



بررسی اثر بازدارندگی *Ulva Lactuca* بر رشد و فعالیت برخی از باکتریهای روده ای در سیستم آبی و آزمایشهای کوتاه مدت

دکتر صدیقه مهربابان^۱ - نسرين غفاری^۲

۱- دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم

۲- دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شمال

کلمات کلیدی: باکتری های روده ای- اشريشیاکلی- استافیلوکوکوس اورئوس- الوالاکتوکا

چکیده:

در این پژوهش نمونه های جلبکی *Ulva Lactuca* از سواحل چهار جمع آوری شد. جنس و گونه آن را با بررسی های میکروسکوپی و ماکروسکوپی تعیین کردیم. پس از شستشو و خشک کردن، پودر آن تهیه شد. با استفاده از روش تندالیزاسیون و اتوکلاو پودر را سترون می کنیم. اثر ضد میکروبی الواسترون شده با روش تندالیزاسیون قویتر از روش اتوکلاو بود. تعدادی از سوشهای میکروبی که در آب باعث آلودگی می شود و به عنوان اندیکاتور برای بررسی کیفی آب مورد استفاده قرار می گیرند انتخاب شد که شامل پسودوموناس آنروژینواز (PTCC 1310)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1113)، اشريشیاکلی (PTCC 1338) بود. عصاره گیری توسط آب و حلالهای آلی شامل کلروفرم، اتانل، استن، تتراکلرید کربن، پترولیوم اتر و n هگزان انجام شد. از الوالاکتوکا در دو دما $4^{\circ}C$ و $25^{\circ}C$ عصاره گیری شد. عصاره های تهیه شده در $4^{\circ}C$ اثر ضدمیکروبی شدیدتر نسبت به $25^{\circ}C$ داشتند.

دراین تحقیق اثر این جلبک به دو روش، شرایط آزمایشگاهی (*Invitro*) و درسیستم آبی (*Invivo*) بررسی شد.

در روش *Invitro* سنجش قطر هاله عدم رشد وروش رقت در محیط مایع انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که برخی عصاره های آلی اثر ضدمیکروبی داشتند.

اثر بازدارندگی، الواد در مورد باکتریهای گرم منفی قویتر از گرم مثبت بود درسیستم آبی کوتاه مدت عصاره حلالهای آلی الواد اثر داشت، بطوریکه در مورد اشريشیاکلی عصاره تهیه شده از تتراکلرید کربن بعداز ۴ ساعت باکتری مورد نظر را درآب از بین برد.

مقدمه:

جوامع بشری که در نزدیکی دریا و کنار ساحل زندگی می‌کردند از دیرباز با این دسته گیاهان آشنا بوده و از آن به‌عنوان خوراک و دام استفاده می‌کردند، اما امروزه با پیشرفت علم و تکنولوژی شناسایی کاربردهای آنها در صنایع کشاورزی، دارویی و بهداشتی جلبکها ارزش شایان توجهی یافته‌اند. *ulva lactuca* به‌فرم شناور آزاد در سراسر سال در قسمتهای مختلف دریا در مناطقی از جهان دیده شده است رشد در طول تابستان بیشتر بوده و بیش از دو برابر رشد در طول پاییز است.

جلبک *ulva* به‌ترتیب فراوانی در سواحل چابهار، بندرلنگه، بوشهر و بندرعباس دیده شده است که در فصول مختلف میزان آن متفاوت است و در بهار بیشتر دیده شده است. استخراج و اندازه‌گیری عناصر در جلبک تقریباً از سال ۱۹۷۰ با بکارگیری روشهای گوناگون آنالیتیک انجام گرفته است. براساس تجربیات دیگر دانشمندان مشخص شده که جلبکهای دریایی از جمله *ulva lactuca* شامل مقادیر زیادی کربوهیدرات، پروتئین، ویتامین، اسید آسپارتیک و گلوتامیک همچنین گلی سین و آلانین، آهن، منگنز، منیزیم، روی، کلسیم، فسفر، آلکالوئیدها، پتاسیم و کلر^(۱) و... هستند.

براساس تحقیقات از جلبکها توسط بنزن، کلروفورم، متانل، اتانل، کلروفورم، اتیل لاکتیک، دی‌اتیل اتر عصاره‌گیری شده^(۲) و اثرشان برعلیه برخی باکتریهای گرم منفی و مثبت آزمایش شده است. وجود ترکیبات کربوهیدرات موجود برای فعالیت ضد ویروس آنفولانزا مطالعه شده است.

در تحقیقات انجام شده اثر ضد میکروبی *ulva lactuca* نیز بررسی شده است^(۳).

روش کار:

در این پژوهش نمونه‌های جلبکی *ulva lactuca* از سواحل چابهار در دریای عمان جمع‌آوری شده، جنس و گونه آنها با بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی و تطبیق با کلیدهای شناسایی مشخص گردیده است پس از شستشو و جدانمودن نمک و آلودگی‌های آب دریا جلبک در سایه خشک شده سپس پودر آن تهیه شد و با روش‌های تندالیزاسیون و اتوکلاو سترون کردیم و اثر هر دو نوع پودر الواسترون شده بررسی شد.

براساس بررسی آلودگی میکروبی آب برخی سوشهای باکتریایی که باعث آلودگی آب شده و می‌توانند به‌عنوان یک اندیکاتور برای بررسی کیفی آب مدنظر باشند انتخاب کردیم که شامل پسودوموناس آئروژینوزا^(۴)

(PTCC 1310) استافیلوکوکوس اورئوس^(۱۵) (PTCC 1113) اشریشیا کنی^(۱۶) (PTCC 1338) بود.

عصاره گیری:

عصاره گیری توسط آب و حلالهای آبی شامل کلروفرم، اتانل، استن، تتراکلریدکربن، پترولیم اتر و n هگزان به نسبت ۱:۱۰ انجام شد. عصاره گیری در شرایط استریل در دمای مختلف ۲۵°C و ۴°C انجام شد.

روش بررسی اثر ضد میکروبی الوالاکتوکا

به بررسی اثر بازدارندگی *ulva lactuca* بر روی این میکروارگانیسم‌ها به دو طریق *invivo* و *invitro* می‌پردازیم. در مورد روش *invitro* سنجش قطر هاله مهار رشد که شامل استفاده از دیسک بلانگ آغشته به عصاره‌های مختلف الوالوا و ایجاد چاهک و ریختن مقدار معین عصاره‌های مختلف الوالوا با در نظر گرفتن شاهد (حلال) و همچنین استفاده از پودر بررسی کردیم.

در قسمت دیگر از روش تهیه رقت در محیط مایع برای بررسی اثر بازدارندگی استفاده کردیم. در این روش از نوترین برات به همراه سوسپانسیون باکتری و پودر الوالاکتوکا به نسبت به ترتیب ۱/۱۰:۰:۱۰^(۱۷) (باکتری) استفاده شد بعد از ۲۴ ساعت از این محیط روی محیط مولر هینتون کشت دادیم و با سنجش کدورت اثر آنرا در مقایسه با شاهد بدون الوالوا بررسی کردیم.

در روش *invivo* از آب مصرفی شهر که به وسیله اتوکلاو استریل شده استفاده می‌شود و برای بررسی اثر ضد میکروبی از عصاره‌هایی که در *invitro* جواب مثبت داد استفاده شد نسبت آب، حلال، الوالاکتوکا به ترتیب ۱gr : ۱۰ ml : ۱۰۰ ml بود (قبل از اضافه کردن آب حلال به وسیله دستگاه تقطیر خارج شد) حال به این محلول ۱cc از سوسپانسیون باکتری^(۱۸) اضافه شد.

نمونه‌ها در فواصل زمانی صفر، ۲، ۴، ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت برداشت شد و روی محیط مولر هینتون جهت شمارش تعداد باکتری کشت داده شد و با شاهد مقایسه گردید (در تمام آزمایشات *invivo* و *invitro* v بار تکرار انجام دادیم) نتایج نشان دهنده اثر بازدارندگی رشد بود.

رفت	پودر	پترولیم اتر	n همگزان	آب	کلروفورم	نتراکلریدکربن	اتانل	استن	حلال
									باکتری
d	-	۰	۰	۰	۳/۱	۰	۵	۵/۵	استافیلوکوکوس چاله
									اورئوس دیسک
d	-	۰	۰	۰	۴/۴	۱۲/۲	۵/۸	۴/۸	اشریشیا چاله
									کلی دیسک
d	-	۰	۰	۰	۳/۱	۷/۸	۰	۲/۹	پسودوموناس چاله
									آتروژینوزا دیسک

نتایج حاصل از روش *invitro* - عصاره گیری در ۴°C - اعداد میانگین از ۷ بار تکرار است. قطر هاله مهار برحسب میلی متر است. (۰ بدون تأثیر d: کاهش تعداد کلنی (از $10^8 \times 3$ به 10^6) جدول ۱

کلروفورم	نتراکلریدکربن	اتانل	استن	حلال
				باکتری
۲	۰	۰	۲	استافیلوکوکوس اورئوس
۴/۳	۲	۱	۰	اشریشیا کلی
۲	۱/۵	۱/۳	۲/۶	پسودوموناس آتروژینوزا

نتایج حاصل از روش *invitro* - عصاره گیری در ۲۵°C - قطر هاله مهار برحسب میلی متر است. جدول ۲

زمان/h	۰	۲	۴	۶	۲۴	۴۸
شاهد	۳۵۵	۳۵۷	۳۶۰	۳۵۴	۹۵۱	۱۲۵۶
آب		۱۳۸	۱۵۱	۱۸۸	۳۷۶	۵۵۹
استن		۱۳۰	۱۵۰	۱۶۷	۳۷۱	۵۴۹
اتانل		۱۴۰	۱۷۰	۳۹۵	۵۱۰	۶۵۰
کلروفورم		۲۳۳	۲۷۳	۴۱۶	۵۹۶	۷۴۴

نتایج حاصل از روش *invivo* در استافیلوکوکوس اورئوس - اعداد میانگین از ۷ بار تکرار جدول ۳

زمان/h	۰	۲	۴	۶	۲۴	۴۸
شاهد	۹۹	۲۸۵	۳۹۸	۵۳۶	۸۶۱	۱۰۲۱
آب		۱۲۲	۳۰۵	۵۰۴	۸۴۵	۹۹۷
استن		۴۵	۳۸	۳۰	۰	۰
اتانل		۲۲۶	۲۷۱	۳۹۶	۶۴۳	۸۱۴
کلروفرم		۱۶۳	۱۸۴	۳۷۴	۷۸۸	۸۹۳
تتراکلریدکربن		۳۵	۰	۰	۰	۰

نتایج حاصل از روش *invivo* در اشربشیاکلی - اعداد میانگین از ۷ بار تکرار است. جدول ۴

زمان/h	۰	۲	۴	۶	۲۴	۴۸
شاهد	۳۸	۸۶	۱۲۶	۳۸۶	۸۴۱	۱۲۶۷
آب		۳۷	۷۵	۲۰۲	۵۰۸	۱۰۱۰
استن		۲۸	۳۵	۷۷	۲۹۱	۵۷۰
تتراکلریدکربن		۲۶	۲۸	۴۴	۲۳۶	۴۲۷
کلروفرم		۴۳	۹۰	۱۷۱	۳۵۱	۶۹۶

نتایج حاصل از روش *invivo* در پسدوموناس آئروژینوزا - اعداد میانگین از ۷ بار تکرار است. جدول ۵

نتایج و بحث

- ۱- براساس نتایج نشان داده می‌شود که الوالاکتوکا اثر بازدارندگی رشد بر باکتریهای آلوده‌کننده آب دارد و پژوهشگران دیگر نیز بر روی اثر ضد میکروبی جلبک *ulva lactuca* تحقیق کرده‌اند. (۳)
- ۲- در این پژوهش اثر بازدارندگی رشد با روش ایجاد چله قویتر از روش استفاده از دیسک بود. به این دلیل که در چاله مقدار نفوذ ماده مؤثره در محیط کشت بیشتر بوده است. (جدول شماره ۱)
- ۳- در روش تهیه رقت تعداد باکتری مورد آزمایش از $10^8 \times 3$ به حدود 10^6 کاهش یافت (جدول شماره ۱)
- ۴- عصاره‌گیری در دو دمای 25°C و 4°C به مدت ۷۲ ساعت انجام شد نتایج نشان می‌دهد که افزایش درجه حرارت باعث کاهش مواد مؤثره در نتیجه کاهش اثر ضد میکروبی می‌شود. (جدول شماره ۲)
- ۵- در آزمایش *invivo* در محیط آبی در حضور استافیلوکوکوس اورئوس با وجود الوالاکتوکا و بررسی در زمانهای مختلف (۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸) و مقایسه آن با شاهد مشاهده می‌شود که در آب واجد عصاره‌های مختلف تهیه شده با الوالاکتوکا به تدریج تعداد باکتری کاهش می‌یابد. (جدول شماره ۳)
- ۶- در مورد اشیریشیاکلی در محیط *invivo* عصاره تهیه شد توسط تتراکلریدکربن در ۴ ساعت تعداد باکتری را به صفر می‌رساند. (جدول شماره ۴)
- ۷- در پسودوموناس آئروژینوزا با توجه به شاهد تعداد باکتری در محیط آبی حاوی عصاره‌های مختلف الوالاکتوکا می‌یابد. (جدول شماره ۵)

منابع:

- 1- Castro - Gonzalez, etal Gienic.Mar 1996, 22(2) 205-213
- 2- Ivanova-v, etal Biologically active substances from marine organisms Herba-Hungarica 1991, 30:3, 47-59.
- 3- Bandar - BMR - Gunatilaka, etal

Antimicrobial activity of some marine algae of srilanka J.N.sei.sri 1988 16:2, 209-221

4- Warburton, D.W and Dodds, K.L.,A review of microbiological bottledwater sold in india between 1981 and 1989

Ca.J.Microbial, 39, 12, 1992

5- ALASRI. A, etal Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and incombination and chlorine and formal dehyde against bacterial water strains can.j.Microbial 38: 653 - 642

6- Coburn, j.k,etal Apre liminary study of the use of colilert for water quality monitoring Appl.Microbial 19(1): 50-52