

# بررسی اثر ضد ژیاوردیایی جلبک کاهوی دریائی

## *Ulva lactuca*

- صدیقه مهربان، عضو هیات علمی دانشگاه تربیت معلم تهران
- مهناز فرهمند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
- مهدی آسمار، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
- مزگان امتیازجو، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
- احمد رضا اسماعیلی، انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۰

### مقدمه

یکی از مسائل مهم در امر بهداشت و سلامت عمومی دستیابی به آب آشامیدنی سالم و روشهای نوین در امر ضد عفونی کردن آبها (آشامیدنی، حوضچه‌های پرورش ماهی) و حفظ مسائل زیست محیطی می‌باشد. به علاوه در حال حاضر بیماریهای انگلی از جمله *G. lamblia* از عوامل عمده بیماری‌زایی محسوب می‌شوند.

همانطور که می‌دانیم *G. lamblia* از انتشار جهانی برخوردار است و با نوشیدن آب آلوده، مصرف سبزی و میوه‌جات آلوده (به‌طور خام) یا به واسطه تماس‌های فردی تظاهر پیدا می‌کند. *G. lamblia* در اغلب موارد بدون نشان بالینی است اما می‌تواند به صورت اسهال حاد یا مزمن تظاهر نماید و در عفونت‌های شدید ممکن است اسهال چرب، کم‌خونی، ضعف و کاهش وزن مشاهده گردد و در مواردی باعث سندرم سوء جذب شدید به خصوص در کودکان می‌شود (۱).

کیست انگل در مقابل میزان کلر مصرفی در آب آشامیدنی (۱-۲ ppm) مقاوم می‌باشد. پس باید به دنبال راهی برای زدودن کیست انگل *G. lamblia* از آب آشامیدنی باشیم.

امروزه جلبکها منابع استخراج بعضی از مواد دارویی می‌باشند. به‌طور کلی جلبکهای دریایی منبع غذایی از مواد طبیعی با فعالیت‌های بیولوژیکی به حساب می‌آیند. آنها دارای اثرات ضد چربی، ضد انعقاد خون، ضد میکروبی، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد اسپاسم و... می‌باشند (۴).

پس علی‌رغم این که تعداد کثیری از مردم این طور می‌پندارند که جلبکها زباله‌های ناخواسته هستند، انواع فرآورده‌های آنها در صنایع دارویی، پزشکی، غذایی، کشاورزی، تولید لوازم آرایش و... مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما متأسفانه تا به حال در کشور ما به جز موارد نادر، هیچ استفاده‌ای از ذخایر جلبکی نشده است.

با توجه به تنوع فرآورده‌های استخراج شده از جلبکها، فراوانی جلبک *G. lactuca* در سواحل خلیج فارس و گزارش‌هایی از اثرات ضد باکتری و ضد

### ✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 53 PP:68-71 Antigiardial effect of Alga *Ulva Lactuca* by decreasing cysts

By: Sedigheh Mehrabian, Teacher training university; Mahnaz Farahmand, Azad university; Mehdi Asmar, Tehran university; Mojgan Emtiazjoo, Azad university. Esmaili AR. Pasteur institute. Iran.

In this research the samples of alga *Ulva lactuca* were collected from Chahbahar in summer. Then the genus and species of the samples were determined microscopically and macroscopically. For long term storing, the algae were dried in shade and powdered to fine particles. Extraction were done with water and organic solvents. The anti-giardial effect of *Ulva lactuca* assessed at 25°C and 37°C. In respect to findings, the extracts of alga *Ulva lactuca* had severe anti-giardial effect. The chloroform extract were stronger than water ones, but with respect to the economical applicability the water form was more important and after 24 hr all of the cyst were destroyed. For chemical analysis TLC, (UV-VIS), HPLC methods were used. In the TLC method, RFs in each extract were determined and alkaloids in some of them detected. From the GLC and HPLC method the relative activity of agents determined that were appropriate for themselves.

Keyword: Extraction, Giardia, *Ulva lactuca*

### چکیده

در این پژوهش نمونه‌های جلبک *Ulva lactuca* از سواحل چابهار در فصل تابستان جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها شسته و ناخالصی‌های آن جدا شدند. برای تعیین جنس و گونه آن بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی انجام گرفت. برای نگهداری طولانی مدت جلبک‌ها آنها را در سایه خشک و سپس آسیاب کرده و پودر نرمی از آنها تهیه گردید. عصاره‌گیری توسط آب و حلال‌های آلی انجام شد. بررسی اثر ضد ژیاوردیایی جلبک در دو دمای ۲۵ و ۳۷، درجه سانتیگراد صورت گرفت. براساس نتایج مشخص گردید که عصاره آبی جلبک *U. lactuca* اثر ضد انگلی شدید روی کیستهای *Giardia lamblia* نشان می‌دهد. اثر عصاره کلروفومی از نوع آبی قوی‌تر بوده اما با توجه به جنبه کاربردی و اقتصادی عصاره آبی اهمیت بیشتری دارد و بعد از ۲۴ ساعت همگی کیست‌ها از بین رفتند. در آنالیز شیمیایی از سه روش TLC، UV-VIS، HPLC استفاده شد. در روش UV-VIS، RFهای موجود در هر عصاره تعیین و با استفاده از معرف وجود آلکالوئید در برخی از عصاره‌ها نشان داده شد. در روش UV-VIS و HPLC فعالیت نسبی مواد شاخص مشخص گردید که با عملکرد آنها مطابقت داشت. کلمات کلیدی: جلبک کاهویی دریایی، ژیاوردیا، عصاره

قارچی جلبک مزبور و این که اثر کشندگی بر انگل *Plasmodium falciparum* داشسته است (۷، ۱۰) می تواند دلایل انتخاب این کار پژوهشی باشد. امید است با بررسی اثر ضد انگلی آن بتوان از این منبع پرارزش استفاده شایان کرد.

### روش کار

در این تحقیق نمونه های جلبک *U. lactuca* از سواحل چابهار جمع آوری شد و جنس و گونه آنها با بررسی های میکروسکوپی (تهیه برش با میکروتوم و آب دهی به نمونه و استفاده از رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو<sup>۱</sup> و بعد مشاهده میکروسکوپی (تطبیق با کلید شناسایی و منابع موجود از لحاظ مورفولوژی و خصوصیات) مشخص گردید. سپس هرگونه آلودگی خارجی از جلبکها جدا شد و پس از شستشو، نمونه ها در سایه خشک شد و توسط آسیاب کردن پودر نرمی از آنها تهیه گردید. برای استریل کردن پودر از روش تندالیزاسیون<sup>۲</sup> استفاده گردید.

سیس از آب آلوده به ژیازدیا با تعداد مشخص جهت بررسی اثر ضد انگلی استفاده شد. عصاره گیری توسط آب و حلالهای آلی شامل استن، اتانل، کلروفرم، تتراکلرید کربن و پترولیوم اتر به نسبت ۱۰:۱ انجام شد. عصاره گیری طی ۷۲ ساعت با روش خیساندن در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام گرفت.

### روش بررسی اثر ضد ژیازدیایی جلبک *U. lactuca*

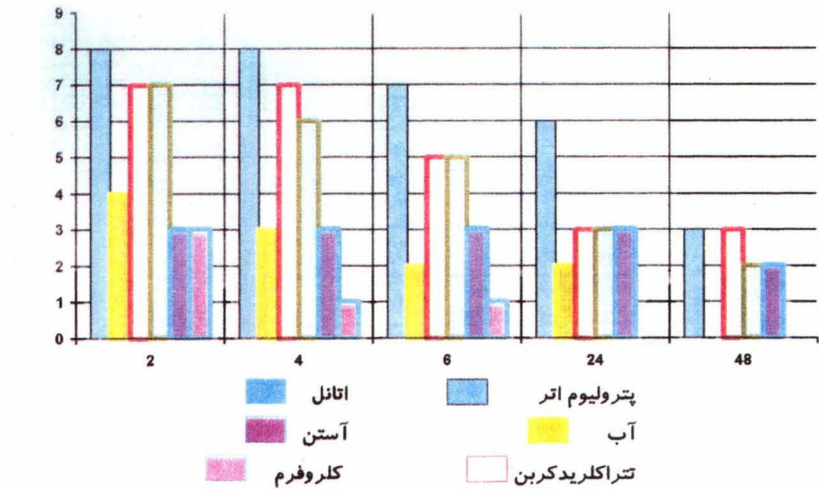
بررسی اثر ضد انگلی جلبک *U. lactuca* بر روی *G. lamblia* در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد صورت گرفت. به این صورت که ابتدا حلالهای موجود در عصاره ها به وسیله دستگاه خلاء خارج می شود. سپس در ۶ لوله آزمایش به ترتیب در هر لوله ۱ میلی لیتر آب آلوده به ژیازدیا با تعداد تقریبی ۵۰۰ کیست ژیازدیا و مقدار ۱/۱ میلی لیتر از هر یک از عصاره های آبی و حلالهای آلی به طور جداگانه اضافه می گردد. تعدادی از لوله ها در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و تعدادی از لوله ها در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده می شود. نمونه برداری از لوله ها در فواصل زمانی صفر، ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت صورت می گیرد. بدین منظور مقدار ۲۰ لانداز هر لوله برداشت شده و با استفاده از لام توما و روش رنگ آمیزی اتوزین اثر کشندگی عصاره ها بررسی می شود.

در رنگ آمیزی اتوزین کیست های مرده به رنگ قرمز و کیست های زنده ژیازدیا به رنگ طبیعی خود (سبز) دیده می شوند. با شمارش کیست های زنده در میکروسکوپ با عدسی ۴۰ میزان اثر کشندگی عصاره های مختلف در درجه حرارت ۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد می شود و با شاهد بدون عصاره مقایسه می گردد. این آزمایش ۶ بار تکرار می شود.

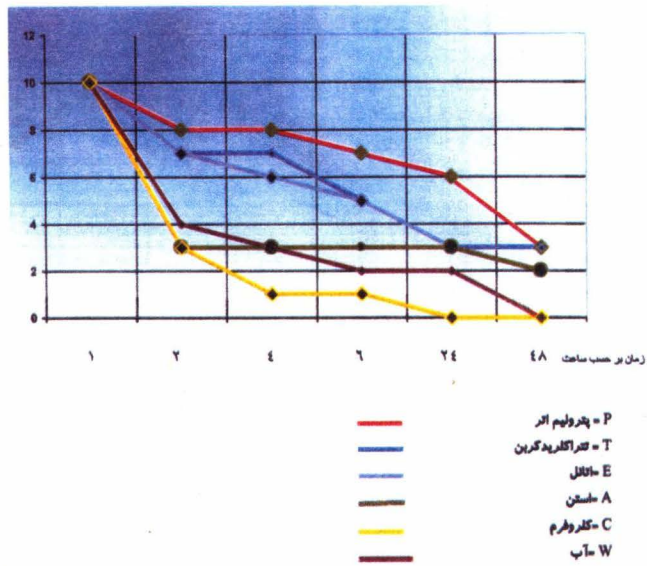
### بررسی ترکیب شیمیایی ترکیبات موجود در جلبک *Ulva lactuca*

به منظور بررسی شیمیایی مواد فعال زیستی در

هیستوگرام ۱- اثر بخشی عصاره های مختلف جلبک کاهوی دریایی بر کیست *G. lamblia* در زمانهای متفاوت در ۳۷°C



نمودار ۱- نتایج اثر بخشی عصاره های مختلف جلبک کاهوی دریایی بر کیست *G. lamblia* در زمانهای مختلف درجه حرارت ۳۷°C (اعداد جدول تعداد کیت زنده در ۲۰ لانداز و میانگین ۶ تکراری می باشند)



عصاره مختلف (زمان بر حسب ساعت)	آب	کلروفرم	استن	اتانل	تتراکلرید کربن	پترولیوم اتر
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
۲	۳	۳	۳	۳	۳	۳
۴	۳	۳	۳	۳	۳	۳
۶	۳	۳	۳	۳	۳	۳
۲۴	۳	۳	۳	۳	۳	۳
۴۸	۳	۳	۳	۳	۳	۳

*U. lactuca* عملیات لازم برای روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) و روش طیف سنجی فوتومتری (UV-VIS) و کروماتوگرافی با کارکرد عالی (HPLC) صورت می‌گیرد.

در روش TLC به منظور تایید وجود آلکالوئید با استفاده از معرف دراژندرف، RF‌های مربوط به آلکالوئیدها در عصاره‌ها مشخص گردید. در روش سنجش فوتومتری و روش HPLC نیز مواد شاخص مشخص گردید.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد ژیاوردیایی جلبک *U. lactuca* بر کیست *G. lamblia* در حرارت‌های ۲۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد نشان داد که همه عصاره‌های آبی و آلی اثر ضد ژیاوردیایی دارند. نتایج این تحقیقات مشخص نمود که حرارت ۲۷ درجه اثر بیشتری در انهدام کیست‌های ژیاوردیایی نسبت به ۲۵ درجه سانتیگراد دارد (جدول ۱ و ۲).

نتایج حاصل از تحقیقات دیگر پژوهشگران در زمینه این جلبک نظیر Valchos, Ivanova, Febles, Egan, Osterhage نشان داده است جلبک مزبور اثرات ضد میکروبی دارد (۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲).

نتایج استفاده از عصاره‌های مختلف جلبک دریایی نشان داد که عصاره کلروفومی و آبی بیشترین اثربخشی را دارد. عصاره‌های حلالهای مختلف توسط محققین دیگر نیز کار شده از جمله Valchos و Ivanova که به ترتیب از کلروفوم و استن برای بررسی فعالیت ضد میکروبی استفاده کردند (۸، ۱۱).

عصاره‌های حاصل از تتراکلرید کربن و پترولیوم اثر کمترین اثر ضدانگلی را از خود نشان دادند. بررسی در زمینه اثر ضد میکروبی جلبک‌های مختلف از جمله *Gracilaria vergoza*, *U. lactuca* و *Polyphona sp.* بیشترین فعالیت ضد میکروبی را داشتند که در این پژوهش نیز اثر ضدانگلی جلبک مزبور ثابت گردید. در سال ۲۰۰۰ تحقیقی در زمینه جداسازی عصاره‌های مختلف جلبک *U. lactuca* بر روی انگل *P. falciparum* انجام شد که همانند این تحقیق، اثر ضد انگلی قابل توجهی مشاهده گردید (۱۰). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عامل حرارت اثر مثبت بر افزایش کشندگی و کاهش کیست‌های انگل *G. lamblia* دارد. شاید به این علت باشد که در حرارت بالاتر انتشار مواد بهتر صورت می‌گیرد و مواد فعال زیستی موجود در عصاره‌ها بهتر به درون بهتر به درون کیست نفوذ پیدا می‌کنند پس اثربخشی سریعتر صورت می‌گیرد (هیستوگرام ۱ و ۲).

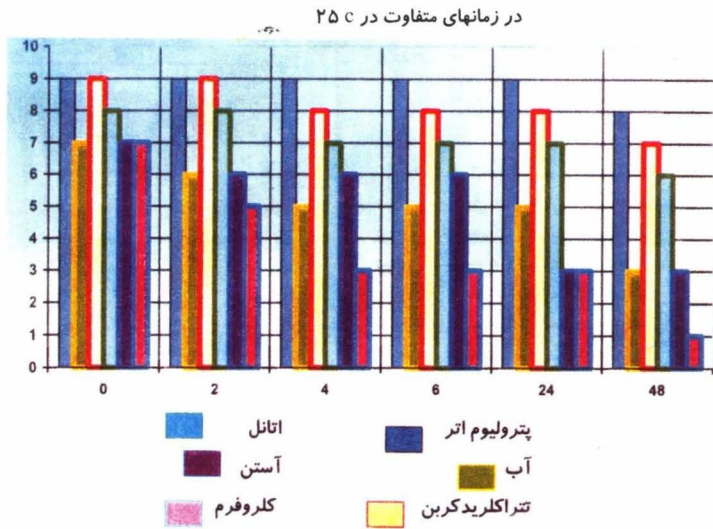
بررسیهای مقدماتی انجام شده نشان دادند که استفاده از جلبک *Ulva lactuca* جهت رفع آلودگی آبهای آشامیدنی آلوده به *G. lamblia* می‌تواند در سطح وسیعی مورد بررسی قرار گرفته و با سایر روش‌ها مقایسه گردد.

نتایج بررسی شیمیایی ترکیبات موجود

در جلبک *U. lactuca*

یکی از روش‌های متداول برای سنجش مواد فعال

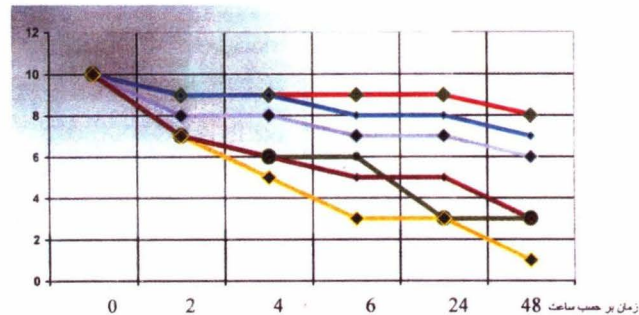
هیستوگرام ۲- اثر بخشی عصاره های مختلف جلبک کاهوی دریایی بر کیست ژیاوردیالامبلیا



نمودار شماره ۲- اثر بخشی عصاره های مختلف جلبک کاهوی دریایی بر کیست ژیاوردیالامبلیا

در زمانهای مختلف و درجه حرارت ۲۵ C

(اعداد جدول تعداد کیست زنده در ۲۰ لانه و میانگین ۶ تکرار می باشند).



عصاره مختلف	زمان بر حسب ساعت	آب	کلروفوم	استن	اتانل	تتراکلرید کربن	پترولیوم اثر
صفر	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
۴	۷	۷	۷	۷	۸	۹	۹
۴	۶	۶	۵	۶	۸	۹	۹
۶	۵	۴	۶	۷	۸	۹	۹
۲۴	۵	۳	۳	۳	۷	۸	۹
۴۸	۳	۱	۳	۳	۶	۷	۸

جدول ۳: سنجش R توسط TLC برای عصاره‌های مختلف اولوالاکتوکا

R <sub>g</sub>	R <sub>14</sub>	R <sub>13</sub>	R <sub>12</sub>	R <sub>11</sub>	R <sub>f</sub>	عصاره‌ها
		۰/۹۷	۰/۷۲	۰/۶۳		آبی
	۰/۶۶	۰/۴۵	۰/۰۸	۰/۰۴		اتانولی
	۰/۸۳	۰/۷۰	۰/۶۶	۰/۶۱		استنی
	۰/۹۳	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۷۳		تتراکلرید کربنی
۰/۶۸	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۲۶	۰/۱۱		کلروفرمی

Manolovan, 1991. Biologically active substances from marine organism. I. Isolation of substance from marine algae with antiviral effect. *Herba. Biochem.* 30(3), 47-53.

9- Ivanova. V. Rouseva, R. Kolarova, Manolovan, 1994. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*, *Biochem* 24(2), 83-91.

10- Osterhage C. Kaminsky R., Kong Gm Wright AD., 2000. Cytotoxic metabolites secondary metabolites natural products. *Alga. Substances. Isoflavones. Penostains. Inhibitor, Journal of organic chemistry*, 65(20): 6412-6417.

11- Valchos. V. Saboureau D. Creppy EE., 1996. Establishment of a protocol for testing antimicrobial activity in Southern African macroalgae, *microbios*, 88(355) 115-123.

12- Valchos. V. Saboureau D. Creppy EE., 1997. Antimicrobial activity of extract from selected African marine macroalgae, *south African Journal of science*, 93(7), 328-332.

کربنی در مقایسه با تتراکلرید کربن دو ترکیب شاخص در ۸/۷۲۳ و ۷/۳۷۵ دارد و یکسری ترکیبات کمتر در ۱۳/۶۵۷ و ۱۶/۰۴ و ۱۲/۵۶۲ دارد. عصاره پترولیوم اتری در مقایسه با پترولیوم اتر ترکیب شاخص نداشته و یکسری ترکیبات با غلظت کم دیده می‌شود. عصاره‌های استنی و اتانولی نسبت به عصاره‌های تتراکلرید کربنی و پترولیوم اتری فعالیت بیشتری از خود نشان دادند. برای تشخیص دقیق این مواد بایستی از GC/MS استفاده شود تا ترکیبات شاخص شناسایی شوند.

#### پاورقی‌ها

- 1- Lactophenol cotten blue
- 2- Tyndallization
- 3- Aconitine
- 4- Retention time

#### منابع مورد استفاده

- ۱- براون، نوا، ترجمه فرهاد همت‌خواه، ۱۳۷۵. انگل شناسی پزشکی، انتشارات شهر آب.
- ۲- ژل. گینبار، ترجمه رضا حیدری، ۱۳۷۳. سیری در زیست شیمی، مرکز نشر دانشگاهی تهران.
- ۳- زگرگی، ع. ۱۳۷۱. گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران.
- ۴- هرمزدار، کیان مهر، ۱۳۷۱. مبانی جلبک شناسی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- ۵- نوروزی، م. و همکاران، بررسی فیتوشیمی و اثرات ضد میکروبی گیاه خوشاروزه پایان‌نامه برای دریافت درجه دکتری رشته داروسازی، دانشگاه تهران، دانشکده داروسازی.
- 6- Egan S. Thomast. Holmstorm C. Kjellebergs 2000. Phylogenic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine algae *Ulva lactuca*, *Environmental Microbiology* 2(3): 343-347.
- 7- Febles Cl., Fabbri D. & Torsi G., 1995. Antimicrobial activity of extracts from some canary species of phaeophyta and chlorophyta ohytotherapy, *Research*, 9(5), 385-387.
- 8- Ivanova V. Rouseva, R. Kolarova,

بررسی TLC می‌باشد که در این روش ماده آلکالوئید از عصاره جدا شد و RFهای موجود در هر عصاره مشخص گردید (جدول شماره ۳).

بهترین حلال جدا کننده آلکالوئید در این پژوهش کلروفرم بوده است. آلکالوئیدهای حلال در کلروفرم از نوع آکونی تین<sup>۳</sup> می‌باشند (۳). از آنجایی که همواره اثر سمی و ضد انگلی آلکالوئیدها در علم پزشکی ثابت شده است (۲) در نتیجه می‌توان یکی از مواد مؤثر جلبک مزبور را آلکالوئیدهای آکونی تین معرفی نمود و به دلیل این که حلال کلروفرم ترکیبات آلکالوئیدی را بهتر جدا کرده است بیشترین اثر کشندگی نیز در عصاره کلروفرمی مشاهده گردید.

نتیجه مهمی که از روش سنجش فتومتری حاصل شد این بود که تمام عصاره‌ها در طول موج ۲۴۵ نانومتر جذب نوری داشتند و دستگاه HPLC را روی این طول موج تنظیم کردیم.

براساس روش UV-VIS ترکیبات جدا شده از جلبک *U. lactuca* ترکیبات پیچیده و متنوعی هستند و چون در طول موج‌های مختلف جذب‌های متفاوتی برای هر عصاره داریم در نتیجه هر حلال قادر به جدا کردن ماده خاصی از جلبک می‌باشد (۸) این نتایج با مطالعات Valchos مشابه است (۱۲).

آلکالوئید جدا شده دارای اثر ضد میکروبی است (۵) و از اسید آمینه تریپتوفان مشتق شده است (۱۲).

در ادامه روش از روش (HPLC) کروماتوگرافی با کارکرد عالی استفاده نمودیم و تعداد ترکیبات شاخص به همراه زمان بازداری آنها را مشخص کردیم.

براساس نتایج اعداد نشان دهنده زمان بازداری<sup>۴</sup> یا RT هستند. عصاره کلروفرمی در مقایسه با کلروفرم دو ترکیب شاخص در ۸/۷۰۲ و ۷/۴۴۵ دارد. عصاره آبی در مقایسه با آب دو ترکیب شاخص در ۷/۶۵۳ و ۷/۳۲۵ دارد. هر دو عصاره آبی و کلروفرمی فعالیت بسیار بالایی از خود نشان دادند.

عصاره استنی در مقایسه با استن دارای دو ترکیب شاخص در RT ۱۲/۵۲۵ و ۱۴/۷۲۳ است و یک سری ترکیبات کمتر در ۱۵/۷۲۸ و ۱۷/۸۲۶ و ۱۸/۰۰۸ وجود دارد.

عصاره اتانولی در مقایسه با اتانول دو ترکیب شاخص در RT ۸/۷۷۵ و ۸/۶۱۸ دارد. عصاره تتراکلرید