

## ***Effects of Cream Containing Rhamnolipid Microbial Surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on Growth Inhibition of *Staphylococcus aureus****

Tooran Bagheri<sup>1</sup>,  
Kobra Rahimi<sup>2</sup>,  
Tayebe Bagheri Lotfabad<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Nursing, Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> MSc in Chemical Engineering, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

(Received October 5, 2019; Accepted March 1, 2020)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Dramatic increase in antibiotic-resistant bacteria highlights the need for new compounds with more effective antibacterial properties and biotechnology could be useful in producing these metabolites. The present study aimed at investigating the effects of rhamnolipid microbial surfactants in a cream-based formulation on growth inhibition of *Staphylococcus aureus* using *in vitro* and animal models.

**Materials and methods:** The inhibitory effects of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on the growth of *S. aureus* were investigated by disk diffusion method. Then, the effects of dirhamnolipid compounds on the survival and morphology of bacteria were studied using estimation of colony forming units (CFUs) and scanning electron microscopy (SEM). The di-rhamnolipid-containing cream was prepared and its effects on inhibition of the bacterial growth was evaluated *in vitro* and animal subjects.

**Results:** Disk diffusion tests showed a minimum inhibitory value of 30mg/disk for aqueous solutions of mono- and di-rhamnolipids, and 20mg/disk and 10mg/disk for mono- and di-rhamnolipid solutions in Dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively. The aqueous solution of di-rhamnolipids at 20mg/ml resulted in lack of viable cells of *S. aureus*. SEM images showed changes in spherical shape of *S. aureus* during rhamnolipid treatments. Di-rhamnolipid-containing cream led to inhibition of bacterial growth *in vitro* on agar medium. Moreover, findings in rats indicated inhibition of bacterial growth in wound areas after 20 days of treatment with the cream.

**Conclusion:** In current study, Di-rhamnolipids demonstrated inhibitory effects on the growth of *S. aureus*. These compounds in cream formulation could also have antibacterial effects.

**Keywords:** Rhamnolipids, cream, antibacterial, *Staphylococcus aureus*, animal model

**J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (184): 14-27 (Persian).**

\* Corresponding Author: Tayebe Bagheri Lotfabad - National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran (E-mail: bagheril@nigeb.ac.ir)

# تاثیر کرم حاوی سورفکتانت میکروبی رامنولیبیدی گرفته شده از سودوموناس آئروژینوزا MR01 بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس

توران باقری<sup>1</sup>

کبری رحیمی<sup>2</sup>

طیبه باقری لطف آباد<sup>3</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها، توسعه ترکیبات جدید با ویژگی‌های ضدباکتریایی را ضروری می‌نماید. در این راستا، استفاده از فناوری‌های زیستی به منظور تولید این ترکیبات استراتژی مناسبی می‌باشد. در مطالعه حاضر، تاثیر استفاده از سورفکتانت‌های میکروبی رامنولیبیدی در فرمولاسیون کرم، بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی و در مدل حیوانی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، اثر مهارکنندگی رامنولیبیدهای حاصل از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا MR01، بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. سپس، تاثیر ترکیبات دی‌رامنولیبیدی بر زنده‌مانی و مورفولوژی باکتری‌ها با استفاده از روش شمارش واحدهای کلنی (CFUs) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شد. در ادامه، کرم حاوی ترکیبات دی‌رامنولیبیدی تهیه و تاثیر آن بر مهار رشد باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی و نیز در مدل حیوانی سنجش شد.

**یافته‌ها:** نتایج انتشار دیسک، بیانگر حداقل مقدار مهارکنندگی 30mg/disk برای محلول‌های آبی مونو و دی‌رامنولیبیدها و 20mg/disk و 10mg/disk برای محلول‌های مونو و دی‌رامنولیبیدی در حلال DMSO بود. همچنین، محلول آبی دی‌رامنولیبیدها از غلظت 20mg/ml موجب عدم زنده‌مانی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس شد. تصاویر SEM، تغییر شکل کروی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس را در طول تیمار رامنولیبیدی نشان داد. کرم‌های حاوی دی‌رامنولیبیدها منجر به مهار رشد باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی روی محیط آگاردار شد. همچنین، نتایج بیانگر مهار رشد باکتری‌ها در محل زخم رت‌های تیمار شده با کرم‌های دی‌رامنولیبیدی در روز بیستم تزریق بود.

**استنتاج:** ترکیبات دی‌رامنولیبیدی دارای قدرت مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند. استفاده از این ترکیبات در فرمولاسیون کرم می‌تواند موجب تاثیرات ضد باکتریایی در کرم شود.

**واژه‌های کلیدی:** رامنولیبیدها، کرم، ضد میکروبی، استافیلوکوکوس اورئوس، مدل حیوانی

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، مسئول عفونت‌های متعدد مزمن و عودکننده مانند استئومیلیت، اندوکاردیت و عفونت‌های ریوی فیبروز کیستیک و همچنین ترومای نفوذی و عفونت‌های سوختگی، زخم‌های وریدی پا،

E-mail: bagheril@nigeh.ac.ir

**مؤلف مسئول:** طیبه باقری لطف آباد - تهران: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

1. کارشناسی ارشد پرستاری، مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

2. کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

3. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1398/7/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/8/13 تاریخ تصویب: 1398/12/11

زخم‌های فشاری و زخم‌های پای دیابتی می‌باشد. علیرغم این که جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشات برون تنی، و اندازه‌گیری‌های حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC : Minimum Inhibitory Concentration) حساسیت کامل نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نشان می‌دهند، اما این عفونت‌ها به سختی درمان می‌شوند (1). این امر نشان می‌دهد که عوامل محیطی موجود در شرایط درون تنی ممکن است بر حساسیت بیماری‌زها به آنتی‌بیوتیک تأثیرگذار باشند. در حضور این عوامل که می‌توانند شامل موانع فیزیکی در برابر فعالیت آنتی‌بیوتیکی باشند، مانند نکرورز بافت یا بافت‌مردگی و پایین بودن عروق کرونری در محل عفونت یا تکثیر باکتری‌ها در فاگوسیت‌های میزبان، شکست درمان نمی‌تواند به طور کامل با نفوذ ضعیف دارو توجیه شود، بلکه عوامل محیطی مانند تعامل با میزبان، می‌تواند پاسخ‌های فنوتیپی یا سازگاری‌های ژنتیکی را در باکتری‌ها تحریک نماید و حساسیت آنتی‌بیوتیکی را کاهش دهد (1). بنابراین شناسایی ترکیباتی که از تأثیرگذاری قابل قبولی بر مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط برون تنی و نیز درون تنی برخوردار باشند مورد توجه قرار می‌گیرد.

رامنولیبیدها، گروهی از مواد فعالی سطحی هستند که وقتی در یک سیستم متشکل از دو فاز غیرقابل امتزاج قرار می‌گیرند قادر به بروز ویژگی‌های سورفکتانتی نظیر کاهش کشش سطحی و بین سطحی و خصیصه‌های امولسیون‌کنندگی نظیر تشکیل میکروامولسیون و پایداری فاز امولسیون می‌باشند (2). رامنولیبیدها عمدتاً توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شوند (3). از دیدگاه ساختار شیمیایی، رامنولیبیدها، زیرگروهی از ترکیبات گلیکولیپیدی هستند که دارای یک یا دو حلقه رامنوز در ترکیب با اسیدچرب 3-هیدروکسی می‌باشند و به این ترتیب با عنوان مونورامنولیبیدها و دی‌رامنولیبیدها

اطلاق می‌شوند (4). تاکنون تحقیقات گسترده‌ای روی پتانسیل داوری رامنولیبیدها صورت گرفته است. در همین راستا، عملکردهای متعددی پیش‌تر از این برای رامنولیبیدها گزارش شده است، که شامل نقش ضدباکتریایی و ضدقارچی، افزایش دهنده عملکرد آنتی‌بیوتیکی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، عوامل ضدسرطانی و توزیع‌کننده دارو می‌شود (5،4). در زمینه پتانسیل ضد میکروبی رامنولیبیدها، مطالعات اولیه Itoh و همکارانش در سال 1971، پیشنهاد کرد که رامنولیبیدها روی طیف وسیعی از میکروب‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیر ضد میکروبی دارند (6) و از آن پس گزارشات متعددی در این زمینه ارائه شده است (8،7). با توجه به این یافته‌های ارزشمند، بعلاوه این حقیقت که مسیرهای ژنتیکی و متابولیکی سنتز رامنولیبیدها به خوبی مشخص شده است و نیز اینکه رامنولیبیدها قابل تولید از مواد اولیه تجدیدپذیر هستند و ترکیباتی زیست‌تخریب‌پذیر می‌باشند (9)، چشم‌انداز خوبی از بکارگیری گسترده رامنولیبیدها وجود دارد. بنابراین، تکامل مطالعات قبلی می‌تواند سهم قابل توجهی در پیشرفت دستاوردها در این زمینه تحقیقاتی باشد.

در راستای پتانسیل کاربردی رامنولیبیدها، مطالعات پیشین ما در سال 2010 به ارزیابی اثر ضد میکروبی مخلوط رامنولیبیدی خام حاصل از سویه سودوموناس آئروژینوزا MR01 بر گونه‌های متعدد از باکتری‌های گرم منفی شامل کلسیلا پنومونیه، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا و باکتری‌های گرم مثبت شامل انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتیلیس (10) اختصاص یافت. نتایج آزمایشات حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) نشان داد که رامنولیبیدهای حاصل از سویه MR01 تا غلظت 512 µg/ml تأثیری بر رشد باکتری‌های گرم منفی نداشتند اما در غلظت 128 µg/ml تأثیر مهار رشد بر باکتری‌های گرم مثبت مشاهده شد (10). به این ترتیب، از

پیشین ما گزارش شده است (11) تهیه و از محیط کشت استخراج گردید. عصاره خام حاصل، با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی که پیش تر گزارش نموده ایم به دو جزء مونو و دی رامنولپیدی تفکیک و با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک مورد تایید قرار گرفت (10). هومولوگ های رامنولپیدی موجود در بخش های مونورامنولپیدی و دی رامنولپیدی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی جرمی شناسایی شد و فعالیت های سطحی آن ها اعم از توانایی جابجایی روغن، کاهش کشش سطحی، غلظت بحرانی میسل و شاخص امولسیون کنندگی تعیین گردید که جزئیات روش های سنجش و نتایج آن ها در مقاله دیگری منتشر شده است (12).

#### سنجش فعالیت ضد میکروبی رامنولپیدها

فعالیت ضد میکروبی مونورامنولپیدها و دی رامنولپیدها علیه سویه باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار که توسط کربی - بائر (Kirby & Bauer) توضیح داده شد (13) ارزیابی گردید. برای این منظور محلول های با غلظت 1 mg/μl از مونورامنولپیدها و دی رامنولپیدها در آب دیونیزه و در حلال دی متیل سولفو کساید (DMSO) تهیه شد. از کشت 24 ساعته استافیلوکوکوس اورئوس روی محیط جامد لوریا برتانی (LB)، سوپانسیون میکروبی 0/5 مک فارلند در محیط مولر هینتون مایع تهیه شد. سپس با استفاده از سوآب روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. دیسک های 6/4 میلی متری خریداری شده از شرکت پادتن طب روی محیط جامد در فواصل مناسب تعبیه گردید و مقادیر مختلف 10 μl، 20 μl، 30 μl، 40 μl و 50 μl از محلول های رامنولپیدی روی هر دیسک مجزا بارگذاری شد. دیسک کنترل فاقد رامنولپید بوده و تنها با استفاده از حلال استریل بارگذاری گردید. محیط ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C انکوبه و سپس عکسبرداری با استفاده از دوربین دیجیتال انجام شد. هاله

آن جاکه نتایج تحقیقات قبلی بیانگر تاثیر گذاری ترکیبات رامنولپیدی حاصل از سویه MR01 بر مهار رشد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس بود و اینکه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس از جمله مهم ترین بیماری زا های انسانی می باشد که در زمره علل اصلی عفونت های بیمارستانی در دنیا محسوب می شوند؛ از این رو مطالعه حاضر به تکمیل مطالعات قبلی انجام گرفته در زمینه تاثیر رامنولپیدهای حاصل از سودوموناس آئروژینوزا MR01 بر استافیلوکوکوس اورئوس می پردازد. در این مطالعه، رامنولپیدهای خام حاصل از باکتری های MR01 پس از استخراج از محیط کشت با استفاده از کروماتوگرافی ستونی به دو گروه مونورامنولپیدها و دی رامنولپیدها خالص سازی و تفکیک شدند و تاثیر آن ها به طور مجزا بر مهار رشد سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 با استفاده از روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، تاثیر دی رامنولپیدها بر زندهمانی و مورفولوژی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شد. علاوه بر این تاثیر ترکیبات دی رامنولپیدی به شکل فرمولاسیون کرم رامنولپیدی بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط برون تنی و درون تنی رت های آلوده شده به باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی گردید.

#### مواد و روش ها

این مطالعه که از تیرماه تا اسفندماه 1397 به طول انجامید، تاثیر ضد باکتریایی ترکیبات رامنولپیدی را بر سویه باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 خریداری شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران مورد بررسی قرار گرفت.

#### تهیه رامنولپیدها

عصاره خام حاوی رامنولپیدها با استفاده از کشت سویه سودوموناس آئروژینوزا MR01 روی محیط کشت حاوی روی روغن سویا به روشی که در مطالعات

180rpm انکوبه گردید. پس از انجام تیمار، تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر از نمونه، به روش شمارش تشکیل واحد کلنی (Colony Forming Unit : CFU) تعیین گردید و درصد زنده‌مانی نسبت به نمونه کنترل محاسبه شد. همچنین، تغییرات ناشی از تیمار دی‌رامنولیبیدی، بر مورفولوژی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، با استفاده از روش میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

#### آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

سوسپانسیون سلولی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، از کشت شبانه این باکتری‌ها در محیط لوریا بر تانی (LB) در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و هوادهی 180rpm تهیه شد. 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل به میکروتیوب‌های مجزا انتقال یافت و دو مرتبه با استفاده از بافر فسفات نمکی (PBS، pH7.4) شستشو داده شد و رسوبات سلولی با استفاده از سانتریفوژ (دور 4000rpm،  $4^{\circ}\text{C}$ ، بمدت 10 دقیقه) جمع‌آوری گردید. جهت انجام تیمار، به توده سلولی موجود در هر میکروتیوب، 1ml محلول PBS استریل حاوی مقادیر مختلف از دی‌رامنولیبید (صفر (کنترل)، 10 mg، 20 mg، 30 mg، 40 mg و 50 mg) اضافه شد و به مدت 24 h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و هوادهی 180rpm انکوبه گردید. پس از انجام تیمار، توده سلولی جمع‌آوری و با استفاده از روش توضیح داده شده توسط باقری لطف‌آباد و همکارانش (15) برای انجام آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy: SEM) آماده‌سازی شدند. به طور خلاصه، توده‌های سلولی با استفاده از محلول 3 درصد گلو تارآلد هاید در PBS فیکس شد و پس از سه مرتبه شستشو با بافر PBS، با استفاده از محلول‌های الکل از غلظت 25 تا 100 درصد بتدریج آبگیری و سپس توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی (AIS2300c، کره) مورد ارزیابی قرار گرفت.

عدم رشد با استفاده از نرم افزار آنالیز تصویر Digimizer نسخه 4 تعیین شد. تمامی مراحل آزمایش 3 بار تکرار شد و داده‌های بدست آمده، به صورت میانگین مورد ارزیابی قرار گرفت. از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) برای هر داده بررسی شد. برای بررسی آماری از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) توام با آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

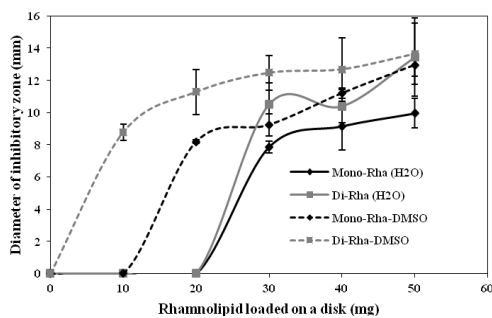
#### اثر دی‌رامنولیبیدها بر زنده‌مانی و تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌ها

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مرحله قبل در تست‌های دیسک دیفیوژن آگار، دی‌رامنولیبیدها برای مطالعات بیش‌تر انتخاب شدند و تاثیر آن‌ها بر زنده‌مانی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش اصلاح شده بهار علی و همکارانش (14) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، سوسپانسیون سلولی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، از کشت شبانه این باکتری‌ها در محیط لوریا بر تانی (LB) در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و هوادهی 180rpm تهیه گردید. سوسپانسیون سلولی حاصل، سانتریفوژ (دور 4000rpm،  $4^{\circ}\text{C}$ ، به مدت 10 دقیقه) شد تا رسوبات سلولی جمع‌آوری شوند و سپس دو مرتبه با استفاده از بافر فسفات نمکی (PBS، pH7.4) شستشو داده شد. در ادامه، با افزودن بافر PBS روی توده سلولی جمع‌آوری شده، سوسپانسیون 0/5 مک فارلند تهیه گردید و به میکروتیوب‌های مجزا (هر کدام 1ml) انتقال داده شد و پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی تخلیه گردید. جهت انجام تیمار، به توده سلولی موجود در هر میکروتیوب، 1ml محلول PBS استریل حاوی مقادیر مختلف از دی‌رامنولیبید (صفر (کنترل)، 10 mg، 20 mg، 30 mg، 40 mg و 50 mg) اضافه شد و به مدت 24 h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و هوادهی

دمای °C 22-24 نگهداری شدند. در این مدت حیوانات دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. پس از ایجاد بیهوشی عمومی با تزریق عضلانی زایلازین (15 mg/kg) و کتامین (60 mg/kg)، موهای ناحیه پشت رت‌ها توسط دستگاه تراش برقی تراشیده شد. سپس زخم‌های تمام ضخامت به ابعاد  $1/5 \times 1/5$  توسط بیستوری شماره 10 بر روی پشت رت‌ها ایجاد و  $100 \mu\text{l}$  از سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند/استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 با سرنگ انسولین به بستر زخم‌ها تزریق شد. رت‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه A، B و C تقسیم شدند و یک رت جهت کشت شاهد نگهداری شد. عمل تلقیح به مدت سه روز تکرار شد و روز چهارم از محل زخم رت شاهد، نمونه برای کشت تهیه گردید و سپس معدوم شد. در گروه A روزانه مقدار 100 mg کرم رامنولپیدی و در گروه B همین مقدار از کرم کنترل استعمال شد و گروه C بدون درمان باقی ماند. در تمامی گروه‌ها پس از قرار دادن یک لایه گاز استریل بر روی محل زخم، با چسب لکوپلاست پانسمان شد. انجام پانسمان تا 20 روز به صورت یک روز درمیان ادامه یافت. در روز 5 و 15، از 3 رت و در روز 10 و 20، از 5 رت در هر گروه نمونه تهیه و تعداد باکتری‌های زنده/استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 در نمونه‌ها با استفاده از روش شمارش واحد تشکیل کلنی (CFU) مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که، نمونه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و وزن آن‌ها یادداشت شد. نمونه مورد نظر در یک فالكون حاوی 1/5 ml نرمال سالین استریل با استفاده از یک میله شیشه‌ای استریل هموژن شد. رقت‌های مختلف از سوسپانسیون حاوی نمونه ساخته شد، سپس  $100 \mu\text{l}$  از هر یک از رقت‌ها روی پلیت لوریا برتانی آگار کشت داده شد و پس از پخش روی آن به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای °C 37 انکوبه گردید. سپس شمارش واحدهای کلنی‌ها انجام پذیرفت و نتایج به‌صورت CFU/mg (تعداد کلنی باکتری‌های زنده به ازای میلی گرم نمونه برداشته

تهیه کرم حاوی دی‌رامنولپیداها و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن به منظور بررسی امکان بهره‌گیری از فعالیت ضدباکتریایی دی‌رامنولپیداها به صورت فرمولاسیون کرم، از پایه اوسرین استفاده شد و کرم حاوی ترکیبات دی‌رامنولپیدی تهیه گردید. برای این منظور اوسرین با جذب 200 درصد، از داروخانه خریداری شد. محلول حاوی 20 mg دی‌رامنولپید در  $80 \mu\text{l}$  آب دیونیزه با 80 mg اوسرین ترکیب و مخلوط شد، سپس فعالیت ضد میکروبی کرم حاصل در شرایط برون‌تنی آزمایشگاه، بررسی شد. به این صورت که کرم رامنولپیدی روی پلیت مولر هینتون آگار که باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس با کدورت 0/5 مک فارلند روی آن کشت چمنی داده شده بود، قرار داده شد و در محدوده یک مربع  $1/5 \times 1/5$  روی آن گسترده گردید. محیط‌ها به مدت 24 ساعت در دمای °C 37 انکوبه شد و سپس عدم رشد ایجاد شده توسط کرم بررسی شد. کرم کنترل از اختلاط 100 mg اوسرین با  $80 \mu\text{l}$  آب دیونیزه تهیه شد. همچنین به منظور بررسی تاثیر حلال، آزمایشات فوق با  $40 \mu\text{l}$  حلال DMSO بجای  $80 \mu\text{l}$  آب دیونیزه تکرار گردید. در ادامه فعالیت ضد میکروبی کرم رامنولپیدی در شرایط درون تنی در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات درون تنی با استفاده از کرم رامنولپیدی حاصل از اختلاط دی‌رامنولپید، اوسرین و آب دیونیزه و با نسبت 1mg: 4 mg:  $4 \mu\text{l}$  انجام شد. کرم کنترل از مخلوط نمودن اوسرین و آب دیونیزه با نسبت 5 mg:  $4 \mu\text{l}$  تهیه شد. مطالعه تجربی زیر در سال 1397 در آزمایشگاه حیوانات مرکز آموزشی درمانی حضرت فاطمه (س) تهران انجام گرفت و در تمام مراحل آزمایش پروتکل‌های اخلاق در پژوهش جهت کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. تعداد 49 رت نر بالغ نژاد Sprague-Dawley به وزن تقریبی 250-300 g انتخاب و در قفس‌های جداگانه استاندارد با چرخه نوری 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی و

میزان برآورد شده قطر هاله‌های عدم رشد به صورت نمودار شماره 1 ترسیم شد. این نمودار، میانگین و انحراف معیار قطر نواحی مهار مربوط به رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 را در حضور غلظت‌های مختلف مونو و دی رامنولیبیدها نشان می‌دهد. آنالیز واریانس یکطرفه توام با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) نشان داد که مینیمم مقدار مهار کنندگی برای محلول‌های آبی مونو و دی رامنولیبیدها و نیز محلول آن‌ها در حلال DMSO معادل با: «مونو-رامنولیبید در آب؛ 30 mg/disk»، «دی-رامنولیبید در آب؛ 30 mg/disk»، «مونو-رامنولیبید در DMSO؛ 20 mg/disk»، «دی-رامنولیبید در DMSO؛ 10 mg/disk» برآورد گردیدند که هر یک به ترتیب منجر به مهار رشد با قطرهای  $7/86 \pm 0/35$  mm،  $10/51 \pm 1/35$  mm،  $8/19 \pm 0/13$  mm و  $8/78 \pm 0/5$  mm شدند.



نمودار شماره 1: فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف مونورامنولیبیدها و دی رامنولیبیدها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 بر اساس قطر هاله عدم رشد (mm) در روش بررسی انتشار دیسک. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار نتایج تکرار سه آزمایش مجزا بیان شده‌اند.

اثر دی رامنولیبیدها بر زنده‌مانی و تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌ها

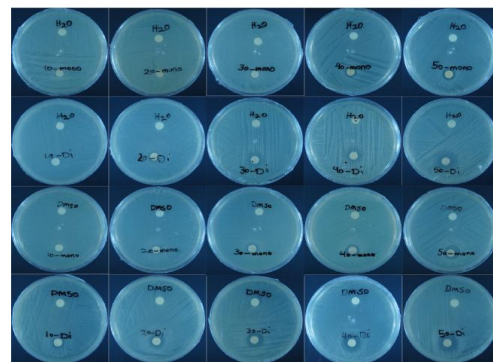
با توجه به تاثیر گذاری بیش تر دی رامنولیبیدها بر مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و ایجاد هاله عدم رشد با قطر بالاتر، اثر گذاری آن‌ها بر زنده‌مانی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت، به طوری که نتایج

شده از زخم رت) گزارش شد. قبل از نمونه برداری با استفاده از دوربین دیجیتال Nikon D300 digital camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) و لنز ماکروی 60 mm با درجه بزرگ‌نمایی 1:10 و فاصله 80 cm، در مجاورت خط کش از محل زخم‌ها عکس برداری شد. پس از انتقال تصاویر به کامپیوتر، وسعت زخم‌ها با استفاده از نرم افزار ImageJ نسخه 1/45 اندازه گیری و محاسبه شد. داده‌های گردآوری شده توسط نرم افزار SPSS نسخه 16، مورد تحلیل آماری قرار گرفت. برای توصیف داده‌های کمی از شاخص مرکزی میانگین و پراکنندگی انحراف معیار استفاده شد. توزیع داده‌ها و نرمال بودن آن‌ها سنجیده شد. جهت تحلیل داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، از آزمون‌های آنالیز واریانس یکطرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده گردید.  $P < 0/05$  از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

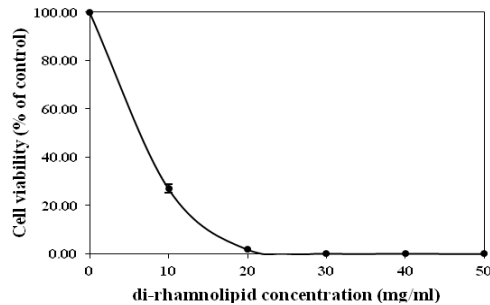
## یافته‌ها

### فعالیت ضد میکروبی رامنولیبیدها

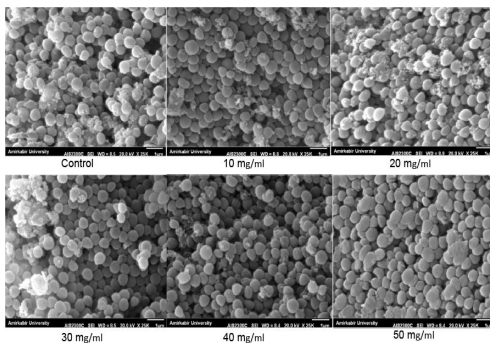
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی محلول‌های مونورامنولیبیدی و دی رامنولیبیدی روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که با استفاده از روش انتشار دیسک انجام گرفت میزان مهار رشد باکتری‌ها را در حضور مقادیر مختلف از رامنولیبیدها نشان داد (تصویر شماره 1).



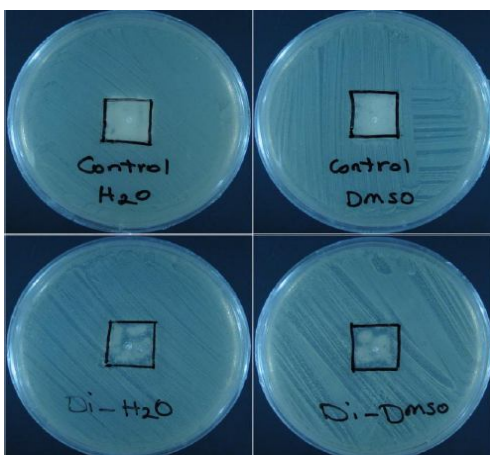
تصویر شماره 1: نمایش قطر هاله مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 توسط غلظت‌های مختلف از مونورامنولیبیدها و دی رامنولیبیدها در آب یا حلال DMSO به روش انتشار دیسک



نمودار شماره 2: زنده‌مانی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 پس از 24h تیمار با غلظت‌های مختلف از دی‌رامنولیپیدها. مقادیر بصورت  $mean \pm SD$  برای سه بار تکرار (n=3) بیان شده‌اند.



تصویر شماره 2: تصاویر آنالیز میکروسکوپ الکترونی روشی از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 تیمار نشده و تیمار شده با غلظت‌های مختلف دی‌رامنولیپیدها (از 10 mg/ml تا 50 mg/ml).



تصویر شماره 3: نمایش منطقه مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 توسط کرم دی‌رامنولیپیدی تهیه شده در آب یا حلال DMSO روی محیط مولر هینتون آگار، در مقایسه با کرم کنترل فاقد دی‌رامنولیپید.

شمارش واحدهای کلنی که به صورت درصد زنده‌مانی نسبت به کنترل در نمودار شماره 2 نمایش داده شده است، نشان می‌دهد که تیمار با غلظت 10 mg/ml از محلول دی‌رامنولیپیدها پس از 24h موجب افت چشمگیری در زنده‌مانی سلول‌ها شد و تنها  $26/94 \pm 1/75$  درصد از باکتری‌ها زنده ماندند و تیمار با غلظت‌های بالاتر از 20 mg/ml از دی‌رامنولیپیدها تقریباً منجر به عدم زنده‌مانی باکتری‌ها گردید. از طرفی، تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) موجود در تصویر شماره 4، بیانگر این مطلب است که غشای باکتری‌ها تا غلظت 50 mg/ml از دی‌رامنولیپیدها تغییر محسوسی نکرده است، اما با بررسی بیش‌تر عکس‌های موجود در تصویر شماره 2، این‌طور به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت دی‌رامنولیپیدها، شکل کروی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس بیش‌تر به سمت کشیده شدن می‌رود به‌طوری‌که در غلظت 50 mg/ml از دی‌رامنولیپیدها تعداد باکتری‌هایی که از فرم کروی تغییر شکل یافته‌اند مشهودتر است.

#### اثرات ضدمیکروبی کرم حاوی دی‌رامنولیپیدها

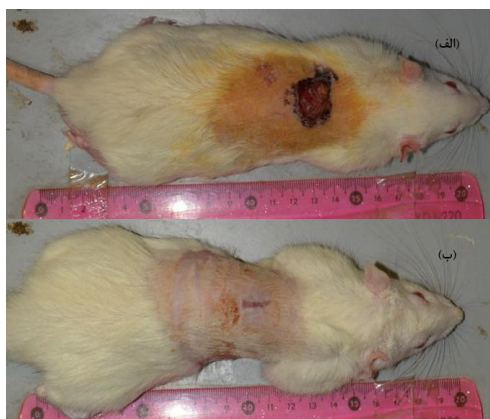
سنجش فعالیت ضدمیکروبی کرم رامنولیپیدی در شرایط برون‌تنی روی پلیت مولر هینتون آگار انجام گرفت، عدم رشد در حضور کرم حاوی دی‌رامنولیپیدها را به‌صورت تصاویر موجود در تصویر شماره 3 نمایش می‌دهد. از طرفی تصویر شماره 3، بیان می‌دارد که کرم اوسرین فاقد دی‌رامنولیپید (کرم کنترل) چه در حضور آب و چه حلال DMSO تهیه شده باشد، قادر به مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس نمی‌باشد. فعالیت ضدمیکروبی کرم رامنولیپیدی در مدل حیوانی، به‌صورت شمارش واحدهای کلنی باکتری‌های زنده موجود در محل زخم ایجاد شده به ازای میلی‌گرم نمونه برداشته شده از محل زخم، در طی روزهای 5، 10، 15 و 20 از شروع تزریق، ارزیابی گردید. بررسی آنالیز واریانس یک‌طرفه که برای مقایسه بین گروه‌های کنترل و تیمار در روزهای مشخص شده انجام گرفت در جدول شماره 1 ارائه شده است.



جدول شماره 1: آنالیز آماری توسط آنالیز واریانس یکطرفه توام با آزمون تعقیبی توکی، برای مقایسه شمارش باکتری های زنده موجود در زخم موش ها بین گروه های کنترل و تیمار شده با کره رامنولیبیدی

فاصله اطمینان 95%		معنی داری	خطای استاندارد	اختلاف میانگین (I-J)	گروه (J)	گروه (I)	متغیر وابسته
حد بالا	حد پایین						
4/2326	-1/8992	0/512	0/99923	1/16667	B	A	روز پنج -Log (CFU/mg)
3/9192	-2/2126	0/686	0/99923	0/85333	C		
1/8992	-4/2326	0/512	0/99923	-1/16667	A	B	
2/7526	-3/3792	0/948	0/99923	-0/31333	C		
2/2126	-3/9192	0/989	0/99923	-0/85333	A	C	
3/3792	-2/7526	0/948	0/99923	0/31333	B		
2/7227	-1/1947	0/567	0/73420	0/76400	B	A	روز ده -Log (CFU/mg)
2/5027	-1/4147	0/745	0/73420	0/54400	C		
1/1947	-2/7227	0/567	0/73420	-0/76400	A	B	
1/7387	-2/1787	0/952	0/73420	-0/22000	C		
1/4147	-2/5027	0/745	0/73420	-0/54400	A	C	
2/1787	-1/7387	0/952	0/73420	0/22000	B		
2/3165	-1/9080	0/953	0/68871	0/20333	B	A	روز پانزده -Log (CFU/mg)
1/9665	-2/2598	0/975	0/68871	-0/14667	C		
1/9098	-2/3165	0/953	0/68871	-0/20333	A	B	
1/7631	-2/4631	0/870	0/68871	-0/35000	C		
2/2598	-1/9665	0/975	0/68871	0/14667	A	C	
2/4631	-1/7631	870	0/68871	0/35000	B		
-0/9484	-5/3716	0/015*	0/62054	-3/16000	B	A	روز بیست -Log (CFU/mg)
-0/1361	-4/1739	0/041*	0/56648	-2/15500	C		
5/3716	0/9484	0/015*	0/62054	3/16000	A	B	
3/0239	-1/0139	0/288	0/56648	1/00500	C		
4/1739	0/1361	0/041*	0/56648	2/15500	A	C	
1/0139	-3/0239	0/288	0/56648	-1/00500	B		

\*: معنی دار است



تصویر شماره 4: تصویر زخم آلوده به باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 در رت ها در روزهای (الف) چهار و (ب) بیستم از شروع تزریق

نتایج موجود در جدول شماره 1 بیان می دارد که تیمار با کره رامنولیبیدی پس از روز بیستم منجر به تغییر معنی داری در تعداد باکتری های زنده موجود در زخم رت ها شده است. شایان ذکر است که در انجام آنالیز واریانس از لگاریتم داده های مربوط به CFU استفاده شده است. علاوه براین، بررسی سطح زخم ها در گروه های کنترل و تیمار نشان داد که در همه گروه ها، زخم ها به طور معنی داری روند بهبود را در دوره تیمار طی نمودند به طوری که مساحت زخم ها تا روز بیستم به صورت چشمگیری کاهش داشت (تصویر شماره 4)، اما آنالیز واریانس نشان داد که تفاوت معنی داری بین مساحت زخم ها در گروه های مختلف در هیچکدام از روزهای مورد بررسی وجود نداشت.



3- هیدروکسی دکانویل-3- هیدروکسی دکانویت (Rha-Rha-C10-C10) می‌باشند (4).

با توجه به اینکه در مراحل قبلی نشان داده شد که قدرت مهارکنندگی دی‌امنولپیدها در مقایسه با رامنولپیدها بیش‌تر است، برای این منظور محلول‌های دی‌امنولپیدی تهیه و تأثیر آن‌ها در محیط مایع بر زنده‌مانی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار با غلظت‌های بالاتر از 20mg/ml از دی‌امنولپیدها تقریباً منجر به عدم زنده‌مانی باکتری‌ها شد. پیش‌تر از این، بهارعلی و همکارانش با استفاده از اندازه‌گیری جذب کریستال ویوله گزارش نموده‌اند که که تیمار با غلظت 3% w/v (معادل با 30 mg/ml) از رامنولپیدها منجر به 57 درصد افزایش جذب در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده گردید یا به عبارت دیگر موجب تغییر در غشای باکتری‌ها و کاهش 57 درصد از سلول‌های زنده شد (14). در ادامه، به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 تحت تأثیر محلول‌های دی‌امنولپیدی، باکتری‌های تیمار نشده بودند (کنترل) و نیز باکتری‌های تیمار شده با محلول‌های دی‌امنولپیدی (10mg/ml تا 50 mg/ml) فیکس شده و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تصاویر SEM موجود در تصویر شماره 2، بیانگر این مطلب است که غشای باکتری‌ها تا غلظت 50 mg/ml از دی‌امنولپیدها تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرده است. که این مشاهدات خلاف گزارشی است که توسط بهار علی و همکارانش صورت پذیرفته است. ایشان بیان می‌دارند که 3% w/v (معادل با 30 mg/ml) از رامنولپیدها سبب تغییر سطح سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس از بافت نرم عادی به ظاهری خشن شده است و این امر را مربوط به از هم گسیختگی غشاء سلول و از بین رفتن یکپارچگی آن دانسته‌اند (14). اما، در تصاویر میکروسکوپ الکترونی این‌طور به نظر

می‌رسد که با افزایش غلظت دی‌امنولپیدها، شکل کروی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس بیش‌تر به سمت کشیده شدن می‌رود، به‌طوری‌که در غلظت 50 mg/ml از دی‌امنولپیدها تعداد باکتری‌هایی که از فرم کروی تغییر شکل یافته‌اند مشهودتر است. به نظر می‌رسد این امر می‌تواند مربوط به جایگیری ملکول‌های رامنولپیدی در غشای لیپیدی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس باشد که قضاوت در این خصوص نیاز به مطالعه بیش‌تر دارد.

به منظور بررسی امکان استفاده از دی‌امنولپیدها به صورت فرمولاسیون کرم جهت مهار رشد باکتری‌ها، از پایه اوسرین برای تهیه کرم استفاده شد. برای این منظور، کرم دی‌امنولپیدی یک بار با حضور آب و بار دیگر با حضور حلال DMSO به عنوان فاز حامل دی‌امنولپید تهیه گردید. مشاهدات (تصویر شماره 3) بیانگر عدم رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در منطقه‌ای است که از کرم رامنولپیدی در روی پلیت حاوی محیط آگاردار استفاده شده است، از طرفی، کرم اوسرین فاقد دی‌امنولپید (کنترل) چه در حضور آب و چه حلال DMSO تهیه شده باشد، قادر به مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس نمی‌باشد. به این ترتیب، یافته‌ها موید این مطلب است که امکان وارد کردن دی‌امنولپید، هم توسط آب و هم توسط حلال DMSO در کرم پایه اوسرین وجود دارد. علاوه بر این، مشاهده شد که کرم‌های دی‌امنولپیدی تهیه شده در حضور آب یا حلال DMSO، تأثیر مشابهی بر مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند. با این‌که نتایج آزمایشات انتشار دیسک بیانگر این بود که به دلیل حلالیت بهتر دی‌امنولپیدها در حلال DMSO در مقایسه با آب، در غلظت‌های یکسان از دی‌امنولپیدها تأثیرگذاری محلول‌های دی‌امنولپیدی در DMSO در مقایسه با محلول‌های آبی آن‌ها نتایج بهتری را در مهار رشد باکتری‌ها دارد، اما در فرمولاسیون کرم، تأثیر مشابهی برای کرم‌های دی‌امنولپیدی پایه آبی و پایه

نظر بر ترمیم زخم، مستلزم حذف اثر مداخله‌ای این عضله در آزمایشات است، که چگونگی اجرای این امر توسط محققین متعدد با روش‌های پیشنهادی گوناگون در دست بررسی می‌باشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که یافته‌های این مطالعه نشان داد که دی‌رامنولپیدهای تهیه شده از سودوموناس آئروژینوزا MR01 می‌توانند به صورت موثر و معنی‌داری رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس را مهار نمایند. همچنین فرمولاسیون دی‌رامنولپیدها به صورت فرمولاسیون کرم ارائه شده، از قابلیت استفاده در مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار می‌باشند. با توجه به نتایج نوید بخش این مطالعه، توسعه فرمولاسیون‌های متفاوت جهت بهره‌گیری از پتانسیل ضدباکتریایی دی‌رامنولپیدها در شکل‌های کاربردی مالیدنی (کرم، پماد و قطره) و تزریقی در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که موجبات انجام این تحقیق را فراهم آورده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماید. کد اخلاق IR.NIGEB.EC.1398.6.24 D توسط کمیته اخلاق زیستی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به این مطالعه اختصاص یافت، بدین وسیله از زحمات اعضای این کمیته محترم تشکر می‌شود. از کارمندان مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران واقع در بیمارستان حضرت فاطمه (س) سپاسگزاری می‌شود. علاوه بر این، از سرکار خانم دکتر پروین شریعتی، عضو هیات علمی پژوهشگاه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، جهت ارائه مشاوره در خصوص تهیه باکتری‌های استاندارد به منظور انجام آزمون‌های ضدباکتریایی تشکر می‌گردد.

آلی مشاهده شد. دلیل آن می‌تواند مربوط به این امر باشد که در فرمولاسیون کرم، با یک سیستم دو فازی مواجه هستیم که ملکول‌های دی‌رامنولپیدها چه در حلال آبی حل شده باشند و چه در حلال DMSO، وقتی در فرمولاسیون کرم وارد می‌شوند به شکل امولسیون کننده عمل نموده و در فصل مشترک دو فاز موجد در فرمولاسیون کرم قرار می‌گیرند. اما در آزمون انتشار دیسک، با یک سیستم تک فازی متشکل از یک حلال مواجهیم و بنابراین دی‌رامنولپیدها در یک فاز قرار می‌گیرند و لذا بسته به ساختاری که در هر حلال دارند رفتار متفاوتی نشان می‌دهند. به عنوان مثال در غلظت مورد استفاده در این مطالعه، در سیستم آبی به صورت ساختار میسل هستند و محلول کدیری ایجاد می‌کنند، در حالی که وقتی با همان غلظت مشابه وارد سیستم آلی DMSO می‌شوند به حد تشکیل میسل نرسیده و محلول شفاف‌تری دارند که منجر به دسترسی بهتر آن‌ها به باکتری‌ها و ایجاد مهار رشد بالاتر در آزمون انتشار دیسک می‌گردد. البته فرضیات ارائه شده نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد.

بررسی تاثیر کرم رامنولپیدی در آزمایشات درون‌تنی در مدل حیوانی نشان داد که در روز بیستم، تعداد باکتری‌های زنده موجود در محل زخم رت‌های تیمار شده با کرم رامنولپیدی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش یافت. که این مشاهدات موید یافته‌های آزمایشگاهی روی پلیت حاوی محیط آگاردار است و بیان می‌دارد که رامنولپیدها قادر به مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند. از طرفی، بهبود زخم‌ها در طی روزهای تیمار در گروه‌های مختلف می‌تواند مربوط به حضور عضله پانیکولوس کارنوسوس که در زیر لایه چربی پوست و بالای بافت چربی زیر جلدی و فاسیا قرار دارد دانست. نقش مهم این عضله در انقباض زخم‌های سطحی در پستانداران رده پایین، پیش‌تر از این توسط محققین گزارش شده است (19). به نظر می‌رسد جهت بررسی تاثیر تیمار مورد

## References

1. Radlinski L, Rowe SE, Kartchner LB, Maile R, Cairns BA, Vitko NP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *PLOS Biology* 2017; 15(11): 1-25.
2. Varjani SJ, Upasani VN. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour Technol*. 2017; 232: 389-397.
3. Chen J, Wu Q, Hua Y, Chen J, Zhang H, Wang H. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; 101(23-24): 8309-8319.
4. Déziel E, Lépine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer OA, Villemur R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440(2-3): 244-252.
5. Gudiña EJ, Rangarajan V, Sen R, Rodrigues LR. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34(12): 667-675.
6. Ito S, Honda H, Tomita F, Suzuki T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). *The J Antibiot* 1971; 24(12): 855-859.
7. Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* 2003; 81(3): 316-322.
8. Elshikh M, Funston S, Chebbi A, Ahmed S, Marchant R, Banat IM. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *N Biotechnol* 2017; 36: 26-36.
9. Li Q. Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 2017; 11(1): 27-36.
10. Lotfabad TB, Abassi H, Ahmadkhaniha R, Roostaazad R, Masoomi F, Zahiri HS, et al. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2010; 81(2): 397-405.
11. Partovi M, Lotfabad TB, Roostaazad R, Bahmaei M, Tayyebi S. Management of soybean oil refinery wastes through recycling them for producing biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* MR01. *World J Microbiol and Biotechnol* 2013; 29(6): 1039-1047.
12. Rahimi K, Lotfabad TB, Jabeen F, Mohammad Ganji S. Cytotoxic effects of mono- and di-rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on MCF-7 human breast cancer cells. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2019; 181: 943-952.
13. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology* 1966; 45(4): 493-496.
14. Bharali P, Saikia JP, Ray A, Konwar BK. Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBPI: A novel chemotaxis

- and antibacterial agent. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2013; 103: 502-509.
15. Bagheri Lotfabad T, Ebadipour N, Roostaazad R, Partovi M, Bahmaei M. Two schemes for production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Applying residues from soybean oil industry and silica sol-gel immobilized cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 152: 159-168.
  16. Stipcevic T, Piljac A, Piljac G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns* 2006; 32(1): 24-34.
  17. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, García F, Manresa A. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir* 2001; 17(5): 1367-1371.
  18. Costa SGVAO, Nitschke M, Lépine F, Déziel E, Contiero J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochemistry* 2010; 45(9): 1511-1516.
  19. Naldaiz-Gastesi N, Goicoechea M, Alonso-Martín S, Aiastui A, López-Mayorga M, García-Belda P, et al. Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2016; 7(3): 411-424.