New Cell Mol Biotech
j.11/41 , 2021

Research article

Scan online to view this article

Evaluation of Antimicrobial Compounds Produced By *Exiguobacterium Acetylicum* and Analysis of its Supernatant By GC/MS Method

Morteza Azizollahi Aliabadi*[1], Masoumeh Heidari Tajan[2], Alireza Azizollahi Aliabadi[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Medical Science, Faculty of Medicine, University of Georgia, Tbilisi, Georgia

Abstract

Aim and Background: Many microorganisms produce antimicrobial agents protecting them in extreme environmental conditions. *Exiguobacterium* sp. has particularly been adapted to their environment and is of wide diversity depending on the species and environmental conditions. The present study aims to study on the isolation, identification, and examination of antimicrobial property of bioactive compounds produced by *Exiguobacterium acetylicum* PTCC 1765.

Materials and Methods: *E. acetylicum* was taken from Iranian Research Organization for Science and Technology and was cultured in Corynebacterium broth and nutrient broth. Agar diffusion and well diffusion techniques were used to study the antimicrobial effect of supernatant of this bacterium against pathogenic and standard strains of bacteria such as *Escherichia coli, Salmonella enterica, Staphylococcus aureus, Shigella dysenteriae* and compounds with antibacterial property were identified using GC/MS.

Results: *E. acetylicum* culture's supernatant displayed a good antimicrobial property. Its greatest effect was observed during Well diffusion technique over *salmonella entrica* servpvar *paratiphi* PTCC 1231 with 8.5 mm zone of inhibition based on GC/MS analysis 2- ethyl hexyl parametoxy cynamate, 1-2-benzen-dicarboxilic acid, 1-7- dimethyl 3- phenil- thilidin byciclo (1-2-2) – heptanes-2- on and phenol 2-4 bis(1-1-dimethyle ethyle)were dominant compounds.

Conclusion: Nowadays, by increased resistance of antibiotics and the complexities resulted from consumption of chemical pharmaceutics, using alternative medicines, seems necessary. The supernatant of *E. acetylicum* culture having high antimicrobial capability and useful compounds with restricting property can be suggested as an antimicrobial agent. While comprehension studies are needed to affirm the effect of this bacteria and its resulting metabolites in the human body conditions.

Key words: *Exiguobacterium acetylicum*, GC/MS, antimicrobial property, supernatant

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

Corresponding author:
Department of Microbiology, Faculty of Biology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: morteza_azizollahi@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۱ - زمستان ۱۳۹۹
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ارزیابی ترکیب‌های ضدمیکروبی تولید شده توسط *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* و تحلیل مایع رویی کشت با استفاده از GC/MS

مرتضی عزیزاللهی علی آبادی*[۱]، معصومه حیدری تجن[۲]، علیرضا عزیزاللهی علی آبادی[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جورجیا.

چکیده

سابقه و هدف: بسیاری از میکروارگانیسم‌ها عوامل ضدمیکروبی تولید می‌کنند که آن‌ها را در شرایط سخت محیطی حمایت می‌کنند. گونه‌های اگزیگوباکتریوم به‌طور خاصی با محیط اطراف خود وقف یافته‌اند و برحسب نوع گونه و شرایط محیطی دارای تنوع گسترده‌ای هستند. هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی خاصیت ترکیب‌های ضدمیکروبی توسط *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* است.

مواد و روش‌ها: سویه لیوفیلیزه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و در محیط کورینه باکتریوم براث و نوترینت براث کشت داده شد. جهت بررسی اثر ضدمیکروبی مایع رویی کشت (سوپرناتانت) این باکتری از روش انتشار از چاهک در آگار و انتشار از دیسک علیه باکتری‌های پاتوژن و استاندارد *اشریشیاکولای، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلادیسانتری* استفاده شد و به کمک تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی (GC /MS) ترکیب‌های با خاصیت ضدمیکروبی شناسایی گردید.

یافته‌ها: مایع رویی کشت باکتری *اگزیگوباکتریوم* خاصیت ضدمیکروبی خوبی از خود نشان داد که بیش‌ترین اثر طی روش انتشار از چاهک و روی سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* PTCC 1231 زیر گونه انتریکا پاراتیفی با هاله عدم رشد ۸/۵ میلی‌متر مشاهده شد. در روش GC/MS نیز ترکیب‌های ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سینامات، ۱-۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید،۱-۷- دی متیل ۳- فنیل- تیلیدین بای سیکلو (۲-۲-۱)- هپتان-۲- اون و فنول ۲-۴- بیس (۱-۱- دی متیل اتیل) شاخص‌ترین ترکیب‌ها بودند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به‌دست آمده از *اگزیگوباکتریوم* با توانایی بالای ضدمیکروبی و داشتن ترکیب‌های مفید با خاصیت مهارکنندگی بالا می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم*، GC/ MS، خاصیت ضدمیکروبی، مایع رویی کشت

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه در باکتری‌ها در نتیجه شرایط خاص محیطی همانند محدودیت منابع غذایی و غیره در فاز سکون از زندگی باکتری‌ها تولید می‌شوند و در شرایط سخت

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: morteza_azizollahi@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۳۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

محیطی از آن‌ها حمایت می‌کنند. به‌طور معمول متابولیت ثانویه منحصر به یک ارگانیسم یا یک گروه از ارگانیسم‌ها هستند و در سایر موجودات زنده یافت نمی‌شوند. میکروارگانیسم‌هایی از قبیل باکتری‌ها و قارچ‌ها منابع با ارزشی در تولیدات دارویی و ترکیب‌های زیستی هستند به‌طور کلی متابولیت‌های ثانویه با اهداف گوناگونی جداسازی می‌شوند به‌طور مثل شناسایی یک ترکیب ناشناخته با فعالیت بیولوژیکی خاص، جداسازی یک گروه از ترکیب‌های درون یک ارگانیسم با توجه‌به مسائل دیگری از قبیل وجود ساختارهای مشترک در آن‌ها، جداسازی و شناسایی متابولیت‌های تولید شده به‌وسیله یک منبع تولیدی زیستی که توسط گونه‌های دیگر تولید نمی‌شود، تجزیه شیمیایی یک ارگانیسم برای شناسایی تمام ترکیب‌های آن و سرانجام به‌منظور کاربرد و استفاده از این ترکیب‌ها در زمینه‌های مختلف و تلاش برای سنتز مصنوعی این ترکیب‌ها است (۱). جنس *اگزیگوباکتریوم* اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط کالنیز و همکارانش شناسایی گردید و در سال ۱۹۹۴، Farrow و همکاران گونه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* را شناسایی و نام‌گذاری کردند. از آن زمان تاکنون، ۱۱ گونهٔ جدید به این جنس افزوده شده است و از دامنه گسترده‌ای از زیستگاه‌ها شامل محیط‌های سرد و گرم با دامنه دمایی ۱۲ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد جدا گردیده است. جنس *اگزیگوباکتریوم* شامل گونه‌هایی مختلفی مانند *اگزیگوباکتریوم اکسیدوتلورانس*، *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم*، *اگزیگوباکتریوم اورانتیکوم*، *اگزیگوباکتریوم اوندایی* و *اگزیگوباکتریوم انترکتیکوم* است (۳،۴،۵،۶،۷). گونه‌های *اگزیگوباکتریوم* از مناطق بسیار متنوعی شامل یخچال‌های یخی گرینلند، چشم‌های آب گرم در پارک ملی یلواستون، ریزوسفر گیاهان، محیط پیرامون کارخانجات فرآوری مواد غذایی و هم‌چنین دریای خزر جدا شده‌اند و به‌طور خاصی با محیط زیست خود وقف یافته است (۸،۹،۱۱،۱۲). بیش‌تر گزارش‌ها حاکی از آن است که این باکتری‌ها دارای قدرت کاتالازی، اکسیدازی بالا و توانایی تولید بالای آنزیمی هستند و در محیط پایه نوترینت آگار در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند. چندین سویه از این باکتری دارای مشخصه‌های منحصر به فردی است که برای کاربرد در فناوری زیستی، صنعت و کشاورزی جالب توجه است. سویه *اگزیگوباکتریوم* Z8 قادر به خنثی‌سازی فاضلاب قلیایی صنایع پارچه‌بافی است و سویه Sz پتانسیل بالایی را برای جداسازی آفت‌کش نشان می‌دهد و سویه WK6 قادر به کاهش آرسنات به آرسنیت است (۱۴،۱۵). تلاش برای یافتن عوامل کنترل کننده بیولوژیکی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها امری ضروری به‌نظر می‌رسد. از نواحی مختلف جهان میکروارگانسیم‌هایی شناسایی و جداسازی شده‌اند که توانایی ضدمیکروبی خوبی دارند. *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم*، باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، متحرک، دارای درصد G+C پائین و کلنی‌های زرد رنگ است. این باکتری می‌تواند ژلاتین، نشاسته و کازئین را هیدرولیز کرده و تحت فشار و دمای بالا، شوری و pH مختلف زنده بماند (۱۳). از آن به‌عنوان یک باکتری جدید آلکالوفیل با قدرت بالای کاتالازی یاد می‌کنند که پتانسیل آنتاگونیسمی آن به‌طور کامل شناخته شده نیست. برخی تحقیقات تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور توسط سویهٔ *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم*، را گزارش نموده‌اند (۱۰،۱۳،۱۵). هدف از این پژوهش، بررسی خاصیت آنتاگونیسمی *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* علیه چندین باکتری بیماری‌زا و استاندارد و هم‌چنین شناسایی ترکیب‌های فعال زیستی تولید شده توسط این باکتری با استفاده از تکنیک GC/MS(کروماتوگرافی گازی – اسپکترومتر جرمی) است.

مواد و روش ها

تهیه سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* (*PTCC* 1756)

این تحقیق که یک مطالعه پژوهشی است طی مدت ۸ ماه در یکی از آزمایشگاه‌های دانشگاه لاهیجان انجام گرفت، در این مطالعه سویه لیوفیلیزه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه گردیده و در محیط کورینه باکتریوم براث و نوترینت براث کشت داده شد.

تهیه مایع رویی کشت باکتری *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم*

سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* خالص شده در محیط کورینه باکتریوم براث در شرایط هوازی و دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری گردید تا کدورتی معادل ۰/۵مک فارلند

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

($1/5\times10^{8}$CFU/ml) به‌دست آید. برای تهیه مایع رویی کشت، سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای4^{o}C با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد و از مایع رویی باقی‌مانده برای بررسی خواص ضد میکروبی استفاده شد.

تهیه و آماده سازی باکتری‌های بیماری‌زا

چهار سویه شایع بیماری‌زای باکتریایی، شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431)، *اشریشیاکولای* (PTCC 1399)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188)، *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا سروار پاراتیفی B (PTCC 1231) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه و چهار سویه *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *سالمونلا انتریکا* از آزمایشگاه تشخیص طبی تهیه شدند و در محیط نوترینت براث با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* از محیط مولرهینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش‌های انتشار از دیسک و چاهک برای تعیین میزان مهارکنندگی استفاده شد. به‌منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد.

۱- روش انتشار از چاهک (Well Diffusion Agar)

طی این روش از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک‌فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس به‌کمک پیپت پاستور استریل چاهک‌هایی روی محیط ایجاد کرده و از سوپرناتانت سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* خالص به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در چاهک‌ها ریخته شد، بعد از خشک شدن محیط، پلیت‌ها در دمای $37\ ^{o}$C به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده علیه هریک از باکتری‌های بیماری‌زا توسط خط‌کش میلی‌متری، اندازه‌گیری شد.

۲- روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion Agar)

دیسک‌های کاغذی استریل به‌قطر ۶ میلی‌متر به سوپرناتانت سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* به‌مدت ۵ دقیقه آغشته شد و دیسک‌ها در دمای 37^{o}C به‌مدت ۴ ساعت قرار داده شد تا به‌طور کامل خشک شود. طی این روش از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زای کشت داده شده در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک‌فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس دیسک‌های آغشته به محلول رویی کشت سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای 37^{o}C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* علیه هریک از باکتری‌های بیماری‌زا توسط خط‌کش میلی‌متری، اندازه‌گیری شد.

GC/MS

از مایع رویی تهیه شده به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر برای شناسایی ترکیب‌های ضدمیکروبی توسط تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) با مدل 6890N-5973 MASS selective detector استفاده گردید. طی این تکنیک برحسب جرم مولی ترکیب‌های شناسایی شده و نمودار حاصله از آنالیز برحسب زمان و شدت سیگنال رسم گردید.

بررسی‌های آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS داده‌های پژوهش بررسی شدند.

یافته‌ها

فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی کشت *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* که از طریق سانتریفیوژ جداسازی شده بود علیه سویه کلینیکی و استاندارد *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *سالمونلا انتریکا* به کمک روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت که اثرهای مثبتی در برداشت. سوپرناتانت کشت این باکتری روی تمام گونه‌ها توانستند از خود خاصیت ضدمیکروبی نشان دهد که توانایی مهارکنندگی آن از ۸/۵- ۶/۵ میلی‌متر متغیر بود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

اگزیگوباکتریوم استیلیکوم بیش‌ترین توانایی را در مهار باکتری استاندارد *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا سروار پاراتیفی به‌کمک روش چاهک و کم‌ترین اثر را روی باکتری کلینیکی *اشریشیاکولای* به کمک روش انتشار از دیسک ازخود نشان داد. به‌طور کلی مایع رویی کشت این باکتری اثر مهاری بیش‌تری روی سویه‌های استاندارد نسبت‌به کلینیکی از خود نشان داد.

نتایج حاصل از روش انتشار از چاهک و انتشار از دیسک (Well Diffusion and Disk Diffusion (Agar

براساس نتایج این پژوهش فعالیت ضدباکتریایی *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* روی باکتری‌های ذکر شده با استفاده از روش‌های انتشار از دیسک و چاهک در جدول شماره ۱ و ۲ نشان‌دهنده اثر مهاری سوپرناتانت باکتری *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* است. در طی روش چاهک بیش-ترین اثر مهاری برعلیه سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* (۸/۵ میلی‌متر) و کم‌ترین میزان مهارکنندگی برعلیه سویه کلینیکی *اشرشیاکولای* (۶/۶۰ میلی‌متر) مشاهده شد و طی روش دیسک بیش‌ترین اثر مهاری برعلیه سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* (۸/۲۰ میلی‌متر) و کم‌ترین میزان مهارکنندگی برعلیه سویه کلینیکی *اشریشیاکولای* (۶/۵۰ میلی‌متر) مشاهده شده است.

جدول۱: بررسی فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت باکتری *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* علیه سویه‌های استاندارد و کلینیکی به‌روش چاهک بر حسب میلی‌متر

سوپرناتانت کشت / سویه های استاندارد و کلینیکی	هاله عدم رشد برحسب میلی متر (تکرار سه بار)	میانگین هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر
اشریشیاکولای (*Escherichia coli* PTCC 1533)	۷ ۶/۵ ۷/۵	۷
سالمونلا انتریکا (*Salmonella enterica* PTCC 1231)	۹ ۸/۵ ۸	۸/۵۰
استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)	۷ ۷/۵ ۷/۲	۷/۲۳
شیگلا دیسانتری (*Shigella dysenteriae* PTCC 1234)	۹ ۸ ۸	۸/۳۳
اشریشیاکولای	۷ ۶/۵ ۶/۳	۶/۶۰
سالمونلا انتریکا	۸/۵ ۸ ۷/۵	۸
استافیلوکوکوس اورئوس	۷ ۶/۵ ۷/۵	۷
شیگلا دیسانتری	۸ ۷/۵ ۷/۵	۷/۶۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

جدول ۲: بررسی فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت باکتری *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* علیه سویه‌های استاندارد و کلینیکی به روش دیسک

سوپرناتانت کشت / سویه های استاندارد و کلینیکی	هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر (تکرار سه بار)	میانگین هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر
اشریشیاکولای (*Escherichia coli* PTCC 1533)	۷ ۶/۵ ۷/۵	۷
سالمونلا انتریکا (*Salmonella enterica* PTCC 1231)	۷/۸ ۸/۵ ۸/۳	۸/۲۰
استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)	۷ ۷/۵ ۷	۷/۱۶
شیگلا دیسانتری (*Shigella dysenteriae* PTCC 1234)	۸ ۷/۵ ۷	۷/۵۰
اشریشیاکولای	۶ ۷ ۶/۵	۶/۵
سالمونلا انتریکا	۸ ۷/۵ ۷/۲	۷/۵۶
استافیلوکوکوس اورئوس	۶/۵ ۷ ۷	۶/۸۳
شیگلا دیسانتری	۷ ۶/۵ ۷/۵	۷

نتایج حاصل از مقایسه روش دیسک و چاهک

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اگزیگوباکتریوم برای هر سویه میکروبی سه مرتبه تکرار شده است. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به‌عنوان یک شاخص فعالیت ضدمیکروبی بوده و نتایج به‌صورت میانگین بیان شده‌اند. در مقایسه این دو روش، روش چاهک (شکل ۱) نسبت‌به روش دیسک (شکل ۲) از نتایج بهتری برخوردار بود و *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* میزان مهارکنندگی خوبی را از خود نشان داد.

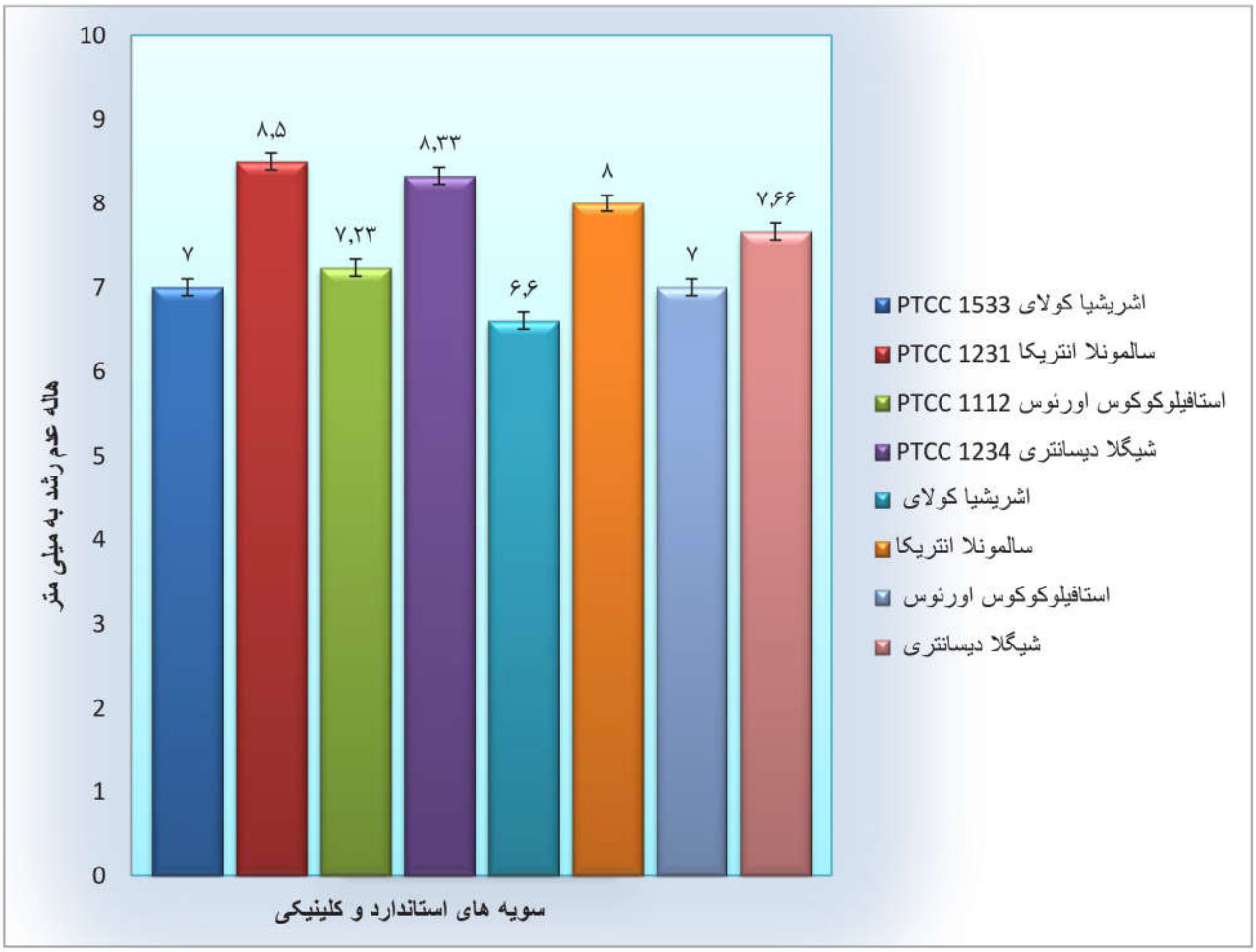
نتایج حاصل از GC/MS

در روش GC/MS شاخص‌ترین پیک با جرم مولی۴ مربوطبه ۱-۱- دی متیل اتیل است (نمودار ۱) و فراوانی نتایج حاصل از GC/MS در جدول ۳ نشان این بود که ماده ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل-تیلیدی سیکلو (۵۰٪)، ماده ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی س (۵۵٪)، ماده ۱و۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید (۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

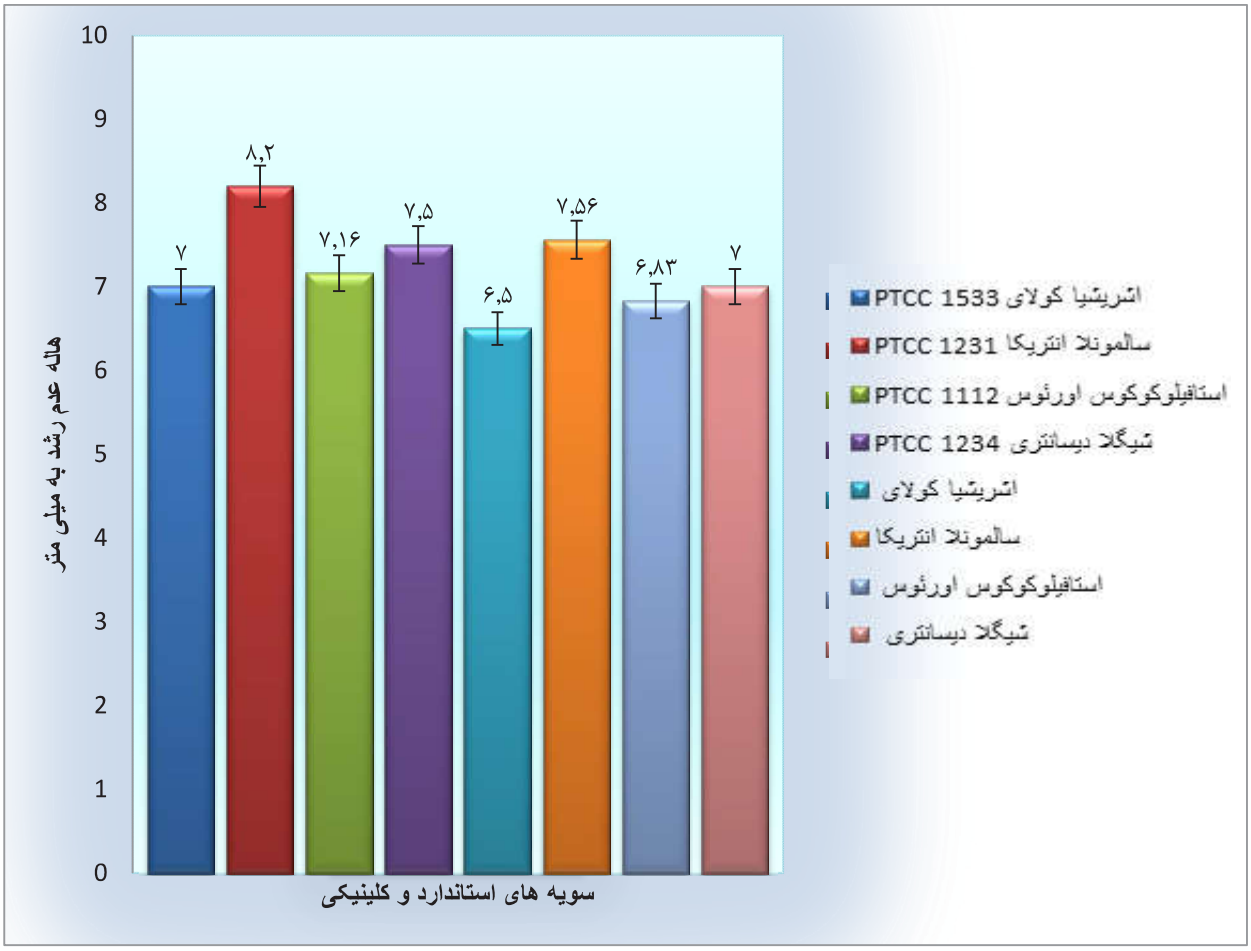
ماده فنول ۲-۴ بیس (۱-۱- دی متیل اتیل) (۵۸٪) دارای شاخص‌ترین ترکیب‌ها بودند.



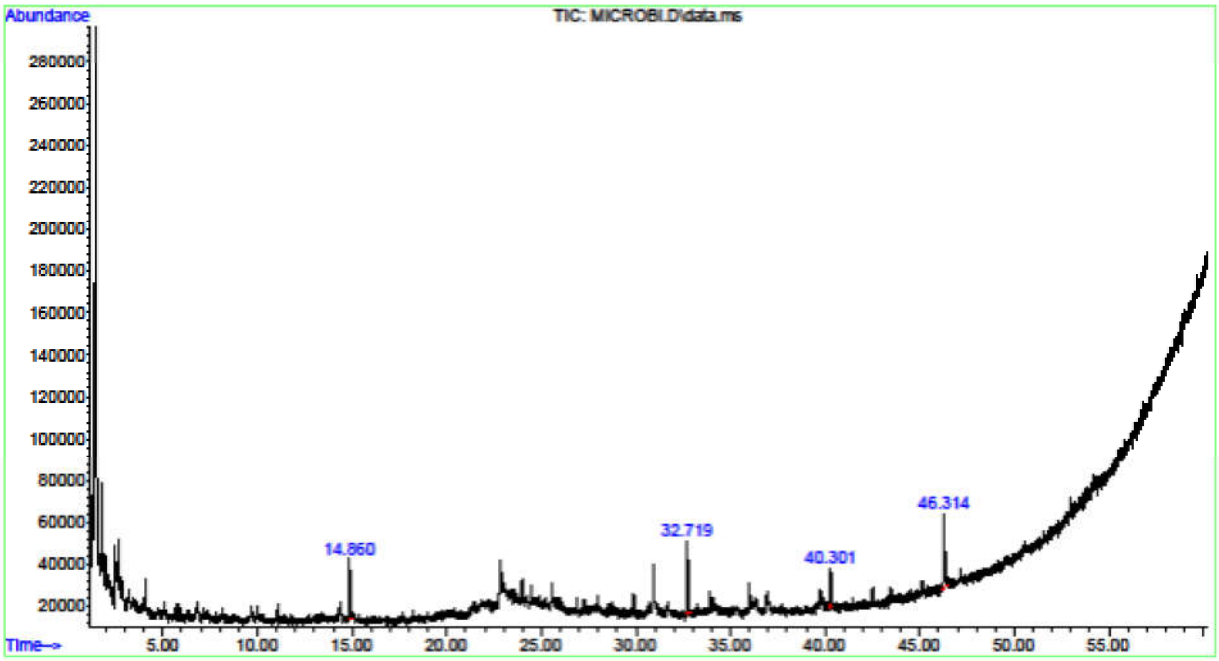
شکل ۱: مقایسه فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی کشت *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* علیه سویه‌های پاتوژن و استاندارد *اشریشیاکولای*، *سالمونلا انتریکا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا دیسانتری* به روش انتشار از آگار

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]



شکل ۲: مقایسه فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی کشت *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* برعلیه سویه‌های پاتوژن و استاندارد *اشریشیاکولای*، *سالمونلا انتریکا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا دیسانتری* به‌روش انتشار از دیسک



نمودار ۱. نتایج حاصل از GC/MS

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

جدول ۳: درصد فراوانی نتایج حاصل از GC/MS

درصد فراوانی	جرم مولی	ترکیب‌های شناسایی شده
٪۵۰	۱۴/۸۶۰	۱-۷- دی متیل ۳- فنیل-تیلیدین بای سیکلو
٪۵۵	۳۲/۷۱۹	۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سینامات
٪۳۵	۴۰/۳۰۱	۱و۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید
٪۵۸	۴۶/۳۱۴	فنول ۲-۴- بیس (۱-۱- دی متیل اتیل)

نتایج آزمون‌های آماری

فعالیت ضدمیکروبی *اگزیگوباکتریوم* برای هر سویه باکتریایی سه مرتبه تکرار شده است. *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* در روش انتشار از چاهک نسبت‌به روش انتشار از دیسک، میزان مهارکنندگی خوبی را از خود نشان داد. و اختلاف معنی‌داری بین روش انتشار از چاهک و دیسک مشاهده شد. هم‌چنین بیش‌ترین اثر ضدباکتری اگزیگوباکتریوم طی روش انتشار از چاهک روی سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* PTCC 1231 با هاله عدم رشد ۸/۵ میلی‌متر نسبت‌به دیگر باکتری‌ها تفاوت معنی‌دار وجود داشت. و مشاهده شد که بیش‌ترین درصد فراوانی در روش GC/MS متعلق‌به فنول ۲-۴- بیس (۱-۱- دی متیل اتیل) با ٪۵۸ و جرم مولی ۴۶/۳۱۴ بود.

بحث

هدف این مطالعه، بررسی خاصیت آنتاگونیستی *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* با روش‌های انتشار از چاهک و انتشار از دیسک و هم‌چنین شناسایی ترکیب‌های فعال زیستی تولید شده در فازهای رشد لگاریتمی و یا فاز رشد ثابت است. گونه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* یک باسیل گرم مثبت است که در محیط کشت پایه نوترینت آگار پیگمان زرد تولید می‌کند. این باکتری به‌عنوان یک باکتری جدید آلکالوفیل با قدرت بالای کاتالازی شناخته می‌شود که پتانسیل آنتاگونیسمی آن به‌طور کامل شناخته شده نیست. سویهٔ *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم*، از نظر تولید HCN و سیدروفور مثبت است. به‌طورکلی تحقیقات اندکی در ارتباط با این باکتری و اثرهای ضدمیکروبی آن انجام شده است (۱۶،۱۷). این باکتری در سال ۱۳۸۸ از آب‌های ساحلی دریای خزر جداسازی و توسط PCR شناسایی گردید. این باکتری توانایی بالای آنتاگونیسمی در مقابل باکتری‌های *سالمونلا تایفی*، *اشریشیاکلای*، استافیلوکوکوس *اوریوس* و *شیگلا فلکسنری* از خود نشان داد (۱). در مطالعه Yumoto و همکاران در سال ۲۰۰۴ باکتری *اگزیگوباکتریوم اکسیدتلورانس* از گیاهان اطراف آب جداسازی گردید. این باکتری آلکالوفیل بوده و توانایی کاتالازی بالایی از خود نشان داد و در محدوده pH ۷تا۱۰ توانایی رشد داشت (۱۵). در بررسی Selvakumar و همکارانش در سال ۲۰۰۹ سویهٔ *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* 1P از خاک کوه‌های هیمالیا در شمال غربی هندوستان شناسایی شده است و بررسی‌های انجام شده نشان داد این باکتری با تولید مواد فعال زیستی از جمله تولید HCN و سیدروفور دارای اثرهای بازدارندگی خوبی است. ترکیب‌های تولید شده توسط این باکتری، دارای قدرت در بازدارندگی قارچ رشته‌ای *رایزوکتونیا سولانی*، *اسکلروتیوم رولفسی* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* به‌ترتیب به‌مقدار ۴۵/۵۵، ۴۱/۳۸ و ۳۹/۷۴ درصد بود (۱۳). طی بررسی Barnett و همکاران جلوگیری از رشد *R. solani* AG-8 روی گندم در یک رابطه متقاطع توسط اگزیگوباکتریوم پنتوئا (*Exiguobacterium Pantoea*) و *میکروباکتریا* گزارش گردید هم‌چنین طی این بررسی برای اولین بار توانایی آنتاگونیسمی سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* در مقابل پاتوژن‌های چندگانه قارچی گیاهان مشاهده گردید (۲). در مطالعه ما نیز سوپرناتانت کشت باکتری *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* خاصیت ضدمیکروبی خوبی از خود نشان داد که بیش‌ترین اثر طی روش چاهک و روی سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا سروار پاراتیفی با هاله عدم رشد ۸/۵ میلی‌متر مشاهده گردید.در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

نهایت سوپرناتانت حاصله به کمک روش GC/ MS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در روش GC/MS ترکیب‌های ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سینامات، ۱-۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید، ۱ -۷-دی متیل ۳- فنیل- تیلیدین بای سیکلو (۲-۲-۱)- هپتان-۲- اون و فنول ۲-۴- بیس (۱-۱- دی متیل اتیل) دارای بیش‌ترین فراوانی و شاخص‌ترین ترکیب‌ها بودند. ترکیب ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سینامات، یک ترکیب خطی ساده است که در آن ۱۰۰٪ HCN وجود دارد. HCN بر راه های تنفسی ریشه گیاهان و قارچ‌ها اثرگذار است و چندین گونه‌های قارچی شناخته شده‌اند که تحت تأثیر HCN تولیدی توسط باکتری ریزوسفری قرار گرفته‌اند (۱۳). طی مطالعه‌های ما نژاد *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* با تولید HCN رشد برخی از باکتری‌های پاتوژن را مهار کرد. همان‌طورکه در مطالعه Selvakumar et.al (2009) نیز *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* با تولید HCN قادر به مهار هیف‌های قارچی بود. ترکیب ۱- ۷- دی متیل ۳- فنیل - تیلیدین بای سیکلو (۲-۲-۱)- هپتان-۲- اون، یک ترکیب آروماتیک است که هیدروکسامات از این شاخه است و ترکیب فنول ۲-۴- بیس (۱-۱- دی متیل اتیل) نیز یک ترکیب میکس، فنولی هیدروکساماتی است. این ترکیب‌ها از انواع سیدوروفورمحسوب می‌شوند. توانایی باکتری‌های مختلف در شلاته کردن آهن متفاوت است. سیدروفور تولید شده توسط *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* قادر است مولکول‌های آهن را از محیط جداسازی کند. در مطالعه Selvakumar سیدروفور تولیدی توسط سویه *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* 1P توانست با شلاته کردن آهن (آهن عنصر ضروری برای قارچ‌ها محسوب می‌شود) از رشد قارچ‌ها جلوگیری کند (۱۳). که در مطالعه ما نیز ممکن است. یکی از دلایل خاصیت آنتاگونیسمی *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* باشد.

نتیجه‌گیری

امروزه با افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عوارض‌های ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، استفاده از درمان‌های جایگزین ضروری به‌نظر می‌رسد. سوپرناتانت باکتری *اگزیگوباکتریوم استیلیکوم* با توانایی بالای ضدمیکروبی و داشتن ترکیب‌های مفید با خاصیت مهارکنندگی می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی مطرح باشد. البته برای اثبات دقیق‌تر اثر این باکتری و متابولیت‌های حاصله از آن در شرایط درونی انسان، به تحقیقات جامع‌تری نیاز است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

منابع

1. Yousefi S, Faezi Qasemi M, Amir Mozaffari N. Investigation of production of biologically active substances in bacteria isolated from coastal waters of Caspian Lake. Journal of Life Sciences of Lahijan Branch, Winter 2009; Third Year, No.4.

2. Barnett SJ, Roget DK, Ryder MH. Suppression of *Rhizoctonia solani* AG-8 induced disease on wheat by the interaction between *Pantoea*, *Exiguobacterium* and *Microbacteria*. Aust J Soil Res, 2006; 44:331–342.

3. Chaturvedi P, Prabahar V, Manorama R, Pindi PK, Bhadra B, Begum Z, Shivaji S. *Exiguobacterium soli* sp nov., a psychrophilic bacterium from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Int J Syst Evol Microbiol, 2008; 58:2447–2453.

4. Chaturvedi P, Shivaji S. *Exiguobacterium* indicum sp nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. Int J Syst Evol Microbiol, 2006; 56:2765–2770.

5. Collins MD, Kroppenstedt RM. Lipid-composition as a guide to the classification of some coryneform bacteria-containing an A4-alpha type peptidoglycan. Syst Appl Microbiol, 1983; 4:95–104.

6. Collins MD, Lund BM, Farrow JAE, Schleifer KH. Chemotaxonomic study of an alkaliphilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen nov., sp. nov. J Gen Microbiol, 1983; 129:2037–2042.

7. Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell-walls based on lysine and the non-spore-forming genera Caryophanon, *Exiguobacterium*, Kurthia, and Planococcus. Int J Syst Bacteriol, 1994;44:74–82.

8. Knudston KE, Haas EJ, Iwen PC. Characterization of a Gram-positive non spore forming *Exiguobacterium* like organism isolated from a western Colorado (USA) hot spring. Abstr: Annu Meet Am Soc Microbiol, 2001; 1(92):30.

9. Miteva VI, Sheridan PP, Brenchly JE. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. Appl Environ Microbiol, 2004; 70:202–213.

10. Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002; 81:537–547.

11. Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plant to infection with Erwinia carotovora subsp. atroseptica. Appl Environ Microbiol, 2002; 68:2261–2268.

12. Rodriguez DF, Goris J, Vishnivetskaya. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. Extremophiles, 2006; 10:285–294.

13. Selvakumar G, Joshi P, Nazim S, Mishra PK, Kundu S, Gupta HS. *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. World J Microbiol Biotechnol, 2009; 25:131–137.

14. Wada M, Yoshizumi A, Furukawa Y. Cloning and expression of *Exiguobacterium* sp F42 gene encoding a new short chain dehydrogenase, which catalyzes the stereo selective reduction of ethyl 3-oxo

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]

3-(2- thienyl) propanoate to ethyl(S)- 3-hydroxy-3 (2-thienyl) propanoate. Biosci Biotechnol Biochem, 2004; 7:1481–1488.

15. Yumoto I, Hishinuma-Narisawa M, Hirota K, Shingyo T, Takebe F, Nodasaka Y, Matsuyama H, Hara I. *Exiguobacterium oxidotolerans* sp. nov., a novel alkaliphile exhibiting high catalase activity. Int J Syst Evol Microbiol, 2004; 54:2013–2017.

16. Yumoto I, Nakamura A, Iwata H, Kojima K, Kusumoto K, Nodasaka Y, Matsuyama H. Dietzia psychralcaliphila sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. Int J Syst Evol Microbiol, 2002; 52: 85–90.

17. Zheng SP, Ponder MA, Shih JY, Tiedje JM, Thomashow MF, Lubman DM. A proteomic analysis of Psychrobacter arcticus 273-4 adaptation to low temperature and salinity using a2-D liquid mapping approach. Electrophoresis, 2007; 28:467–488.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.1.5]