

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۱۱۱-۱۳۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و متانولی برخی از گونه‌های سیانوباکتری در شرایط آزمایشگاهی

معین صفری*: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه ایلام، ایران، m.safari@mail.ilam.ac.ir
سلمان احمدی اسبجین: دانشیار زیست‌شناسی، میکروبیولوژی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، sahmadyas@yahoo.fr
ندا سلطانی: دانشیار زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، soltani6@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سیانوباکتری‌ها به عنوان منابع جدید و غنی از ترکیبات فعال زیستی شناسایی شده‌اند. توجه به خواص سیانوباکتری‌ها به عنوان منبع سرشاری از متابولیت‌های ثانویه در گذشته بسیار کم بوده است اما امروزه نشان داده شده که این میکروارگانیسم‌ها دارای کاربردهای فراوانی در زمینه پزشکی و داروسازی هستند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سویه‌های سیانوباکتری *Synechococcus Fischerella ambigua* ISC67، *Synechococcus elangatus* ISC106 و *Schizothrix vaginata* ISC108 از کلکسیون ریز جلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی تهیه شد. عصاره‌گیری با آغشته کردن بیومس سیانوباکتری با حلال و سپس، صاف و خشک کردن مخلوط حاصل انجام شد. به منظور بررسی اثر ضد میکروبی از روش انتشار در دیسک و برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده از روش برآث میکرودیلوژن استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که عصاره متانولی گونه *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌ها اثر در خور توجهی نداشت، اما عصاره متانولی گونه *Fischerella ambigua* فعالیت ضدباکتریایی نشان داد. عصاره آبی *Fischerella ambigua* اثر چشمگیری بر روی باکتری‌های گرم مثبت داشت، به طوری که بیش‌ترین تأثیر را بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) با قطر هاله ۳۳/۳۳ میلی‌متر داشت. از بین عصاره‌های مورد آزمایش تنها عصاره متانولی *Fischerella ambigua* بر روی هر چهار گونه قارچ فوزاریوم سولانی، راینکوسپوریوم سکالیس، بوتریتیس سینره آ و فوزاریوم اوکسیسپوروم اثر مهاری داشت. تأثیر عصاره آبی *Fischerella ambigua* بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC1114) از تمام آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر آن‌ها بیشتر بود. بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها مربوط به عصاره آبی *Synechococcus elangatus* و بیش‌ترین اثر ضد قارچی مربوط به عصاره متانولی *Fischerella ambigua* بود.

بحث و نتیجه‌گیری: از میان سه گونه سیانو باکتری مورد بررسی، دو گونه *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* دارای فعالیت ضد میکروبی بودند. بنابراین، می‌توانند یک کاندیدای خوب برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی باشند و می‌توان از ترکیبات موجود در عصاره آن‌ها به عنوان دارو در کنترل و مهار بسیاری از بیماری‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: متابولیت‌های ثانویه، ضد میکروبی، سیانوباکتری‌ها، عصاره متانولی، برآث میکرودیلوژن

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

سیانوباکتری‌ها^۱ قدیمی‌ترین پروکاریوت‌های فتوسنتزکننده روی زمین هستند (۱). این میکروارگانیسم‌ها به‌طور گسترده در خاک‌های طبیعی، آب‌های شیرین و زیستگاه‌های دریایی توزیع شده‌اند و دارای تنوع ریخت‌شناسی قابل ملاحظه‌ای هستند (۲). تاریخچه تکاملی طولانی این میکروارگانیسم‌ها به شکل در خور توجهی گواهی بر موفقیت سیانوباکتری‌ها برای زنده ماندن در زیستگاه‌های متعدد و قدرت تحمل اکولوژیکی بالای آنهاست (۳). علاوه بر این، سیانوباکتری‌ها با قدرت تحمل اکولوژیکی بالا با دما، نور، شوری، رطوبت و شرایط قلیایی توسعه یافته‌اند و دارای بسیاری از ویژگی‌ها و سازگاری‌ها هستند که توزیع گسترده و موفقیت آن‌ها در بقا را توضیح می‌دهد (۴). اصطلاح "متابولیسم سیال یا لغزنده"، کوتاه‌ترین و در عین حال گویاترین توجیهی است که برای این گستردگی به کار می‌رود. نوعی انعطاف‌پذیری متابولیک که شاید منحصر به فرد باشد و تنها در مورد زیستگاه‌ها صدق نمی‌کند (۵). هنوز مکانیسم خوگیری و سازگاری‌های خاص سیانوباکتری‌ها به شرایط محیطی و سیالیت‌هایی که برای مثال در تغییر آرایش سیستم‌های فتوسنتزی و رنگیزه‌های این موجودات در مواجهه با تغییرات سریع شرایط محیطی به وقوع می‌پیوندد، برای صاحب‌نظران روشن نیست. طبقه‌بندی تاکسونومیک سیانوباکتری‌ها بسیار پیچیده است. سیانوباکتری‌ها در گذشته تنها براساس صفات ریخت‌شناسی و بر طبق کدهای بین‌المللی نام‌گذاری گیاهی^۲ طبقه‌بندی می‌شدند. این طبقه‌بندی که تنها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی است، با وجود این واقعیت که ریخت‌شناسی سیانوباکتری‌ها در مقایسه با بسیاری از

میکروب‌های پروکاریوتی پیچیده است و صفات ریخت‌شناسی در پاسخ به شرایط زیست محیطی مختلف تغییر پذیرند، لزوماً نمی‌تواند یک طبقه‌بندی فیلوژنتیکی معتبر باشد (۶). از سوی دیگر سیانوباکتری‌ها براساس کدهای بین‌المللی نام‌گذاری پروکاریوتی^۳ نیز طبقه‌بندی شده‌اند. امروزه این طبقه‌بندی براساس روش‌های مولکولی و ویژگی‌های فنوتیپی، شموئیپی و ژنوتیپی یک کشت خالص از سیانوباکتری‌هاست که به اصطلاح روش پلی‌فازیک^۴ نامیده می‌شود (۷). ترکیب طبقه‌بندی ریخت‌شناسی گذشته و طبقه‌بندی بر اساس روش‌های مولکولی به منظور دستیابی به کلیدهای شناسایی معتبر، یک چالش مهم برای زیست‌شناسان محسوب می‌شود، با این حال، کوشش برای متحد ساختن این دو سیستم طبقه‌بندی همچنان ادامه دارد. در حال حاضر سیستم نام‌گذاری باکتریولوژیکی سیانوباکتری‌ها به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است. در ایران نیز پژوهش‌های فراوانی در زمینه شناسایی سیانوباکتری‌ها بر اساس کلیدهای ریخت‌شناسی و مولکولی انجام شده که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به گزارش سلطانی^۵ و همکاران در سال ۱۳۷۸ در منطقه فیروزکوه اشاره کرد. آن‌ها ۲۰ گونه سیانوباکتری را در خاک‌های منطقه فیروزکوه در شرق تهران شناسایی کردند (۸). گزارش‌های مربوط به سیانوباکتری‌های ایران بیشتر مربوط به نمونه‌های آبزی بوده است، برای مثال گونه‌های کروکوکوس^۶، لینیجیا^۷، آناپنا^۸، سینکوکوس^۹ و اوسیلاتوریا^{۱۰} که از دریاچه ارومیه جداسازی و شناسایی شده‌اند (۹)، از سوی دیگر نمونه‌های خاکزی که شناسایی شده‌اند بیشتر به خاک شالیزارها متعلق بوده‌اند مانند: گونه‌های استیگونما^{۱۱}، آناپائوپسیس^{۱۲}، نوستوک^{۱۳} و کالوتریکس^{۱۴} که در مزارع شمال کشور شناسایی شده‌اند (۱۰).

توجه و باور نکردنی از فعالیت‌های زیستی را نشان می‌دهند. برای مثال فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد ویروس، مهارکننده سیستم ایمنی، حشره کشی و ضد التهابی با مهار فعالیت پروتئیناز که از اهداف قابل توجه پژوهش‌های پزشکی هستند (۱۵-۱۷). توجه به خواص سیانوباکتری‌ها به عنوان منبع سرشار از متابولیت‌های ثانویه، در گذشته بسیار کم بوده است اما امروزه نشان داده شده که این میکروارگانیسم‌ها دارای کاربردهای فراوانی در زمینه پزشکی، تولید سوخت زیستی، تولید متانول و همچنین، پاک‌سازی زیستی هستند و از نظر مصارف غذایی نیز کاربرد دارند (۱۸). تنوع بسیار زیاد فعالیت‌های زیستی و شیمیایی متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتری‌ها، این میکروارگانیسم‌ها را به عنوان یک منبع قابل توجه از داروهای جدید برای استفاده در مناطق درمانی گوناگون توصیه می‌کند. با وجود زیستگاه‌ها و منابع فراوان سیانوباکتری‌ها در ایران در مقایسه با سایر کشورها، مطالعات اندکی در مورد خواص ضد میکروبی عصاره سیانوباکتری‌ها انجام شده است. از جمله مهمترین پژوهش‌های انجام شده در این زمینه در ایران می‌توان به گزارش‌های زرینی^{۱۶} و همکاران در سال ۱۳۹۰ و قاسمی^{۱۷} و همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره کرد (۱۰ و ۱۹). با توجه به مقاومت روز افزون باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی، شناسایی سیانوباکتری‌های توانمند برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی و بررسی اثرات ضد میکروبی اهمیت خاصی دارد. هدف اصلی این پژوهش، بررسی اثرات ضد میکروبی برخی از گونه‌های سیانوباکتری‌ها علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی است.

تنوع بسیار زیاد در این گروه از میکروارگانیسم‌ها، جدا از تنوع ریخت‌شناسی و دامنه وسیعی از زیستگاه‌ها، در میزان سنتز محصولات طبیعی توسط آن‌ها نیز منعکس شده است. سیانوباکتری‌ها برای تولید مجموعه متنوعی از متابولیت‌های ثانویه تکامل یافته‌اند که به بقای گونه‌ها در این نیچ‌های اکولوژیکی گوناگون و بسیار رقابتی کمک کرده است (۱۱).

امروزه ترکیبات طبیعی (متابولیت‌های ثانویه) منبع مهمی از داروهای جدید و ترکیبات دارویی مؤثر هستند (۱۲). فرآورده‌های طبیعی نه تنها به عنوان دارو در مسیر درست خود به کار گرفته می‌شوند، بلکه ممکن است به عنوان مدل‌های ساختاری برای ایجاد آنالوگ‌های مصنوعی و نیز به عنوان مدل‌هایی در مطالعات ساختار فعالیت به کار روند (۱۳). فرآورده‌های طبیعی از طیف گسترده‌ای از گونه‌های متنوع جداسازی و برای فعالیت‌های مختلف زیستی آزمایش شده است. بیشتر این فرآورده‌های طبیعی از منابعی همچون استرپتومیسس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان مشتق شده‌اند. مشکل اصلی در تمرکز بر این منابع برای دستیابی به مولکول‌های فعال زیستی جدید، کشف مجدد محصولاتی است که قبلاً از منابع دیگری شناخته شده‌اند. یک راه برای به حداقل رساندن این مشکل، توسعه روش‌های زیستی شناسایی فرآورده‌های طبیعی و بررسی قابلیت درمانی جدید آن‌هاست. رویکرد دیگر این است که به منابع جدید و مختلف از محصولات طبیعی توجه شود. در میان این میکروارگانیسم‌ها، سیانوباکتری‌ها نشان دهنده چنین منابعی هستند. مطالعات ریچار مورور^{۱۵} در دانشگاه هاوایی نشان داد که سیانوباکتری‌ها می‌توانند منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه باشند (۱۴). متابولیت‌های سیانوباکتری‌ها طیف قابل

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری از نمونه‌ها: در این مطالعه تجربی،

سویه‌های سیانوباکتری *Fischerella ambigua* ISC67، *Synechococcus elangatus* ISC106 و *Schizothrix vaginata* ISC108 از کلکسیون ریز جلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه شد. ابتدا برای اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها به روش پلیت آگار بر روی محیط کشت جامد BG11 انجام شد (۲۰). به این صورت که ابتدا محیط مایع BG11 تهیه شد. ترکیب محیط کشت BG11 مورد استفاده برای سیانوباکتری‌ها در هر لیتر ۱۵۰ میلی‌گرم NaNO_3 ، ۷۵ میلی‌گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۳۶ میلی‌گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۶ میلی‌گرم Citric Acid، ۱ میلی‌گرم Ferric ammonium citrate، ۲۰ میلی‌گرم Na_2CO_3 و یک میلی‌لیتر محلول trace metal mix شامل ۲/۸۶ میلی‌گرم در لیتر H_3BO_3 ، ۱/۸۱ میلی‌گرم در لیتر $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۲۲۲ میلی‌گرم در لیتر $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۳۹ میلی‌گرم در لیتر $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۷۹ میلی‌گرم در لیتر $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۴۹ میلی‌گرم در لیتر $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ دارا می‌باشد (۲۱). سپس برای تهیه محیط کشت جامد، ۱۵ گرم آگار به محیط کشت مایع BG11 اضافه، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و پس از اندکی خنک شدن به ظروف پتری منتقل شد. پس از سرد شدن محیط کشت جامد، کلونی‌های سیانوباکتری‌ها توسط لوپ به شکل زیگزاگی روی آن کشت داده شد. این کار برای به دست آوردن کلونی‌های خالص سیانوباکتری‌ها چندین بار تکرار شد و هر بار کلونی‌هایی که باید دوباره کشت

داده می‌شدند، توسط تهیه‌ی اسلاید و بررسی میکروسکوپی انتخاب شدند. بعد از اطمینان از خالص بودن کلونی‌های موجود در کشت جامد، کلونی‌ها به محیط کشت مایع BG11 منتقل و در اتاقک رشد تحت هوادهی و تابش نور مداوم و همچنین دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری از سیانوباکتری‌ها: عصاره‌گیری به

روش وال^{۱۸} و همکاران انجام شد. برای این منظور ۵۰۰ میلی‌لیتر از کشت مایع BG11 رشد یافته نمونه‌های سیانوباکتریایی ۳۰ روزه در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد، برای ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل پس از خشک شدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون، به عنوان عصاره آبی نگهداری شد. بیومس به دست آمده ابتدا در ۶۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد. برای تهیه عصاره‌های متانولی بر روی بیومس حاصل به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. سپس، مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. عصاره‌های حاصل به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون کاملاً خشک شد. بدین ترتیب عصاره متانولی تهیه شد. تمام عصاره‌های خشک شده در فالكون‌های استریل جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲).

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی: در این پژوهش، ۵

گونه باکتری گرم مثبت بیماری‌زا شامل: استافیلوکوکوس اورئوس^{۱۹} (PTCC 1112)، استافیلوکوکوس اپیدرمیس^{۲۰} (PTCC 1114)، باسیلوس سرئوس^{۲۱} (PTCC 1247)، انتروکوکوس فیکالیس^{۲۲} (PTCC 1237) و استرپتوکوکوس پایوژنز^{۲۳} (PTCC

طول موج ۶۲۰ نانومتر برابر ۰/۰۸ تا ۰/۱ شود. در نهایت از تمام باکتری‌ها و قارچ‌ها غلظت نیم مک فارلندی تهیه شد (۲۳).

بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی: به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری‌ها از روش انتشار در دیسک (کربی-بائر^{۳۳}) استفاده شد، زیرا این روش یکی از متداول‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌های زیستی برای ارزیابی خواص ضد میکروبی است (۲۴). به این شکل که ابتدا از عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری‌ها، به وسیله دی‌متیل سولفو کساید ۱۰ درصد، رقت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. به تعداد باکتری‌ها (۱۰ گونه باکتری) و قارچ‌ها (۴ گونه قارچ) دیسک کاغذی بلانک ۶ میلی متری تهیه شده از شرکت پاتن طب (ایران) در داخل رقت‌های مختلف از هر عصاره ریخته شد. پس از ۱۰ دقیقه که حداقل زمان لازم برای جذب است، دیسک‌های کاملاً آغشته شده به عصاره از داخل عصاره‌ها خارج و به طور جداگانه در آون ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا حلال آن بخار و دیسک‌ها خشک شود. دیسک‌ها قبل و بعد از ترکیب با عصاره‌ها وزن شد و اختلاف وزن آن دو، مقدار عصاره‌ای بود که دیسک‌ها در رقت‌های مختلف هر عصاره جذب کرده بودند. مقدار عصاره جذب شده توسط هر دیسک در رقت‌های مختلف عصاره‌های فعال در جدول ۱ آمده است. به این ترتیب دیسک‌ها برای بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آماده شد (۲۵). با استفاده از سوآب استریل از سوسپانسیون نیم مک فارلندی باکتری‌ها برداشته و در محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد.

۱۴۴۷) و ۵ گونه باکتری گرم منفی شامل: /شریشیا کلی^{۲۴} (PTCC 1338)، پروتئوس ولگاریس^{۲۵} (PTCC 1312)، سودموناس آئروژینوزا^{۲۶} (PTCC 1430)، سالمونلا تیفی^{۲۷} (PTCC 1609) و یرسینا پستیس^{۲۸} از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه شد. همچنین، ۴ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی شامل: فوزاریوم سلوانی^{۲۹}، راینکوسپوریوم سکالیس^{۳۰}، بوتریتیس سینره^{۳۱} و فوزاریوم اوکسیسپوروم^{۳۲} از آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی دانشگاه ایلام تهیه شد.

تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری‌ها و

قارچ‌ها: برای تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری‌ها (1×10^8) واحد سارنده کلونی در میلی لیتر) و قارچ‌ها (1×10^6) واحد سارنده کلونی در میلی لیتر)، ابتدا باکتری‌ها و قارچ‌ها را به طور جداگانه، به ترتیب روی محیط کشت‌های مولر هیتون آگار و سابورد کستروز آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت (برای باکتری‌ها) و ۴۸ ساعت (برای قارچ‌ها) در انکوباتور قرار داده شد. سپس، به اندازه تعداد میکروارگانیسم‌ها لوله استریل تهیه و داخل هر لوله به مقدار ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. به وسیله آنس حلقوی از کلونی‌های باکتری‌ها و قارچ‌ها برداشته و داخل لوله‌ها انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد. برای به دست آوردن غلظت نیم مک فارلندی از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. دستگاه روی طول موج ۶۲۰ نانومتر تنظیم و با سرم فیزیولوژی صفر شد. سپس، از سوسپانسیون ورتکس شده در کوئیت‌های شیشه‌ای مخصوص دستگاه ریخته و جذب نوری آن‌ها تعیین شد. به منظور تهیه کدورت نیم مک فارلندی باید مقدار جذب نوری در

جدول ۱- مقدار عصاره جذب شده توسط دیسک‌ها در غلظت‌های مختلف از عصاره‌های فعال متانولی و آبی سیانوباکتری‌ها

سیانوباکتری‌ها	غلظت عصاره‌ها*		
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰
عصاره متانولی <i>Synechococcus elangatus</i>	۴/۸	۱۰/۱	۱۹/۱
عصاره متانولی <i>Fischerella ambigua</i>	۵	۹/۸	۱۹
عصاره آبی <i>Synechococcus elangatus</i>	۴/۳	۹/۴	۱۸/۵
عصاره آبی <i>Fischerella ambigua</i>	۴/۱	۹/۲	۱۹/۶

* تمام اعداد در جدول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

کلرامفنیکل و پنی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت برای باکتری‌ها و از آنتی‌بیوتیک نیستاتین به عنوان کنترل مثبت برای قارچ‌ها استفاده شد. تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت پاتن طب (ایران) تهیه شد.

تعیین مقدار MIC و MBC: حداقل غلظت مهارکننده (MIC) عصاره‌های سیانوباکتری‌هایی که دارای اثر ضدباکتریایی بودند، با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و روش برات میکرودیولوشن^{۳۴} طبق دستورالعمل CLSI^{۳۵} تعیین شد (۲۷). به این ترتیب که ابتدا به هر یک از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت برات به اضافه ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده عصاره (۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس، مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری به چاهک‌ها اضافه شد. سپس، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از این مدت کف پلیت زیر نور در آینه مشاهده و وجود کدورت را که نشان دهنده رشد یا عدم رشد باکتری است، در جدول یادداشت شد. با مقایسه کدورت چاهک‌های تحت تیمار با چاهک‌های شاهد میزان حداقل غلظت مهارکننده مشخص شد. نخستین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت مهارکننده به شکل میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲۳). حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها با توجه به نتایج حداقل غلظت مهارکننده تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها کاملاً متوقف شده بود با سوآپ استریل نمونه‌برداری و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت کم‌ترین غلظتی از عصاره که باکتری‌ها در آن رشد نکرده بودند به عنوان مقادیر حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (۲۸).

بر اساس روش استاندارد انتشار دیسک، دیسک‌های آغشته به عصاره در فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متری) از یکدیگر در محیط کشت‌ها قرار داده شدند (۲۴). محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌ها با استفاده از خط کش معمولی اندازه‌گیری شد. از سوسپانسیون نیم مک فارلندی قارچ‌های خالص شده روی محیط سابورود کستروز آگار کشت داده شد. سپس، دیسک‌های آغشته به عصاره در فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متری) از یکدیگر روی محیط کشت‌ها قرار داده شد. محیط کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله‌ها با استفاده از خط کش معمولی اندازه‌گیری شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد (۲۶). در این پژوهش از دی‌متیل سولفو کساید ۱۰ درصد به علت اینکه تأثیری بر روی باکتری‌های مورد بررسی ندارد به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین، از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید،

با توجه به میانگین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* علیه باکتری‌های گرم مثبت، می‌توان گفت که از بین باکتری‌های گرم مثبت تنها باکتری باسیلوس سرئوس (PTCC 1247) و باکتری انتروکوکوس فیکالیس (PTCC 1237) و از بین گرم منفی‌ها تنها باکتری پروتئوس ولگاریس (PTCC 11312) به عصاره متانولی این سیانوباکتری حساس بودند و سایر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نسبت به این عصاره مقاومت نشان دادند. نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که این عصاره بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر ضدباکتریایی داشت. نتایج نشان داد که عصاره آبی این سیانوباکتری اثر چشمگیری بر روی باکتری‌های گرم مثبت داشت، به طوری که بیش‌ترین تأثیر را بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) با قطر هاله ۳۳/۳۳ میلی‌متر داشت (شکل ۱). از بین ۵ گونه باکتری گرم مثبت مورد بررسی تنها باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز (PTCC 1447) نسبت به عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* مقاوم بود. این عصاره بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس (PTCC 1114) تقریباً اثر یکسان داشت. با این وجود، از بین باکتری‌های گرم منفی مورد بررسی عصاره آبی *Fischerella ambigua* تنها بر روی باکتری پروتئوس ولگاریس (PTCC 1312) اثر ضدباکتریایی داشت و سایر باکتری‌های گرم منفی نسبت به این عصاره مقاوم بودند. تحلیل آماری داده‌ها در سطح یک درصد نشان

نتایج آزمایش‌های بدست آمده از نظر آماری به شکل توصیفی با یکدیگر مقایسه شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

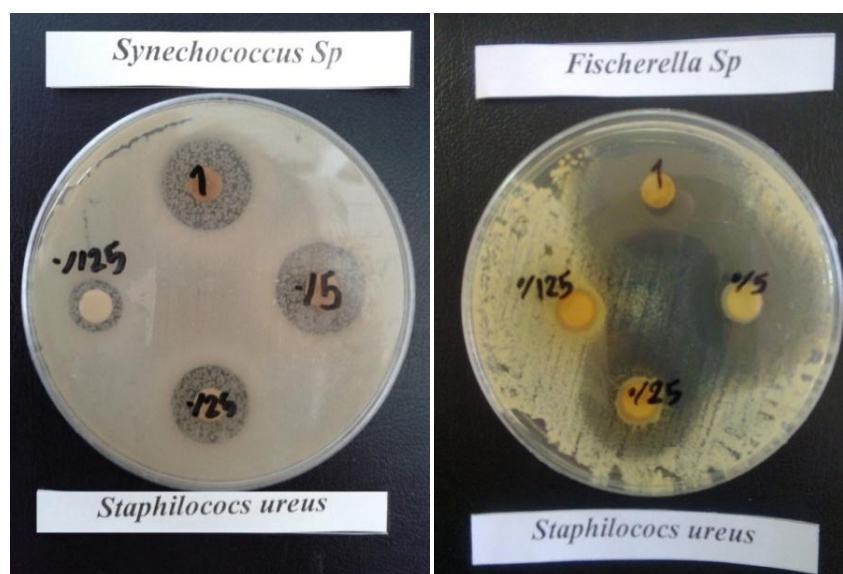
تحلیل‌های آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار اس پی اس^{۳۶} نسخه ۲۰ استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون یک طرفه آنووا^{۳۷} و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن^{۳۸} در سطح یک درصد انجام شد. همچنین، برای توصیف متغیرهای پژوهش از آمار توصیفی مانند میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که هیچ یک از عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی نبودند. نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی و متانولی دو گونه سیانوباکتری *Fischerella ambigua*، *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره متانولی گونه *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌ها اثر در خور توجهی نداشت، اما عصاره متانولی گونه *Fischerella ambigua* فعالیت ضدباکتریایی نشان داد. همچنین، نتایج بدست آمده از تأثیر عصاره‌های آبی سیانوباکتری‌ها نشان داد که عصاره آبی سیانوباکتری‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* فعالیت ضدباکتریایی معناداری علیه باکتری‌های مورد بررسی داشتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده تقریباً برابر صفر است ($P \text{ value} \leq 0/01$).

عدم رشد در بین باکتری‌های گرم منفی مربوط به باکتری سودموناتس آنروژینوزا (PTCC 1430) با قطر هاله ۲۲/۳۳ میلی‌متر بوده است (شکل ۱). در بین باکتری‌های گرم مثبت تنها باکتری باسیلوس سرئوس (PTCC 1247)، و در بین باکتری‌های گرم منفی تنها باکتری سالمونلا تیفی (PTCC 1609) نسبت به این عصاره مقاوم بودند. تأثیر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقریباً یکسان بود به طوری که تحلیل آماری داده‌ها در سطح یک درصد، خطای محاسبه شده برابر ۰/۰۲ بود، بنابراین، اختلاف معناداری بین تأثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نشد.

داد که خطای محاسبه شده برابر صفر است بنابراین، فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* علیه باکتری‌های گرم مثبت به طور معناداری بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج به دست آمده پس از تأثیر عصاره آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که عصاره آبی این سیانوباکتر دارای اثر ضدباکتریایی در خور توجهی علیه باکتری‌های مورد بررسی بود. بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) به اندازه ۲۶/۳۳ میلی‌متر بود، در صورتی که بیش‌ترین قطر هاله

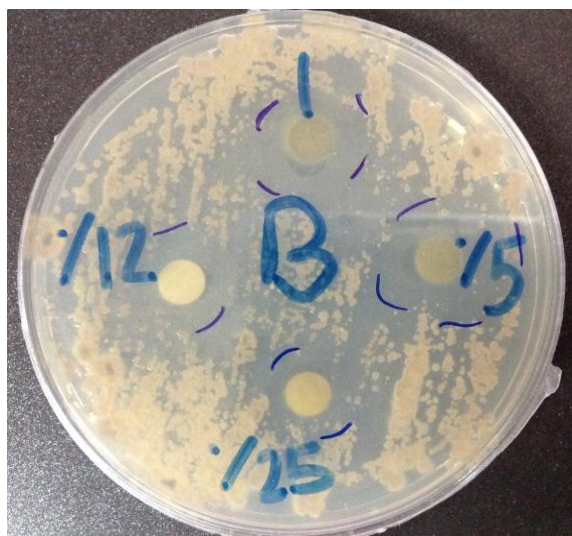


شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف (گرم بر لیتر) عصاره آبی سیانوباکتری‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

جدول ۲- میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی‌متر) و انحراف معیار حاصل از تأثیر عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* و عصاره آبی *Synechococcus elangatus* علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

<i>Staphylococcus aureus</i> (PTCC 1112)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (PTCC 1114)	<i>Enterococcus faecalis</i> (PTCC 1237)	<i>Bacillus cereus</i> (PTCC 1247)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (PTCC 1447)	<i>Escherichia coli</i> (PTCC 1338)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PTCC 1430)	<i>Proteus vulgaris</i> (PTCC 1312)	<i>typhi</i> (PTCC 1609)	<i>Yersinia pestis</i>		
۲۸/۶۷ ۱/۱۵±	۱۰/۶۷ ۰/۵۷±	۲۵/۳۳ ۰/۵۷±	۲۱/۶۷ ۱/۵۲±	۲۳/۳۳ ۱/۵۲±	۱۳ ۱±	۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	۲۰/۳۳ ۰/۵۷±	۲۱/۳۳ ۱/۱۵±	۲۵/۳۳ ۰/۵۷±	جنتامایسین	کنترل‌های مثبت
۲۳/۳۳ ۰/۵۷±	۱۰/۳۳ ۰/۵۷±	۲۰/۶۷ ۰/۵۷±	۱۸/۳۳ ۰/۵۷±	۱۲ ۰±	۱۴/۶۷ ۱/۱۵±	۲۱ ۱/۷۳±	۱۰ ۰±	۱۵/۳۳ ۰/۵۷±	۲۱/۳۳ ۰/۵۷±	استرپتومایسین	
۳۰/۳۳ ۰/۵۷±	۳۱/۳۳ ۰/۵۷±	۲۳/۶۷ ۰/۵۷±	۲۳/۶۷ ۲/۳±	۱۵/۶۷ ۰/۵۷±	۲۳/۳۳ ۰/۵۷±	۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	۱۶/۳۳ ۰/۵۷±	۲۸/۶۷ ۰/۵۷±	۳۰/۳۳ ۰/۵۷±	کلرامفنیکل	
۱۵/۳۳ ۰/۵۷±	مقاوم	۱۶/۶۷ ۱/۱۵±	۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	۱۶/۳۳ ۱/۵۲±	مقاوم	۱۲/۳۳ ۰/۵۷±	۱۴/۳۳ ۰/۵۷±	۲۲/۶۷ ۲/۰۸±	۲۲ ۱±	نالیدیکسیک اسید	
۲۷/۳۳ ۰/۵۷±	مقاوم	۱۶ ۱±	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	۱۱/۵ ۰/۵±	مقاوم	پنی سیلین	
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۹ ۱±	۲۰/۶۷ ۱/۱۵±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۶/۳۳ ۰/۵۷±	۲۷/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۳۱/۳ ^۰	<i>Fischerella ambigua</i>
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۷/۶۷ ۰/۵۷±	۱۹ ۰±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۲۳/۶۷ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۹	
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۵/۳۳ ۰/۵۷±	۱۸ ۱±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۲۰/۶۷ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۹/۸	
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۳/۶۷ ۰/۵۷±	۱۴/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۵	
۳۳/۳۳ ۰/۵۷±	۳۲/۳۳ ۰/۵۷±	۲۴ ۱±	۲۰/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۶/۳۳ ۰/۵۷±	۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۲۹/۵	<i>Fischerella ambigua</i>
۳۰ ۰±	۲۷/۳۳ ۰/۵۷±	۲۱/۳۳ ۰/۵۷±	۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۶/۶۷ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۹/۶	
۲۸/۶۷ ۱/۱۵±	۲۵ ۱±	۱۹/۶۷ ۰/۵۷±	۱۷/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۳/۶۷ ۱/۱۵±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۹/۲	
۲۲ ۰±	۱۷/۳۳ ۰/۵۷±	۱۳/۶۷ ۰/۵۷±	۱۲/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۸ ۰±	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۴/۱	
۲۶/۳۳ ۱/۵۲±	۲۴/۳۳ ۰/۵۷±	۱۴/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۱۸/۶۷ ۰/۵۷±	۲۰/۳۳ ۰/۵۷±	۲۲/۳۳ ۰/۵۷±	۱۵/۶۷ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۱۵/۶۷ ۰/۵۷±	۲۹/۲	<i>Synechococcus elangatus</i>
۱۹/۳۳ ۰/۵۷±	۱۷/۳۳ ۰/۵۷±	۱۱/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۱۵ ۰±	۱۵/۳۳ ۰/۵۷±	۱۹ ۰±	۱۴/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۱۳/۳۳ ۰/۵۷±	۱۸/۵	
۱۴/۶۷ ۰/۵۷±	۱۳/۳۳ ۰/۵۷±	۹/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۱۱/۳۳ ۰/۵۷±	۹/۳۳ ۰/۵۷±	۱۶/۶۷ ۰/۵۷±	۱۱/۶۷ ۱/۱۵±	عدم تأثیر	۱۱/۶۷ ۰/۵۷±	۹/۴	
۸/۳۳ ۰/۵۷±	۱۰/۳۳ ۰/۵۷±	۶/۶۷ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۷/۳۳ ۰/۵۷±	۷/۳۳ ۰/۵۷±	۱۲/۶۷ ۰/۵۷±	۹/۳۳ ۰/۵۷±	عدم تأثیر	۹/۳۳ ۰/۵۷±	۴/۳	

*: مقدار عصاره جذب شده (میلی گرم بر میلی لیتر)



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف (گرم بر لیتر) عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* بر روی قارچ بوتریتیس سینه‌آ

نتایج حاصل از تأثیر کنترل‌های مثبت (آنتی‌بیوتیک‌های رایج) و مقایسه تأثیر آن‌ها با عصاره‌های سیانوباکتریایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که تمام باکتری‌های گرم منفی به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، استرپتومایسین و کلرامفنیکل حساس بودند. مؤثرترین عصاره بر روی باکتری‌های گرم منفی عصاره آبی *Synechococcus elangatus* و مؤثرترین عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت عصاره آبی *Fischerella ambigua* بود. کم‌اثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌های گرم منفی مربوط به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بود. تأثیر عصاره متانولی *Fischerella ambigua* (۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی باکتری پروتئوس ولگاریس (PTCC 1312) از تمام آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر روی این باکتری بیشتر بود.

نتایج حاصل از اثر ضدقارچی عصاره‌ها بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری نشان داد که عصاره متانولی گونه‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* و عصاره آبی *Synechococcus elangatus* فعالیت ضدقارچی نشان دادند (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده تقریباً برابر صفر است ($P \text{ value} \leq 0.01$). بنابراین، اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گونه‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* و عصاره آبی *Synechococcus elangatus* بر روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی معنادار است. نتایج به دست آمده نشان داد که از بین عصاره‌های مورد آزمایش تنها عصاره متانولی *Fischerella ambigua* بر روی هر ۴ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی اثر مهاری داشت (شکل ۲). این عصاره بیش‌ترین تأثیر را بر روی قارچ *راینکوسپوریوم سکالیس* داشت به طوری که قطر هاله حاصل از تأثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری اطراف آن ۳۰/۶۷ میلی‌متر بود. عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی قارچ‌های *فوزاریوم سولانی* و *فوزاریوم اوکسیسپوروم* تأثیر تقریباً یکسانی داشت. همچنین، نتایج نشان داد که عصاره متانولی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* تنها بر روی قارچ *فوزاریوم سولانی* تأثیر داشت. به طوری که این قارچ به دیسک‌های حاوی ۲۸/۴ و ۱۹/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این سیانوباکتری حساسیت نشان داد. عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی قارچ *راینکوسپوریوم سکالیس*، *بوتریتیس سینه‌آ* و *فوزاریوم اوکسیسپوروم* هیچ تأثیری نداشت.

جدول ۳- میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی‌متر) و انحراف معیار حاصل از تأثیر عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* و عصاره متانولی *Synechococcus elangatus* علیه ۴ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی.

<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhynchosporium secalis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Botrytis cinerea</i>		
۱/۱۵±۲۲/۶۷	۰/۵۷±۳۵/۶۷	۰±۱۷	۱±۲۸	نیستاتین	کنترل مثبت
۰/۵۷±۱۵/۳۳	۰/۵۷±۳۲/۳۳	۰/۵۷±۱۴/۳۳	۱±۲۰	۳۱/۳*	عصاره متانولی <i>Fischerella ambigua</i>
۱/۱۵±۱۴/۶۷	۰/۵۷±۲۵/۶۷	۰/۵۷±۱۲/۶۷	۰/۵۷±۱۸/۳۳	۱۹	
۰/۵۷±۱۳/۳۳	۰/۵۷±۲۲/۶۷	۱/۱۵±۱۱/۶۷	۰/۵۷±۱۵/۶۷	۹/۸	
۰/۵۷±۱۱/۳۳	۰/۵۷±۱۸/۶۷	۰/۵۷±۹/۳۳	۰/۵۷±۱۴/۳۳	۵	
۰/۵۷±۱۰/۶۷	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۲۹/۵	عصاره آبی <i>Fischerella ambigua</i>
۰/۵۷±۹/۶۷	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۹/۶	
۰/۵۷±۸/۳۳	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۹/۲	
عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۴/۱	
۰/۵۷±۱۱/۳۳	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۲۸/۴	عصاره متانولی <i>Synechococcus elangatus</i>
۰/۵۷±۱۰/۳۳	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۹/۱	
۰/۵۷±۷/۳۳	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۰/۱	
۰/۵۷±۶/۶۷	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۴/۸	

*: مقدار عصاره جذب شده (میلی گرم بر میلی لیتر)

کلرامفنیکل و مؤثرترین عصاره بر روی این باکتری عصاره آبی *Fischerella ambigua* (۲۹/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بود. نتایج همچنین نشان داد که دی متیل سولفو کساید به عنوان کنترل منفی هیچ گونه اثر ضدباکتریایی نداشت.

مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی و متانولی سیانوباکتری‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا در جدول ۴ مشخص شده است. این نتایج نیز نشان می‌دهند که عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری‌های پروتئوس و لگاریس (PTCC 1312) و باسیلوس سرئوس (PTCC 1247) اثر کشندگی و بر روی باکتری ائروکوکوس فیکالیس (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت. عصاره متانولی این سیانوباکتری در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر

از بین عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1430) بیش‌ترین تأثیر را عصاره آبی *Synechococcus elangatus* (۲۹/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) داشت. مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و مؤثرترین عصاره علیه باکتری‌های گرم مثبت عصاره آبی *Fischerella ambigua* بود. تأثیر عصاره آبی *Fischerella ambigua* (۲۹/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1112) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس (PTCC1114) از تمام آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر آن‌ها بیشتر بود. کم‌اثرترین آنتی‌بیوتیک مؤثر بر روی باکتری‌های گرم مثبت، آنتی‌بیوتیک پنی سیلین بود. نتایج بررسی قطر هاله حاصل از تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری باسیلوس سرئوس (PTCC 1247) نشان داد که مؤثرترین آنتی‌بیوتیک بر روی این باکتری، آنتی‌بیوتیک

باکتری‌های گرم منفی بود ($P \text{ value} \leq 0/01$). عصاره آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری سودوموناس آنروژینوزا (PTCC 1430) اثر کشندگی و بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی (PTCC 1338)، استرپتوکوکوس پایوژنز (PTCC 1447)، یرسینا پستیس، پروتئوس و لگاریس (PTCC 1312)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس (PTCC 1114) اثر بازدارندگی داشت. غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر این عصاره بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس پایوژنز (PTCC 1447)، پروتئوس و لگاریس (PTCC 1312)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس (PTCC 1114) اثر کشندگی و بر روی باکتری آنروکوکوس فیکالیس (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت.

میلی لیتر بر روی باکتری آنروکوکوس فیکالیس (PTCC 1237) اثر کشندگی داشت. تحلیل‌های آماری در سطح یک درصد نشان داد که اختلاف معناداری بین اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود ندارد. همچنین، مشخص شد که عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، استافیلوکوکوس اپیدرمیس (PTCC 1114)، آنروکوکوس فیکالیس (PTCC 1237) و باسیلوس سرئوس (PTCC 1247) اثر کشندگی و بر روی پروتئوس و لگاریس (PTCC 1312) اثر بازدارندگی داشت. این عصاره در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری‌های پروتئوس و لگاریس (PTCC 1312) اثر کشندگی داشت. تحلیلی داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت به طور معناداری بیشتر از

جدول ۴- مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* و آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا (میلی گرم بر میلی لیتر)

عصاره متانولی <i>Fischerella ambigua</i>		عصاره آبی <i>Fischerella ambigua</i>		عصاره آبی <i>Synechococcus elangatus</i>		باکتری‌ها
حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی	
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	<i>Staphylococcus aureus</i> PTCC 1112
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	<i>Staphylococcus epidermidis</i> PTCC 1114
عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	<i>faecalis</i> PTCC <i>Enterococcus</i> PTCC 1237
۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عدم تأثیر	عدم تأثیر	<i>Bacillus cereus</i> PTCC 1247
عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۲۵۰	<i>Streptococcus pyogenes</i> PTCC 1447
عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۵۰۰	<i>Escherichia coli</i> PTCC 1338
۵۰۰	۱۰۰۰	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۱۲۵	<i>aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> PTCC 1430
۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC 1312
عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	<i>Salmonella typhi</i> PTCC 1609
عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	عدم تأثیر	۱۲۵	۵۰۰	<i>Yersinia pestis</i>

بحث و نتیجه گیری

با توجه به مقاومت روز افزون میکروارگانیزم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی در نواحی متعددی از دنیا، شناسایی میکروارگانیزم‌های توانمند و بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها اهمیت خاصی دارد. در طی دهه اخیر سیانوباکترها به عنوان منبع غنی از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی، ویتامین‌ها، سوخت و تولیدات دارویی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۱۸). با این حال، تاکنون در کشور ایران در مقایسه با سایر کشورها در زمینه شناخت ترکیبات آنتی‌بیوتیکی و بررسی خواص دارویی سیانوباکتری‌ها مطالعات کاربردی اندکی انجام شده است.

نتایج حاصل از بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی ۳ گونه سیانوباکتری *Fischerella* *Synechococcus elangatus*, *ambigua* ISC67 و ISC106 و *Schizothrix vaginata* ISC108 در این پژوهش نشان داد که تنها عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* دارای فعالیت ضدباکتریایی است و عصاره متانولی گونه‌های دیگر دارای اثر ضدباکتریایی معناداری نیست. ساکتیول^{۳۹} و همکاران نیز ضمن بررسی خواص ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها نشان دادند که متانول بهترین حلال برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی از سیانوباکتری‌هاست (۱۵). آن‌ها همچنین نشان دادند که متانول برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی برخی از سیانوباکتری‌ها سینکوکوس الانگاتوس^{۴۰} و اوسیلاتوریا ویلیه^{۴۱} حلال مناسبی نیست. با بررسی خواص ضدباکتریایی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* مشخص شد که این سیانوباکتری از بین باکتری‌های گرم مثبت بر روی باکتری‌های باسیلوس سرئوس (PTCC 1247) و

اتروکوس فیکالیس (PTCC 1237) اثر داشته و سایر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به این عصاره مقاوم بودند. همچنین، مشخص شد که عصاره متانولی این سیانوباکتری از بین باکتری‌های گرم منفی بیش‌ترین تأثیر را بر روی پروتئوس ولگاریس (PTCC 1312) داشته است. قاسمی و همکاران نیز در پژوهش خود نشان دادند که عصاره متانولی سیانوباکتری‌ها دارای در خور قابل توجهی علیه باکتری‌های پاتوژن است و بیش‌ترین تأثیر را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و پروتئوس ولگاریس دارد. آن‌ها در نتیجه پژوهش خود، با توجه به مطالعات و تحقیقات زیادی که در این زمینه توسط پژوهشگران در سراسر دنیا انجام شده بود، گزارش کردند که، ترکیبات زیادی، از جمله، فیشرلین^{۴۲} و آمیگوتین^{۴۳} از این سیانوباکتری تولید می‌شود که این ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی هستند (۱۰).

اگرچه در بیشتر مطالعات عصاره‌های به دست آمده از سیانوباکتری‌ها علیه باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیا کلی* و پروتئوس ولگاریس مؤثر هستند، اما در این پژوهش مشخص شد که عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* بر روی باکتری *اشریشیا کلی* هیچ اثری ندارد. این نتیجه با با نتایج زندگی و همکاران و قاسمی و همکاران مطابقت دارد ولی با یافته‌های تیواری^{۴۴} و شارما مطابقت ندارد (۱۰، ۲۹ و ۳۰)، آن‌ها گزارش دادند که ترکیبات فعال موجود در عصاره متانولی سیانوباکتری فیشرلا^{۴۵} علیه باکتری *اشریشیا کلی* مؤثر است. نتایج نشان داد که عصاره متانولی *Fischerella ambigua* بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و مثبت مورد بررسی به یک اندازه تأثیر داشت به طوری که اختلاف معناداری بین تأثیر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت با گرم

منفی دیده نشد ($P \text{ value} \geq 0/01$). در مطالعات مشابه، قاسمی و همکاران و همچنین سلطانی و همکاران نشان دادند که بین تأثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معناداری وجود ندارد (۱۰ و ۳۱).

نتایج به دست آمده از بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* نشان داد که این عصاره دارای اثر در خور توجهی بر روی اکثر باکتری‌های گرم مثبت است و از بین باکتری‌های گرم منفی تنها باکتری پروتئوس ولگاریس (PTCC 1312) نسبت به این عصاره حساس بود. دافی و پاور^{۴۶} گزارش کردند که، یک توضیح احتمالی برای این مشاهدات ممکن است به تفاوت‌های قابل توجهی که در لایه‌های بیرونی باکتری‌های گرم منفی و مثبت وجود دارد، نسبت داده شود. آن‌ها بیان کردند که باکتری‌های گرم منفی دارای یک غشای خارجی و فضای پری‌پلاسمیک منحصر به فردی هستند که در باکتری‌های گرم مثبت وجود ندارند (۳۲). سلطانی و همکاران و قاسمی و همکاران نیز با بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* دریافتند که این عصاره دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است، طوری که تأثیر این عصاره از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر این باکتری بیشتر بود (۱۰ و ۳۱). این در حالی است که تیواری و شارما نشان دادند که بر خلاف نتایج به دست آمده در این مطالعه، عصاره آبی سیانوباکتری‌ها فاقد اثر ضدباکتریایی است (۳۰). همچنین، نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که این عصاره دارای اثر در خور توجهی بر

روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. با این حال، اثر این عصاره علیه باکتری‌های گرم مثبت کمتر یا تقریباً یکسان با باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج حاصل از تأثیر این عصاره با یافته‌های مارتینز^{۴۷} و همکاران مطابقت دارد، آن‌ها در پژوهش خود ضمن بررسی فعالیت ضدباکتریایی سیانوباکتری‌های جنس سینکوسیستیس^{۴۸} و سینکوکوس علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسان، نشان دادند که عصاره‌های به دست آمده از سیانوباکتری‌ها دارای فعالیت ضدباکتریایی معناداری علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است (۳۳). همچنین، در این پژوهش نشان داده شد که عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* فاقد اثرات ضدباکتریایی و ضد قارچی است. تاکنون پژوهشی مبنی بر اثرات ضد میکروبی عصاره آبی و متانولی این سیانوباکتری گزارش نشده است.

نتایج حاصل از اثر ضدباکتریایی عصاره‌های حاصل از سیانوباکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا نشان داد که اثر این عصاره‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. نتایج پژوهش‌های زیادی نشان داد که اثرات عصاره‌های به دست آمده از سیانوباکتری‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. برای مثال سلطانی و همکاران در بررسی خواص ضد میکروبی سیانوباکتری فیشرلا^{۴۹} تحت تأثیر تنش‌های شوری نشان دادند که اثر عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیس و باسیلوس سرئوس بیشتر از اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم منفی مانند شریشیا کلی و انتروکوکوس فیکالیس (PTCC 1237) است (۳۱). شان^{۵۰} و همکاران گزارش

آمیگوتین تولید شده توسط سیانوباکتری فیشرلا دارای فعالیت ضدقارچی مطلوبی بر روی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنز، پنی سیلیوم نوتاتوم و ساکارومایسس سرویزیه است (۳۷).

طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که در تمام عصاره‌های مؤثر بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا، با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان قطر هاله مهاري و در نتیجه میزان فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌ها افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای مشابه متیوانان^{۵۴} و همکاران نشان دادند که بین قطر هاله عدم رشد و غلظت عصاره سیانوباکتری‌های لینجییا ماجوسکولا^{۵۵} و اوسیلاتوریا پرنیسیس^{۵۶} رابطه مستقیمی وجود دارد (۳۸).

تاکنون متابولیت‌های ثانویه فراوانی با فعالیت ضد میکروبی از سیانوباکتری‌ها جداسازی و شناسایی شده‌اند، برای مثال چاندر^{۵۷} و راجاشخار^{۵۸} با بررسی فیتوشیمیایی عصاره‌های اتانولی، متانولی، کلروفرمی، دی اتیل اتری و آبی چند گونه از سیانوباکتری‌ها نشان دادند که فنول، فلاونوئید و کارتوئید در تمام عصاره‌های به دست آمده وجود دارند، در حالی که آلکالوئیدها و استروئیدها/ تریترین‌ها در همه عصاره‌ها به جز عصاره آبی سیانوباکتری‌ها وجود داشتند. همچنین، به طور مشابه فیکوسیائین‌ها در تمام عصاره‌ها به استثنای عصاره کلروفرمی موجود بودند. تانین‌ها در تمام عصاره‌ها به جزء عصاره آبی و کلروفرمی وجود داشتند اما ساپونین‌ها و کومارین‌ها در هیچ کدام از عصاره‌ها موجود نبودند. آن‌ها نشان دادند که این ترکیبات دارای فعالیت‌های ضد میکروبی هستند (۳۹). چو^{۵۹} و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی و تریپنوئیدها دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند و قادرند از طریق تخریب

کردند که مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به مواد ضد باکتریایی مربوط به سطح آب دوست غشای خارجی آنهاست که غنی از مولکول‌های لیپوپلی ساکارید است، که یک مانع برای نفوذ مولکول‌های متعددی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدباکتریایی تشکیل می‌دهند. از سوی دیگر غشا نیز با آنزیم‌ها موجود در فضای پری پلاسمیک، که قادر به شکستن مولکول‌های وارد شده از خارج سلول‌اند، در ارتباط است (۳۴). با این حال، کالمبا و کونیکا^{۵۱} بیان کردند که باکتری‌های گرم مثبت بر خلاف باکتری‌های گرم منفی فاقد غشای خارجی و ساختار دیواره سلولی هستند. آن‌ها نیز گزارش کردند که اثر عصاره سیانوباکتری‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است و آن را با اختلاف ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت با گرم منفی مرتبط دانستند (۳۵). همچنین، در این پژوهش مشخص شد که حساسیت قارچ‌های مورد بررسی به عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که متانول بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدقارچی از سیانوباکتری‌هاست این یافته‌ها با نتایج پریادهارشینی^{۵۲} و همکاران نیز مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که عصاره متانولی سیانوباکتری‌ها دارای فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به عصاره آبی و استونی هستند (۳۶). این در حالی است که این نتایج با پژوهش قاسمی و همکاران مطابقت ندارد، آن‌ها نشان دادند که فعالیت ضد قارچی عصاره آبی فیشرلا نسبت به عصاره متانولی آن بیشتر است (۱۰). پژوهش‌های زیادی در زمینه شناسایی و جداسازی ترکیبات ضد قارچی سیانوباکتری‌ها انجام شده است. در نخستین مطالعات انجام شده، اسمیتکا^{۵۳} و همکاران نشان دادند که ترکیب

میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل دارویی بالقوه است (۱۹).

در ایران در سال‌های اخیر، رویکرد پژوهش‌های جدید به سمت مسائل زیست محیطی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها در صنعت داروسازی و پزشکی بوده است. با این حال، بیشتر پژوهش‌ها متمرکز بر میکروارگانیسم‌های خاصی بوده و سیانوباکتری‌ها با وجود تنوع فراوان در فعالیت‌های زیستی به جهت شناخت کمی که نسبت به این میکروارگانیسم‌ها وجود دارد، همچنین دشواری مراحل کشت خالص آنها کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر، مطالعات در زمینه استفاده از سیانوباکتری‌ها به عنوان منبعی از ترکیبات ضد میکروبی و منابع طبیعی برای مقابله با بیماری‌های عفونی و باکتریایی نسبتاً کم بوده است. یکی از مهم‌ترین علت‌های استفاده کمتر از این میکروارگانیسم‌ها ممکن است اثر جانبی ناشی از سموم بسیار قوی باشد که توسط برخی از گونه‌های سیانوباکتری‌ها تولید می‌شود. این سموم حیات بسیاری از موجودات زنده از جمله آبزیان و دام‌های اهلی که از آب رودخانه‌ها و برکه‌ها استفاده می‌کنند را به خطر می‌اندازد. از این رو شناسایی سیانوباکتری‌های مفید و پژوهش در زمینه استفاده کاربردی از آنها در صنعت و پزشکی امری ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر، جزو پژوهش‌های انجام گرفته در زمینه کاربردهای پزشکی این میکروارگانیسم‌ها در ایران است. در این مطالعه بررسی فعالیت ضد میکروبی گونه *Schizothrix vaginata* برای نخستین بار در کشور انجام شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، از میان سیانوباکتری‌های مورد بررسی، تنها سیانوباکتری *Fischerella ambigua* بود که هر دو عصاره به دست

غشا از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کنند (۴۰). در مطالعه دیگری کوشینی^{۶۰} و همکاران گزارش کردند که فعالیت ضد میکروبی فلاونوئیدها احتمالاً ناشی از توانایی آنها برای تشکیل کمپلکسی با پروتئین‌های خارج سلولی و محلول و در نهایت، با دیواره سلولی باکتری‌هاست (۴۱). همچنین، توییت^{۶۱} در سال ۲۰۱۰ در پژوهش خود در زمینه شناسایی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط سیانوباکتری‌ها، با بررسی عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* ۶ ترکیب تولید شده توسط این سیانوباکتری را جداسازی و شناسایی کرد. این ترکیبات شامل آمیگوتین D ایزونیتریل^{۶۲}، آمیگوتین B ایزونیتریل^{۶۳}، دی‌کلرو آمیگوتین B ایزونیتریل، فیشیرلین^{۶۴} A، همچنین هیدروکسی-ایکوساتترائوئیک اسید^{۶۵} و متوکسی-نانادکادنوئیک اسید^{۶۶} بودند. توییت بیان کرد که این ترکیبات دارای فعالیت‌های زیستی هستند (۴۲). راون و کارملی^{۶۷} در پژوهش خود نشان دادند که آمیگوتین D ایزونیتریل و آمیگوتین B ایزونیتریل دارای اثرات ضد باکتری و ضدقارچی متوسطی هستند (۴۳).

به نظر می‌رسد با توجه به تولید مواد ضد میکروبی فراوان توسط سیانوباکتری‌ها، احتمالاً سنتز این متابولیت‌ها نتیجه دفاع سیانوباکتری‌ها در محیط علیه ارگانیسم‌های دیگر مثل: باکتری، قارچ، ویروس و ریزجلبک‌های یوکاریوتی است که می‌تواند یک مزیت برای بقای این میکروارگانیسم‌ها در محیط طبیعی باشد (۴۴). در این زمینه زرینی و همکاران گزارش کردند که تولید ترکیبات ضد باکتریایی و ضدقارچی توسط سیانوباکتری‌ها می‌تواند بازتابی از شرایط محیطی و نیز هویت سیانوباکتری‌ها باشد. استعداد سیانوباکتری‌ها به عنوان منبع ترکیبات آنتی‌بیوتیکی نشانگر اهمیت این

نفت خام توسط سیانوباکتری‌ها» مصوب سال ۱۳۹۰ با کد ۱۰۶۵۸۳۹ است که با حمایت دانشگاه ایلام و همکاری گروه میکروبیولوژی نفت پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا شده است.

References

- (1) Lopes V.R., Ramos V., Martins A., Sousa M., Welker M., Antunes A., et al. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research* 2012; 73: 7- 16.
- (2) Baskara V, Sethubathi G, Ashok Prabu V. Antibacterial Activity of Cyanobacterial Species from Adirampattinam Coast, Southeast Coast of Palk Bay. *Current Research Journal of Biological Sciences* 2010; 2 (1): 24- 6.
- (3) Nieto P.J.G., Lasheras F.S., Juez F.J.C, Fernandez J.R.A. Study of cyanotoxins presence from experimental cyanobacteria concentrations using a new data mining methodology based on multivariate adaptive regression splines in Trasona reservoir (Northern Spain). *Journal of Hazardous Materials* 2011; 195: 414- 21.
- (4) Rikkinen J. Molecular studies on cyanobacteria diversity in lichen symbioses. *MycoKeys* 2013; 6: 1- 32.
- (5) Shokravi Sh., Soltani N., Baftechi L., *Cyanobacteriology*, 1st. ed. Gorgan: Islamic Azad University of Gorgan; 2009.
- (6) Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L., Broadwater S.T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 2005; 41: 421- 38.

آمده از آن (متانولی و آبی) دارای فعالیت ضدباکتریایی بود و هیچ یک از عصاره‌های آبی و متانولی *Schizothrix vaginata* و عصاره متانولی *Synechococcus elangatus* اثرات ضدباکتریایی نداشتند. بیشترین اثرات ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها مربوط به عصاره آبی *Synechococcus elangatus* بود. همچنین، در این مطالعه مشخص شد که بیشترین اثر ضد قارچی مربوط به عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* است. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان بیان کرد که عصاره آبی *Synechococcus elangatus* بهترین عصاره برای جداسازی ترکیبات ضدباکتریایی و متانول نیز بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدقارچی از این سیانوباکتری است. همچنین، مشخص شد هیچ کدام از حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش برای استخراج متابولیت‌های ضد میکروبی *Schizothrix vaginata* مناسب نیست و از این رو پژوهش‌های بیشتری بر روی این گونه با سایر حلال‌ها پیشنهاد می‌شود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که از میان سیانوباکتری‌های مورد بررسی، دو گونه سیانوباکتری *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و می‌توانند یک کاندیدای خوب برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی باشند و به نظر می‌رسد می‌توان از ترکیبات موجود در عصاره آن‌ها به عنوان دارو در کنترل و مهار بسیاری از بیماری‌ها استفاده کرد که بررسی بیشتر اثرات آن مستلزم مطالعات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد با عنوان «بررسی اثرات ضد میکروبی و تجزیه زیستی

- (7) Mishra A.K., Shukla E., Singh S.S. Phlogenetic comparison among the heterocystous cyanobacteria based on a polyphasic approach. *Protoplasma* 2013; 250 (1):77- 94.
- (8) Soltani N., Dezfolian M., Shokravi Sh., Baftechi L., Shima E. Isolation and Morphological and Molecular Identification of New Species of Cyanobacteria from Firoozkoo region (Tehran Province) Using Different Culture Media. *Journal of science kharazmi university* 2010; 8 (4): 319- 28.
- (9) Riyahi H., Shokravi Sh., Soltani N., Study of algal flora from Uromia Lake. *Pajouhesh- Va- Sazandgi* 1995; 25: 23- 5.
- (10) Ghasemi Y., Tabatabaei-Yazdi M., Shokravi S., Soltani N., Zarrini G. Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 2003; 14 (3): 203- 209.
- (11) Kalaitzis J.A., Lauro F.M., Neilan B.A. Mining cyanobacterial genomes for genes encoding complex biosynthetic pathways. *Natural Product Reports* 2009; 26 (11): 1447- 65.
- (12) Cragg G.M., Newman D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1830 (11): 3670- 695.
- (13) Harvey A.L. Natural products in drug discovery. *Drug discovery today* 2008; 13: 894- 901.
- (14) Cardellina J.H., Moore B.S. Editorial: Richard E. Moore (1933- 2007). *Journal of Natural Products* 2010; 73 (3): 301- 2.
- (15) Sakthivel K., Kathiresan K. Antimicrobial activities of marine cyanobacteria isolated from mangrove environment of south east coast of India. *Journal of Natural Products* 2012; 5: 147- 56.
- (16) Oftedal L., Selheim F., Wahlsten M., Sivonen K., Døskeland S.O., Herfindal L. Marine Benthic Cyanobacteria Contain Apoptosis-Inducing Activity Synergizing with daunorubicin to Kill Leukemia Cells, but not Cardiomyocytes. *Marine Drugs* 2010; 8: 2659- 672.
- (17) Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Yazdi M.T, Shokravi S., Fernández-Valiente E. Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology* 2005; 43 (5): 455- 59.
- (18) Abed R.M.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 106 (1): 1- 12.
- (19) Zarrini G., Rasooli I., Abazari M., Ghasemi Y. Investigation of Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Urmia Lake Catchment Area. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 2011; 11 (4): 329- 36.
- (20) Andersen R.A. *Algal culturing techniques*. 1st. ed. West Boothbay Harbor, ME USA: Elsevier Academic Press. 2005.
- (21) Shyam K.R., Thajuddin N., Venkateswari C. Antibacterial activity of cyanolichen and symbiotic cyanobacteria against some selected microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (13): 1408- 11.
- (22) Val A.G., Platas G., Basilio A., Cabello A., Gorrochategui J. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology* 2001; 4 (1): 35- 40.
- (23) Ahmady-Asbchin S., Safari M., Moradi H., Sayadi V. Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (*Mespilus germanica*) against bacteria isolated from hospital environment. *Arak Medical University Journal* 2013; 16 (75): 1- 13.
- (24) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009a, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 10th. ed. Approved Standard. Wayne, PA.

- (25) Valadbeygi T., Moradi H. An investigation of antibacterial effect of methanol and acetone extracts in some lichens in Ilam. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 5 (1): 463- 50.
- (26) Kumar M., Kumar M.T., Srivastava A., Kumar G.J., Kumar S.R., Tilak R., et al. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; 3 (6): 458- 63.
- (27) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009b, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 17th. ed. Approved Standard. Wayne, PA.
- (28) Yilmaz M.T. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2012; 42(1): 1423- 9.
- (29) Zandi F., Hossini R., Soltani N., Abolhasani Soorki A. Comparative Assay on the Antimicrobial Activity of Cyanobacterial Isolates from Oil-polluted and Non-polluted Areas of Khozestan (Iran). *Environmental Sciences* 2012; 9: 97- 106.
- (30) Tiwari A., Sharma D. Antibacterial Activity of Bloom forming Cyanobacteria against Clinically Isolated Human Pathogenic Microbes. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2013; 4 (1):83- 9.
- (31) Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Tabatabaei-Yazdi M., Shokravi S. Growth and Some metabolic Features of Cyanobacterium *Fischerella* Sp. FS18 in Different Combined Nitrogen Sources. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran* 2007; 18 (2): 123- 8.
- (32) Duffy C.F., Power R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of Chinese plant extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 7: 191- 201.
- (33) Martins R.F., Ramos M., Herfindal L., Sousa J.A., Skarven K., Vasconcelos V.M. Antimicrobial and cytotoxic Assessment of Marine cyanobacteria- *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marin Drugs* 2008; 6: 1- 11
- (34) Shan L., He P., Sheen J. Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 167- 74.
- (35) Kalembe D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10 (10): 813- 29.
- (36) Priyadharshini R., Ambikapathy V., Pavai T. *In vitro* Antimicrobial Activity of *Oscillatoria angustissima*. *International Journal of Advanced Research*. 2013; 1 (4): 60- 8.
- (37) Smitka T.A., Bonjouklian R., Doolin L., Jones N.D., Deeter J.B., Yoshida W.Y., et al. Ambiguine isonitriles, fungicidal hapalindole-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the Stigonemataceae. *Journal of Organic Chemistry* 1992; 57: 857- 61.
- (38) Mathivanan K., Ramamuthy V., Rajaram R. Antimicrobial activity of *Oscillatoria princeps* and *Lyngbya majuscula* against pathogenic microbes. *International journal of Current Research* 2010; 5: 97- 101.
- (39) Chandra K., Rajashekhar M. Antimicrobial activity of freshwater cyanobacteria isolated from pharmaceutical wastes. *African Journal of Microbiology Research* 2013; 7 (17): 1757- 65.
- (40) Cho W.I., Choi J.B., Lee K., Chung M.S., Pyun Y.R. Antimicrobial activity of Toilin Isolated from *Torilis japonica* Fruit against *Bacillus subtilis*. *JFS M: Food Microbiology and Safety* 2008; 1: 37- 43.
- (41) Cushinie T., Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26 (5): 343- 56.
- (42) Tuyet L.T.A. Chemical and Biological Investigations of Vietnamese Cyanobacteria [Dissertation]. Germany: Ernst-Moritz-Arndt University; 2010.

(43) Raveh A., Carmeli S. Antimicrobial ambiguines from the cyanobacterium *Fischerella* sp. Collected in Israel. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 196- 201.

(44) Thajuddin N., Subramanian G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 2005; 89: 47- 57.

-
- 1- Cyanobacteria
 - 2- International Code of Botanical Nomenclature
 - 3- International Code of Nomenclature of Prokaryotes
 - 4- polyphasic approach
 - 5- Soltani
 - 6- *Chroococcus*
 - 7- *Lyngbya*
 - 8- *Anabaena*
 - 9- *Synechococcus*
 - 10- *Oscillatoria*
 - 11- *Stigonema*
 - 12- *Anabaenopsis*
 - 13- *Nostoc*
 - 14- *Calothrix*
 - 15- Richard Moore
 - 16- Zarrini
 - 17- Soltani
 - 18- Val
 - 19- *Staphylococcus aureus*
 - 20- *Staphylococcus epidermidis*
 - 21- *Bacillus cereus*
 - 22- *Enterococcus faecalis*
 - 23- *Streptococcus pyogenes*
 - 24- *Escherichia coli*
 - 25- *Proteus vulgaris*
 - 26- *Pseudomonas aeruginosa*
 - 27- *Salmonella typhi*
 - 28- *Yersinia pestis*
 - 29- *Fusarium Solani*
 - 30- *Rhynchosporium secalis*
 - 31- *Botrytis cinerea*
 - 32- *Fusarium oxysporum*
 - 33- Kirby-bauer
 - 34- Broth microdilution
 - 35- *Clinical and Laboratory Standards Institute*
 - 36- SPSS
 - 37- ANOVA
 - 38- Duncan
 - 39- Sakthivel
 - 40- *Synechococcus elangatus*
 - 41- *Oscillatoria willei*
 - 42- Fischerellin
 - 43- Ambiguine
 - 44- Tiwari
 - 45- *Fischerella*
 - 46- Duffy and Power
 - 47- Martins
 - 48- *Synechocystis*
 - 49- *Fischerella* sp.

- 50- Shan
- 51- Kalembe and Kunicka
- 52- Priyadharshini
- 53- Smitka
- 54- Mathivanan
- 55- *Lyngbiya maguscula*
- 56- *Oscillatoria princeps*
- 57- Chandra
- 58- Rajashekhar
- 59- Cho
- 60- Cushinie
- 61- Tuyet
- 62- ambiguine D isonitrile
- 63- ambiguine B isonitrile
- 64- fischerellin A
- 65- hydroxy-eicosatetraenoic acid
- 66- methoxy-nonadecadienoic acid
- 67- Raveh and Carmeli

In Vitro Assessment of Antimicrobial Activity from Aqueous and Methanolic Extracts of Some Species of Cyanobacteria

Moein Safari *

M.Sc. of Microbiology, Ilam University, Iran, m.safari@mail.ilam.ac.ir

Salman Ahmady-Asbchin

Associate Professor of Biology-Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, sahmadyas@yahoo.fr

Neda Soltani

Associate Professor of Biology, Research Institute of applied science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, soltani6@yahoo.com

Abstract

Introduction: Cyanobacteria have been identified as a new and rich source of bioactive compounds. Attention to the properties of cyanobacteria as a good source of secondary metabolites in the past was very low but today has been shown that these microorganisms have many applications in the medical field and pharmaceutical products.

Materials and methods: In this experimental study, the cyanobacteria of *Synechococcus elangatus* ISC 106, *Fischerella ambigua* ISC67 and *Schizothrix vaginata* ISC108 were obtained from the algal culture collection of research institute of applied science, ACECR, Tehran, Iran. Extraction was performed by adding the solvent to cyanobacteria biomass and then filtering and drying the mixture. Disk diffusion method was used to study the effect of antimicrobial and broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration.

Results: The results showed that the methanol extract of *Synechococcus elangatus* had no significant effect on the bacteria, but the methanol extract of *Fischerella ambigua* showed antibacterial activity. Aqueous extract of *Fischerella ambigua* had significant effect on Gram-positive bacteria, so that maximum antibacterial activity was against *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112) which the average zone diameter around it was 33.33 mm. Among tested extracts, only methanol extract of *Fischerella ambigua* had inhibitory effects against four plant pathogenic fungi. The effect of aqueous extract *Fischerella ambigua* on *Staphylococcus aureus* (PTCC1112) and *Staphylococcus epidermidis* (PTCC1114) was more effective than all of the affecting antibiotics. The highest antibacterial activity of cyanobacteria was related to aqueous extract of *Synechococcus elangatus* and maximum effect of antifungal activity was related to methanol extract of *Fischerella ambigua*.

Discussion and conclusion: Among the three species of cyanobacteria, two species of cyanobacteria *Fischerella ambigua*, and *Synechococcus elangatus* had antimicrobial activity, thus it can be a good candidate for the extraction of antimicrobial compounds and many compounds found in these extracts can be used to monitor and inhibit many diseases.

Key words: Secondary metabolites, Antimicrobial, Cyanobacteria, Methanol extract, Broth microdilution

* Corresponding author

Received: October 29, 2013 / **Accepted:** June 25, 2014