20.1001.1.20080026.1401.16.1.2.9

بهینه‌سازی محیط کشت میکسوتروفیک برای بیشترین تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و ترکیبات بیواکتیو توسط سیانوباکتری *Aliinostoc oryzae* جدا شده از آبهای شور استان گلستان

گلزار انصاف[۱]، بهاره نوروزی[۱*]، سروناز فلسفی[۲]

[۱] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۱۱

چکیده

سنتز پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در میکروارگانیسم‌ها، خصوصا سیانوباکتری‌ها نقش عمده ای در محافظت سلول در برابر بسیاری از تنش‌ها در زیستگاه‌های مختلف دارد. در سال‌های اخیر، سویه‌های سیانوباکتریایی متعلق به خانواده Nostocaceae به عنوان منابع قابل قبولی برای تولید پلی‌ساکارید در کشت‌های سوسپانسیون مایع و جامد همراه، مورد توجه هستند. لذا در این پژوهش بهینه سازی شرایط کشت برای بیشترین تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و ترکیبات بیواکتیو تحت تاثیر محیط میکسوتروفیک توسط سیانوباکتریه ریسه‌ای جدا شده از آب شور مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه پیش رو با هدف بررسی عوامل موثر در بهینه‌سازی تولید اگزوپلی‌ساکاریدها و تاثیر محیط میکسوترف، ازسویه‌ی سیانوباکتری *Aliinostoc oryzae* از آب‌های شور استان گلستان جداسازی و بعد از شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی، میزان پلی‌ساکارید تولید شده و فعالیت ضدمیکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها حاکی از آن است که میزان تولید پلی‌ساکارید از سیانوباکتری به شرایط محیط کشت وابسته است. میزان تولید پلی‌ساکارید کشت‌های رشد یافته درغلظت نیترات با غلظت‌های 0.04 و 0.06 گرم در میلی‌لیتر و در روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه با تفاوت معنی‌داری بیشتر از کنترل بود. بررسی‌های تست آنتی‌بیوگرام نیز نشان داد که تولید پلی‌ساکارید در حضور استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت نیترات، تفاوت معناداری وجود داشت. بررسی‌های میانگین تولید استخراج پلی‌ساکارید به‌صورت برون سلولی نیز، در محیط‌های کشت مختلف تفاوت معناداری را نشان داد. پلی‌ساکارید خارج سلولی استخراج شده از سیانوباکتری‌ها در صنعت از جمله صنعت دارو و صنعت غذا و کشاورزی استفاده بیشماری دارد. بنابراین بهینه‌سازی شرایط کشت سیانوباکتر برای تولید حداکثری پلی‌ساکارید نمود پیدا می‌کند. از آنجا که اگزوپلی‌ساکاریدهای سیانوباکتریایی از دیدگاه زیست فناوری مهم می‌باشند، توجه به بسیاری از عوامل دیگر برای بیشرین تولید اگزوپلی‌ساکارید در این جنس از سیانوباکتری اهمیت زیادی دارد.

واژه‌های کلیدی: سیانو باکتری *Aliinostoc oryzae*، پلی ساکارید خارج سلولی، بهینه سازی، محیط کشت

[*]نویسندهٔ مسئول: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

مقدمه

از آغاز سال ۱۹۵۰ تاکنون، بسیاری از سیانوباکتریی ها، با قابلیت سنتز و آزادسازی پلی-ساکاریدهای خارج سلولی به محیط، از اهمیت بسیاری برخوردارشدند (Laurienzo و همکاران، ۲۰۱۰). لیپوپلی‌ساکاریدها از خانواده گلیکولیپیدهای فسفریله می‌باشند که در پوشش باکتری‌های گرم منفی وجود دارند و از جنس پپتیدوگلیکانی هستند. در سال‌های اخیر، استفاده صنعتی از سیانوباکتری‌ها نسبت به دیگر پلی‌ساکاریدهای تفکیک شده از گیاهان یا ماکروجلبک‌ها کاربرد زیادی داشته است (Cho و همکاران، ۲۰۱۰). امروزه، درحدود ۷۰ سویه سیانوباکتری با قابلیت تولید پلی‌ساکاریدهای محلول معرفی شده‌اند که در حال حاضر بیشتر مطالعات متوجه تعیین ترکیب قندی این پلیمرها می‌باشد. بیشترین سویه‌های سیانوباکتری که پلی ساکاریدهای محلول تولید می‌کنند، متعلق به راسته‌های کروکوکالس، اسیلاتوریالس و *نوستوکالس* می باشند. در طول رشد سلول در کشت مایع، بخش‌هایی از مواد پلی‌ساکاریدی شامل کپسول و اسلیم ممکن است به مواد محلول در آب آزاد شوند و موجب افزایش ویسکوزیته محیط شوند. پلی‌ساکاریدهای محلول می‌توانند به آسانی از کشت‌های مایع بازیافت شده و بسیاری از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها برای بسیاری از کاربردهای صنعتی مناسب می باشد. این موضوع، سیانوباکتری‌ها را جذابترین منبع تولید پلیمرهای جدید ساخته است (De Philippis و همکاران، ۱۹۹۸).

تحقیقات نشان داده‌اند که پلی‌ساکاریدهای آزاد شده بوسیله سیانوباکتری‌ها، در مقایسه با دیگر منابع میکروبی دارای ویژگی خاصی هستند، مثلاً آنها دارای خاصیت آنیونیک بوده و غالباً یک یا دو قند پنتوز در ساختار خود دارند، که به‌طور معمول در پلی-ساکاریدهای استخراج شده از دیگر پروکاریوت‌ها، دیده نمی‌شوند. به علاوه، ساختار پلی‌ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها، بسیار پیچیده هستند و دارای ۶ یا حتی تعداد بیشتری مونوساکارید می‌باشند. این خصوصیات به ندرت در پلیمرهای آزاد شده به وسیله گونه‌های متعلق به دیگر گروه‌های میکروبی مشاهده می‌شوند (Singh و همکاران، ۲۰۱۱). این ترکیبات در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی- آرایشی، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی کاربرد فراوانی دارند (Chandini همکاران، ۲۰۰۸). دسته‌ای از ماکرومولکول‌ها که به تازگی توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است، پلی‌ساکاریدهای سولفاته می‌باشند. پلی‌ساکاریدهای سولفاته در دیواره سلولی جلبک‌ها وجود دارد و ساختار شیمیایی آنها با توجه به نوع گونه جلبکی متفاوت است (Burtin، ۲۰۰۳). از پلی‌ساکاریدهای سولفاته در صنایع گوناگون به عنوان تثبیت کننده، قوام دهنده، امولسیافیر و همچنین در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود (Cho همکاران، ۲۰۱۰؛ Tseng و همکاران، ۲۰۰۱؛ Wijesekara و همکاران، ۲۰۱۱). براساس یافته‌های مطالعات، پلی‌ساکاریدهای که از سیانو باکتری‌ها استخراج شده‌اند علاوه بر ویژگی‌های خاص رئولوژیکی، از نظر بیولوژیکی نیز حائز اهمیت بوده و از آنها در جلوگیری از انعقاد خون، کاهش تکثیر و پراکندگی سلول‌های سرطانی، کنترل فرایند التهاب، کاهش کلسترول خون، کنترل واکنش‌های اکسیداسیونی، از بین بردن ویروس‌ها، ترمیم زخم و محافظت پوست در برابر اشعه فرابنفش استفاده می-شود (Rodrigues و همکاران، ۲۰۱۱). در واقع اهمیت این مواد خارج سلولی از لحاظ پتانسیل کاربرد صنعتی آنقدر فراوان است که موجب استخراج پلی‌ساکاریدها از سیانوباکتری‌ها شده است. از آنجایی که عوامل مختلف، تاثیر متفاوتی در تولید اگزوپلی-

ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها دارند، به‌منظور فهم کامل پتانسیل یک سیانوباکتری به عنوان تولید کننده پلی-ساکاریدهای مفید، تعیین بهترین شرایط تولید مواد خارج سلولی از اهمیت فراوانی برخوردار است. لذا بررسی میزان اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده و همچنین مساعدسازی محیط، می‌تواند گامی مهم در معرفی سویه‌های بالقوه سیانوباکتریایی از لحاظ دارویی باشد. در این راستا در کنار استخراج اگزوپلی-ساکاریدها، تست آنتی‌بیوگرام و TLC، از تکثیر ژن‌های ساختمانی 16S rRNA به‌منظور فیلوژنی مولکولی سویه مورد مطالعه نیز استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

کشت و شناسایی سویه سیانوباکتریوم آب شور: ابتدا سویه سیانوباکتری از مجموعه کشت سیانوباکتری‌های دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات Cyanobacteria culture collection (CCC)، واقع در هرباریوم البرز، تهیه و کشت داده شد. نمونه متعلق به آبهای شور تالابهای موجود در روستای روشن آباد استان گلستان است. نمونه‌های آب شور توسط بطری های پلاستیکی از سطح و کناره های تالاب جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور کشت و خالص سازی نمونه‌های آب ابتدا از محیط کشت جامد $BG\text{-}11_0$ استفاده گردید. بعد از دو هفته، کلنی‌های رشد یافته به منظور خالص‌سازی، در محیط کشت‌های جداگانه دوباره کشت گردیدند. کشت نمونه‌های سیانوباکتری در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ممتد فلورسنت با شدت ۶۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه انجام شد و در نهایت عکس‌های ماکروسکوپی تهیه گردید (Andersen و همکاران، ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶). شناسایی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک نمونه با یک میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج شناسایی گردیدند. چندین پارامتر شامل طول و قطر سلول‌های رویشی، هتروسیست و آکینت، مورفولوژی سلول انتهایی، مسافت بین هتروسیست‌ها و مسافت بین هتروسیست و نزدیکترین آکینت، حضور یا غیاب هتروسیست‌های انتهایی، شکل فیلامنت‌ها و تجمع در کلنی‌ها، برای بررسی‌های مورفولوژیک بررسی شدند (شکل ۱) (Briones-Nagata و همکاران، ۲۰۰۷).

شناسایی ملکولی سویه سیانوباکتری

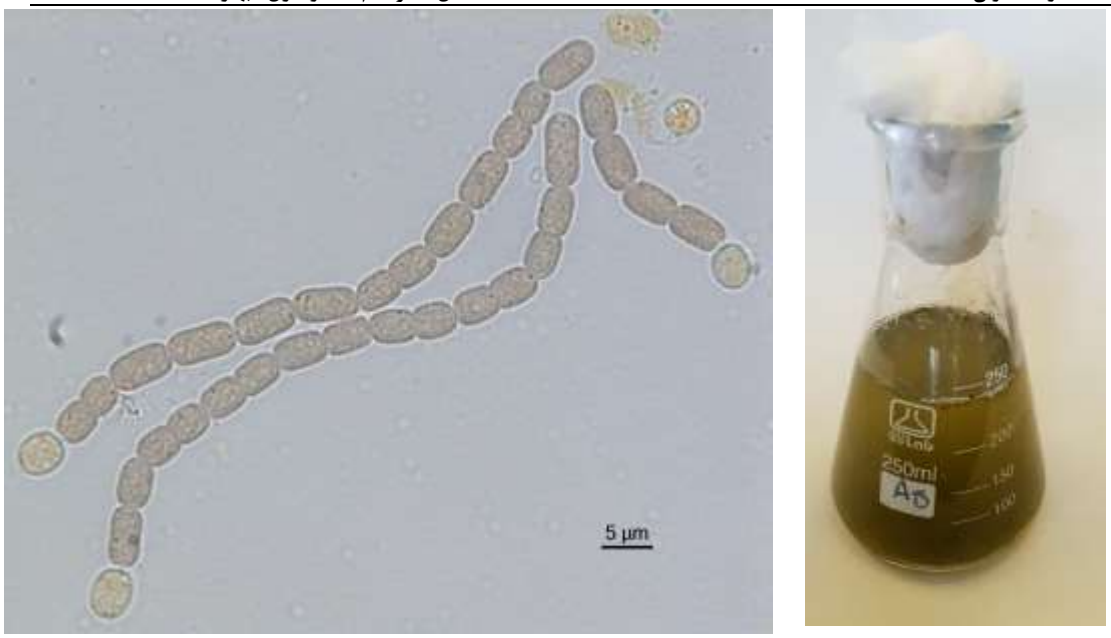
استخراج DNA ژنومیک: استخراج DNA به روش دستی CTAB انجام و برای تعیین کیفیت DNA از روش کیفی به کمک لود کردن روی ژل الکتروفورز و روش کمی به کمک دستگاه نانودراپ Thermo (spectrophotometer Scientific) استفاده شد (Berg همکاران، ۲۰۰۹).

تکثیر توالی ژن 16S rRNA: تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از آغازگر رفت و آغازگر برگشت (جدول یک) انجام گرفت و سپس اندازه محصول در مقایسه با DNA نشانگر (λ/HinfIII + φx/HaeIII; Finnzymes) سنجیده شد (شکل ۱).

محصولات PCR با استفاده از کیت (Qbiogene/MP Biomedicals, Solon, OH, Turbo Geneclean (USA خالص شدند (Boussiba و همکاران، ۱۹۸۰).

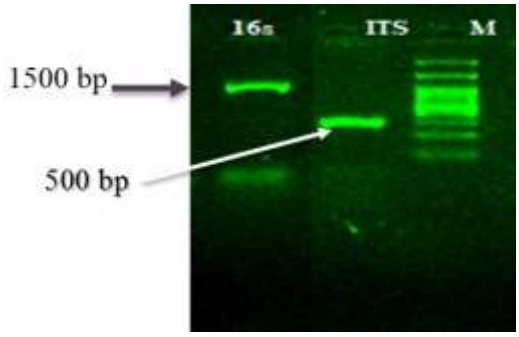
جدول ۱- توالی پرایمرهای 16S rRNA

توالی	پرایمر
5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'	27F
5'- CGGGTTACCTTGTTACGACTT -3'	1492R



B **A**

شکل ۱- A: سویه سیانوباکتری *Aliinostoc oryzae* تلقیح شده در محیط کشت مایع $BG\text{-}11_0$
B: مورفولوژی سویه سیانوباکتری *Aliinostoc oryzae* توسط میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج



شکل ۲- الکتروفورز DNA تکثیرشده ژن 16S rRNA با PCR روی ژل اگارز.

پ) توالی‌یابی، تجزیه و تحلیل، آنالیزهای بیوانفورماتیک و رسم درخت فیلوژنتیک: سویه مطالعه شده به منظور توالی یابی به شرکت میکروسینس سوئیس ارسال شد و توسط روش Sanger توالی یابی شدند. بررسی‌های Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ژن *16S rRNA* برای شناسایی شباهت توالی با توالی‌های مشابه در بانک اطلاعات ژنی NCBI انجام شدند. عملیات ثبت ژن با نرم‌افزار bankit موجود در سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank، انجام شد. نتایج حاصل از توالی یابی توالی‌های Forward و reverse با کمک نرم‌افزار BioEdit، همردیف‌سازی شدند. توالی اجماع به دست آمده در سایت NCBI، Blast N گردید و با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک ژن مقایسه شد و درصد تشابه آن‌ها با سایر ژن‌های ثبت شده بررسی گردید. صد سویه ای که دارای بیشترین شباهت با ژن مورد نظر بودند، به کمک سایت MAFFT VERGEN7 هم ردیف‌سازی شدند و در نهایت پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درخت فیلوژنتیک به کمک برنامه آن لاین Iq tree web server انجام گردید. علاوه بر

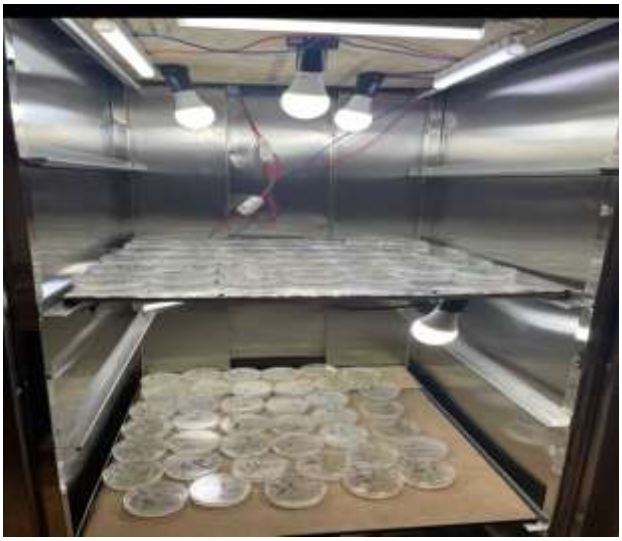
آن از سویه *Synechococcus elongatus* به‌عنوان ریشه استفاده گردید (Nowruziو همکاران، ۲۰۱۲).

چ) طراحی بهترین شرایط کشت برای بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید

ابتدا مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی سیانوباکتری‌ها انتخاب شدند (Dietrich و همکاران، ۲۰۰۸؛ Hu و همکاران، ۲۰۰۸) و سپس با هدف تولید بیشترین میزان پلی-ساکارید، برهمکنش چندین عامل اکوفیزیولوژیکی در دو شرایط تغذیه‌ای فتوتروف و میکسوتروف ارزیابی شدند تا در نهایت بهینه‌ترین شرایط کشت برای رشد سیانوباکتریوم آب شیرین به‌منظور تولید پلی‌ساکارید پیشنهاد شود.

۱. برای کشت‌های دیازوتروفیک از محیط کشت $BG\text{-}11_0$ بدون منابع نیتروژنه استفاده گردید.
۲. برای تهیه محیط کشت میکسوتروفیک از غلظت‌های مختلف گلوکز (۲ و ۵ گرم بر لیتر) و سوکرز (۲.۰ و ۵.۰ گرم بر لیتر) استفاده گردید (Nowruzi و همکاران، ۲۰۱۲).
۳. محیط کشت $BG\text{-}11_0$ با غلظت‌های متفاوت فسفات (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) برای کشت‌های غیر دیازوتروفیک استفاده شد.
۴. محیط کشت $BG\text{-}11_0$ با نیترات (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار)، به‌عنوان منبع نیتروژن برای کشت‌های غیر دیازوتروفیک به کار رفت (Yu و همکاران، ۲۰۰۹).

سپس پلیت‌های حاوی محیط کشت‌های غنی شده، در داخل اتاقک کشت جدید از لحاظ میزان روشنایی قرار گرفتند. یک طرف اتاقک کشت میانگین فوتون فلاکس ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه را به عنوان شدت روشنایی متوسط دریافت می‌کرد، در حالی که طرف دیگر اتاقک کشت میانگین متوسط شدت روشنایی ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه را به عنوان روشنایی بالا و افراطی دریافت می کرد (شکل ۳) (Alcorta همکاران، ۲۰۱۹).



شکل ۳- کشت سویه‌ها را در اطاقک کشتی که به دو قسمت تقسیم شده است، نشان می‌دهد. قسمت بالا شدت نور افراطی و قسمت پایین شدت نور پایین را دریافت می کند.

استخراج اگزوپلی‌ساکاریدها: استخراج اگزوپلی-ساکاریدها به روش Cruz و همکاران انجام شد. کشت‌های سی روزه، برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی استفاده شدند. سلول‌ها در دمای اتاق و

با سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه جدا شدند و رسوب با مقدار مناسبی آب مقطر به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و دوباره در تری کلرواستیک اسید ۵ درصد حل شد و سپس به مدت ۲ ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد؛ محلول حاصل پس از سرد شدن به‌مدت ۳۰ دقیه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس بخش رویی شامل پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی جدا و هم حجم آن، اتانول اضافه شد. مخلوط در ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب قرار گرفت و دوباره به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دو بار با اتانول ۹۶ درصد شسته و به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب نهایی در ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل و در منفی ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Ozturk و همکاران، ۲۰۱۰).

بررسی اثر ضدباکتریایی به روش انتشار: در این روش ازیک باکتری گرم مثبت (*StapHylococcus aureus* (ATCC 25923) و یک باکتری گرم منفی (*Escherichia coli* (ATCC 25922)) استفاده شد. از دیسک‌های کاغذی آغشته به بیومس سیانوباکتریایی حل شده در متانول (بازدارنده رشد باکتری‌ها) استفاده و در نتیجه به شکل‌هاله رشد نکردن ظاهر شد. به منظور مناسب ساختن محیط کشت برای تولید بیشتر پلی ساکارید ابتدا سویه مد نظر در محیط کشت عمومی سیانو باکتری‌ها بدون منابع نیتروژن کشت داده شد و سپس به بررسی قدرت ممانعت‌کنندگی سویه در برابر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و باکتری گرم منفی *Escherichia coli* پرداخته شد. به‌دلیل آماده‌سازی عصاره‌های سیانو باکتریایی از فاز ایستایی رشد استفاده شد. به این صورت که زیست توده بدست آمده بوسیله یک کاردک پلاستیکی از سطح هر ظرف پتریدیش جمع‌آوری شد و به‌مدت ۶۰ دقیقه در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از زیست‌توده خشک شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون چند میکروتیوپ تقسیم (هرکدام ۱۰۰ میلی‌گرم) و ۳۰۰ میلی‌گرم دانه شیشه ای ۰.۵ میلی‌لیتری و در نهایت به هر کدام یک میلی‌لیتر حلال متانول اضافه شد. سپس به‌مدت ۴ ساعت ورتکس انجام شد و سه تا چهار ساعت زمان داده تا رنگ آن سبز و قهوه‌ای شود و دیواره اسکلتی سیانو باکتری‌ها از هم جدا شود. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در داخل سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور ، سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی را که جمع شده است را برای مطالعه ویژگی‌های ضد باکتریایی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Nowruzi و همکاران، ۲۰۱۹).

به‌منظور کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. به این صورت که مقدار ۳۴ گرم پودر آگار مولر هینتون و ۰/۵ میکروگرم متیلن بلو در یک لیتر آب بوسیله همزن بر روی هیتر حل شد. با استفاده از متیلن بلو پس از اینکه محیط جامد شد و در روی دیسک‌های کاغذی قرار گرفت اندازه ناحیه بازدارندگی با دقت بیشتری اندازه‌گیری شد. دیسک استاندارد برای باکتری مشخص دیسک بلنک برای باکتری گرم منفی استفاده شد. سپس پلیت‌ها در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت‌هاله مشخصی ملاحظه شد. سپس قطرهاله با خط کش اندازه گرفته شد (Nowruzi وهمکاران، ۲۰۱۹; Dussault و همکاران، ۲۰۱۶).

آزمایش TLC: به منظور جداسازی مادهی بیواکتیو دارای ویژگیهای ضد باکتریایی، محیط کشتی که بیشترین قطرهالهی رشد نکردن را داشت انتخاب و آزمون TLC انجام شد. به این ترتیب که زیست توده سیانوباکتریها رسوبگیری و با آب مقطر شسته و خشک شد. مقدار ۱ گرم از زیست توده دو بار با ۱۰۰ میلی لیتر متانول شسته و محلول رویی به دست آمده تا زمانیکه خشک شود تبخیر و باقیمانده دوباره در متانول ۵ میلیلیتر حل شد. به منظور استخراج به روش TLC از حلال تتراکلریدکربن: متانول (۱:۹ حجمی-حجمی) استفاده شد، سپس باندهای حاصل از هم جدا و در حلال متانولی حل شدند و دوباره آزمون آنتی بیوگرام برای هر یک از باندها انجام شد (Alcorta همکاران، ۲۰۱۹). سپس آنتی بیوگرام دوم بعد از TLC برای محیط کشت حاوی نیترات ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نور ۱۵۰ میکروانیشتین در مترمربع بر ثانیه و محیط کشت نیترات ۳۰۰ میلیگرم بر لیتر نور ۱۵۰ میکروانیشتین در مترمربع بر ثانیه انجام شد.

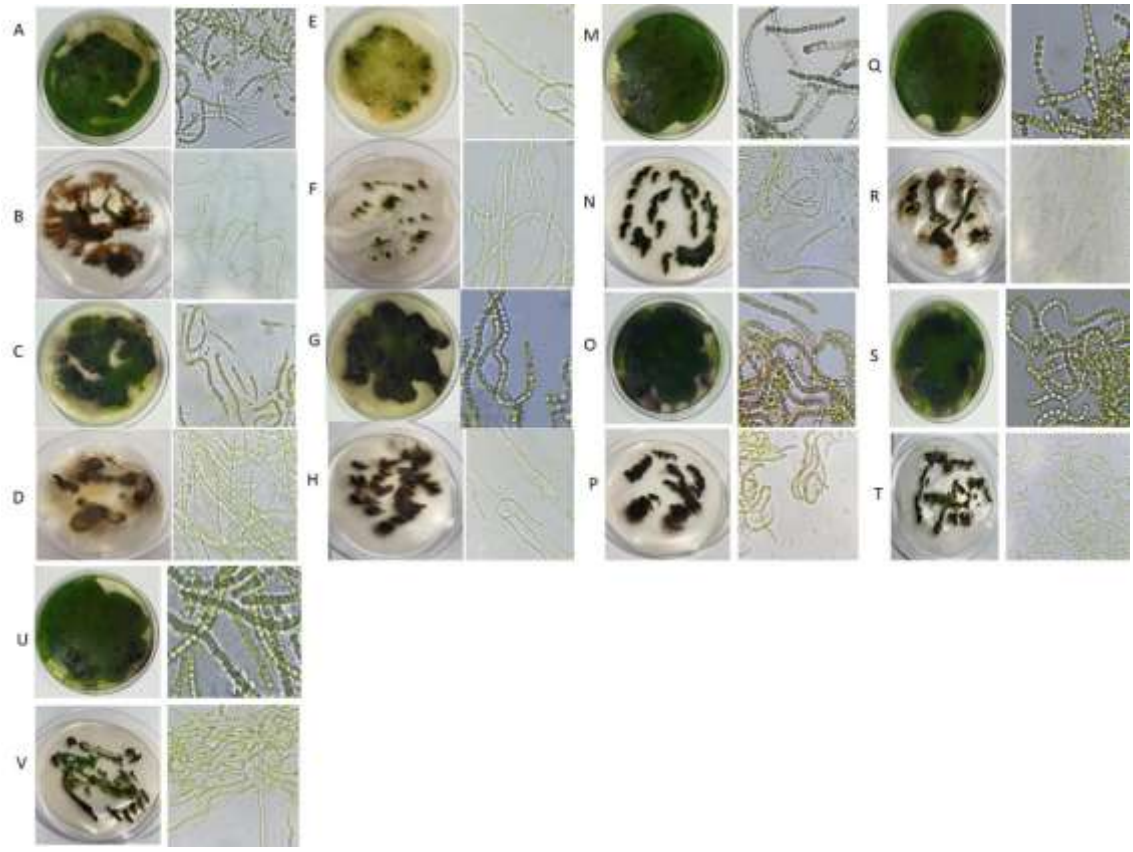
آنالیزهای آماری

واکاوی دادههای آماری به دست آمده از هر آزمایش با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴) انجام شد. همهدادهها از سه بار تکرار آزمون به دست آمدهاند. معنی دار بودن تفاوتها بین موارد اندازهگیری شده با آنالیز واریانس یکطرفه با حدود اطمینان ۹۵٪ و مقایسه میانگینها با آزمون tukey انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از ریختشناسی سویه مورد مطالعه: به‌طور خلاصه، نتایج بررسی ریخت‌شناسی سویه مطالعه شده در غلظت‌های مختلف گلوکز نشان دادند که در نورکم، سویه مورد مطالعه انشعابات طویل به رنگ سبزروشن را تولید می کند و در کشت‌های رشد کرده با غلظت ۲ و ۵ گرم بر لیتر سوکروز در شدت نوری زیاد، رشته‌های طویل و در شدت نوری کم، رشته‌های کوتاه و بلند جدا از هم هستند. بررسی ریخت‌شناسی کشت‌های رشد کرده در نیترات و فسفات در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، رشته‌های ماری شکل ضخیم و بلند بیشتری در شدت نوری زیاد، تولید شده است. جزئیات بیشتر این بررسی‌ها، در جدول سه بیان شده است.

نتایج حاصل از اثرات غلظت‌های متفاوت نیترات، فسفات، گلوکز و سوکروز بر میزان اگزوپلی-ساکارید تولید شده: بررسی میانگین و انحراف معیار محیط کشت‌های مختلف در نور ۵۰ و ۱۵۰ میکروانیشتین در مترمربع بر ثانیه بررسی شد. در مرحله میزان استخراج پلی ساکارید، میانگین کشت میکسوتروفیک در نوع محیط کشت گلوکز و سوکروز ۲ گرم و ۵ گرم بر لیتر در نور۱۵۰ نسبت به نور ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه بیشتر بود. کشت در غلظت‌های مختلف نیترات نیز حاکی از آن بود که غلظت‌های ۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم بر لیتر در نور ۱۵۰ میکرو انشتین در مترمربع در ثانیه، نسبت به میانگین کشت نیترات به نور ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه بیشتر بوده است. در کل می‌توان نتیجه گرفت که میانگین میزان استخراج پلی ساکارید در غلظت‌های نیترات نسبت به سایر محیط کشت‌ها بیشتر شده است (جدول۴) (شکل ۷).

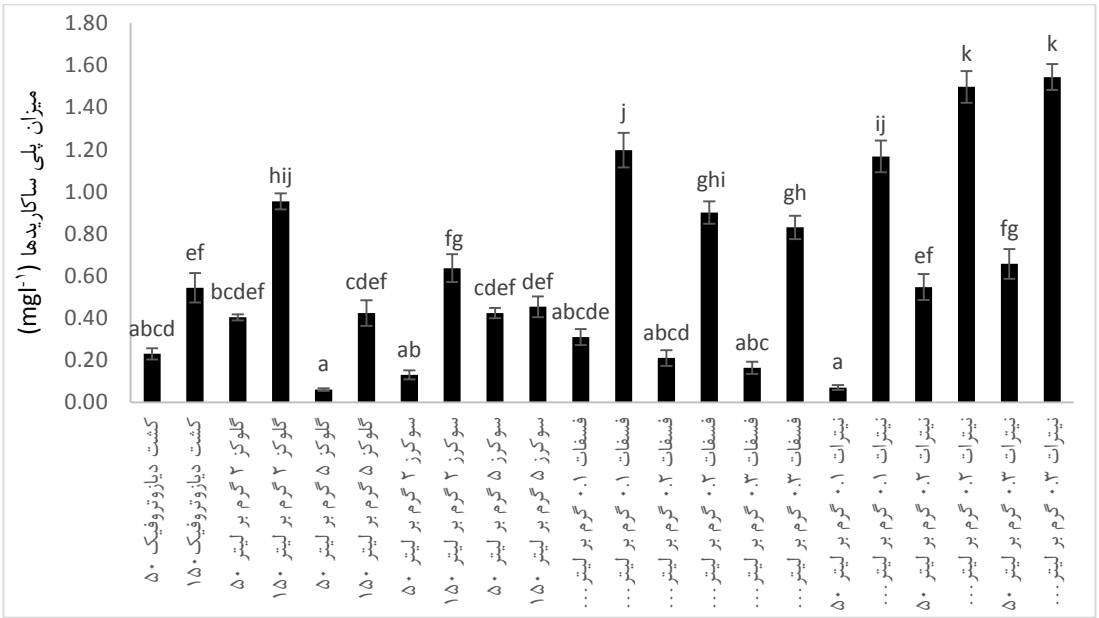


شکل ۴-A. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در نمونه کنترل با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، .B ریخت‌شناسی ریسه‌ها در نمونه کنترل با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، C. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار گلوکز در غلظت ۲ گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، D. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار گلوکز در غلظت ۲ گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، E. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار گلوکز در غلظت ۵ گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، F. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار گلوکز در غلظت ۵ گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، G. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار سوکروز در غلظت ۲ گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، H. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار سوکروز در غلظت ۲ گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، .I ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار سوکروز در غلظت ۵ گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، J. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار سوکروز در غلظت ۵ گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، K. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار فسفات در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، L ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار فسفات در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، M. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار فسفات در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، N. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار فسفات در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، O. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار فسفات در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، P. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار فسفات در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، Q. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار نیترات در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، R. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار نیترات در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، S. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار نیترات در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، T. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار نیترات در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، .U ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار نیترات در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X)، V. ریخت‌شناسی ریسه‌ها در تیمار نیترات در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه (400X).

جدول ۳- شرح ریخت‌شناسی سویه مطالعه شده در تیمارهای مختلف

نوع تیمار	شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه		شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه	
	ریخت‌شناسی کلنی‌ها روی پلیت	ریخت‌شناسی سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری	ریخت‌شناسی کلنی‌ها روی پلیت	ریخت‌شناسی سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری
کشت دیازوتروفیک	کلنی‌ها کوچک، پراکنده، به رنگ سبز تیره و جدا از هم هستند.	رشته‌های کوتاه بدون انشعاب و به رنگ سبز تیره و روشن که با تراکم زیاد در هم تنیده شده اند.	کلنی‌ها به شکل سطح نازک و چسبیده به سطح پلیت و به رنگ سبز تیره مایل به قهوه ای می‌باشند.	کلنی‌هایی جدا از هم، در قسمت‌هایی متصل به هم، چسبیده به سطح پلیت و به رنگ سبز لجنی تیره هستند.
گلوکز ۲ گرم بر لیتر	کلنی‌ها به رنگ سبز تیره و به صورت جدا از هم دیده می‌شوند	انشعابات کوتاه، متراکم، جدا از هم و ترکیبی از رنگ سبز تیره و روشن هستند..	کلنی‌ها قهوه ای رنگ و به صورت جدا از هم دیده می‌شوند.	انشعابات رشته ای و طویل و با رنگ روشن دیده می‌شوند.
گلوکز ۵ گرم بر لیتر	کلنی‌ها کم و به رنگ سبز تیره دیده می‌شوند.	به‌طور کلی رشته‌هایی کوتاه و از هم جدا هستند اما در بخش‌هایی متراکم دیده می‌شوند.به رنگ سبز روشن و به صورت کروی شکل هستند..	کلنی‌ها کوچک، زیاد و جدا از هم به رنگ سبز تیره دیده می‌شوند	رشته‌هایی طویل و جدا از هم، سلول‌ها مستطیل شکل و به رنگ سبز روشن می‌باشند.
سوکروز ۲ گرم بر لیتر	کلنی‌ها به رنگ سبز تیره و به‌صورت جدا از هم دیده می‌شوند.	رشته‌هایی طویل، متراکم و سبز رنگ در کنار هم هستند که از واحدهایی مکعب شکل تشکیل شده اند.	کلنی‌ها قهوه‌ای رنگ و به صورت جدا از هم دیده می‌شوند.	. رشته‌هایی کوتاه و بلند و جدا از هم و به رنگ سبز روشن و در قسمت‌هایی سبز تیره می‌باشند
سوکروز ۵ گرم بر لیتر	کلنی‌ها به رنگ سبز تیره و به صورت جدا از هم دیده می‌شوند.	رشته‌ها ی ماری شکلی که از واحدهایی کروی شکل بوجود آمده اند.این رشته‌ها ترکیبی از سبز تیره و روشن هستند که در قسمت‌هایی نیز در هم تنیده شده اند.	کلنی‌ها قهوه ای رنگ و به صورت جدا از هم دیده می‌شوند.	رشته‌های کوتاه و بلند سبز رنگ در هم پیچیده شده‌ای هستند.
فسفات ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر	کلنی‌ها به رنگ سبز تیره مجزا از هم و در بخش‌هایی به صورت به هم چسبیده و متراکم هستند	رشته‌هایی ضخیم و متراکم که از سلول‌هایی بیضی شکل و با رنگ سبز لجنی و قهوه ای تشکیل شده و در هم پیچیده اند.	کلنی‌ها جدا ازهم و به رنگ سبز تیره و در برخی قسمت‌ها کم تراکم می‌باشند.	رشته‌هایی طولانی ساخته شد از سلول‌هایی کروی شکل و به رنگ سبز روشن که شکل مارپیچی دارند و در بخش‌هایی نیز به صورت متراکم دیده می‌شوند.
فسفات ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر	کلنی‌ها با سطح وسیع اما کم تراکم و به رنگ قهوه ای و بدون شکل دیده می‌شوند.	ریسه‌هایی که تشکیل شده از سلول‌هایی با اندازه ای نسبتا" بزرگتر و غالبا" به رنگ سبز تیره هستند.این ریسه‌ها به صورت جدا از	کلنی‌ها توده‌هایی کوچک، پر تراکم، جدا از هم و به رنگ سبز تیره می‌باشند.	رشته‌هایی طولانی ساخته شد از سلول‌هایی کروی شکل و به رنگ سبز روشن که شکل مارپیچی دارند و در بخش‌هایی نیز به

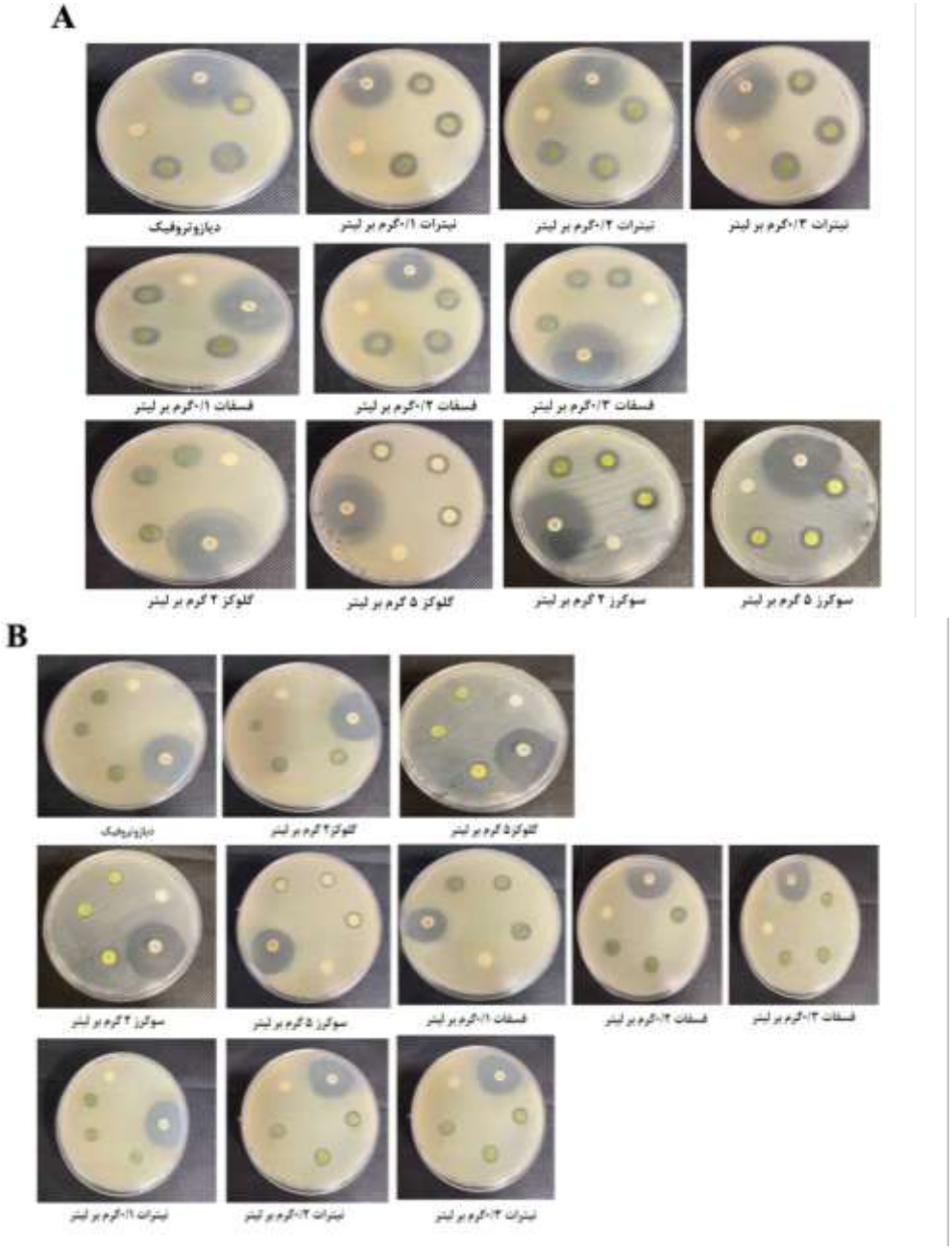
		هم و در قسمت‌هایی نیز به صورت متراکم و در هم		صورت متراکم دیده می‌شوند.
فسفات ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر	کلنی‌ها جدا از هم، پر تراکم، با رنگ سبز تیره مایل به قهوه ای و در قسمت‌هایی به صورت توده ای تجمع یافته اند	رشته‌هایی بلند که با تراکم بالا به صورت مارپیچی قرار گرفته اند و به رنگ سبز لجنی و قهوه ای دیده می‌شوند..	کلنی‌ها جدا از هم و پر تراکم و با رنگ سبز و قهوه ای دیده می‌شوند.	رشته‌هایی پر تراکم، تشکیل شده از سلول‌های لجنی رنگ و مکعب شکل.
نیترات ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر	کلنی‌ها سبز مایل به قهوه ای، پراکنده و بدون شکل و به صورت لایه ای نازک روی سطح	رشته‌های ماری شکل ضخیم تشکیل شده از سلول‌های سبز رنگ کروی و کمی بزرگ ..	کلنی‌ها سبز تیره و در قسمت‌هایی قهوه ای رنگ، بیشتر به شکل خطی و پراکنده در سطح پلیت دیده می‌شوند.	رشته‌هایی بلند و به رنگ سبز روشن که با تراکم زیادی در هم پیچ خورده اند.
نیترات ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر	کلنی‌ها سبز تیره مایل به قهوه ای، توده‌های به هم چسبیده و نازک در تمام سطح پلیت هستند.	رشته‌های ماری شکل ضخیم تشکیل شده از سلول‌های سبز رنگ کروی و کمی بزرگ ..	کلنی‌هایی به رنگ سبز لجنی، بدون شکل، متراکم، جدا از هم و چسبیده به سطح پلیت می‌باشند.	رشته‌هایی بلند و به رنگ سبز روشن که با تراکم زیادی در هم پیچ خورده اند.
نیترات ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر	کلنی‌ها نازک، به هم چسبیده، بدون شکل و به رنگ سبز تیره مایل به قهوه ای می‌باشند.	رشته‌های ماری شکل ضخیم تشکیل شده از سلول‌های سبز رنگ کروی و کمی بزرگ ..	کلنی‌هایی جدا از هم، در قسمت‌هایی متصل به هم، چسبیده به سطح پلیت و به رنگ سبز لجنی تیره هستند.	رشته‌هایی بلند و به رنگ سبز روشن که با تراکم زیادی در هم پیچ خورده اند.



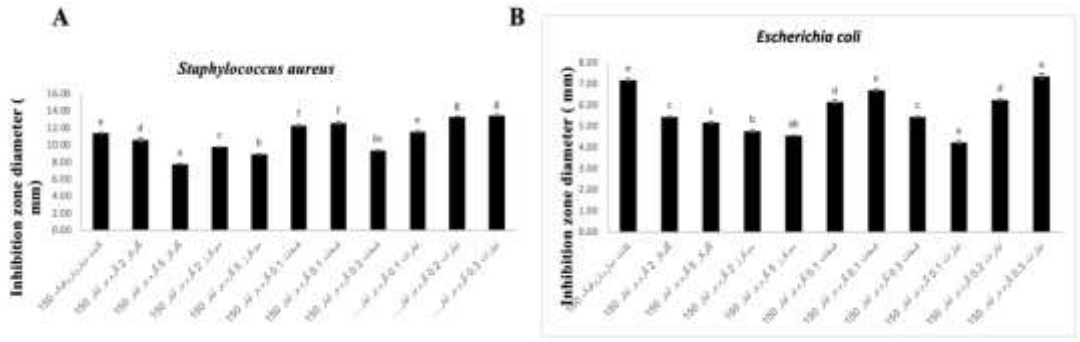
شکل ۷- نمودار میانگین میزان استخراج پلی ساکارید در کشت‌های مختلف در نور ۱۵۰ میکرووانیشتین در متر مربع بر ثانیه

بازدارندگی میکروبی: نتایج بررسی فعالیت ضدباکتریایی، تحلیل آماری وآزمون توکی در برابر باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی نشان دادند که همبستگی مثبتی میان میزان اگزوپلی‌ساکاریدها در

تیمارهای مختلف و فعالیت ضد باکتریایی وجود دارد. به این ترتیب که سویه استافیلوکوکوس اورئوس درنور ۱۵۰ میکروانیشتین در مترمربع بر ثانیه در محیط کشت نیترات 0.3 و 0.2 گرم بر لیتر، با هم تفاوت معنی‌داری ندارند ولی نسبت به سایر محیط‌ها و کشت کنترل دارای تفاوت معنی‌دار هستند. میانگین بازدارندگی در باکتری اشرشیاکولی نیز در در نور ۱۵۰ میکروانیشتین در مترمربع بر ثانیه محیط کشت کنترل، فسفات 0.1 و نیترات 0.3 گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری با هم را نشان ندادند (شکل ۸ A و B).

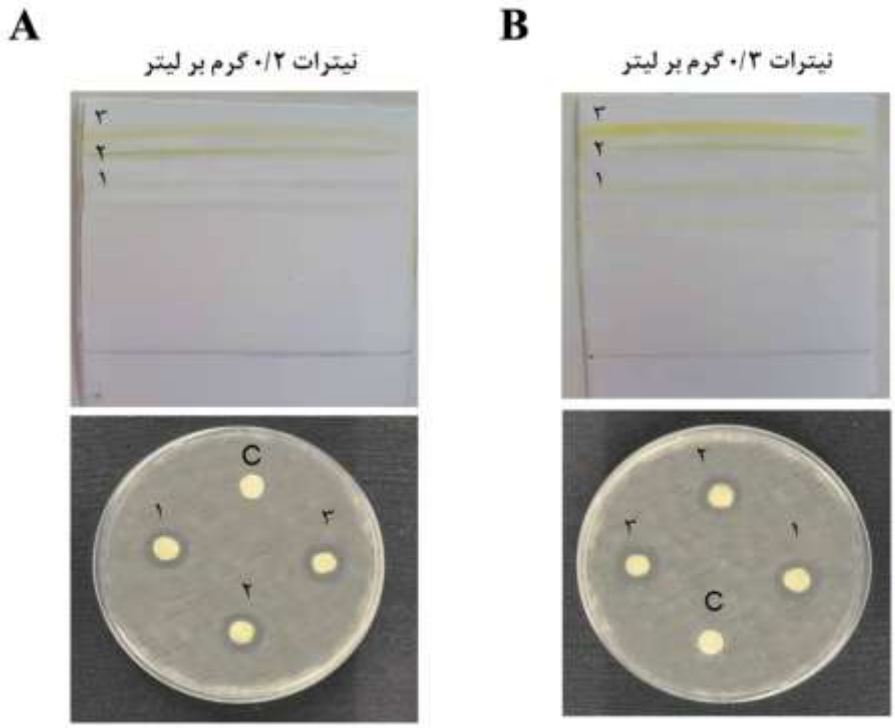


شکل ۵- نتایج تست آنتی‌بیوگرام نمونه مورد مطالعه در محیط کشت A) نیترات در مقابل باکتری *S. aureus* و B) محیط کشت کنترل در مقابل باکتری *E.coli*



شکل ۸- نمودار مقایسه میانگین آنتی بیوگرام A) سویه *Staphylococcus aureus* و B) سویه E.Coli در نور ۱۵۰ میکروانیشتین در مترمربع بر ثانیه در محیط کشت‌های مختلف در ابتدا و بعد از ۳۰ روز

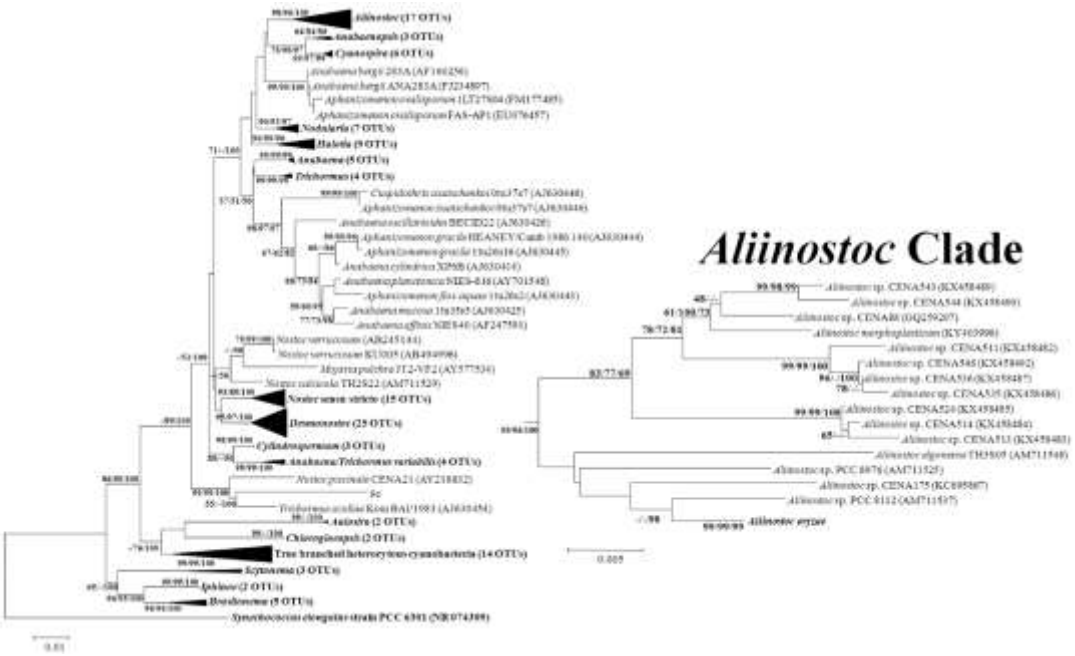
نتایج حاصل از آزمون TLC: نتایج آزمون TLC روی زیست توده حاصل از کشت سویه مطالعه شده در محیط کشت ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم نیترات، سه باند مجزا را نشان دادند. هر سه باند حاصل در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موثر بودند که نشان دهنده حضور ماده موثر ضدباکتریایی در سه باند حاصله است.



شکل ۶- محیط کشت نیترات A) ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و B) ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر در نور ۱۵۰ میکروانیشتن در متر مربع بر ثانیه

نتایج حاصل از شناسایی مولکولی سویه مورد مطالعه: درخت فیلوژنتیک، روابط فیلوژنتیک بین سویه مورد مطالعه و سویه‌های مشابه را بر اساس توالی ژن16S rRNA نشان داده است. اعداد کنار هر گره انشعابی، نشان‌دهنده فراوانی حاصل از آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. با توجه به

درخت فیلوژنتیک رسم شده، هر شاخه روابط بین آرایه‌ها از نظر نسل یا جد (نیاکان) را معین می‌کند. طول شاخه، بیانگر میزان تفاوت‌ها نسبت به نیای مشترک است (شکل ۱۰). درخت رسم شده با روش Iq tree web server نشان داد که سویه مورد مطالعه با قرابت فیلوژنتیکی ۹۹ ٪ همراه با سایر سویه‌های *Aliinostoc* درون یک کلاد قرار گرفته است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- روابط فیلوژنتیک بین سویه مورد مطالعه و سویه‌های مشابه را بر اساس توالی ژن 16S rRNA را نشان می‌دهد.

بحث

در مطالعه حاضر به بررسی بهینه‌سازی شرایط کشت برای بیشترین تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی و ترکیبات بیواکتیو تحت تاثیر محیط میکسوتروفیک توسط سیانوباکتری ریسه ای آب شور *Aliinostoc oryzae* پرداخته شد. بیشتر بودن میانگین کشت نیترات در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم بر لیتر) در نور ۱۵۰ میکرو انشتین در متر مربع نسبت به نور ۵۰ میکروانشتین در متر مربع همسو با نتایج مطالعه Abbaspour و همکاران در سال (۲۰۲۰) و مطالعه El-Sheekh و همکاران در سال (۲۰۰۶) بوده است. در مطالعه Abbaspour میزان تولید اگزوپلی-ساکارید و فعالیت ضدباکتریایی به شرایط کشت و شدت روشنایی به هم وابسته بودند، همچنین در شرایط غیردیازتروفیک با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار و روشنایی ۵۰ و ۱۵۰ میکرو انشتین در مربع بر ثانیه نیز بستگی داشت. در مطالعه El-Sheekh افزایش غلظت نیترات محیط به افزایش تولید ضد میکروبی منجر شد. Yu و همکاران در سال (2009) به بررسی شرایط رشد و تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی سلول‌های تاژکدار *Nostoc* در کشت میکسوتروفیک پرداختند که در این مطالعه نرخ رشد سلول‌ها و میزان استخراج پلی‌ساکارید در محیط کشت گلوکز با شدت نور ارتباط مستقیمی داشت. علاوه بر آن، در نتایج این مطالعه نیز شدت نور با میزان استخراج پلی‌ساکارید ارتباط مستقیم دارد. نتایج این مطالعه همسو با مطالعه Khazi و همکاران در سال ۲۰۱۸ و Seddek و همکاران، ۲۰۱۹ بود. در مطالعه Elias و همکاران در

سال ۲۰، سه سویه سیانوباکتری برای تولید فیکوبیلی‌پروتئین مورد بررسی قرار گرفت و تأثیر نیترات سدیم، نیترات پتاسیم و کلرید آمونیوم بر رشد و ترکیب فیکوبیلی‌پروتئینی سویه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که *PHormidium* sp. و *Pseudoscillatoria* sp. می‌توانند انتخاب‌های خوبی برای تولید فیکوسیانین باشند (Seddek وهمکاران، ۲۰۱۹؛ Elias و همکاران؛ ۲۰۲۱؛ Khazi و همکاران، ۲۰۱۸).

در مطالعه حاضر، در تست آنتی‌بیوگرام از باندهای خالص شده در ورقه ژل برای انجام آزمایش تعیین فعالیت ضدمیکروبی استفاده شد و نتایج بدست آمده در دو حالت قبل و بعد بررسی شدند. میانگین استخراج پلی‌ساکارید با حضور باکتری *Staphylococcus aureus* در نور ۱۵۰ در محیط کشت نیترات در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم بر لیتر بعد از ۳۰ روز اختلاف معنی داری داشتند و همچنین E.*Coli* در نور ۱۵۰ میکرو انشتین در متر مربع در ثانیه تفاوت معنی‌داری نداشتند.

برای بررسی میانگین میزان استخراج پلی‌ساکارید در تولید پلی‌ساکاریدهای برون سلولی سیانوباکتری‌ها چند نوع محیط کشت در نور ۱۵۰ میکرو انشتین در متر مربع در ثانیه و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شده است. با توجه به مقدار p-value<0.001 نشان داده شد که میانگین میزان استخراج پلی ساکارید تولید پلی‌ساکاریدهای برون سلولی سیانوباکتری در محیط کشت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

میانگین تولید پلی‌ساکارید در محیط کشت نیترات ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین تولید پلی‌ساکاریدهای در محیط کشت نیترات با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر تفاوت معنی‌داری باهم داشتند. نتیجه این مطالعه ۵۰ درصد با مطالعه Borsari همسو است. در مطالعه Borsari و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی رشد سیانو باکتری *Nostoc* در محیط کشت میکسوتروفیک که شامل گلوکز، ساکاروز و نیشکر ملاس برای تولید فیکو بیلی پروتیئن پرداختند (Borsari و همکاران، ۲۰۰۷). در این مطالعه از محیط کشت گلوکز و ساکاروز و ملاس نیشکر به‌عنوان محیط کشت برای تولید زیست توده فیکو بیلی پروتئین توسط *Nostoc* sp. با تغییر غلظت BG11 استفاده شد که نشان داد میزان تولید فیکوبیلی پروتئین از سیانو باکتری *Nostoc* sp. در محیط میکسوتروفیک نسبت به محیط کشت اتوتروف بیشتر است یعنی گلوکز و ساکاروز و ملاس نیشکر تولید بیشتری نسبت به محیط کشت اتوتروف داشتند. در مطالعه Yu و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی ویژگی‌های رشد سیانوباکتریوم *Nostoc* sp. در محیط کشت‌های فوتواتوتروفیک، میکسوتروفیک و کشت هتروتروف پرداختند و یافتند که در محیط کشت میکسوتروفیک رشد فیلامنتها بیشتر است، نتایج حاصل از این مطالعه هم از نظر محیط کشت همسو با مطالعه حاضر بود (Ahmadi و همکاران، ۲۰۱۳).

برای بررسی اینکه آیا میزان تولید پلی‌ساکارید و مواد تراوش شده در تست آنتی‌بیوگرام در محیط کشت‌های مختلف و در نور ۱۵۰ میکروانشتین در مربع در ثانیه و باکتری E.*Coli* و *Staphylococcus aureus* تفاوت دارد یا خیر از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد که با توجه به مقدار p-value<0.001 نشان داده شد که میزان تولید پلی‌ساکارید مواد تراوش شده در تست آنتی‌بیوگرام در محیط کشت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری دارند. در کل نتایج بررسی نشان داد که میزان تولید پلی‌ساکارید در محیط کشت‌های نیترات بیشتر است. نتایج مطالعه El-Sheekh و همکاران در سال (2006) همسو با مطالعه حاضر است. در مطالعه El-Sheekh وهمکاران در سال 2006 مطالعه به بررسی تولید و شناسایی ماده

فعـــال ضـــد میکروبـــی از ســـیانوباکتریوم *Nostoc muscorum* پرداختند. در ایـن مطالعـه سـیانو بـاکتری *Nostoc muscorum* فعالیـت آنتاگونیسـتی بـر علیـه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد.

Ahmadi و همکاران در سال (2013) بـه بررسـی مطالعه خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی، اتری و آبی برخی از گونه‌هـای سـیانوباکتری‌هـا در شـرایط آزمایشگاهی پرداختند. نتایج نشان داد هر سـه عصـاره متانولی، اتری و آبـی *Fischerella* آمبیگـوآ و عصـاره آبی سینکوکوس الانگاتوس دارای اثرات ضـدباکتریایی قابـــل ملاحضـــه‌ای بودنـــد. عصـــاره اتـــری *Fischerella* آمبیگـــوآب بیشـــترین تـــاثیر را بـــر *Staphylococcus aureus* و *Hylococcus Stap epidermidis* داشـت. نتـایج ایـن مطالعـه تقریبـا ۳۰ درصد با مطالعـه حاضـر همسـو اسـت (Ahmadi و همکاران، ۲۰۱۳).

نتیجه‌گیری

انواع گوناگون سیانوباکتری بـه شـکل منـابع قابـل توجهی بـرای اسـتخراج پلـی سـاکارید در کشـت‌هـا همواره مورد توجه است. در واقـع ایـن مـواد از نظـر صـنعتی بسـیار بـا ارزش هسـتند و در زمینـه‌هـای کشاورزی، غذا و مواد دارویی، ترکیبات بیوشیمیایی به انـدازه زیـادی بـا ارزش هسـتند. در سـالهای اخیـر استخراج و تشخیص چندین متابولیت مختلف و تـازه با فعالیتهای دارویی مانند داروهای ضد سرطانی، آنتـی بیوتیک، سیانوباکتری‌ها و همچنین ترکیبات بازدارنـده پروتئـازی و نظـایر آن از سـیانوباکتری‌هـا، کـاربرد سیانوباکتری‌هـای بـه شـکل موجـودات بـا ارزش در صنایع داروسازی را بیشتر روشن کرده است، به همین مقایسه میزان پلی ساکاریدها تولیـد شـده و همچنـین بهینه ساختن محیط کشت از قدم‌های موثر در پیشنهاد دادن سـویه‌هـای سـیانوباکتریایی اسـت و همچنـین نوآوری و استفاده از محـیط کشـت جامـد در مطالعـه حاضر باعث شده بیشترین بهره وری از ترکیبات فعال ضد باکتریایی داشته باشیم. شایان ذکر است اگـر چـه مطالعات زیـادی در زمینـه اثـر بازدارنـدگی ترکیبـات ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها انجام شده است، با توجه به اهمیت مواد خارج سلولی از لحاظ پتانسیل کـاربرد صنعتی برای تثبیت تجاری مواد شـیمیایی ناپایـدار در کشاورزی، غذا، مواد دارویی، ترکیب‌های بیوشـیمیایی و مخصوصا ثبات کیفیت مواد و با توجه بـه ایـن کـه این قبیـل تحقیقـات در کشـور، هنـوز در حـد کـاملا مقدماتی است، انجام اینچنین تحقیقاتی می تواند منجر به گسترش استفاده از این مواد پلیمریـک بـا ارزش از لحاظ صنعتی شود. از طرفی دیگر نمونه مورد بررسـی برای اولین بار از آبهـای شـور ایـران اسـتخراج شـده است، لذا تاکنون مطالعه ای در این سویه انجام نشـده است.

در حقیقـت پـژوهش حاضـر در ایـن زمینـه جـزو نخستین مطالعات انجام شده در ایـران اسـت و نتـایج آن می‌تواند ایده‌های جدیدی بـرای توسـعه داروهـای ضـد باکتریایی در صنایع داروسازی باشـد. در مطالعـه حاضـر افزایش غلظت نیترات در محیط کشت و شدت روشنایی سبب افزایش پلی ساکارید خارج سلولی شد.

References

Abbaspour, S., Nowruzi. B., and Hamidi, S.M.M. 2020. Optimizing the Cultivation Conditions of Fischerella sp. SH.A Cyanobacterium for Maximizing Polysaccharide Production with Antibacterial Activity. Biological journal of Microorganism. 9, 23-53.

Ahmadi, Asb China., Salman, Safari, Moin, Soltani, Neda and Kamali Maryam. 2013. Study of antibacterial properties of methanolic, ethereal and aqueous extracts of some species of

cyanobacteria in laboratory conditions. Magazine of Mazandaran University of Medical Sciences. 24, 54-39

Alcorta, J., Vergara-Barros, P., Antonaru, L.A., Alcamán-Arias, M.E., Nürnberg, D.J., and Díez, B. 2019. Fischerella thermalis: A model organism to study thermophilic diazotrophy, photosynthesis and multicellularity in cyanobacteria. Extremophiles. 23,635-647

Andersen, L.B., Harro, M., Sardinha, L.B., Froberg, K., Ekelund, U., and Brage, S., et al. 2006. Physical activity and clustered cardiovascular risk in children: a cross-sectional study (The European Youth Heart Study). The Lancet. 368, 299-304.

Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques: Elsevier.

Borsari, R.R., Morioka, L.R., Ribeiro, M.L., Buzato, J.B., and Pinotti, M.H. 2007. Mixotrophic growth of Nostoc sp. on glucose, sucrose and sugarcane molasses for phycobiliprotein production. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 29, 9-13.

Boussiba, S., and Richmond, A.E. 1980. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga Spirulina platensis. Archives of Microbiology. 125, 143-7.

Briones-Nagata, M., Martinez-Goss, M., and Hori, K. 2007. A comparison of the morpho-cytology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, Nostoc commune Vauch., from the Philippines and Japan. Journal of applied phycology.19, 675-83.

Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry. 2, 498-503.

Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health; perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology. 84, 11-18.

Chandini, S.K., Ganesan, P., and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food chemistry. 107, 707-13.

Cho, M., Yang, C., Kim, S.M., and You, S. 2010. Molecular characterization and biological activities of watersoluble sulfated polysaccharides from Enteromorpha prolifera. Food science and Biotechnology. 19, 525-33.

De Philippis, R., and Vincenzini, M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. FEMS Microbiology Reviews. 22, 151-75.

Dietrich, D.R., Fischer, A., Michel, C., and Höger, S.J. 2008. Toxin mixture in cyanobacterial blooms–a critical comparison of reality with current procedures employed in human health risk assessment. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs: Springer; p. 885-912.

Dussault, D., Vu, K.D., Vansach, T., Horgen, F.D., and Lacroix, M. 2016. Antimicrobial effects of marine algal extracts and cyanobacterial pure compounds against five foodborne pathogens. Food chemistry. 199, 114-8.

El-Sheekh, M.M., Osman, M.E., Dyab, M., and Amer, M.S. 2006. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium Nostoc muscorum Toxicol. PHarmacol. 21, 42-50.

Elias, S.A., Leonidovna, F. L.2021. Bio indicators of Laban lakes identified by marker gene 16sr RNA Cyanobacteria. Multidisciplinary academic research.

Hu. Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., and Seibert, M., et al. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The plant journal. 54, 621-39.

Khazi. M.I., Demirel, Z., and Dalay, M.C. 2018. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. Journal of applied phycology. 30, 1513-23.

Laurienzo, P. 2010. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. Marine drugs. 8,2435-65.

Nowruzi, B., Akhavan Sepahi, A., and Soltani Savoji, G.H. 2019. Genetic analysis of nonribosomal peptide synthesis genes (NRPSs) in natural product biosynthesis of the cyanobacterial strains of Lavasan lake. Biological Joutnal of Microorganisms

Nowruzi, B., Khavari-Nejad, R.A., Sivonen, K., Kazemi, B., Najafi, F., and Nejadsattari, T. 2012. Identification and toxigenic potential of a Nostoc sp. Algae. 27, 303-313.

Ozturk, S., and Aslim, B. 2010. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. Environmental Science and Pollution Research. 17, 595-602

Rodrigues, J.A.G., Queiroz, I.N.L.D., Quinderé, A.L.G., Vairo, B.C., and Mourão, P.A.d.S. 2011. Benevides NMB. An antithrombin-dependent sulfated polysaccharide isolated from the green alga Caulerpa cupressoides has in vivo anti-and prothrombotic effects. Ciência Rural. 41, 634-9.

Seddek, NH., Fawzy,M.A., El-Said,W.A., and Ahmed, MMR. 2019. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and characterization of bioactive substances from freshwater blue-green algae. 2019. Global Nest J. 21, 328-336.

Singh, S.P., and Montgomery, B.L. 2011. Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. Trends in microbiology. 19,278-85.

Tseng, C. 2001. Algal biotechnology industries and research activities in China. Journal of Applied Phycology. 13, 375-80.

Wijesekara, I., Pangestuti, R., and Kim, S-K. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate polymers. 84, 14-21.

Yu, H., Jia, S., and Dai, Y. 2009. Growth characteristics of the cyanobacterium Nostoc flagelliforme in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. Journal of Applied Phycology. 21, 127-33.

Journal of New Technologies in Aquaculture Development, Azadshahr Branch, Islamic Azad University
Vol. 16, No. 1, Spring 2022

Optimization of mixotrophic culture medium for maximum production of extracellular polysaccharides and bioactive compounds *Aliinostoc oryzae* cyanobacteria isolated from saline water of Golestan province

G. Ensaf[1], B. Nowruzi[1*], S. Falsafi[2]

[1] Department of Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

The synthesis of extracellular polysaccharides in microorganisms, especially cyanobacteria, plays a major role in protecting the cell against many stresses in different habitats. In recent years, cyanobacterial strains belonging to the Nostocaceae family are of interest as acceptable sources for polysaccharide production in liquid and solid suspension cultures. Therefore, in this research, the optimization of culture conditions for maximum production of extracellular polysaccharides and bioactive compounds under the influence of mixotrophic environment by filamentous cyanobacteria isolated from salt water has been studied. In the upcoming study, with the aim of investigating the effective factors in optimizing the production of exopolysaccharides and the effect of the mixotrophic environment, the cyanobacterium *Aliinostoc oryzae* strain was isolated from the salty waters of Golestan province, and after morphological and molecular identification, the amount of polysaccharide produced and its antimicrobial activity was investigated. The findings indicate that the amount of polysaccharide production from cyanobacteria depends on the conditions of the culture environment. The amount of polysaccharide production of cultures grown in nitrate concentration with concentrations of 0.04 and 0.06 g/ml and in light of 150 microns per square meter per second was significantly higher than the control. Antibiogram tests also showed that there was a significant difference in polysaccharide production in the presence of Staphylococcus aureus in nitrate culture. Investigations of the average production of extracellular polysaccharide extraction also showed a significant difference in different culture environments. Extracellular polysaccharide extracted from cyanobacteria has countless uses in the industry, including the pharmaceutical industry, food industry, and agriculture. Therefore, the optimization of the cyanobacterium culture conditions for the maximum production of polysaccharides appears. Since cyanobacterial exopolysaccharides are important from the point of view of biotechnology, it is important to pay attention to many other factors for maximum exopolysaccharide production in this genus of cyanobacteria.

Keywords Cyanobacterium *Aliinostoc oryzae*, Extracellular polysaccharide, Optimization, culture medium

[*]Corresponding author; bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir