بررسی اثرات بازدارندگی عصاره‌ی جلبک *Chlorella vulgaris* روی باکتری *Bacillus subtilis* در محیط کشت آزمایشگاهی

رضا صفری[1] ، بهروز ابطحی[2]، پروانه طیبی[3]*

[1] پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

[2] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

[3] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشکده‌ی منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/٤/۲۷

چکیده

جلبک‌ها منابع غنی از متابولیت‌های فعال طبیعی می‌باشند که می توانند در صنعت داروسازی استفاده شوند. در این بررسی، جلبک تک سلولی کلرلا ولگاریس جهت مطالعه انتخاب گردید. پس از تهیه و کشت استوک جلبک، عصاره‌ی الکلی و استونی آن تهیه و اثرات ضد باکتریایی این جلبک و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد میکروب با استفاده از روش رقت لوله‌ای و انتشار در دیسک، علیه باکتری باسیلوس سوبتیلیس مشخص گردید. نتایج به دست آمده، نشان داد که جلبک کلرلا دارای خواص مهارکنندگی علیه باکتری *Bacillus subtilis* می‌باشد. تاثیر ممانعت کنندگی عصاره‌های مختلف در آزمایش‌های میکروبی متفاوت بوده و بیش‌ترین خواص ضدمیکروبی در عصاره‌ی استونی دیده شد. عصاره‌ی استنی جلبک کلرلا ولگاریس توانست در غلظت ۳ µg/ml رشد باکتری باسیلوس سوبتی لیس را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: محیط کشت آزمایشگاهی، باسیلوس سوبتی لیس، کلرلا ولگاریس، اثر مهارکنندگی.

---

* مسوول مکاتبه : p_tayebi2000@yahoo.com

۱- مقدمه

بیش از دو هزار سال است که از جلبک‌ها در مصارف غـذایی و دارویی استفاده می‌شود. کاربرد آن‌ها در پزشکی سنتی انگیـزه‌ای برای محققان به وجود آورده تا مطالعات گسترده‌ای را در مـورد خواص آن‌هـا آغـاز کننـد. در ایـن راسـتا، مـواد مختلفـی مثـل اسیدهای امینه، ترپنوئیدها، فلورانتین‌هـا، آلکـان‌هـا، کتـون‌هـای هالوژنـه، ترکیبـات اسـتروئیدی، پلـی سـولفیدهای حلقـوی، اسیدهای چرب، فنل‌ها و غیره از جلبک‌ها به دست آمـده اسـت که برخی از آن‌ها تاثیر ضـد باکتریـایی دارنـد. بـه عنـوان مثـال می‌توان از آنتی بیوتیک Chlorellin نام برد که از جلبـک کلـرلا استخراج می‌شود (۱۵) .

کلرلا ولگاریس یکی از مشهورترین ریز جلبک‌هاسـت. ایـن جلبک میکروسکوپی با قطر ۲ تا ۱۰ میکرون ساکن در آب‌هـای شیرین می باشد. کلرلا مشابه گیاهان از فعـال تـرین موجـودات فتوسنتز کننده و دارای کلروفیـل بـا تـراکم بالاسـت. بخـشی از خواص درمانی کلرلا در بدن مربوط به مقـدار زیـاد کلروفیـل و ساختمان دیواره‌ی سلولی، علی الخـصوص مـواد متـشکله ایـن دیواره‌ی سلولی است. ایـن جلبـک، سـلامتی و قـدرت دفـاعی پوست بدن را بهبود می بخـشد. از عـصاره‌ی کلـرلا در تهیـه‌ی لوازم آرایشی، بهداشتی و با توجه به پلی سـاکاریدهای موجـود در آن در داروسازی استفاده می‌گردد.

باسیلوس سوبتی لیس، باکتری گـرم مثبـت، میلـه‌ای شـکل، هوازی و اسپوردار است (۱). این باکتری کم تر باعـث بیمـاری در انسان می‌شود ولی مـی‌توانـد غـذا را آلـوده کنـد. باسـیلوس زنجیره‌ای طنابی شکل، چسبنده و محکم از پلی‌ساکارید تشکیل می دهد که در فساد خمیر نان نقش دارد. این بـاکتری در نقـاط مختلف جهان به عنوان عامل مـسمومیت غـذایی گـزارش شـده است. اسپور باکتری معمولاً در حبوبات، سـبوس گنـدم، بـرنج، شیر، گوشت پخته، سوسیس، سـوپ، سـبزیجات، مـرغ و سـایر مواد غذایی وجود دارد. مسمومیت غـذایی ناشـی از باسـیلوس، ناگهانی اتفاق می افتد و از نشانه‌های آن حالت تهـوع اسـهال و استفراغ می‌باشد که ۱۰ دقیقه تا ٤ ساعت بعد از مواجه شدن بـا باکتری بروز می‌کند (۳). علت انتخاب باسیلوس سوبتی لیس بـه واسطه‌ی مقاومـت بـسیار بـالای آن در محـیط‌هـای مختلـف و بیماریزای فرصت طلب بودن آن می‌باشـد. از طرفـی مطالعـات، نشان داده که کلرلا ولگاریس بر اکثر باکتری‌های بیماریزا تاثیر معنی‌داری نشان داده است(۲).

با توجه به نقش مهم جلبک‌ها در کنترل باکتری‌های بیماریزا، تحقیقات وسیعی بر روی گونه‌های مختلفی از آن‌ها انجام شده است. این تحقیق با هدف شناخت خواص مهار کننده‌ی عصاره‌ی جلبک *Chlorella volgaris* علیه باکتری *Bacillus subtilis* سویه PTCC1156 انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانیزم‌ها

جلبک *Chlorella vulgaris* از پژوهشکده‌ی اکولوژی دریای خزر تهیه و نسبت به کشت آن اقدام گردید. جلبک در محیط (Tang Kang Marine Research Lab)(TMRL)که ترکیبی از املاح معدنی و ازت به عنوان منبع نیتروژن می‌باشد در شرایط دمای۲±۲۷ درجه‌ی سانتیگراد و ۳۰۰۰ لوکس روشنایی(با تناوب ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در طول زمان،) کشت داده شد و هوادهی به طور منظم انجام گردید. پس از ۱۵ روز، جلبک‌ها برداشت شدند. pH محیط کشت ٦/٨ تا ۷/۲ بود.

آمپـول‌هـای لیـوفیلیزه بـاکتری *Bacillus subtilis* سـویه PTCC1156 در شرایط آسپتیک بـاز و بـه محـیط (TSB) Tryptic Soya broth انتقـال و بـه مـدت ۱۸ سـاعت در ۳۵°C انکوبه شد. جهت بررسی اثرات ضـد میکروبـی هـر بـار کشت تازه ٢٤ ساعته تهیه گردید. با استفاده از پیپت اسـتریل بـه مقدار لازم از محیط کشت تازه‌ی ٢٤ ساعته به لوله‌هـای حـاوی محیط کشت TSB انتقال داده و سـپس کـدورت سوسپانـسیون میکروبی تهیه شـده بـا اسـتفاده از محلـول ۰/۵ اسـتاندارد مـک فارلند برابر با حدود CFU/ml ۱/۵×۱۰۸ تنظیم گردید.

۲-۲- عصاره‌گیری

جلبک‌ها پس از برداشت، توسـط سـانتریفوژ (KOKUSAN (H-103NR)) در دور g ۳٤۲۷ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس به نسبت ۵ گرم در۱۰۰ میلی لیتر حلال اتـانول و استن (Merck) حل شده و در دسـتگاه سوکـسله (Soxhlet extraction appartus)به مدت ۱-۲ ساعت قرار داده شدند. تغلیظ عصاره‌ها با استفاده از دسـتگاه تبخیـر کننـده چرخـان در خـلا(Rotary evaporator ، Buchi 464) و در دمـای حدود ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد (۱۰). سپس رقـت‌هـای µg/ mL (۰/۳، ۰/٦، ۰/۹، ۱/۵، ۳، ٦، ۹ و ۱۲) جهت ارزیابی

اثرات ضد میکروبی در نظر گرفته شدند.

۲-۳- آزمایش‌های باکتری شناسی

ارزیابی اثرات مهارکننده جلبک در دو محیط Agar و Broth انجام شد.

۲-۳-۱- روش انتشار دیسک[1]: جهت تهیه‌ی دیسک‌های مورد آزمایش، هر دیسک با µL ۲۰ از عصاره‌های تهیه شده با غلظت‌های تعیین شده از هر جلبک، اشباع گردید. در هر سری آزمایش یک دیسک حاوی µl ۲۰ حلال اتانول و استون به عنوان کنترل منفی و برای کنترل مثبت دیسک‌های حاوی تتراسایکلین (µg/ mL)(۳۰)، نیتروفورانتوین (µg/mL) ۳۰۰ پنی‌سیلین (µg/mL) ۱۰ به عنوان آنتی بیوتیک‌های استاندارد به کار برده شدند. دیسک‌های حاوی مقدار مشخص و استاندارد آنتی بیوتیک روی محیط کشت TSA که باکتری مورد نظر روی آن کشت شده بود قرار داده شد. این عمل، باعث نفوذ آنتی بیوتیک در آگار می‌شود. هر چه باکتری نسبت به آنتی بیوتیک حساس تر باشد و غلظت‌های کم تر آنتی بیوتیک قابلیت ممانعت از رشد باکتری را داشته باشد، قطرهاله عدم رشد بیش تر می شود. پلیت‌ها را در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۶-۱۸ قرار داده و پس از آن با استفاده از خط‌کش دقیق، قطرهاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد(۱۱).

۲-۳-۲- روش رقت لوله‌ای[2]: با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) به دست آمد. برای تعیین MIC، برای هر عصاره از یک سری ۱۰ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. لوله‌ها با رقت‌های متفاوتی از عصاره‌ی جلبک به همراه ml ۱ از سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت TSB آماده شد و یک لوله‌ی حاوی ml ۹ محیط کشت به علاوه ml ۱ از سوسپانسیون باکتری به عنوان کنترل تهیه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون لوله‌ها، مراحل مختلف رشد باکتری با اضافه نمودن مقدار مشخصی از عصاره‌ی جلبک به محیط کشت (TSB)، از طریق دستگاه اسپکتروفتومتری UV/visible در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد مطالعه قرار گرفت. میزان رشد باکتری در فواصل زمانی ٤ ساعت در سه تکرار بررسی شد (۱۳،٤ و ۱٤).

۲-٤- آنالیز آماری:

نتایج کمی حاصل از دو روش سنجش اثر عصاره‌ها به طور جداگانه (برای هر روش) با استفاده از نرم افزار SPSS 13 و تست آنالیز واریانس یک طرفه مورد مقایسه قرار گرفته و در نهایت با استفاده ازآزمون LSD، معنی دار بودن داده‌ها در درون گره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

نتایج، نشان داد که عصاره‌ی اتانولی جلبک کلرلا ولگاریس در غلظت µg/ml ۱۲ باعث کاهش معنی دار رشد باسیلوس سوبتی لیس می گردد ($P<0.01$). رشد باکتری در غلظت‌های کم تر از µg/ml ۱۲ عصاره‌ی اتانولی کلرلا، در مقایسه با کنترل، تغییر محسوسی از خود نشان نداده است (جدول و شکل ۱) .

مطابق جدول و شکل ۲، عصاره‌ی استنی جلبک کلرلا ولگاریس نیز توانست در غلظت µg/ml ۳ رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس را کاهش دهد($P<0.01$).

عصاره‌ی استونی کلرلا ولگاریس با غلظت µg/ml ۳، دارای قطرهاله عدم رشدی برابر با mm ۰/۷۵±۱٤/۲ علیه باکتری باسیلوس سوبتی لیس بود. در ضمن، عصاره‌ی اتانولی آن هم با غلظت µg/ml ۱۲ وهاله عدم رشد mm ۰/۹۲±۱۰/۵٦، علیه رشد این باکتری فعال بود.

مرگ و میر ناشی از عوامل میکروبی و افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها، بشر را بر آن داشته تا به فکر راه‌های مقابله با این میکروارگانیزم‌ها برآید. یکی از این راه‌ها، مواد استخراج شده از گیاهان و جلبک‌هاست که به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی و جایگزین داروهای سنتتیک مطرح می‌باشند.

Lai و همکاران (۲۰۰٤) آزمایشی روی گونه‌ای از کلرلا به نام *Chlorella pyrenoidosa* انجام داده، متوجه شدند که عصاره‌ی اتانولی این جلبک از رشد باکتری *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* ممانعت می‌کند. Minimum inhibitory concentration (MIC) عصاره‌ی اتانولی این جلبک برای *Bacillus subtilis*، ۳۹/۱ میکروگرم ماده‌ی خشک بود.

1- Disk Diffushon Method
2- Micro Dilution Method

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار جذب نوری سوسپانسیون باسیلوس سوبتی لیس در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی جلبک کلرلا در طی ۲٤ ساعت

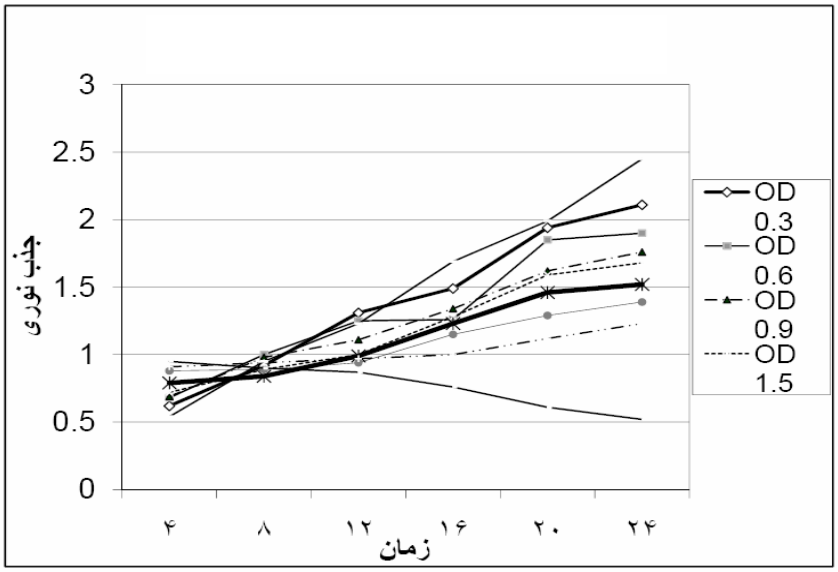
زمان (ساعت)	غلظت(µg/ mL)								
	۰/۳	۰/۶	۰/۹	۱/۵	۳	۶	۹	۱۲*	شاهد Δ
۴	۰/۶۰±۰/۰۱	۰/۶۶± ۰/۰۱	۰/۶۷± ۰/۰۱	۰/۷۱± ۰/۰۱	۰/۷۵± ۰/۰۴	۰/۸۶± ۰/۰۱	۰/۹۱± ۰/۰۰	۰/۹۴± ۰/۰۰	۰/۵۳± ۰/۰۱
۸	۰/۹۱±۰/۰۰	۱/۰۱± ۱/۰۱	۰/۹۶± ۰/۰۱	۰/۸۸± ۰/۰۱	۰/۸۲± ۰/۰۱	۰/۸۹± ۰/۰۰	۰/۹۶± ۰/۰۲	۰/۹۰± ۰/۰۰	۰/۹۲± ۰/۰۲
۱۲	۱/۲۹±./۰۲	۱/۲۳± ۰/۰۲	۱/۱۰± ۰/۰۰	۱/۰۵± ۰/۰۴	۰/۹۷± ۰/۰۲	۰/۹۷± ۰/۰۲	۱/۰۲± ۰/۰۵	۰/۸۶± ۰/۰۱	۱/۲۱± ۰/۰۱
۱۶	۱/۴۶±۰/۰۳	۱/۲۴± ۰/۰۲	۱/۳۱± ۰/۰۲	۱/۲۴± ۰/۰۳	۱/۲۱± ۰/۰۱	۱/۱۶± ۰/۰۲	۱/۰۶± ۰/۰۵	۰/۷۳± ۰/۰۲	۱/۲۵± ۰/۰۲
۲۰	۱/۹۴±۰/۰۳	۱/۸۰± ۰/۰۳	۱/۵۹± ۰/۰۲	۱/۴۹± ۰/۰۹	۱/۴۰± ۰/۰۴	۱/۲۹± ۰/۰۱	۱/۱۴± ۰/۰۵	۰/۶۱± ۰/۰۱	۱/۹۷± ۰/۰۱
۲۴	۲/۱۰±۰/۰۰	۱/۸۳± ۰/۰۵	۱/۷۰± ۰/۰۴	۱/۷۰± ۰/۰۸	۱/۴۹± ۰/۰۲	۱/۳۹± ۰/۰۱	۱/۲۵± ۰/۰۵	۰/۵۲± ۰	۲/۳۸± ۰/۰۷

Δ محیط کشت TSB + سوسپانسیون میکروبی(داده‌های ستونی که با* مشخص شده اند با بقیه‌ی داده‌ها در ستون‌های دیگر اختلاف آماری دارند $P<0.01$)).

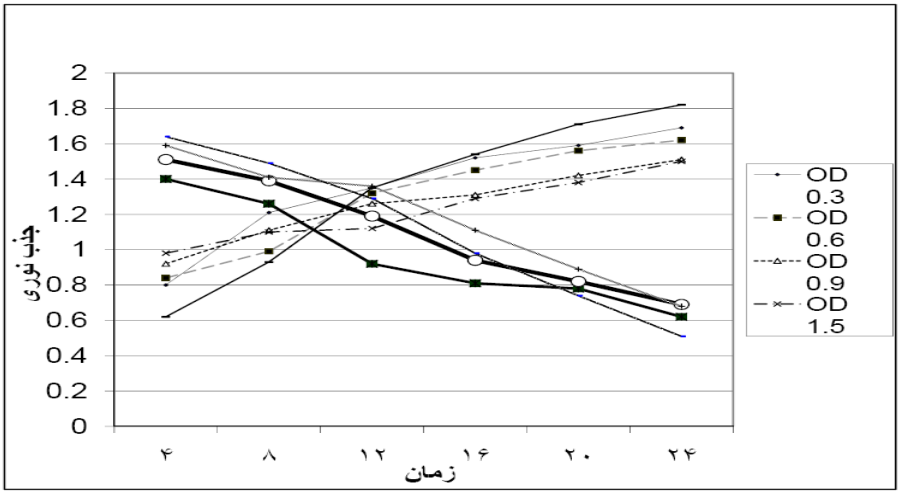
جدول۲- میانگین و انحراف معیار جذب نوری سوسپانسیون باسیلوس سوبتی لیس در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی استونی جلبک کلرلا در طی ۲٤ساعت

زمان (ساعت)	غلظت(µg/ mL)								
	۰/۳	۰/۶	۰/۹	۱/۵	۳	۶	۹	۱۲*	شاهد Δ
۴	۰/۷۸±۰/۰۱	۰/۸۲± ۰/۰۱	۰/۹۲± ۰/۰۱	۰/۹۷± ۰/۰۱	۱/۴۱± ۰/۰۳	۱/۴۹± ۰/۰۱	۱/۵۶± ۰/۰۳	۱/۶۲± ۰/۰۱	۰/۶۰± ۰/۰۱
۸	۱/۲۰±۰۰/۰	۱/۰۰± ۰/۰۱	۱/۱۱± ۰/۰۱	۱/۱± ۰/۰۱	۱/۲۶± ۰۰/۰	۱/۳۷± ۰/۰۱	۱/۴۰± ۰/۰۰	۱/۴۴± ۰/۰۴	۰/۹۴± ۰/۰۱
۱۲	۱/۳۵±۰/۰۳	۱/۲۹± ۰/۰۲	۱/۲۲± ۰/۰۳	۱/۱۳± ۰/۰۳	۰/۹۲± ۰/۰۱	۱/۱۸± ۰/۰۱	۱/۳۴± ۰/۰۲	۱/۲۳± ۰/۰۵	۱/۳۲± ۰/۰۲
۱۶	۱/۵۰±۰/۰۱	۱/۴۱± ۰/۰۳	۱/۲۸±۰/۰۲	۱/۲۶± ۰/۰۲	۰/۸۵±۰/۰۳	۰/۹۲± ۰/۰۱	۱/۱۰± ۰/۰۰	۰/۹۴± ۰/۰۳	۱/۴۹± ۰/۰۴
۲۰	۱/۵۹±۰/۰۲	۱/۵۳± ۰/۰۲	۱/۴۱± ۰/۰۳	۱/۳۹± ۰/۰۱	۰/۷۸± ۰۰/۰	۰/۸۵± ۰/۰۲	۰/۸۷± ۰/۰۲	۰/۷۲± ۰/۰۱	۱/۶۴± ۰/۰۶
۲۴	۱/۶۹±۰/۰۲	۱/۶۲± ۰/۰۲	۱/۴۹± ۰/۰۱	۱/۵۰± ۰/۰۲	۰/۵۹± ۰/۰۲	۰/۶۴± ۰/۰۴	۰/۶۸± ۰/۰۳	۰/۵± ۰۰/۰	۱/۷۹± ۰/۰۲

Δ محیط کشت TSB + سوسپانسیون میکروبی(داده‌های ستون‌هایی که با* مشخص شده اند با بقیه‌ی داده‌ها در ستون‌های دیگر اختلاف آماری دارند ($P<0.01$)).



شکل۱ - نمودار رشد باکتری *باسیلوس سوبتی لیس* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اتانولی جلبک *کلرلا* در طی ۲۴ ساعت بررسی



شکل۲ - نمودار رشد باکتری *باسیلوس سوبتی لیس* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف *عصاره‌ی استنی جلبک کلرلا* در طی ۲۴ ساعت بررسی

در تحقیق حاضر، خواص ممانعت کنندگی از رشد *Chlorella vulgaris* بر *Bacillus subtilis* مورد بررسی قرار گرفته، برای انجام این کار از دو روش انتشار دیسک و رقت لوله‌ای استفاده شد. نتایج، نشان داد که *Chlorella vulgaris* همانند *Chlorella pyrenoidosa* دارای خواص مذکور می‌باشد. MIC برای عصاره‌ی اتانولی کلرلا ولگاریس، µg ۱۲ به دست آمد که نشان می دهد کلرلا ولگاریس دارای خواص مهار کنندگی رشد قوی‌تری نسبت به کلرلا پیرنوئیدوزا علیه باکتری باسیلوس سوبتیلیس می باشد. هم‌چنین طبق نتایج، عصاره‌ی استونی کلرلا ولگاریس دارای خواص ضد باکتری قوی تری نسبت به عصاره‌ی اتانولی است. این نتیجه، مربوط به کلرلا ولگاریس است که ممکن است در مورد کلرلا پیرنوئیدوزا هم صدق کند.

Katircioglu و همکاران (۲۰۰۶)، تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌ی اتانولی جلبک *Chrococcus sp.* را علیه *Bacillus subtilis* ATCC 6633 بررسی کردند. کم ترین غلظت مهارکننده رشد ۰/۱٤ mg/ml به دست آمد. در همین تحقیق، تأثیر مهارکنندگی رشد جلبک *Synechocystis aquatilis* روی باکتری *Bacillus subtilis* بررسی شد و MIC این جلبک ۰/۱۷ mg/ml به دست آمد. در مقایسه با تأثیر کلرلا ولگاریس روی باکتری باسیلوس سوبتیلس در تحقیق حاضر به خاصیت آنتی باکتریایی قوی تر این جلبک پی می بریم.

Venkatesan و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقاتی که روی خواص ضد باکتری *Rhizosolenia alata* انجام دادند از حلال‌های استن، کلروفرم، کلروفرم: متانول (۱:۱)، متانول: آب مقطر (۱:٤) و آب مقطر، در عصاره‌گیری استفاده کردند. نتایج، نشان داد که همه حلال‌های آلی مورد استفاده علیه پاتوژن‌ها از خود فعالیت نشان می‌دهند. اما بیش ترین فعالیت در عصاره‌ی کلروفرمی علیه *Proteus vulgaris* و کم ترین آن در عصاره‌ی کلروفرم: متانول علیه *Staphylococcus aureus* مشاهده شد و فعالیتی در عصاره‌ی آب مقطر دیده نشد.

Febles و همکاران (۱۹۹٤) نیز در مطالعات خود روی تأثیر ضد باکتریایی جلبک‌های موجود در سواحل جزایر قناری، از ۳ حلال متفاوت n-هگزان، اتیل استات و متانول برای عصاره‌گیری استفاده کردند و مشاهده کردند که عصاره‌ی متانول بیش ترین فعالیت ضد میکروبی را از خود نشان می‌دهد.

تأثیر نوع حلال در عصاره گیری جلبک روی میزان خواص ضد میکروبی گیاه در تحقیق Rania و همکاران (۲۰۰۸) نیز به خوبی مشهود است. آن‌ها ۳ گونه سیانوباکتری *Anabaena oryzae*، *Spirulina platen*، *Tolypothrx ceitonica* و سه میکروآلگ *Chlorella pyrenoidosa*، *Scenedesmus quadricauda* را با ٤ حلال متانول، دی اتیل اتر، استون و اتانول عصاره گیری کردند. عصاره‌ی جلبک‌ها علیه باکتری *Bacillus subtilis* فعال بود. عصاره‌های مختلف کلرلا به ترتیب هاله‌های عدم رشدی معادل ۱۵، ۲۵، ۲۵ و ۲۰ میلی متر و عصاره‌های سندسموس‌هاله‌های عدم رشد معادل ۳۰، ٤۰، ۲۵ و ۲۰ میلی متر تشکیل دادند. مشاهده می شود که عصاره‌ی استونی تاثیر قوی تری نسبت به عصاره‌ی اتانولی دارد. در تحقیق حاضر نیز حلال‌های استونی و اتانولی موجب تفاوت در خواص ضد میکروبی جلبک شده‌اند. شاید علت آن طبیعت قطبی ترکیبات ضدمیکروبی جلبک و خاصیت قطبی تر استون نسبت به اتانول باشد.

دیگر محققین نیز به حساسیت‌های متفاوت گونه‌های باکتریایی و قارچی علیه ماده‌ی ضدمیکروبی اشاره کرده‌اند. احتمالاً تفاوت حساسیت میکروارگانیزم‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیزم‌ها می‌باشد.

باکتری *Bacillus subtilis* از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشند که برخلاف باکتری‌های گرم منفی دیواره‌ی سلولی چند لایه ندارند که این خود می تواند سبب شود که ترکیبات فعال به آسانی در آن نفوذ کنند. باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه‌ی چربی در لایه‌ی بیرونی نفوذناپذیرتر هستند (Ordog و همکاران، ۲۰۰٤).

در تحقیقی که Yolanda (۲۰۰٤) انجام دادند خواص مهارکنندگی رشد ۱۰ گونه از جلبک‌های سبز و ۹ گونه جلبک قرمز علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی و مشاهده شد که اکثر گونه‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت فعالند. برای مثال در تحقیق Rania (۲۰۰۸) عصاره‌ی اتیل‌استاتی جلبک *Trichodesmium erythraeum* علیه باکتری B *subtilis* . هاله عدم رشد مساوی با ۱۱ mm تشکیل داد، در صورتی که نسبت به باکتری E. coli که یک باکتری گرم منفی می‌باشد، غیرفعال بود.

باکتری باسیلوس سوبتیلیس نسبت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوین حساسیت بیش‌تری از خود نشان داد. بعد از نیتروفورانتوین عصاره‌های استونی و اتانولی کلرلا بیش ترین‌هاله عدم رشد را تشکیل دادند. این تاثیر مهارکنندگی را در هر دو عصاره‌ی استونی و اتانولی کلرلا می بینیم با این تفاوت که عصاره‌ی استونی، خواص مهارکنندگی قوی‌تری از خود نشان داد.

٤- نتیجه گیری

جلبک کلرلا دارای خواص مهارکنندگی رشد خوبی علیه باکتری *Bacillus subtilis* بوده و استفاده از حلال استونی در عصاره‌گیری سبب افزایش اثر مهار کنندگی و کاهش MIC در جلبک مربوطه می‌شود.

٥- منابع

۱- ادیب فر پ.، ۱۳۷۵: میکروب شناسی پزشکی، انتشارات نشریران، چاپ چهارم، قم: ص.۸۰۲ .

۲- صفری ر، ۱۳۸۳: تاثیر کلرلا ولگاریس بر برخی از باکتری‌های بیماریزا و مولد مسمومیت غذایی. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر.

3-Apetroaie-Constantin,C., Mikkola, R., Andersson, M.A.,Teplova, V., Suominen, I.,Johansson, M. 2009. Bacillus subtilis and B.mojavensis strains; Connected to food poisoning produce the heat stable toxin amylosin, *Applied Microbiology*,Vol.106(6):1976-1985.

4-Cornu, M., Delignett,P.,Muller, ML and Flandrois, J.P.,1999.Charecterization of unexpected growth of *Escherichia coli*0157:H7 by modeling, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.65(12):5322-5327.

5- Febles, C. I., Arias, A., Hardisson, A., Sierra López , A and Gil-Rodríguez, M. C., 1994. Antimicrobial activity of extracts from some Canary species of *Phaeophyta* and *Chlorophyta, Phytotheraphy Research*, Vol. 9 (5): 385-387.

6-Katircioglu H., Beyatii Y., Aslim B., Yuksekdag Z and Atici T.,2006. Screening for Antimicrobial Agent production of some Microalgae in Fresh water, *The International Journal of Microbiology*,Vol.2(2).

7- Lai Shan,Y., Yao Chu, C., Chun Wei, T and Ping Lin, L.,2004. Antibacterial Activity of Chlorella Pyrenoidosa Extracts, *Journal of Applied Phycology*,Vol.42(3):224-230.

8-Noaman, N.H., Fattah, A., Khaleafa, M and Zaky, S.H., 2004. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*, *Microbiological Research*, V.159: 395-402.

9-Ordog, V., Stirk ,R., Lenobel, M., Bancirova, M., Strand, J., Vanstanden, W.,2004.Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites, J. *Applied phycol.*,Vol.16 309-314.

10-Premila, J., Ravirajar, N. S. and Sridhar, K. R.1997.Antimicrobial activity of some marine Algae of southwest of India, *Indian of Marine Sciences,*Vol.26(2):201-205.

11-Qstensvik, Q., Skulberg, O. M., Underdal, B and Hormazabal., 1997. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria –acomparative study of bacterial bioassays, *Applied Microbiology*, Vol. 84 (12): 1117-1124.

12-Rania M.,Abedinhala A and Taha M., 2008.Antibacterial and Antifungal Activity of Cyanobacteria and Green Microalgae ,Global *Journal of Biotechnology and Biochemistry*,Vol.3(1):22-31.

13-Rohde, J., Kessler, M., Amtsberg, C. and Amtsberg, G., 2004.Comparison of methods for antimicrobial suscebtibility testing and MIC values for pleuromitilin drugs for *brachyspira hodysenteriae* isolated in Germany, *Veterinary Microbiology,*Vol. 102 (1-2): 25-32.

14-Smith, RP., Baltch, AL., Michelsen, PB., Ritz, WJ and Alteri, R.,2003.Use of the microbial growth curve in postantibiotic effect studies of *Legionella pneumophila*, *Amtimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.47(3):1081-1087

15-Taskin, E., Ozturk, E and Kurt, O., 2007. Antibacterial activities of some Marine algae from the Aegean Sea(Turkey), *African Journal of Biotechnology,* Vol. 6 (24): 2746-2751.

16-Venkatesan, R., Karthikayen, R., Priyanayagi, R., Ssikala, v and Balasubramanian, T., 2007:Antibacterial Activity of the Marine Diatom, *Journal of Microbiology*, Vol. 2 (1): 98-100.

17-Yolanda, F., Pelegrin J and Juan luis M., 2004.Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan , Mexico, *Botanica marina,* Vol.(47):140-146.