



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* 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- thildin 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

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 ضدبیکروبی 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 ضدبیکروبی تولید می‌کنند که آن‌ها در شرایط سخت محیطی حمایت می‌کنند. گونه‌های اگزیگوباکتریوم به طور خاصی با محیط اطراف خود وقف یافته‌اند و بر حسب نوع گونه و شرایط محیطی دارای تنوع گسترده‌ای هستند. هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی خاصیت ترکیب‌های ضدبیکروبی 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 ضدبیکروبی مایع رویی کشت (سوپرناتانت) این باکتری از روش انتشار از چاهک در آگار و انتشار از دیسک علیه باکتری‌های پاتوژن و استاندارد/شریشیاکولا، سالمونلا انتریکا، استافیلکوکوس اورئوس و شیگلادیسانتری استفاده شد و به کمک تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی (GC /MS) ترکیب‌های با خاصیت ضدبیکروبی شناسایی گردید.

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

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده از اگزیگوباکتریوم با توانایی بالای ضدبیکروبی و داشتن ترکیب‌های مفید با خاصیت مهارکنندگی بالا می‌تواند به عنوان یک عامل ضدبیکروبی مطرح باشد.

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

متabolیت‌های 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

مقدمه

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 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 آنتی-بیوتیک‌ها امری ضروری به‌نظر می‌رسد. از نواحی مختلف جهان میکرووارگانسیم‌هایی شناسایی و جداسازی شده‌اند که تووانایی ضدمیکروبی خوبی دارند. اگزیگوباکتریوم استیلیکوم، باسیل گرم مثبت، بی‌هوای اختیاری، متحرک، دارای درصد G+C پائین و کلینی‌های 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 آنتاگونویسمی آن به‌طور کامل شناخته شده نیست. برخی تحقیقات تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور توسط سویه اگزیگوباکتریوم استیلیکوم، را گزارش نموده‌اند (۱۰، ۱۳، ۱۵). هدف از این پژوهش، بررسی خاصیت آنتاگونویسمی اگزیگوباکتریوم استیلیکوم علیه چندین باکتری بیماری‌زا و استاندارد و همچنین شناسایی ترکیب‌های فعال زیستی تولید شده توسط این باکتری با استفاده از تکنیک (کروماتوگرافی گازی – اسپکترومتر جرمی) است.

مواد و روش‌ها

تهییه 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 به صورت لیوفیلیزه تهییه گردیده و در محیط کورینه باکتریوم براث و نوترینت براث کشت داده شد.

تهییه مایع رویی کشت باکتری اگزیگوباکتریوم استیلیکوم

سویه اگزیگوباکتریوم استیلیکوم خالص شده در محیط کورینه باکتریوم براث در شرایط هوایی و دمای ۳۷°C گرماخانه‌گذاری گردید تا کدورتی معادل ۵٪ مک فارلن

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. میکرووارگانسیم‌هایی 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 توجه به 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 كالنیز Farrow و همکارانش شناسایی گردید و در سال ۱۹۹۴، همکاران گونه اگزیگوباکتریوم استیلیکوم را شناسایی و نام-گذاری کردند. از آن زمان تاکنون، ۱۱ گونه جدید به این جنس افزوده شده است و از دامنه گسترهای 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، ۶، ۷، ۴، ۵). 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 تووانایی تولید بالای آنزیمی هستند و در محیط پایه نوترینت آگلر 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

دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر به سوپرناتانت سویه آگزیگوباکتریوم 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 مک‌فارلندر) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس دیسک‌های آغشته به محلول رویی کشت سویه آگزیگوباکتریوم 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 آگزیگوباکتریوم 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 ضدمیکروبی توسط تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) با مدل 6890N-5973 MASS selective detector گردید. طی این تکنیک بر حسب جرم مولی ترکیب‌های شناسایی شده و نمودار حاصله از آنالیز بر حسب زمان و شدت سیگنال رسم گردید.

بررسی‌های آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS داده‌های پژوهش بررسی شدند.

یافته‌ها

فعالیت ضدمیکروبی مایع رویی کشت آگزیگوباکتریوم استیلیکوم که از طریق سانتریفیوژ جداسازی شده بود علیه سویه کلینیکی و استاندارد/شیریشیاکولاوی، استافیلکوکوس اورئوس، شیگلا فلکسنتری 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 $6/5-8/5$ میلی‌متر متغیر بود.

10^4 CFU/ml) به دست آید. برای تهیه مایع رویی کشت، سوسپانسیون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 40°C با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد و از مایع رویی باقی‌مانده برای بررسی خواص ضد میکروبی استفاده شد.

تهیه و آماده سازی باکتری‌های بیماری‌زا

چهار سویه شایع بیماری‌زا باکتری‌ای، شامل استافیلکوکوس اورئوس (PTCC 1431)، اشیریشیاکولاوی (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 به صورت لیوفلیزه و چهار سویه اشیریشیاکولاوی، استافیلکوکوس اورئوس، شیگلا فلکسنتری و سالمونلا انتریکا از آزمایشگاه تشخیص طبی تهیه شدند و در محیط نوترینت براث با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلندر مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه آگزیگوباکتریوم 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 مک‌فارلندر) 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 آگزیگوباکتریوم استیلیکوم خالص به میزان $0/1$ 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 میلی-متری، اندازه‌گیری شد.

۲- روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion Agar)

براساس نتایج این پژوهش فعالیت ضدبacterیایی آگریگوباکتریوم 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 آگریگوباکتریوم/استیلیکوم است. در طی روش چاهک بیش-۸/۵ ترین اثر مهاری برعلیه سویه استاندارد سالمونلا/انتریکا (Agar ۸/۵ میلی‌متر) و کمترین میزان مهارکنندگی برعلیه سویه میلی‌متر) مشاهده شد و طی 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 اشرشیاکولای (۶/۵۰ میلی‌متر) مشاهده شده است.

آگریگوباکتریوم 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 اشرشیاکولای به کمک روش انتشار از دیسک از خود نشان داد. به طور کلی مایع رویی کشت این باکتری اثر مهاری بیش‌تری روی سویه‌های استاندارد نسبت به کلینیکی از خود نشان داد.

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

جدول ۱: بررسی فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت باکتری آگریگوباکتریوم/استیلیکوم علیه سویه‌های استاندارد و کلینیکی به روش چاهک بر حسب میلی‌متر

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

جدول ۲: بررسی فعالیت ضد میکروبی سوپر ناتانت باکتری اگزیگوباکتریوم استیلیکوم علیه سویه های استاندارد و کلینیکی به روش دیسک

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

نتایج حاصل از GC/MS

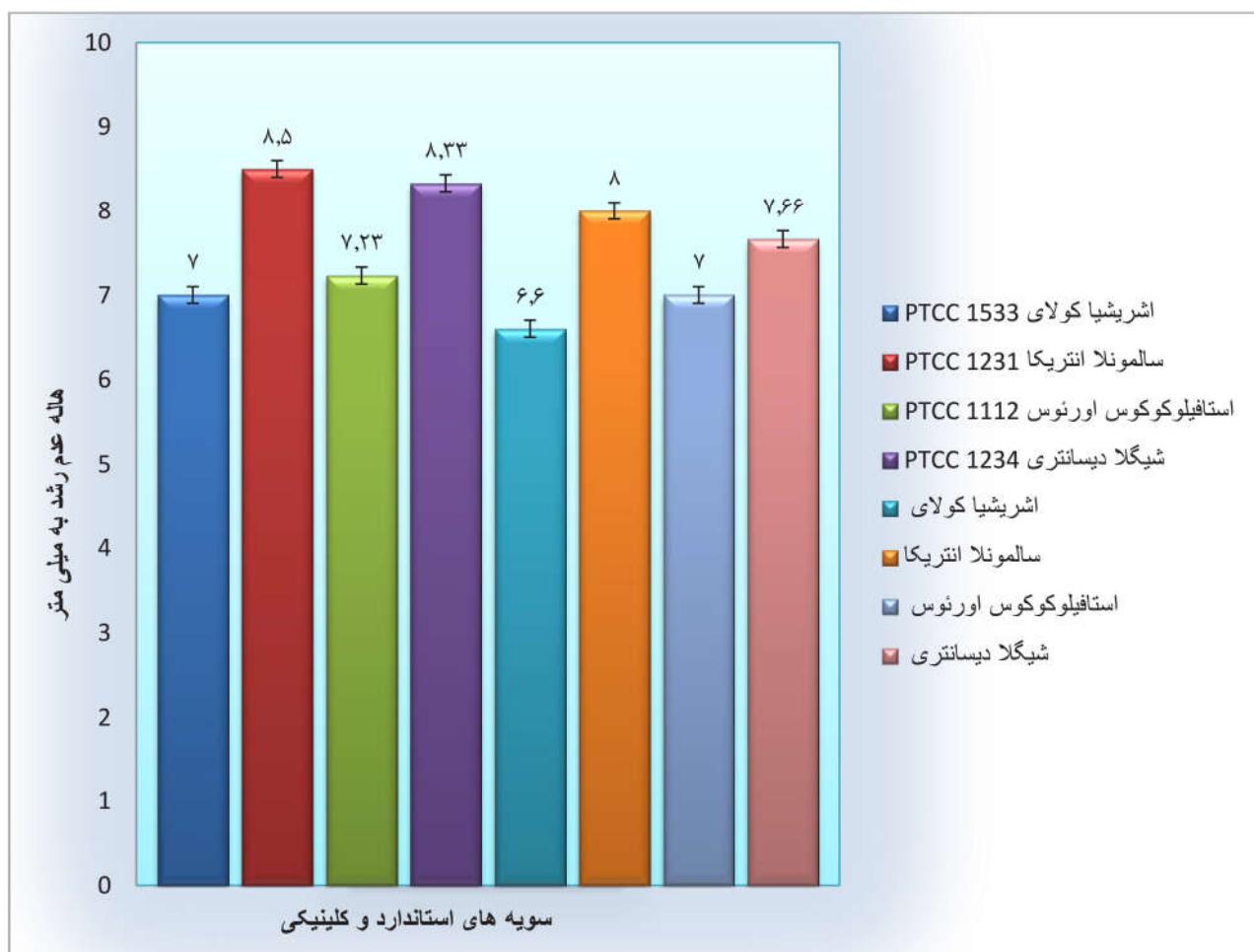
در روش GC/MS شاخص ترین پیک با جرم مولی ۴۰ مربوط به ۱-۱- دی متیل اتیل است (نمودار ۱) و فراوانی نتایج حاصل از GC/MS در جدول ۳ نشان این بود که ماده ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل-تیلیدی سیکلو (٪.۵۰)، ماده ۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی س (٪.۵۵)، ماده ۱-۲- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید (٪.۵۵)

نتایج حاصل از مقایسه روش دیسک و چاهک

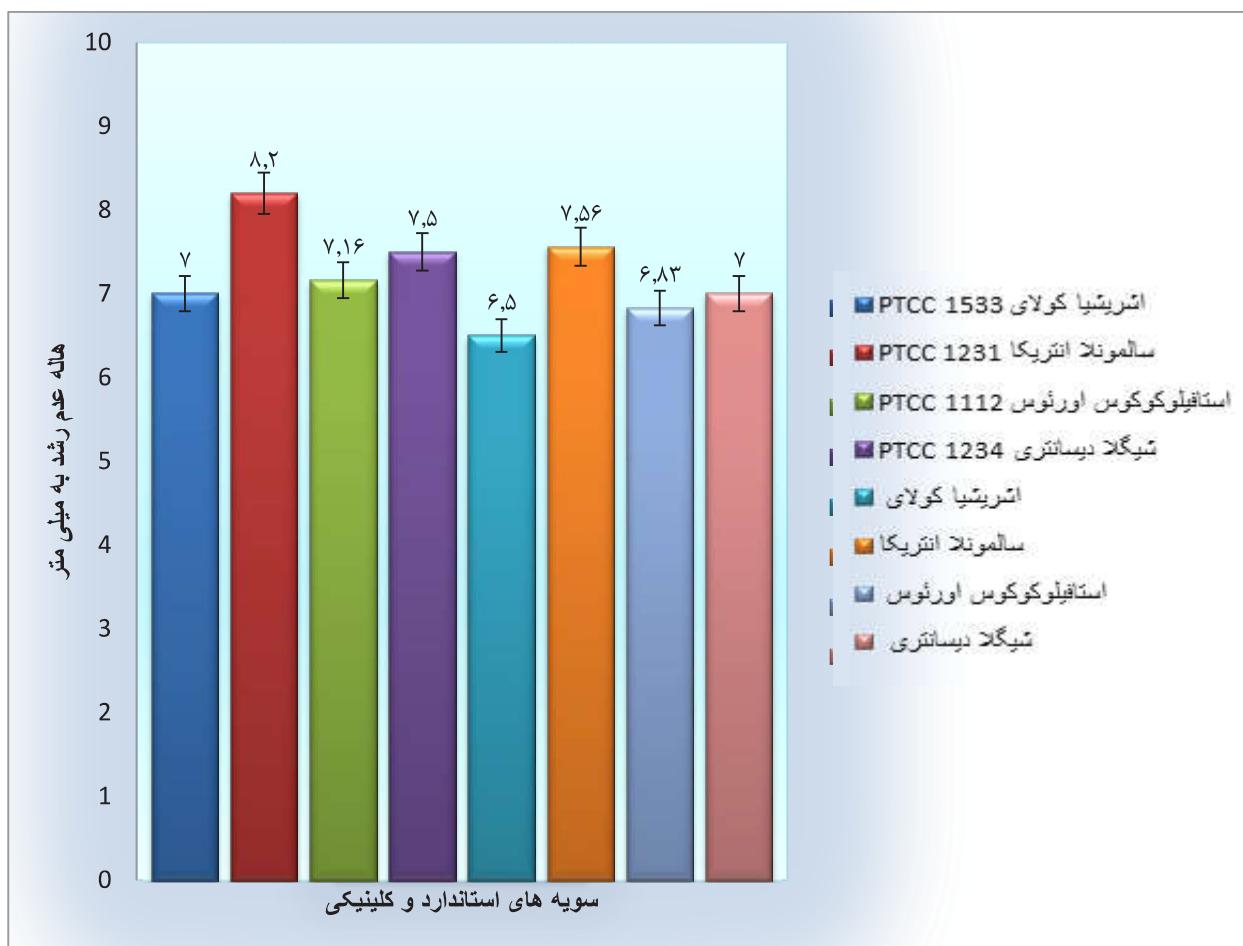
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اگزیگوباکتریوم برای هر سویه میکروبی سه مرتبه تکرار شده است. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی بوده و نتایج به صورت میانگین بیان شده‌اند. در مقایسه این دو روش، روش چاهک (شکل ۱) نسبت به روش دیسک (شکل ۲) از نتایج بهتری برخوردار بود و اگزیگوباکتریوم استیلیکوم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

شاخص ترین ترکیب‌ها بودند.

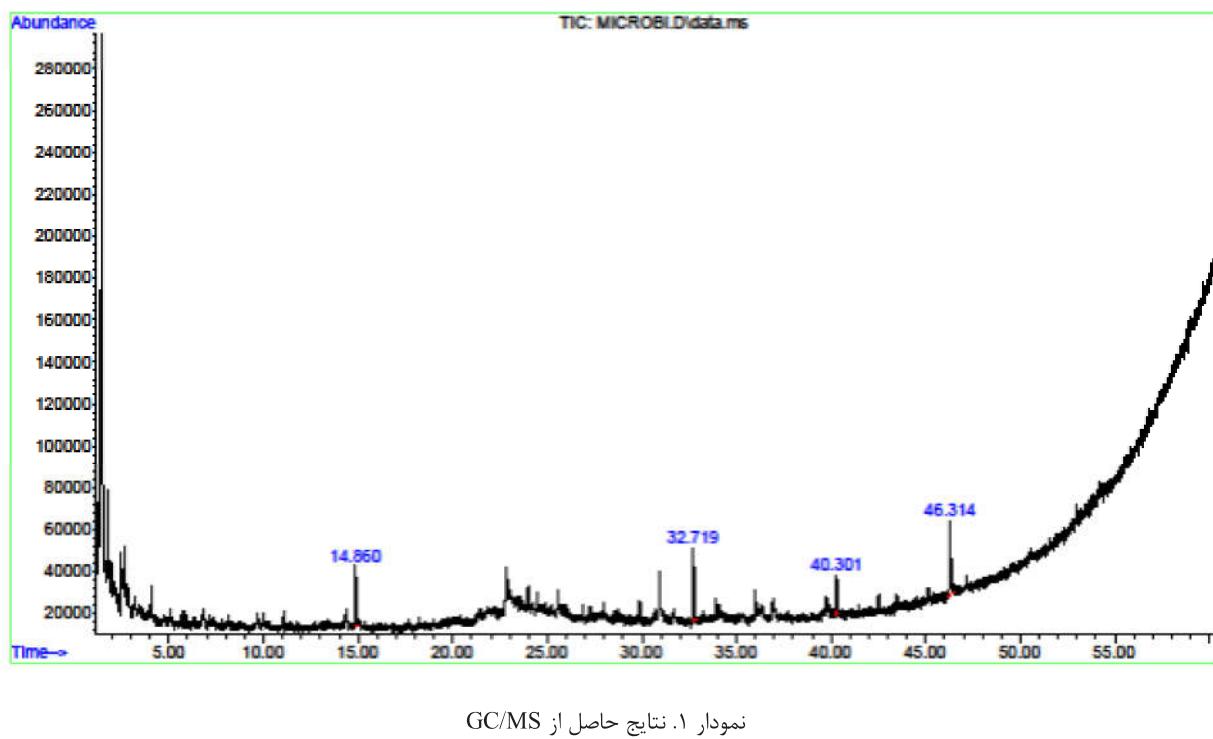
ماده فنول ۴-۲ بیس (۱-۱-دی متیل اتیل) (۰.۵۸٪) دارای



شکل ۱: مقایسه فعالیت ضدیکروبی مایع رویی کشت اگزیگوباکتریوم استیلیکوم علیه سویه‌های پاتوزن و استاندارد/شیریشیاکولای، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورنوس و شیگلا دیسانتری به روش انتشار از آگار



شکل ۲: مقایسه فعالیت ضدیکروبی مایع رویی کشت اکریکوباکتریوم استیلیکوم بر علیه سویه‌های پانتوژن و استاندارد/شیریشیاکولای، سالمونلا انتریکا، استافیلکوکوس اورئوس و شیگلا دیسانتری به روش انتشار از دیسک



جدول ۳: درصد فراوانی نتایج حاصل از GC/MS

درصد فراوانی	جرم مولی	ترکیب‌های شناسایی شده
%۵۰	۱۴/۸۶۰	۱- دی متیل -۲- فنیل-تیلیدین بای سیکلو
%۵۵	۲۲/۷۱۹	۲- اتیل هگزیل پارامتوکسی سینامات
%۳۵	۴۰/۳۰۱	۱و-بنزن- دی کربوکسیلیک اسید
%۵۸	۴۶/۳۱۴	فنول -۴- بیس (۱- دی متیل اتیل)

دریای خزر جداسازی و توسط PCR شناسایی گردید. این باکتری توانایی بالای آنتاگونیسمی در مقابل باکتری‌های سالمونلا تایفی، اشريشیاکلای، استافیلوكوکوس اوریوس و 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 ۷تا ۱۰ توانایی رشد داشت (۱۵). در بررسی Selvakumar و همکارانش در سال ۲۰۰۹ سویه اگزیگوباکتریوم استیلیکوم ۱P 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 ریزوکتونیا سولانی، اسکلروتیوم رولفسی و فوزاریوم اکسیپیوروم 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 و *Barnett* روی گندم در یک رابطه مقاطعه 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 اتریکا زیر گونه اتریکا سروار پاراتیفی با هاله عدم رشد ۸/۵ میلی‌متر مشاهده گردید. در

نتایج آزمون‌های آماری

فعالیت ضدمیکروبی اگزیگوباکتریوم برای هر سویه باکتریابی 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 ضدبакتری اگزیگوباکتریوم طی روش انتشار از چاهک روی سویه استاندارد سالمونلا اتریکا ۱۲۳۱ PTCC 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 -۴- بیس (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 به عنوان یک باکتری جدید آلکالوفیل با قدرت بالای کاتالازی شناخته می‌شود که پتانسیل آنتاگونیسمی آن به طور کامل شناخته شده نیست. سویه اگزیگوباکتریوم استیلیکوم، از نظر تولید HCN و سیدروفور مثبت است. به طور کلی تحقیقات اندکی در ارتباط با این باکتری و اثرهای ضدمیکروبی آن انجام شده است (۱۶، ۱۷). این باکتری در سال ۱۳۸۸ از آبهای ساحلی

اگزیگوباکتریوم 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 دقیق‌تر 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، ۲-۱- بنزن- دی کربوکسیلیک اسید، ۱-۷- دی متیل ۳- فنیل- تیلیدین بای سیکلو (۱-۲-۲)- هپتان- ۲- اون و فنول ۴- ۲- 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 اگزیگوباکتریوم استیلیکوم با تولید HCN رشد برخی از باکتری‌های پاتوژن را مهار کرد. همان‌طور که 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 (۱-۲-۲)- هپتان- ۲- اون، یک ترکیب آروماتیک است که هیدروکسامات از این شاخه است و ترکیب فنول ۴- ۲- 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 اگزیگوباکتریوم استیلیکوم قادر است مولکول‌های آهن را از محیط جداسازی کند. در مطالعه Selvakumar تولیدی توسط سویه اگزیگوباکتریوم استیلیکوم ۱P 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 آناتاگونیسمی اگزیگوباکتریوم 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002; 81:537–547.
- 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.
- Rodriguez DF, Goris J, Vishnivetskaya. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. Extremophiles, 2006; 10:285–294.
- Selvakumar G, Joshi P, Nazim S, Mishra PK, Kundu S, Gupta HS. *Exiguobacterium acetyllicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. World J Microbiol Biotechnol, 2009; 25:131–137.
- 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 a 2-D liquid mapping approach. Electrophoresis, 2007; 28:467–488.