

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^۳، سمیه نصیری^۴، احمد رضا گوهری کاخکی^۵، بایرام محمد قرنچیک^۶، جلوه شهرابی پور^۷

۱- جهاد دانشگاهی واحد استان البرز، ایمیل: fb.farahani@gmail.com؛ موبایل: ۰۹۱۲۲۹۳۴۸۰

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

۴- 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 میکرووارگانیسم‌ها و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سرتاسر 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، مтанولی و آب مтанولی 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. عصاره گیری به روش پرکولاسان انجام شد. اثرات ضد باکتریایی (MIC) عصاره‌های نهایی به روش رقت‌های متوالی در لوله جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به دست 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 $<2/5 \text{ mg/ml}$ در مقایسه با کنترل مثبت در مقابل هر سه سویه باکتری، بیشترین اثر را داشت ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: هر سه عصاره اتیل استاتی، مтанولی 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) و *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 از تحقیق به بررسی اثر ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای *Iyengaria stellata* و *Colpomenia sinuosa* 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.

عصاره گیری:

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

صرف 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، ضدویروسی، ضدقارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی دریایی شناسایی شده‌اند که بسیاری از متابولیک‌های اولیه و ثانویه این جلبک‌ها می‌توانند به مواد فعال مورد علاقه صنایع دارویی تبدیل شوند (۳). نوع جلبک‌ها به عنوان بخش مهمی از فلور سواحل جزر و مدى اقیانوس‌ها، دریاها و تولیدکنندگان اولیه اکوسیستم‌های دریایی، تابع عوامل جغرافیایی و اقلیمی حاکم بر آن مناطق است. میزان تولیدات اولیه در بسترها مرجانی و جلبکی می‌تواند از میزان تولیدات اولیه در جنگل‌های پرباران مناطق حاره‌ای بیشتر باشد (۴). این منع پرارزش بیولوژیکی دارای کاربردهای گوناگونی است که استفاده از جلبک‌های دریایی به عنوان غذا و دارو بیش از سایر جنبه‌ها، نظر انسان را به خود جلب کرده است (۵ و ۶). جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتینوئید، 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 به واسطه داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمند مانند آگار، کاراژینان و آژئینات دارای اهمیت اقتصادی زیادی هستند (۷).

برات مایع همراه با غلظت معینی از عصاره و یک میلی لیتر از سوسپانسیون کشت یک شبه میکرووار گانیسم اضافه گردید بدین ترتیب در لوله شماره یک و هشت غلظت عصاره به ترتیب برابر با ۱۰۰۰ و ۷/۸۱ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. سپس لوله ها برای مدت ۲۴ ساعت در گرمانه ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون (Incubation) لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکرووار گانیسم بررسی گردیدند (۱۲). از میان لوله هایی که در آنها باکتری رشد نکرده بود لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره جلبکی بود به عنوان MIC گزارش گردید.

یافته ها

نتایج به دست آمده از آزمون های رقت لوله ای با توجه به جدول ۱ نشان داد که عصاره های جلبکی مورد مطالعه در محیط مایع بر روی باکتری های موربد بررسی اثر ضد باکتریایی داشتند و در بین عصاره ها، عصاره اتیل استاتی مقایسه با کنترل مثبت در مقابل هر سه سویه باکتری مورد بررسی بیشترین اثر را داشت.

هر کدام با عبور از فیلتر های میکروبی استریل گردیدند (۱۰).

آزمون های ضد میکروبی:

سویه های باکتری مورد استفاده در این تحقیق *E. coli*, *Staphylococcus aureus*(PTCC:1112) *Pseudomonas* (PTCC:1338)

Aeruginosa(PTCC1707) بودند. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته یک چرخش کامل بر روی محیط های مورب و همچنین کشت خطی بر روی پلیت های مولرهیتون برات آگار (Merk Germany) انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت در درجه ۳۵ گراد در گرمانه قرار داده تا به عنوان منبع باکتری استفاده شود. محیط های منبع در یخچال نگهداری و در صورت لزوم مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت ضد میکروبی بر اساس روش MIC با استفاده از روش رقت لوله ای تعیین گردید. به منظور تعیین (MIC) ابتدا از هر عصاره، غلظت ۴۰ mg/ml تهیه و به ازای هر میکرووار گانیسم از یک سری ده تایی لوله های آزمایش استفاده شد (۱۱). هشت لوله برای غلظت های مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. هر کدام از لوله ها به میزان ۹ میلی لیتر از محیط کشت مولرهیتون

جدول ۱: اندازه گیری میزان MIC عصاره های 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 مثانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Colpomenia sinuosa</i> (عصاره مثانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Colpomenia sinuosa</i> (عصاره اتیل استاتی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml

<i>Iyengaria stellata</i> (عصاره آب مтанولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Iyengaria stellata</i> (عصاره متانولی)	>5mg/ml	>5mg/ml	>5mg/ml
<i>Iyengaria stellata</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

ثانویه این جانداران می‌توانند با تبدیل به مواد زیست فعال در صنایع دارویی مورداستفاده قرار گیرند (۱۵ و ۱۶).

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 (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 م atanولی، استونی، پترولیوم اتر، اتانولی، اتیل استات، کلروفرمی و دی اتیل اتر استفاده شد. نتایج نشان داد عصاره م atanولی دارای تأثیر بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها است (۱۹).

هر سه عصاره اتیل استاتی، م atanولی و م atanول آبی دو جلبک قهوه‌ای کلپومینا سینوسا و اینگاریا استلاتا

بحث و نتیجه‌گیری

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

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

جلبک‌های دریایی در صنایع کاغذسازی، نساجی، رنگ‌سازی، تهیه فیلم‌های عکاسی، لوازم آرایشی و بهداشتی، علوم پزشکی، داروسازی و دندانپزشکی، تهیه محیط‌های کشت میکروبی، تهیه قرص‌ها، شربت‌های دارویی، قالب‌های اولیه دندان و در تغذیه به طور مستقیم و غیرمستقیم مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۳). تاکنون، ترکیبات زیستی متعددی با گسترده کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلوی دریایی شناسایی و استخراج شده است و بسیاری از متابولیک‌های اولیه و یا

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران در مرکز فارماکنوزی 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 *E. coli*، *PTCC:1112*)*Staphylococcus aureus*) *Pseudomonas* (PTCC:1338) *aeruginosa*(PTCC1707 معناداری با کنترل مثبت داشت ($p<0.05$).

Referecnces

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 *Myrtuscommunis* Hydro-alcoholic 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 *Escherichia coli* strain from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. *Asian Pacific J Tropical Med.* 2010;12:977-981.
12. Vanden DA, Vlietinck AJ, In: Dey P M, Harborne JB. (Eds). *Methods in plant biochemistry: Screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.* London Academic press1991; 47-69.
13. Kaladhran P, Kaliaperumal N. Seaweed industry in India Naga. *The Iclarm Quarterly.* 1999;22:11-14.

14. Tuney 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 *Gracilariafisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *penaeusmonodon*. *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* ($MIC > 2/5 \text{ mg / ml}$) 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