

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2019, 29(4): 421–439

<https://doi.org/10.15407/alg29.04.421>

САФАВИ М.¹, НОВРУЗИ Б.², ЭСТАЛАКИ С.², ШОКРИ М.М.³

¹Отдел биотехнологии, Иранская научно-исследовательская организация науки и техники,

Р.О. Вох 3353-5111, Тегеран, Иран

safavi_maliheh@yahoo.com

²Кафедра биологии, научно-исследовательское отделение, Исламский университет Азад,

Тегеран, Иран

bahareh.nowruzzi@srbiau.ac.ir

³Международный научно-исследовательский институт осетровых,

Организация сельскохозяйственных исследований, образования и распространения знаний (AREEO), Рашт, Иран

monsef_shokri@yahoo.com; aidamomennezhad.am@gmail.com

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ШТАММОВ *NOSTOC* SP. N42 И *FISCHERELLA* SP. S29, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДНЫХ И НАЗЕМНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ

Представлены результаты изучения биологической активности (биохимический, антимикробный, антиоксидантный и противораковый анализ) двух штаммов цианобактерий – *Nostoc* sp. N42 и *Fischerella* sp. S29, выделенных из водных и наземных местообитаний Керманшаха и Голестана (Иран). Цианобактерии являются источником целого ряда биологически активных натуральных продуктов и перспективным объектом для поиска новых лекарств и штаммов для биотехнологии. На синтез вторичных метаболитов в клетках водных и наземных цианобактерий влияют различные факторы окружающей среды. Штаммы цианобактерий из провинций Керманшах и Голестан до сих пор почти не исследованы. Количество общих фенолов и алкалоидов устанавливали методом Фолина-Чокалтеу, цитотоксическую активность в отношении клеток рака печени и легких определяли с использованием МТТ-теста, антиоксидантную активность – с помощью методов DPPH и ABTS. Антимикробную активность исследовали в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий с использованием методов MIC и дисковой диффузии. Установлено, что штаммы *Nostoc* sp. N42 и *Fischerella* sp. S29 содержат значительное количество алкалоида и фенола. Оценка цитотоксической активности метанольного экстракта штамма *Fischerella* sp. S29 показала, что в отношении рака печени IC₅₀ составляет 254,51 мкг/мл, а против рака легких – 171,74 мкг /мл, тогда как IC₅₀ метанольного экстракта штамма *Nostoc* sp. N42 в отношении рака печени составляет 583,1 мкг/мл, а против рака легких – 792,17. Максимальный процент ингибирующего действия антиоксидантной и антимикробной активности обнаружен у *Fischerella* sp. S29. В природе этому штамму угрожают многочисленные хищники в их среде обитания, поэтому максимальное

© Сафави М., Новрузи Б., Эсталаки С.М., Шокри М.М., 2019

ное количество антибактериальных и антиоксидантных метаболитов, обнаруженных в этом штамме, является важным фактором защитных механизмов для существования в выбранной ими нише. Результаты исследования показывают, что цианобактерии из наземных местообитаний обладают способностью продуцировать большое количество вторичных метаболитов для выживания в конкурентных экологических нишах.

Ключевые слова: биологическая активность, антиоксиданты, противораковый эффект, противомикробное действие, цианобактерии

Введение

Цианобактерии являются грамотрицательными бактериями и единственными представителями бактерий, способными осуществлять кислородный фотосинтез. Их можно обнаружить практически во всех наземных и водных экосистемах, включая экстремальные местообитания, такие как горячие источники, солончаки и ледники (Nowruzzi, Ahmadimoghadam, 2006; Shokraei et al., 2019). С появлением устойчивости к антибиотикам и химиотерапии все больше лекарств постепенно теряют свое действие. Существует острая потребность в новых фармацевтических препаратах с антиоксидантной, антимикробной и противоопухолевой активностью (Nowruzzi et al., 2020; Hassouani et al., 2017; Jerez-Martel et al., 2017). Цианобактерии, являясь самыми древними микроорганизмами, обладают большим потенциалом биологически активных веществ (Liu et al., 2014; Nowruzzi et al., 2019b). Они считаются хорошим ресурсом для поиска новых биологически активных натуральных продуктов с различной химической структурой; многие из них проявляют биологическую активность разного рода, например противораковую, противогрибковую и антибактериальную, выступают ингибитором трипсина, оказывают нейротоксическое и гепатотоксическое действие (Dixit, Suseela, 2013; Nowruzzi et al., 2018a; Nowruzzi, Blanco, 2019). Большинство из этих соединений синтезируются с помощью механизма NPRS (нерибосомальной пептидсинтетазы) или смешиваются с PKS (поликетидсинтаза) (Nowruzzi et al., 2017; Hosseini et al., 2019).

Известно, что цианобактерии продуцируют ряд противораковых соединений. Многие из них, например криптофицин, курацин А и доластатин 10, таргетируют нити тубулина или актина эвкариотических клеток. Криптофицин является хорошим цитотоксическим средством против клеток лейкемии L1210, рака яичников и устойчивых к лекарствам клеток рака молочной железы (Nowruzzi et al., 2012). Курацин А – сильный антипролиферативный агент, который ингибирует сборку микротрубочек (Zhang et al., 2017). Доластатин 10, как сильный ингибитор микротрубочек, может задерживать клетки при митотическом делении. Обладая довольно простой структурой, он является важным соединением Свинца для новых типов противоопухолевых препаратов (Gunasekera et al., 2016). Кроме того,

считается, что цианобактерии богаты антиоксидантами (Mata et al., 2010). Они играют важную роль в ингибировании и удалении радикалов, обеспечивая защиту людей от инфекций и дегенеративных заболеваний (Wu et al., 2010). Перспективной стратегией замены антибактериальных и противогрибковых химикатов является продвижение продуктов естественного биологического контроля, полученных из микроводорослей (Shen et al., 2018). Так, штаммы цианобактерий предотвращают окисление, удаляя свободные радикалы и активный кислород и косвенно уменьшая образование раковых клеток в организме человека (Kamble et al., 2013).

Как известно, цианотоксины, антимикробные и антиоксидантные соединения цианобактерий поражают многочисленные водные и наземные организмы. Это позволяет предположить, что биологически активные соединения из цианобактерий являются природным регулятором – защитой от выедания и/или снижения конкуренции за ресурсы (Holland, Kinnear, 2013). Несмотря на многочисленные данные об антиоксидантных и антимикробных свойствах, а также потенциале микроводорослей и цианобактерий в качестве источников этих соединений, до сих пор не исследована роль этих вторичных метаболитов в защите от внешних абиотических факторов или адаптации к ним, либо комбинации этих функций (Nowruzi et al., 2013; Kultschar et al., 2018).

Поэтому основной целью нашей работы было определение токсичности, антиоксидантного и антимикробного потенциала, а также количественного содержания биологически активных соединений у двух штаммов цианобактерий – *Nostoc* sp. N42 и *Fischerella* sp. S29, выделенных из различных климатических/географических регионов и местообитаний для использования в медицинской и фармацевтической промышленности.

Материалы и методы

Отбор образцов и культивирование

Образцы почв различного типа (согласно почвенной карте провинции Керманшах) были отобраны в сельскохозяйственных районах провинции с поверхности до глубины 5 см стерилизованным шпателем. Пробы соленой воды были собраны в провинции Голестан на глубине около 30 см в 1 м от берега с использованием бутылок в форме конуса. Образцы переносили в стерильные чашки Петри с не содержащей нитрата жидкой и твердой средой BG11 (Nowruzi, Ahmadi Moghadam, 2006; Shokraei et al., 2019). После стерилизации pH среды доводили до отметки 7,1. Чашки Петри инкубировали в культуральной камере, снабженной непрерывным искусственным освещением (~ 1500–2000 лк) при 28 °C в течение двух недель (Nowruzi et al., 2017). Через 14 дней одну или две колонии выделяли для очистки, трижды промывали деионизированной водой и переносили на свежую жидкую среду для

получения большого количества биомассы (рис. 1, *b* и *d*) (Nowruzi et al., 2012).

Морфологическое и фенотипическое изучение

Для избежания трудностей при идентификации цианобактерий, в процессе получения чистых культур был проведен детальный морфологический анализ 10-дневных культур с помощью светового микроскопа Leica DM750 с фазовым контрастом (рис. 1). При описании морфологии гетероцитных цианобактерий были выбраны следующие параметры: морфология вегетативных клеток (включая терминальные клетки), гетероцист, акинет; наличие или отсутствие терминальных гетероцист; внешний вид нитей и их расположение в колониях (Rajaniemi et al., 2005). Виды определяли в соответствии с Komárek (2013). Для дальнейшего анализа были отобраны два штамма гетероцитных цианобактерий, которые наиболее часто встречались в исследованных районах (см. рис. 1).

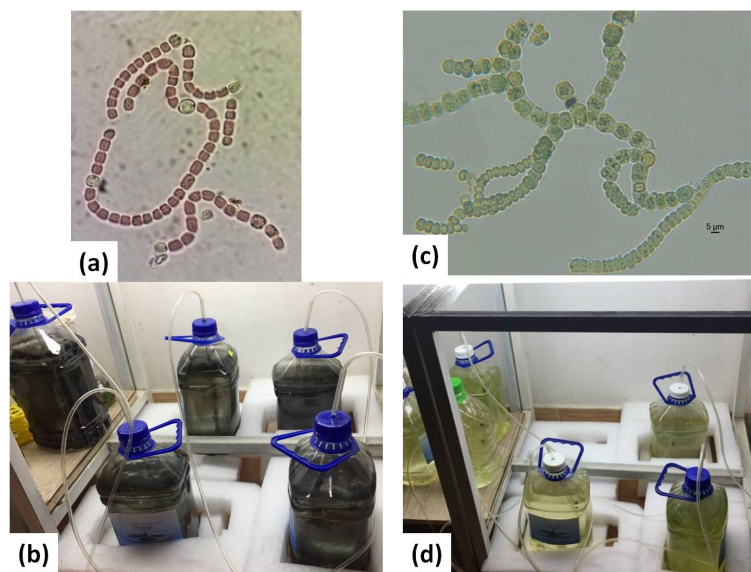


Рис. 1. Микрофотографии исследованных цианобактерий: *a, b* – штамм *Nostoc* sp. N42. Макроскопические темно-коричневые колонии в культуре на жидкой среде (масштаб 10 мкм); *c, d* – штамм *Fischerella* sp. S29. Макроскопические светло-зеленые разрастания в культуре на жидкой среде (масштаб 5 мкм)

Получение экстрактов цианобактерий

Культуры водорослей центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 мин для получения биомассы водорослей. Цианобактериальную пасту высушивали в сушильном шкафу при 60 °С. Один грамм высушенной биомассы экстрагировали с помощью 10 мл метанола и выдерживали в растворителях в течение 48 ч. Затем смесь центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин и температуре 4 °С. Надосадочную жидкость фильтровали через стерильную воронку и стерильную фильтровальную бумагу Whatman № 1. Полученный

экстракт использовали для скрининга биологической активности (Agun et al., 2012) (рис. 2).

Определение содержания фикобилинов

Количественное содержание фикоэритрина (PE, мкг/мл⁻¹), фикоцианина (PC, мкг/мл⁻¹) и аллофикоцианина (APC, мкг/мл⁻¹) в различных билипротеинсодержащих экстрактах и растворах рассчитывали по измерениям поглощения при 565, 620 и 650 нм с использованием следующих уравнений (Román et al., 2002) (рис. 3):

$$PC (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{(OD\ 620\ \text{nm} - 0.7OD\ 650\ \text{nm})}{7.38}$$

$$APC (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{(OD\ 650\ \text{nm} - 0.190OD\ 620\ \text{nm})}{5.65}$$

$$PE (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{(OD\ 565\ \text{nm} - 2.8[R - PC] - 1.34[ARC])}{12.7}$$



Рис. 2. Приготовление экстрактов из штаммов *Fischerella* sp. S29 (a) и *Nostoc* sp. N42 (b)

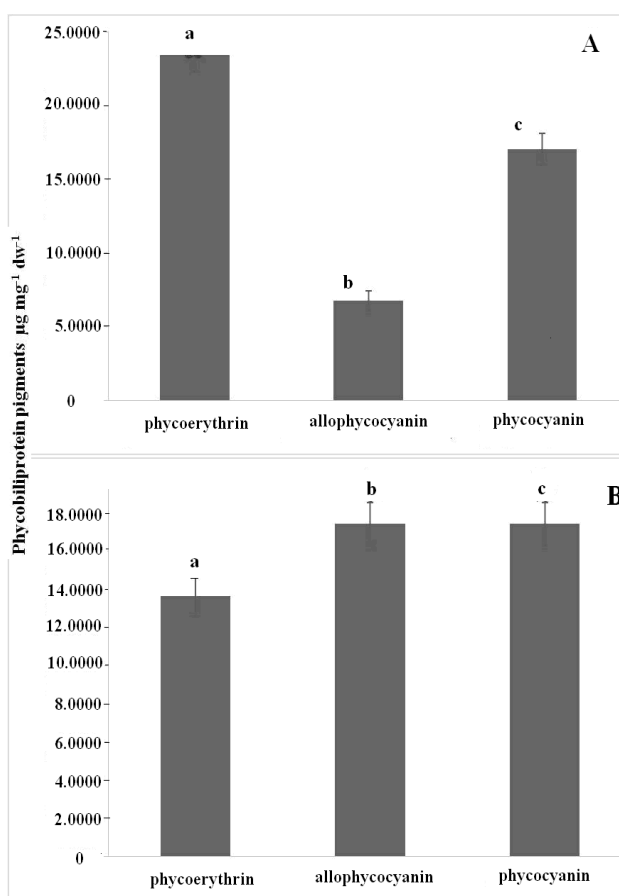


Рис. 3. Фикобилиновые пигменты в клетках *Nostoc* sp. N42 (A) и *Fischerella* sp. S29 (B). Значения ± SE с одной и той же буквой (a–c) существенно не отличаются друг от друга ($p > 0,05$ ANOVA с последующими групповыми тестами Тьюки)

Антибактериальные биопробы: метод дисковой диффузии

Антимикробный препарат двух штаммов цианобактерий исследован с использованием метода диффузии дисков и штаммов некоторых болезнетворных бактерий человека. *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *E. coli* (ATCC-25922), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC-6305), *Micrococcus luteus* (ATCC-16872) и *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-2785) выращивали на агаре Мюллера-Хинтона. Некоторые колонии с чашек переносили в физиологический раствор так, чтобы мутность соответствовала 0,5 нормам Макфарланда. Метанольные экстракты цианобактерий в количестве 100 мкл пипеткой наносили на диски из фильтровальной бумаги диаметром 6 мм в аналитических планшетах. Планшеты с бактериями инкубировали в темноте при 37 °С в течение 18–24 ч. Диаметр зон с полной приостановкой роста колоний измеряли с точностью до миллиметров с помощью линейки. Тесты проводили в стерильных условиях в трех повторностях (Nowruz et al., 2012b).

Количественная оценка антимикробных эффектов, оценка минимальной ингибирующей концентрации (МИК)

Минимальную ингибирующую концентрацию метанольных экстрактов цианобактерий определяли по стандартным методикам CLSI. На чашки с агаром Мюллера-Хинтона с активным началом (500–0/97 мкг/мл) наносили 2 мкл бактериального инокулята (10^7 КОЕ/мл⁻¹) и инкубировали при 37 °С в течение 20 ч. МИК определяли как самую низкую концентрацию метанольных экстрактов, приводящую к полному ингибированию роста бактерий после инкубации. Каждый анализ проводили в трех повторностях; каждый тест повторялся дважды.

Фитохимический анализ вторичных метаболитов. Алкалоиды

Алкалоиды экстрагировали в соответствии с Shanab et al. (2012). Экстракт растворяли в 2 мл хлороформа, затем добавляли 25 мл 0,02 н. H₂SO₄. Полученный раствор нагревали до удаления хлороформа, охлаждали и титровали избыток кислоты с помощью 0,02 н. раствора NaOH, используя метиловый красный в качестве индикатора. Эрготамин служил стандартным раствором.

Фенолы

Общее содержание фенолов в каждом экстракте определяли с использованием реагента Фолина-Чокальтеу (Shanab et al., 2012). Абсорбцию реакционной смеси измеряли спектрофотометрически при 750 нм против холостой пробы. Галловую кислоту применяли в качестве стандартного раствора.

Антиоксидантная активность

Анализ 2, 2 дифенил-1-дипикрилгидразила (DPPH)

Тест проводили по методике Shanab et al. (2012) с некоторыми модификациями. Метанольный экстракт в количестве 710 мкг/мл смешивали с 1 мл реагента DPPH. После 30 мин инкубации в темноте при

комнатной температуре измеряли оптическую плотность при 517 нм. Аскорбиновую кислоту (100 мкг/л) использовали в качестве положительного контроля. Применяли формулу: активность (%) = $A_c - A_t / A_c \times 100$, где A_t и A_c – поглощение образца и DPPH соответственно.

Анализ ABTS

Анализ по удалению катион-радикалов ABTS проводили по известному методу (Shanab et al., 2012) с некоторыми модификациями. Радикалы ABTS⁺ (7 мМ) получали добавлением персульфата калия (2,45 мМ) в темноте в течение 12–16 ч. Полученный раствор разбавляли этанолом до оптической плотности 0,5 при 734 нм. Раствор ABTS⁺ в количестве 3 мл добавляли к 50 мкл метанольного экстракта (710 мкг/мл) и стандартам, регистрировали поглощение при 734 нм против этанола в виде холостого раствора. Раствор ABTS⁺ был принят в качестве положительного контроля и ВНТ в качестве стандарта. Использовали следующее уравнение: активность (%) = $A_c - A_t / A_c \times 100$, где A_t и A_c – оптическая плотность образца и ABTS соответственно.

Анализ цитотоксичности in vitro

Линии раковых клеток, включая клеточную линию рака печени человека (Hep-G2) и немелкоклеточном раке легких (A-549), были приобретены в Институте Пастера Ирана (Тегеран). Жизнеспособность раковых клеток определяли анализом МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетра-золийбромид] в трех повторностях. Клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640 (GibcoBRL, Великобритания) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной сыворотки теленка (GibcoBRL, Великобритания), а также 100 мг/мл стрептомицина и 100 мг/мл пенициллина при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. Цитотоксичность метанольных экстрактов штаммов цианобактерий с различными конечными концентрациями (100, 200, 400 и 800 мкг/мл) протестирована на двух линиях раковых клеток человека. После получения 1×10^4 клеток на 1 мл^{-1} суспензию клеток высевали в 96-луночный культуральный планшет и инкубировали в течение ночи в атмосфере увлажненного воздуха при 37 °С с 5% CO₂. Клетки обрабатывали различными концентрациями экстрактов и инкубировали в течение еще 48 ч. После обработки среду удаляли и в лунки добавляли 200 мкл среды, свободной от фенолового красного, содержащей МТТ (1 мг/мл), с последующим инкубированием в течение 4 ч. После инкубации супернатант удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл ДМСО. Величину поглощения определяли с помощью многолуночного планшетридера (Gen5, Epoch, BioTek, America) при 492 нм. Процент ингибирования и значения IC₅₀ по сравнению с отрицательным контролем рассчитывали с использованием нелинейного регрессионного анализа и выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Эксперименты проводили в трех повторностях (Abolhasani, 2018).

Статистический анализ

Результаты каждого репрезентативного эксперимента анализировали односторонним ANOVA и t-тестом с 95% доверительным интервалом ($p < 0,05$) и выражали как среднее \pm SE с использованием статистического программного обеспечения (SPSS версия 24), а различия между группами устанавливали с помощью тестов Тьюки. Основные значения и стандартное отклонение рассчитаны на основе данных, полученных в триплетных исследованиях.

Результаты

Штаммы идентифицировали в соответствии с их морфологическими характеристиками. Были выбраны два штамма, принадлежащие к разным географическим регионам Ирана. *Fischerella* sp. S29 выделена из почв сельскохозяйственного использования в провинции Керманшах; *Nostoc* sp. N42 выделен из соленых вод в провинции Голестан. Далее приводим морфологические и морфометрические характеристики каждого штамма (см. рис. 1).

Fischerella sp. S29. Таллом однорядный, истинноветвящийся, оливково-зеленый. Вегетативные клетки в основных нитях от круглых до прямоугольных, в 0,7–1,1 раза длиннее ширины, 6,3–15,5 мкм шир., 6,5–13,5 мкм дл., в ветвях – сферической или слегка продолговатой формы, в 3–8 раз длиннее ширины, 4,5–6,0 мкм шир., 11,2–29,5 мкм дл. Гетероциты интеркалярные, в основных нитях удлиненные, округлые или сжатые, 6,5–11,5 мкм шир., 10,0–22,5 мкм дл. Акинеты продолговатые, в основном располагаются в цепочках, 5,0–6,0 мкм шир., 6,5–11,0 мкм дл.

Nostoc sp. N42. Трихомы коричневатые или темноокрашенные. Вегетативные клетки цилиндрические, 3,5–4,0 мкм шир., 7,0–11,0 мкм дл., коричневатые. Гетероциты округлые или продолговатые, 5,0–6,5 мкм шир., 6,0–12,5 мкм дл. Акинеты овальные до продолговатых, 5,0–5,5 мкм шир., 10–12 мкм дл.

Сравнительный анализ количества фикобилипротеиновых пигментов в штамме *Nostoc* sp. N42 по одностороннему анализу ANOVA и тесту Тьюки показал существенно различные содержания PE, ПК и APC. Количество PE значительно выше, чем PC и APC, при этом содержание этого пигмента в штамме *Fischerella* sp. S29 было значительно ниже (см. рис. 3).

Антибактериальная активность наблюдалась в отношении всех протестированных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Установлено, что экстракт *Fischerella* sp. S29 проявлял наибольшую ингибирующую активность в отношении золотистого стафилококка. По отношению к остальным бактериям никаких существенных различий не выявлено. Ингибирующее действие экстракта *Nostoc* sp. N42 по сравнению с тестируемыми бактериями также было однородным (рис. 4).

Количество очищенного фикоэритрина, обладающего антимикробной активностью, измеренное по минимальной ингибирующей концентрации, приведено в таблице. Установлено, что МИК экстракта *Fischerella* sp. S29 составлял 3,9 мкг/мл по сравнению с *Staphylococcus aureus*, для других протестированных бактерий МИК экстракта *Nostoc* sp. N42 – более 7,81.

Сравнительный анализ общих фенолов и алкалоидов с помощью t-критерия показал значительные различия между *Nostoc* sp. N42 и *Fischerella* sp. S29, большее количество фенолов и меньшее количество алкалоидов у *Fischerella* sp. S29 по сравнению с *Nostoc* sp. N42 (рис. 5).

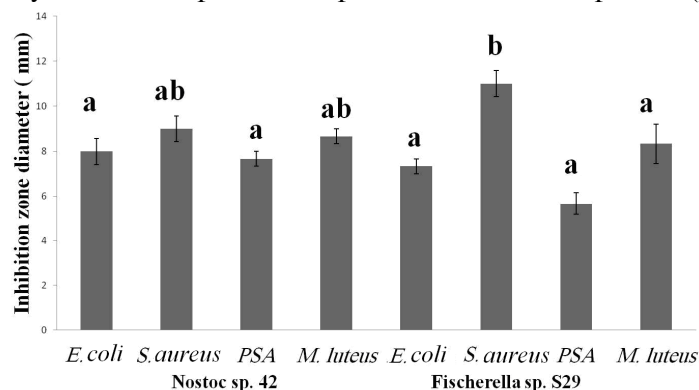


Рис. 4. Тестирование зон ингибирования *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* и *Pseudomonas aeruginosa* экстрактами *Nostoc* sp. N42 и *Fischerella* sp. S29. Значения \pm SE с одной и той же буквой (a, b) существенно не отличаются ($p > 0,05$ ANOVA с последующими групповыми тестами Тьюки)

Таблица

Минимальная ингибирующая концентрация

Микроорганизм	Концентрация экстракта, мкг/мл ⁻¹									
	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,9	1,95	0,97	МИК
<i>Nostoc</i> sp. N42										
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-25923)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	125
<i>E. coli</i> (ATCC-25922)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	31,25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC-6305)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	62,5
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC-16872)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-2785)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	125
<i>Fischerella</i> sp. S29										
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-25923)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3,9

<i>E. coli</i> (ATCC-25922)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	7,81
<i>Streptococcus pneumonia</i> (ATCC-6305)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	31,25
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC-16872)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-2785)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	31,25

(-) – рост не наблюдается, (+) – наблюдается.

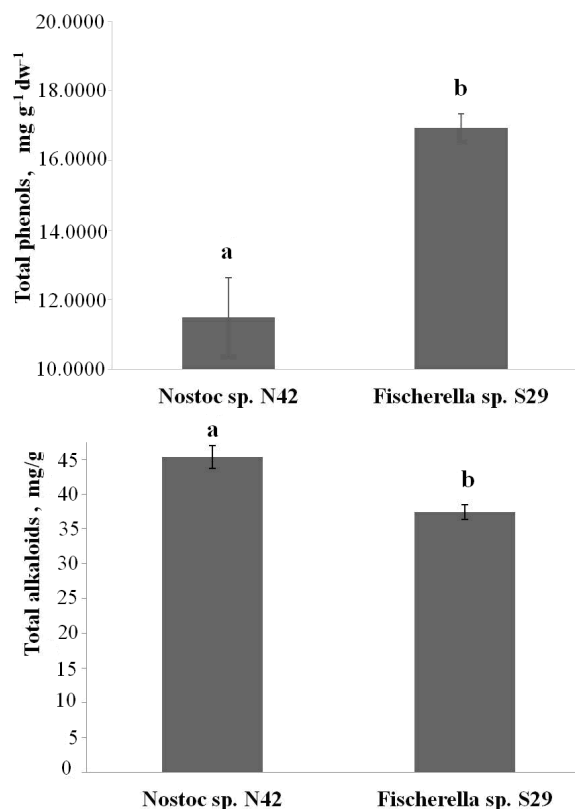


Рис. 5. Общие фенолы и алкалоиды штаммов *Fischerella sp. S29* и *Nostoc sp. N42*. Значения \pm SE с одной и той же буквой (*a*, *b*) достоверно не отличаются друг от друга ($p > 0,05$ ANOVA с последующим и групповыми тестами Тьюки)

Установлено, что потенциал поглощения свободных радикалов экстрактами изученных штаммов зависит от их концентрации. У *Fischerella sp. S29* был самый высокий процент ингибирования по результатам тестирования обоими методами DPPH и ABTS (рис. 6).

Цитотоксическую активность метанолового экстракта выделенных цианобактерий *in vitro* оценивали в отношении линий клеток рака печени и легких человека. Среди протестированных экстрактов,

метанольный экстракт *Fischerella* sp. S29 показал самую высокую цитотоксическую активность по сравнению с клеточной линией A-549. Как видно из рис. 8, 9, метаноловый экстракт *Fischerella* sp. S29 имеет сильное ингибирующее действие в отношении клеточной линии A-549 со значением IC_{50} 171,71 мкг/мл, тогда как метанольный экстракт *Nostoc* sp. N42 не имеет такой цитотоксической активности относительно этой линии раковых клеток ($IC_{50} = 764,34$ мг/мл). По отношению к клеткам рака печени экстракты *Nostoc* sp. N42 и *Fischerella* sp. S29 ингибировали пролиферацию клеточной линии Hep-G2 дозозависимым образом со значениями IC_{50} 246,91 и 569,62 мкг/мл соответственно.

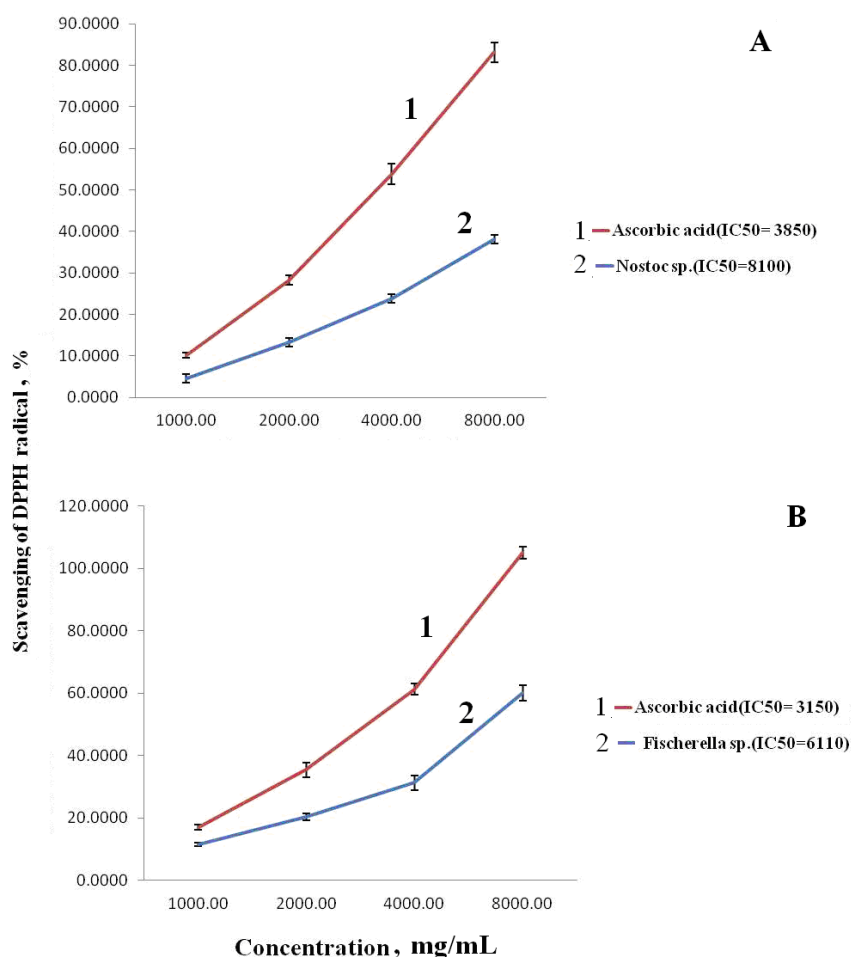


Рис. 6. Антиоксидантная активность штаммов *Nostoc* sp. N42 (A) и *Fischerella* sp. S29 (B) по методу DPPH. Показаны среднее значение \pm стандартное отклонение и значительная разница между обработками ($p < 0,05$)

Обсуждение

За последнее десятилетие установлено, что противомикробные, антиоксидантные и противоопухолевые препараты теряют свою эффектив-

ность из-за эволюции резистентности патогенов к лекарствам. Известно, что устойчивость к антибиотикам в бактериальной популяции резко возрастает с продолжительностью использования противомикробных препаратов. Поэтому существует постоянная необходимость в исследовании, поиске и разработке новых и более эффективных противомикробных препаратов широкого спектра действия. Необходимо найти альтернативные источники противомикробных препаратов, которые нетоксичны/менее токсичны для человека и не имеют побочных эффектов для окружающей среды (Nowruzzi et al., 2018b).

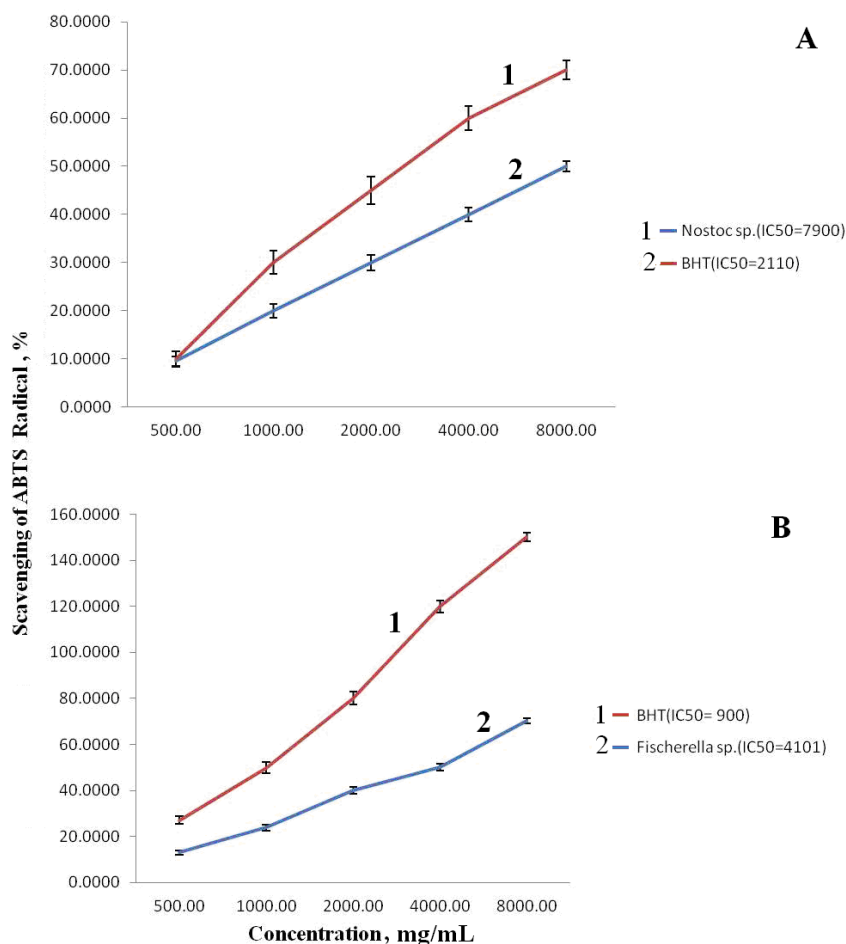


Рис. 7. Антиоксидантная активность штаммов *Nostoc* sp. N42 (A) и *Fischerella* sp. S29 (B) по методу ABTS. Показаны среднее значение \pm стандартное отклонение и значительная разница между обработками ($p < 0,05$)

Поэтому основной целью данного исследования было изучение природных биологически активных соединений цианобактериального происхождения, обладающих антимикробным, антиоксидантным и

противоопухолевым эффектами. К настоящему времени около 4000 штаммов пресноводных и морских цианобактерий были подвергнуты скринингу. Установлено, что цианобактерии являются богатым источником потенциально полезных натуральных продуктов (6% обладают противораковой, антипролиферативной активностью). Позже были начаты работы по скринингу штаммов, обладающих антибактериальным, противогрибковым, анти-СПИД, противораковым и др. действием. Скрининг цианобактерий на наличие антибиотиков открыл новые возможности в поиске новых лекарственных препаратов (Ahmed et al., 2018; Vajpai et al., 2018).

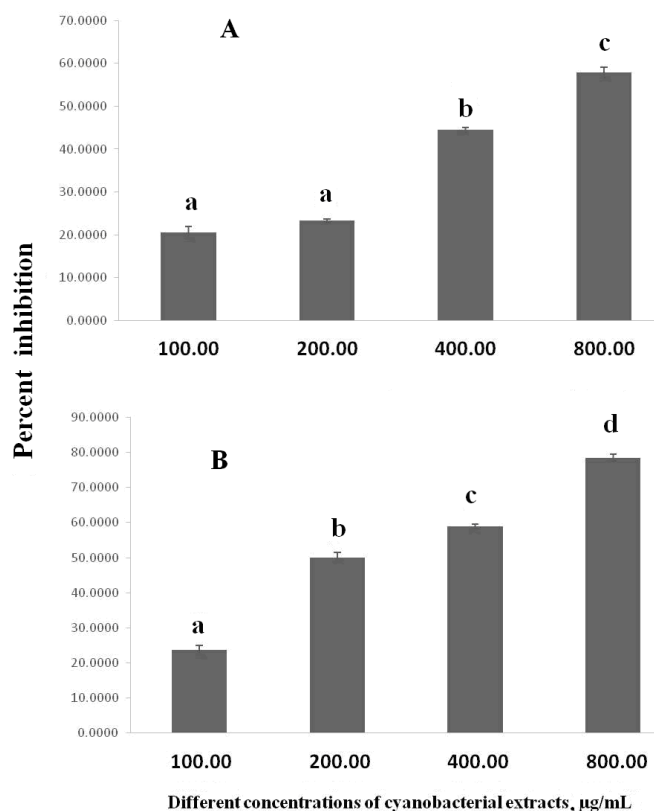


Рис. 8. Антираковая активность (%) штаммов *Nostoc* sp. N42 (A) и *Fischerella* sp. S29 (B) против рака печени. Показаны средние значения \pm SE, буквами a–c обозначена значительная разница между обработками ($p < 0,05$). Одна и та же буква обозначает отсутствие существенной разницы и наоборот

Известно, что различные штаммы цианобактерий продуцируют внутриклеточные и внеклеточные метаболиты с антибактериальной активностью (Cragg, Newman, 2013). Многие ученые исследовали антибактериальную активность некоторых цианобактерий и их экстрактов (Sivonen, Börner, 2008; Zaid et al., 2015; El-Karim, 2016; Seddek et al., 2019). Имеются многочисленные сообщения о

биологически активных соединениях, выделенных из цианобактерий, живущих как в пресной, так в морской среде (Victory, 2009; Nowruz et al., 2013b). Но немного было сделано для скрининга цианобактерий, выделенных из сельскохозяйственных районов и соленых вод, с точки зрения производства этими штаммами биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной, антимикробной и противораковой активностью.

Установлено, что культуральные среды штамма цианобактерии *Fischerella* sp. S29 (*Nostocales*, *Hapalosiphonaceae*), выделенного из почв сельскохозяйственных районов провинции Керманшах, оказались наиболее активными в отношении *Staphylococcus aureus*. Присутствие высших фенольных соединений в этом штамме может быть причиной его высокой антибактериальной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Кроме того, наличие фенольных соединений в клетках этой цианобактерии также соответствовало антиоксидантной и антибактериальной активности.

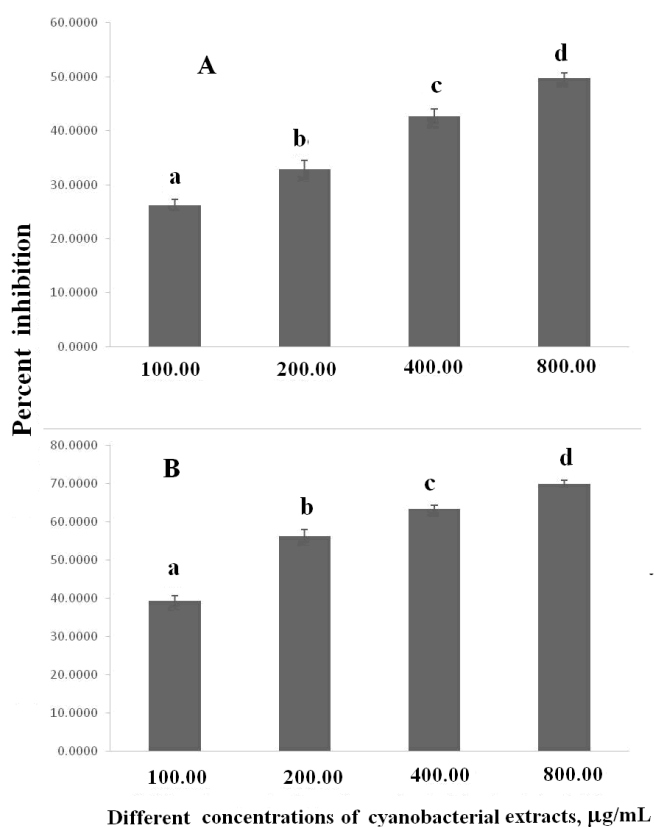


Рис. 9. Антираковая активность (%) штаммов *Nostoc* sp. N42 (A) и *Fischerella* sp. S29 (B) против рака легких. Показаны средние значения \pm SE, буквами a–c обозначена значительная разница между обработками ($p < 0,05$). Одна и та же буква означает отсутствие существенной разницы и наоборот

Фенольные соединения представляют собой класс антиоксидантов, которые действуют как терминаторы свободных радикалов. Эти соединения были тщательно изучены в отношении их антиоксидантных свойств не только у фруктов и овощей, но и у цианобактерий (Rajeshwari, Rajashekhar, 2011). Известно, что фенольные соединения водорослей являются потенциальными антиоксидантами для борьбы со свободными радикалами, вредными для организма человека. Эпидемиологические исследования показали, что фенольные соединения, присутствующие в рационе, полезны при лечении ишемической болезни сердца (Sharathchandra, Rajashekha, 2013). Кроме того, фенолы проявляют фармакологические свойства: антиканцерогенные, противовирусные, антимикробные, противовоспалительные или противоопухолевые (Nowruzzi et al., 2020). М. Миранда и соавт. (Miranda et al., 1998), изучая антиоксидантную активность каротиноидов, фенолов и токоферолов, извлеченных из *Spirulina maxima*, обнаружили, что именно фенольные соединения отвечают за антиоксидантные свойства ее экстрактов. Эта гипотеза согласуется с нашими результатами, показавшими, что *Fischerella* sp. S29 проявляла наибольшую антиоксидантную активность. Установлено, что разнообразные химические соединения цианобактерий индуцируют цитотоксичность в линиях раковых клеток.

Наши результаты свидетельствуют о том, эти прокариотические организмы могут продуцировать соединения с фармацевтической ценностью, как, например, противораковые агенты. Наше исследование показало, что *Fischerella* sp. S29 обладает сильной ингибирующей активностью в отношении клеточной линии А-549 со значением IC_{50} 171,71 и IC_{50} 246,91 мкг/мл против раковых клеток А-549. Экстракты цианобактерий, например штаммов *Cyanothece* sp. PCC7564 (El Semary, 2015) или *Fischerella* BS1-EG (Ahmed et al., 2018), выделенных в Египте, показали хорошую активность против рака молочной железы, легких и толстой кишки. Полисахарид из *Nostoc commune* Vauch. может запускать внешние, внутренние и эндоплазматические ретикулумные стрессы (ERS) — опосредованных апоптотических сигнальных путей и может использоваться в качестве нового перспективного источника природных противоопухолевых агентов (Guo, 2015). Апоптоз является важным процессом для предотвращения рака, и раковые клетки избегают этих процессов, поэтому в настоящее время многие усилия направлены на то, чтобы заставить раковые клетки перейти в апоптотическую стадию. Экстракты микроводорослей могут вызывать апоптоз в раковых клетках (Ноа, 2011, Abolhasani, 2018). В связи с этим цианобактерии, независимо от их родовой принадлежности, климата и географического происхождения, рассматриваются как перспективный источник противоопухолевых соединений (El Semary, 2015).

Большинство вторичных метаболитов продуцируются цианобактериями в ответ на биотический или абиотический стресс в окружающей среде, обеспечивая защиту и выживание (Nowruzzi et al., 2013a).

Заклучение

Сельскохозяйственные экосистемы обеспечивают среду, благоприятную для роста гетероцитных цианобактерий благодаря умеренному освещению, воде, высокой температуре и доступности питательных веществ. Однако здесь они входят в тесное взаимодействие с другими членами сообщества и испытывают сильную конкуренцию с их стороны, а также более часто сталкиваются с многочисленными хищниками, в том числе с травоядными и фагами. Поэтому можно предположить, что максимальное количество антибактериальных и антиоксидантных метаболитов у *Fischerella* sp. S29 играет важную роль в защитных механизмах. Полученные данные показывают, что почвенные цианобактерии являются перспективным источником для получения большого количества биологически активных соединений.

REFERENCES

- Abolhasani M.H., Safavi M., Goodarzi M.T., Kassae S.M., Azin M. 2018. Identification and anti-cancer activity in 2D and 3D cell culture evaluation of an Iranian isolated marine microalgae *Picochlorum* sp. RCC486. *Daru*. 26(2): 105–116.
- Ahmed B.E., Badawi M.H., Mostafa S.S., Higazy A.M. 2018. Human anticancer and antidiabetic activities of the cyanobacterium *Fischerella* sp. BS1-EG isolated from Nile River, Egypt. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7: 3473–3485.
- Arun N., Gupta S., Singh D.P. 2012. Antimicrobial and antioxidant property of commonly found microalgae *Spirulina platensis*, *Nostoc muscorum* and *Chlorella pyrenoidosa* against some pathogenic bacteria and fungi. *Int. J. Pharm. Sci. and Res.* 3(12): 4866–4875.
- Bajpai V., Shukla S., Kang S.M., Hwang S., Song X., Huh Y., Han Y.K. 2018. Developments of cyanobacteria for nano-marine drugs: relevance of nanoformulations in cancer therapies. *Mar. Drugs*. 16(6): 1–179.
- Cragg G.M., Newman D.J. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochim. et Biophys. Acta*. 1830(6): 3670–3695.
- El Semaary N.A., Fouda M. 2015. Anticancer activity of *Cyanothece* sp. strain extracts from Egypt: First record. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5(12): 992–995.
- El-Karim M.S.A. 2016. Chemical composition and antimicrobial activities of Cyanobacterial mats from hyper saline lakes, Northern Western Desert. Egypt. *J. Appl. Sci.* 16(1): 1–10.
- Falaise C., François C., Travers M.A., Morga B., Haure J., Tremblay R., Turcotte F., Pasetto P., Gastineau R., Hardivillier Y., Leignel V. 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Mar. Drugs*. 14(9): 1–159.
- Gunasekera S.P., Imperial L., Garst C., Ratnayake R., Dang L.H., Paul V.J., Luesch H. 2016. Caldoramide, a modified pentapeptide from the marine cyanobacterium *Caldora penicillata*. *J. Nat. Prod.* 79(7): 1867–1871.
- Guo M., Ding G.B., Guo S., Li Z., Zhao L., Li K., Guo X. 2015. Isolation and antitumor efficacy evaluation of a polysaccharide from *Nostoc commune* Vauch. *Food Funct.* 6(9): 3035–3044.

- Hassouani M., Sabour B., Belattmania Z., El Atouani S., Reani A., Ribeiro T., Castelo-Branco R., Ramos V., Preto M., Costa P.M., Urbatzka R. 2017. *In vitro* anticancer, antioxidant and antimicrobial potential of *Lyngbya aestuarii* (Cyanobacteria) from the Atlantic coast of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* 8(S): 4923–4933.
- Hoang L.T.P., Quang D.N., Ha N.T.H., Tri N.H. 2011. Isolating and screening mangrove microalgae for anticancer activity, *Res. J. Phytochem.* 5: 156–162.
- Holland A., Kinnear S. 2013. Interpreting the possible ecological role (s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Mar. Drugs.* 11(7): 2239–2258.
- Hosseini N., Akhavan A., Nowruzi B. 2019. Detection and relation of polyketide synthase (PKSs) genes with antimicrobial activity in terrestrial Cyanobacteria of Lavasan. *Iran. J. Med. Microbiol.* 12(6): 419–431.
- Jerez-Martel I., Garcia-Poza S., Rodriguez-Martel G., Rico M., Afonso-Olivares C., Gyme-Pinchetti J.L. 2017. Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. *J. Food Quality.* Vol. 2017, Article ID 2924508: 1–8.
- Kamble S.P., Gaikar R.B., Padalia R.B., Shinde K.D. 2013. Extraction and purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3(8): 149–153.
- Komárek J. 2013. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/3, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad. Verlag.
- Kultschar B., Llewellyn C. 2018. In: *Secondary metabolites-sources and applications.* Vol. 2, InTech: London, UK.
- Liu L., Jokela J., Wahlsten M., Nowruzi B., Permi P., Zhang Y.Z., Xhaard H., Fewer D.P., Sivonen K. 2014. Nostosins, trypsin inhibitors isolated from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain FSN. *J. Nat. Prod.* 77(8): 1784–1790.
- Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14: 217–232.
- Miranda M.S., Cintra R.G., Barros S.B.D.M., Mancini-Filho J. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz. J. Med. and Biol. Res.* 31(8): 1075–1079.
- Nowruzi B., Ahmadimoghadam A. 2006. Two new records of heterocystus cyanobacteria (*Nostocaceae*) from paddy fields of Golestan Province. *Iran. J. Bot.* 11(2): 170–173.
- Nowruzi B., Blanco S. 2019a. In silico identification and evolutionary analysis of candidate genes involved in the biosynthesis methylproline genes in cyanobacteria strains of Iran. *Phytochem. Lett.* 29: 199–211.
- Nowruzi B., Khavari-Nejad R.A., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstattari T. 2012. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. *Algae.* 27(4): 303–313.
- Nowruzi B., Khavari-Nejad R.A., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstattari T. 2013a. Optimization of cultivation conditions to maximize extracellular investments of two *Nostoc* strains. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 142(1): 63–76.
- Nowruzi B., Khavari-Nejad R.A., Sivonen K., Kazemi B., Najafi F., Nejadstattari T. 2013b. Identification and toxigenic potential of a cyanobacterial strain (*Stigomena* sp.). *Prog. Biol. Sci.* 3(1): 79–85.
- Nowruzi B., Fahimi H., Ordodari N., Assareh R. 2017. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthase genes of cyanobacteria as a mining tool for new pharmaceutical compounds. *JPHS.* 5(2): 139–150.

- Nowruzi B., Haghghat S., Fahimi H., Mohammadi E. 2018a. *Nostoc* cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *J. Pharm. Health. Serv. Res.* 9(1): 5–12.
- Nowruzi B., Blanco S., Nejadstarrari T. 2018b. Chemical and molecular evidences for the poisoning of a duck by Anatoxin-a, Nodularin and Cryptophycin at the coast of the Lake ShoorMast (Mazandaran Province, Iran). *Int. J. Algae.* 20(4): 359–376. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v20.i4.30>
- Nowruzi B., Wahlsten M., Jokela J. 2019b. A report on finding a new peptide aldehyde from Cyanobacterium *Nostoc* sp. Bahar M by LC-MS and Marfey's analysis. *Iran. J. Biotech.* 17(2): e1853.
- Nowruzi B., Sarvari G., Blanco S. 2019. In: *The handbook of algal science, microbiology, technology, and medicine*. Amsterdam: Elsevier (in press).
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kastovska K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J., and Sivonen K. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (*Nostocales*, *Cyanobacteria*). *Int. J. System. Evol. and Microbiol.* 55: 11–26.
- Rajeshwari K.R., Rajashekhar M. 2011. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India, *Braz. Arch. Biol. and Techn.* 54(5): 849–857.
- Román R.B., Alvarez-Pez J.M., Fernández F.A., Grima E.M. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnol.* 93(1): 73–85.
- Seddek N.H., Fawzy M.A., El-Said W.A., Ahmed M.M. 2019. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and characterization of bioactive substances from freshwater blue-green algae. *Global NEST J.* 21(3): 328–336.
- Shanab S.M., Mostafa S.S., Shalaby E.A., Mahmoud G.I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac. J. Tropic. Biomed.* 2(8): 608–615.
- Sharathchandra K., Rajashekhar M. 2013. Antioxidant activity in the four species of cyanobacteria isolated from a sulfur spring in the Western Ghats of Karnataka. *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 4: 275–285.
- Shen S.G., Jia S.R., Wu Y.K., Yan R.R., Lin Y.H., Zhao D.X., Han P.P. 2018. Effect of culture conditions on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Nostoc* flagelliforme. *Carbohydrate polymers.* 198: 426–433.
- Shokraei R., Fahimi H., Blanco S., Nowruzi B. 2019. Genomic fingerprinting using highly repetitive sequences to differentiate close cyanobacterial strains. *Microbial. Bioactives.* 2(1): 068–075.
- Sivonen K., Börner, T. 2008. In: *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Poole, UK: Caister Acad. Press. Pp. 159–197.
- Victory K.J. 2009. *Isolation and characterisation of antimicrobial compounds synthesised by Microcystis* sp. Dr. Sci. (Biol.). Abstract. Univ. Adelaide. 937 pp.
- Wu S.C., Wang F.J., Pan C.L. 2010. The comparison of antioxidative properties of seaweed oligosaccharides fermented by two lactic acid bacteria. *J. Marine Sci. and Technol.* 18: 537–545.
- Zaid A.A., Hammad D.M., Sharaf E.M. 2015. Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. *Int. J. Pharm.* 11(7): 846–851.

Zhang C., Naman C., Engene N., Gerwick W. 2017. Laucysteinamide A, a hybrid PKS/NRPS metabolite from a Saipan Cyanobacterium, cf. *Caldora penicillata*. *Mar. Drugs*. 15(4): 1–121.

Поступила 28.08.2019

Подписала в печать Е.К. Золотарева

Algologia. 2019, 29(4): 421–439

<https://doi.org/10.15407/alg29.04.421>

Safavi M.¹, Nowruzi B.², Estalaki S.¹, Shokri M.³

¹Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, P. O. Box 3353-5111, Tehran, Iran

²Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

BIOLOGICAL ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT FROM *NOSTOC* SP. N42 AND *FISCHERELLA* SP. S29 ISOLATED FROM AQUATIC AND TERRESTRIAL ECOSYSTEMS

Cyanobacteria are abundant producers of natural products well recognized for their bioactivity and utility in drug discovery and biotechnology applications. Novel secondary metabolites from aquatic and terrestrial cyanobacteria are affected by different environmental factors. Cyanobacteria strains from Kermanshah and Golestan Province (Iran), where biodiversity is high, are mainly unexplored. Thus, in this research, biological activities (biochemical, antimicrobial, antioxidant, and anti-cancer analyses) of two strains of cyanobacteria, *Nostoc* sp. N42 and *Fischerella* sp. S29, were investigated. The amount of total phenols and alkaloids was analyzed using Folin–Ciocalteu assay. Cytotoxic activity was determined compared to liver and lung cancer cells using the MTT assay. The antioxidant activity was determined through the DPPH test and the ABTS assay. Moreover, antimicrobial activity was investigated against gram-positive and gram-negative bacteria using MIC and disk diffusion methods. Results showed that higher amounts of alkaloid (45/33 mg·g⁻¹) and phenol were found in *Nostoc* sp. N42 and *Fischerella* sp. Results of cytotoxic activity showed that IC₅₀ methanolic extract of *Fischerella* sp. S29 against liver cancer was 254.51 µg·mL⁻¹ and against lung cancer was 171.74 µg·mL⁻¹, while IC₅₀ methanolic extract of strain *Nostoc* sp. N42 against liver cancer was 583.1 µg·mL⁻¹ and against lung cancer was 792.17 µg·mL⁻¹. Moreover, the maximum percentage of the inhibitory effect of antioxidant and antimicrobial activities were found in *Fischerella* sp. S29. Actually, this strain faces numerous predators in their habitat, and therefore the amount of antibacterial and antioxidant metabolites found in this strain is thought to play an important part in the defense mechanisms to survive. The results of this study prove that cyanobacteria from terrestrial environments have the ability to produce a large number of secondary metabolites to survive in competitive ecological niches.

Key words: biological activities, anticancer, antimicrobial, antioxidant, cyanobacteria