بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره جلبک‌های *پادینا* (*Padina* sp.) و *سارگاسوم* (*Sargassum* sp.) جمع‌آوری شده از سواحل بندر بوشهر بر باکتری‌های *ویبریو کلرا* و *اشیریشیا کلی* جدا شده از آب

علیرضا گلچین منشادی[1*]، برهان مال الهی[2]، محمد ترحمی[1]

۱. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۲. دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

***نویسنده مسئول**: *golchinalireza@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/٤/۳۰

چکیده

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره جلبک‌های *پادینا* و *سارگاسوم* جمع‌آوری شده از سواحل بندر بوشهر بر باکتری‌های *ویبریو کلرا* و *اشیریشیا کلی*، پس از شست و شو در آب مقطر، جلبک‌ها خشک‌شده و به منظور به‌دست آوردن عصاره متانولی، عصاره‌گیری به روش غوطه‌وری در متانول ۹۶ درصد انجام شد. رقت‌های متوالی عصاره‌های جلبکی به صورت خالص (۱۰۰ درصد)، ۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد تا ۰/۱۹۵ درصد با حلال‌های متانول و دی متیل سولفوکساید به منظور بررسی تاثیر حلال در توان جلبک-ها تهیه گردید. غلظت باکتری‌ها برای تلقیح در لوله‌ها بر اساس کدورت مک فارلند تهیه و جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده و سپس حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره‌های جلبکی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد، هر دو جلبک *پادینا* و *سارگاسوم* بر روی باکتری‌های *ویبریو کلرا* و *اشیرشیا کلی* اثر دارند، گرچه نتایج به دست آمده از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). با این حال اثر جلبک *پادینا* بر روی هر دو باکتری بیشتر بوده است. همچنین بررسی رابطه بین میزان غلظت عصاره‌های جلبکی با حداقل غلظت بازدارنده و حداقل غلظت باکتری‌کشی به روش رگرسیون خطی نشان داد بین این دو متغیر رابطه معنی‌داری برقرار است (P≤۰/۰۵).

واژگان کلیدی: *سارگاسوم*، *پادینا*، حداقل غلظت بازدارنده، حداقل غلظت باکتری‌کشی، *ویبریوکلرا*، *اشیرشیاکلی*.

مقدمه

به تازگی علاقه زیادی به مواد بیولوژیکی فعال جداشده از جلبک‌ها و اثر آن‌ها بر عملکرد فیزیولوژیک بدن انسان به خصوص افزایش قابلیت سیستم ایمنی و فعالیت ضد سرطانی این مواد نشان داده شده است (Noda et al., 1996; Okai and Higashi-Okai, 1997). *کوندروس* نوعی جلبک قرمز با خواص ضد میکروبی است و به عنوان نرم‌کننده و در تهیه مسهلی به نام کوندرمول کاربرد دارد. برخی جلبک‌ها دارای خواص دارویی هستند، عصاره استخراجی حاصل از جلبک‌های قهوه‌ای، اثر ضد ویروسی از خود نشان داده‌است. امروزه برای درمان گواتر، از برخی جلبک‌های قهوه‌ای مانند *لامیناریا* و *سارگاسوم*، به دلیل داشتن ید، دارویی به نام پالکاتو به دست می‌آید.

پژوهش‌های اخیر بر روی جلبک‌های قرمز و دیگر جلبک-های دریایی نشان داده‌است که این جلبک‌ها دارای مواد

دارویی با ارزشی می‌باشند، از جمله در کاهش کلسترول و فشار خون موثرند (نبی‌پور و مرادحاصلی، ۱۳۸۵) درمورد اثر ضد میکروبی جلبک کاهوی دریایی تحقیقات پراکنده‌ای صورت گرفته‌است (Kubo et al., 1992). جلبک‌ها به‌دلیل دارا بودن ترکیبات ویژه پلی ساکاریدی و نیز ترکیبات دارویی خاص، دارای کاربردهای وسیعی می‌باشند (Patterson, 1993). از جمله کاربردهای این مواد می‌توان به عنوان مسهل در درمان یبوست، التیام دهنده زخم‌های گوارش و به عنوان داروی ضد انگلی دستگاه گوارش و هم-چنین در کاهش فشارخون، کاهش چربی خون، کاهش وزن و نیز جلوگیری از انسداد عروق اشاره نمود (Okai and Higashi-Okai, 1997). مطالعات نشان داد که در مصرف‌کنندگان جلبک، میزان مبتلایان به ایدز به طور چشمگیری کمتر از افراد دیگر بوده‌است (Damonte and Pujol, 1994). همچنین در برخی منابع به قدرت مقابله این گیاهان در مقابل ویروس ایدز و ویروس تبخال نیز اشاره شده‌است (Damonte et al., 1994). برخی از جلبک‌ها منبع آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند و مانع از رشد باکتری‌ها می‌گردند به عنوان مثال می‌توان آنتی‌بیوتیک *chlorellin* را نام برد که در جلبک *کلرلا* یافت می‌شود. تولید ترکیبات ضد باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشند به‌وسیله گونه *آسکوفیلوم نودوزم* گزارش شده‌اند (Marasneh et al., 1995).

مواد و روش کار

تهیه و آماده‌سازی باکتری و نمونه‌های جلبکی در این بررسی، باکتری‌های مورد استفاده از آب آلوده مورد بررسی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تهیه شد (گزارش منتشر نشده). نمونه‌برداری جلبک‌های *سارگاسوم* و *پادینا* از مناطق بین جزر و مدی ساحل بندر بوشهر انجام گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون ظرف‌های شیشه‌ای حاوی آب دریا نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور عصاره‌گیری ابتدا جلبک‌ها را کاملاً و با دقت شسته و به منظور خارج شدن املاح، درون آب مقطر غوطه‌ور شدند و هر چند ساعت، آب آن‌ها تعویض گردید سپس جلبک‌ها روی پارچه تمیز در سایه گسترانیده و طی سه روز خشک شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط آسیاب برقی کاملاً به صورت پودر درآمدند. عصاره‌گیری از جلبک‌ها به روش غوطه‌وری در حلال متانول به این ترتیب انجام پذیرفت که در ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک گونه‌های جلبکی توزین شد و به ظروف شیشه‌ای منتقل گردید سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد به آن‌ها افزوده و پس از تکان دادن، به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری گردیدند. پس از این مدت، عصاره‌های حاصل، توسط کاغذ صافی فیلتر شده، با استفاده از دستگاه تبخیرکننده گردان (روتاری) تغلیظ شدند و برای خشک کردن و گرفتن کامل الکل موجود در عصاره، به مدت ۲۴ ساعت عصاره در دستگاه دسیکاتور تحت خلاء قوی قرار داده‌شد و پودر خشک عصاره‌های جلبک به‌دست آمد (Kubo et al., 1992).

برای تهیه غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، عصاره‌ها درون دو حلال متانول و دی متیل سولفواکساید (DMSO) حل شدند و سپس با عبور از فیلترهای میکروبی با قطر ۴۵ میکرون، استریل گردیدند. علت استفاده از دو نوع حلال این بوده‌است که مشاهده شود آیا نوع حلال نیز می‌تواند تأثیری بر توان بازدارندگی یا باکتری‌کشی عصاره‌های جلبکی داشته باشد یا خیر.

برای هر جلبک ۴ سری لوله به منظور تعیین حداقل غلظت نگهدارنده تهیه شد که برای جلبک *پادینا* شامل دو سری عصاره جلبک *پادینا* با باکتری *ویبریو*، حلال‌های متانول و دی متیل سولفوکساید و دو سری عصاره جلبک *پادینا* با

باکتری *اشریشیا کلی*، حلال‌های متانول و دی متیل سولفوکساید و همچنین برای جلبک *سارگاسوم* شامل دو سری عصاره جلبک *سارگاسوم* با باکتری *ویبریو*، حلال‌های متانول و دی متیل سولفوکساید در نظر گرفته شدند. هر سری لوله شامل ۱۲ لوله حاوی یک میلی لیتر محیط کشت مولرهینتون براث بود. در ۱۰ لوله اول، رقت‌های مختلف عصاره‌ها تهیه شد. غلظت لوله‌ها به ترتیب شامل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ ، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹و ۰/۰۱۹۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

در لوله ۱۱ شامل محیط کشت بدون عصاره و در لوله ۱۲ شامل محیط کشت با عصاره ریخته شد که به همه لوله‌ها به غیر از لوله ۱۲، به میزان یک میلی‌لیتر باکتری که به کدورت مک فارلند رسیده‌است و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شده اضافه گردید و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شدند (Albuqurque et al., 1983). پس از تعیین حداقل غلظت بازدارنده، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر کدام از لوله‌های آزمایش، که پس از یک شب انکوباسیون، کدورت باکتریایی آن‌ها قابل مشاهده نبود، در پلیت آگار جامد به صورت پاساژ کشت داده‌شدند تعداد کلونی‌هایی که پس از یک شبانه روز انکوباسیون روی این محیط کشت ثانویه رشد می‌کنند، شمارش شده و با تعداد cuf/ml در کشت اولیه استاندارد مقایسه گردیدند.

جهت تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی، لوله‌های شفاف مانده، به روش رقیق‌کردن، روی محیط جامد، کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شدند. کمترین غلظتی که هیچگونه باکتری روی محیط کشت رشد نکرده به عنوان کمترین غلظت کشنده باکتری محسوب گردید (Albuqurque et al., 1983).

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری داده‌های به دست آمده با روش آنالیز واریانس دوطرفه به کمک نرم افزار SPSS 18 صورت گرفت.

نتایج

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره متانولی جلبک *پادینا* در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی هر دو باکتری *اشریشیا کلی* و *ویبریو کلرا* و در حلال دی متیل سولفو اکساید در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد همچنین عصاره متانولی جلبک *سارگاسوم* در حلال متانول در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *ویبریوکلرا* و در حلال دی متیل سولفو اکساید در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، خاصیت مهار رشد داشته است. عصاره متانولی جلبک *پادینا* در حلال متانول در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بر روی باکتری *اشریشیا کلی* و در حلال دی متیل سولفو اکساید در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *ویبریوکلرا* اثر باکتری‌کشی داشت.

عصاره متانولی جلبک *سارگاسوم* در حلال متانول در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، و در حلال دی متیل سولفو اکساید نیز در همین غلظت، اثر باکتری‌کشی بر روی باکتری های *اشریشیا کلی* و *ویبریوکلرا* از خود نشان داده‌است.

اگرچه استفاده از دو نوع حلال برای مقایسه تأثیر نوع حلال بر توان بازدارندگی یا باکتری‌کشی جلبک‌ها نشان می‌دهد که در خصوص جلبک *پادینا* عصاره متانولی نسبت به عصاره جلبکی محلول در دی متیل سولفوکساید اثر بیشتری داشته‌است و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی در عصاره متانولی نسبت به عصاره محلول در دی متیل سولفوکساید در غلظت‌های پایین‌تری رخ داده است اما بررسی نتایج آماری داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که نوع جلبک و حلال تاثیر معنی‌داری در مهار رشد باکتری‌ها ندارند. نتایج حاصل از

این بررسی، بر اساس غلظت جلبک نشان می‌دهد که غلظت جلبک‌ها تاثیر معنی‌داری در مهار رشد باکتری‌ها داشته است (P≤۰/۰۵). بررسی نتایج بروش رگرسیون خطی نشان می‌دهد رابطه معنی‌داری بین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و کمترین غلظت کشنده (MBC) باکتری با غلظت جلبک‌ها وجود دارد.

بحث

مطالعات زیادی پیرامون خواص دارویی و درمانی از جمله اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها صورت گرفته است. نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ای نشان داد که عصاره متانولی جلبک‌های *پادینا گیمنوسپورا* (*Padina gymnospora*) و *سارگاسوم دنتیفولیوم* (*Sargassum dentifolium*) اثر متوسطی بر روی باکتری *اشریشیا کلی* دارند (Salem et al., 2011). مطالعات پیشین، اثر ضد باکتریایی جلبک‌های قهوه‌ای را نشان داده‌اند. جلبک‌های قهوه‌ای دارای متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی و دیگر مواد طبیعی هستند که این مواد مسئول خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها می‌باشند(Ayyad et al., 2001).

همچنین در تحقیق دیگری نتایج به‌دست آمده از آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که جلبک *پادینا گیمنوسپورا* (*Padina gymnospora*) نسبت به جلبک *سارگاسوم ویتی* (*Sargassum wightii*) اثر بیشتری بر روی *ویبریوکلرا* داشته‌است(Marasneh, 1995). همچنین (Lavanya et al,. 2011) نتایج مشابهی به‌دست آوردند که عصاره متانولی جلبک *سارگاسوم ویتی* اثر مهاری بر روی *اشریشیا کلی* ندارد (Lavanya and Veerapan, 2011). این تفاوت در نتایج ممکن است ناشی از گونه مورد استفاده و زمان و مکان جمع‌آوری نمونه، میزان قابلیت روش عصاره‌گیری برای برگرداندن متابولیست‌های فعال و یا تفاوت در روش آزمایش باشد که نتایج، حساسیت متفاوت گونه‌های هدف را نشان می‌دهد. (Salem et al., 2011) نشان دادند که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتراست. در بررسی حاضر نیز حساسیت نسبی باکتری‌های گرم منفی *ویبریوکلرا* و *اشریشیا کلی* نسبت به عصاره جلبک‌های مورد آزمایش مشاهده شد. حساسیت بیشتر باکتری گرم مثبت به عصاره جلبک‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در ساختار دیواره سلولی و ترکیبات آن‌ها باشد. فعالیت لایه خارجی در باکتری‌های گرم منفی، مانع از ورود بسیاری از مواد طبیعی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. همچنین حضور یک لایه ضخیم مورین در دیواره سلولی مانع از ورود مهارکننده‌ها می‌شود (Rajasulochana et al., 2009).

نتایج به‌دست آمده در این بررسی، بر اساس آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد، هر دو جلبک *پادینا* و *سارگاسوم* بر روی باکتری‌های *ویبریوکلرا* و *اشیرشیاکلی* اثر دارند اگرچه نتایج به‌دست آمده به جز اثر غلظت عصاره از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، با این حال اثر جلبک *پادینا* بر روی هر دو باکتری بیشتر بوده‌است.

همچنین بررسی رابطه بین میزان غلظت عصاره‌های جلبکی و نتایج به‌دست آمده به روش رگرسیون خطی نشان داد، بین این دو متغیر رابطه معنی‌دار برقرار است (P≤۰/۰۵). در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که جلبک‌های قهوه‌ای سواحل جنوبی ایران، منابع بالقوه از مواد فعال زیستی هستند و می‌توانند برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی مورد استفاده قرار گیرند. با این حال مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیبات فعال زیستی در جلبک‌های دریایی مورد نیاز است.

منابع

۱. نبی‌پور، ایرج.، مرادحاصلی، فرزاد. (۱۳۸۱). جلبک‌های دارویی خلیج فارس. چاپ اول، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر، صفحه ۵۶-۱.

2. Ayyad, S., Slama, M., and Mokhtar, A. 2001. Cytotoxic bicyclic diterpene from brown algae *sargassum cripsum*. J Chem Pharm. 14: 155-159.
3. Albuqurque, M., campos, T., and Koening, M. 1983. Detection of antimicrobial activity in marine seaweed. Rev Int Antibiot Univ Fed Pernambuco Recife. 6: 127-138.
4. Damonte, E., Neyts, J., and Pujol, C. 1994. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. J Biochem Pharmacol. 28: 2187-2192.
5. Kubo, I., Himejima, M., and Tsujimoto, K. 1992. Antibacterial activity of Crinitol and its potentiation. J Nat Prod. 55: 780-785.
6. Lavanya, R., and Veerapan, N. 2011. Antibacterial potential of six seaweed collected from gulf of southeast coast of India. J Adv in Biol Res. 5: 38-44.
7. Marasneh, I., Jamal, M., Kashasneh, M., and Zibdeh, M. 1995. Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria. J Microbiol. 83: 23-26.
8. Noda, K., Ohno, N., and Tanaka, K ., 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. J Planta Med. 62: 423-426.
9. Okai,Y., and Higashi-Okai, K. 1997. Potent anti-inflammatory activity of a derived from edible green algae, *Entromorpha prolifera* (sujiao-nori). J Int Immunopharmacol. 19: 355-358.
10. Patterson, G. 1993. Bioactive natural products from blue-green algae. J Phycol. 29: 140-147
11. Rajasulochana, P., Dhamotharan, R., Krishnamoorthy, P., and Murgesan, S. 2009. Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. J Am Sci. 5: 20-25.
12. Salem, W.M., Galal, H., and Nasr El-deen, F. 2011. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). J Afr Microbiol Res. 5: 2160-2167.

Survey on antibacterial effect of *Padina* sp. and *Sargassum* sp. collected from the coastal areas of Bushehr port on *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* isolated from water

Golchin Manshadi AR[1]*, Malelahi B[2], Tarahomi, M[1]

1. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad university, Kazerun, Iran.

2. Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

***Corresponding author:** *Golchinalireza@yahoo.com*

Accepted: 21 July 2015 Received: 10 May 2015

Abstract

To evaluate the antibacterial effect of *Padina* sp. and *Sargassum* sp. extracts, collected from coastal areas of Bushehr port, on *Vibrio cholera* and *Escherichia coli*, after washing in distilled water, the *Padina* sp. and *Sargassum* sp. were dried. Extraction was performed by immersion in 96% methanol to obtain methanol extract. Serial dilutions of the algal extracts were prepared by methanol and DMSO to find effect of solvent on algea potential as pure (100 percent), 25 percent and finally 12.5 to 0.195 percent. Concentration of bacteria for inoculating in tubes were prepared base on McFarlane turbidity and was used to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of algal extracts. The results showed that both *Padina* sp .and *Sargassum* sp. were effective on *V. cholera* and *E. coli,* although the results were not statistically significant ($P>0.05$). However the effect of *Padina* sp. on both bacteria and methanol extract was more. The relationship between the concentration of algal extracts with MIC and MBC based on linear regression method showed that there is a significant relationship between two parameters ($P\leq0.05$).

Keywords: *Sargassum* sp., *Padina* sp., MIC, MBC, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli.*