



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 Tajan², Alireza Azizollahi Aliabadi²

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* serpvvar *paratiphi* PTCC 1231 with 8.5 mm zone of inhibition based on GC/MS analysis 2- ethyl hexyl parametoxo cynamate, 1-2-benzen-dicarboxylic 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 pharmaceuticals, 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

Corresponding author:

Department of Microbiology, Faculty of Biology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: morteza_azizollahi@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

ارزیابی ترکیب های ضد میکروبی تولید شده توسط اگزیکوباکتریوم/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 فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جورجیا.

چکیده

سابقه و هدف: بسیاری از میکروارگانیسم ها عوامل ضد میکروبی تولید می کنند که آن ها را در شرایط سخت محیطی حمایت می کنند. گونه های اگزیکوباکتریوم به طور خاصی با محیط اطراف خود وقف یافته اند و بر حسب نوع گونه و شرایط محیطی دارای تنوع گسترده ای هستند. هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی خاصیت ترکیب های ضد میکروبی توسط اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم است.

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

یافته ها: مایع رویی کشت باکتری اگزیکوباکتریوم خاصیت ضد میکروبی 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 میلی متر مشاهده شد. در روش GC/MS نیز ترکیب های ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سینامات، ۱-۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید، ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل- تیلیدین بای سیکلو (۱-۲-۲)- هپتان-۲- اون و فنول ۲-۴- بیس (۱-۱- دی متیل اتیل) شاخص ترین ترکیب ها بودند.

نتیجه گیری: طبق نتایج به دست آمده از اگزیکوباکتریوم با توانایی بالای ضد میکروبی و داشتن ترکیب های مفید با خاصیت مهار کنندگی بالا می تواند به عنوان یک عامل ضد میکروبی مطرح باشد.

واژه های کلیدی: اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم، GC/MS، خاصیت ضد میکروبی، مایع رویی کشت

مقدمه

متابولیت های ثانویه در باکتری ها در نتیجه شرایط خاص محیطی همانند محدودیت منابع غذایی و غیره در فاز سکون از زندگی باکتری ها تولید می شوند و در شرایط سخت

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های 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

است. سویه *اگزیکوباکتریوم* Z8 قادر به خنثی سازی فاضلاب قلیایی صنایع پارچه بافی است و سویه Sz پتانسیل بالایی را برای جداسازی آفت کش نشان می دهد و سویه WK6 قادر به کاهش آرسنات به آرسنیت است (۱۴،۱۵). تلاش برای یافتن عوامل کنترل کننده بیولوژیکی جایگزین آنتی-بیوتیک ها امری ضروری به نظر می رسد. از نواحی مختلف جهان میکروارگانیسم هایی شناسایی و جداسازی شده اند که توانایی ضد میکروبی خوبی دارند. *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم*، باسیل گرم مثبت، بی هوازی اختیاری، متحرک، دارای درصد G+C پائین و کلنی های زرد رنگ است. این باکتری می تواند ژلاتین، نشاسته و کازئین را هیدرولیز کرده و تحت فشار و دمای بالا، شوری و pH مختلف زنده بماند (۱۳). از آن به عنوان یک باکتری جدید آلکالوفیل با قدرت بالای کاتالازی یاد می کنند که پتانسیل آنتاگونیسمی آن به طور کامل شناخته شده نیست. برخی تحقیقات تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور توسط سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم*، را گزارش نموده اند (۱۰،۱۳،۱۵). هدف از این پژوهش، بررسی خاصیت آنتاگونیسمی *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* علیه چندین باکتری بیماری زا و استاندارد و هم چنین شناسایی ترکیب های فعال زیستی تولید شده توسط این باکتری با استفاده از تکنیک GC/MS (کروماتوگرافی گازی - اسپکترومتر جرمی) است.

مواد و روش ها

تهیه سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* (PTCC 1756)

این تحقیق که یک مطالعه پژوهشی است طی مدت ۸ ماه در یکی از آزمایشگاه های دانشگاه لاهیجان انجام گرفت، در این مطالعه سویه لیوفیلیزه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردیده و در محیط کورینه باکتریوم براث و نوترینت براث کشت داده شد.

تهیه مایع رویی کشت باکتری *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم*

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

محیطی از آن ها حمایت می کنند. به طور معمول متابولیت ثانویه منحصر به یک ارگانیسم یا یک گروه از ارگانیسم ها هستند و در سایر موجودات زنده یافت نمی شوند. میکروارگانیسم هایی از قبیل باکتری ها و قارچ ها منابع با ارزشی در تولیدات دارویی و ترکیب های زیستی هستند به-طور کلی متابولیت های ثانویه با اهداف گوناگونی جداسازی می شوند به طور مثل شناسایی یک ترکیب ناشناخته با فعالیت بیولوژیکی خاص، جداسازی یک گروه از ترکیب های درون یک ارگانیسم با توجه به مسائل دیگری از قبیل وجود ساختارهای مشترک در آن ها، جداسازی و شناسایی متابولیت های تولید شده به وسیله یک منبع تولیدی زیستی که توسط گونه های دیگر تولید نمی شود، تجزیه شیمیایی یک ارگانیسم برای شناسایی تمام ترکیب های آن و سرانجام به منظور کاربرد و استفاده از این ترکیب ها در زمینه های مختلف و تلاش برای سنتز مصنوعی این ترکیب ها است (۱). جنس *اگزیکوباکتریوم* اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط کالینز و همکارانش شناسایی گردید و در سال ۱۹۹۴، Farrow و همکاران گونه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* را شناسایی و نام گذاری کردند. از آن زمان تاکنون، ۱۱ گونه جدید به این جنس افزوده شده است و از دامنه گسترده ای از زیستگاه ها شامل محیط های سرد و گرم با دامنه دمایی ۱۲ تا ۵۵ درجه سانتی گراد جدا گردیده است. جنس *اگزیکوباکتریوم* شامل گونه هایی مختلفی مانند *اگزیکوباکتریوم اکسیدوتلورانس*، *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم*، *اگزیکوباکتریوم اورانتیکوم*، *اگزیکوباکتریوم/اوندایی* و *اگزیکوباکتریوم/انترکتیکوم* است (۳،۴،۵،۶،۷). گونه های *اگزیکوباکتریوم* از مناطق بسیار متنوعی شامل یخچال های یخی گرینلند، چشم های آب گرم در پارک ملی یلواستون، ریزوسفر گیاهان، محیط پیرامون کارخانجات فرآوری مواد غذایی و همچنین دریای خزر جدا شده اند و به طور خاصی با محیط زیست خود وقف یافته است (۸،۹،۱۱،۱۲). بیش تر گزارش ها حاکی از آن است که این باکتری ها دارای قدرت کاتالازی، اکسیدازی بالا و توانایی تولید بالای آنزیمی هستند و در محیط پایه نوترینت آگار در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه می شوند. چندین سویه از این باکتری دارای مشخصه های منحصر به فردی است که برای کاربرد در فناوری زیستی، صنعت و کشاورزی جالب توجه

$10^8 \times 1/5$ CFU/ml) به دست آید. برای تهیه مایع رویی کشت، سوسپانسیون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد و از مایع رویی باقی مانده برای بررسی خواص ضد میکروبی استفاده شد.

تهیه و آماده سازی باکتری های بیماری زا

چهار سویه شایع بیماری زای باکتریایی، شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431)، *اشریشیا کولای* (PTCC 1399)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188)، *سالمونلا انتریکا* زیر گونه انتریکا سروار پاراتیفی B (PTCC 1231) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه و چهار سویه *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *سالمونلا انتریکا* از آزمایشگاه تشخیص طبی تهیه شدند و در محیط نوترینت براث با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش های انتشار از دیسک و چاهک برای تعیین میزان مهار کنندگی استفاده شد. به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد.

۱- روش انتشار از چاهک (Well Diffusion Agar)

طی این روش از سوسپانسیون باکتری های بیماری زا در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس به کمک پمپ پاستور استریل چاهک هایی روی محیط ایجاد کرده و از سوپرناتانت سویه *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* خالص به میزان ۰/۱ میلی لیتر در چاهک ها ریخته شد، بعد از خشک شدن محیط، پلیت ها در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده علیه هریک از باکتری های بیماری زا توسط خط کش میلی-متری، اندازه گیری شد.

۲- روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion Agar)

دیسک های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی متر به سوپرناتانت سویه *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* به مدت ۵ دقیقه آغشته شد و دیسک ها در دمای 37°C به مدت ۴ ساعت قرار داده شد تا به طور کامل خشک شود. طی این روش از سوسپانسیون باکتری های بیماری زای کشت داده شده در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس دیسک های آغشته به محلول رویی کشت سویه *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری شدند. پس از آن قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سویه *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* علیه هریک از باکتری های بیماری زا توسط خط-کش میلی متری، اندازه گیری شد.

GC/MS

از مایع رویی تهیه شده به میزان ۰/۵ میکرو لیتر برای شناسایی ترکیب های ضد میکروبی توسط تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) با مدل 6890N-5973 MASS selective detector استفاده گردید. طی این تکنیک بر حسب جرم مولی ترکیب های شناسایی شده و نمودار حاصله از آنالیز بر حسب زمان و شدت سیگنال رسم گردید.

بررسی های آماری

با استفاده از نرم افزار SPSS داده های پژوهش بررسی شدند.

یافته ها

فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* که از طریق سانتریفوژ جداسازی شده بود علیه سویه کلینیکی و استاندارد *اشریشیا کولای*، *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 گونه ها توانستند از خود خاصیت ضد میکروبی نشان دهد که توانایی مهار کنندگی آن از ۸/۵-۶/۵ میلی متر متغیر بود.

اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم بیشترین توانایی را در مهار باکتری استاندارد سالمونلا/انتریکا زیر گونه انتریکا سروار پاراتیفی به کمک روش چاهک و کمترین اثر را روی باکتری کلینیکی/شریشیاکولای به کمک روش انتشار از دیسک ازخود نشان داد. به طور کلی مایع رویی کشت این باکتری اثر مهاری بیشتری روی سویه های استاندارد نسبت به 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 اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم روی باکتری های ذکر شده با استفاده از روش های انتشار از دیسک و چاهک در جدول شماره ۱ و ۲ نشان دهنده اثر مهاری سوپرناتانت باکتری اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم است. در طی روش چاهک بیشترین اثر مهاری بر علیه سویه استاندارد سالمونلا/انتریکا (۸/۵) میلی متر) و کمترین میزان مهارکنندگی بر علیه سویه کلینیکی/شریشیاکولای (۶/۶۰ میلی متر) مشاهده شد و طی روش دیسک بیشترین اثر مهاری بر علیه سویه استاندارد سالمونلا/انتریکا (۸/۲۰ میلی متر) و کمترین میزان مهارکنندگی بر علیه سویه کلینیکی/شریشیاکولای (۶/۵۰ میلی متر) مشاهده شده است.

جدول ۱: بررسی فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت باکتری اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم علیه سویه های استاندارد و کلینیکی به روش چاهک بر حسب میلی متر

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

جدول ۲: بررسی فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت باکتری *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* علیه سویه های استاندارد و کلینیکی به روش دیسک

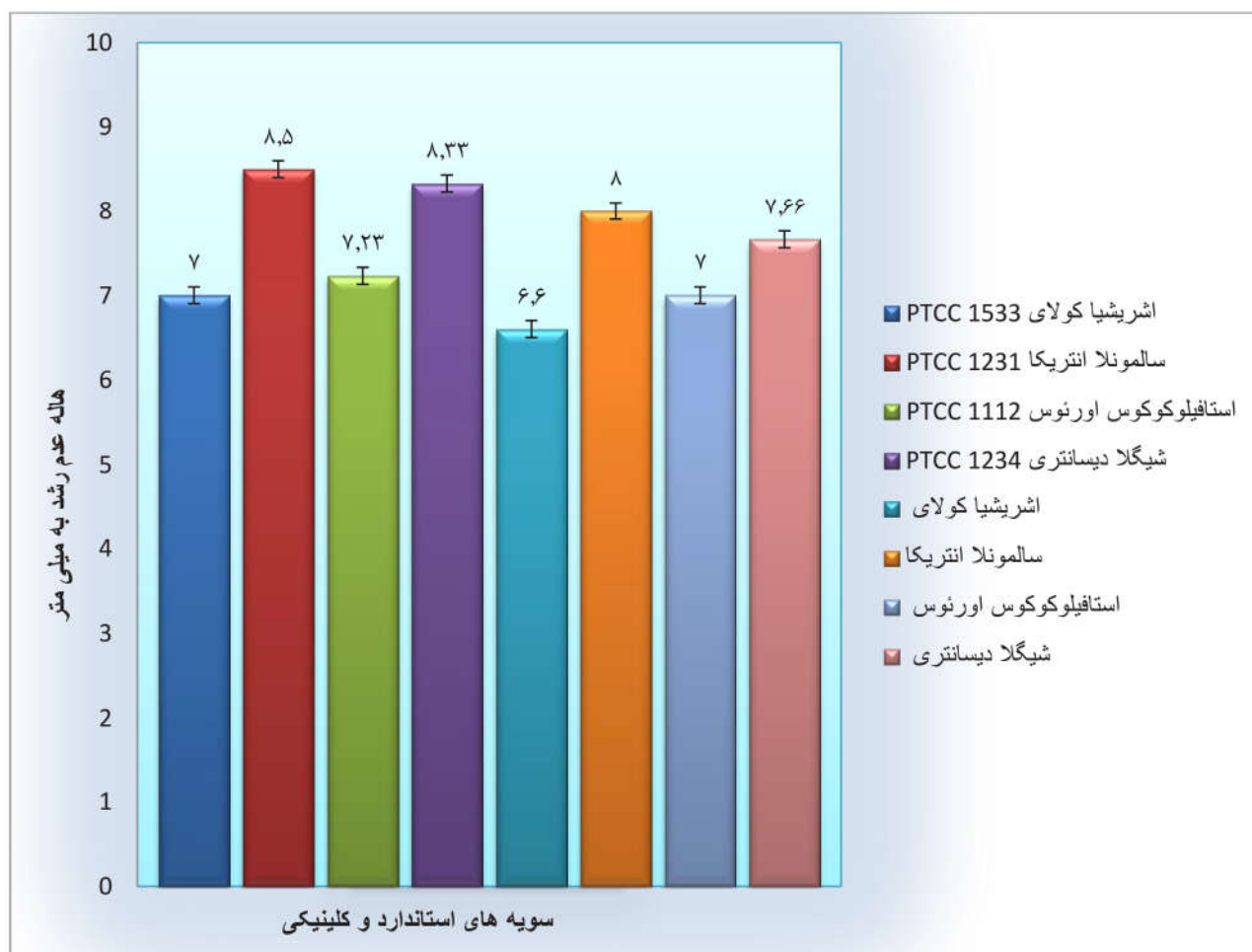
سوپرناتانت کشت	هاله عدم رشد بر حسب میلی متر (تکرار سه بار)	میانگین هاله عدم رشد بر حسب میلی متر
سویه های استاندارد و کلینیکی		
<i>اشریشیا کولای</i> (<i>Escherichia coli</i> PTCC 1533)	۷ ۶/۵ ۷/۵	۷
<i>سالمونلا انتریکا</i> (<i>Salmonella enterica</i> PTCC 1231)	۷/۸ ۸/۵ ۸/۳	۸/۲۰
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>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

نتایج حاصل از مقایسه روش دیسک و چاهک

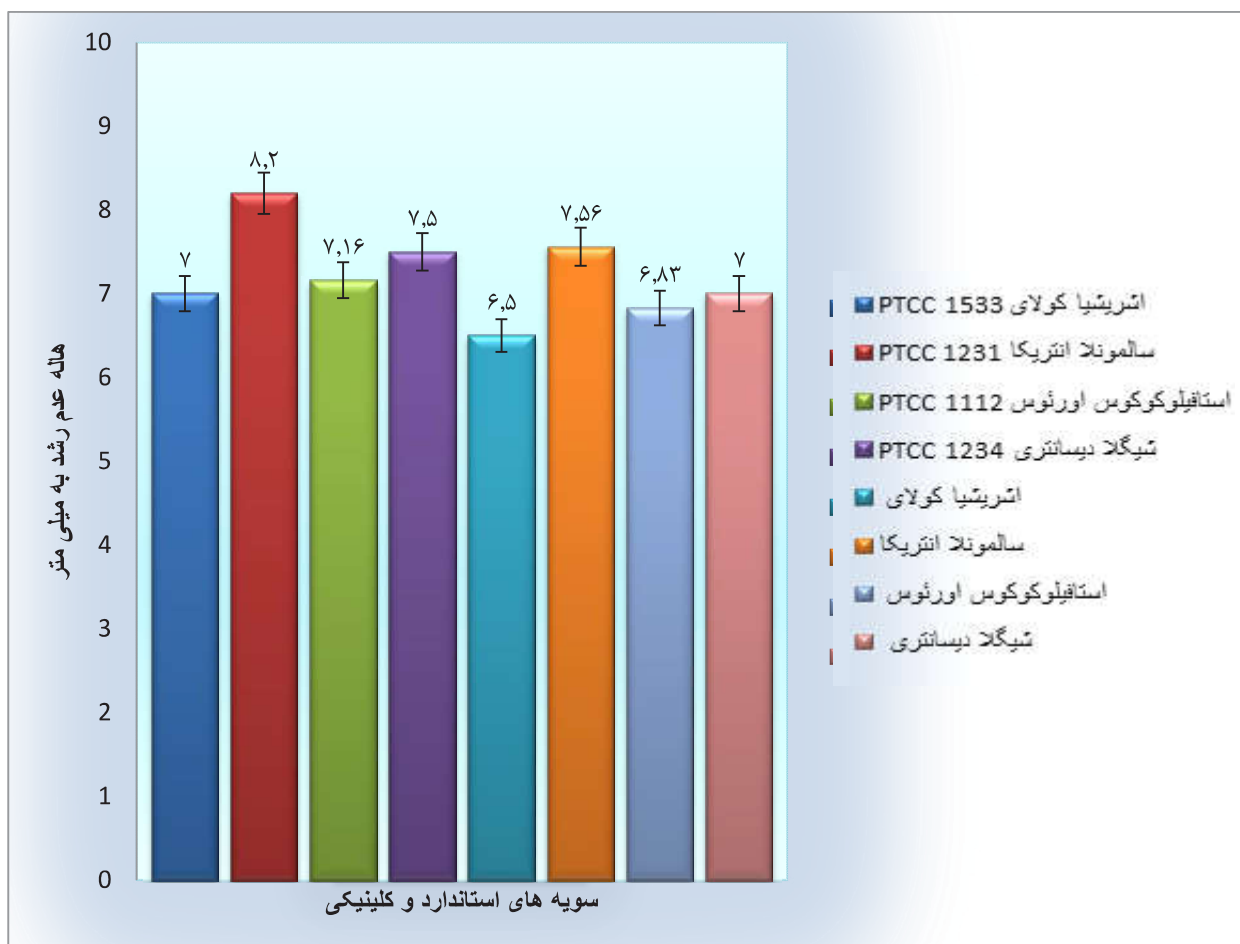
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی *اگزیکوباکتریوم* برای هر سویه میکروبی سه مرتبه تکرار شده است. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی بوده و نتایج به صورت میانگین بیان شده اند. در مقایسه این دو روش، روش چاهک (شکل ۱) نسبت به روش دیسک (شکل ۲) از نتایج بهتری برخوردار بود و *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* میزان مهار کنندگی خوبی را از خود نشان داد.

نتایج حاصل از GC/MS

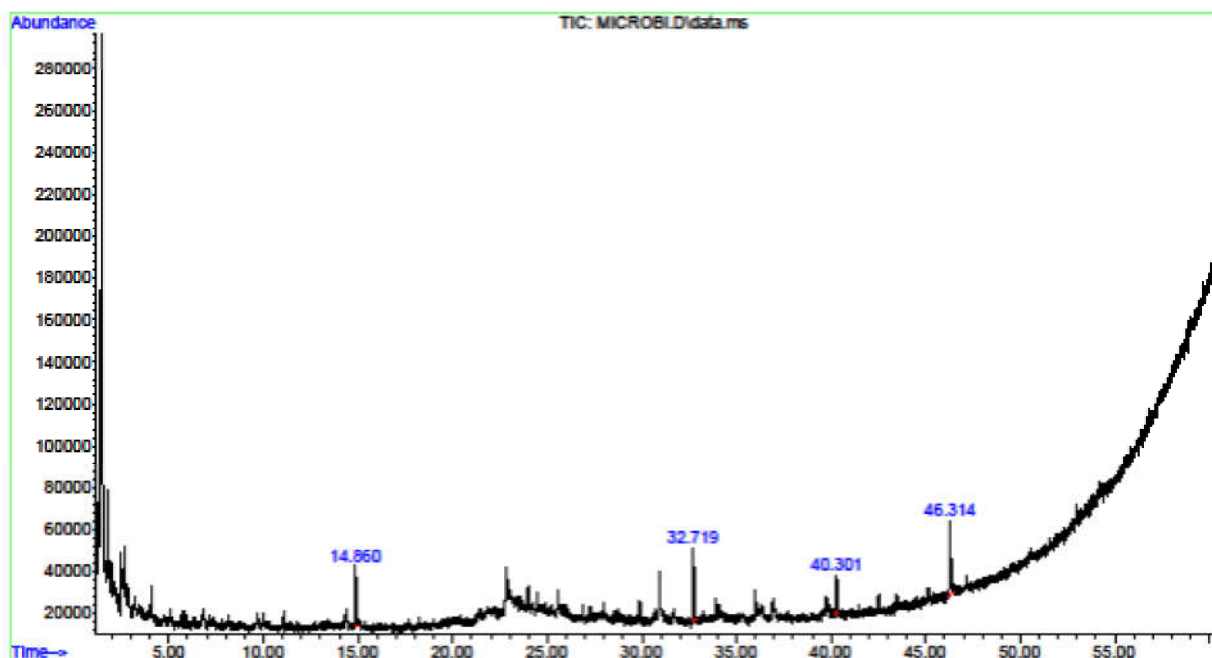
در روش GC/MS شاخص ترین پیک با جرم مولی ۴ مربوط به ۱-۱- دی متیل اتیل است (نمودار ۱) و فراوانی نتایج حاصل از GC/MS در جدول ۳ نشان این بود که ماده ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل-تیلیدی سیکلو (۵۰٪)، ماده ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سد (۵۵٪)، ماده ۱-۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید (۱)



شکل ۱: مقایسه فعالیت ضد میکروبی مایع روی کشت/اگزیزگوباکتریوم/استیلیکوم علیه سویه‌های پاتوژن و استاندارد/اشریشیا کولای، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس و شیگلا دیسانتری به روش انتشار از آگار



شکل ۲: مقایسه فعالیت ضد میکروبی مایع روی کشت/اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم بر علیه سویه های پاتوژن و استاندارد/اشیریشیا کولای، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس و شیگلا دیسانتری به روش انتشار از دیسک



نمودار ۱. 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	۱-۲-بنزن-دی کربوکسیلیک اسید
۵۸٪	۴۶/۳۱۴	فنول ۲-۴-بیس (۱-۱-دی متیل اتیل)

نتایج آزمون‌های آماری

فعالیت ضد میکروبی *اگزیگوباکتریوم* برای هر سویه باکتریایی سه مرتبه تکرار شده است. *اگزیگوباکتریوم* / *استیلیکوم* در روش انتشار از چاهک نسبت به 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 نسبت به دیگر باکتری‌ها تفاوت معنی‌دار وجود داشت. و مشاهده شد که بیش‌ترین درصد فراوانی در روش GC/MS متعلق به 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. سویه *اگزیگوباکتریوم* / *استیلیکوم*، از نظر تولید HCN و سیدروفور مثبت است. به‌طور کلی تحقیقات اندکی در ارتباط با این باکتری و اثرهای ضد میکروبی 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*، *اشریشیا کلائی*، *استافیلوکوکوس* / *اورئوس* و *شیگلا فلکسنری* از خود نشان داد (۱). در مطالعه Yumoto و همکاران در سال ۲۰۰۴ باکتری *اگزیگوباکتریوم* / *اکسیدتورانس* از گیاهان اطراف آب جداسازی گردید. این باکتری آلکالوفیل بوده و توانایی کاتالازی بالایی از خود نشان داد و در محدوده pH ۷ تا ۱۰ توانایی رشد داشت (۱۵). در بررسی Selvakumar و همکارانش در سال ۲۰۰۹ سویه *اگزیگوباکتریوم* / *استیلیکوم* IP 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*، *اسکروتیوم* / *رولفسی* و *فوزاریوم* / *اکسیسپوروم* به‌ترتیب به-مقدار 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* پنتونا (*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 ضد میکروبی خوبی از خود نشان داد که بیش‌ترین اثر طی روش چاهک و روی سویه استاندارد *سالمونلا* / *انتریکا* زیر گونه *انتریکا* / *سرور* پاراتیفی با هاله عدم رشد ۸/۵ میلی‌متر مشاهده گردید. در

اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم با توانایی بالای ضد میکروبی و داشتن ترکیب‌های مفید با خاصیت مهارکنندگی می‌تواند به عنوان یک عامل ضد میکروبی مطرح باشد. البته برای اثبات دقیق تر اثر این باکتری و متابولیت‌های حاصله از آن در شرایط درونی انسان، به تحقیقات جامع‌تری نیاز است.

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 (۱-۲-۲)- 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 راه‌های 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 اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم با تولید HCN رشد برخی از باکتری‌های پاتوژن را مهار کرد. همان‌طور که در مطالعه (2009) Selvakumar et.al نیز اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم با تولید HCN قادر به مهار هیف‌های قارچی بود. ترکیب ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل - تیلیدین بای سیکلو (۱-۲-۲)- 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 سیدوروفور محسوب می‌شوند. توانایی باکتری‌های مختلف در شلاته کردن آهن متفاوت است. سیدوروفور تولید شده توسط اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم قادر است مولکول‌های آهن را از محیط جداسازی کند. در مطالعه Selvakumar سیدوروفور تولیدی توسط سویه اگزیکوباکتریوم/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 اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم باشد.

نتیجه‌گیری

امروزه با افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عوارض‌های ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، استفاده از درمان‌های جایگزین ضروری به نظر می‌رسد. سوپرناتانت باکتری

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

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.