



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 Aliabadi¹, 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 enterica* serovar *paratypi* PTCC 1231 with 8.5 mm zone of inhibition based on GC/MS analysis 2- ethyl hexyl paramethoxy cynamate, 1-2-benzen-dicarboxylic acid, 1-7- dimethyl 3- phenil- thilidin bicyclo (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 ترکیب‌های ضد میکروبی تولید شده توسط اگزیزگوباکتریوم 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 ضد میکروبی تولید می‌کنند که آن‌ها را در شرایط سخت محیطی حمایت می‌کنند. گونه‌های اگزیزگوباکتریوم 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 ضد میکروبی توسط اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم است.

مواد و روش‌ها: سویه لیوفیلیزه اگزیزگوباکتریوم 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 ضد میکروبی مایع رویی کشت (سوپرناتانت) این باکتری از روش انتشار از چاهک در آگار و انتشار از دیسک علیه باکتری‌های پاتوژن و استاندارد/شریشیا کولای، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس و شیگلادیسانتزی استفاده شد و به کمک تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی (GC/MS) ترکیب‌های با خاصیت ضد میکروبی شناسایی گردید.

یافته‌ها: مایع رویی کشت باکتری اگزیزگوباکتریوم 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 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 اگزیزگوباکتریوم با توانایی بالای ضد میکروبی و داشتن ترکیب‌های مفید با خاصیت مهارکنندگی بالا می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم، GC/MS، خاصیت ضد میکروبی، 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

است. سویه *اگزیرگوباکتریوم 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 های شناسایی و جداسازی شده اند که توانایی ضد میکروبی خوبی دارند. *اگزیرگوباکتریوم 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 آکالوفیل 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 *اگزیرگوباکتریوم استیلیکوم*، را گزارش نموده اند (۱۰،۱۳،۱۵). هدف از این پژوهش، بررسی خاصیت آنتاگونیسمی *اگزیرگوباکتریوم 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 *اگزیرگوباکتریوم 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 *اگزیرگوباکتریوم 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 *اگزیرگوباکتریوم استیلیکوم*

سویه *اگزیرگوباکتریوم استیلیکوم* خالص شده در محیط کورینه باکتریوم براث در شرایط هوازی و دمای 37°C گرمخانه گذاری گردید تا کدورتی معادل 0.5 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 *اگزیرگوباکتریوم* اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط کالینز و همکارانش شناسایی گردید و در سال ۱۹۹۴، *Farrow* و همکاران گونه *اگزیرگوباکتریوم 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 *اگزیرگوباکتریوم* شامل گونه هایی مختلفی مانند *اگزیرگوباکتریوم اکسیدوتلورانس*، *اگزیرگوباکتریوم استیلیکوم*، *اگزیرگوباکتریوم اورانتیکوم*، *اگزیرگوباکتریوم اوندایی* و *اگزیرگوباکتریوم انترکتیکوم* است (۳،۴،۵،۶،۷).
گونه های *اگزیرگوباکتریوم* 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 هم چنین دریای خزر جدا شده اند و به طور خاصی با محیط زیست خود وقف یافته است (۸،۹،۱۱،۱۲).
بیشتر 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

دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر به سوپرناتانت سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* به مدت ۵ دقیقه آغشته شد و دیسک‌ها در دمای 37°C به مدت ۴ ساعت قرار داده شد تا به طور 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 *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* علیه هریک از باکتری‌های بیماری‌زا توسط خط-کش میلی‌متری، اندازه‌گیری 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 پاراتیپی B (PTCC 1231) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت 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 ضد میکروبی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش‌های انتشار از دیسک و چاهک برای تعیین میزان مهارکنندگی 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 باکتری‌های بیماری‌زا در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک‌فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس به کمک پیپت پاستور استریل چاهک‌هایی روی محیط ایجاد کرده و از سوپرناتانت سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* خالص به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در چاهک‌ها ریخته شد، بعد از خشک شدن محیط، پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت 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 به قطر ۶ میلی‌متر به سوپرناتانت سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* به مدت ۵ دقیقه آغشته شد و دیسک‌ها در دمای 37°C به مدت ۴ ساعت قرار داده شد تا به طور 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 *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سویه *اگزیکوباکتریوم/استیلیکوم* علیه هریک از باکتری‌های بیماری‌زا توسط خط-کش میلی‌متری، اندازه‌گیری شد.

GC/MS

از مایع رویی تهیه شده به میزان ۰/۵ میکرولیتر برای شناسایی ترکیب‌های ضد میکروبی 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 ضد میکروبی مایع رویی کشت *اگزیکوباکتریوم/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 ضد میکروبی نشان دهد که توانایی مهارکنندگی آن از ۸/۵-۶/۵ میلی‌متر متغیر بود.

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

اگزیزگوباکتریوم 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 اشرشیاکولای به کمک روش انتشار از دیسک ازخود نشان داد. به‌طور کلی مایع رویی کشت این باکتری اثر مهارى 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

جدول ۱: بررسی فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت باکتری اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم علیه سویه‌های استاندارد و کلینیکی به‌روش چاهک بر حسب میلی‌متر

سوپرناتانت کشت	هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر (تکرار سه بار)	میانگین هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر
سویه های استاندارد و کلینیکی		
اشرشیاکولای (<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
اشرشیاکولای	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 اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم علیه سویه های استاندارد و کلینیکی به روش دیسک

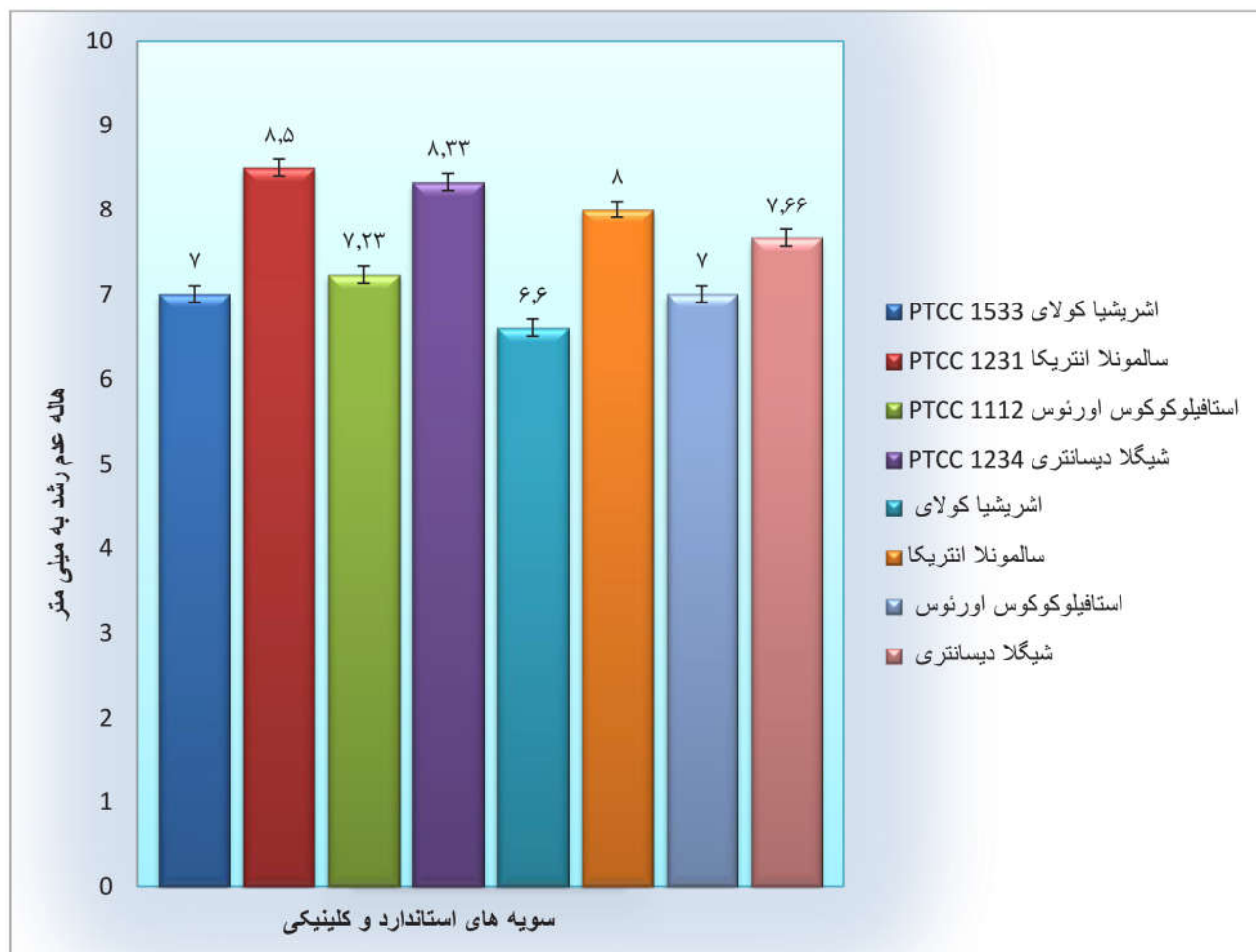
میانگین هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	هاله عدم رشد بر حسب میلی متر (تکرار سه بار)	سوپرناتانت کشت سویه های استاندارد و کلینیکی
۷	۷ ۶/۵ ۷/۵	اشریشیاکولای (<i>Escherichia coli</i> PTCC 1533)
۸/۲۰	۷/۸ ۸/۵ ۸/۳	سالمونلا انتریکا (<i>Salmonella enterica</i> PTCC 1231)
۷/۱۶	۷ ۷/۵ ۷	استافیلوکوکوس اورئوس (<i>Staphylococcus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

نتایج حاصل از مقایسه روش دیسک و چاهک

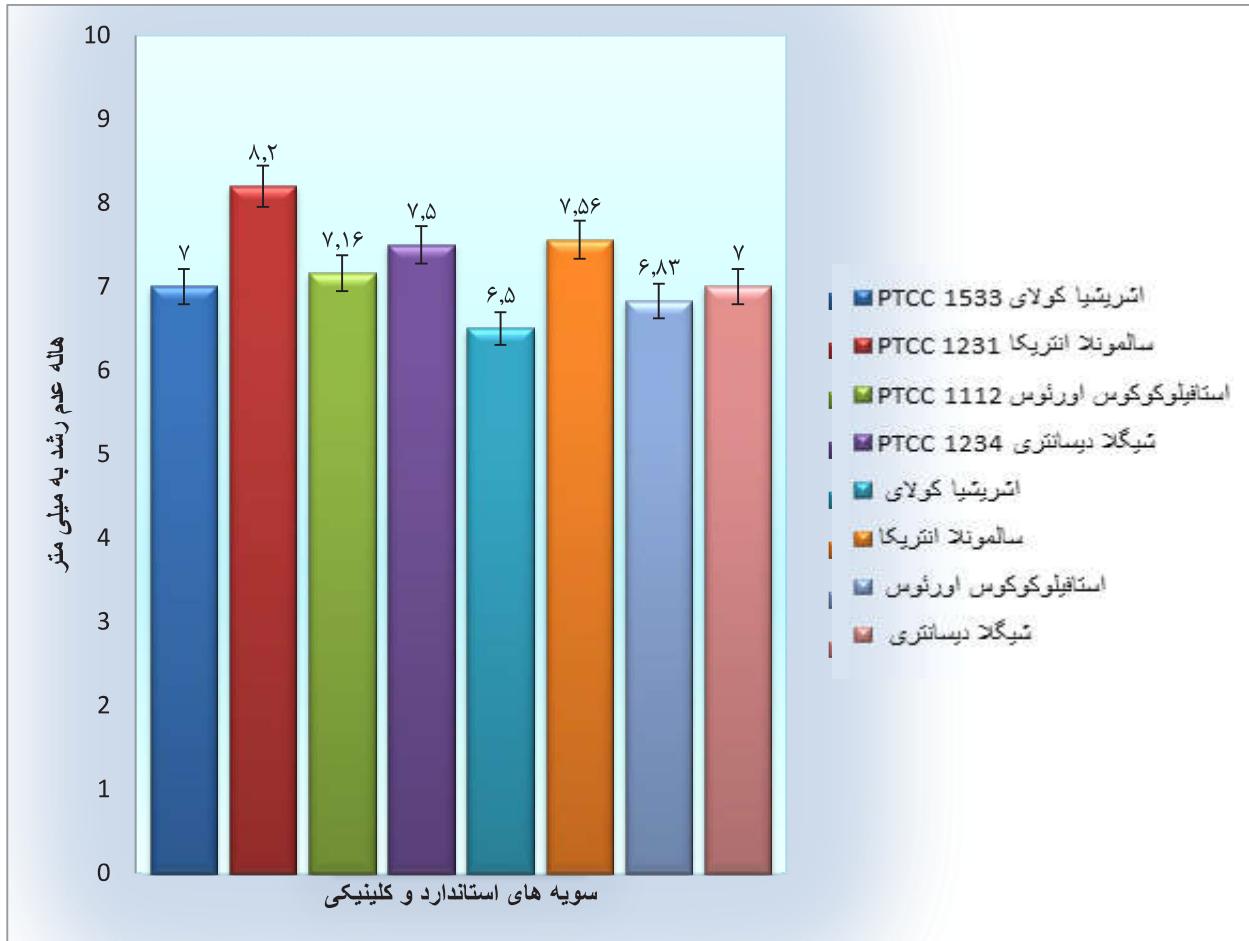
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اگزیزگوباکتریوم برای هر سویه میکروبی سه مرتبه تکرار شده است. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی بوده و نتایج به صورت میانگین بیان شده اند. در مقایسه این دو روش، روش چاهک (شکل ۱) نسبت به روش دیسک (شکل ۲) از نتایج بهتری برخوردار بود و اگزیزگوباکتریوم استیلیکوم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

نتایج حاصل از GC/MS

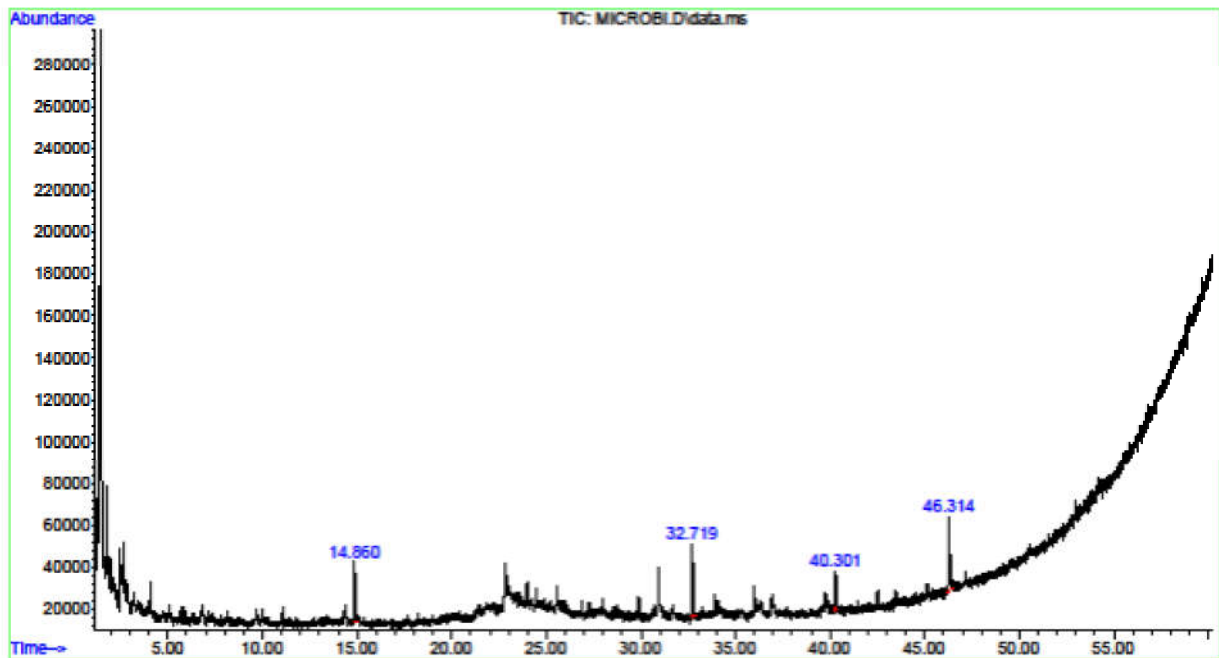
در روش GC/MS شاخص ترین پیک با جرم مولی ۴ مربوط به ۱-۱- دی متیل اتیل است (نمودار ۱) و فراوانی نتایج حاصل از GC/MS در جدول ۳ نشان این بود که ماده ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل-تیلیدی سیکلو (۰/۵۰٪)، ماده ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سد (۰/۵۵٪)، ماده ۱-۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید (۱)



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



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



نمودار ۱. نتایج حاصل از GC/MS

جدول ۳: درصد فراوانی نتایج حاصل از GC/MS

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

نتایج آزمون‌های آماری

فعالیت ضد میکروبی *اگزیکوباکتریوم* برای هر سویه باکتریایی سه مرتبه تکرار شده است. *اگزیکوباکتریوم* / 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 *اگزیکوباکتریوم* 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 *اگزیکوباکتریوم* / 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 *اگزیکوباکتریوم* / 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 *اگزیکوباکتریوم* / 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 *اگزیکوباکتریوم* / *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 *اگزیکوباکتریوم* / 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، *اسکلروتیوم رولفسی* و *فوزاریوم اکسیسپوروم* به ترتیب 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 *اگزیکوباکتریوم* پنتونا (*Exiguobacterium Pantoea*) و میکروباکتریا گزارش گردید هم‌چنین طی این بررسی برای اولین بار توانایی آنتاگونیسمی سویه *اگزیکوباکتریوم* / استیلیکوم در مقابل پاتوژن‌های چندگانه قارچی گیاهان مشاهده گردید (۲). در مطالعه ما نیز سوپرناتانت کشت باکتری *اگزیکوباکتریوم* / 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

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 (۱-۱-۱- 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 *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* با تولید HCN رشد برخی از باکتری‌های پاتوژن را مهار کرد. همان‌طور که در مطالعه Selvakumar et.al (2009) 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 (۱-۱-۱- دی متیل اتیل) نیز یک ترکیب میکس، فنولی هیدروکساماتی است. این ترکیب‌ها از انواع سیدروفور محسوب می‌شوند. توانایی باکتری‌های مختلف در شلاته کردن آهن متفاوت است. سیدروفور تولید شده توسط *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* قادر است مولکول‌های آهن را از محیط جداسازی کند. در مطالعه Selvakumar سیدروفور تولیدی توسط سویه *اگزیکوباکتریوم استیلیکوم* IP 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 به‌نظر می‌رسد. سوپرناتانت باکتری

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

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.