکوس (2B) بود. حساس‌ترین سویه گرم منفی اشرشیاکلی(NA17) و مقاوم‌ترین آن اسینتوباکتر (NA12) بود. شکل ۶ نتایج برخی از تست‌های انجام شده بر روی سویه‌ها را نشان می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که اکثر سویه‌ها مقاوم به چند دارو بوده و این امر حساسیت ارزیابی الگوی آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها را ضروری می‌کند. علاوه بر این داده‌ها حاکی از آن است که بهترین آنتی‌بیوتیک برای از بین بردن گرم مثبت‌ها ونکومایسین (۹۰٪ سویه‌های گرم مثبت حساس) و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک برای باکتری‌های گرم منفی ایزوله شده از زخم‌ها جنتامایسین ۷۷٪ باکتری‌های گرم منفی نسبت به آن حساس) بود.

تحلیل آماری داده‌ها

آنتی‌بیوتیک‌های MEM و IPM نسبت به سایرین از حساسیت بیشتری برخوردار بودند. با توجه به میانگین‌های محاسبه‌شده بین آنتی‌بیوتیک‌ها به نظر می‌رسد که AN، CAZ، LEV، CPM و GM عملکردی شبیه به هم دارند و ازنظر عملکرد در دسته بعدی و با سطح عملکرد متوسط قرار می‌گیرند و TE را نیز می‌توان در دسته کم مؤثرترین آنتی‌بیوتیک نسبت به سایرین در نظر گرفت. لازم به ذکر است که یافته‌های دو آنتی‌بیوتیک GM و AN با توجه به انحراف معیار کوچکی که داشته‌اند ازنظر آماری از دقت بیشتری برخوردار بوده‌اند. با توجه به نتایج بدست آمده ($P<0/0001$) تفاوت بین آنتی‌بیوتیک‌ها تائید می‌شود. نمودار ۱، میانگین ۱۲ آنتی‌بیوتیک به همراه فاصله اطمینان را نشان می‌دهد.

جدول ۴. حداکثر جذب نوری رنگدانه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(نانومتر)

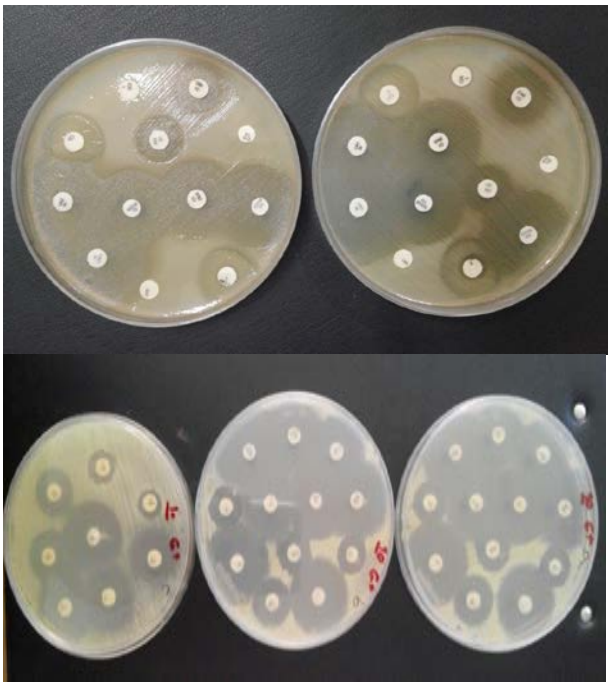
شماره رنگدانه	رنگ رنگدانه	حداکثر جذب نوری(λmax)(nm)
1N	نارنجی	۴۶۰
2N	زرد پررنگ	۳۵۰
3N	زرد – نارنجی	۴۵۰
4N	زرد فسفری	۴۳۰ - ۴۲۰
4AN	نارنجی کمرنگ	۴۵۰
6N	قرمز- صورتی	۴۸۰
9N	گلبهی موکوئیدی	۴۸۰
10N	گلبهی- صورتی	۴۸۰

جدول ۵. میزان RF برای هر حلال

شماره پیگمان		1N	2N	3N	4N	4AN	6N	9N	10N
RF و حلال‌ها	هگزان	-	-	-	-	-	-	-	-
	اتیل استات	۰/۸۶	۰/۶۸	۰/۷۶	۰/۷۹	۰/۸۰	۰/۸۵	۰/۷۱	۰/۹۵
	استون	۰/۷۶	۰/۸۷	۰/۹۰	۰/۸۸	۰/۸۴	۰/۷۸	۰/۸۰	۰/۸۳
	استیک اسید	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۸۴	۰/۷۶	۰/۷۴	۰/۸۱	۰/۸۷	۰/۹۳
	اتانول	۰/۸۹	۰/۹۰	۰/۸۵	۰/۸۹	۰/۹۳	۰/۷۱	۰/۸۶	۰/۷۵
	آب مقطر	-	-	-	-	-	۰/۶۶	-	-

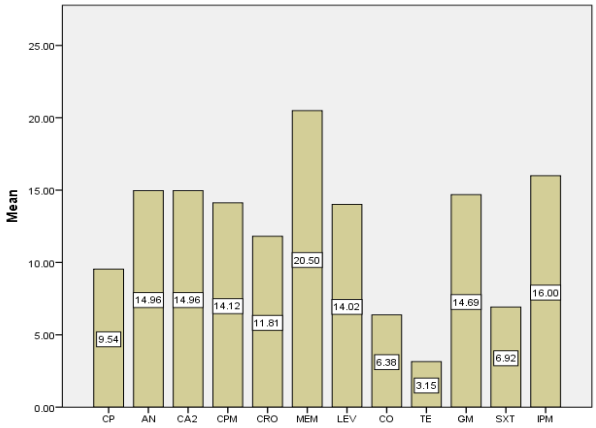
جدول ۶. عامل عفونت و درصد باکتری‌های دخیل در عفونت زخم ناحیه پای ۲۳ بیمار دیابتی

عامل عفونت	تعداد و درصد
اشرشیاکلی	۴(۳۰/۷۶٪)
سودوموناس آئروجنوزا	۲(۱۵/۳۸٪)
پروتئوس ولگاریس	۱(۷/۷٪)
پروتئوس میرابیلیس	۲(۱۵/۳۸٪)
کلبسیلا	۲(۱۵/۳۸٪)
اسنیتوباکتر	۲(۱۵/۳۸٪)
استافیلوکوکوس اورئوس	۵ (۲۱/ ۷۳٪)
استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس	۳(۱۳/۰۴٪)
استرپتوکوکوس بتا همولایتیک	۲(۸/۷٪)

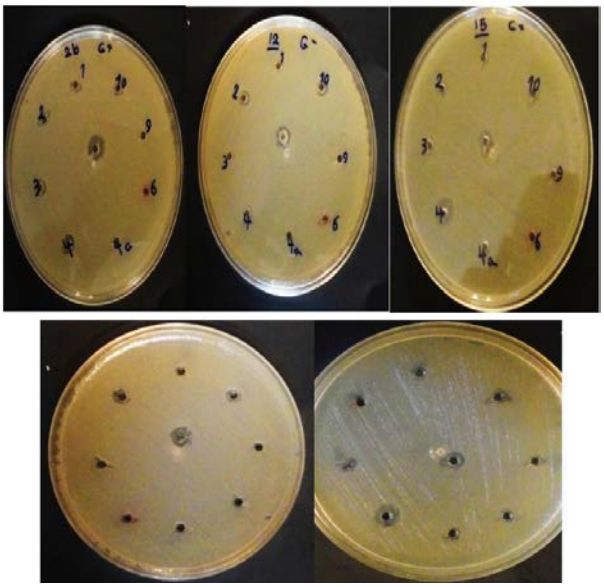


شکل ۶. تعیین الگوی آنتی بیوتیکی برخی جدایه ها

بر اساس آزمون فریدمن انجام‌شده، تفاوت معنی‌داری بین آنتی‌بیوتیک‌های به کار گرفته جهت باکتری‌های گرم مثبت که از زخم پای بیماران دیابتیک جداسازی شدند مشاهده نشد؛ بنابراین اثربخشی تمامی آنتی‌بیوتیک‌های موردنظر جهت مقابله با باکتری‌های گرم مثبت ازنظر آماری به یک میزان بود.



نمودار ۱. میانگین ۱۲ آنتی‌بیوتیک روی باکتری‌های گرم منفی به همراه فاصله اطمینان آن‌ها



شکل ۷. ارزیابی اثر پیگمانها بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) جداشده از عفونت زخم پای دیابتیک

بررسی خواص ضدمیکروبی پیگمان‌ها بر باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک

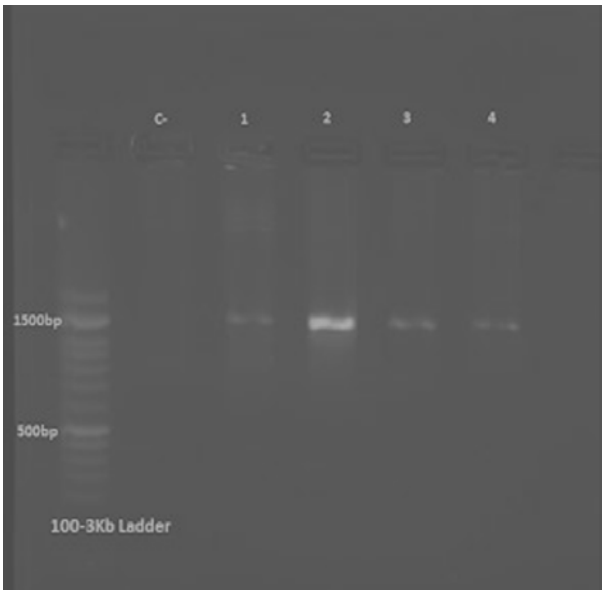
از میان ۸ رنگدانه استخراج‌شده توسط حلال، ۴ رنگدانه دارای خاصیت بسیار جزئی ضد باکتریایی بر روی چهار باکتری پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از زخم پا، شامل جنس‌های اشرشیاکلی، استاف اورئوس، اسینتوباکتر و استرپتوکوکوس، بودند. شکل ۷ هاله عدم رشد جدایه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) در حضور پیگمان‌ها با خاصیت بسیار جزئی آنتی باکتریال رانشان می‌دهد. جدول ۷ نتیجه سه تکرار فعالیت آنتی‌بیوتیکی رنگدانه‌ها را نشان می‌دهد.

جدول۷. نتیجه ارزیابی رنگدانه‌ها بر ۴ پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک

نام و شماره باکتری پاتوژن	منطقه هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر			
	متانول (کنترل منفی)	شماره پیگمان+ متانول		
		1N	2N	4N	10N
اشرشیاکلی (NA5)	۴mm	-	۵/۹۶±۰/۰۴	-	-
استاف اورئوس (NA15)	۷ mm	۷/۰۶±۰/۰۹	۷±۰/۰۸	۸±۰/۰۸	-
اسینتوباکتر (NA12)	۸ mm	۸/۱±۰/۲۳	۹/۱±۰/۲۳	۸/۰۳±۰/۰۹	۸/۸±۰/۱۲
استرپتوکوکوس (2B)	۷ mm	-	۷/۲±۰/۲۱	-	-

جدول۸. نتایج شناسایی باکتری‌های تولیدکننده پیگمان در سطح جنس و گونه

کد نمونه	درصد همولوژی	شناسایی مولکولی نهایی
1N	۹۹	*Brevundimonas sp. NeomS2D2*
2N	۹۹	*Brachybacterium nesterenkovii strain DSM 9573*
4N	۹۹	*Brachybacterium sp. IARI-ABL-35*
10N	۹۸	Kocuria sp. YIM 75764



شکل۸. محصول PCR ژل اگاروز، از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ جفت باز(کنترل مثبت)، کنترل منفی، جدایه‌های تولیدکننده رنگدانه با کد10N و1N,2N,4N به ترتیب در چاهک‌های شماره ۱،۲، ۳ و ۴ با تشکیل باندهای با وزن ۱۵۰۶ جفت باز

شناسایی مولکولی ایزوله‌های تولیدکننده رنگدانه

۴ نمونه باکتری‌های جداشده از محیط، حاوی رنگدانه با کدهای 2N،1N، 4N و 10N که بیشترین هاله عدم رشد را روی محیط کشت مولر هینتون آگار از خود نشان دادند، جهت تشخیص مولکولی انتخاب شدند و پس از دریافت نتایج توالی ژنی، گراف‌های هر نمونه جهت شناسایی مولکولی توسط نرم‌افزار Chromas (version 2.33) مشاهده و بررسی شدند. سپس سکانس‌های حاصل از تعیین توالی جهت هم‌تراز سازی و تعیین جنس و گونه با استفاده از نرم‌افزار Blast با توالی‌های موجود در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (WWW.macrogen.com) مقایسه شدند (جدول ۸). نتایج موقعیت باندهای مربوط به جنس و گونه‌هایی که بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند، توسط عکس‌برداری UV ترانس لومیناتور در شکل ۸ آمده است.

بحث

دیابت یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های متابولیک در جهان است که به علت نقص در ترشح انسولین یا نقص در عملکرد آن یا هر دو به وجود می‌آید و باعث هایپرگلیسمی یا قند خون بالا در بیمار می‌شودکه متاسفانه امروزه به دلیل تغییر شیوه زندگی، کم‌تحرکی و رژیم غذایی نامناسب رو به افزایش است (۲۰).

ازآنجاکه باکتری‌های دخیل در عفونت زخم دیابتیک در بیماران بسته به شرایط گوناگون متفاوت است و الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌ها جهت درمان صحیح، حائز اهمیت است. محققان از نقاط مختلف دنیا آمارهای بسیاری از جداسازی میکروارگانیسم‌های دخیل در زخم پای دیابتیک گزارش کرده‌اند؛ بنابراین برای اینکه بتوان عفونت زخم پای دیابتی را درمان کرد، باید نوع عفونت و عوامل درگیر کننده زخم را شناخت تا بتوان داروی موثر بر درمان را به موقع تجویز کرد (۶). مطابق تحقیقی دیگر بر روی ۵۰ بیمار دیابتی با عفونت زخم پا، بیشترین باکتری جداسازی شده از زخم، شامل بی‌هوازی‌ها (۲۲٪) و باکتری‌های هوازی (۶٪) بودند که

اشرشیاکلی بیشترین پاتوژن دخیل در عفونت محسوب می‌شد و کلستریدیوم شایع‌ترین باکتری بی‌هوازی درگیر در زخم گزارش شد. همچنین مترونیدازول به‌عنوان بهترین داروی انتخابی جهت درمان برای مقابله با بی‌هوازی ها گزارش شد. همچنین مشاهده شد که باکتری‌های بی‌هوازی موجود در زخم اکثراً به پنی‌سیلین (۷۰٪) و نیز به مترونیدازول (۴۰٪) و به کلیندامایسین (۳۰٪) مقاومت نشان دادند. از طرف دیگر بهترین آنتی‌بیوتیک جهت درمان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، ایمی پنم و لینه زولید و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت ترکیبی (پیپراسیلین+ تازوباکتام) و (سفوپرازون + سولباکتام) که هیچ‌گونه مقاومتی در آن‌ها دیده نشد، جهت درمان مناسب گزارش شد (۸). به دنبال آن در سال ۲۰۱۶ در کشور پرتغال بر روی جداسازی و شناسایی و بررسی و تعیین الگوی آنتی‌بیوتیکی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی از عفونت زخم پای بیماران دیابتی انجام پذیرفت و مشخص شد که بیشترین جدایه‌های گرم مثبت دخیل در عفونت زخم، مشابه تحقیق حاضر که در ۱۰ بیمار بررسی گردید، استافیلوکوکوس اورئوس بود (۲۲٪). محققان انتروکوکوس فیکالیس را برخلاف تحقیق حاضر از زخم جداسازی کردند. از باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا و پروتئوس به ترتیب بیشترین ایزوله به شمار می‌رفت. با توجه به حساسیت ضد میکروبی در سویه استاف اورئوس، بیتشرین مقاومت را به آنتی بیوتیکهای لووفلوکساسین و اگزاسیلین به ترتیب با ۳۹ ٪ و ۳۵/۲٪ گزارش نمودند و این در حالیست که در شرایط آزمایشگاهی هیچ مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپریم، سولفامتوکسازول وانکومایسین و لینزولید دیده نشد. (۲۱). در تحقیق حاضر، باکتری‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس، استرپتوکوکوس و باکتری‌های گرم منفی چون اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، پروتئوس ولگاریس، سودوموناس، کلبسیلا و اسنیتوباکتر از بیماران دیابتی دارای عفونت مزمن و حاد زخم پا جداسازی و ارزیابی شدند. همچنین مشخص شد که اشریشیا کلی با ۳۰/۷۶٪ به‌عنوان باکتری گرم منفی و استافیلوکوکوس آرئوس با ۲۱/۷۳٪ به‌عنوان باکتری گرم مثبت بیشترین سویه‌های جداسازی شده از زخم و پروتئوس ولگاریس کمترین باکتری جداسازی شده دخیل در عفونت زخم پای دیابتیک است که با توجه به اینکه اکثریت جدایه‌ها مربوط به اشرشیاکلی (گرم منفی) و استاف اورئوس (گرم مثبت) است این امر بیانگر عدم رعایت بهداشت مناسب و غالب بودن این باکتری‌ها در ایجاد عفونت در زخم پا است.

به‌طورکلی نشان داده شد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های دخیل در عفونت زخم دیابتیک به تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به جنتامایسین و آمیکاسین است و از ۲۳ جدایه گرم مثبت و گرم منفی، ۱۷ ایزوله (۷۴٪) مقاوم به بیشتر از سه آنتی‌بیوتیک بودند.

تحقیق دوو در سال ۲۰۱۴ مشخص کرد نوراسپیریمیدین که به عنوان متابولیت ثانویه حاصله از نوعی جلبک است، قادر به کاهش میزان قابل‌توجهی از خاصیت چسبندگی بیوفیلم ناشی از گونه‌های برجسته باکتریایی دخیل در عفونت زخم پای دیابتیک مانند سودوموناس، استاف اورئوس، انتروکوک و انتروباکتر است. وی نشان داد که استفاده از این ماده، اثر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین جهت درمان را افزایش می‌دهد (۲۲).

در اغلب مطالعات که به بررسی میکروارگانیسم دریایی پرداخته‌اند، نشان داده‌اند که رنگدانه‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه، کاربردهای بالینی مؤثری در بهبود بیماری‌ها دارند. این مطالعات همچنین بر این موضوع تأکید دارد که متابولیت‌های میکروبی دارای خواص آنتی‌بیوتیکی، ضد سرطانی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی نیز هستند. چنین فرضیه‌ای نیز وجود دارد که این ترکیبات در برابر دیگر پروکاریوت‌ها و حتی یوکاریوت‌ها نیز نقش دارند (۱۳، ۱۴) و افزایش بهره‌وری از رنگدانه‌ها با میزان کم، یکی از مسائل اصلی است که محققان به آن می‌پردازند و در حال حاضر، راه‌حل‌هایی جهت تولید رنگدانه بیشتر هم به لحاظ کیفی و هم ازلحاظ کمی مانند در نظر گرفتن شرایط دمایی و غذای باکتری‌ها گزارش‌شده است که در این تحقیق بهترین محیط کشت جهت تشویق باکتری-های تولید کننده پیگمان محیط کشت penanut seed agar و بهترین دما ۳۷درجه سانتی‌گراد است.

در سال ۲۰۰۶، Yoon و همکارانش از خاک قلیایی کشور کره باکتری *Brevundimonas terrae sp* را جداسازی و گزارش کردند این باکتری شباهت زیادی با سویه KSL-145T دارد (۲۳). در این تحقیق، باکتری *Brevundimonas sp. NeomS2D2* با کد مشخصه (1N)، گرم منفی میله‌ای شکل است که به میزان بسیار جزئی خاصیت آنتی باکتریایی پیگمان آن بر روی باکتری‌های استاف اورئوس(NA15) و اسنیتوباکتر (NA12) جداشده از زخم بیماران دیابتیک تائید شده است.

در سال ۲۰۱۵، Wang و همکارانش باکتری *Kocuria dechangensis sp* را از خاک‌های قلیایی و شور شهرستان چانگ واقع در شهر زادنگ چین جداسازی کردند (۲۴). در تحقیق حاضر، باکتری *Kocuria sp. YIM 75764* با کد

مشخصه (10N) از خاک جداسازی شد. این سویه از باکتری از لحاظ خاصیت آنتی باکتریایی بر روی باکتری اسنیتوباکتر (NA12) جداشده از زخم دیابتیک مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که به‌طور بسیار جزئی دارای خواص آنتی باکتریال است.

Singh و همکارانش در سال ۲۰۱۶، یک‌سویه جدید باکتریایی به نام *Brachybacterium* از خاک باغ جداسازی کرد که مشابهت با سویه جداسازی شده در این تحقیق دارد (۲۵). در این مطالعه، باکتری *Brachybacterium sp. IARI-ABL-35* با کد مشخصه (4N)، گرم مثبت و کوکسی با پیگمان زرد فسفری نیز از خاک جداسازی شد که پیگمان این باکتری بر روی باکتری‌های استاف اورئوس(NA15) و اسنیتوباکتر(NA12) جداشده از زخم خاصیت آنتی باکتریایی بسیار ضعیفی از خود نشان داد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسه درصدهای مختلف نتایج آنتی بیوگرام بدست آمده با آزمایش‌های مشابه باید توجه داشت که تفاوت منطقه‌ای در نقاط مختلف دنیا، پاسخ‌های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای درمانی ایجاد می‌کند و دلیل این تفاوت‌ها در مناطق مختلف دنیا را می‌توان تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌ها و تفاوت شیوه و شرایط زندگی بیماران و تفاوت در زمینه‌های دیگر در نظر گرفت که با توجه به این امر الگوهای درمانی مختلف و بر اساس ویژگی‌های خاص بیمار و هر منطقه مورد انتظار است. ازآنجایی‌که وجود باکتری‌های مقاوم به چند دارو یکی از مهم‌ترین عوامل شکست درمان است، این امر موجب می‌شود که کنترل عفونت زخم در بیماران مشکل و باعث افزایش آمپوتاسیون ناحیه درگیر شود؛ بنابراین تحقیقات در زمینه به دست آوردن ترکیبات و مواد جدید می تواند راهگشایی بر این مهم باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله ازجناب آقای دکتر غلامرضا پیشداد، جناب آقای دکتر حامد زارعی، سرکار خانم شیعتی و مسئولین غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی جناب آقای دکتر غلامحسین رنجبر *عمرانی* و درمانگاه شبانه روزی پردیس بخش دیابت که زمینه این مطالعه را فراهم ساختند، تشکر و قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Bakker K, Apelqvist J, Lipsky BA, Van Netten JJ; International Working Group on the Diabetic Foot. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. Diabetes Metab Res Rev 2016;1:2-6.

2. Federation ID. IDF diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation. 2013.

3. Lipsky BA, Peters EJ, Berendt AR, Senneville E, Bakker K, Embil JM, et al. Specific guidelines for the treatment of diabetic foot infections 2011. Diabetes Metab Res Rev 2012;1:234-5.

4. Gardner SE, Frantz RA. Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. Biol Res Nurs 2008;10:44-53.

5. Zanella MC, Kressmann B, Wuarin L, Coulin B, Maître S, Suva D, et al. Microbiology and antibiotic treatment of diabetic foot infection. Rev Med Suisse 2016;12:732-7.

6. Pednekar S, Pol SS, Kamble SS, Deshpande SK, Bharadwag r. Drug resistant anaerobic infections: are they complicating diabetic foot ulcer. Int J Healthc Biom Res 2015;3:142-8.

7. Rashid M, Fakruddin M, Mazumdar RM, Kaniz F, Chowdhury M. Anti-Bacterial Activity of Pigments Isolated From Pigment-Forming Soil Bacteria. Br J Pharm Res 2014;4:880-894.

8. Giri AV, Anandkumar N, Muthukumaran G, Pennathur G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil. BMC Microbiol 2004;4:11.

9. Ahmad WA, Ahmad WY, Zakaria ZA, Yusof NZ. Isolation of Pigment-Producing Bacteria and Characterization of the Extracted Pigments.Application of Bacterial Pigments as Colorant 2012;2:25-44.

10. Shatila F, Yusef H, Holail H. Pigment production by Exiguobacterium aurantiacum FH, a novel Lebanese strain. Int J Curr Microbiol App Sci 2013;2:176-91.

11. Goswami B, Bhowal J. Identification and characterization of extracellular red pigment producing bacteria isolated from soil. Int J Curr Microbiol App Sci 2014;3:169-76.

12. Ahmadi Fakhr F, Khanafari A. Marandi R. Determination of optimum conditions for the production of pigment Prodigiosin from dissected plants, Fourth National Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran. 2005;5:1-4.

13. Giri AV, Anandkumar N, Muthukumaran G, Pennathur G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil. BMC Microbiol 2004;4:11.

14. Shahitha S, Poornima K. Enhanced production of prodigiosin production in serratia marcescens. J Appl Pharm Sci 2012;02:138-40.

15. Nazemi A, Mehrabi M, Nasrollahi A. Isolation and molecular identification of pigment producing microorganisms and acute toxicity of pigments. Journal Of Microbial Biotechnology 2011;3:19-28.

16. Asgari A, Safari N, Zare D. Purification and Partial Identification of Carotenoid Pigment Haloarcula IRU1.sp A highly salty ark isolated from Lake Urmia. Journal Of Cellular And Molecular Research (Iranian Journal Of Biology) 2013;26:326-8.

17. Malik K, Tokas J, Anand RC. Characterization and Cytotoxicity Assay of Pigment Producing Microbes. Int J Curr Microbiol App Sci 2016;5:370-6.

18. Basserisalehi M, Bahador N. Diagnostic Bacteriology. Navy Publication. 2012.

19. Andrews JM, Howe RA; BSAC Working Party on Susceptibility .Testing BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). J Antimicrob Chemother 2011;66:2726-57.

20. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2016;1:13-22.

21. Oliveira P, Guelho D, Cardoso L, Vicente N, Martins D, Oliveira D, et al. Microbiological profile in diabetic foot infections: identification and susceptibility profile of bacteria isolated in 5 years in a Portuguese tertiary care hospital. Endocrine Abstracts 2016.

22. Do DC. The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections; UC Riverside Electronic Theses and Dissertations. Schiller, Neal L: University of California 2014;93-6.

23. Yoon JH, Kang SJ, Lee JS, Oh TK. Brevundimonas terrae sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. Int J Syst Evol Microbiol 2006;56:2915-9.

24. Wang K, Zhang L, Liu Y, Pan Y, Meng L, Xu T, et al. Kocuria dechangensis sp. nov., an actinobacterium isolated from saline and alkaline soils. Int J Syst Evol Microbiol 2015;65:3024-30.

25. Singh H, Du J, Yang JE, Yin CS, Kook M, Yi TH. Brachybacterium horti sp. nov., isolated from garden soil. Int J Syst Evol Microbiol 2016;66:189-95.