Archive of SID

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

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

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

چکیده

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

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

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

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

واژه‌های کلیدی: متابولیت‌های ثانویه، ضدمیکروبی، سیانوباکتری‌ها، عصاره متانولی، براث میکرودیلوشن

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیانوباکتری‌ها[۱] قدیمی‌ترین پروکاریوت‌های فتوسنتزکننده روی زمین هستند (۱). این میکروارگانیسم‌ها به‌طور گسترده در خاک‌های طبیعی، آب‌های شیرین و زیستگاه‌های دریایی توزیع شده‌اند و دارای تنوع ریخت شناسی قابل ملاحظه‌ای هستند (۲). تاریخچه تکاملی طولانی این میکروارگانیسم‌ها به شکل در خور توجهی گواهی بر موفقیت سیانوباکتری‌ها برای زنده ماندن در زیستگاه‌های متعدد و قدرت تحمل اکولوژیکی بالای آنهاست (۳). علاوه بر این، سیانوباکتری‌ها با قدرت تحمل اکولوژیکی بالا با دما، نور، شوری، رطوبت و شرایط قلیایی توسعه یافته‌اند و دارای بسیاری از ویژگی‌ها و سازگاری‌ها هستند که توزیع گسترده و موفقیت آن‌ها در بقا را توضیح می‌دهد (۴). اصطلاح "متابولیسم سیال یا لغزنده"، کوتاه ترین و در عین حال گویاترین توجیهی است که برای این گستردگی به کار می‌رود. نوعی انعطاف‌پذیری متابولیک که شاید منحصر به فرد باشد و تنها در مورد زیستگاه‌ها صدق نمی‌کند (۵). هنوز مکانیسم خوگیری و سازگاری‌های خاص سیانوباکتری‌ها به شرایط محیطی و سیالیت‌هایی که برای مثال در تغییر آرایش سیستم‌های فتوسنتزی و رنگیزه‌های این موجودات در مواجهه با تغییرات سریع شرایط محیطی به وقوع می‌پیوندد، برای صاحبنظران روشن نیست. طبقه‌بندی تاکسونومیک سیانوباکتری‌ها بسیار پیچیده است. سیانوباکتری‌ها در گذشته تنها براساس صفات ریخت‌شناسی و بر طبق کدهای بین المللی نام‌گذاری گیاهی[۲] طبقه‌بندی می‌شدند. این طبقه‌بندی که تنها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی است، با وجود این واقعیت که ریخت‌شناسی سیانوباکتری‌ها در مقایسه با بسیاری از میکروب‌های پروکاریوتی پیچیده است و صفات ریخت‌شناسی در پاسخ به شرایط زیست محیطی مختلف تغییر پذیرند، لزوما نمی‌تواند یک طبقه‌بندی فیلوژنتیکی معتبر باشد (۶). از سوی دیگر سیانوباکتری‌ها براساس کدهای بین‌المللی نام‌گذاری پروکاریوتی[۳] نیز طبقه‌بندی شده‌اند. امروزه این طبقه‌بندی براساس روش‌های مولکولی و ویژگی‌های فنوتیپی، شموتیپی و ژنوتیپی یک کشت خالص از سیانوباکتری‌هاست که به اصطلاح روش‌پلی‌فازیک[۴] نامیده می‌شود (۷). ترکیب طبقه‌بندی ریخت‌شناسی گذشته و طبقه‌بندی بر اساس روش‌های مولکولی به منظور دستیابی به کلیدهای شناسایی معتبر، یک چالش مهم برای زیست‌شناسان محسوب می‌شود، با این حال، کوشش برای متحد ساختن این دو سیستم طبقه‌بندی همچنان ادامه دارد. درحال حاضر سیستم نام‌گذاری باکتریولوژیکی سیانوباکتری‌ها به طور گسترده‌ای پذیرفته شده است. در ایران نیز پژوهش‌های فراوانی در زمینه شناسایی سیانوباکتری‌ها بر اساس کلیدهای ریخت‌شناسی و مولکولی انجام شده که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به گزارش سلطانی[۵] و همکاران در سال ۱۳۷۸ در منطقه فیروزکوه اشاره کرد. آن‌ها ۲۰ گونه سیانوباکتری را در خاک‌های منطقه فیروزکوه در شرق تهران شناسایی کردند (۸). گزارش‌های مربوط به سیانوباکتری‌های ایران بیشتر مربوط به نمونه‌های آبزی بوده است، برای مثال گونه‌های *کروکوکوس*[۶]، *لینجبیا*[۷]، *آنابنا*[۸]، *سینکوکوس*[۹] و *اوسیلاتوریا*[۱۰] که از دریاچه ارومیه جداسازی و شناسایی شده‌اند (۹)، از سوی دیگر نمونه‌های خاکزی که شناسایی شده‌اند بیشتر به خاک شالیزارها متعلق بوده‌اند مانند: گونه‌های *استیگونما*[۱۱]، *آنابائنوپسیس*[۱۲]، *نوستوک*[۱۳] و *کالوتریکس*[۱۴] که در مزارع شمال کشور شناسایی شده‌اند (۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

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

امروزه ترکیبات‌طبیعی (متابولیت‌های ثانویه) منبع مهمی از داروهای جدید و ترکیبات دارویی مؤثر هستند (۱۲). فرآورده‌های طبیعی نه تنها به عنوان دارو در مسیر درست خود به‌کار گرفته می‌شوند، بلکه ممکن است به عنوان مدل‌های ساختاری برای ایجاد آنالوگ‌های مصنوعی و نیز به عنوان مدل‌هایی در مطالعات ساختار فعالیت به‌کار روند (۱۳). فرآورده‌های طبیعی از طیف گسترده‌ای از گونه‌های متنوع جداسازی و برای فعالیت‌های مختلف زیستی آزمایش شده است. بیشتر این فرآورده‌های طبیعی از منابعی همچون استرپتومیسس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان مشتق شده‌اند. مشکل اصلی در تمرکز بر این منابع برای دستیابی به مولکول‌های فعال زیستی جدید، کشف مجدد محصولاتی است که قبلا از منابع دیگری شناخته شده‌اند. یک راه برای به حداقل رساندن این مشکل، توسعه روش‌های زیستی شناسایی فرآورده‌های طبیعی و بررسی قابلیت درمانی جدید آن‌هاست. رویکرد دیگر این است که به منابع جدید و مختلف از محصولات طبیعی توجه شود. در میان این میکروارگانیسم ها، سیانوباکتری‌ها نشان دهنده چنین منابعی هستند. مطالعات ریچار مور[15] در دانشگاه هاوایی نشان داد که سیانوباکتری‌ها می‌توانند منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه باشند (۱۴). متابولیت‌های سیانوباکتری‌ها طیف قابل توجه و باورنکردنی از فعالیت‌های زیستی را نشان می‌دهند. برای مثال فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد ویروس، مهارکننده سیستم ایمنی، حشره‌کشی و ضد التهابی با مهار فعالیت پروتئیناز که از اهداف قابل توجه پژوهش‌های پزشکی هستند (۱۵-۱۷). توجه به خواص سیانوباکتری‌ها به عنوان منبع سرشار از متابولیت‌های ثانویه، در گذشته بسیار کم بوده است اما امروزه نشان داده شده که این میکروارگانیسم‌ها دارای کاربردهای فراوانی در زمینه پزشکی، تولید سوخت زیستی، تولید متانول و همچنین، پاک‌سازی زیستی هستند و از نظر مصارف غذایی نیز کاربرد دارند (۱۸). تنوع بسیار زیاد فعالیت‌های زیستی و شیمیایی متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتری‌ها، این میکروارگانیسم‌ها را به عنوان یک منبع قابل توجه از داروهای جدید برای استفاده در مناطق درمانی گوناگون توصیه می‌کند. با وجود زیستگاه‌ها و منابع فراوان سیانوباکتری‌ها در ایران در مقایسه با سایر کشورها، مطالعات اندکی در مورد خواص ضدمیکروبی عصاره سیانوباکتری‌ها انجام شده است. از جمله مهمترین پژوهش‌های انجام شده در این زمینه در ایران می‌توان به گزارش‌های زرینی[16] و همکاران در سال ۱۳۹۰ و قاسمی[17] و همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره کرد (۱۰ و ۱۹). با توجه به مقاومت روز افزون باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی، شناسایی سیانوباکتری‌های توانمند برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی و بررسی اثرات ضد میکروبی اهمیت خاصی دارد. هدف اصلی این پژوهش، بررسی اثرات ضدمیکروبی برخی از گونه‌های سیانوباکتری‌ها علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری از نمونه‌ها: در این مطالعه تجربی، سویه‌های سیانوباکتری *Fischerella ambigua* ISC67، *Synechococcus elangatus* ISC106 و *Schizothrix vaginata* ISC108 از کلکسیون ریزجلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه شد. ابتدا برای اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها به روش پلیت آگار بر روی محیط کشت جامد BG11انجام شد (۲۰). به این صورت که ابتدا محیط مایع BG11 تهیه شد. ترکیب محیط کشت BG11 مورد استفاده برای سیانوباکتری‌ها در هر لیتر ۱۵۰ میلی‌گرم $NaNO_3$، ۷۵ میلی‌گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۳۶ میلی‌گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۶ میلی‌گرم Citric Acid، ۶ میلی‌گرم Ferric ammonium citrate، ۱ میلی‌گرم EDTA (TriplexIII)، ۲۰ میلی‌گرم Na_2CO_3 و یک میلی‌لیتر محلول trace metal mix شامل ۲/۸۶ میلی‌گرم در لیتر H_3Bo_3، ۱/۸۱ میلی‌گرم در لیتر $MnCl_2.4H_2O$، ۰/۲۲۲ میلی‌گرم در لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۳۹ میلی‌گرم در لیتر $Na_2MoO_4.2H_2O$، ۰/۰۷۹ میلی‌گرم در لیتر $CuSO_4.5H_2O$، ۰/۰۴۹ میلی‌گرم در لیتر $Co(NO_3).6H_2O$ دارا می‌باشد (۲۱). سپس برای تهیه محیط‌کشت جامد، ۱۵گرم آگار به محیط کشت مایع BG11 اضافه، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و پس از اندکی خنک شدن به ظروف پتری منتقل شد. پس از سرد شدن محیط کشت جامد، کلونی‌های سیانوباکتری‌ها توسط لوپ به شکل زیگزاگی روی آن کشت داده شد. این کار برای به دست آوردن کلونی‌های خالص سیانوباکتری‌ها چندین بار تکرار شد و هر بار کلونی‌هایی که باید دوباره کشت داده می‌شدند، توسط تهیه‌ی اسلاید و بررسی میکروسکوپی انتخاب شدند. بعد از اطمینان از خالص بودن کلونی‌های موجود در کشت جامد، کلونی‌ها به محیط کشت مایع BG11 منتقل و در اتاقک رشد تحت هوادهی و تابش نور مداوم و همچنین دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری از سیانوباکتری‌ها: عصاره‌گیری به روش وال[18] و همکاران انجام شد. برای این منظور ۵۰۰ میلی‌لیتر از کشت مایع BG11 رشدیافته نمونه‌های سیانوباکتریایی ۳۰ روزه در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، برای ۱۵دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل پس از خشک شدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون، به عنوان عصاره آبی نگهداری شد. بیومس به دست آمده ابتدا در ۶۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد. برای تهیه عصاره‌های متانولی بر روی بیومس حاصل به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. سپس، مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۵۰دور در دقیقه قرار داده شد. عصاره‌های حاصل به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف وسپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون کاملاً خشک شد. بدین‌ترتیب عصاره متانولی تهیه شد. تمام عصاره‌های خشک شده در فالکون‌های استریل جمع آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲).

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی: در این پژوهش، ۵ گونه باکتری گرم مثبت بیماری‌زا شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*[19] (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*[20] (PTCC 1114)، *باسیلوس سرئوس*[21] (PTCC 1247)، *انتروکوکوس فیکالیس*[22] (PTCC 1237) و *استرپتوکوکوس پایوژنز*[23] (PTCC

www.SID.ir

Archive of SID

1447) و ۵ گونه باکتری گرم منفی شامل: *اشریشیا کلی*[۲۴] (PTCC 1338)، *پروتئوس ولگاریس*[۲۵] (PTCC 1312)، *سودموناس آئروژینوزا*[۲۶] (PTCC 1430)، *سالمونلا تیفی*[۲۷] (PTCC 1609) و *یرسینا پستیس*[۲۸] از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه شد. همچنین، ۴ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی شامل: *فوزاریوم سولانی*[۲۹]، *رایزوکتونیا سولانی*[۳۰]، *بوتریتیس سینره آ*[۳۱] و *فوزاریوم اوکسیسپوروم*[۳۲] از آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی دانشگاه ایلام تهیه شد.

تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری‌ها و قارچ‌ها: برای تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری‌ها (۱×۱۰^{۸} واحد سازنده کلونی در میلی‌لیتر) و قارچ‌ها (۱×۱۰^{۶} واحد سازنده کلونی در میلی‌لیتر)، ابتدا باکتری‌ها و قارچ‌ها را به طور جداگانه، به ترتیب روی محیط کشت‌های مولر هینتون‌آگار و سابوردکستروز آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت (برای باکتری‌ها) و ۴۸ ساعت (برای قارچ‌ها) در انکوباتور قرار داده شد. سپس، به اندازه تعداد میکروارگانیسم‌ها لوله استریل تهیه و داخل هر لوله به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. به وسیله آنس حلقوی از کلونی‌های باکتری‌ها و قارچ‌ها برداشته و داخل لوله‌ها انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد. برای به دست آوردن غلظت نیم مک‌فارلندی از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. دستگاه روی طول موج ۶۲۰ نانومتر تنظیم و با سرم فیزیولوژی صفر شد. سپس، از سوسپانسیون ورتکس شده در کوئیت‌های شیشه‌ای مخصوص دستگاه ریخته و جذب نوری آن‌ها تعیین شد. به منظور تهیه کدورت نیم مک فارلندی باید مقدار جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر برابر ۰/۰۸ تا ۰/۱ شود. در نهایت از تمام باکتری‌ها و قارچ‌ها غلظت نیم مک فارلندی تهیه شد (۲۳).

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

سیانوباکتری‌ها		غلظت عصاره‌ها*		
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
عصاره متانولی *Synechococcus elangatus*	۴/۸	۱۰/۱	۱۹/۱	۲۸/۴
عصاره متانولی *Fischerella ambigua*	۵	۹/۸	۱۹	۳۱/۳
عصاره آبی *Synechococcus elangatus*	۴/۳	۹/۴	۱۸/۵	۲۹/۲
عصاره آبی *Fischerella ambigua*	۴/۱	۹/۲	۱۹/۶	۲۹/۵

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

بر اساس روش استاندارد انتشار دیسک، دیسک‌های آغشته به عصاره در فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متری) از یکدیگر در محیط کشت‌ها قرار داده شدند (۲۴). محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌ها با استفاده از خط‌کش معمولی اندازه‌گیری شد. از سوسپانسیون نیم مک فارلندی قارچ‌های خالص شده روی محیط سابورودکستروزآگار کشت داده شد. سپس، دیسک‌های آغشته به عصاره در فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متری) از یکدیگر روی محیط کشت‌ها قرار داده شد. محیط کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله‌ها با استفاده از خط‌کش معمولی اندازه‌گیری شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد (۲۶). در این پژوهش از دی‌متیل‌سولفوکساید ۱۰ درصد به علت اینکه تأثیری بر روی باکتری‌های مورد بررسی ندارد به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین، از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل و پنی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت برای باکتری‌ها و از آنتی‌بیوتیک نیستاتین به عنوان کنترل مثبت برای قارچ‌ها استفاده شد. تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت پاتن طب (ایران) تهیه شد.

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که هیچ یک از عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی نبودند. نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی و متانولی دو گونه سیانوباکتری *Fischerella ambigua*، *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره متانولی گونه *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌ها اثر در خور توجهی نداشت، اما عصاره متانولی گونه *Fischerella ambigua* فعالیت ضدباکتریایی نشان داد. همچنین، نتایج بدست آمده از تأثیر عصاره‌های آبی سیانوباکتری‌ها نشان داد که عصاره آبی سیانوباکتری‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* فعالیت ضدباکتریایی معناداری علیه باکتری‌های مورد بررسی داشتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده تقریباً برابر صفر است ($P\ value \leq ۰/۰۱$).

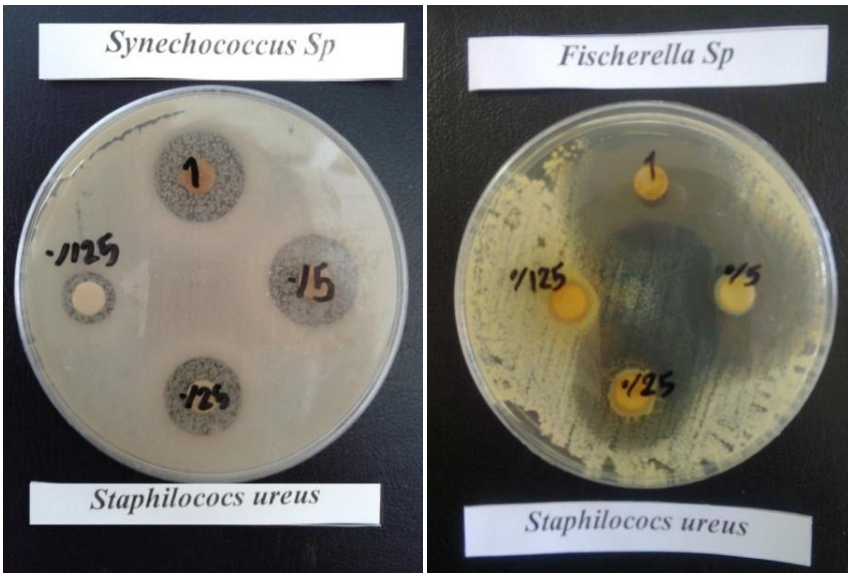
با توجه به میانگین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* علیه باکتری‌های گرم مثبت، می‌توان گفت که از بین باکتری‌های گرم مثبت تنها باکتری *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) و باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) و از بین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

www.SID.ir

Archive of SID

داد که خطای محاسبه شده برابر صفر است بنابراین، فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* علیه باکتری‌های گرم مثبت به طور معناداری بیشتر از باکتری‌های گرم‌منفی بود.

نتایج به دست آمده پس ار تأثیر عصاره‌آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که عصاره آبی این سیانوباکتر دارای اثر ضدباکتریایی در خور توجهی علیه باکتری‌های مورد بررسی بود. بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) به اندازه ۲۶/۳۳ میلی‌متر بود، در صورتی که بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد در بین باکتری‌های گرم‌منفی مربوط به باکتری *سودموناس آئروژینوزا* (PTCC 1430) با قطر هاله ۲۲/۳۳ میلی‌متر بوده است (شکل ۱). در بین باکتری‌های گرم مثبت تنها باکتری *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247)، و در بین باکتری‌های گرم منفی تنها باکتری *سالمونلا تیفی* (PTCC 1609) نسبت به این عصاره مقاوم بودند. تأثیر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقریبا یکسان بود به طوری که تحلیل آماری داده‌ها در سطح یک درصد، خطای محاسبه شده برابر ۰/۰۲ بود، بنابراین، اختلاف معناداری بین تأثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نشد.



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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

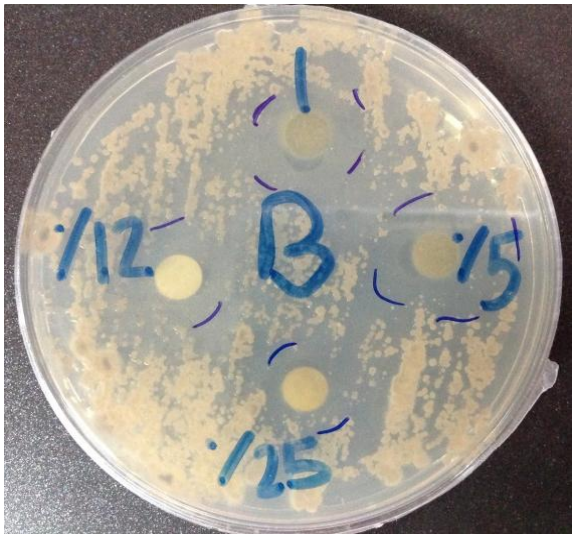
*: مقدار عصاره جذب شده (میلی گرم بر میلی‌لیتر)

www.SID.ir

Archive of SID

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

تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده تقریباً برابر صفر است ($P\ value \leq$ ۰/۰۱). بنابراین، اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گونه‌های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* و عصاره آبی *Synechococcus elangatus* بر روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی معنادار است. نتایج به دست آمده نشان داد که از بین عصاره‌های مورد آزمایش تنها عصاره متانولی *Fischerella ambigua* بر روی هر ۴ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی اثر مهاری داشت (شکل ۲). این عصاره بیش‌ترین تأثیر را بر روی قارچ *راینکوسپوریوم سکالیس* داشت به طوری که قطر هاله حاصل از تأثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری اطراف آن ۳۰/۶۷ میلی‌متر بود. عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی قارچ‌های *فوزاریوم سولانی* و *فوزاریوم اوکسیسپوروم* تأثیر تقریباً یکسانی داشت. همچنین، نتایج نشان داد که عصاره متانولی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* تنها بر روی قارچ *فوزاریوم سولانی* تأثیر داشت. به طوری که این قارچ به دیسک‌های حاوی ۲۸/۴ و ۱۹/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این سیانوباکتری حساسیت نشان داد. عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی قارچ *راینکوسپوریوم سکالیس*، *بوتریتیس سینره‌آ* و *فوزاریوم اوکسیسپوروم* هیچ تأثیری نداشت.



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

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳- میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی‌متر) و انحراف معیار حاصل از تأثیر عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* و عصاره متانولی *Synechococcus elangatus* علیه ۴ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی.

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

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

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

مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی و متانولی سیانوباکتری های *Fischerella ambigua* و *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا در جدول ۴ مشخص شده است. این نتایج نیز نشان می دهند که عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) و *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) اثر کشندگی و بر روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت. عصاره متانولی این سیانوباکتری در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر بر روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر کشندگی داشت. تحلیل‌های آماری در سطح یک درصد نشان داد که اختلاف معناداری بین اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود ندارد. همچنین، مشخص شد که عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114)، *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) و *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) اثر کشندگی و بر روی *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر بازدارندگی داشت. این عصاره در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر کشندگی داشت. تحلیل داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت به طور معناداری بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود ($P\ value \leq ۰/۰۱$). عصاره آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1430) اثر کشندگی و بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* (PTCC 1338)، *استرپتوکوکوس پایوژنز* (PTCC 1447)، *یرسینا پستیس*، *پروتئوس ولگاریس*(PTCC 1312)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) اثر بازدارندگی داشت. غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس پایوژنز* (PTCC 1447)، *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) اثر کشندگی و بر روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت.

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

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

نتایج حاصل از بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی ۳ گونه سیانوباکتری *Fischerella ambigua* ISC67، *Synechococcus elangatus* ISC106 و *Schizothrix vaginata* ISC108 در این پژوهش نشان داد که تنها عصاره متانولی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* دارای فعالیت ضدباکتریایی است و عصاره متانولی گونه‌های دیگر دارای اثر ضدباکتریایی معناداری نیست. ساکتیول[۳۹] و همکاران نیز ضمن بررسی خواص ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها نشان دادندکه متانول بهترین حلال برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی از سیانوباکتری‌هاست (۱۵). آن‌ها همچنین نشان دادند که متانول برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی برخی از سیانوباکتری‌ها *سینکوکوس الانگاتوس*[۴۰] و *اوسیلاتوریا ویلیه*[۴۱] حلال مناسبی نیست. با بررسی خواص ضدباکتریایی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* مشخص شد که این سیانوباکتری از بین باکتری‌های گرم‌مثبت بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) و *انتروکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر داشته و سایر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به این عصاره مقاوم بودند. همچنین، مشخص شد که عصاره متانولی این سیانوباکتری از بین باکتری‌های گرم منفی بیش‌ترین تأثیر را بر روی *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) داشته است. قاسمی و همکاران نیز در پژوهش خود نشان دادند که عصاره متانولی سیانوباکتری‌ها دارای در خور قابل توجهی علیه باکتری‌های پاتوژن است و بیش‌ترین تأثیر را بر وری باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *پروتئوس ولگاریس* دارد. آن‌ها در نتیجه پژوهش خود، با توجه به مطالعات و تحقیقات زیادی که در این زمینه توسط پژوهشگران در سراسر دنیا انجام شده بود، گزارش کردند که، ترکیبات زیادی، از جمله، فیشرلین[۴۲] و آمبیگوئین[۴۳] از این سیانوباکتری تولید می‌شود که این ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی هستند (۱۰).

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

www.SID.ir

Archive of SID

منفی دیده نشد ($P\ value \geq ۰/۰۱$). در مطالعات مشابه، قاسمی و همکاران وهمچنین سلطانی و همکاران نشان دادند که بین تأثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معناداری وجود ندارد (۱۰ و ۳۱).

نتایج به دست آمده از بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* نشان داد که این عصاره دارای اثر در خور توجهی بر روی اکثر باکتری‌های گرم مثبت است واز بین باکتری‌های گرم منفی تنها باکتری *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) نسبت به این عصاره حساس بود. دافی و پاور[۴۶] گزارش کردند که، یک توضیح احتمالی برای این مشاهدات ممکن است به تفاوت‌های قابل توجهی که در لایه‌های بیرونی باکتری‌های گرم منفی و مثبت وجود دارد، نسبت داده شود.آن‌ها بیان کردند که باکتری‌های گرم منفی دارای یک غشای خارجی و فضای پری‌پلاسمیک منحصر به فردی هستند که در باکتری‌های گرم مثبت وجود ندارند (۳۲). سلطانی و همکاران و قاسمی و همکاران نیز با بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *Fischerella ambigua* دریافتند که این عصاره دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است، طوری که تأثیر این عصاره از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر این باکتری بیشتر بود (۱۰ و ۳۱). این در حالی است که تیواری و شارما نشان دادن که بر خلاف نتایج به دست آمده در این مطالعه، عصاره آبی سیانوباکتری‌ها فاقد اثر ضدباکتریایی است (۳۰). همچنین، نتایج حاصل از تأثیر عصاره آبی سیانوباکتری *Synechococcus elangatus* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادکه این عصاره دارای اثر در خور توجهی بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم منفی است. با این حال، اثر این عصاره علیه باکتری‌های گرم مثبت کمتر یا تقریباً یکسان با باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج حاصل از تأثیر این عصاره با یافته‌های مارتینز[۴۷] و همکاران مطابقت دارد، آن‌ها در پژوهش خود ضمن بررسی فعالیت ضدباکتریایی سیانوباکتری‌های جنس *سینکوسیستیس*[۴۸] و *سینکوکوس* علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسان، نشان دادند که عصاره‌های به دست آمده از سیانوباکتری‌ها دارای فعالیت ضدباکتریایی معناداری علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است (۳۳). همچنین، در این پژوهش نشان داده شد که عصاره‌های آبی و متانولی سیانوباکتری *Schizothrix vaginata* فاقد اثرات ضدباکتریایی و ضد قارچی است. تاکنون پژوهشی مبنی بر اثرات ضدمیکروبی عصاره آبی و متانولی این سیانوباکتری گزارش نشده است.

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

www.SID.ir

Archive of SID

کردند که مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به مواد ضد باکتریایی مربوط به سطح آب دوست غشای خارجی آنهاست که غنی از مولکول‌های لیپوپلی‌ساکارید است، که یک مانع برای نفوذ مولکول‌های متعددی از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدباکتریایی تشکیل می‌دهند. از سوی دیگر غشا نیز با آنزیم‌ها موجود در فضای پری پلاسمیک، که قادر به شکستن مولکول‌های وارد شده از خارج سلول‌اند، در ارتباط است (۳۴). با این حال، کالمبا و کونیکا[۵۱] بیان کردند که باکتری‌های گرم مثبت بر خلاف باکتری‌های گرم منفی فاقد غشای خارجی و ساختار دیواره سلولی هستند. آن‌ها نیز گزارش کردند که اثر عصاره سیانوباکتری‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است و آن را با اختلاف ساختار دیواره‌سلولی باکتری‌های گرم مثبت با گرم منفی مرتبط دانستند (۳۵). همچنین، در این پژوهش مشخص شد که حساسیت قارچ‌های مورد بررسی به عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که متانول بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدقارچی از سیانوباکتری‌هاست این یافته‌ها با نتایج پریادهارشینی[۵۲] و همکاران نیز مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که عصاره متانولی سیانوباکتری‌ها دارای فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به عصاره آبی و استونی هستند (۳۶). این در حالی است که این نتایج با پژوهش قاسمی و همکاران مطابقت ندارد، آن‌ها نشان دادند که فعالیت ضد قارچی عصاره آبی *فیشرلا* نسبت به عصاره متانولی آن بیشتر است (۱۰). پژوهش‌های زیادی در زمینه شناسایی و جداسازی ترکیبات ضد قارچی سیانوباکتری‌ها انجام شده است. در نخستین مطالعات انجام شده، اسمیتکا[۵۳] و همکاران نشان دادند که ترکیب آمبیگوئین تولید شده توسط سیانوباکتری *فیشرلا* دارای فعالیت ضدقارچی مطلوبی برروی قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *کاندیدا آلبیکنز*، *پنی سیلیوم نوتاتوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* است (۳۷).

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

تاکنون متابولیت‌های ثانویه فراوانی با فعالیت ضدمیکروبی از سیانوباکتری‌ها جداسازی و شناسایی شده‌اند، برای مثال چاندرا[۵۷] و راجاشخار[۵۸] با بررسی فیتوشیمیایی عصاره‌های اتانولی، متانولی، کلروفرمی، دی اتیل اتری و آبی چند گونه از سیانوباکتری‌ها نشان دادند که فنول، فلاونوئید و کارتنوئید در تمام عصاره‌های به‌دست آمده وجود دارند، درحالی که آلکالوئیدها و استروئیدها/ تریترپن‌ها در همه عصاره‌ها به جز عصاره آبی سیانوباکتری‌ها وجود داشتند. همچنین، به طور مشابه فیکوسیانین‌ها در تمام عصاره‌ها به استثنای عصاره کلروفرمی موجود بودند. تانین‌ها در تمام عصاره‌ها به جزء عصاره آبی و کلروفرمی وجود داشتند اما ساپونین‌ها و کومارین‌ها در هیچ کدام از عصاره‌ها موجود نبودند. آن‌ها نشان دادند که این ترکیبات دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی هستند (۳۹). چو[۵۹] و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی و ترپنوئیدها دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند و قادرند از طریق تخریب

www.SID.ir

Archive of SID

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

به نظر می‌رسد با توجه به تولید مواد ضدمیکروبی فراوان توسط سیانوباکتری‌ها، احتمالاً سنتز این متابولیت‌ها نتیجه دفاع سیانوباکتری‌ها در محیط علیه ارگانیسم‌های دیگر مثل: باکتری، قارچ، ویروس و ریزجلبک‌های یوکاریوتی است که می‌تواند یک مزیت برای بقای این میکروارگانیسم‌ها در محیط طبیعی باشد (۴۴). در این زمینه زرینی و همکاران گزارش کردند که تولید ترکیبات ضدباکتریایی و ضدقارچی توسط سیانوباکتری‌ها می‌تواند بازتابی از شرایط محیطی و نیز هویت سیانوباکتری‌ها باشد. استعداد سیانوباکتری‌ها به عنوان منبع ترکیبات آنتی‌بیوتیکی نشانگر اهمیت این میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل دارویی بالقوه است (۱۹).

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد با عنوان «بررسی اثرات ضدمیکروبی و تجزیه زیستی نفت خام توسط سیانوباکتری‌ها» مصوب سال ۱۳۹۰ با کد ۱۰۶۵۸۳۹ است که با حمایت دانشگاه ایلام و همکاری گروه میکروبیولوژی نفت پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا شده است.

References

(1) Lopes V.R., Ramos V., Martins A., Sousa M., Welker M., Antunes A., et al. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research* 2012; 73: 7- 16.

(2) Baskara V, Sethubathi G, Ashok Prabu V. Antibacterial Activity of Cyanobacterial Species from Adirampattinam Coast, Southeast Coast of Palk Bay. *Current Research Journal of Biological Sciences* 2010; 2 (1): 24- 6.

(3) Nieto P.J.G., Lasheras F.S., Juez F.J.C, Fernandez J.R.A. Study of cyanotoxins presence from experimental cyanobacteria concentrations using a new data mining methodology based on multivariate adaptive regression splines in Trasona reservoir (Northern Spain). *Journal of Hazardous Materials* 2011; 195: 414- 21.

(4) Rikkinen J. Molecular studies on cyanobacteria diversity in lichen symbioses. *MycoKeys* 2013; 6: 1- 32.

(5) Shokravi Sh., Soltani N., Baftechi L., *Cyanobacteriology*, 1st. ed. Gorgan: Islamic Azad University of Gorgan; 2009.

(6) Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L., Broadwater S.T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 2005; 41: 421- 38.

www.SID.ir

Archive of SID

(7) Mishra A.K., Shukla E., Singh S.S. Phlogenetic comparison among the heterocystous cyanobacteria based on a polyphasic approach. *Protoplasma* 2013; 250 (1):77- 94.

(8) Soltani N., Dezfolian M., Shokravi Sh., Baftechi L., Shima E. Isolation and Morphological and Molecular Identification of New Species of Cyanobacteria from Firoozkooh region (Tehran Province) Using Different Culture Media. *Journal of science kharazmi university* 2010; 8 (4): 319- 28.

(9) Riyahi H., Shokravi Sh., Soltani N., Study of algal flora from Uromia Lake. *Pajouhesh- Va- Sazandgi* 1995; 25: 23- 5.

(10) Ghasemi Y., Tabatabaei-Yazdi M., Shokravi S., Soltani N., Zarrini G. Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 2003; 14 (3): 203- 209.

(11) Kalaitzis J.A., Lauro F.M., Neilan B.A. Mining cyanobacterial genomes for genes encoding complex biosynthetic pathways. *Natural Product Reports* 2009; 26 (11): 1447- 65.

(12) Cragg G.M., Newman D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1830 (11): 3670- 695.

(13) Harvey A.L. Natural products in drug discovery. *Drug discovery today* 2008; 13: 894- 901.

(14) Cardellina J.H., Moore B.S. Editorial: Richard E. Moore (1933- 2007). *Journal of Natural Products* 2010; 73 (3): 301- 2.

(15) Sakthivel K., Kathiresan K. Antimicrobial activities of marine cyanobacteria isolated from mangrove environment of south east coast of India. *Journal of Natural Products* 2012; 5: 147- 56.

(16) Oftedal L., Selheim F., Wahlsten M., Sivonen K., Døskeland S.O., Herfindal L. Marine Benthic Cyanobacteria Contain Apoptosis-Inducing Activity Synergizing with daunorubicin to Kill Leukemia Cells, but not Cardiomyocytes. *Marine Drugs* 2010; 8: 2659- 672.

(17) Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Yazdi M.T, Shokravi S., Fernández-Valiente E. Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biol*ogy 2005; 43 (5): 455- 59.

(18) Abed R.M.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 106 (1): 1- 12.

(19) Zarrini G., Rasooli I., Abazari M., Ghasemi Y. Investigation of Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Urmia Lake Catchment Area. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 2011; 11 (4): 329- 36.

(20) Andersen R.A. *Algal culturing techniques*. 1st. ed. West Boothbay Harbor, ME USA: Elsevier Academic Press. 2005.

(21) Shyam K.R., Thajuddin N., Venkateswari C. Antibacterial activity of cyanolichen and symbiotic cyanobacteria against some selected microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (13): 1408- 11.

(22) Val A.G., Platas G., Basilio A., Cabello A., Gorrochategui J. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology* 2001; 4 (1): 35- 40.

(23) Ahmady-Asbchin S., Safari M., Moradi H., Sayadi V. Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (*Mespilus germanica*) against bacteria isolated from hospital environment. *Arak Medical University Journal* 2013; 16 (75): 1- 13.

(24) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009a, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 10th. ed. Approved Standard. Wayne, PA.

www.SID.ir

Archive of SID

(25) Valadbeygi T., Moradi H. An investigation of antibacterial effect of methanol and acetone extracts in some lichens in Ilam. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 5 (1): 463- 50.

(26) Kumar M., Kumar M.T., Srivastava A., Kumar G.J., Kumar S.R., Tilak R., et al. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; 3 (6): 458- 63.

(27) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009b, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 17th. ed. Approved Standard. Wayne, PA.

(28) Yilmaz M.T. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2012; 42(1): 1423- 9.

(29) Zandi F., Hossini R., Soltani N., Abolhasani Soorki A. Comparative Assay on the Antimicrobial Activity of Cyanobacterial Isolates from Oil-polluted and Non-polluted Areas of Khozestan (Iran). *Environmental Sciences* 2012; 9: 97- 106.

(30) Tiwari A., Sharma D. Antibacterial Activity of Bloom forming Cyanobacteria against Clinically Isolated Human Pathogenic Microbes. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2013; 4 (1):83- 9.

(31) Soltani N., Khavari-Nejad R.A., Tabatabaei-Yazdi M., Shokravi S. Growth and Some metabolic Features of Cyanobacterium *Fischerella* Sp. FS18 in Different Combined Nitrogen Sources. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran* 2007; 18 (2): 123- 8.

(32) Duffy C.F., Power R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of Chinese plant extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 7: 191- 201.

(33) Martins R.F., Ramos M., Herfindal L., Sousa J.A., Skarven K., Vasconcelos V.M. Antimicrobial and cytotoxic Assessment of Marine cyanobacteria- *Synechocystis* and *Synechococcus. Marin Drugs* 2008; 6: 1- 11

(34) Shan L., He P., Sheen J. Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe* 2007; 1: 167- 74.

(35) Kalemba D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10 (10): 813- 29.

(36) Priyadharshini R., Ambikapathy V., Pavai T. *In vitro* Antimicrobial Activity of *Oscillatoria angustissima. International Journal of Advanced Research*. 2013; 1 (4): 60- 8.

(37) Smitka T.A., Bonjouklian R., Doolin L., Jones N.D., Deeter J.B., Yoshida W.Y., et al. Ambiguine isonitriles, fungicidal hapalindole-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the Stigonemataceae. *Journal of Organic Chemistry* 1992; 57: 857- 61.

(38) Mathivanan K., Ramamuthy V., Rajaram R. Antimicrobial activity of *Oscillatoria princeps* and *Lyngbya majuscule* against pathogenic microbes. *International jornal of Current Research* 2010; 5: 97- 101.

(39) Chandra K., Rajashekhar M. Antimicrobial activity of freshwater cyanobacteria isolated from pharmaceutical wastes. *African Journal of Microbiology Research* 2013; 7 (17): 1757- 65.

(40) Cho W.I., Choi J.B., Lee K., Chung M.S., Pyun Y.R. Antimicrobial activity of Toilin Isolated from Torilis japonica Fruit against *Bacillus subtilis*. *JFS M: Food Microbiology and Safety* 2008; 1: 37- 43.

(41) Cushinie T., Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26 (5): 343- 56.

(42) Tuyet L.T.A. Chemical and Biological Investigations of Vietnamese Cyanobacteria [Dissertation]. Germany: Ernst-Moritz-Arndt University; 2010.

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

[1]- Cyanobacteria
[2]- International Code of Botanical Nomenclature
[3]- International Code of Nomenclature of Prokaryots
[4]- polyphasic approach
[5]- Soltani
[6]- *Chroococcus*
[7]- *Lyngbya*
[8]- *Anabaena*
[9]- *Synechococcus*
[10]- *Oscillatoria*
[11]- *Stigonema*
[12]- *Anabaenopsis*
[13]- *Nostoc*
[14]- *Calothrix*
[15]- Richard Moore
[16]- Zarrini
[17]- Soltani
[18]- Val
[19]- *Staphylococcus aureus*
[20]- *Staphylococcus epidermidis*
[21]- *Bacillus cereus*
[22]- *Enterococcus faecalis*
[23]- *Streptococcus pyogenes*
[24]- *Escherichia coli*
[25]- *Proteus vulgaris*
[26]- *Pseudomonas aeruginosa*
[27]- *Salmonella typhi*
[28]- *Yersinia pestsi*
[29]- *Fusarium Solani*
[30]- *Rhynchosporium secalis*
[31]- *Botrytis cinerea*
[32]- *Fusarium oxysporum*
[33]- Kirby-bauer
[34]- *Broth microdilution*
[35]- *Clinical and Laboratory Standards Institute*
[36]- SPSS
[37]- ANOVA
[38]- Duncan
[39]- Sakthivel
[40]- *Synechococcus elangatus*
[41]- *Oscillatoria willei*
[42]- Fischerellin
[43]- Ambiguine
[44]- Tiwari
[45]- *Fischerella*
[46]- Duffy and Power
[47]- Martins
[48]- *Synechoccystis*
[49]- *Fischerella sp.*
[50]- Shan
[51]- Kalemba and Kunicka
[52]- Priyadharshini
[53]- Smitka
[54]- Mathivanan
[55]- *Lyngbiya maguscula*
[56]- *Oscillatoria princeps*
[57]- Chandra
[58]- Rajashekhar
[59]- Cho
[60]- Cushinie
[61]- Tuyet
[62]- ambiguine D isonitrile
[63]- ambiguine B isonitrile
[64]- fischerellin A
[65]- hydroxy-eicosatetraenoic acid
[66]- methoxy-nonadecadienoic acid
[67]- Raveh and Carmeli

www.SID.ir

Archive of SID

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

Moein Safari *
M.Sc. of Microbiology, Ilam University, Iran, m.safari@mail.ilam.ac.ir
Salman Ahmady-Asbchin
Associate Professor of Biology-Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran, sahmadyas@yahoo.fr
Neda Soltani
Associate Professor of Biology, Research Institute of applied science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, soltani6@yahoo.com

Abstract

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

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

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

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

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

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

www.SID.ir