In Vitro Assessment of Antimicrobial Activities of Ether and Hexane Extracts of microalgae *Chlorella vulgaris* against pathogenic bacteria

Zahra Shabanzad
M.Sc. of Aquatic Ecology, University of Guilan, Iran, zahra.shabanzad@hotmail.com
Javid Imanpour Namin *
Associate Professor of Hydrobiology and Ecology Fish Ecology, University of Guilan, Iran, imanpour@guilan.ac.ir
Zohreh Ramezanpour
Assistant Professor of Ecology and Phycology, Guilan, Iran, zohreh66@gmail.com

Abstract

Introduction: Increasing trends of drug-resistant strains of microorganisms especially bacteria have urged scientists to seek for antimicrobial compounds in natural resources with minimal or negligible side effects. Microalgae are one of these natural resources which are rich in active metabolites with potential use in pharmaceutical industries.

Materials and methods: In this study *Chlorella vulgaris* was collected from microalgae collection of the International Sturgeon Institute- Rasht- Iran. Antibacterial activities of hexane and ether extracts of *C. vulgaris* against gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* and Gram-negative bacterium *Aeromonas hydrophila* were evaluated. Algae was purely cultured to obtain the required volume and cell concentration for experiment and then the prepared biomass were extracted and Cannell et al. (1988) methods were used to examine antibacterial activities of hexane and ether extracts of the algae (1).

Results: The results of the study approved inhibitory properties of hexane and ether extracts of *C. vulgaris* against *A. hydrophila* and *B. subtilis* bacteria. The diameter of inhibition zone of hexane extract against *B. subtilis* and *A. hydrophila*, were 11-15.6 and 9.6- 11 mm and for ether extract were 12-18.6 and 7.6-16 mm respectively. Gas chromatography mass spectrophotometry was used to identify different substances in diethyl ether and hexane extracts. The main substances in ether extract included ketone compounds, esters, hydrocarbons, siloxane, Saylyl, terpenes and Hydrvsaylyl polyesters and in hexane extract the main substances were hydrocarbons, siloxane, Saylyl and Hydrvsaylyl are polyester.

Discussion and conclusion: The inhibitory effect of ether extract was higher than the hexane extract therefore it could be used as a solvent to extract antimicrobial compounds.

Key words: *Chlorella vulgaris*, Inhibitory properties, Extract, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*

* Corresponding author
Received: January 9, 2016/ **Accepted:** May 10, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۱۳۴- ۱۲۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱

بررسی فعالیت ضدباکتری عصاره‌های اتری و هگزانی ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در شرایط آزمایشگاهی بر باکتری‌های بیماری‌زا

زهرا شعبانزاد: کارشناس ارشد بوم‌شناسی آبزیان، دانشگاه گیلان، ایران، zahra.shabanzad@hotmail.com
جاوید ایمانپور نمین *: دانشیار هیدروبیولوژی و اکولوژی ماهیان، دانشگاه گیلان، ایران، imanpour@guilan.ac.ir
زهره رمضانپور: دانشیار اکولوژی و جلبک‌شناسی، گیلان، ایران، zohre66@gmail.com

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به دارو در میان انواع میکروارگانیسم‌ها، یافتن ترکیبات ضدمیکروبی از مواد طبیعی که آثار جانبی کمتری داشته باشند، از دیرباز مورد توجه پژوهشگران بوده است. ریزجلبک‌ها منابع غنی از متابولیت‌های فعال طبیعی هستند که می‌توانند در این زمینه در صنعت داروسازی استفاده شوند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سویهٔ ریزجلبک *Chlorella vulgaris* از مجموعهٔ ریزجلبک‌های انسیتو ماهیان خاویاری تهیه شد. فعالیت ضدباکتری عصاره‌های هگزانی و اتری علیه باکتری گرم‌مثبت *Bacillus subtilis* و باکتری گرم‌منفی *Aeromonas hydrophila* ارزیابی شد. جلبک موردبررسی به‌طور خالص کشت داده شد و پس از تأمین حجم مناسب جلبک با استفاده از روش کانل و همکاران، عصاره هگزانی و اتری آن استخراج شد. ارزیابی خاصیت آنتی‌باکتریال با استفاده از روش چاهک انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که عصاره‌های هگزانی و اتری جلبک *C. vulgaris* خاصیت مهارکنندگی علیه باکتری *B. subtilis* و *A. hydrophila* دارد. هالهٔ عدم‌رشد مشاهده‌شدهٔ عصارهٔ هگزانی علیه باکتری‌های *B. subtilis* و *A. hydrophila* به‌ترتیب در دامنهٔ ۱۵/۶-۱۱، ۱۱- ۹/۶ میلی‌متر و هالهٔ عدم‌رشد مشاهده‌شدهٔ عصارهٔ اتری به‌ترتیب در دامنهٔ ۱۸/۶-۱۲، ۱۶-۷/۶ میلی‌متر بود. ترکیبات عصاره‌های دی‌اتیل‌اتر و هگزان توسط کروماتوگرافی جرمی حجمی بررسی شد و مشاهده شدکه بخش اصلی این ترکیبات در عصارهٔ اتری: کتون، استر، هیدروکربن، سیلوکسان، سایلیل، ترپن و هیدروسایلیل استر و در عصارهٔ هگزانی: استر، هیدروکربن، سیلوکسان، سایلیل و هیدروسایلیل استر هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: در این بررسی عصارهٔ اتری اثر مهارکنندگی بیشتری در مقایسه با عصارهٔ هگزانی نشان داد؛ بنابراین می‌تواند به‌عنوان حلال مناسب جهت استخراج ترکیبات ضدمیکروبی به شمار آید.

واژه‌های کلیدی: *Chlorella vulgaris* , خاصیت مهارکنندگی, عصاره *Aeromonas hydrophila* , *Bacillus subtilis* ,

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

طیف وسیعی از انواع آنتی‌بیوتیک‌های سنتیک با ساختارهای شیمیایی گوناگون برای درمان بیماری‌های مختلف و عفونی در سراسر جهان استفاده می‌شوند. از طرفی آثار جانبی این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث بروز مشکلات فراوانی می‌شود (۲). ریزجلبک‌ها منابع غنی از پروتئین و سایر مواد مغذی شبیه به گیاهان آلی هستند و نقش مهمی را به‌عنوان تولیدکنندگان اولیه برای مصرف‌کنندگان مختلف در شبکهٔ غذایی ایفا می‌کنند. همچنین منبع غنی از کربوهیدرات و اسیدهای چرب ضروری به حساب می‌آیند (۳). متابولیت‌های اولیه یا ثانویه تولیدشده توسط این ارگانیسم‌ها از مواد فعال زیستی قابلِ‌استفاده در صنعت داروسازی هستند (۴-۶). اسیدهای چرب، ترکیبات آلیفاتیک هالوژنه، کربوهیدرات‌ها، فنول‌ها و ساپونین‌ها در جلبک‌ها فعالیت ضدمیکروبی دارند (۷). فعالیت ضدباکتری عصاره‌های سلولی و ترکیبات فعال جلبک‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده‌اند (۸-۱۰). *Chlorella vulgaris* یکی از مشهورترین ریزجلبک‌هاست. این جلبک میکروسکوپی با قطر ۲ تا ۱۰ میکرون ساکن آب‌های شیرین، مشابه سایر گیاهان از فعال‌ترین موجودات فتوسنتزکننده، دارای کلروفیل با تراکم بالا و پروتئین‌های با ارزش است. بخشی از خواص درمانی آن مربوط به غلظت بالای کلروفیل و ساختمان دیوارهٔ سلولی، به‌ویژه مواد تشکیل‌دهندهٔ دیوارهٔ سلولی آنها است. از عصارهٔ جلبک *Chlorella* در تهیهٔ لوازم آرایشی، بهداشتی و با توجه به پلی-ساکاریدهای موجود در آن در داروسازی استفاده می‌شود (۱۱). مطالعات زیادی بر فعالیت ضدباکتری ریزجلبک‌ها انجام شده است. پراکاش[1] و همکاران فعالیت ضدباکتری ۸ گونه جلبک آب شیرین علیه ۶ گونه از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی را بررسی کردند (۱۲). نیر[2] و کریشنیکا[3]، فعالیت ضدباکتری اعضای *Chlorophycea* مانند *Chlorella* sp. *Chlamydomonas* sp. و *Scenedesmus* sp. را علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی بررسی کردند (۱۳). چاکماک[4] و همکاران فعایت ضدباکتری جلبک *Dunaliella salina* را علیه باکتری‌های بیماری‌زای ماهی و انسان بررسی کردند (۱۴). اولین بررسی فعالیت ضدباکتری از جلبک *Chlorella* Sp. را پرات[5] و همکاران انجام داده‌اند که فعالیت ضدباکتری را به کلرولین[6] نسبت دادند. این اسیدچرب فعالیت مهاری علیه باکتری‌های گرم‌منفی و گرم‌مثبت دارد (۶). *B. subtili* باکتری گرم‌مثبت، میله‌ای‌شکل، هوازی و اسپوردار است (۲). این باکتری کمتر باعث بیماری در انسان می‌شود ولی می‌تواند غذا را آلوده کند و در نقاط مختلف جهان به‌عنوان عامل مسمومیت غذایی گزارش شده است. مسمومیت غذایی ناشی از *B. subtilis*، ناگهانی اتفاق می‌افتد و از نشانه‌های آن حالت تهوع، اسهال و استفراغ است که ۱۰ دقیقه تا ۴ ساعت بعد از مواجه با باکتری بروز می‌کند (۱۵). علت انتخاب *B. subtilis* فرصت‌طلب‌بودن و مقاومت بسیار بالای آن در محیط‌های مختلف است. *Aeromonas hydrophila* باکتری گرم‌منفی، متحرک هوازی و بی‌هوازی اختیاری

است که در محیط‌های آبی و دستگاه گوارش ماهیان سالم یافت می‌شود. این باکتری در شرایط استرس‌زا عامل اصلی مرگ‌ومیر در ماهیان آب شیرین است و موجب سپتیسمی همراه با خونریزی‌های جلدی و احشایی، تورم روده و مرگ می‌شود (۱۶). مطالعات مختلف تأثیر معنی‌دار عصاره‌های *C. vulgaris* بر اکثر باکتری‌های بیماری‌زا را نشان داده است (۱۱). ازاین‌رو با توجه به کشت آسان و تولید انبوه این ریزجلبک در شرایط آزمایشگاهی و به‌عنوان یک منبع تجدیدپذیر در تولید مواد دارویی، مطالعهٔ حاضر به‌منظور ارزیابی اثر ضدباکتری عصاره‌های اتری و هگزانی *C. vulgaris* بر دو سویه از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری نمونه‌ها: در این مطالعه تجربی سویه ریزجلبک *Chlorella vulgaris* از مجموعه ریزجلبک‌ها از انستیتو ماهیان خاویاری تهیه شد. ابتدا برای اطمینان از خالص‌بودن نمونه‌ها، خالص‌سازی به‌روش پلیت آگار بر محیط کشت جامد Zehnder انجام شد (۱۷). این کار برای به‌دست‌آوردن کلونی‌های خالص چندین بار تکرار شد. کلنی‌های موجود در پتری‌دیش و لوله‌های آزمایش کشت داده شد. بدین منظور ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع Zehnder به هر لوله آزمایش تزریق شد. سلول‌های جلبک با استفاده از آنس استریل‌شده روی شعله به لوله‌های آزمایش منتقل شدند. نمونه‌ها زیر لامپ فلورسنت (با شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس) به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۰/۵± ۲۴ درجه سانتیگراد پرورش یافتند. مراحل بعدی کشت به‌ترتیب در ارلن_مایرهای ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. سرانجام کشت در داخل ارلن‌مایرهای ۴۰۰۰ میلی‌لیتر با اعمال هوادهی صورت گرفت. سلول‌های جلبک پس از رسیدن به حجم و تراکم سلولی مناسب (۵۰×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر) از کشت برداشت شدند.

عصاره‌گیری: برای گرفتن عصارهٔ ریزجلبک از روش کانل و همکاران استفاده شد (۱). تغلیظ جلبک به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه با سانتریفیوژ انجام شد. برای خشک‌کردن بیومس، نمونه‌ها به‌مدت ۸ ساعت در دستگاه فریزدرای قرار داده شدند. سپس در هاون ساییده شدند. مقدار ۰/۲ گرم از بیومس خشک‌شده جلبک با ۵ میلی‌لیتر از حلال‌های هگزان و اتر به‌صورت جداگانه به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بر روی دستگاه هیتراستیرر قرار داده شد. مایع رویی با سانتریفیوژ جدا و برای خارج‌شدن حلال در دمای محیط قرار داده شد. تمام عصاره‌های خشک‌شده در میکروتیوپ‌های استریل جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای منفی ۱۶درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

میکروارگانیسم‌های موردبررسی: باکتری بیماری‌زای آبزیان *Aeromonas hydrophila* و باکتری بیماری‌زای انسانی *Bacillus subtilis* از سازمان پژوهان و انستیتو بین‌المللی ماهیان خاویاری تهیه شدند. محیط نوترینت آگار[۷] و تریپتون سوی آگار[۸] برای رشد باکتری استفاده شد. محیط کشت باکتری‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در درون دستگاه انکوباتور قرار داده شد. فعالیت ضدمیکروبی با استفاده از روش

چاهک‌گذاری تعیین شد. پس از طی مدت‌زمان لازم برای رشد باکتری‌ها در محیط نوترینت‌آگار و تریپتون-سوی‌آگار ۴۰ میکرولیتر از هر باکتری بر محیط کشت نوترینت‌آگار و تریپتون‌سوی‌آگار اضافه و با استفاده از سوآپ پنبه‌ای به‌صورت سفره‌ای کشت داده و در هر پلیت به‌وسیلهٔ انتهای پیپت پاستور سه چاهک در وسط محیط کشت ایجاد شد و از غلظت‌های(۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره در چاهک‌ها ریخته و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در درون دستگاه انکوباتور قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت هالهٔ عدم‌رشد باکتری‌ها بررسی و قطر آنها با خط‌کش شفاف در حد میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تمام مراحل در کنار شعله و شرایط استریل انجام پذیرفت (۱۲، ۱۸ و ۱۹).

کروماتوگرافی جرمی- حجمی: شناسایی و تخمین ترکیبات موجود در عصاره‌ها با استفاده از کروماتوگرافی جرمی-حجمی[۹] با دستگاه ۵۹۷۵ c Agilentانجام شد. ستون HP-5MS استفاده شد. برای آشکارسازی از سیستم یونیزاسیون الکترون با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت استفاده شد. گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل و سرعت جریان آن ۳ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد و تزریق نیز در دمای محفظهٔ تزریق ۳۰۰ درجه سانتیگراد انجام شد. تغییرات دمایی آون به‌صورت دمای ابتدایی ۵۰ درجه سانتیگراد، سپس ۱۲۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۲۷۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۵ دقیقه بود. ولتاژ مطلق ۱۱۱۸ ولت بود. تخمین کمی ترکیبات شناخته‌شده براساس سطح پیک نسبی انجام شد. تعیین ترکیبات براساس مقایسهٔ زمان بازداری نسبی و طیف جرمی با کتابخانه موجود در دستگاه (WILLY, NIST) انجام شد .

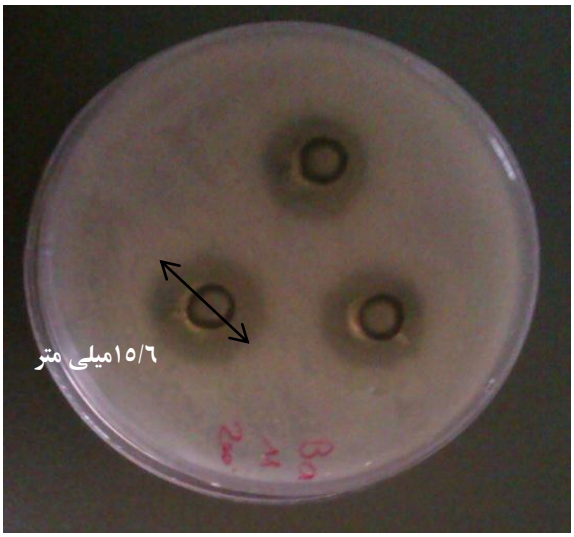
نتایج

آثار ضدباکتریایی عصارهٔ *C. vulgaris* بر گونه‌های باکتریایی *B. subtilis* و *A. hydrophyla* به‌وسیلهٔ ارزیابی قطر هالهٔ عدم‌رشد سنجش شد (شکل ۱، ۲، ۳ و۴). نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری عصارهٔ هگزانی و اتری ریزجلبک *C. vulgaris* در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که عصارهٔ هگزانی و اتری ریزجلبک *C. vulgaris* فعالیت ضدباکتری علیه باکتری‌های *B. subtilis* و *A. hydrophila* دارند و اثرگذاری عصارهٔ اتری بر هردو گونهٔ باکتری بیشتر از عصارهٔ هگزانی بود. چنان‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فعالیت ضدباکتری با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. این ویژگی یک فعالیت وابسته به دوز تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. در تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از گازکروماتوگرافی، عصارهٔ اتری *C. vulgaris* درصد بالایی از ترکیبات دی‌اتیل‌فتالات[۱۰] (۹۸درصد)، سیکلو پنتاتیک اسید[۱۱](۹۸درصد)، ۷-استیل -۶- اتیل ۱ و ۱و ۴و۴ – تترا متیل تترالین[۱۲] (۹۶درصد)، لیمونن[۱۳] (۹۶درصد)،ایکوسان[۱۴] (۹۳درصد)، ۱- هیدرو ایزواینـدول ۱ و ۳- (۲ هیدرو) دی تی یون و دو اتیل[۱۵](۹۰درصد) را نشان داد (جدول۲- شکل۵). درحالی‌که در عصارهٔ هگزانی لیمونن (۹۸درصد)، دی هیدرو متیل جاسمونات[۱۶] (۹۶درصد) ترکیبات غالب بودند (جدول۳- شکل۶).

جدول ۱- نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتری عصارهٔ هگزانی و اتری ریزجلبک *C. vulgaris* (میلی‌متر)

	عصارهٔ هگزانی (mg/ml)			عصارهٔ اتری (mg/ml)		
غلظت	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
B. subtilis	۱۱	۱۱/۳	۱۵/۶	۱۲	۱۲/۶	۱۸/۶
A. hydrophila	۹/۶	۱۰	۱۱	۷/۶	۱۱/۳	۱۶

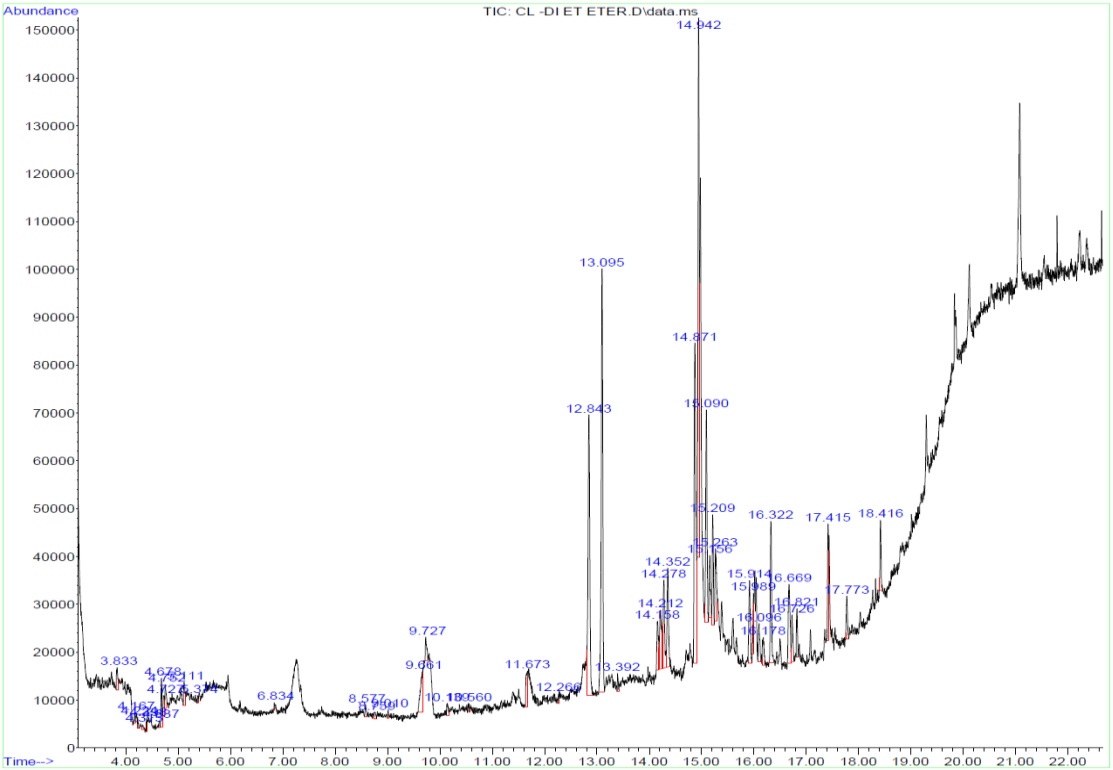
شکل ۱- هالهٔ عدمِ‌رشد عصارهٔ اتری *C. vulgaris* علیه باکتری *B. subtilis*



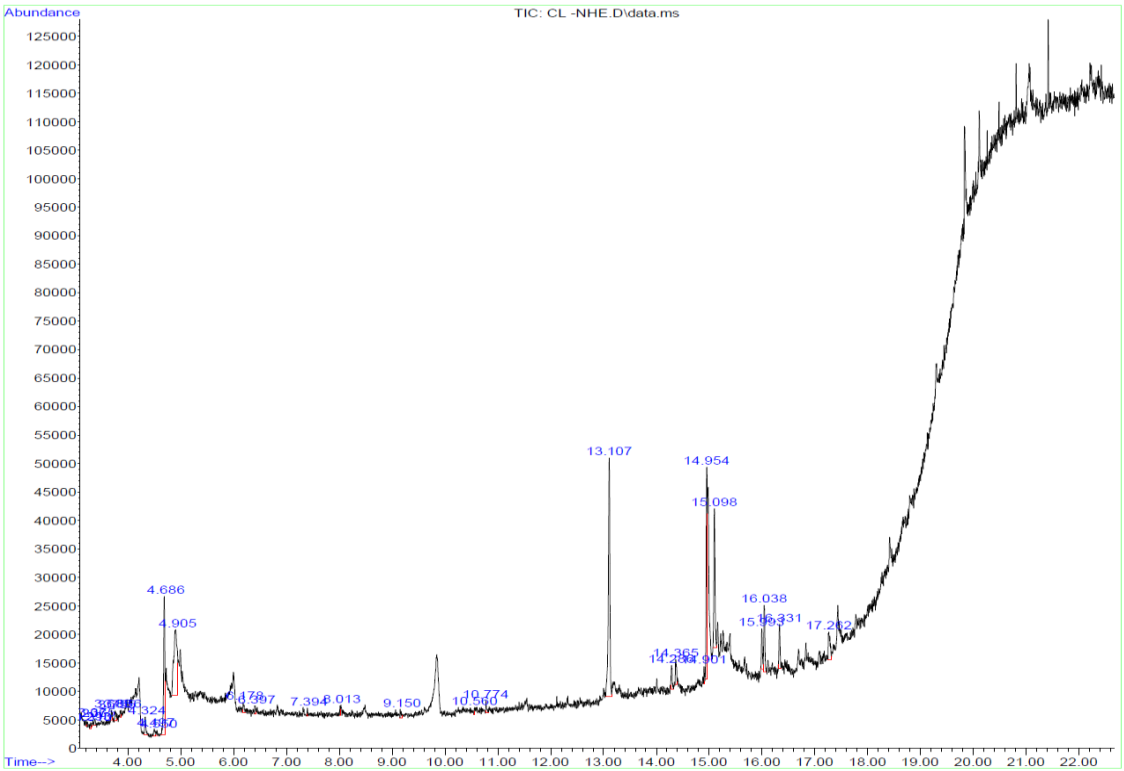
شکل۲- هالهٔ عدمِ‌رشد عصارهٔ هگزانی جلبک *C. vulgaris* علیه باکتری *B. subtilis*

شکل ۳- هالهٔ عدمِ‌رشد عصارهٔ اتری جلبک *C. vulgaris* علیه باکتری *A. hydrophila*

شکل ۴- هالهٔ عدمِ‌رشد عصارهٔ هگزانی جلبک *C. vulgaris* علیه باکتری *A. hydrophila*

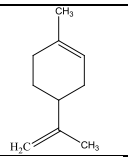
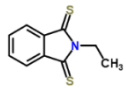
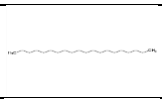
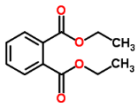
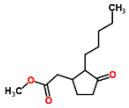
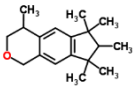
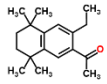


شکل ۵- کروماتوگرافی گازی-جرمی عصارهٔ اتری ریزجلبک *C. vulgaris*

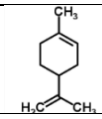
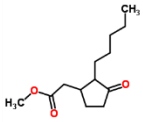


شکل ۶- کروماتوگرافی گازی-جرمی عصارهٔ هگزانی ریزجلبک *C. vulgaris*

جدول ۲- ترکیبات حاصل از کروماتوگرافی گازی– جرمی عصارهٔ اتری ریزجلبک *C.vulgaris*

دستهٔ ترکیبات شیمیایی	ساختار	فرمول بسته	٪	اسم ترکیب
هیدروکربن		$C_{10}H_{16}$	96	Limonene
هتروسیکل		$C_{10}H_9NS_2$	90	1H-Isoindole-1,3(2H)-dithione, 2-ethyl
هیدروکربن		$C_{20}H_{42}$	93	Eicosane
استر		$C_{12}H_{14}O_4$	98	Diethyl Phthalate
استر		$C_{13}H_{22}O_3$	98	Cyclopentaneacetic acid
هتروسیکل		$C_{18}H_{26}O$	95	Galaxolide
کتون		$C_{18}H_{26}O$	96	7-acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin

جدول ۳- ترکیبات حاصل از کروماتوگرافی گازی–جرمی عصارهٔ هگزانی ریزجلبک *C. vulgaris*

دستهٔ ترکیبات شیمیایی	ساختار شیمیایی	فرمول بسته	درصد	اسم ترکیب
هیدروکربن		$C_{10}H_{16}$	98	Limonene
استر		$C_{13}H_{22}O_3$	96	Dihydro methyl jasmonate

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مقاومت روزافزون ریزجلبک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و گرایش عمومی به به‌کارگیری ترکیبات طبیعی در مناطق مختلف دنیا، شناسایی میکروارگانیسم‌ها و بررسی آثار ضدمیکروبی آنها اهمیت خاصی پیدا کرده است. بسیاری از ریزجلبک‌های آب شیرین به‌عنوان منبع بالقوه از مواد ضدباکتری شناخته شده‌اند (۲۰). در بررسی حاضر مشاهده شد که عصارهٔ اتری و هگزانی حاصل از ریزجلبک *C. vulgaris* فعالیت مهارکننده بر باکتری *B. subtilis* و *A. hydrophila* دارد. در مقایسهٔ اثر ضدباکتریایی دو نوع عصاره بر دو سویه از باکتری، تمامی غلظت‌های عصاره‌های *C. vulgaris* علیه باکتری‌های *B. subtilis* و *A. hydrophila* خاصیت مهارکنندگی نشان دادند. عصارهٔ هگزانی تنها در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری *B. subtilis* (میانگین ۱۵٫۶میلی متر) فعالیت مهارکنندگی بالایی نشان داد. درحالی‌که تأثیر این عصاره در همهٔ غلظت‌های دیگر علیه باکتری *A. hydrophila* دارای خاصیت مهارکنندگی متوسط بود. عصارهٔ اتری در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *B. subtilis* (میانگین ۱۸٫۶۶میلی‌متر) و *A. hydrophila* (میانگین ۱۶ میلی متر) فعالیت مهارکنندگی بالایی نشان داد. خاصیت مهارکنندگی این عصاره علیه باکتری *A. hydrophila* در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ضعیف بود. در مقایسه بین دو عصاره، بزرگ‌ترین قطر هالهٔ عدم‌رشد در باکتری‌های گرم‌مثبت (میانگین ۱۸٫۶میلی‌متر) و گرم‌منفی(۱۶میلی‌متر) مربوط به عصارهٔ اتری بود. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های اتری این ریزجلبک بر باکتری *B. subtilis* با مطالعهٔ صفری[17] مقایسه شد. در مطالعهٔ وی عصارهٔ استونی فعالیت بیشتری را علیه باکتری *B. subtilis* نشان داده بود که تقریباً مشابه فعالیت دی‌اتیل‌اتر بر باکتری *B. subtilis* در این مطالعه است (۲). با توجه به استفاده از حلال‌های مختلف برای فعالیت‌های ضدباکتریایی، هنوز بهترین نوع حلال برای استخراج عصاره نامشخص است (۲۱). تأثیر نوع حلال در عصاره‌گیری جلبک روی میزان خواص ضدباکتریایی در پژوهش رانیا[18] و همکاران به‌خوبی مشهود است. آنها سه گونهٔ سیانوباکتری *Anabaena oryzae*، *Arthrospira platensis*، *Tolypothrx ceitonica* و دو ریزجلبک *Chlorella* sp. و *Scenedesmus quadricauda* را با چهار حلال متانول، اتانول، دی‌اتیل‌اتر و استون عصاره‌گیری کردند که این عصاره‌ها خواص ضدباکتری علیه باکتری *B. subtilis* نشان دادند و به‌ترتیب هالهٔ عدم‌رشدی معادل ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌متر تشکیل دادند. بالاترین فعایت ضدباکتری علیه *B. subtilis* در عصاره‌های استونی و اتری مشاهده شد (۲۲). نتایج حاصل از مطالعهٔ کوکوئو[19] و همکاران نشان داد عصارهٔ اتری بیشترین تأثیر را علیه باکتری‌های گرم‌منفی دارد درحالی‌که نتایج آل واتنانی[20] و همکاران نشان داد که تأثیر عصارهٔ اتری بر باکترهای گرم‌منفی از سایر عصاره‌ها بیشتر است که با نتایج حاصل از این مطالعه همسو است (۲۳ و۲۴). شاید علت آن طبیعت قطبی‌ترکیبات ضدمیکروبی جلبک و خاصیت قطبی‌تر دی‌اتیل‌اتر باشد. *B. subtilis* باکتری گرم‌مثبت محسوب می‌شود که برخلاف باکتری‌های گرم‌منفی دیوارهٔ سلولی چندلایه ندارد که این خود می‌تواند سبب شود که ترکیبات فعال به‌آسانی در آن نفوذ کند (۲۵). پریا[21] آثار ضدمیکروبی عصارهٔ اتری *C. vulgaris* علیه گونه‌های باکتریایی *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Micrococcus luteus* و *Klebsiella pnemoniae* به‌وسیلهٔ ارزیابی هالهٔ عدم‌رشد، قطر هاله و

ارزش MIC سنجش کرد. همهٔ عصاره‌های اتری *C. vulgaris* در برابر همهٔ باکتری‌ها تست شد، میزان خاصیت ضدباکتری بستگی به میزان مصرفی عصاره‌ها دارد (۳). در بررسی‌هایی که یوما[۲۲] و همکاران بر جلبک سبز *Chlorococcum humicola, Chlorella vulgaris, Desmococcus Olivaceous* با استفاده از عصاره‌های اتری، متانولی، اتانولی و دی‌متیل‌سولفواکسید [۲۳]علیه ۵ باکتری گرم‌منفی و یک باکتری گرم‌مثبت انجام دادند، حداکثر فعالیت ضدباکتری توسط عصارهٔ اتری ریزجلبک *C. vulgaris* بر باکتری‌های گرم‌مثبت مشاهده شد (۲۶). ترکیبات ضدمیکروبی مشتق‌شده از جلبک‌های آب شیرین شامل گروه‌های مختلفی از مواد شیمیایی مانند ترکیبات آلیفاتیک هالوژنه، ماکرولیدها، پپتید حلقوی، پروتئین‌ها، پلی‌کتیدها، ترپن‌ها، ساپونین‌ها، کربوهیدرات‌ها، فنول‌هاو اسیدهای چرب هستند (۷ و ۲۷) که آثار ضدباکتری آنها در شرایط آزمایشگاهی بر باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی اثبات شده است (۸، ۱۰ و ۲۸) و این فعالیت‌ها وابسته به عوامل بسیاری ازجمله گونهٔ جلبک، اندامک مورداستفادهٔ جلبک، حلال‌های مورداستفاده، میکروارگانیسم‌ها، فصل و شرایط رشد و نگهداری جلبک‌ها هستند (۱۲، ۲۹، ۳۰ و ۳۱). در بررسی کروماتوگرافی جرمی-حجمی عصاره‌های اتری و هگزانی ترکیب لیمونن با درصد بالا در هر دو عصاره مشترک است. کاماردا[۲۴] و همکاران و شائو[۲۵] و همکاران بیان کردند لیمونن موجود در عصاره، یکی از ترکیبات اصلی در فعالیت‌های ضدمیکروبی است. لیمونن به‌عنوان رایحه و طعم‌دهنده در داروها، مواد غذایی و شوینده‌ها و به‌عنوان حلال در آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی استفاده می‌شود، این ترکیب باعث افزایش عملکرد در تحریک گیاهان می‌شود و فعالیت ضدباکتری قوی در مقایسه با ترکیبات تجاری مصنوعی دارد که می‌توان از آن به‌عنوان یک ترکیب طبیعی حاوی مواد ضدمیکروبی استفاده کرد. شاید بتوان خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های این ریزجلبک را به ترکیب لیمونن نسبت داد (۳۲، ۳۳ و ۳۴). احتمالاً وجود اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع اثبات‌کننده اثر ضدمیکروبی این ریزجلبک باشد. دزبویز[۲۶] و همکاران، حضور اسید چرب غیراشباع در عصارهٔ متانولی از ریزجلبک *C. vulgaris* را گزارش دادند که یک اسیدچرب اشباع نشده در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بوده و بسیار فعال است. اثر ضدمیکروبی می‌تواند مربوط به ترکیبات فرار در نمونه مانند ترپنوئید و اسیدهای‌چرب فرار باشد (۳۵). چو[۲۷] و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی و ترپنوئیدها دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند و قادرند از طریق تخریب غشاء از رشد میکروارگانیسم جلوگیری کنند (۳۶). یوما و همکاران و باگاواتی[۲۸] و همکاران فعالیت ضدباکتری از *C. vulgaris* را به اسیدهای‌چرب، ترپن‌ها، فنول‌ها و کربوهیدرات‌ها نسبت دادند (۲۱، ۲۷). بررسی حاضر نشان داد که می‌توان از عصاره‌های *C. vulgaris* برای کنترل عوامل بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در صنعت داروسازی و آبزی‌پروری استفاده کرد. ازلحاظ اکولوژیکی این احتمال وجود دارد که متابولیت‌های ثانویهٔ تولیدشده توسط جلبک‌های مختلف، می‌توانند در حفاظت از بیماری‌های انسان و ماهی‌ها نقش داشته باشند. تجدیدپذیربودن ریزجلبک‌ها (با کشت یا به‌طور طبیعی) برای توسعهٔ محصولات ضدباکتری مزیت دیگر این متابولیت‌ها است و به‌لحاظ اقتصادی می‌توان روش‌های استاندارد تهیهٔ عصاره در مقیاس بزرگ با راندمان ضدباکتری بالا و تجدیدپذیر را توسعه داد.

References

(1) Cannell R., Ania M., Owsianka M. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *British Phycological Journal* 1988; 23(1): 41-44.

(2) Moniri R., Mosayebi Z., Movahedian AH., Mossavi GhA. Increasing trend of antimicrobial drug-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* causing septicemia. *Iranian Journal Pub Health* 2006; 35(1): 58-62.

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

(4) Safari M., Ahmadi S., Soltani N. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of some species of cyanobacteria In vitro. *Journal of Biology of Microorganisms* 2015; 14(4): 111-130.

(5) Febles C. In vitro study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios* 1995; 34(2): 181-192.

(6) Pratt R., John F., Oneto J. Studies on Chlorella vulgaris. X. Influence of the age of the culture on the accumulation of chlorellin. *American Journal of Botany* 1944; 405-408.

(7) Kannan R., Ragupathi R., Rajasekaran A., Perumal A. In vitro antioxidant activities of ethanol extract from Enhalus acoroides (LF) Royle. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012; 3(11): 898-901.

(8) Borowitzka M. Algal biotechnology products and processes—matching science and economics. *Journal of applied phycology* 1992; 4(3): 267-279.

(9) Ostensvik O. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria-a comparative study of bacterial bioassays. *Journal of applied microbiology* 1998; 84(6): 1117-1124.

(10) Goud M., Prakash J., Seshikala D., Singara Charya MA. Antibacterial activity and biomolecular composition of certain fresh water microalgae collected from River Godavari (India). *International Journal on Algae* 2007; 9(4), 350-358.

(11) Safari R. Effects of Chlorella vulgaris on some pathogenic bacteria causing food poisoning. *Journal of Food Science and Technology* 2005; 4(1): 66-73.

(12) Prakash J., Johnson M., Jeeva S. Antimicrobial activity of certain fresh water micro-algae from river Thamirabarani, Tamilnadu, South India. *Asian Pac Journal Trop Biomed* 2011; 1: 168-171.

(13) Nair B., Krishnika A. Antibacterial activity of freshwater Microalga (Sc e ne de sm us sp.) against three bacterial strains. *Journal Bioscience Research* 2011; 2(4): 160-165.

(14) CakmakY., Murat K., Meltem A. Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from dunaliella salina, a green microalga. *Experimentl and clinical Sciences* 2014; 13: 679-690.

(15) Tavakoli H., Akhlaghi M. Evaluation of changes in lysozyme, immunoglobulins, and hematocrit blood cells in *rainbow trout* after experimental infection with the pathogen *Aeromonas hydrophila.___Journal of Veterinary Research.* 2010; 64(2): 157-162

(16) Safari R, Abtahi B, Tayybi P_Inhibitory Effects of *Chlorella vulgaris* algae extract in culture media on *Bacillus subtilis* bacteria. *Journal of Food Science and Technology.* 2014; 3(2): 87-92.

(17) Kotai J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research* 1972; 11(69): 5-11.

(18) Inci T. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology* 2006; 30(3): 171-175.

(19) Sharma A., Kanika Sh. Should solubility and zone of inhibition be the only criteria for selection of solvent in antimicrobial assay. *Advances in Biological Research* 2011; 5(5): 241-247.

(20) Bhagavathy S., Sumathi P., Bell I. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2011; 1(1): 1-7.

(21) Zheng Y., Chen Y., Lu H. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with threedifferent solvents. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 2001; 19(4): 327-331.

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

(23) Kokou F., Makridis P., Kentouri M., Divanach P. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research* 2012; 43(10): 1520-1527.

(24) Al-Wathnani H., Ara I., Tahmaz R., Al-Dayel T., Bakir M. Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast. *Journal Medicinal Res*earch 2012; 6(18): 3425-3433.

(25) Ördög V., Stirk W., Lenobel R., Bancířová M., Strnad M., Van Staden J., et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology* 2004; 16(4): 309-314.

(26) Uma R., Sivasubramanian V., Niranjali Devaraj S. Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus olivaceous, Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal Algal Biomass Utln* 2004; 2: 74-81.

(27) Wijesinghe W., Jeon Y. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Journal Carbohydrate Polymers* 2012; 88(1): 13-20.

(28) Kolanjinathan K., Ganesh P., Govindarajan M. Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2009; 13(3): 173-177.

(29) Nelson M., Phleger C., Nichols P. Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern Pacific Ocean. *Botanica Marina* 2002; 45(1): 58-65.

(30) Freile-Pelegrin Y., Morales J. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botanica Marina* 2004; 47(2): 140-146.

(31) Radhika D., Veerabahu C., Priya R. Antibacterial activity of some selected seaweeds from the Gulf of Mannar coast, South India. *Asian Journal Pharm Clinnical Res*earch 2012; *5*(4): 276-282.

(32) Camarda L., Dayton T., Di Stefano V., Pitonzo R., Schillaci D. Chemical composition and antimicrobial activity of some oleogum resin essential oils from Boswellia spp. (Burseraceae). *Annali di chimica* 2007; 97(9): 837-44.

(33) Shao Y., Ho C., Chin C., Badmaev V., Huang M. Inhibitory activity of boswellic acids from Boswellia serrata against human leukemia HL-60 cells in culture. *Planta medica* 1998; 64(4): 328-331.

(34) Rancic A., Sokovic M., Van Griensven L., Vukojevic J., Brkic, D., Ristic M. Antimicrobial activity of limonene. *Lekovite sirovine* 2003.

(35) Desbois A., Mearns-Spragg A., Smith V. A fatty acid from the diatom Phaeodactylum tricornutum is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Marine Biotechnology* 2009; 11(1): 45-52.

(36) Cho W., Choi J., Lee K., Chung M., Pyun Y. Antimicrobial activity of Toilin Isolated from Torilis japonica Fruit against *Bacillus subtilis*. *JFS M: Food Microbiology and Safety* 2008; 1: 37- 43.

[1]- Prakash
[2]- Nair
[3] Krishnika
[4]- Cakmak
[5]- Pratt
[6]- Chlorellin
[7]- Nutrient agar
[8]- Tryptone soya agar
[9]- Gas Chromatography- Mass Spectrum
[10]- Diethyl Phthalate
[11]- Cyclopentaneacetic acid
[12]- 7-acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin
[13]- Limonene
[14]- Eicosane
[15]- 1H-Isoindole-1,3(2H)- dithione, 2-ethyl
[16]- Dihydro methyl jasmonate
[17]- Safari
[18]- Rania
[19]- Kokou
[20]- Al-Wathnani
[21]- Priya
[22]- Uma
[23]- Dimethyl sulfoxide
[24]- Camarda
[25]- Shao
[26]- Desbois
[27]- Cho
[28]- Bhagavathy