جمهوری اسلامی ایران

جهاد دانشگاهی
واحد استان البرز

جهاد دانشگاهی واحد استان البرز

عنوان طرح:

بررسی خواص بیولوژیک جلبک‌های مایکروسکوپی کلپومنیا سینوسا و اینگاریا استلاتا

(*Colpomenia Sinousa,Iyengaria Stellata*)

کد طرح:

11 - 2077

محل اجراء طرح :

جهاد دانشگاهی واحد استان البرز

مجری طرح:

فرزانه فراهانی

تیرماه1394

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

جمهوری اسلامی ایران

واحد استان البرز

جهاد دانشگاهی واحد استان البرز

عنوان طرح:

بررسی خواص بیولوژیک جلبک‌های مایکروسکوپی کلپومنیا سینوسا و اینگاریا استلاتا (*Colpomenia Sinousa,Iyengaria Stellata*)

محل اجراءطرح:

جهاد دانشگاهی واحد استان البرز

کد طرح:

11 - 2077

مجری طرح:

فرزانه فراهانی

مشاور طرح:

محمدرضا عبدالهی - احمدرضا گوهری

همکار اصلی طرح:

پریسا پرمه - مونا نوایی

همکاران طرح:

جلوه سهرابی پور

تیرماه 1394

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات مسئول و همکاران طرح

نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی		رشته تحصیلی	تخصص	شغل و مؤسسه متبوع	نوع مسئولیت در طرح	میزان همکاری در هفته (ساعت)	
	رتبه	پایه					موظف	غیرموظف
محمد رضا عبدالهی		استاد تمام	داروسازی	سم شناسی	دانشگاه علوم پزشکی تهران	مشاور تستهای آنتی کانسر		2
احمد رضا گوهری		دکتری	داروسازی	فارماکوگنوزی	دانشگاه علوم پزشکی تهران	مشاورتستهای بیولوژیک		2
پریسا پرمه		دکتری	بیولوژی دریا	فارماگنوزی	جهاد دانشگاهی تربیت معلم	عصاره گیری و تست های بیولوژیک		15
مونا نوایی		دانشجو دکترا	سم شناسی گیاهی	سم شناسی	دانشکده داروسازی دانشگاه تهران	تستهای آنتی کانسری		15
رضا نوری دفرازی		کارشناس	شیلات	آمار	شیلات	شناسایی نمونه ها		5
جلوه سهرابی پور		کارشناس ارشد	گیاه شناسی	سیستماتیک گیاهی	جهاد دانشگاهی تربیت معلم	شناسائی نمونه ها		5
فرحنازخلیقی سیگارودی		دکترا	داروسازی	فارماگنوزی	گیاهان دارویی	تست آنتی باکتریال		

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده:

امروزه استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث به وجود آمدن سویه‌های مقاوم میکروارگانیسم‌ها و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سرتاسر جهان شده است لذا دستیابی به منابع جدید دارویی با اثرات جانبی کمتر از اهمیت فراوانی برخوردار است. لذا این مطالعه باهدف بررسی اثرات بیولوژیکی عصاره‌های اتیل استاتی، متانولی و آب متانولی جلبک های قهوه‌ای کلوپومینیا سینوسا (*Colpomenia sinousa*) و اینگاریا استلاتا (*Iyengaria stellate*) از سواحل شمالی خلیج‌فارس انجام شد.

در این پژوهش پس از نمونه برداری، اثرات ضد باکتریایی ،ضدقارچی و ضد سرطانی عصاره های آلی کلوپومینیا سینوسا و اینگاریا استلاتا جمع آوری شده از خلیج‌فارس بر روی یک سویه باکتری گرم مثبت به نام استافیلوکوک اورئوس و دو سویه باکتری های گرم منفی به نام های اشرشیا کولای، سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت ونتایج آن با آنتی بیوتیک های استاندارد مقایسه گردید. عصاره گیری به روش پرکولاسیون انجام شد. اثرات ضد باکتریایی (MIC) عصاره های نهایی به روش رقت های متوالی در لوله جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده بررسی شد.

هر سه عصاره اتیل استاتی، متانولی و متانول آبی دو جلبک قهوه‌ای کلپومنیا سینوسا و اینگاریا استلاتا از سواحل خلیج‌فارس اثرات ضد باکتریایی نشان دادند، در این میان عصاره اتیل استاتی جلبک اینگاریا استلاتابا MIC >2/5 mg/mlبیشترین اثر را بر روی هر سه سویه باکتری (*Staphylococcus aureus*) PTCC:1112)، *E coli* (PTCC:1338) و *Pseudomonas aeruginosa*(PTCC1707) داشت.

بررسی آزمون‌های ضد قارچی نشان داد که دو جلبک موردبررسی فاقد اثرات ضد قارچی بودند.بررسی خاصیت آنتی کانسری عصاره ها نشان داد که عصاره متانولی جلبک کلپومنیا سینوسا در غلظت 100 میکروگرم در میلی‌لیتر پس از 48 ساعت می‌تواند 59 درصد از سلول‌های سرطانی را در محیط کشت از بین ببرد. عصاره اتیل استاتی جلبک آینگاریااستلاتا در غلظت 200 میکروگرم در میلی‌لیتر پس از 48 ساعت می‌تواند 35 درصد از سلول‌های سرطانی را در محیط کشت از بین ببرد.

کلمات کلیدی: آنتی باکتریال، آنتی تومور، ضدقارچی، ماکروجلبک

Archive of SID

www.SID.ir

عنوان	صفحه
چکیده	
مقدمه	4
فصل اول: کلیات و بررسی منابع	6
1- صفات عمومی جلبک‌ها	7
1-1- ساختار سلولی جلبک‌ها	7
1-1-2 رده‌بندی جلبک‌ها	9
1-1-3-چرخه زندگی در جلبک‌ها	10
1-2- جلبک‌های مایکروسکوپی	11
1-2-1- اهمیت اقتصادی جلبک‌های مایکروسکوپی	11
1-2-2- کاربردهای دارویی و پزشکی جلبک‌های مایکروسکوپی	12
1-3- ویژگی‌های جلبک‌های قهوه‌ای	12
1-3-1-پراکندگی جلبک‌های قهوه‌ای	13
1-3-2- شیمی جلبک‌های قهوه‌ای	13
1-3-2-1-بتائین ها	13
1-3-2-1-1-گلیسین بتائین	13
1-3-2- 2-استرول‌های جلبک‌های قهوه‌ای	14
1-3-2- 3-پلی هیدرو کسی فنل ها	14
1-3-2- 4-دی ترپن های موجود در جلبک‌های قهوه‌ای	14
1-3-2- 5-ترکیبات نیتروژن دار	15
1-3-2- 6-کربوهیدرات‌هایی با خاصیت انعقاد خون	15
1-3-2- 7-متابولیک‌های استخراج‌شده از جلبک‌های قهوه‌ای	15
1-3-2- 8-پلی فنل ها، ترپن ها و استرول‌ها در جلبک‌های قهوه‌ای	15
1-3-3-رده‌بندی جلبک قهوه‌ای*Iyengaria Stellata*	16
1-3-3-1-ریخت‌شناسی جلبک قهوه‌ای *Iyengaria Stellata*	17
1-3-3-2-تولیدمثل جلبک قهوه‌ای*Iyengaria Stellata*	17
1-3-3-3-پراکنش جلبک قهوه‌ای*Iyengaria Stellata*	17
1-3-4- ریخت شناسی جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*	17
1-3-4-1- تولیدمثل جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*	18
1-3-4-2-تولیدمثل جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*	18
1-3-4-3- پراکنش جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*	18
1-4- خلیج‌فارس	18
1-4-1- موجودات خلیج‌فارس	19

Archive of SID
www.SID.ir

1-5- جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی	19
1-6- مروری اجمالی بر انواع آزمون‌های غربال‌گری	20
1-6-1- روش‌های غربال‌گری عمومی	20
1-6-2- آزمون‌های غربال‌گری جامع	20
1-6-3- آزمون‌های غربال‌گری اولیه	20
1-6-4- روش‌های غربال‌گری اختصاصی	21
1-7- آزمون BST	21
1-8- آرتمیا سالینا	22
1-9- تحقیقات انجام‌شده	23
1-9-1- مطالعات انجام‌شده در جهان	23
1-9-2- مطالعات انجام‌شده در ایران	24
فصل 2: مواد و روش‌ها	26
2-1-مواد،وسایل و دستگاههای مورد استفاده	27
2-2-جمع آوری، خشک و پودر کردن جلبک	28
2-3- عصاره گیری	29
2-4- آزمون های آنتی باکتریال	29
2-5- آزمونهای ضدقارچی	29
2-6- بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های جلبکی بر رده سلولی سرطان پوست	30
2-7-آزمونهای بیولوژیک	30
2-7-1-کشت آرتمیا	30
2-7-2-انجام آزمایشهای سیتوتوکسیک	31
فصل 3: نتایج	32
3-1- نتایج آزمون‌های آنتی باکتریال عصاره‌های جلبک *Colpomenia sinousa*	33
3-2- نتایج آزمون‌های آنتی باکتریال عصاره‌های جلبک *Iyengaria stellata*	33
3-3- نتایج آزمون‌های ضد قارچی عصاره‌های جلبک‌های *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellate*	33
3-4- نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Colpomenia sinousa* پس از 24 ساعت	33
3-5- نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Colpomenia sinousa* پس از 48 ساعت	35
3-6- نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Iyengaria stellata* پس از 24 ساعت	37
3-7- نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Iyengaria stellata* پس از	38

Archive of SID
www.SID.ir

48ساعت	
فصل 4: بحث	**41**
بحث و تفسیر نتایج	**42**
4-1- میزان پراکنش جلبک ها	**42**
4-2- ارزیابی درصدعصاره های مختلف	**42**
4-3-تفسیر نتایج حاصل از آزمون آنتی باکتریال بر روی دو جلبک *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata*	**42**
4-4- تفسیر نتایج حاصل از آزمون ضد قارچی بر روی دو جلبک *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata*	**43**
4-5- تفسیر نتایج حاصل از آزمون آنتی کانسر جلبک *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata* پس از 24 و 48 **ساعت**	**43**
منابع	**47**
خلاصه انگلیسی	**51**

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

ترکیبات طبیعی از دورهٔ باستان به‌عنوان مهم‌ترین منبع تهیه داروها موردتوجه بوده‌اند. در سال‌های اخیر گرایش جدیدی به جداسازی ترکیبات اصلی از منابع طبیعی مشاهده می‌شود. علت این امر در دسترس بودن بیشتر این ترکیبات و تهیه آن‌ها از منابع تجدید شدنی، سمیت کمتر ترکیبات طبیعی و نیز کم‌هزینه بودن تهیه اغلب آن‌ها نسبت به ترکیبات شیمیایی و سنتزی هست (43و1). حداقل دوسوم ترکیبات آنتی کانسری که امروزه مورداستفاده قرار می‌گیرند مستقیماً از ارگانیزم‌های زنده جداشده‌اند و یا مشتقات نیمه سنتتیک ترکیبات طبیعی می‌باشند (44و2). اولین قدم درراه دستیابی و تکامل داروهای آنتی کانسر از منابع طبیعی، انجام آزمون‌های غربالگری هست. به‌کارگیری آزمون‌های غربالگری مناسب در حوزه مطالعه خالص‌سازی ترکیبات طبیعی موجب هدفمند شدن امر جداسازی، تسریع در شناسایی ترکیبات فعال و کاهش هزینه‌ها می‌شود. این مسئله کمتر موردتوجه محققین قرارگرفته است. به‌منظور دستیابی و تکامل واحدهای آنتی کانسر از منابع طبیعی به یک سری آزمایش‌های غربالگری عصاره‌های خام نیازمندیم. یکی از آزمون‌های معتبر جهت یافتن ترکیبات سیتوتوکسیک آزمون BST (Brine Shrimp Lethality) هست که توسط موسسه ملی سرطان در آمریکا (NC1) تائید شده است (3). اساس این آزمون قابلیت ترکیبات در کشتن لاروهای نوعی سخت‌پوست به نام *Artemia Salina* در محیط آزمون آزمایشگاهی هست.

فیتوشیمی دانش بررسی و مطالعه ترکیبات شیمیایی گیاهی است به‌بیان‌دیگر می‌توان گفت شاخه‌ای از علم شیمی است که موضوع آن مطالعه ترکیبات شیمی گیاهان است ازجمله این ترکیبات، متابولیک‌های ثانویه گیاهی است. فن‌های رایج در این علم عبارت‌اند از استخراج و جداسازی، تغلیظ، آنالیز و فن‌های کروماتوگرافی که درنهایت شناخت ساختارهای دقیق و مسیرهای بیوسنتزی را امکان‌پذیر می‌سازد. امروزه استخراج مواد طبیعی از جلبک‌ها با کاربردهای متفاوت در صنایع مختلف ازجمله صنایع غذایی، مصارف دارویی، کنترل آلودگی و غیره بسیار موردتوجه محققین قرارگرفته است؛ و لازمه این امر جداسازی و شناسایی ترکیبات اصلی این جلبک‌ها، مطالعه اثرات سیتوتوکسیک آن‌ها هست.

امروزه استروئیدهای جلبکی به لحاظ اثرات بیولوژیک شاخص، جهت تهیه داروها و دیگر مصارف بسیار موردتوجه هست. خلیج‌فارس دارای جلبک‌های اقتصادی و دارویی فراوانی است که تابه‌حال موردبررسی

Archive of SID
www.SID.ir

فیتوشیمیایی قرار نگرفته‌اند ازجمله دو جلبک *Colpomenia sinosa* و Iyengaria *stellata* موردبررسی در این تحقیق که بومی ایران بوده و از فراوانی وسیعی سواحل خلیج‌فارس در فصول زمستان و بهار برخوردار هستند.

اهداف کلی موردنظر در این طرح شناسایی ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی باکتریال، سیتوتوکسیک و ضد قارچی جلبک‌های قهوه‌ای *Colpomenia Sinosa* و *Iyengaria Stellata* هست.

اهداف جزئی این طرح عبارت‌اند از:

- جمع‌آوری و شناسایی جلبک‌های قهوه‌ای از سواحل خلیج‌فارس *Colpomenia Sinosa* و Iyengaria *Stellata*
- تهیه عصاره‌های اتیل استاتی-متانولی و متانولی –آبی از جلبک‌های فوق
- بررسی خواص آنتی باکتریال –سیتوتوکسیک و ضد قارچی وضدسرطانی عصاره‌های جلبک‌ها

در این تحقیق فرض بر این گذاشته می‌شود که عصاره‌های جلبک‌های مذکور دارای اثرات آنتی باکتریال، سیتوتوکسیک، ضد قارچی و ضدسرطانی هست.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول

کلیات و بررسی منابع

Archive of SID

www.SID.ir

1- صفات عمومی جلبک‌ها

1-1- ساختار سلولی جلبک‌ها

الف- **شکل سلول:** جلبک‌ها دارای بافت‌های نسبتاً غیر متمایز هستند که فاقد ریشه- ساقه یا برگ‌های حقیقی هستند. پیکر جلبک‌ها دارای تنوع بسیاری است. برخی اشکال تک‌سلولی بدون حرکت و برخی متحرک هستند در بسیاری از گونه‌ها سلول‌ها در دسته‌هایی به نام کلونی‌ها جمع شده‌اند. این جلبک‌ها ممکن است رشته‌ای (نخی شکل) و یا اشکال دیگر داشته باشند.

انواع رشته‌ای جلبک‌ها معمولاً چند سلولی بوده و با قرار گرفتن سلول‌ها انتها به انتها، رشته‌های نخی منشعب یا غیر منشعب تشکیل می‌دهند و به‌اندازه‌ای بزرگ هستند که با چشم غیرمسلح دیده می‌شوند. معمولاً سلول قاعده‌ای رشته‌ها اختصاص‌یافته است. این سلول گیره (Holdfast) نامیده می‌شود و مانند قلابی رشته را به بستر صخره‌ای، چوبی به‌ندرت به ماسه‌ای و گلی متصل می‌سازد.

کلونی جلبک‌های غیر رشته‌ای معمولاً تجمعی از سلول‌های گوی مانند یا صفحه‌ای شکل، بدون گیره قاعده است. سلول‌ها درون چنین کلونی‌هایی ممکن است از یکدیگر مستقل یا به‌وسیله رشته‌های سیتوپلاسمی به هم متصل باشند.

جلبک‌های سبز، سبز – آبی، سبز – زرد و دیاتومه ها گروه‌هایی هستند که شامل بسیاری اشکال تک‌سلولی و کلونی‌های رشته‌ای و غیر رشته‌ای می‌باشند. در جلبک‌های قرمز و قهوه‌ای اشکال تک‌سلولی و کلونی غیر رشته‌ای نادر است.

پیکر یک جلبک به‌عنوان تال (ریشه) شناخته می‌شود. تشکیلات تال در جلبک‌ها به دو شکل است: تک‌سلولی و پرسلولی. سلول‌ها در تال پرسلولی توسط ماده موسیلاژی در کنار هم قرار می‌گیرند و یا توسط الیاف متصل به تیغه‌ها ارتباط برقرار می‌کنند.

جلبک‌ها در چرخه زندگی دو مرحله می‌گذرانند:

الف- مرحله رشد و توسعه ب- مرحله تولیدمثل و تکثیر

در جلبک‌های تک‌سلولی در مرحله رشد تنها با بزرگ شدن سلول صورت می‌گیرد و ازدیاد سلول که همراه با تقسیم سلولی همراه است در مراحل تولیدمثل است ولی در پرسلولی‌ها هم مرحله رویش و هم مرحله تولیدمثل هر دو با رشد سلول همراه است.

در کلیه شاخه‌های جلبک‌های تک‌سلولی (به‌جز جلبک‌های قهوه‌ای)، اشکال تک‌سلولی بی‌حرکت یا متحرک هستند. تک‌سلولی‌های متحرک دو نوع هستند، یکی نوع تاژک‌دار که به‌وسیله تاژه حرکت می‌کنند (که در تمام شاخه‌ها به‌جز جلبک‌های سبز – آبی و جلبک‌های قرمز وجود دارند.) و نوع دیگر، نوع ریزوپودیال Rhizopodiales یعنی دارای برآمدگی‌های پروتوپلاسمی در سطح سلول می‌باشند که مشابه با پاهای کاذب Rhizopodia بوده دارای حرکت آمیبی است.

Archive of SID
www.SID.ir

در اشکال چند سلولی نحوه تقسیم سلول‌ها و طرز قرار گرفتن سلول‌های جدید، پس از تقسیم به سه نوع اصلی کلونی دار، رشته‌ای ولوله‌ای شناخته می‌شوند.

جلبک‌ها و سایر تال داران به‌عنوان اشکال ابتدایی زندگی گیاهان در نظر گرفته می‌شوند که ارتباط نزدیک با ابتدایی‌ترین موجودات زنده سطح زمین‌دارند. صفت ابتدایی‌ترین به فقدان پیچیدگی نسبت داده‌شده است نه به فقدان سازش با محیط. تال داران می‌توانند به‌خوبی گیاهان عالی نظیر سرخس‌ها، مخروطیان و گیاهان گل‌دار با وضع زندگی خود سازش یابند. اگرچه جلبک‌ها به‌طورکلی دارای تشکیلات ساختمانی نسبتاً ساده هستند، بسیاری از گروه‌های جلبک‌ها نه‌فقط در تمایز ساختمانی بلکه درروش های تولیدمثلی، بسیار پیچیده‌تر از گیاهان دیگر هستند. (45و4).

ب- **پلاست**: پلاست ها معمولاً برجسته‌ترین صفت سلول‌های جلبکی هستند که در زیر میکروسکوپ دیده می‌شوند. تعداد آن‌ها از یک تا چندین عدد متغیر بوده و تنوع شکلی زیادی نشان می‌دهند. در پلاست بسیاری از جلبک‌ها ناحیه متراکمی با پروتئین خاصی به نام پیرنوئید یافت می‌شود. در جلبک‌های سبز پیرنوئید معمولاً به‌وسیله ورقه‌ای از دانه‌های نشاسته احاطه‌شده و در میان کلروپلاست قرارگرفته است. در سایر جلبک‌ها اجسام نشاسته مانندی ممکن است خارج از پلاست در سیتوپلاسم یافت شود.

ج- **تاژه**: در کلیه شاخه‌های جلبکی به‌استثناء جلبک‌های سبز- آبی و قرمز سلول‌های تاژک‌دار وجود دارد. ساختمان تاژک شبیه به تاژک سایر موجودات زنده است. تعداد و محل خارج شدن و طول تاژک در جلبک‌ها متفاوت است.

د- **دیواره سلولی**: دیواره سلولی موجود در جلبک‌ها از جنس کربوهیدرات است و گاهی با مواد دیگری نظیر پروتئین، کربنات کلسیم، آهن و پکتین همراه است و گاهی هم کاملاً سیلیسی است. دیواره سلولی از دو قسمت تشکیل‌شده است. یک بخش خارجی بی‌شکل که موسیلاژی یا پکتینی است و به‌آسانی در آب جوش حل می‌شود و بخش دیگر یک‌لایه بیرونی است که سخت و غیر محلول در آب جوش بوده و از میکروفیبریل تشکیل‌شده است.

بر اساس ترکیبات شیمیایی سه نوع دیواره در جلبک‌ها وجود دارد: سلولزی، سیلیسی و موکوپلیمری.

جلبک‌ها بر اساس جنس دیواره سلولی به گروه‌های زیر تقسیم می‌شوند:

جلبک سبز: جنس دیواره از سلولزاست.

جلبک قهوه‌ای: دارای ترکیبات اضافی مانند هموسلولزی یا اسید آلژنیک، فوکوئیدین، فوسین است.

جلبک سبز – زرد: جنس دیواره ازپکتین است.

جلبک قرمز: جنس دیواره از سلولز و پکتین است.

دیاتومه: جنس دیواره از سیلیس در قالب ماده پکتین است.

Archive of SID
www.SID.ir

جلبک سبز – آبی: جنس دیواره ازموکو پلیمر (گلوکز آمین، اسیدهای آمینه، اسید دی آمینوسیمیک) است (5).

1-1-2- رده‌بندی جلبک‌ها

در سال 1754 لینه دانشمند و گیاه‌شناس سوئدی کتابی تحت عنوان گونه‌های گیاهی نوشت و این گیاهان را جلبک نام‌گذاری کرد. البته گروه جلبکی رده‌بندی لینه، بسیاری از هپاتیک ها (شبه خزه‌ها) را نیز دربرمی گرفت و این شاید به‌این‌علت بود که در آن زمان بسیاری از شبه خزه‌ها را جلبک می‌پنداشتند. دوژیسو در سال 1789 برای اولین مرتبه حدود و جایگاه جلبک‌ها را مشخص نمود ولی چون برای شناسایی آن‌ها خصوصیات مورفولوژیکی و مایکروسکوپی را مبنا قرارداد گروه‌بندی وی چندان قابل‌اطمینان نبود و تقریباً بدون استفاده قرار گرفت. در سال 1836 یکی از گیاه شناسان به نام ایندیچر، جلبک‌ها، قارچ‌ها و گلسنگ‌ها را جزء یک شاخه گیاهی به نام گیاهان ریسه‌ای یا تالوفیتا قرارداد. ایخلر در سال 1886 توضیحات بیشتر و نسبتاً قابل‌پذیرش را درباره گروه جلبک‌ها عرضه کرد و آن‌ها را همراه با قارچ‌ها در شاخه ریسه‌داران قرار دارد و در این شاخه پنج رده از جلبک‌ها شناسایی شدند. این پنج رده عبارت‌اند از: سیانوفیسه ها، کلروفیسه ها، فئوفیسه ها، دیاتومه ها و ردوفیسه ها. دانشمند دیگری به نام تیپو در سال 1942 جلبک‌ها را در زیر سلسله ریسه‌داران قرارداد و هفت شاخه را شناسایی نمود که عبارت‌اند از: سیانوفیتا، کلروفیتا، اوگلنوفیتا، فائوفیتا، ردوفیتا، گزیستوفیتا و پروفیتا.

کلاً در مورد رده‌بندی جلبک‌ها دو روش اساسی وجود دارد. درروش اول تمام جلبک‌ها در یک شاخه قرارگرفته و سپس به رده‌هایی تقسیم می‌گردند از این رونام آن‌ها با پسوند phyceae می‌آید. درروش دوم جلبک‌ها در حدی بالاتر از شاخه قرار می‌گیرند ازاین‌رو ابتدا به چندین شاخه تقسیم‌شده و پسوند Phyta می‌گیرند. درواقع روش دوم به چندین شاخه گیاهی جلبک اطلاق می‌شود.

تفاوت دیگر در رده‌بندی جلبک‌ها، تعداد شاخه‌ها و رده‌ها قائل شده توسط جلبک شناسان است. ازاین‌رو نام‌های متفاوتی نیز برای هر یک ممکن است وجود داشته باشد و یک رده یا شاخه در دو یا چند رده یا شاخه دیگر موردبررسی قرار می‌گیرد.

سالیان متمادی جلبک‌ها را بر اساس رنگ‌دانه‌های مشخص تقسیم‌بندی می‌کردند این رنگ‌دانه‌ها در جلبک‌ها اهمیت خاصی در شناسایی گروهی دارند. رنگ‌دانه‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند:

1- رنگ‌دانه‌هایی مانند کلروفیل a و b که مستقیماً در امر فتوسنتز نقش دارند.

2- رنگ‌دانه‌هایی مثل فیکواریترین و فیکوسیانین که غیرمستقیم در امر فتوسنتز دخالت دارند.

هر گروه از جلبک‌ها حاوی رنگ‌دانه‌های خاصی می‌باشند و نسبت‌های مختلف این رنگ‌دانه‌هاست که می‌تواند طیف وسیعی از رنگ را در بعضی از گروه‌ها ظاهر نماید؛ بنابراین جلبک‌ها شامل رده سبز، سبز-آبی، قهوه‌ای و قرمز می‌باشند. در تقسیم‌بندی جدید هنوز وجود برخی از رنگ‌دانه‌ها را به‌حساب می‌آوردند.

Archive of SID
www.SID.ir

ولی در سایر صفات نظیر سلول‌شناسی، تاریخچه زندگی، فرآورده‌های ذخیره‌ای، دیواره سلولی، ساختمان و طرز قرار گرفتن تاژک‌ها در سلول‌های تولیدمثلی مانند زئوسپورها و گامت ها، نیز در تقسیم‌بندی تأکید شده است. درنتیجه مطالعات دقیق 25 سال اخیر، جلبک شناسان متوجه شده‌اند که شناخت جلبک‌ها می‌باید بر مبنای مطالعات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی هر یک از سلول‌ها استوار گردد. ازاین‌رو توانستند جلبک‌ها را با در نظر گرفتن پنج مشخصه: شامل رنگ‌دانه فتوسنتزی، نوع مواد ذخیره‌ای، مواد تشکیل‌دهنده دیواره سلولی، تعداد و مکان تاژک‌ها و جزئیات ساختمان سلولی به شش شاخه تقسیم‌بندی کنند.

1- سیانوفیتا (Cyanophyta) یا جلبک‌های سبز- آبی.
2- کلروفیتا ((Chlorophyta یا جلبک‌های سبز.
3- کریسوفیتا (Chrysophyta) یا جلبک‌های سبز –زرد.
4- باسیلاریوفیتا (Bacillariophyta) یا دیاتومه ها
5- ردوفیتا (Rhodophyta) یا جلبک‌های قرمز
6- فائوفیتا (Phaophyta) یا جلبک‌های قهوه‌ای (4).

1-1-3-چرخه زندگی در جلبک‌ها

هر موجود زنده در طی حیات خود مراحل متفاوتی را طی می‌کند تا نسل جدیدی را که مشابه خود هستند به وجود آورد. این مراحل را چرخه زندگی Life cycle گوییم. سه نوع اصلی چرخه حیاتی در جلبک‌ها دیده می‌شود؛

1 :چرخه زندگی هاپلوبیونتیک و هاپلوئیدی : Haplobiontic,Haplontic (H,h) این جلبک‌ها فقط به یک حالت دیده می‌شوند و آن به‌صورت هاپلوئیدی است؛ یعنی گیاه اصلی یا تولیدمثل کننده گیاه هاپلوئید است و تنها مرحله دیپلوئیدی (اسپوروفیتی) مربوط به زیگوت است. زیگوت با گذراندن میوز چهار زئوسیور را ایجاد می‌کند (هاپلوئید) که مدت کوتاهی شنا کرده و سلول مادر را ایجاد می‌کنند. سلول مادر به روش میتوز تقسیم‌شده و گامتهای نر و ماده را ایجاد می‌کند که مجدداً زیگوت را به وجود می‌آورند، این نوع از چرخه زندگی در کلامیدوموناس و ولوکس وجود دارد.

2 :چرخه زندگی هاپلوبیونیک و دیپلوئیدی : Haplobiontic ,Diplontic (H,d) این جلبک‌ها نیز فقط به یک حالت دیده می‌شوند و آن به‌صورت دیپلوئیدی است؛ یعنی گیاه اصلی دیپلوئیدی بوده و درنتیجه اندام‌های تولیدمثل جنسی (آنتریدیوم و اوگونیوم) ایجاد می‌کند که در آن‌ها با تقسیم میوز گامت های هاپلوئید ایجاد می‌شوند. این گامت ها با یکدیگر آمیزش حاصل کرده و زیگوت n2 را ایجاد می‌کنند که با تقسیمات میتوزی گیاه دیپلوئید را به وجود می‌آورد. در این نوع از چرخه زندگی مرحله هاپلوئید تنها در گامتها خلاصه می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

3 :چرخه زندگی دیپلوبیونیک هاپلوئیدی به‌علاوه دیپلوئیدی :Diplobiontic (D, h+d) در این چرخه زندگی دو نسل (دو نوع گیاه) هاپلوئید و دیپلوئید ایجاد می‌شود که ممکن است ازنظر ریختی مشابه یا متفاوت باشند. سلول تخم با تقسیمات میتوز ایجاد گیاه دیپلوئید (اسپورفیتی) را می‌نماید. گیاه اسپورفیت در درون گامت آنژیوم هایی تقسیم میوز انجام داده و زئوسپورهای (n) هاپلوئید را ایجاد می‌کند. زئوسپورها پس از مدت کوتاهی تاژک‌های خود را ازدست‌داده و با تقسیمات میتوزی گیاه هاپلوئید را می‌سازند. گیاه هاپلوئید گامتهای n کروموزومی را ایجاد می‌نماید که با ترکیب آن‌ها زیگوت ایجاد می‌شود. در جلبک‌هایی مانند اکتوکارپوس، دیکتیوتا و اولوا دو گیاه هاپلوئید و دپلوئید ازنظر ریختی مشابه هستند که این نوع چرخه زندگی به ایزومورفیک Isomorphic معروف است. اگر دو گیاه هاپلوئید و دیپلوئید شباهتی به یکدیگر نداشته باشند مثلاً جلبک گامتوفیت کوچک و اسپورفیت بزرگ داشته باشد (مانند لامیناریا) و یا برعکس دارای گامتوفیت بزرگ و اسپوروفیت کوچک باشد (مانند کاتلریا)، گیاه را هترومورفیک Heteromorphic می‌نامند.

4 : چرخه زندگی‌تری فازیک یا سه مرحله‌ای: این نوع از چرخه زندگی دارای سه نسل متفاوت شامل گامتوفیت هاپلوئید، کارپواسپورفیت دیپلوئید و تتراسپورفیت دیپلوئید است. در برخی جلبک‌های قرمز این نوع چرخه مشاهده می‌شود که در این حالت گیاه گامتوفیت نر و ماده مشترک یا مجزا هستند و درنهایت تولید آنتروزوئید و اووگون می‌نمایند و زیگوت حاصل از لقاح آن‌ها کارپوسپور تولید می‌نماید. کارپوسپور می‌تواند گیاه کارپوسپوروفیت را بسازد و این گیاه نیز تتراسپورفیت را بسازد و یا اینکه کارپوسپور مستقیماً فرد تتراسپورفیت را می‌سازد. در هر حالت تتراسپورفیت با تقسیم میوز تتراسپورها و گیاه گامتوفیت جدید را تولید می‌کند.

1-2- جلبک‌های مایکروسکوپی:

جلبک‌های مایکروسکوپی دریایی که معمولاً به‌صورت بنتوزی یا کف زی می‌باشند تحت عنوان Seaweed شناخته می‌شوند. به گروه ابتدایی گیاهان غیرگلدار تعلق دارند که تالوفیت‌ها می‌باشند. این گروه از گیاهان مجموعه از تولیدکنندگان اولیه را در مناطق جزر ومدی و زیر جزر و مدی تشکیل می‌دهند. بیشتر جلبک‌های دریایی ازنظر پراکنش از نواحی بین جزر و مدی تا ناحیه کم‌عمق زیر جزر و مدی محیط‌های دریایی محدود می‌گردند. اختلاف در الگوی پراکنش آن‌ها به توانایی سازگاری آن‌ها به شرایط اکولوژیک در زیستگاه‌هایشان برمی‌گردد.

1-2-1- اهمیت اقتصادی جلبک‌های مایکروسکوپی:

جلبک‌های مایکروسکوپی از دو جنبه ا اقتصادی و اکولوژیکی دارای اهمیت زیادی می‌باشند .ازنظر اکولوژیکی، جلبک‌ها در پایه هرم انرژی اکوسیستم‌های عظیم دریایی بوده و به‌عنوان تولیدکنندگان اصلی زنجیره غذایی، تثبیت‌کنندگان ازت و ایجاد اکوسیستم‌های خاص و تأمین زیستگاه مناسب برای آبزیان

Archive of SID
www.SID.ir

دارای نقش حیاتی می‌باشند .از جنبه اقتصادی این گیاهان در تهیه علوفه، کود و تولید بسیاری از پلی سارکاریدهای باارزش نظیر آگار، کاراژینان، آلژینها، اسیدهای چرب ضروری، املاح معدنی، ویتامین‌ها و غیره می‌باشند لذا کاربردهای فراوانی در صنایعی از قبیل صنایع کاغذسازی، نساجی، علوم پزشکی و داروسازی دارند، بسیاری از گونه‌ها به‌طور مستقیم به‌عنوان سبزی و سالاد، چاشنی سوپ به کار می‌روند. مردم ژاپن مدت طولانی است که از جلبک‌های دریایی به‌عنوان ماده خام اولیه در رژیم غذایی خود استفاده می‌برند و مصارف مستقیم این گیاهان وفیکوکلویید های قابل‌استخراج از آن‌ها روزبه‌روز در حال گسترش است (6و7).

1-2-2- کاربردهای دارویی و پزشکی جلبک‌های مایکروسکوپی:

با تحقیقات و آزمایش‌های به‌عمل‌آمده در بسیاری از جلبک‌ها آثار دارویی نظیر ضد قارچی، ضد باکتری، ضدویروسی، خواص آنتی‌بیوتیکی، ضد تومور، کاهنده کلسترول خون، درمان گواتر، سل، درد مفاصل، التیام سوختگی، بند آمدن خونریزی، کاهنده تب کودکان مشخص‌شده است (8).

1-3-ویژگی‌های جلبک‌های قهوه‌ای

رنگیزه‌های موجود در کلروپلاست آن‌ها شامل کلروفیل a و c و کاروتن و رنگیزه قهوه‌ای‌رنگی است به نامفوکوگزانتین که مقدار آن از مقدار کلروفیل بیشتر بوده و درنتیجه باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای در تال می‌شود. مواد غذایی ذخیره در یاخته شامل مانیتول و لامینارین است و در ترکیبات دیواره یاخته‌ای جلبک‌های قهوه‌ای، غیر از سلولز مواد دیگری ازجمله اسید آلژینیک وجود دارد که ازنظر اقتصادی دارای اهمیت زیادی است. تال در جلبک‌های قهوه‌ای تماماً پرداخته‌ای است. در این جلبک‌ها، تال تک‌یاخته‌ای و همچنین به‌صورت کلونی دیده نمی‌شود؛ و یاخته‌های متحرک آن‌ها قلوه‌ای شکل بوده و دارای دو تاژک در قسمت جانبی هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

1-3-1-پراکندگی جلبک‌های قهوه‌ای

به‌جز چند نمونه که از آن‌ها در آب‌های شیرین یافت می‌شوند بقیه آن‌ها تماماً در آب‌های شور دریاها و اقیانوس‌های مناطق سرد زیست می‌کنند. بعضی از آن‌ها نیز در آب‌های گرم دیده می‌شوند. عده‌ای از جلبک‌های قهوه‌ای در آب‌های کم‌عمق و در فاصله جزر و مد دریا بر روی سنگ‌ها زیست می‌کنند.

1-3-2- شیمی جلبک‌های قهوه‌ای:

این جلبک‌ها به خاطر دارا بودن رنگ‌دانه قهوه‌ای و یا ترکیبی از چند رنگ‌دانه به رنگ قهوه‌ای مشاهده و لذا به این نام خوانده می‌شود. انتشار جغرافیایی آن‌ها بیشتر در سواحل اقیانوس‌ها و دریاهای سردتر بوده و رشد آن‌ها عمدتاً بر روی صخره‌ها در نواحی جزر و مدی و زیر جزرمدی است. به‌طورکلی از این جلبک‌ها به خاطر داشتن ازت و پتاسیم فراوان در تهیه کودهای پتاس یا ازته استفاده می‌شود. ثانیاً از دیواره سلول‌های آن‌ها مواد کلوئیدی خاصی (آلژینات‌ها) استخراج می‌شود که دارای مصارف دارویی و صنعتی است. همچنین مواد طبیعی استخراج‌شده از این جلبک‌ها اثرات آنتی باکتریایی مشهودی بر روی برخی باکتری‌ها نشان داده‌اند.

مواد طبیعی استخراج‌شده از جلبک‌های قهوه‌ای عبارت‌اند از:

1- بتائین‌ها، استرول‌ها
2- پلی هیدرو کسی فنل‌ها
3- دی ترپنوئیدها و سنرکوئی ترپنوئیدها
4- فنل‌های آسیله
5- ترکیبات نیتروژن دار
6- کربوهیدرات‌های پلی مریک
7- کربوهیدرات‌های جلبکی با فعالیت ضد توموری
8- کربوهیدرات‌های با خاصیت ضد انعقاد خون.

1-3-2-1-بتائین ها

تعداد نسبتاً زیادی از جلبک‌های قهوه‌ای بتائین های زیر را دارا هستند.

1-3-2-1-1-گلیسین بتائین: دارای عامل متیل است.

$$\text{—}\quad \overset{\diagup}{\underset{\diagdown}{N^{+}(CH_2)_n}}\text{—}coo^{-}$$

آمینوبوتیریک اسید بتائین تقریباً اثر مشابه استیل کولین دارد (n=3).

بتا آلائین بتائین: میزان کلسترول پلاسما را پایین می‌آورد (n=2).

پرولین بتائین: به‌صورت مؤثری بر میزان و مدت واکنش‌ها مؤثر است.

Archive of SID
www.SID.ir

محققان آمینواسیدهای یددار از جلبک‌های قهوه‌ای به دست آورده‌اند مانند منو یدو تیروزین، دی یدو تیر وزین، تری یدو تیروزین و تیروکسین که پس از هیدرولیز از عصاره‌های جلبک *Laminaria* به دست آوردند که نقش مهمی در کاهش غلظت کلسترول خون به عهده‌دارند.

1-3-2- 2-استرول‌های جلبک‌های قهوه‌ای

استرول‌ها گروهی از ترکیبات آلی هستند که به‌صورت طبیعی در گیاهان خشکی، جلبک‌ها، قارچ‌ها، جانوران وجود دارند. یکی از آشناترین برگه‌های استرول، کلسترول است که برای انجام فعالیت‌های سلولی. ساختن ویتامین‌ها و هورمون‌های استروئیدی به کار می‌رود. به استرول‌های گیاهی فیتواسترول اطلاق می‌شود. از فیتواسترول‌ها مشترک بین گیاهان خشکی و جلبک‌ها می‌توان به سیتواسترول و استیگمااسترول اشاره کرد. از استرول‌های گزارش‌شده از جلبک‌های قهوه‌ای فوکوسترول ((Fucosterol، سارینگوسترول 22 متیلن کلسترول، سارگا سترول اشاره کرد.

با افزودن استرول‌های جلبکی به رژیم غذایی می‌توان میزان کلسترول پلاسما را کاهش داد. همچنین تحقیقات انجام‌شده افزودن سارگارسترول و فوکوسترول از جلبک‌های قهوه‌ای جنس سارگاسوم می‌تواند کلسترول پلاسما را تا 59 درصد پایین می‌آورد. همچنین کلسترول به‌عنوان پیش ساز هورمون‌های استروئیدی (استروژن، گلوکوکورتیکوئیدها و مینرالوکورتیکوئیدها) واسیدهای صفراوی عمل می‌کند.

1-3-2- 3-پلی هیدرو کسی فنل ها:

فعالیتی که جلبک‌های قهوه‌ای علیه باکتری‌ها نشان می‌دهند بیشتر به دلیل مواد تانن مانند فنوولیک آن‌ها است. در حال حاضر 5 گروه از این مواد شناسایی‌شده‌اند که عبارت‌اند از:

الف:Fucols: که دارای واحدهای Phloroglucinol بوده و با پیوند آریل-آریل به هم ملحق شده‌اند.

ب:Phlorethols دارای واحدهایی هستند که با باندهای استر دی آریلی به هم متصل شده‌اند.

ج:Fuco phlorethols که هم پیوند هائی مستقیم C.C و هم باندهای اتردی آریل دارند.

1-3-2- 4-دی ترپن های موجود در جلبک‌های قهوه‌ای:

بسیاری از دی ترپن های آلیفاتیک و سیکلیک از گروه‌های خاصی از جلبک‌های قهوه‌ای خصوصی خانواده سارگاسوم، سیستوسریا و دیکتیوتاسه جداشده‌اند. این مواد غالباً به همراه سایر اثرات داروئی خود، اثر ضد میکروبی، سمی و ضد تغذیه‌ای علیه گیاهخواران دارند. دی ترپن های حلقوی از جلبک‌های *Sargassum totile* و *Cystoseria crinito* در اعضای خانواده Dictyotaceae یافت شده اندکه این مواد ازنظر ساختمانی مشابه دی ترپن هایی هستند که از خیار دریائی و مرجان‌های نرم به دست می‌آیند.

الف-دی ترپن هایی که اسکلت Xenicane دارند که از مرجانهای نرم وگزنیکانها فعال که از خانواده Dictyotaceaeاستخراج می‌شوند.

Archive of SID
www.SID.ir

ب-دی ترپن هایی که دارای سیستم حلقوی سز کویی ترپن با واحد ایزوپرن اضافی و یا Spatoldiol در اطراف زنجیر هستند. این دو ترکیب از جلبک‌های قهوه‌ای *Stoechospermum marginatum* استخراج می‌شوند.

ج-دی ترپن هایی که دارای اسکلت دولابلایی بوده و از متابولیک‌های جلبک‌ها به‌دست‌آمده‌اند. در سال 1982 پژوهشگران سریلانکایی از مخلوطی از جلبک‌های قهوه‌ای مو نو استات های دی ترپنوییدی جداسازی کرده بودندکه بر روی باکتری استافیلوکوکوس مؤثر و خاصیت ضد باکتریایی داشته‌اند.

1-3-2- 5-ترکیبات نیتروژن دار:

متابولیک‌های نیتروژنه کالرپین از چندگونه Caulerpa جداشده و به نظر می‌رسد که فعالیت بازدارندگی تغذیه‌ای این جلبک و بخصوص گونه *Caulerpa prolifera* به دلیل این ماده است.

1-3-2- 6-کربوهیدرات‌هایی با خاصیت انعقاد خون:

از گونه‌های سارگاسوم،پلی ساکارید سولفاته شده به‌دست‌آمده که فعالیت ضد انعقادی زیادی دارد. ظاهراً این فعالیت به دلیل گروه سولفات استری این مواد است.

1-3-2- 7-متابولیک‌های استخراج‌شده از جلبک‌های قهوه‌ای

1-3-2- 8-پلی فنل ها، ترپن ها و استرولها در جلبک‌های قهوه‌ای

غلظت پلی فنل ها، ترپنها و استرولها در گونه‌های Dictyotales اندازه‌گیری شده‌اند و مانند یک دفاع شیمیایی علیه آمفی پودها آزمایش شدند. فوکوس‌ها مقادیر بالایی از استرول‌ها را نشان دادند. دیکتیوتالها در دی ترپن ها غنی بوده و هر دو گونه در پلی فنل ها ضعیف بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

1-3-3- رده‌بندی جلبک قهوه‌ای Iyengaria Stellata (Børg.) Børg:

جدول شماره 1 رده‌بندی جلبک قهوه‌ای *Iyengaria Stellata* (Børg.) Børg

Iyengaria Stellata (Børg.) Børg	
Ochrophyta	سلسله
Phaeophyceae	رده
Scytosiphonales	راسته
Scytosiphonaceae	خانواده
Iyengaria	جنس
Stellata	گونه

شکل 1: جلبک قهوه‌ای *Iyengaria Stellata (Børg.) Børg*

Archive of SID

www.SID.ir

1-3-3-1-ریخت‌شناسی جلبک قهوه‌ای *Iyengaria Stellata (Børg.) Børg*

این جلبک دارای رنگ قهوه‌ای تیره، نیمه کروی، نیمه ستاره‌ای، اسفنجی و دارای تال یا ریسه‌های توخالی با زوائد توخالی است. دارای طول 50-25 میکرومتر و پهنای 25-10 میکرومتر است. شکل آن در حالت کلنی کشیده سیلندری شکل است.

1-3-3- 2-تولیدمثل جلبک قهوه‌ای *Iyengaria Stellata (Børg.) Børg*

دارای اندام تناسلی اسپورانژیا پلوریکولار است این جلبک دارای اسپورانژیا ها چند سلولی و هر سلول حاوی یک اسپور است. این اسپورانژها از لایه اپیدرم یا محیطی تولید می‌شوند.

1-3-3- 3-پراکنش جلبک قهوه‌ای *Iyengaria Stellata (Børg.) Børg*

اولین بار در سال 1940 در سواحل کراچی مشاهده و گزارش شد. این نمونه بومی خلیج‌فارس و اقیانوس آرام است. این‌گونه ساکن مناطق بین جزرمدی وزیر جزرمدی است و به‌صورت اپی لیتیک یا بنتیک بر روی مناطق صخره‌ای گسترش می‌یابد. رشد انبوه آن‌ها از اوایل زمستان تا اوایل بهار است.

1-3-4- رده‌بندی جلبک قهوه‌ای*Colpomenia Sinuosa*

جدول شماره 2: رده‌بندی جلبک قهوه‌ای*Colpomenia Sinuosa*

Colpomenia sinuosa	
سلسله	Brown algae
شاخه	Heterokontophyta
رده	Phaeophyceae
راسته	Sphacelariales
جنس	*Colpomenia*
گونه	*Sinuosa*

Archive of SID

www.SID.ir

شکل 2: جلبک قهوه‌ای*Colpomenia sinuosa*

1-4-3-1- ریخت‌شناسی جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*

این جلبک دارای تال یا ریسه‌های قهوه‌ای مایل به سبز یا زرد، دارای تالهایی با سطح صاف و نیمه کروی با لکه‌های قهوه‌ای تیره بر روی سطح تال است. تال ها توخالی دارای ساختار لوب مانند غشائی و تاشو می‌باشند. توسط دیسک‌های کوچک غشائی به سطح صخره‌ها می‌چسبند که قطر این دیسک‌ها 64-4/5 سانتیمتر است.

1-3-4-2- تولیدمثل جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*

دارای اندام تناسلی اسپورانژیا پلوریکولار می این اسپورانژها از لایه اپیدرم تولیدشده‌اند که به‌صورت پخش بر روی سطح تال قرار دارند. اسپورانژها سیلندری شکل به‌صورت یک یا دو سری به رنگ قهوه‌ای تیره با طول 25-85 میکرومتر و پهنای 7.5-25 میکرومتر هستند.

1-3-4-3- پراکنش جلبک قهوه‌ای *Colpomenia Sinuosa*

این جلبک به‌صورت چسبیده به بستر در مناطق صخره‌ای در مناطق جزرمدی و زیر جزرمدی مشاهده می‌شود. دارای پراکنش نسبتاً وسیعی در مناطق صخره‌ای در فصول زمستان و اوایل بهار (دی‌ماه تا اردیبهشت‌ماه) بوده و نوسانات زی‌توده آن نیز در این دو فصل است. حداکثر زی‌توده این‌گونه در فصول زمستان و بهار است.

1-4-خلیج‌فارس:

خلیج‌فارس در 24 تا 30 درجه و 30 دقیقه عرض شمالی و 48 تا 56 درجه و 25 دقیقه طول شرقی از نصف‌النهار گرینویچ قرار دارد. این خلیج توسط تنگه هرمز به دریای عمان و از طریق آن به دریاهای آزاد مرتبط است و گسترش آن به‌موازات محور NW/SE از تنگه هرمز تا سواحل شمال غربی ایران است. خط

Archive of SID
www.SID.ir

ساحلی به طول حدود 1000 کیلومتر و مساحت آن 239/000 کیلومترمربع است. طول خلیج‌فارس از تنگه هرمز تا آخرین نقطه پیشروی آن در جهت غرب در حدود 805 کیلومتر است. عریض‌ترین بخش خلیج‌فارس 180 مایل (290 کیلومتر) است. این دریا در حقیقت محیط نیمه بسته کم‌عمقی است که عمق متوسط آن حدود 35 متر با حداکثر عمق بین 10 تا 90 متر در سمت شمال شرقی سواحل ایران و حدود 100 متر نزدیک به تنگه باریک هرمز است. این تنگه باعث اتصال دریا به خلیج عمان و دریای عرب می‌شود.

حداکثر عرض این دریا 338 کیلومتر است و تخمین زده می‌شود که حجم آن برابر با حدود 7800 کیلومتر مکعب و یا حدود 8730 کیلومتر مکعب باشد.عمقی این دریا باعث شده تا شدیداً تحت تأثیر متغیرهای جوی قرار گیرد. با توجه به احاطه شدن توسط ارتفاعات مرتفع و سرزمین‌های پست در طرفین شمالی، جنوبی، میزان تبخیر در آن تشدید شده و باعث افزایش تبادلات آبی از میان تنگه هرمز می‌شود.

1-4-1- موجودات خلیج‌فارس:

جانداران خلیج‌فارس مانند تمام آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری از تنوع فراوانی برخوردارند. در خلیج‌فارس انواع مختلفی از ماهی، میگو، صدف، جلبک، مرجان و ... یافت می‌شوند. وجود سواحل صخره‌ای و شرایط زیست‌محیطی مناسب، رویش جلبک‌های مایکروسکوپی را در سواحل و جزایر خلیج‌فارس مناسب نموده است.

1-5- جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی

در سال‌های اخیر گرایش جدیدی به جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی مشاهده می‌شود. به‌کارگیری آزمون‌های غربالگری مناسب در حوزه مطالعه و خالص‌سازی ترکیبات طبیعی موجب هدفمند شدن امر جداسازی، تسریع در شناسایی ترکیبات فعال و کاهش هزینه‌ها می‌گردد. بااین‌وجود، این مسئله کمتر موردتوجه محققین قرارگرفته است (9).

آزمون‌های بیولوژیک به 4 گروه پیش غربالگری[1]، غربالگری[2]، پایش[3] و آزمون‌های ثانویه[4] تقسیم می‌شوند.

آزمون‌های پیش غربالگری بر روی تعداد زیادی از نمونه‌های اولیه به‌منظور یافتن هرگونه فعالیت بیولوژیک در آن‌ها انجام می‌شوند. این آزمون‌ها باید سریع با هزینه کم قابل انجام باشند و از ظرفیت بالایی جهت بررسی تعداد زیادی نمونه برخوردار باشند. اغلب این آزمون‌ها کیفی می‌باشند. آزمایش‌های غربالگری، جهت انتخاب ترکیبات برای ورود به مرحله آزمون‌های ثانویه انجام می‌شوند و شیوه‌های پایش به‌منظور هدفمند کردن فراکشن های عصاره‌های تام و جداسازی ترکیبات خالص از آن‌ها به کار گرفته می‌شوند. این آزمایش‌های نیز باید سریع و ارزان بوده و ظرفیت بالایی داشته باشند. در آزمون‌های ثانویه، ترکیبات خالص

---

[1] - Prescreening
[2] - screening
[3] - monitoring
[4] - secondary tests

Archive of SID
www.SID.ir

به‌دست‌آمده از مراحل قبل برای ورود به مراحل بالینی دست‌چین می‌شوند. به‌این‌ترتیب، آزمون‌های ثانویه اختصاصی و گران‌تر در مدت‌زمان طولانی‌تری قابل انجام هستند و ظرفیت پایینی دارند (10).

لازم به ذکر است که در همه برنامه‌های غربالگری مراحل پیش غربالگری و غربالگری مجزا از یکدیگر نمی‌باشند و درصورتی‌که آزمون مورداستفاده به‌اندازه کافی انتخابی باشد و توان کاهش تعداد ترکیبات فعال به تعداد قابل ورود به مرحله آزمون ثانویه را داشته باشد، نیازی به انجام آزمایش‌های پیش غربالگری نبوده و می‌توان از آن صرف‌نظر کرد. شیوه‌های مورداستفاده جهت پایش جداسازی نیز ممکن است همان آزمون‌های مورداستفاده جهت غربالگری باشند (10).

1-6- مروری اجمالی بر انواع آزمون‌های غربالگری:

1-6-1-روش‌های غربالگری عمومی:

این آزمون‌ها خود به دودسته آزمایش‌های جامع[5] و آزمایش‌های اولیه[6] تقسیم می‌شوند.

1-6-2-آزمون‌های غربالگری جامع:

1-6-3- آزمون‌های غربالگری اولیه[7]:

دو مورد از معروف‌ترین آزمون‌های غربالگری اولیه عبارت‌اند از Brine Shrimp Lethality Assay و Crown-gall Tumor Inhibitionآزمون. فن اول یک آزمایش In vivo است که توسط یک سخت‌پوست آبزی به نام آرتمیا سالینا انجام می‌شود. این آزمون از زمان معرفی آن در سال 1982 به‌عنوان روشی جهت یافتن ترکیبات آنتی تومور و حشره‌کش تولیدشده توسط گیاهان مورداستفاده قرارگرفته است. با این عقیده که سمیت همان اثر فارماکولوژیک است که در دوزهای بالاتر ظاهر می‌شود، می‌توان این آزمون را جهت پایش فراکشن عصاره‌ها و استخراج ترکیبات فعال فارماکولوژیک نیز به کار گرفت (7). فن بعدی مهار توسعه تومورهای کرون گال بر روی دیسک‌های سیب‌زمینی است. کرون گال یک عارضه نئوپلاستیک است که توسط باکتری گرم منفی به نام *Agrobacterium tumefacien* ایجاد می‌شود و ناشی از انتقال یک پلاسمید ایجادکننده تومور از باکتری به ژنوم گیاه است. این روش سریع، ارزان، ایمن و یک پیش غربالگری قابل‌اطمینان برای فعالیت آنتی توموری 3ps است (11).

در آزمونی دیگر از تخم‌های ستاره دریایی جهت یافتن ترکیبات آنتی تومور استفاده می‌شود. تخم‌های ستاره دریایی *Asterina pectinifera* دارای غشای سلولی قابل‌نفوذ نسبت به برخی ترکیبات است. قرار دادن تخم‌های بارورشده در معرض ترکیبات مختلف آنتی نئوپلاستیک موجب تغییرات مختلف در آن‌ها می‌شود به‌گونه‌ای که می‌توان ترکیبات مهارکننده سنتز DNA و RNA و مهارکننده‌های سنتز پروتئین را ردیابی کرد (12).

---

[5] - broad screening bioassays
[6] - primary screening bioassay
[7] - Primary screening bioassays

Archive of SID
www.SID.ir

1-6-4- روش‌های غربالگری اختصاصی:

این آزمون‌ها پیشرفته‌تر از آزمایش‌های اولیه بوده به مهارت و تجربه بیشتری نیاز داشته و تنها توسط گروه‌های تحقیقاتی متشکل از متخصصان مختلف قابل‌اجرا می‌باشند. این آزمایش‌های بر اساس ارگانیسم‌های مورداستفاده در آن‌ها به دسته‌ها مختلف تقسیم می‌شوند.

الف- **ارگانیسم‌های پست:** برنامه‌های تحقیقاتی متعددی جهت یافتن ترکیبات ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی‌ویروس و ضد پارازیت، ترکیبات ضد ایدز، ترکیبات ضد مالاریا در این دسته جای می‌گیرند.

ب- **دستگاه‌های تحت سلولی:** آنزیم‌ها و رسپتورها ازجمله اجزای جداشده از سلول‌ها می‌باشند که اثر ترکیبات مختلف بر آن‌ها موردمطالعه قرار می‌گیرند.

ج- **دستگاه‌های سلولی:** مانند کشت رده‌های مختلف سلول‌های توموری جهت یافتن ترکیبات ضد سرطان با استفاده از حیوانات کامل.

1-7- آزمون BST:

به‌منظور دستیابی و تکامل داروهای آنتی کانسر از منابع طبیعی، به یک سری آزمایش‌های غربالگری عصاره‌های خام نیازمندیم. همان‌گونه که در آزمون‌های غربال‌گری اولیه ذکر شد، یکی از آزمون‌های معتبر جهت یافتن ترکیبات سیتوتوکسیک، آزمون (BST) است که توسط موسسه ملی سرطان در آمریکا (NCI) تائید شده است (7). اساس این آزمون قابلیت ترکیبات در کشتن لاروهای نوعی سخت‌پوست به نام *Artemia Salina* در محیط کشت آزمایشگاهی است.

آرتمیا سالنیا در سال 1956 توسطMicheal و همکارانش به‌عنوان ارگانیسم مناسب جهت انجام آزمون‌های بیولوژیک معرفی شد(13). سپس توسط Vanhyaeck در سال 1981 و نیز Sleet در سال 1982 توسعه یافت (15و14).

علت استفاده از این موجود، قرابت زیاد آن به ارگانیسم‌های پستاندار است؛ مانند شباهت RNA پلیمر از وابسته به DNA، پمپ سدیم پتاسیم ATPase (35). همچنین این روش دارای مزایای متعددی نسبت به سایر روش‌های مورداستفاده است که از این میان می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: (7).

1-هزینه کم در انجام آزمایش

2-کوتاهی زمان انجام آزمایش

3-عدم نیاز به شرایط استریل یا آسپتیک

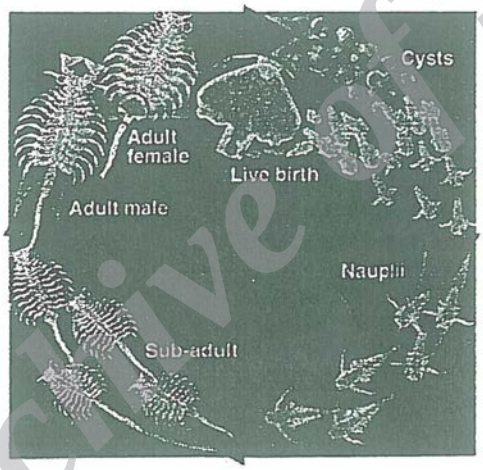
4-نیاز به مقادیر بسیار کم از ماده مورد آزمایش (20 میلی‌گرم برای عصاره‌های اولیه و مقدار خیلی کمتر از فراکسیون‌های فعال)

5- فراوانی تعداد ارگانیسم‌های مورداستفاده و نزدیکی نتایج به‌دست‌آمده ازلحاظ آماری به واقعیت

Archive of SID
www.SID.ir

1-8- آرتمیا سالینا (*Artemia Salina*)

آرتمیا سالینا سخت‌پوستی متعلق به خانواده Artemidae است که در آب‌های شور یافت می‌شود. بر اساس نحوه تولیدمثل، دوسویه برای این خانواده متصور است. سویه اول بکرزا بوده و تولیدمثل غیرجنسی دارد و سویه دوم دارای تولیدمثل جنسی است که آرتمیا سالنیا یکی از آن‌هاست. نحوه تولیدمثل آرتمیای دوجنسی وابسته به شرایط محیط است. در شرایط مساعد به‌صورت تخم‌گذار زنده‌زا بوده و در صورت نامساعد شدن شرایط محیطی (کاهش میزان اکسیژن، کاهش مواد غذایی یا تغییرات شدید درجه حرارت و درجه شوری) تولیدمثل جنسی آرتمیا به‌صورت سیاست‌گذاری انجام می‌گیرد به‌طوری‌که تخم‌ها با پوسته ضخیمی پوشیده شده و در شرایط خشک به مدت طولانی، به‌صورت غیرفعال باقی می‌مانند. قطر سی ست‌ها به‌طور متوسط 240-300 میکرون و وزن خشک هریک از آن‌ها 3-5 میکروگرم است. پس از یک دوره خواب و استراحت[8] با مساعد شدن شرایط محیطی و درجه شوری آب، سی ست‌ها آب جذب کرده و متورم شده، لاروی از آن خارج می‌گردد که ناپلیوس[9] نامیده می‌شود.



شکل 3: چرخه زندگی آرتمیا سالینا

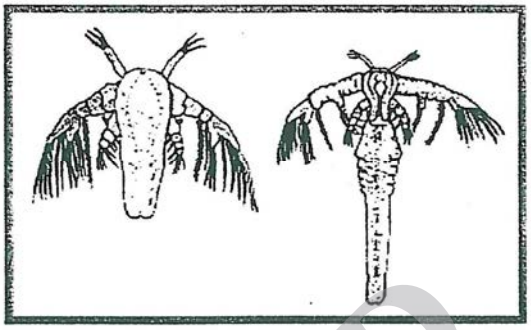
(U.S Geological Survery)

ناپلیوس‌ها تا رسیدن به مرحله بلوغ، مراحل مختلفی را پشت می‌گذارند که در هر مرحله به نام معینی خوانده می‌شوند. بلافاصله پس از تفریح سیست، ناپلیوس در مرحله Instar 1 قرار دارد که از ذخیره غذایی خود استفاده می‌کند. ظهور لوله گوارشی و مخرج نشان می‌دهد که مرحله Instar 1 خاتمه یافته و آرتمیا وارد مرحله Instar 11 شده است. سرعت گذار از این مراحل بستگی به شرایط محیطی، به‌خصوص درجه

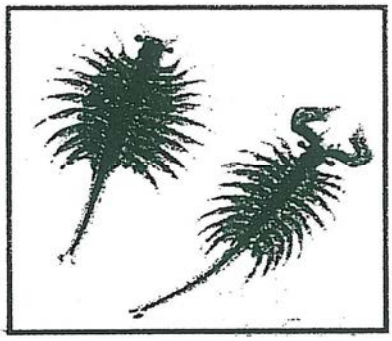
[8] - Diapous
[9] - nauplius

Archive of SID
www.SID.ir

حرارت بالای آب دارد. مرحله Instar حدود 8-6 ساعت طول می‌کشد و پس‌ازآن آرتمیا وارد مرحله متا نوپلیوس[10] شده و پس از طی چند مرحله دیگر به آرتمیای بالغ تبدیل می‌گردد.



شکل 4: متاناپلیوس (چپ) و ناپلیوس (راست)
(Vos, 1980)



شکل 5: آرتمیای بالغ نر (راست) و ماده (چپ)
(U.S. Geological Scurvey)

آرتمیا در محدوده دمایی وسیعی از 6 تا $40^{\circ}C$ قابلیت حیات دارد اما به‌طورکلی درجه حرارت مطلوب بین 30-25 درجه سانتی‌گراد است. سی ست‌ها شرایط دمایی بسیار سخت که هیچ‌گاه در طبیعت رخ نمی‌دهد، از صفر مطلق ($-273^{\circ}C$) تا $100^{\circ}C$ را تحمل می‌کنند. درجه شوری آب نیز می‌تواند از 10 تا 220 گرم نمک در لیتر متفاوت باشد و این در حالی است که بهترین محیط برای زندگی، آب دریا با شوری معادل 35g نمک در هر لیتر آب است.

آرتمیای بالغ به رنگ صورتی روشن است. این رنگ ناشی از وجود پیگمان‌های خونی قرمزرنگ یا هموگلوبین در بدن آن‌ها است که به جانور در برداشت اکسیژن از آب هنگامی‌که غلظت اکسیژن آب به علت افزایش غلظت نمک و افزایش دمای آب، کاهش‌یافته باشد کمک می‌کند. اندازه آرتمیای بالغ حدود 10 میلی‌متر و وزن آن 10-15 میکروگرم است. یک آرتمیای بالغ در طول عمر خود که 2 تا 3 ماه است ممکن است 2000 عدد سیست تولید نماید (16).

1-9- تحقیقات انجام‌شده

1-9-1- مطالعات انجام‌شده بر روی ماکرو جلبک‌ها در جهان

- برخی از گونه‌های شناخته‌شده از ماکرو جلبک‌های دریایی قهوه‌ای حاوی مقدار زیادی از پلی سا کارید در دیواره می‌باشند که اکثر آن‌ها پلی ساکاریدهای سولفاته و فوکویدان هستند که در گیاهان خشکی زی یافت نمی‌شوند(17). فوکویدان دارای گروهای ال-فروکتوز و استر سولفات و طیف گسترده‌ای از مواد فعال بیولوژیکی و دارویی است(18). مطالعات متعددی بر روی وزن مولکول‌های فعال بیولوژیکی، پارامترهای ساختاری و خصوصیات فیزیولوژیکی پلی ساکاریدهای ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای شده است (17). اخیراً عصاره تام جلبک قهوه‌ای Hydroclathrus clathratus جمع‌آوری‌شده از هنگ‌کنگ دارای فعالیت بالا در

[10] - Meta nauplius

Archive of SID
www.SID.ir

برابر ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) و دارای سمیت کم نسبت به ویروس‌های Vero و HEp-2 است (19). فعالیت‌های آنتی‌ویروسی پلی ساکاریدهای سولفاته جداسازی شده از *Sargassum latifolium* توسط آسکار در سال 2007 گزارش‌شده است که این فعالیت وابسته به درجه سولفاته شدن و وزن مولکولی آن دارد. بسیاری از پلی ساکاریدهای جداسازی شده به روش اسیدی، فوکوییدان خام هستند (20). میزان و بازده پلی ساکاریدهای استخراجی از جلبک‌های قهوه‌ای بستگی به گونه جلبک، روش استخراج و فاکتورهای اکولوژیکی دارد(51). فعالیت ضد میکروبی جلبک‌های قهوه‌ای در تایلند گزارش‌شده است (21). عصاره خام فوکییدان استخراج‌شده از *Sargassum polycystum* سبب کاهش اثرات و عفونت سندرم ویروس (WSSV) در Penaeus monodon شد(22).

- در سال2006 پاسکالوا و همکارانش تحقیقاتی را بر روی جلبک *S.fusiformis* انجام دادند و نتایج نشان داد که فراکسیون SP4-2 این جلبک با LC_{50} حدود $3/7 \mu gr$ تا 89/9% بر روی ویروس HIV-I اثر بازدارندگی دارد.

- در سال 2009 ناتارجان و همکارانش به بررسی عصاره متانولی جلبک‌های *G-gracilis* و *Cladophora fasicularis* پرداختند. نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که عصاره‌های جلبک‌های مذکور دارای خاصیت بازدارندگی بر روی آنزیم کولین استراز (ChE) می‌باشند. درواقع می‌توان از این اثر در جهت تکامل و ساخت داروهای بیماری‌های عصبی به‌ویژه پارکینسون و آلزایمر بهره برد.

- در سال 1957، آکاجی و همکارش به بررسی فیتوشیمیایی جلبک قهوه‌ای *Sargassum ringgol dianum* پرداختند و موفق به استخراج استروئیدی به نام سارگاسترول از این جلبک شدند(23).

در سال 2008 جاویر و همکارانش تحقیقی را درزمینهٔ میزان استخراج آگار در مقایسه با فصل‌ها پرداختند. بدین منظور جلبک‌های قرمز خانواده *Gracilariaceae* موردبررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داده است که بیشترین میزان محصول آگار از جلبک *G.Vermicalophylla* و در فصل تابستان و کمترین میزان محصول آگار از *G.Longissima* در فصل بهار و پاییز بوده است(24).

- در سال 1998، گروهی از محققان طی بررسی فیتو شیمیای جلبک قرمز *G.Lemaneformis* موفق به استخراج پیرول‌های جدید از جلبک مذکور شدند.

1-9-2- مطالعات انجام‌شده بر روی ماکرو جلبک‌ها در ایران

در سال 1387 کیوان زندی و همکارانش به بررسی اثر ضدویروسی جلبک *G.Salicornia* جمع‌آوری‌شده از خلیج‌فارس پرداختند و نتایج حاکی از آن بود که عصاره‌های جلبک مذکور دارای اثر بازدارندگی بر روی ویروس HSV-2 می‌باشند (25).

از دیگر مطالعات انجام‌شده پیرامون جلبک‌ها در ایران می‌توان به استخراج آگار از گونه‌های مختلف جلبک گراسیلاریا اشاره کرد.

Archive of SID
www.SID.ir

درخشش در سال 1390 به بررسی اثرات ضد باکتریایی جلبک‌های دریایی laurencia snyderiaو Sargassum angustifolium بر روی پاتوژنهای انسانی پرداخت و نتیجه گرفت که جلبک لورنسیا سیندریا دارای اثرات ضدباکتریایی قوی‌تر و بهتری نسبت به جلبک سارگاسوم انگوتیفولیوم برخوردار است.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم

مواد و روش‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم: مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از گونه‌های جلبک‌های *Colpomenia Sinuosa* و *Iyengaria Stellata* از سواحل سیستان بلوچستان با توجه به فراوانی و پراکنش نمونه‌ها صورت خواهد گرفت. پس از شناسایی نمونه‌ها بر اساس کلیدهای معتبر موجود در حد جنس و گونه، نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های بعدی شامل عصاره گیری و آزمون‌های بیولوژیک موردنظر خشک و آماده‌سازی شدند.

2-1-مواد، وسایل و دستگاه‌های مورداستفاده:

1- ظروف وسایل شیشه‌ای شامل: بشر در ابعاد مختلف، ارلن، لوله‌آزمایش، قیف، پیپت، میله‌های شیشه‌ای، قیف، مزور، لوله مویین، پیپت پاستور، بالن و ...

2- آسیاب برقی

3- دستگاه تقطیر در خلأ دوار

4- دستگاه فریز درایر

5- بن ماری

6- انکوباتور

7- تخم‌های آرتمیا سالینا (تهیه‌شده از مرکز شیلات تهران)

8- آبزی‌دان جهت نگهداری لاروهای آرتمیا سالینا

9- پمپ هوادهی

10- لامپ با نور سفید

11- سمپلر 500 میکرو لیتر

12- لوپ

13- پلیت‌های میکروتیتر 24 خانه

14- سشوار جهت خشک‌کردن ظروف

15- NaCl (Merck)

16- کمک حلال‌های DMSO و تونین 80

17- حلال اتیل استات، متانول، آب، اتر دوپترول، هگزان و کلروفرم (Kiankaveh)

18- ستون‌های کروماتوگرافی در ابعاد مختلف

19- پایه‌های نگه‌دارنده ستون

20- تانک TLC

21- صفحات TLC با فاز ساکن سیلیکا ژل (Riedel-deHaen-DC-CardsSIF. 0.2mm)

Archive of SID
www.SID.ir

22- سیلیکا ژل فاز نرمال (210-70 مش)

23- سفادکس – LH 20

24- معرف انیس آلدئید

25- لامپ UV با طول‌موج 254 nm

26- طیف‌سنج تشدید رزونانس مغناطیسی هسته‌ای Bruker، Varian: 400MHz: 500MHz

27- طیف‌سنج جرمی (EI-MS Finigan-mat)

28- HPLC

29- حلال DMSO-96 ,CDC13 (Merck)

30- ترازو

31- رنگ‌پاش

32- بربرین هیدروکلراید به عنوان کنترل مثبت آزمون BST (Fluka)

33- منتل

34- سیستم تقطیر جهت تقطیر نمودن حلال‌های بشکه‌ای

2-2- جمع‌آوری، خشک و پودر کردن جلبک:

نمونه‌برداری جلبک‌های *Colpomenia sinosa*و *Iyengaria stellata* از سواحل استان هرمزگان از شهریور تا مرداد 1391 صورت گرفت.

همچنین ساحل شرقی استان به علت فقدان بسترهای صخره‌ای و شنی – گلی بودن بستر، پوشش جلبکی ضعیف بودن و نمونه‌برداری در این مناطق صورت نگرفت. در سواحل غربی استان، ایستگاه‌ها بر اساس قابل‌دسترس بودن از طریق جاده انتخاب گردیده‌اند.

سپس در آزمایشگاه نمونه‌ها به تفکیک هم ایستگاه در تشت ریخته و به‌وسیله آب شیرین شسته شده و از مواد زائد و اپی نیت جدا می‌گردند. سپس نمونه‌ها به تفکیک گونه‌ای جدا گشته و توسط ترازوی دیجیتالی با دقت 0/01 گرم توزین می‌شوند سپس نمونه‌ها در آون خشک می‌شوند. خشک‌کردن نمونه‌ها در درجه حرارت 70C در مدت‌زمان 24 ساعت کفایت می‌نماید.

شناسایی: شناسایی اولیه جلبکی با استفاده از خصوصیات ظاهری صورت گرفته و سپس شناسایی نهایی با استفاده از کیت کلیدی موجود مورد شناسایی نهایی قرار گرفتند و سپس به قطعات کوچک‌تر خود

Archive of SID
www.SID.ir

شدند (26).

2-3-عصاره گیری:

ابتدا جلبک‌ها را کاملاً شسته از شن و ماسه و جانداران اپیفیت کاملاً عاری گردیدند؛ و هرچند ساعت آب آن‌ها تعویض گردید سپس جلبک‌ها را خشک نموده توسط آسیاب برقی کاملاً به‌صورت پودر درآمدند (29و28و27). عصاره گیری از جلبک‌ها به روش پرکولاسیون با استفاده از حلال‌های اتیل استات، متانول و متانول آب به ترتیب انجام پذیرفت. عصاره‌های حاصل را صاف نموده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده گردان در فشار کاهش‌یافته در دمای 45 درجه سانتی گراد تغلیظ گردیدند؛ و سپس زیر هود خشک شدند. عصاره‌ها برای تهیه غلظت‌های آزمون ضد باکتریایی درون دی متیل سولفواکساید حل شدند و سپس هرکدام با عبور از فیلترهای میکروبی استریل گردیدند (30).

2-4- آزمون‌های آنتی باکتریال:

سویه‌های باکتری مورداستفاده در این تحقیق (*Staphylococcus aureus(PTCC:1112*، *E coli* (PTCC:1338)، *Pseudomonas aeruginosa*(PTCC1707) بودند. سپس از محیط کشت 24 ساعته یک چرخش کامل بر روی محیط‌های مورب و همچنین کشت خطی بر روی پلیت های مولر هیلتون آگار (Merk Germany) انجام داده شد و به مدت 24 ساعت در 35 درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده تا به‌عنوان منبع باکتری استفاده شود. محیط‌های منبع در یخچال نگهداری و در صورت لزوم مورداستفاده قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی بر اساس روش MIC با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. به‌منظور تعیین (MIC) (19). ابتدا از هر عصاره غلظت mg/ml40 برای هر عصاره به ازای هر میکروارگانیسم از یک سری ده‌تایی لوله‌های آزمایش استفاده شد. هشت لوله ب‌رای غلظت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت و یک لوله به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. ه هرکدام از لوله‌ها به میزان 9میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هیلتون مایع همراه با غلظت معینی از عصاره و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت یک‌شبه میکروارگانیسم اضافه گردید بدین ترتیب در وله شماره یک و هشت غلظت عصاره به ترتیب برابر با 1000 و 7/81 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. سپس *لوله‌ها* برای مدت 24 ساعت در گرمخانه 35 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون (Incubation) لوله‌ها ازنظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم بررسی گردیدند (۳٦). از میان لوله‌هایی که در آن‌ها باکتری رشد نکرده بود لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره جلبکی بود به‌عنوان MIC گزارش گردید.

2-5- آزمون‌های ضد قارچی:

برای انجام آزمون‌های ضد قارچی از روش کشت قارچ مورد در محیط کشت Saburud dextrose agar استفاده شد. بدین‌صورت که 500 µl عصاره جلبک قبل از سرد شدن محیط کشت، اتوکلاو و درون

Archive of SID
www.SID.ir

پلیت استریل ریخته شد و پس از اضافه شدن محیط کشت به آن در جهت عقربه‌های ساعت هم زده د.در ادامه بعد سرد شدن محیط کشت، قارچ‌های تهیه‌شده از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری‌های ایران به‌وسیله یک پیپت استریل در وسط محیط کشت قرار داده شد، سپس به مدت 72 ساعت در دمای $37C^{\circ}$ انکوبه شد. از یک محیط کشت جداگانه حاوی قارچ نیز جهت کنترل مثبت (شاهد) استفاده گردید. پس‌ازاین مدت، رشد بسیار اندکی در محیط کشت مشاهده شد.

2-6- بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های جلبکی بر رده سلولی سرطان پوست

در این آزمون مبنای سنجش بر اساس معرض گذاری عصاره با غلظت‌های مختلف در مجاورت رده سلولی تهیه‌شده از انستیتو پاستورA_{431} (Squamous cell carcinoma) و سنجش تعداد سلول‌های مرده است. بدین منظور از ماده مؤثره زردرنگ تترازولیوم (MTT) و ایجاد بلوره‌های بنفش‌رنگ نامحلول فورمازان درروش MTT استفاده شد. به همین دلیل در مرحله نخست برای سنجش درصد سلول‌های زنده برای کنترل تعداد سلول‌های انتقال‌یافته به پلیت ها از روش تریپان بلو استفاده گردید. سلول‌ها به تعداد $1x10^4$ سلول بر میلی‌لیتر به پلیت های 96 خانه‌ای در محیط کشت کامل منتقل شدند. بعد از 24 ساعت سلول‌ها با بافر فسفات شستشو و با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها اتیل استات، متانولی و متانولی آب جلبکی (۰،۲۵،۵۰،۱۰۰،۲۰۰) میکروگرم بر میلی‌تر در محیط کشت حاوی 10% سرم جنینی گاوی گرمخانه‌ای شدند. غلظت صفر به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از به اتمام رسیدن زمان گرمخانه گذاری، محلول رویی سلول‌ها را دو ریخته و به هر چاهک 100 میکرو لیتر الکل ایزوپروپانول اسیدی 4%(حجم/حجم) اضافه شد. پلیت ها در دمای اتاق به مدت 10 دقیقه قرارگرفته و بعد با دستگاه خواننده دانش گر (Elsa Reader Anthos 2020) در طول‌موج 490 نانومتر و طول‌موج رفرنس 630 شدت جذب اندازه‌گیری شد. برای هر آزمایش سه چاهک در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها نیز دو بار تکرار گردید.

2-7-آزمون بیولوژیک: Brine shrimp cytotoxicity assay

2-7-1 -کشت آرتمیا:

به‌منظور کشت سیست های آرتمیا، ابتدا آبزی‌دان را با محلول 3/5 درصد از نمک دریا پر نموده و آن را در بن ماری ترموستات دار که روی درجه حرارت 28C تنظیم‌شده قرار می‌دهیم. پس‌ازاینکه دمای محلول داخل آبزی‌دان به28درجه سانتی‌گراد رسید، می‌توان سیست های آرتمیا را به آن اضافه کرد. درصورتی‌که سیست ها قبلاً در سردخانه نگهداری شده‌اند، پیش از مصرف لازم است که به مدت یک هفته در دمای محیط نگهدار شوند. در غیر این صورت درصد تفریخ سیست‌ها به‌شدت کاهش می‌یابد.

تخم‌ها را پس از آماده شدن به یک‌نیمه آبزی‌دان اضافه نموده و سپس پمپ هوادهی داخل آبزی‌دان را فعال می‌نماییم. هوادهی به دو دلیل انجام می‌شود:

Archive of SID
www.SID.ir

1- جدا شدن تخم‌ها از یکدیگر و پراکنده شدن آن‌ها در آبزی‌دان.

2- تأمین اکسیژن محلول در آب برای لاروهایی که از تخم خارج خواهند شد.

شدت هوادهی باید اپتیمم باشد به‌گونه‌ای که کم بودن فشار هوا موجب کاهش غلظت اکسیژن محلول در آب نگردد و فشار بیش‌ازحد هوا نیز موجب تولید کف در سطح آب نشود. تخم‌هایی که در این حباب‌ها به دام می‌افتند تفریخ نمی‌یابند.

همچنین یک منبع نور در بالای آبزی‌دان نصب می‌گردد. هوادهی و تابش نور باید در تمام مدت تاریخ تخم‌ها تا تولید ناپلی ادامه یابد. پس از گذشت 48 ساعت، لاروها از تخم خارج‌شده و آماده انجام آزمایش می‌باشند. در صورت افزایش یا کاهش دما این مدت تغییر می‌یابد.

2-7-2- انجام آزمایش‌ها سیتوتوکسیک:

غلظت‌های 10 و 100 و 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های به‌دست‌آمده از دو جلبک در آب دریای مصنوعی (معادل سالیان 3/5 درصد وزنی – حجمی) تهیه شد. در صورت لزوم از کمک حلال‌های مناسب مانند تونین 80 و DMSO برای حل کردن عصاره‌ها استفاده شد. پس‌ازاینکه درجه حرارت محلول‌ها به 28C رسید، لاروهای فعال در معرض عصاره‌ها قرار گرفتند. به این منظور، از پلیت های میکروتیتر 24 چاهکی استفاده شد. در هر چاهک آزمون، میزان 500 میکرو لیتر سوسپانسیون لارو حاوی 10 -20 ناپلی فعال به همراه 500 میکرو لیتر محلول عصاره با غلظت مشخص جای گرفت. پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 28C و تحت نور مداوم قرار گرفتند. نحوه قرار دادن منبع نورانی در انکوباتور به‌گونه‌ای بود که موجب افزایش بیش‌ازحد دما در اطراف پلیت ها نگردد.

پس از 24 ساعت تعداد لاروهای زنده باقی‌مانده در چاهک‌ها توسط لوپ شمارش گردید. نتایج کشندگی هر غلظت از عصاره‌ها بر لاروهای آرتمیا سالنیا، 3 بار مشاهده شد. جهت حذف اثر عوامل محیطی، برای هر غلظت 3 چاهک شاهد نیز کاملاً مشابه چاهک آزمون ولی فاقد عصاره در نظر گرفته شد. از بربرین هیدروکلراید (LC50=26) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از دستیابی به نتایج اولیه، در مورد عصاره‌هایی که به سمیت آن‌ها کمتر از 1000g/ml بود، نتایج خام به‌صورت درصد مرگ‌ومیر بیان‌شده و برای محاسبه LC50 وارد آزمون آماری probit analysis شد (31).

Archive of SID
www.SID.ir

فصل سوم

نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

3-1- نتایج آزمون‌های آنتی باکتریال عصاره‌های جلبک *Colpomenia sinousa*

ردیف	نمونه	عصاره‌ها	MIC for Escherchia coli PTCC:1338	MIC for Staphylococcus aureus PTCC:1112	MIC for Pseudomonas aeroginosa PTCC:1707
1	Colpomenia sinousa	آب متانولی	>5mg	>5mg	>5mg
2	Colpomenia sinousa	متانولی	>5mg	>5mg	>5mg
3	Colpomenia sinousa	اتیل استاتی	>5mg	>5mg	>5mg
Ciprofloxacin			0.02g/ml	0.2g/ml	0.2g/ml

3-2- نتایج آزمون‌های آنتی باکتریال عصاره‌های جلبک *Iyengaria stellata*

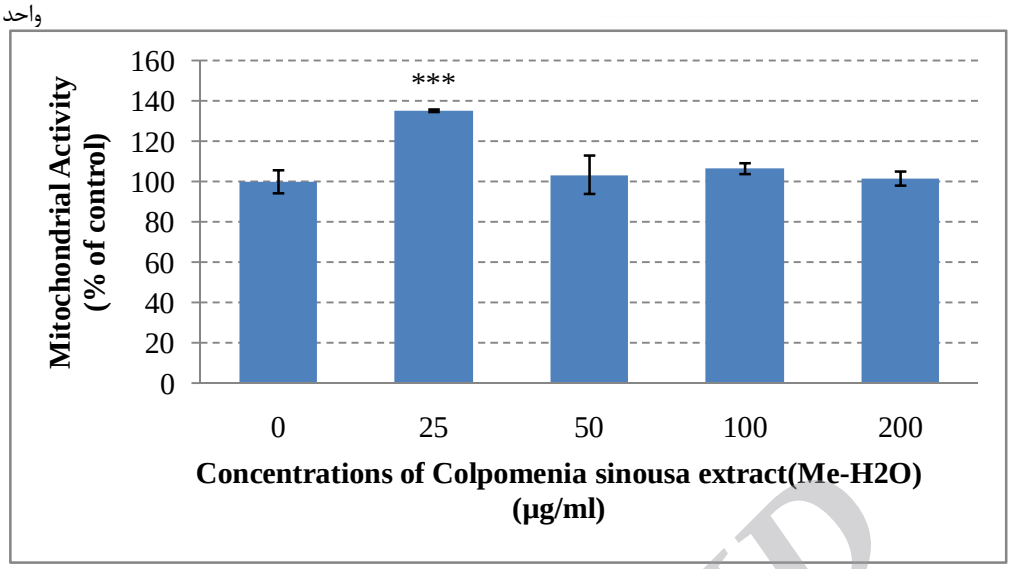
ردیف	نمونه	عصاره‌ها	MIC for Escherchia coli PTCC:1338	MIC for Staphylococcus aureus PTCC:1112	MIC for Pseudomonas aeroginosa PTCC:1707
1	Iyengaria stellata	آب متانولی	>5mg	>5mg	>5mg
2	Iyengaria stellata	متانولی	>5mg	>5mg	>5mg
3	Iyengaria stellata	اتیل استاتی	>2.5mg	>2.5mg	>2.5mg
Ciprofloxacin			0.02g/ml	0.2g/ml	0.2g/ml

3-3- نتایج آزمون‌های ضد قارچی عصاره‌های جلبک‌های *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellate*

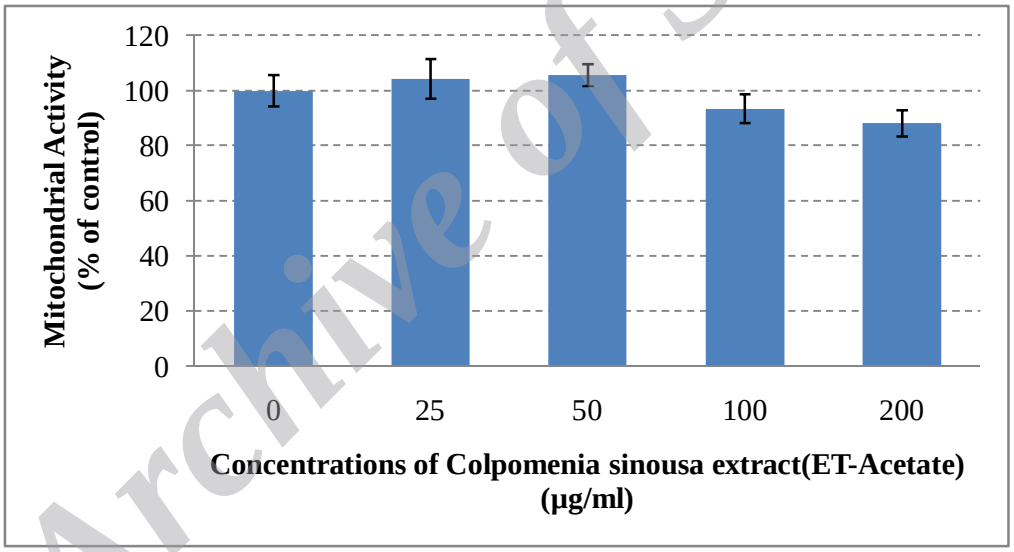
این دو جلبک فاقد اثرات ضد قارچی بودند.

3-4-نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Colpomenia sinousa* پس از 24 ساعت

Archive of SID
www.SID.ir



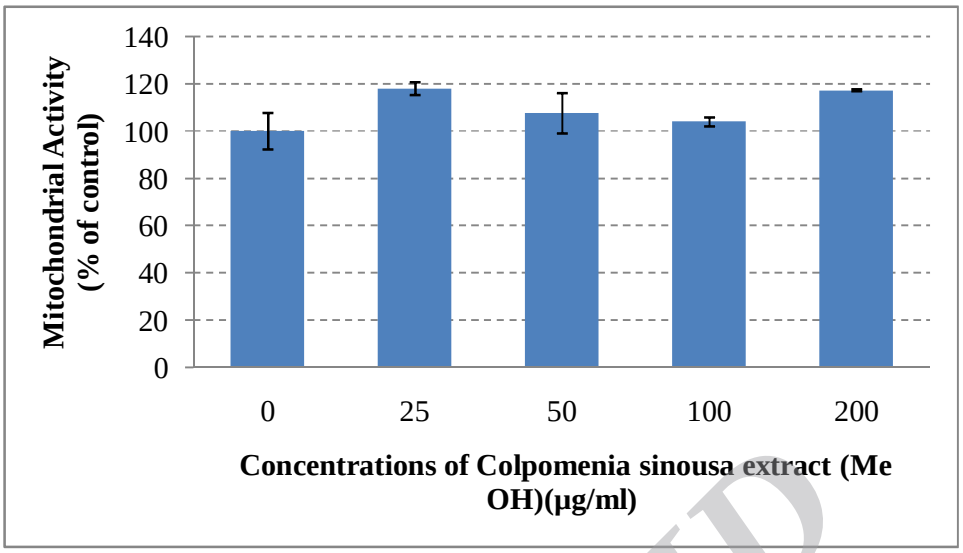
شکل 1: بررسی اثر عصاره متانولی آبی جلبک *Colpomenia sinousa* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 24 ساعت



شکل 2: بررسی اثر عصاره اتیل استاتی جلبک *Colpomenia sinousa* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 24 ساعت

Archive of SID

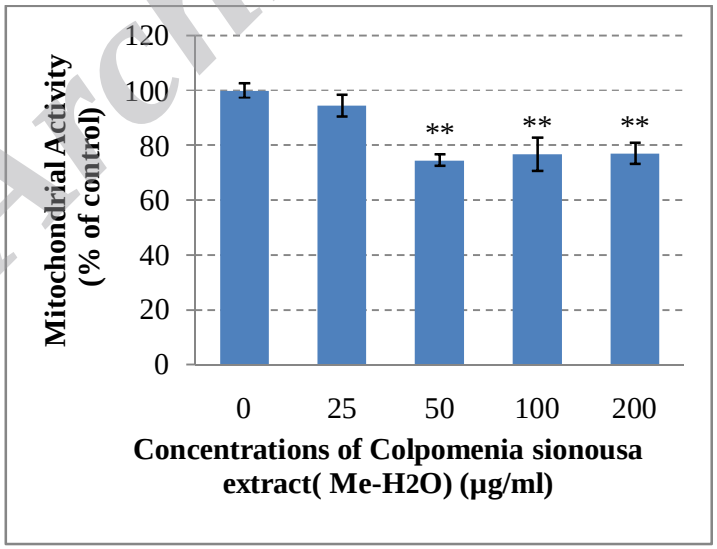
www.SID.ir



شکل 3: بررسی اثر عصاره متانولی جلبک *Colpomenia sinousa* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 24 ساعت

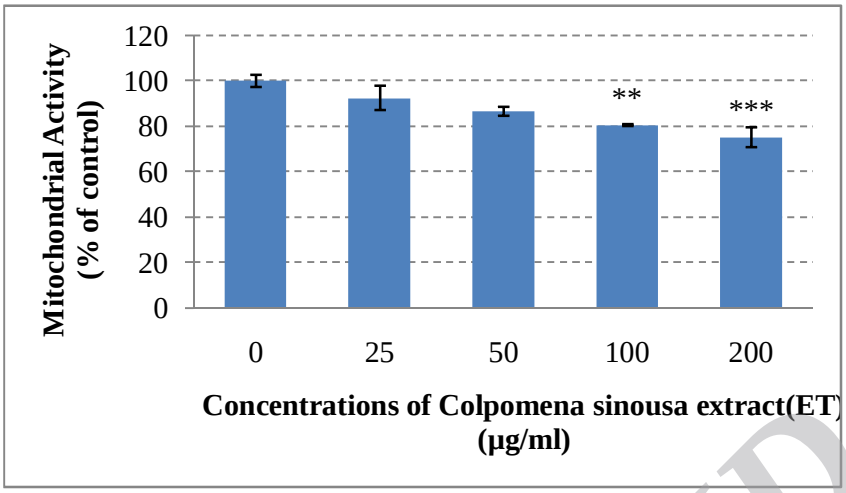
بررسی خاصیت آنتی کانسری عصاره‌های متانولی آبی، متانولی و اتیل استاتی کلپومنیا سینوسا پس از 24 ساعت نشان داد که بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی متعلق به عصاره متانولی آبی، آن‌هم در غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر است به عبارتی سطح فعالیت میتوکندریها را به میزان 35 درصد افزایش داده است و سایر عصاره‌ها هیچ‌گونه خواص آنتی کانسری از خود نشان نداده‌اند.

5-3-نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Colpomenia sinousa* پس از 48ساعت

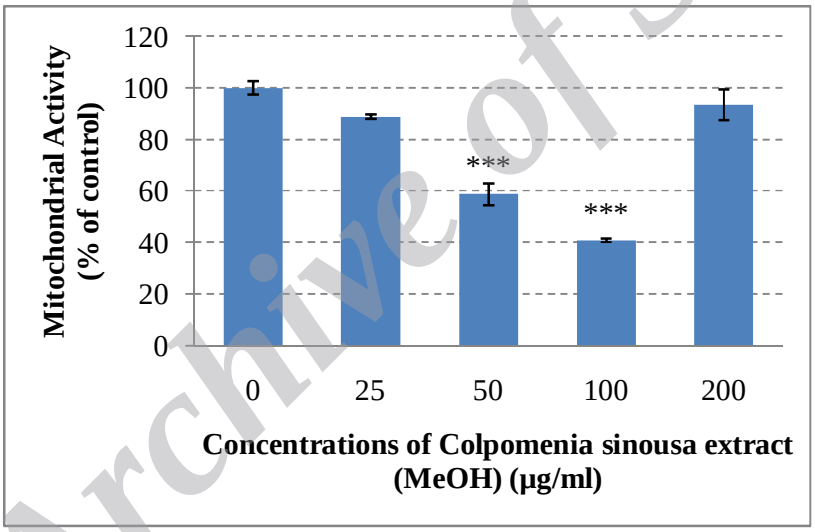


شکل 4: بررسی اثر عصاره متانولی آبی جلبک *Colpomenia sinousa* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 48 ساعت

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 5: بررسی اثر عصاره اتیل استاتی جلبک *Colpomenia sinousa* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 48 ساعت



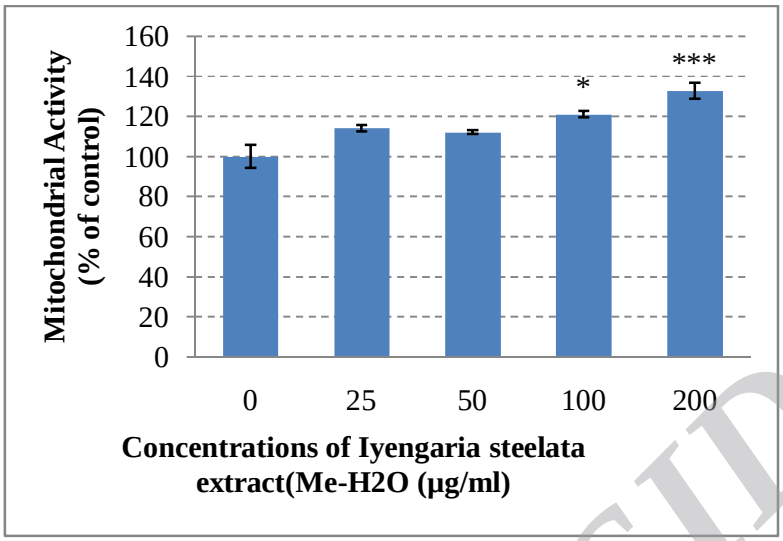
شکل 5: بررسی اثر عصاره متانولی جلبک *Colpomenia sinousa* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 48 ساعت

خاصیت آنتی کانسری عصاره‌ها پس از 48 ساعت نتایج قابل‌توجهی از خود نشان داده به نحوئیکه عصاره متانولی آبی در غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی کانسری 25 درصد است به بیانی دیگر این عصاره می‌تواند در محیط کشت، حدود 25 درصد از سلول‌های سرطانی را نابود سازد.

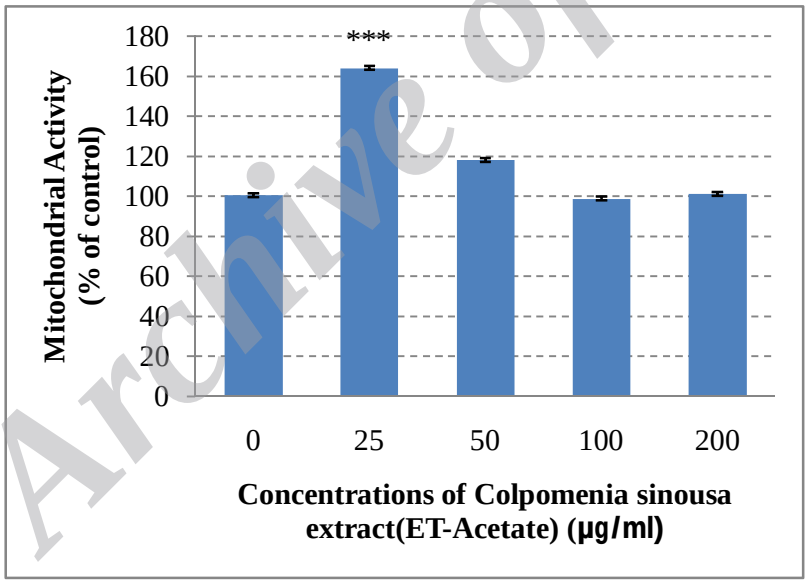
عصاره اتیل استاتی در غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند 25 درصد از سلول‌های سرطانی را نابود سازد.

Archive of SID
www.SID.ir

3-6-نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Iyengaria stellata* پس از 24 ساعت

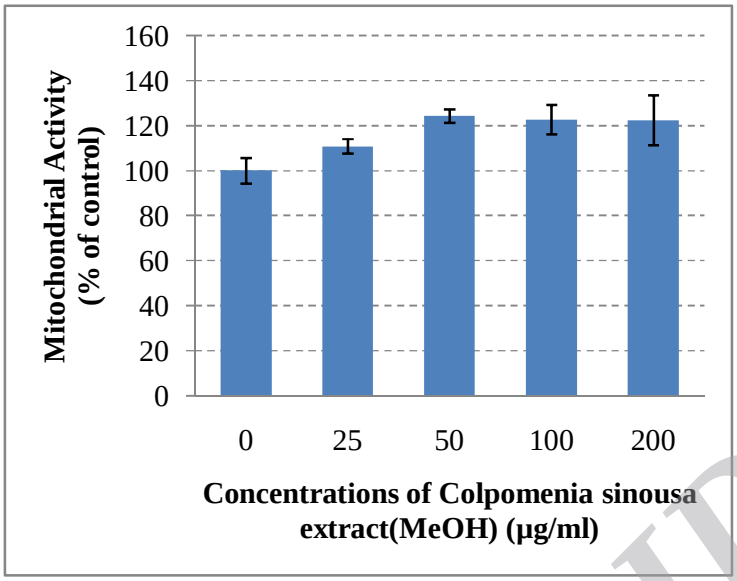


شکل 6: بررسی اثر عصاره متانولی آبی جلبک *Iyengaria stellata* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 24 ساعت



شکل 7: بررسی اثر عصاره اتیل استاتی جلبک *Iyengaria stellata* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی *A431* در غلظت های مختلف پس از 24 ساعت

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 8: بررسی اثر عصاره متانولی جلبک *Iyengaria stellate* بروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی *A431* در *غلظت های مختلف* پس از 24 ساعت

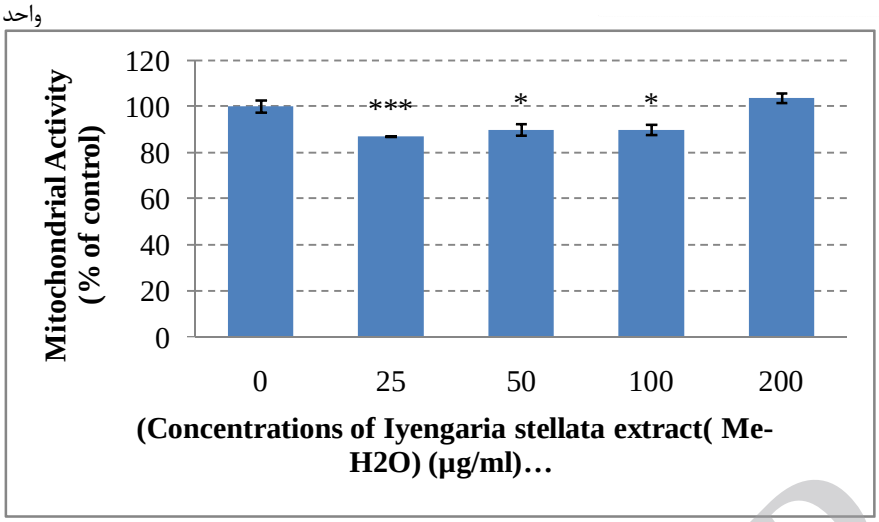
بررسی خاصیت آنتی کانسری عصاره‌های متانولی آبی، متانولی و اتیل استاتی جلبک آینگاریا استلاتا پس از 24 نشان داد که هیچ‌یک از عصاره‌ها دارای خاصیت آنتی کانسری نمی‌باشند بجای خاصیت آنتی کانسری دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند به نحوئیکه عصاره متانولی آبی این جلبک سطح فعالیت سلول‌های سرطانی را در غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر 33 درصد افزایش داده است.

عصاره اتیل استاتی با افزایش غلظت عصاره خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد و بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر است که 64 درصد است.

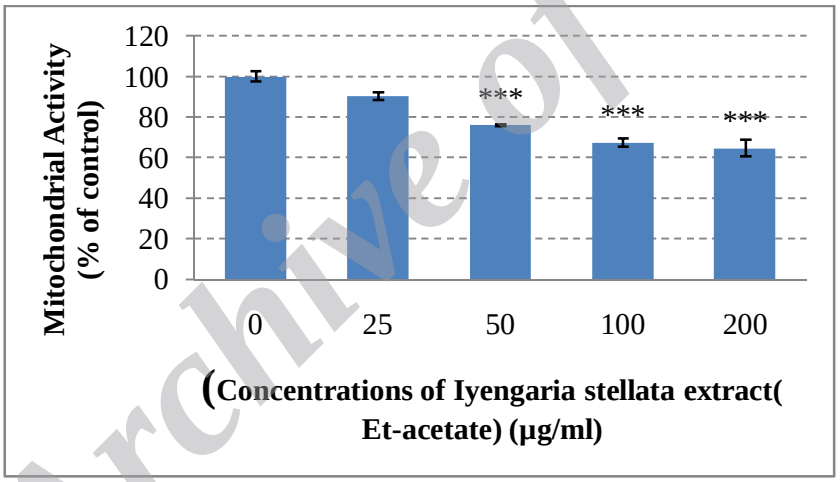
عصاره متانولی آینگاریا خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی از خود نشان نداده است.

3-7-نتایج آزمون‌های ضد توموری عصاره‌های جلبک *Iyengaria stellata* پس از 48 ساعت

Archive of SID
www.SID.ir



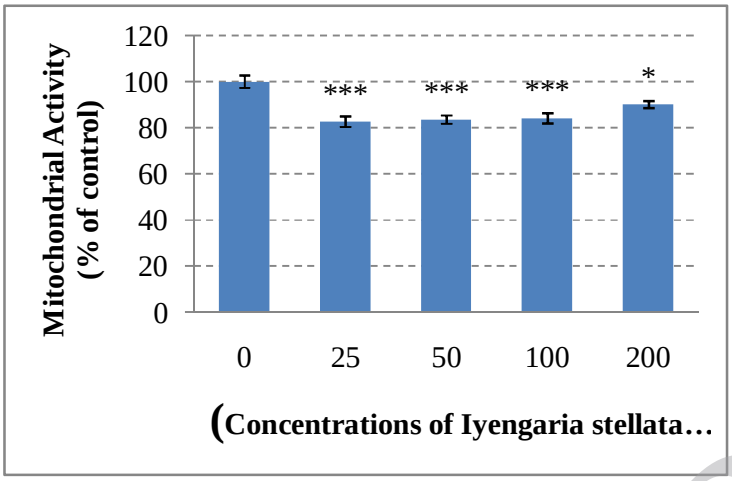
شکل 8: بررسی اثر عصاره متانولی آبی جلبک Iyengaria stellata برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 48 ساعت



شکل 9: بررسی اثر عصاره اتیل استاتی جلبک *Iyengaria stellata* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 48 ساعت

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 10: بررسی اثر عصاره متانولی جلبک *Iyengaria stellata* برروی تعدادمرگ ومیر رده سلولی A431 در غلظت های مختلف پس از 48 ساعت

مطالعه خاصیت آنتی کانسری این جلبک پس از 48 ساعت نشان داد که عصاره متانولی آبی در غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی کانسری 13 درصد است.عصاره اتیل استاتی در غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین خاصیت آنتی کانسری 35 درصد است و با افزایش غلظت عصاره بر شدت خاصیت آنتی کانسری افزوده می‌شود.عصاره متانولی جلبک در غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی کانسری حدود 17 درصد است.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل چهارم

بحث

Archive of SID

www.SID.ir

فصل چهارم: بحث و تفسیر نتایج

4-1-میزان پراکنش جلبک‌ها:

بیومس و همچنین ترکیب گونه‌های این جلبک‌ها همانند سایر جلبک‌های دریایی عمدتاً بستگی به فصل، ساختار جمعیت و عوامل متعدد اکولوژیکی بستگی دارد (24). این بررسی همچنین نشان داد که این جلبک‌های قهوه‌ای حداکثر توزیع اشان در طول سواحل شمالی خلیج‌فارس می باشدکه احتمالاً به خاطر شرایط زیست‌محیطی ازجمله منطقه وسیع جزرومدی، نوع بستر و نیز کمتر در معرض باد و امواج قرارگرفته است که به‌نوعی سبب می‌شود بستر مناسبی را برای رشد این جلبک‌ها فراهم سازد.

4-2-ارزیابی درصد عصاره‌های مختلف:

با توجه به نتایج درصد عصاره‌های مختلف جلبک‌های *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata* عصاره اتیل استات نسبت به عصاره متانولی و متانولی-آبی بسیار اندک بوده و این مطلب نشان‌دهنده این است که ترکیبات غیر قطبی در این جلبک‌ها نسبت به ترکیبات قطبی اندک است؛ زیرا غالب ترکیبات جلبک‌ها پلی ساکاریدها، آگار، کاراجینان و ترکیبات قطبی دیگر است که این ترکیبات بیشتر حجم جلبک را تشکیل می‌دهد.

4-3-تفسیر نتایج حاصل از آزمون آنتی باکتریال بر روی دو جلبک *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata*:

جلبک‌های دریایی در صنایع کاغذسازی، نساجی، رنگ‌سازی، تهیه فیلم‌های عکاسی، لوازم‌آرایشی و بهداشتی، علوم پزشکی، داروسازی و دندانپزشکی، تهیه محیط‌های کشت میکروبی، تهیه قرص‌ها، شربت‌های دارویی، قالب‌های اولیه دندان و در تغذیه به‌طور مستقیم و غیرمستقیم مورداستفاده قرار می‌گیرند (32) . تاکنون، ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و استخراج‌شده است و بسیاری از متابولیک‌های اولیه و یا ثانویه می‌توانند به مواد زیست فعال مورداستفاده در صنایع دارویی تبدیل شود (33و29و20و27).

Rosalineو همکاران در سال 2012 خواص ضد باکتریایی تعدادی از جلبک‌های سواحلTamil Nadu جنوب هند را موردمطالعه قراردادند (26). در این تحقیق از اتیل استات، متانول و متانول آب جهت عصاره گیری استفاده شد .نتایج بررسی نشان داد عصاره اتیل استاتی جلبک *Iyengaria stellata* اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت.

طبق نتایج این مطالعه هر سه عصاره اتیل استاتی، متانولی و متانولی آبی دو جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinuosa* و *Iyengaria stellata* از سواحل خلیج‌فارس دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشند. در این میان عصاره اتیل استاتی جلبک *Iyengaria stellata* بیشترین اثر را بر روی هر سه سویه باکتری

Archive of SID
www.SID.ir

Pseudomonas aeruginosa(PTCC1707) ،*E coli* (PTCC:1338)،*Staphylococcus aureus*(PTCC:1112(نشان داد؛ که اختلاف معناداری با کنترل مثبت داشت؛ و این مطالعه برای نخستین بار صورت گرفت؛ و به‌عنوان اولین گزارش است.

4-4-تفسیر نتایج حاصل از آزمون ضد قارچی بر روی دو جلبک *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata*:

بررسی آزمون‌های ضد قارچی نشان داد که دو جلبک موردبررسی فاقد اثرات ضد قارچی بودندونیز کمتر مورد توجه محققین قرارگرفته است(34).

5-4-تفسیر نتایج حاصل از آزمون آنتی کانسر جلبک *Colpomenia sinousa* و *Iyengaria stellata* پس از 24 و 48 **ساعت:**

بررسی خاصیت آنتی کانسری عصاره‌های متانولی آبی، متانولی و اتیل استاتی ***Colpomenia sinousa*** پس از 24 نشان داد که بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی متعلق به عصاره متانولی آبی، آن‌هم در غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از 24 ساعت است به عبارتی سطح فعالیت میتوکندریها را به میزان 35 درصد افزایش داده است و سایر عصاره‌ها هیچ‌گونه خواص آنتی کانسری از خود نشان نداده‌اند پس از گذشت 48 عصاره متانولی آبی در غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی کانسری 25 درصد است. عصاره اتیل استاتی در غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیترنیز می‌تواند 25 درصد از سلول‌های سرطانی را نابود سازد. در مطالعات گذشته هیچ فعالیت سیتوتوکسیکی از عصاره تام و فراکشن های ***Colpomenia sinousa*** دیده نشده است(26). عصاره جلبک*Sargassum fusiforme*به عنوان سیتوتوکسین سلولهای سرطانی در انسان شناخته شده است(35)،عصاره متانولی جلبک کلپومنیا در غلظت 100 میکروگرم در میلی‌لیتر پس از 48 ساعت می‌تواند **59 درصد** از سلول‌های سرطانی را در محیط کشت از بین ببرد **درواقع این عصاره در مقایسه با سایر عصاره‌ها دارای بهترین خاصیت آنتی کانسری بر علیه سلولهای سرطانی پوست انسان باشد.**این عصاره می تواند زمینه ساز طرحهای بعدی باشدو تاکنون در ایران چنین گزارشی داده نشده است. عصاره متانولی جلبک *S.swartzii* جداشده از خلیج‌فارس دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی لاین سلولی $T D_{47}$ است (12).

بررسی خاصیت آنتی کانسری عصاره های***Iyengaria stellata*** پس از 24 نشان داد که هیچ‌یک از عصاره‌ها دارای خاصیت آنتی کانسری نمی‌باشند بجای خاصیت آنتی کانسری دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند به نحوئیکه عصاره متانولی آبی این جلبک سطح فعالیت سلول‌های سرطانی را در غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر 33 درصد افزایش داده است.در واقع سطح رشد سلولهای سرطانی ارتقائ می یابد.عصاره اتیل استاتی با افزایش غلظت عصاره،خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد و بیشترین خاصیت

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌اکسیدانی مربوط به غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر است که 64 درصد است.عصاره متانولی آینگاریا خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی از خود نشان نداده است.مطالعه خاصیت آنتی کانسری پس از 48 ساعت نشان داد که عصاره متانولی آبی در غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی کانسری **13 درصد** است.عصاره اتیل استاتی در غلظت 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین خاصیت آنتی کانسری **35 درصد** است و با افزایش غلظت عصاره بر شدت خاصیت آنتی کانسری افزوده می‌شود.عصاره متانولی جلبک در غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی کانسری حدود 17 درصد است. به عبارتی عصارها اتیل استاتی جلبک آینگاریا در غلظت 200 میکروگرم در میلی‌لیتر پس از 48 ساعت می‌تواند 35 درصد از سلول‌های سرطانی را در محیط کشت از بین ببرد درواقع این عصاره در مقایسه با سایر عصاره‌ها دارای بهترین خاصیت آنتی کانسری است.مطالعات جلبکهای قهوه ای نشان داده است که گلیکوپروتئین استخراجی از جلبکهای*Laminaria japonica* ، فوکویدان حاصل از *Sargassum hornery*,Eclonia cava و *Costaria costata*دارای خاصیت ضدسرطانی در سرطان روده بزرگ است.هترو فوکانها استخراجی از *Sargassum filipendula* دارای خاصیت ممانعت کننده از گسترش سلولهای سرطانی گردن،پروستات و کبد می باشد(36).

مواد سیتوتوکسیک ضد توموری حاصل از موجودات دریایی بیش از 40 سال است که استخراج، مطالعه و گزارش‌شده است. خواص سیتوتوکسیک موجودات دریایی بر اساس حضور متابولیک‌های ضد توموری است. ترکیبات فعال زیستی با خواص سیتوتوکسیک در ماکرو جلبک‌های دریایی به تعداد فراوان مشاهده‌شده است. برخی از پلی ساکاریدهای سولفاته استخراجی از جلبک‌ها دارای خاصیت آنتی توموری، ضد سرطانی و ضد متاستازی در موش می‌باشند (37).

خواص ضدتوموری و سیتوتوکسیک ماکروجلبکها به حضور چهار گروه از ترکیبات از جمله Polyketidesو Terpenesو Nitrogencontainingو Polysaccharides بر می گردد که در این میان جنس سارگاسوم دارای خاصیت ضدتوموری است(40).در واقع پلی ساکاریدهای جلبکهای خوراکی مورد توجه جهت بررسی های خواص بیولوژیکی است(31).

اثر ضدتوموری پلی ساکاریدهای استخراجی از جلبک قهوه ای *Sargassum confusum* دارای توانایی بهبود و ارتقاء سیستم های ایمنی ، خواص آنتی اکسیدانی و مرگ سلولهای سرطانی در موش آلوده به تومور است(25و14).

عصاره جلبک*Sargassum fusiforme*به عنوان سیتوتوکسین سلولهای سرطانی در انسان شناخته شده است(35). عصاره جلبک قهوه ای *Scytosiphon lomentaria*دارای فعالیت آشکاری بر روی سلولهای سرطان پستان در موش می باشد(3).

خاصیت ضد توموری جلبک قهوه ای Sargassum *kjellmanianum* نیز گزارش شده است(38).

Archive of SID
www.SID.ir

باتوجه به نتایج بدست آمده از طرح ،عصاره های جلبکی که خواص آنتی باکتریال یا آنتی کانسر با دوز پایین تر از خود نشان دادند میتوانند جهت درمان بسیاری از بیماری های باکتریایی و انواع سرطان ها با اندام های هدف متفاوت مورد بررسی های بالینی تخصصی تر قرار گرفته و پس از مانیتور کردن عصاره تام و مراحل کروماتوگرافی ، فرمول شیمیایی ترکیب موثر ضدباکتریایی و ضد سرطانی استخراج و با روش های مختلف اسپکتروسکوپی شناسایی شود، سپس وارد پروسه سنتز دارویی شده با توجه به منشا طبیعی دارو بسیاری از عوارض داروهای شیمیایی دیگر را نداشته و اثر گذاری بالاتری نیز دارد. و نتایج به دست آمده نشان میدهد که خوشبختانه تمامی اهداف اولیه طرح پوشش داده شده و حتی منع اثر ضد قارچی عصاره های جلبکی خود نتیجه ای جالب بوده زیرا اکثر عصاره ها با خواص ضد سرطانی معمولا به دلیل متابولیت های ترپنی فاقد اثر ضد قارچی بوده و این نتیجه نیز نتایج حاکی از بررسی سمیت سلولی را تایید میکند.

در سال 2005 فعالیت ضد توموری در جلبک ماکروسکوپی ***Sargassum stenophyllum*** مشاهده‌شده است (2). دی ترپن هیدروکینون استخراج‌شده از جلبک ***Cystoseria mediterraneol*** دارای اثر مهارکننده بر روی تقسیم میتوز سلول‌ها است. عصاره متانولی جلبک ***S.swartzii*** جداشده از خلیج‌فارس دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی لاین سلولی $T D_{47}$ است (12). تاکنون بیش از 2400 محصولات طبیعی دریایی از ماکرو جلبک‌ها مناطق نیمه گرمسیری و گرمسیری جداسازی شده است که پژوهش‌های اخیر گواه آن است که دارای خواص آنتی باکتریال، ضد قارچ و ضد توموری می‌باشند. برخی از محققین گزارش دادند که ماکرو جلبک‌ها یا عصاره‌های آلی آن‌ها دارای خاصیت آنتی متاستاز بر روی سلول‌های انسانی و همچنین مهار فعالیت سلول‌های توموری در موش در مرحله آزمایشگاهی می‌باشند و اثر آنتی ژنوتوکسیک بر روی محیط‌های کشت لنفوسیت‌های انسانی است (2). مواد گیاهی حاصل از ماکرو جلبک‌ها مانند فلاونوئیدها، عصاره‌های غنی پلی فنلها و ترکیبات فلورتنین هانشان داده‌شده است که دارای خاصیت ضدالتهابی می‌باشند (32و31). اخیراً پلی ساکاریدها و پپتیدهای جداسازی شده از ماکرو جلبک‌ها جهت درمان سرطان موردتوجه قرار گرفتند. مکانیسم فعالیت ضد سرطانی آن‌ها مرتبط به توانایی سرکوب رشد سلول‌های سرطانی است. اثرات سیتوتوکسیک یا سایتواستاتیک سبب افزایش پاسخ‌های دستگاه‌های ایمنی و مهار سلول‌های توموری می‌شوند (31). برخی از پلی ساکاریدهای جلبکی دریایی، فوکویدانها-اولوان به‌ویژه القای کننده مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی می‌باشند (39). فراکشنهای تام فوکویدان استخراجی از جلبکهای دریایی خوراکی دارای فعالیتهای ضد توموری بر علیه لوکومیا L-1210 است(24).

مطالعات گسترده نشان می دهد که ماکروجلبکها در مبارزه با بسیاری از بیماریها از جمله سرطان پستان و سرطان روده بزرگ موفق بوده است.بسیاری از ترکیبات استخراجی از ماکروجلبکها قادر به تحریک مرگ سلولی از مسیرهاو مکانیسمهای مختلف هستند.برخی مطالعات مشخص نمود که فوکویدان می تواند مرگ

Archive of SID
www.SID.ir

سلولی در تومور را تحریک ، ممانعت از توسعه رگهای خونی جدید در تومورو‌سرکوب متاستازهای شش در سرطان پستان هم در سطح آزمایشگاهی وهم بدن شود(40و35و28و1).علاوه بر این خواص،فوکویدان ممانعت از رشد و تحریک مرگ سلولی در سلولهای سرطانی روده بزرگ HT-29 راسبب می شود(41).

بر اساس مروری بر مقالات چاپ‌شده درصحنه مطبوعات علمی بین‌المللی در مورد ترکیبات ضد سرطان جداشده از منابع دریایی، به نظر می‌رسد که این گستره بیش‌ازپیش شتاب‌یافته است و در سال 2006-2005، از 136 فرآورده طبیعی دریایی، بسیاری از آن‌ها ترکیبات جدیدی بوده‌اند که شامل گروه‌هایی از پلی کیتایدها، ترپن‌ها، استروئیدها و پپتیدها بوده که از جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها جداشده بودند (42).

مطالعات فارماکولوژیک ضد توموری در لاین‌های سلول‌های توموری انسانی و جانوری برای 94 ترکیب اطلاعات باارزشی را فراهم نموده‌اند، ولی هنوز مکانیسم‌های اثر این ترکیبات درهالهٔ ابهام قرار دارند (13).

ازاین‌رو هرچند هنوز بسیاری از این ترکیبات وارد فازهای گوناگون کارآزموده‌های بالینی نشده‌اند، امّا انتظار می‌رود با این رشد شتابان در پژوهش‌های پایه جهت جداسازی فرآورده‌های زیستی دریایی، ما شاهد یک رنسانس از پیش بالین به کاربرد بالینی این ترکیبات در آینده‌ای نزدیک باشیم (41). بنابراین، توجه به این ذخایر عظیم دریایی خلیج‌فارس و شناسایی گونه‌های حاوی ترکیبات فعال زیستی و تقویت مراکز تحقیقاتی زیست‌فناوری پزشکی دریایی در سواحل خلیج‌فارس، می‌تواند جایگاه ویژه‌ای را برای انجام این پژوهش‌ها برای کشور عزیزمان فراهم نماید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع:

1-Noda, H. Amano, H. Arashima, K. Hashimoto, S. Nisizawa,K. 1989.Studies on the antitumor activity of marine algae. Nippon Suissan Gakkaishi.55:1259-1264.

2-Cragg, G.M. et al. 1997.Forests and Thermal Vents: The World Wild Exploration of Nature for Novel Antitumor Agents, Semi Oncol. 24:156-163.

3-Rosaline, X;et al.2012. Screening of Selected Marine algae from the Coastal Tamil Nadu,South India for Antibacteral Activity.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. S140-S146.

4-کهن مهر، هرمز دیار،1375، مبانی جلبک‌شناسی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

5- شوقی، حسین، پروژه بررسی و شناسایی جلبک های سیستان و بلوچستان، مرکز تحقیقات شیلات ایران، 1377.

6-Abbott, I.A. 1995. A Decade of Species of Gracilaria (sensu lato). In: Taxonomy of Economic Seaweeds. (Abbott, I.A. Eds) Vol.5, pp. 185-195. La Jolla, California: California Sea Grant College System.

7-McLaughlin, J.L. Chang, C.J; et al. 1991.Bench Top Bioassays for the discovery of Bioactive Natural Products: An update: Ed. Aha-Vrrahman:STUDIES:In Natural Products Chemistry, Elsevire.9:388-409.

8-Trono, Jr GC.1999. Diversity of the Seaweed flora of the Philippines and its utilization.Hydrobiologia. 398/399, pp. 1-6.

9-Michael, A. S; et al.1956. Artemina Salina as Organism for a Bioassay. Science.

10-Suffness, M. Pezzuto, I.M.1991.Assays Related to Cancer Deug discovery:ED.Hosteman,K:Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6. Landon Academic Press.pp. 261-280.

۱۱- Ermakova, S. Sokolova, R. Kim, SM ; et al.۲۰۱۱.Fucoidans from brown seaweeds Sargassum hornery, Eclonia cava,Costaria costata: Structural Characteristics and Anticancer activity.Appl Biochem Biotechnol.۱٦٤:۸٤۱–۸٥۰.

Archive of SID
www.SID.ir

12-Ghisalberi, E.L. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products: Eds. Colegate, S.M. Molyneux, R.J. Bioactive Natural Products: Detextion, Isolation and Structural Determination, Boca Raton, CRC Press.pp. 9-57.

13-درخشش بهروز،1390،بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderia* و *Sargassum angustifolium* علیه پاتوژن های انسانی،فصلنامه طب جنوب،سال چهارم،شماره1 ،صفحات22-17.

14-Sleet, R. B. Brendel, k. 1983.Improved Methods for Harvesting and Counting Synchronous population of Artemia NauplII for Use in Developmental Toxicology, Ecotoxicol.Env.Safety.7: 435-446.

15-Vanhaecke, P; et al. 1981.Proposal for a short term toxicity test with Artemia NauplII, Ecotoxicol Env. Safety.5:382-387.

16-Vos,J. Dela –Rosa, N.L. 1980.Manual in Artemia Production in salt ponds In the Philippines, Fao Corporate Document Repository.

17-Asker, M.M.S. S.F. Mohamed and El-Sayed, O.H. 2007. Chemical Structure and Antiviral Activity of water-Soluble sulfated polysaccharides from *Sargassum latifolium*.J. Appl. Sci. Res. 3: 1178-1185.

18-Bilan, M.I. Grachev, N.E. Ustuzhanina, Shashkov,A.S. Nifantiev, N.E. 2002.Structure of a fucoidan from the Brown Seaweed Fucus evanescens polysaccharides of algae. Carbohydr. Res. 337: 719-730.

19-QY, L. GY, M. 2004.In vivo anti-tumor effect of polysaccharide from Sargassum confusum and the mechanisms. Di Yi Jun Yi Da Xue Bao. 24:434-436.

20-Becker, D.J. and Lowe, J.B. 2003. Fucose:Biosynthesis and Biological function in mammals. Glycobiology 13: 41R-53R.

21-Kaewsrithong, J. Intarak,K.Longpol,T Chairgulprasert, V. Prasertsongsakun,S. Chotimakorn, C. and Ohshima, T. 2007. Antibacterial activity and bioactive compounds of some Brown Algae from Thailand. pp. 608-613.

22-Chotigeat, W. S. Tongsupa, K. Supamataya and Phongdara, A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp.Aquaculture 233: 23-30.

23-Natarajan, S. Shanmugiahthevar, KP. Kasi, PD.2009. Cholinesterase

Archive of SID
www.SID.ir

inhibitors from Sargassum and Gracilaria gracilis: Seaweeds inhabiting South Indian coastal areas (Hare Island, Gulf of Mannar). Nat. Prod. Res. 23: 355-369.

24-Akagi, S. Kishida, Y. 1957. Discovery of Cholesterol in some Red Algae.Science. 126: 927–928.

25-Javier, O.et al. 2008. Agar properties of two species of Gracilariaceae from the Gulf of California, Mexico.Applied pharmacology J.20:169-175.

26-Sohrabipoor, J.Nejadsatari, T. ET al.2004.The marine algae of the southern coast of Iran, Persian Gulf, Lengeh area. Iran Journ Bot. 10: 83-93

27-Zandi, K. Fouladvand, M. Pakdel, P. Sartavi, K. 2007. Evaluation of in vitro Antiviral activity of a Brown Algae (*Cystoseira myrica*) from the Persian Gulf against the Herpes simplex virus Type 1.Afr J Biotech. 6: 2511-2514.

28-Khanavi, M; et al.2010. Cytotoxic Activity and Some Marine Brown Algae against Cancer Cell Lines. Biol Res. 43: 31-37.

29-Borgesen,F.1939.Marine Algae From the Iranian Gulf. Danish Scientific Investigation In Iran.part 1,94 p.

30-Mohanan, P. V; et al.1998.Cytotoxicity of Extracts of Solanum Trilobatum and Anti- Carcinogentic Activity of Sobatum.Biomedicine.

31-Kim, W-J. Sung,M.K; et al. 2010. Structure and Antitumoral Activity of Fucoidan isolated from Sporophyll of Korean Brown Seaweed Undaria Pinnatifida. Carbohydrate Polymers.81(1): 41-48.

32-Francisco, C; et al. 1985. Mediterraneol, A Novel Rearranged Diterpenoidhydroquinon from the Marine Alga Cystoseira Mediterranea. Tetrahedron Lett. 26: 2629-2632.

33-Finney, D.J.1971.Probit Analysis(3rd edn).Cambridge University press,Cambridge,UK.

34-Park, JS. Yoon, SY; et al. 2004.Identification of Vovel Genes Asociated with the Response to 5-FU Treatment in Gastric Cancer Cell Lines using a Cdna Microarray.Cancer Letter.214, 19–33.

35-Afzal,M.Shameel,M.2005.Pharmaceutical Biology of Seaweeds from the Karachi Coast of Pakistan.Pharmaceutical Biology.Vol.2,pp.97-105.

36-Grundy, S.M; et al.1969. The Interation of Cholesterol Absorption and

Archive of SID
www.SID.ir

Cholesteol Synthesis In Man.J Lipid Res.

37- Costa, LS. Fidelis, GP. Telles, CB. Dantas-Santos, N. Camara, RB. Cordeiro, SL.Costa, MS. Almeida-Lima, J. Melo-Silveira, RF. Oliveira, RM. et al;۲۰۱۱.Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed Sargassum filipendula. Mar Drugs.۹(٦):۹٥۲–۹٦٦.

38-Coombe,Dr.Parish, Cr. Ramshaw,Ie. Snowden, JM.1987. Analysis of the Inhibition of Tumor Metastasis By Sulfate Polysaccharides. Int J Cancer. 39: 82-88.

39-Xue, M. GE, Y. Zhang, J. Wanq, Q. Hou, L. Liu, Y. Sun, L. Li, Q. 2012.Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. PLoS One.7, e43483.

40- Go, H. Hwang, HJ. Nam, TJ. 2010. A glycoprotein from Laminaria japonica Induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. Toxicol in Vitro.24 (6):1546–1553.

41-Kaladharan, P. and N. Kaliaperunal, 1999. Seaweed industry in India. NAGA, ICLARM Q. 22: 11-14.

42-Dias, PF. Siqueira, JR. et al. 2005. Antiangiogenic and Antitumoral Properties of a Polysaccharide Isolated from The Seaweed *Sargassum Stenophyllum*. Cancer Chemother Pharmacol. 56: 436-446.

43-Paskaleva, E;et al.2008. Inhibition of highly productive HIV-1 infection in T cells, primary human macrophages, microglia, and astrocytes by Sargassum fusiforme.Virology J. doi: 10.1186/1743-422X-5-8.

44-سعید نیا سودابه،1380. بررسی فیتوشیمیایی و ایمونولوژیک گونه بومادران طالقانی Achillea talagonica.Bioss”، به راهنمایی دکتر نرگس یاسا، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، شماره پ-51

45-کیان مهر – هرمز دیار،1384. بیولوژی جلبک‌ها.

Archive of SID
www.SID.ir

Abstract:

The widespread use of antibiotics leads to resistant strains of microorganisms and antibiotic resistance is increasing throughout the world, therefore, access to new sources of drugs with fewer side effects is important. This paper examines the effects of biological extracts of ethylacetate, methanol and methanol-water of *Colpomenia sinousa* and *Iyengaria stellata* in the Northern coast of the Persian Gulf.

In this study after sampling, antibacterial, antifungal and aniticancer effects of extracts of *Colpomenia sinousa* and *Iyengaria stellata* collected from Persian Gulf on a strain of bacteria called Staphylococcus aureus (gram-positive) and E.coli (gram-negative), Pseudomonas aeruginosa examined and the results were compared with standard antibiotics. Extraction was performed using percolation method. Antibacterial effects (MIC) of the final extracts based on a tube dilution method were determined. All three extracts, ethyl acetate, methanol and methanol-water of Colpomenia sinousa and Iyengaria stellata Showed antibacterial effects of Persian Gulf Coast and among the extracts, ethyl acetate extracts of Iyengaria stellata (MIC> ۲/۵ mg / ml) on each of the three strains of bacteria Staphylococcus aureus (PTCC: ۱۱۱۲), E coli (PTCC: ۱۳۳۸), Pseudomonas aeruginosa (PTCC۱۷۰۷) have the greatest effect.

Results of the antifungal tests showed that two algae have no antifungal activity. The anticancer effect showed, The methanol extracts of *Colpomenia sinousa* at a concentration of ۱۰۰ µgr/ml can destroy ۵۹% of cancer cells after ٤٨ hours in vitro.Ethyl acetate extract of Iyengaria stellata at a concentration of ۲۰۰ µgr/ml can destroy ۳۵% of cancer cells after ٤٨ hours in vitro.

Keyword: Antibacterial,Antitumoral, Antifungal, Seaweed

Archive of SID

www.SID.ir

واحد استان البرز

واحد استان البرز

جمهوری اسلامی ایران

Project Title:

Survey of Biological properties of marine Macro algae *Colpomenia sinosa* and *Iyengaria stellata*

Project Code:

۲۰۷۷-۱۱

Location Plan:

ACECR Alborz

Executive:

Farzaneh Farahani

June ۲۰۱۵

Archive of SID

www.SID.ir