فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۹۵

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella* sp. رشد یافته در شرایط اتوتروفیک

احمد مشهدی‌نژاد[۱]، حجت‌اله زمانی[۲]*، جنت سرمد[۲]

تاریخ دریافت: اسفند ۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۵

چکیده

با توجه به افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به دارو در میان انواع میکروارگانیزم‌ها، یک جستجوی جهانی برای یافتن ترکیبات ضدمیکروبی از مواد طبیعی که اثرات جانبی کم‌تری داشته باشد مورد توجه پژوهشگران بوده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella* sp. رشد یافته در شرایط اتوتروفیک انجام پذیرفت. جلبک کلرلا در محیط کشت مایع Zinder کشت داده شد و در پایان فاز لگاریتمی زیست‌توده آن برداشت شد. سپس عصاره‌گیری از آن توسط حلال‌های استون، کلروفرم، هگزان، اتیل استات و استون- هگزان انجام شد و فعالیت ضدمیکروبی آن بر روی دو باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*)، دو باکتری گرم منفی (*Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*) و یک گونه قارچ (*Candida albicans*) مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های حاصل از طریق سنجش قطر هاله عدم رشد باکتری به روش نفوذ چاهک تعیین شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی ریزجلبک *Chlorella* از بالاترین قدرت ضدمیکروبی در مقایسه با سایر عصاره‌ها برخوردار است. درنتیجه عصاره ریزجلبک *Chlorella* از فعالیت ضدمیکروبی مناسبی برخوردار بوده و نوع حلال مورد استفاده نیز در میزان فعالیت ضدمیکروبی آن تأثیرگذار است.

واژگان کلیدی: *عصاره اتیل استاتی*، Chlorella، *عصاره کلروفرمی*.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استادیارگروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: h_zamani@guilan.ac.ir

مقدمه

امروزه افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های بیماری‌زا رو به افزایش است. مصرف بیش‌ازحد دارو و استفاده نادرست از داروهای آنتی‌بیوتیک موجب افزایش و گسترش مقاومت در باکتری‌ها شده است (Perry et al., 2002). به علت نگرانی روزافزون جهانی درباره افزایش هشدار دهنده عفونت‌های حاصل از میکروارگانیزم‌هایی که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند، در سال‌های اخیر پژوهش در زمینه ترکیبات طبیعی دارای فعالیت ضدمیکروبی از اهمیت زیادی برخوردار بوده است. در سه دهه گذشته، پژوهشگران علاقه زیادی به محصولات طبیعی استخراج شده از گیاهان نشان داده‌اند و در زمینه یافتن عوامل جدید ضدمیکروبی طبیعی تلاش‌های زیادی صورت پذیرفته است (Mala et al., 2009). جلبک‌ها به عنوان منابع ترکیبات فعال زیستی از دیرباز مورد توجه و بررسی قرار گرفته‌اند (Pratt et al., 1944). در این راستا مواد مختلفی مثل اسیدهای آمینه، ترپنوئیدها، فلوروتانن‌ها، آلکان‌ها، کتون‌های هالوژنه، ترکیبات استروئیدی، پلی‌سولفیدهای حلقوی، اسیدهای چرب، فنل‌ها و غیره از جلبک‌ها به دست آمدند که برخی از آن‌ها از فعالیت ضدمیکروبی مناسبی برخوردار بوده‌اند (Mtolera and Semesi, 1996). ریزجلبک‌ها منابع زیستی هستند که طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست‌فناوری را به خود اختصاص داده‌اند. تعداد گونه‌های جلبک‌ها، که اکثر آن‌ها ریزجلبک هستند، یک تا ده میلیون تخمین زده می‌شود (Chu, 2012). ریزجلبک‌ها گروهی از میکروارگانیزم‌های ساده یک یا چند سلولی هستند که توانایی بالقوه‌ای در تثبیت کربن دی‌اکسید دارند (Wigmosta et al., 2011). جلبک *Chlorella* یکی از مشهورترین ریزجلبک‌ها است. این جلبک، کروی شکل بوده و دارای دیواره نسبتاً نازک و کلروپلاست بزرگ فنجانی شکل است. تولیدمثل در *Chlorella* بسیار ساده و از طریق تولیدمثل غیرجنسی است (Kerem et al., 2008). این جلبک میکروسکپی با قطر ۲ تا ۱۰ میکرومتر ساکن آب‌های شیرین است. جلبک *Chlorella* مشابه گیاهان از فعال‌ترین موجودات فتوسنتز کننده بوده و دارای کلروفیل با تراکم بالا است. ریزجلبک *Chlorella* با توجه به میزان پروتئین (٪۵۸-۵۱ وزن خشک)، کاروتنوئیدها و طیف گسترده‌ای از ویتامین‌ها دارای ارزش غذایی بالایی است. این ریزجلبک دارای

تأثیرات مفید دیگر در مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش چربی خون است. محصولات اضافی *Chlorella* که «فاکتور رشد کلرلا» نامیده می‌شود در بهبود رشد باکتری‌های لاکتیکی کاربرد دارد. همچنین *Chlorella* دارای خواص دارویی از جمله ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدسرطانی است (Chu, 2012). به عنوان مثال می‌توان از آنتی‌بیوتیک Chlorellin نام برد که از جلبک *Chlorella* استخراج می‌شود (Taskin et al., 2007). Priya (۲۰۱۲) طی مطالعات خود درباره عصاره‌های *Chlorella* نشان داد که خواص ضدباکتریایی این جلبک می‌تواند به دلیل کاروتنوئیدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده در عصاره آن باشد. این در حالی است که Pratt و همکاران (۱۹۴۴) خاصیت ضدمیکروبی *Chlorella* را به مخلوطی از اسیدهای چرب ۱۸ کربنه نسبت دادند که علاوه بر خاصیت ضدباکتری، اثرات دگرآسیبی (Allelopathy) نیز دارد. بخشی از خواص درمانی *Chlorella* در بدن مربوط به مقدار زیاد کلروفیل، ساختمان دیواره سلولی و به ویژه مواد تشکیل دهنده دیواره سلولی است. این جلبک سلامتی و قدرت دفاعی بدن را بهبود می‌بخشد. از عصاره *Chlorella* در تهیه لوازم آرایشی، بهداشتی و با توجه به پلی ساکاریدهای موجود در آن، در داروسازی استفاده می‌شود (Kerem et al., 2008; Hinder et al., 2011; Rasoul-Amini et al., 2014). این پژوهش با هدف بررسی تأثیر حلال‌های مختلف (استون، کلروفرم، اتیل استات، هگزان و استون- هگزان) بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره ریزجلبک *Chlorella* sp. در برابر چهار گونه باکتری و یک گونه قارچی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی ریزجلبک *Chlorella* sp.

جلبک سبز تک سلولی *Chlorella* sp. از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری واقع در شهرستان رشت (استان گیلان) تهیه شد. به منظور خالص‌سازی، ابتدا کشت مجدد استوک *Chlorella* بر روی محیط کشت جامد Zinder و سپس چندین بار بر روی محیط کشت مایع Zinder به شرح زیر انجام پذیرفت.

کشت مقدماتی ریزجلبک در محیط کشت جامد

ابتدا محیط کشت Zinder (Z-8+N) تهیه شد که شامل عناصر $NaNO_3$ (۱g/L)،

$Ca(NO_3)2.4H_2O$ (۰/۶۲۵ g/L)، $Mg(SO_4).7H_2O$ (۰/۵ g/L)، KH_2PO_4 (۰/۰۷۵ g/L)، Na_2CO_3 (۰/۱ g/L)، $FeCl_3.6H_2O$ (۰/۰۰۵ g/L)، $EDTA.Na_2$ (۰/۰۱ g/L)، KBr (۰/۰۳ g/L)، $(NH_4)_6Mo_7O_{24}+4H_2O$ (۰/۰۰۸ g/L)، KI (۰/۰۳ g/L)، $MnCl_2+4H_2O$ (۰/۰۰۱ g/L)، $Na2SiO_3.9H_2O$ (۰/۰۰۱ g/L)، $Ca(NO_3)_2.6H_2O$ (۰/۱ g/L)، $2Ca(SO_4).$ $5H_2O$ (۰/۰۰۸ g/L)، $AL_2(SO_4)_3.18H_2O$ (۰/۵۵۶ g/L) و $H_3BO_3.H_2O$ (۰/۱۹ g/L) بود. سپس قبل از اتوکلاو، ۱/۵ درصد آگار به محیط کشت اضافه شد (Wegmann et al., 1971). پس از استریل‌سازی و قبل از سرد شدن، محیط کشت به داخل لوله آزمایش استریل ریخته شد و ریزجلبک *Chlorella* sp. در کنار شعله روی آن کشت داده شد. به منظور کاهش میزان تبخیر و جلوگیری از نفوذ آلودگی، در لوله‌ها با پارافیلم مسدود شد. لوله‌های حاوی محیط کشت برای رشد جلبک به اتاقک کشت منتقل شدند.

کشت مقدماتی ریزجلبک در محیط کشت مایع

کشت مایع ریزجلبک در محیط کشت Zinder (Z-8+N) انجام شد. pH محیط در محدوده ۷-۶/۸ تنظیم شد و جهت حذف آلودگی‌های میکروبی و قارچی، محیط کشت مورد نظر با استفاده از دستگاه اتوکلاو در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. پس از این مرحله، انتقال به درون ارلن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری در شرایط استریل انجام گرفت. به این ترتیب که به ازای هر ۷۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی که در مرحله لگاریتمی رشد قرار داشتند اضافه شد. پس از تلقیح، به منظور جلوگیری از نفوذ آلودگی و تبخیر، در ارلن با فویل و پارافیلم مسدود شد.

کشت انبوه ریزجلبک *Chlorella* sp.

برای کشت انبوه ریزجلبک از اتاقک کشت استفاده شد. بدین صورت که ابتدا نمونه خالص‌شده در محیط کشت Zinder و در ظرف‌های یک لیتری کشت داده شد. سپس برای کشت انبوه به ظرف‌های پنج لیتری انتقال داده شد. نمونه‌ها در شرایط پایه با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی تحت شرایط هوادهی قرار گرفتند. برای نوردهی از لامپ‌های فلورسنت (مهتابی) و

همگن ساختن محیط از لوله و پمپ هوا استفاده شد.

میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل دو سویه باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* 6538 و *Bacillus subtilis* 6051، دو سویه باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 و *Escherichia coli* ATCC 8739 و یک سویه قارچ *Candida albicans* 10231 بودند که از بانک میکروارگانیزم‌های مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و در محیط کشت نوترینت آگار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

عصاره‌گیری

توده سلولی ریزجلبک *Chlorella* بعد از قرارگیری در پایان فاز لگاریتمی توسط سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه جداسازی شد. سپس توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی، لیوفیلیزه شد. سپس به میزان ۵ گرم جلبک در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال‌های مختلف شامل استون، کلروفرم، اتیل استات، هگزان و استون- هگزان (V/V ۱:۲) به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (Misonix Sonicator 3000، آمریکا)، تحت اثر فرکانس ۲۰-۵۰KHz قرار گرفت تا دیواره ضخیم ریزجلبک کاملاً شکسته شود. سپس با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد و محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن No.1، فیلتر شد. عصاره حاصل در دستگاه روتاری (Rotary Evaporator DV-42N-250، چین) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Patil et al., 2011; Salehi et al., 2012). در انتخاب حلال‌ها سعی بر آن شد تا آن‌ها قطبیت و خواص فیزیکوشیمیایی متفاوت و متناسب با نوع ترکیبات مورد استخراج داشته و خودشان فاقد فعالیت ضدمیکروبی باشند که بر این ویژگی با به کارگیری حلال‌ها به عنوان شاهد منفی، صحه‌گذاری شد.

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella*- روش انتشار چاهک

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella* sp. در برابر گونه‌های

بیماری‌زا از طریق سنجش قطر هاله عدم رشد باکتری و به روش نفوذ چاهک (Well Diffusion) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش پس از آماده کردن سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند (معادل $۵/۱\times۱۰^{۸}$CFU/mL)، با استفاده از سوآپ استریل بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت یکنواختی از باکتری‌ها انجام گرفت. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل در سطح محیط کشت ایجاد شد. کف چاهک‌ها با استفاده از ۲۰ میکرو لیتر محیط کشت ذوب شده پوشانده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال قرار گرفتند. سپس ۵۰ میکرو لیتر از هر یک از عصاره‌های مختلف تهیه شده در چاهک مربوطه ریخته شد و پلیت‌ها به انکوباتور منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که مدت گرماگذاری سویه قارچی ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد. پس از این مدت با اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد، میزان حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های مختلف مورد سنجش قرار گرفت. به عنوان شاهد منفی، از حلال‌های عصاره‌گیری به تنهایی و برای شاهد مثبت نتایج آزمون حساسیت ضدباکتریایی و ضدقارچی به ترتیب از آنتی‌بیوتیک‌های تجاری کلرامفنیکل و نیستاتین استفاده شد (CLSI, 2012).

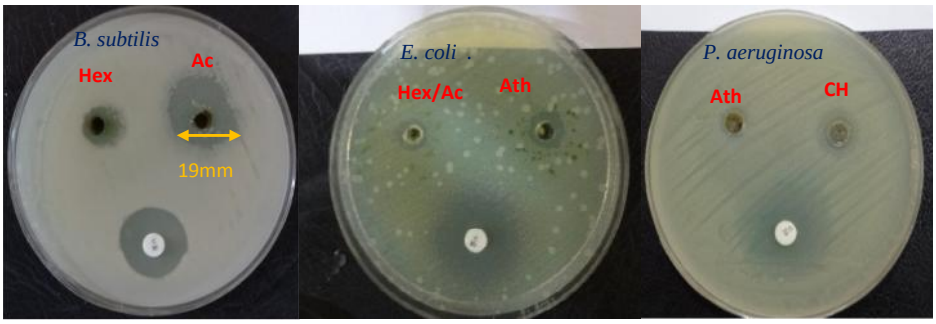
آنالیز آماری

به منظور مقایسه اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف علیه میکروارگانیزم‌های مورد بررسی، آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. از نرم افزار SPSS 18 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون LSD برای بررسی اختلافات بین میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

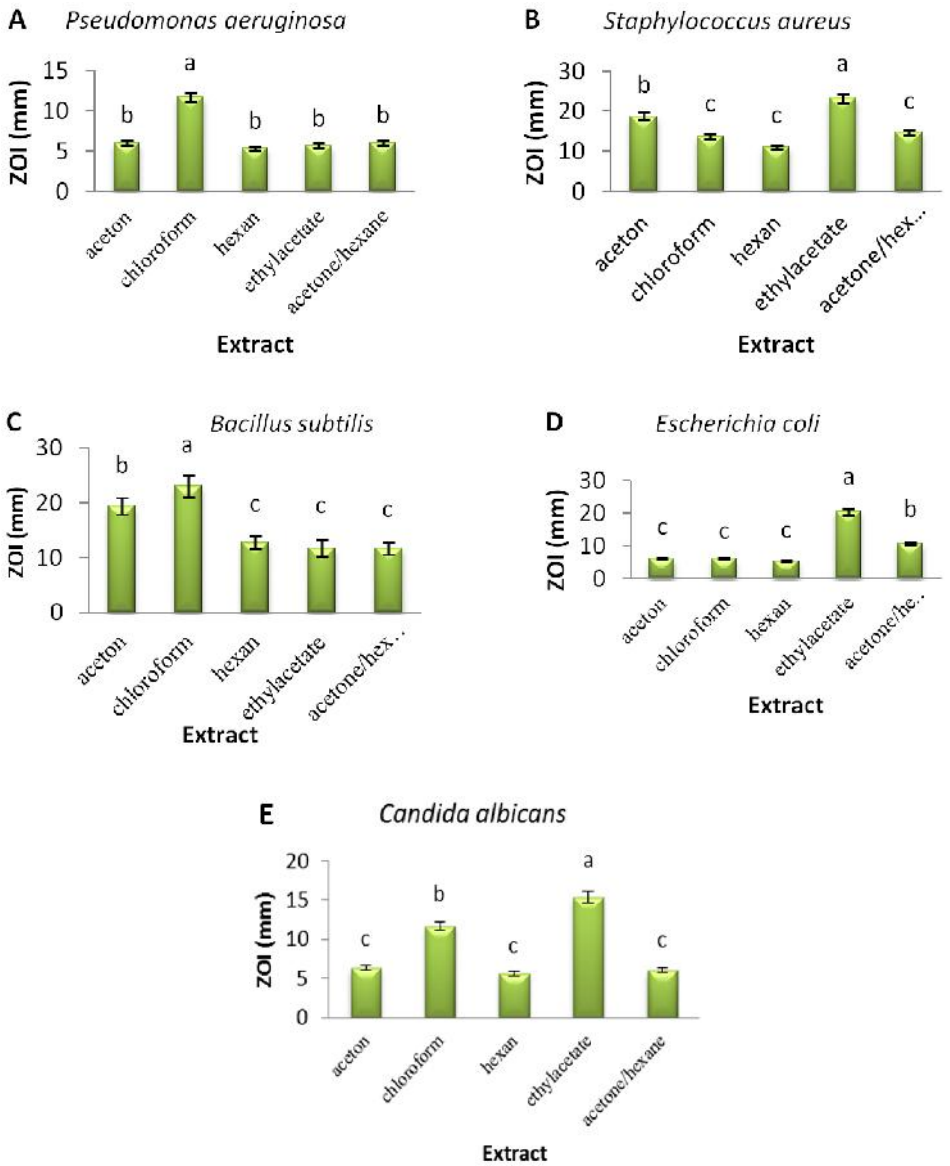
نتایج

در این مطالعه عصاره‌های مختلف جلبک *Chlorella* با استفاده از حلال‌های مختلف به دست آمد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف با مشاهده و اندازه‌گیری هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌های حاوی عصاره برای تمامی میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌های مختلف جلبک *Chlorella* دارای اثرات ضد میکروبی

متفاوتی بودند به طوری‌که عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی بیش‌ترین تأثیر ضدمیکروبی را از خود نشان دادند. از سوی دیگر، عصاره‌های استونی و هگزانی دارای کم‌ترین اثر ضد میکروبی بودند. همچنین، عصاره کلروفرمی اثر ضدمیکروبی بهتری بر قارچ *C. albicans* نشان داد. در این آزمایش‌ها از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاهد مثبت استاندارد برای باکتری‌ها و نیستاتین به عنوان شاهد مثبت استاندارد برای سویه قارچی استفاده شد. میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش در برابر عصاره‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella* sp.، در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره تهیه شده توسط اتیل استات اثر مهاری بیش‌تری روی میکروارگانیزم‌های مورد بررسی داشت. در این بررسی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بیش‌ترین مقاومت را در برابر عصاره‌های مختلف از خود نشان داد. همچنین بیش‌ترین حساسیت در باکتری *Staphylococcus aureus* نسبت به عصاره‌های مختلف جلبکی دیده شد.



شکل ۱: سنجش اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف علیه برخی باکتری‌های موردمطالعه. Ac: استون. Ch: کلروفرم. Ath: اتیل استات. Hex: هگزان. Hex/Ac: هگزان- استون.



شکل ۲: مقایسه قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف علیه میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه (میانگین± خطای استاندارد). A: *Pseudomonas aeruginosa*؛ B: *Staphylococcus aureus*؛ C: *Bacillus subtilis*؛ D: *Escherichia coli*؛ E: *Candida albicans*. حروف انگلیسی مشابه در هر نمودار نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است. ZOI: قطر ناحیه عدم رشد.

بحث

مرگ و میر ناشی از عوامل میکروبی و افزایش مقاومت میکروارگانیزم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، بشر را بر آن داشت تا به فکر راه‌های مقابله با این میکروارگانیزم‌ها برآید. یکی از این راه‌ها مواد استخراج شده از گیاهان و جلبک‌ها است که به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی و جایگزین داروهای سنتتیک مطرح هستند (صفری و همکاران، ۱۳۹۰). ریزجلبک‌ها دارای منابع بسیار وسیعی از ترکیباتی هستند که فعالیت زیستی دارند و تعداد زیادی از عصاره‌ها یا محصولات خارج سلولی ریزجلبک‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی هستند (Pesando and Gnassia-Garelli, 1979). در این پژوهش از حلال‌های استون، کلروفرم، اتیل استات، هگزان و استون- هگزان برای عصاره‌گیری از ریزجلبک *Chlorella* sp. استفاده شد. برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی از روش انتشار چاهک استفاده شد. نتایج بررسی نشان داد عصاره اتیل استاتی به دست آمده از جلبک مورد نظر اثر ضدمیکروبی بیش‌تری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت که این یافته با نتایج حاصل از مطالعه فراهانی و همکاران (۱۳۹۳) مطابقت داشت. آن‌ها فعالیت ضدباکتریایی جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinousa* را مورد بررسی قراردادند و از عصاره‌های اتیل استاتی، متانولی و آبی- متانولی استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد عصاره اتیل استاتی این جلبک بیش‌ترین اثر را بر روی سه سویه باکتری *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* داشت (فراهانی و همکاران، ۱۳۹۳). فعالیت ضدمیکروبی جلبک‌ها را می‌توان به ترکیبات مختلف فعال زیستی که در آن‌ها وجود دارند نسبت داد (Mtolera and Semesi, 1996). روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده نیز تأثیرات ضدمیکروبی عصاره را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عصاره‌هایی که با روش‌ها و حلال‌های متفاوت استخراج می‌شوند می‌توانند تأثیرات ضدمیکروبی متفاوتی در گونه‌های خاص میکروارگانیزم‌ها از خود نشان دهند (Nostro et al., 2000). Beena و Krishnika (۲۰۱۱) طی آزمایش‌های خود فعالیت عصاره متانولی ریزجلبک *Scenedesmus* در برابر باکتری *Xanthomonas oryzae* را به ثبت رساندند در حالی که عصاره‌های اتانولی و هگزانی هیچ فعالیتی در غلظت‌های مختلف آزمایش شده نشان ندادند. این امر تأثیر حلال‌های متفاوت را به خوبی نشان می‌دهد. تأثیر نوع حلال در عصاره‌گیری جلبک روی میزان خواص

ضدمیکروبی آن در مطالعه Rania و همکاران (۲۰۰۸) نیز به خوبی مشهود است. آن‌ها سه گونه سیانوباکتری *Tolypothrx ceitonica*، *Anabaena oryzae* و *Spirulina platen* و دو ریزجلبک *Chlorella pyrenoidosa* و *Scenedesmus quadricauda* را با چهار حلال متانول، دی‌اتیل اتر، استون و اتانول عصاره‌گیری کردند. عصاره جلبک‌ها بر باکتری *Bacillus subtilis* دارای اثر ضدباکتریایی بود ضمن این که عصاره‌های مختلف *C. pyrenoidosa* به ترتیب هاله‌های عدم رشدی معادل ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۲۵ میلی‌متر و عصاره‌های *S. quadricauda* هاله‌های عدم رشد معادل ۳۰، ۴۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌متر تشکیل دادند. در پژوهش حاضر حلال‌های کلروفرمی و اتیل استاتی موجب افزایش معنی‌داری در خواص ضدمیکروبی جلبک شدند. شاید علت آن درجه قطبیت ترکیبات ضدمیکروبی جلبک باشد که با توجه به این که درجه قطبیت حلال‌های ذکرشده به ترتیب ۱/۴و ۴/۴ است شاید به توان نتیجه گرفت که اکثر ترکیبات ضدمیکروبی این جلبک دارای قطبیتی در محدوده ۴/۴-۱/۴ هستند. با توجه به این که استون از قطبیت بیش‌تری نسبت به کلروفرم و اتیل استات برخوردار است اما نتایج ضدباکتریایی ضعیف‌تری نسبت به آن‌ها نشان داده است، می‌توان احتمال داد که به علت قطبیت بیش‌تر، اکثر ترکیبات و سایر اجزای جلبکی (از جمله مقدار فراوانی کلروفیل) را همراه ماده فعال استخراج می‌کند و در نهایت در این نوع عصاره، نسبت مواد فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی نسبت به کل محلول استخراجی در قیاس با عصاره‌های کلروفرمی و اتیل استاتی کاهش می‌یابد. شاهد این فرضیه این است که عصاره استخراج شده با حلال استون به علت وجود کلروفیل بیش‌تر، پررنگ‌تر است. با توجه به این نتایج، اجزای فعال زیستی مورد نظر باید ترکیباتی با قطبیت کم و چربی‌دوست باشند. Pratt و همکاران (۱۹۹۴) اولین ترکیب ضدباکتریایی را از ریزجلبک *Chlorella* جداسازی کردند که کلرلین (Clorellin) نام گرفت. کلرلین که مخلوطی از اسیدهای چرب ۱۸کربنه است، باز دارنده فعالیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. دیگر پژوهشگران نیز به حساسیت‌های متفاوت گونه‌های باکتریایی و قارچی به ماده ضدمیکروبی اشاره کرده‌اند. احتمالاً تفاوت در حساسیت میکروارگانیزم‌های گوناگون به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیزم‌ها است. باکتری *Bacillus*

subtilis از باکتری‌های گرم مثبت است که برخلاف باکتری‌های گرم منفی، فاقد لایه خارجی در دیواره خود است که این خود می‌تواند سبب شود که ترکیبات فعال در آن نفوذ بهتری داشته باشند. باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه چربی در لایه بیرونی نفوذناپذیرتر هستند (Ordog et al., 2004). در مطالعه حاضر نیز باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*بیش‌ترین مقاومت را از خود نشان دادند که شاید یکی از علت‌های آن ساختار دیواره سلولی آن‌ها باشد. هم‌چنین تأثیر عصاره‌های استونی و کلروفرمی ریزجلبک بر روی باکتری‌های *E. coli* و *P. aeruginosa* با پژوهش Syed و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. در پژوهشی دیگر خواص مهارکنندگی رشد ۱۰ گونه از جلبک‌های سبز و ۹ گونه جلبک قرمز بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی و مشاهده شد که اکثر گونه‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت فعالیت بهتری دارند (Pelegrin and Morales, 2004). در پژوهش Rania و همکاران (۲۰۰۸) عصاره اتیل استاتی جلبک *Trichodesmium erythraeum* در برابر باکتری *B. subtilis* هاله عدم رشدی معادل با ۱۱ میلی‌متر تشکیل داد در صورتی که نسبت به باکتری *E. coli* که یک باکتری گرم منفی است، غیرفعال بود. درخشش و همکاران در سال۱۳۹۰ اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderiae* و *Sargassum angustifolium* را مورد بررسی قراردادند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره‌های آلی سلولی در واقع به صورت مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات شیمیایی متفاوت با اثرات مختلف بر یکدیگر هستند که احتمالاً بخش کوچکی از این ترکیبات نامشخص دارای فعالیت آنتی‌بیوتیکی هستند (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰). دیگر پژوهشگران عنوان کرده‌اند که عصاره‌های جلبک *Chlorella* فعالیت متوسطی در برابر باکتری‌ها دارد (Uma et al., 2011). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره جلبک *Chlorella* فعالیت خوبی در برابر میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش داشته است که علت آن را می‌توان به عواملی مانند روش استخراج، مدت زمان عصاره‌گیری و نوع حلال‌های مورد استفاده نسبت داد که از این جهت با نتایج مطالعات سایر پژوهشگران (Debro and Ward, 1979; Ordog et al., 2004) هم‌خوانی دارد. Jayshree و همکاران (۲۰۱۲) طی آزمایش‌های خود درباره خواص

ضدباکتریایی *Chlorella* با استفاده از روش فتوشیمیایی حضور آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل، تانن، ترپنوئیدها، ساپونین و گلیکوزید را نشان دادند که می‌تواند علت خواص ضدباکتریایی آن باشد.

این مطالعه نشان داد که ریزجلبک *Chlorella* دارای قابلیت ضدمیکروبی مناسبی است و می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای اهداف بهداشتی و درمانی مد نظر قرار گیرد. علاوه بر این، قدرت ضدمیکروبی این جلبک تحت تأثیر حلال‌های عصاره‌گیری متفاوت است که شناسایی اجزاء دخیل در فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف مستلزم انجام آزمایش‌های تکمیلی فیتوشیمیایی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از زحمات بی‌دریغ سرکار خانم هادوی، کارشناس محترم آزمایشگاه‌های گروه زیست‌شناسی دانشگاه گیلان و همچنین سرکار خانم دکتر رمضان‌پور از موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری رشت ابراز می‌نمایند.

منابع

درخشش ب.، یوسف‌زادی م.، افشارنسب م.، یگانه و. و دشتیان نسب ع. ۱۳۹۰. بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderiae* و *Sargassum angustifolium* علیه پاتوژن‌های انسانی. فصلنامه طب جنوب، ۱۴ (۱): ۲۲-۱۷.

صفری ر.، ابطحی ب. و طیبی ب. ۱۳۹۰. بررسی اثرات بازدارندگی عصاره جلبک *Chlorella vulgaris* روی باکتری *Bacillus subtilis* در محیط کشت آزمایشگاهی. مجله علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی، ۳(۲): ۳۳-۲۷.

فراهانی ف.، پرمه پ.، مخلصی ا.، نصیری س.، گوهری ا.، قرنچیک ب. و سهرابی‌پور ج. ۱۳۹۳. بررسی خواص بیولوژیکی جلبک‌های قهوه‌ای *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellate* در سواحل شمالی خلیج‌فارس. مجله علوم پزشکی زانکو، ۱۵(۴۶): ۶۵-۵۹.

Beena B.N. and Krishnika A. 2011. Antibacterial activity of freshwater Microalga (*Scenedesmus* sp.) against three bacterial strains. Journal of Biosciences Research, 2(4): 160–165.

Chu W.L. 2012. Biotechnological applications of microalgae. International e-Journal of Science, Medicine and Education, 6: 24–37.

CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Approved standard: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 29(1): 1–76.

Debro L.H. and Ward H.B. 1979. Antibacterial activity of freshwater green glgae. Planta Medica, 36(08): 375–378.

Hinder S.L., Hays G.C., Brooks C.J., Davies A.P., Edwards M. and Walne A.W. 2011. Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British Isles: History, review of epidemiology, and future implications. Environmental Health, 10(54): 1–12.

Jayshree A., Jayashree S. and Thangaraju N. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. International Journal of Current Research and Review, 4(7): 33–38.

Kerem M., Salman B., Pasaoglu H., Bedirli A., Alper M. and Katircioglu H. 2008. Effects of microalgae *Chlorella* species crude extracts on intestinal adaptation in experimental short bowel syndrome. World Journal of Gastroenterology, 14(28): 4512–4517.

Mala R., Sarojini M., Saravanababu S. and Umadevi

G. 2009. Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. Journal of Cell and Tissue Research, 9(3): 1951–1955.

Mtolera M.S.P. and Semesi A.K. 1996. Antimicrobial activity of extracts from six green algae from Tanzania. Current Trends In Marine Botanical Research In East African Region, 211–217.

Nostro A., Germano M.P., D'angelo V., Marino A. and Cannatelli M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology, 30(5): 379–384.

Ordog V., Stirk R., Lenobel M., Bancirova M., Strand J. and Vanstanden W. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. Journal of Applied Phycology, 16: 309–314.

Patil K.J., Patil Vidya A., Mahajan S.R. and Mahajan R.T. 2011. Bio-activity of algae belonging to Bhusawal region, Maharashtra. Current Botany, 2(1): 29–31.

Pelegrin Y.F. and Morales J.L. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. Botanica Marina, 47: 140–146.

Perry J.J., Staley J.T. and Lory S. 2002. Microbial Life. Sinauer Associates Inc. 800P.

Pesando D. and Gnassia-Garelli M. 1979. Partial characterization of a specific antibiotic, antifungal substance isolated from the marine diatom *Chaetoceros lauderi* Ralfs CC. Marine Algae in Pharmaceutical Science, 1: 447–459.

Pratt R., Daniels T.C., Eiler J.B., Gunnison J.B. and W.D. Kumler. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. Science, 99: 351–352.

Priya S. 2012. Analysis of value–added biochemical compounds and antimicrobial activity of green algae *Chlorella vulgaris*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(5): 2577–2579.

Rania M., Abedinhala A. and Taha M. 2008. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3(1): 22–31.

Rasoul-Amini S., Montazeri-Najafabady N., Shaker S., Safari A., Kazemi A. and Mousavi P. 2014. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2): 126–131.

Salehi M., Moradi S., Aghili T. and Razavipour R. 2012. Search in Iranian patients in *Streptococcus mutans* isolated I/III and II genes mutacin. Medical Science Journal of Islamic Azad University, 21(2): 89–96.

Syed S., Arasu A. and Ponnuswamy I. 2015. The uses of *Chlorella vulgaris* as antimicrobial agent and as a diet: The presence of bio-active compounds which caters the vitamins, minerals in general. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology, 7(1): 185–190.

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

Uma R., Sivasubramanian V. and Niranjali D.S. 2011. Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. Journal of Algal Biomass Utilization, 2(3): 74–81.

Wegmann T.G., Hellstrom I. and Hellstrom K.E. 1971. Immunological tolerance: "Forbidden clones" allowed in tetraparental mice". Proceedings of the National Academy of Sciences, 68(7): 1644–1647.

Wigmosta M.S., Coleman A.M., Skaggs R.J., Huesemann M.H. and Lane L.J. 2011. National microalgae biofuel production potential and resource demand. Water Resources Research, 47(3): 1-13.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 1, Spring 2016

Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of microalga, *Chlorella* sp., grown under autotrophic condition

Ahmad Mashhadinejad[1], Hojjatolah Zamani[2]*, Jannat Sarmad[2]

Received: March 2016 Accepted: May 2016

Abstract

Regarding increasing rate of drug resistance among microbial pathogens, a global search to find new antimicrobials from natural compounds with fewer side effects has been considered by researchers. The aim of the current study was to evaluate antimicrobial effects of different extracts of the microalga *Chlorella* sp. grown under autotrophic condition. Algal cultivation was performed in Zinder medium and the biomass was harvested at the end of log phase. Different extracts were prepared using acetone, chloroform, hexane, ethyl acetate and hexane-acetate as extraction solvents and antimicrobial activity of the extracts was investigated against two Gram positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*), two Gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and a fungal strain (*Candida albicans*). Antimicrobial activity of the extracts was determined by measuring the zone of inhibition (ZOI) using well-diffusion method. According to the results, the chloroform and ethyl acetate mediated extracts showed the highest antimicrobial activity compared to the other extracts. In conclusion, *Chlorella* sp. extracts show good antimicrobial activity and antimicrobial efficacy depends on extraction solvents.

Key words: *Ethyl acetate Extract*, Chlorella, *Chloroform Extract*.

1- M.Sc. Student in Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding Author: h_zamani@guilan.ac.ir