

## Detection and Relation of Polyketide Synthase (PKSs) Genes Responsible for Antimicrobial Activity in Terrestrial Cyanobacteria of Lavasan

Roghayeh Sadat Hosseini<sup>1</sup>, Abbas Akhavan Sepahi<sup>2</sup>, Bahareh Nowruzi<sup>1\*</sup>

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2018/07/23  
Accepted: 2019/02/10  
Available online: 2019/03/06

#### Article Subject:

Microbial Biotechnology

IJMM 2019; 12(6): 419-431

#### Corresponding author:

#### Bahareh Nowruzi

Department of Biology,  
Science and Research Branch,  
Islamic Azad University,  
Tehran, Iran

#### Email:

bahare77biol@yahoo.com

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** Cyanobacteria are considered as favorable source for new pharmaceutical compounds. To date, the majority of bioactive metabolites isolated from cyanobacteria are either polyketides (PKSs) or non-ribosomal peptides. Despite of several worldwide studies on prevalence of PKSs, none of them included the terrestrial cyanobacteria of the Lavasan. Therefore, this study aimed to detect the PKS genes and correlation of the presence of these genes with antimicrobial compounds synthesis.

**Materials and Methods:** Morphological and molecular identification of the terrestrial strains was performed after culture and purification. Amplification of polyketide synthase and phylogenetic trees were used for phylogenetic analysis. Nucleotide and protein sequences were deposited in GenBank. Lastly, to show the correlation of this gene with antimicrobial compounds synthesis, antibiogram bioassay was used.

**Results:** Phylogenetic analysis revealed that most of the identified 16S rRNA genes and PKS domains had more than 90% similarity to their closest matches in the Gen-Bank. In addition, antibiogram assessment showed the different pattern of inhibition, indicating the involvement of variety antimicrobial substances.

**Conclusions:** According to the results of this study, it seems the antibiogram bioassay and molecular detection of polyketide synthase genes are useful techniques for the assessment of productive species of natural products and the possible role of polyketide synthase enzyme complexes in the biosynthesis of biologically active compounds.

**Keywords:** Polyketide synthase (PKSs), Soil cyanobacteria, Antimicrobial activity

### How to cite this:

Hosseini N, Akhavan A, Nowruzi B. Detection and Relation of Polyketide Synthase (PKSs) Genes With Antimicrobial Activity in Terrestrial Cyanobacteria of Lavasan. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :419-431



## شناسایی و ارتباط ژن‌های پلی‌کتیدسنتاز (PKSs) با فعالیت ضد میکروبی در سیانوباکتری‌های خاکزی لواسان

رقیه‌سادات حسینی<sup>۱</sup>، عباس اخوان‌سپهی<sup>۲</sup>، بهاره نوروزی<sup>۱\*</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** سیانوباکتری‌ها منبع مطلوبی از ترکیبات دارویی جدید هستند. امروزه، بخش عمده متابولیک‌های بیواکتیو جداسازی شده از سیانوباکتری‌ها به صورت پلی‌کتیدی، پپتیدهای غیرریبوزومی و یا هیبریدی از این دو هستند. به‌رغم مطالعات وسیعی که تاکنون در زمینه پراکنش ژن‌های پلی‌کتیدسنتاز (PKSs) انجام گرفته، هیچ‌کدام از آنها شامل سیانوباکتری‌های خاکزی لواسان نبوده است. به همین دلیل هدف از این مطالعه، ردیابی ژن‌های پلی‌کتیدسنتاز و بررسی همبستگی حضور این ژن‌ها با سنتز ترکیبات ضد میکروبی است.

**مواد و روش کار:** شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی سویه‌های خاکزی بعد از کشت و خالص‌سازی انجام گرفت. به‌منظور آنالیزهای فیلوژنتیک، از تکثیر ژن پلی‌کتیدسنتاز و رسم درختان فیلوژنتیک استفاده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی در بانک ژن ثبت شدند و در نهایت، به‌منظور نشان‌دادن همبستگی حضور این ژن‌ها با سنتز ترکیبات ضد میکروبی، آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام انجام گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیک نشان داد که ژن‌های 16S rRNA و DMN های PKS شناسایی شده، بیش از ۹۰ درصد شباهت را با نزدیک‌ترین سویه‌ها در بانک ژن داشتند. همچنین نتایج حاصل از آزمایش‌های زیستی آنتی‌بیوگرام، الگوهای متفاوت ممانعت را که نشان‌دهنده مواد ضد میکروبی متنوع است، نشان داد. **نتیجه‌گیری:** براساس این نتایج، به نظر می‌رسد که تجزیه و تحلیل زیستی ژن‌های پلی‌کتیدسنتاز، ممکن است تکنیک مفیدی برای ارزیابی گونه‌های تولیدکننده محصولات طبیعی و نقش احتمالی این کمپلکس‌های آنزیمی، در بیوسنتز ترکیبات فعال زیستی باشد.

**کلمات کلیدی:** ژن‌های پلی‌کتیدسنتاز (PKSs)، سیانوباکتری‌های خاکزی، فعالیت ضد میکروبی

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

### موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM1397;12(6): 419-431

### نویسنده مسئول:

### بهاره نوروزی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

### پست الکترونیک:

bahare77biol@yahoo.com

### مقدمه

مانند ونکومایسین، پنی‌سیلین و اریترومایسین و همچنین عوامل سرکوب‌کننده ایمنی مانند مرحله‌وسپورین، راپامایسین هستند (۱). ترکیبات فعال زیستی سیانوباکتریایی، داروهای مفید و جدیدی را فراهم می‌کنند که تولید آنها به صورت سنتتیک، به‌علت پیچیدگی ساختمان‌شان مشکل است. تعداد فراوانی از متابولیت‌های ثانویه سیانوباکتری‌ها، پپتیدها و دپسی‌پپتیدها هستند. ویژگی‌های ساختمانی متنوع در متابولیت‌های ثانویه تولیدشده، پیشنهاد می‌کند که این پپتیدها با ماشین ریبوزومی وابسته به اسید نوکلئیک

سیانوباکتری‌های خاکزی (اپیدافیک و اندافیک) به دلیل تثبیت ازت هوا، مهم‌ترین و کاربردی‌ترین ریزجلبک‌هایی هستند که امروزه در بیوتکنولوژی مطرح هستند. این میکروارگانیسم‌ها، شاخه منحصر به فردی از موجودات با قابلیت رشد در نیچ‌های مختلف رقابتی بوده و در نتیجه به‌عنوان منابع مطلوبی از ترکیب‌های فعال زیستی شناخته شدند (۱). برخی از این پپتیدها دارای بخش‌های مشتق شده از استات هستند که از طریق پلی‌کتیدسنتازها سنتز می‌شوند و مسئول سنتز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های شناخته‌شده‌ای

از ترکیب‌های آنتی‌بیوتیکی هستند. بیشتر این متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی جداسازی شده در زیتوده سیانوباکتریایی تجمع می‌یابند؛ اما بررسی‌ها نشان می‌دهد که سیانوباکتری‌ها همچنین می‌توانند ترکیب‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی را به درون محیط خود تراوش کنند. کشف ترکیب‌های شیمیایی جدید در سیانوباکتری‌ها می‌تواند منجر به تکامل صنعت داروسازی شود. همچنین، تعداد فراوانی از این ترکیب‌ها کاندیدای خوبی در کشاورزی و صنعت، به‌ویژه داروسازی هستند (۵).

به‌رغم مطالعات بسیار در زمینه پراکنش ژن‌های PKS در سراسر جهان، هیچ‌کدام از آنها در زمینه سویه‌های سیانوباکتریایی خاک‌زی لواسان نبوده و تاکنون از منابع بیوتکنولوژی آنها در ایران کمتر بهره‌برداری شده است؛ لذا جستجو برای کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید و بررسی حضور ژن‌های PKS با سنتز ترکیبات ضد میکروبی در هفت سویه خاک‌زی لواسان، جزو اولین کارهای انجام‌شده در معرفی سویه‌های سیانوباکتریایی در تولید متابولیت‌هایی با منشأ دارویی است. در این راستا جستجو برای آشکارسازی حضور ژن‌های پلی‌کتید سنتاز و ارتباط این ژن‌ها با فعالیت‌های ضد میکروبی، اهمیت بسیاری دارد.

## مواد و روش‌ها

### موقعیت جغرافیایی مکان نمونه‌برداری شده، روش

#### نمونه‌برداری و کشت

نمونه‌برداری از بخش فوقانی خاک مناطق مختلف لواسان تا عمق ۱۰ سانتی‌متری انجام شد. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری، در شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. برای کشت، جداسازی و خالص‌سازی نمونه‌های سیانوباکتری‌ها از محیط کشت جامد BG-110 استفاده شد. نمونه‌های سیانوباکتریایی در اتاقکی با روشنایی ممتد با شدت ۸-۱۲ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از ۱۳ روز، کلنی‌ها با رنگ‌های مختلف روی محیط کشت مشاهده شدند. به‌منظور خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها از کلنی‌های به‌دست‌آمده سه تا پنج بار کشت مجدد تهیه شد تا کاملاً از خالص بودن آنها اطمینان حاصل شود. پس از خالص‌سازی، برای انجام آزمایش‌های مولکولی، می‌بایست از اگزینیک‌بودن نمونه‌ها اطمینان حاصل کرد. به همین دلیل مقداری از نمونه‌کشت‌های اگزینیک‌شده به‌صورت نقطه‌نقطه در محیط کشت R2A کشت شدند. تلاش شد از تمام سطح کشت اگزینیک نمونه‌برداری انجام شود. سپس ظرف‌های پلیت تلقیح‌شده،

سنتز نمی‌شوند. تولید این محصولات حتی در حضور بازدارنده‌های ریبوزومی یا RNase، بیانگر این ادعا است (۲).

پلی‌کتیدها، گروه مهم دیگری از محصولات طبیعی هستند. تعداد زیادی از آنها از طریق آنزیم‌های چند مودوله پلی‌کتید سنتاز سنتز می‌شوند. با وجود تنوع ساختمانی بسیار بالای این فرآورده‌ها، فقط دو بلوک ساختمانی، یعنی استات و پروپیونات در سنتز پلی‌کتیدها سهمیم هستند. تنوع بالای ساختمانی موجود در این ترکیبات، با احیای گروه‌های کتو (keto) از طریق واکنش‌های هیدروکسیلاسیون و گلیکوزیلاسیون حاصل می‌شود. هر مودول پلی‌کتید سنتاز، مسئول مشارکت یک واحد استات یا پروپیونات درون زنجیره پلی‌کتید در حال رشد است و بلوک‌های ساختمانی در اشکال فعال‌شده، به‌صورت مالونیل و متیل مالونیل کوانزیم A هستند. چگونگی تولید محصول از طریق این آنزیم‌ها کمی پیچیده و به شرح زیر است:

هر مودول پلی‌کتید سنتاز، به‌دمین‌های ضروری و در برخی موارد اختیاری برای طویل‌سازی زنجیره، تقسیم‌شدنی است. سه‌دمین ضروری شامل دمین کتوسنتاز، دمین آسیل ترانسفراز و دمین تیواستراز هستند. مرحله اول در تجمع پلی‌کتیدها با دمین آسیل ترانسفراز (حدود ۳۵۰ باقی‌مانده) کاتالیز می‌شود که انتقال بلوک‌های ساختمانی فعال‌شده را به ACP-domain برعهده دارد. دمین کتوسنتاز حدود ۴۵۰ باقی‌مانده دارد و واکنش طویل‌سازی را در سنتز پلی‌کتیدها کاتالیز می‌کند. واکنش با انتقال زنجیره‌کتیدی از پروتئین حامل آسیل یک مودول بالادست به سایت فعال دمین کتوسنتاز شروع می‌شود. سپس یک واحد مالونیل متصل به پروتئین حامل آسیل با دمین کتوسنتاز دیکربوکسیله می‌شود. درنهایت در دمین تیوله‌شده، آزادسازی فرآورده در پایانه C انجام می‌شود (۳).

تحقیقات پیرامون سیانوباکتری‌ها در صنعت داروسازی در اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی آغاز شد که منجر به کشف ترکیب‌های جدید با ویژگی‌های ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد HIV، ضد باکتریایی، ضد قارچی و سیتوتوکسیک در کاربردهای کلینیکی شد. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها که بیش از نیم‌قرن برای معالجه انسان و حیوان به کار رفته است، منجر به کاهش چشمگیری در کارآمدی تأثیر تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌واسطه تکامل تحمل باکتری‌ها شده است. به‌علاوه، تعداد آنتی‌بیوتیک‌های جدید معرفی‌شده در دنیای امروز کاهش چشمگیری یافته است؛ از این رو جست‌وجو برای یافتن متابولیت‌هایی با خواص آنتی‌بیوتیکی جدید، اهمیت خاصی دارد (۴). در این میان، سیانوباکتری‌ها منابع مهمی

برای تکثیر توالی ژن 16SrRNA با استفاده از پرایمرهای 149Revers / 27Forward واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر، انجام شد. برنامه PCR، شامل چهار مرحله است: مرحله یک، ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه؛ مرحله دو، ۹۴ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه؛ مرحله سه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ مرحله چهار، ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه. تکثیر ژن PKS، با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی دژنره DKReves/DKForword انجام شد (جدول ۱) (۹). برنامه زمانی انجام PCR، ۲۵ چرخه برای تکثیر ژن 16SrRNA و ۳۵ چرخه برای تکثیر ژن PKS در نظر گرفته شد. قطعه حاصل برای دمین PKS تقریباً ۷۰۰bp و ۱۶۰۰ جفت بازی ژن 16SrRNA توالی یابی شد. عمل ترادف گیری فرآورده های PCR، از طریق توالی یاب خودکار مدل Beckman از سوی شرکت Microgene (کره جنوبی) انجام گرفت. برنامه PCR، شامل ۴ مرحله است. مرحله یک، ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، مرحله دو، ۹۴ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، شیب دمایی از ۳۵ درجه سلسیوس تا ۵۵ درجه سلسیوس برای دمای اتصال به کار رفت و در نهایت دمای ۵۱ درجه سلسیوس مناسب، تشخیص داده شد؛ سپس ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله سه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و مرحله چهار شامل ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه است.

در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت پنج تا هفت روز یا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز قرار داده شد. بعد از رشد، وجود یا نبود کلنی در اطراف هر نقطه چک شد. در نهایت نمونه های آگزیک به منظور آزمایش های مولکولی، استفاده شدند (۶).

### شناسایی براساس ویژگی های مورفولوژیک نمونه ها

شناسایی مورفولوژیک سیانوباکتری ها، به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر مدرج با اندازه ۱۰ میکرومتر انجام گرفت. چندین نمونه باید برای شناسایی مطمئن آزمایش می شدند. شناسایی براساس کلیدهای شناسایی انجام شد (۷). پارامترهایی مثل: طول و قطر سلول های رویشی، هتروسیست و آکینت، مورفولوژی سلول انتهایی، مسافت بین هتروسیست و نزدیک ترین آکینت (محاسبه شده به عنوان تعداد سلول ها)، حضور یا غیاب هتروسیست های انتهایی، شکل فیلامنت ها و تجمع در کلنی ها برای بخش های مورفولوژیک بررسی شدند.

### غربال گیری حضور ژن PKS در نمونه های سیانوباکتری

#### هدف استخراج DNA

استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت. برای به دست آوردن غلظت DNA هم از روش کیفی به کمک لودکردن روی ژل الکتروفورز و هم به روش کمی به کمک دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) spectrophotometer استفاده شد. کیفیت مطلوب DNA استخراج شده، کیفیت بالای باندها را تضمین می کند (۸).

### انجام واکنش PCR برای تکثیر ژن PKS و 16SrRNA

جدول ۱. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی ژن های هدف و برنامه های استفاده شده در این مطالعه

ژن	توالی
16SrRNA	27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') 149R (5'-CTTCGCTCTGTGTGCCTAGGT-3')
PKS	DKF(5'-GTGCCGGTNCRTGNGYYTC-3') DKR(5'-GCGATGGAYCCNCARCARYG-3')

(شکاف های موجود در توالی ها پس از هم ردیف سازی حذف شد. درخت فیلوژنی با استفاده از آنالیز Maximum Likelihood و Neighbour-Joining ساخته شد. انجام یک سلسله تصحیحات از جمله ادغام و درج فراوانی های حاصل از دو روش Neighbour-Joining و آنالیز Maximum Likelihood با استفاده از نرم افزار Snagit Editor (نسخه ۱۰) انجام گرفت. ژن 16SrRNA Aquifexaolicus (با کد دسترسی AJ309733 در بانک ژن به عنوان

### ساخت درختان فیلوژنتیک و ثبت ژن

جستجوی بلاست نوکلئوتید برای یافتن توالی های مشابه ژن 16S rRNA که در پایگاه داده های GenBank™ در NCBI موجود است، انجام شد. توالی ژن 16S rRNA به دست آمده در این بررسی، به همراه دیگر توالی های مشابه گرفته شده از GeneBank با استفاده از برنامه CLUSTAL W هم ردیف شده و سپس به طور دستی در برنامه BioEdit نسخه ۷ و MEGA (نسخه ۷) ادیت شدند

سه باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* (PTCC 1112)، *Bacillus cereus* (PTCC 1015) سه باکتری گرم منفی (*Escherichia coli* (PTCC 1047) و *Enterobacter* sp. 638) یک مخمر (*Candida albicans* (ATCC 10231) و قارچ‌های پاتوژنیک (*Aspergillus niger* (ATCC 16404) و *Fusarium* sp) در این بررسی استفاده شدند. برای کشت باکتری‌های ۲۴ ساعته، از محیط کشت مولر - هینتون آگار و برای بررسی اثر ضدقارچی، محیط سابرو دکستروز آگار انتخاب شد. پلیت‌ها در گرم‌خانه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری‌ها و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۲۷ درجه سلسیوس برای قارچ‌ها قرار گرفتند. قطر مناطق بازدارنده رشد شامل قطر دیسک کاغذی با خط‌کش اندازه‌گیری و با میلی‌متر بیان شد.

### روش‌های آماری

پس از انجام آزمایش‌ها، آنالیزهای آماری داده‌های حاصل از هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و Excel انجام شد (۱۲). تمام داده‌ها حاصل از نتایج سه تکرار است. تفاوت معنی‌دار بین عوامل اندازه‌گیری شده با آنالیز واریانس یک‌طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گرفت و نتایج مربوط به مقایسه‌ها به صورت نمودار با برنامه Excel نشان داده شد.

### یافته‌ها

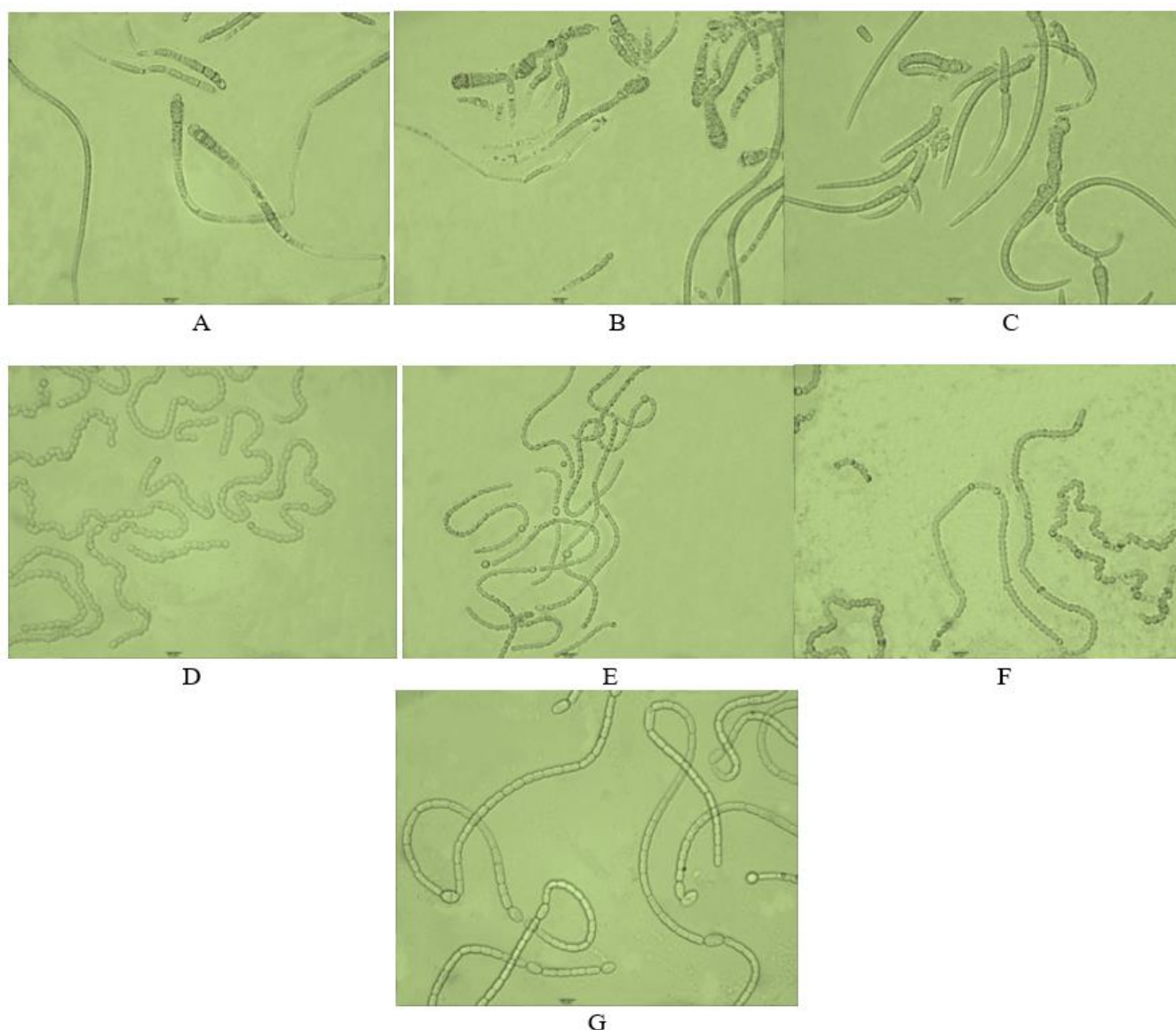
#### نتایج حاصل از بررسی تاکسونومی مورفولوژیکی و مولکولی سیانوباکتری‌های موجود در خاک لواسان

در کل ۲۲ سویه سیانوباکتری مختلف متعلق به سه خانواده *Nostocaceae*، *Scytonemataceae* و *Rivulariaceae* یافت شد. جنس‌های یافت‌شده شامل سویه‌های مختلف *Nostoc*، *Scytonema* و *Calothrix* گزارش شدند. نتایج حاصل از سه بار تکرار تکثیر ژن PKS نشان داد که فقط چهار سویه متعلق به جنس *Nostoc*، یک سویه *کلوتریکس* و دو سویه *سایتونما* از ۲۲ سویه دارای این ژن هستند. از هفت سویه خالص شده، عکس‌های میکروسکوپی تهیه شد (شکل ۱). شناسایی مولکولی با استفاده از تکثیر ژن ۱۶ SrRNA فقط روی هفت سویه انجام گرفت.

گروه خارجی (Outgroup) استفاده شد. برای جلوگیری از تک شاخه‌ای درون‌گروهی، از توالی‌های 16SrRNA، *Chloroflexus*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Escherichia coli aurantiacus* استفاده شد. صحت روابط بین تاکسون‌ها با آنالیز Bootstrap تشکیل‌شده از ۱۰۰۰ نمونه تکرار انجام گرفت. جستجوی بلاست X، برای یافتن توالی‌های مشابه ژن *PKS* که در پایگاه داده‌های GenBank™ در NCBI موجود است، انجام شد. توالی‌های ژن *PKS* به دست آمده در این بررسی به همراه دیگر توالی‌های مشابه گرفته شده از GeneBank با استفاده از برنامه MUSCLE هم‌ردیف شدند. برای ساختن درخت از برنامه IQ-Tree، با استفاده از برنامه Maximum likelihood ساخته شده و سپس درخت با کمک برنامه Figtree تصحیح شد. صحت روابط بین تاکسون‌ها با آنالیز Bootstrap تشکیل شده از ۱۰۰۰ نمونه تکرار انجام گرفت (۱۰). عملیات ثبت ژن با استفاده از نرم‌افزار Bankit موجود در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank> صورت پذیرفت. برای گرفتن کد دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی توالی‌یابی شد، هفت سویه در پایگاه داده DDBJ ثبت شده و به آن رمز یا شماره‌ای تعلق گرفت که مخصوص آن توالی است.

#### بررسی تأثیرهای ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار

در این روش از دیسک‌های کاغذی آغشته به عصاره سیانوباکتریایی حل‌شده در حلال متانول که براساس مطالعات پیشین برترین حلال در مطالعات ضد میکروبی است، به عنوان بازدارنده رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده شد. برای آماده‌سازی عصاره‌های سیانوباکتریایی در فاز ایستایی رشد (روز ۱۵) به کار رفت (۱۱). ۵۰۰ میلی‌گرم از زیست‌توده خشک‌شده در ۶۰ درجه سلسیوس، داخل میکروتیوپ‌ها تقسیم شد (هرکدام ۱۰۰ میلی‌گرم) و به هرکدام ۳۰۰ میلی‌گرم میله شیشه‌ای ۰/۵ میلی‌متری (disruptor beads, Scientific Industries) و یک میلی‌لیتر حلال اضافه شد. سپس ورتکس به مدت نیم‌ساعت صورت گرفت تا دیواره اسکلتی عصاره‌ها، کاملاً از بین برود. مخلوط در ۱۰/۰۰۰g× به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی برای بررسی خواص ضد میکروبی در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۱).



شکل ۱. شکل های سویه های سیانوباکتریایی بومی یافت شده در خاک لواسان.

A: *Calothrix* sp. F6; B: *Scytonemas* sp. F11; C: *Scytonema* sp. F12; D: *Nostoc* sp. F16; E: *Nostoc* sp. F25; F: *Nostoc* sp. F27; G: *Nostoc* sp. F187

گیرند. به بیان دیگر، این سویه بیشترین قرابت را با سویه *Nostoc* sp. SN64 دارد. سویه *Nostoc* sp. F16 کلاذ جداگانه ای را تشکیل می دهد که نشان از فاصله فیلوژنتیکی بین آن و سویه های دیگر از لحاظ تکاملی است. سویه *Nostoc* sp. F18 با حمایت بالای (۹۹ درصد) با سویه های *Nostoc* sp. BN1 و *Nostoc* sp. N66 خوشه بندی می شوند و در یک کلاذ قرار می گیرند. سویه *Nostoc* sp. F25 با حمایت بالای (۹۴ درصد) با سویه *Nostoc* sp. LCRSM-24105 خوشه بندی می شوند و در یک کلاذ قرار می گیرند. سویه *Calotrix* sp. F6 با حمایت بالای (۹۴ درصد) Bootstrap با سویه *Calotrix derestica* خوشه بندی می شوند و در یک کلاذ قرار می گیرند. به بیان دیگر،

### نتایج حاصل از آنالیز درخت فیلوژنتیک ژن *16SrRNA*

#### هفت سویه بررسی شده

با توجه به درخت فیلوژنتیک ساخته شده، هر شاخه روابط بین تاکسون ها از نظر نسل یا جد (نیاکانی) را معین می کند. طول شاخه، بیانگر میزان تفاوت ها نسبت به نیای مشترک است. در واقع، طول شاخه تعداد تغییرهایی که در یک شاخه رخ داده را نشان می دهد. درخت ساخته شده با روش Maximum Likelihood نشان می دهد که سویه *Nostoc* sp. F27 با حمایت بالای (۹۹ درصد) Bootstrap با سویه *Nostoc* sp. SN64 خوشه بندی می شوند و در یک کلاذ قرار می

Bootstrap تشکیل شده از ۱۰۰۰ نمونه تکرار انجام شد. مقیاس نشان داده شده در شکل ۳/۰ جهش را به ازای هر وضعیت اسید آمینه نشان می دهد. سویه های مطالعه شده در درخت فیلوژنتیک با حمایت بالا، با سویه های هم نام خود در یک کلاستر قرار گرفتند و این قرابت فیلوژنتیک آنها را نشان می دهد.

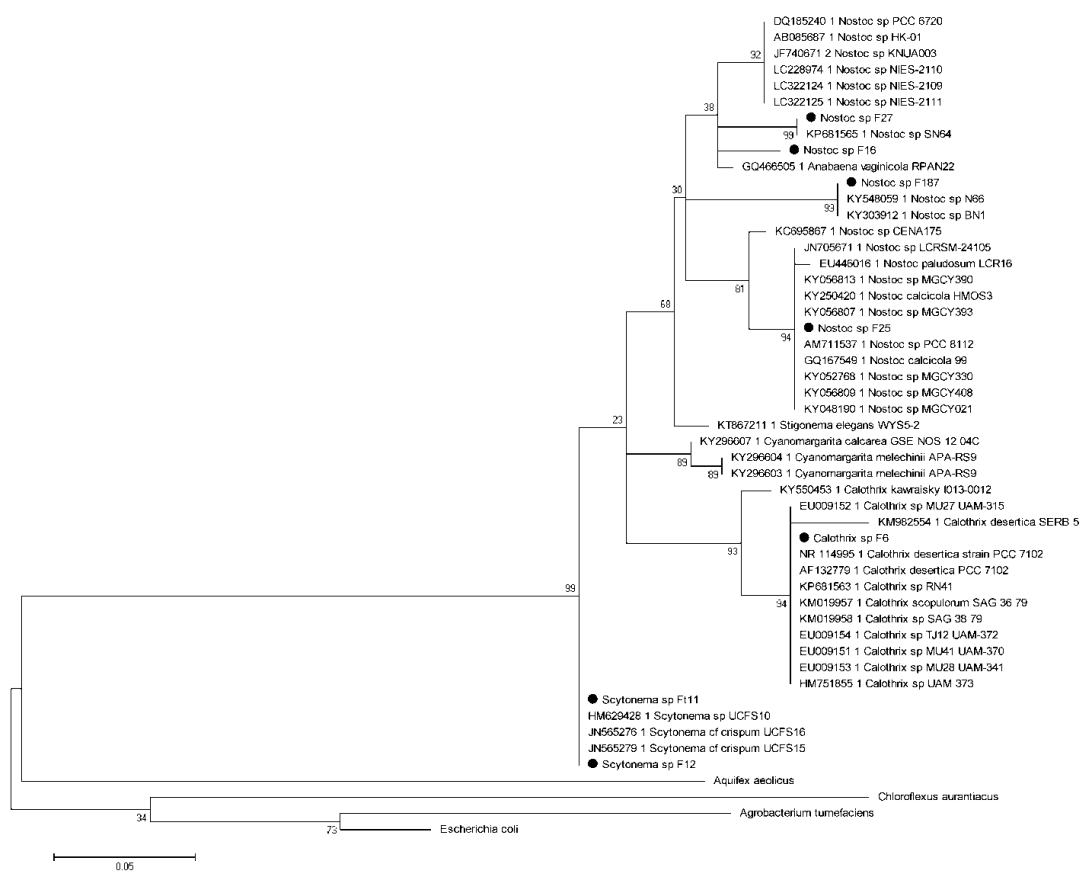
### نتایج حاصل از ثبت توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن های تکثیر شده

توالی های نوکلئوتیدی و پروتئینی توالی یابی شده هفت سویه براساس توالی ژن *16S rRNA* و PKS در پایگاه داده های (DDBJ) ثبت شدند (جدول ۲). سویه های خالص شده در بانک هرباریوم سیانوباکتریایی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات نگهداری می شوند.

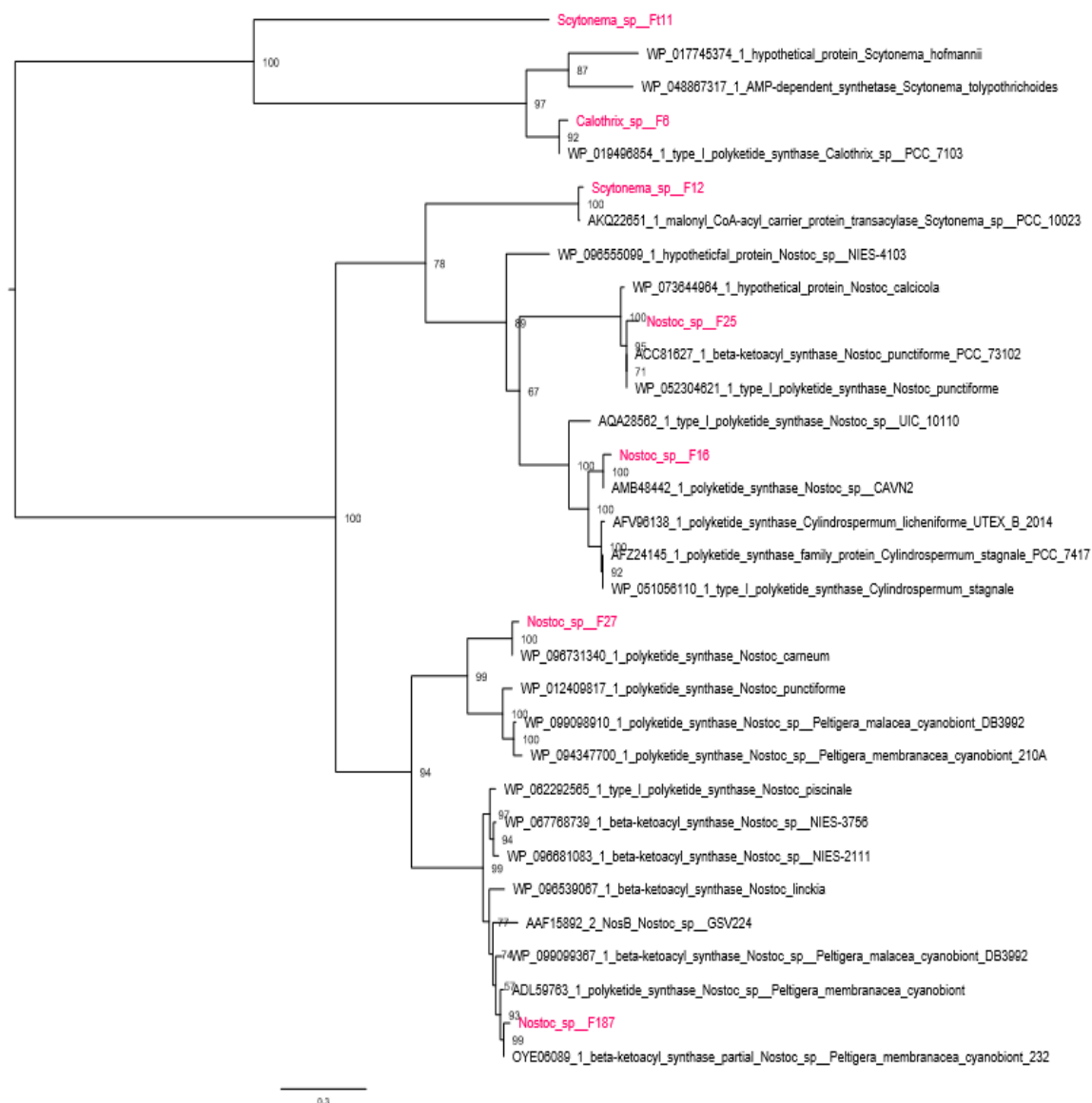
سویه مورد مطالعه دارای بیشترین قرابت با سویه *Calatridexteristica* است. سویه *Scytonema sp. Ft11* و سویه *Scytonema sp. F12* با حمایت بالای (۹۹ درصد) Bootstrap در یک کلاستر خوشه بندی می شوند (شکل ۲).

### آنالیز فیلوژنی دمین های ژن PKS هفت سویه سیانوباکتری

تکثیر دمین های PKS به طور موفقیت آمیز از DNA الگوی هفت سویه سیانوباکتریایی انجام شد. برای تأیید فرآورده های تکثیر شده دمین PKS، توالی یابی انجام شد. قطعه تقریباً ۷۰۰ کیلو باری با دمین آدنیله شده PKS ترادف گیری شد. شکل ۳، درخت فیلوژنتیک را با استفاده از برنامه IQtree server و روش Maximum Likelihood نشان داد. بعد از هم ردیف سازی توالی های گرفته شده از بانک ژن با BLASTx، درخت فیلوژنتیک رسم شده به کمک برنامه fig tree تصحیح شد. صحت روابط بین تاکسون ها با آنالیز



شکل ۲. شکل درخت فیلوژنتیک را نشان می دهد. مقیاس نشان داده شده در شکل، نشان دهنده ۰/۰۵ جهش به ازای هر نوکلئوتید است. نمونه های مورد مطالعه با دایره توپور نشان داده شده است.



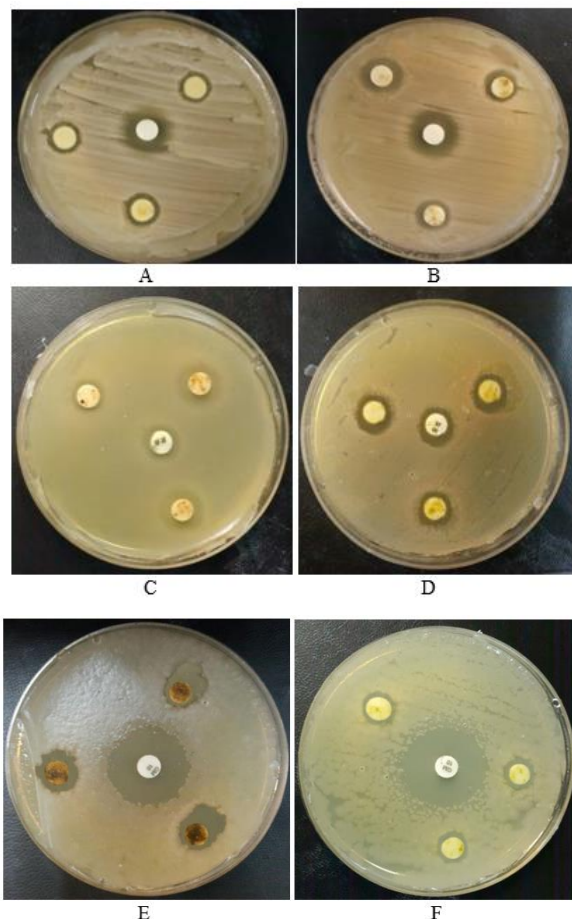
شکل ۳. درخت فیلوژنتیک ژن PKS هفت سویه مورد بررسی. مقیاس نشان داده شده در شکل، نشان‌دهنده ۰/۳ جهش به ازای هر اسید آمینه است. نمونه‌های مورد مطالعه با رنگ متفاوت نشان داده شده است.

جدول ۲. کدهای دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی توالی ژن ۱۶SrRNA و PKS

	توالی نوکلئوتیدی (۱۶SrRNA)	توالی نوکلئوتیدی (PKS)
<i>Calothrix</i> sp. F6	MG549308.1	MG548375.1
<i>Scytonema</i> sp. Ft11	MG549309.1	MG548376.1
<i>Scytonema</i> sp. F12	MG549312.1	MG548378.1
<i>Nostoc</i> sp. F16	MG549316.1	MG548379.1
<i>Nostoc</i> sp. F25	MG549317.1	MG548380.1
<i>Nostoc</i> sp. F27	MG549318.1	MG548381.1
<i>Nostoc</i> sp. F187	MG549311.1	MG548377.1



داشتند. در این میان تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های *Scytonema* sp.F11 و *Nostoc* spp. F16 با یکدیگر و نیز دو سویه با استاندارد مشاهده شد (شکل ۴؛ جدول ۴).



شکل ۴. وجود هاله در نمونه‌های (A) *Calothrix* sp. F6 و (B) *Scytonema* sp. F11 در مقابل قارچ *Candida albicans*. وجود هاله در نمونه‌های (C) *Nostoc* sp. F25 و *Nostoc* sp. F27 در مقابل *Enterobacter* sp. وجود هاله در نمونه‌های (E) *Scytonema* sp. F11 و (F) *Nostoc* sp. F16 در مقابل *Bacillus cereus*.

### نتایج حاصل از بررسی اثرهای ضدباکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های متانولی هفت سویه مورد بررسی

بررسی فعالیت ضدقارچی هفت سویه بررسی شده نشان داد که فقط عصاره‌های *Calothrix* sp. F6 و *Scytonema* sp. Ft11 دارای فعالیت ضدقارچی در مقابل *Candida albicans* بودند (شکل ۴). قطر منطقه بازداری شده برحسب میلی‌متر و به صورت  $\text{Means} \pm \text{SE}$  در (جدول ۳) نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز آماری (آزمون توکی) نشان داده شد که تفاوت معنی‌داری از فعالیت ضدقارچی در مقابل قارچ *Candida albicans* بین دو سویه *Scytonema* spp. Ft11 و *Calothrix* sp. F6 یافت نشد؛ اما با استاندارد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. علاوه بر آن عصاره به‌دست‌آمده از هفت سویه در مقابل قارچ *Aspergillus niger* و *Fusarium* spp. هیچ تأثیر ضد میکروبی نشان نداد. نتایج حاصل از آنالیز آماری (آزمون توکی) قطر منطقه بازدارندگی حاصل از فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *Staphylococcus aureus* نشان داد تنها سه سویه *Nostoc* spp. F187 و سویه *Calothrix* sp. F6 و *Scytonema* sp. F12 دارای خواص آنتی‌باکتریال بودند. سه سویه مورد آزمایش در برابر باکتری *Staphylococcus aureus* اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند، اما با استاندارد تفاوت معنی‌دار دارند. نتایج حاصل از آنالیز آماری (آزمون توکی) قطر منطقه بازدارندگی حاصل از فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *Enterobacter* spp. نشان داد، فقط دو سویه *Nostoc* sp. F25 و *Nostoc* sp. F27 دارای خواص ضدباکتریال بودند. در این میان تفاوت معنی‌داری از فعالیت ضدباکتریایی بین دو سویه *Nostoc* sp. F25 و *Nostoc* sp. F27 استاندارد یافت نشد (شکل ۴). نتایج حاصل از آنالیز آماری (آزمون توکی) قطر منطقه بازدارندگی حاصل از فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *Bacillus cereus* نشان داد که فقط دو سویه *Scytonema* spp. F11 و *Nostoc* spp. F16 خواص ضدباکتری

جدول ۳. میزان فعالیت ضدقارچی عصاره‌های بررسی شده.

<i>Scytonema</i> sp. Ft 11	<i>Calothrix</i> sp. F6	<i>Candida albicans</i>
$1 \pm 0.03$	$1.3 \pm 0.08$	

فعالیت ضدقارچی عصاره‌های *Scytonema* sp. Ft11 و *Calothrix* sp. F6 در شرایط فتوتروف، قطر منطقه بازداری شده برحسب میلی‌متر و به صورت  $\text{Means} \pm \text{SE}$  نشان داده شده است.

جدول ۴. میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره های بررسی شده.

Calothrix F6	Scytonema F11	Scytonema F12	Nostoc F16	Nostoc F25	Nostoc F27	Nostoc F187	
				1.46 ± 0.17	1.36 ± 0.06		Entrobacter
1 ± 0.17		1.16 ± 0.08				1.1 ± 0.05	Staphylococcus aureus
	1.3 ± 0.1		1.03 ± 0.06				Bacillus cereus

قطر منطقه بازدارنده بر حسب میلی متر و به صورت Means ± SE نشان داده شده است.

## بحث و نتیجه گیری

به دلیل فراوانی اکوسیستم های طبیعی در ایران پژوهش های علمی در زمینه های مختلف در این مناطق ضرورت دارد. از بین مناطق مختلف کشور، شهر لواسان به دلیل همجواری با رشته کوه های البرز و پیشینه ای کهن، با احتمال سویه های مختلف سیانوباکتریایی، به عنوان منطقه هدف برای نمونه برداری از خاک در این تحقیق، انتخاب شد. در این تحقیق با استفاده از این محیط کشت BG-11 تعداد هفت سیانوباکتر جداسازی و خالص شدند. سپس برای جستجوی ژن های تولیدکننده ترکیبات آنتی بیوتیکی، ژن های PKS فعالیت ضد میکروبی غربال گری شده و برای تفسیر توالی ها از آنالیزهای بیوانفورماتیکی و رسم درختان فیلوژنتیک استفاده شد.

آثار پزشکی درمانی سیانوباکتری ها اولین بار در اوایل ۱۵۰۰ قبل از میلاد با استفاده از گونه های نوستوک برای طب نقرس و انواع مختلف سرطان، یافت شد. بعد از آن در طول سال های ۱۹۹۰، محققان دانشگاه Hawaii، جداسازی سویه های سیانوباکتریایی *Microcystis* و *Anabaena* sp را با هدف کشف فعالیت های بیولوژیکی مختلف شروع کردند. همچنین آزمایش هایی با هدف شناسایی خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد ویروسی (AIDS)، ضدسرطانی، فعالیت ضد مالاریایی، فعالیت بازدارندگی پروتئازی، فعالیت سیتوتوکسیک، فعالیت ضد پروتوزوال و فعالیت های دیگر انجام شد. در واقع جستجوی سیانوباکتری ها به عنوان منابعی جدید از آنتی بیوتیک ها، افق تازه ای را برای کشف داروهای جدید گشود (۱۷-۱۳). ترکیب های فعال زیستی در سیانوباکتری ها، محدوده وسیعی از فعالیت های زیستی مانند فعالیت های ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد ویروسی و سیتوتوکسیک و در برخی مواقع فعالیت های بازدارندگی پروتئاز دارند (۱۸، ۱۹). همچنین بررسی های مختلف در زمینه آثار ضد میکروبی عصاره های *Phormidium* و *Anabaena*، *Oscillatoria Pseudoanabaena* و *Synechocystis*

*Calothrix parietina* و *Oscillatoria angustissima* روی موجودات مختلف پاتوژنیک انجام شده است. بررسی های بسیاری در زمینه آثار ضدباکتریایی عصاره های *Spirulina Fischerella sp.*، *Nostoc sp.*، *CCC537*، *Anabaena variabilis platensis*، *Synechocystis*، *Nostoc*، *Anabaena*، *Oscillatoria*، *Synechococcus* و دیگر گونه های متعلق به راسته های *Chroococcales*، *Pleurocapsales*، *Oscillatoriales*، *Nostocales* و *Stigonematales* انجام شده است (۲۰-۲۶). از جمله ترکیب های ضدباکتریایی جدا شده در منابع می توان به ایزونیتریل های *Norharmaline*، *Comnostins A-E*، *Aoscomin*، *Ambiguine*، *Lynghyazothrins* و *Carbamidocyclophanes* اشاره کرد (۲۰). بسیاری از پپتیدهای حلقوی سیانوباکتری ها دارای فعالیت ضد میکروبی ویژه هستند. برای مثال *Kawaguchi-peptins A* و *B* و دو پپتید حلقوی با فعالیت ضدباکتریایی هستند که از *aeruginosa* *Microcystis* جداسازی شدند و مانع از رشد باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* در غلظت  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  می شوند (۲۱). نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که عصاره های جلبکی بعضی از سویه ها دارای خواص ضد میکروبی جالب توجهی در برابر باکتری های گرم مثبت، باکتری های گرم منفی و قارچ ها بودند. تنوع در فعالیت های ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره های هفت سویه می تواند به واسطه تفاوت در نفوذپذیری ترکیب های فعال زیستی درون سیانوباکتری مورد آزمایش و همچنین تفاوت در واکنش پذیری سویه های مختلف قارچی و باکتریایی در برابر ترکیب های فعال زیستی موجود در عصاره جلبکی باشند. همان طور که از نتایج پیداست، قطر مناطق بازدارندگی عصاره های حاصل با یکدیگر متفاوت بوده و این تنوع متابولیت های ثانویه در سویه های مختلف را نشان می دهد.

نتایج حاصل از بررسی همبستگی آزمایش های آنتی بیوگرام و تکثیر ژن های PKS در هفت سویه سیانوباکتر مطالعه شده، ارتباط بین حضور ژن تولیدکننده فرآورده های طبیعی PKS با سنتز

مشاهده شده، ممکن است توسط سیستم‌هایی غیر از ژن‌های *NRPS* و *PKS* کنترل شود (۲۷).

تأیید نهایی روابط بین حضور ژن‌های *PKS* و فعالیت‌های بیولوژیکی، نیازمند آزمایش‌های بیان ژن است تا ارتباط بین فعالیت‌های بیوشیمیایی با این ژن‌های ویژه، همچنین سیستم پیام‌رسانی مؤثر بر بیان این ژن‌ها شناخته شوند. در حقیقت، خلاقیت و استفاده از روش‌های مختلف، موجب تکامل روش‌های جدید برای به دست آوردن حداکثر بهره‌بری از ترکیب‌های فعال زیستی می‌شود. لازم به ذکر است، اگرچه بررسی‌ها و تحقیق‌های بسیاری در زمینه جست‌وجوی اثر بازدارندگی ترکیب‌های ضد میکروبی در گذشته انجام شده است، تاکنون هیچ اطلاعاتی راجع به فعالیت ضد میکروبی و ارتباط آنها با ژن‌های *PKS*، در خاک لواسان، در مراجع دردسترس نیست. در واقع این پژوهش جزو اولین بررسی‌های انجام شده در ایران است. در طول چند سال گذشته، جداسازی چندین متابولیت متنوع و جدید با فعالیت‌های داروشناختی جدیدی مثل آنتی‌بیوتیکی، آنزیم‌های ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد قارچی و همچنین ترکیب‌های بازدارنده پروتئازی و نظایر آن از سیانوباکتری‌ها، اهمیت استفاده از آنها را به عنوان موجوداتی باارزش در صنایع داروسازی آشکارتر ساخته است. امید است که نتایج این تحقیق نیز تا حدی توانسته باشد در راستای شناساندن این موجودات به عنوان منبعی بسیار ارزشمند گامی برداشته باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

فرآورده‌های طبیعی (خواص ضد میکروبی) اثبات شد. دیگر محققان در بررسی‌های گسترده نشان داده‌اند که سویه‌های هتروسیست‌دار ظاهراً بیشترین احتمال حضور فرآورده‌های طبیعی فعال از لحاظ بیوشیمیایی را دارند، این نتیجه با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد.

محققان بسیاری به جست‌وجوی ژن پلی‌کتید سنتاز در سیانو باکتری‌ها پرداختند. آنالیز توالی‌ها به کمک نرم‌افزارهای مختلف بیوانفورماتیکی به منظور بررسی مدول‌های مختلف سنتزکننده ترکیبات غیرریبوزومی و نقش هر کدام در فعال‌سازی اسید آمینه تا در نهایت سنتز محصول انجام شد (۳۰-۲۷). در این بررسی، فقط ناحیه ۷۰۰ جفت بازی *PKS*، در هفت سویه سیانوباکتر خاک لواسان با استفاده از پرایمرهای دژنره تکثیر شد. سویه‌های مورد مطالعه در درخت فیلوژنتیک با حمایت بالا با سویه‌های هم‌نام خود در یک کلاستر قرار گرفتند و این، قرابت فیلوژنتیک آنها را نشان می‌دهد. خوشه‌بندی دمی‌های *PKS*، وابستگی‌های تاکسونومیک را بین دمی‌های دارای *PKS*، در بین جنس‌ها و سویه‌های سیانوباکتریایی نشان می‌دهد. به این معنی که جنس‌های هم‌نام در یک کلاستر با یکدیگر قرار گرفتند.

در مطالعه Ehrenreich و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شد که ارتباط مشخصی بین حضور این ژن‌ها و فعالیت‌های بیوشیمیایی و آنتی‌بیوتیکی آنها در تولید متابولیک‌های ثانویه وجود ندارد (۹)؛ به طوری که نیمی از سویه‌های آزمایش شده دارای ژن *PKS* بودند، در حالی که هیچ فعالیت ضد میکروبی مشخصی نداشتند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تمامی هفت سویه بررسی شده دارای ژن‌های *PKS* و همچنین فعالیت بالقوه ضد باکتریایی و ضد قارچی بودند. نتایج ضدونقیض دیگر نشان داد که دو سویه *Cyanothecesp. WH8904* و *Lynghyasp. PCC7419* به رغم وجود فعالیت عمده بیولوژیکی، فاقد ژن‌های رمزگذاری‌کننده فرآورده‌های طبیعی بودند، این نتایج پیشنهاد می‌کند که فعالیت‌های بیولوژیکی

## References

- Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, De Marsac NT, Rippka R, Herdman M. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110(3): 1053-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217107110>
- Panrace C, Gugger M, Calteau A. Genomics of NRPS/PKS Biosynthetic Gene Clusters in Cyanobacteria. *Cyanobacteria: Omics and Manipulation*. CAISTER ACADEMIC PRESS. 2017; 32: 55-74.
- Nowruzi B, Fahimi H, Ordodari N, Assareh R. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthase genes of cyanobacteria as a mining tool for new pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical & Health Sciences*. 2017; 5(2): 139-50.
- Rastogi RP, Sinha RP. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(4): 521-39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.009>
- Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*. 2007; 68(7): 954-79. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.012>
- 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): 1784-90. <https://doi.org/10.1021/np500106w>
- Komárek J, Kaštrovský J, Mareš J, Johansen JR. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*. 2014; 86: 295-33.
- Maneeruttanarungroj C, Incharoensakdi A. Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016; 32(6):99. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2055-y>
- Ehrenreich IM, Waterbury JB, Webb EA. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(11): 7401-13. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7401-7413.2005>
- 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). *Int J Algae*. 2018; 20(4). <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v20.i4.30>
- Espinel-Ingroff A. Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clin Microbiol Newsl*. 2007; 29(13): 97-100. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2007.06.001>
- Nowruzi B, Khavari-Nejad RA, Sivonen K, Kazemi B, Najafi F, Nejadstattari T. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. *Algae*. 2012; 27(4): 303-13. <https://doi.org/10.4490/algae.2012.27.4.303>
- Khairy HM, El-Kassas HY. Active substance from some blue green algal species used as antimicrobial agents. *Afr J Biotechnol*. 2010; 9(19): 2789-800.
- El-Sheekh MM, Dawah AM, El-Rahman AM, El-Adel HM, El-Hay RA. Antimicrobial activity of the cyanobacteria *Anabaena wisconsinense* and *Oscillatoria curviceps* against pathogens of fish in aquaculture. *Ann Microbiol*. 2008; 58(3): 527. <https://doi.org/10.1007/BF03175553>
- Thillairajasekar K, Duraipandiyan V, Perumal P, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr)(microalga) from south East coast of Tamil Nadu, India. *Int J Integr Biol*. 2009; 5(3): 167-70.
- Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010; 2(4): a000315. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000315>
- Kaushik P, Chauhan A. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian J Microbiol*. 2008; 48(3): 348-52. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0043-0>
- Nowruzi B, Khavari-Nejad RA, Sivonen K, Kazemi B, Najafi F, Nejadstattari T. Identification and toxigenic potential of a cyanobacterial strain (*Stigomena* sp.). *Progress in Biological Sciences*. 2013; 3(1): 79-85.
- Nowruzi B, Haghghat S, Fahimi H, Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: A new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *J Pharm Health Serv Res*. 2018; 9(1): 5-12. <https://doi.org/10.1111/jphs.12202>
- Asthana RK, Tripathi MK, Srivastava A, Singh AP, Singh SP, Nath G, et al. Isolation and identification of a new antibacterial entity from the Antarctic cyanobacterium *Nostoc* CCC 537. *J Appl Phycol*. 2009; 21(1): 81. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9328-2>
- Abdel-Raouf N, Ibraheem IB, Abdel-Tawab S, Naser YA. Antimicrobial and antihyperlipidemic activities of isolated quercetin from *Anabaena aequalis* 1. *J Phycol*. 2011; 47(4): 955-62. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01020.x>
- Martins RF, Ramos MF, Herfindal L, Sousa JA, Skærven K, Vasconcelos VM. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria-

- Synechocystis and Synechococcus. Mar Drugs. 2008; 6(1): 1-11. <https://doi.org/10.3390/md6010001>
23. Agger SA, Lopez-Gallego F, Hoye TR, Schmidt-Dannert C. Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. J Bacteriol. 2008; 190(18): 6084-96.
24. Singh RK, Upadhyay S, Tiwari SP, Rai AK, Mohapatra TM. Screening of cyanobacterial extracts against bacteria causing nosocomial infections. J Pharm Res. 2010; 3(2096): e8.
25. Sethubathi GV, Prabu VA. Antibacterial activity of cyanobacterial species from adirampattinam coast, southeast coast of palk bay. Current Research Journal of Biological Sciences. 2010; 2(1): 24-6.
26. Abedin RM, Taha HM. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2008; 3(1): 22-31.
27. Zhao J, Yang N, Zeng R. Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. Extremophiles. 2008; 12(1): 97-105. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0107-9>
28. Humisto A, Jokela J, Liu L, Wahlsten M, Wang H, Permi P, et al. The swinholide biosynthesis gene cluster from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. strain UHCC 0450. Appl Environ Microbiol. 2018; 84(3): e02321-17.
29. Roulet J, Taton A, Golden JW, Arabolaza A, Burkart MD, Gramajo H. Development of a cyanobacterial heterologous polyketide production platform. Metabolic engineering. 2018; 49: 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.013>
30. Dittmann E, Gugger M, Sivonen K, Fewer DP. Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. Trends Microbiol. 2015; 23(10): 642-52. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.008>