

Genetic Analysis of Nonribosomal Peptide Synthesis Genes (NRPSs) in Natural Product Biosynthesis of the Cyanobacterial Strains of Lavasan Lake

Bahareh Nowruzi *

Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abbas Akhavan Sepahi

Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.

Ghazaleh Sadat Soltani Savoji

Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Cyanobacteria are regarded as good candidates for natural product discovery, with applications in pharmaceuticals industry. The majority of bioactive metabolites have either been polyketides, non-ribosomal peptides, or a hybrid of the two. Despite of several worldwide studies on prevalence of NRPSs, none of them included Iranian cyanobacteria of Lavasan Lake. Therefore, the aim of this study was to show that the presence of these genes correlates with natural product synthesis.

Materials and Methods: In this study, ten cultured fresh water cyanobacteria strains of the Lavasan Lake were identified based on the sequence of 16SrRNA gene. For the phylogenetic analysis the genes responsible for the production of secondary metabolites, a NRPS PCR was conducted. *Bioinformatics software* tools were used in order to predict peptide compound, amino acid activated and the signature sequences by a specific unknown NRPS A module. Antibioassays were conducted to detect the presence of antimicrobial effects. Lastly, the studied strains have been deposited at the Cyanobacteria Culture Collection (CCC) of herbarium ALBORZ at the Science and Research Branch, Islamic Azad University of Teheran.

Results: The results showed that NRPS genes present in all strains. Moreover, bioinformatics analysis confirmed the type of natural compound, signature sequences and predicted amino acid. In the clustering of NRPS protein sequences, there was no clear phylogenetic correlation between adenylation domains and activated amino acid and this result emphasize the variety of adenylation domains. In addition, the results of antibiogram bioassays showed that there are positive correlation between the presence of those genes and antimicrobial activity.

Discussion and Conclusion: Sequence analysis indicates that the enzymes encoded by these genes may be responsible for the production of different secondary metabolites such as antibiotics. The presented results prove that fresh water cyanobacterial of Iran is a promising source to yield chemical and pharmaceutical interesting compounds.

Keywords: Peptide Synthetase Genes (NRPSs), Fresh Water Cyanobacterial, Genetic Analysis, Lavasan Lake, Natural Products.

* Corresponding author

Received: October 15, 2018 / **Accepted:** January 26, 2019

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۳۰، تابستان ۱۳۹۸، صفحه ۲۷-۵۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۳- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۶

تجزیه و تحلیل ژنتیکی ژن‌های پپتیدسنتتاز (NRPSs) در بیوستتر محصولات طبیعی سیانوباکتری‌های دریاچه لواسان

بهاره نوروزی*: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir
عباس اخوان: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، a_akhavan@iau-tnb.ac.ir
غزاله سلطانی: کارشناس ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، ghazalfantasy@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سیانوباکتری‌ها نامزدهای مناسبی برای کشف محصولات طبیعی دارای کاربرد در صنایع داروسازی به شمار می‌آیند. امروزه، عمده متابولیت‌های زیست‌فعال جداشده از سیانوباکتری‌ها به شکل پلی‌کتیدی یا پپتیدهای غیرریبوزومی و یا هیبریدی از این دو هستند. با وجود مطالعه‌های بسیار در زمینه پراکنش ژن‌های NRPS، هیچ‌کدام از آنها در زمینه سویه‌های سیانوباکتریایی دریاچه لواسان نبوده است؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی همبستگی بین حضور این ژن‌ها و سنتز ترکیبات طبیعی است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ده سیانوباکتری آب شیرین بر اساس توالی ژن *16S rRNA* در دریاچه لواسان شناسایی شدند. PCR ژن NRPS با استفاده از روش‌های مولکولی به منظور تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن‌های مسئول تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شد. به منظور پیشگویی ترکیب پپتیدی، آمینواسید فعال‌شده و توالی‌های امضای مودول آدنیل‌شده NRPS از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک استفاده شد. آزمایش‌های غربال‌گری آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش دیسک انجام شدند. سویه‌های مطالعه‌شده در مجموعه کشت میکروبی (CCC) هرباریوم البرز در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات نگهداری شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند ژن‌های NRPS در همه سویه‌های مطالعه‌شده وجود دارند؛ علاوه بر این، نتایج تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک، نوع ترکیب طبیعی، توالی‌های امضا و پیشگویی آمینواسید فعال‌شده را نشان دادند. خوشه‌بندی توالی‌های پروتئینی NRPS نشان داد هیچ همبستگی فیلوژنتیکی مشخصی بین دمین‌های آدنیل‌شده و نوع آمینواسید فعال‌شده وجود ندارد و این، تنوع زیاد درون دمین‌های آدنیل‌شده را نشان می‌دهد. نتایج آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام، همبستگی مثبتی را بین حضور این ژن‌ها و فعالیت آنتی‌میکروبی نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: تجزیه و تحلیل توالی‌ها نشان داد احتمالاً آنزیم‌های رمزگذاری‌کننده این ژن‌ها مسئول تولید متابولیت‌های ثانویه جدید مانند آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند سیانوباکتری‌های آب شیرین ایران منبع درخور توجهی برای تولید ترکیبات دارای ارزش شیمیایی و دارویی‌اند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های پپتیدسنتتاز (NRPSs)، سیانوباکتری‌های آب شیرین، تجزیه و تحلیل ژنتیکی، دریاچه لواسان، محصولات طبیعی

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

سیانوباکتری‌ها، پروکاریوت‌های فتوسنتزی اکسیژنیک با ویژگی‌های مشابه باکتری‌ها (پروکاریوت‌ها) و جلبک‌ها (یوکاریوت‌ها) هستند. تنوع بی‌اندازهٔ سیانوباکتری‌ها منعکس‌کنندهٔ تولید محدودهٔ وسیعی از فراورده‌های طبیعی^۱ است که موجب زنده ماندن این موجودات در زیستگاه‌های متنوع اکولوژیکی و رقابتی می‌شود. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند سیانوباکتری‌ها قابلیت تولید بلوم‌های سمی را در بسیاری از آب‌ها دارند و محدودهٔ وسیعی از نئوروتوکسین‌ها، هپاتوکسین‌ها و متابولیت‌های ثانویهٔ ارتقادهندهٔ تومور را تولید می‌کنند (۱-۴). این فراورده‌های طبیعی نه تنها ارزش دارویی دارند، به شکل مدل‌های ساختمانی برای ایجاد آنالوگ‌های سنتتیک نیز به کار می‌روند (۵-۷). تاکنون فراورده‌های طبیعی بسیاری از طیف وسیعی از تاکسون‌ها^۲ جدا و برای فعالیت‌های زیست‌شناختی مختلف آزمایش شده‌اند؛ در میان این تاکسون‌ها، سیانوباکتری‌ها به عنوان منابع غنی و جدید ترکیب‌های فعال زیستی شناسایی شده‌اند (۸-۱۷).

پپتیدها و دپسپپتیدها^۱ تعداد فراوانی از متابولیت‌های ثانویهٔ سیانوباکتری‌ها را تشکیل می‌دهند. ویژگی ترکیب‌های یادشده اینست که شامل آمینواسیدهای غیرپروتئینی و آمینواسیدهای متیله شده‌اند و این ویژگی پپتیدهای بیوسنتز شده توسط پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی^۳ (NRPSs) است (۱۸). وجود ویژگی‌های ساختمانی متنوع در متابولیت‌های ثانویهٔ تولید شده پیشنهاد می‌کند این پپتیدها با ماشین ریبوزومی وابسته به نوکلئیک‌اسید سنتز نمی‌شوند و تولید این محصولات حتی در حضور بازدارنده‌های

ریبوزومی یا RNase گواه این ادعاست. درحقیقت، این آنزیم‌ها سوبسترای آمینواسیدی را با صرف ATP به شکل آمینوآسیل‌آدنیلات فعال می‌کنند. NRPSها بزرگ‌ترین آنزیم‌های با وزن مولکولی بیش از دو یا سه مگادالتون هستند و از واحدهای کاتالیتیک تکراری به نام مودول تشکیل شده‌اند که هر کدام حدود ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ آمینواسید طول دارند. وظیفهٔ مودول‌ها، اضافه کردن باقیمانده^۴ به درون زنجیرهٔ پپتیدی در حال رشد است. تعداد و ترتیب مودول‌ها درون یک NRPS با تعداد و توالی آمینواسیدهای تشکیل شده درون فراوردهٔ پپتیدی منطبق است. یک مودول کامل حداقل سه دمین آنزیمی شامل دمین آدنیله شده^۵ (A)، دمین تراکمی^۶ (C) و دمین تیوله شده^۷ (T) دارد. هر مودول که مسئول کاتالیز یک چرخهٔ کامل طول‌سازی زنجیره است شامل سه واکنش اساسی تشخیص پیش‌ماده، فعال‌سازی به شکل آسیل‌آدنیلات و پیوند کووالانسی به شکل تیواستر است؛ این فعالیت‌های آنزیمی به شکل دمین‌های کاتالیتیکی مجزا درون هر مودول جاسازی شده‌اند (۱۹). دمین آدنیله شده نخستین مراحل سنتز پپتید غیرریبوزومی را کنترل می‌کند و پیش‌ماده آمینواسیدی را انتخاب و آن را به شکل آمینوآسیل‌آدنیلات فعال می‌کند. آمینواسید غیرپایدار آدنیلات پی‌درپی به پایین دست^۸ دمین T (تیوله شده) منتقل می‌شود و به همین علت، دمین T پروتئین حامل پپتیدیل^۹ (PCP) نیز نامیده می‌شود. دمین T نسبتاً کوچک (۸ تا ۱۰ کیلودالتون در مقایسه با دمین‌های ۵۰ کیلودالتونی A و C) است. دمین تراکمی حدود ۴۵۰ آمینواسید طول دارد و تشکیل پیوند پپتیدی را بین یک آمینوآسیل PCP یا peptidyl-PCP از مودول

و بررسی حضور ژن‌های NRPS با سنتز ترکیبات ضد میکروبی در ده سویه آب شیرین جزو نخستین پژوهش‌های انجام شده به منظور معرفی سویه‌های سیانوباکتریایی در تولید متابولیت‌های با منشأ دارویی است. در این راستا، جستجو برای آشکارسازی حضور ژن‌های پتیدسنتازهای غیرریبوزومی و ارتباط این ژن‌ها با حضور متابولیت‌های ثانویه در سیانوباکتری‌ها در دریاچه لواسان اهمیت بسیار زیادی دارد.

مواد و روش‌ها

مکان و روش نمونه‌برداری: نمونه‌های آب از سطح تا عمق ۱۰ سانتی‌متری دریاچه لواسان با بطری‌های پلاستیکی جمع‌آوری شدند؛ به این منظور، ظرف‌های جمع‌آوری به دقت و به آرامی چرخانده شدند تا از آب، گل‌ولای و جلبک‌ها پر شوند. هنگام نمونه‌برداری دقت شد تا بخش بالایی ظرف‌ها خالی بماند تا هوا به میزان کافی وجود داشته باشد. نمونه‌برداری از ایستگاه‌های مختلف انجام شد و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند (۲۲ و ۲۳).

تهیه محیط کشت BG-110: محیط کشت مایع استوک^{۱۲} BG-110 (بدون نمک‌های نیتروژنه) برای کشت و خالص‌سازی سیانوباکتری‌های راسته نوستوکالز^{۱۳} آماده شد. به منظور آماده‌سازی این محیط به شکل استوک، ۵۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۱۵ دقیقه با CO₂ هوادهی و سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های استوک به آن اضافه و با آب به حجم ۱ لیتر رسانده شد؛ در نهایت، محیط به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. پس از استریل و سرد شدن محیط، اسیدیته آن در حد ۷/۱ تنظیم شد (جدول ۱) (۲۲ و ۲۳).

بالادست و باقیمانده آمینوآسیل متصل به مودول پایین دست مربوطه کاتالیز می‌کند. دمین تیواستراز^{۱۴} یا خاتمه^{۱۵} نیز حدود ۲۵۰ باقیمانده دارد که برای آزادسازی فراورده ضروریست و آزادسازی پتید بیوسنتزی را در شکل خطی، حلقوی یا منشعب کاتالیز می‌کند (۲۰).

استفاده از سیانوباکتری‌ها در صنایع داروسازی از اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی آغاز و به کشف ترکیب‌های جدید با ویژگی‌های ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد HIV، ضد باکتریایی، ضد قارچی و سیتوتوکسیک در کاربردهای کلینیکی منتهی شده است. استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها که بیش از نیم قرن است برای معالجه انسان و حیوان به کار می‌روند، کاهش چشمگیر کارآمدی تأثیر تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها به واسطه تکامل تحمل باکتری‌ها را در پی داشته است؛ علاوه بر این، تعداد آنتی‌بیوتیک‌های جدید معرفی شده در دنیای امروز کاهش چشمگیری داشته است و از این رو، جستجو برای یافتن متابولیت‌های دارای ویژگی‌های آنتی‌بیوتیکی جدید اهمیت ویژه‌ای دارد (۲۰).

با وجود مطالعه‌های بسیار در زمینه پراکنش ژن‌های NRPS، هیچ کدام از آنها درباره سویه‌های سیانوباکتریایی دریاچه لواسان نبوده و تاکنون منابع زیست‌فناوری آنها در ایران کمتر بهره‌برداری شده است (۲۱). کشف ترکیب‌های شیمیایی جدید در سیانوباکتری‌ها می‌تواند به تکامل صنعت داروسازی منجر شود (۱۲). مقاومت ایجاد شده به آنتی‌بیوتیک‌های فعلی به غریبال‌گری ترکیب‌های زیست‌فعال جدید در سیانوباکتری‌ها منجر شده است؛ از این رو، جستجو برای کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید

جدول ۱- محیط کشت مایع BG-110 (استوک) برای رشد سیانوباکتری‌های راسته نوستوکالز (۲۲)

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	۴/۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر	محلول عناصر کمیاب	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	۷/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر	H_2BO_3	۲/۸۶ گرم در لیتر
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	۳/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	۱/۸۱ گرم در لیتر
Citric acid	۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	۰/۲۲۲ گرم در لیتر
Na_2CO_3	۴/۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	۰/۰۷۹ گرم در لیتر
Ferric ammonium citrate	۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر		
EDTA (disodium magnesium)	۰/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر		
محلول عناصر کمیاب	۱ میلی‌لیتر	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	۰/۳۹۰ گرم در لیتر
		$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	۰/۰۴۹۴ گرم در لیتر
آب الکترو دی‌یونیزیشن (Elix)	۱ لیتر	آب الکترو دی‌یونیزیشن (Elix)	۱ لیتر

کشت قرار داده شدند و مدت انکوباسیون بین یک تا چهار هفته در نظر گرفته شد (۲۲ و ۲۳).

خالص‌سازی و تهیه کشت‌های تک جلبکی به‌منظور

بررسی تاکسونومیک مولکولی: حضور فیلامنت‌های متحرک یا هورموگونیوم با قابلیت سرخوردن روی ظرف پتری از ویژگی‌های راسته نوستوکالز است که برای جداسازی و خالص‌سازی این راسته استفاده می‌شود. ابتدا از روش رقیق‌سازی درون لوله استفاده شد و زیر لامینار فلو، رقت‌های متفاوتی از کشت مایع متعلق به هر گونه درون لوله آماده شد؛ به این منظور، ابتدا کلنی‌های نوستوک با سونیکیتور حمام آب (Sonorex Digital 10P) جدا شدند تا به شکل فیلامنت درآیند و سپس با میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند. لوله‌ای انتخاب شد که حاوی تعداد زیادی تک‌فیلامنت بود و سپس ۱ میلی‌لیتر از آن زیر لامینار فلو به درون ظرف پتری حاوی محیط کشت جامد منتقل و در سراسر ظرف پتری منتشر شد؛ دور ظرف پتری با پارافیلם مسدود شد. پس از گذشت نیم ساعت که محیط مایع جذب شد، دوباره زیر میکروسکوپ مشاهده و هر مکانی که تک‌فیلامنت مشاهده شد با مارکر دائمی پشت و روی ظرف پتری مشخص شد. پس از گذشت دو هفته،

اتاقک کشت سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار:

پس از آماده‌سازی محیط کشت استریل، ۲۰ میلی‌لیتر از آن زیر لامینار فلو به داخل ظرف‌های پتری حاوی ۵ گرم خاک افزوده شد؛ سپس ظرف‌های پتری حاوی اینوکولوم سیانوباکتری‌ها داخل اتاقک رشد با شدت روشنایی ۴۰ تا ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه^{۱۴} و دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۲۳). پس از دو هفته، تعداد زیادی از کلنی‌های سیانوباکتری‌ها در هر ظرف پتری دیده شدند.

تهیه محیط کشت جامد: به‌منظور جداسازی و

خالص‌سازی سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار لازم است کشت و جداسازی در محیط کشت اختصاصی جامد انجام شود؛ به این منظور باید مقدار ۱۰ گرم آگار به هر لیتر محیط کشت مایع BG-110 اضافه شود. پس از تهیه محیط کشت و جامد شدن آن، مقداری از هر کلنی با رنگ‌های مختلف به وسیله لوپ برداشته و به شکل زیگزاگ روی محیط کشت جامد کشت شد؛ این کار در شرایط استریل و زیر لامینار فلو انجام شد. به‌منظور اطمینان از خالص بودن سیانوباکتری‌ها، سه تا پنج بار از کشت‌های به‌دست آمده کشت مجدد تهیه شد. ظرف‌های پتری پس از تلقیح در اتاقک مخصوص

جدول ۲- محیط کشت جامد R2A برای آزمایش نمونه‌های آکزنیک

عصاره مخمر	۰/۵ گرم
Meat peptone	۰/۵ گرم
Casamino acids	۰/۵ گرم
گلوکز	۰/۵ گرم
نشاسته	۰/۵ گرم
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۰/۳ گرم
منیزیم سولفات	۰/۰۵ گرم
سدیم پیروات	۰/۳ گرم
آگار	۰/۱۵ گرم
آب الکترو دیونیزیشن (Elix)	۱ لیتر

شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی

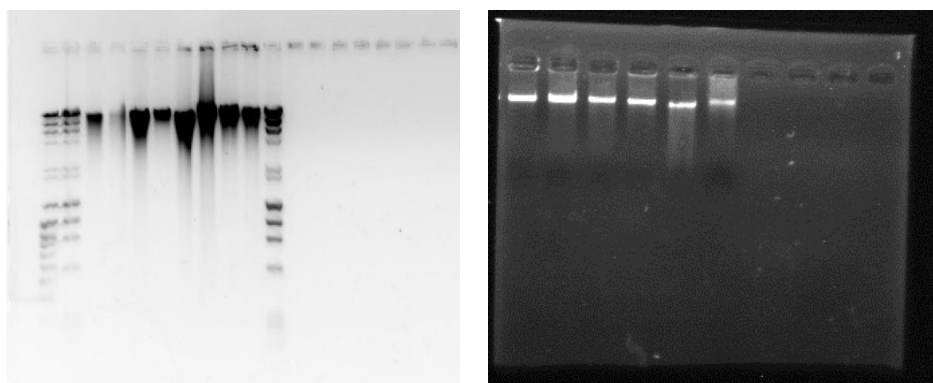
نمونه‌ها: شناسایی ریخت‌شناختی سیانوباکتری‌ها با میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج انجام شد. چندین نمونه برای شناسایی مطمئن آزمایش شدند و شناسایی بر اساس کلیدهای شناسایی انجام شد (۳۱-۴۰). شاخص‌های مختلف شامل طول و قطر سلول‌های رویشی، هتروسیست و آکینت، ریخت‌شناسی سلول انتهایی، مسافت بین هتروسیست‌ها و مسافت بین هتروسیست و نزدیک‌ترین آکینت (محاسبه شده به عنوان تعداد سلول‌ها)، حضور یا نبود هتروسیست‌های انتهایی، شکل فیلامنت‌ها و تجمع در کلنی‌ها طی بررسی‌های ریخت‌شناختی مطالعه شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های سیانوباکتریایی بر اساس توالی 16S rRNA

استخراج DNA: استخراج DNA به روش دستی CTAB^{۱۷} انجام و برای تعیین کیفیت DNA از روش کیفی به کمک لود کردن روی ژل الکتروفورز (شکل ۱) و روش کمی به کمک دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) spectrophotometer استفاده شد. کیفیت مطلوب DNA استخراج شده کیفیت مناسب باندها را تضمین می‌کند.

فیلامنت‌های متحرک یا هورموگونیا روی سطح ظرف پتری حرکت و با این کار تا حدی خود را از دسترس باکتری‌ها و سایر موجودات تک‌یاخته‌ای دیگر رها کردند. گاهی ممکن است تراکم باکتری‌ها و سایر عوامل آلوده‌کننده به قدری زیاد شود که موجب نابودی تک‌فیلامنت شود و در مواردی هر تک‌فیلامنت و یا هورموگونیا پس از گذشت دو هفته، کلنی تشکیل دهد. با توجه به اینکه کلنی رشد یافته روی سطح ظرف پتری حاصل رشد تک‌فیلامنت است، انتقال کلنی‌ها به درون محیط کشت تازه دیگر علاوه بر ایجاد کشت‌های تک‌جلبکی موجب خلوص و آکزنیک شدن^{۱۵} کشت‌ها می‌شود. انتقال کلنی‌ها به درون محیط کشت جامد تازه تا حد زیادی از تراکم عوامل آلوده‌کننده می‌کاهد. مراحل انتقال گاهی ۵ یا ۶ بار تکرار شد تا از خالص و آکزنیک بودن کشت اطمینان حاصل شود (۲۴-۲۹).

آزمایش نمونه‌های آکزنیک توسط تلقیح^{۱۶} در محیط کشت R2A (R2A LAB163): محیط R2A به طور آماده خریداری شد و ترکیبات آن در جدول ۲ آورده شده است. ۱۸ گرم از این محیط در ۱ لیتر آب (الکترو دیونیزیشن Elix) به کمک همزن مغناطیسی حل و سپس استریل شد. اسیدیته محیط حدود ۷/۲ تنظیم شد؛ سپس ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت درون هر ظرف پتری ریخته شد و پس از آماده شدن هر محیط، مقداری از نمونه کشت‌های آکزنیک شده با سر سرنگ استریل و زیر لامینار فلو به شکل نقطه نقطه دورتادور ظرف پتری تلقیح شد. سعی شد از تمام سطح کشت آکزنیک نمونه برداری شود و سپس ظرف‌های پتری تلقیح شده به مدت ۵ تا ۷ روز در ۲۲ درجه سانتی‌گراد یا به مدت ۳ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رشد، وجود داشتن یا نداشتن کلنی در اطراف هر نقطه بررسی شد (۳۰).



شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد (w/v)

به مدت ۵ دقیقه انجام شد؛

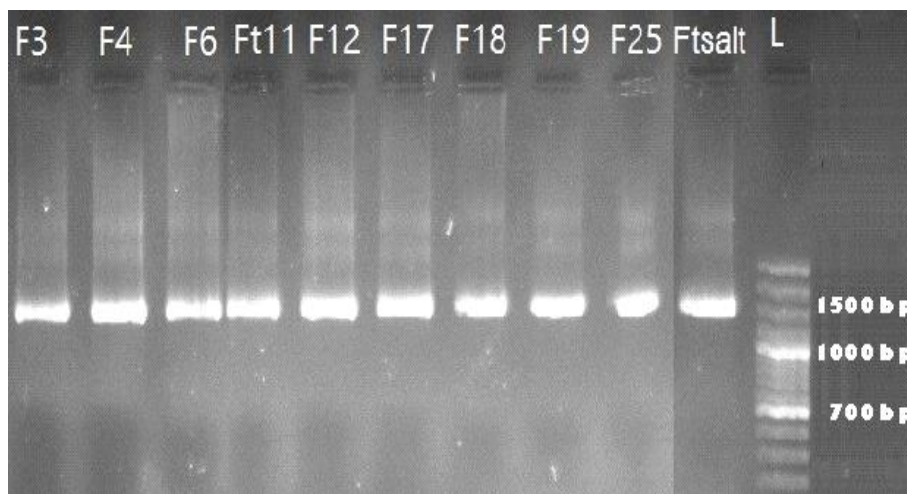
چرخه دوم شامل سه مرحله بود: مرحله اول شامل بازشدن^{۱۸} دو رشته DNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود؛ در مرحله دوم (اتصال^{۱۹}) آغازگرها به تک رشته‌ای DNA الگو متصل شدند و این مرحله در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد؛ مرحله سوم (طول شدن^{۲۰}) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد؛

چرخه سوم (طول شدن نهایی^{۲۱}) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد؛ چرخه چهارم (مرحله نگهداری نهایی^{۲۲}) در ۴ درجه سانتی‌گراد حفظ شد (شکل ۲).

تکثیر توالی ژن 16S rRNA: به منظور تکثیر

توالی ژن 16S rRNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط اولیه در ۹ تکرار (۳ تکرار برای هر نمونه، ۱ تکرار برای شاهد مثبت، ۱ تکرار برای شاهد منفی و ۱ تکرار برای جلوگیری از خطا) تهیه شد. از آغازگرهای رفت 27F1: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (8-23S30Ra: 5'- (30-52) و برگشت (۴۱) 27) CTTGCCTCTGTGTGCCTAGGT (۴۲) برای تکثیر توالی ژن 16S rRNA استفاده شد. برنامه PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA در چهار چرخه طراحی شد:

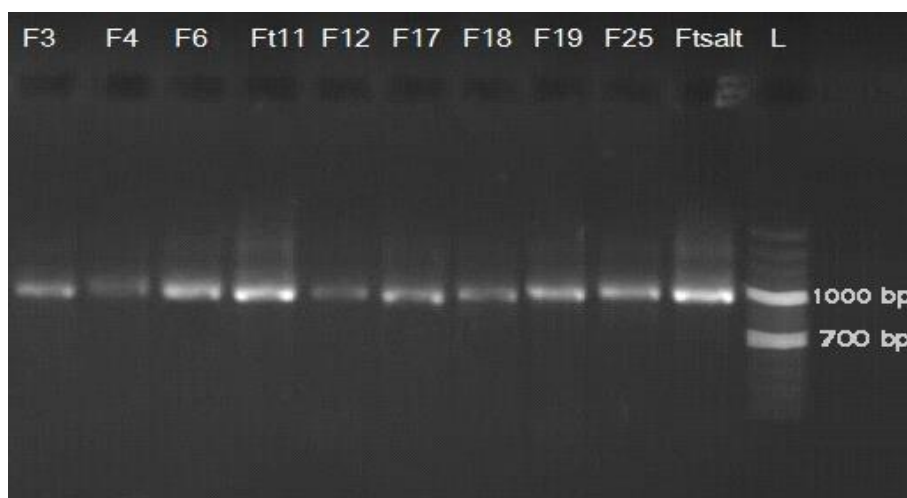
چرخه اول (مرحله شروع) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد



شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصولات PCR ژن 16S rRNA

PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از PCR Primus (MWG, Germany) انجام شد. تمام مواد لازم برای انجام واکنش PCR و آغازگرها از شرکت سیناژن خریداری شدند و در نهایت، PCR با شیب دمایی ۳۵ تا ۵۵ درجه سانتی گراد برای تعیین نقطه اتصال آغازگر به DNA انجام شد (شکل ۳).

غربالگری حضور ژن NRPS در نمونه های سیانوباکتری شناسایی شده: تکثیر ژن NRPS با استفاده از آغازگرهای الیگونوکلوئیدی دجنریت^۳ (5'- MTF2 MTR (5'- GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC-3') و (5'-CCNCGDATYTTNACYTG-3') با هدف تکثیر دمین های آدنیل شده انجام شد (۴۳). واکنش



شکل ۳- الکتروفورز فراورده های PCR ۱ کیلو جفت بازی NRPS متعلق به ده سویه سیانوباکتری

(Molecular Imager® Gel Doc™ XR system (Bio-Rad)) ردیابی شد. عکس دیجیتالی با نرم افزار QUANTITY ONE® 1-D V 4.6.7 analysis گرفته شد.

قطعه تقریباً ۱ کیلوبایتی دمین آدنیل شده NRPS و ۱۵۰۰ جفت بازی ژن *16S rRNA* توالیابی شد. عمل ترادف گیری فراورده های PCR با توالی یاب خودکار مدل Beckman توسط شرکت Microgene (کره جنوبی) انجام شد.

پیشگویی آمینواسید فعال شده به وسیله مودول آدنیل شده و شناسایی نوع ترکیب احتمالی: آمینواسید فعال شده به وسیله مودول NRPS A با نرم افزار برگرفته از سایت <http://www.tigr.org/jravel/nrps> پیشگویی

الکتروفورز ژل آگارز: به منظور انجام الکتروفورز، میزان ۱۰ میلی لیتر از محلول 50X TAE با آب الکترو دیونیزیشن (Elix) به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده و برای بافر الکتروفورز استفاده شد. دو رنگ الکتروفورز (برومو فنل بلو و زایلن سیانول FF) برای تهیه لودینگ بافر استفاده و در نهایت، لودینگ بافر شامل ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (اسیدیته ۷/۶)، برومو فنل بلو ۰/۳ درصد، گلیسرول ۶۰ درصد، گزیلن سیانول ۰/۳ درصد و ۶۰ میلی مولار EDTA آماده شد. ۵ میکرولیتر از فراورده های PCR با ۲ میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط و با میکروپیپت درون چاهک ژل ۱ درصد ریخته شد. ژل از تانک خارج و باند مدنظر با روشی UV و دستگاه transilluminator

nbank انجام شد. به‌منظور گرفتن کد دسترسی^{۲۵}، توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی‌شده دو سویه در پایگاه داده‌های (DDBJ)^{۲۶} ثبت شدند و به آنها رمز یا شماره مخصوص آن توالی تعلق گرفت.

بررسی آثار ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار^{۲۷}:
در روش انتشار (۵۰) از عصاره سیانوباکتریایی حل‌شده در حلال متانولی به‌عنوان بازدارنده رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده و نتیجه به‌شکل هاله حاوی ریزموجودات رشدنکرده ظاهر شد. اندازه هاله نشان‌دهنده غلظت و قدرت بازدارندگی عصاره نمونه مورد آزمایش است و درحقیقت، ارتباطی خطی بین اندازه هاله و غلظت ماده آزمایش‌شده وجود دارد که با اندازه‌گیری فاصله‌ای که ماده آزمایش‌شده در آن منتشر شده است و به‌شکل رشدکردن یا نکردن میکروب آزمایش‌شده مشخص می‌شود. در انتشار، ماده آزمایش‌شده به‌شکل افقی از مرکز به اطراف منتشر می‌شود و هاله‌های رشد یا عدم‌رشد را ایجاد می‌کند و درنهایت، قطر هاله اندازه‌گیری می‌شود.

انتخاب دیسک‌های کاغذی: روش دیسک کاغذی بیشترین کاربرد را دارد و محلول‌های موردآزمایش با سمپلر روی دیسک‌های کاغذی قرار می‌گیرند. کاغذ مورد استفاده برای تهیه دیسک ویژگی‌های مناسبی از نظر ضخامت، مقاومت در محلول عصاره، قدرت جذب محلول عصاره، بافت شبکه فیبری، مقاومت در برابر حرارت استریل‌شدن، دوام و استحکام مناسب و عدم‌پرزدهی دارد. دیسک‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر از شرکت پادتن طب تهیه شدند و شرایط استاندارد برای تبدیل به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را داشتند. قطر هر دیسک ۶/۸ میلی‌متر بود.

شد. از آنجاکه توالی‌های به‌دست‌آمده از ژن NRPS به‌دین حفاظت‌شده آذینه‌شده تعلق داشتند، ساختار سه‌بعدی آنها با استفاده از سایت جستجوی دمین‌های محافظت‌شده به آدرس <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> به دست آمد (۴۴ و ۴۵).

رسم درختان فیلوژنتیک و ثبت ژن: جستجوی بلاست نوکلئوتید^{۲۴} برای یافتن توالی‌های مشابه ژن 16S rRNA موجود در پایگاه داده‌های GenBankTM در NCBI انجام شد. توالی ژن 16S rRNA حاصل در بررسی حاضر به همراه توالی‌های مشابه گرفته‌شده از GeneBank با استفاده از برنامه CLUSTAL W (۴۶) هم‌ردیف و سپس به‌طور دستی در برنامه‌های BioEdit نسخه ۷ (۴۷) و MEGA نسخه ۷ (۴۸) ویرایش شدند (شکاف‌های موجود در توالی‌ها پس از هم‌ردیف‌سازی حذف شدند). درخت فیلوژنی با استفاده از تجزیه و تحلیل Maximum Likelihood و مدل Kimura two-parameter رسم شد.

جستجوی بلاست X برای یافتن توالی‌های مشابه ژن NRPS موجود در پایگاه داده‌های GenBankTM در NCBI انجام شد. توالی‌های ژن NRPS به‌دست‌آمده در بررسی حاضر به همراه دیگر توالی‌های مشابه گرفته‌شده از GeneBank با استفاده از برنامه MUSCLE (۴۹) هم‌ردیف شدند. به‌منظور رسم درخت از برنامه IQ-Tree و تجزیه و تحلیل maximum likelihood استفاده شد؛ سپس ویرایش درخت به کمک برنامه figtree انجام شد.

عملیات ثبت ژن با استفاده از نرم‌افزار bankit واقع در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=ge>

آماده‌سازی عصاره‌ها: آماده‌سازی عصاره‌های

سیانوباکتریایی در فاز ایستایی رشد (روز ۱۵) انجام شد؛ به این ترتیب که زیتوده حاصل به کمک کاردک پلاستیکی از سطح هر ظرف پتری جمع‌آوری و به مدت ۱ ساعت در گرمخانه ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۵۱). ۵۰۰ میلی‌گرم از زیتوده خشک‌شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد داخل چندین میکروتیوب تقسیم شد (هرکدام ۱۰۰ میلی‌گرم) و به هرکدام ۳۰۰ میلی‌گرم میله شیشه‌ای (۰/۵ میلی‌متری Scientific Industries Disruptor (Scientific Industries Disruptor Beads) و ۱ میلی‌لیتر حلال اضافه شد؛ ورتکس به مدت نیم ساعت انجام شد تا دیواره اسکلتی عصاره‌ها کاملاً از بین برود. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس بخش رویی برای بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ریز موجودات آزمایش‌شده به منظور بررسی

ویژگی‌های ضد میکروبی: دو باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* (PTCC 1112)، *Bacillus cereus* (PTCC 1015)، دو باکتری گرم منفی (*Escherichia coli* (PTCC 1047) و *Enterobacter* sp. 638، یک مخمر *Candida albicans* (ATCC 10231) و قارچ‌های پاتوژنیک *Fusarium* و *Aspergillus niger* (ATCC 16404) در این بررسی استفاده شدند.

تهیه محیط کشت باکتریایی: برای کشت ۲۴ ساعته

باکتری‌ها از محیط کشت مولر-هیتون آگار^{۲۸} استفاده شد؛ به این ترتیب که ۳۴ گرم پودر مولر هیتون آگار و ۰/۵ میکروگرم متیلن‌بلو در ۱ لیتر آب مقطر به کمک همزن مغناطیسی روی هیتر حل شد. متیلن‌بلو کمک

می‌کند قطر منطقه بازدارندگی^{۲۹} (IZ) پس از جامدشدن محیط و قراردادن دیسک‌های کاغذی با وضوح بیشتر مشاهده و اندازه‌گیری شود. به منظور تهیه محیط آنگوست غذایی برای باکتری‌ها و سنجش حداقل غلظت بازدارندگی، ۱۳ گرم پودر نوترینت‌براث^{۳۰} به ۱ لیتر آب مقطر اضافه و به همراه همزن مغناطیسی روی هیتر قرار داده شد. پس از شفاف‌شدن محیط، استریل کردن انجام شد.

تهیه محیط کشت قارچی: محیط سابرو دکستروز

آگار^{۳۱} برای بررسی اثر ضدقارچی انتخاب و به میزان ۲۵ گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میکروگرم متیلن‌بلو بر اساس دستور یادشده برای محیط کشت مولر تهیه شد. محیط تهیه‌شده پس از استریل شدن و در مجاورت شعله درون ظرف‌های پتری استریل شده پخش شد. به منظور تهیه سوسپانسیون قارچی برای سنجش حداقل غلظت بازدارندگی از محیط کشت مایع سابرو دکستروز براث^{۳۲} ۳۰ گرم در لیتر استفاده شد. استریل کردن محیط کشت‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه انجام شد.

آماده‌سازی باکتری‌ها و قارچ‌ها پیش از آغاز

آزمایش: پیش از آغاز آزمایش، باکتری‌ها و قارچ‌ها آماده‌سازی شدند؛ به این ترتیب که *Candida albicans* در محیط سابرو دکستروز آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد و *Aspergillus niger* در محیط سابرو دکستروز آگار به مدت ۷ روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. باکتری‌ها در محیط مولر هیتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. کلنی‌های رشد یافته *C. albicans* و باکتری‌ها به ۲ میلی‌لیتر محلول نمکی

(سدیم کلرید ۰/۱۴۵ مولار) منتقل شدند تا سوسپانسیون تشکیل شود و سپس کدورت هر سوسپانسیون با استاندارد مک‌فارلند^{۳۳} ۰/۵ تنظیم شد. به منظور تهیه لوله ۰/۵ مک‌فارلند، ۱/۱۷۵ درصد کلریدباریوم به ۹/۹۵ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید ۱ درصد اضافه شد؛ کدورت ایجادشده تقریباً معادل 1.0×10^{-8} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر باکتری بود. کلنی‌های رشدیافته *A. flavus* به محلول نمکی با همان غلظت منتقل شدند و کدورت سوسپانسیون مربوطه با دستگاه اسپکتروفوتومتر میکروپلیت (Infinite M200, Tecan) در طول موج ۵۳۰ نانومتر بین ۰/۰۹ و ۰/۱۱ تنظیم شد.

روش تلقیح سوسپانسیون آماده‌شده: تلقیح سوسپانسیون آماده‌شده به این شکل انجام شد که سواب در مجاورت شعله و در شرایط کاملاً استریل زیر لامینار فلو درون لوله آزمایش حاوی سوسپانسیون باکتریایی یا قارچی با کدورت تنظیم‌شده وارد شد و مایع اضافی با فشار محکم سواب به داخل لوله از بالای سطح محیط‌کشت خارج شد؛ سپس سواب به شکل یکنواخت در تمام سطح محیط‌کشت آگار و در سه جهت با چرخش ۶۰ درجه کشیده شد.

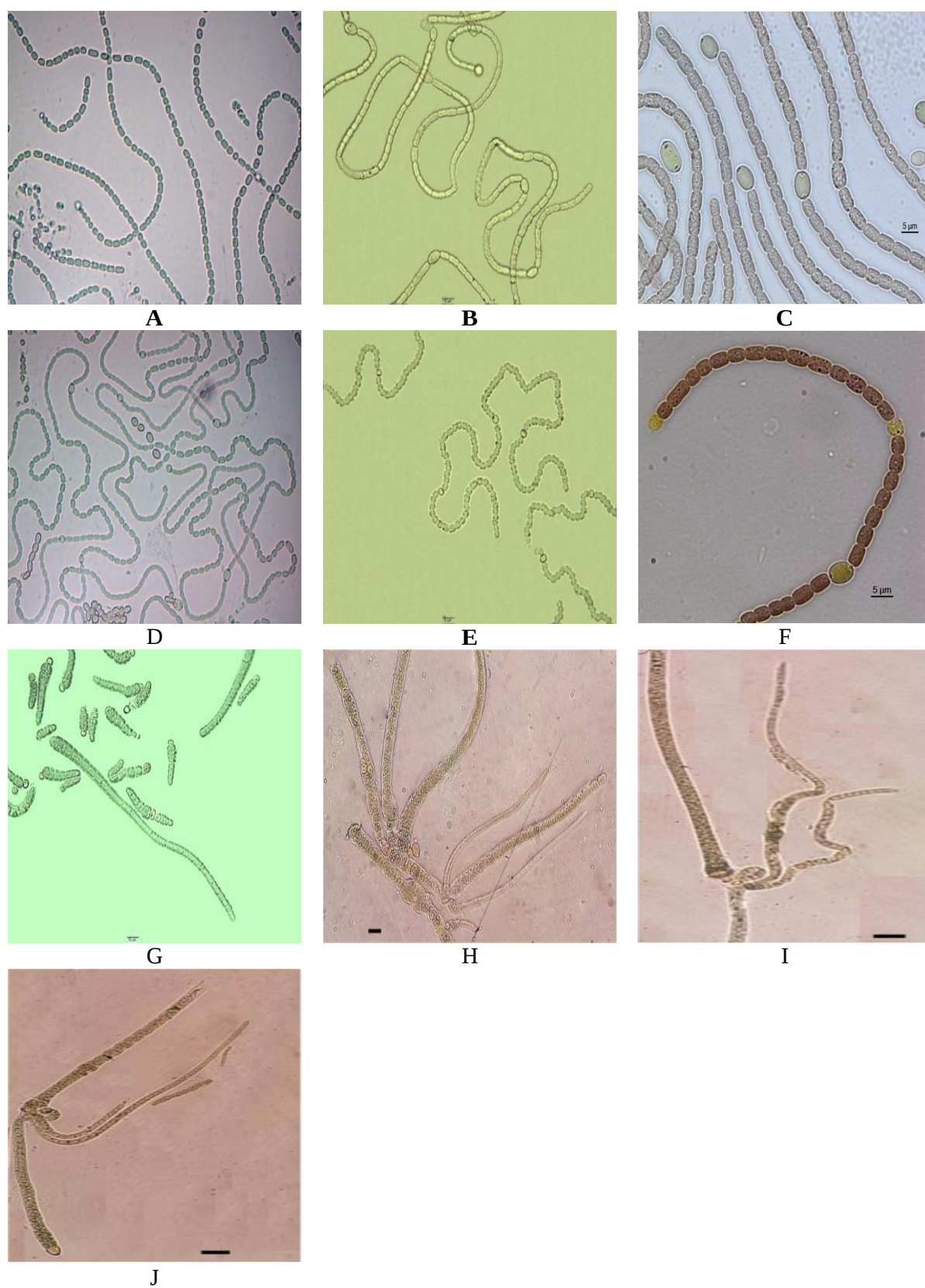
آماده‌سازی دیسک‌های کاغذی با عصاره‌های سیانوباکتریایی: پس از آماده‌سازی محیط‌کشت باکتری‌ها و قارچ‌ها و تلقیح کردن هر ظرف پتری با سوسپانسیون باکتریایی و قارچی با کدورت تنظیم‌شده، برای شاهد مثبت هر دیسک با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره سیانوباکتریایی با حلال مربوطه

تلقیح شد. ظرف‌های پتری با پارافilm بسته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌ها و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای قارچ‌ها قرار داده شدند. قطر مناطق بازدارنده رشد شامل قطر دیسک کاغذی با خط‌کش اندازه‌گیری و به میلی‌متر بیان شد.

روش‌های آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) انجام شد؛ تمام داده‌ها حاصل ۳ تکرار بودند. تفاوت معنادار بین عوامل اندازه‌گیری‌شده با تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها، پس از انجام چندین بار تجزیه و تحلیل و مطالعه چندین مقاله از آزمون توکی استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی تاکسونومی به روش ریخت‌شناسی و مولکولی سیانوباکتری‌های واقع در دریاچه لواسان: در کل، ۲۲ سویه سیانوباکتری مختلف متعلق به سه خانواده Nostocaceae، Scytonemataceae و Rivulariaceae و جنس‌های *Nostoc*، *Scytonema* و *Calothrix* گزارش شدند. نتایج سه بار تکرار تکثیر ژن NRPS نشان دادند ۶ سویه متعلق به جنس *Nostoc*، ۱ سویه متعلق به *Calothrix* و سه سویه متعلق به *Scytonema* از ۲۲ سویه این ژن را دارند. شکل ۴ عکس‌های میکروسکوپی ده سویه خالص‌شده را نشان می‌دهد.



شکل ۴- سویه‌های سیانوباکتریایی بومی یافت‌شده در دریاچه لواسان؛ A. *Nostoc* sp. F3. B. *Nostoc* sp. F4. C. *Nostoc* sp. F19. D. *Nostoc* sp. F25. E. *Nostoc* sp. F17. F. *Nostoc* sp. F11. G. *Nostoc* sp. Ft salt. H. *Calothrix* sp. F6. I. *Scytonema* sp. F18. J. *Scytonema* sp. F12

نتایج تعیین غلظت DNA: نتایج تعیین غلظت

DNA از طریق لود کردن روی ژل الکتروفورز (شکل ۱) نشان دادند کیفیت مطلوب DNA استخراج شده کیفیت مناسب باندها را تضمین می‌کند. اندازه‌گیری شدت جذب DNA با استفاده از نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر نشان داد میزان ۲۶۰/۲۸۰ حدود ۱/۸ است که این میزان، خلوص DNA استخراج شده را نشان می‌دهد. میزان ۲۶۰/۲۳۰ برای اندازه‌گیری ثانویه خلوص نوکلئیک‌اسید استفاده شد. ارزش‌های ۲۶۰/۲۳۰ بین ۲/۰ تا ۲/۲ گزارش شد؛ البته اگر این میزان کمتر از حد انتظار بود، حضور آلوده‌کننده‌ها را نشان می‌داد که در ۲۳۰ نانومتر جذب می‌شوند.

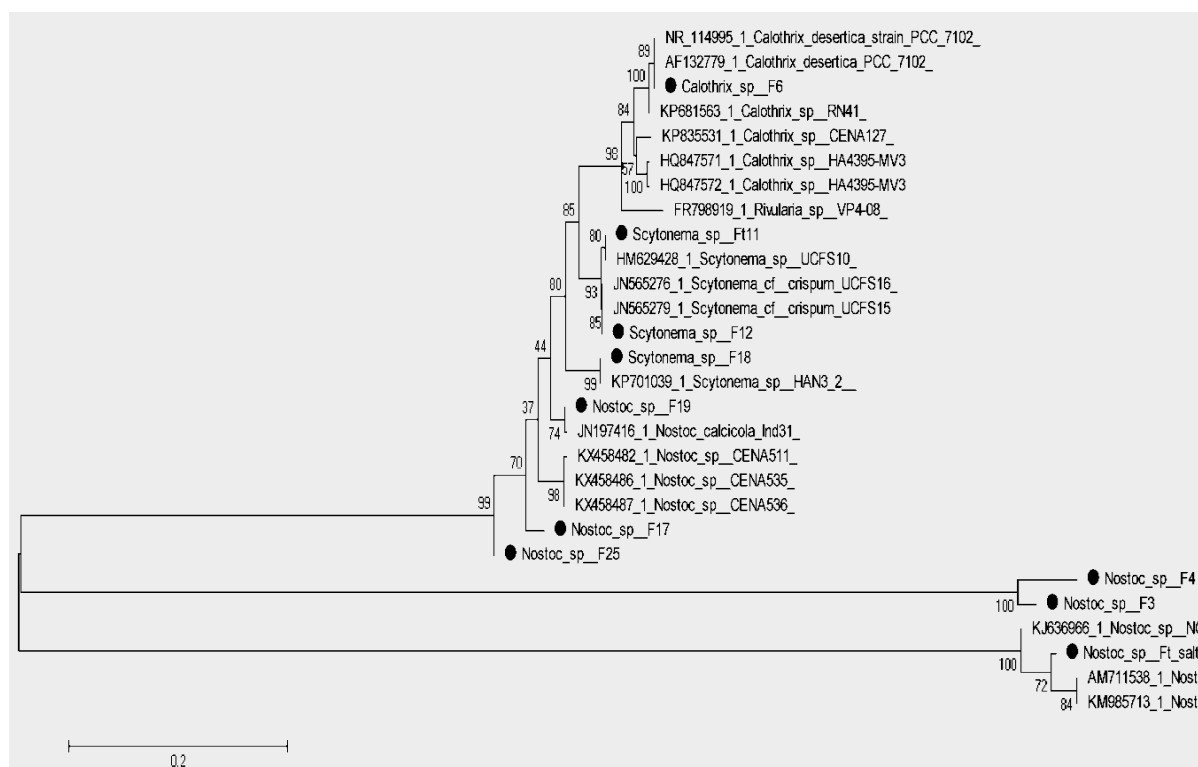
نتایج تکثیر ژن 16S rRNA: مطابق شکل ۲، اندازه

باندها در همه نمونه‌ها با توجه به مارکر (M)، ۱۵۰۰ جفت باز است. همان‌طور که مشخص است، باند حاصل از فراورده PCR کیفیت زیادی دارد و این کیفیت، مترادف‌گیری موفقیت‌آمیز توالی‌ها را تضمین می‌کند.

نتایج تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک ژن 16S

رRNA ده سویه بررسی شده: شکل ۵ درخت فیلوژنتیک بدون ریشه حاصل از برنامه MEGA نسخه ۷ را نشان می‌دهد. پس از هم‌ردیف‌سازی تمام توالی‌های گرفته شده از بانک ژن، درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش Maximum Likelihood، برنامه MEGA نسخه ۷ و مدل Kimura two-parameter ترسیم شد. اعداد کنار هر گره انشعابی نشان‌دهنده فراوانی حاصل از تجزیه و تحلیل Bootstrap برای

۱۰۰۰ تکرارند. با توجه به درخت فیلوژنتیک رسم شده، هر شاخه روابط بین تاکسون‌ها را از نظر نسل یا جد (نیاکان) معین می‌کند. طول شاخه بیان‌کننده میزان تفاوت‌ها نسبت به نیای مشترک است؛ درحقیقت، طول شاخه تعداد تغییرهایی را نشان می‌دهد که در یک شاخه رخ داده‌اند. درخت رسم شده به روش Maximum Likelihood نشان می‌دهد سویه *Calotrix sp. F6* با حمایت زیاد Bootstrap (۱۰۰ درصد) با سویه *Calotrix derestica* خوشه‌بندی می‌شود و در یک کلاذ^{۳۴} قرار می‌گیرد؛ به بیان دیگر، سویه مطالعه شده بیشترین نزدیکی را با سویه *Calotrix derestica* دارد. سویه‌های *Scytonema sp. Ft11* و *Scytonema sp. F12* با حمایت زیاد Bootstrap (۸۵ و ۸۰ درصد در یک کلاذ خوشه‌بندی می‌شوند. سویه *Scytonema sp. F18* با حمایت زیاد Bootstrap (۹۹ درصد) با سویه HAN3- *Scytonema sp. 2* خوشه‌بندی می‌شود و در یک کلاذ قرار می‌گیرد. سویه *Nostoc sp. F19* با حمایت زیاد Bootstrap (۷۴ درصد) با سویه *Nostoc calicida* خوشه‌بندی می‌شود و در یک کلاذ قرار می‌گیرد. سویه‌های *Nostoc sp. F17* و *Nostoc sp. F25* با حمایت زیاد Bootstrap به ترتیب ۷۰ و ۷۴ درصد، کلاذ جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهند که فاصله فیلوژنتیکی بین آنها و سویه‌های دیگر را از نظر تکاملی نشان می‌دهد. مقیاس نشان‌داده شده در شکل ۵، ۰/۲ جهش به ازای هر نوکلئوتید را نشان می‌دهد.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک بدون ریشه حاصل از برنامه MEGA نسخه ۷

آمینواسید پیش‌بینی شده برای ده سویه را نشان می‌دهد؛ علاوه بر این، ساختمان سه‌بعدی توالی‌های به‌دست آمده از ژن NRPS، متعلق به دمین حفاظت‌شده آدنیل‌شده ده سویه بررسی شده با استفاده از سایت جستجوی دمین‌های حفاظت‌شده رسم شد (شکل ۶). شکل ۷ درخت فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از برنامه IQtree server و روش Maximum Likelihood را نشان می‌دهد. پس از هم‌ردیف کردن توالی‌های گرفته‌شده از بانک ژن با BLASTx، درخت فیلوژنتیک رسم شده به کمک برنامه fig tree تصحیح شد. درستی روابط بین تاکسون‌ها با تجزیه و تحلیل Bootstrap انجام شده برای ۱۰۰۰ تکرار تأیید شد. سویه‌های مطالعه‌شده در درخت فیلوژنتیک با حمایت زیاد با سویه‌های هم‌نام خود در یک کلاستر قرار گرفتند که نزدیکی فیلوژنتیک آنها را نشان می‌دهد (جدول ۴).

نتایج تکثیر قطعه یک کیلو جفت بازی ژن

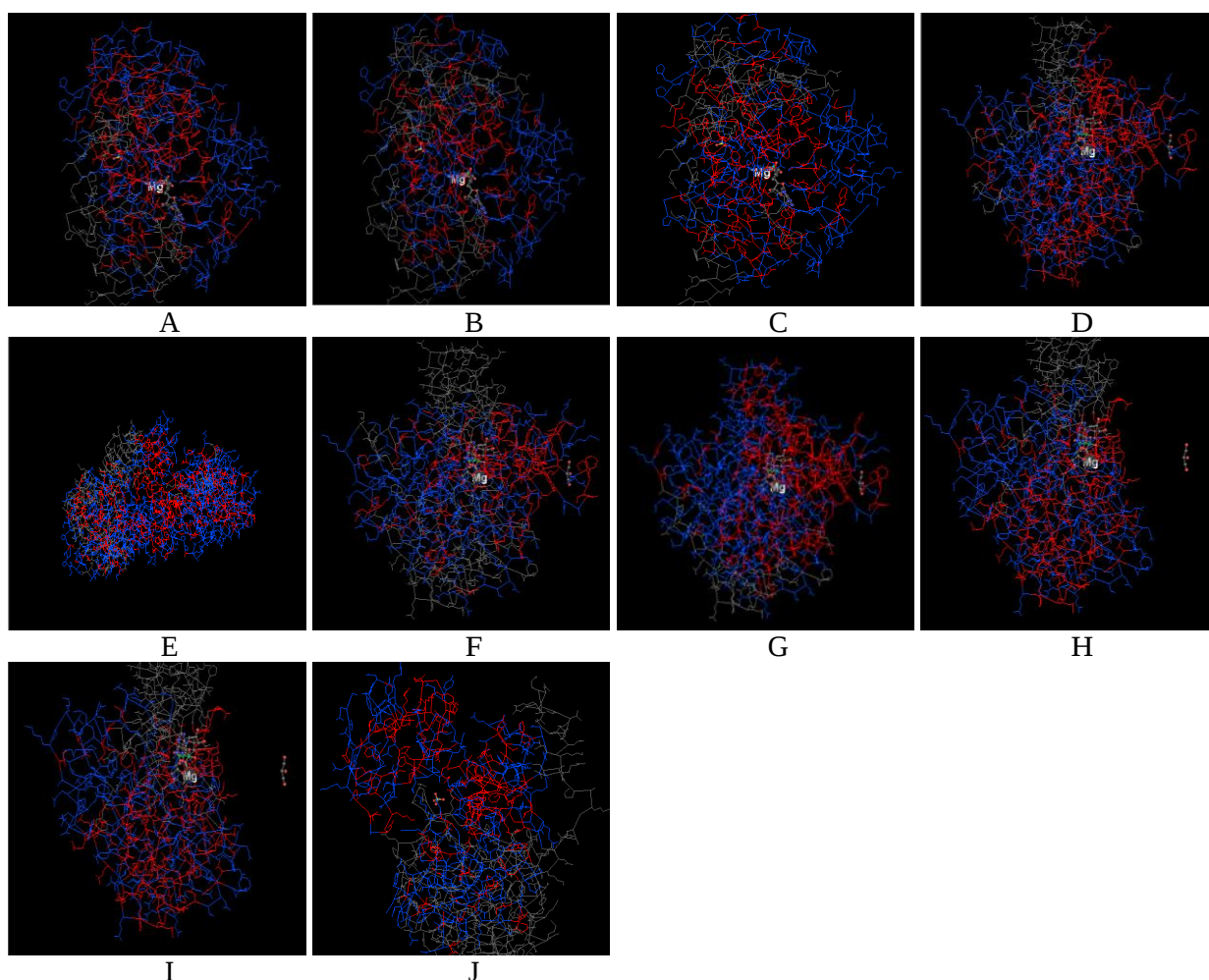
NRPS: تکثیر قطعه تقریباً یک کیلو جفت بازی دمین آدنیل‌شده NRPS از DNA الگوی سویه‌های مطالعه‌شده به‌طور موفقیت‌آمیز انجام شد (شکل ۳). پس از انجام توالی‌یابی، جستجوی BLASTX تأیید کرد توالی‌های به‌دست آمده با دمین‌های آدنیل‌شده سویه‌های دیگر سیانوباکتریایی موجود در بانک ژن مشابهند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنی دمین‌های آدنیل‌شده ژن

NRPS ده سویه سیانوباکتری: تکثیر دمین‌های آدنیل‌شده NRPS از DNA الگوی ده سویه سیانوباکتریایی به‌طور موفقیت‌آمیز انجام شد (شکل ۳). به‌منظور تأیید اینکه فراورده‌های تکثیرشده دمین‌های آدنیل‌شده NRPS هستند، توالی‌یابی انجام شد. قطعه تقریباً یک کیلو جفت بازی دمین آدنیل‌شده NRPS ترادف‌گیری شد. جدول ۳ توالی امضا^{۳۵}، نام ترکیب و

جدول ۳- آمینواسید فعال شده توسط دمین‌های آدنیل‌شده توالی‌های NRPS؛ تجزیه و تحلیل توالی‌های NRPS یافت شده با BLASTx، همراه با کد دسترسی در بانک ژن، شناسایی آمینواسید فعال شده به وسیلهٔ مودول آدنیل‌شده NRPS و نام احتمالی ترکیب تولید شده به همراه توالی امضا دیده می‌شود.

نام سویه	ترکیب	توالی امضا	آمینواسید پیش‌بینی شده
<i>Nostoc</i> sp.F3	tyrocidine synthetas...	D A W T V A G I	TycB-M3-D-/L-Phe/Trp
<i>Nostoc</i> sp.F4	tyrocidine synthetas...	D A W I V A G V	TycB-M3-D-/L-Phe/Trp
<i>Calothrix</i> sp.F6	Microcistin synthetase A	D L F N N A L T	McyA-M2-Gly
<i>Scytonema</i> sp.Ft11	Nostopeptolide synthetase	D V W H I S L I	NosA-M2-Ser
<i>Scytonema</i> sp.F12	Surfactin synthetase B	D L T K I G H V	SrfAB-M2-Asp
<i>Nostoc</i> sp.F17	Nostopeptolide synthetase	D V W H I S L I	NosA-M2-Ser
<i>Scytonema</i> sp.F18	Microcistin synthetase A	D L F N N A L T	McyA-M2-Gly
<i>Nostoc</i> sp.F19	Microcistin synthetase A	X X X N N A L T	McyA-M2-Gly
<i>Nostoc</i> sp.F25	Nostopeptolide synthetase	D V W H I S L I	NosA-M2-Ser
<i>Nostoc</i> sp.Ftsalt	tyrocidine synthetase..	D A W T V A G V	TycB-M3-D-/L-Phe/Trp



شکل ۶- ساختار سه‌بعدی توالی‌های به دست آمده از ژن NRPS، متعلق به دمین حفاظت شده آدنیل‌شده ده سویه بررسی شده: A. *Nostoc* sp. F3، B. *Nostoc* sp. F4، C. *Nostoc* sp. F19، D. *Nostoc* sp. F25، E. *Nostoc* sp. F17، F. *Nostoc* sp. Ft salt، G. *Calothrix* sp. F6، H. *Scytonema* sp. F18، I. *Scytonema* sp. F12، J. *Scytonema* sp. Ft11



شکل ۷- درخت فیلوژنتیک ژن NRPS ده سویه بررسی شده؛ مقیاس نشان داده شده در شکل، ۰/۱ جهش را به ازای هر وضعیت آمینواسید نشان

می دهد.

جدول ۴- نوع ترکیب و آمینواسید پیش‌بینی شده با بیشترین نزدیکی فیلوژنتیک به سویه‌های بررسی شده

نمونه	آمینواسید	ترکیب
WP_096687816_1	Asp	surfactin synthetase B
WP_096589775_1	Asp	surfactin synthetase B
Scytonema_sp_F12	Asp	surfactin synthetase B
WP_073634571_1	Asp	surfactin synthetase B
WP_069068160_1	Gly	Microcistin synthetase A
ASA69432_1	Hty	Anabaenopeptilide synthetase B
ASR75188_1	NO HIT	
WP_069068162_1	Trp	tyrocidine synthet...
Nostoc_sp_F3	Trp	tyrocidine synthet...
WP_094341259_1	Trp	tyrocidine synthet...
WP_073640236_1	Asn	Nostopeptolide synthetase
WP_073640234_1	Trp	tyrocidine synthet...
Nostoc_sp_Ftsalt	Trp	tyrocidine synthet...
Nostoc_sp_F4	Trp	tyrocidine synthet...
WP_041033271_1	Gly	Microcistin synthetase A
Scytonema_sp_F18	Gly	Microcistin synthetase A
WP_096562233_1	Gly	Microcistin synthetase A
Calothrix_sp_F6	Gly	Microcistin synthetase A
WP_096647410_1	Gly	Microcistin synthetase B
WP_073643010_1	Gly	Microcistin synthetase A
WP_096537455_1	Gly	Microcistin synthetase A
ACV53800_1	Gly	Microcistin synthetase A
Nostoc_sp_F19	Gly	Microcistin synthetase A
ACV53799_1	Gly	Microcistin synthetase A
WP_073629400_1	Ser	Phosphitricin synthetase
WP_096549593_1	Ser	Phosphitricin synthetase
WP_063779441_1	Ser	Phosphitricin synthetase
WP_096562230_1	Ser	Phosphitricin synthetase
WP_073629390_1	Ser	Phosphitricin synthetase
WP_015217385_1	Ser	Nostopeptolide synthetase
Scytonema_sp_Ft11	Ser	Nostopeptolide synthetase
WP_073634573_1	Ser	Nostopeptolide synthetase
BAB74347_1	Ser	Nostopeptolide synthetase
WP_015139593_1	Ser	Nostopeptolide synthetase
Nostoc_sp_F25	Ser	Nostopeptolide synthetase
Nostoc_sp_F17	Ser	Nostopeptolide synthetase
WP_066382496_1	Ser	Nostopeptolide synthetase
WP_096681347_1	Ser	Nostopeptolide synthetase
WP_067767842_1	Ser	Pyoverdine synthetase

نتایج ثبت توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های

تکثیر شده: توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی شده ده سویه بر اساس توالی ژن 16S rRNA و NRPS به همراه توالی پروتئینی دمین آدنیل‌ه شده در پایگاه داده‌های DDBJ ثبت شدند (جدول ۵).

نتایج بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی

عصاره‌های متانولی ده سویه بررسی شده: بررسی

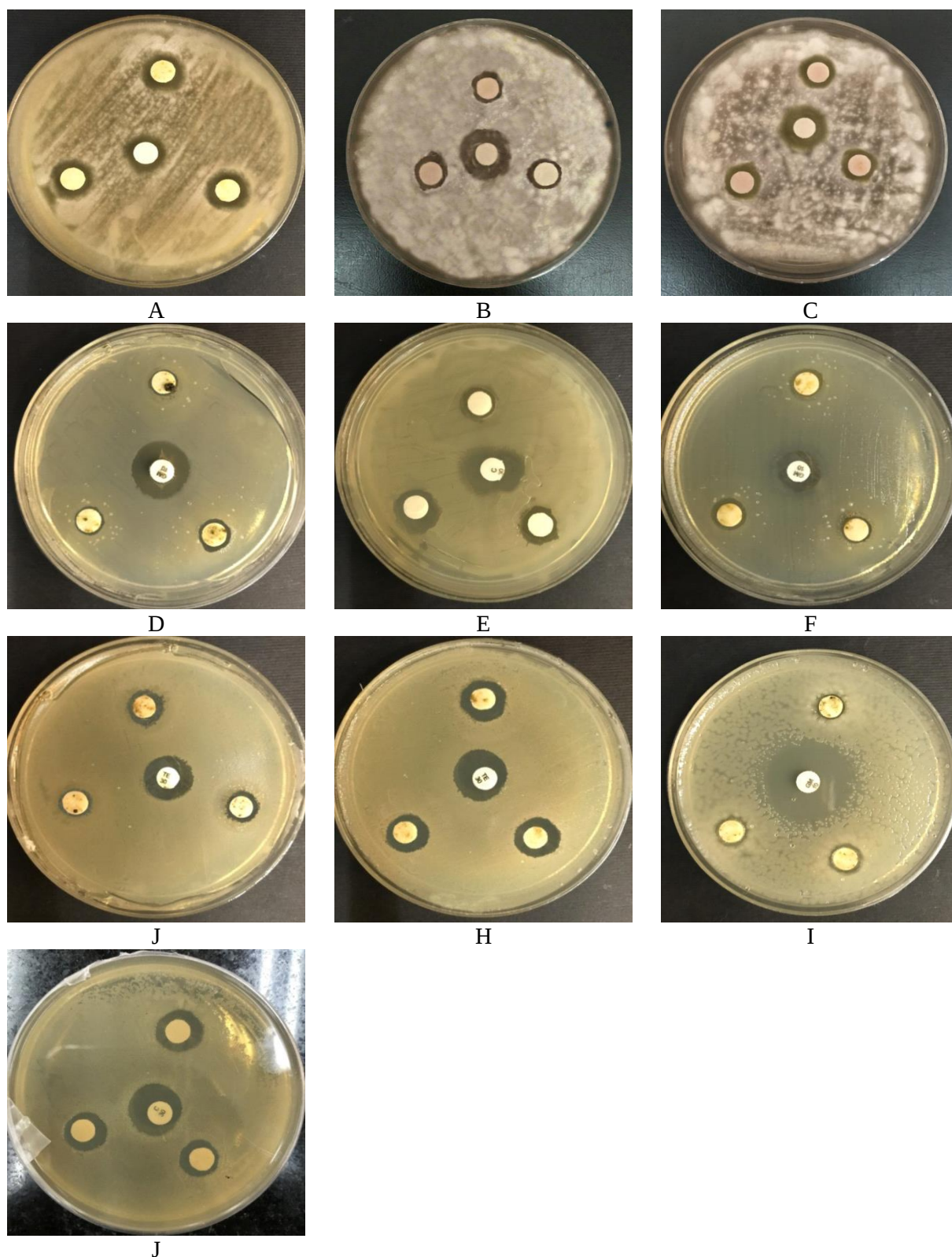
فعالیت ضدقارچی ده سویه بررسی شده نشان داد تنها عصاره‌های *Nostoc* sp. F17، *Scytonema* sp. F18 و *Nostoc* sp. Ft salt فعالیت ضدقارچی دارند (شکل ۸، A-C). قطر منطقه بازدارندگی بر حسب میلی‌متر و به شکل $\text{Means} \pm \text{SE}$ در جدول ۶ نشان داده شده است. بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری (آزمون توکی)، تفاوت معناداری از نظر فعالیت ضدقارچی در

Nostoc معنادار بود ($P < 0.01$) (شکل ۸، I-j). نتایج تجزیه و تحلیل آماری (آزمون توکی) قطر منطقه بازدارندگی حاصل از فعالیت ضدباکتریایی در برابر *Enterobacter* sp. نشان دادند تنها دو سویه *Nostoc* sp.F19 و *Nostoc* sp.F25 خواص ضدباکتریایی دارند؛ در این میان، تفاوت معناداری از نظر فعالیت ضدباکتریایی بین دو سویه *Nostoc* sp.F19، *Nostoc* sp.F25 و استاندارد یافت نشد ($P < 0.01$) (شکل ۸، G-H). نتایج تجزیه و تحلیل آماری (آزمون توکی) قطر منطقه بازدارندگی حاصل از فعالیت ضدباکتریایی در برابر *Bacillus cereus* نشان دادند تنها دو سویه *Nostoc* sp. F3 و *Nostoc* sp. F4 خواص ضدباکتریایی دارند؛ در این میان، تفاوت بین سویه های *Nostoc* sp. F3 و *Nostoc* sp. F4 معناداری بود، اما تفاوت بین *Nostoc* sp. F3 و استاندارد معنادار نبود ($P < 0.01$) (شکل ۸ و جدول ۷).

برابر قارچ *Fusarium* بین *Scytonema* sp. F18 و *Nostoc* F17 و استاندارد وجود ندارد ($P < 0.01$)؛ علاوه بر این، تنها عصاره به دست آمده از گونه *Nostoc* sp. Ft *Aspergillus* تأثیر ضد میکروبی بر قارچ *flavus* نشان داد و عصاره های به دست آمده از سایر گونه ها تأثیر ضد میکروبی بر این قارچ نداشتند. هیچ کدام از عصاره ها تأثیر ضد میکروبی بر مخمر *Candida albicans* نشان ندادند (شکل ۸، D-F). نتایج تجزیه و تحلیل آماری (آزمون توکی) قطر منطقه بازدارندگی حاصل از فعالیت ضدباکتریایی در برابر *Staphylococcus aureus* نشان دادند تنها سه سویه *Nostoc* sp. F17، *Scytonema* sp. F18 و *Nostoc* sp. Ft salt خواص ضدباکتریایی دارند؛ در این میان، تفاوت معناداری از نظر فعالیت ضدباکتریایی بین دو سویه *Nostoc* sp.Ft salt و *Scytonema* sp.F18 مشاهده نشد ($P < 0.01$) و تفاوت بین سویه *Nostoc* sp.F17 با سویه های *Nostoc* sp.Ft salt و *Scytonema* sp.F18

جدول ۵- کدهای دسترسی توالی های نوکلئوتیدی و پروتئینی توالی ژن 16S rRNA و NRPS

توالی پروتئینی (NRPS)	توالی نوکلئوتیدی (NRPS)	توالی نوکلئوتیدی (16S rRNA)	
AUZ99711.1	MG548370.1	MG549314.1	<i>Nostoc</i> sp.F3
AUZ99811.1	MG548371.1	MG549315.1	<i>Nostoc</i> sp.F4
AUZ99707.1	MG548365.1	MG549308.1	<i>Calothrix</i> sp.F6
AUZ99708.1	MG548366.1	MG549309.1	<i>Scytonema</i> sp.Ft11
AUZ99709.1	MG548368.1	MG549312.1	<i>Scytonema</i> sp.F12
AUZ99800.1	MG548367.1	MG549310.1	<i>Nostoc</i> sp.F17
AUZ99713.1	MG548373.1	MG549319.1	<i>Scytonema</i> sp.F18
AUZ99710.1	MG548369.1	MG549313.1	<i>Nostoc</i> sp.F19
AUZ99712.1	MG548372.1	MG549317.1	<i>Nostoc</i> sp.F25
AUZ99714.1	MG548374.1	MG549320.1	<i>Nostoc</i> sp.Ftsalt



شکل ۸- وجود هاله در نمونه‌های (A) *Scytonema* sp.F18 و (B) *Nostoc* sp.F17 در برابر قارچ *Fusarium* sp. و (C) *Nostoc* sp. Ft salt در برابر قارچ *Aspergillus niger*، وجود هاله در نمونه‌های (D) *Nostoc* sp.F17 و (E) *Scytonema* sp.F18 و (F) *Nostoc* sp.F salt در برابر *Staphylococcus aureus*، وجود هاله در نمونه‌های (G) *Nostoc* sp.F19 و (H) *Nostoc* sp.F25 در برابر *Enterobacter* sp.، وجود هاله در نمونه‌های (I) *Nostoc* sp.F3 و (J) *Nostoc* sp.F4 در برابر *Bacillus cereus*

جدول ۶- میزان فعالیت ضدقارچی عصاره‌های *Nostoc* sp.F17، *Scytonema* sp.F18 و *Nostoc* sp.salt در شرایط فتوتروف؛ قطر منطقه بازدارنده بر حسب میلی‌متر و به شکل $\text{Means} \pm \text{SE}$ نشان داده شده است. حرف‌های a و b نشان می‌دهند عصاره‌های بررسی شده تفاوت معناداری از نظر فعالیت ضدقارچی ندارند.

<i>Nostoc</i> sp. F17	<i>Scytonema</i> sp. F18	<i>Nostoc</i> sp. Ft salt	
$0.9 \pm 0.05^{(b)}$	$1.1 \pm 0.05^{(ab)}$	-	<i>Fusarium</i> sp.
-	-	1.23 ± 0.08	<i>Aspergillus niger</i>

جدول ۷- میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های بررسی شده. قطر منطقه بازدارندگی بر حسب میلی‌متر و به شکل $\text{Means} \pm \text{SE}$ نشان داده شده است. حرف‌های a، b و c تفاوت معنادار در فعالیت ضدباکتریایی را نشان می‌دهند؛ به این ترتیب که سویه‌هایی که حرف‌های مشابه دارند، تفاوت معناداری در این زمینه ندارند و سویه‌های که حرف‌های مشابه ندارند، تفاوت معنادار دارند.

<i>Nostoc</i> sp. F3	<i>Nostoc</i> sp. F4	<i>Nostoc</i> sp. F17	<i>Scytonema</i> sp. F18	<i>Nostoc</i> sp. F19	<i>Nostoc</i> sp. F25	<i>Nostoc</i> sp. Ft salt	
-	-	$0.03 \pm 0.83^{(b)}$	$1.03 \pm 0.03^{(c)}$	-	-	$1 \pm 0^{(c)}$	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	-	-	-	$1.3 \pm 0.05^{(a)}$	$1.36 \pm 0.06^{(a)}$	-	<i>Enterobacter</i> sp
$2.23 \pm 0.39^{(a)}$	$0.9 \pm 0.1^{(b)}$	-	-	-	-	-	<i>Bacillus cereus</i>

بحث

فراوانی اکوسیستم‌های طبیعی در ایران، انجام پژوهش‌های علمی در زمینه‌های مختلف را در این مناطق ضروری کرده است. در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری از آب‌های جاری شهر لواسان واقع در دامنه‌های جنوبی کوه‌های البرز انجام و برای افزایش تعداد و رشد سیانوباکترها از محیط BG110 استفاده شد. نخستین بار Stainer و همکارانش در سال ۱۹۷۱ از این محیط برای کشت سیانوباکترها استفاده کردند و از آن به بعد، این محیط کشت به عنوان محیط مغذی برای رشد و جداسازی سیانوباکترها معرفی و به کار گرفته شد (۲۲). در پژوهش حاضر، تعداد ده سیانوباکتر با استفاده از محیط کشت یادشده جدا و خالص شدند و سپس برای جستجوی ژن‌های تولیدکننده ترکیبات آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های NRPS با فعالیت ضد میکروبی غربال‌گری شدند. آثار پزشکی درمانی سیانوباکتری‌ها نخستین بار در اوایل ۱۵۰۰ پیش از میلاد با استفاده از گونه‌های *Nostoc* برای درمان نقرس و انواع مختلف سرطان آشکار شدند و سپس پژوهشگران دانشگاه

Hawaii طی سال‌های دهه ۱۹۹۰، جداسازی سویه‌های سیانوباکتریایی *Microcystis* و *Anabaena* را با هدف کشف فعالیت‌های زیستی گوناگون آغاز کردند؛ پس از آن، تقریباً ۴۰۰۰ سویه سیانوباکتری دریایی و آب شیرین طی پژوهش Leflaive و Ten-Hage در سال ۲۰۰۷ جدا شدند؛ نتایج این پژوهش (۶ درصد فعالیت ضدسرطانی و ضدتکثیرشوندگی) سیانوباکتری‌ها را منابع غنی از فراورده‌های طبیعی مفید معرفی کردند (۵۲-۵۷). سال‌ها بعد، چندین آزمایش دیگر با هدف شناسایی ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد ویروسی (AIDS)، ضدسرطانی، فعالیت ضد مالاریایی، فعالیت بازدارندگی پروتئازی، فعالیت سیتوتوکسیک، فعالیت ضد پروتوزوای و فعالیت‌های دیگر انجام شدند؛ در حقیقت، جستجوی سیانوباکتری‌ها به عنوان منابع جدید آنتی‌بیوتیک‌ها، افق تازه‌ای را برای کشف داروهای جدید گشوده است (۵۸-۶۵). ترکیب‌های فعال زیستی در سیانوباکتری‌ها محدوده وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد ویروسی و

سیتوتوکسیک و گاهی فعالیت بازدارندگی پروتئاز را دارند (۶۶-۷۰). بررسی‌های مختلفی در زمینه آثار ضد میکروبی عصاره‌های *Nostoc* (۷۱)، *Phormidium* (۷۲)، *Pseudoanabaena*، *Oscillatoria*، *Anabaena* و *Synechocystis* (۷۳-۷۵)، *Oscillatoria* *anguistissima* و *Calothrix parietina* (۷۶) روی موجودات مختلف بیماری‌زا و در زمینه آثار ضدباکتریایی عصاره‌های *Spirulina*، *Fischerella* sp.، *Nostoc* sp.، *Anabaena variabilis*، *platensis*، *Nostoc*، *Anabaena*، *Oscillatoria*، *CCC537*، *Synechococcus*، *Synechocystis* و دیگر گونه‌های متعلق به راسته‌های *Chroococcales*، *Pleurocapsales*، *Oscillatoriales*، *Nostocales* و *Stigonematales* انجام شده‌اند (۷۷-۸۷).

فعالیت ضد میکروبی ترکیب‌های سیانوباکتریایی راسته کروکوکال‌ها^{۳۶} (برای نمونه، *Synechocystis* و *Synechococcus*) کمتر بررسی شده است. Martins و همکاران در سال ۲۰۰۸، پتانسیل این جنس‌ها را به عنوان منابع درخور توجهی از ترکیب‌های آنتی‌بیوتیکی با آثار بازدارندگی روی سلول‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک اثبات کردند (۷۵). ترکیب‌های فعال زیستی‌ای که تاکنون شناسایی شده‌اند ساختمان‌های متنوعی از جمله اسیدهای چرب، فنولیک‌ها، بروموفنول‌ها، ترپنوئیدها، N- گلوکوزیدها، دپسی‌پتیدهای^{۳۷} حلقوی، لیپوپتیدها، پپتیدهای حلقوی و آلکالوئیدهای ایندولی‌اند. بسیاری از ترکیب‌های فعال زیستی شناسایی شده در گونه‌های نوستوک به رده‌های شیمیایی پپتیدهای سیکلیک و آلکالوئیدها تعلق دارند (۸۸ و ۸۹). نتایج بررسی حاضر نشان دادند عصاره‌های جلبکی برخی از سویه‌ها خواص ضد میکروبی درخور توجهی در برابر باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های

گرم منفی و قارچ‌ها نشان می‌دهند (شکل ۸ و جدول‌های ۶ و ۷). تنوع فعالیت‌های ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره‌های ده سویه ممکن است به علت تفاوت در نفوذپذیری ترکیب‌های فعال زیستی درون سیانوباکتری آزمایش شده و همچنین تفاوت در واکنش‌پذیری سویه‌های مختلف قارچی و باکتریایی در برابر ترکیب‌های فعال زیستی موجود در عصاره جلبکی باشد (۹۰). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند قطر مناطق بازدارندگی عصاره‌های حاصل با یکدیگر متفاوت است و این تنوع متابولیت‌های ثانویه را نشان می‌دهد. تولید ترکیب‌های فعال زیستی و فعالیت ضد میکروبی به عوامل فیزیولوژیکی مختلف مانند حضور ترکیب‌های آلی، مراحل رشد و شرایط کشت وابسته است؛ شرایط محیطی مختلف ممکن است موجب بیان متفاوت فعالیت‌های زیستی شود (۹۱). پژوهش‌های Radhakrishnan و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند در تیمار گونه‌ای از *Anabaena* sp.، قطر منطقه بازدارندگی در دمای 40 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۴۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه حداکثر است؛ درحالی‌که در *Synechococcus* sp. هیچ فعالیتی در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده نمی‌شود (۹۲). پژوهش مشابهی در زمینه ارزیابی فعالیت قارچی، قطر منطقه بازدارندگی را محدوده‌ای از ۶ تا ۱۴ میلی‌متر نشان داد (۹۳)؛ همچنین نتایج پژوهش حاضر هاله عدم‌رشد را در مقابل باکتری‌ها و قارچ‌های آزمایش شده نشان دادند. در مقاله Zarrini و همکاران (۲۰۱۱)، برخی سیانوباکترها مانند *Anabaena* sp.، *Nodularia* sp. و *Leptolyngbya* sp. به عنوان یکی از منابع تولید ترکیبات ضد میکروبی مطرح شده‌اند و نتایج نشان داده‌اند سیانوباکترها ترکیبات مؤثری را علیه باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌های مخمری تولید

می‌کنند (۹۴). نتایج آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام و تکثیر ژن NRPS در ده سویه سیانوباکتر مطالعه‌شده، ارتباط بین حضور ژن تولیدکننده فراورده‌های طبیعی NRPS با سنتز فراورده‌های طبیعی (ویژگی‌های ضد میکروبی) را اثبات کردند. بررسی‌های وسیع پژوهشگران دیگر نشان دادند ظاهراً سویه‌های هتروسیست‌دار بیشترین احتمال حضور فراورده‌های طبیعی فعال از نظر بیوشیمیایی را دارند. متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتری‌ها از طریق کمپلکس‌های چند آنزیمی بزرگ متشکل از مودول‌های NRPS مسئول اضافه کردن یک آمینواسید در مراحل طولی سازی زنجیره پتیدی تشکیل می‌شوند (۹۵ و ۹۶). پژوهشگران بسیاری به جستجوی ژن NRPS در سیانوباکتری‌ها پرداخته‌اند (۹۷-۱۰۸). در بررسی حاضر به تکثیر ژن NRPS با استفاده از آغازگرهای دجنریت در ده سویه سیانوباکتر رودخانه لواسان پرداخته شد. سویه‌های مطالعه‌شده در درخت فیلوژنتیک با حمایت زیاد همراه با سویه‌های هم‌نام خود در یک کلاستر قرار گرفتند و این نزدیکی فیلوژنتیک آنها را نشان می‌دهد (شکل ۷). خوشه‌بندی دمین‌های NRPS فقدان وابستگی‌های تاکسونومیک بین دمین‌های آدنیل‌شده جنس‌ها و سویه‌های سیانوباکتریایی را نشان می‌دهد؛ برای نمونه، نمونه‌های اندکی روابط نزدیک بین وضعیت تاکسونومیک و ترکیب پیش‌بینی شده دارند؛ به این معنا که نوع ترکیب خاص تولیدشده نمی‌تواند نوع جنس را نشان دهد (شکل ۷). درخت فیلوژنتیک رسم‌شده با توالی دمین آدنیل‌شده ده سویه همراه با دیگر توالی‌های آمینواسیدها، تفاوت بین نوع جنس و نوع ترکیب رمزگذاری‌کننده را نشان می‌دهد؛ برای نمونه، ترکیب Phosphitricin synthetase و آمینواسید سرین که توسط دمین آدنیل‌شده یک سویه تولید می‌شوند، به یک جنس معین اختصاص ندارند و ممکن

است در جنس‌های دیگر سیانوباکتری نیز یافت شود. خوشه‌بندی می‌تواند بر اساس خصوصیت پیوند با پیش‌ماده آمینواسیدی (آمینواسید فعال‌شده) نیز انجام شود (جدول ۴). در میان جنس‌های یافت‌شده با BLASTx، آمینواسیدهای گلايسين، هوموتیروزین، تریتوفان، اسپارژین و سرین به‌عنوان پیش‌ماده آمینواسیدی برای پیوند با دمین آدنیل‌شده پتیدسنتازهای غیرریبوزومی شناخته شده‌اند (شکل ۷ و جدول ۴).

اگرچه نتایج کلی بررسی ژنوم رمزگذاری‌کننده فراورده‌های طبیعی ده سویه سیانوباکتر دریاچه لواسان حضور ژن‌های NRPS را آشکار کرد، فعالیت بیوشیمیایی مرتبط با فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی در همه سویه‌ها یافت نشد؛ همچنین نتایج پژوهش Ehrenreich و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند دو سویه *Cyanothece* sp. و *Lyngbya* sp. PCC7419 و WH8904 باوجود فعالیت درخور توجه زیستی، ژن‌های رمزگذاری‌کننده فراورده‌های طبیعی را ندارند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند سیستم‌هایی غیر از ژن‌های NRPS و PKS فعالیت‌های زیستی مشاهده‌شده را کنترل می‌کنند (۴۳).

نتیجه‌گیری

تأیید نهایی روابط بین حضور ژن NRPS و فعالیت‌های زیستی به آزمایش‌های بیان ژن نیاز دارد تا ارتباط بین فعالیت‌های بیوشیمیایی با این ژن‌های ویژه و همچنین سیستم پیام‌رسانی مؤثر بر بیان این ژن‌ها شناخته شوند (۱۰۹)؛ درحقیقت، خلاقیت و استفاده از روش‌های مختلف موجب تکامل روش‌های جدید برای به‌دست آوردن حداکثر بهره‌بری از ترکیب‌های فعال زیستی می‌شود. گفتنی است اگرچه در گذشته، بررسی‌ها

- 894-901.
- (8) Wiegand C., Pflugmacher S. Ecotoxicological affects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 203: 201-218.
 - (9) Bhadury P., Wright PC. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta* 2004; 219: 561-578.
 - (10) Shimizu Y. Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6: 236-243.
 - (11) Burja AM., Banaigs B., Abou-Mansour E., Grant Burgess J., Wright PC. Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 2001; 46: 9347-9377.
 - (12) Tan LK., Chang YY., Ashootosh T. Besarhanamides A and B from the marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry* 2008; 69: 2067-2069.
 - (13) Gademann K., Portmann C. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Current Organic Chemistry* 2008; 12: 326-341.
 - (14) Smith FMJ., Wood SA., Ginkel RV., Broady PA., Gaw S. First report of saxitoxin production by a species of the freshwater benthic cyanobacterium, *Scytonema Agardh* Francine. *Toxicon* 2011; 57: 566-573.
 - (15) Dahms HU., Xu Y., Pfeiffer C. Antifouling potential of cyanobacteria: a minireview. *Biofouling* 2006; 22: 317-327.
 - (16) Liwei L., Jouni J., Nowruzi B., Fewer D., Wahlsten M., Sivonen K. Nostoginosins: trypsin inhibitors from *Nostoc* sp. strain FSN. *Journal of Natural Products* 2015; 77: 1784-1790.
 - (17) Nowruzi B., Haghighat S., Fahimi H., Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research* 2018; 9: 5-12.

و پژوهش‌های بسیاری در زمینه جستجوی اثر بازدارندگی ترکیب‌های ضد میکروبی انجام شده‌اند، در مراجع هیچ اطلاعاتی درباره فعالیت ضد میکروبی و ارتباط آن با ژن‌های NRPS در دریاچه لواسان در دسترس نیست و پژوهش حاضر جزو نخستین بررسی‌های انجام شده در این زمینه در ایران است.

References

- (1) Nowruzi B., Khavari-Nejad RA., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstari T. Identification and toxigenic potential of a *NOSTOC* sp. *Algae* 2012; 27(4): 303-313.
- (2) Nowruzi B., Khavari-Nejad RA., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstari T. Identification and toxigenic potential of a Cyanobacterial strain (*Anabaena* sp.). *Progress in Biological Sciences* 2013; 3: 79-85.
- (3) Sivonen K., Börner T. Bioactive compounds produced by Cyanobacteria. In: Herrero A., Flores E. editors. *The Cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Norfolk: Caister Academic Press; 2008: 159-197.
- (4) Whitton BA., Potts M. Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton BA., Potts M. editoes. *The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000: 1-11.
- (5) Newman DJ., Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 461-477.
- (6) Quinn RJ., Taylor C., Suganuma M., Fujiki H. The conserved acid binding domain model of inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: molecular modelling aspects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1993; 3: 1029-1034.
- (7) Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2008; 13:

- (18) Nowruzi B., Fahimi H., Ordodari N., Assareh R. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthase genes of cyanobacteria as a mining tool for new pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical and Health Sciences* 2017; 5(2): 139-150.
- (19) Marahiel MA., Stachelha T., Mootz HD. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* 1997; 97(7): 2651-2674.
- (20) Neuendettelsau A. Substrate specificity prediction of enzymes and its applications to nonribosomal peptide synthetases [Dissertation]. Eberhard Karls University of Tübingen, verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; 2007.
- (21) Rastogi RP., Sinha RP. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2009; 27: 521-539.
- (22) Stanier RY., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 1971; 35: 171-205.
- (23) Kaushik BD. Laboratory methods for blue-green algae. New Delhi: Associated Publishing CO; 1987: 17-63.
- (24) Ferris MJ., Hirsch CF. Method for isolation and purification of Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57: 1448-1452.
- (25) Lobban CS., Chapman DJ., Kremer BP. Experimental phycology: A laboratory manual. Cambridge: Cambridge University Press; 1988.
- (26) Acreman J. Algae and Cyanobacteria: isolation, culture and long-term Maintenance. *The Journal of Industrial Microbiology* 1994; 13: 193-194.
- (27) Vazquez-Martinez G., Rodriguez MH., Hernández-Hernández F., Ibarra JE. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. *Journal of Microbiological Methods* 2004; 57: 115-121.
- (28) Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 1998; 167: 3-27.
- (29) Sarchizian I., Ardelean I. Axenic culture of a diazotrophic filamentous *Cyanobacterium* isolated from mesothermal sulphurous springs (obanul mare-mangalia). *Plant Biology* 2010; 55: 47-53.
- (30) Berg K. Heterotrophic bacteria associated with Cyanobacteria in recreational and drinking water [Dissertation]. Helsinki: University of Helsinki; 2007.
- (31) Anand N. Hand book of blue-green algae of rice fields of South India. Deharadun: Bishen Singh Mahendra Pal singh; 1989.
- (32) Prescott GW. Algae of western Great Lakes area. Dubuque: Iowa William C. Brown Company Publishers; 1962.
- (33) Desikachary TV. Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research; 1959.
- (34) Anagnostidis K., Komarek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. *Archiv fur Hydrobiologie. Supplementband: Algological Studies* 1999; 50: 248-317.
- (35) Santra SC. Biology of Rice fields blue green algae. New Delhi: Daya publishing House; 1993.
- (36) Sahin B. Algal flora of lakes Aygır and Balıklı (Trabzon, Turkey). *Turkish Journal of Botany* 2000; 24: 35-45.
- (37) Stanier RY., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 1971; 35: 171-205.
- (38) Rippka RJ., Deruelles JB., Waterbury M., Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 1979; 111: 1-61.

- (39) Watanabe M., Yamagishi T. *Fresh water algae of Papua New Guinea blue-green algae from MT-Wilhelm*. Tokyo: Academia Scientific Book Inc.; 1979.
- (40) Bessey CE., Saunders D., Woods AF. Flora of Nebraska: Introduction; Part I. Protophyta-Phycophyta; Part II. Coleochaetaceae, Characeae. *University of Nebraska-Lincoln* 1894; 8-15.
- (41) Neilan BA., Jacob SD., Dot TD., Blackall L., Hawkins PR., Cox PT., Goodman AE. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic Cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; 47: 693-697.
- (42) Lepere C., Wilmotte A., Meyer B. Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants* 2000; 70: 275-283.
- (43) Ehrenreich IM., Waterbury JB., Webb EA. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 11: 7401-7413.
- (44) Challis GL., Ravel J., Townsend CA. Predictive, structurebased model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemical biology* 2000; 7: 211-224.
- (45) Ansari MZ., Yadav G., Gokhale RS., Mohanty D. NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic Acids Research* 2004; 32: 405-413.
- (46) Thompson JD., Higgins DG., Gibson TL. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994; 11: 4673-4680.
- (47) Hall T. BioEdit. Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, 92008, USA. 2004.
- (48) Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 8: 1596-1599.
- (49) Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 2004; 32(5): 1792-1797.
- (50) Espinel-Ingroff A. Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter* 2007; 29: 97-100.
- (51) Kaushik P., Chauhan A. Cyanobacteria: Antibacterial Activity. *Current Science* 2009; 97: 1378-1379.
- (52) Leflaive J., Ten-Hage L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 2007; 52: 199-214.
- (53) Cannell RJP., Owsianka AM., Walker JM. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *European Journal of Phycology* 1988; 23: 41-44.
- (54) Caicedo NH., Heyduck-Söller B., Fischer U., Thöming J. Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. *Journal of Applied Phycology* 2011; 23: 811-818.
- (55) Tuyet LTA. Chemical and biological investigations of vietnamese Cyanobacteria. Thanh Hoa: Universität Greifswald; 2010.
- (56) Madhumathi V., Deepa P., Jeyachandran S., Manoharan C., Vijayakumar S. Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake. *International Journal of Microbiology Research* 2011; 2: 213-216.
- (57) Prasanna R., Sood S., Jaiswal P., Nayak S., Gupta V., Chaudhary V., Joshi M., Natarajan C. Rediscovering Cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 2010; 46: 119-134.
- (58) Khairy HM., El-Kassas HY. Active

- substance from some blue green algal species used as antimicrobial agents. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9: 2789-2800.
- (59) Kim JD. Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 2006; 34: 138-142.
- (60) Thillairajasekar K., Duraipandian V., Perumal P., Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of *Trichodesmium erthraeum* (Her) (microalga) from south east coast of Tamil Nadu, India. *International Journal of Integrative Biology* 2009; 5: 167-170.
- (61) Clardy J., Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature* 2004; 432: 829-837.
- (62) El-Sheekh M., Dawah AM., El-Rahman AM., El-Adel HM., El-Hay A. Antimicrobial activity of the Cyanobacteria *Anabaena wisconsinense* and *Oscillatoria curviceps* against pathogens of fish in aquaculture. *Annals of Microbiology* 2008; 3: 527-534.
- (63) Cano MMS., Mule MCZ., Caire GZ., Haiperin DR. Inhibition of candida albicans and staphylococcus aureus by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc mascorum*. *Journal of Applied Phycology* 1990; 2: 79-81.
- (64) Kaushik P., Chauhan P., Chauhan G., Goyal P. Evaluation of *Nostoc commune* for potential antibacterial activity and UV-HPLC analysis of methanol extract. *The Internet Journal of Microbiology* 2008; 5: 1-5.
- (65) Kumar RS., Thajuddin N., Venkateswari C. Antibacterial activity of cyanolichen and symbiotic cyanobacteria against some selected microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4: 1408-1411.
- (66) Biondi N., Piccardi R., Margheri MC., Rodolfi L., Smith GD., Tredici MR. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70: 3313-3320.
- (67) Juttner F., Todorova AK., Walch N., philipsborn WV. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. *Phytochemistry* 2001; 57: 613-619.
- (68) Portmann B., Gademann KC. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Current Organic Chemistry* 2008; 12: 326-341.
- (69) Aleksandra V., Drobac T., Dejan B., Stojanovic Z. The importance of extremophile cyanobacteria in the production of biologically active compounds. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke* 2007; 112: 57-66.
- (70) Richard JPC., Owsianka AM., Walker JM. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *European Journal of Phycology* 1988; 23: 41-44.
- (71) Asthana RK Deepali., Tripathi MK Srivastava A., Singh AS., Singh SP., Nath G., Srivastava R., et al. Isolation and identification of a new antibacterial entity from the Antarctic cyanobacterium *Nostoc* CCC 537. *Journal of Applied Phycology* 2009; 21: 81-88.
- (72) Fish SA., Codd GA. Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant Cyanobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1994; 10: 338-341.
- (73) Kreitlow S., Mundt S., Lindequist U. Cyanobacteria- a potential source of new biologically active substances. *J-Biotech* 1999; 70: 61-63.
- (74) Abdel-Raouf N., Ibraheem IBM., Abdel-Tawab S., Naser YAG. Antimicrobial and antihyperlipidemic activities of isolated quercetin from *Anabaena aequalis*. *Journal of Phycology* 2011; 47: 955-962.
- (75) Martins RF., Ramos MF., Herfindal L., Sousa J., Skarven K., Vasconcelos VM. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine Cyanobacteria- *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs* 2008; 6: 1-11.

- (76) Issa AA. Antibiotic production by the Cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1999; 8: 33-37.
- (77) Subramaniam A., Carpenter E. Bio-optical properties of the marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. I. Absorption and photosynthetic action spectra. *Limnology and Oceanography* 1999; 3: 608-617.
- (78) Beattie KA., Kaya K., Sano T., Codd GA. Three dehydrobutyrine containing microcystins from *Nostoc*. *Pergamon Phytochemistry* 1998; 7: 1282-1292.
- (79) Asthana RK., Srivastava A., Singh P., Deepali A., Singh SS., Nath G., et al. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. *Journal of Applied Phycology* 2006; 18: 33-39.
- (80) Singh RK., Upadhyay S., Tiwari SP., Rai AK., Mohapatra TM. Screening of cyanobacterial extracts against bacteria causing nosocomial infections. *Journal of Pharmacy Research* 2010; 3: 2096-2098.
- (81) Agger SA., Gallego L., Hoye TR., Schmidt-Dannert C. Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* 2008; 13: 6084-6096.
- (82) Bajpai R., Sharma NK., Lawto LA., Edwards C., Rai A. Microcystin producing cyanobacterium *Nostoc* sp. BHU001 from a pond in India. *Toxicon* 1999; 53: 587-590.
- (83) Sabarinathan KG., Ganesan G. Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycocyanin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium *Westiellopsis* spp. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2008; 12: 79-82.
- (84) Ozdemir G., Karabay NU., Dalay MC., Pazarbasi, B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research* 2004; 18: 754-757.
- (85) Mundt S., Kreitlow S., Jansen R. Fattyacids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology* 2003; 15(2): 263-267.
- (86) Chang EH., Yang SS. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei* 2002; 44: 43-52.
- (87) Sethubathi GVB., Prabu VA. Antibacterial activity of cyanobacterial species from Adirampattinam Coast, Southeast Coast of Palk Bay current research. *Journal of Biological Sciences* 2010; 2: 24-26.
- (88) Dembitsky VM., Řezanka T. Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. *Folia Microbiologica* 2005; 5: 363-391.
- (89) Řezanka T., Dembitsky VM. Metabolites produced by cyanobacteria belonging to several species of the family nostocaceae. *Folia Microbiologica* 2006; 3: 159-182.
- (90) Ordog V., Stirk WA., Lenobel R., Bancrova M., Strnad M., Staden JV., et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology* 2004; 16: 309-314.
- (91) Pawar ST., Puranik PR. Screening of terrestrial and freshwater halotolerant cyanobacteria for antifungal activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24: 1019-1025.
- (92) Radhakrishnan B., Prasanna R., Jaiswal P., Nayak S., Dureja P. Modulation of biocidal activity of *Calothrix* sp. and *Anabaena* sp. by environmental factors. *Biologia* 2009; 64: 881-889.
- (93) Chetsumon A., Fujied F., Hirata K., Kiyohito Y., Miura Y. Optimization of antibiotic production by the cyanobacterium *Scytonema* sp. TISTR 8208 immobilized on polyurethane foam. *Journal of Applied Phycology* 1993; 5(6): 615-622.

- (94) Zarrini G., Rasooli I., Abazari M., Ghasemi Y. Investigation of antimicrobial activity of Cyanobacteria isolated from Urmia lake Catchment area. *Journal of Ardebil University of Medical Science* 2011; 11(4): 329-36.
- (95) Maschek JA., Baker BJ. The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler CD. editor. *Algal Chemical Ecology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008: 1-24.
- (96) Jones AC., Monroe EA., Eisman EB., Gerwick L., Sherman DH., Gerwick WH. The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. *Natural Product Reports* 2010; 27: 1048-1065.
- (97) Neilan BA., Dittmann E., Rouhiainen L., Bass RA., Schaub V., Sivonen K., et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 1999; 13: 4089-4097.
- (98) Lerena MEB., Burja AM., Wright C. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2007; 34: 443-456.
- (99) Moffitt MC., Neilan BA. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiology Letters* 2001; 196: 207-214.
- (100) Christiansen G., Dittmann E., Ordorika LV., Rippka R., Herdman M., Börner T. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. *Archives of Microbiology* 2001; 176: 452-458.
- (101) Burns BP., Seifert F., Goh F., Pomati AD., Jungblut A., Neilan A. Genetic potential for secondary metabolite production in stromatolite communities. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 243(1): 293-301.
- (102) Genuario DB., Silva-Stenico ME., Welker M., Moraes LAB., Fiore MF. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. *Toxicon* 2010; 55: 846-854.
- (103) Zhao J., Yang N., Zeng R. Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. *Extremophiles* 2008; 12: 97-105.
- (104) Becker JE. Biosynthesis of cyclic peptides and depsipeptides in *Nostoc* Sp. ATCC 53789 [Dissertation]. Manoa: University of Hawaii; 2002.
- (105) Silva-Stenico ME., Silva CSP., Lorenzi AS., Shishido TK., Etchegaray A., Lira SP., et al. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research* 2011; 166: 161-175.
- (106) Rounge TB., Rohrlack T., Nederbragt AJ., Kristensen T., Jakobsen KS. A genome-wide analysis of nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrix rubescens* strain. *BMC Genomics* 2009; 10: 1-11.
- (107) Minowa Y., Araki M., Kanehisa M. Comprehensive analysis of distinctive polyketide and nonribosomal peptide structural motifs encoded in microbial genomes. *Journal of Molecular Biology* 2007; 368: 1500-1517.
- (108) Becker JE., Moore RF., Moore BS. Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization *Gene* 2004; 325: 35-42.
- (109) Cane DE., Walsh CT. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology* 1999; 6: 319-325.

¹ Natural product² Taxon³ Non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs)⁴ Residue⁵ Adenylation⁶ Condensation⁷ Thiolation

- ⁸ Downstream
- ⁹ Peptidyl carrier protein
- ¹⁰ Thioesterase
- ¹¹ Termination
- ¹² Stock media culture
- ¹³ Nostocales
- ¹⁴ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- ¹⁵ Axenic
- ¹⁶ Incubation
- ¹⁷ cetyl trimethylammonium bromide
- ¹⁸ Denaturation step
- ¹⁹ Annealing step
- ²⁰ Extension
- ²¹ Elongation step
- ²² Final hold
- ²³ Degenerate primers
- ²⁴ Blast N
- ²⁵ *Accession number*
- ²⁶ DNA Data Bank of Japan
- ²⁷ The *disk diffusion* method
- ²⁸ Mueller-Hinton agar
- ²⁹ Inhibition zone
- ³⁰ Nutrient broth
- ³¹ Sabouraud Dextrose Agar
- ³² Sabouraud's dextrose Broth
- ³³ McFarland
- ³⁴ واحد سیستماتیک تک‌نیایی است و گروهی از Clade
تاکسون‌ها را نشان می‌دهد که یک نیای مشترک دارند.
- ³⁵ Signature Sequence
- ³⁶ Chroococales
- ³⁷ Depsipeptides