

بررسی خواص بیولوژیکی جلبک‌های قهوه‌ای *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata* در سواحل شمالی خلیج فارس

مقاله پژوهشی
(Original paper)

فرزانه فراهانی^۱، پریسا پرمه^۲، امین مخلصی^۲، سمیه نصیری^۲، احمد رضا گوهری کاخکی^۳، بایرام محمد
قرنچیک^۴، جلوه سهرابی پور^۵

۱- جهاد دانشگاهی واحد استان البرز، ایمیل: fb.farahani@gmail.com؛ موبایل: ۰۹۱۲۲۹۳۴۴۸۰

۲ و ۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث به وجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم‌ها و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان شده است لذا دستیابی به منابع جدید دارویی با اثرات جانبی کمتر از اهمیت فراوانی برخوردار است. لذا این مطالعه باهدف بررسی اثرات بیولوژیکی عصاره‌های اتیل استاتی، متانولی و آب متانولی جلبک‌های قهوه‌ای کلپومینیا سینوسا (*Colpomenia sinousa*) و اینگاریا استلاتا (*Iyengaria stellata*) از سواحل شمالی خلیج فارس انجام شد.

روش بررسی: در این پژوهش پس از نمونه برداری، اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های آلی کلپومینیا سینوسا و اینگاریا استلاتا جمع‌آوری شده از خلیج فارس بر روی یک سویه باکتری گرم مثبت به نام استافیلوکوک اورنوس و دو سویه باکتریهای گرم منفی به نام‌های اشرشیا کولای، سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مقایسه گردید. عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون انجام شد. اثرات ضد باکتریایی (MIC) عصاره‌های نهایی به روش رقت‌های متوالی در لوله جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های رقت لوله‌ای نشان داد که عصاره‌های جلبکی مورد مطالعه در محیط مایع بر روی باکتری‌های مورد بررسی اثر ضد باکتریایی داشتند و در بین عصاره‌ها، عصاره اتیل استاتی اینگاریا استلاتا با MIC $>2/5$ mg/ml در مقایسه با کنترل مثبت در مقابل هر سه سویه باکتری، بیشترین اثر را داشت ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: هر سه عصاره اتیل استاتی، متانولی و متانول آبی دو جلبک قهوه‌ای کلپومینیا سینوسا و اینگاریا استلاتا از سواحل خلیج فارس اثرات ضد باکتریایی نشان دادند، در این میان عصاره اتیل استاتی جلبک اینگاریا استلاتا بیشترین اثر را بر روی هر سه سویه باکتری (*Staphylococcus aureus* (PTCC:1112)، *E. coli* (PTCC:1338)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1707) نشان داد که اختلاف معناداری با کنترل مثبت داشت ($p < 0/05$).

واژه‌های کلیدی: خواص بیولوژیکی، جلبک‌های قهوه‌ای، خلیج فارس

مقدمه

در کشور ایران جلبک‌های دریایی از سه خانواده سبز، قهوه‌ای و قرمز می‌باشند و تمامی این جلبک‌ها در فصول مختلفی از سال قابل بهره‌برداری هستند (۸). متأسفانه در ایران مطالعات کمی روی خواص زیست فعال این منابع ارزشمند انجام گرفته و مطالعات متعدد زیست‌فناوری در این زمینه ضروری است، لذا در این تحقیق به بررسی اثر ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای *Colpomenia sinuosa* و *Iyengaria stellata* علیه سه سویه باکتری پرداخته شده است.

روش بررسی

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های جلبکی:

نمونه‌برداری جلبک‌ها از سواحل شمالی خلیج فارس در فصل زمستان، در زمان جزر کامل و به صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون ظروف شیشه‌ای حاوی آب دریا جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه تخصصی جهاد دانشگاهی تهران منتقل شدند.

عصاره‌گیری:

ابتدا جلبک‌ها را برای پاک‌سازی از شن، ماسه و جانداران اپیفیت با آب شستشو شدند و هرچند ساعت آب آن‌ها تعویض شد سپس جلبک‌ها را خشک و توسط آسیاب برقی کاملاً به صورت پودر درآمدند (۹). عصاره‌گیری از نمونه‌ها به روش پرکولاسیون با استفاده از حلال‌های اتیل استات، متانول و متانول آب به ترتیب انجام پذیرفت. عصاره‌های حاصل را صاف و با استفاده از دستگاه تبخیرکننده گردان در فشار کاهش‌یافته و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردیده آنگاه زیر هود خشک شدند. عصاره‌ها برای تهیه غلظت‌های آزمون ضد باکتریایی درون دی متیل سولفواکساید حل شده و سپس

مصرف روزافزون داروهای شیمیایی باعث ایجاد خود ایمنی و عوارض جانبی دیگر می‌شود که از خود بیماری خطرناک‌تر است (۱). امروزه به دلیل تغییر فرم مقاومتی باکتری‌ها و مقاوم شدن آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های معمول، گرایش به جایگزینی آنها با آنتی‌بیوتیک‌های نوین وجود دارد (۲). جلبک‌ها منبعی از ترکیبات فعال زیستی هستند و تاکنون ترکیبات زیستی متعددی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی دریایی شناسایی شده‌اند که بسیاری از متابولیک‌های اولیه و ثانویه این جلبک‌ها می‌توانند به مواد فعال موردعلاقه صنایع دارویی تبدیل شوند (۳). تنوع جلبک‌ها به‌عنوان بخش مهمی از فلور سواحل جزر و مدی اقیانوس‌ها، دریاها و تولیدکنندگان اولیه اکوسیستم‌های دریایی، تابع عوامل جغرافیایی و اقلیمی حاکم بر آن مناطق است. میزان تولیدات اولیه در بسترهای مرجانی و جلبکی می‌تواند از میزان تولیدات اولیه در جنگل‌های پرباران مناطق حاره‌ای بیشتر باشد (۴). این منبع پرارزش بیولوژیکی دارای کاربردهای گوناگونی است که استفاده از جلبک‌های دریایی به‌عنوان غذا و دارو بیش از سایر جنبه‌ها، نظر انسان رابه خود جلب کرده است (۵ و ۴). جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند و کاربرد غذایی دارند. جلبک‌ها علاوه بر غذا می‌توانند کاربرد صنعتی، آرایشی و پزشکی نیز داشته باشند (۶). جلبک‌ها به‌واسطه داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمند مانند آگار، کاراژینان و آلژینات دارای اهمیت اقتصادی زیادی هستند (۷).

برات مایع همراه با غلظت معینی از عصاره و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت یک‌شبه میکروارگانسیم اضافه گردید بدین ترتیب در لوله شماره یک و هشت غلظت عصاره به ترتیب برابر با ۱۰۰۰ و ۷/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. سپس لوله‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون (Incubation) لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانسیم بررسی گردیدند (۱۲). از میان لوله‌هایی که در آن‌ها باکتری رشد نکرده بود لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره جلبکی بود به‌عنوان MIC گزارش گردید.

یافته‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های رقت لوله‌ای با توجه به جدول ۱ نشان داد که عصاره‌های جلبکی مورد مطالعه در محیط مایع بر روی باکتری‌های مورد بررسی اثر ضد باکتریایی داشتند و در بین عصاره‌ها، عصاره اتیل استاتی *Iyengaria stellata* دارای $MIC > 2/5 \text{ mg/ml}$ در مقایسه با کنترل مثبت در مقابل هر سه سویه باکتری مورد بررسی بیشترین اثر را داشت.

هرکدام با عبور از فیلترهای میکروبی استریل گردیدند (۱۰).

آزمون‌های ضد میکروبی:

سویه‌های باکتری مورد استفاده در این تحقیق *E coli* (PTCC:1112)، *Staphylococcus aureus* (PTCC:1338)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1707) بودند. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته یک چرخش کامل بر روی محیط‌های مورب و همچنین کشت خطی بر روی پلیت‌های مولر هیتون برات آگار (Merk Germany) انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده تا به‌عنوان منبع باکتری استفاده شود. محیط‌های منبع در یخچال نگهداری و در صورت لزوم مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت ضد میکروبی بر اساس روش MIC با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. به‌منظور تعیین (MIC) ابتدا از هر عصاره، غلظت ۴۰ mg/ml تهیه و به ازای هر میکروارگانسیم از یک سری ده‌تایی لوله‌های آزمایش استفاده شد (۱۱). هشت لوله برای غلظت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت و یک لوله به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. هرکدام از لوله‌ها به میزان ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هیتون

جدول ۱: اندازه‌گیری میزان MIC عصاره‌های جلبکی

Samples	MIC FOR <i>Ecoli</i>	MIC FOR <i>Staphylococcus aureus</i>	MIC FOR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Colpomenia sinuosa</i> (عصاره آب متانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Colpomenia sinuosa</i> (عصاره متانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Colpomenia sinuosa</i> (عصاره اتیل استاتی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml

<i>Iyengaria stellate</i> (عصاره آب متانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Iyengaria stellate</i> (عصاره متانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Iyengaria stellate</i> (عصاره اتیل استاتی)	>2/5 mg/ml p < 0/05	>2/5 mg/ml p < 0/05	>2/5 mg/ml p < 0/05
Ciprofloxacin	>0.02 µg/ml	>0.02 µg/ml	>0.02 µg/ml

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر عصاره اتیل استاتی جلبک *Iyengaria stellata* بیشترین اثر را بر روی هر سه سویه باکتری (*Staphylococcus aureus* (PTCC:1112)، *Pseudomonas coli* (PTCC:1338) و *aeruginosa* (PTCC1707) نشان داد که اختلاف معناداری با کنترل مثبت داشت و این مطالعه برای نخستین بار در ایران بر روی این جلبک‌ها صورت گرفت و به‌عنوان اولین گزارش است.

در سال‌های اخیر استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث به وجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان شده است (۹).

جلبک‌های دریایی در صنایع کاغذسازی، نساجی، رنگ‌سازی، تهیه فیلم‌های عکاسی، لوازم‌آرایی و بهداشتی، علوم پزشکی، داروسازی و دندانپزشکی، تهیه محیط‌های کشت میکروبی، تهیه قرص‌ها، شربت‌های دارویی، قالب‌های اولیه دندان و در تغذیه به‌طور مستقیم و غیرمستقیم مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳). تاکنون، ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسولولی دریایی شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیک‌های اولیه و یا

ثانویه این جانداران می‌توانند با تبدیل به مواد زیست فعال در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گیرند (۱۵ و ۱۴). Rosaline و همکاران در سال ۲۰۱۲، خواص ضد باکتریایی تعدادی از جلبک‌های سواحل Tamil Nadu جنوب هند را مورد مطالعه قراردادند (۱۶). در این تحقیق از اتیل استات، متانول و متانول آب جهت عصاره‌گیری استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد عصاره اتیل استاتی جلبک *Iyengaria stellata* اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت.

طی بررسی Caccamese و همکاران در سال ۱۹۸۵، عصاره جلبک‌های قهوه‌ای دارای تأثیر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به جلبک‌های قرمز بود (۱۸ و ۱۷).

Manivannan و همکاران در سال ۲۰۱۱، فعالیت ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای سواحل Vedalai را مورد بررسی قراردادند. در این مطالعه از ۷ روش عصاره‌گیری متانولی، استونی، پترولیوم اتر، اتانولی، اتیل استات، کلروفومی و دی اتیل اتر استفاده شد. نتایج نشان داد عصاره متانولی دارای تأثیر بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها است (۱۹).

هر سه عصاره اتیل استاتی، متانولی و متانول آبی دو جلبک قهوه‌ای کلپومینا سینوسا و اینگاریا استلاتا

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران در مرکز فارماکونوزی دانشگاه تهران و مرکز گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی که در انجام عصاره گیری، آنالیز داده ها و هماهنگی های لازم جهت اجرای این پروژه همکاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

از سواحل خلیج فارس اثرات ضد باکتریایی نشان دادند، در این میان عصاره اتیل استاتی جلبک اینگاریا استلاتا بیشترین اثر را بر روی هر سه سویه باکتری (*Staphylococcus aureus* (PTCC:1112), *E coli* (PTCC:1338), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1707) نشان داد که اختلاف معناداری با کنترل مثبت داشت ($p < 0/05$).

References

1. Puglisi MP, Engel S, Jensen PR, Fenical W. Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Mari Biol.* 2006; 149:991-1002.
2. Gonzalez A, Platas G, Basillio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria Canary Islands, Spain. *Inter Micro.* 2001; 4(1):35-40.
3. Al-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z. Antibacterial activity in marine algae *Eucheumadenticulatum* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Res J Biol Sci.* 2009; 4: 519-524.
4. Rajasulochana P, Dhamotharan R, Krishnamoorthy P, Murugasan S. Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. *Mars Press J Amer Sci.* 2009;5:20-25
5. Dhargalkar VK, Verlecar XN. Southern Ocean seaweed: A resource for exploration in food and drugs. *Aquacul.* 2009;287:229-242
6. Kotnala S, Garg A, Chatterji A. Screening for the presence of antimicrobial activity in Few Indian seaweeds. *Pertan J Tropical Agricul Sci.* 2009;32:69-75.
7. Taskin E, Ozturk M, Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afric J Biotech.* 2007; 6:2746-51.
8. Gharanjik BM, Abkenar AM. The marin algae of the Sistan and Baluchestan Province, Iran. *Iran Science Fish J.* 2000; 9:37-49. [Full Text in Persian]
9. Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, Nasery F. Antibacterial effect of *Myrtus communis* Hydroalcoholic extract on some pathogenic bacteria. *Zahedan J Res Med Sci.* 2013;15:19-24. [Full Text in Persian]
10. Cos P, Vlietinck A, Berghe D. Antiinfective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof of concept. *J Ethnopharmacol.* 2006;106: 290-302.
11. Kumaran S, Deivasigamani B, Alagappan K, Sakthivel M, Karthikeyan R. Antibiotic resistant *Esherichia coli* strain from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. *Asian Pacific J Tropical Med.* 2010;12:977-981.
12. Vanden DA, Vlietinck A J, In: Dey P M, Harborne JB. (Eds). *Methods in plant biochemistry: Screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.* London Academic press 1991; 47-69.
13. Kaladhran P, Kaliaperumal N. Seaweed industry in India Naga. *The Iclarm Quarterly.* 1999;22:11-14.

14. Tüney I, Cadirci BH, Ünal D, Sukatar A. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (izmir, Turkey). *Turkish J Biol.* 2006;30:171-5.
15. Choudhury S, Sree A, Mukherjee SC, Pattnaik P, Bapuji M. In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. *Asian Fish Sci.* 2005;18:285-94.
16. Rosaline XD, Sakthivelkumar S, Rajendran K, Janarthanan S. Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. *Asian Pacific J Tropical Biomed.* 2012;140-146.
17. Caccamese S, Toscana RM, Funari G, Cormaci M. Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from southern Italy coast. *Botanica Mari J.* 1985;28:505-7.
18. Kanjana K, Radtanatip T, Asuvapongpatana S, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 2011;30:389-96.
19. Manivannak K, Karthikai devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T. Antimicrobial Potential of selected brown seaweed from vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pacific J Trop Biomed.* 2011;1:114-120.

Original paper

Biological properties of Brown algae in Northern Coast of Persian Gulf

Farzaneh Farahani¹, Parisa Permeh², Amin Mokhlesi², Somayeh Nasiri², Ahmad Reza Gohari Kakhaki³, Baiyram Mohamad Gharachik⁴, Jelveh Sohrabipoor⁵

1- Iranian Academic center for Education, Culture and Research of Alborz Branch, Email: fbfarahani@gmail.com; Mobile: 09122934480

2, 3- Medicinal Plants Research Center, Tehran University of Medical Sciences

4- Distant water fisheries Research Center, Chabahar

5- Agriculture and Natural Resources Research and Training Center, Hormozgan

Abstract

Background: The widespread use of antibiotics leads to resistant strains of microorganisms and antibiotic resistance is increasing throughout the world, therefore, access to new sources of drugs with fewer side effects is important. This paper examines the effects of biological extracts of ethylacetate, methanol and methanol-water of *Colpomenia sinousa* and *Iyengaria stellata* in the Northern coast of the Persian Gulf.

Methods: In this study after sampling, antibacterial effects of extracts of *Colpomenia sinousa* and *Iyengaria stellata* collected from Persian Gulf on a strain of bacteria called Staphylococcus aureus (gram-positive) and E.coli (gram-negative), Pseudomonas aeruginosa examined and the results were compared with standard antibiotics. Extraction was performed using percolation method. Antibacterial effects (MIC) of the extracts were determined.

Results: Results of the dilution tests showed, the algal extracts had antibacterial effect and among the extracts, ethyl acetate extracts of *Iyengaria stellata* (MIC > 2/5 mg / ml) compared to the positive control against three strains of bacteria, have the greatest effect (p < 0/05).

Conclusion: All three extracts, ethyl acetate, methanol and methanol-water of *Colpomenia sinousa* and *Iyengaria stellata* Showed antibacterial effects of Persian Gulf Coast, ethyl acetate extract of *Iyengaria stellata* greatest effect on each of the three strains of bacteria Staphylococcus aureus (PTCC: 1112), E coli (PTCC: 1338), Pseudomonas aeruginosa (PTCC1707) and showed that there was significant difference with the positive control (p < 0.05).

Key word: Biological properties, Brown algae, Persian gulf