NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/51 , 2023

Scan online to view this article

In vitro evaluation of the inhibitory effect of prodigiosin pigment from Serratia marsecsenes on Trichomonas vaginalis

Elahe Mohammadi, Zohreh Momeni*, Leila Jabalameli

Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Aim and Background: Microbial pigments are a type of secondary metabolite that can play a good role due to their antimicrobial properties. Prodigiosin is an antimicrobial tri-pyrrole pigment that can be extracted from Serratia marcescens. Trichomonas vaginalis is a protozoan that enters the human reproductive system. Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted disease treated with metronidazole. Side effects and drug resistance are the two main problems of this drug that make doctors look for new treatments. The aim of this study was to extract prodigiosin pigment from Serratia marcesens to evaluate the antiparasitic properties of this pigment against Trichomonas vaginalis in vitro.

Materials and Methods: Serratia marcescens strain RTCC 2281 was purchased from Razi Institute and mass cultivated .prodigiosin was extracted using Ethyl acetate and acetone tools and the relativity of the pigment was confirmed by TLC chromatography, UV-Vis spectrophotometry, FTIR, and its effect on Trichomonas vaginalis and PC12 cell line was examined in different concentrations.

Results: Prodigiosin pigment at 10000 µg/ml in 24 hours and 5000 µg/ml and 2500 in 48 hours caused 100%, 92.89%, and 84.26% growthinhibition of the parasite. Its IC_{50} in 48 hours was112.8 µg/ml and the CC_{50} of this pigment on thePC12 cell line reached 842.4 µg/ml.

Conclusion This pigment was tested on Trichomonas vaginalis and its toxicity on the cell line was 7.46 times (SI = 7.46), so it can be concluded that prodigiosin pigment had an antiparasitic effect more comprehensive study of prodigiosin composition in vitro and in vivo is suggested.

Keywords: Prodigiosin pigment, Serratia marcescens, Trichomonas vaginalis, Cell line, IC_{50}, lau Science

Corresponding author:
Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Email: zohreh.momeni@kiau.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره۵۱ - تابستان ۱۴۰۲
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارزیابی اثر مهاری رنگدانه پرودیجیوسین حاصل از باکتری سراشیا مارسسنس بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس در شرایط برون تنی

الهه محمدی، زهره مومنی*، لیلا جبل‌عاملی
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: رنگدانه‌ی باکتریایی نوعی متابولیت ثانویه است که با داشتن خاصیت ضد میکروبی می‌تواند به عنوان داروواستفاده شود. پرودیجیوسین یک رنگدانه تری پیرول است که از باکتری سراشیا مارسسنس قابل استخراج است. تریکوموناس واژینالیس، انگل تک سلولی است که با ورود به دستگاه تناسلی انسان سبب تریکومونیازیس می‌شود. تریکومونیازیس شایع‌ترین بیماری مقاربتی غیر ویروسی است که با مترونیدازول درمان می‌شود. عوارض جانبی و مقاومت دارویی دو معضل اصلی این داروست که محققان دنبال راهی برای حل آن هستند. هدف ما استخراج رنگدانه پرودیجیوسین وارزیابی خواص ضد انگلی تریکوموناس در شرایط برون تنی است.

مواد و روش‌ها: سویه سراشیا مارسسنس RTCC 2281 از موسسه رازی خریداری و کشت انبوه شد. رنگدانه پرودیجیوسین را به کمک استات اتیل و استون استخراج نموده و خلوص نسبی رنگدانه با کروماتوگرافی لایه نازک، اسپکتروفتومتری UV-Vis و FTIR تایید شدو تاثیر آن را در غلظت‌های مختلف روی انگل تریکوموناس واژینالیس و رده سولی PC_{12} بررسی شد.

یافته‌ها: رنگدانه پرودیجیوسین در غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتردر ۲۴ ساعت وغلظت‌های ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و۲۵۰۰ در ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۲/۸۹٪ و۸۴/۲۶٪ باعث مهار رشد انگل شدند. میزان IC50 آن در۴۸ ساعت ۱۱۲/۸ میکروگرم برمیلی‌لیتر نیز بوده و CC50 این رنگدانه برروی رده سلولی PC12، ۸۴۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتربه‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: این رنگدانه برروی انگل تریکوموناس واژینالیس موثر بوده و سمیت آن بر روی رده سلولی با غلظت ۷/۴۶ برابر بوده است (SI =۷/۴۶) لذا مطالعات جامع‌تری برای بررسی ترکیب پرودیجیوسین در شرایط برون تنی و درون تنی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: رنگدانه ی پرودیجیوسین، سراشیا مارسسنس، تریکوموناس واژینالیس، رده سلولی، IC50، lau Science

مقدمه

تریکوموناس واژینالیس (Trichomonas vaginalis) عامل بیماری تریکومونیازیس ، یک بیماری شایع مقاربتی است که باعث افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های مقاربتی مانند HIV و HPV است. این تک یاخته به‌طورشگفت‌انگیزی می‌تواند با ارگانیسم‌های دیگر روابط همزیستی و مسالمت آمیز داشته باشد. تریکوموناس واژینالیس، واژن زنان را تحت کنترل خود قرار داده و به نوعی باعث ایجاد تغییر در میکروبیوتای واژن شده و سبب دیس بیوزیس می‌گردد. در زنان سالم، میکروبیوتای واژن با وجود تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی که در یک محیط مناسب تحت کنترل باکتری‌های جنس لاکنوباسیلوس (lactobacillus) زندگی

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
پست الکترونیکی: zohreh.momeni@kiau.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

می‌کنند، مشخص می‌شود. شایع‌ترین عدم تعادل میکروبی واژن واژینوز باکتریایی است، یک بیماری چند میکروبی که با چندین پیامد نامطلوب باروری همراه است(۱،۲). تک‌یاخته تریکوموناس باعث افزایش خطر زایمان زودرس و تولد نوزادن کم وزن می‌شود و نیز سبب افزایش ریسک سرطان دهانه رحم در زنان و سرطان پروستات در مردان می‌گردد (۳). درمان اصلی و استاندارد جهانی برای تریکوموناس واژینالیس مترونیدازول یا تینیدازول است(۴). این آنتی‌بیوتیک‌ها از خانواده ۵-نیترومیدازول بوده که باعث اختلال در سیستم هیدروژنوزوم و کاهش سیستم اکسایش انگل می‌شود. دارو به شبکه ردوکس با واسطه تیوردوکسین متصل شده و از تیوردوکسین ردوکتاز جلوگیری می‌کند (۵). رنگ‌ها مهم ترین پارامتری هستند که در ارتباط با هر ماده‌ای، توجه مصرف کننده را به خود جلب می‌کنند. این رنگدانه‌ها به‌صورت طبیعی و مصنوعی تولید شده که رنگدانه‌های طبیعی را می‌توان ارزان‌تر، سریعتر و بیشتر تولید نمود. بسیاری از رنگ‌های مصنوعی به دلیل داشتن اثرات حساسیت‌زایی، سرطان‌زایی و سمی بودن حتی به مرحله ممنوع شدن هم رسیده اند. اثرات نامطلوب رنگدانه‌های مصنوعی، محققان را به سمت کشف و تولید رنگدانه‌های طبیعی سوق داده است. بسیاری از رنگدانه‌های میکروبی نه تنها به عنوان عوامل رنگی در صنایع مختلف مواد غذایی و آرایشی کاربرد دارند، بلکه دارای فعالیت‌های ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی نیز بوده و در صنایعی مانند نساجی، پلاستیک، رنگ، کاغذ و چاپ استفاده شده‌اند(۶). سراشیا مارسسنس (Serratia marcescens) جز باکتری‌های ساپروفیت و غیر بیماری‌زا دسته بندی می گردد که به دلیل داشتن رنگدانه‌ی قرمز به خوبی قابل شناسایی هستند(۷) پرودیجیوسین، یک رنگدانه قرمز خطی طبیعی است که توسط سراشیا مارسسنس به عنوان متابولیت ثانویه تولید می‌شود . این رنگدانه دارای فرمول شیمیایی $C_{20}H_{25}N_3O$ بوده که از نظر ساختاری یک رنگدانه قرمز سه خطی است. این رنگدانه به عنوان متابولیت ثانویه باکتری در غشای سلولی و گرانول‌های داخل سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تجمع می‌یابد(۸). رنگدانه‌های پرودیجیوزینین جز متابولیت‌های ثانویه هستند که باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت قادر به تولید آن می‌باشند امروزه این رنگدانه به دلیل سرکوب فعالیت شدید سیستم ایمنی و خاصیت دارویی و ضد سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است ، دو مورد از انواع این رنگدانه به خوبی شناخته شده عبارتنداز، پرودیجیوسین و آن دسیل پرودیجیوسین. ساختار این رنگدانه در سراشیا و استرپتومایسس (streptomyces) به خوبی شناخته شده است ولی هنوز اطلاعات دقیقی از عملکرد این رنگدانه و نحوه ایجاد آن مشخص نیست تولید این رنگدانه در باکتری سراشیا قدمت بالایی دارد و در گذشته از آن برای جنگ‌های بیولوژیکی استفاده می‌شده‌است(۹). با توجه به اهمیت موارد فوق، هدف از این مطالعه جداسازی رنگدانه‌ی پرودیجیوسین از باکتری سراشیا مارسسنس و تاثیر آن بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش مداخله‌ای_تجربی به شرح زیر انجام شده است:

الف – بخش جداسازی رنگدانه از باکتری

نمونه استاندارد سراشیا از مرکز سرم سازی رازی RTCC (Razi type culture collection) با کد ۲۲۸۱ خریداری شد. باکتری در محیط نوترینت آگار به مدت۲۴ و۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه ی سلسیوس انکوبه گردید. به جهت اطمینان از باکتری تست‌های بیوشیمیایی انجام و نتایج را با رفرنس‌های معتبر مقایسه و مطمئن گردید. سپس جهت تولید انبوه رنگدانه، باکتری‌ها را به محیط کشت نوترینت براث منتقل و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شد. محیط‌های کشت مایع، با دور۱۴۳۴ RCFبه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس مایع رویی محیط کشت دور ریخته شد. رنگدانه و سلول باکتری در ته فالکون قرار گرفتند که در مرحله به مرحله با اضافه کردن استون، اتیل استات و سانتریفوژ، مایع رویی حاوی رنگدانه به دست آمد. برای اطمینان از تولید رنگدانه ، مقداری از آن در دو لوله ریخته و محتوای لوله اول را با یک قطره HCl و محتوای لوله‌ی دوم را با یک قطره آمونیاک مورد بررسی قرار داده شد که در حالت اسیدی_قرمز یا صورتی و در حالت قلیایی_زرد یا برنز می‌شود. سپس نوترینت براث حاوی ارگانیسم، با دور ۱۴۳۴ RCF مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید.

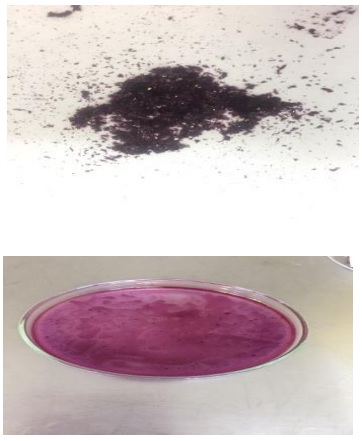
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]



شکل۲:فالکون حاوی محیط کشت و باکتری سراشیا که تولید رنگدانه کرده است

مایع رویی و رسوب سلولی با استون و استات اتیل استخراج گردید برای انجام این امر به نسبت برابر ابتدا اتیل استات به رسوب افزوده و با دور RCF ۱۴۳۴ مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. دوباره استون را اضافه کرده و با دور RCF ۱۴۳۴ مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رنگدانه موجود در رسوب سلولی به مخلوط اتیل و استون اضافه شد و یک رسوب سفید رنگ در انتهای فالکون باقی ماند. رسوب را چند بار سانتریفوژ کردیم تا رسوب سفید ظاهر شد عصاره‌های رنگی استات اتیل و استون را از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر عبورداده سپس در ظروف تبخیر در دمای اتاق قرار داده تا تبخیر شده و پودر ظاهر گردید بعد از گذشت دو روز اتیل و استون به دلیل فرار بودن از بین رفته و رنگدانه به ظرف چسبید(۱۰،۱۱).



شکل۳:تصویر سمت راست رنگدانه‌ی جداشده درون پلیت ریخته شده تا خشک گردد،تصویر وسط پودر رنگدانه‌ی خشک شده، تصویر سمت چپ جمع آوری رنگدانه درون میکروتیوپ و نگهداری در ۲۰- درجه سلسیوس

جهت اطمینان ، الگوی جذب رنگدانه پرودیجیوسین با طول موج‌های مختلف بررسی شد. رنگدانه پرودیجیوسین در طول موج ۵۳۵ نانومتر بیشترین جذب را داشت. با استفاده از کروماتوگرافی لایه ی نازک، خالص بودن رنگدانه تایید گردید. رنگدانه‌ی پرودیجیوسین با استفاده از صفحات TLC پوشش داده شده با ژل سیلیکا جدا شد (.در این مرحله در دستگاه فاز ثابت ژل سیلیکا G میباشد و فاز متحرک ما کلروفرم، دی‌کلرومتان و استون است). در مخزن کروماتوگرافی، حلال‌های کلروفرم ، دی کلرو متان و استون با نسبت های ۴:۲:۴ v/v استاندارد گردید و ریخته شد. مقدارRf کروماتوگرام در صفحات TLC مشاهده و با Rf استاندارد پرودیجیوسین تطبیق داده شد(۱۰،۱۱). برای بررسی دقیق‌تر رنگدانه، در نهایت پودر رنگدانه را به وسیله FTIR مورد بررسی قرار گرفت.

ب – بخش کشت انگلتریکوموناس واژینالیس

سوش تریکوموناس واژینالیس تایپ H ژن اکتین با کد ثبت KP400513 از بانک انگلی دانشگاه آزاد واحد کرج تهیه شد. کرایو ویال‌های حاوی سوش انگل تریکوموناس واژینالیس را از فریزر ۷۰- درجه سلسیوس بیرون آورده و با سرعت به کمک سمپلر محیط TYM کامل انتقال داده شد. طی پنج مرحله پاساژ یک روز در میان، تعداد انگل، به انبوه چندین میلیونی رسید. محیط TYM کامل، حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله استریل به همراه آنتی بیوتیک‌هایی شامل آمفوتریسینB (۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر)، سفتریاکسون (۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سیپروفلوکساسین(۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) می باشد (۱۲). برای شمارش تعداد انگل از لام نئوبار استفاده شد به اینصورت که از محیط کشت حاوی انگل در انتهای لوله ۵۰ لاندا انگل برداشته داخل میکروتیوپ ریخته شد و ۵۰ لاندا رنگ تریپان بلو به آن اضافه کردیم به خوبی مخلوط شد و سپس بر روی لام ریخته و زیر میکروسکوپ تعداد انگل را شمارش گردید برای بدست آمدن تعداد انگل:

تعداد انگل در یک خانه ۱۶ تایی موجود در لام نئوبار × ۲ ×۱۰۰۰۰=تعداد انگل در میلی‌لیتر

$$cell/ml = \frac{Average\ of\ cells}{mm^{2}} \times 2 \times 10000$$

جهت انجام آزمایش از پلیت‌های استریل ۲۴ خانه‌ای استفاده گردید. برای دقت بیشتر، هر کدام از رقت‌های رنگدانه تهیه شده در ۲ چاهک انجام وآزمایش۳ بار تکرارشد. مطابق روش

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

کار در چاهک‌های مورد استفاده در پلیت ۲۴ خانه ۲۰۰ میکرولیتر ، TYM ریخته شد. سپس لوله ی حاوی انگل که تعداد انگل‌ها را به کمک لام نئوبار شمارش و به ۶۰۰۰۰۰ عدد در میلی‌لیتر تنظیم نموده و کاملا تکان داده تا یکنواخت شود و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به همه چاهک‌ها اضافه شد. پودر رنگدانه را به کمک آب مقطر استریل حل و به غلظت معینی تنظیم و از فیلتر استریل گذرانده و به کمک PBS رقت‌های مختلف رنگدانه که شامل ۱۰۰۰۰ ،۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵،۳۱۲،۱۵۶ و ۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه وبه میزان ۳۰۰میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید (سریال رقت با چند بار آزمایش به دست آمد به گونه ای که سری رقتی مناسب است که در بعضی غلظت‌ها کلا انگل از بین برود و بعضی رقت ها انگل زنده بماند) . جهت کنترل منفی، به چاهک به جای رنگدانه و داروی مترونیدازول با غلظت‌های ۱۲/۵ ، ۶/۲۵ ، ۳/۱۲، ۱/۵۶ ، ۰/۷۸، ۰/۳۹ و۰/۱۹۵تهیه شد و به PBS اضافه شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار و درفواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تحرک و زنده بودن انگل‌ها با رنگ تریپان بلو (انگل‌های مرده رنگ راجذب کرده و آبی شدند در حالی که انگل‌های زنده بی‌رنگ باقی ماندند) بررسی گردید. نتایج شمارش انگل به صورت درصد بازدارندگی رشد GI% با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. در این فرمول a تعداد انگل زنده در میکروتیوپ شاهد منفی و b تعداد انگل زنده در میکروتیوپ حاوی رنگدانه است. همچنین فرایند آماری به کمک نرم افزار Graphpad prism9 مقدار IC_{50} محاسبه گردید.

$$GI\% = \frac{a-b}{a} \times 10$$

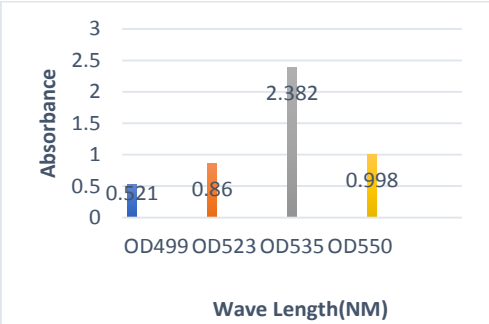
ج – بخش بررسی میزان سمیت رنگدانه با استفاده از آزمون MTT

برای انجام این تست از کیت MTT، کشت رده سلولی موجود (PC12) در محیط کشت DMEM ودر پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلول استفاده شد. مطابق دستورالعمل کیت، کشت انجام و با کمک الایزا ریدر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر درصد حیات رده سلولی درغلظت‌های مختلف رنگدانه پرودیجیوسین بدست آمد. براساس فرمول AB جذب نوری چاهک بلانک، AC جذب نوری چاهک کنترل و AT جذب نوری سلول تیمار شده با رنگدانه است. در نهایت محاسبات با نرم افزارGraphpad prism9 انجام گرفت.

درصد حیات = [AT-AB].[AC-AB]×100

یافته‌ها

نتایج حاصل از تست بیوشیمیایی باکتری سراشیا، با اطمینان نوع باکتری را تایید نمود. نتایج حاصل از خوانش طول موج و غلظت رنگدانه در ۵۳۵ نانومتر با دستگاه UV-Vis باتوجه به مشاهدات در مقالات متعدد و خوانش رنگدانه در غلظت‌های متفاوت در طول موج ۲۰۰ تا ۶۰۰ ، مقدار جذب در ۵۳۵ برابر با ۲/۳۸۲ می‌باشد لازم به ذکر است خوانش این غلظت با حلال اتیل استات و استون انجام گردید(۱۳).



نمودار۱:بررسی تولید رنگدانه در غلظت‌های مختلف در حلال اتیل استات و استون

نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک TLC رنگدانه‌ی پرودیجیوسین نشان از خلوص رنگدانه داشت دلیل انجام TLC در این مرحله اطمینان از خالص بودن رنگدانه است . وجود یک لکه رنگ و بالا رفتن آن نشان از خالص بودن پرودیجیوسین دارد. برای بدست اوردن Rf طبق فرمول زیر عمل گردید که مقدار Rf بدست آمده ۰/۷۷ می‌باشد

$$Rf = \frac{Zx}{Zf-Z0}.$$

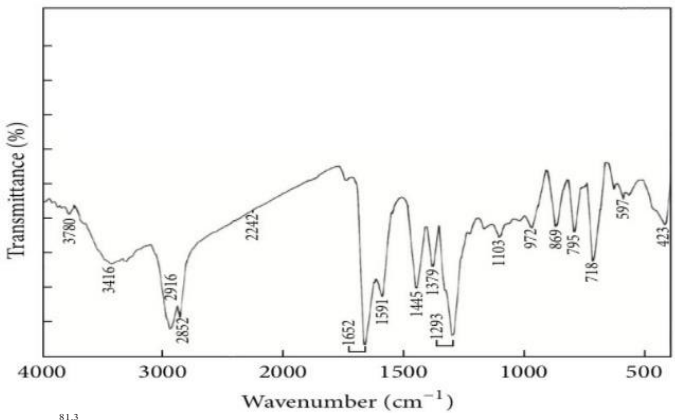
روش FTIR به جهت شناسایی گروه های عاملی در رنگدانه‌ی پرودیجیوسین برای شناسایی پیوندها انجام گرفت در این روش از نور مادون قرمز با تاباندن به ماده سبب ارتعاش در اتم و مولکول ها شده و باعث شناسایی پیوندها و ذرات ماده شد. در نمودار زیر پوشش وسیعی از یک طیف در محدوده‌ی ۳۳۰۰ تا ۳۶۰۰ با مرکز ۳۴۱۶/۹۴ وجود داشت، این محدوده به پیوندهای -N-H نسبت داده شد. قله‌ی موجود در ۲۸۵۴ دلالت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

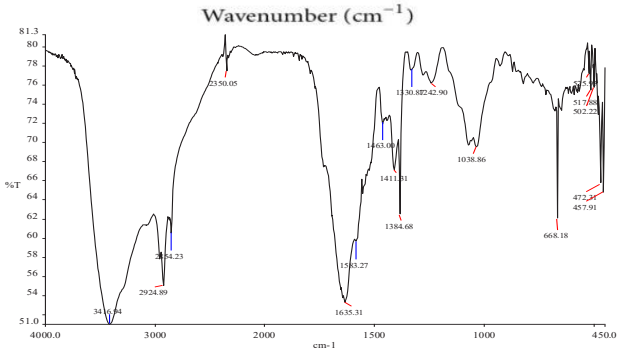
برکشش نامتقارن در گروه های متیلن دارد. مرکز ۱۶۳۵ و ۱۴۶۳ به گروه های NH- و گروه متیل موجود در پرودیجیوسین اشاره دارد. اوج قله‌ی موجود در ۱۳۳۰ نشان دهنده ی پیوند C-O می‌باشد و قله‌ی ۱۳۸۴ پیوند دوگانه ی کربن -کربن را نشان می‌دهد.

نمودار۲و۳: نمودار حاصل از FTIR رنگدانه‌ی رودیجیوسین

الف



ب



الف) نتیجه مقاله رفرنس (۱۴)

ب) نتایج حاصل از FTIR

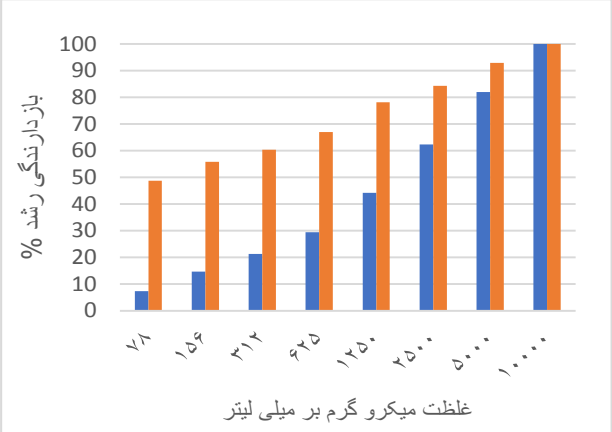
به منظور ارزیابی میزان تأثیر رنگدانه‌ی پرودیجیوسین بر روی تریکوموناس واژینالیس و همچنین مقایسه تاثیر آن‌ها با مترونیدازول در غلظت‌های متوالی تهیه و در مجموع ۶ سری آزمایش انجام گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش ها نشان داد که رنگدانه‌ی پرودیجیوسین دارای خاصیت ضد تریکومونایی بوده و بر رشد و حیات انگل تاثیر می گذارند. البته این تاثیر درمقایسه با مترونیدازول بسیار کمتر بود (جدول۱)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

جدول۱: شمارش انگل تریکوموناس واژینالیس در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف رنگدانه پرودیجیوسین(Mean ±SD)

	غلظت رنگدانه‌ی پرودیجیوسین میکروگرم بر میلی لیتر	تعداد انگل تریکوموناس واژینالیس×۱۰۴	
		شمارش انگل در ۲۴ ساعت (Mean ±SD)	شمارش انگل در ۴۸ ساعت (Mean ±SD)
	کنترل	۲/۰۸ ± ۴۰/۶۶	۶۵/۶۶ ± ۳/۰۵
۱	۷۸	۱/۱۵ ± ۳۷/۶۶	۳۳/۶۶ ± ۱/۵۲
۲	۱۵۶	۱/۵۲ ± ۳۴/۶۶	۲۹±۱
۳	۳۱۲	۳۲±۱	۲۶±۱
۴	۶۲۵	۱/۵۲ ± ۲۸/۶۶	۲۱/۶۶ ± ۱/۵۲
۵	۱۲۵۰	۲/۵۱ ± ۲۲/۶۶	۱۴/۳۳ ± ۱/۱۵
۶	۲۵۰۰	۲/۰۸ ± ۱۵/۳۳	۱۰/۳۳ ± ۱/۵۲
۷	۵۰۰۰	۷/۳۳ ± ۰/۵۷	۴/۶۶ ± ۰/۵۷
۸	۱۰۰۰۰	۰	۰



نمودار۴: بررسی درصد بازدارندگی رشدرنگدانه پرودیجیوسین برانگل تریکوموناس

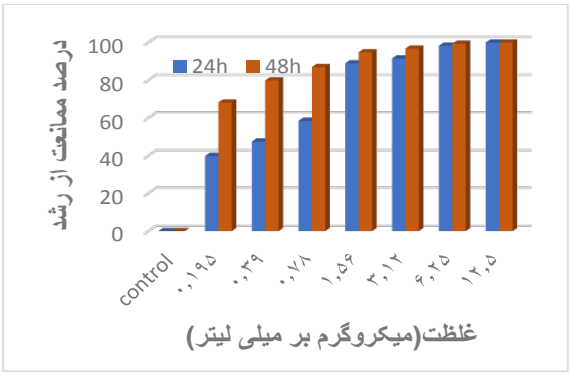
نتایج حاصل از بررسی IC_{50} تاثیر رنگدانه‌ی پرودیجیوسین بر انگل تریکوموناس واژینالیس با نرم افزار GraphPad prism 9 انجام گرفت. مقدار IC_{50} برای هردو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۱۳۲۱ و ۱۱۲/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج حاصل از بررسی اختلاف معنی دار بودن تاثیر رنگدانه پرودیجیوسین بر انگل تریکوموناس واژینالیس باآزمون Two-way ANOVA، نشان دهنده این است که افزایش درصد ممانعت از رشد انگل‌ها در تمامی غلظت‌ها و هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده است (P value <0.0001). با نمونه گیری از چاهک‌ها، تعداد انگل تریکوموناس واژینالیس که با غلظت‌های مختلف داروی مترونیدازول تیمار شده بودند، شمارش شد. محاسبه درصد بازدارندگی رشد در برابر دارو نشان‌داد که هرچه غلظت دارو بیشتر باشد، میزان بازدارندگی رشد نیز بیشتر می‌گردد، به‌طوری که در غلظت ۲۵ و۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان بازدارندگی ۱۰۰ ٪ است و در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتردر ۲۴ ساعت ۹۸/۳۰ ٪ و در ۴۸ ساعت ۹۹/۳۵ ٪ است لذا میزان بازدارندگی با افزایش غلظت دارو رابطه مستقیم دارد. آنالیز داده‌ها نشان‌داد که افزایش درصد ممانعت از رشد انگل‌ها در تمامی غلظت‌ها و در دو زمان ۲۴ و۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنی داری داشت (P<0.0001).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

جدول۲:شمارش تعداد انگل تریکوموناس واژینالیس در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف تحت تیمار با مترونیدازول(Mean± SD)

	غلظت داروی مترونیدازول میکروگرم بر میلی لیتر	تعداد انگل واژینالیس×۱۰۴ شمارش انگل در ۲۴ ساعت (Mean ±SD)	تریکوموناس شمارش انگل در ۴۸ ساعت (Mean ±SD)
	کنترل	۳۳/۳۹ ± ۳/۷۸	۵۱/۳۳ ± ۳/۲۱
۱	۰/۱۹۵	۲۳/۶۶ ± ۱/۵۲	۱۶/۳۳ ± ۲/۰۸
۲	۰/۳۹	۲۰/۶۶ ± ۱/۱۵	۱۰/۳۳ ± ۱/۵۲
۳	۰/۷۸	۱۶/۳۳ ± ۲/۰۸	۶/۶۶ ± ۱/۵۲
۴	۱/۵۶	۴/۳۳ ± ۰/۵۷	۲/۶۶ ± ۰/۵۷
۵	۳/۱۲	۳/۳۳ ± ۰/۵۷	۱/۶۶ ± ۰/۵۷
۶	۶/۲۵	۰/۶۶ ± ۰/۵۷	۰/۳۳ ± ۰/۵۷
۷	۱۲/۵	۰	۰



نمودار۵:درصد ممانعت از رشد انگل تریکوموناس واژینالیس تحت تیمار با داروی مترونیدازول

به منظور بررسی IC_{50} داروی مترونیدازول بر انگل تریکوموناس واژینالیس،:به کمک نرم افزار GraphPad prism9 مقدار IC_{50} برای هردوزمان ۲۴ و ۴۸ ساعت محاسبه شد. مقدار IC_{50} در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر ۰/۳۷ و ۰/۰۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. آنالیز داده ها با استفاده از آزمون Two-way ANOVA، نشان دهنده این بود که افزایش درصد ممانعت از رشد انگل‌ها در تمامی غلظت‌ها ودر هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بوده است (P value <0.0001). برای بررسی میزان سمیت رنگدانه‌ی پرودیجیوسین و داروی مترونیدازول از رده سلولی PC12 و آزمون MTT استفاده شد . درصد زنده مانی و حیات در غلظت‌های مختلف از دارو و رنگدانه مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تاثیر سمیت رنگدانه‌ی پرودیجیوسین از غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۵۰۰۰ ،۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵ ، ۷۸/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتراستفاده شد. برای بررسی تاثیر سمیت داروی مترونیدازول از غلظت‌های ۲۰۰ ، ۱۰۰ ، ۵۰ ، ۲۵ ، ۱۲/۵، ۶/۲۵ ، ۳/۱۲۵ ، ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. ۴۸ ساعت بعد از کشت سلول داخل میکروپلیت ۹۶ خانه ای، سلول‌ها را تحت تیمار با داروها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گذاشته سپس ماده MTT را اضافه نموده، روی آن فویل کشیده تا تاریک باشد و ۴ ساعت پلیت را انکوبه نمودیم. پس از اتمام زمان ، چاهک‌ها را تخلیه و DMSO ریخته و با الایزا ریدر در طول موج ۵۴۵ نانومتر خواندیم نتایج با نرم افزار Graphpad prism9 بدست آمد.

نتایج حاصل از CC_{50} برای رنگدانه‌ی پرودیجیوسین و مترونیدازول

بعد از خوانش پلیت حاوی سلول که تحت تیمار دارو و رنگدانه در غلظت‌های مشخص انجام گرفت مقایسه‌ی نتایج OD چاهک‌های حاوی رنگدانه و دارو با OD چاهک‌های کنترل با استفاده از نرم افزار Graphpad prism9 بدست امد و مقدار CC_{50} سلول را در مدت زمان ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار دادیم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

نتایج حاصل از SI

دارو زمانی قابل استفاده می‌باشد که در غلظت کشندگی عامل بیماری زا، برای میزبان سمیت نداشته باشد . مؤثر بودن هر ترکیب دارویی به ایندکس درمانی (SI) آن بستگی دارد که با تقسیم CC_{50} به IC_{50} هر دارو محاسبه می‌شود.

$SI=CC_{50}$ (Cell) /IC_{50} (Trichomons vaginalis)

جدول۳: نتایج ایندکس رنگدانه‌ی پرودیجیوسین و داروی مترونیدازول

ترکیب	IC_{50} ۴۸ساعت	CC_{50} ۴۸ ساعت	SI
پرودیجیوسین	۱۱۲/۸	۸۴۲/۴	۷/۴۶
مترونیدازول	۰/۰۸۸	۷۲/۵۳	۸۲۴/۲۰

بحث

در مطالعه حاضر، اثر ضد انگلی رنگدانه‌ی پرودیجیوسین استخراج شده از باکتری سراشیا مارسسنس بر روی تریکوموناس واژینالیس مورد ارزیابی قرار گرفت. تاثیر این رنگدانه بر روی انگل تریکوموناس برای اولین بار انجام‌گردید، لذا برای استفاده از این رنگدانه در فاز درمانی نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتر می‌باشد. باکتری سراشیا مانند اعضای دیگر خانواده انتروباکتریاسه بر روی اکثر محیط‌های غذایی رشد می‌کند و برای تولید رنگدانه پرودیجیوسین نیاز به دمای ۲۸ درجه ی سلسیوس و pH قلیایی دارد که در این شرایط رنگدانه‌ی بهتری تولید می‌کنند. در تحقیقات انجام شده توسط Srimathi و همکاران بیان شد که بهترین شرایط برای تولید رنگدانه، دمای ۲۸ درجه سلسیوس، مدت زمان ۴۸تا۷۲ ساعت و pH خنثی تا قلیایی است که نتایج این پژوهش با مقاله فوق همخوانی دارد.(۱۵). طبق تحقیقات انجام شده توسط Chee-Hoo Yip و همکاران در سال ۲۰۲۰ ، رنگدانه پرودیجیوسین بر روی میکروارگانیسم‌های متعددی موثر بوده اما بر روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa) گونه‌ی PA14 و سالمونلا تیفی موریوم (Salmonella typhimurium) تاثیری نداشته و مقاوم هستند. غلظت موثر رنگدانه بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus) و باکتری انتروکوکوس فکالیس(Enterococcus faecalis) ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر (۰/۰۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و میزان تاثیر برروی MRSA بیش از ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر است (۱۶). طبق تحقیقات Estelle Marchal و همکاران در سال۲۰۱۳ رنگدانه پرودیجیوسین دارای انواعی از مشتقات می‌باشد که هر یک از این مشتقات دارای یک گروه عاملی منحصر به فرد هستند تاثیر رنگدانه با این گروه‌های عاملی بر روی انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم(Plasmodium falciparum) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان‌داد که بعضی از گروه‌های عاملی باعث کاهش تاثیر ضد میکروبی رنگدانه‌ی پرودیجیوسین و کاهش مقدار IC_{50} تا ۵۰ برابر می‌گردد (۱۷). ما در این پژوهش، به دلیل قیمت بالای رنگدانه، امکان تهیه تجاری آن مقدور نبود بلکه رنگدانه را با وجود محدودیت‌ها جداسازی نمودیم و لذا وجود نوع گروه های عاملی رنگدانه برایمان مشخص نگردید. شاید یکی از دلایل زیاد بودن مقدار IC_{50} این رنگدانه، همین گروه‌های عاملی باشد. Elhameur Hacene و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان‌دادند که رنگدانه پرودیجیوسین دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد و مقدار IC_{50} موثر بر روی این میکروارگانیسم‌ها را ۵۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعنوان نمودند (۱۸). در حالی که در مطالعه ی ما مقدار IC_{50} در ۴۸ ساعت ۱۱۲/۸ میکروگرم بر میلی لیتربود. به غیر از مسئله خلوص و فرمول شیمیایی و مدت زمان تاثیر گذاری رنگدانه که در هردوپژوهش یکسان نیست، شاید یکی از علل تفاوت‌ها، نوع میکروارگانیسم مورد مطالعه می‌باشد که یکسان نبوده ولی آن چه مسلم است مسئله موثربودن رنگدانه در کشتن میکروب و تک یاخته می‌باشد که برای مقایسه آن‌ها تحقیقات بیشتری نیاز است. در پژوهش Mohamad A Othman و همکاران در سال ۲۰۱۹ تاثیر رنگدانه‌ی پرودیجیوسین بر روی ۴ باکتری گرم مثبت و ۷ باکتری گرم منفی بررسی شد. غلظت‌های مورد استفاده ی رنگدانه بین ۲۵ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترذکر گردیده شد و مقدار IC_{50} برای باکتری‌های گرم مثبت در محدوده‌ی ۱۸/۲۶ تا۵۴/۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتراست و برای باکتری‌های گرم منفی ۳۱/۲۰ تا ۷۱/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیترذکر شده‌است (۱۹). در این پژوهش میزان IC_{50} در ۴۸ ساعت ۱۱۲/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتربه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

دست آمد که گرچه تاثیر روی باکتری‌ها بهتر از تک‌یاخته تریکوموناس به نظر می رسد ولی اختلافات فاحش نمی‌باشد. در این مطالعه، بعد از استخراج رنگدانه غلظت رنگدانه در طول موج ۵۳۵ دارای قله بود و همچنین خالص بودن رنگدانه به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی و تایید شد (۲۰). نتایج مورد بررسی از پیوندها و گروه‌های عاملی رنگدانه پرودیجیوسین به روش FTIR، وجود گروه‌های عاملی در رنگدانه با موارد ذکر شده در مقالات، تطبیق و مورد تایید بود و همین امر دلیلی بر درستی و تایید رنگدانه پرودیجیوسین می‌باشد (۱۴). طبق تحقیقات انجام شده توسط بهاروند و همکاران در سال ۲۰۱۵ تاثیر داروی مترونیدازول در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت بر روی سلول Vero انجام شد نتایج بدست آمده اینگونه گزارش شده‌است که مقدار CC_{50} برابر با ۷۰/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیترو مقدار IC_{50} برابر با ۰/۰۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتربدست آمده است (21). نتیجه ی پژوهش ما در زمینه تاثیر مترونیدازول بر روی سلول PC12 در بازه ی زمانی ۴۸ ساعت مقدار IC_{50} برابر است یا ۰/۰۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقدار CC_{50} ۷۲/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد نتایج ما تا حدودی با نتایج بهاروند هم خوانی داشته است با ذکر این تفاوت که نتایج ما در ۴۸ ساعت انجام شده‌است. در این پژوهش، میزان IC_{50} پرودیجیوسین بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس به کمک نرم افزار Graphpad prism9 محاسبه گردید که در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۳۲۱ و ۱۱۲/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین میزان CC_{50} این رنگدانه پس از ۴۸ ساعت ۸۴۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر وشاخص SI آن ۷/۴۶ بدست آمد که با توجه به اینکه پرودیجیوسین جدا شده از سویه‌های مختلف، احتمالا تاثیر متفاوتی دارند، با این حال نتیجه خوبی است و چون غلظت ضد سلولی آن بیش از ۷ برابر ضد انگلی رنگدانه هست، مطالعات جامع تر می‌تواند در روند تکمیل این پژوهش موثر باشد. قطعا نوع رنگدانه مجزا از سویه ها و بررسی سمیت رنگدانه روی رده های سلولی دیگر در افزایش آگاهی ما برای رسیدن به نتیجه مطلوب کمک خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

رنگدانه‌های باکتریایی می توانند به صورت موثری دارای اثر ضد میکروبی باشند. تحقیق حاضر به جهت بررسی اثر این رنگدانه بر انگل تریکوموناس واژینالیس صورت گرفت که نتایج آن بیانگر موثر بودن این رنگدانه برروی انگل تریکوموناس واژینالیس می‌باشد. رنگدانه پرودیجیوسین استخراج شده در این تحقیق برروی انگل تریکوموناس واژینالیس موثر بوده و با غلظت بیشتر برای رده سلولی سمیت داشت که نتیجه خوبی است اما شاخص درمانی آن بسیار کمتر از داروی مترونیدازول بود. این مطالعه اولین مطالعه صورت گرفته بر روی انگل تریکوموناس واژینالیس بوده و لذا استفاده از این رنگدانه در درمان عفونت این انگل، نیازمند بررسی‌های بیشتری در شرایط برون تنی و درون تنی می‌باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی میکروبیولوژی گرایش میکروب‌های بیماری‌زا دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج می‌باشد، بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج دانشکده علوم وکارشناس بخش آزمایشگاه میکروبیولوژی سرکار خانم عاطفه صبوری زاده تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

منابع

1. Margarita V, Fiori PL, Rappelli P. Impact of Symbiosis Between Trichomonas vaginalis and Mycoplasma hominis on Vaginal Dysbiosis: A Mini Review. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10(May):1–6.

2. Lazenby GB, Taylor PT, Badman BS, Mchaki E, Korte JE, Soper DE, et al. An association between Trichomonas vaginalis and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. Clin Ther [Internet]. 2014;36(1):38–45.

3. Stark JR, Judson G, Alderete JF, Mundodi V, Kucknoor AS, Giovannucci EL, et al. Prospective study of trichomonas vaginalis infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' health study. J Natl Cancer Inst. 2009;101(20):1406–11.

4.Muzny CA, Schwebke JR. The clinical spectrum of Trichomonas vaginalis infection and challenges to management. Sex Transm Infect. 2013;89(6):423–5.

5. Leitsch D, Kolarich D, Binder M, Stadlmann J, Altmann F, Duchêne M. Trichomonas vaginalis: Metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. Mol Microbiol. 2009;72(2):518–36.

6.Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. J Food Sci Technol. 2015;52(8):4669–78.

7. Characteristics B, Wilkowske CJ, Ii JAW, Martin WJ, Ritts RE. Serratia marcescens.. 2010;152(1):903–12.

8. Paul T, Bandyopadhyay TK, Mondal A, Tiwari ON, Muthuraj M, Bhunia B. A comprehensive review on recent trends in production, purification, and applications of prodigiosin. Biomass Convers Biorefinery. 2020;

9. Jehlička J, Němec I, Varnali T, Culka A, Svatoš A, Frank O, et al. The pink pigment prodigiosin: Vibrational spectroscopy and DFT calculations. Dye Pigment. 2016;134:234–43.

10.Srimathi, Priya R, Nirmala M, Malarvizhi A. Isolation, Identification, Optimization of Prodigiosin Pigment Produced by Serratia Marcescens and its Applications. Int J Latest Eng Manag Res. 2017;02(09):11–21.

11. Mehta M, Shah G. Extraction of pigment from Serratia marcescens and its application in candle industry . Adv Appl Res. 2015;7(2):144.

12.Momeni Z, Sadraei J, Kazemi B, Dalimi A. Molecular typing of the actin gene of Trichomonas vaginalis isolates by PCR-RFLP in Iran. Exp Parasitol [Internet]. 2015;159:259–63.

13.Tejasvini S. Pore, Ashwini B. Khanolkar NHN. Production, Purification, Identification of Prodigiosin From Serratia Sp. and Its Antimicrobial Activity. Res J Life Sci Bioinformatics, Pharm Chem Sci. 2016;1(325):212–21.

14.Sumathi C, Mohanapriya D, Swarnalatha S, Dinesh MG, Sekaran G. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. Sci World J. 2014;2014.

15.Srimathi R, Priya R, Nirmala M, Malarvizhi A. Isolation, Identification, Optimization of Prodigiosin Pigment Produced by Serratia Marcescens and its Applications. 2017;02(09):11–21.

16.Yip CH, Mahalingam S, Wan KL, Nathan S. Prodigiosin inhibits bacterial growth and virulence factors as a potential physiological response to interspecies competition. PLoS One. 2021;16(6 June):1–24.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]

17.Marchal E, Smithen DA, Uddin MI, Robertson AW, Jakeman DL, Mollard V, et al. Synthesis and antimalarial activity of prodigiosenes. Org Biomol Chem. 2014;12(24):4132–42.

18.HACENE E. Effect of Prodigiosin From Serratia Marcescens Br1 Strain As an Antioxidative, Antimicrobial, and in Vivo Wound Healing. Asian J Pharm Clin Res. 2020;(October):175–9.

19.Othman M, El-Zamik F, Hegazy M, Salama A. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF EGYPTIAN STRAINS OF Serratia marcescens PRODUCING ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT PRODIGIOSIN PIGMENT. Zagazig J Agric Res. 2019;46(5):1573–82.

20.Elmenshawey A, Abdelrazak A, Mowafy AM, Osman Y. Optimization of bioreactor cultivation parameters by taguchi orthogonal array design for enhanced prodigiosin production. Iran J Chem Chem Eng. 2020;39(3):319–30.

21.Baharvandi Z, Sadraei J. Comparison of the Effect of Metronidazole, Tinidazole, Mango and Blueberry Extracts on Trichomonas vaginalis in Vitro. Infect Epidemiol Med. 2016;2(3):24–7.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.9.1]