مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

ارزیابی عملکرد عصاره برخی از گونه‌های ماکروجلبکی بر ممانعت از رشد باکتری‌های پاتوژن انسانی

میترا آرمـان*

گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور،صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۵/۰۵/۱۳
اصلاح: ۹۵/۰۷/۱۷
پذیرش: ۹۵/۰۷/۲۲

کلمات کلیدی:
انتشار دیسک
عصاره
ضدباکتریایی
ماکروجلبک

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های سه گونه جلبک قهوه ای *Padina pavonica*, *Colpomenia sinuosa* و *Cystoseira myrica* بود که با استفاده از حلال‌های اتیل‌استات و متانول استخراج شد. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها با استفاده از ۱۰ باکتری به روش انتشار دیسک انجام گرفت. طبق نتایج به دست آمده سه باکتری *K. pneumoniae*، *P. aeruginosa* و *C. albicans* بیشترین مقاومت را روی هر دو نوع عصاره ماکروجلبکها از خود نشان دادند و باکتری *S. cerevisiae* نیز از مقاومت بالایی برخوردار بود. از طرفی، بیشترین حساسیت را به ترتیب باکتریهای *B. pumulis*، *S. epidermidis* و *B. subtilis* بر روی عصاره متانولی گونه *Colpomenia sinuosa* از خود نشان دادند. همچنین باکتریهای *E. coli* ، *S. epidermidis* و *B. Pumulis* نسبت به عصاره متانولی گونه *Cystoseira myrica* و باکتری *E. Coli* به عصاره متانولی گونه *Colpomenia sinuosa* حساسیت بالایی نشان دادند. در بین باکتریهای مورد استفاده در این تحقیق نیز باکتری *S. epidermidis* و *B. pumulis* نسبت به عصاره اتیل استاتی گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* حساسیت بالایی نشان دادند. اما در مجموع، حساسیت باکتری ها نسبت به عصاره متانولی بیشتر بود.

مقدمــه

در سال‌های اخیر استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث به وجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم‌ها و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان شده است (Gonzalez *et al*., 2001). تمایل عمومی به استفاده از ترکیبات طبیعی در درمان بیماری‌ها و عفونت‌ها، به دلیل شیوع مقاومت‌های عوامل بیماریزا به داروهای شیمیایی، افزایش یافته است. یافتن ترکیباتی با توانایی شفابخشی از طبیعت، همواره جزو تلاش‌های بشر بوده است (Evans and Cowan, 2006). امروزه، به دلیل تغییر فرم مقاومتی باکتری‌ها و مقاوم شدن آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های معمول، گرایش به جایگزینی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های نوین وجود دارد (Okeke *et al*., 2005). از این‌رو تحقیقات در رابطه با عوامل ضدمیکروبی جدید که به طور طبیعی تولید می‌شوند به منظور دستیابی به منابع نوین دارویی از اهمیت فراوانی برخوردار است (Okeke *et al*., 2005). یکی از مشکلات عمده در علم پزشکی، توانایی بسیاری از باکتری‌ها در کسب مقاومت به عوامل ضدباکتریایی می‌باشد؛ از این رو، یافتن ترکیبات ضدباکتریایی جدید امری ضروری است (Rizvi, 2010).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mitraarman2003@yahoo.com

جلبک‌های دریایی یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان در محیط‌های دریایی هستند (Badury and Wright, 2004). آن‌ها علاوه بر نقش‌های بوم‌شناختی بسیار مهمی که در طبیعت دارند، به‌دلیل غنی بودن از مواد معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای‌چرب ضروری قرن‌ها به‌عنوان غذایی سالم در رژیم غذایی انسان و یا برای مصارف دارویی، صنعتی و آرایشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Khan and Satam, 2003; Kotnala *et al*., 2009). هم‌چنین، به واسطه داشتن پلی‌ساکاریدهای ارزشمندی مانند (آگار، کارژینان و آلژینات) دارای ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی هستند (Taskin *et al*., 2007). تاکنون بیش از ۲۴۰۰ ترکیب طبیعی در ماکروجلبک‌ها شناسایی شده‌اند که در زمینه‌های پزشکی، داروسازی، غذایی و صنعتی تجاری شده‌اند. ماکروجلبک‌ها بر اساس ترکیبات شیمیایی موجود در آنها به سه دسته ماکروجلبک‌های سبز (Chlorophyta)، قرمز (Rhodophyta) و قهوه‌ای (Phaeophyta) تقسیم می‌شوند. جلبک‌های دریایی به علت غنی بودن از ترکیبات ضروری و مورد نیاز، در بسیاری از کشورهای جهان از گذشته های دور تا کنون مورد استفاده قرار می‌گیرند به طوریکه در ژاپن در ترکیبات مربا، پنیر، نوشیدنی‌ها، چای، سوپ و ... کاربرد دارند و همچنین در کشورهای غربی به عنوان منابع پلی‌ساکاریدهای متنوع در صنایع غذایی و داروسازی مورد استفاده قرارمی‌گیرند. همچنین به علت دارا بودن ترکیبات مفید و فعال زیستی تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال مورد نیاز صنایع دارویی تبدیل شوند (Al-Haj *et al*., 2009).

در حال حاضر، یکی از اساسی‌ترین مشکلات برخی صنایع غذایی و دارویی کشور، هزینه‌های بالای تولید و مصرف روزافزون داروهای شیمیایی و سنتزی و هم‌چنین عدم کیفیت مناسب و کافی نبودن مواد افزودنی طبیعی مناسب می‌باشد. با توجه به مشکلات بیان شده و وجود منابع غنی جلبک‌های دریایی در سواحل خلیج‌فارس و دریای عمان، با تدوین استراتژی علمی و اصولی روی این جلبک‌ها، می‌توان بهره‌برداری‌های بهینه دارویی از منابع ساحلی جنوب کشور نمود و در نهایت گامی در جهت تولید موادغذایی و دارویی طبیعی برداشت. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی برخی از ماکروجلبک‌های جنوب کشور، به‌عنوان منابع موجود، برای جایگزینی با داروهای شیمیایی، علیه پاتوژن‌های انسانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

عملیات نمونه‌برداری ماکروجلبک‌های قهوه ای از سواحل جزیره قشم در اوایل زمستان در زمان بیشینه جزر صورت گرفت. برای مشخص شدن زمان حداکثر جزر در ایستگاه‌ها، از وبگاه ایران آب‌نگاری که وضعیت جزرومدی سواحل ایران را نشان می‌دهد، استفاده شد. جلبک‌های جمع‌آوری شده با آب دریا شسته شده و از شن و ماسه و جانداران اپی‌فیت پاکسازی و درون کیسه‌های پلاستیکی درون جعبه یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. مقداری از جلبک‌ها برای نگهداری و شناسایی در فرمالین ۴٪ قرار داده شدند. در آزمایشگاه جلبک‌ها دوباره با آب معمولی شسته و روی پارچه تمیزی در سایه خشک شوند.

شناسایی نمونه

جهت شناسایی نمونه‌های جمع‌آوری شده، از هر نمونه شیت هرباریومی و نمونه فرمالینی (۴٪) تهیه شد. سپس هر یک از نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Braune, 2011 ؛Basson, 1978 ؛ Trono, 2003; Basson, 1979)، اطلس و چک‌لیست‌های موجود از ماکروجلبک‌های منطقه خلیج‌فارس (Sohrabipour *et al*., 2004; Sohrabipour and Rabiei, 1999; Sohrabipour and Rabiei, 2007; Sohrabipour and Rabiei, 2008)، جستجو در پایگاه‌های علمی معتبر از جمله سایت www.Algaebase.org و براساس خصوصیات مورفولوژیکی آن‌ها تا سطح گونه شناسایی شدند. برای بررسی خصوصیات مورفولوژیکی نمونه‌ها از فتومیکروسکوپ Olympus مدل CX 21 و فتواستریومیکروسکوپ Axiom مدل SQF 301 استفاده گردید.

عصاره‌گیری

نمونه‌ها بعد از خشک شدن با آسیاب برقی کاملاً به صورت پودر درآمدند. سپس با استفاده از دو حلال اتیل‌استات و متانول به ترتیب افزایش قطبیت عصاره‌گیری شدند. عصاره‌ها در دستگاه روتاری (Strike102، ایتالیا) در دمای کم‌تر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلاء تبخیر و خشک شدند. عصاره به دست آمده پس از حل شدن در (DMSO (Dimethyl sulphoxide، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. لازم به ذکر است که تمام مراحل عصاره‌گیری در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. در این روش عصاره‌گیری، طیفی از ترکیبات با درجه قطبیت متفاوت به دست می‌آید (Gohari *et al*., 2005).

باکتری‌های مورد بررسی

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است که از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی محسوب می‌شوند و از موسسه پاستور تهران تهیه شدند.

جدول ۱. باکتری های مورد استفاده

نام باکتری	فعالیت گرم	شماره استاندارد
Enterococcus faecalis	+	ATCC 29212
Bacillus subtillis	+	ATCC 465
Bacillus pumilis	+	PTCC 1274
Staphylococcus aureus	+	ATCC 25923
Staphylococcus epidermidis	+	ATCC 12228
Klebsiella pneumoniae	-	ATCC 10031
Escherichia coli	-	ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa	-	ATCC 85327

کشت باکتریایی

از تمام سویه‌های باکتری با روش خطی پلیت تهیه شد. سپس در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله از پلیت کشت باکتری، تک کلنی برداشته و در لوله‌های حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث کشت داده شد. جهت رشد باکتری، لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار داده شدند. در نهایت، میزان کدورت محیط حاوی باکتری در حال رشد با استاندارد نیم مک فارلند مقایسه گردید که در نتیجه، این سوسپانسیون محتوی تقریبا تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد کلنی باکتری در میلی‌لیتر می‌باشد.

تعیین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روش انتشار روی دیسک (IZ)

برای بررسی اثرات ضدباکتریایی از آزمون حساسیت ضدمیکروبی به روش اصلاح شده انتشار دیسک استفاده گردید. در روش انتشار دیسک پس از تلقیح باکتریایی (کشت چمنی سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌وسیله سوآپ استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های آماده بلانک (محصول شرکت پادتن طب) به ظرفیت ۲۰ میکرولیتر به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت به وسیله یک پنس استریل به دقت روی سطح آگار قرار گرفتند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌های

استریل با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (وزنی/حجمی) برداشته و به دقت به دیسک‌های بلانک (قطر ۶ میلی‌متر) تزریق شدند و بعد به آرامی دیسک‌ها با فشار پنس در محیط آگار ثابت شدند. قطر هاله‌های عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. قطر این هاله‌ها به کمک خط‌کش Hi Antibiotic Zone Scale اندازه‌گیری و نتایج میانگین با سه بار تکرار محاسبه شدند (Yousefzadi *et al*., 2013).

اندازه گیری کمترین غلظت بازدارندۀ رشد یا MIC

عصارۀ جلبک‌هایی که در تست انتشار به وسیلۀ دیسک، اثر ضدمیکروبی قابل قبول نشان داده بودند، در آزمون تعیین کمتـرین غلظت بازدارندۀ رشد (MIC) مورد استفاده قرار گرفتند (Jorgensen and Turnidge, 2015) تا میزان حساسـیت بـاکتری‌هـای مورد آزمایش، نسبت به آنها تعیین شود. در این روش از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده شد. به چاهک اول هر ردیـف ۱۲ تایی، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع در شرایط استریل ریخته شد (هر میکروپلیت از ۱۲ ردیف عمـودی و ۸ ردیـف افقـی تشکیل شده است). سپس در بقیۀ چاهک‌ها، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت مایع اضافه شد. در مرحلۀ بعد به چاهک‌هـای ردیـف اول ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ٪۱۰ اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از چاهک اول بـه چاهـک دوم انتقـال داده شـد و بـه همـین روش، عصاره به صورت ۲ برابر تا چاهک آخر رقیق شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از چاهک آخر به خـارج از آن ریختـه شـد تـا رقت های سریال با حجم یکسان تهیه شود. در مرحلۀ آخر به تمام ۹۶ چاهک ۵۰ میکرولیتر از هر میکروب اضـافه کـرده و بـه مدت ۲۴ ساعت، میکروپلیت در انکوباتور قرار داده شد. در پایان مدت گرماگذاری، نتایج با بررسی شـفافیت محـیط کـه نشـان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم می‌باشد، کمترین غلظت بازدارندۀ رشد (MIC) برای هر عصاره گزارش شد.

نتایـج

عصاره متانولی

نتایج آزمون حساسیت به روش انتشار دیسک در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی و اتیل استاتی جلبک‌ها به ترتیب جدول ۲ و ۳ ارائه شده است.

براساس نتایج، باکتری *B. pumilis* بیش‌ترین حساسیت را نسبت به عصاره متانولی گونه *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۴±۱۹ میلی‌متر نشان داد که در مقایسه با نتایج آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، از تاثیر بالاتری برخوردار بود. همچنین روی این باکتری عصاره متانولی گونه *Cystoseira myrica* نیز با قطر هاله عدم رشد ۰/۷±۱۶تاثیر بسیار خوب و بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین از خود نشان داد. به همین ترتیب عصاره گونه جلبکی *Padina pavonica*, نیز روی این باکتری با قطر هاله عدم رشد ۰/۸±۱۴ تاثیر متوسطی از خود نشان داد.

نتایج حاصل از عصاره متانولی روی باکتری *B. pumulis* نیز نشان دهنده حساسیت بسیار بالای این باکتری به عصاره‌ی گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۹±۲۰ می باشد که باز از تاثیر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بیشتر می‌باشد. عصاره گونه های *Cystoseira myrica* و *Padina pavonica*, نیز به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۷±۱۷ و ۰/۹±۱۵ نیز تاثیر بسیار خوب و بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشان دادند.

در مورد باکتری *E. faecalis*، تنها عصاره گونه *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۷±۱۵ موثر بود که این میزان نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بیشتر است.

تاثیر عصاره های جلبکی ذکر شده بر روی باکتری *S. aureus* کمتر از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود و از بین این سه گونه جلبکی تنها *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۳±۱۷ میلی‌متر تاثیر خوبی نشان داد.

عصاره های متانولی هر سه گونه جلبکی بر روی باکتری *S. epidermidis* تاثیر بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشان دادند. در بین آنها عصاره‌ی گونه *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۸±۲۰ بیشترین تاثیر را داشت.

در مورد باکتری *E. coli* تاثیر عصاره های دو گونه جلبکی *Colpomenia sinuos* و *Cystoseira myrica* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۴±۱۸و ۰/۵±۱۷ خوب و عصاره جلبکی *Padina pavonica* با قطر هاله عدم رشد ۰/۹±۱۴ تاثیر متوسطی را نشان دادند. عصاره های متانولی سه گونه جلبک مورد بررسی هیچ تاثیری را بر روی باکتریهای *K. pneumoniae* ،

P. aeruginosa و *C. albicans.* از خود نشان ندادند. بر روی باکتری *S. cerevisiae* نیز تنها عصاره گونه *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۸±۱۴ تاثیر متوسطی هر چند کمتر از آنتی‌بیوتیک نیستاتین از خود نشان داد.

نتایج آزمون عصاره اتیل استاتی

نتایج حاصل از عصاره اتیل استاتی روی باکتری *B. subtilis* نشان‌دهنده تاثیر بسیار خوب عصاره‌ی گونه *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۸±۱۶ و بالاتر از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود و عصاره های دو گونه *Cystoseira myrica* و *Padina pavonica* نیز به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۷±۱۴ و ۰/۷±۱۲ تاثیر متوسطی نشان دادند.

عصاره جلبکی *Colpomenia sinuosa* نیز با قطر هاله عدم رشد ۰/۶±۱۷ بر روی باکتری *B. pumulis* تاثیر بسیار خوب و عصاره‌های دو گونه جلبکی *Cystoseira myrica* و *Padina pavonica* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۷±۱۴و ۰/۹±۱۳تاثیر متوسطی از خود نشان دادند.

برروی باکتری *E. faecalis* تنها عصاره اتیل استاتی گونه *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۵±۱۲ تاثیر متوسطی از خود نشان داد. در حالیکه عصاره دو گونه *Padina pavonica* و *Cystoseira myrica* هیچ تاثیری از خود نشان ندادند. باکتری *S. aureus* نیز نسبت به عصاره جلبکی *Padina pavonica* از خود مقاومت نشان داد در حالیکه دو گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* و *Cystoseira myrica* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۷±۱۴و ۰/۹±۱۰تاثیر متوسطی از خود نشان دادند. باکتری *S. epidermidis* نسبت به عصاره دو گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* و *Cystoseira myrica* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۴±۱۸و ۰/۴±۱۶ حساسیت بالایی نشان داد و عصاره گونه *Padina pavonica* با قطر هاله عدم رشد ۰/۶±۱۲ تاثیر متوسطی بر این باکتری داشت. باکتری *E. coli* نیز نسبت به عصاره دو گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* و *Cystoseira myrica* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۰/۴±۱۶و ۰/۵±۱۵ حساسیت بالایی نشان داد و عصاره گونه *Padina pavonica* با قطر هاله عدم رشد ۰/۹±۱۲ تاثیر متوسطی بر این باکتری داشت.

عصاره های اتیل استاتی نیز مانند عصاره متانولی بر روی سه باکتری *K. pneumoniae*، *P. aeruginosa* و *C. albicans* هیچ تاثیری نداشتند. بر روی باکتری *S. cerevisiae* نیز تنها عصاره گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* با قطر هاله عدم رشد ۰/۳±۱۲ تاثیر متوسطی هر چند کمتر از آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین از خود نشان داد.

عصاره‌هایی که در تست انتشار دیسک، دارای پتانسیل بازدارنگی رشد بر روی میکروارگانیسم‌ها بودند، در آزمون تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) استفاده شدند. کمترین میزان MIC به دست آمده مربوط به عصارهٔ جلبک *Colpomenia sinuosa* بود که این غلظت مطابق با هاله‌های به دست آمده در تست تعیین حساسیت بود. مقادیر کمترین غلظت بازدارندگی به دست آمده برای باکتری‌های گرم منفی بالاتر از MIC به دست آمده برای باکتری‌های گرم مثبت بود که این موضوع نشان‌دهندهٔ حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های جلبکی است. پایین‌ترین MICهای به دست آمده، عمدتاً مربوط به باکتری گرم مثبتِ *S. epidermidis* بود.

در مجموع، بین سویه‌های باکتریایی این پژوهش، سه باکتری *K. pneumoniae*، *P. aeruginosa* و *C. albicans* بیشترین مقاومت را در برابر هر دو نوع عصاره سه گونه جلبکی از خود نشان دادند و باکتری *S. cerevisiae* نیز از مقاومت بالایی برخوردار بود. از لحاظ حساسیت نیز بیشترین حساسیت را به ترتیب باکتریهای *B. pumulis*، *S. epidermidis* و *B. subtilis* بر روی عصاره متانولی گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* از خود نشان دادند همچنین باکتریهای *E. coli*، *S. epidermidis* و *Pumulis B.* نیز نسبت به عصاره متانولی گونه جلبکی *Cystoseira myrica* حساسیت بالایی نشان دادند. باکتری *E. Coli* به عصاره متانولی گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* نیز حساسیت بالایی نشان داد.

در بین باکتریهای مورد استفاده در این تحقیق، باکتری *S. epidermidis* و *B. pumulis* نسبت به عصاره اتیل استاتی گونه جلبکی *Colpomenia sinuosa* حساسیت بالایی نشان دادند ولی در مجموع حساسیت باکتری ها نسبت به عصاره متانولی بالاتر بود.

جدول ۲. مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی سه گونه ماکروجلبک قهوه‌ای بر روی میکروارگانیسم‌های بیماریزا

microorganisms	*Padina pavonica*		*Colpomenia sinuosa*		*Cystoseira myrica*		Ampicillin[c]	Nystatine[d]
	IZ[a]	MIC[b]	IZ	MIC	IZ	MIC		
B. subtilis	./۸± ۱۴	۱۵	./۴± ۱۹	۷/۵	± ۱۶ ./۷	۱۵	./۳±۱۵	
B. pumulis	./۹±۱۵	۷/۵	./۹±۲۰	۳/۷۵	./۷±۱۷	۷/۵	./۳±۱۱	
E. faecalis	۰	-	./۵± ۱۵	۷/۵	۰	-	./۳±۱۳	
S. aureus	./۹± ۱۰	۱۵	./۳± ۱۷	۷/۵	± ۱۲ ./۹	۱۵	./۵±۱۹	
S. epidermidis	./۴± ۱۵	۷/۵	./۸± ۲۰	۳/۷۵	± ۱۸ ./۴	۷/۵	./۲±۱۲	
E. coli	./۹± ۱۴	۱۵	./۴± ۱۸	۷/۵	± ۱۷ ./۵	۷/۵	-	
K. pneumoniae	۰	-	۰	-	۰	-	./۳±۱۰	
P. aeruginosa	۰	-	۰	-	۰	-	./۴±۱۴	
C. albicans	۰	-	۰	-	۰	-		./۵±۱۸
S. cerevisiae	۰	-	./۸± ۱۴	۱۵	۰	-		./۲±۱۸

جدول ۳. مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره اتیل استاتی سه گونه ماکروجلبک قهوه‌ای بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

Microorganisms	*Padina pavonica*		*Colpomenia sinuosa*		*Cystoseira myrica*		Ampicillin[c]	Nystatine[d]
	IZ[a]	MIC[b]	IZ	MIC	IZ	MIC		
B. subtilis	۰/۷± ۱۲	۱۵	± ۱۶ ۰/۷	۱۵	± ۱۴ ۰/۷	۱۵	۰/۳± ۱۵	
B. pumulis	۰/۹±۱۳	۱۵	± ۱۷ ۰/۶	۷/۵	± ۱۴ ۰/۷	۱۵	۰/۳± ۱۱	
E. faecalis	۰	-	± ۱۲ ۰/۵	۱۵	۰	-	۰/۳± ۱۳	
S. aureus	۰	-	± ۱۴ ۰/۷	۱۵	۹± ۱۰	۱۵	۰/۵± ۱۹	
S. epidermidis	۰/۶± ۱۲	۱۵	± ۱۸ ۰/۴	۷/۵	± ۱۶ ۰/۴	۷/۵	۰/۲± ۱۲	
E. coli	۰/۹± ۱۲	۱۵	± ۱۶ ۰/۹	۷/۵	± ۱۵ ۰/۵	۱۵	-	
K. pneumoniae	۰	-	۰	-	۰	-	۰/۳± ۱۰	
P. aeruginosa	۰	-	۰	-	۰	-	۰/۴± ۱۴	
C. albicans	۰	-	۰	-	۰	-		۰/۵± ۱۸
S. cerevisiae	۰	-	± ۱۲ ۰/۳	۱۵	۰	-		۰/۲± ۱۸

Results were obtained from 3 independent experiments performed in dublicate.
[a] Inhibition Zone includes diameter of disc (6 mm).
[b]Minimum inhibitory concentration values as mg ml^{-1}.
[c] Tested at 10 µg $disc^{-1}$.
[d]Tested at 30 µg $disc^{-1}$.
Inactive (-); moderately active (7 - 14); highly active (> 14). Values are given as mean ± standard deviation

بحث

در سال‌های اخیر، تولید دارو از منابع دریایی مورد توجه بسیاری از محققین در زمینه شیمی ترکیبات طبیعی، قرار گرفته است. ترکیبات ثانویه تولید شده از ارگانیسم‌های دریایی می‌توانند به‌عنوان منبع مواد فعال زیستی عمل نموده و در مدل‌سازی ساختار داروها مورد استفاده قرار گیرند (Bhosale *et al*., 1999).

جلبک‌های دریایی تولید کننده متابولیت‌های مختلف ثانویه و با ارزش تجاری بالقوه می‌باشند. در چند دهه اخیر، خواص ضدمیکروبی این ارگانیسم‌ها مورد علاقه پژوهشگرانی در نقاط مختلف دنیا قرار گرفته است و باتوجه به نیاز جهانی به ترکیبات زیست‌فعال جدید، به دلیل مقاوم شدن باکتری‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌های پاتوژن به آنتی بیوتیک های رایج، بررسی چنین ترکیباتی با منشاء دریایی، ضروری به نظر می‌رسد (Cabrita *et al*., 2010). توسعه ایمن و موثر داروهای ضدمیکروبی از ۷۰ سال پیش تاکنون رواج یافته است (Franklin and Snow, 2005). توسعه و رواج استفاده از داروهای مقاوم در مقابل پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی، ضرورت تحقیق در زمینه تولید داروهای ضدمیکروبی جدید را از سایر منابع شامل منابع دریایی بیش از پیش نمایان می‌کند (Blunt *et al*., 2007).

در این تحقیق، حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت به عصاره جلبکی ناشی از اختلاف و تفاوت در ساختار دیواره سلولی و ترکیب آن است (Taskin *et al*., 2007). در باکتری‌های گرم منفی غشاء خارجی به عنوان سدی در مقابل اجسام خارجی مانند آنتی‌بیوتیک عمل می‌کند (Tortora *et al*., 2001). باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن لایه لیپوپلی‌ساکاریدی غشا خارجی و هم‌چنین داشتن کانال‌های درگیر در حمل و نقل مواد، ذاتا نسبت به مواد سمی و رنگ‌های آب‌دوست و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت بیش‌تری دارند (Ebrahimi *et al*., 2009). در مطالعه حاضر نیز، حساسیت بیش‌تر باکتری‌های گرم مثبت به عصاره‌های جلبکی مورد آزمایش به اثبات رسید. هم‌چنین، نتایج این مطالعه، مقاومت باکتری‌های گرم منفی به عصاره‌های جلبکی مورد آزمایش را نشان داد. در این میان مطالعات متعددی بیان کردند که، حلال‌هایی با قطبیت کم‌تر نتایج بهتری نسبت به حلال‌هایی با قطبیت بیش‌تر دارند که می‌توان احتمال داد که به علت قطبیت بیش‌تر، اکثر ترکیبات و اجزا جلبکی دیگر (از جمله مقدار فراوانی کلروفیل) را همراه ماده فعال استخراج می‌کند (Kandhasamy *et al*., 2008).

Manivannan و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز فعالیت ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای سواحل Vedalai را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۷ حلال جهت عصاره‌گیری متانولی، استونی، پترولیوم اتر، اتانولی، اتیل‌استات، کلروفرمی و دی‌اتیل‌اتر استفاده شد. نتایج نشان داد عصاره متانولی دارای تاثیر بیش‌تری نسبت به دیگر حلال‌ها می‌باشد، هم‌چنین باکتری *Bacillus subtilus* بیش‌ترین حساسیت را نسبت به عصاره متانولی جلبک *Padina gymnospora* از خود نشان داد (Manivannan *et al*., 2011). در مطالعه پیش‌رو در مجموع، عصاره متانولی تاثیر بیشتری بر روی باکتری ها از خود نشان داد که با نتایج فوق مطابقت دارد، در عصاره اتیل استاتی نسبت مواد فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی نسبت به کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره متانولی کاهش می‌یابد. دلیل این تفاوت را می‌توان به فاکتورهایی از قبیل فصل جمع‌آوری آن‌ها، محیط و مراحل مختلف رشد جلبک، روش‌های عصاره‌گیری و گونه جلبک نسبت داد (Manivannan *et al*., 2011). هم‌چنین، مطالعات نشان داده‌اند که باکتری گرم منفی *E. coli* در مقابل اکثر عصاره‌های جلبکی از خود مقاومت نشان داده ولی در مطالعه اخیر این باکتری در مقایسه با دو باکتری گرم منفی دیگر *K. pneumoniae* و *P. aeruginosa* که کاملاً از خود مقاومت نشان داده‌اند، مقاومت کمتری نشان داده (Kandhasamy and Arunachalam, 2008). اصلی‌ترین و بیش‌ترین ترکیبات جلبک‌های دریایی را ترکیبات سولفاتی و مواد قندی تشکیل می‌دهند (Al-Amoudi *et al*., 2009). با توجه به این نتایج اجزای فعال زیستی مورد نظر بایستی ترکیباتی با قطبیت کم و چربی دوست باشند (Derakhshesh *et al*., 2011).

خواص ضدباکتریایی تعدادی از جلبک‌های سواحل Tamil Nadu جنوب هند توسط Rosaline و همکاران در سال ۲۰۱۲ مورد مطالعه قرار گرفت (Rosaline *et al*., 2012). در این تحقیق از حلال‌های ان- هگزان، اتیل‌استات، استون و متانول جهت عصاره‌گیری استفاده شد. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که عصاره استونی به‌دست آمده از جلبک‌های مورد نظر اثر ضدباکتریایی بیش‌تری نسبت به دیگر حلال‌ها دارد. هم‌چنین در تحقیق دیگری از عصاره جلبک قرمز *G. fisheri* برای پیشگیری از عفونت با *Vibrio harveyi* در میگوی ببری سیاه *Mnodon penaeus* استفاده شد. در این بررسی برای عصاره‌گیری جلبک از حلال‌هایی مانند اتانول، متانول، کلروفرم و ان- هگزان استفاده شده بود.

Manivannan و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز فعالیت ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای سواحل Vedalai را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۷ حلال جهت عصاره‌گیری متانولی، استونی، پترولیوم اتر، اتانولی، اتیل‌استات، کلروفرمی و دی‌اتیل‌اتر استفاده شد. نتایج نشان داد عصاره متانولی دارای تاثیر بیش‌تری نسبت به دیگر حلال‌ها می‌باشد. هم‌چنین باکتری *Bacillus subtilus* بیش‌ترین حساسیت را نسبت به عصاره متانولی جلبک *Padina gymnospora* از خود نشان داد.

تحقیقات متعددی که بر روی خواص ضدمیکروبی جلبکهای قهوه‌ای انجام شده نشان دهنده تاثیر بیشتر عصاره متانولی می‌باشد. از جمله این تحقیقات می توان به مطالعه ای که Zeliha و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی فعالیت ضد میکروبی دو نوع حلال متانولی و ان هگزانی چند گونه از جلبکهای قهوه ای انجام دادند، تحقیق Sridharan و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی خواص ضد باکتریایی جلبک قهوه ای *Turbinaria conoides* و همچنین تحقیق Pandithurai و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی خواص ضد میکروبی جلبک قهوه ای *Spatoglossum asperum* بر روی چند باکتری پاتوژن انسانی اشاره کرد که در همه آنها عصاره متانولی تاثیر بیشتری از خود نشان داده است و با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد.

منابـع

Al-Amoudi, O.A., Mutawie, H.H., Patel, A.V. 2009. Chemical composition and antioxidant activities of *Jeddah corniche* algae, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 16: 23-9.

Al-Haj, N.A., Mashan, N.I., Shamsudin, M.N., Mohamad, H., Vairappan, C.S., Sekawi, Z. 2009. Antibacterial activity in marine algae Eucheumadenticulatum against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Research Journal of Biological Sciences. 4: 519-524.

Badury, P., Wright, P.C. 2004. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. Planta. 219: 561-578.

Basson, P.W. 1978. Marine algae of the Arabian Gulf coast of Saudi Arabia (first half). Botanica Marina. 22: 47-64.

Basson, P.W. 1979. Marine algae of the Arabian Gulf coast of Saudi Arabia (second half). Botanica Marina. 22: 65-82.

Bhosale, S.H., Jagatap, T.G., Naik, C.G. 1999. Antifungal activity of some marine organisms from India against food spaelage *Aspergillus* strains. Mycopathologia. 147: 133-38

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2007. Marine natural products. Natural Product Reports. 21:1-49

Braune, W. 2011. Seaweeds a colour guide to common benthic green, brown and red algae of the world's oceans. Gantner verlag, A.R.G., KÖnigstein, K.G., Germany. p. 601.

Cabrita, M.T., Vale, C., Rauter, A.P. 2010. Halogenated compounds from marine algae. Marine Drugs. 8(8): 2301-2317.

Derakhshesh, B., Yousefzadi, M., Afsharnasab, M., Dashtiyannasab, A. 2011. Antibacterial effects of *Laurencia snyderiae* and *Sargassum angustifolium* against human pathogens. South Medical Journal. 1: 22-17. (in Persian).

Ebrahimi, A., Khayami, M., Nejati, V. 2009. Antimicrobial activity of hydro- alcoholic extract of *Castanea Sativa*. Journal of Medicinal Plants. 9(33): 34-26. (in Persian).

Evans, S.M., Cowan, M.M. 2006. Plant products as antimicrobial agents. Cosmetic Science and Technology Series. 31: 205.

Gohari, A.R., Hadjiakhondi, A., Gohari, M.R. 2005. Cytotoxic terpenoids from Satureja macrantha C.A. mey. DARU. 13: 145-148.

Gonzalez, A., Basilio, A., Cabello, A. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gram Canaria (Canary Islands, Spain). International Microbiology. 4: 35-40.

Jorgensen, J., Turnidge, J. 2015. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods, Manual of Clinical Microbiology. 9th edition. p 1253-1273.

Kandhasamy, M., Arunachalam, K.D. 2008. Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. African Journal of Biotechnology. 7: 1958-61.

Khan, S.I., Satam, S.B. 2003. Seaweeedmariculture: scope and potential in India. Aquaculture Asia. 4: 26-28.

Kotnala, S., Garg, A., Chatterji, A. 2009. Screening for the presence of antimicrobial activity in Few Indian seaweeds. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science. 32: 69-75.

Manivannan, K., Karthikai, G., Anantharaman, P., Balasubramanian, T. 2011. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalaicoastal waters, Gulf of Mannar. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1: 114-20.

Okeke, N., Laxmaninarayan, R., Bhutta, A. 2005. Antimicrobial resistance in developing countries, Part 1: recent trends and current status. The Lancet Infectious Diseases. 5: 481-93.

Pandithurai, M., Murugesan, S., Sivamurugan, V. 2015. Antibacterial activity of various solvent extracts of marine brown alga *Spatoglossum asperum.* International Journal of Pharmacological Research. 5(6): 133-138.

Rizvi, M.A. 2010. Comparative antibacterial activities of seaweed extracts from Karachi costal, Pakistan. Pakistan Journal of Pharmacology. 27: 53-57.

Rosaline, X.D., Sakthivelkumar, S., Rajendran, K., Janarthanan, S. 2012. Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 9:140-146.

Sastry, V.M.V.S., Rao, G.R.K. 1994. Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Botanica Marina. 37: 357-360.

Sohrabipour, J., Nejadsatari, T., Assadi, M., Rabiei, R. 2004. The marine algae of the southern coast of Iran, Persian Gulf, Lengeh area. Iranian Journal of Botany. 10: 83-93.

Sohrabipour, J., Rabiei, R. 1999. A list of marine algae from seashores of Iran (Hormozgan Province). Qatar Univercity Science Journal. 19: 312-337.

Sohrabipour, J., Rabiei, R. 2007. The checklist of green algae of the Iranian coastal lines of the Persian Gulf and Gulf of Oman. Iranian Journal of Botany. 13: 146-149.

Sohrabipour, J., Rabiei, R. 2008. Rhodophyta of Oman Gulf (South East of Iran). Iranian Journal of Botany. 14: 70-74.

Sridharan, M.C., Dhamotharan, R. 2012. Antibacterial activity of marine brown alga *Turbinaria conoides*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4(4): 2292-2294.

Taskin, E., Ozturk, M., Kurt, O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African Journal of Biotechnology. 6: 2746-51.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2001. Microbiology: An Introduction. San Francisco: Benjamin Cummings. 11th edition..

Trono, G.C. 2003. Field Guide and Atlas of the Seaweed Resources of the Philippines. Bookmark, Inc. Makati City, Philippines. pp. 306.

Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R., Biniaz, M. 2013. Toxicity of essential oil *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. Journal of Immunotoxicology. 11(1): 50-55.

Demireli, Z., Ferdad, F., Koz, Y., Ulku, N., Yavasoglu, K., Ozdermir, G., Sukatar, A. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. Journal of Serbiaan Chemical Society. 74(6): 619-628.