ORIGINAL ARTICLE

In vitro Antibacterial Activity of Methanol, Ether and Aqueous Extracts in Some Species of Cyanobacteria

Salman Ahmadi Esbechin[1],
Moein Safari[2],
Neda Soltani[3],
Maryam kamali[4]

[1] Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[2] MSc in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ilam University, Ilam, Iran
[3] Associate Professor, Iranian Academic Centre for Education, Culture and Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[4] BSc in Nursing, School of Nursing, Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Tehran, Iran

(Received March 18, 2014 ; Accepted September 16, 2014)

Abstract

Background and purpose: Cyanobacteria are rich sources of secondary metabolites. Antibiotic resistant pathogens are rising and people are more interested in using natural products these days. Hence, identifying competent cyanobacteria for the extraction of antimicrobial compounds is of great benefit. The main objective of this study was to investigate the in vitro antibacterial activity of methanol, ether and aqueous extracts of some species of cyanobacteria.

Materials and methods: In this experimental study, the cyanobacteria of *Fischerella ambigua*, *Synechococcus elongatus* and *Schizothrix vaginata* were obtained from the culture collection of algae at the Iranian Academic Centre for Education, Culture and Science. Extraction was performed by adding the solvent to cyanobacterial biomass and then filtering and drying of the mixture. The antimicrobial effect was studied using disk diffusion method and broth microdilution method was applied to determine the minimum inhibitory concentration.

Results: Results showed that methanol, ether and aqueous extracts of *Fischerella ambigua* and aqueous extract of *Synechococcus elongatus* had considerable antibacterial activity. Ether extract of *Fischerella ambigua* was the most effective against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, and the average diameter of inhibition zone were 31/67 and 32/67 mm, respectively. The most effective extracts against gram-negative and gram-positive bacteria were the aqueous extract of *Synechococcus elongatus* and the ether extract of *Fischerella ambigua*, respectively.

Conclusion: Two species of cyanobacteria *Fischerella ambigua* and *Synechococcus elongatus* were found with significant antimicrobial activity. The aqueous extract of *Synechococcus elongatus* was the best for isolation of antibacterial compounds and diethyl ether was an efficient solvent for the extraction of antimicrobial compounds from *Fischerella ambigua* species.

Keywords: Cyanobacteria, antibacterial, natural products, broth microdilution

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 39-54 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۷ مهر سال ۱۳۹۳ (۵۴-۳۹)

مطالعه خواص ضدباکتریایی عصاره های متانولی، اتری و آبی برخی از گونه های سیانوباکتری ها در شرایط آزمایشگاهی

سلمان احمدی اسبچین[1]
معین صفری[2]
ندا سلطانی[3]
مریم کمالی[4]

چکیده

سابقه و هدف: سیانوباکتری‌ها منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند. باتوجه به مقاومت روزافزون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها وگرایش عمومی به ترکیبات طبیعی، شناسایی سیانو باکتری‌های توانمند جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی اهمیت دارد. هدف اصلی این‌مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی برخی ازگونه‌های سیانوباکتری‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سویه‌های سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ*، *سینکوکوس الانگاتوس* و *شیزوتریکس واجیناتا* از کلکسیون ریزجلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی تهیه شدند. عصاره‌گیری با آغشته کردن بیوماس سیانوباکتری با حلال و سپس صاف و خشک کردن مخلوط حاصل صورت گرفت. به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی از روش انتشار در دیسک و برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده از روش براث میکرودیلوشن استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد هر سه عصاره متانولی، اتری و آبی *فیشرلا آمبیگوآ* و عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* دارای اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحضه‌ای بودند. عصاره اتری *فیشرلا آمبیگوآ* بیش‌ترین تاثیر را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* داشت، به طوری‌که میانگین قطر هاله اطراف آن‌ها به ترتیب ۳۱/۶۷ و ۳۲/۶۷ میلی‌متر بود. موثرترین عصاره بر باکتری‌های گرم منفی عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* و موثرترین عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت عصاره اتری *فیشرلا آمبیگوآ* بود.

استنتاج: دو گونه سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* و *سینکوکوس الانگاتوس* دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی هستند. عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* بهترین عصاره برای جداسازی ترکیبات ضدباکتریایی و همچنین دیاتیل اتر بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از گونه *فیشرلا آمبیگوآ* می‌باشد.

واژه های کلیدی: سیانوباکتری، ضدباکتریایی، ترکیبات طبیعی، براث میکرودیلوشن

مقدمه

امروزه فرآورده‌های طبیعی منبع مهمی برای داروهای جدید و ترکیبات دارویی موثر می‌باشند(۱). فرآورده‌های طبیعی نه تنها به عنوان دارو به کار گرفته می‌شوند، بلکه به عنوان مدل‌های ساختاری برای ایجاد آنالوگ‌های

مولف مسئول: معین صفری– ایلام، بلوار پژوهش، دانشگاه ایلام، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی E-mail: safari_moein@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۳. دانشیار، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران
۴. کارشناس پرستاری، دانشکده پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۲/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۶/۲۵

مصنوعی و نیز به عنوان مدل‌هایی در مطالعات ساختار فعالیت به‌کار می‌روند(۲). بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۶، ۹۷۴ مولکول شیمیایی کوچک به عنوان دارو در سراسر جهان معرفی شدند که ۶۳ درصد آن‌ها از فرآورده‌های طبیعی الهام گرفته شده‌اند(۳). این فرآورده‌ها شامل فرآورده‌های طبیعی (۶ درصد)، مشتقات فرآورده‌های طبیعی (۲۸ درصد)، ترکیبات مصنوعی حاصل از محصولات طبیعی با استفاده ماکرومولکول‌های دارویی (۵ درصد)، و ترکیبات مصنوعی بر پایه دانش به دست آمده از یک محصول طبیعی (۲۴ درصد) می‌باشد. در برخی از نواحی درمانی کاربرد این داروها بیش‌تر است. ۷۷/۸ درصد از داروهای ضدسرطان یا محصولات طبیعی هستند و یا مشتق از محصولات طبیعی می‌باشند. فرآورده‌های طبیعی از طیف گسترده‌ای از گونه‌های متنوع جداسازی شده و برای فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی مورد آزمایش قرار می‌گیرند. اکثر قریب به اتفاق این فرآورده‌های طبیعی از منابعی همچون استرپتومیسس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان مشتق شده‌اند(۴). مشکل عمده در تمرکز بر این منابع جهت دستیابی به مولکول‌های فعال زیستی جدید، کشف مجدد محصولاتی است که قبلا از منابع دیگری به دست می‌آمدند. یک راه برای به‌حداقل رساندن این مشکل توسعه روش‌های زیستی جهت شناسایی فرآورده‌های طبیعی و بررسی قابلیت درمانی جدید آن‌ها می‌باشد. رویکرد دیگر این است که به منابع جدید و مختلف طبیعی توجه شود.

در میان میکروارگانیسم‌ها، سیانوباکتری‌ها یکی از این منابع است. سیانوباکتری‌ها قدیمی‌ترین پروکاریوت‌های فتوسنتز کننده هستند که دارای ویژگی‌هایی مشابه با باکتری‌ها (پروکاریوت) و جلبک‌ها (یوکاریوت) می‌باشند(۵). ساختار و ترکیبات سلولی آن‌ها از نظر فقدان هسته سلولی و اندامک‌های تمایز یافته سلول‌های یوکاریوتی، مشابه سلول‌های پروکاریوتی می‌باشد و از سوی دیگر ترکیبات شیمیایی و ساختار ویژه دیواره سلولی آن‌ها اساساً مشابه با دیواره باکتری‌های گرم منفی است(۶). امروزه این طبقه‌بندی براساس روش های مولکولی و خصوصیات فنوتیپی، شیمیایی و ژنوتیپی یک کشت خالص از سیانوباکتری‌ها انجام می‌شود که به اصطلاح روش پلی‌فازیک نامیده می‌شود(۷). در حال حاضر سیستم نام‌گذاری باکتریولوژیکی سیانوباکتری‌ها به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است. در ایران نیز تحقیقات فراوانی در زمینه شناسایی سیانوباکتری‌ها بر اساس کلیدهای مورفولوژیکی و مولکولی صورت گرفته که از جمله مهترین آن‌ها می‌توان به گزارشات سلطانی و همکاران در سال ۱۳۷۸ در منطقه فیروزکوه اشاره نمود که ۲۰ گونه سیانوباکتری را در خاک‌های منطقه فیروزکوه در شرق تهران شناسایی نمودند(۸). گزارش‌های مربوط به سیانوباکتری های ایران بیشتر مربوط به نمونه‌های آبزی بوده است، برای مثال جنس‌های *کروکوکوس*، *لینجبیاآنابنا*، *سینکوکوس* و *اوسیلاتوریا* که از دریاچه ارومیه جداسازی و شناسایی شده‌اند(۹)، از سوی دیگر نمونه‌های خاکزی که شناسایی شده‌اند، بیش‌تر متعلق به خاک شالیزارها بوده‌اند مانند جنس‌های *استیگونما*، *آنابائنوپسیس*، *نوستوک* و *کالوتریکس* که در مزارع شمال کشور مورد شناسایی قرار گرفته‌اند(۱۰). این میکروارگانیسم‌ها به‌طور گسترده‌ای در خاک‌های طبیعی، آب‌های شیرین و زیستگاه‌های دریایی توزیع شده‌اند و دارای تنوع مورفولوژیکی قابل ملاحضه‌ای می‌باشند(۱۱).

تنوع بسیار زیاد در این گروه از میکروارگانیسم‌ها، جدا از تنوع موفولوژیکی و دامنه وسیعی از زیستگاه‌ها، در میزان سنتز محصولات طبیعی توسط آن‌ها نیز منعکس شده است. سیانوباکتری‌ها برای تولید مجموعه متنوعی از متابولیت‌های ثانویه تکامل یافته‌اند که به بقای گونه‌ها در این نیچ‌های اکولوژیکی گوناگون و بسیار رقابتی کمک کرده است(۱۲). توجه به خواص سیانوباکتری‌ها در گذشته بسیار کم بوده است اما امروزه نشان داده شده که این میکروارگانیسم‌ها دارای کاربردهای فراوانی در زمینه پزشکی، تولید سوخت زیستی، تولید متانول و

همچنین پاک‌سازی زیستی هستند و از نظر مصارف غذایی نیز کاربرد دارند(۱۳). مطالعات اولیه Richard Moore در دانشگاه هاوایی نشان داد که سیانوباکتری‌ها می‌توانند منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه باشند(۱۴). متابولیت‌های سیانوباکتری‌ها طیف قابل توجه‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی را نشان می‌دهند، که شامل فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدسرطان، ضد ویروس، مهارکننده سیستم ایمنی، حشره‌کشی، ضدالتهابی با مهار فعالیت است(۱۷-۱۵). متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی به‌صورت گسترده‌ای توسط سیانوباکتری‌ها تولید می‌شود(۱۸).

به رغم مطالعاتی که تاکنون انجام شده، بسیاری از ترکیبات سیانوباکتری‌ها هنوز تا حد زیادی ناشناخته‌اند و مواد شیمیایی موجود شناسایی نشده‌اند، بنابراین فرصت زیادی برای کشف ترکیبات فعال زیستی در این ارگانیسم‌ها وجود دارد. امروزه با وجود زیستگاه‌ها و منابع فراوان سیانوباکتری‌ها در ایران در مقایسه با سایر کشورها، مطالعات اندکی در مورد خواص ضدمیکروبی عصاره سیانوباکتری‌ها صورت گرفته است. از جمله مهمترین تحقیقات صورت گرفته در این زمینه در ایران می‌توان به گزارشات زرینی و همکاران در سال ۱۳۹۰ و قاسمی و همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره نمود(۱۹،۱۰). بنابراین باتوجه به مقاومت روزافزون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی، شناسایی سیانو باکتری‌های توانمند جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها اهمیت خاصی دارد. هدف اصلی از این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی برخی از گونه‌های سیانوباکتری‌ها علیه باکتری‌های بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری از نمونه ها

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۱ انجام شد، سویه‌های سیانوباکتری *فیشرلا تامبیگو* ISC67، *سینکوکوس الانگاتوس* ISC106و *شیزوتریکس واجیناتا* ISC108 از کلکسیون ریز جلبک‌ها در پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران تهیه شدند. ابتدا جهت اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها خالص سازی سیانوباکتری‌ها به روش پلیت آگار روی محیط کشت جامد BG11 انجام شد(۲۰). به دین صورت که ابتدا محیط کشت مایع BG11 تهیه و سپس ۱۵ گرم آگار به ازای هر یک لیتر محیط به آن اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد و پس از خنک شدن به ظروف پتری منتقل گردید. سپس کلنی‌های سیانوباکتری‌ها توسط لوپ روی محیط کشت جامد BG11 به صورت زیگزاگی کشت داده شدند. این کار برای به دست آوردن کلنی‌های خالص سیانوباکتری‌ها چندین بار تکرار گردید و هر بار کلنی‌هایی که باید دوباره کشت داده می‌شدند، توسط تهیه‌ی اسلاید و بررسی میکروسکوپی انتخاب گردیدند. بعد از اطمینان از خالص بودن کلنی‌های موجود در کشت جامد، کلنی‌ها به محیط کشت مایع BG11 منتقل و در اتاقک رشد تحت هوادهی و تابش نور مداوم و دردمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

عصاره‌گیری از سیانوباکتری ها

عصاره‌گیری به روش Val و همکاران صورت گرفت. برای این منظور ۵۰۰ میلی لیتر از کشت مایع BG11 رشد یافته نمونه‌های سیانو باکتریایی ۳۰ روزه در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، برای ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاصل پس عبور دادن از کاغذ صافی واتمن سه مرتبه صاف شده و بعد از خشک شدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون، به عنوان عصاره آبی نگهداری شد. بیوماس به دست آمده ابتدا در ۶۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد. جهت تهیه‌ی عصاره‌های متانولی و اتریبررویبیوماس حاصل به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر حلال (متانول یا دی اتیل اتر) اضافه شد، سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه رویشیکربا

سرعت ۱۵۰rpm قرار داده شد. عصاره‌های حاصل به وسیله کاغذ صافی واتمن صاف گردید و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون کاملاً خشک شدند. بدین ترتیب عصاره متانولی و اتری تهیه گردید. تمام عصاره‌های خشک شده در فالکون‌های استریل جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند(۲۱).

میکروارگانیسم‌های مورد بررسی

در این تحقیق شش گونه باکتری گرم مثبت بیماری‌زا شامل: *استرپتوکوکوس پایوژنز* (PTCC 1447)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247)، *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) و *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC1169) و شش گونه باکتری گرم منفی بیماری‌زا شامل: *سودموناس آئروژینوزا* (PTCC 1430)، *سالمونلا تیفی* (PTCC 1609)، *اشرشیا کلی* (PTCC 1338)، *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312)، *یرسینا پستیس* (ATCC19428) و *سراشیا مارسنس* (PTCC 1621) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه گردید.

تهیه‌ی سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری‌ها

برای تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلندی از باکتری‌ها ابتدا باکتری‌ها را به‌طور جداگانه، به ترتیب روی محیط کشت‌های مولر هینتون آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس به اندازه تعداد میکروارگانیسم‌ها لوله استریل تهیه و داخل هر لوله به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. به وسیله‌ی آنس حلقوی از کلنی‌های باکتری‌ها برداشته و داخل لوله‌ها انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. برای به دست آوردن غلظت نیم مک‌فارلندی از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. دستگاه روی طول موج ۶۲۰ نانومتر تنظیم و با سرم فیزیولوژی صفر شد. سپس از سوسپانسیون ورتکس شده در کوئیت‌های شیشه‌ای مخصوص دستگاه ریخته و جذب نوری (OD) آن‌ها تعیین شد. به منظور تهیه کدورت نیم مک فارلندی باید OD در طول موج ۶۲۰ نانومتر برابر ۰/۰۸ تا ۰/۱ شود. در نهایت از تمام باکتری‌ها غلظت نیم مک فارلندی تهیه شد(۲۲).

بررسی اثرات ضدباکتریایی

به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی، اتری و آبی سیانوباکتری‌ها از روش انتشار در دیسک (کربی-بائر) استفاده شد(۲۳). به این صورت که ابتدا از عصاره‌های متانولی،اتری و آبی سیانوباکتری‌ها، به وسیله دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد، رقت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. به تعداد باکتری‌ها (۱۰ گونه باکتری) دیسک کاغذی بلانک ۶ میلی‌متری تهیه شده از شرکت پاتن طب (ایران) در داخل رقت‌های مختلف از هر عصاره ریخته شد. پس از ۱۰ دقیقه که دیسک‌ها کاملاً به عصاره آغشته شدند از داخل عصاره‌ها بیرون کشیده شدند و به طور جداگانه در پلیت‌های شیشه‌ای داخل آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا حلال آن بخار و دیسک‌ها خشک شود. دیسک‌ها قبل و بعد از ترکیب با عصاره‌ها وزن شدند و اختلاف آن دو، مقدار عصاره‌ای بود که دیسک‌ها در رقت‌های مختلف هر عصاره جذب کرده بودند. به این ترتیب دیسک‌ها برای بررسی خواص ضد باکتریایی آماده شدند. از سوسپانسیون نیم مک فارلندی باکتری‌ها با سوآب استریل برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به صورت چمنی کشت داده شدند. طبق روش استاندارد انتشار دیسک، دیسک‌های آغشته به عصاره در فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متری) از یکدیگر در محیط کشت‌ها قرار داده شدند(۲۳). محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای

۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌ها با استفاده از خط‌کش معمولی اندازه‌گیری شد. تمام آزمایشات سه بار تکرار گردیدند. در این تحقیق از دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد به دلیل این‌که تاثیری روی باکتری‌های مورد بررسی ندارد به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، کلرامفنیکل و پنی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شدند.

تعیین مقدار MIC و MBC

حداقل غلظت مهارکننده MIC (minimum inhibitory concentration) عصاره‌های سیانوباکتری‌هایی که دارای اثر ضدباکتریایی بودند، با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و روش براث میکرودیلوشن تعیین شد(۲۴). به این ترتیب که ابتدا به هر یک از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث به اضافه ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده عصاره (۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید، سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری به چاهک‌ها اضافه شد. سپس پلیت‌های به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس با مقایسه‌ی کدورت چاهک‌های تحت تیمار با چاهک‌های شاهد میزانMIC مشخص گردید، لذا اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت باز دارنده به صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد(۲۵). حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration) MBC عصاره‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها کاملا متوقف شده بود با سوآپ استریل (به مقداری که سوآپ کاملاً آغشته شود) نمونه‌برداری و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت کم‌ترین غلظتی از عصاره که باکتری‌ها در آن رشد نکرده بودند، به عنوان مقادیر MBC گزارش شدند(۲۶). نتایج آزمایش‌های به دست آمده از نظر آماری به صورت توصیفی با یکدیگر مقایسه گردیدند. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. کلیه مراحل آزمایشات این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام انجام پذیرفت.

آنالیزهای آماری

برای آنالیزآماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. ابتدا از آزمون مقایسه میانگین چند جامعه (تحلیل واریانس) با فاصله اطمینان ۹۹ درصد استفاده گردید. از آن‌جا که با توجه به آزمون تحلیل واریانس بین جوامع مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، از این رو یکی از آزمون‌های پس از تجربه (دانکن) برای دسته‌بندی این متغیرها استفاده گردید. همچنین برای توصیف متغیرهای تحقیق از آمار توصیفی (میانگین و انحراف معیار) استفاده شد.

یافته ها

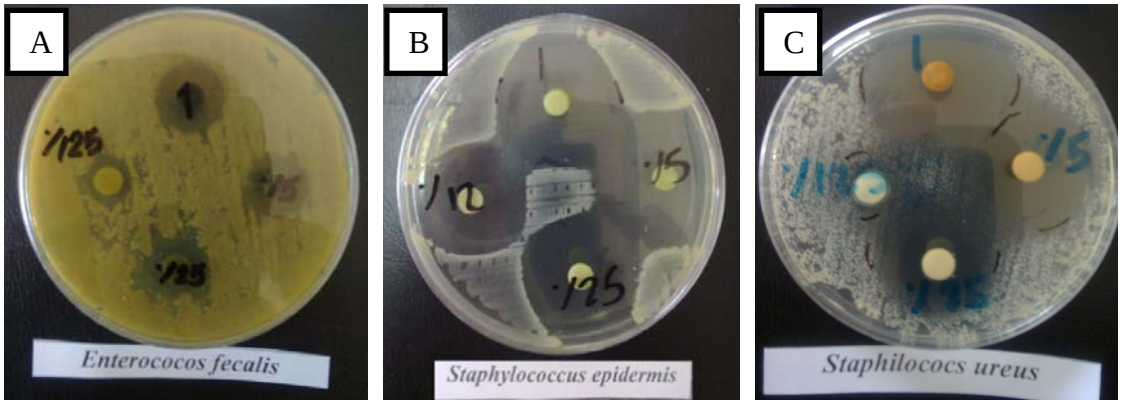
با توجه به میانگین قطر هاله‌ها، عدم رشد اندازه‌گیری شده پس از تاثیرعصاره‌های متانولی، اتری و آبی سه گونه سیانوباکتری مورد بررسی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماریزا نشان داد که هر سه عصاره متانولی، اتری و آبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* و عصاره آبی سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس* دارای اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحضه ای بودند اما هیچ یک از عصاره‌های سیانوکتری *شیزوتریکس واجیناتا* و همچنین عصاره متانولی و اتری سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس* اثر ضدباکتریایی قابل توجهی نداشتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده تقریباً برابر صفر است ($p< ۰/۰۱$).

نتایج حاصل از تاثیر عصاره متانولی، اتریوآبی سیانو

باکتری *فیشرلا آمبیگوآ* و عصاره آبی سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس* روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا در جدول شماره ۱ نشان داده شده است (تصویر شماره ۱). با توجه به میانگین قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تاثیر غلظت‌های ۱۲۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* علیه باکتری‌های گرم مثبت، می‌توان گفت که تنها باکتری استاندارد *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) و باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) به عصاره متانولی این سیانوباکتری حساس بودند (قطر هاله بین ۱۳ تا ۱۸میلی‌متر). عصاره متانولی این سیانوباکتری روی سایر باکتری‌های گرم مثبت استاندارد و تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی ایلام اثر قابل توجهی نداشت. همچنین از بین گرم منفی‌ها تنها باکتری *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 11312)به عصاره متانولی این سیانوباکتری حساس بود. این باکتری بیش‌ترین حساسیت را به دیسک‌های حاوی ۳۱/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی این سیانوباکتری نشان داد.سایر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نسبت به این عصاره مقاومت نشان دادند.

عصاره اتری سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* بیشترین تاثیر را روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) داشت، به‌طوری‌که میانگین قطر هاله حاصل از تاثیر عصاره، اطراف آن‌ها به ترتیب ۳۱/۶۷ و ۳۲/۶۷ میلی‌متر بود. این عصاره کم‌ترین اثر را روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) داشت. از بین ۶ گونه باکتری گرم منفی، این عصاره تنها روی دو گونه باکتری *یرسینا پستیس* (ATCC19428)و *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر داشت. آنالیز آماری داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتری سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* علیه باکتری‌های گرم مثبت به طور معنی‌داری بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی بود ($p< ۰/۰۱$).

یافته‌های حاصل از تاثیر عصاره آبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگو* روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که این عصاره روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر ضدباکتریایی داشت. عصاره آبی این سیانوباکتری اثر چشم‌گیری روی باکتری‌های گرم مثبت داشت، به طوری که بیش‌ترین تاثیر را روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) با قطر هاله ۳۳/۳۳ میلی‌متر داشت. تنها دو باکتری *استرپتوکوکوس پایوژنز* (PTCC 1447) و *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC1169) از بین ۶ گونه باکتری گرم مثبت مورد بررسی نسبت به این عصاره مقاوم بود. با این وجود، از بین باکتری‌های گرم منفی مورد بررسی



تصویر شماره ۱: تصاویری از اثرات ضد باکتریایی عصاره های متانولی (A)، اتری (B) و آبی (C) سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* به ترتیب علیه باکتری های انتروکوکوس فیکالیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استافیلوکوکوس اورئوس

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی متر) و انحراف معیار حاصل از تاثیر عصاره‌های متانولی، اتری و آبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* و عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* علیه باکتری‌های گرم‌منفی و گرم مثبت بیماری‌زا.

		Serratia marcescens (PTCC 1621)	*Yersinia pestsi* (ATCC19428)	*Salmonella typhi* (PTCC 1609)	*Proteus vulgaris* (PTCC 1312)	*Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1430)	*Escherichia coil* (PTCC 1338)	*Micrococcus luteus* (PTCC1169)	*Streptococcus pyogenes* (PTCC 1447)	*Bacillus cereus* (PTCC 1247)	*Enterococcus faecalis* (PTCC 1237)	*Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1114)	*Staphylococcus aureus* (PTCC 1112)
کنترل های مثبت	جنتامایسین	۲۲ ±۱/۷۳	۲۵/۳۳ ±۰/۵۷	۲۱/۳۳ ±۱/۱۵	۲۰/۳۳ ±۰/۵۷	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	۱۳ ±۱	۲۱/۳۳ ±۱/۱۵	۲۳/۳۳ ±۱/۵۲	۲۱/۶۷ ±۱/۵۲	۲۵/۳۳ ±۰/۵۷	۱۰/۶۷ ±۰/۵۷	۲۸/۶۷ ±۱/۱۵
	استرپتومایسین	۱۴/۳۳ ±۱/۱۵	۲۱/۳۳ ±۰/۵۷	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷	۱۰ ±۰	۲۱ ±۱/۷۳	۱۴/۶۷ ±۱/۱۵	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷	۱۲ ±۰	۱۸/۳۳ ±۰/۵۷	۲۰/۶۷ ±۰/۵۷	۱۰/۳۳ ±۰/۵۷	۲۳/۳۳ ±۰/۵۷
	کلرامفنیکل	۲۴/۶۷ ±۰/۵۷	۳۰/۳۳ ±۰/۵۷	۲۸/۶۷ ±۰/۵۷	۱۶/۳۳ ±۰/۵۷	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	۲۳/۳۳ ±۰/۵۷	۲۸/۶۷ ±۰/۵۷	۱۵/۶۷ ±۰/۵۷	۲۳/۶۷ ±۲/۳	۲۳/۶۷ ±۰/۵۷	۳۱/۳۳ ±۰/۵۷	۳۰/۳۳ ±۰/۵۷
	نالیدیکسیک اسید	۱۵/۶۷ ±۰/۵۷	۲۲ ±۱	۲۲/۶۷ ±۲/۰۸	۱۴/۳۳ ±۰/۵۷	۱۲/۳۳ ±۰/۵۷	مقاوم	۲۲/۶۷ ±۲/۰۸	۱۶/۳۳ ±۱/۵۲	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	۱۶/۶۷ ±۱/۱۵	مقاوم	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷
	پنی سیلین	مقاوم	مقاوم	۱۱/۵ ±۰/۵	مقاوم	مقاوم	مقاوم	۱۱/۵ ±۰/۵	مقاوم	مقاوم	۱۶ ±۱	مقاوم	۲۷/۳۳ ±۰/۵۷
عصاره متانولی *فیشرلا آمبیگوآ*	۳۱/۳*	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۷/۳۳ ±۰/۵۷	۶/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۰/۶۷ ±۱/۱۵	۱۹ ±۱	عدم تاثیر	عدم تاثیر
	۱۹	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۳/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۹ ±۰	۱۷/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر
	۹/۸	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۰/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۸ ±۱	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر
	۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۴/۳۳ ±۰/۵۷	۱۳/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر
عصاره آبی *فیشرلا آمبیگوآ*	۲۹/۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	۶/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۰/۳۳ ±۰/۵۷	۲۴ ±۱	۳۲/۳۳ ±۰/۵۷	۳۳/۳۳ ±۰/۵۷
	۱۹/۶	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۶/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	۲۱/۳۳ ±۰/۵۷	۲۷/۳۳ ±۰/۵۷	۳۰ ±۰
	۹/۲	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۳/۶۷ ±۱/۱۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۷/۳۳ ±۰/۵۷	۱۹/۶۷ ±۰/۵۷	۲۵ ±۱	۲۸/۶۷ ±۱/۱۵
	۴/۱	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۸ ±۰	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۲/۳۳ ±۰/۵۷	۱۳/۶۷ ±۰/۵۷	۱۷/۳۳ ±۰/۵۷	۲۲ ±۰
عصاره اتری *فیشرلا آمبیگوآ*	۲۸	عدم تاثیر	۱۲/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۱/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۸/۳۳ ±۰/۵۷	۲۲ ±۱	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷	۱۲/۳۳ ±۰/۵۷	۳۲/۶۷ ±۰/۵۷	۳۱/۶۷ ±۰/۵۷
	۱۸/۷	عدم تاثیر	۱۰/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۹/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۶/۶۷ ±۰/۵۷	۲۰ ±۰	۱۴ ±۱	۱۱/۶۷ ±۰/۵۷	۳۰/۳۳ ±۰/۵۷	۲۵/۶۷ ±۰/۵۷
	۹/۵	عدم تاثیر	۷/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۷/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۳/۶۷ ±۰/۵۷	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷	۱۲/۳۳ ±۰/۵۷	۱۰/۳۳ ±۰/۵۷	۲۵/۶۷ ±۰/۵۷	۲۰/۳۳ ±۰/۵۷
	۴/۶	عدم تاثیر	۷/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۶/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۱/۶۷ ±۰/۵۷	۱۵/۶۷ ±۰/۵۷	۱۰/۶۷ ±۱/۱۵	۷/۶۷ ±۰/۵۷	۲۰/۳۳ ±۰/۵۷	۱۹/۶۷ ±۰/۵۷
عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس*	۲۹/۲	۱۶ ±۰	۱۵/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۵/۶۷ ±۰/۵۷	۲۲/۳۳ ±۰/۵۷	۲۰/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۸/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۴/۳۳ ±۰/۵۷	۲۴/۳۳ ±۰/۵۷	۲۶/۳۳ ±۱/۵۲
	۱۸/۵	۱۲/۶۷ ±۰/۵۷	۱۳/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۴/۳۳ ±۰/۵۷	۱۹ ±۰	۱۵/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۵ ±۰	عدم تاثیر	۱۱/۳۳ ±۰/۵۷	۱۷/۳۳ ±۰/۵۷	۱۹/۳۳ ±۰/۵۷
	۹/٤	۱۰/۳۳ ±۰/۵۷	۱۱/۶۷ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۱/۶۷ ±۱/۱۵	۱۶/۶۷ ±۰/۵۷	۹/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۱۱/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۹/۳۳ ±۰/۵۷	۱۳/۳۳ ±۰/۵۷	۱۴/۶۷ ±۰/۵۷
	٤/۳	۹/۳۳ ±۰/۵۷	۹/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۹/۳۳ ±۰/۵۷	۱۲/۶۷ ±۰/۵۷	۷/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۷/۳۳ ±۰/۵۷	عدم تاثیر	۶/۶۷ ±۰/۵۷	۱۰/۳۳ ±۰/۵۷	۸/۳۳ ±۰/۵۷

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

عصاره آبی *فیشرلا آمبیگوآ* تنها روی باکتری *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر ضدباکتریایی داشت و سایر باکتری‌های گرم منفی نسبت به این عصاره مقاوم بودند. آنالیز آماری داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده برابر صفر می‌باشد، بنابراین فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* علیه باکتری‌های گرم مثبت به طور معنی‌داری بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج به دست آمده پس از تاثیر عصاره آبی سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس* روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که عصاره آبی این سیانوباکتر دارای اثر ضدباکتریایی قابل توجه‌ای علیه باکتری‌های مورد بررسی بود. بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد حاصل از تاثیر این عصاره روی باکتری‌های گرم مثبت مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) به اندازه ۲۶/۳۳ میلی‌متر بود (تصویر شماره۲)، در صورتی که بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد در بین باکتری‌های گرم منفی مربوط به باکتری *سودموناس آئروژینوزا* (PTCC 1430) با قطر هاله ۲۲/۳۳ میلی‌متر بوده است. در بین باکتری‌های گرم مثبت باکتری *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) و *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC1169)، و در بین باکتری‌های گرم منفی تنها باکتری *سالمونلا تیفی* (PTCC 1609) نسبت به این عصاره مقاوم بودند. تاثیر این عصاره روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقریبا یکسان بود. آنالیز آماری داده‌ها در سطح یک درصد، خطای محاسبه شده برابر ۰/۰۲ نشان داد، بنابراین اختلاف معنی‌داری بین تاثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری روی باکتری‌های

تصویر شماره ۲: تصویر اثر ضد باکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *سینکوکوسالانگاتوس* علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس.

گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نشد.

بر اساس نتایج به دست آمده تاثیر عصاره اتری *فیشرلا آمبیگوآ* (۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر) روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431) و *استافیلوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر این باکتری‌ها بیش‌تر بود. همچنین تاثیر عصاره متانولی *فیشرلا آمبیگوآ* (۱۹ میلی گرم بر میلی‌لیتر) روی باکتری *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) از تمام آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر این باکتری بیش‌تر بود. از بین عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1430) بیشترین تاثیر را عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* (۲۹/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر) داشت.موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و موثرترین عصاره علیه باکتری‌های گرم مثبت عصاره آبی *فیشرلا آمبیگوآ* بود. تاثیر عصاره آبی *فیشرلا آمبیگوآ* (۲۹/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC1114) از تمام آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر آن‌ها بیش‌تر بود. موثرترین آنتی‌بیوتیک علیه باکتری *سراشیا مارسسنس* (PTCC 1621)، جنتامیسین و موثرترین عصاره روی این باکتری عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* (۲۹/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر) بود. کم اثرترین آنتی‌بیوتیک موثر بر روی باکتری‌های گرم مثبت، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بود. نتایج بررسی قطر هاله حاصل از تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها علیه باکتری *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) نشان داد که موثرترین آنتی بیوتیک روی این باکتری، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و موثرترین عصاره بر روی این باکتری عصاره آبی *فیشرلا آمبیگوآ* (۲۹/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) بود. نتایج همچنین نشان داد که دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی هیچ گونه اثر ضدباکتریایی نداشت.

مقادیر MIC و MBC عصاره آبی و متانولی سیانوباکتری‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا در جدول شماره ۲ مشخص شده است. این نتایج نیز نشان می دهندکه عصاره متانولی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر روی باکتری‌های *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) و *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) اثر کشندگی و روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت. عصاره متانولی این سیانوباکتری در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر کشندگی داشت. آنالیزهای آماری در سطح یک درصد نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود ندارد. عصاره اتری سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) و *استرپتوکوکوس پیوژنز* (PTCC 1447) اثر کشندگی و بر روی باکتری‌های *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) و *میکروکوکوس لوتئوس* (PTCC1169) اثر بازدارندگی داشت. عصاره اتری این سیانوباکتری در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) و

میکروکوکوس لوتئوس (PTCC1169) اثر کشندگی و بر روی باکتری‌های *یرسینا پستیس* (ATCC19428) و *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت. این عصاره در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری‌های *یرسینا پستیس*(ATCC19428)و *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر کشندگی و بر روی باکتری *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر بازدارندگی داشت. آنالیز آماری داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای محاسبه شده برابر صفر می‌باشد (p< ۰/۰۱). همچنین مشخص شد که عصاره آبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114)، *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247) اثر کشندگی و بر روی *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر بازدارندگی داشت. این عصاره در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر روی باکتری‌های *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) اثر کشندگی داشت. آنالیز داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که، اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت به طور معنی‌داری بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود (p< ۰/۰۱). عصاره آبی سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس* در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1430) اثر کشندگی و بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* (PTCC 1338)، *استرپتوکوکوس پایوژنز* (PTCC 1447)، *یرسینا پستیس* (ATCC19428)، *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) اثر بازدارندگی داشت. غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر این عصاره روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس پایوژنز* (PTCC 1447)، *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (PTCC 1114) اثر کشندگی و بر روی باکتری *انتروکوکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر بازدارندگی داشت. این غلظت‌ها به صورت تجربی به دست آمده و تفسیر می‌شود.

بحث

دراین پژوهش سه گونه سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ*، *سینکوکوس الانگاتوس*و*شیزوتریکس واجیناتا* از نظر فعالیت‌های ضدمیکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. در میان این سه گونه، بررسی اثرات ضدمیکروبی

جدول شماره ۲: مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های متانولی،اتریوآبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* و آبی سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس*علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

باکتری ها	عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس*		عصاره اتری *فیشرلا آمبیگوآ*		عصاره آبی *فیشرلا آمبیگوآ*		عصاره متانولی *فیشرلا آمبیگوآ*	
	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی	حداقل غلظت مهارکنندگی
Staphylococcus aureus PTCC 1112	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Staphylococcus epidermidis PTCC 1114	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Enterococcus faecalis PTCC 1237	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Bacillus cereus PTCC 1247	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
Streptococcus pyogenes PTCC 1447	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Micrococcus luteus PTCC1169	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۲۵۰	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Escherichia coli PTCC 1338	۵۰۰	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Pseudomonas aeruginosa PTCC 1430	۱۲۵	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	۱۰۰۰	۵۰۰
Proteus vulgaris PTCC 1312	۲۵۰	۱۲۵	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
Salmonella typhi PTCC 1609	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Yersinia pestsi ATCC19428	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۲۵۰	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر
Serratia marcescens PTCC 1621	۲۵۰	۱۲۵	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر	عدم تاثیر

سیانوباکتری *شیزوتریکس واجیناتا* برای نخستین بار در کشور مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج حاصل از اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی اتری و آبی سیانوباکتری‌ها نشان داد که عصاره‌های حاصل از هر سه حلال می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی نشان دهند. از بین عصاره‌های متانولی و اتری سه گونه سیانوباکتری مورد بررسی تنها عصاره‌های متانولی و اتری *فیشرلا آمبیگوآ* فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری از خود نشان دادند.از این رو انتخاب حلال‌های مناسب قطبی یا غیرقطبی جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی سیانوباکتری‌ها در ایجاد اثرات ضدمیکروبی آن‌ها دارای اهمیت می‌باشد. در بین عصاره‌های آبی، عصاره آبی دو گونه *فیشرلا آمبیگوآ* و *سینکوکوس الانگاتوس*فعالیت ضدمیکروبی داشتند. گزارشات مختلفی از اثرات ضدمیکروبی سیانوباکتری‌ها با حلال‌های گوناگون صورت گرفته است. برای مثال، سلطانی و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که عصاره‌های اترنفتی، متانولی و آبی سیانوباکتری‌ها فعالیت ضدمیکروبی نشان داده‌اند(۱۷). نتایج همچنین نشان داد که عصاره آبی، متانولی و اتری *شیزوتریکس واجینات ا* فاقد اثر ضدمیکروبی معنی‌داری بود. تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات ضدمیکروبی این گونه با حلال‌های مورد مطالعه گزارش نشده است. از بین عصاره‌های متانولی مورد بررسی تنها عصاره متانولی سیانوباکتری*فیشرلا آمبیگوآ* دارای فعالیت ضدباکتریایی می‌باشد و عصاره متانولی دو گونه دیگر فاقد اثر ضدباکتریایی معنی‌داری بودند. در تحقیق مشابه‌ای Sakthivel و همکاران در سال ۲۰۱۲ ضمن بررسی خواص ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها نشان دادند که متانول بهترین حلال برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی از سیانوباکتری‌ها می‌باشد، آن‌ها همچنین نشان دادند که متانول برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی برخی از سیانوباکتری‌ها مانند *سینکوکوس الانگاتوس*و*اوسیلاتوریا ویلیه* حلال مناسبی نیست(۱۵). با بررسی خواص ضدباکتریایی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* مشخص شد که این سیانوباکتری از بین باکتری‌های گرم مثبت بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1247)، *انتروکوس فیکالیس* (PTCC 1237) اثر داشته و سایر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به این عصاره مقاوم بودند. همچنین مشخص شد که عصاره متانولی این سیانوباکتری از بین باکتری‌های گرم منفی بیش‌ترین تاثیر را روی *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) داشته است. قاسمی و همکاران نیز در تحقیقات خود نشان دادند که عصاره متانولی سیانوباکتری‌ها اثر قابل توجهی علیه باکتری‌های پاتوژن دارد. آن‌ها در تحقیق خود،گزارش نمودند که ترکیبات زیادی از جمله، فیشرلین و آمبیگوئین از این سیانوباکتری تولید می‌شود که این ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی هستند(۱۰). طبق نتایج به دست آمده عصاره متانولی *فیشرلا آمبیگوآ* بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و مثبت مورد بررسی به یک اندازه تاثیر داشت. در مطالعات مشابه، قاسمی و همکاران و همچنین سلطانی و همکاران نشان دادند که بین تاثیر عصاره متانولی این سیانوباکتری روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(۲۷،۱۰).

نتایج به دست آمده از بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* نشان داد که این عصاره اثر قابل توجهی روی اکثر باکتری‌های گرم مثبت دارد و از بین باکتری‌های گرم منفی تنها باکتری *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1312) نسبت به این عصاره حساس بود.قاسمی و همکاران نیز با بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی سیانو باکتری *فیشرلا* دریافتند که این عصاره دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد، به‌طوری‌که تاثیر این عصاره از آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر این باکتری بیش‌تر بود(۱۰). همچنین نتایج حاصل از اثر ضدباکتریایی عصاره اتری سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* روی باکتری‌های بیماری‌زا

نشان داد که اثر این عصاره بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی است. تحقیقات زیادی نشان دادند که اثرات عصاره‌های به دست آمده از سیانوباکتری‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی است(۲۷-۲۹). Shan و همکاران گزارش نمودند که مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به مواد ضد باکتریایی مربوط به سطح آب دوست غشای خارجی آن‌ها است که غنی از مولکول‌های لیپوپلی ساکارید است و مانعی برای نفوذ مولکول‌های متعدد از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدباکتریایی است. از سوی دیگر غشاء نیز با آنزیم‌ها موجود در فضای پری پلاسمیک، که قادر به شکستن مولکول‌های وارد شده از خارج سلول‌اند، در ارتباط است(۳۰). با این حال Kalemba و Kunicka نیز بیان نمودند که باکتری‌های گرم مثبت بر خلاف باکتری‌های گرم منفی فاقد غشای خارجی و ساختار دیواره سلولی می باشند(۳۱). در این تحقیق مشخص شد که دی‌اتیل‌اتر بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدباکتریایی از سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* می‌باشد. Inci و همکاران نیز با بررسی سه عصاره متانولی، دی اتیل اتر و استونی ۱۱ گونه سیانوباکتری دریافتند که دی اتیل اتر بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از گونه‌های مختلف سیانوباکتری‌ها می‌باشد و حلال استونی و متانولی هیچ گونه فعالیت ضدمیکروبی نداشتند(۳۲). اثر سیانوباکتری *سینکوکوس الانگاتوس* در این تحقیق علیه باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر یا تقریباً یکسان با باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج حاصل از تاثیر این عصاره با یافته‌های Tiwari و Sharma مطابقت دارد(۱۸). طبق نتایج حاصل نشان داد که در تمام عصاره‌های موثر روی باکتری‌ها، با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان قطر هاله مهاری و در نتیجه میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای مشابه نیز Mathivanan و همکاران نشان دادند که بین قطر هاله عدم رشد و غلظت عصاره سیانوباکتری‌های *لینجبیا ماجوسکولا* و *اوسیلاتوریا پرینسپس* رابطه مستقیمی وجود دارد(۳۳).

مطالعات فراوانی در زمینه جداسازی و شناسایی متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضدمیکروبی از سیانوباکتری‌ها انجام شده است. برای مثال Chandra و Rajashekhar با بررسی فیتوشیمیایی عصاره‌های اتانولی، متانولی، کلروفرمی، دی اتیل اتری و آبی چند گونه از سیانوباکتری‌ها نشان دادند که فنول، فلاونوئید و کارتنوئید در تمام عصاره‌های به دست آمده وجود دارند، درحالیکه آلکالوئیدها و استروئیدها/تریترپن‌ها در همه عصاره‌ها به جزء عصاره آبی سیانوباکتری‌ها وجود داشتند. همچنین به طور مشابه فیکوسیانین‌ها در تمام عصاره‌ها به استثناء عصاره کلروفرمی موجود بودند. تانین‌ها در تمام عصاره‌ها به جزء عصاره آبی و کلروفرمی وجود داشتند اما ساپونین‌ها و کومارین‌ها در هیچ‌کدام از عصاره‌ها موجود نبودند. آنها نشان دادند که این ترکیبات دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی هستند(۳۴). Cho و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی و ترپنوئیدها دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند و قادرند از طریق تخریب غشاء از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کنند(۳۵). در مطالعه دیگری Cushinie و همکاران گزارش کردند که فعالیت ضدمیکروبی فلاونوئیدها احتمالاً ناشی از توانایی آن‌ها برای تشکیل کمپلکسی با پروتئین‌های خارج سلولی و محلول و در نهایت با دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد(۳۶). همچنین توییت در سال ۲۰۱۰ در تحقیقات خود در زمینه شناسایی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط سیانوباکتری‌ها، با بررسی عصاره متانولی سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* شش ترکیب تولید شده توسط این سیانوباکتری را جداسازی و شناسایی نمود. این ترکیبات شامل آمبیگوئین D ایزونیتریل، آمبیگوئین B ایزونیتریل، دی‌کلرو آمبیگوئین B ایزونیتریل، فیشرلین A، همچنین هیدروکسی- ایکوساتترائنوئیک اسید و متوکسی- نانادکادنوئیک اسید بودند. توئیت بیان کرد که این ترکیبات دارای فعالیت‌های زیستی می‌باشند(۳۷).

Ravehو Carmeliدر تحقیق خود نشان دادند که آمبیگوئین D ایزونیتریل و آمبیگوئین B ایزونیتریل دارای اثرات ضد باکتری و ضدقارچی متوسطی هستند(۳۸). به نظر می‌رسد با توجه به تولید مواد ضدمیکروبی فراوان توسط سیانوباکتری‌ها، احتمالاً سنتز این متابولیت‌ها نتیجه دفاع سیانوباکتری‌ها در محیط علیه ارگانیسم‌های دیگر مثل: باکتری، قارچ، ویروس و ریزجلبک‌های یوکاریوتی است که می‌تواند مزیتی برای بقاء این میکروارگانیسم‌ها در محیط طبیعی باشد.

در سال‌های اخیر در ایران رویکرد پژوهش‌های جدید به سمت مسائل زیست محیطی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها در صنعت داروسازی وپزشکی بوده است. با این حال، بیش‌تر تحقیقات متمرکز بر میکروارگانیسم‌های خاصی بوده و با وجود تنوع فراوان در فعالیت‌های زیستی سیانوباکتری‌ها شناخت کمی نسبت به آن وجود دارد، همچنین به علت دشواری مراحل کشت خالص، آن‌ها کم‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از این رو شناسایی سیانو باکتری‌های مفید و تحقیق در زمینه استفاده کاربردی از آن‌ها در صنعت و پزشکی امری ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر کاربردهای پزشکی این میکروارگانیسم‌ها مورد توجه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌های متانولی، آبی و اتری گونه *شیزوتریکس واجینا تا* هیچ‌گونه اثرات ضدمیکروبی در ایران ندارد و بررسی اثرات ضدمیکروبی این گونه با سایر حلال‌ها پیشنهاد می‌گردد. گزارشی مبنی بر بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتری سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* وجود ندارد اما نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره اتری این سیانوباکتری در ایران روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثر قابل توجهی داشته است. از این‌رو بررسی متابولیت‌های ثانویه و اثرات ضدمیکروبی این سیانوباکتری در مناطق جغرافیایی مختلف پیشنهاد می‌گردد. بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، بیش‌ترین اثرات ضدباکتریایی سیانوباکتری‌ها مربوط به عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس*و بعد از آن عصاره اتری *فیشرلا آمبیگوآ* بود. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان نمود که عصاره آبی *سینکوکوس الانگاتوس* بهترین عصاره برای جداسازی ترکیبات ضدباکتریایی است و همچنین دیاتیلاتر بهترین حلال برای استخراج ترکیبات ضدمیکروبی از گونه *فیشرلا آمبیگوآ* می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که از میان سیانوباکتری‌های مورد بررسی، دو گونه سیانوباکتری *فیشرلا آمبیگوآ* و*سینکوکوس الانگاتوس* دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بوده و می‌توانند کاندیدای خوب جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی باشند و به نظر می‌رسد می‌توان از ترکیبات موجود در عصاره آن‌ها به عنوان دارو در کنترل و مهار بسیاری از بیماری‌های عفونی و باکتریایی استفاده نمود. با این حال استفاده از عصاره سیانوباکتری‌ها به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی مستلزم تحقیقات بیش‌تری در زمینه مکانیسم عمل مواد موثر این عصاره‌ها روی میکروارگانیسم‌ها و مطالعات فارماکولوژیکی است و انجام این گونه مطالعات قبل از استفاده دارویی روی آن‌ها ضروری است.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی میکروبیولوژی مصوب سال ۱۳۹۰ با کد ۱۰۶۵۸۳۹ است که با حمایت مالی دانشگاه ایلام و همکاری گروه میکروبیولوژی نفت پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا شده است.

References

1. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads, Biochim Biophys Acta 2013; 1830(6): 3670-3695.

2. Harvey AL. Natural products in drug discovery. Drug Discov Today 2008; 13(19-20): 894-901.
3. Sadri SM, Namjoo A, Rafieian M, Ashrafi K, Shahin-Fard N, Ansari-Samani R, et al. Comparing the Effects of Nigella Sativa Extract and Gentamicin in Treatment of Urinary Tract Infection Caused by Ecoli. J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(96): 22-29 (Persian).
4. Sharafati-Chaleshtori R, Rafieian-Kopaei M, Rokni N, Mortezaei S, Sharafati-Chaleshtori A. Antioxidant Activity of Zataria Multiflora Hydroalcoholic Extract and Its Antibacterial Effect on Staphylococcus Aureus. J Mazand Univ Med Sci 2013; 22(1): 88-94 (Persian).
5. Lopes VR, Ramos V, Martins A, Sousa M, Welker M, Antunes A, et al. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. Mar Environ Res 2012; 73: 7-16.
6. Kalaitzis JA, Lauro FM, Neilan BA. Mining cyanobacterial genomes for genes encoding complex biosynthetic pathways. Nat Prod Rep 2009; 26(11): 1447-1465.
7. Mishra AK, Shukla E, Singh SS. Phylogenetic comparison among the heterocystous cyanobacteria based on a polyphasic approach. Protoplasma 2013; 250(1): 77-94.
8. Soltani N, Dezfolian M, Shokravi Sh, Baftechi L, Shima E. Isolation and Morphological and Molecular Identification of New Species of Cyanobacteria from Firoozkooh region (Tehran Province) Using Different Culture Media. Journal of Science Kharazmi University 2010; 8(4): 319-328 (Persian).
9. Asadi M, Dehghan G, Zarrini G, Soltani N. Taxonomic survey of cyanobacteria of Urmia Lake (NW Iran) and their adjacent ecosystems based on morphological and molecular methods. Rostaniha 2011; 12(2): 153-116 (Persian).
10. Ghasemi Y, Tabatabaei-Yazdi M, Shokravi S, Soltani N, Zarrini G. Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 2003; 14(3): 203-209.
11. Baskara V, Ashok Prabu V. Antibacterial Activity of Cyanobacterial Species from Adirampattinam Coast, Southeast Coast of Palk Bay. Current Research Journal of Biological Sciences 2010; 2(1): 24-26.
12. Kalaitzis JA, Lauro FM, Neilan BA. Mining cyanobacterial genomes for genes encoding complex biosynthetic pathways. Nat Prod Rep 2009; 26(11): 1447-1465.
13. Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. J Appl Microbiol 2009; 106(1): 1-12.
14. Cardellina JH, Moore Guest Editor BS. Richard E. Moore (1933-2007). J Nat Prod 2010; 73(3): 301-302.
15. Sakthivel K, Kathiresan K. Antimicrobial activities of marine cyanobacteria isolated from mangrove environment of south east coast of India. J Nat Prod 2012; 5: 147-156.
16. Oftedal L, Selheim F, Wahlsten M, Sivonen K, Døskeland SO, Herfindal L. Marine Benthic Cyanobacteria Contain Apoptosis-Inducing Activity Synergizing with daunorubicin to Kill Leukemia Cells, but not Cardiomyocytes. Marine Drugs 2010; 8(10): 2659-2672.
17. Soltani N, Khavari-Nejad RA, Yazdi MT, Shokravi S, Fernández-Valiente E. Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. Pharm Biol 2005; 43(5): 455-459.

18. Tiwari A, Sharma D. Antibacterial Activity of Bloom forming Cyanobacteria against Clinically Isolated Human Pathogenic Microbes. J Algal Biomass Utiln 2013; 4(1): 83-89.
19. Zarrini G, Rasooli I, Abazari M, Ghasemi Y. Investigation of Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Urmia Lake Catchment Area. J Ardabil Univ Med Sci 2012; 11(4): 329-336 (Persian).
20. Andersen RA. Algal culturing techniques. 1th ed. Massachusetts: Elsevier Academic Press; 2005.
21. Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, et al Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Int Microbiol 2001; 4(1): 35-40.
22. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. Food Control 2014; 35(1): 177-183.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Approved Standard. 15th ed. Clinical Laboratory Standards Institute; 2009.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard. 8th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
25. Ahmady-Asbchin S, Safari M, Moradi H, Sayadi V. Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (Mespilus germanica) against bacteria isolated from hospital environment. J Arak Univ Med Sci 2013; 16(6): 1-13 (Persian).
26. Yilmaz MT. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. Turkish Journal of Medical Sciences 2012; 42(s2): 1423-1429.
27. Soltani N, Khavari-Nejad RA, Tabatabaei-Yazdi M, Shokravi S. Growth and Some metabolic Features of Cyanobacterium Fischerella Sp. FS18 in Different Combined Nitrogen Sources. Journal of Sciences Islamic Republic of Iran 2007; 18(2): 123-128.
28. Asadi A, Khavari-Nejad R, Soltani N, Najafi F, Molaie-Rad A. Physiological and antimicrobial characterizations of some cyanobacteria isolated from the rice fields in Iran. Journal of Agricultural Technology 2011; 7(3): 649-663.
29. Madhumathi V, Deepa P, Jeyachandran S, Manoharan C, Vijayakumar S. Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake. Int J Microbiol Res 2011; 2(3): 213-216.
30. Shan L, He P, Sheen J. Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. Cell Host Microbe 2007; 1(3): 167-174.
31. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003; 10(10): 813-829.
32. Inci T, Bilge H, Dilek U, Atakan S. Antimicrobial activities of the extracts marine algae from the Coast of Urla (Izmir, Tukey). Turk J Biol 2006; 30: 171-175.
33. Mathivanan K, Ramamuthy V, Rajaram R. Antimicrobial activity of Oscillatoria princeps and Lyngbya majuscule against

pathogenic microbes. International Journal of Current Research 2010; 5: 097-101.

34. Chandra KSh, Rajashekhar M. Antimicrobial activity of freshwater cyanobacteria isolated from pharmaceutical wastes. Afri J Microbiol Rese 2013; 7(17): 1757-1765.
35. Cho WI, Choi JB, Lee K, Chung MS, Pyun YR. Antimicrobial activity of Torilin Isolated from Torilis japonica Fruit against Bacillus subtilis. J M Food Sci 2008; 73(2): 37-46.
36. Cushinie T, Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob l Agents 2005; 26(5): 343-356.
37. Tuyet, LTA. Chemical and Biological Investigations of Vietnamese Cyanobacteria Available at: http://ub-ed.ub.uni-greifswald.de/opus/volltexte/2010/848/.
38. Raveh A, Carmeli S. Antimicrobial ambiguines from the cyanobacterium Fischerella sp. Collected in Israel. J Nat Prod 2007; 70(2): 196-201.