فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۴

بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی سیانوباکتری *Anabaena* sp. جدا شده از تالاب‌های استان گیلان

رضا کریمی[۱]، اکبر نورسته نیا[۲]*، جنت سرمد[۲]

تاریخ دریافت: مهر ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴

چکیده

سیانوباکترهای هتروسیست‌دار گروهی از میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده ازت هوا هستند که به طور طبیعی در خاک مرطوب مزارع برنج و آب‌های شیرین تالاب‌ها رشد می‌کنند. سیانوباکتری‌ها منبع مهمی برای متابولیت‌های ثانویه هستند و می‌توانند انواع ترکیبات ضدباکتری، ضدقارچ، ضدلارو، ضدپروتوزوآ، ضدجلبک و به طور کلی ترکیبات ثانویه سمی تولید کنند. با توجه به کاربردهای وسیع صنعتی و دارویی سیانوباکتری‌ها، یکی از گونه‌های بومی جنس *Anabaena* در تالاب‌های استان گیلان مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی شامل باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Micrococcus luteus* و قارچ‌های *Fusarium fujikuro*i، *Rhizoctonia solani*، *Colletotrichum* sp. 62 و *Saccharomyces cerevisiae* بودند. قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و استنی به دست آمده از *Anabaena* با روش انتشار دیسک در محیط جامد و مقایسه آن‌ها با نمونه شاهد (بدون عصاره) از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد بررسی شد. تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت برای باکتری‌ها و مانکوزب برای قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌های مختلف *Anabaena* sp. مورد استفاده در این بررسی در مقابل باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش اثرات بازدارنده نداشت.

واژگان کلیدی: *Anabaena*، *عصاره ضدمیکروبی، هاله عدم رشد.*

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: norasteh@guilan.ac.ir

مقدمه

تولیدات طبیعی حاصل از ریزجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی ضروری در زمینه سلامتی مورد استفاده هستند. به دنبال بررسی متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتری‌ها، ترکیبات فعال زیستی با ویژگی‌های ضدمیکروبی شناسایی شده است (Trias and Gordon, 1997).

سیانوباکتری‌ها که پیش‌تر به گروه جلبک‌های سبز- آبی نیز معروف بودند، یوباکترهای گرم منفی هستند که تاریخچه تکاملی آن‌ها به ۳/۵ میلیارد سال قبل برمی‌گردد (Thajuddin and Subramanian, 2005). این باکتری‌ها در محیط‌های مختلف خاکی، آبی و دریایی پراکنده هستند و به واسطه تنوع وسیع گونه‌ای و زیستگاهی به عنوان نشانگرهای زیستی زیستگاه‌های آبی محسوب می‌شوند. فتوتروف بودن و عدم نیاز به مواد آلی در کشت سیانوباکتری‌ها از نظر زیست‌فناوری یک مزیت اقتصادی محسوب می‌شود که به آن‌ها، نسبت به دیگر موجودات ذره‌بینی، برتری می‌دهد.

سیانوباکتری‌ها دارای کاربردهای متنوع در صنایع دارویی، پژوهش‌های علمی، تولید مواد غذایی برای انسان، دام و آبزیان هستند و با داشتن مسیرهای سوخت و ساز ویژه، امکان دستیابی به ترکیبات جدید در آن‌ها بیش‌تر است (Victory, 2009).

در سال‌های اخیر ترکیبات ضدمیکروبی متعددی از سیانوباکتری‌ها جداسازی شده‌اند که هرکدام دارای طیف اثر متنوعی روی باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند. ترکیبات ضدقارچی تولید شده توسط آن‌ها شامل پپتیدها، پلی‌کتیدها و آلکالوئیدها است (Shishido et al., 2015). سیانوباکترهای راسته‌های Stigonematales، Nostocales و Oscillatoriales از جمله گروه‌هایی از سیانوباکتری‌ها هستند که ترکیبات مختلفی مانند Hapalindole، Fisherellin A، Tjipanazole، Tolytoxin، Carazostatin، Nostocyclamide، Toyocamycin و Scytophycin در آن‌ها گزارش شده است (Abed et al., 2009).

با وجود مطالعات زیادی که در زمینه ترکیبات فعال زیستی سیانوباکتری‌ها صورت گرفته است، اما در این میان، پژوهش‌های داخلی سهم اندکی را به خود اختصاص داده‌اند. پژوهش حاضر به مطالعه برخی پارامترهای ضدمیکروبی و فیتوشیمیایی سیانوباکتری

Anabaena sp. جداسازی شده از تالاب‌های استان گیلان پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سیانوباکتری

نمونه‌های محیطی متعددی برای جداسازی سیانوباکتری جنس *Anabaena* از تالاب‌های استان گیلان برداشت شد. عمل خالص‌سازی با روش پلیت آگار (Victory, 2009) و با استفاده از محیط کشت زایندر منفی انجام شد (ناصر علوی، ۱۳۸۰). رشته‌های سیانوباکتریایی رشد یافته بر سطح پلیت با چندین بار کشت مجدد خالص شدند. شناسایی با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلید شناسایی معتبر صورت پذیرفت (Tiwari et al., 2011).

شرایط کشت

محیط کشت مایع زایندر منفی برای کشت سیانوباکتری *Anabaena* sp. شامل عناصر $FeCl_3$، $NaCl$، Na_2CO_3، $CaCO_3$، KH_2PO_4، $MgSO_4+7H_2O$، HCl، Na_2EDTA، $MnCl_2+4H_2O$، $Na_2CO_3+9H_2O$، H_3BO_3، $CO(NO_3)_2+6H_2O$، $LiCl$، KBr، $Al_2(SO_4)_3+18H_2O$، $ZnSO_4+7H_2O$، $CuSO_4+5H_2O$، $KI(NH_4)_6$ و $MO_7O_{27}+4H_2O$ بود. سیانوباکتری به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در شرایط استریل منتقل شد. سپس ارلن‌ها به اتاقک کشت منتقل و در شرایط پایه با pH ۸، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شدت نوری ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه قرار گرفتند.

آماده‌سازی عصاره‌های مختلف سیانوباکتری *Anabaena* sp.

در این پژوهش، تهیه عصاره‌ها با استفاده از چهار نوع حلال آبی، استنی، اتانولی و متانولی به روش Bharat و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت. بدین ترتیب که برای تهیه عصاره آبی به ۰/۵ گرم *Anabaena* sp. تازه ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)[1] اضافه شد. سپس سونیکیت (Misonix Sonicator 3000، ایران) به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ صورت گرفت و پس از سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه محلول رویی در دسیکاتور قرار گرفت. از عصاره خشک شده برای تهیه استوک اصلی (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)

1- Dimethyl Sulfoxide

استفاده شد. برای تهیه عصاره استنی به سیانوباکتری مذکور به صورت قطره‌ای ۱۰ میلی‌لیتر استن ۵۰ درصدی که در فریزر نگهداری شده بود، اضافه شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) نگهداری و پس از آن ۱۰ ثانیه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی در دسیکاتور و مراحل قبلی تکرار شد.

عصاره اتانولی با روش سوکسله و با اتانول ۱۰۰ درصد انجام شد. ابتدا ۲/۷ گرم پودر سیانوباکتری به همراه ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۱۰۰ درصد به مدت ۴ ساعت در دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. سپس توسط روتاری (DV-42N-250، آمریکا) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس تغلیظ صورت گرفت و تغلیظ بیش‌تر درخلاء و با کاهش فشار در دسیکاتور انجام شد. عصاره خشک شده در ظرف استریل در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال نگهداری شد.

برای تهیه عصاره متانولی ابتدا به ۰/۵ گرم پودر سیانوباکتری، ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۹۰ درصد اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه سونیکیت شد و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد، محصول با کاغذ واتمن صاف شد و برای تبخیر حلال چند ساعت در انکوباتور قرار گرفت.

از همه عصاره‌ها استوک اصلی (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. تمام عصاره‌های بالا زمان تهیه استوک اصلی (مادر)، توسط فیلتر با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند.

تعیین فعالیت ضدمیکروبی

فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های سیانوباکتریایی روی کدورت نیم مک فارلند[1] (معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU/ml) باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Micrococcus luteus* و قارچ‌های *Fusarium fujikuroi*، *Rhizoctonia solani*، *Colletotrichum* sp. و *Saccharomyces cerevisiae* به روش Jassbi و همکاران (۲۰۰۲) صورت گرفت. برای انجام آزمون ضدباکتریایی ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌ها توسط سمپلر به دیسک های بلانک (ساخت شرکت پادتن طب ایران) تلقیح شد تا برای دیسک‌گذاری روی پلیت‌های تلقیح شده با باکتری آماده شوند. دی‌متیل

1- McFarland’s Turbidity

سولفوکسید ۱۰٪ نیز به عنوان شاهد تحت شرایط ذکر شده به دیسک بلانک تزریق شد. پلیت‌ها به منظور ایجاد شرایط رشد مساعد باکتری، در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در اطراف دیسک های حاوی عصاره *Anabaena* sp. تعیین شد. این عمل ۵ بار تکرار شد.

برای بررسی فعالیت ضدقارچی، پلیت‌های تلقیح شده با مخمر و قارچ‌های دیگر به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق (۳۰ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. در این مرحله نیستاتین (۱۰۰٫۰۰۰IU/mL)، مانکوزب (۲g/mL) و کاپتان (۳g/mL) به عنوان شاهد مثبت و از دی‌متیل سولفوکسید ۱۰٪ به عنوان شاهد منفی استفاده شد (نیستاتین از شرکت دارو سازی جابرابن حیان تهیه شد و سایر قارچ کش‌ها از خدمات کشاورزی لاهیجان فراهم شدند).

سنجش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی

سنجش فیتوشیمیایی عصاره متانولی برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها (Mayer's Test)، تانن‌ها (Gelatin Test)، ساپونین‌ها (آزمون ایجاد کف یا Foam Test) و فلاونوئیدها (Shinoda's Test) انجام شد (Tiwari et al., 2011).

نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که هیچ یک از عصاره‌های آبی، اتانولی، استنی سیانوباکتری *Anabaena* sp. بر روی باکتری‌ها و مخمر و دیگر قارچ‌های مورد آزمایش اثر ضدمیکروبی نداشتند و هاله عدم رشد مشاهده نشد (جدول‌های ۱ و ۲). در حالی که هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد مشاهده شد (شکل ۱).

سنجش‌های فیتوشیمیایی

در آزمایش فیتوشیمیایی مقدماتی در این پژوهش، وجود آلکالوئید و ساپونین در عصاره متانولی سیانوباکتری *Anabaena* sp. بومی جداسازی شده نشان داده شد، اما حضور کیفی فلاونوئید و تانن مشخص نشد (جدول ۳). نتایج حاصل از شناسایی برخی ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره متانولی *Anabaena* sp. در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف سیانوباکتری *Anabaena* در باکتری‌های مورد مطالعه (میانگین ± خطای استاندارد)

	قطر هاله (mm)			
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*B. subtilis*
عصاره آبی	۰	۰	۰	۰
عصاره اتانولی	۰	۰	۰	۰
عصاره متانولی	۰	۰	۰	۰
عصاره استنی	۰	۰	۰	۰
عصاره شاهد*	۱۷±۲	۱۵±۲	۱۲±۱	۱۴±۲
عصاره شاهد**	۱۳±۱	۱۴±۲	۱۵±۲	۱۴±۲

* آنتی‌بیوتیک اریترومایسین استاندارد

** آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین استاندارد

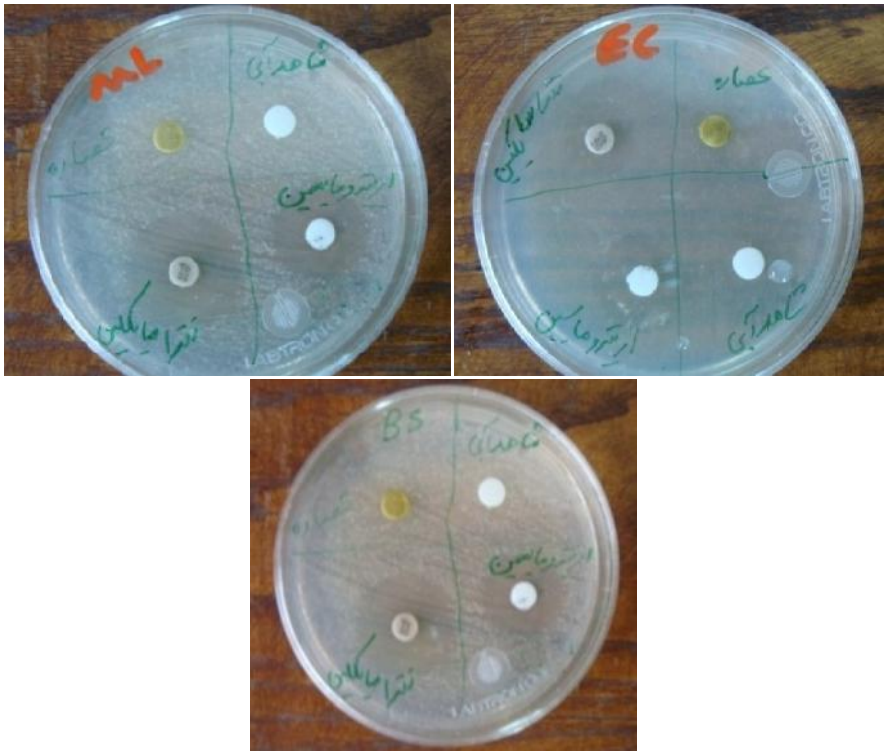
جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف سیانوباکتری *Anabaena* در قارچ‌های مورد مطالعه (میانگین ± خطای استاندارد)

	قطر هاله (mm)		
	Fusarium fujikuroi	*Colletotrichum* sp.	*Saccharomyces* cerevisiae
عصاره آبی	۰	۰	۰
عصاره اتانولی	۰	۰	۰
عصاره متانولی	۰	۰	۰
عصاره استنی	۰	۰	۰
عصاره شاهد*	۱۵±۲	۱۲±۱	۱۶±۲
عصاره شاهد**	۱۲±۱	۱۴±۲	۳۰±۲
عصاره شاهد***	-	۲۰±۲	-

* مانکوزب

** کاپتان

*** نیستاتین



شکل ۱: هاله عدم رشد *Escherichia coli* (بالا سمت راست)، *Micrococcus luteus* (بالا سمت چپ) و *Bacillus subtilis* (پایین) حاوی عصاره اتانولی سیانوباکتری *Anabaena* sp. در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اریترومایسین و عصاره آبی

جدول ۳: نتایج سنجش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی در سیانوباکتری *Anabaena* sp. جدا شده از تالاب‌های استان گیلان (میانگین ± خطای استاندارد)

ماده موثره موجود در عصاره	معرف به کار رفته	مشاهده مثبت	نتایج
آلکالوئید	Mayer’s Test	ایجاد کدورت و رسوب	+
ساپونین	Foam Test	ایجاد کف پایدار	+
فلاونوئید	Shinoda's test	رنگ ارغوانی	–
تانن	Gelatin Test	ایجاد رنگ آبی یا سبز در رسوب	–

+: حضور ماده موثره. – : عدم حضور ماده موثره.

بحث

استفاده بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و آفت‌کش‌های متنوع، سبب ورود آن‌ها به محیط زیست و افزایش سویه‌های مقاوم باکتری‌ها و قارچ‌ها شده است. در پژوهش حاضر اثرات ضدمیکروبی و ضدقارچی در هیچ کدام از عصاره‌های سیانوباکتری *Anabaena* sp. با حلال‌های آبی، استنی، متانولی و اتانولی مشاهده نشد. احتمالا یکی از دلایل مشاهده نشدن خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی در گونه مذکور آبزی بودن این گونه است. مطالعه Drobac-Cik و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نتایج مشابهی داشت. آن‌ها مطالعه‌ای بر روی سویه‌های مختلف *Anabaena* sp. و *Nostoc* sp. از هر دو محیط آبی و خاکی (خاک، شالیزار و غیره) انجام دادند و مشاهده کردند که عصاره متانولی سویه‌های آبی این دو جنس هیچ اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های *E. coli*، *Staphylococcus oxfordii*، *S. aureus* و *S. pyogenes* نشان نداد و تأثیر قابل توجه‌ای روی قارچ‌های مورد آزمایش (*Rhizopus* sp.، *Trichoderma* sp.، *Penicillium* sp.، *Aspergillus* sp.، *Cladosporium* sp.، *Candida albicans* و *Saccharomyces* sp.) نداشت. در حالی که بیش‌تر سویه‌های خاکزی که در سطح خاک و شالیزارها پیدا شدند خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی نشان دادند (Drobac-Cik et al., 2007).

عواملی چون میزان و نوع متابولیت‌های موجود در سیانوباکتری، همچنین نوع محیط کشت، مرحله رشد سیانوباکتری، روش عصاره‌گیری، غلظت عصاره، نوع حلال مورد استفاده در عصاره‌گیری، نوع سویه و نوع گونه مورد بررسی، بر اثرات ضدمیکروبی آن موثر است. بررسی Khairy و El-Kassas در سال ۲۰۱۰ با استفاده از ۵ عصاره متفاوت (اتیل استات، کلروفرم، دی اتیل اتر، متانول و آب) از سه سیانوباکتری *Anabaena flos*، *A. variabilis* و *Oscillatoria angustissima* بر روی باکتری‌های گرم مثبت (از جمله: *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*)، باکتری‌های گرم منفی (*Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Vibrio fluvialis*) و دو قارچ (*Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus*) نشان دادند که عصاره‌های اتیل استاتی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش تأثیر بیش‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت. عصاره اتیل استاتی *Anabaena flos* بالاترین اثر را بر دو قارچ مذکور داشت. این پژوهشگران دریافتند که

با افزایش غلظت عصاره‌ها اثرات ضدمیکروبی افزیش می‌یابد (Khairy and El-Kassas, 2010). بررسی Tiwari و Sharma (۲۰۱۳) نشان داد که اثرات ضدقارچی عصاره‌های متانولی و اتانولی *Anabaena variabilis* بر ضد دو پاتوژن گیاهی *Aspergillus niger* و *Rhizopus stolonifer* مثبت بود.

Farag و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که عصاره‌های آبی و اتانولی سیانوباکتری گونه *Anabaena circinalis* بر ضد *Serratia marcescens* و *Escherichia coli* فعالیت ضدباکتریایی داشت، با این حال تنها عصاره اتانولی آن علیه باکتری *Klebsiella pneumonia* و قارچ *Aspergillus flavus* موثر بود.

پژوهشگران معتقد هستند که دمای رشد، pH محیط کشت، مدت رشد، شدت نور و نوع محیط کشت فاکتورهای موثری برای تولید عوامل ضدباکتریایی هستند (Mundt et al., 2003). پژوهشگران دمای رشد بهینه برای تولید متابولیت‌های ثانویه توسط بیش‌تر سیانوباکترها از جمله *Anabaena* sp. را ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس می‌دانند (Robats and Zohary, 1987).

در یک مطالعه اثرات ضدباکتریایی سه عصاره آلی (کلروفرم، اتیل استات و N-بوتانول) از ده گونه سیانوباکتری (ازجمله *Anabaena variabilis*، *A. solitaria*، *A. spiroides*، *A. circinalis*، *Oscillatoria ornata* و *O. prolifica*) بر روی چهار باکتری پاتوژن ماهی از جنس *Aeromonas* (*A. salmonicida*، *A. hydrophila*، *A. formicans* و *A. liquefaciens*) بررسی شد. از بین همه عصاره‌های مورد استفاده، عصاره اتیل استات به دست آمده از *A. variabilis* و *A. circinalis* بیش‌تر از بقیه عصاره‌ها بر روی گونه‌های *Aeromonas* موثر بود (Neveen and Ibraheem, 2008). بنابراین استفاده از حلال مناسب در استخراج ترکیبات موثر بر روی باکتری‌ها حائز اهمیت است.

ترکیبات فیتوشیمیایی از جمله ترکیبات خاص گیاهی هستند که به عنوان متابولیت های ثانویه عمل می‌کنند (Oktay et al., 2003). در آزمایش فیتوشیمیایی مقدماتی در این پژوهش، آلکالوئیدها و ساپونین‌های فراوانی در عصاره متانولی سیانوباکتری *Anabaena* sp. بومی جداسازی شده، وجود داشت (جدول ۳). بر اساس داده‌های انتشار یافته آلکالوئیدها

به عنوان مواد موثره موجود در سیانوباکتری‌ها، بر برخی باکتری‌های پاتوژن اثرات بازدارندگی دارند و رشد آن‌ها را مهار می‌کنند (Ebana et al., 1991). از نظر زیست‌شناختی، ساپونین های گیاهی نیز از ترکیبات دفاعی در برابر میکروب‌های پاتوژن و علفخواران محسوب می‌شوند (Osbourn, 1996). ساپونین‌ها دارای خواص مفیدی برای انسان هستند. گیاهان *Panax* و *Glycyrrhiza* از منابع داروهای گیاهی حاوی ساپونین و گلیسیریزین با اثرات دارویی متنوع محسوب می‌شوند (Tiwari et al., 2011). بر اساس شرایط کشت سیانوباکتری *Anabaena* sp. و نوع روش شناسایی ترکیبات ثانویه در پژوهش حاضر، حضور موثر فلاونوئید و تانن مشاهده نشد. به نظر می‌رسد تولید متابولیت‌های ثانویه به شدت تحت تأثیر شرایط محیط باشد (Becerro and Paul, 2004; Gairola et al., 2010; Hrouzek et al., 2011).

ترکیبات موثره ضدمیکروبی در جنس *Anabaena* تا حد زیادی وابسته به شرایط رشد این سیانوباکتری است. از این رو در شرایط رشد در محیط‌های آبی مقادیر درون‌زاد آن‌ها به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد. در نتیجه، حداقل غلظت‌های مورد استفاده در این مطالعه هیچ گونه اثر ضدمیکروبی در محیط رشد باکتریایی و قارچی ایجاد نکرد. تغلیظ عصاره‌های به دست آمده از این سیانوباکتری و استفاده از طیف وسیع‌تری از حلال‌های آلی و میکروارگانیسم‌ها شاید بتواند راهی برای شناخت و بهره‌برداری بهتر از ترکیبات ضدمیکروبی موجود در این منبع زیستی باشد.

منابع

ناصر علوی م.ق. ۱۳۸۰. تأثیر فلزات سنگین بر رشد جلبک‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اهواز. ۶۹ص.

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

Becerro M.A. and Paul V.J. 2004. Effects of depth and light on secondary metabolites production andcyanobacterial symbionts of the sponge *Dysidea granulose*. Marine Ecology Progress Series, 280: 115–128.

Bharat N., Irshad M., Rizvi M.M.A. and Fatma T. 2013. Antimicrobial and cytotoxic activities of cyanobacteria. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 2(9): 4328–4343.

Drobac-Cik A.V., Dulic T.I., Stojanovic D.B. and Svircev Z.B. 2007. The importance of extremophile cyanobacteria in the production of biologically active compounds. Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad, 112: 57–66.

Ebana R., Madunagu B., Ekpe E. and Otung I. 1991. Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreriaocymoides Kola nitida* and *Citrus aurantifoli*. Journal of Applied Biotechnology, 71: 398–401.

Farag A.S., Ahmed A.I. and Ahmad M. 2014. Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. Archives of Biomedical Sciences: 2(2): 34–41.

Gairola S., Shariff N.M., Bhatt A. and Kala C.P. 2010. Influence of climate change on production of secondary chemicals in high altitude medicinal plants: Issues needs immediate attention. Journal of Medicinal Plants Research, 4(18): 1825–1829.

Hrouzek P., Tomek P., Lukesova A., Urban J., Voloshko L., Pushparaj B., Ventura S., Lukavsky J., Stys D. and Kopecky J. 2011. Cytotoxicity and secondary metabolites production in terrestrial *Nostoc* strains, originating from different climatic/geographic regions and habitats: Is their cytotoxicity environmentally dependent? Environmental Toxicology, 26(4): 345–358.

Jassbi A.R., Zamani-zadehnajari S., Azar P.A. and Tahara S.

2002. Antibacterial diterpenoids from *Astragalus brachystachys*. Zeitschrift fur Naturforschung C, 57: 1016–1021.

Khairy H.M. and El-Kassas H.Y. 2010. Active substance from some blue green algal species used as antimicrobial agents. Journal of Biotechnology, 9(19): 2789–2800.

Mundt S., Kreitlow S. and Jansen R. 2003. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. Journal of Applied Phycology, 15: 263–267.

Neveen A. and Ibraheem I.B.M. 2008. Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species. Journal of Biotechnology, 7(15): 2644–2648.

Oktay M., Gulcin I. and Kufrevioglu O.I. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. LWT-Food Science and Technology, 36(2): 263–271**.**

Osbourn A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell, 8: 1821–1831.

Robats R.D. and Zohary T. 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 21(3): 391–399.

Shishido T.K., Humisto A., Jokela J., Liu L., Wahlsten M., Tamrakar A., Fewer D.P., Permi P., Andreote A.P.D., Fiore M.F. and Sivonen K. 2015. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. Marine Drugs, 13(4): 2124–2140.

Thajuddin N. and Subramanian G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. Current Science, 89(1): 47–57.

Tiwari A. and Sharma A. 2013. Antifungal activity of *Anabaena variabilis* against plant pathogens. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 4(2): 1030–1036.

Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A review. Internationale Pharmaceutica Sciencia, 1(1): 98–106.

Trias J. and Gordon E.M. 1997. Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. Current Opinion in Biotechnology, 8(6): 757–762.

Victory K.J. 2009. Isolation and characterization of antimicrobial compounds synthesised by *Microcystis* sp. Ph.D. Thesis, University of Adelaide, Australia. 255P.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 3, Autumn 2015

Evaluation of antibacterial and antifungal activity in extracts of *Anabaena* sp. (Cyanobacteria) in Guilan wetlands

Reza Karimi [1], Akbar Norastehnia [2]*, Jannt Sarmad [2]

Received: October 2015 Accepted: December 2015

Abstract

Heterocyst-forming cyanobacteria are a group of N_2-fixing microorganisms which normally grow in the damp soil of rice farms and fresh water wetlands. Cyanobacteria are important source of secondary metabolites. They have been shown to produce a variety of antibacterial, antifungal, antilarval, antiprotozoan, antialgal, and generally, cytotoxic secondary metabolites. Considering the extensive industrial and pharmaceutical uses of blue-green algae, antimicrobial activity of the native *Anabaena* sp. from Guilan wetlands studied. Studied Bacteria included *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* and fungi included *Fusarium fujikuroi*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* sp. 62 and *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrobial effects were detected by Disk Agar Diffusion method. Tetracycline was used as a positive control for bacteria and mancozeb was used for fungi. The inhibition zone diameter was measured. The results showed that the extracts from *Anabaena* sp. were not effective against studied bacteria and fungi.

Key words: Anabaena, *Antimicrobial Extract, Zone Inhibition*.

1- Ph.D. Student in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding Author: norasteh@guilan.ac.ir