

Optimizing the Cultivation Conditions of *Fischerella* sp. SH.A Cyanobacterium for Maximizing Polysaccharide Production with Antibacterial Activity

Shadab Abbaspour

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. , sh.abbaspour.90@gmail.com

Bahareh Nowruzi*

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. , bahare77biol@gmail.com

Sayyed Mohammad Mahdi Hamdi

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. , mm_hamdi@asia.com

Abstract

Introduction: Among the photosynthetic microorganisms, cyanobacteria belonging to the genus *Fischerella* appear particularly promising for new polysaccharides producing strains. Extracellular polysaccharides (EPS) serve as a boundary to the immediate environment and play a protective role against antimicrobial agents. That is why cyanobacteria are so popular in the industry today as thickeners or floating agents, heavy metal absorbers, or in the case of sulfate polysaccharides as bioactive substances. This is an advantage over other polysaccharides extracted from plants or other macroalgae. There are many factors affecting cell growth and metabolite accumulation in cell cultures. However, there is insufficient knowledge about the factors affecting maximal EPS biosynthesis and antibacterial activity. In this regard, in this paper, the effect of some physical, environmental, and nutritional factors on the simultaneous production of exopolysaccharide by *Fischerella* sp. SH.A was investigated in order to select the best cultivation conditions for the industrial application of exopolysaccharides.

Materials and methods: In this study, the cyanobacterium isolated from the fresh water of Golestan province was undertaken with the aim of investigating the key factors regulating EPS biosynthesis and antibacterial activity. After the morphological and molecular identification, the possible correlations between the type of stress and the amount of polysaccharides production were also investigated.

Results: The obtained results indicated that EPS production and antibacterial activity were highly dependent on the culture conditions and light intensity. Furthermore, the production of exopolysaccharides in *non-diastrophic* conditions was highly correlated with the concentration of nitrate up to 500 mM and the illumination of 50 or 150 microeinsteins per second per square meter.

Discussion and conclusion: Since cyanobacterial extracellular polysaccharides are interesting from the biotechnological point of view, considering some other parameters are of crucial importance for the maximization of EPS production in this genus.

Key words: Cyanobacteria, Extracellular Polysaccharide, *Fischerella* sp. SH.A, Optimization

* Corresponding author

Received: December 31, 2019/ **Accepted:** May 20, 2020

فصل نامه متن شناسی ادب فارسی

معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان

سال نهم، شماره ۳۴، تابستان ۱۳۹۹، صص ۲۳-۵۳

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳۱

Doi: [10.22108/BJM.2020.120846.1261](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.120846.1261)

بهینه سازی محیط کشت سویه سیانوباکتریوم *Fischerella* sp. SH.A برای بیشترین تولید اگزوپلی ساکارید با فعالیت ضدباکتریایی

sh.abbaspour.90@gmail.com

شاداد عباسپور: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران،

bahare77biol@gmail.com

بهاره نوری*: استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران،

mm_hamdi@asia.com

سید محمد مهدی حمدی: دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران،

چکیده

مقدمه: در بین ریز موجودات فتوسنتز کننده، سیانوباکتریوم *Fischerella* sp. منبع نویدبخشی برای جستجوی پلی ساکاریدهای با ساختمان جدید است. اگزوپلی ساکاریدها مانند مرزی در برابر عوامل ضد میکروبی عمل می کنند؛ به همین علت، امروزه در صنعت به سیانوباکتری ها با عنوان عوامل غلیظ کننده یا شناور کننده، جاذب فلزات سنگین یا در زمینه پلی ساکاریدهای سولفات به شکل مواد بیواکتیو بسیار توجه شده است که خود مزیتی در مقایسه با دیگر پلی ساکاریدهای جدا شده از گیاهان و ریز جلبک های دیگر به حساب می آید. عوامل بسیاری بر رشد و تجمع متابولیت ها در کشت های سلولی تأثیر دارند؛ با وجود این، دانش کافی در زمینه عوامل مؤثر بر بیشترین بیوسنتز اگزوپلی ساکاریدها و فعالیت ضدباکتریایی وجود ندارد. در مطالعه حاضر، به منظور انتخاب بهترین شرایط کشت برای کاربرد صنعتی اگزوپلی ساکاریدها به بررسی تأثیر هم زمان برخی از عوامل فیزیکی، محیطی و غذایی بر تولید اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده از *Fischerella* sp. SH.A پرداخته شد.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر با هدف بررسی عوامل اصلی مؤثر بر بیوسنتز اگزوپلی ساکاریدها و فعالیت ضدباکتریایی، سیانوباکتریوم *Fischerella* sp. SH.A از آب های شیرین استان گلستان جداسازی و پس از شناسایی ریخت شناختی و مولکولی، همبستگی های احتمالی بین نوع تنش و میزان تولید پلی ساکارید و فعالیت ضدباکتریایی سنجیده شد.

نتایج: نتایج نشان دادند میزان اگزوپلی ساکارید تولید شده و فعالیت ضدباکتریایی بسیار به شرایط کشت و شدت روشنائی وابسته است؛ علاوه بر این، تولید اگزوپلی ساکارید در شرایط غیر دیازوتروفیک با غلظت نیترات ۵۰۰ میلی مولار و روشنائی ۵۰ یا ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه همبستگی دارد.

بحث و نتیجه گیری: از آنجا که اگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتریایی از دیدگاه زیست فناوری جالب توجه هستند، توجه به بسیاری از عوامل دیگر برای بیشترین تولید اگزوپلی ساکارید در این جنس اهمیت زیادی دارد.

واژه های کلیدی: سیانوباکتری ها، پلی ساکارید خارج سلولی، *Fischerella* sp. SH.A، بهینه سازی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

غشای خارجی و لیپولی ساکاریدی دیوارهٔ سیانوباکتری‌ها با باکتری‌های گرم منفی مشابه است؛ لایهٔ ضخیم پپتیدوگلیکانی دارد و با باکتری‌های گرم مثبت مشابه است. از دههٔ گذشته، بهره‌برداری صنعتی از سیانوباکتری‌ها سود بیشتری نسبت به دیگر پلی ساکاریدهای جدا شده از گیاهان یا درشت‌جلبک‌های دریایی به همراه داشته است؛ در نتیجه، پژوهش‌های وسیعی در زمینهٔ سویه‌های سیانوباکتری‌های دارای ظرفیت ترشح مواد موسیلاژی به منظور یافتن پلی ساکاریدهای جدید انجام شده‌اند؛ با وجود این، فقدان اطلاعات در زمینهٔ ژن‌های رمزگذاری‌کنندهٔ پروتئین‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتزی اگزوپلی ساکاریدها و عوامل کنترل‌کنندهٔ این مراحل، پتانسیل کاربرد زیست‌فناوری آنها را به شدت محدود کرده است (۱ و ۲). تفاوت در محتوای سولفور و ترکیب مونوساکاریدی گزارش شده برای غلاف و پلی ساکاریدهای محلول برخی از سیانوباکتری‌ها به شدت از فرضیهٔ مسیرهای بیوسنتزی مختلف پشتیبانی می‌کند؛ با وجود این، مطالعه‌های بیشتر برای روشن شدن این مسیرها در سیانوباکتری‌ها ضروری‌اند (۳ و ۴).

از آغاز دههٔ ۱۹۵۰، سیانوباکتری‌های بسیاری با قابلیت سنتز و آزادسازی پلی ساکاریدهای خارج سلولی^۱ به محیط معرفی شدند؛ به طوری که تاکنون، حدود ۷۰ سویه با قابلیت تولید پلی ساکاریدهای محلول معرفی شده‌اند. تمام مطالعه‌های انجام شده در زمینهٔ سویه‌های تولیدکنندهٔ پلی ساکاریدهای محلول به زیربخش‌های کروکوکالس^۲، اسیلاتوریالس^۳ و نوستوکالس^۴ مربوط می‌شوند. طی رشد سلول در کشت مایع، بخش‌هایی از مواد پلی ساکاریدی

شامل کپسول و لعاب^۵ به درون آب آزاد می‌شوند و غلظت محیط را افزایش می‌دهند. پلی ساکاریدهای محلول به آسانی از کشت‌های مایع بازیافت می‌شوند و بسیاری از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها برای کاربردهای صنعتی مناسب‌اند؛ این موضوع سبب شده است سیانوباکتری‌ها به جذاب‌ترین منبع برای تولید پلیمرهای جدید تبدیل شوند (۴-۸).

اطلاعات در دسترس از ترکیب مونوساکاریدی اگزوپلی ساکاریدهای سیانوباکتری‌ها به حضور مولکول‌هایی مانند یک یا دو یورونیک‌اسید^۶ اشاره می‌کنند که به ندرت در ترکیب اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده از سایر گروه‌های میکروبی یافت می‌شود. حضور گروه‌های سولفات، گروه‌های پیرووات و اسیدهای اورونیک سبب خاصیت آنیونی اگزوپلی ساکاریدها و بار منفی ماکرومولکول‌ها می‌شود. در نمونه‌های محدودی، حضور انواع دیگر مونوساکاریدها (برای نمونه، قندهای متیل و قندهای آمینو مانند N-استیل گلوکز آمین^۷، ۲ و ۳-O متیل رامنوز^۸، ۳-O متیل رامنوز^۹، ۴-O متیل رامنوز^{۱۰} و ۳-O متیل گلوکز^{۱۱}) گزارش شده است؛ این ویژگی با پلیمرهایی که باکتری‌ها یا ریز/درشت جلبک‌های دیگر سنتز می‌کنند و کمتر از چهار مونومر مختلف دارند، مغایرت دارد (۹ و ۱۰). در میان مونوساکاریدهای اگزوپلی ساکارید سیانوباکتری‌ها، گلوکز سهم بیشتری از نظر غلظت دارد؛ اگرچه تاکنون پلیمرهایی با قندهای دیگر مانند گزیلوز، آرابینوز، گالاکتوز و فروکتوز در غلظت‌های بیشتر از گلوکز نیز گزارش شده‌اند (۱۱ و ۱۲). ترکیب شیمیایی، نوع و میزان اگزوپلی ساکاریدهای تولیدی یک سویهٔ سیانوباکتری جزو ویژگی‌های پایدار و

آگزوپلی ساکاریدها بستگی دارد. از آنجا که منابع مختلف نیتروژنه، اسیدیته، میزان رقیق‌سازی، فاز رشد، حضور و غیاب منیزیم، کلسیم، پتاسیم و فلزهای سنگین، همچنین اضافه کردن گلی اکسیلات، استات، والرات، گلوکز، سترات و EDTA، تابش، چرخه روشنایی، دما، شوری، جریان هوا، مرحله رشد، سن کشت و غلظت سولفور، فسفر و پتاسیم تأثیر متفاوتی بر تولید آگزوپلی ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها دارند، مشکل بتوان نتیجه گرفت تفاوت‌های گزارش شده در تولید آگزوپلی ساکاریدها از تفاوت‌های فیزیولوژیکی گونه‌ها ناشی می‌شود یا با تفاوت در شرایط کشت آزمایشگاهی به کاررفته مرتبط است (۱۳، ۲۵ و ۲۶). طی چند سال گذشته، جداسازی چندین متابولیت متنوع و جدید با فعالیت‌های داروشناختی (ضدسرطانی، آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی) و همچنین ترکیبات بازدارنده پروتئازی و نظایر آن از سیانوباکتری‌ها و تشخیص آنها، اهمیت استفاده از این موجودات به شکل موجودات باارزش در صنایع داروسازی را آشکارتر کرده است (۲۷-۳۱)؛ از این رو، بررسی میزان آگزوپلی ساکاریدهای تولیدشده و همچنین مساعد کردن محیط، گام مهمی در معرفی سویه‌های سیانوباکتریایی بالقوه از نظر دارویی به شمار می‌آید. با توجه به مطالب یادشده، بررسی پتانسیل سیانوباکتری با عنوان موجود دارای قابلیت تولید پلی ساکاریدهای مفید و تعیین بهترین شرایط تولید مواد خارج سلولی از اهداف مقاله حاضر است و در این راستا، تأثیر برخی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر تولید پلی ساکارید خارج سلولی و ضدباکتریایی بررسی می‌شود.

به‌طور عمده وابسته به گونه و شرایط کشت است؛ هرچند ترکیب قندی آگزوپلی ساکارید تولیدی یک سویه معین ممکن است از نظر کمی و کیفی با سن کشت نیز مرتبط باشد (۱۳ و ۱۴). طی دهه گذشته، مطالعه‌های بسیاری برای فهم ژنتیکی و بیوشیمیایی بیوسنتز آگزوپلی ساکاریدها در باکتری‌ها انجام شده‌اند؛ اما اطلاعات در دسترس درباره سیانوباکتری‌ها در زمینه یادشده بسیار محدود است (۱۵).

سازوکارهای درگیر در سنتز مستقیم آگزوپلی ساکاریدها در باکتری‌ها بسیار محافظت شده هستند و از چهار مرحله مختلف شامل فعال‌سازی مونوساکاریدها و تبدیل آنها به نوکلئوتیدهای قندی در سیتوپلاسم، تجمع واحدهای تکراری با اضافه شدن پشت سرهم قندها به درون ناقل لپید به کمک گلیکوزیل ترانسفرازها در غشای پلاسمایی، پلیمریزاسیون واحدهای تکراری در سطح پری پلاسمی غشای پلاسمایی و صادر شدن پلیمر به سطح سلول تشکیل شده‌اند (۱۶-۱۹).

توانایی سنتز لایه پلی ساکاریدی خارج سلولی یکی از سازوکارهای حفاظتی سیانوباکتری‌ها برای زنده ماندن در زیستگاه‌های سخت است که از سلول‌ها در شرایط محیطی نامطلوب محافظت می‌کند (۲۰ و ۲۱). توانایی سلول‌های باکتریایی در سنتز مواد خارج سلولی با طبیعت پلی ساکاریدی به‌طور مستقیم با محدودیت‌های محیطی مرتبط است که ریزموجود با آن مواجه است (۲۲)؛ به‌طوری که تغییرات شرایط به‌ویژه تغییر محیط کشت سیانوباکتری‌ها با میزان تولید آگزوپلی ساکارید و ترکیبات ضدباکتریایی آنها ارتباط مستقیم دارد (۲۲-۲۴).

تکامل کاربردهای زیست‌فناوری آگزوپلی ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها به شناسایی عوامل مؤثر بر افزایش سنتز

مواد و روش‌ها

کشت و شناسایی ریخت‌شناختی سویه سیانوباکتریوم آب شیرین: ابتدا سویه سیانوباکتریوم آب شیرین جمع‌آوری شده از استان گلستان (39° 40' 26" N, 41° E) از مجموعه کشت سیانوباکتری‌های دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات Cyanobacteria Culture Collection (CCC) واقع در هرباریوم البرز تهیه و کشت داده شد. به منظور خالص‌سازی نمونه، چندین بار کشت‌های متوالی انجام شدند و در نهایت، کشت نمونه‌های خالص‌شده در محیط کشت جامد BG110 انجام شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ روز در اتاقک رشدی با دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ممتد فلورسنت با شدت ۳۰۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه^{۱۲} نگهداری شدند (۳۲).

شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی نمونه با میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج و با مراجعه به کلیدهای شناسایی (۳۳) انجام شد. چندین شاخص شامل طول و قطر سلول‌های رویشی، حضور هتروسیست^{۱۳} و آکینت^{۱۴}، ریخت‌شناسی سلول انتهایی، فاصله بین هتروسیست‌ها و فاصله نزدیک‌ترین آکینت، حضور یا غیاب هتروسیست‌های انتهایی، شکل رشته‌ها و تجمع در کلنی‌ها طی مطالعه‌های ریخت‌شناختی بررسی شدند (۳۴).

شناسایی مولکولی سویه سیانوباکتریوم آب شیرین

استخراج DNA ژنومیک: کشت‌های ده‌روزه برای استخراج DNA استفاده شدند؛ به این منظور، ابتدا باید از خلوص کشت‌ها اطمینان یافت و از این‌رو، آزمایش نمونه‌های آکزنیک با تلقیح در محیط کشت R2A (R2A LAB163) انجام شد؛ سپس ظرف‌های پتری تلقیح‌شده به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد یا به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رشد، حضور یا غیاب کلنی در اطراف هر نقطه بررسی شد و چنانچه کلنی باکتریایی در اطراف نقطه‌ای ایجاد شده بود، کشت‌های متوالی انجام شدند تا از خلوص نمونه اطمینان حاصل شود (۳۵).

استخراج DNA با استفاده از کیت E.Z.N.A. SP (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, Plant DNA kit NanoDrop GA, USA) انجام و DNA با اسپکتروفوتومتر NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., ND-1000 Wilmington, DE, USA) کیفیت‌سنجی شد (۲۸).

تکثیر ژن 16S rRNA به کمک PCR: تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگر رفت^{۱۵} و آغازگر برگشت^{۱۶} انجام (جدول ۱) و اندازه محصولات در مقایسه با DNA نشانگر (λ/HinfIII + φx/HaeIII; Finnzymes) سنجیده شد. محصولات PCR با استفاده از کیت GeneClean (Qbiogene/MP Biomedicals, Solon, OH, Turbo USA) خالص شدند (۲۸).

جدول ۱- آغازگرهای الگونیوکلئوتیدی 16S rRNA استفاده‌شده در مطالعه حاضر (۲۸)

Target gene/sequence	Sequence 5'→3'
16S rRNA	PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') B23S (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3')

سوئیس ارسال شد. بررسی‌های Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ژن 16S

توالی‌یابی، تجزیه و تحلیل و ثبت ژن: سویه مطالعه‌شده به منظور توالی‌یابی به شرکت میکروسینس

کشت‌های غیردیازوتروفیک به کار رفت (۴۰ و ۴۱). محیط کشت‌های آماده‌شده طبق آزمون‌های طراحی شده (الف تا د) در دو شدت روشنایی مختلف ۵۰ و ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه قرار گرفتند؛ به طوری که سمتی از اتاقک کشت، میانگین شدت روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه و سمت دیگر اتاقک کشت، میانگین شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه را دریافت می‌کرد (۴۲).

جداسازی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS):

استخراج پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی به روش تغییر یافته Ozturk و همکاران (۴۳) انجام شد. کشت‌های سی‌روزه برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی استفاده شدند. سلول‌ها در دمای اتاق و با سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه جدا شدند و رسوب با مقدار مناسبی آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. محلول به مدت 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 به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس بخش رویی شامل پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی جدا و هم‌حجم آن، اتانول اضافه شد. مخلوط در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار گرفت و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دو بار با اتانول ۹۶ درصد شسته و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب نهایی در ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل و در منفی ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

rRNA برای شناسایی شباهت توالی با توالی‌های مشابه در بانک اطلاعات ژنی NCBI انجام شدند (۳۶). عملیات ثبت ژن با نرم‌افزار bankit موجود در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank> انجام شد. به منظور دریافت کد دسترسی^{۱۷}، توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی شده دو سویه در پایگاه داده‌های (DDBJ)^{۱۸} ثبت شدند و به آنها رمز یا شماره‌ای تعلق گرفت که مخصوص آن توالی بود.

طراحی بهترین شرایط کشت برای بیشترین تولید آگروپلی ساکارید: مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی سیانوباکتری‌ها انتخاب شدند (۳۷ و ۳۸) و سپس با هدف تولید بیشترین میزان پلی‌ساکارید (متابولیت ثانویه ارزشمند)، برهم‌کنش چندین عامل اکوفیزیولوژیکی در دو شرایط تغذیه‌ای فتوتروف و میکسوتروف ارزیابی شد تا در نهایت، بهینه‌ترین شرایط کشت برای رشد سیانوباکتریوم آب شیرین به منظور تولید پلی‌ساکارید پیشنهاد شود.

الف- برای کشت‌های فتوتروفیک از محیط کشت BG-11₀ در شرایط دیازوتروف و بدون منابع نیتروژنه استفاده شد.

ب- برای تهیه محیط کشت میکسوتروفیک از غلظت‌های مختلف گلوکز (۲ و ۵ گرم بر لیتر) و سوکروز (۲ و ۵ گرم بر لیتر) استفاده شد.

ج- محیط کشت BG-11₀ با غلظت‌های متفاوت فسفات (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) برای کشت‌های غیردیازوتروفیک استفاده شد (۳۹).

د- محیط کشت BG-11₀ با غلظت‌های متفاوت نترات (۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار) (منبع نیتروژن) برای

بررسی آثار ضدباکتریایی به روش انتشار: در این روش

از دیسک‌های کاغذی آغشته به عصاره سیانوباکتریایی حل شده در متانول (بازدارنده رشد باکتری‌ها) استفاده و نتیجه به شکل هاله رشد نکردن ظاهر شد. به منظور مناسب کردن محیط کشت برای بیشترین تولید آگروپلی ساکارید، ابتدا سویه مدنظر در محیط کشت عمومی سیانوباکتری‌ها بدون منابع نیتروژنه کشت داده شد و سپس به بررسی قدرت ممانعت کنندگی سویه در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* (PTCC 1112) و *Bacillus cereus* (PTCC 1015) و *Escherichia coli* (PTCC 1047) و *Enterobacter sp.* 638 پرداخته شد. به منظور آماده کردن عصاره‌های سیانوباکتریایی از فاز ایستایی رشد (روز ۱۵) استفاده شد؛ به این ترتیب که زیست‌توده حاصل به کمک کاردک پلاستیکی از سطح هر ظرف پتری جمع‌آوری و به مدت ۱ ساعت در گرمخانه ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از زیست‌توده خشک شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون چند میکروتیوب تقسیم (هر کدام ۱۰۰ میلی‌گرم) و ۳۰۰ میلی‌گرم دانه شیشه‌ای ۰/۵ میلی‌متری (disruptor beads, Scientific Industries) و ۱ میلی‌لیتر حلال به هر کدام اضافه شد؛ سپس ورتکس به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد تا دیواره اسکلتی سیانوباکتری‌ها کاملاً از بین برود. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس بخش رویی برای بررسی ویژگی‌های ضدباکتریایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۴۴).

به منظور کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها از محیط کشت

مولر هیتون آگار استفاده شد؛ به این ترتیب که ۳۴ گرم پودر مولر هیتون آگار و ۰/۵ میکروگرم متیلن‌بلو در ۱ لیتر آب مقطر حل شد (به کمک هم‌زن مغناطیسی و روی هیترا). متیلن‌بلو کمک می‌کند پس از جامد شدن محیط و قرار گرفتن دیسک‌های کاغذی، قطر منطقه بازدارندگی^{۱۹} (IZ) با وضوح بیشتری مشاهده و اندازه‌گیری شود. پیش از آغاز آزمایش، باکتری‌ها آماده شدند؛ به این ترتیب که باکتری‌ها در محیط مولر هیتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. کلنی‌های رشد یافته باکتری‌ها به ۲ میلی‌لیتر محلول نمکی (کلرید سدیم ۰/۱۴۵ مولار) منتقل شدند تا سوسپانسیون تشکیل شود؛ سپس کدورت هر سوسپانسیون با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند^{۲۰} تنظیم شد. به منظور تهیه لوله ۰/۵ مک‌فارلند، ۱/۱۷۵ درصد کلرید باریم به ۹/۹۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۱ درصد اضافه شد؛ کدورت ایجاد شده تقریباً معادل $10^8 \times 1/5$ کلنی در هر میلی‌لیتر باکتری بود. پس از آماده‌سازی محیط کشت باکتری‌ها و تلقیح هر ظرف پتری با سوسپانسیون باکتریایی با کدورت تنظیم شده، هر دیسک با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره سیانوباکتریایی تلقیح شد. ظرف‌های پتری با پارافیلیم بسته و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه‌ای با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. قطر مناطق بازدارنده رشد شامل قطر دیسک کاغذی با خط‌کش اندازه‌گیری و به میلی‌متر گزارش شد (۳۱ و ۴۵). پس از یافتن هاله ممانعت از رشد باکتری آزمایش شده، سویه بررسی شده با غلظت‌های مختلف گلوکز و سوکروز (۲ و ۵ گرم بر لیتر)، فسفات (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) و نترات (۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار) کشت شد و ویژگی‌های ضدباکتریایی سنجیده

شدند.

MN817980 در بانک ژن ثبت شد.

جداسازی مواد بیواکتیو با TLC^{۲۱}: به منظور جداسازی

مادهٔ بیواکتیو دارای ویژگی‌های ضدباکتریایی، محیط کشتی که بیشترین قطر هالهٔ رشدنکردن را داشت، انتخاب و آزمون TLC انجام شد؛ به این ترتیب که زیست‌تودهٔ سیانوباکتریایی (۱۰ گرم وزن تر) رسوب‌گیری و با آب مقطر شسته و لیوفیلیزه شد. مقدار ۱ گرم از زیست‌تودهٔ به دست آمده دو بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول شسته و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به دست آمده تا زمانی که خشک شود، تبخیر و باقیمانده دوباره در متانول (۵ میلی‌لیتر) حل شد. به منظور استخراج به روش TLC (Mercksilicagel-60) از حلال تتراکلرید کربن: متانول (۹:۱ حجمی - حجمی) استفاده شد، سپس باندهای حاصل از هم جدا و در حلال متانولی حل شدند و دوباره آزمون آنتی‌بیوگرام برای هر یک از باندها انجام شد (۴۵).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های

هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و Excel انجام شد. تمام داده‌ها، نتایج سه تکرار بودند. تفاوت معنادار بین عوامل اندازه‌گیری شده به کمک آنالیز واریانس یک طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون توکی^{۲۲} بررسی شد. نتایج مقایسه‌ها به شکل نمودار با برنامهٔ Excel رسم شدند.

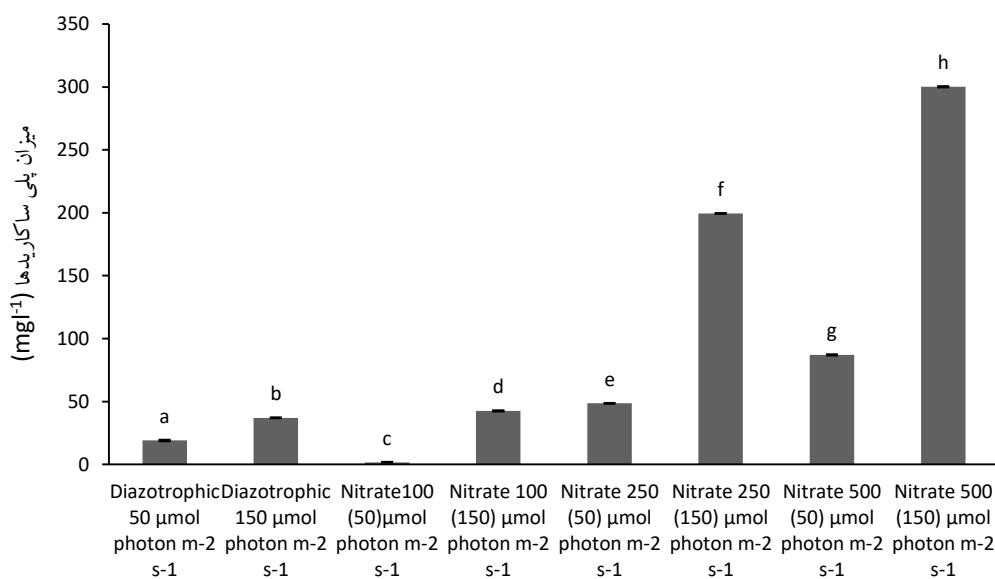
نتایج**نتایج تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی حاصل از ژن**

16S rRNA: سویهٔ مطالعه شده به میزان ۹۵ درصد با سویهٔ *Fischerella* sp. HKAR-5 شباهت نشان داد. سویهٔ مطالعه شده با نام *Fischerella* sp. SH.A و کد دسترسی

اثر غلظت‌های متفاوت نیتрат، فسفات، گلوکز و سوکروز بر میزان اگزوپلی ساکارید تولیدشده: نتایج تحلیل آماری SPSS و آزمون توکی نشان دادند استفاده از نیترات با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار و شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه با اختلاف معناداری دارای بیشترین میزان اگزوپلی ساکارید نسبت به سایر غلظت‌هاست؛ پس از آن، غلظت نیترات ۲۵۰ میلی‌مولار دارای بیشترین مقدار اگزوپلی ساکارید گزارش شد. نتایج نشان دادند استفاده از غلظت نیترات ۱۰۰ میلی‌مولار با اختلاف معناداری دارای کمترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید است. نتایج نشان دادند در شرایط غیردیازوتروفی، سویهٔ *Fischerella* sp. SH.A بیشترین انرژی خود را صرف تولید اگزوپلی ساکاریدها می‌کند. به نظر می‌رسد در دسترس بودن نیترات، مهم‌ترین عامل مؤثر بر تولید اگزوپلی ساکارید، تراکم سلولی و وزن خشک پلی ساکارید خارج سلولی در *Fischerella* sp. SH.A است؛ همچنین مقدار پلی ساکاریدهای خارج سلولی به شدت تحت تأثیر میزان روشنایی دریافت شده قرار دارد؛ به طوری که این میزان در کشت‌های رشد یافته در غلظت نیترات ۵۰۰ میلی‌مولار با روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه تقریباً ۳ برابر کشت‌های رشد یافته در همان غلظت نیترات با شدت روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه و ۸ برابر کشت‌های رشد یافته در شرایط شاهد با همان شدت روشنایی گزارش شد (شکل ۱) و تفاوت معناداری بین کشت‌های دیازوتروف و غیردیازوتروف وجود داشت. میزان پلی ساکاریدهای کشت‌های رشد یافته در غلظت نیترات ۵۰۰ میلی‌مولار با

اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در غلظت نترات ۵۰۰ میلی‌مولار با روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه ۱/۵ برابر و در روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه ۱/۷ برابر غلظت نترات ۲۵۰ میلی‌مولار بود. در کشت‌های با غلظت‌های مختلف نترات، روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه با تولید در مجموع ۵۴۲ میلی‌گرم اگزوپلی‌ساکارید، شرایط برتر شناخته شد (شکل ۱).

شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه برابر ۳۰۰ میلی‌گرم بود و میزان پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در کشت‌های رشد یافته در غلظت نترات ۵۰۰ میلی‌مولار با روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه به ۸۷ میلی‌گرم رسید و تقریباً ۸ برابر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در کشت‌های دیازوتروف با شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه و ۴/۵ برابر کشت‌های دیازوتروف با شدت روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه بود؛ همچنین میزان



شکل ۱- مقایسه میزان تولید اگزوپلی‌ساکاریدها (ستون‌های مشکی‌رنگ) در شرایط تغذیه‌ای با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار) نترات با شرایط دیازوتروفیک (شاهد) در شدت روشنایی ۱۵۰ و ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه؛ تحلیل‌های آماری با آزمون توکی، اختلاف معناداری ($P < 0.05$) را بین غلظت‌های مختلف نترات و شاهد نشان می‌دهند. اعداد هر نمودار، میانگین سه تکرار هستند و حرف‌های متفاوت در هر ستون نشان می‌دهند تفاوت معناداری بین میزان اگزوپلی‌ساکارید در غلظت‌های مختلف نترات وجود دارد.

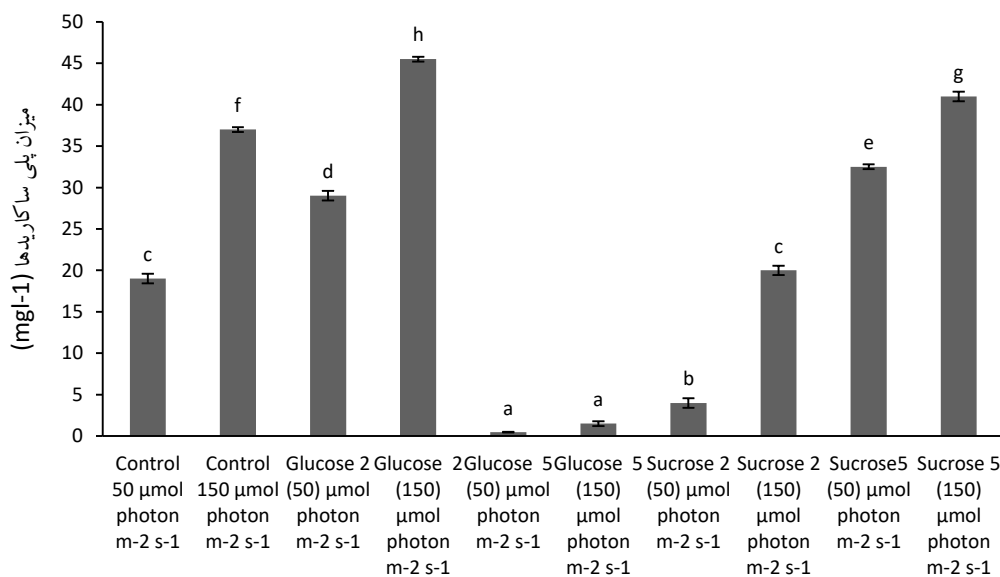
بیشترین مقدار پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در سویه *Fischerella sp. SH.A* و در حضور گلوکز با غلظت ۲ و ۵ گرم بر لیتر و روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع

در کشت‌های میکسوتروف نیز سنتز پلی‌ساکاریدهای کل تحت تأثیر شدت روشنایی و حضور غلظت ۲ گرم بر لیتر گلوکز یا غلظت ۵ گرم بر لیتر سوکروز بود.

خارج سلولی در کشت‌های رشد یافته در غلظت گلوکز ۲ گرم بر لیتر و ۳۱ برابر کمتر از پلی ساکاریدهای خارج سلولی در کشت‌های دیازوتروف گزارش شد. نتایج نشان دادند غلظت ۵ گرم بر لیتر گلوکز اثر ممانعت‌کنندگی روی میزان کل آگزوپلی ساکاریدها دارد؛ همچنین بررسی‌ها مشخص کردند تفاوت معناداری بین تولید آگزوپلی ساکارید در غلظت ۵ گرم بر لیتر تحت تأثیر شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه و ۵۰ میکروانشتین در مترمربع وجود ندارد و برعکس، تأثیر افزایش غلظت ۲ گرم بر لیتر گلوکز و ۵ گرم بر لیتر سوکروز در تولید بیشتر آگزوپلی ساکارید استنتاج می‌شود (شکل ۲).

در ثانیه به ترتیب برابر ۴۵/۵ و ۱/۵ میلی گرم گزارش شد؛ در حالی که مقادیر کمتر در روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه به ترتیب برابر ۲۹ و ۰/۴۶ میلی گرم به دست آمدند (شکل ۲). مقدار پلی ساکاریدهای خارج سلولی در حضور سوکروز با غلظت ۲ و ۵ گرم بر لیتر و روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه به ترتیب ۲۰ و ۴۱ میلی گرم گزارش شد؛ در حالی که مقادیر کمتر در روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه به ترتیب ۴ و ۳۲/۵ میلی گرم به دست آمدند (شکل ۲).

میزان پلی ساکاریدهای خارج سلولی در حضور گلوکز با غلظت ۵ گرم بر لیتر بسیار کم بود؛ به طوری که این میزان تقریباً ۴۱ برابر کمتر از میزان پلی ساکاریدهای



شکل ۲- مقایسهٔ میزان تولید آگزوپلی ساکاریدها (ستون‌های مشکی رنگ) در شرایط تغذیه‌ای با غلظت‌های مختلف (۲ و ۵ گرم بر لیتر) گلوکز و سوکروز در شدت‌های روشنایی ۱۵۰ و ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه؛ تحلیل‌های آماری با آزمون توکی، اختلاف معناداری را بین غلظت‌های مختلف گلوکز و سوکروز با شاهد در سطح اطمینان ($P < 0.05$) نشان می‌دهند. اعداد هر نمودار، میانگین سه تکرار هستند و حرف‌های متفاوت در هر ستون نشان می‌دهند تفاوت معناداری در میزان آگزوپلی ساکارید در غلظت‌های متفاوت گلوکز و سوکروز وجود دارد.

(شکل ۳). مقدار آگزوپلی ساکارید در سلول‌های سویه

Fischerella sp. SH.A کشت شده تحت تأثیر غلظت ۱۰

میلی گرم برلیتر فسفات در روشنایی ۱۵۰ و ۵۰

میکروانشتین در مترمربع در ثانیه ۱ تا ۱/۲ برابر بیشتر از

سلول‌های کشت شده در شرایط شاهد با همین شدت

روشنایی گزارش شد؛ در شدت روشنایی ۵۰

میکروانشتین در مترمربع در ثانیه، غلظت‌های مختلف

فسفات اختلاف معناداری در تولید آگزوپلی ساکارید کل

ایجاد نکردند (شکل ۳).

در کل، نتایج بررسی میزان تولید پلی ساکاریدهای

خارج سلولی در روز سی‌ام کشت نشان دادند میزان

نیترات و شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در

ثانیه، مهم‌ترین عوامل در افزایش تولید

آگزوپلی ساکاریدها هستند (شکل ۴).

میزان آگزوپلی ساکارید کل تولید شده در غلظت

فسفات ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم برلیتر در شدت روشنایی

۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه به ترتیب برابر ۴۵/۸،

۴۰/۸ و ۱۸/۵ میلی گرم و میزان آگزوپلی ساکارید کل در

روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه به ترتیب

برابر ۲۱، ۱۷/۸ و ۱۶/۸ میلی گرم گزارش شد. نتایج نشان

دادند میزان تولید آگزوپلی ساکارید در غلظت فسفات ۱۰

و ۲۰ میلی گرم برلیتر در شرایط روشنایی ۱۵۰

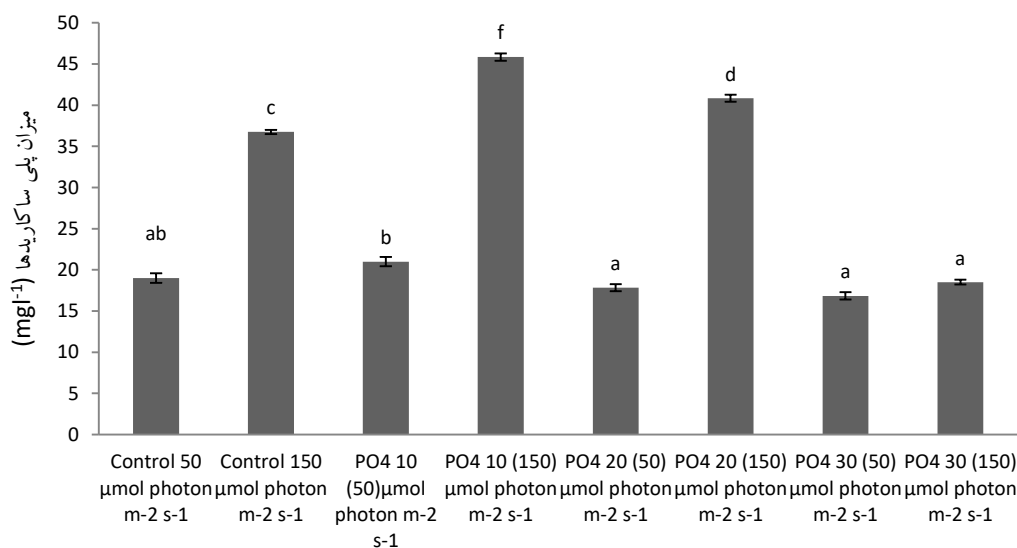
میکروانشتین در مترمربع در ثانیه تقریباً ۲ برابر این میزان

در شرایط روشنایی ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه

است؛ علاوه بر این، نتایج نشان دادند غلظت فسفات ۱۰

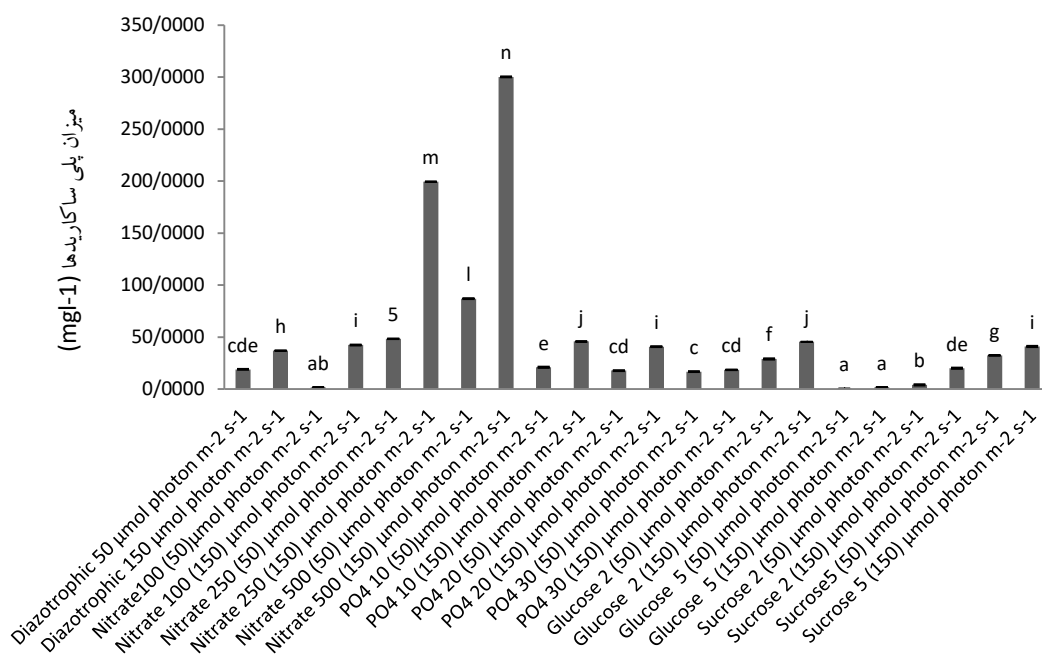
میلی گرم برلیتر در هر دو شدت روشنایی، شرایط برتر

نسبت به غلظت فسفات ۲۰ و ۳۰ میلی گرم برلیتر است



شکل ۳- مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم برلیتر) فسفات و شدت روشنایی ۱۵۰ و ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه با شاهد بر میزان تولید آگزوپلی ساکاریدهای کل خارج سلولی؛ تحلیل‌های آماری با آزمون توکی، اختلاف معناداری را بین غلظت‌های مختلف

فسفات و شاهد در سطح اطمینان ($P < 0.05$) نشان می‌دهند. اعداد هر نمودار، میانگین سه تکرار هستند و حرف‌های متفاوت در هر ستون نشان می‌دهند تفاوت معناداری در میزان آگزوپلی ساکارید در غلظت‌های متفاوت فسفات وجود دارد.

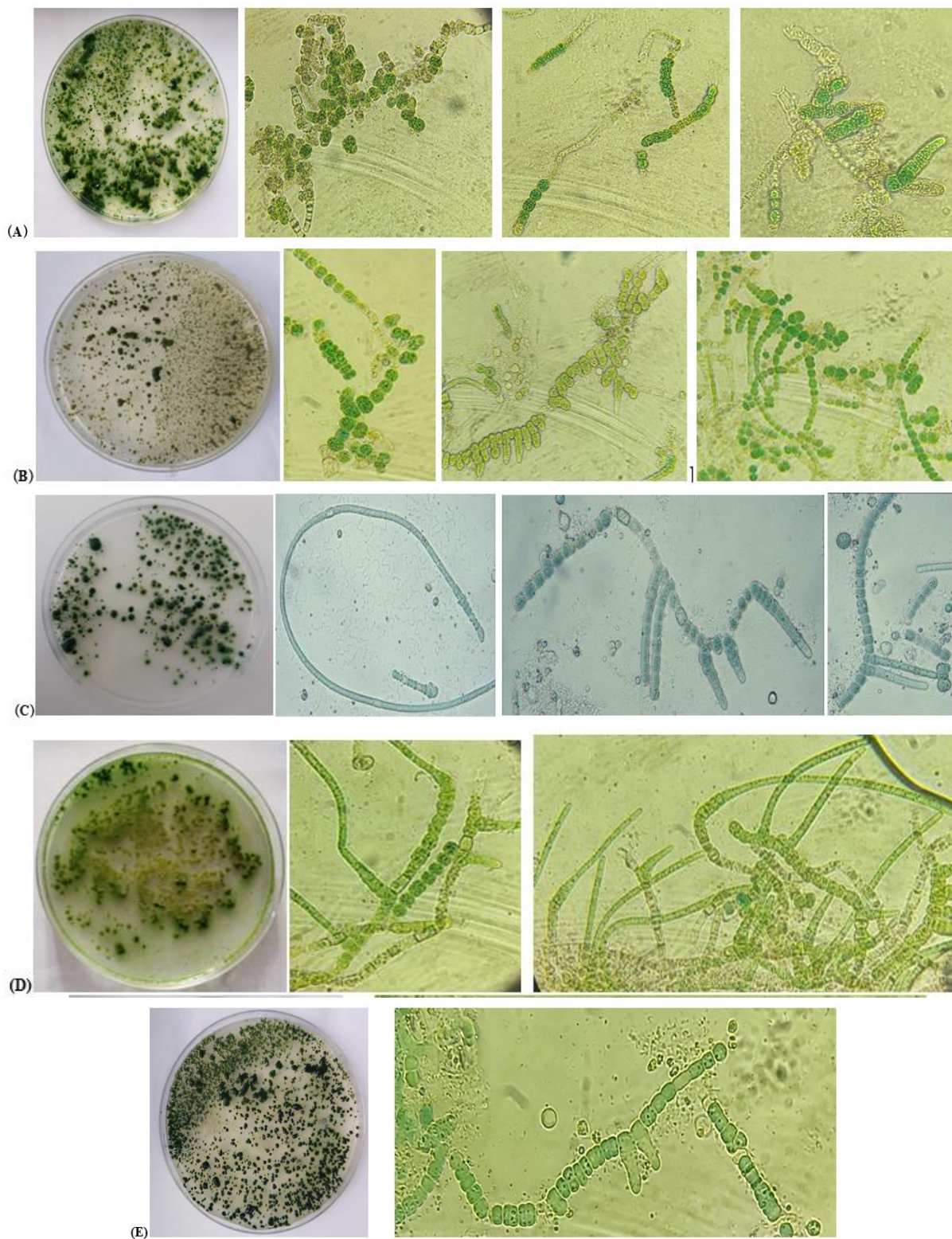


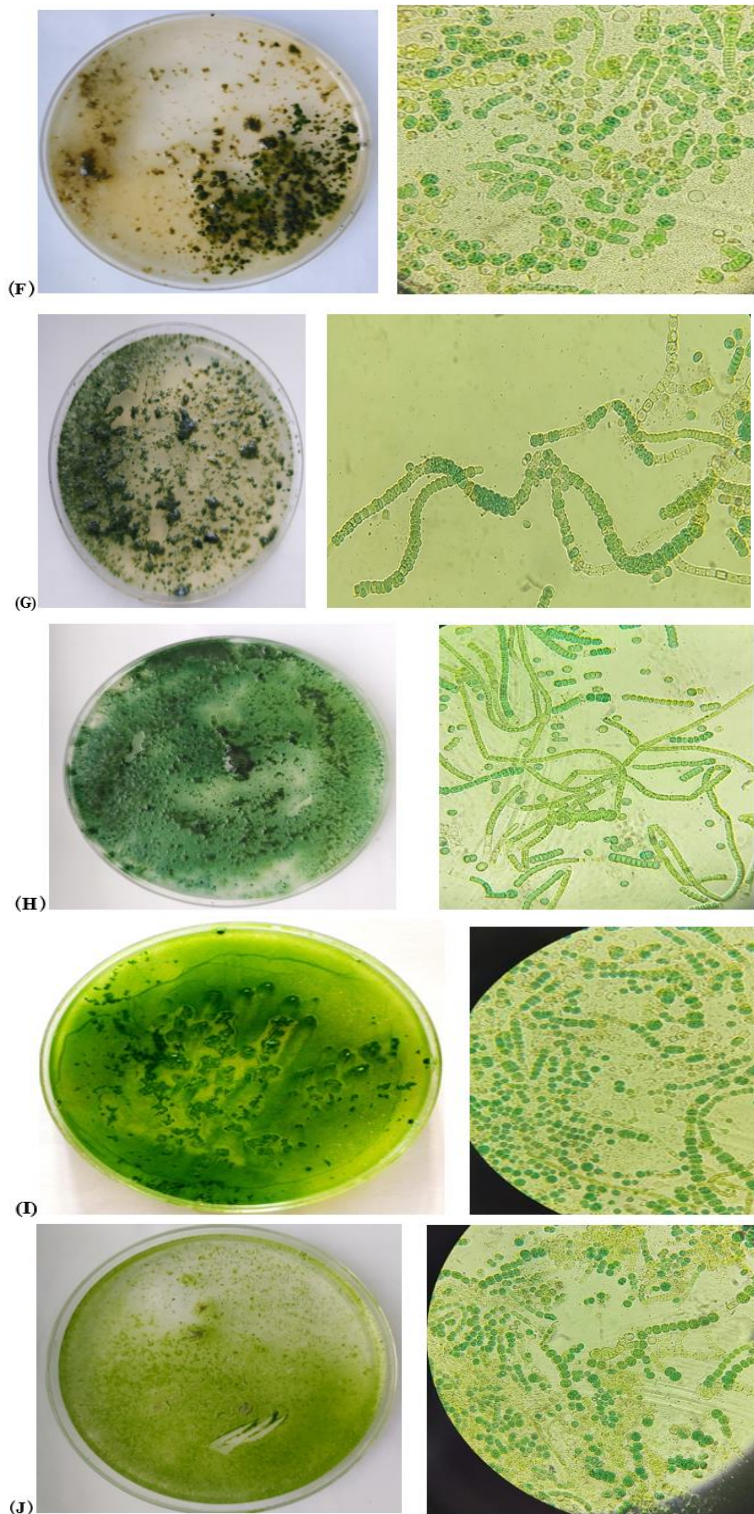
شکل ۴- مقایسهٔ تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات، فسفات، گلوکز و سوکروز در شدت روشنایی ۱۵۰ و ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه با شرایط دیازوتروفیک (شاهد) بر میزان تولید آگزوپلی ساکاریدهای کل خارج سلولی به کمک تحلیل‌های آماری و آزمون توکی در سطح اطمینان ($P < 0.05$). اعداد هر نمودار، میانگین سه تکرار هستند و حرف‌های متفاوت در هر ستون نشان می‌دهند تفاوت معناداری در میزان آگزوپلی ساکارید در غلظت‌های متفاوت نیترات وجود دارد.

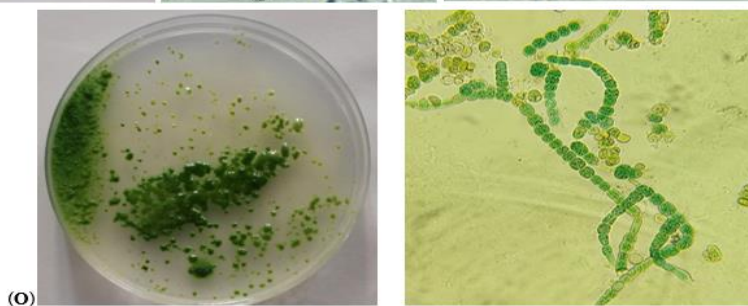
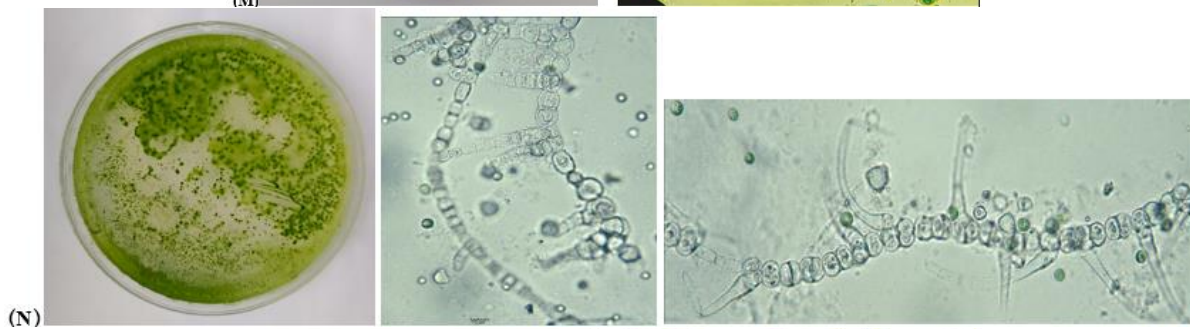
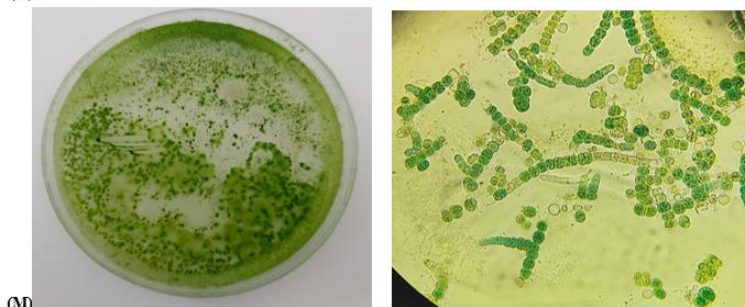
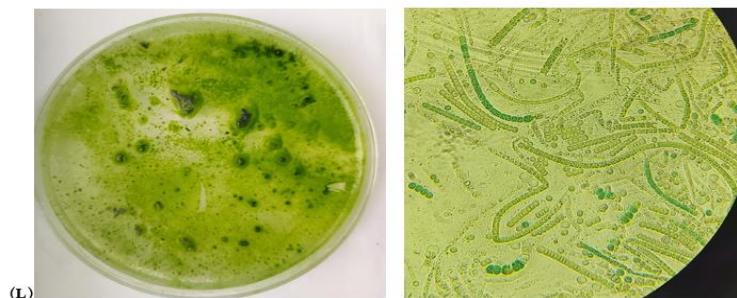
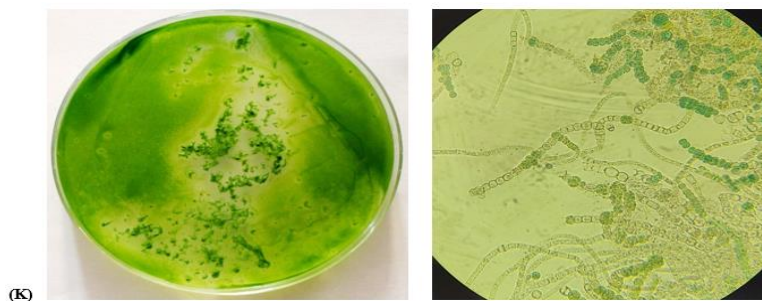
انشعاب ممانعت می‌کند و در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار نیز انشعابات بسیار کم و سوزنی شکل هستند. در کشت‌های رشد کرده در غلظت‌های متفاوت فسفات، ریشه‌ها تمایلی به تشکیل انشعاب نداشتند و تنها در غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم برلیتر، انشعابات کوتاهی تولید شدند. در سایر نمونه‌ها، تعداد زیادی آکینت در محور اصلی و پشت سرهم وجود داشتند (شکل ۵). جزئیات بیشتر این بررسی‌ها در جدول ۲ بیان شده است.

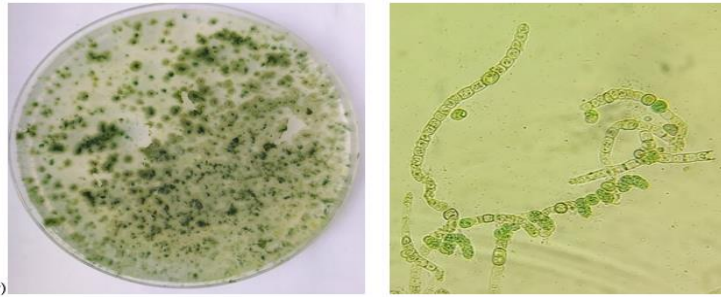
نتایج بررسی ریخت‌شناختی *Fischerella* sp. SH.A در

تیمارهای مختلف: به‌طور خلاصه، نتایج بررسی ریخت‌شناختی سویهٔ مطالعه‌شده در غلظت‌های مختلف گلوکز نشان دادند در نور کم، سویهٔ مطالعه‌شده انشعابات بیشتری را تولید می‌کند و در کشت‌های رشد کرده با غلظت‌های ۲ و ۵ گرم برلیتر سوکروز، ریشه‌های بدون انشعاب بیشتر دیده می‌شوند؛ به‌طوری‌که انشعابات معمولاً کوتاه هستند. بررسی ریخت‌شناختی کشت‌های رشد کرده در نیترات نشان داد غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار از تشکیل









(P)



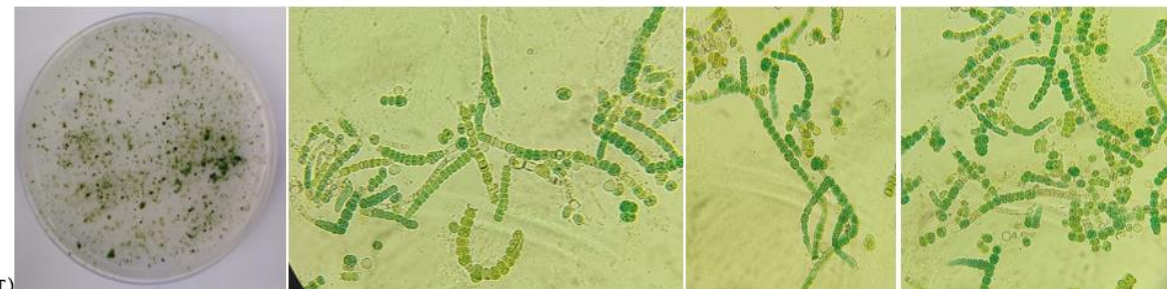
(Q)



(R)



(S)



(T)

جدول ۲- شرح ریخت‌شناسی سویه مطالعه‌شده در تیمارهای مختلف

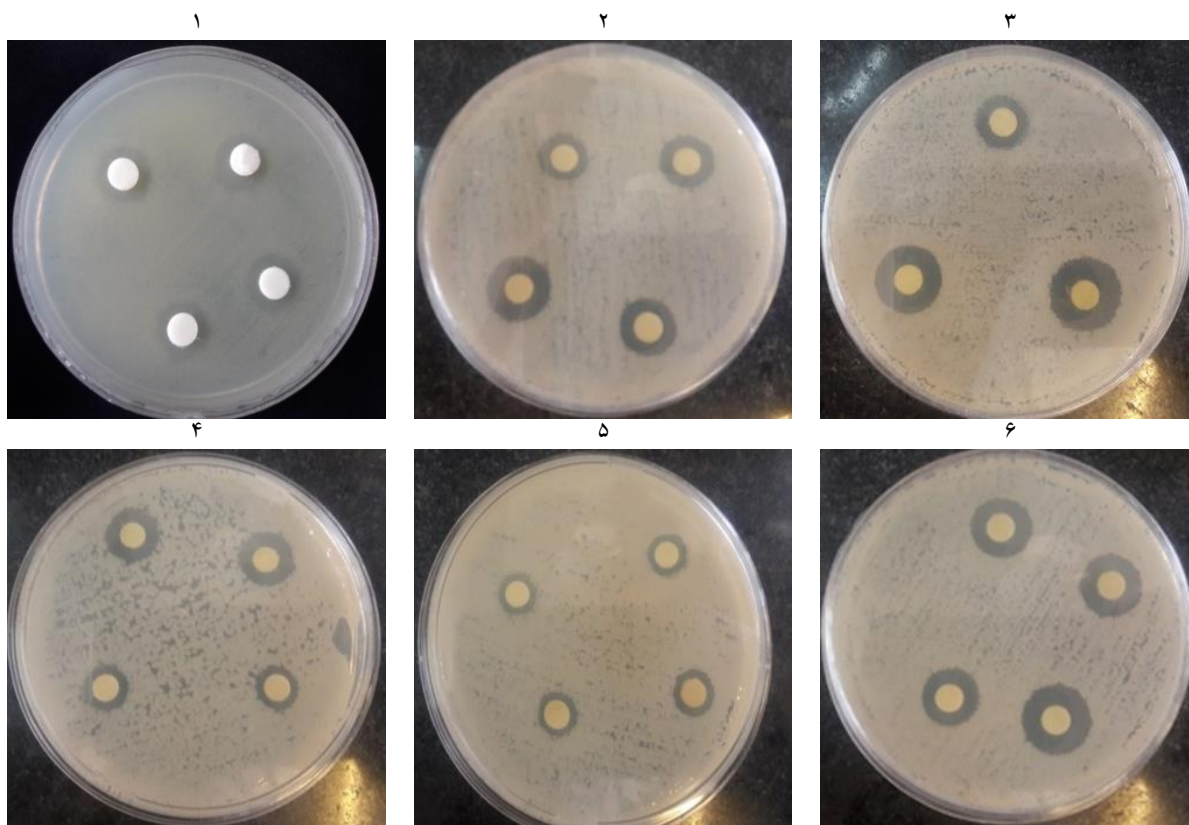
شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه		شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه		نوع تیمار
ریخت‌شناسی سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری	ریخت‌شناسی کلنی‌ها روی پلیت	ریخت‌شناسی سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری	ریخت‌شناسی کلنی‌ها روی پلیت	
انشعابات طولی بدون دیواره عرضی و دارای آکینت‌های درشت و کروی هستند.	کلنی‌ها به رنگ سبز چمنی در اندازه‌های کوچک هستند و به‌طور پراکنده، گاهی جدا و گاهی به‌هم چسبیده دیده می‌شوند.	انشعابات به‌ندرت وجود دارند و نسبتاً کوتاه هستند. برخی از ریشه‌ها بدون دیواره عرضی هستند. سلول‌های بدون انشعاب بلند فراوان هستند. آکینت‌های کروی پررنگ جداشده به‌فراوانی دیده می‌شوند، هتروسیست‌های مستطیلی بزرگ در محور اصلی دیده می‌شوند، سلول‌های رویشی در محور اصلی استوانه‌ای شکل هستند.	کلنی‌ها به رنگ سبز چمنی تیره، کروی و مجزا دیده می‌شوند.	گلوکز ۲ گرم بر لیتر
تمام محور اصلی دارای انشعابات است؛ انشعابات بلند، کوتاه و فراوان هستند. سلول‌های انشعابات دیواره عرضی دارند. آکینت‌های درحال تقسیم به‌شکل منفرد یا پشت‌سرهم در ریشه قرار گرفته‌اند. سلول‌های محور اصلی مربع تا مستطیلی شکل هستند.	کلنی‌ها به رنگ سبز چمنی با تراکم کلنی‌های کم دیده می‌شوند.	انشعابات کوتاه و دارای دیواره عرضی هستند. آکینت‌های سبز چمنی و درحال تقسیم و تولید ریشه‌هایی با چهار تا پنج سلول و سلول‌های محور اصلی استوانه‌ای شکل دیده می‌شوند.	کلنی‌های سبز پررنگ و بسیار متراکم دیده می‌شوند.	گلوکز ۵ گرم بر لیتر
عرض سلول‌ها دو برابر طول آنهاست. انشعابات بسیار به‌ندرت دیده می‌شوند. آکینت‌ها پشت‌سرهم در طول ریشه قرار دارند.	کلنی‌ها به رنگ سبز تیره هستند. تراکم در سطح پلیت بسیار زیاد است و تمام سطح پلیت را پوشانده‌اند و در برخی نواحی به‌شکل توده تجمع یافته‌اند.	دو ردیفی شدن سلول‌ها در محور اصلی در نتیجه تقسیم‌های آکینت دیده می‌شود، عرض سلول‌ها دو برابر طول در محور اصلی است، انشعابات به‌ندرت دیده می‌شوند و کوتاه هستند، هتروسیست‌های مستطیلی حضور دارند.	کلنی‌ها به رنگ سبز لجنی مایل به قهوه‌ای، بیشتر کروی شکل و به‌طور توده‌ای و چسبیده به سطح محیط کشت دیده می‌شوند.	سوکروز ۲ گرم بر لیتر
ریشه‌ها کوتاه به همراه آکینت‌های درحال تقسیم فراوان هستند و انشعابات بسیار به‌ندرت دیده می‌شوند.	کلنی‌های سبز لجنی مایل به قهوه‌ای به‌طور متراکم و کنار هم و چسبیده به سطح پلیت مشاهده می‌شوند.	انشعابات کم و کوتاه هستند. در محور اصلی، آکینت‌های درحال تقسیم وجود دارد.	کلنی‌ها به رنگ سبز لجنی و تقریباً کروی شکل دیده می‌شوند، تراکم آنها زیاد است و به‌شکل کلنی‌های مجزا در کنار هم رشد کرده‌اند.	سوکروز ۵ گرم بر لیتر
ریشه‌ها بدون انشعاب، دارای تعداد زیادی آکینت در محور اصلی و درحال تقسیم هستند.	کلنی‌ها به رنگ سبز روشن هستند، در سطح پلیت گسترش یافته‌اند و در برخی نواحی به‌شکل توده‌های متراکم و تیره‌تر دیده می‌شوند.	ریشه‌های بی‌رنگ و منشعب، آکینت‌های درحال تقسیم دیده می‌شوند.	کلنی‌ها به رنگ سبز روشن و به‌شکل لایه نازکی روی سطح محیط کشت گسترش یافته‌اند.	نیتрат ۱۰۰ میلی مولار

<p>نیترات ۲۵۰ میلی مولار</p>	<p>کلنی‌های بسیار کوچکی وجود دارند و به رنگ سبز روشن دیده می‌شوند.</p>	<p>تعداد زیادی آکینت‌های درحال تقسیم در محور اصلی و همچنین در انشعابات دیده می‌شوند، انشعابات کوتاه هستند.</p>	<p>کلنی‌های بسیار کوچکی وجود دارند و به رنگ سبز روشن تا تیره دیده می‌شوند.</p>	<p>انشعابات سوزنی، بی‌رنگ و بسیار کوتاه هستند. سلول‌ها در محور اصلی در دو ردیف قرار گرفته‌اند. سلول‌های انشعابات بدون دیوارهٔ عرضی هستند. آکینت‌های جداشده فراوان هستند. سلول‌های محور اصلی بیضوی شکل هستند.</p>
<p>نیترات ۵۰۰ میلی مولار</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز دیده می‌شوند و در سطح پلیت به شکل لایه‌ای یکنواخت پراکنده هستند و در مرکز محیط کشت به شکل توده‌های متراکم و تیره‌تر تجمع یافته‌اند.</p>	<p>ریسه‌ها بدون انشعاب، تمام سلول‌های محور اصلی دارای تعداد زیادی آکینت به شکل پیوسته و جداشده و درحال تقسیم هستند.</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز چمنی روشن به شکل لایهٔ نازکی سطح پلیت را پوشش داده‌اند</p>	<p>شکل سلول‌ها، تقسیم آکینت‌ها و فقدان انشعاب مانند در معرض بودن با شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه است.</p>
<p>بدون نیتروژن</p>	<p>کلنی‌های سبز متراکم پرنرنگ و لجنی دیده می‌شوند.</p>	<p>تعداد زیادی انشعابات کوتاه، حضور آکینت‌های درحال تقسیم در محور اصلی و همچنین انشعابات دیده می‌شود.</p>	<p>کلنی‌های جداگانه با تراکم نسبتاً کم و به رنگ سبز لجنی دیده می‌شوند.</p>	<p>ریسه‌های بلند دارند. سلول‌ها دیوارهٔ عرضی دارند. آکینت‌ها تنها در انشعابات دیده می‌شوند.</p>
<p>فسفات ۱۰ میلی گرم بر لیتر</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز تیره، مجزا از هم و پراکنده هستند</p>	<p>ریسه‌ها کوتاه هستند. سلول‌های محور اصلی نکریدیوم دارند. آمادهٔ تقسیم سلولی هستند. انشعابات بزرگ و دارای دیوارهٔ عرضی هستند. آکینت‌های بزرگ در انشعابات وجود دارند. انشعابات در دوطرف (یکی به سمت بالا و دیگری به سمت پایین) هستند. غلاف بسیار ضخیم دارند و در نمونه‌هایی بدون سلول هستند.</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز تیره هستند و تراکم کم است.</p>	<p>سلول‌های محور اصلی بیچ و تاب خورده‌اند و به شکل مارپیچی هستند. ریسه‌ها انشعاب ندارند. سلول‌های تک در زمینه مشاهده می‌شوند. سلول‌های دارای آکینت به رنگ سبز تیره دیده می‌شوند.</p>
<p>فسفات ۲۰ میلی گرم بر لیتر</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز تیره، بی‌شکل و به هم چسبیده هستند و تراکم زیاد است.</p>	<p>ریسه‌ها بزرگ و به دو رنگ زرد و سبز دیده می‌شوند. سلول‌های محور اصلی باریک و بدون انشعاب هستند. سلول‌ها در ردیف اصلی دوتایی شده‌اند. آکینت‌ها زیاد هستند. دسته‌های ۸ تا ۱۴ تایی از سلول‌هایی مشاهده می‌شوند که پراز آکینت هستند.</p>	<p>کلنی‌ها به‌طور مجزا و پراکنده در سطح پلیت هستند. تراکم بسیار کم است.</p>	<p>ریسه‌ها انشعاب دارند. سلول‌ها دارای آکینت و درحال تقسیم بسیار دیده می‌شوند.</p>
<p>فسفات ۳۰ میلی گرم بر لیتر</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز چمنی هستند. تراکم نسبتاً کم است و در برخی نواحی به شکل توده تجمع یافته‌اند.</p>	<p>سلول‌های بسیار ضخیم و پرنرنگ مشاهده می‌شوند. هتروسیست‌های مستطیلی وجود دارند. انشعابات بسیار کوتاه هستند. دو ردیفی شدن سلول‌ها به همراه تقسیم آکینت‌ها دیده می‌شود.</p>	<p>کلنی‌ها به رنگ سبز و قهوه‌ای و به‌طور مجزا هستند. تراکم کم است.</p>	<p>ریسه‌ها بلند هستند. دوردیفی شدن سلول‌ها در برخی نواحی مشاهده می‌شود. سلول‌ها دیوارهٔ عرضی دارند.</p>

ممانعت کنندگی را داشتند؛ همچنین نتایج نشان دادند در همهٔ نمونه‌ها، نور حداکثر با شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه دارای بیشترین میزان ممانعت کنندگی است (شکل ۶ و جدول ۳).

نتایج جداسازی مواد بیواکتیو با TLC: نتایج آزمون TLC روی زیست تودهٔ حاصل از کشت سویهٔ مطالعه‌شده در محیط کشت ۵۰۰ میلی مولار نیترات، پنج باند مجزا را نشان دادند؛ از پنج باند حاصل، چهار باند در برابر باکتری *Staphylococcus aureus* مؤثر بودند که نشان‌دهندهٔ حضور مادهٔ مؤثر ضدباکتریایی در چهار باند حاصل است (شکل ۷).

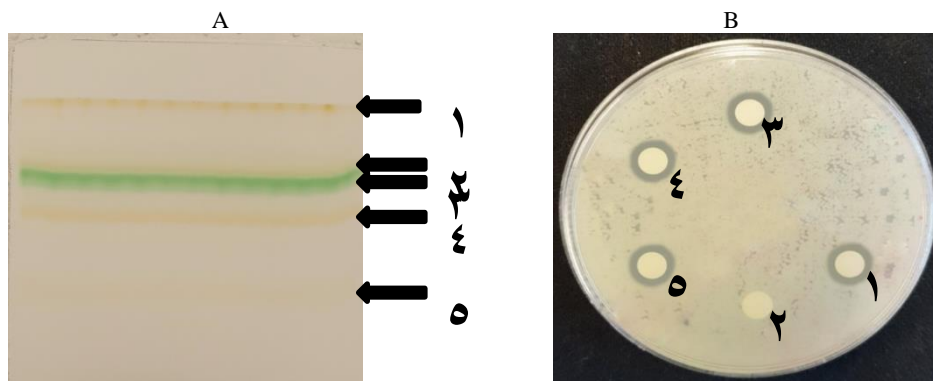
نتایج فعالیت ضدباکتریایی در کشت‌های شاهد و تیمار: نتایج بررسی فعالیت ضدباکتریایی، تحلیل آماری و آزمون توکی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند سویهٔ مطالعه‌شده دارای بیشترین قطر ممانعت در برابر باکتری *Staphylococcus aureus* است؛ به‌همین علت، بررسی فعالیت ضدباکتریایی تنها در برابر این باکتری در کشت‌های تیمار انجام شد. نتایج نشان دادند همبستگی مثبتی میان میزان اگزوپلی ساکاریدها در تیمارهای مختلف و فعالیت ضدباکتریایی وجود دارد؛ به‌این ترتیب که تیمارهای با غلظت ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی مولار نیترات، ۲۰ میلی گرم برلیتر فسفات، ۵ و ۲ گرم برلیتر گلوکز با اختلاف معناداری ($P < 0.05$) بیشترین میزان قطر



شکل ۶- وجود هاله در تیمارهای مختلف گلوکز، سوکروز، فسفات و نیترات؛ ۱. کشت شاهد، ۲. ۲۰ میلی گرم برلیتر فسفات، ۳. ۲۵۰ میلی مولار نیترات، ۴. ۲ گرم برلیتر گلوکز، ۵. ۵ گرم برلیتر سوکروز، ۶. ۵۰۰ میلی مولار نیترات

جدول ۳- میزان فعالیت ضدباکتریایی سویه مطالعه‌شده در کشت‌های مختلف؛ قطر منطقه بازدارندگی بر حسب میلی‌متر و به شکل میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

قطر منطقه بازدارندگی (میلی‌متر)	کشت‌های مختلف به کاررفته
$0.28 \pm 9/5$	بدون نیتروژن با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.1 \pm 8/7$	بدون نیتروژن با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.1 \pm 7/7$	نیترات در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.2 \pm 6/9$	نیترات در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.4 \pm 7/8$	نیترات در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.21 \pm 11/9$	نیترات در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.3 \pm 8/7$	نیترات در غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.6 \pm 12/3$	نیترات در غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.3 \pm 6/7$	فسفات در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.1 \pm 11/04$	فسفات در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.2 \pm 7/7$	فسفات در غلظت ۲۰ میلی‌گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.12 \pm 11/5$	فسفات در غلظت ۲۰ میلی‌گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.2 \pm 8/5$	فسفات در غلظت ۳۰ میلی‌گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.4 \pm 8/1$	فسفات در غلظت ۳۰ میلی‌گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.1 \pm 7/7$	گلوکز در غلظت ۲ گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.02 \pm 10/1$	گلوکز در غلظت ۲ گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.1 \pm 7/7$	گلوکز در غلظت ۵ گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.1 \pm 8/7$	گلوکز در غلظت ۵ گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.3 \pm 6/9$	سوکروز در غلظت ۲ گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.4 \pm 7/8$	سوکروز در غلظت ۲ گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.3 \pm 6/7$	سوکروز در غلظت ۵ گرم برلیتر با شدت نوری ۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه
$0.04 \pm 8/9$	سوکروز در غلظت ۵ گرم برلیتر با شدت نوری ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه



بحث

شکل ۷- A. باندهای حاصل از آزمون TLC، B. انجام آزمون آنتی‌بیوگرام برای بررسی اثر ترکیب بیواکتیو موجود در هر باند به شکل مجزا کاربرد صنعتی به حدی زیاد است که موجب استخراج پلی‌ساکاریدها از گیاهان و ریزجلبک‌ها طی سالیان متمادی شده است (۴۶)؛ این امر سبب شده است استخراج پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از سیانوباکتریوم آب شیرین در مقیاس آزمایشگاهی انجام شود تا گامی در راستای کاربرد هرچه بیشتر این متابولیت ثانویه با ارزش در صنایع دارویی، غذایی و شیمیایی برداشته شود. در پژوهش‌های Tiwari و همکاران (۲۰۱۵)، تولید اگزوپلی ساکارید منعقدکننده زیستی از ۴۰ سویه سیانوباکتریایی طی رشد فتواتوتروفیک آنها بررسی شد و بیشترین مقدار EPS را *Nostoc* sp. BTA97 و *Anabaena* sp. BTA990 تولید کردند و بیشترین تولید EPS در غیاب منبع نیتروژن ترکیبی رخ داد (۴۷). نتایج آزمایش‌های یادشده نشان دادند گونه‌های *Anabaena* sp. BTA990 و *Nostoc* sp. BTA97 گزینه‌های خوبی برای تولید تجاری EPS هستند؛ این در حالیست که در مقاله حاضر، بیشترین تولید EPS در حضور منبع نیتروژن رخ داد. مقایسه نتایج Tiwari و یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد تولید EPS به نوع سویه وابسته است.

Singh در سال ۲۰۱۵ روی یک سویه سیانوباکتری مطالعه و از روش‌های مختلف مانند ویژگی‌های مربوط به فنوتیپ، توالی‌یابی ژن‌های *psbA*، *rbcl*، *16S rRNA* و *nifD* و *pc-IGS* و فیلوژنی مولکولی استفاده و ثابت کرد سویه NE-PS، گونه جدیدی از جنس *Nostoc* است (۴۸). در مطالعه حاضر نیز باتوجه به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* و نتایج تحلیل درخت فیلوژنتیک نشان داده شد سویه *Fischerella* sp.

سنتز پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در ریزموجودات و به ویژه سیانوباکتری‌ها، نقش عمده‌ای در محافظت از سلول در برابر بسیاری از تنش‌های موجود در زیستگاه‌های مختلف دارد. پژوهش Otero و Vincenzini در سال ۲۰۰۴ نشان داد تکامل کاربردهای زیست‌فناوری اگزوپلی ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها به شناسایی عوامل مؤثر بر افزایش سنتز اگزوپلی ساکاریدها وابسته است. از آنجاکه عوامل مختلف تأثیر متفاوتی روی تولید اگزوپلی ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها دارند، مشکل بتوان نتیجه گرفت تفاوت‌های گزارش شده در تولید اگزوپلی ساکاریدها از تفاوت‌های فیزیولوژیک بین گونه‌ها ناشی می‌شود یا به تفاوت در شرایط کشت آزمایشگاهی به کاررفته مربوط است؛ در نتیجه، به منظور فهم کامل پتانسیل سیانوباکتری تولیدکننده پلی‌ساکاریدهای مفید، تعیین بهترین شرایط تولید مواد خارج سلولی اهمیت بسزایی دارد. در پژوهش حاضر، تلاش شد به بررسی تأثیر برخی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر تولید پلی‌ساکاریدها پرداخته شود و نتیجه‌گیری کلی از آزمایش‌ها نشان داد همبستگی مثبتی بین میزان نترات محیط کشت و تولید اگزوپلی ساکاریدها در کشت‌های سویه *Fischerella* sp. SH.A رشد یافته در روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه وجود دارد (۲۵).

Guedes در سال ۲۰۱۱ بیان کرد گونه‌های *Nostoc* منابع درخور توجهی برای تولید پلی‌ساکارید هستند. درحقیقت، اهمیت این مواد خارج سلولی از نظر پتانسیل

در رشد استفاده می‌کند. در پژوهش حاضر با هدف پیشینه‌سازی تولید فراورده‌های طبیعی، سعی شد تا با ترکیب الگوی رشد اتوتروف با سیستم متابولیک هتروتروف که میکسوتروف نامیده می‌شود، توانایی سویه *Fischerella* sp. SH.A در دو محیط فتوتروف و میکسوتروف در رابطه با تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی سنجیده شود. نتایج بررسی‌ها نشان دادند نیترات بهترین پیش‌ماده برای تولید ترکیبات پلی‌ساکاریدی در مقایسه با سایر پیش‌ماده‌هاست و درحقیقت، یکی از دلایل آن اینست که احتمالاً سویه *Fischerella* sp. SH.A از نیتروژن محیط برای تثبیت چرخه ازت استفاده و انرژی خود را صرف تولید بیشتر پلی‌ساکارید خارج سلولی می‌کند.

بررسی‌های بسیاری در زمینه قابلیت سیانوباکتری‌های تولیدکننده پلی‌ساکارید برای غلبه بر تنش خشکی در بیابان یا محیط‌های شور انجام شده‌اند و نتایج نشان داده‌اند پیوندهای هیدورژنی برقرار شده بین پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA، پوسته‌های آبی را شکل می‌دهند که برای مقابله با تنش خشکی بسیار سودمند است (۵۱). آگزوپلی‌ساکاریدها با داشتن ویژگی‌های آبدوستی^{۳۳} و آبگریزی^{۲۴} و به‌دام‌انداختن و تجمع آب و ایجاد لایه ژلاتینی در اطراف سلول‌ها، غشای سلولی را در طول دوره خشکی پایدار نگه می‌دارند. مهم‌ترین عمل کپسول پلی‌ساکاریدی، ایجاد سد بین سلول باکتری و محیط اطراف آن است؛ به‌علاوه، نقش محافظتی این لایه پلی‌ساکاریدی در برابر دهیدریشن، فاگوسیتوزیس و حتی لیز شدن در اثر ویروس‌ها یا ایجاد توانایی چسبیدن به بستر و جلوگیری از شسته شدن در زیستگاه‌های طبیعی در اثر آب

SH.A مطالعه شده بیشترین قرابت فیلوژنتیک را با سویه‌های *Fischerella* sp. HKAR-13 و *Fischerella* sp. HKAR-14 دارد. سویه مطالعه شده کلاد جداگانه‌ای تشکیل داد که نشان‌دهنده جدید بودن این سویه است. Huang و همکاران در سال ۲۰۰۹ تأکید کردند اگرچه مراحل خالص‌سازی بسیار طولانی و وقت‌گیر هستند، اهمیت فراوانی در ادامه پژوهش‌ها دارند؛ زیرا اولاً برای بررسی‌های مولکولی به کشت خالص نمونه‌ها نیاز است و ثانیاً در مرحله تشخیص نوع متابولیت ثانویه موجود در هر سویه، وجود کشت‌هایی متشکل از تنها یک نمونه دارای اهمیت زیادی است تا بتوان ترکیب فعال زیستی تولیدشده را به آن سویه خاص نسبت داد (۴۹)؛ از این رو، در مقاله حاضر با ایجاد کشت‌های متوالی و چندین بار آزمایش، سویه *Fischerella* sp. SH.A جداسازی و خالص‌سازی و بهترین شرایط کشت برای رشد سویه مطالعه شده فراهم شد. Katoh در سال ۲۰۰۳ بیان کرد سیانوباکتری‌ها دارای راهبردهای متفاوتی برای زندگی در شرایط تغذیه‌ای مختلف هستند و از عمده‌ترین راهبردها می‌توان به تغییر شکل زندگی از اتوتروف به هتروتروف اشاره کرد. میکسوتروفي، سیستمی از رشد است که کربن آلی و کربن دی‌اکسید به‌طور هم‌زمان با متابولیسم فتوسنتزی و تنفسی تغذیه می‌شوند. زمانی که ریزجلبک کربن بیشتری را تثبیت می‌کند، تولید کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدها افزایش می‌یابد (۵۰). بررسی نتایج پژوهش حاضر نشان داد سویه *Fischerella* sp. SH.A شدت روشنایی ۱۵۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه را به‌شکل منبع انرژی به دام می‌اندازد و از گلوکز، سوکروز، نیترات و فسفات به‌شکل منابع غذایی

آب به‌طور گاه و بی‌گاه است، بازی می‌کند؛ درحقیقت، این پلیمرها مانند ترکیب بافری عمل می‌کنند و علاوه‌بر حفظ آب، آزادسازی آرام آب را سبب می‌شوند. به‌تازگی گزارشی دربارهٔ اکلوزی جنس *Nostoc* نشان داده است تراکم موسیلاژ احاطه‌کنندهٔ تریکوم‌های تعداد فراوانی از سویه‌های *Nostoc* در مقایسه با دیگر ریزجلبک‌هایی که کپسول ندارند، آنها را از خطر خورده‌شدن رهایی می‌بخشد (۶۰). خاصیت آبگریزی آگروپولی ساکاریدها که به‌علت حضور گروه‌های استیل دارای پیوند استری (تا ۱۲ درصد وزن خشک EPS)، بخش‌های پتیدی و قندهایی همچون فوکوز و رامنوز است، به ویژگی امولسیفیه‌کنندگی پلی ساکاریدها در سیانوباکتری‌ها در پوسته‌های میکروبی بیابان منجر می‌شود؛ به‌طوری‌که در آن، پلی ساکاریدها با متصل کردن ذره‌های شن سبب حفاظت از جوامع میکروبی پوسته در برابر شسته‌شدن در اثر جریان آب می‌شوند.

بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند غلاف سیانوباکتری‌ها می‌تواند سلول‌ها را از آثار خسارت‌بار معدنی‌سازی محافظت کند؛ درحقیقت، بررسی‌های نفوذپذیری غلاف *Calothrix* sp. نشان داده‌اند این سیانوباکتری به ذره‌های دارای کمتر از ۱۱ نانومتر قطر نفوذناپذیر است و بنابراین از معدنی‌شدن زیستی ترکیبات حساس دیوارهٔ سلول جلوگیری می‌کند (۶۱). پژوهش‌های انجام‌شده در زمینهٔ سویه‌ای از *Nostoc* sp. نشان داده‌اند پوشش لعابی احاطه‌کنندهٔ تریکوم‌ها سبب پراکندگی آسان‌تر ریشه‌ها به درون محیط مایع می‌شود و به‌این ترتیب، دسترسی ریشه‌ها را به منابع نوری و مواد غذایی تسهیل می‌کند؛ درحقیقت، ترشح مواد لزج آگروپولی ساکاریدی با تولید نیروی دافعهٔ

روان، ویژگی‌های ضدباکتریایی یا جلوگیری از شکار به‌وسیلهٔ تک‌یاخته‌های آغازی را نباید نادیده گرفت (۵۲) و (۵۳). طی تنش خشکی، جدا از جایگزینی آب از دست‌رفته، سیانوباکتری‌ها می‌توانند به‌سرعت فعالیت‌های متابولیکی خود را باز یابند و سلول را محافظت کنند (۵۴). پژوهش‌های Hill و همکاران (۵۵) روی *Nostoc commune* با پراکندگی وسیع در زیستگاه‌های مختلف (از مناطق گرمسیری تا مناطق قطبی) نشان دادند گلیکان ترشح‌شده از این موجود، مخزنی برای حفظ آب فراهم می‌کند که به‌شکل بافر بین سلول و اتمسفر عمل می‌کند. عملکرد یادشده، سازوکار کلیدی این سیانوباکتریوم برای تحمل دهیدریشن است؛ درحقیقت، پلی ساکاریدها به همراه ترهالوز و سوکروز به‌شکل سد دفاعی سلول‌های *N. commune* را در برابر خشکی هوا محفوظ نگه می‌دارند. بررسی‌ها نشان داده‌اند این گونه با تشکیل غلاف، کپسول و لایهٔ لعابی چسبناک می‌تواند در برابر آثار مضر تابش‌های UV مقابله کند (۵۶).

بررسی‌ها نشان داده‌اند تابش UV سنتز پلی ساکاریدهای خارج سلولی، رنگدانهٔ جذب‌کنندهٔ UV (سایتونمین^{۲۵})، ترکیبات آمینواسیدی مایکوسپورین مانند^{۲۶} (MMAS) و سوپراکسیددیسموتازها شامل آهن فعال را در *N. commune* القا و با تشکیل ماتریکس خارج سلولی، سدی را در برابر نفوذ تابش‌های مضر UV فراهم می‌کند (۵۷-۵۹). بررسی آزادسازی پلی ساکاریدها از سویه‌های سیانوباکتریایی جداشده از تپه‌های شنی در بیابان نشان داد وجود پلیمرهای پلی ساکاریدی نقش مهمی را در محافظت از رطوبت در بیابان طی ماه‌ها و در جایی که شبنم صبحگاهی تنها منبع

نمک‌های آمونیومی یا قلیایی آلزینیک اسید هستند که از واحدهای D-مانورونیک اسید^{۲۸}، L-گلورونیک اسید^{۲۹} و باقیمانده‌های L-گلورونیک اسید تشکیل شده‌اند. گروه‌های کربوکسیل هریک از این واحدها نقش اصلی را در اتصال یون‌های فلزی به آلزینات‌ها ایفا می‌کنند و از آنجا که محتوای آلزیناتی جلبک‌های قهوه‌ای ۱۰ تا ۴۰ درصد وزن خشک آنها را تشکیل می‌دهد، پتانسیل بالقوه‌ای برای جذب یون‌های فلزی فراهم می‌کند (۶۹).

جلبک‌های قهوه‌ای دارای ۵ تا ۱۰ درصد پلی‌ساکاریدهای گوگرداری به نام فوکوئیدان هستند که پلی‌ساکارید شاخه‌دار سولفات‌ه است و ساختمان آن از واحدهای L-فوکوز تشکیل شده است که با اتصالات آلفا ۱-۲ به یکدیگر متصل شده‌اند. جذب کاتیون‌های سه‌ظرفیتی عمدتاً به وجود پلی‌ساکاریدهای سولفات‌دار بستگی دارد. در پژوهش دیگری به بررسی دو سویه جهش یافته و وحشی پرداخته و نشان داده شد محیط کشت سویه جهش یافته با وجود نداشتن غلاف، دو برابر بیشتر از سویه وحشی توانایی حذف یون مس را دارد (۳). نتایج نشان دادند ظرفیت بیشتر حذف مس در محیط کشت سویه جهش یافته از آزادسازی مقدار زیاد ترکیبات پلی‌ساکارید ناشی می‌شود. در پژوهش دیگری به بررسی ترکیبات شیمیایی پلی‌ساکارید محلول^{۳۰} تولیدشده از سویه وحشی و سویه جهش یافته پرداخته و مشخص شد این ترکیب از ۱۱ نوع مونومر یکسان تشکیل شده است. قند اسیدی حدود ۳۵ درصد در سویه جهش یافته بیشتر است که تمایل زیاد برای یون‌های مثبت مس را نشان می‌دهد؛ در حالی که قندهای دئوکسی فوکوز و رامنوز حدود ۲۸ درصد در پلی‌ساکارید محلول تولیدی در سویه

ضروری برای حرکت، نقش مهمی را در حرکت و سرخوردن سیانوباکتری‌ها بازی می‌کند (۶۲)؛ برای نمونه، سیانوباکتری *Microcystis flosaquae* C3-40 در زیستگاه‌های قلیایی زندگی می‌کند و کپسول این سیانوباکتری با تجمع یون‌های ضروری مانند آهن و منگنز که نسبتاً در آب‌های قلیایی غیرمحلول هستند، نقش مهمی را در تغذیه و رشد سیانوباکتری بر عهده دارد. در زمینه سیانوباکتری‌هایی که در همزیستی با گیاهان عالی زندگی می‌کنند، نقش آگروپلی‌ساکاریدها به شکل عامل چسبناک برای اتصال *Anabaena* به سطح و ایجاد حفره در گیاه میزبان *Azolla* بسیار ضروری است (۶۳ و ۶۴). طبیعت آنیونی پلی‌ساکاریدهای سیانوباکتریایی از تماس مستقیم سلول‌ها با فلزات سنگین سمی که ممکن است در محیط وجود داشته باشند، جلوگیری می‌کند (۶۵ و ۶۶). در پژوهشی، پژوهشگران روش‌هایی را برای تعیین مقدار فلزاتی که روی جلبک‌ها جذب سطحی شده‌اند و فلزاتی که به درون سلول‌ها وارد شده‌اند، ارائه کردند؛ نتایج نشان دادند بیش از ۸۰ درصد مقدار اولیه فلزات در سطح سلول‌ها جذب می‌شوند (۶۷ و ۶۸). در پژوهش دیگری در زمینه جلبک‌های دریایی نیز پژوهشگران نشان دادند جلبک‌های دریایی با توجه به ظرفیت اتصال زیادی که برای یون‌های فلزی دارند، هدف مطالعه‌های بسیاری قرار گرفته‌اند. مهم‌ترین اجزای دیواره سلولی جلبک‌های دریایی شامل سلولز (اسکلت سلولی)، آلزینات‌ها و فوکوئیدان‌های^{۲۷} تشکیل‌دهنده ماتریکس بی‌شکل و موسیلاژ داخل سلولی هستند. فوکوئیدان‌ها، پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ه‌ای هستند که انواعی از جلبک‌های قهوه‌ای آنها را تولید می‌کنند. آلزینات‌ها،

را آشکارتر کرده است؛ از این رو، بررسی میزان آگروپلی ساکاریدهای تولیدشده و همچنین مساعد کردن محیط، گام مهمی در معرفی سویه‌های سیانوباکتریایی بالقوه از نظر دارویی است؛ همچنین خلاقیت و استفاده از محیط کشت جامد در بررسی حاضر سبب بیشترین بهره‌وری از ترکیبات فعال ضدباکتریایی شد. گفتنی است اگرچه بررسی‌ها و پژوهش‌های بسیاری در زمینهٔ اثر بازدارندگی ترکیبات ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها انجام شده‌اند، تاکنون هیچ اطلاعاتی دربارهٔ فعالیت ضدباکتریایی و ارتباط آن با میزان آگروپلی ساکاریدهای تولیدشده در محیط کشت‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نمک‌ها و شدت‌های روشنایی ۵۰ و ۱۵۰ میکروانشین در مترمربع در ثانیه در دسترس نیست و درحقیقت، پژوهش انجام‌شده در این زمینه جزو نخستین بررسی‌های انجام‌شده در ایران است و نتایج می‌توانند ایدهٔ جدیدی برای گسترش داروهای ضدباکتریایی در صنایع داروسازی باشند. در بررسی حاضر، افزایش غلظت نترات در محیط کشت و شدت روشنایی سبب افزایش میزان پلی ساکارید خارج سلولی شد؛ به‌همین علت، جداسازی و شناسایی آگروپلی ساکاریدهای موجود در *Fischerella* sp. SH.A اهمیت بسیاری دارد و انجام پژوهش‌های بیشتر برای شناخت این سویه بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

تمام فعالیت‌های انجام‌شده در پژوهش حاضر با حمایت‌های شخصی خانوادهٔ دانشجو و گروه تخصصی

وحشی وجود دارند و زیادبودن میزان آبگریزی و کاهش حلالیت برای یون مس را نشان می‌دهد.

باتوجه به اهمیت پلی ساکاریدهای خارج سلولی از نظر پتانسیل کاربرد صنعتی برای تثبیت تجاری مواد شیمیایی ناپایدار در کشاورزی، غذا، مواد دارویی، ترکیبات بیوشیمیایی و به‌ویژه ثبات کیفیت مواد و در نظر گرفتن این نکته که چنین پژوهش‌هایی در کشور کاملاً مقدماتی هستند، انجام این دسته پژوهش‌ها به گسترش استفاده از این مواد پلیمری با ارزش از نظر صنعتی منجر می‌شود.

نتیجه‌گیری

گونه‌های سیانوباکتری‌ها به‌شکل منابع درخورد توجه‌برای تولید پلی ساکارید در کشت‌های سوسپانسیون مایع و کلسی‌های خشک‌شده همواره مدنظر قرار داشته‌اند؛ درحقیقت، اهمیت این مواد خارج سلولی از نظر پتانسیل کاربرد صنعتی برای تثبیت تجاری مواد شیمیایی ناپایدار در کشاورزی، غذا، مواد دارویی، ترکیبات بیوشیمیایی و به‌ویژه ثبات کیفیت مواد به حدی زیاد است که موجب استخراج پلی ساکاریدها از گیاهان و ریزجلبک‌ها طی سالیان متمادی شده است.

در طول چند سال گذشته، جداسازی و تشخیص چندین متابولیت متنوع و جدید با فعالیت‌های داروشناختی جدید (ضدسرطانی، آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی) و همچنین ترکیبات بازدارندهٔ پروتئازی و نظایر آن از سیانوباکتری‌ها، اهمیت استفاده از آنها به‌شکل موجودات با ارزش در صنایع داروسازی

استادان انجام شده است.

References

- (1) Li P., Harding SE., Liu Z. Cyanobacterial exopolysaccharides: Their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 2001; 18(1): 375-404.
- (2) Su J., Jia S., Chen X., Yu H. Morphology, cell growth, and polysaccharide production of *Nostoc* flagelliforme in liquid suspension culture at different agitation rates. *Journal of Applied Phycology* 2008; 20(3): 213-217.
- (3) Suresh Kumar A., Mody K., Jha B. Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of Basic Microbiology* 2007; 47(2): 103-117.
- (4) Singh S., Verma E., Tiwari B., Mishra AK. Exopolysaccharide production in *Anabaena* sp. PCC 7120 under different CaCl₂ regimes. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 2016; 22(4): 557-566.
- (5) Tiwari ON., Khangembam R., Shamjetshabam M., Sharma AS., Oinam G., Brand JJ. Characterization and optimization of Biofloculant exopolysaccharide production by Cyanobacteria *Nostoc* sp. BTA97 and *Anabaena* sp. BTA990 in culture conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015; 176(7): 1950-1963.
- (6) Wu X., Li R., Zhao Y., Liu Y. Separation of polysaccharides from *Spirulina platensis* by HSCCC with ethanol-ammonium sulfate ATPS and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers* 2017; 173: 465-472.
- (7) Gao L., Pan X., Zhang D., Mu S., Lee DJ., Halik U. Extracellular polymeric substances buffer against the biocidal effect of H₂O₂ on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 2015; 69: 51-58.
- (8) Bhunia B., Uday US., Oinam G., Mondal A., Bandyopadhyay TK., Tiwari ON. Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. *Carbohydrate Polymers* 2018; 179: 228-243.
- (9) Parikh A., Madamwar D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology* 2006; 97(15): 1822-1827.
- (10) Arora M., Kaushik A., Rani N., Kaushik CP. Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination. *Journal of Environmental Biology* 2010; 31(5): 701-704.
- (11) Bender J., Phillips P. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technology* 2004; 94(3): 229-238.
- (12) Brüll LP., Huang Z., Thomas-Oates JE., Paulsen BS., Cohen EH., Michaelsen TE. Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *Journal of Phycology* 2000; 36(5): 871-881.
- (13) Trabelsi L., Houda M'sakni N., Ben Ouada H., Bacha H., Roudesli S. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2009; 14: 27-31.
- (14) Pereira S., Zille A., Micheletti E., Moradas-Ferreira P., De Philippis R., Tamagnini P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews* 2009; 33(5): 917-941.

- (15) Chug R., Mathur S. Extracellular polymeric substances from cyanobacteria: Characteristics, isolation and biotechnological applications-A. *International Journal of Engineering, Science and Technology* 2013; 3: 49-53.
- (16) Delattre C., Pierre G., Laroche C., Michaud P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 2016; 34(7): 1159-1179.
- (17) Rossi F., De Philippis R. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life* 2015; 5(2): 1218-1238.
- (18) De Philippis R., Ena A., Paperi R., Sili C., Vincenzini M. Assessment of the potential of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest. *Journal of Applied Phycology* 2000; 12(3-5): 401-407.
- (19) De Philippis R., Faraloni C., Margheri MC., Sili C., Herdman M., Vincenzini M. Morphological and biochemical characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2000; 16(7): 655-661.
- (20) Pereira SB., Mota R., Santos CL., De Philippis R., Tamagnini P. Assembly and export of extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacteria: a phylogenomic approach. *In Advances in Botanical Research* 2013; 65: 235-279.
- (21) Tamaru Y., Takani Y., Yoshida T., Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(11): 7327-7333.
- (22) Volk RB., Venzke K., Blaschek W. Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal of Applied Phycology* 2007; 19(3): 255.
- (23) Pereira S., Micheletti E., Zille A., Santos A., Moradas-Ferreira P., Tamagnini P., et al. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology* 2011; 157(2): 451-458.
- (24) Wiegand C., Pflugmacher S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 203(3): 201-218.
- (25) Otero A., Vincenzini M. *Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: Extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism I. *Journal of Phycology* 2004; 40(1): 74-81.
- (26) Richert L., Golubic S., Le Guédès R., Ratiskol J., Payri C., Guezennec J. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Current Microbiology* 2005; 51(6): 379-384.
- (27) Nowruzi B., Blanco S., Nejadstattari T. Chemical and molecular evidences for the poisoning of a duck by anatoxin-a, nodularin and cryptophycin at the coast of lake shoormast (Mazandaran province, Iran). *International Journal on Algae* 2018; 20(4): 359-376.
- (28) Nowruzi B., Blanco S. *In silico* identification and evolutionary analysis of candidate genes involved in the biosynthesis methylproline genes in cyanobacteria strains of Iran. *Phytochemistry Letters* 2019; 29: 199-211.
- (29) Nowruzi B., Wahlsten M., Jokela J. A

- report on finding a new peptide aldehyde from cyanobacterium *Nostoc* sp. Bahar M by LC-MS and Marfey's analysis. *Iranian Journal of Biotechnology* 2019; 17(2): e1853.
- (30) Hosseini N., Akhavan A., Nowruzi B. Detection and relation of polyketide synthase (PKSs) genes with antimicrobial activity in terrestrial cyanobacteria of Lavasan. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2019; 12(6): 419-431.
- (31) Nowruzi B., Akhavan Sepahi A., Soltani Savoji Gh. Genetic analysis of nonribosomal peptide synthesis genes (NRPSs) in natural product biosynthesis of the cyanobacterial strains of Lavasan lake. *Biological Journal of Microorganisms* 2019; 30: 27-54.
- (32) Andersen RA. *Algal culturing techniques*. 1st ed. Cambridge: Academic Press; 2005.
- (33) Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen JR. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 2014; 86(4): 295-335.
- (34) Briones-Nagata MP., Martinez-Goss MR., Hori K. A comparison of the morphology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, *Nostoc commune* Vauch., from the Philippines and Japan. *Journal of Applied Phycology* 2007; 19(6): 675-683.
- (35) Berg K. Heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in recreational and drinking water [Dissertation]. Helsinki: University of Helsinki; 2009.
- (36) Nowruzi B., Khavari-Nejad RA., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstarrari T. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. *Algae* 2012; 27(4): 303-313.
- (37) Nowruzi B., Khavari-Nejad RA., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstarrari T. Optimization of cultivation conditions to maximize extracellular investments of two *Nostoc* strains. *Algological Studies* 2013; 142(1): 63-76.
- (38) Stuart RK., Mayali X., Boaro AA., Zemla A., Everroad RC., Nilson D., et al. Light regimes shape utilization of extracellular organic C and N in a cyanobacterial biofilm. *MBio* 2016; 7(3): e00650-16.
- (39) Otero A., Vincenzini M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology* 2003; 102(2): 143-152.
- (40) Yu H., Jia S., Dai Y. Accumulation of exopolysaccharides in liquid suspension culture of *Nostoc flagelliforme* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010; 160(2): 552-560.
- (41) Vonshak A., Cheung SM., Chen F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology* 2000; 36(4): 675-679.
- (42) Alcorta J., Vergara-Barros P., Antonaru LA., Alcamán-Arias ME., Nürnberg DJ., Díez B. *Fischerella thermalis*: A model organism to study thermophilic diazotrophy, photosynthesis and multicellularity in cyanobacteria. *Extremophiles* 2019; 23: 635-647.
- (43) Ozturk S., Aslim B. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research* 2010; 17(3): 595-602.
- (44) Mashjoor S., Yousefzadi M., Esmaeili MA., Rafiee R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. *Cytotechnology* 2016; 68(5): 1717-1726.
- (45) Dussault D., Vu KD., Vansach T., Horgen FD., Lacroix M. Antimicrobial effects of marine algal extracts and cyanobacterial pure

- compounds against five foodborne pathogens. *Food Chemistry* 2016; 199: 114-118.
- (46) Guedes AC., Amaro HM., Malcata FX. Microalgae as sources of high added-value compounds- A brief review of recent work. *Biotechnology Progress* 2011; 27(3): 597-613.
- (47) Tiwari ON., Khangembam R., Shamjetshabam M., Sharma AS., Oinam G., Brand JJ. Characterization and optimization of Biofloculant exopolysaccharide production by Cyanobacteria *Nostoc* sp. BTA97 and *Anabaena* sp. BTA990 in culture conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015; 176(7): 1950-1963.
- (48) Singh P., Singh SS., Aboal M., Mishra AK. Decoding cyanobacterial phylogeny and molecular evolution using an evonumeric approach. *Protoplasma* 2015; 252(2): 519-535.
- (49) Huang J., Graham N., Templeton MR., Zhang Y., Collins C., Nieuwenhuijsen M. A comparison of the role of two blue-green algae in THM and HAA formation. *Water Research* 2009; 43(12): 3009-3018.
- (50) Katoh H., Shiga Y., Nakahira Y., Ohmori M. Isolation and characterization of a drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01. *Microbes and Environments* 2003; 18(2): 82-88.
- (51) Giner-Lamia J., Pereira SB., Bovea-Marco M., Futschik ME., Tamagnini P., Oliveira P. Extracellular proteins: Novel key components of metal resistance in cyanobacteria? *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 878.
- (52) Liu XJ., Chen F. Potential uses of cyanobacterial polysaccharides in the food industry. In: Pometto A., Shetty K., Paliyath G., Levin RE., editors. *Food Biotechnology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2005: 473-490.
- (53) Liu L., Jokela J., Wahlsten M., Nowruzi B., Permi P., Zhang YZ., et al. Nostosins, trypsin inhibitors isolated from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain FSN. *Journal of Natural Products* 2014; 77(8): 1784-1790.
- (54) Gupta P., Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* 2017; 13: 58-71.
- (55) Hill DR., Keenan TW., Helm RF., Potts M., Crowe LM., Crowe JH. Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology* 1997; 9(3): 237-248.
- (56) Helm RF., Huang Z., Edwards D., Leeson H., Peery W., Potts M. Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *Journal of Bacteriology* 2000; 182(4): 974-982.
- (57) Ploutno A., Carmeli S. Prenostodione, a novel UV-absorbing metabolite from a natural bloom of the cyanobacterium *Nostoc* species. *Journal of Natural Products* 2001; 64(4): 544-545.
- (58) Nowruzi B., Haghghat S., Fahimi H., Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research* 2018; 9(1): 5-12.
- (59) Sharma M., Kaushik A., Bala K., Kamra A. Sequestration of chromium by exopolysaccharides of *Nostoc* and *Gloeocapsa* from dilute aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 2008; 157(2-3): 315-318.
- (60) Hu C., Liu Y., Paulsen BS., Petersen D., Klaveness D. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with

- different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydrate Polymers* 2003; 54(1): 33-42.
- (61) Klock JH., Wieland A., Seifert R., Michaelis W. Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimisation. *Marine Biology* 2007; 152(5): 1077-1085.
- (62) De Philippis R., Faraloni C., Margheri MC., Sili C., Herdman M., Vincenzini M. Morphological and biochemical characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2000; 16(7): 655-661.
- (63) De Philippis R., Sili C., Paperi R., Vincenzini M. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *Journal of Applied Phycology* 2001; 13(4): 293-299.
- (64) Freire-Nordi CS., Vieira AA., Nascimento OR. The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochemistry* 2005; 40(6): 2215-2224.
- (65) Micheletti E., Colica G., Viti C., Tamagnini P., De Philippis R. Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105(1): 88-94.
- (66) Singh N., Asthana RK., Singh SP. Characterization of an exopolysaccharide mutant of *Nostoc spongiaeforme*: Zn²⁺-sorption and uptake. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003; 19(8): 851-857.
- (67) De Philippis R., Paperi R., Sili C., Vincenzini M. Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc PCC7936*. *Journal of Applied Phycology* 2003; 15(2-3): 155-161.
- (68) Pereira S., Micheletti E., Zille A., Santos A., Moradas-Ferreira P., Tamagnini P., et al. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology* 2011; 157(2): 451-458.
- (69) Nie ZY., Xia JL., Levert JM. Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) maxima* in nitrogen-limited batch culture. *Journal of Central South University of Technology* 2002; 9(2): 81-86.

-
- 1- Exopolysaccharide
 - 2- Chroococales
 - 3- Oscillatoriales
 - 4- Nostocales
 - 5- Slime
 - 6- Uronic acid
 - 7- N-acetyl glucosamine
 - 8- 2,3-O-methyl rhamnose
 - 9- 3-O-methyl rhamnose
 - 10- 4-O-methyl rhamnose
 - 11- 3-O-methyl glucose
 - 12- Microeinstains per second per squar meter
 - 13- Heterocyst
 - 14- Akinete
 - 15- Forward
 - 16- Reverse
 - 17- Accession number
 - 18- DNA Data Bank of Japan
 - 19- Inhibition Zone (IZ)
 - 20- McFarland
 - 21- Thin-Layer Chromatography (TLC)
 - 22- Tukey
 - 23- Hydrophilic
 - 24- Hydrophobic
 - 25- Scytonemin
 - 26- Mycosporine-like amino acids
 - 27- Fucoidan
 - 28- D-Mannuronic acid
 - 29- L-Glucuronic acid
 - 30- Released Polysaccharides (RPs)