

مقایسه تأثیر سن کشت بر فعالیت ضد باکتریایی فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید استخراج شده از

سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT 3 بر علیه باکتری‌های خورنده فولاد

ابوذر نیکزاد^۱، علی بهرامی^۲، سید یونس صالحی^۱، داریوش عربیان^۲، محمد داوود غفاری^۳، محمد رضا معصومیان^۴

۱. کارشناس ارشد، گروه مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران
۲. استادیار، گروه مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران
۳. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شاهد، تهران
۴. محقق، گروه مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران

چکیده

سابقه و هدف: از مخرب‌ترین نوع خوردگی، خوردگی زیستی می‌باشد که حدود ۲۰-۴۰ درصد خسارات ناشی از خوردگی را در پی دارد. از روش‌های مقابله با خوردگی زیستی تولید محصولات متابولیکی از باکتری‌ها که خود نقش ضد باکتریایی دارند و مانع از رشد و تکثیر باکتری‌های خورنده و خزه‌ها و جلبک‌های دریایی در سطوح فلزات می‌شوند می‌توان نام برد.

مواد و روش‌ها: با توجه به اهمیت موضوع در این پژوهش یک ترکیب زیستی ضد باکتری تولید شد که اثر کشندگی آن روی باکتری‌های خورنده فولاد که از تأسیسات دریایی جداسازی شده بود مورد بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی مشخص شد که ترکیب زیستی تولید شده فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید می‌باشد. تولید آنتی باکتریال فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (PCA) از باکتری سودوموناس آئروجینوزا MUT 3 در هفت روز به صورت ناپیوسته بررسی شد.

یافته‌ها: آنچه آزمایشات نشان داد بیشترین میزان تولید وزنی عصاره ضد میکروبی مربوط به روز ششم با تولیدی برابر ۰/۳۱۳ g/l بود اما با تست فعالیت آنتی باکتریال مشاهده شد هاله عدم رشد و منطقه بازدارندگی در روز چهارم نسبت به روزهای دیگر بزرگتر بوده و آنالیز کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) نشان دهنده خلوص بیشتر PCA در این روز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان اثر ضد باکتریایی آنتی باکتریال تولیدی را پس از چهار روز کشت بیشتر از روزهای دیگر قلمداد کرد و در پژوهش‌های آینده بر روی فرمولاسیون این ماده زیستی در رنگ‌های دریایی به کار برد.

کلمات کلیدی: خوردگی زیستی، آنتی باکتریال فنازین، هاله عدم رشد، کروماتوگرافی، کشت ناپیوسته

مقدمه

به از بین رفتن یا نابودی یک فلز بوسیله فرایندهای خوردگی که به طور مستقیم یا غیر مستقیم نتیجه فعالیت موجودات جاندار است خوردگی زیستی می‌گویند (۱۰ و ۱). طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در طبیعت وجود دارند که می‌توانند در فرایندهای خوردگی مؤثر باشند، آن‌ها دارای ساختار سلولی پروکاریوت^۱ (مانند باکتری تیوباسیلوس^۲) و یا دارای ساختار

*نویسنده مسئول: دکتر علی بهرامی

پست الکترونیکی: a_bahrami@mut.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۱۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۰۶

² Thiobacillus

¹ Prokaryotic

پژوهشکده علوم و فن‌آوری‌های زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر جداسازی شد و شناسایی این سویه باکتریایی در مرکز جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران به دو روش مولکولی و بیوشیمیایی انجام شد. این سویه وحشی در شرایط ۲۰٪ گلیسرول و دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

نمونه پس از خروج از محیط ذخیره کشت بر روی محیط LB آگار^۶ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس، یک کلنی از روی پلیت مورد نظر به یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری که محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB برات^۷ بود، منتقل شد. کشت به مدت ۱۴ ساعت و با دورهمزن ۱۲۰ rpm و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه شیکر انکوباتور^۸ هم زده شد.

محیط کشت مورد نظر، محیط کشت تولید آنتی‌باکتریال با ترکیبات جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت تولید آنتی‌باکتریال

غلظت (gr/lit)	ترکیب
۳	Yeast Extract
۳	Peptone
۵	Meat Extract
۳	Glucose
۱/۵	K ₂ HPO ₄
۱/۵	KH ₂ PO ₄
۵	NaCl

محیط کشت معرفی شده در جدول ۱ درون هفت ارلن مایر ۱ لیتری جهت بررسی بهترین سن کشت آنتی‌باکتریال به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر به حجم رسانده شد و در شرایط ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد (۱۵). لازم به ذکر است که گلوکز به صورت جداگانه و به وسیله آب مقطر به حجم رسانده شده و بعد از سترون سازی به سایر مواد محیط کشت

سلولی یوکاریوت^۱ (مانند قارچ‌هایی چون هورموکونیس رزینا^۲) می‌باشند (۸). میکروب‌ها می‌توانند به‌طور فعال در فرایندهای خوردگی شرکت کنند و روی ترمودینامیک و سرعت‌های واکنش‌های الکتروشیمیایی درآند، کاتد یا هر دو اثر بگذارند (۱۸)، هم‌چنین می‌توانند حد واسط فلز- محلول و پتانسیل اکسایش کاهش زیر لایه را از طریق گروهی از مکانیسم‌های بهم وابسته حاکم تغییر دهند (۱۶ و ۱۴).

از روش‌های مقابله با خوردگی زیستی تولید محصولات متابولیکی از باکتری‌ها که خود نقش ضد باکتریایی^۳ دارند و مانع از رشد و تکثیر باکتری‌های خورنده و خزها و جلبک‌های دریایی در سطوح فلزات می‌شوند می‌توان نام برد (۲). آنتی‌باکتریال‌ها متابولیت‌های ثانویه درون سلولی می‌باشند که در فاز سکون^۴ رشد سلولی تولید می‌شوند و با استخراج و تغلیظ از سویه مورد نظر و خالص‌سازی و ترکیب با پوشش‌های ضد خوردگی کارکرد وسیعی پیدا می‌کنند (۴).

از جمله آنتی‌باکتریال‌های مؤثر در خوردگی زیستی نوع فنازین (Phenazine) می‌باشد که با فرمول شیمیایی C₁₂H₈N₂ یک ترکیب شیمیایی با شکل ظاهری پودری زرد و قهوه‌ای رنگ می‌باشد که از گونه باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا^۵ که باکتری است که از خاک و آب و غالب نمونه‌های کلینیکی جدا می‌شود استخراج می‌شود (۲۰).

از آنجا که در پژوهش‌های گذشته در دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تولید فنازین و تأثیر آن بر ممانعت از خوردگی در فلزاتی چون فولاد و آلومینیوم به اثبات رسیده (۱۷) در این مطالعه سعی شد تا با بررسی تولید و تغلیظ ماده ضد باکتریایی تولید شده توسط سویه Pseudomonas aeruginosa MUT3 و مقایسه عملکرد ضد خوردگی این ماده در هفت روز کشت متوالی به زمان بهینه کشت دست یافت و با مقایسه قطر هاله عدم رشد و آنالیز HPLC هر کدام از نمونه‌ها به مؤثرترین زمان کشت تولید عصاره ضد باکتری بر علیه باکتری‌های خورنده نائل شد.

مواد و روش تحقیق

میکروارگانیسم و آماده‌سازی مایه تلقیح و محیط کشت میکروارگانیسم مورد استفاده در این پژوهش از نوع سودوموناس آئروجینوزا می‌باشد که از چشمه‌های آب گرم محلات توسط

⁵ Pseudomonas aeruginosa

⁶ LB Agar

⁷ LB Broth

⁸ Shaker incubator

¹ Eukaryotic

² Hormoconis resiniae

³ Antibacterial

⁴ Stationary

تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-ملکولی، دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳ مقایسه تأثیر سن کشت ...

افزوده شد. سپس با سرد شدن محیط‌های کشت تا دمای اتاق مایه تلقیح به میزان ۰.۵٪ حجمی به محیط کشت افزوده شد (۹). بعد از افزودن مایه تلقیح به محیط کشت، نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ rpm هم‌زده شد.

سویه‌های خورنده‌ی در این آزمون شامل سه سویه خورنده هوازی MUT.20، MUT.33 و MUT.39 (۱۴) و سه سویه‌ی باکتری خورنده احیاء‌کننده گوگرد (SRB) بی‌هوازی SRB.1، SRB.2 و SRB.3 از مؤسسه تحقیقات صنعت نفت ایران (RIPI-Tehran Iran) می‌باشند. محیط کشت باکتری‌های خورنده هوازی محیط LB آگار و بی-هوازی‌ها محیط پیشنه‌ادی مؤسسه تحقیقاتی صنعت نفت می‌باشد که در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲ - محیط کشت باکتری‌های خورنده

مقدار (گرم بر لیتر)	ترکیبات محیط کشت باکتری هوازی
۰/۵	KH ₂ PO ₄
۱	Na ₂ SO ₄
۱	NH ₄ Cl
۲	MgSO ₄ .7H ₂ O
۱	CaCl ₂ .6H ₂ O
۳/۵	Sodium lactate
۱	Yeast extract
۰/۵	FeSO ₄ .7H ₂ O
۰/۱	Ascorbate
۰/۱	Thioglycolate
۱۵	Agar
pHV/۶	

در این پژوهش از انواع میکروارگانیسم‌های خورنده، از قبیل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی خورنده در محیط آب دریا استفاده شد.

باکتری‌های خورنده این آزمون شامل انواع هوازی و بی‌هوازی (SRB) بوده که در مطالعات گذشته جدا شده است.

فعالیت آنتی‌باکتریال

در این روش به منظور بررسی قدرت ضد خوردگی ماده ضد باکتری تولیدی در روزهای مختلف، روش نفوذ دیسکی انجام شد.

منحنی رشد سویه

با افزودن مایه تلقیح حاوی سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT3 مورد نظر به محیط کشت مایع و قراردادن محیط در دستگاه شیکر انکوباتور جهت هم‌زدن با دور ۱۲۰ rpm، در ساعات مختلف مقداری از محیط را جدا کرده و با دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. با تکرار این فرایند تا زمانی که کدورت کاهش یافت منحنی شامل نسبت کدورت به زمان رسم شد.

استخراج آنتی‌باکتریال

در فرایند استخراج و تغلیظ، ابتدا نمونه محیط کشت مورد نظر جهت جداسازی توده سلولی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شد (۱۲). توده سلولی در این مرحله جدا شده و با اسیدی کردن محیط تا pH=۲ ناخالصی‌ها در محیط کشت حل شد و با سانتریفیوژ مجدد با شرایط ذکر شده در حالت قبل، مایع رویی جهت استخراج ماده ضدباکتری با حلال اتیل استات با نسبت ۱:۱ در دکانتور ۱ لیتری به مدت ۳۰ ثانیه به خوبی هم زده شد تا دو فاز آبی و آلی از هم تفکیک شوند و جهت جداسازی فاز آلی و آبی به مدت ۴ ساعت در دکانتور نگه داشته شد سپس فاز آلی جداسازی شده در داخل دستگاه تقطیر کننده قرار گرفت. فاز آلی تقطیر شده در دستگاه، برای جداسازی کامل ماده ضدباکتری تغلیظ شد.

آنالیز کروماتوگرافی

به منظور انجام کروماتوگرافی مایع فشار بالا (HPLC) از ستون C18 با طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر و قطر خارجی ۶ میلی‌متر استفاده شد که این ستون به وسیله پرکن‌های اکتا دیسیل سیلیکا با قطر متوسط ۵ میکرومتر پر شده است. تمامی آزمایشات آنالیز HPLC در سرعت تزریق ۱ میلی‌متر بر دقیقه و در طول موج ۲۵۰ نانومتر انجام گرفت.

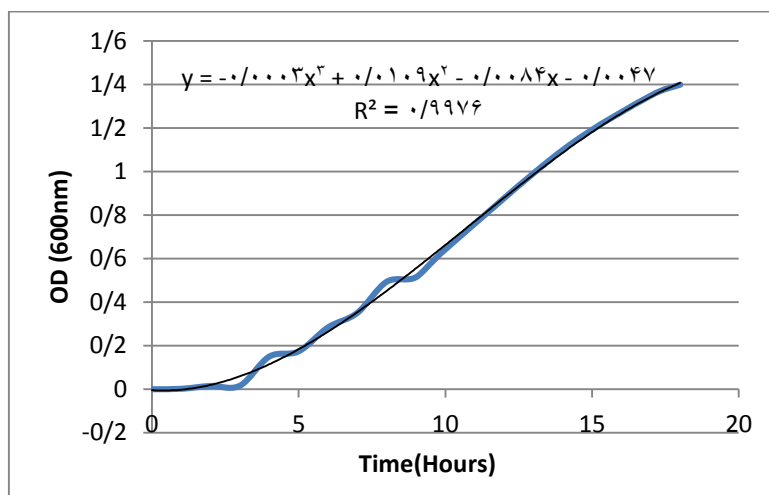
آزمون باکتری‌های خورنده

باکتری خورنده فولاد دریایی به عنوان نمونه در سطح پلیت به کمک پیپت پاستور به طور کامل کشت شد، سپس از روش نفوذ دیسکی استفاده شد، به این صورت که دیسک های آغشته به آنتی باکتریال در روزهای مختلف از روز اول تا هفتم بر روی پلیت محتوی باکتری خورنده قرار گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند تا تأثیر فعالیت آنتی باکتریال با ایجاد هاله عدم رشد باکتری خورنده مشخص شود.

رسم منحنی رشد

با توجه به این مسئله که ماده ضد باکتری به عنوان متابولیت ثانویه در انتهای فاز لگاریتمی تولید می‌شود، از لحظه ابتدای تلقیح باکتری تا ۱۸ ساعت پس از کشت، میزان کدورت و رشد باکتری در محیط با رسم منحنی رشد طبق آنچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود به دست آمد. بر اساس این منحنی انتهای فاز لگاریتمی این سویه تقریباً ۱۶ ساعت پس از کشت می‌توان اطلاق کرد.

یافته‌ها



شکل ۱: منحنی رشد سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT3

محاسبه شد. جدول ۳ وزن خشک نمونه‌ها در طی ۷ روز کشت، به صورت ناپیوسته^۱ را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بیشترین میزان تولید مربوط به روز ششم بعد از کشت می‌باشد

جدول ۳: میزان تولید آنتی باکتریال بعد از هفت روز کشت

روز کشت	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم
میزان تولید عصاره ضد میکروبی (gr/l)	۰/۱۹۷	۰/۲۱۳	۰/۲۳۹	۰/۲۶۷	۰/۲۹۳	۰/۳۱۳	۰/۳۱۳

مقادیر آنتی باکتریال تولیدی

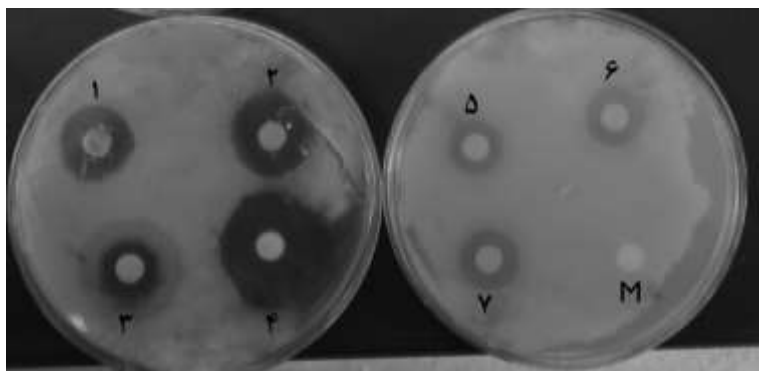
بعد از تغلیظ و خشک کردن فاز آلی جدا شده در دستگاه تقطیر کننده، میزان وزن خشک آنتی باکتریال تولیدی با دقت ۰/۰۰۱

^۱ Batch

فعالیت آنتی‌باکتریال

در این روش به منظور بررسی قدرت ضد خوردگی ماده ضد باکتری تولیدی در روزهای مختلف، روش نفوذ دیسکی انجام شد.

همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود بزرگترین هاله عدم رشد مربوط به دیسک آنتی‌باکتریال روز چهارم می‌باشد که نشان‌دهنده بیشترین فعالیت ماده ضدباکتری تولید شده در این روز می‌باشد.



شکل ۲: تشکیل هاله عدم رشد باکتری خورنده توسط آنتی‌باکتریال در طی هفت روز کشت

(۱) روز اول بعد از کشت (۲) روز دوم (۳) روز سوم (۴) روز چهارم (۵) روز پنجم (۶) روز ششم (۷) روز هفتم (M) متانول

پس از انجام آزمایش فعالیت ماده ضد باکتری، جهت ارزیابی آماری بهترین عملکرد در جلوگیری از رشد باکتری خورنده، براساس آنچه جدول ۴ نشان می‌دهد قطر هاله ایجاد شده مربوط به هر کدام از روزهای کشت به دقت اندازه‌گیری شد.

در شکل ۲ حرف M تأثیر متانول بر باکتری خورنده را نشان می‌دهد که به عنوان شاهد استفاده شد و همان‌طور که مشخص است هیچ خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری خورنده ایجاد نمی‌کند و این نشان از تأثیر خالص آنتی‌باکتریال تولیدی بر باکتری خورنده است.

جدول ۴- اندازه قطر هاله عدم رشد در روزهای مختلف کشت ماده ضد باکتری

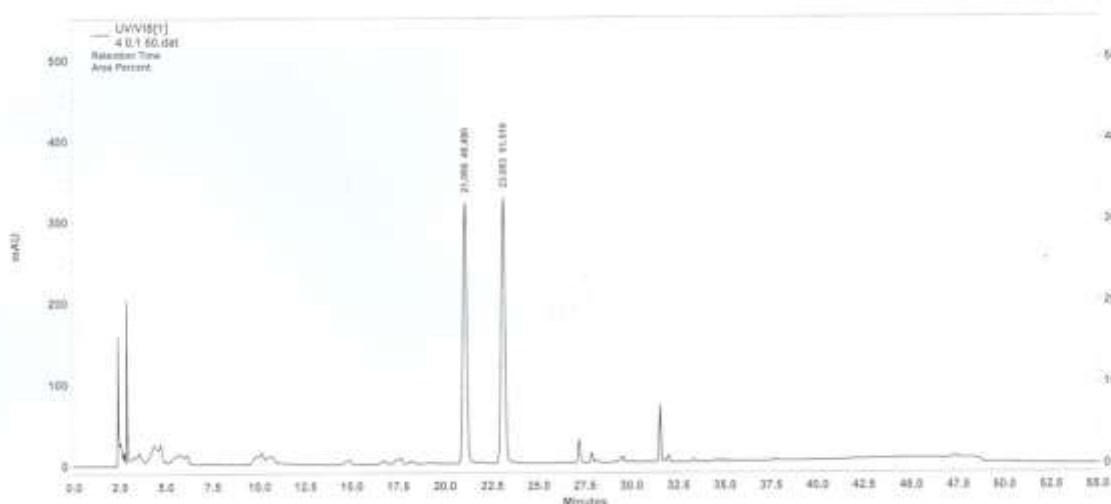
زمان کشت	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم
قطر هاله	۱۷ cm	۱۹ cm	۱۴ cm	۲۶ cm	۱۳ cm	۱۵ cm	۱۴ cm

همان‌طور که گفته شد روز چهارم بعد از کشت از لحاظ فعالیت ضد باکتریایی بهینه‌ترین حالت را دارد پس لزوم تشخیص خلوص آنتی‌باکتریال تولیدی احساس شد در نتیجه آنالیز کروماتوگرافی انجام گرفت و طبق آنچه در شکل ۳ مشاهده می‌شود پیک‌های مطلوب در زمان ماند حدود ۲۱ و ۲۳ دقیقه دیده شد اما وجود پیک‌های کوچک در زمان‌های ابتدایی نشان از تشکیل اسیدهای چرب بودند که جداسازی ناحیه ابری در فاز آلی هنگام استخراج آنتی‌باکتریال می‌تواند ناخالصی‌ها را از بین ببرد.

آنچه مشخص است قطر هاله در روز چهارم بسیار بیشتر از روزهای دیگر است و این نشان از فعالیت ضد خوردگی بالا در این شرایط می‌باشد.

آنالیز کروماتوگرافی

پیک‌های مربوط به آنالیز HPLC آنتی‌باکتریال فنازین تقریباً در زمان ماند ۲۱ و ۲۳ دقیقه ایجاد می‌شود (۷). با رقیق سازی نمونه‌ها با متانول، جهت آنالیز آماده شدند، در این روش هدف، تشخیص جداسازی و اندازه‌گیری مواد تشکیل دهنده یک نمونه مورد آزمایش می‌باشد که هر جز می‌تواند بر اساس نوع ترکیب در زمان ماند خاصی پیک‌هایی را ایجاد کند.



شکل ۳: آنالیز محصولات متابولیت ثانویه سویه پس از خالص سازی در روز چهارم

بحث

آنتی‌باکتریال تولیدی از سویه بومی سودوموناس آئروجینوزا MUT3 با استفاده از محیط پایه گزارش شده در این مقاله، در زمان‌های کشت متفاوت، میزان تولید متفاوت و قطر هاله عدم رشد مختلفی از خود نشان می‌دهد.

در تحقیق حاضر تولید ماده ضد باکتری در دوره‌های زمانی یک تا هفت روز گرماگذاری بررسی شد، با توجه به آزمایش‌های انجام گرفته، بیشترین میزان تولید به میزان 0.313 g/l مربوط به روز ششم می‌باشد اما با توجه به تست نفوذ دیسکی، فعالیت آنتی‌باکتریال در روز چهارم بیشتر از دیگر نمونه‌ها بود و خاصیت بازدارندگی بیشتری دارد.

مطالعه هوآنگ و همکارانش نشان می‌دهد تولید آنتی‌باکتریال فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید وابسته به رشد نیست و به عنوان متابولیت ثانویه معرفی می‌شود (۱۳). در این تحقیق نیز نتایج به دست آمده از حداکثر میزان تولید، نشان دهنده تولید فنازین در انتهای فاز لگاریتمی و در فاز سکون می‌باشد و به عنوان متابولیت ثانویه اثبات می‌گردد. نتایج بررسی جین جیانگ سو و همکارانش بیانگر تولید PCA از سویه‌های وحشی سودوموناس در محیط پایه پس از ۶۰ ساعت کشت به میزان حداکثر 0.15 g/l می‌باشد (۱۱). در حالی که در این مطالعه سویه وحشی و بومی پس از کشت در مدت زمان مشابه به میزان ۱.۵ برابر افزایش تولید آنتی‌باکتریال نسبت به گزارش سو و همکارانش نشان می‌دهد، که با توجه به مطالعات جی و همکارانش بر روی سویه‌های جهش یافته از همین گونه که منجر به افزایش تولید چشمگیر فنازین شده است (۵)، لزوم انجام مطالعات آینده بر

سویه‌های مهندسی ژنتیک شده احساس می‌شود. در این مقاله قطر هاله عدم رشد در روزهای مختلف کشت بر باکتری‌های خورنده SRB مقایسه شد که ماده ضد باکتری تولیدی در تمامی زمان‌های کشت دارای هاله بازدارندگی بوده و بزرگترین هاله مربوط به فنازین تولیدی بعد از ۴ روز کشت گزارش شده، در این مورد نیز در مقایسه با مطالعات مشابه قطر هاله ایجاد شده قابل توجه است (۱۵ و ۳۶). پیک‌های مربوط به آنالیز HPLC در مطالعه کاویتا و همکارانش در زمان ماند ۲۱ و ۲۳ دقیقه ایجاد می‌شود (۷) که مطابق آنچه در شکل ۳ این مقاله مشخص است دو پیک نسبتاً بزرگ در این محدوده بیانگر بیشترین میزان تولید فنازین در روز چهارم پس از کشت می‌باشد.

تأثیر مثبت آنتی‌باکتریال تولیدی بر باکتری‌های خورنده جدا شده از منابع دریایی می‌تواند زمینه استفاده این مواد در پوشش‌های ضد خوردگی جهت تأسیسات دریایی را در برداشته باشد که بهینه‌سازی و بررسی فرمولاسیون آنتی‌باکتریال در رنگ‌های دریایی در برنامه آتی این پژوهشگر قرار دارد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش بر اساس زمان‌های کشت متفاوت میزان وزنی تولید آنتی‌باکتریال مختلفی در برداشت. با توجه به آزمایشات انجام گرفته، بیشترین میزان تولید مربوط به روز ششم پس از کشت می‌باشد اما از آنجا که ناخالصی‌ها و وجود ترکیبات نامطلوب در وزن خشک تولیدی عامل ضد باکتریایی ندارد، آنالیز کروماتوگرافی و روش نفوذ دیسکی نشان‌دهنده بیشترین فعالیت ضد میکروبی در روز چهارم پس از کشت است. این نتایج در بهبود روش‌های آبی در زمینه بهینه‌سازی محیط

تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-ملکولی، دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳ مقایسه تأثیر سن کشت ...
کشت و فرمولاسیون این ماده زیستی در رنگ‌های دریایی مؤثر
است. آزمایشگاه بیوشیمی و بیوفیزیک و تجهیزات و امکانات لازم در
راستای این پژوهش قدردانی و تشکر فراوان به‌عمل می‌آید.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران و مسئولین پژوهشکده علوم و فناوری‌های
زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر جهت در اختیار قرار دادن

منابع

۱. غفاری م د. (۱۳۹۱)، بررسی خوردگی فولاد کربنی گرید E در حضور باکتری‌های جداسازی شده از چاه نفت و مناطق شور، پروژه نخبگی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران.
2. Brenda J. L, Jason S.L, Microbiologically Influenced Corrosion. John Wiley & Sons, Inc, DOI:(2009),10.1002/0471238961.
3. "Dorlands Medical Dictionary:antibacterial". Archived from the original on 2010-Retrieved 2010-10-29.
4. Ge, Y.H., Huang, X.Q., Wang, S.L., Zhang, X.H., Xu, Y.Q. Phenazine-1- carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by gacA in *Pseudomonas* sp. M18. FEMS Microbiol.(2004). Lett. 237, 41–47.
5. Ghafari M.D, Bahrami A, Rasooli I, Arabian D, Ghafari F,Bacterial exopolymeric inhibition of carbon steel corrosion,International Biodeterioration and Biodegradation (2013) ,80-29-33.
6. Huang, J.F., Xu, Y.Q., Zhang, H., Li, Y.Q., Huang, X.Q., Ren, B., Zhang, X.H., Temperature-dependent expression of phzM with its regulatory genes lasI and ptsP in rhizosphere isolated *Pseudomonas* sp. strain M18. Appl. Environ. Microbiol. (2009). 75, 6568–6580.
7. Iverson W. P,Biological corrosion in Advance in corrosion Science and Technology.Plenum Press, New York, (1972), 2:1-42.
8. J.L. Brenda, S.L.Jason, Microbiologically Influenced Corrosion, John Wiley & Sons, Inc, (2009), DOI: 10.1002/0471238961.
9. Jayaraman A, Hallock P J, Carson R M, Lee C C., Mansfeld F, Wood T K, Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. Applied Microbiology and Biotechnology, (1999), 53(2): 267-275.
10. Jin-Jiang Su, Quan Zhou, Hong-Yan Zhang, Ya-Qian Li, Xian-Qing Huang, Yu- Quan Xu. Medium optimization for phenazine-1-carboxylic acid production by a gacA qscR double mutant of *Pseudomonas* sp. M18 using response surface methodology. Bioresource Technology 101 (2010) 4089–4095.
11. Kavitha K, Mathiyazhagan S, Sendhilvel V, Nakkeeran S, Chandrasekar G, W. G Fernando, Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. Archives of Phytopathology and Plant Protection. Vol. 38, No. 1, (2005), Pp. 69 – 76.
12. Krieg N.R, Bergey J.G, Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. 428 East Preston Street,Baltimore, (1984) MD 21202,USA.
13. Madhava Charyulu E, Sekaran G, Suseela Rajakumar G & Arumugam Gnanamani, Antimicrobial activity of secondary metabolite from marine isolate, *Pseudomonas* sp.against Gram positive and negative bacteria including MRSA. India Journal of Experimental Biology, (2009), Vol.47 pp.964-968.

14. Makarand R Rane, Prashant D Sarode, Bhushan L Chaudhari, Sudhir B Chincholkar Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of pseudomonas aeruginosa. Journal of scientific & industrial research vol.66 2007, pp.627-631.
15. Rongjun Zuo, Biofilms: Strategies for metal Corrosion inhibition employing microorganisms. Appl microbial Biotechnol, (2007),76: 1245 – 1253.
16. Saha S, Thavasi R and Jayalakshmi S, Phenazine Pigments from Pseudomonas aeruginosa and Their Application as Antibacterial Agent and Food Colourants . Research Journal of Microbiology, (2008), 3: 122-128.
17. Saosong K, Wongphathanakul W, Chanokporn Poasiri, Chalerm Ruangviriyachai, Isolation and Analysis of Antibacterial Substance Produced from P. aeruginosa . (2009), TISTR 781. KKU Sci. J.37(2) 163-172 .
18. Schweitzer A, Philip A, Fundamental of corrosion mechanisms causes and preventative methods. CRC Press,(2010).
19. Shi X, Avci R, Lewandowski Z,Comparative study in chemistry of microbiology and electrochemistry initiated pits of type 316L stainless steel. Corros.Sci vol 45(11),(2003),pp.2577-95.
20. Videla H.A, Manual of Biocorrosion, L Lewis Publishers CRC Press, USA,(1996), pp. 273.