مطالعه امکان استفاده از عصاره جلبک *Enteromorpha intestinalis* به منظور کنترل برخی پاتوژن‌های غذایی

محمد خضری احمدآباد[۱]، مسعود رضائی[۲*]، مهدی ذوالفقاری[۳]

۱- دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور
۲- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور
۳- دانشجوی دکتری گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۹)

چکیده

در این تحقیق عصاره جلبک *Entromorpha intestinalis* با استفاده از حلال‌های آب، کلروفرم، متانول، اتانول، هگزان و استون استخراج گردید و خاصیت ضدباکتریایی و ضد قارچی این عصاره‌ها با استفاده از روش اصلاح شده انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. میکروارگانیسم های مورد بررسی شامل باکتری های گرم مثبت *Lactococcus lactis*، *Listeria monocytogenes*، *Bacillus subtilis*، باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و قارچ *Candida albicans* بودند. بر اساس نتایج این تحقیق، برای باکتری *L. lactis* عصاره های متانولی و هگزانی دارای بهترین اثر ممانعت کنندگی بودند ($p<۰/۰۵$). عصاره متانولی و عصاره اتانولی نیز بهترین عصاره‌ها برای مهار باکتری *L. monocytogenes* بودند ($p<۰/۰۵$). اما برای سایر میکرواورگانیسم‌های مورد بررسی در این تحقیق، عصاره استونی بهترین هاله‌های بازدارندگی رشد را ایجاد نمود ($p<۰/۰۵$). با توجه به نتایج این پژوهش عصاره جلبک *E. intestinalis* دارای فعالیت ضدباکتری و ضد قارچی خوبی بر علیه میکروارگانیسم های مورد بررسی بوده و می تواند به عنوان یک ماده ضدمیکروبی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: عصاره جلبک، *Entromorpha intestinalis*، خواص ضد باکتریایی، خواص ضد قارچی، روش انتشار دیسک

* مسئول مکاتبات: rezai_ma@modares.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

تولیدکنندگان و محققان بخش سلامت مواد غذایی و نهادهای ناظر نگران شیوع مسمومیت‌های غذایی مرتبط با برخی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا هستند که در این میان مسمومیت‌های غذایی ایجاد شده بوسیله باکتری‌ها رایج‌تر می‌باشد [۱]. آلودگی‌های باکتریایی از دلایل اصلی فساد فرآورده‌های گوشتی می‌باشد [۲]. پسودوموناس‌ها، انتروباکترها و باکتری‌های اسید لاکتیک باعث فساد فرآورده‌های گوشتی می‌شوند. بسته به منطقه جغرافیایی، بیش از یک چهارم تا یک سوم تولید جهانی گوشت هر ساله در اثر فساد از دسترس خارج می شود [۳]. بعلاوه گوشت و فرآورده‌های گوشتی در اثر آلودگی با باکتری‌های بیماریزای خطرناک از قبیل لیستریا مونوسایتوژنز، سالمونلا تیفیموریوم، ایشریشیاکلی و گونه‌های یرسینیا باعث ایجاد مسمومیت های غذایی و حتی مرگ مصرف کنندگان می‌گردند [۳]. امروزه استفاده از مواد ضدمیکروبی نظیر نیترات سدیم، پتاسیم هیدروژن سولفات، سدیم بی سولفات به دلیل افزایش شیوع آلودگی‌ها و مسمومیت‌ها، به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی متداول شده است [٤]. اما به دلیل مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، و هزینه‌های بالای این داروها و همچنین مضراتی همچون اثرات سرطان زائی نگهدارنده‌های شیمیایی و همچنین افزایش آگاهی مردم، امروزه تصوری منفی از افزودنی‌های سنتتیک به مواد غذایی در مصرف-کنندگان ایجاد شده است و تمایل برای استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی جهت افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی افزایش یافته است [۵]. در این میان گیاهان دارویی از طرف سازمان سلامت جهانی به عنوان بهترین منابع برای به‌دست آوردن انواع مختلف داروها معرفی شده اند [۱]. یکی از منابعی که پتانسیل استفاده در مواد غذایی به عنوان نگهدارنده را دارند، عصاره جلبک‌ها می‌باشند. جلبک‌ها به دلیل فراوانی بالا و تنوع بالای گونه ای در طبیعت برای تولید ترکیبات جدید که دارای فعالیت بیولوژیکی می باشند از اهمیت خاصی برخوردار هستند. جلبک ها گروهی از موجودات فتوسنتز کننده، شامل ۳۰۰۰۰ – ۲۵۰۰۰ گونه می باشند [٦]. از دیر باز جلبک‌ها برای اهداف تغذیه‌ای، دارویی و تهیه کود ها مورد استفاده قرار گرفته اند. جلبک‌ها دارای سطوح بالای مواد معدنی، ویتامین ها، اسیدهای آمینه ضروری، کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم و فیبرهای رژیمی می باشند [٦ و ۷]. جلبک‌ها همچنین دارای تعدادی از ترکیبات دارویی ارزشمند می‌باشند که می‌توان برای نمونه انواع آنتی بیوتیک‌ها، ملین کننده‌ها، داروهای ضد انعقاد خون و انواع داروهای بهبود دهنده زخم را نام برد [۵]. تحقیقات نشان داده است که عصاره جلبک‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی است و در بسیاری از موارد قادر به مهار رشد پاتوژن‌های خطرناک مواد غذایی می‌باشد [۵]. به طور کلی ترکیبات ضد میکروبی موجود در جلبک‌ها کوندرویل، سیکلویودسمول، پرپاسیفنول و لائورینترول گزارش شده است [۸]. داشتن ویژگی‌های نظیر تنوع گونه ای و فراوانی بالا، قابلیت رشد در محیط‌های مختلف با شرایط پیچیده، تولید اختصاصی بعضی از ترکیبات فعال به همراه پرورش آسان، رشد سریع، و قابلیت کنترل کنندگی تولید ترکیبات زیست فعال از طریق تغییر شرایط پرورش آنها، ضرورت استفاده از جلبک ها را بیش از پیش نشان می‌دهد [۹]. یکی از پتانسیل‌های موجود در دریای خزر و به ویژه در سواحل ایران جلبک سبز، گونه *Entromorpha intestinalis* است. این جلبک از سلسله Plant، شاخه Chorophyta، رده Chlorophyacea، راسته Ulotrichales، خانواده Ulvaceae، جنس Entromorpha می‌باشد. این جلبک در اکثر نقاط جهان از آلاسکا، آمریکای شمالی، اسپانیا، روسیه، فرانسه، تا جنوب شرق آسیا گزارش شده است. از نظر سازگاری به شوری نیز گونه‌ای بسیار مقاوم بوده به

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

نحوی که از آب شیرین تا شوری‌های بسیار بالا رشد می‌کند که می تواند آن را به عنوان پتانسیلی جهت استخراج ترکیبات زیست فعال مطرح کند. البته ترکیبات زیست فعال جلبک‌ها تحت اثر عوامل مختلفی از جمله گونه، منطقه جغرافیایی، فصل و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب تغییر می‌کند [۵]. نوع و روش به کار رفته برای عصاره گیری از بافت‌های گیاهی به نوع بافت گیاهی، نوع ماده جدا شدنی و مقاومت ماده جدا شده به حرارت بستگی دارد. انتخاب یک روش مناسب می تواند غلظت ترکیبات فعال استخراج شده را افزایش دهد. استخراج با حلال در دمای محیط یکی از روش های متداول عصاره‌گیری می باشد. که در این روش گیاه و حلال به مدت مشخصی در تماس با یکدیگر قرار می گیرند و در نهایت، پس از عمل استخراج، حلال جدا می شود [۱۰].

پژوهش‌های محدودی در رابطه با قدرت ضد میکروبی عصاره جلبک‌های جنس انترومورفا در خارج از ایران انجام شده است. Taskin و همکاران [۱۱] و Ravi Kumar و همکاران [۱۲] طی پژوهشی بر ویژگی ضدمیکروبی این گونه تأکید کردند. Jebeshingh و همکاران [۵] نیز خواص ضد میکروبی این گونه را مورد مطالعه قرار دادند و قدرت ضدمیکروبی این جلبک را در مقابل برخی پاتوژن‌ها گزارش کردند. اما تاکنون پژوهشی در مورد ویژگی‌های ضدمیکروبی این جلبک در دریای خزر و استفاده از آن برای مهار رشد پاتوژن‌های مواد غذایی، انجام نشده است. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی ویژگی ضدمیکروبی عصاره جلبک *E. intestinalis* سواحل مازندران دریای خزر، به منظور ممانعت از رشد برخی پاتوژن‌های فرآورده‌های شیلاتی می‌باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- نمونه‌گیری و آماده سازی نمونه‌ها

جلبک‌های گونه *E. intestinalis* در خرداد ماه ۱۳۹۰ از سواحل دریای مازندران در شهر نور جمع آوری شده و به آزمایشگاه فرآوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. نمونه‌های جمع آوری شده با آب دریا شسته شده و همچنین در مرحله بعد این نمونه‌ها بوسیله آب شهر، به منظور جدا کردن مواد چسبیده شده به این جلبک‌ها شستشو داده شدند. سپس جلبک‌ها در سایه خشک شدند و در مرحله بعد به وسیله آون با دمای ٤٥ درجه سلسیوس کاملا خشک گردیده و سپس خرد و کاملاً آسیاب شدند. این نمونه ها در داخل پلاستیک‌های زیپ لاک قرار داده شدند و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند [۱۳].

تمامی حلال ها و مواد شیمیایی مصرفی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت های مرک، شارلو و اپلای کم تهیه گردیدند.

۲-۲- عصاره گیری

۳۰ گرم از نمونه‌های جلبکی تهیه شده در بالا برای هر تیمار مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور برای هر تیمار ۳ تکرار ۱۰ گرمی وارد ارلن گردید و به نسبت‌های ۱:۲۰ حلال‌های مورد استفاده در آزمایش (آب، کلروفرم، متانول، اتانول، استون و هگزان) به آن‌ها اضافه گردید [١٤] و مخلوط فوق به مدت ٢٤ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. بعد از فیلتر کردن مخلوط فوق، عصاره بدست آمده با استفاده از دستگاه روتاری تحت شرایط خلأ حلال پرانی گردید تا آسیب دیدن ترکیبات استخراج شده به حداقل برسد. در نهایت، باقی مانده حلال به وسیله گاز ازت حذف گردید. لازم به ذکر است که برای نمونه‌های آبی عمل تغلیظ با استفاده از دستگاه فریز درایر صورت گرفت. با در دست

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

داشتن وزن خشک هر عصاره، اقدام به تهیه محلول های لازم برای انجام آزمایشات مورد نظر گردید [۱۵].

۲-۳- آزمایشات میکروبی

باکتری‌های *Lactococcus lactis* (PTCC: 1336)، *Listeria monocytogenes* (PTCC: 1163)، *Bacillus subtilis* ، *Escherichia coli* (PTCC: 3315) و قارچ *Candida albicans* در این تحقیق مورد آزمون قرار گرفتند. برای بررسی اثرات ضد باکتریایی از آزمون حساسیت ضد میکروبی (آنتی بیوگرام) به روش انتشار دیسک[1] استفاده شد. بدین منظور سوسپانسیون‌های باکتریایی مورد استفاده در آزمون‌های آنتی بیوگرام از کشت های یک روزه سویه های باکتریایی تهیه گردید. محیط کشت مورد استفاده در آزمون های آنتی بیوگرام شامل مولر – هینتون آگار[2] می‌باشد. در روش انتشار دیسک پس از تلقیح باکتریایی (کشت چمنی سوسپانسیون های باکتریایی به وسیله سوآپ استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های کاغذی با قطر ٦ میلی میتر به فاصله حداقل ۲۵ میلی متر از یکدیگر و از لبه پلیت به وسیله یک پنس استریل به دقت روی سطح آگار قرار داده شد. برای تهیه دیسک‌های مورد نظر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره های تهیه شده با غلظت اولیه ۳ mg/cc، به دقت به دیسک‌های بلانک استریل تزریق گردید (بدین صورت به هر دیسک ۳۰۰ µg وزن خشک حاصل از عصاره گیری منتقل گردید) و بعد از خشک شدن در محیط استریل و در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت، به آرامی دیسک ها با فشار پنس در محیط آگار ثابت شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای پیش انتشار درون یخچال با دمای ٤ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از این مرحله پلیت ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به ترتیب به مدت ۲٤ ساعت برای نمونه‌های باکتری و ۷۲ ساعت برای نمونه‌های قارچ قرار گرفتند. پس از این مدت قطر هاله تشکیل شده اطراف دیسک توسط کولیس به دقت اندازه گیری شد [٦]. آزمون‌های حساسیت ضدباکتریایی به روش انتشار دیسک با ۳ مرتبه تکرار انجام شد. به منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضد باکتریایی از آنتی بیوتیک تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. و از حلال های مورد استفاده برای عصاره گیری نیز به عنوان کنترل منفی برای تلقیح دیسک ها استفاده گردید.

۳- تجزیه و تحلیل آماری

پس از جمع آوری داده‌های بدست آمده شامل قطر هاله های اطراف دیسک ها، به منظور تجزیه و تحلیل آنها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس همگنی داده ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اختلاف بین تیمارها از روش آنالیز واریانس یک طرفه[3] استفاده گردید. مقایسه میانگین ها با آزمون LSD با سطح اطمینان ٪۹۵ صورت پذیرفت. تمام آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS 17 صورت گرفت.

٤- نتایج و بحث

فعالیت ضد باکتریایی عصاره های جلبک *E. intestinalis* بدست آمده بوسیله حلال های مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک مورد آزمایش قرار گرفت. فعالیت ضد باکتریایی این عصاره ها در جداول ۱ تا ۵ ارائه شده است.

1. Agar disk diffusion
2. Muller-Hinton agar
3. One way ANOVA

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۱ تاثیر عصاره های استخراج شده جلبک *E. intestinalis* به وسیله حلال های مختلف بر باکتری *L. lactis*

حلال	آب	کلروفرم	متانول	اتانول	هگزان	استون	تتراسایکلین
قطر هاله عدم رشد	۱۰/۹۹±۰/۸۳^{b}	۱۰/۷۳±۰/۵۳^{b}	۱٤/۱۵±۰/۸٤^{a}	۷/۲۷±۰/٤۹^{c}	۱۲/۳٦±۰/۹۸^{ab}	۷/۳٤±۰/۳٦^{c}	۱۲±۱/۷۳^{b}

حروف کوچک a، b، c و ... نشان دهنده اختلاف معنی دار بین عصاره های مختلف نسبت به باکتری *L. lactis* در سطح p<۰/۰۵

نتایج اثرات ضد باکتریایی عصاره های جلبک *E. intestinalis* نسبت به باکتری *L. lactis* تفاوت معنی داری نشان دادند (p<۰/۰۵). به طوریکه بیشترین تاثیرات بدست آمده به ترتیب مربوط به عصاره های متانولی و هگزانی به ترتیب با هاله های تشکیل شده ۱٤/۱۵ mm و ۱۲/۳٦ mm بدست آمد. عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره ها توانست به طور معنی داری (p<۰/۰۵) هاله های بهتری را ایجاد نماید. به جز عصاره هگزانی که با عصاره متانولی تفاوت معنی داری نداشت (p>۰/۰۵). لازم به ذکر است که عصاره متانولی برای این باکتری حتی نسبت به تتراسایکلین نیز هاله بازدارندگی رشد بهتری را نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۲ تاثیر عصاره های استخراج شده جلبک *E. intestinalis* به وسیله حلال های مختلف بر باکتری *L. monocytogenes*

حلال	آب	کلروفرم	متانول	اتانول	هگزان	استون	تتراسایکلین
قطر هاله عدم رشد	۱۰/۵۹±۰/۲۳^{e}	۱۳/٤۱±۰/۷۹^{d}	۱۹/۱۵±۰/٤٦^{a}	۱۷/٤۲±۰/٤٤^{b}	۱۲/۲۷±۰/۸۵^{d}	۱۲/۹۵±۰/۲۰^{d}	۱٤/۹٤±۱/٤۸^{c}

حروف کوچک a، b، c و ... نشان دهنده اختلاف معنی دار بین عصاره های مختلف نسبت به باکتری *L. monocytogenes* در سطح p<۰/۰۵

لیستریا مونوسایتوژنز باکتری غیر اسپورزا، گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است که آن را از گوشت و فرآورده های آن، شیر و لبنیات و سبزیجات جدا نموده اند [۱٦]. لیستریا منوسایتوژنز عامل بیماری لیستریوزیز است که از بیماری های مشترک انسان وحیوان می باشد در موارد اپیدمیک عفونت مواد غذایی میزان مرگ و میر ۳۰ تا ٤۰ درصد و در افراد مستعد تا ۷۵ درصد هم گزارش شده است [۱۷].

بیشترین خاصیت ضد باکتریایی عصاره های مورد آزمایش در این تحقیق بر علیه باکتری لیستریا مربوط به عصاره های متانولی و در مرحله بعد اتانولی بود که به ترتیب هاله های عدم رشد ۱۹/۱۵ mm و ۱۷/٤۲ mm را ایجاد کردند (p<۰/۰۵). که این دو عصاره توانستند هاله های عدم رشد بزرگتری را برای این باکتری در مقایسه با تتراسایکلین ایجاد کنند (p<۰/۰۵). عصاره متانولی نسبت به سایر عصاره های مورد استفاده برای این باکتری نتایج بهتری را نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۳ تاثیر عصاره های استخراج شده جلبک *E. intestinalis* به وسیله حلال های مختلف بر باکتری *B. subtilis*

حلال	آب	کلروفرم	متانول	اتانول	هگزان	استون	تتراسایکلین
قطر هاله عدم رشد	0	۱۰/٤۰±۱/٦۲^{c}	۱۰/۹۱±۰/۹۹^{c}	۱۰/۳۵±۱/۲۷^{c}	۱٤/٦۳±۲/٦۸^{b}	۱۸/۹٦±۰/۹۹^{a}	۹/۵۹±۰/۷۳^{c}

حروف کوچک a، b، c و ... نشان دهنده اختلاف معنی دار بین عصاره های مختلف نسبت به باکتری *B. subtilis* در سطح p<۰/۰۵

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

باسیلوس سابتیلیس یک باکتری گرم مثبت می باشد که بطور معمول در خاک یافت می شود. همچنین در صورت آلودگی گوشت و فرآورده های آن با این باکتری باعث فساد گوشت می شود [۱۸].

برای باکتری *B. subtilis* عصاره استونی دارای بیشترین هاله عدم رشد (۱۸/۹۶ mm) بود. که این عصاره نسبت به سایر عصاره های مورد آزمایش توانست به طور معنی داری هاله عدم رشد بیشتری را ایجاد نماید (p<۰/۰۵). عصاره های استون و هگزان نسبت به تتراسایکلین هاله های بهتری را نسبت به این باکتری ایجاد کردند (p<۰/۰۵). برای عصاره آبی این جلبک هیچ فعالیت ضد باکتریایی نسبت به باکتری *B. subtilis* مشاهده نشد.

Roy و همکاران [۱۹] گزارش کردند که عصاره کلروفرمی گیاه *Andrographis paniculata* می تواند به طور مؤثری رشد باکتری *B. subtilis* را مهار نماید.

جدول ٤ تاثیر عصاره های استخراج شده جلبک E. intestinalis به وسیله حلال های مختلف بر باکتری E. coli

حلال	آب	کلروفرم	متانول	اتانول	هگزان	استون	تتراسایکلین
قطر هاله عدم رشد	۸/۳۰±۰/۳۷^{d}	۹/۰۳±۰/۳۸^{cd}	۹/۲۸±۰/۷۹^{c}	0	۹/۱۷±۰/۰۹^{cd}	۱۵/۰٤±۰/۰۲^{b}	۲٦/۷۵±۰/۰۲^{a}

حروف کوچک a، b، c و ... نشان دهنده اختلاف معنی دار بین عصاره های مختلف نسبت به باکتری *E. coli* در سطح p<۰/۰۵

شریشیاکلی یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه می باشد. این باکتری بیهوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد. باکتری اشریشیاکلی که در روده جانداران خونگرم (مانند انسان) زندگی می‌کند. انتقال از راه دهان یا مدفوع از راههای آلودگی به این باکتری می باشد [۲۰].

Abd El Mageid و همکاران [٦] گزارش دادند که عصاره های کلروفرم، هگزان، اتانول و متانول جلبک های *Aspragopsis toxiformis* و *Sargassum vulgar* دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی نسبت به باکتری *E. coli* بودند. نتایج این محققان نشان داد که از بین عصاره های مورد آزمایش آنها، عصاره هگزانی جلبک قرمز *Aspragopsis toxiformis* دارای بیشترین فعالیت ضدباکتریایی نسبت به این باکتری بود در حالی که در مورد جلبک قهوه ای *Sargassum vulgar* عصاره تهیه شده بوسیله اتانول بیشترین فعالیت را روی این باکتری نشان داد.

از بین عصاره های مورد آزمایش نسبت به باکتری *E. coli*، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی برای عصاره استونی با هاله عدم رشد ۱۵/۰٤ mm مشاهده گردید (p<۰/۰۵). اما کارآیی این عصاره نسبت به تتراسایکلین کمتر بود (p<۰/۰۵). نتایج بدست آمده در این تحقیق برای باکتری *E. coli* با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. Kolanjinathan و Stella نیز نشان دادند که برای گونه های *Halimeda gracilis*، *Gracilaria edulis*، *Hypnea musciformis*، *Turbinaria conoides* و *Sargassum myricystum* عصاره استونی فعالیت ضد باکتریایی خوبی را نسبت به باکتری *E. coli* نشان داد اگر چه عصاره‌های اتانولی و متانولی این جلبک ها فاقد قدرت مهارکنندگی نسبت به این باکتری بودند [۲۱]. در پژوهش حاضر نیز عصاره اتانولی هیچ اثر ضد باکتریایی را روی باکتری *E. coli* نداشت. در مقابل Karthikaidevi و همکاران طی تحقیقات خود گزارش کردند که عصاره های متانول و استون جلبک سبز *Halimeda tuna* نسبت به عصاره های اتیل استات، پترولیوم اتر، دی اتیل اتر، اتانول و کلروفرم از فعالیت ضد باکتریایی بهتری نسبت به باکتری *E. coli* برخوردار بودند[۲۲].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۵ تاثیر عصاره های استخراج شده جلبک *E. intestinalis* به وسیله حلال های مختلف بر قارچ *c. albicans*

حلال	آب	کلروفرم	متانول	اتانول	هگزان	استون	تتراسایکلین
قطر هاله عدم رشد	۹/۱۴±۰/۸۷^{e}	۱۲/۱۹±۲/۳۰^{d}	۱۲/۸۸±۱/۳۵^{d}	۱۳/۵۱±۱/۶۳^{cd}	۱۵/۵۲±۰/۹۳^{bc}	۱۶/۲۷±۰/۸۸^{b}	۲۴/۸۳±۰/۲۱^{a}

حروف کوچک a، b، c و ... نشان دهنده اختلاف معنی دار بین عصاره های مختلف نسبت به قارچ *c. albicans* در سطح p<۰/۰۵

کاندیدا آلبیکانس یک قارچ دیپلوئیدی است و معمولا باعث ایجاد بیماری های عفونی برفک دهان و برفک واژینال می شود. کاندیدا آلبیکانس یک قارچ هم‌زیست در دهان و روده و معده‌ی انسان است. این قارچ به طور معمول در بدن انسان مشکلی ایجاد نمی‌کند، اما رشد بی رویه این قارچ می‌تواند موجب بیماری کاندیدیازیس شود [۲۳].

عصاره های استون با قطر هاله عدم رشد ۱۶/۲۷ mm نسبت به این قارچ دارای فعالیت مهار کنندگی بالاتری بودند که نسبت به سایر عصاره های مورد آزمایش دارای تفاوت معنی داری بود (p<۰/۰۵). برای این قارچ بیشترین هاله در تیمار تتراسایکلین بدست آمد (p<۰/۰۵). Shittu و همکاران [۱] نشان دادند که عصاره آبی *Sesame radiatum* توانست هاله های بازدرندگی بزرگتر از ۱۰ mm را نسبت به این قارچ نشان دهد. همچنین عصاره اتانولی *Sesame radiatum* دارای تاثیرات خوبی برای مهار این قارچ بود.

در مطالعات موجود عصاره کلروفرمی جلبک *Aspragopsis toxiformis* خواص ضد قارچی نسبت به قارچ کاندیدا آلبیکانس نشان داد. برای جلبک قهوه ای *Sargassum vulgar* هم عصاره کلروفرمی و هم عصاره اتانولی دارای فعالیت ضد قارچی بود [٦].

فعالیت ضدباکتریایی عصاره های به‌دست آمده از جلبک های سبز، قرمز و قهوه ای با استفاده از حلال های مختلف، نسبت به باکتری های گرم منفی و گرم مثبت توسط تعدادی از محققین گزارش شد [۲۱، ۲٤، ۲۵، ۲٦]. Sastry و Rao [۲٤] گزارش دادند که عصاره های استخراج شده از جلبک‌های مختلف شامل دو گونه جلبک قهوه‌ای، دو گونه جلبک قرمز و یک گونه جلبک سبز به وسیله حلال های بنزن، کلروفرم و متانول دارای فعالیت ضد باکتریایی بود. در حالیکه Karthikaidevi و همکاران از هفت حلال از جمله متانول و اتیل استات برای استخراج مواد ضد باکتریایی از جلبک های *Codium adherens, Ulva reticulata* و *Halimeda tuna* استفاده کردند [۲۲].

عصاره های استخراج شده جلبک *E.estistinalis* بوسیله حلال های مورد آزمایش در این تحقیق، تاثیرات ضدباکتریایی خوبی را نسبت به میکروارگانیسم های مورد آزمایش نشان دادند. در پژوهش حاضر عصاره های متانولی و هگزانی دارای بهترین فعالیت ضدباکتریایی نسبت به باکتری *L. lactis* بودند (p<۰/۰۵). عصاره‌های متانولی و اتانولی بهترین عصاره ها برای مهار باکتری *L. monocytogenes* بودند (p<۰/۰۵). Ravi Kumar و همکاران [۱۲] نیز نشان دادند که عصاره متانولی جلبک های دریایی دارای اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه ای روی برخی از باکتری ها از جمله *Bacillus megaterium*، *Proteus vulgaris*، *Streptococcus lactis* دارد. این محققان همچنین گزارش دادند که باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی از حساسیت بیشتری نسبت به عصاره های آزمایش شده، برخوردارند. این تفاوت ها احتمالا به دلیل تفاوت ساختاری این باکتری ها می باشد. دیواره سلولی باکتری های گرم منفی بسیار پیچیده تر است که باعث کاهش حساسیت آنها نسبت به مواد ضدباکتریایی می گردد. مورائو و همکاران [۲۷] فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره هگزانی *D. dichotoma* را گزارش کردند. Lima-Filho و همکاران [۲۸] نشان دادند که عصاره هگزانی Gracilaria sp فقط توانست باکتری *Bacillus subtilis* را مهار نماید. در مقابل، Tüney و همکاران [۲۹] نشان دادند که عصاره دی اتیل اتر جلبک *G. gracilis* توانست میکرواورگانیسم های *Candida sp*، *E. faecalis*، *S. epidermids*، *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* را مهار نماید. بعضی از تحقیقات نشان داده‌اند که استخراج بوسیله متانول منتج به بروز خواص ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به هگزان و اتیل استات می شود [۳۰]. در حالی که سایرین گزارش کرده‌اند که کلروفرم نسبت به متانول و بنزن

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

کارآیی بهتری دارد [۲۵]. از آنجا که ترکیبات محلول در چربی موجود در جلبک ها از جمله اسید های چرب، پلی سولفید های حلقوی و ترکیبات هالوژنه چربی دوست منبعی اصلی بروز ویژگی های ضد باکتریایی می باشند، واضح است که استفاده از حلال های آلی در مقایسه با آب، همیشه کارآیی بالاتری برای استخراج ترکیبات فعال دارای خواص ضد باکتریایی دارد [۱۲، ۱۶، ۲۹، ۳۳]. Tüney و همکاران به این نتیجه رسیدند که دی اتیل اتر هاله های عدم رشد بهتری را نسبت به متانول، استون و اتانول ایجاد می‌کند [۲۹]. بطور کلی تفاوت در میزان فعالیت ضد باکتریایی ممکن است به دلیل تفاوت در روش استخراج، حلال مورد استفاده و همچنین فصل نمونه گیری باشد. Stirk و همکاران [۳۱] طی تحقیقات خود بیان داشتند که تغییرات فصلی در میزان فعالیت ضد قارچی تغیری ایجاد نمی‌کند، ولی موجب تغیر در فعالیت ضد باکتریایی می‌شود. به طوری که عصاره های آنها در فصل تابستان دارای اثر ضدباکتریایی نبودند ولی در اواخر زمستان و اوایل بهار فعالیت ضد باکتریایی خوبی را نشان دادند. برای باکتری‌های *B. subtilis* و *E. coli* و قارچ *C. albicans* عصاره استونی بهترین هاله های بازدارندگی رشد را ایجاد نمود ($p<۰/۰۵$). بطور کلی نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط Kolanjinathan و Stella [۲۱] مبنی بر اینکه استون بهترین حلال برای استخراج ترکیبات موثر ضد باکتریایی از چندین گونه جلبکی بود، همخوانی دارد.

امروزه خاصیت ضد باکتریایی جلبک ها ثابت شده است و این خاصیت ضد باکتریایی به دلیل داشتن ترکیباتی از قبیل ترپنوئید ها، استیلنس ها، فنول های حاوی هالوژن ها، کوندرویل، سیکلویودسمول، پرپاسیفنول و لائورینترول [۸]، پلی ساکارید های سولفاته، گالاکتوز سولفاته و ترکیبات هالوژنه می باشد [۱۲]. Reviers و Leproux گزارش کردند که محتوی قابل ملاحظه ای از ترکیبات سولفاته و اورانیک اسید در جلبک *E. intestinalis* در مقایسه با سایر جلبک های Ulvaceae وجود دارد [۳۲]. Bansemir و همکاران [۲۶] طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که ترکیبات دارای خاصیت ضد باکتری در جلبک ها ترکیبات چربی دوست هستند. همچنین این محققان احتمال دادند که این ترکیبات فعال ترکیبات هالوژنه چربی دوست باشند. به غیر از ترکیبات هالوژنه، پراکسید هیدروژن، ترپنوئید و ترکیبات برومو-اتر و اسید های چرب در نمونه های تازه تهیه شده باعث ایجاد بروز فعالیت ضد باکتریایی می شود. [۲۹، ۳۳]. Freil-Pelegrin و Morales طی تحقیقات خود نشان دادند که عصاره های استخراج شده از *Udotea occidentalis* با استفاده از حلال های چربی ها (مخلوط کلروفرم-متانول) بیشترین فعالیت را در مقایسه با عصاره اتانولی همان جلبک، نسبت به باکتری *L. lactis* نشان داد [۳۳].

به طور کلی عصاره های جلبکی مورد آزمایش در این تحقیق توانستند فعالیت ضد باکتریایی خوبی را نسبت به میکروارگانیسم های مورد آزمایش نشان دهند به غیر از باکتری *B. subtilis* که در مقابل عصاره آبی این جلبک مقاوم بود. و همچنین باکتری *E. coli* که نسبت به عصاره اتانولی مقاومت نشان داد. باید توجه داشت که همه گونه های جلبکی مربوط به یک خانواده یا جنس فعالیت های ضدباکتریایی یکسانی را نشان نخواهند داد. تفاوت نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر با مطالعات قبلی ممکن است به این دلیل باشد که اولاً قابلیت گونه های مختلف برای تولید متابولیت های ثانویه ممکن است تحت تاثیر فاکتورهایی مثل تغییرات فصلی، متغیر باشد. دوم این که دقت و تنوع روش های مختلف استخراج و همچنین تفاوت های موجود در روش های آزمایش می تواند بر میزان استخراج ترکیبات فعال هر گونه تاثیرگذار باشد [۲۷-۲۹].

۵- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره های استخراج شده از جلبک *E. intestinalis* به وسیله حلال های مختلف، دارای تاثیرات ضد باکتریایی و ضد قارچی خوبی بود. نتایج نشان داد که عصاره های متانولی و هگزانی دارای بهترین فعالیت ضدباکتریایی نسبت به باکتری *L. lactis* بودند ($p<۰/۰۵$). عصاره‌های متانولی و اتانولی بهترین عصاره ها برای مهار باکتری *L. monocytogenes* بودند ($p<۰/۰۵$). اما برای برای باکتری‌های *B. subtilis* و *E. coli* و قارچ *C. albicans* عصاره استونی بهترین هاله های بازدارندگی رشد را ایجاد نمود ($p<۰/۰۵$). لذا استفاده از این پتانسیل جهت عصاره‌گیری و تولید

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، جهت ممانعت از رشد پاتوژن‌های مواد غذایی رویکردی جدید و موثر می باشد.

٦- سپاسگزاری

نویسندگان بر خورد لازم می دانند که از کمک ها و همکاری آقایان اسماعیل عبدالله زاده، مهدی عبدالهی و آریا باباخانی در انجام این پروژه تشکر و قدردانی نمایند.

۷- منابع

[1] Shittu, L. A. J., Bankole, M. A., Ahmed, T., Bankole, M. N., Shittu, R. K., Saalu, C. L., and Ashiru, O. A. 2007. Antibacterial and antifungal activities of essential oils of crude extracts of Sesame Radiatum against some common pathogenic micro-organism. Iranian Journal of pharmacology and Therapeutics, 6, 165-170.

[2] Weng, Y. M., Chen, M. J., and Chen, w. 1999. Antimicrobial Food Packaging Materials from Poly (ethylene-co-methacrylic acid). LWT-Food Science and Technology, 32, 191-195.

[3]Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., and Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5598–5605.

[4] Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., and Naghdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against Aspergillus Xavus in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18, 1518-1523

[5] Jebeshingh, S. E. J., Rosemary, S., Elaiyaraja, S., Sivaraman, K., Lakshmikandan, M., Murugan, A., and Raja, P. 2011. Potential antibacterial activity of selected green and red seaweed. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 5(14), 1-7.

[6] Abd El Mageid, M. M., Salama, N. A., Saleh, M. A. M., and Abo Taleb, H. M. 2009. Antioxidant and antimicrobial characteristics of red and brown algae extracts. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture.

[7] Akköz1, C., Arslan, D., Ünver, A., Özcan, M. M. and Yilmaz, B. 2011. Chemical composition, total phenolic and mineral contents of enteromorpha intestinalis (l.) kütz. And cladophora glomerata (l.) kütz. Seaweeds. Journal of Food Biochemistry, 35, 513-523.

[8] Sims, J. J., Donnell, M. S., Leary, J. V., and Lacy, G. H. 1975. Antimicrobial agents from marine algae. Antimicprobial Agents and Chemotherapy, 7(3), 320-321.

[9] Plaza, M., Cifuentes, A., and Ibanez, E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. Trends Food Science and Technology, 19, p. 31.

[10] Suhaj, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 531-537

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

[12] Ravi Kumar, S., Ramanathan, G., Subhakaran, M., and Inbaneson, S. G. 2009. Antimicrobial compounds from marine alophytes for silkworm disease treatment. International Journal of Medicine and Medical Sciences, 1(5), 184-191.

[13] Chandini, S. K., Ganesan, P., and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107(2), 707–713.

[14] Hellio, C., De La Broise, D., Dufossé, L., Le Gal, Y., and Bourgougnon N. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: Potential use for environmentally friendly antifouling paints. Marine Environmental Research, 52(3), 231-247.

[15] Su, L., Yin, J. J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., and Yu, L. 2007. Total phenolic contents chelating capacities and radicalscavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. Food Chemistry, 100, 990-7.

[16] Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., et al. 2003. Listeria and Erysipelothrix . Manual of Clinical Microbiology, 1, 4619.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[17] Aguado, v., Vitas, A. I., and Garcia-Jalon, I. 2004 . Characterization of L. monocytogenes and L. Innocua from a vegtable processing plant by RAPD and REA. International Journal of Food Microbiology, 90(3), 341-7.

[18] Ryan, K. J., Ray, C. G. (editors) .2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. ISBN,0-8385-8529-9.

[19] Roy, S., Rao, K., Bhuvaneswari, Ch., Giri, Archana., and Mangamoori, L. N. 2010. Phytochemical analysis of Andrographis paniculata extract and its antimicrobial activity. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, 85–91.

[20] Feng, P., Weagant, S., and Grant, M. 2002. Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria". Bacteriological Analytical Manual (8th ed.). FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition. Retrieved 2007-01-25.

[21] Kolanjinathan, K., and Stella, D. 2009. Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. Recent Research in Science and Technology, 1(1), 020–022.

[22] Karthikaidevi, G., Manivannan K., Thirumaran G., Anantharaman, P., and Balasubaramanianm, T. 2009. Antibacterial properties of selected green seaweeds from vedalai coastal waters: Gulf of mannar marine biosphere reserve. Global Journal of Pharmacology, 3, 107-112.

[23] Molero, G., Díez-Orejas, R., Navarro-García, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, G., Sánchez-Pérez, M., and Nombela, C. 1998. Candida albicans: genetics, dimorphism and pathogenicity. International Microbiology, 1, 95–106.

[24] Sastry, V. M. V. S., and Rao, G. R. K. 1994. Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Botanica Marina, 37, 357-360.

[25] Febles, C. I., Arias, A., and Gil-Rodriguez, M. C. 1995. In vitro study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife (in Spanish). Anuario del Estudios Canarios, 34, 181-192

[26] Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., and Lindequist, U. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture, 252, 79–84.

[27] Moreau, J., Pesando, D., Bernad, P., Cram, B., and Pionnat, J. C. 1988. Seasonal variations in theproduction of antifungal substances by some Dictyotales (brownalgae) from French Mediterranean coast. Hydrobiology, 162, 157-162,.

[28] Lima-Filho, J. V. M., Carvalho, A. F. F. U., Freitas, S. M., and Melo, V. M. M. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian Coast. Brazilian Journal of Microbiology, 33, 311-313.

[29] Tüney, I., Çadirci, B. H., Ünal, D., and Sukatar, A. 2006. Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Üzmir, Turkey) Turkish Journal of Biology, 30, 171-175.

[30] Rosell, K. G., and Srivastava, L. M. 1987. Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. Hydrobiologia 151/152, 471-475

[31] Stirk, W. A., Reinecke, D. L., and Staden, J. V. 2007. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholineesterase activity in seven South African seaweed, Journal of Applied Phycology, 19, 271-276

[32] Reviers, B. D,. and Leproux, A. 1993. Characterization of polysaccharides from Enteromorpha intestinalis (L.) Link, Chlorophyta. Carbohydrate Polymers, 22, 253-259.

[33] Freil-Pelegrin, Y., and Morales, J. L. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, mexico. Botanica Marina, 47, 140-146.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Studying the possibility of using the extract of *Entromorpha intestinalis* in order to control some food-borne pathogens

Khezri Ahmadabad, M. [1], Rezaei, M. [2*], Zolfaghari, M. [3]

1. M. Sc. student, Dept. of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran.
2. Dept. of Seafood Processing, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
3. Ph.D. student, Dept. Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran.

(Received: 92/1/20 Accepted: 93/3/19)

In this study, the extract of *Entromorpha intestinalis* was exctracted using different solvents including water, chloroform, methanol, ethanol, hexane and acetone. Antibacterial and antifungal properties of these extracts were evaluated using a modified disk diffusion method. Microorganisms investigated in this research were included Gram-positive bacteria *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and fungi *Candida albicans.* According to the results, the methanol and hexane extracts of this alga had the best activity against L. lactic. (p<0/05). Methanol and ethanol extracts had the best activity against L. monocytogenes (p<0/05). But for the others tested microorganisms in this study, the extract of aceton exhibited the best inhibition zone (p<0/05). The extract of *E. intestinalis* possesses good antibacterial and antifungal activity against the investigated microorganisms and it could also used as a suitable natural antimicrobial compound.

***Keywords*:** Algae extract, *Entromorpha intestinalis*, Antibacterial activity, Antifungal activity, Disc diffusion method

* Corresponding Author E-Mail Address: rezai_ma@modares.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]