مقایسه قدرت ضد رادیکالی و ضد باکتریایی ماکروجلبک هادر سواحل شمالی خلیج فارس

محسن حیدری[۱]، حسین ذوالقرنین*[۱]، نسرین سخایی[۱]، علی میرزایی[۲]، عبدالعلی موحدی نیا[۱]

* zolgharnein@kmsu.ac.ir

۱-دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر-دانشکده علوم دریایی واقیانوسی
۲-عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج بخش بیوشیمی

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۳

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد اکسیدانی با آزمون های DPPH، FRAP، RP و PMB و ضد باکتریایی به دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک عصاره هیدروالکلی(اتانول ۷۰ درصد) سه گونه ازجلبک های سبز، قهوه ای و قرمز در سواحل خلیج فارس بود. در این مطالعه بهترین فعالیت ضد اکسیدانی و پتانسیل مهار با رادیکال آزاد DPPH و بهترین فعالیت ضد اکسیدانی با آزمون RP را عصاره هیدروالکلی گونه *Entromorpha intestinalis* از جلبک های سبز و کمترین این مقادیر با این دو آزمون را جلبک قهوه ای *Cystoseira myrica* و بالاترین فعالیت ضد اکسیدانی با استفاده آزمونFRAP را جلبک سبز *E. Intestinalis*و کمترین این فعالیت با این آزمون را جلبک قرمز گونه*Gracilaria corticata* داشت. با آزمونPMBبالاترین فعالیت ضد اکسیدانی را جلبک قرمز گونه *G. corticata* داشت. به طور کلی فعالیت ضد اکسیدانی جلبک سبز *E. intestinalis* از بقیه جلبک های مورد مطالعه دیگر با آزمون هایدی فنیل پیکریل هیدرازیل، احیاء یون فریک و توان احیا کنندگی فعالیت بالایی را نشان داد. همچنین هیچ یک از عصاره هیدروالکلی جلبک های مورد مطالعه خواص ضد باکتریایی از خود نشان ندادند.

لغات کلیدی : ضد اکسیدانی، آنتی باکتریال،جلبک های سواحل خلیج فارس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیاکلی.

*نویسنده مسئول

مقدمه

جلبک های دریایی از مهمترین تولیدکنندگان در محیط های دریایی، دارای اهمیت اکولوژیکی وسیعی در محیط زندگی شان هستند. تعدادی از جلبک های دریایی از منابع غذایی در آسیا به شمار می روند که حاوی مواد مغذی ضروری نیز هستند (Taskin *et al*., 2007). جلبک‌ها در صنایع غذایی، تغذیه دام، پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و برای غنی سازی خاک استفاده می-شوند(Horincar *et al*., 2011).

فعالیت های بیولوژیکی در ترکیبات زیستی طبیعی فعال در جلبک ها دارای اثرات گسترده ای همچون به عنوان ضد باکتریایی (Stirk *et al*., 2007)، ضد قارچی (Volka and Furkert., 2006)، ضد توموری (Jiao *et al*., 2009) و فعالیت های آنتی اکسیدانی هستند. جلبک‌های دریایی تنوع وسیعی از متابولیت‌های شیمیایی در محیط بالقوه خود دارند که در برابر ارگانیسم‌های خارجی از خود دفاع می‌کنند (Bhadury and wright., 2004; Smit, 2004).

استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها باعث بوجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم‌ها و افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیک‌ها در سراسر جهان شده است. تحقیقات در رابطه با عوامل ضد میکروبی جدیدکه به طور طبیعی تولید می‌شوند برای دستیابی به منابع نوین دارویی از اهمیت فراوانی بر خوردار است (Gonzalez *et al*., 2001; Okeke *et al*., 2005).

فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در برخی از جلبک‌های قرمز ، قهوه ای و سبز مورد مطالعه قرار گرفته و نشان داده شده که خواص آنتی اکسیدانی آن‌ها متناسب با محتوای ترکیبات آنتی اکسیدانی آنهاست (Zubia *et al*., 2007). تنوع و ماهیت شیمیایی ضد اکسیدان‌ها باعث طراحی مجموعه‌ای از آزمایشات که بتوانند فعالیت ضد اکسیدان را اندازه گیری نماید شده است (Bocanegra *et al*., 2009).

جاسبی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که عصاره آبی *Cystoseira myrica* بالاترین خاصیت پاکسازی رادیکالی و عصاره متانولی کمترین خاصیت پاکسازی رادیکالی را نیز دارد. فراستی و همکاران در سال۲۰۱۳ خواص ضداکسیدانی دو گونه از جلبک های سبز خوراکی سواحل خلیج فارس را مطالعه کردند.

هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی سه گونه جلبکی سبز، قرمز و قهوه ای (*Entromorpha intestinalis*، *Cystoseira myrica* و *Gracilaria corticata*) سواحل خلیج فارس در استان بوشهر بود.

مواد وروش‌ها

عملیات نمونه برداری در اواخر فصل بهار و اوایل تابستان سال ۱۳۹۱ و در زمان حداکثر جزر از چهار منطقه بالای میان کشندی[1]، میان میان کشندی[2]، پایین میان کشندی[3] و زیرکشندی[4] سواحل صخره ای و جزر و مدی استان بوشهر(سه ایستگاه گناوه (۲۹° ,۳۹′N و ۲۴ ′E ,۵۰°)، دانشگاه بوشهر(۲۸°, ۵۴′N و ۴۹′E ,۵۰°) و ایستگاه نیروگاه اتمی بوشهر(۵۰′N ,۲۸° و ۵۲′E ,۵۰°) صورت گرفت. جلبک های جمع‌آوری شده را درون جعبه یونولیتی حاوی یخ نگه‌داری و سپس به آزمایشگاه (پژوهشکده اقیانوس‌شناسی بوشهر) منتقل شدند. در آزمایشگاه جلبک‌های مورد نظر را با آب معمولی کاملا و با دقت شسته سپس درون آب مقطر غوطه ور کرده (برای خارج شدن املاح) و هر چند ساعت آب آنها تعویض شد. این کار تا سه مرحله تکرار و بعد از آن روی پارچه تمیزی در سایه گسترانیده و طی سه روز خشک شدند. نمونه ها بعد از خشک شدن توسط آسیاب برقی کاملا به صورت پودر در آمدند(Salehi *et al*., 2005).

در آزمایشگاه جهت شناسایی هر یک از گونه‌ها خصوصیات ریخت شناسی آن‌ها (رنگ، اندازه، پهنک‌ها و...) ثبت شده و سپس مشخصات مذکور به کمک کلیدهای شناسایی معتبر (Abbott *et al*., 1976; قرنجیک و روحانی قادیکلایی، ۱۳۸۸; سایت مرجع Algae base) و دیگر تحقیقات انجام شده در این زمینه تطبیق داده شد و در نهایت شناسایی نمونه های جلبکی صورت گرفت.

عصاره گیری و بررسی ضد باکتریایی خواص ضد اکسیدانی و جلبک های

عصاره هیدروالکلی جلبک ها به روش ماستراسیون (خیساندن) با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه و درتاریکی انجام شد Salehi *et al*., (2005).

1-Upper Mid Litoral
2-Mid Mid Litoral
3-Lower Mid Litoral
4-Infra Litoral

بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره جلبک های موردمطالعه

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ها، باکتری های لیستریا مونوسیتوژنز *Listeria monosytogenes*13932)، اشریشیاکلی (*E. coli*) 25922 از انستیتو پاستور تهران خریداری و در فریزر نگهداری شدند.

تست‌های آنتی باکتریال به روش‌های دیسک دیفیوژن[5] و چاهک[6] انجام شد. در روش دیسک دیفیوژن از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت مولر هینتون براث سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از سواب بر سطح محیط مولر هینتون آگار، کشت یکنواختی از باکتری ها صورت گرفت. سپس دیسک بلانک (PadtanTeb co. 6.4 mm) آغشته به ۲۵ میکرولیتر از عصاره های مورد نظر را در مرکز آن قرار داده. بعد از این مرحله پلیت‌ها به انکوباتور انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از این مدت با اندازه‌گیری هاله-های عدم رشد میزان حساسیت یا مقاومت باکتری ها در غلظت‌های مختلف عصاره‌ها مشخص شدند. در روش چاهک نیز پس از آماده کردن سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند، کشت یکنواختی از باکتری‌ها در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفت. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی متر در سطح محیط ایجاد کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های متفاوت عصاره ها را در چاهک ها ریخته و به مدت ۲۴ساعت گرماگذاری شدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC[7]) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)[8] صاره ها به روش رقت میکرو چاهک[9] با استفاده از چاهک های ۹۶ تایی انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن را در چاهک ها ریخته سپس از هر کدام از عصاره ها ۱۰ سری رقت به صورت سری دوتایی[10] تهیه شد و ۱۰۰میکرولیتر از رقت های تهیه شده از هرکدام از عصاره ها، به سوسپانسیون میکروبی در میکروپلیت اضافه گشت. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. جذب نوری، قبل و بعد از انکوباسیون با استفاده از دستگاه قرائت گر الیزا (Biotek/USA) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس کشت گسترده ای از چاهک هایی که تغییری در جذب نوری آنها مشاهده نشد، در محیط نوترینت آگار صورت گرفت و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. رشد در این محیط نشان دهنده حداقل غلظت ممانعت کنندگی و عدم رشد نشان دهنده حداقل غلظت کشندگی بود که قادر بوده باکتری را از بین ببرد.

بررسی فعالیت ضداکسیدانی

۱.ارزیابی فعالیت ضد اکسیدان بوسیله رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH): فعالیت ضد اکسیدان تام نمونه های عصاره توسط روشون گادو و همکاران ارزیابی شد (Von Gadow *et al*., 1997). بر طبق این روش، ۲/۴ میلی گرم پودر DPPH در۱۰۰ میلی لیتر اتانول خالص حل شد.در لوله آزمایش به ۰/۰۲۵ میلی لیتر نمونه یا محلول استاندارد ترولکس، ۱ میلی لیتر محلول الکلی DPPH اضافه و مخلوط شد. همچنین از محلول DPPH· به عنوان کنترل استفاده گردید. بعد از ۱۰ دقیقه قرار دادن در تاریکی و دمای محیط ، جذب نوری نمونه ها قرائت شدند. برای رسم منحنی استاندارد از محلول ترولکس با غلظت ۱۰۰۰-۱۰۰میکرومول استفاده شد.درصد فعالیت خنثی سازی رادیکالی عصاره ,RSA[11] بر اساس فرمول زیر بدست آمد.

$A_{Control}$ =میزان جذب کنترل در زمان صفر (t=0).

A sample =میزان جذب نمونه در زمان ۶ دقیقه (t=6min)

$$\%RSA=\frac{(A_{Control}-A_{Sample})}{A_{Control}}\times 100$$

فعالیت ضد اکسیدان نمونه‌های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره (µmoltrolex/g) بیان شد.

درصد فعالیت خنثی سازی رادیکالی عصاره (RSA) برای هر نمونه بدست آمد و سپس فعالیت ضد اکسیدان

[5]-disk diffusion

[6]-Well method

[7]- Minimum inhibitory concentration

[8]Minimum Bactericide Concentration

[9]- Micro well dilution

[10]- Two Fold Dilution

[11] Radical Scavenging Activity

نمونه ها ی عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس بر گرم عصاره محاسبه شد.

۲.اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی از طریق آزمون توان آنتی اکسیدانی احیاء یون فریک(FRAP)[۱۲]:

در این آزمون از روش بنزی و استرین با اندکی تغییر استفاده شد (Benzie *et al.*, 1996). محلول کاری FRAP بوسیله مخلوط کردن ۱۰ میلی لیتر بافراستات ۳۰۰ میلی مول (pH=۳/۶)، ۱میلی لیتر ۲و۴ و۶ تری-۲- پیریدیل- S-تریازین(TPTZ)۱۰ میلی مول (حل شده دراسید کلریدریک ۴۰ میلی مول) و ۱ میلی لیتر کلرید آهن ۲۰ میلی مول روزانه تهیه می شد. در لوله آزمایش به ۰/۰۲ میلی لیتر عصاره (با غلظت ۱ میلی گرم /میلی لیتر) یا محلول استاندارد آبی سولفات آهن (غلظت ۰/۳۷-۰/۱۸۵ میکرومول)، ۱ میلی لیتر از محلول کاری FRAP اضافه و مخلوط گشت. مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه ها قرائت شدند. فعالیت احیا کنندگی نمونه ها ی عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول آهن در گرم عصاره محاسبه شد.

۳.اندازه‌گیری فعالیت ضداکسیدان به طریق فسفومولیبدنم (PMB):

برای اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسیدانی عصاره ها با این آزمون از روش پریتو، پنیدا و اگولار استفاده شد(Prieto *et al.*,1999). به ۰/۱ میلی لیتر از نمونه های عصاره مورد مطالعه (غلظت ۱میلی گرم بر میلی لیتر) یا محلول استاندارد ترولکس (غلظت ۰/۴-۱/۶ میکرومول)، ۱ میلی لیتر از محلول معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مول ، فسفات سدیم ۲۸ میلی مول و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مول) اضافه و مخلوط شد . نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد قرائت شد. فعالیت ضد اکسیدان نمونه های عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکرومول ترولکس/ گرم عصاره محاسبه شدند.

۴.اندازه‌گیری فعالیت ضد اکسیدان به روش توان احیا کنندگی (RP):

پتانسیل احیاکنندگی نمونه‌ها و استاندارد طبق روش سینگ و راجینی اندازه گیری شدند (Oyaizu *et al.*, 1989). به ۰/۱میلی لیتر عصاره (با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) یا محلول استاندارد بوتیل هیدرواکسی آنیزول، یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۶ و ۱ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۰/۱٪ اضافه و مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. ۱میلی لیتر از محلول بالائی حاصل از (سانتریفوژ یخچال دار یونیورسال هیتاچی کا دو اس دی ۷۲۰۰ آلمان) را با ۰/۲ میلی لیتر محلول ۰/۱٪ کلروفریک و یک میلی لیترآب مقطر مخلوط کرده و جذب نوری آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد.

ازآزمون T-test جهت مقایسه خواص ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره جلبک های مورد مطالعه استفاده شد. نرمال بودن داده ها توسط آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت. گروه ها در سطح $p<۰/۰۵$ معنی دار می باشند. در صورت معنی دار بودن آنالیز داده ها با استفاده از روش های آنالیز آماری آنالیز واریانس یک سویه با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS نسخه ۱۸ برای بررسی نتایج آزمون ها و مقایسه میانگین عصاره های مختلف استفاده شد. تمامی اندازه گیری ها برای هر نمونه جلبکی سه بار تکرار و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیارگزارش شد(Jimenez *et al.*, 2011).

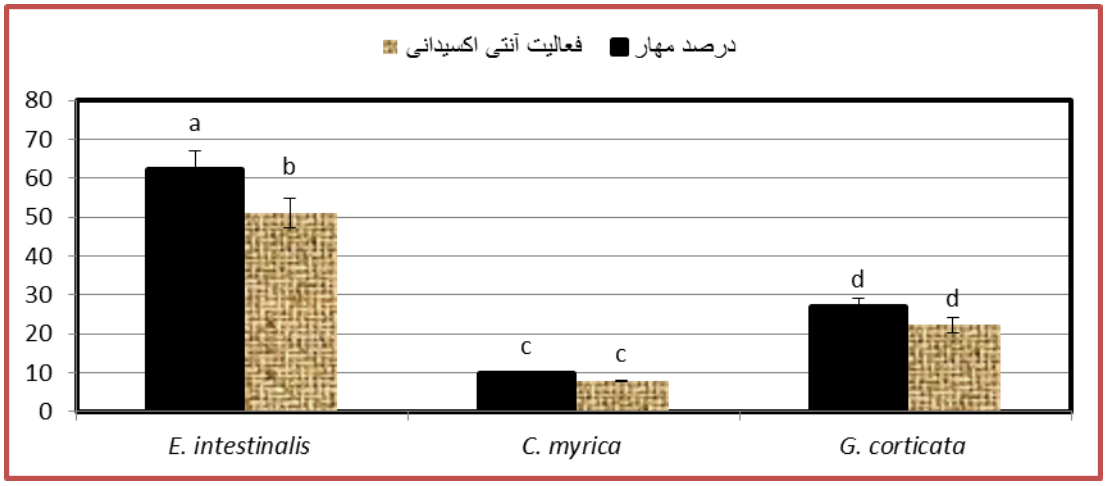
نتایج

خواص ضداکسیدانی

۱.ارزیابی فعالیت ضد اکسیدان بوسیله رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH):

باتوجه به شکل شماره۱ بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی(۳/۸±۵۱/۰۶) (میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره) و درصد مهار(۴/۷±۶۲/۳۹) با آزمون رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل مربوط به جلبک سبز*E. intestinalis* و کمترین مقدار مربوط به جلبک قهوه‌ای *C. myrica* (۰/۲۵±۷/۸) (میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره) و (۰/۳۳±۹/۸۲) بود.

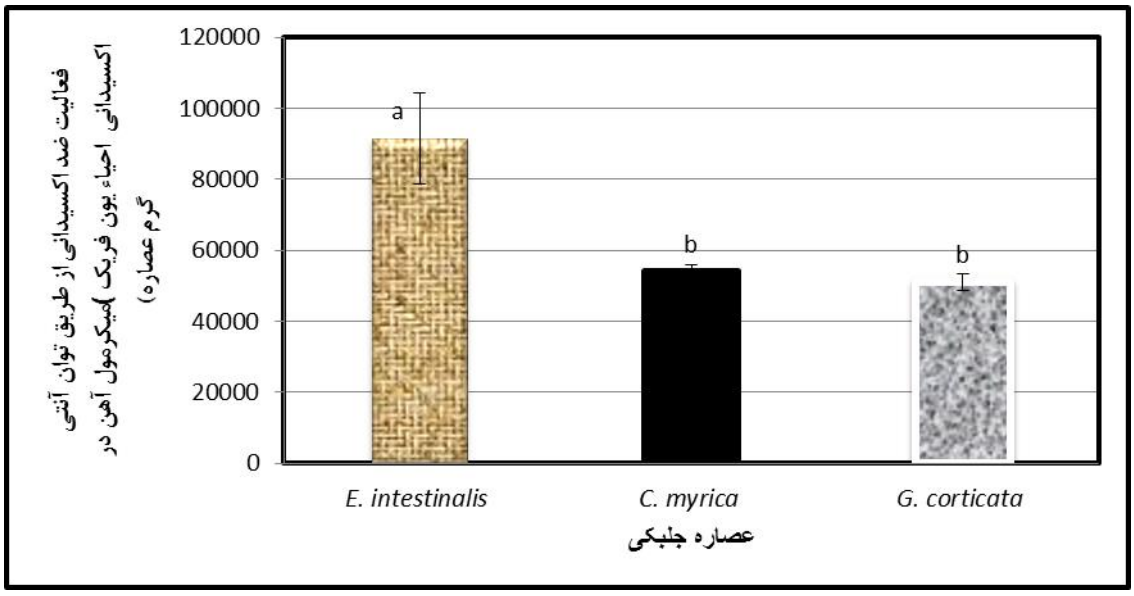
[12] - Ferric reducing ability of plasma



شکل ۱: مقادیر درصد مهار و فعالیت ضد اکسیدانی(میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره)در نمونه ها با آزمون رادیکال آزاد (DPPH) - حروف نامتشابه اختلاف آماری معنی داری را نشان می دهد.

۲.اندازه گیری خواص آنتی اکسیدانی از طریق آزمون توان آنتی اکسیدانی احیاء یون فریک (FRAP)

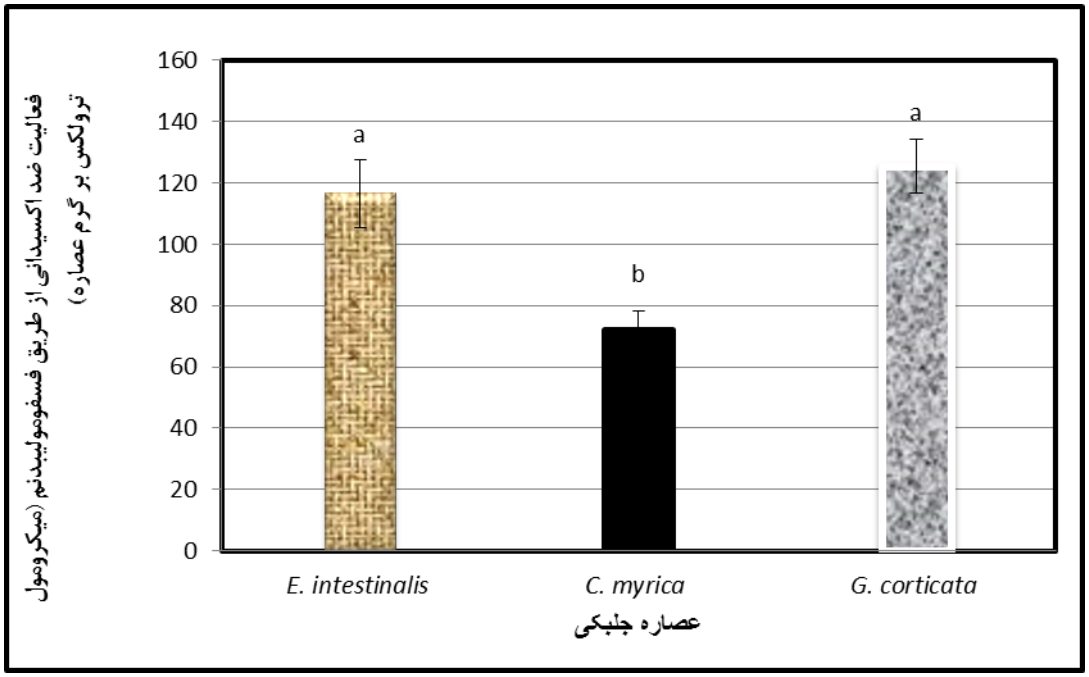
باتوجه به شکل ۲ بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی (۹۱۴۷۶/۶±۱۲۷۱۷/۸) (بر حسب میکرومول آهن در گرم عصاره) با آزمون فوق مربوط به جلبک سبز *E. intestinalis* و کمترین مقدار (۵۱۰۸۰±۲۲۹۲/۸۵) (بر حسب میکرومول آهن در گرم عصاره) مربوط به جلبک قهوه ای *G. corticata* بود.



شکل ۲: فعالیت ضد اکسیدانی نمونه ها ی عصاره از طریق آزمون توان آنتی اکسیدانی احیاء یون فریک(بر حسب میکرومول آهن در گرم عصاره) **-حروف نامتشابه اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می دهد.**

۳.اندازه گیری فعالیت ضد اکسیدان به طریق فسفومولیبدنم (PMB):

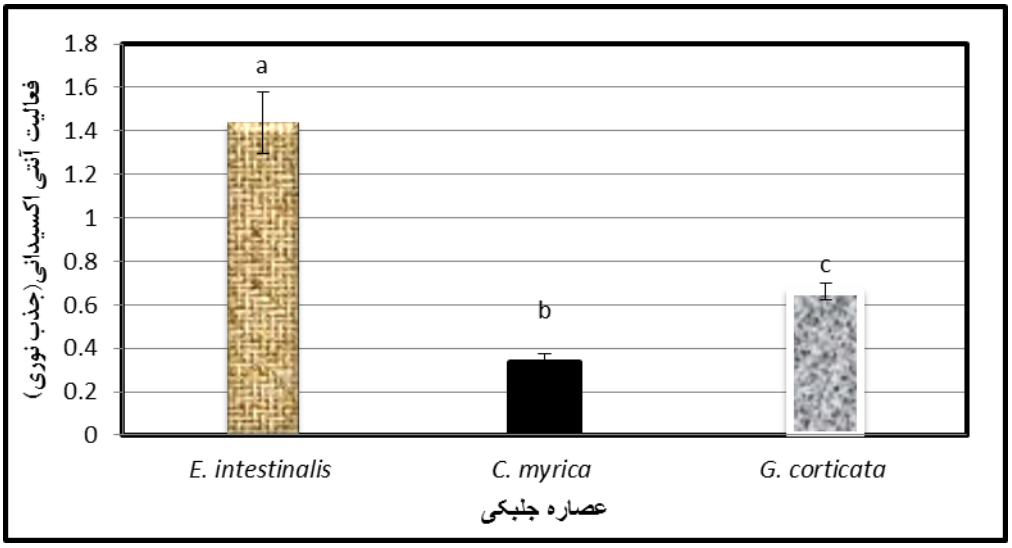
باتوجه به شکل شماره ۳ بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی با آزمون فوق (۱۲۵/۳۳±۸/۷۳) (بر حسب میکرومول ترولکس/ گرم عصاره) مربوط به جلبک قرمز *G. Corticata* و کمترین مقدار مربوط (۷۲±۶/۲) (بر حسب میکرومول ترولکس/ گرم عصاره) به جلبک قهوه ای *C. myrica* ب‌ود.



شکل۳: فعالیت ضد اکسیدانی نمونه های عصاره به طریق فسفومولیبدنم (میکرومول تروکس/ گرم عصاره) حروف نامتشابه اختلاف آماری معنی داری را نشان می دهد.

۴. اندازه گیری فعالیت ضد اکسیدان به روش توان احیا کنندگی (RP)

باتوجه به شکل۵ بیشترین جذب نوری(فعالیت ضد اکسیدانی) به روش توان احیا کنندگی(۱/۴۴±۰/۱۴) مربوط به جلبک سبز*E. Intestinalis* و کمترین این مقدار (۰/۳۳±۰/۰۳) مربوط به جلبک قهوه ای *C. myrica* بود.



شکل۴: فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس روش توان احیا کنندگی (RP)- حروف نامتشابه اختلاف آماری معنی داری را نشان می دهد.

در روش توان احیا کنندگی جذب نوری نمونه ها رابطه مستقیمی دارد با توان احیا کنندگی دارد یعنی جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر و به طبع آن خاصیت انتی اکسیدانی می باشد و بدون واحد اندازه گیری می باشد زیرا از جذب نوری برای شدت خاصیت احیاکنندگی استفاده می شود.

۵. فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی جلبک‌های مورد مطالعه

باتوجه به جدول شماره ۱ و ۲ هیچ یک از عصاره هیدروالکلی جلبک‌های مورد مطالعه در هیچ غلظتی به روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان ندادند.

جدول ۱: فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی جلبک های مورد مطالعه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن(غلظت عصاره های مورد استفاده ۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰ میلی گرم در میلی لیترآب مقطر است).

کنترل مثبت(گروه شاهد)		*G. corticata*			*C.myrica*			*E. intestinalis*			عصاره جلبکی (غلظت) / قطر هاله عدم رشد(میلی متر)
آمپی سیلین	تتراسایکلین	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	
۱۷/۹۳± ۶/۱۷	۲۷/۶±۶/۰۸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***L. monocytogenes***
۱۹/۶±۷/۹	۲۴/۲۶±۸/۳۸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***E.coli***

جدول شماره۲. فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی جلبک های مورد مطالعه با استفاده از روش چاهک (غلظت عصاره های مورد استفاده ۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰ میلی گرم در میلی لیترآب مقطر است).

کنترل مثبت(گروه شاهد)		*G. corticata*			*C.myrica*			*E. intestinalis*			عصاره جلبکی (غلظت) / قطر هاله عدم رشد(میلی متر)
آمپی سیلین	تتراسایکلین	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	
۲۵/۳۳±۵/۸۵	۲۹/۶۶±۵/۰۳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***L. monocytogenes***
۲۶±۳	۲۳/۳۳±۱۰/۶۹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	***E.coli***

بحث

آنتی اکسیدان‌ها دارای خواص فیزیکوشیمیایی مختلفی هستند. فعالیت‌های آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی غالبا بستگی به ترکیب عصاره ها وشرایط آزمایش مربوطه دارد. پتانسیل‌های آنتی اکسیدانی تحت تاثیرعوامل زیادی قرار می‌گیرد که با یک نوع آزمایش به طور کامل نمی-تواند توصیف شود. لذا هیچ تستی به تنهایی توانایی نشان دادن تمام خصوصیات آنتی اکسیدان‌ها و اکسیدان‌ها را نداشته و استفاده از چند تست معمولاً توصیه می‌شود بنابراین لازم است که برای اندازه‌گیری فعالیت‌های مختلف آنتی اکسیدانی با مکانیزم‌های مختلف تست‌های متنوع بکار برد (Ayse *et al*., 2009).

در سال‌های اخیر روش‌های مختلف زیادی برای ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی نمونه های مختلف عصاره ها مورد استفاده قرار گرفته (Nickavar *et al*., 2007). در این تحقیق برای تعیین مقدار آنتی اکسیدانی از چهار آزموندی فنیل پیکریل هیدرازیل، توان آنتی اکسیدانی احیاء یونفریک و فسفومولیبدات استفاده شد.

با استفاده از آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل بین خواص ضد اکسیدانی عصاره‌های هیدروالکلی حاصل از همه جلبک‌های نمونه‌برداری شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل شماره ۱). بالاترین فعالیت ضد اکسیدانی با استفاده آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل (میکرومول ترولکس بر گرم وزن خشک عصاره) مربوط به جلبک سبز *E. Intestinalis* و کمترین فعالیت ضد اکسیدانی را جلبک قهوه ای *C. myrica* داشت. فراستی و همکاران در مطالعه خود روی پتانسیل آنتی اکسیدانی جلبک های سبز رشته ای(جنس *Chaetomorpha*) بین فعالیت پاکسازی رادیکالی و محتوای فنلی، فلانوئیدی اختلاف معنی داری را گزارش کردند. مطالعات دیگر نشان داده که بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی عصاره ها از جمله ترکیبات قطبی است (Muret *et al*., 2007). از طرف دیگر بعضی

از محققین میان فعالیت ضداکسیدانی و کل محتوای فنلی از عصاره های جلبکی همبستگی ضعیفی را گزارش کرده-اند (Liu *et al*., 2010).

مطالعات مختلف ظرفیت آنتی اکسیدانی بالا را در جلبک‌ها به عصاره‌های پلی ساکاریدهای سولفاته نسبت داده‌اند (Costa *et al*., 2010; Qi *et al*., 2010).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اختلاف معنی-داری بین خواص ضد اکسیدانی عصاره هیدروالکلی حاصل از جلبک سبز *E. intestinalis* با جلبک‌های *C. myrica* و *G. corticata* نمونه‌برداری شده با استفاده از آزمون توان آنتی اکسیدانی احیاء یون فریک وجود داشت(شکل شماره ۲). بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی با آزمون فوقرا جلبک سبز *E. intestinalis* وکمترین فعالیت ضد اکسیدانی را جلبک *G .corticata* داشت.

با توجه به اینکه این جلبک سبز *E. intestinalis* در منطقه بالای جزر و مدی و در معرض استرس‌های شدید محیطی (مانند شدت نور بالا، فشار گیاه خواران، در معرض خشکی زدگی و ...) بیشتری نسبت به دو گونه جلبک دیگر قرار دارد و اینکه مدت زمان بیشتری در طول شبانه روز خارج از آب و نسبت به دوگروه دیگر بیشتر تحت تأثیرتنش های محیطی قرار می گیرند احتمالا بالا بودن خواص ضداکسیدانی این جلبک نسبت به دو گونه دیگر را می توان به این امر مرتبط دانست. Connan و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی را در ارتباط با استرس های محیطی (همچون شدت تابش خورشید، فشار گیاه خواران، در معرض آفتاب بودن، عمق، شوری، خشکی زدگی و ...) دانسته. همچنین مشاهده شده که تولید ترکیبات فعال اکسیژن (ROS)[۱۳] در جلبک ها در همبستگی با استرس های محیطی مانند شدت نور بالا، فلزات سنگین، غلظت بالای نمک ها، اشعه ی فرابنفش و غیره هستند(Wu *et al*., 2010). آنتی اکسیدان ها زیان های ناشی از رادیکالهای آزاد واکنش پذیر و گونه های واکنش پذیر اکسیژن دار را در سلول ها کاهش می‌دهند (Anchana *et al*., 2005). احتمالا ترکیبات آنتی اکسیدانی در توازن و خنثی سازی با این ترکیبات نیز در جلبک ها ساخته می شوند.

فسفومولیبدنم یک روش اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی است که از طریق اسپکتروفتومتری انجام می شود. آزمایش براساس احیاء مولیبدنم توسط نمونه‌های مورد ازمایش در محیط اسیدی می باشد که در نتیجه کمپلکس مولیبدنم سبز رنگ تشکیل می‌گردد. با توجه به شکل شماره ۳ بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی با آزمون فوق (۱۲۵/۳۳±۸/۷۳) (بر حسب میکرومول ترولکس/ گرم عصاره) مربوط به جلبک قرمز *G. Corticata* و کمترین مقدار مربوط (۷۲±۶/۲) (بر حسب میکرومول ترولکس/ گرم عصاره) به جلبک قهوه ای *C. myrica* بود. جاسبی و همکاران در سال۲۰۱۳ در مطالعه خود بر روی سه گونه جلبکی قرمز و قهوه ای نشان داد که بالاترین پتانسیل پاکسازی رادیکالی با رادیکال آزاد DPPH را عصاره متانولی جلبک‌های قهوه‌ای (*C. myrica, Sargassum boveanum*) و کمترین فعالیت را عصاره جلبک قرمز مورد مطالعه از خود نشان دارد. همچنین در این مطالعه عصاره آبی جلبک قرمز *Hypnea flagelliformis* بالاترین فعالیت را از خود نشان داد.زوبیا و همکاران (Zubia) در سال ۲۰۰۷ در پی تحقیق خود بر روی ۴۸ گونه جلبک دریایی فعالیت ضداکسیدانی بالایی را برای جلبک های قهوه ای ثبت کردند که در توافق با تحقیق حاضر نیست.خواص ضد اکسیدانی عصاره هیدروالکلی حاصل از جلبک *C. myrica* با *E. intestinalis* و *G. corticata* نمونه برداری شده با استفاده از آزمون فسفومولیبدنم اختلاف معنی داری وجود داشت.

در روش توان احیا کنندگی جذب نوری نمونه ها رابطه مستقیمی با توان احیا کنندگی دارد یعنی جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر است. در این روش سنجش فعالیت های آنتی اکسیدانی بر اساس جذب نوری صورت می گیرد. افزایش در جذب نوری مخلوط واکنش بیانگر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد و بدون واحد اندازه گیری می باشد. زیرا از جذب نوری برای شدت خاصیت احیاکنندگی استفاده می شود. بهترین فعالیت ضد اکسیدانی عصاره هیدروالکلی حاصل از جلبک های نمونه برداری شدهبا استفاده از آزمونتوان احیا کنندگی (RP) را جلبک سبز *E. Intestinalis* داشت. بین خواص ضد اکسیدانی جلبک های غالب مورد مطالعه با استفاده از آزمون توان احیا کنندگی اختلاف معنی داری وجود داشت.

نوع حلال مورد استفاده برای استخراج بیشترین تاثیر را بر روی خاصیت ضد باکتریایی عصاره بدست آمده دارد. اتانول با درجه ۷۰ در بین حلال های رایج جهت عصاره

[13]-Reactive Oxygen Species

گیری مواد گیاهی، برای ترکیبات قطبی و غیر قطبی دارای بیشترین کارائی می باشد (Harborne, 1998).

در این مطالعه هیچ یک از عصاره جلبک های مورد مطالعه در این تحقیق در هیچ غلظتی فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان ندادند. جاسبی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که عصاره های متانولی، دی کلرومتانی، متانولی(۸۰ درصد) و عصاره آبی حاصل از جلبک های(*H. flagelliformis, C. myrica, S. boveanum*) خاصیت ضدباکتریایی(با تاثیر روی اشریشیاکلی) از خود نشان ندادند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.در مطالعه تاجبخش و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که عصاره های استخراجی با آب سرد خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، اشریشیاکلی، پزدوموناس آرژینوزا از خود نشان ندادند اما عصاره های استخراجی با آب گرم خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری های نام برده داشتند.نسبت تغییرات و تفاوتهایی در این مطالعه و یافته های دیگران مشاهده می‌شود (Mhadhebi *et al*., 2012). اختلاف در نتایج ممکن است ناشی از گونه های مورد استفاده، زمان ومکان نمونه های جمع آوری شده باشد(Salem *et al*., 2011).

در پژوهش ها یک تنوعی از حلال ها برای عصاره-گیری جهت انجام فعالیت های پژوهشی در جلبک ها استفاده می شود، با این وجود هنوز مشخص نیست که کدام نوع حلال برای عصاره گیری موثر است(Zheng *et al*., 2001). با توجه به اینکه الکل ۷۰ درجه از قطبیت بالایی برخوردار است عصاره استخراج شده با این حلال بیشتر شامل ترکیبات قطبی است. درخشش پور و همکاران در سال ۱۳۹۰ نشان دادند که حلال هایی با قطبیت کمتر نتایج بهتری نسبت به حلال هایی با قطبیت بیشتر دارند. با توجه به این نتایج اجزای فعال زیستی مورد نظر بایستی ترکیباتی با قطبیت کم و چربی دوست باشند (درخشش و همکاران،۱۳۹۰). با توجه به نتایج تست های آنتی باکتریال و دیگر تحقیقات انجام شده در این زمینه می توان گفت احتمالا حداکثر ماده موثره در عصاره این جلبک ها ترکیبات قطبی بود که هیچ گونه خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان نداده اند.

به طور کلی فعالیت ضد اکسیدانی جلبک *E. intestinalis* از بقیه جلبک های مورد مطالعه دیگر با آزمون‌های FRAP, DPPH و RP فعالیت بالایی را نشان داد. همچنین در این مطالعه هیچ یک از جلبک های مورد مطالعه در هیچ غلظتی فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی (با تاثیر بر باکتری های مورد مطالعه) را از خود نشان ندادند.

سپاسگزاری

مولفین از کارکنان آزمایشگاه های میکروبیولوژی و بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج و همچنین آزمایشگاه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و مرکز اقیانوس شناسی در بوشهر کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

درخشش، ب.، یوسف زادی، م.، افشار نسب، م.، یگانه، و. و دشتیان نسب ،ع.، ۱۳۹۰. بررسی اثرات ضد با کتریاییجلبک های *Laurencia snynderiae* ، *Sargassum angustifoliumm* دریایی. فصلنامه طب جنوب، ۲۲-۱۷ :(۱)۱۴.

قرنجیک، ب. و روحانی قادیکلایی،ک. ۱۳۸۸. اطلس جلبک های دریایی سواحل خلیج فارس و دریایی عمان. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات. ۲۰۲ صفحه.

Abbott, I.A. and Hollenberg, G., 1976. Marine Algae of California. Stanford uni press. 827p.

Anchana, C. Aphiwat, T. and Nuansri, R., 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chem. 92: 491-497.

Ayse, K., Beraat, O. and Samim, S., 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities Food Anal.Methods. 2: 41–60.

Bhadury, P. and Wright, P.C., 2004. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. Planta, 219: 561- 578.

Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S. and Sánchez-Muniz, F.J., 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. J. Med. Food, 12: 236-258.

Jiao, L., Li, X., Li, T., Jiang, P., Zhang, L., Wu, M. and Zhang, L., 2009. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorphaintestinalis*. Int. Immunopharmacol., 9: 324-329.

Jimenez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramirez, A., Ramirez, I. and Peña-Corté, H., 2011. Anti-Phytopathogenic Activities of Macro-Algae Extracts .Mar. drug, 9:739-756.

Liu, C.C., Zhao, G.l., Li, Y.N., Ding, Z.P., Liu, Q.G. and Li, J.L., 2010. Contribution of phenolics and flavonoids to antioxidant activity of ethanol extract from Eichhorniacrassipes. Adv Mater Res. 8: 1372-7.

Mhadhebi, L., Chaieb, K. and Bouraoui, A., 2012. Evaluation of antimicrobial activity of organic fraction of six marie algae from Tunisian mediteraranean coasts. International Journal of Pharmacy and Pharma Scienc, 4: 534-537.

Muret, K., Sevgi, K., Sengul, K., Esra, U., Cemalettin, B. and Fedra, V., 2007. Biological activities, chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chem, 100(2):526-534.

Nickavar, B., Kamalinejad, M., Izadpanah H. 2007. In vitro free radical scavenging activity of five Salvia species. Pak J Pharm Sci. 20(4): 291-4.

Okeke, N., Laxmaninarayan, R. and Bhutta, A., 2005. Antimicrobial resistance in developing countries, Part 1: recent trends and current status. LanInfedis, 5: 481-93.

Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M.M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phoshomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal. Biochem, 269: 337–341.

Connan, S., Delisle, F. and Deslandes, E., 2006. Ar Gall E Intra-thallusphlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. Bot Mar. 49: 34–46.

Costa, L.S., Fidelis, G.P., Cordeiro, S.L., Oliveira, R.M., Sabry, D.A. and Câmara, R.B.G., 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed Pharmacother*. 64(1): 21-28.

Farasat, M., Khavari-nejad R., Nabavi MB.,Namjooyan F., 2013. Antioxidant properties of two edible green seaweed from Northern coasts of the Persian Gulf. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 8(1): 47-52.

Farasat, M., Khavari-nejad R., Nabavi, M.B. and Namjooyan, F., 2013. Antioxidant Properties of Some Filamentous Green Algae (*Chaetomorpha* Genus). Braz. Arch. Biol. Technol. 56: 921-927.

Gonzalez A., Basilio A., Cabello A., Gorrochategui J., Suay I., Visente F., Portilo E., Jimenez M., Garseia Reina G. and Pelaez F., 2001.Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gram Canaria (Canary Islands, Spain). Int Mic, 4: 35-40.

Harborne, J.B., 1998. Phytochemical methods. 3th ed. New York: Chapman and Hall. pp.5-7.

Horincar, V., Parfene, G. and Bahrim, G., 2011. Evaluation of bioactive compounds in extracts obtained from three romanian marine algae species. Romani Biotecnol Letterr, 6: 71-78.

Jassbi, A., Mohabati, M., Eslami, S., Sohrabipour, J. and Miri, R., 2013. Biological Activity and Chemical Constituents of Red and Brown Algae from the Persian Gulf. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 12(3): 339-348.

Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of Antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agri Food Chem, 53:4290-302.

Qi, H., Liu, X., Ma, J., Zhang, Q. and Li, Z., 2010. In vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulvapertusa* (Chlorophyta). J Med Plants Res. 4(23): 2445-2451.

Salehi, P., Sonboli, A. and Eftekhar, F., 2005. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and variousextracts of Ziziphoraclinopodioides subs. rigida (BOISS.) Rech. F. from Iran. Bio Pharm Bul,28: 1892-6.

Salem, W.M., Galal, H. and Nasr, El- deen F., 2011. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). Afr. j. microbial. Res. 5(15): 2160-2167.

Smit, A.J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. J. Appl. Phycol. 16: 245-262.

Sohrabipour, J. and Hadjiakhoondi, A., 2011. Comparison of antioxidant activity and total phenolic contents of some Persian Gulf marine algae. J. Med. Plants 10: 73-79.

Stirk, W.A., Reinecke, D.L. and Staden, J., 2007. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. J. Appl. Phycol. 19: 271-276.

Tajbakhsh, S., Pouan, M., Zandi, K., Bahramian, P., Sartavi, K., Fouladvand, M., Asayesh G. and Barazesh, A., 2011.In vitro study of antibacterial activity of the alga *Sargassum oligocystum* from the Persian Gulf.Eur Rev Med Pharmacol Sci. 15: 293-298.

Taskin, E., Ozturk, M., Taskin, E. and kurt, O., 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). Afr. J. Biotechnol, 6: 2746-2751.

Volka, R.B. and Furkert, F.H., 2006. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. Microb. Res., 161: 180-186.

Von Gadow. A., Joubert, E. and Hansmann, C.F., 1997. Comparison of antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibosed tea (Aspalathonlinearis), a-tocopherol, BHT, and BHA.J.ofAgri.and Food Chemist, 45: 632–638.

Wu, S.C., Wang, F.J. and Pan, C.L., 2010. The comparison of antioxidative properties of seaweed oligosaccharides fermented by two lactic acid bacteria. J Mar Scie Tech, 18(4): 537-45.

Yuan, Y.V. and Walsh, N.A., 2006. Antioxidative and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. Food Chem. Toxicol. 44:1144-1150.

Zheng, Y., Chen, Y.S. and LU H.S., 2001. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. Chin J Oceanol Limnol, 19: 327-331.

Zubia, M., Robledo, D. and Freile-Pelegrin, Y., 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula.Mexico; J Appl Phycol. 19: 449–458.

Comparisons of anti-radical and antibacterial potential among macro algae from northern coasts of the Persian Gulf

Heidari M.[1]; Zolgharnine H.*[1]; Sakhaei N.[1]; Mirzaei A.[2]; Movahedinia A.[1]

* zolgharnein@kmsu.ac.ir

1- College of Marine Science, Khorramshahr Marine Science and Technology University.
3 -Department of Biochemistry, Yasouj University of Medical Scienes.

Keywords: Anti-oxidant, Anti-bacterial, Persian Gulf coast Algae, *Listeria monocytogenes*, *E.coli.*

Abstract

The purpose of study was to evaluate the anti-oxidant and anti-bacterial activities of three species of green, brown and red algae from northern coast of the Persian Gulf, The study was performed using DPPH, FRAP, PMD and RP tests for anti-oxidant capability and disk diffusion and plate methods of ethanol extraction for anti-bacterial ability. In the current investigation, The best anti-oxidant activity and inhibition potential of DPPH free radicals and RP were shown in ethanol extract of *Entromorpha intestinalis* green algae and lowest values was detected in *Cystoseira myrica* brown algae.The highest anti-oxidant activity was measured by FRAP test in green algae *E. intestinalis* and the lowest anti-oxidant activity was obtained in the red algae*Gracilaria corticata*.The highest anti-oxidant activity with PMD test was found in the red algae *G. corticata*. However, anti-oxidant activity of the green algae *E. Intestinalis* was shown high activity with DPPH, FRAP, RP tests. Hydro-alcohol extraction of sea weed did not show any anti-bacterial properties.

*Corresponding author