



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 2322-5173

12<sup>th</sup> Year, Vol. 12, No. 47, Autumn 2023 pp. 117-136

Received: 29.08.2022

Accepted: 22.10.2022

**(Research Paper)**

## **A Comparison of Industrial Application of Exopolysaccharides of Two Strains of Aquatic and Terrestrial Cyanobacteria *Neowestiellopsis Persica* A1387 and *Nostoc Punensis* in Bioremediation of Heavy Metals \***

**Maryam Zaker Firuzabad**

Department of Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

zakerbahar@yahoo.com

**Bahareh Nowruzi** 

Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

bahare77biol@gmail.com

**Sarvenaz Falsafi**

Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

sarvenaz\_falsafi@yahoo.com

### **Abstract**

**Introduction:** The production of exopolysaccharides (EPS) by cyanobacteria in response to heavy metal stress is one of the important features of these microorganisms in the biological treatment of polluted waters. Cyanobacteria, as valuable resources in the production of exopolysaccharides, have distinctive features compared to other bacteria. These compounds are composed of a large number of different monosaccharides, most of which are polymers with 6–13 different sugars, which is in contrast to the polymers produced by other bacteria and microalgae. Also, the exopolysaccharides of cyanobacteria usually contain two different uronic acids (glucuronic and galacturonic acid) and sulfate groups, which are not common in the exopolysaccharides of other bacteria. As a result, these properties make the exopolysaccharides of cyanobacteria very suitable for biotechnological applications such as removing heavy metals from polluted water or thickening or emulsifying agents. The presence of negative charges (urea acids) in the exopolysaccharides of cyanobacteria, which play an important role in the absorption of metal cations, is a potentially beneficial phenomenon for water purification. In this research, the ability of two soil and freshwater cyanobacteria, *Nostoc punensis* and

---

\* Corresponding Author

2322-5181/ © 2023 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Zaker Firuzabad M., Nowruzi B., and Falsafi S. A Comparison of Industrial Application of Exopolysaccharides of Two Strains of Aquatic and Terrestrial Cyanobacteria *Neowestiellopsis Persica* A1387 and *Nostoc Punensis* in Bioremediation of Heavy Metals. *Journal of Microbial Biology*, 2023; 12 (47): 117-136. <http://dx.doi.org/10.22108/bjm.2022.134937.1489>

*Neowestiellopsis persica* A1387, to remove heavy metals such as chromium, nickel, and copper has been investigated.

**Materials and Methods:** The strains of *Nostoc punensis* and *Neowestiellopsis Persica* A1387 cyanobacteria used in this research were obtained from the cyanobacteria culture collection of Azad University, Science and Research Unit, Cyanobacteria Culture Collection (CCC). After the inoculation of heavy metals such as copper, chromium, and nickel, the concentrations of exopolysaccharide content, protein content, and carbohydrate produced by the two strains were investigated and compared with the control. In addition, GC-MS and FT-IR were used to check the amount of effective volatile compounds and functional groups involved in the removal of heavy metals.

## Results

**The effect of metals on dry weight and concentration of exopolysaccharides in a cyanobacterial strain:** *Nostoc punensis* was more sensitive to metal treatments and had a lower cell dry weight. The concentration of exopolysaccharide produced by *Neowestiellopsis persica* A1387 was higher than that of *Nostoc punensis* and produced more in a fixed time.

**The effect of protein and carbohydrate content on the removal of heavy metals:** The results showed that the cyanobacterium *Nostoc punensis* was the superior strain in protein production, and the *Neowestiellopsis Persica* A1387 was the superior strain for carbohydrate production.

**The results of the removal of heavy metals in the liquid culture of cyanobacteria strains:** The results showed that the cyanobacterium *Neowestiellopsis Persica* A1387 was the superior strain in removing metals, and at a fixed time, it removed more metals compared to the cyanobacterium *Nostoc punensis*.

**The results of GC-MS studies of cyanobacterial strains:** The results of GC-MS studies showed that the highest frequency of volatile compounds Butanal, Acetic acid ethyl ester, 2-Phenylethanol, and 2,4-Hexadienal were found in the cyanobacterium *Neowestiellopsis Persica* A1387 in treatment with nickel.

**The results of examining exopolysaccharides using the FT-IR method:** The results of FTIR showed that in the regions of 405 cm<sup>-1</sup>, 575 cm<sup>-1</sup> and 813-920 cm<sup>-1</sup> peaks were found in connection with C-N and carbonyl (C=O) bending groups, which were observed only when exposed to heavy metals.

**Discussion and Conclusion:** The final result of this study showed that the highest amount of cell dry weight in the control was related to *Nostoc* sp., but in the face of heavy metals, the *Neowestiellopsis Persica* A1387 strain had the highest cell dry weight in nickel and chromium metals. On the other hand, the highest amount of exopolysaccharide, carbohydrate, and protein in the control is related to the *Neowestiellopsis Persica* A1387 strain, but when faced with heavy metals, the *Neowestiellopsis Persica* A1387 strain had the highest amount of exopolysaccharide, carbohydrate, and protein in nickel metal. A study of heavy metal absorption by atoms also showed that the *Neowestiellopsis Persica* A1387 strain removed nickel metal more quickly than the *Nostoc punensis* strain in the first ten minutes. The results of Raman and Fourier transform spectroscopy techniques in this research showed that the cyanobacterium *Neowestiellopsis*

*Persica* A1387 showed more resistance than the cyanobacterium *Nostoc punensis* to metal treatments. The superior strain for removing heavy metals was the cyanobacterium *Neowestiellopsis Persica* A1387. Regarding the cyanobacterium *Neowestiellopsis Persica* A1387, a peak was seen in the region of  $405\text{ cm}^{-1}$  of the control strain, which was related to the C-N bending group. This peak was found only in the strain treated with copper. In the region of  $575\text{ cm}^{-1}$  of the control strain and the strains treated with chromium and nickel, a peak related to the carbonyl bending group (C=O) was observed, but this peak was changed in the strain treated with copper. The peaks in the range of  $1000\text{ cm}^{-1}$  are related to C-O groups of polysaccharide and sugar skeleton, which were seen in all treatments of *Neowestiellopsis persica* A1387 and the control strain. The peaks of the strain treated with copper in the range of  $1115\text{--}1048\text{ cm}^{-1}$  were related to the strong pull of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{NH}_3^+$ , which is related to the sugar skeleton and anomeric C-O-C and C-O groups of sugars. In the regions of  $1654\text{ cm}^{-1}$  and  $2935\text{ cm}^{-1}$ , the peak corresponding to the stretching carbonyl group and stretching N-H and OH did not show any changes.

**Key words:** *Neowestiellopsis Persica* A1387, *Nostoc Punensis*, Heavy Metals; Exopolysaccharide; Biological Removal; Bioaccumulation

## مقایسه کاربرد صنعتی اگزوپلی ساکاریدهای دو سویه سیانوباکتری آبی و خاکزی *Nostoc punensis* و *Neowestiellopsis Persica A1387* در تصفیه زیستی فلزات سنگین

مریم ذاکر فیروزآباد: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، zakerbahar@yahoo.com  
بهاره نوروزی\* ID: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، bahare77biol@gmail.com  
سروناز فلسفی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران، sarvenaz\_falsafi@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** تولید اگزوپلی ساکاریدها (EPS) توسط سیانوباکتری‌ها در پاسخ به تنش فلزات سنگین یکی از ویژگی‌های مهم این میکروارگانیسم‌ها در تصفیه زیستی آب‌های آلوده است. در این پژوهش، توانایی دو سیانوباکتری خاک‌زی و آب شیرین *Nostoc punensis* و *Neowestiellopsis Persica A1387* در حذف فلزات سنگین کروم، نیکل و مس بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** پس از رشد سیانوباکتری‌های *Nostoc punensis* و *Neowestiellopsis Persica A1387* در محیط کشت BG-110 در اتاقک رشد، تلقیح به محیط حاوی فلزات سنگین انجام شد. سپس میزان حذف فلزات سنگین در بازه زمانی ۹۰ دقیقه‌ای به همراه اندازه‌گیری وزن خشک، کربوهیدرات، پروتئین و اگزوپلی ساکاریدها انجام شد. علاوه بر آن، آنالیز دستگاهی طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR) و طیف‌سنجی جرمی - کروماتوگرافی گازی (GC-MS) به منظور شناسایی گروه‌های عاملی مؤثر و ترکیبات فرار مؤثر در حذف فلزات سنگین انجام شدند.

**نتایج:** نتایج حاصل از آنالیز واریانی یک‌طرفه و آزمون توکی نشان دادند بیشترین میزان وزن خشک سلولی، اگزوپلی ساکارید، کربوهیدرات و پروتئین در سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* در مواجهه فلزات نیکل و کروم یافت شد. علاوه بر آن، نتایج حاصل از جذب اتمیک فلزات سنگین نشان دادند سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* در ده دقیقه اول بیشترین میزان حذف فلز نیکل (۳۵۰ میلی‌گرم بر وزن خشک) را نشان داد. نتایج حاصل از FTIR نشان دادند در نواحی  $405\text{ cm}^{-1}$ ،  $575\text{ cm}^{-1}$  و  $813-920\text{ cm}^{-1}$  پیوندهایی در ارتباط با گروه‌های خمشی C-N و کربونیل (C=O) یافت شدند که تنها مواجهه با فلزات سنگین مشاهده شد. نتایج حاصل از مطالعات GC-MS نیز نشان دادند بیشترین فراوانی ترکیبات فرار 2-Phenylethanol، Acetic acid ethyl ester، Butanal و 2,4-Hexadienal در سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica A1387* در تیمار با نیکل یافت شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** سیانوباکتری آبی *Neowestiellopsis sp.* مقاومت بیشتری نسبت به سیانوباکتری خاک‌زی *Nostoc sp.* در تیمارهای فلزی (مس، نیکل و کروم) از خود نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** *Neowestiellopsis Persica A1387*، *Nostoc punensis*، فلزات سنگین، اگزوپلی ساکارید، حذف زیستی، تجمع زیستی

## مقدمه

سیانوباکتری‌ها، به‌عنوان منابع با ارزشی در تولید اگزوپلی ساکاریدها، ویژگی‌های متمایزی نسبت به دیگر باکتری‌ها دارند. این ترکیبات از تعداد زیادی مونوساکاریدهای متفاوت تشکیل شده‌اند که بیشتر آنها پلیمرهای دارای ۱۳-۶ قند مختلف‌اند که در تضاد با پلیمرهای تولیدشده توسط دیگر باکتری‌ها و ریزجلبک‌ها هستند. همچنین، اگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتری‌ها معمولاً حاوی دو اورونیک اسید متفاوت (گلوکورونیک و گالاکتورونیک اسید) و گروه‌های سولفات بوده است که در ساختمان اگزوپلی ساکاریدهای دیگر باکتری‌ها متداول نیست؛ در نتیجه، این خصوصیات باعث می‌شوند اگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتری‌ها برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی همانند حذف فلزات سنگین از آب‌های آلوده، تغلیظ یا عوامل امولسیون‌کننده بسیار مناسب باشند [۱].

بهره‌برداری صنعتی از سیانوباکتری‌ها سود بیشتری را نسبت به دیگر پلی ساکاریدهای جداشده از گیاهان یا ریزجلبک‌های دریایی به همراه داشته است؛ در نتیجه، تحقیقات وسیعی برای جستجوی پلی ساکاریدهای جدید در سویه‌های سیانوباکتری‌های دارای ظرفیت ترشح مواد موسیلاژی انجام شده‌اند. تاکنون چندین ریزجلبک پروکاریوت و یوکاریوت برای تولید و دفع مقادیر زیادی از اگزوپلی ساکارید در خارج محیط سلولی شناخته شدند. گونه‌های اصلی سیانوباکتری‌های تولیدکننده پلی ساکاریدها شامل *Arthrospira platensis* و *Aphanizomenon Isochrysis*، *Dunaliella salina*، *Chlorellavulgaris*، *Porphyridium Bannochloropsis salina*، *galbana* و *Haematococcuspluvialis* و *cruentum* هستند.

اگزوپلی ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها یا شامل اگزوپلی ساکاریدی‌های متصل به سلول‌اند که شامل ترکیبی از کپسول، غلاف و اسلیم هستند یا مواد پلی ساکاریدی محلول و آزادشده درون محیط هستند که یا از لایه‌های خارجی غشا یا از مراحل مختلف بیوستزی مشتق می‌شوند و هیچ ارتباط مستقیمی با سنتز اگزوپلی ساکاریدهای متصل به سلول ندارد [۲].

واژه سم‌زدایی، به فرایند خنثی‌سازی یا حذف فلزات سمی در محیط زیست اطلاق می‌شود. فلزات سنگین آلاینده‌های محیطی شدیدی هستند که بسیاری از آنها حتی در غلظت‌های بسیار پایین هم سمی‌اند. فلزات سنگین به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: گروه اول شامل فلزات ضروری مانند مس، روی و آهن است که این فلزات به‌عنوان مواد ریزمغذی در مقادیر مناسب برای موجودات زنده از جمله سیانوباکتری‌ها ضروری بوده است و در فرایندهای فیزیولوژیکی متعدد و واکنش‌های فتوسنتزی دخیل‌اند؛ اما در غلظت‌های بالا بسیار سمی بوده‌اند و باعث کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌شوند. فلزات سنگین گروه دوم نیز شامل فلزات غیرضروری مانند آرسنیک، جیوه، سرب و کادمیوم است که جزء آلاینده‌های عمده محیط زیست محسوب می‌شوند و در تمامی غلظت‌ها بسیار سمی بوده و برای آنها هیچ عملکرد زیستی شناخته نشده است [۳، ۴]. سیانوباکتری‌ها در تولید روزانه حدود ۴۰ درصد زیست‌توده فتوسنتزی جهان سهم هستند و انرژی خورشیدی را با سرعت تقریباً ۴۵۰ تراوات به انرژی شیمیایی تبدیل می‌کنند. فعالیت الکتروژنیکی سیانوباکتری‌ها مسیر مهمی برای هدایت انرژی خورشیدی به زیست کره است که بیشتر توسط فلزات سنگین و سمی مختل می‌شود [۵].

تنش فلزات سنگین، یکی از تنش‌های محیطی است

به همین دلیل است که در این مطالعه توانایی دو سویه سیانوباکتری *Nostoc punensis* و *Neowestiellopsis Persica A1387* متعلق به دو زیستگاه مختلف خاک‌زی و آب شیرین در حذف فلزات سنگین کروم، نیکل و مس سنجش می‌شود.

## مواد و روش‌ها

**کشت سیانوباکتری‌های *Nostoc punensis* و *Neowestiellopsis Persica A1387*:** ابتدا سویه‌های سیانوباکتری از مجموعه کشت سیانوباکتری‌های دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات *Cyanobacteria culture collection* (CCC) تهیه شدند. سویه‌های سیانوباکتری‌های خاک‌زی *Nostoc punensis* و آبی *Neowestiellopsis Persica A1387* متعلق به خاک‌های زراعی و آب‌های اطراف جنگل النگدره استان گلستان هستند. این سویه‌ها با کد دسترسی MZ327713.1 و KT166436.1 به ترتیب در بانک ژن موجودند. *Neowestiellopsis Persica A1387*، سویه سیانوباکتری منشعب است و در تیره Hapalosiphonaceae قرار دارد و *Nostoc punensis* سویه سیانوباکتری غیرمنشعبی است که در تیره Nostocaceae قرار دارد. کشت در محیط کشت BG-110 و در اتاقک رشد با دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و روشنایی ممتد فلورسنت با شدت ۳۰۰ میکروانیشتمین در مترمربع در ثانیه برای ۱۴ روز انجام شد [۸].

**تلقیح فلزات سنگین و اندازه‌گیری میزان جذب:** ابتدا کیسه‌های دیالیز حاوی محیط کشت به مدت ۴۰ دقیقه درون محلول ۰/۱ مولار HCl قرار گرفتند. این کار برای حذف یون‌های فلزی انجام می‌گیرد که ممکن

که به‌علت صنعتی‌شدن سریع جوامع به‌طور گسترده درحال افزایش است. در طول تکامل، موجودات روش‌های متنوعی را برای حفظ تعادل با یون‌های فلزی موجود در محیط اطراف ایجاد کرده‌اند. سلول‌ها دو وظیفه اساسی در این زمینه دارند؛ اول اینکه فلزات سنگینی را انتخاب می‌کنند که برای رشد ضروری‌اند و آن دسته که مورد نیاز نیستند را حذف کنند؛ دوم اینکه یون‌های ضروری را در غلظت‌های درون سلولی مطلوب نگه دارند. تشکیل کمپلکس تبادل یون، جذب، رسوب‌دهی مواد غیرآلی و استفاده از مکانیسم اکسیداسیون یا احیا جزء روش‌هایی است که برای مقابله سلول با اثرات و آسیب‌های فلزات سنگین و سمی تکامل یافته‌اند [۶]. حضور بارهای منفی (اسیدهای اوره‌ای) در آگزوپلی‌ساکاریدهای سیانوباکتری‌ها که نقش مهمی در جذب کاتیون‌های فلزی دارد، یک پدیده پر منفعت احتمالی برای تصفیه آب است [۷].

عوامل متفاوتی از جمله محیط کشت، فلزات سنگین، منابع فسفات، نیتروژن، سولفات، شوری، مواد مغذی و نور در تولید آگزوپلی‌ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها نقش دارند؛ بنابراین، مشکل می‌توان نتیجه گرفت که آیا تفاوت‌های گزارش‌شده در تولید آگزوپلی‌ساکاریدها به دلیل تفاوت‌های فیزیولوژیکی در میان گونه‌هاست یا به دلیل تفاوت در شرایط کشت آزمایشگاهی به کاربرده شده است؛ برای مثال، تأثیر شرایط کشت بر تولید پلی‌ساکاریدها، وابسته به گونه است. سنتز آگزوپلی‌ساکاریدها به‌طور مستقیم به محدودیت‌های محیطی (برای مثال، محیط فیزیکی و شیمیایی) مربوط به میکروارگانیسم وابسته است. با توجه به نوع سویه‌های ریزجلبک، سنتز پلی‌ساکارید خارج سلولی در طول فاز رشد یا در طول فاز ایستایی متفاوت به نظر می‌رسد [۷]؛

**جداسازی و اندازه گیری اگزوپلی ساکاریدها:** بعد از تلقیح فلزات سنگین با محیط کشت سیانوباکتری‌ها، اگزوپلی ساکاریدها از محیط کشت BG-110 حاوی سیانوباکتری‌ها برای بررسی میزان حذف فلزات سنگین پس از ۳۰ روز استخراج شدند. سلول‌ها از محیط کشت‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت بالا (۲۰۰۰۰ g) برای ۴۵ دقیقه در ۱۰ درجه سانتی‌گراد جدا شدند. پس از جدا شدن سلول‌ها، مایع رویی که حاوی پلی ساکاریدی‌های آزاد شده است، به یک ارلن جدید منتقل شد و ۷۰۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به آن اضافه و تمام شب در ۴ درجه سانتی‌گراد برای رسوب‌گیری حفظ شد. پس از گذشت ۱۸ ساعت، رسوب به دست آمده در  $1200 \times g$  برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس در آب دیونیزه حل شد. نمونه حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت با آب مقطر دیالیز شد. بیومس‌ها برای آنالیزهای دستگاهی و بررسی میزان پلی ساکارید در انکوباتور ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک می‌شوند [۹].

**سنجش محتوای کربوهیدرات با استفاده از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش:** سنجش محتوای کربوهیدرات بر طبق روش اسپکتروفوتومتریک محاسبه شد. ۰/۱ گرم از اگزوپلی ساکارید خشک شده سیانوباکتری‌های بررسی شده، در ۵ میلی‌لیتر اتانل ۸۰ درصد ورتکس شده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس در سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب با الکل اتانل ۸۰ درصد شستشو داده شده و این مراحل تکرار شده است و حجم الکل به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. به منظور حذف رسوبات اضافی و ترکیبات دیگر، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول

است با گروه‌های با بار منفی باند شود. بعد از ۳۰ دقیقه، برای حذف HCl اضافی در محیط، کشت‌ها با استفاده از آب به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. در مرحله بعدی ۵۰ میلی‌لیتر از کشت‌های تیمار شده حاوی بیومس و پلی ساکارید آزاد شده، به درون ۴۹۰ میلی‌لیتر از محلول‌های فلزی حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر Cu(II)، Cr(III) و Ni(II) به طور جداگانه با pH~5 منتقل شد. محیط‌های کشت برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با تکان خوردن ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، بیومس حاوی سیانوباکتری‌ها از محیط کشت حاوی محلول فلزی با سانتریفیوژ در ۱۲۰۰g برای ۷ دقیقه جدا و سپس توسط کاغذ واتمن ۰/۷ میکرومتری فیلتر شد. محتوای نهایی فلزات، در سوپرناتانت با جذب اتمی (Spectr AA 10 plus, Varian, CA, USA) در طول موج ۲۳۲ برای مس، ۳۵۹/۹ برای کروم و ۳۲۴/۷ نانومتر برای نیکل خوانده شد. میزان حذف فلزات از محلول با تفاوت در غلظت فلز در قبل و بعد از تماس با کشت سیانوباکتری اندازه‌گیری و با سویه کنترل مقایسه شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار و اطلاعات به صورت میانگین ارزیابی شدند. میزان حذف فلزات (q) به صورت میلی‌گرم حذف فلزات به ازای هر گرم وزن خشک بیان شد.

معادله شماره ۱:  $q \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = v \text{ (C1-C2)} m^{-1}$   
 V: حجم سویه (در لیتر)، Ci: غلظت ابتدایی فلز و C2 غلظت نهایی فلز (میلی‌گرم بر لیتر)، m: مقدار وزن خشک (گرم)

**اندازه‌گیری میزان وزن خشک:** وزن خشک بیومس (گرم بر لیتر) با فیلتراسیون کشت‌های دیالیز شده و خشک کردن فیلترها در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد [۸].



سانتریفیوژ و با اسید هیدروکلریک ۲ مولار به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد متانوله شد. سپس محلول به دست آمده با سرعت ۷۱۶۸ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری شد و به بالن، منتقل و به دستگاه روتاری وصل شد. پس از اتمام کار با روتاری، ۲ میلی‌لیتر هگزان به محتویات داخل بالن، اضافه و سپس محتویات بالن از فیلتر pTEF با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. محلول حاصل دوباره با سرعت ۷۱۶۸ g به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ و محلول رویی برای آنالیز با دستگاه GC-MS جمع‌آوری شد. میزان ۲ میکرولیتر از محلول رویی توسط سرنگ‌های خاص به دستگاه تزریق شد و طیف آن به دست آمد [۱۳].

**روش‌های آماری:** واکاوی داده‌های آماری به دست آمده از هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۴) انجام شد. همه داده‌ها از سه بار تکرار آزمون به دست آمده‌اند. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بین موارد اندازه‌گیری شده با آنالیز واریانس یک‌طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون tukey انجام شد.

### نتایج

**تأثیر فلزات مس، کروم و نیکل بر وزن خشک و غلظت آگزوبلی‌ساکاریدهای دو سویه *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis*:** نتایج حاصل از تیمار سیانوباکتری‌های *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* با فلزات کروم، مس و نیکل نشان دادند وزن خشک سلول‌ها تحت تیمار با فلزات به صورت معناداری در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ در سیانوباکتری‌ها در مقایسه با کنترل کاهش یافته است ( $p\text{-value} < 0.05$ ).

۵ درصد سولفات روی و ۵ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسید باریوم ۳ درصد به آن اضافه و سپس مجدداً ورتکس شده است. برای آخرین بار نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. دو میلی‌لیتر از محلول برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد فنول اضافه شد، ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، اضافه و ۱ ساعت ثابت گذاشته و سپس در طول موج ۴۹۰ نانومتر میزان جذب خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز، محتوای کربوهیدرات‌ها برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان شد [۱۰].

### سنجش محتوای پروتئین با استفاده از طیف‌سنجی

**مرئی-فرابنفش:** سنجش محتوای پروتئین بر طبق روش اسپکتروفوتومتریک محاسبه شد. محلول‌های آگزوبلی‌ساکارید با ۰/۱۲۵ مولار تترابورات سدیم در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ دقیقه غلیظ شدند و بعد از سرد شدن در حمام آب یخ، معرف متاهیدروکسی دیفنیل، اضافه و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پروتئین بر طبق روش برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد [۱۰، ۱۱].

### طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز

(FT-IR): در این طیف‌سنجی، از روش تهیه قرص پتاسیم برماید (KBr) با مخلوط ماده استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم از ماده با ۰/۴ پتاسیم برماید مخلوط شد و سپس به کمک دستگاه پرس مخصوص تهیه قرص IR تحت فشار ۱۵ تن قرص مربوطه، آماده و طیف‌سنجی انجام شد [۱۲].

### آنالیز ترکیبات فرار با استفاده از طیف‌سنجی جرمی

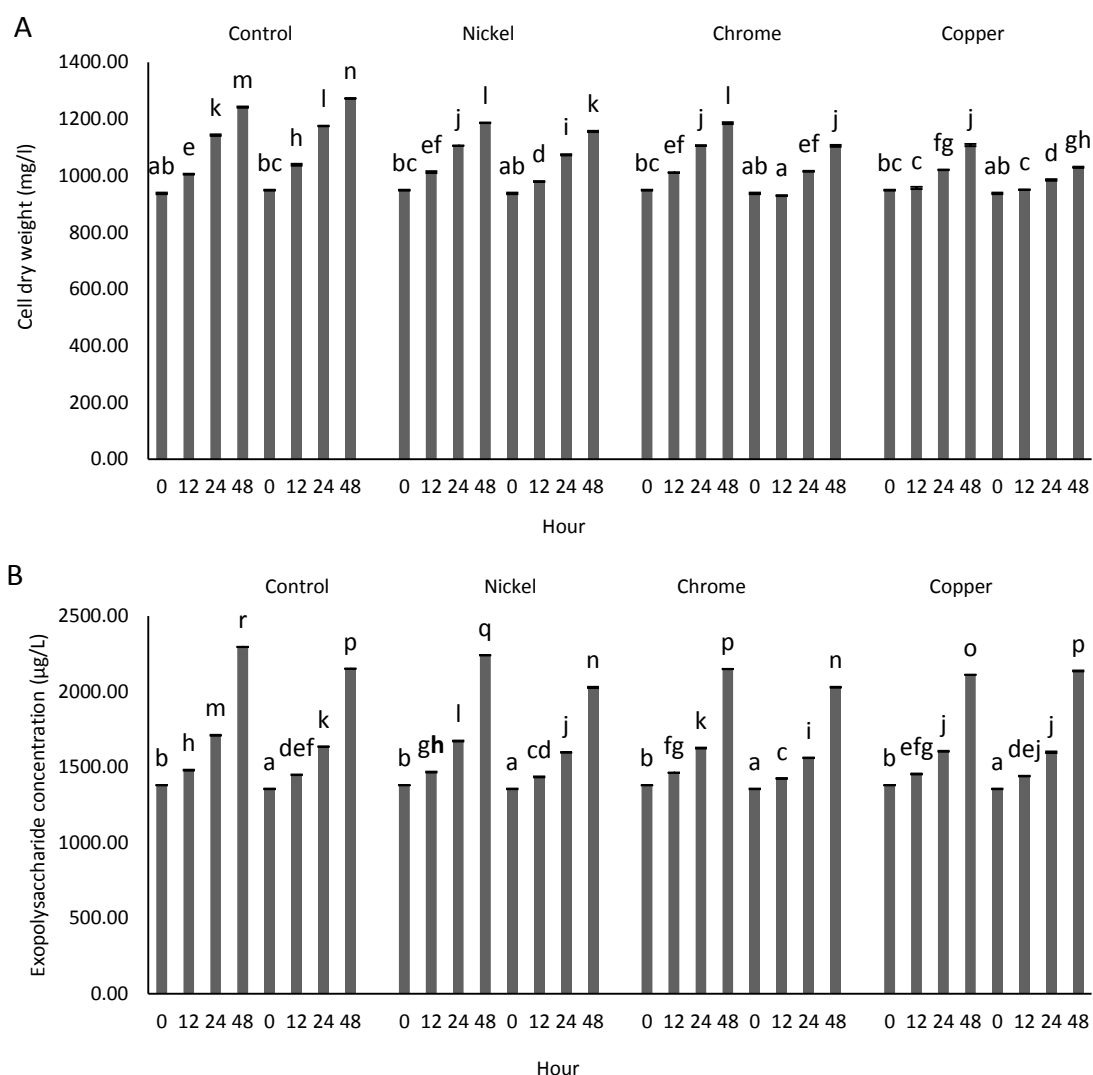
- **کروماتوگرافی گازی:** ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه،



در سویه تحت تیمار با کروم و مس در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری را با سویه کنترل نشان می‌دهد ( $p\text{-value} < 0.05$ )؛ اما در سویه‌های تحت تیمار با نیکل، این تفاوت معنادار در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود (شکل ۱، B). در سیانوباکتری *Nostoc punensis* نیز کاهش معناداری در محتوای غلظت اگزوپلی ساکاریدهای در سویه تحت تیمار با کروم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد ( $p\text{-value} < 0.05$ )؛ اما در سایر تیمارها تفاوت معناداری در زمان ۱۲ ساعت مشاهده نشد ( $p\text{-value} > 0.05$ ). علاوه بر این، تفاوت معناداری در غلظت اگزوپلی ساکارید تولیدشده توسط این سیانوباکتری تحت تیمار با مس در زمان ۴۸ ساعت مشاهده نشد که این نشان می‌دهد با افزایش زمان در مجاورت با فلز مس، سیانوباکتری با آن تطابق پیدا کرده است و سازگار می‌شود که می‌تواند در این زمان غلظتی مشابه با غلظت سویه شاهد، اگزوپلی ساکارید تولید کند. به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهند سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 در تولید اگزوپلی ساکاریدها سویه برتر بوده و در یک زمان ثابت، اگزوپلی ساکارید بیشتری را در مقایسه با *Nostoc punensis* تولید کرده است (شکل ۱، B).

علاوه بر آن، تحت تیمار با مس علاوه بر زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، وزن خشک سلولی در ۱۲ ساعت نیز کاهش معناداری را در مقایسه با سویه شاهد نشان می‌دهد ( $p\text{-value} < 0.05$ ). همان‌طور که در نمودارهای شکل ۱ (A) مشخص شده است، سیانوباکتری *Nostoc punensis* نسبت به تیمارهای فلزی حساس‌تر بوده و وزن خشک سلولی آن در تیمارهای فلزی بیش از سیانوباکتری دیگر مطالعه‌شده کاهش یافته است. در مقایسه میزان تولید بیومس سلولی در تیمار فلزات مس، نیکل و کروم توسط دو گونه *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* نشان می‌دهد سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 در تولید بیومس سلولی سویه برتر بوده و بیومس بیشتری را تولید کرده است. علاوه بر این، سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 که در تولید بیومس سلولی سویه برتر بود، در مقاومت به فلزات سنگین نیز سویه برتر بود و مقاومت بیشتری در برابر فلزات مس، نیکل و کروم دارد که این نشان می‌دهد میزان بیومس سلولی و مقاومت به فلزات رابطه مستقیمی دارند (شکل ۱، A).

نتایج حاصل از غلظت اگزوپلی ساکارید تولیدشده توسط سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 نشان دادند غلظت محتوای اگزوپلی ساکاریدی



شکل ۱- نتایج حاصل از اثر فلزات سنگین کروم، نیکل و مس بر (A) وزن خشک سلولی و (B) غلظت اگزوپلی ساکاریدها بین دو سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 (ستون‌های سیاه) و *Nostoc punensis* (ستون‌های سفید) در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف متفاوت بیان‌کننده وجود تفاوت معنادار بین سویه‌ها است.

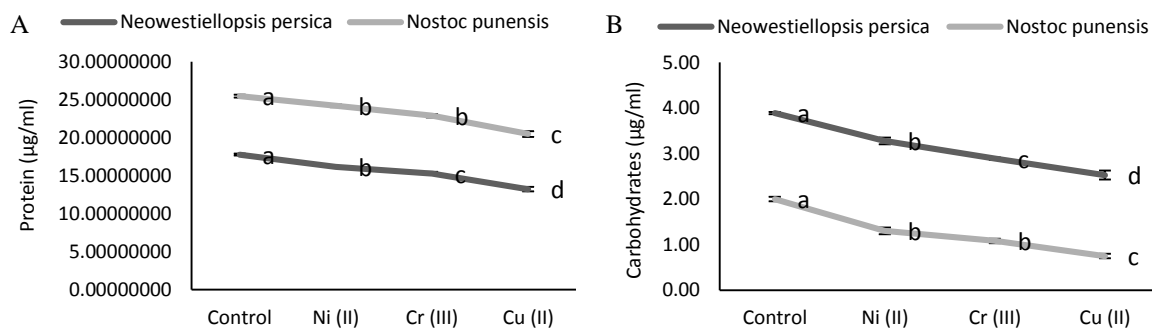
Fig 1 - The results of the effect of heavy metals chromium, nickel and copper on A) cell dry weight and B) concentration of exopolysaccharides among two cyanobacteria *Neowestiellopsis Persica* A1387 (black columns) and *Nostoc punensis* (white columns) at 12, 24 and 48 hours. Different letters indicate significant differences between strains.

پروتئین تولیدشده توسط سیانوباکتری‌ها مشاهده می‌شود (p-value < 0.05). کمترین پروتئین تولیدشده در سویه تیمار شده با مس مشاهده شد؛ در حالی که سویه تیمار شده با نیکل بیشترین میزان پروتئین تولیدشده در میان سویه‌های تیمار شده با فلزات را نشان می‌دهد. تفاوت

تأثیر محتوای پروتئینی و کربوهیدرات بر حذف فلزات سنگین: نتایج حاصل از محتوای پروتئینی تولیدشده توسط دو سویه سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* نشان می‌دهند کاهش معناداری در مقایسه سویه‌های تیمار شده با فلزات و سویه شاهد در

سویه‌های تیمارشده با مس و بیشترین کربوهیدرات تولیدشده در تیمار نیکل مشاهده شده است. میزان کربوهیدرات در تمامی تیمارهای سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 تفاوت معناداری داشتند ( $p\text{-value} < 0.05$ )؛ اما در تیمارهای سیانوباکتری *Nostoc punensis* تفاوت معناداری در میزان کربوهیدرات تولیدشده در تیمارهای نیکل و کروم مشاهده نشده است ( $p\text{-value} > 0.05$ ). به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهند در مقایسه محتوای پروتئینی در تیمار فلزات مس، نیکل و کروم توسط دو گونه *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* سیانوباکتری تفاوت معناداری در تولید کربوهیدرات‌ها سویه برتر بوده و در یک زمان ثابت، کربوهیدرات بیشتری را در مقایسه با سیانوباکتری *Nostoc punensis* تولید کرده است (شکل ۲، B).

معناداری در سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 تیمارشده با نیکل و کروم مشاهده نشد ( $p\text{-value} > 0.05$ ). تولید پروتئین در تمام تیمارهای سیانوباکتری *Nostoc punensis* تفاوت معناداری داشتند ( $p\text{-value} < 0.05$ ). در مقایسه محتوای پروتئینی در تیمار فلزات مس، نیکل و کروم توسط دو گونه *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* (شکل ۲، A) نشان می‌دهد سیانوباکتری *Nostoc punensis* در تولید پروتئین سویه برتر بوده و پروتئین بیشتری را در مقایسه با *Neowestiellopsis Persica* A1387 تولید کرده است. نتایج حاصل از کربوهیدرات‌های تولیدشده توسط سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* تیمارشده با فلزات مس، کروم و نیکل نشان دادند کاهش معناداری در مقایسه با سویه کنترل داشتند ( $p\text{-value} < 0.05$ ). همانند نتایج محتوای پروتئینی کمترین میزان کربوهیدرات تولیدشده در



شکل ۲- نتایج حاصل از اثر فلزات سنگین کروم، نیکل و مس بر (A) غلظت پروتئین (B) کربوهیدرات تولیدشده توسط سیانوباکتری‌های *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* در تیمار با فلزات مس، کروم و نیکل. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنادار بین سویه‌ها هستند.

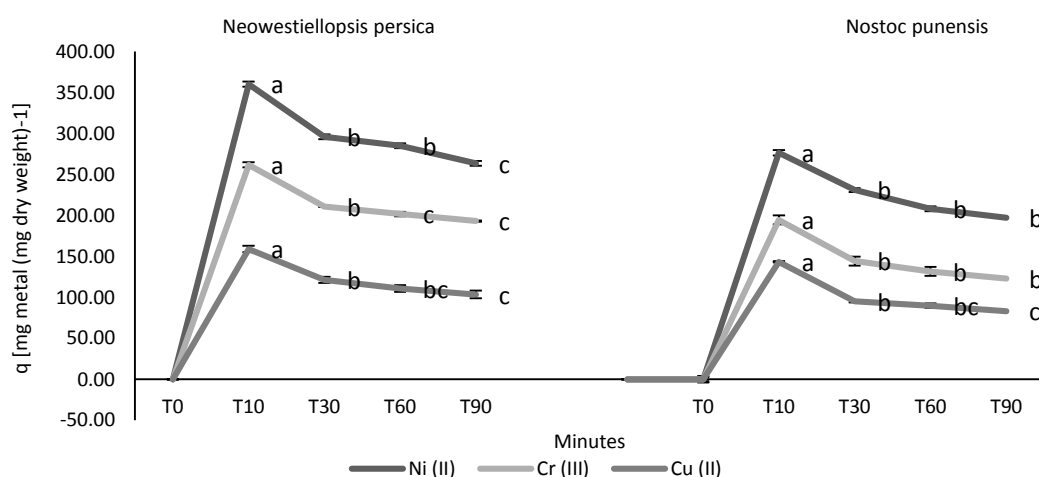
Fig 2 - The results of the effect of heavy metals chromium, nickel and copper on A) protein concentration B) carbohydrate produced by cyanobacteria *Neowestiellopsis Persica* A1387 and *Nostoc punensis* in treatment with copper, chromium and nickel metals. Different letters indicate significant differences between strains.

و *Nostoc punensis*: نتایج حاصل از بررسی حذف فلزات مس، نیکل و کروم نشان دادند سیانوباکتری

نتایج حاصل از حذف فلزات مس، نیکل و کروم در کشت مایع سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387

به علت اشباع شدن پلی ساکاریدها و پروتئین‌های سیانوباکتری توسط فلزات باشد. تفاوت معناداری در حذف فلزات نیکل، کروم و مس در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه‌ای سیانوباکتری *Nostoc punensis* مشاهده نشد ( $p\text{-value} > 0.05$ )؛ اما تفاوت معناداری بین این تیمارها و تیمار ۱۰ دقیقه‌ای با این فلزات مشاهده می‌شود ( $p\text{-value} > 0.05$ ) که این نشان می‌دهد بیشترین حذف فلزات توسط سیانوباکتری‌ها در ۱۰ دقیقه ابتدایی رخ می‌دهد. به‌طور کلی نتایج نشان دادند در مقایسه حذف فلزات مس، نیکل و کروم توسط دو گونه *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 در حذف فلزات سویه برتر بوده و در یک زمان ثابت، میزان بیشتری از فلزات را در مقایسه با سیانوباکتری *Nostoc punensis* حذف کرده است (شکل ۳).

*Neowestiellopsis Persica* A1387 بیشترین حذف فلز در سویه‌های تیمار شده با نیکل در دقیقه ۱۰ داشته است؛ در حالی که کمترین حذف برای فلز مس در دقیقه ۹۰ است. در سیانوباکتری *Nostoc punensis* نیز بیشترین حذف مربوط به تیمار با فلز نیکل در دقیقه ۱۰ بوده است؛ در حالی که کمترین میزان حذف در تیمار با مس در دقیقه ۹۰ مشاهده شده است. همچنین نتایج مشخص کردند سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 توانایی بهتری در حذف نیکل و کروم در مقایسه با سیانوباکتری *Nostoc punensis* در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه دارد ( $p\text{-value} < 0.05$ )؛ در حالی که تفاوت معناداری در حذف مس توسط دو سیانوباکتری مورد استفاده مشاهده نشد ( $p\text{-value} > 0.05$ ). بیشترین حذف پس از ۱۰ دقیقه تیمار سیانوباکتری‌ها با فلزات مشاهده شد و با افزایش زمان، میزان حذف فلزات از محیط کاهش یافت که می‌تواند



شکل ۳- نتایج حاصل از حذف فلزات مس، نیکل و کروم توسط دو سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* در زمان‌های صفر (زمان تلقیح)، ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تیمار.

Fig 3 - The results of the removal of copper, nickel and chromium metals by two cyanobacteria *Neowestiellopsis Persica* A1387 and *Nostoc punensis* at zero times (inoculation time), 10, 30, 60 and 90 minutes after treatment.

(۱۲/۲۹۲ درصد، ۱۳/۱۳۵ درصد، ۱۱/۵۳۵ درصد و ۱۳/۱۷ درصد) و 4-Octan-3-one با فرمول مولکولی  $C_8H_{14}O$ ، وزن مولکولی ۱۲۶/۲۰ گرم بر مول، زمان پیک ۳۰/۱۹ دقیقه و جنس Alkane کمترین درصد فراوانی را (۱/۵۱۸ درصد، ۱/۴۷۹ درصد، ۱/۴۹۷ درصد و ۱/۲۷۲ درصد) داشته است.

نتایج حاصل از مقایسه ترکیبات شیمیایی و درصد فراوانی آنها در سویه کنترل و سیانوباکتری های *Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis* تیمار شده با فلزات کروم، مس و نیکل نشان دادند در سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 تیمار شده با فلزات نسبت به سویه کنترل، میزان ۲- بوتانول و تترادکانال افزایش یافته است؛ در حالی که میزان ۱- بوتانول، ۳- دی متیل بنزن، ۳- متیل-۱- بوتانول، ۳- هیدروکسی-۲- بوتانول و بنزالدهید کاهش یافته است. به طور کلی بیشترین تغییرات در این سیانوباکتری در تیمار نیکل مشاهده می شود. بیشترین جذب فلز سنگین نیز برای تیمار نیکل رخ می دهد که این نشان می دهد سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 با تغییر در ترکیبات ساختاری خود به افزایش جذب فلز نیکل از محیط منجر می شود؛ اما در سیانوباکتری *Nostoc punensis* میزان بوتانال، ۱- بوتانول، ۳- هیدروکسی-۲- بوتانول و بنزالدهید کاهش یافته است؛ در حالی که میزان استیک اسید، ۳- هیدروکسی متیل بوتیل استر، ۱-۳- دی متیل بنزن، ۲- دکانون، ۲-۴- هگزا دیانال و تترادکانال افزایش یافته است. به طور کلی در این سیانوباکتری بیشترین تغییرات در تیمار با کروم دیده می شود؛ در صورتی که بیشترین جذب فلز از محیط مربوط به نیکل است (جدول ۲).

### نتایج حاصل از مطالعات GC-MS سیانوباکتری

*Neowestiellopsis Persica* A1387 و *Nostoc punensis*: نتایج حاصل از مطالعات GC-MS سویه شاهد (فاقد فلزات سنگین)، تیمار شده با Cr(III) و Ni(II)، سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 نشان داده اند Acetic acid methyl ester با فرمول مولکولی  $C_3H_6O_2$ ، وزن مولکولی ۶۰/۰۵ گرم بر مول، زمان پیک ۷/۰۳ دقیقه و جنس Ester بیشترین میزان فراوانی (۱۲/۴۹۱ درصد، ۱۴/۰۴۶ درصد و ۱۲/۸۸۸ درصد) و 4-Octan-3-one با فرمول مولکولی  $C_8H_{14}O$ ، وزن مولکولی ۱۲۶/۲۰ گرم بر مول، زمان پیک ۳۰/۱۹ دقیقه و جنس Alkane کمترین میزان فراوانی (۱/۳۰۴ درصد، ۱/۳۲۱ درصد و ۱/۲۵ درصد) را به ترتیب بین دیگر ترکیبات داشته است (جدول ۱). همچنین نتایج حاصل از مطالعات GC-MS سویه سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 تیمار شده با Cu(II) نشان داده اند ترکیب 3-Hydroxy-2-Butanone با فرمول مولکولی  $C_8H_{16}O_4$ ، وزن مولکولی ۱۷۶/۲۲ گرم بر مول، زمان پیک ۱۷/۲۵ دقیقه و جنس Ketone بیشترین درصد فراوانی (۱۰/۸۱۵ درصد) و ترکیب 4-Octan-3-one با فرمول مولکولی  $C_8H_{10}O$ ، وزن مولکولی ۱۲۲/۱۶ گرم بر مول، زمان پیک ۲۸/۴۴ دقیقه و جنس Alkane کمترین درصد فراوانی (۱/۱۵۱ درصد) را داشته است.

نتایج حاصل از مطالعات GC-MS سویه شاهد (فاقد فلزات سنگین)، تیمار شده با Cr(III)، Cu(II) و Ni(II) در سیانوباکتری *Nostoc punensis* به ترتیب نشان داده اند Acetic acid methyl ester با فرمول مولکولی  $C_3H_6O_2$ ، وزن مولکولی ۶۰/۰۵ گرم بر مول، زمان پیک ۷/۰۳ دقیقه و جنس Ester بیشترین درصد فراوانی

جدول ۱- مقایسه نتایج GC/MS حاصل از سویه شاهد و تیمار سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica A1387* توسط فلزهای مس، نیکل و کروم

Table 1- Comparison of GC/MS results obtained from the control strain and treatment of cyanobacterium *Neowestiellopsis Persica A1387* by copper, nickel and chromium metals

Peaks IDs	RT (min)	Abundance (%)				مقایسه
		Control	Cr (III)	Cu (II)	Ni (II)	
Butanal	۵/۰۵	۸/۷۷۹	۷/۸۲۷	۷/۳۴۱	۱۰/۴۳۹	در تیمار نیکل افزایش
Acetic acid methyl ester	۷/۰۳	۱۲/۴۹۱	۱۴/۰۴۶	۹/۲۱۴	۱۲/۸۸۸	در تیمار مس کاهش
Acetic acid ethyl ester	۷/۳۹	۶/۰۴۴	۵/۳۰۹	۴/۷۹۵	۷/۶۲۲	در تیمار نیکل افزایش
2-Butanone	۸/۳۵	۲/۲۵۶	۵/۳۹۳	۲/۵۶	۳/۵۱۸	افزایش
2-Pentanone	۸/۸۵	۶/۳۸۸	۸/۳۸۵	۸/۱۸۵	۶/۱۷۳	در تیمار نیکل کاهش
Ethanol	۹/۲۱	۳/۲۵۴	۴/۱۴۲	۵/۷۵۱	۳/۱۰۵	در تیمار نیکل کاهش
Acetic acid, 3-methylbutyl ester	۱۳/۳۵	۲/۰۰۱	۳/۴۸۸	۵/۰۶۸	۲/۵۴۲	در تیمار نیکل کاهش
1-Butanol	۱۳/۸۲	۵/۸۸	۳/۳۲۶	۶/۶۶۸	۳/۹۳۸	در تیمار مس افزایش
1,3-di methyl benzene	۱۴/۶۸	۴/۳۳۱	۳/۸۵	۲/۳۱۴	۱/۴۰۱	کاهش
3-Methyl-1-butanol	۱۵/۶۲	۲/۵۹۶	۱/۶۳۹	۲/۳۴۷	۱/۵۶	کاهش
3-Hydroxy-2-Butanone	۱۷/۲۵	۱۱/۹۱۹	۱۰/۳۹۶	۱۰/۸۱۵	۱۱/۰۰۷	کاهش
2-Decanone	۱۹/۰۱	۲/۸۶۴	۱/۵۸۹	۴/۳۳۹	۳/۰۹۶	در تیمار کروم کاهش
2,4-Hexadienal	۱۹/۵۱	۶/۸۸۴	۶/۷۱۲	۸/۸۷	۹/۵۳	در تیمار کروم کاهش
Acetic acid	۲۰/۸۱	۱۱/۱۳۴	۱۲/۳۷۹	۱۰/۶۳	۸/۸۰۱	در تیمار کروم افزایش
Benzaldehyde	۲/۸۲	۴/۷۴۱	۲/۰۲۶	۳/۵۹۱	۴/۷۱۱	کاهش
Tetradecanal	۲۸/۳۱	۳/۹۳۶	۶/۳۳۳	۴/۷۶	۵/۵۴۵	افزایش
2-Phenylethanol	۲۸/۴۴	۲/۴۹۶	۱/۵۶۷	۱/۶	۲/۸۷۳	در تیمار نیکل افزایش
4-Octan-3-one	۳۰/۱۹	۱/۳۰۴	۱/۳۲۱	۱/۱۵۱	۱/۲۵	در تیمار کروم افزایش

کربونیل (C=O) مشاهده شد؛ اما این پیک در سویه تیمارشده با مس دچار تغییرات شده بود. علاوه بر این، در ناحیه بین  $920-813 \text{ cm}^{-1}$ ، ۳ پیک جدید برای سویه تیمارشده با مس مشاهده شدند که در سایرین وجود نداشتند. پیک‌های محدوده  $1000 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های C-O پلی‌ساکاریدی و اسکلت قندی‌اند که در همه تیمارها و سویه کنترل دیده می‌شوند. همچنین یک تفاوت فاحش در تعداد و مکان قرارگیری پیک‌های سویه تیمارشده با مس در بازه  $1115 \text{ cm}^{-1}$  -  $1048 \text{ cm}^{-1}$  یافت شد که مربوط به کشش قوی  $\text{PO}_4^{3-}$  و  $\text{NH}_3^+$  است. پیک  $1055 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به اسکلت قندی

### نتایج حاصل از بررسی اگزوپلی‌ساکاریدها با

استفاده از روش FT-IR: برای درک بهتر، نتایج FT-IR برای دو گونه سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica A1387* و *Nostoc punensis* در حضور فلزات سنگین کروم، مس و نیکل نسبت به گروه کنترل (فاقد فلزات) مقایسه شدند. در رابطه با سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica A1387* در ناحیه  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۵ سویه کنترل پیک دیده می‌شود که مربوط به گروه خمشی C-N است؛ اما این پیک فقط در سویه تیمارشده با مس یافت شده و در سایرین این پیک حذف شده است. در ناحیه  $575 \text{ cm}^{-1}$  سویه کنترل و سویه‌های تیمارشده با کروم و نیکل پیک مربوط به گروه خمشی

تیمارشده با فلزات کروم، مس و نیکل تغییرات چندانی را در مقایسه با سویه کنترل نشان ندادند. در سویه تیمارشده با مس در ناحیه  $874\text{ cm}^{-1}$ ، یک پیک جدید مشاهده شد که مربوط به پیوند  $\beta$ -گلیکوزیدی و گروه عاملی  $\text{CO}_3^{2-}$  است. علاوه بر این، در همین سویه در ناحیه  $1121\text{ cm}^{-1}$  که مربوط به گروه عاملی  $\text{NH}_3$  و  $\text{PO}_4^{3-}$  است، یک پیک جدید مشاهده شد. این ناحیه مربوط به اسکلت قندی و گروه‌های آنومریک قندها است (جدول ۳).

و گروه‌های C-O-C و C-O آنومریک قندها است. همه سویه‌ها به جز سویه تیمارشده با مس در ناحیه مربوط به گروه آمین تغییر شکل یافته ( $1244\text{ cm}^{-1}$ ) پیک داشتند. تغییرات دیگر نیز در نواحی مربوط به گروه آمید و پیک مربوط به N-H و OH کششی در مقایسه سویه‌ها و کنترل دیده می‌شود. سویه‌ها در پیک مربوط به گروه کربونیل کششی و N-H و OH کششی که به ترتیب در ناحیه  $1654\text{ cm}^{-1}$  و  $2935\text{ cm}^{-1}$  دیده شدند، تغییراتی را نشان ندادند. نتایج مربوط به آنالیز FTIR ساختار پروتئین حاصل از سیانوباکتری *Nostoc punensis*

جدول ۲- مقایسه نتایج GC/MS حاصل از سویه شاهد و تیمار سیانوباکتری *Nostoc punensis* توسط فلزهای مس، نیکل و کروم

Table 2- Comparison of GC/MS results obtained from the control strain and *Nostoc punensis* cyanobacterium treatment by copper, nickel and chromium metals

Peaks IDs	RT (min)	Abundance (%)				مقایسه
		Control	Cr (III)	Cu (II)	Ni (II)	
Butanal	5/05	16/684	9/68	7/469	9/095	کاهش
Acetic acid methyl ester	7/03	12/292	13/135	11/535	13/17	در تیمار مس کاهش
Acetic acid ethyl ester	7/39	5/868	3/356	5/509	7/161	در تیمار نیکل افزایش
2-Butanone	8/35	3/197	5/218	2/124	3/057	در تیمار کروم افزایش
2-Pentanone	8/85	7/135	9/048	7/739	5/94	در تیمار نیکل کاهش
Ethanol	9/21	3/89	3/146	5/68	3/99	در تیمار کروم کاهش
Acetic acid, 3-methylbutyl ester	13/35	2/288	3/297	4/408	3/204	افزایش
1-Butanol	13/82	6/39	3/288	4/307	2/836	کاهش
1,3-di methyl benzene	14/68	1/849	2/786	3/207	3/086	افزایش
3-Methyl-1-butanol	15/62	2/533	1/586	2/627	1/84	در تیمار مس افزایش
3-Hydroxy-2-Butanone	17/25	10/5	8/262	9/716	10/3	کاهش
2-Decanone	19/01	2/488	3/06	4/064	4/018	افزایش
2,4-Hexadienal	19/51	7/217	8/073	8/794	10/699	افزایش
Acetic acid	20/81	10/172	12/38	9/95	7/891	در تیمار کروم افزایش
Benzaldehyde	22/82	3/904	2/482	3/544	3/49	کاهش
Tetradecanal	28/31	5/561	7/166	5/635	6/835	افزایش
2-Phenylethanol	28/44	2/513	2/599	2/196	2/116	در تیمار کروم افزایش
4-Octan-3-one	30/19	1/518	1/479	1/497	1/272	کاهش



جدول ۳- مقایسه نتایج FTIR بین دو سیانوباکتری *Nostoc punensis* و *Neowestiellopsis Persica* A1387 تیمار شده با فلزات و سویه‌های شاهد

Table 3- Comparison of FTIR results between two cyanobacteria *Nostoc punensis* and *Neowestiellopsis Persica* A1387 treated with metals and control strains

تفاوت	کنترل گونه <i>Nostoc punensis</i>	تیمار با نیکل گونه <i>Nostoc punensis</i>	تیمار با مس گونه <i>Nostoc punensis</i>	تیمار با کروم گونه <i>Nostoc punensis</i>	کنترل گونه <i>Neowestiellopsis Persica</i> A1387	تیمار با نیکل گونه <i>Neowestiellopsis Persica</i> A1387	تیمار با مس گونه <i>Neowestiellopsis Persica</i> A1387	تیمار با کروم گونه <i>Neowestiellopsis Persica</i> A1387	پیک‌های متناظر با گروه‌های عاملی
با هم متفاوتند	۵۲۷	۵۲۸	۵۲۷	۵۲۸	۴۰۵	-	۴۸۳	-	گروه چرخشی C-N
بدون تغییر	۵۷۷	۵۷۷	۵۷۷	۵۷۷	۵۷۵	۵۷۴	۶۱۷ ۷۷۹	۵۷۵	گروه خمشی C=O
با هم متفاوتند	۸۷۷	۸۷۶	۷۸۶ ۸۷۴	۸۷۷	-	-	۸۱۳ ۸۸۰ ۹۲۰	-	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
تغییرات اندک	۱۰۵۹	۱۰۶۲	۱۰۶۳ ۱۱۲۱	۱۰۶۲	۱۰۵۵	۱۰۵۵	۱۰۴۸ ۱۰۸۲ ۱۱۱۵	۱۰۵۸	NH <sub>3</sub> و PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
پیک جدید	-	-	-	-	۱۲۴۴	۱۲۴۴	-	۱۲۶۱	تغییر شکل NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
عدم تغییر	۱۴۱۳ ۱۵۴۲	۱۴۱۳ ۱۵۴۶	۱۴۱۲ ۱۵۴۶	۱۴۱۲ ۱۵۴۶	۱۴۱۲ ۱۵۴۸	۱۴۱۱ ۱۵۴۸	۱۴۵۷	۱۴۰۸ ۱۵۴۸	گروه آمید، خمشی NH <sub>2</sub>
عدم تغییر	۱۶۵۲	۱۶۴۹	۱۶۴۸	۱۶۴۸	۱۶۵۴	۱۶۵۶	۱۶۵۴	۱۶۵۴	کششی C=O
با هم متفاوتند	۲۹۳۱	۲۹۳۰	۲۹۳۰	۲۹۷۰	۲۱۳۶	۲۱۸۳	۲۳۴۵	۲۱۳۶	کششی N-OH و H
پیک جدید	-	-	-	-	۲۹۳۱	۲۹۲۷	۲۹۲۴	۲۹۳۵	کششی N-OH و H
تغییرات اندک	۳۴۰۰	۳۴۱۶	۳۴۸۳	۳۴۳۰	۳۴۰۶	۳۳۸۹	۳۳۹۴	۳۴۱۲	کششی N-OH و H

## بحث و نتیجه‌گیری

سنگین مس، کروم و نیکل، غلظت محتوای اگزوپلی ساکاریدی، محتوای پروتئینی و کربوهیدرات تولید شده توسط دو سویه، بررسی و با شاهد مقایسه شدند. همچنین از GC-MS و FT-IR به منظور بررسی میزان ترکیبات فرار مؤثر و گروه‌های عاملی دخیل در حذف فلزات سنگین استفاده شد.

در این مطالعه با در نظر گرفتن توانایی‌های بالقوه سیانوباکتری‌ها در حذف فلزات سنگین کروم، نیکل و مس، از سیانوباکتری‌های آبی و خاک‌زی *Neowestiellopsis Persica* و *Nostoc punensis* A1387 استفاده شد. در این پژوهش، بعد از تلقیح فلزات

تفاوت که در مطالعه ما، نتایج حاصل از تأثیر فلزات سنگین بر وزن خشک نشان دادند سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* در حذف فلزات سنگین سویه برتر بوده است. همچنین سویه *Neowestiellopsis sp.* بیشترین میزان حذف را نسبت به نیکل نشان داده است که می تواند به این دلیل باشد که میزان بیومس سلولی و حذف فلزات رابطه مستقیمی با یکدیگر دارند.

همچنین در مطالعات دیگری که توسط سپوی و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام شد، عملکرد تجمع زیستی سویه (*Arthrospira platensis (Spirulina)*) در حذف فلزات سنگین بررسی شد. این دانشمندان، جذب فلز توسط زیست توده *اسپیروولینا* را با استفاده از تجزیه و تحلیل فعال سازی نوترون ارزیابی کردند. نتایج نشان دادند تجمع فلز در زیست توده به ترکیب پساب و غلظت یون فلز بستگی دارد. همچنین کاهش بهره وری (به طور متوسط ۱۰ درصد) زیست توده *اسپیروولینا* رشد یافته در محیط های تیمار شده با نیکل، کروم، آهن، مس، استرانسیوم، روی و مولیبدن در طول اولین چرخه کشت مشاهده شد [۱۹].

در برخی از مطالعات، دانشمندان نشان دادند سویه های سیانوباکتری که در تیمار با فلزات سنگین رشد می کنند، حاوی محتوای رنگدانه و محتوای پروتئین بالاتری نسبت به محیط های کشت استاندارد هستند؛ برای مثال، مطالعاتی که توسط مصطفی ال-شیخ و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام شد نشان دادند دو سویه *N. muscorum* و *A. sub-cylindrica* محتوای پروتئینی و رنگدانه ای کلروفیل و کاروتنوئید بالایی را در تیمار با فلزات مس، کبالت و سرب داشتند [۲۰]. نتایج با پژوهش ما مطابقت داشتند. نتایج حاصل از محتوای پروتئینی در تیمار فلزات مس، نیکل و کروم توسط دو گونه *Neowestiellopsis Persica A1387* و *Nostoc punensis* نشان می دهند

افزایش روزافزونی مطالعات در استفاده از زیست توده های میکروبی برای جذب فلزات سنگین، فرایندی که معمولاً به عنوان جذب زیستی تعریف می شود، پتانسیل خوب این فناوری را برای غلبه بر محدودیت های مرتبط با روش های معمول مطرح می کند. مطالعات نشان دادند باکتری ها به دلیل نسبت سطح به حجم بالا و داشتن تعداد زیادی از مکان های جذب فعال بالقوه، جاذب های زیستی عالی هستند [۱۴، ۱۵].

در مطالعاتی که میچلتی و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام داده اند، توانایی حذف انتخابی فلزات سنگین مس، کروم یا نیکل به طور همزمان در محلول های آبی توسط سیانوباکتری های مختلف تولید کننده اگزوپلی ساکارید، از جمله سویه نوستوک ارزیابی شده است. نتایج نشان دادند سویه *Nostoc PCC 7936* گزینش ویژه و تقریباً انحصاری بالایی نسبت به حذف مس را دارد [۱۶]. همچنین، کونور و همکاران در سال ۲۰۱۵، تیمار فلزات سنگین را با استفاده از سویه های *Chlorella vulgaris*، *Scenedesmus quadricauda* و *Spirulina platensis* بررسی کردند. نتایج نشان دادند این سویه ها قادر به حذف مالتیون از نمونه های فاضلاب با ۹۹ درصد کارایی و تجمع زیستی نیکل تا ۹۵ درصد کارایی هستند. علاوه بر این، توانایی جذب سرب و کادمیوم را تا حدود ۸۸ درصد کارایی داشتند [۱۷]. همچنین قربانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ حذف فلزات نیکل، کروم و مس را با استفاده از سیانوباکتری *Nostoc sp.* بررسی کردند. نتایج نشان دادند سویه *Nostoc sp. N27P72* به ترتیب حداکثر ۱۸۸، ۱۲۰، ۱۰۰ میلی گرم بر گرم وزن سلول خشک و سویه *Nostoc sp. FB71* به ترتیب ۲۰۰، ۱۴۰، ۱۰۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک سلول نیکل، مس و کروم را جذب می کردند [۱۸].

نتایج این دانشمندان با پژوهش ما مطابق بود. با این

محتوای اسید اورونیک سلول‌ها ارتباط داشت [۲۲]. نتایج در این پژوهش نشان دادند در تولید کربوهیدرات، سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* برتر بوده است. بیشترین میزان کربوهیدرات تولیدی در این سویه در تیمار با فلز نیکل و کمترین آن در تیمار با فلز مس نشان داده شده است.

طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز ابزار مهمی برای شناسایی گروه‌های عاملی و برهمکنش‌های بین مولکول‌ها است. سهلان اوستورک و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مطالعات حاصل از تجزیه و تحلیل طیف مادون قرمز تبدیل فوریه اگزوپلی ساکاریدها نشان دادند حضور گروه CH و CO ممکن است به‌عنوان مکان‌های اتصال برای کاتیون‌های دو ظرفیتی عمل کند [۲۲].

نتیجه‌نهایی حاصل از این مطالعه نشان داد بیشترین میزان وزن خشک سلولی در کنترل مربوط به سویه *Nostoc punensis* است؛ اما در مواجهه با فلزات سنگین، سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* بیشترین میزان وزن خشک سلولی را در فلزات نیکل و کروم داشت. در مقابل، بیشترین میزان اگزوپلی ساکارید، کربوهیدرات و پروتئین در کنترل مربوط به سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* است؛ اما در مواجهه با فلزات سنگین، سویه *Neowestiellopsis Persica A1387* بیشترین میزان اگزوپلی ساکارید، کربوهیدرات و پروتئین را در فلز نیکل داشت. این نتایج نشان می‌دهند بیومس سویه *Nostoc punensis* به شدت تحت تأثیر فلزات سنگین کاهش معناداری یافته است. علاوه بر آن، بالاترین میزان اگزوپلی ساکارید، کربوهیدرات و پروتئین در سویه *Neowestiellopsis Persica A1387*، بیشترین نقش را در مقاومت به نیکل دارد. همچنین نتایج حاصل از جذب اتمیک فلزات

سیانوباکتری *Nostoc punensis* سویه برتر در تولید پروتئین بوده است. بیشترین میزان تولید پروتئین در این سویه در تیمار با فلز نیکل و کمترین تولید پروتئین در تیمار با فلز مس نشان داده شده است. مطالعات سپوی و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند محتوای پروتئینی حدود ۱۵ تا ۲۷ درصد در سویه *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) در مواجهه با فلز نیکل کاهش یافته است [۱۹].

اگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتری، مجموعه‌ای از خواص بیوشیمیایی منحصربه‌فردی را ارائه می‌دهند که آنها را از نقطه‌نظر بیوتکنولوژی جالب می‌کند. این اگزوپلی ساکاریدهای پیچیده از حداقل ۱۰ مونوساکارید مختلف تشکیل شده‌اند و با داشتن پنتوزها (معمولاً در پلی ساکاریدهای با منشأ پروکاریوتی وجود ندارد) و همچنین ماهیت آنیونی آنها به دلیل وجود قندهای اسیدی (گلوکورونیک و/یا گالاکتورونیک اسیدها) و جایگزین‌های آلی آنیونی (استیل و پیروویل) و معدنی (فسفات و سولفات) مشخص می‌شود [۲۱]. مطالعات سهلان اوستورک و همکاران در سال ۲۰۱۴، حذف فلزات اگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتری با محتوای اسید اورونیک و ترکیب مونوساکاریدی را نشان دادند. این دانشمندان، حذف فلزات سنگین کروم، کادمیوم و فلز مخلوط (کروم + کادمیوم) و ارتباط آن با اگزوپلی ساکاریدها و تولید اسیدهای اورونیک در سویه *Synechocystis sp.* را بررسی کردند. نتایج نشان دادند تولید اگزوپلی ساکارید توسط سویه *Synechocystis sp.* پس از قرارگرفتن در معرض کادمیوم افزایش یافت. ترکیب مونومر تولید اگزوپلی ساکارید نیز پس از تیمار با فلز تغییر کرد. همچنین، محتوای اسید گلوکورونیک و محتوای اسید گالاکتورونیک تولید اگزوپلی ساکارید با

- cyanobacteria. In *Handbook of advanced industrial and hazardous wastes management* 2017 Oct 30 (pp. 931-964). CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781315117423-29/>
- (2) Volk RB, Venzke K, Blaschek W. Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal of Applied Phycology* 2007 Jun; 19: 255-62. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9131-x>
- (3) Martin S, Griswold W. S, Griswold W. Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology briefs for citizens* 2009 Mar; 15(5):1-6. <https://engg.k-state.edu/chsr/files/chsr/outreach-resources/15HumanHealthEffectsofHeavyMetals.pdf>
- (4) Mišić Radić T, Čačković A, Penezić A, Dautović J, Lončar J, Omanović D, Juračić K, Ljubešić Z. Physiological and morphological response of marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) exposed to cadmium. *European Journal of Phycology* 2021 Jan 2; 56(1):24-36. <https://doi.org/10.1080/09670262.2020.1758347>
- (5) Jasmin C, Anas A, Singh D, Purohit HJ, Gireeshkumar TR, Nair S. Aberrations in the microbiome of cyanobacteria from a tropical estuary polluted by heavy metals. *Marine Pollution Bulletin* 2020 Nov 1; 160: 111575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111575>
- (6) Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: recent advances. *International journal of molecular sciences* 2014 Dec 31; 16(1):871-86. <https://doi.org/10.3390/ijms16010871>
- (7) Gupta P, Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* 2017 Mar 1; 13:58-71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- (8) Nowruzi B, Lorenzi A.S. B, Lorenzi AS. Production of the neurotoxin homoanatoxin-a and detection of a biosynthetic gene cluster sequence (anaC) from an Iranian isolate of *Anabaena*. *South African Journal of Botany* 2021 Jul 1; 139: 300-5. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.02.012>

سنگین نشان دادند سویه *Neowestiellopsis Persica* A1387 در ۱۰ دقیقه اول بیشترین میزان حذف فلز نیکل را نسبت به سویه *Nostoc punensis* داشت. نتایج حاصل از تکنیک طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه در این پژوهش نشان دادند سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 مقاومت بیشتری نسبت به سیانوباکتری *Nostoc punensis* در تیمارهای فلزی از خود نشان داد. سویه برتر در حذف فلزات سنگین سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 بوده است. در رابطه با سیانوباکتری *Neowestiellopsis Persica* A1387 در ناحیه  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۵ سویه کنترل پیک دیده شد که مربوط به گروه خمشی C-N بوده است. این پیک فقط در سویه تیمارشده با مس یافت شده است. در ناحیه  $\text{cm}^{-1}$  ۵۷۵ سویه کنترل و سویه‌های تیمارشده با کروم و نیکل، پیک مربوط به گروه خمشی کربونیل (C=O) مشاهده شد؛ اما این پیک در سویه تیمارشده با مس دچار تغییرات شده بود. پیک‌های محدوده  $\text{cm}^{-1}$  ۱۰۰۰ مربوط به گروه‌های C-O پلی‌ساکاریدی و اسکلت قندی‌اند که در همه تیمار سویه *Neowestiellopsis Persica* A1387 و سویه کنترل دیده شدند. پیک‌های سویه تیمارشده با مس در بازه  $\text{cm}^{-1}$  ۱۱۱۵-۱۰۴۸ مربوط به کشش قوی  $\text{PO}_4^{3-}$  و  $\text{NH}_3^+$  بوده است که مربوط به اسکلت قندی و گروه‌های C-O-C و C-O-C آنومریک قندها است. در نواحی  $\text{cm}^{-1}$  ۱۶۵۴ و  $\text{cm}^{-1}$  ۲۹۳۵، پیک مربوط به گروه کربونیل کششی و N-H و OH کششی، تغییراتی را نشان ندادند.

## References

- (1) De Philippis R, Micheletti E. Heavy metal removal with exopolysaccharide-producing

- (9) Bhunia B, Uday US, Oinam G, Mondal A, Bandyopadhyay TK, Tiwari ON. Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. *Carbohydrate polymers* 2018 Jan 1; 179:228-43. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.091>
- (10) Chakdar H, Thapa S, Srivastava A, Shukla P. Genomic and proteomic insights into the heavy metal bioremediation by cyanobacteria. *Journal of Hazardous Materials* 2022 Feb 15; 424: 127609. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127609>
- (11) Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols* 2020 Apr 1; 2020(4): pdb-rot102269. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- (12) Richert L, Golubic S, Guédès RL, Ratiskol J, Payri C, Guezennec J. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Current Microbiology* 2005 Dec; 51: 379-84. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0069-z>
- (13) Ruiz-Matute AI, Hernández-Hernández O, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML, Martínez-Castro I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *Journal of Chromatography B* 2011 May 15; 879(17-18):1226-40. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>
- (14) Cui J, Xie Y, Sun T, Chen L, Zhang W. Deciphering and engineering photosynthetic cyanobacteria for heavy metal bioremediation. *Science of The Total Environment* 2021 Mar 20; 761:144111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144111>
- (15) Kumar M, Seth A, Singh AK, Rajput MS, Sikandar M. Remediation strategies for heavy metals contaminated ecosystem: A review. *Environmental and Sustainability Indicators* 2021 Dec 1; 12: 100155. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2021.100155>
- (16) Micheletti E, Colica G, Viti C, Tamagnini P, De Philippis R. Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Journal of applied microbiology* 2008 Jul 1; 105(1): 88-94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03728.x>
- (17) Konur O. Algal biosorption of heavy metals from wastes. In *Marine Bioenergy* 2015 May 21 (pp. 616-645). CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b18494-32/>
- (18) Ghorbani E, Nowruzi B, Nezhadali M, Hekmat A. Metal removal capability of two cyanobacterial species in autotrophic and mixotrophic mode of nutrition. *BMC microbiology* 2022 Feb 17; 22(1):58. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02471-8>
- (19) Cepoi L, Zinicovscaia I, Rudi L, Chiriac T, Djur S, Yushin N, Grozdov D. Assessment of Metal Accumulation by *Arthrospira platensis* and Its Adaptation to Iterative Action of Nickel Mono- and Polymetallic Synthetic Effluents. *Microorganisms* 2022 May 17; 10(5): 1041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051041>
- (20) El-Sheekh MM, El-Shouny WA, Osman ME, El-Gammal EW. Growth and heavy metals removal efficiency of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in sewage and industrial wastewater effluents. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005 Feb 1; 19(2): 357-65. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.09.005>
- (21) Challouf R, Trabelsi L, Ben Dhieb R, El Abed O, Yahia A, Ghazzi K, Ben Ammar J, Omran H, Ben Ouada H. Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2011; 54: 831-8. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400024>
- (22) Ozturk S, Aslim B, Suludere Z, Tan S. Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition. *Carbohydrate polymers* 2014 Jan 30; 101: 265-71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.040>