مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات ۳۱۲ تا ۳۳۰

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره جلبک سبز *زیگنما* (*Zygnema*) از زیستگاه آبی شمال ایران

مهرنوش صحرائی‌رودآبادی[۱]، فاطمه مرادی[۲]، محمودرضا آقامعالی[۳]*

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- دکتری بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

چکـــیده

ریزجلبک‌ها به‌دلیل تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های زیست‌فعال، به‌عنوان منابع نویدبخش در توسعه ترکیبات دارویی و کشف آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی برای مقابله با مقاومت آنتی‌بیوتیکی شناخته می‌شوند. با این حال، علی‌رغم گزارش‌های محدود از فعالیت‌های زیستی ریزجلبک‌ها، داده‌های جامع و نظام‌مند درباره ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی جلبک سبز *زیگنما*، به ویژه در زیستگاه‌های طبیعی شمال ایران، همچنان ناکافی است. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH و ضد باکتریایی ترکیبات فیتوشیمیایی عصارهٔ متانولی جلبک سبز *زیگنما* استخراج‌شده از زیستگاه آبی شمال ایران، بر دو گونه باکتری بیماری‌زا و شایع انسانی شامل *Staphylococcus aureus* (باکتری گرم مثبت) و *Escherichia coli* (باکتری گرم منفی) با روش انتشار در چاهک آگار بود. نتایج فیتوشیمیایی و آنالیز GC-MS نشان داد که عصاره متانولی جلبک *زیگنما* شامل ترکیبات هگزادکانوئیک اسید متیل استر ، متیل لینولنات، فیتول ، گاما سیتوسترول ، ایزوفوکوسترول و هم چنین ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، کاروتنوئیدی، کلروفیل‌ها و مشتقات لیپیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی (۸۱ درصد) است. همچنین فعالیت ضدباکتریایی جلبک زیگنما در برابر باکتری‌ها نشان داد که عصاره متانولی جلبک با حداکثر هاله عدم رشد ۳۲ میلی‌متر، بیشترین تأثیر مهار را در برابر باکتری *S. aureus* دارد، در حالی که هاله عدم رشد ۲۳ میلی‌متری در مورد باکتری *E. coli* مشاهده شد. در نتیجه عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* به دلیل حضور ترکیبات زیست‌فعال مؤثر، دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال قابل توجه‌ای بوده و می تواند به‌عنوان یک عامل طبیعی چند هدفه با پتانسیل کاربرد در راهبردهای درمانی مطرح شود.

کـــلید واژه‌ها: جلبک زیگنما، ترکیبات زیست‌فعال، آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری.

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۳۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۳۰

تاریخ چاپ الکترونیکی:
۱۴۰۴/۱۲/۱۵

*نویسنده مسئول:
aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

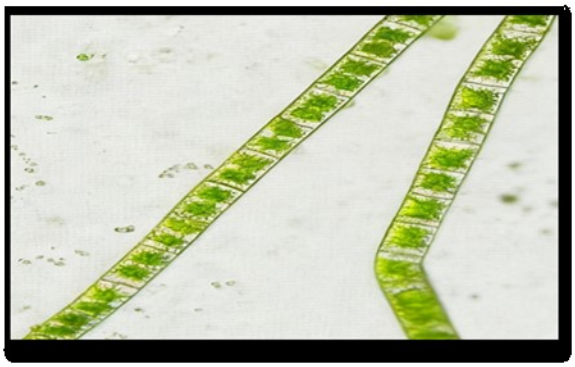
بیماری‌های عفونی یکی از مهم‌ترین علل افزایش میزان ابتلا و مرگ و میر انسان‌ها در سراسر جهان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، محسوب می‌شوند. در سال‌های اخیر، شدت و شیوع این بیماری‌ها به دلیل عفونت‌های شدید و استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است، که منجر به ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها و قارچ‌ها شده و نیاز مبرم به توسعه جایگزین‌های طبیعی و ایمن برای درمان این بیماری‌ها را ایجاد کرده است[۱].

جلبک‌ها، به ویژه جلبک‌های سبز آب شیرین، به دلیل سازگاری با شرایط محیطی شدید و حضور باکتری‌های رقابتی، توانایی تولید مجموعه‌ای گسترده از ترکیبات زیست‌فعال شامل فلوروتانین‌ها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها، پپتیدها و ترپن‌ها را دارند [۲،۳]. ماکروجلبک‌ها و میکروجلبک‌ها، علاوه بر تولید ترکیبات زیست‌فعال، حاوی مولکول‌هایی مانند فلوروتانین‌ها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها، پپتیدها و ترپن‌ها هستند که می‌توانند با تهاجم باکتریایی مقابله کنند. مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج به یک اپیدمی جهانی تبدیل شده و مشتقات جلبک‌ها به‌عنوان کاندیداهایی نویدبخش برای کشف داروهای ضدباکتری جدید مطرح شده‌اند. ترکیبات باکتری‌کش و باکتریواستاتیک برای اولین بار از جلبک‌ها جدا شدند، زمانی که مشخص شد عصاره‌های کلروفرم و اسید چرب بنزن جداشده از *Chlorellin*، جلبک *Chlorella vulgaris*،

باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* و *Bacillus subtilis* را مهار می‌کنند. اگرچه *Chlorellin* برای استفاده تجاری در مقیاس بزرگ مناسب نبود، تحقیقات بیشتری در مورد مهارکننده‌های ضدمیکروبی جلبک در جنس‌هایی مانند *Scenedesmus* آغاز شد. چندین گروه عملکردی شیمیایی در جلبک‌ها، از جمله فلوروتانین‌ها، اسیدهای چرب، پپتیدها، ترپن‌ها، پلی‌ساکاریدها، پلی‌استیلن‌ها، استرول‌ها، آلکالوئیدهای ایندول، اسیدهای آلی آروماتیک، اسید شیکیمیک، پلی‌کتیدها، هیدروکینون‌ها، الکل‌ها، آلدهیدها، کتون‌ها و فورانون‌های هالوژنه، به عنوان مهارکننده‌های باکتریایی گزارش شده‌اند و مکانیسم اثر دارویی برخی از آن‌ها هنوز مشخص نیست [۲].

بررسی‌ها نشان داده است که محتوای ترکیبات زیست‌فعال جلبک‌ها می‌تواند بسته به گونه، سن برداشت و شرایط محیطی زیستگاه یا محل رشد متفاوت باشد [۴]. این ترکیبات شامل فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، ترپنوئیدها، فلوروتانن‌ها، استروئیدها، اسیدهای آمینه، آلکان‌ها و کتون‌های هالوژنه هستند که نقش‌های متنوعی در فرآیندهای زیستی ایفا می‌کنند. علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بسیاری از این ترکیبات دارای اثرات ضدالتهابی، ضدویروسی، ضدسرطانی و به‌ویژه ضدباکتریایی می‌باشند [۵] که می‌توانند به‌عنوان منابع بالقوه برای کشف داروهای طبیعی و توسعه درمان‌های نوین مورد استفاده قرار گیرند[۱-۳].با وجود مطالعات متعدد روی سایر جلبک‌های سبز و دریایی [۱-۶]، بررسی‌های دقیق و سیستماتیک در مورد ترکیبات زیست‌فعال و اثرات ضدباکتریایی گونه‌های *زیگنما* بسیار محدود و اندک است [۷،۸]. بنابراین، انجام پژوهش‌های جدید برای بررسی فعالیت‌های زیست‌فعال عصاره‌های این گونه ، بهینه‌سازی روش‌های استخراج، خالص‌سازی و تجاری‌سازی این ترکیبات برای کاربردهای درمانی و دارویی[۶] و پر کردن این خلأ علمی، ضروری به نظر می‌رسد.

جلبک سبز رشته‌ای زیگنما (*Zygnema*) (شکل۱) از ردهٔ Zygnematophyceae و از نزدیک‌ترین خویشاوندان گیاهان خشکی محسوب می‌شود [۷]؛ این گونه معمولاً به‌صورت توده‌ای از رشته‌ها بر سطح آب شناور شده و بخش مهمی از اکوسیستم‌های آب شیرین و آبزی–زمینی را تشکیل می‌دهد. سلول‌های زیگنما اغلب استوانه‌ای یا بشکه‌ای بوده و دارای دو کلروپلاست ستاره‌ای شکل با پیروئید مرکزی هستند که نقش حیاتی در فتوسنتز و حفاظت سلولی دارند [۷،۹]. این جلبک به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع، از جمله فنول‌ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، قادر به محافظت سلول‌ها در برابر استرس‌های محیطی مانند نور شدید و تابش UV است [۷،۸] و به همین دلیل می‌تواند پتانسیل بالایی در مهار رشد باکتری‌ها داشته باشد. گونه‌هایی مانند زیگنما، در مطالعات میکروسکوپی، به‌عنوان نامزدهای امیدبخش برای توسعه درمان‌های نوآورانه معرفی شده‌اند [۸].



شکل۱- جلبک سبز *زیگنما* (*Zygnema*) با بزرگنمایی 400x.

هدف از اجرای این پژوهش بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما از زیستگاه‌های شمال ایران بر دو گونه باکتری بیماری‌زا و شایع انسانی ، *Staphylococcus aureus* (باکتری گرم مثبت) و *Escherichia coli* (باکتری گرم منفی) است [۷،۸]. هم‌زمان، انجام تحلیل فیتوشیمیایی عصاره امکان ارتباط‌دهی بین ترکیبات زیست‌فعال و اثرات مشاهده‌شده را فراهم می‌آورد. استفاده

از تست انتشار در چاهک آگار، آزمون DPPH و تحلیل فیتوشیمیایی به‌عنوان روش‌های مکمل، محدودیت‌های تحقیقاتی قبلی را پوشش می‌دهد و امکان ارزیابی همزمان فعالیت عملکردی و حضور متابولیت‌های ثانویه را فراهم می‌آورد [۷،۸].با توجه به اهمیت اکولوژیکی و بیوشیمیایی این گونه، مطالعه سیستماتیک و جامع روی ترکیبات زیست‌فعال و اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما*، به ویژه در زیستگاه‌های طبیعی شمال ایران، همچنان یک خلا علمی محسوب می‌شود. نتایج این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز توسعه رویکردهای درمانی نوین، طبیعی، ایمن و کم‌هزینه و مبنای ارزشمند برای تحقیقات پیش‌بالینی و بالینی آینده باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی جلبک سبز *زیگنما*

جلبک سبز زیگنما از سطح شالیزارهای منطقه توتکابن– شهرستان رودبار– استان گیلان جمع‌آوری شد. پس از شستشو با آب شیرین به آزمایشگاه گیاه‌شناسی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان منتقل شد و توسط کارشناس جلبک‌شناسی گروه زیست‌شناسی به کمک کلیدهای شناسایی، در سطح جنس احراز هویت و تأیید گردید. سپس جلبک‌ها به مدت ۱۶–۲۲ ساعت با استفاده از دستگاه لیوفیلیزاتور در دمای منفی ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد خشک و با دستگاه آسیاب پودر شدند. پس از وزن شدن در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند[۹].

تجزیه وتحلیل کروماتوگرافی گازی همراه با طیف سنجی جرمی (GC-MS)

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی و زیست‌فعال موجود در عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما، از آنالیز کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) استفاده شد. فرآیند استخراج عصاره به روش خیساندن در حلال انجام گرفت. بدین منظور، مقدار ۰/۰۳ گرم از پودر خشک جلبک با ۳ میلی‌لیتر متانول خالص مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط در شیکر انکوباتور قرار گرفت. پس از آن، مخلوط حاصل از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. این مرحله ۳ بار تکرار شد. در نهایت، عصاره متانولی حاصل با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای آنالیز با دستگاه GC-MS آماده گردید[۵].

سنجش‌های فیتوشیمیایی

سنجش‌های فیتوشیمیایی به منظور شناسایی ترکیبات فعال زیستی موجود در عصاره جلبک انجام شد، که شامل کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها، فنول‌ها، فلاونوئیدها، پروتئین، کربوهیدرات، آنتوسیانین، ساپونین، استروئیدها و تری‌ترپنوئیدها می‌باشند.

اندازه گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها

برای آنالیز رنگدانه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی، مقدار ۱۰ میلی‌گرم زیست‌توده خشک شده جلبک به ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه و به مدت ۵ دقیقه مخلوط گردید. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. جذب نوری عصاره در طول‌موج‌های ۴۷۰، ۶۵۳ و ۶۶۶ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر کلروفیلa، کلروفیل b و کاروتنوئیدکل با استفاده از فرمول‌های ذیل محاسبه گردید [۱۰].

$$Chlorophyll\ a\ (\mu g/ml) = 12.25\ A_{663} - 2.25\ A_{653}$$

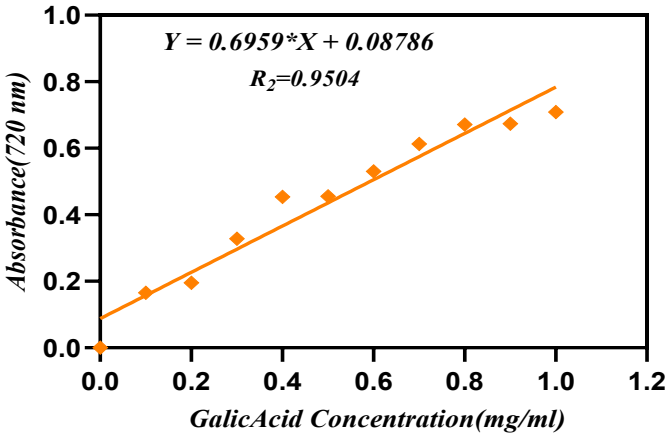
$$Cholorophyll\ b\ (\mu g/ml) = 20.31\ A_{653} - 2.25\ A_{666}$$

$$\text{Cholorophyll a+b } (\mu g/ml) = 17.76\ A_{663} + 7.38\ A$$

$$Carotenoids\ (\mu g/ml) = [\ (1000\ A_{470}\ ) - (2.860\ \text{Chl a}) - (12.29\ \text{Chl b})\ ]\ /24$$

اندازه گیری محتوای فنول کل

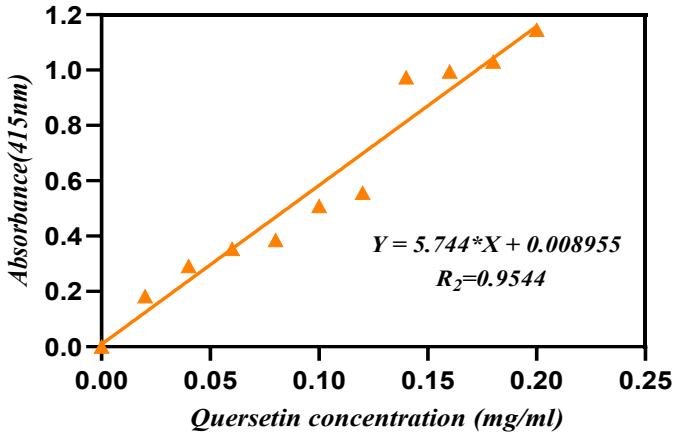
برای اندازه‌گیری مقدار فنول کل عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما که با روش خیساندن در حلال به دست آمده، از روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بهره گرفته شد. بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی جلبک با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر دی‌یونیزه، ۲ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالتیو ۵۰ درصد مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای محیط انکوبه شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۷۲۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد. محتوای فنول تام با استفاده از معادله خط حاصل از منحنی استاندارد اسید گالیک بر حسب میلی‌گرم معادل اسید گالیک در گرم وزن خشک نمونه (mg GAE/g DW) محاسبه گردید (شکل ۲) [۱۱].



شکل۲- منحنی استاندارد و معادله‌خط گالیک اسید.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل

مقدار فلاونوئید کل موجود در عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر واکنش با آلومینیوم‌کلراید تعیین گردید. برای این منظور، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم‌کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار، و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از معادله خط استاندارد حاصل از منحنی کوئرستین، محتوای فلاونوئید عصاره بر حسب میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک نمونه (mg QE/g DW) محاسبه شد (شکل ۳) [۱۲].



شکل ۳- منحنی استاندارد و معادله خط کوئرستین.

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین

برای سنجش میزان آنتوسیانین، مقدار ۰/۰۲گرم از پودر خشک جلبک سبز زیگنما به ۱ میلی‌لیتر متانول اسیدی (حاوی ۱درصد حجمی HCl) اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، هم حجم فاز رویی کلروفرم اضافه گردید. میزان جذب نمونه در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، محتوای آنتوسیانین کل موجود در عصاره بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید[۱۳].

$$\text{Anthocyanin Content (mg/ml)} = A530 - (0.25 \times A657)$$

شناسایی ساپونین

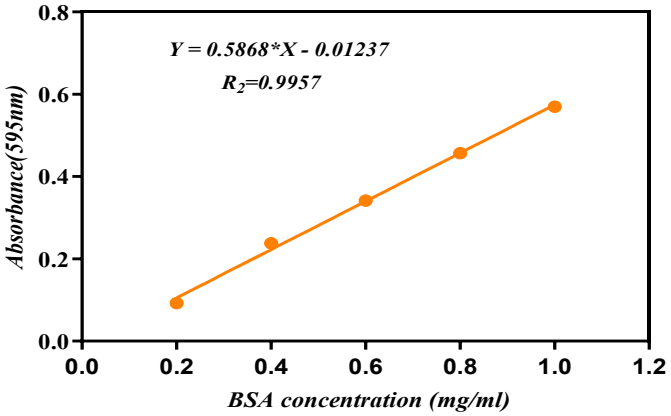
در این روش، مقدار ۰/۰۰۵ گرم از نمونه استخراج‌شده در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر داغ حل شد. سپس محلول حاصل به مدت چند دقیقه به‌صورت شدید تکان داده شد تا کف پایداری ایجاد گردد. در ادامه، یک قطره محلول اسید کلریدریک ۲ مولار به آن افزوده شد. در صورتی که کف ایجاد شده پس از افزودن اسید از بین نرود، وجود ترکیبات ساپونینی در نمونه تأیید می‌شود[۵].

شناسایی استروئید و تری‌ترپنوئیدها

برای شناسایی ترکیبات استروئیدی و تری‌ترپنوئیدی در نمونه استخراج‌شده، مقدار ۰/۰۵ گرم از عصاره روی پتری دیش قرار داده شد. سپس چند میلی‌لیتر کلروفرم به آن افزوده و اجازه داده شد تا کاملاً خشک شود. سپس ۱۰ قطره اسید استیک بدون آب به نمونه اضافه و به‌خوبی هم زده شد. ۳ قطره اسید سولفوریک غلیظ (۹۶درصد) به آرامی به مخلوط افزوده شد. در صورت مشاهده رنگ آبی یا سبز، حضور ترکیبات استروئیدی در نمونه تأیید می‌شود؛ و اگر رنگ قرمز یا بنفش ظاهر شود، نشان‌دهنده وجود ترکیبات تری‌ترپنوئیدی است [۵].

اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل

مقدار ۵ میلی‌گرم پودر جلبک با ۱ میلی‌لیتر محلول سود ۱/۵ مولار مخلوط گردید و به مدت ۱۱ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بر روی هیتر استیرر حرارت داده شد. پس از سرد شدن، نمونه‌ها در سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی پروتئین با ۵ میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط شد. پس از گذشت ۱۵دقیقه، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. در ادامه، منحنی استاندارد با استفاده از سرم آلبومین گاوی ترسیم شد و مقدار پروتئین استخراج شده بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک جلبک محاسبه گردید (شکل ۴) [۱۴].



شکل ۴. منحنی استاندارد و معادله خط سرم آلبومین گاوی (BSA).

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره به روش ۱،۱–دی‌فنیل–۲–پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی در غلظت‌های مختلف (۰، ۷/۸، ۱۵/۶ ، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از متانول ۸۰ درصد رقیق شد. سپس به هر نمونه، یک میلی‌لیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰۴ درصد (وزنی/حجمی) در متانول افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی انکوبه شدند. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. جهت مقایسه، از آسکوربیک اسید در غلظت‌های مشابه به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. سپس با رسم نمودار درصد مهار (I%) در برابر غلظت‌های مختلف عصاره، مقدار IC50 محاسبه شد. پس از تعیین IC_{50} آسکوربیک اسید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بر حسب میلی‌گرم آسکوربیک اسید بر گرم پودر خشک(mgAA/gDW) ، با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد[۱۵].

%Inhibition= [(A control - A sample)/Acontrol] ×100

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

برای ارزیابی فعالیت آنتی‌باکتریایی عصارهٔ متانولی جلبک سبز زیگنما، از روش انتشار دیسک (Disk Diffusion) مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی وآزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد. در این آزمون، دو گونه باکتری بیماری‌زا و شایع انسانی شامل *Staphylococcus aureus* به عنوان باکتری گرم مثبت و *Escherichia coli* به عنوان باکتری گرم منفی مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا محلول استوک عصاره با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین استریل تهیه شدند. سپس محیط کشت مولر هینتون آگار آماده و پس از استریلیزاسیون، در پلیت‌های استریل ریخته شد. برای آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی، کدورت نمونه‌ها بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید که غلظتی در حدود $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر (CFU/mL) را فراهم می‌کند. سوسپانسیون‌های باکتری *E. coli* و *S. aureus* با استفاده از سواپ استریل به‌طور یکنواخت بر سطح محیط کشت پخش شدند. دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر با ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره جلبکی آغشته شده و بر سطح محیط‌کشت قرار گرفتند. دیسک آنتی‌بیوتیکی استاندارد سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم در هر دیسک) به عنوان کنترل‌مثبت و یک دیسک‌خالی بدون ماده فعال به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌ها پس از آماده‌سازی، به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند تا نواحی بازدارندگی رشد باکتری مشاهده و اندازه‌گیری شوند [۱۶].

تجزیه وتحلیل‌های آماری

به‌منظور انجام آنالیزهای آماری و کاهش خطا، کلیه آزمایش‌ها به‌صورت سه تکرار مستقل انجام شدند. میانگین نتایج به همراه انحراف معیار (Mean ± SD) محاسبه گردید. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای GraphPad Prism و Microsoft Excel 2016 استفاده شد.

نتایج

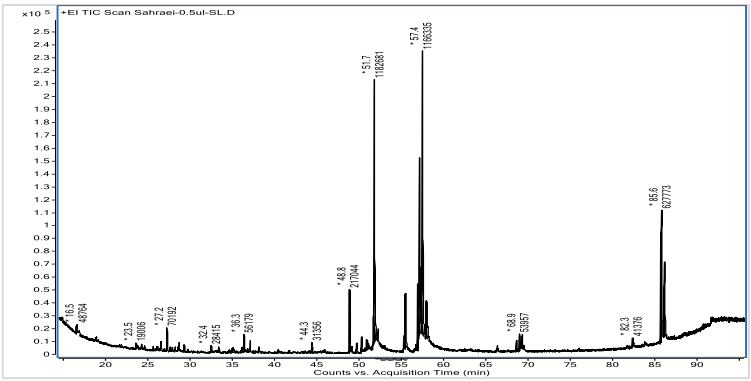
تجزیه وتحلیل طیف کروماتوگرام عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما*

نتایج حاصل از تحلیل طیف کروماتوگرام عصاره متانولی با استفاده از کروماتوگرافی گازی‌همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC–MS) نشان‌داد که ترکیبات مختلفی در این عصاره شناسایی شده‌اند (جدول ۱ و شکل ۵). از میان این‌ترکیبات، هگزادکانوئیک اسید متیل استر (Hexadecanoic acid, methyl ester) با مساحت پیک ۱۹/۲۸ درصد، متیل لینولنات (Methyl linolenate) با ۱۳/۵۳درصد، فیتول (Phytol) با

۱۹/۰۱درصد، گاما سیتوسترول (γ-Sitosterol) با مساحت پیک ۱۰/۲۳ درصد و هم چنین ایزوفوکوسترول (Isofucosterol) با مساحت پیک ۶/۴ درصد، بیشترین سهم را به خود اختصاص داده‌اند. در مجموع این پنج ترکیب اصلی حدود ۶۸ درصد از کل مساحت کروماتوگرام را شامل شده‌اند و می‌توان آن‌ها را به عنوان ترکیبات غالب در عصاره در نظر گرفت. سایر پیک‌ها با سهم کمتر از ۵ درصد، ترکیبات فرعی به شمار می آیند. در عصاره جلبک سبززیگنما ترکیبات هیدروکربنی و الکانی مانند Dodecane, Tridecane, Pentadecane، Eicosane و .....، که در RTهای پایین تا میانی ظاهر شد که سهمی کمتر از ۲ درصد دارند. چندین استر مانند Oxalic acid esters، Methyl stearate، Methyl linolenate، Eicosadienoic acid, methyl ester-۱۱،۱۴ شناسایی شدند که نشان دهنده حضور اسیدهای چرب و مشتقات آنها است.

جدول ۱- نتایج حاصل از طیف کروماتوگرام عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما.

شماره قله	زمان بازداری (دقیقه)	ارتفاع پیک	مساحت پیک	درصد از مجموع مساحت‌ها	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	شماره CAS
۱	۵۱/۷	۲۰۵۶۳۶	۱۱۸۲۶۸	۱۹/۲۸	Hexadecanoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	۷۲۱۲
۲	۵۶/۸	۴۷۵۳۴	۲۰۵۲۵۹	۳/۳۵	11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	$C_{21}H_{38}O_2$	۲۴۶۳-۰۲-۷
۳	۵۷	۱۳۸۹۶۶	۸۲۹۷۷۹	۱۳/۵۳	Methyl linolenate	$C_{19}H_{32}O_2$	۳۰۱-۰۰-۸
۴	۵۷/۴	۲۱۸۹۰۰	۱۱۶۶۳۳۵	۱۹/۰۱	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	۳۸۴۳۲
۵	۵۷/۹	۲۸۹۵۲	۲۲۸۹۸۳	۳/۷۳	Methyl stearate	$C_{19}H_{38}O_2$	۱۱۲-۶۱-۸
۶	۶۶/۲	۳۸۷۸	۱۷۴۵۳	۰/۲۸	1,2-Dibenzyloxybenzene, 4-oxiranylmethoxy	$C_{23}H_{22}O_4$	۲۷۶۸۸-۶۷-۵
۷	۶۸/۵	۷۹۲۹	۳۷۰۸۰	۰/۶	4-Fluorohistamine	$C_5H_8FN_3$	۴۹۸۷۲-۶۰-۸
۸	۶۸/۹	۱۱۶۱۰	۵۳۹۵۷	۰/۸۸	Benzyl 2,3-anhydro-β-d-ribopyranoside	$C_{12}H_{14}O_4$	*
۹	۶۹/۲	۱۱۰۱۲	۵۳۷۷۸	۰/۸۸	Phthalic acid, bis(6-methylheptyl)ester	$C_{24}H_{38}O_4$	۱۳۱-۲۰-۴
۱۰	۸۲/۳	۷۲۱۱	۴۱۳۷۶	۰/۶۷	α-Tocopherol	$C_{29}H_{50}O_2$	۵۹-۰۲-۹
۱۱	۸۵/۶	۱۰۰۷۴۵	۶۲۷۷۷۳	۱۰/۲۳	γ-Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	۷۲۱۲
۱۲	۸۶	۵۸۱۸۲	۳۷۶۶۴۴	۶/۱۴	Isofucosterol	$C_{29}H_{48}O$	۴۸۱-۱۴-۱



شکل ۵- طیف کروماتوگرام عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما*.

محتوای فیتوشیمیایی

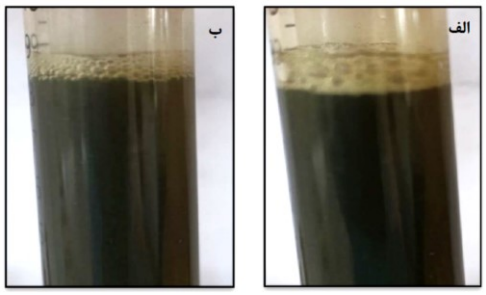
میزان ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما*، از جمله کلروفیل‌های a و b، کاروتنوئیدها، فنل، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و پروتئین در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول۲- میزان ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* (میانگین±انحراف معیار)

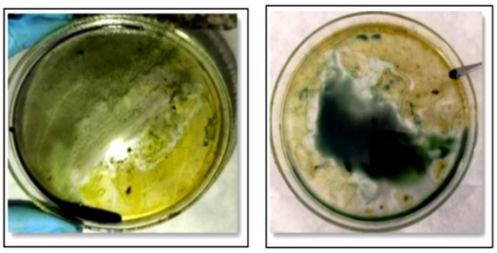
عصاره متانولی	محتوای کلروفیل a (میلی‌گرم بر میلی لیتر)	محتوای کلروفیل b (میلی گرم بر میلی لیتر)	محتوای کاروتنوئید(میلی- گرم بر میلی‌لیتر)	محتوای فنل (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک)	محتوای فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک)	محتوای آنتوسیانین (میلی‌گرم بر میلی لیتر)	محتوای پروتئین (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)
Zygnema sp.	۹/۷۱۲±۰/۰۱۵	۸/۸۱۷±۰/۲۳۷	۰/۱۰۱±۰/۰۷۰	۲۰۳/۶۳۱±۰/۰۱	۴۳/۵۳۲±۰/۳۰	۰/۱۳۰±۰/۰۰۲	۲۹۱/۸۳±۶/۲۳

شناسایی ساپونین، استروئیدی و تری‌پنوئیدی

آزمایش انجام‌شده برای شناسایی ساپونین در عصاره نشان داد که وجود کف پایدار پس از افزودن اسید، تأیید کننده حضور ترکیبات ساپونینی در نمونه می‌باشد. مطابق شکل ۶ این کف پایدار ناشی از خاصیت صابونی مانند ساپونین‌ها بوده و نشانگر مثبت‌بودن تست ساپونین در عصاره است. آزمایش انجام‌شده جهت شناسایی ترکیبات استروئیدی و تری‌ترپنوئیدی نشان‌داد که به دلیل مشاهده رنگ سبز، حضور ترکیبات استروئیدی در نمونهٔ مورد بررسی، تأیید می‌شود. درمقابل، به دلیل عدم مشاهده رنگ قرمز یا بنفش، وجود ترکیبات تری‌ترپنوئیدی در نمونه تأیید نگردید (شکل ۷) .



شکل ۶- مشاهده ترکیب ساپونینی در عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما*. (الف) پس از تکان‌های شدید و قبل از افزودن اسیدکلریدریک، (ب) پس از افزودن اسید کلریدریک و باقی‌ماندن و افزایش‌کف پایدار که خاصیت صابونی‌مانند ساپونین‌ها را نشان می‌دهد.

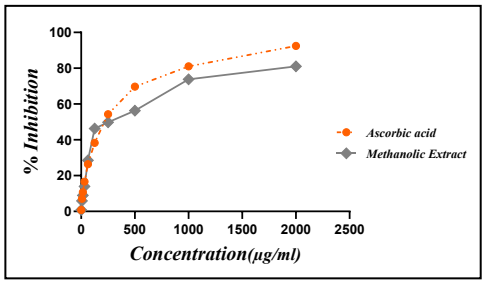


شکل ۷- حضور ترکیبات‌استروئیدی در عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما*. رنگ سبز پس از آزمایش، حضور ترکیبات استروئیدی را نشان می دهد؛ عدم مشاهده رنگ قرمز یا بنفش، تأییدکننده عدم حضور ترکیبات تری‌ترپنوئیدی در نمونه است.

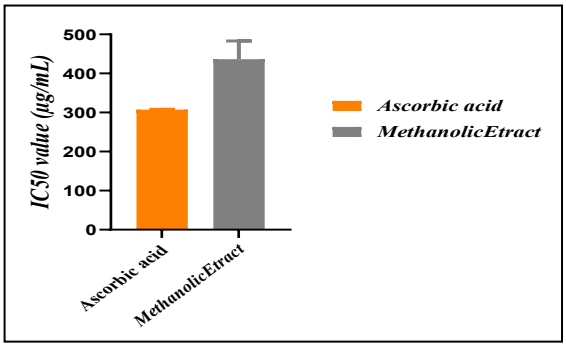
میزان فعالیت آنتی اکسیدانی

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، قدرت مهاری رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد. به‌طور خاص، مطابق شکل ۸ عصاره متانولی در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست ۰/۹۰۳ ± ۸۱ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند، که در مقایسه با آسکوربیک اسید به عنوان

استاندارد مرجع (۹۲درصد) قابل توجه است. غلظت مؤثر برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌ها نیز تعیین شد؛ مطابق شکل ۹ نیز مقدار IC_{50} برای آسکوربیک اسید برابر ۳۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* حدود ۴۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.



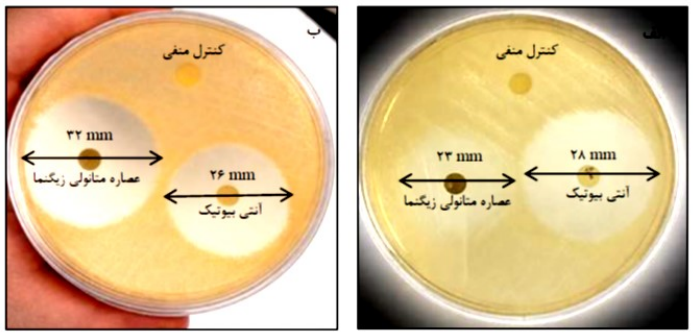
شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در مقایسه با آسکوربیک اسید. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است.



شکل ۹- مقادیر IC_{50} عصاره متانولی جلبک زیگنما و آسکوربیک اسید در آزمون DPPH. مقدار کمتر IC_{50} نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر است. مقدار IC_{50} برای آسکوربیک اسید برابر ۳۰۷ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برای عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* حدود ۴۰۹ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) برآوردشد.

ارزیابی اثر ضدباکتریایی

در این پژوهش، اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* بر رشد باکتری *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به روش استاندارد انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. پس‌از انکوباسیون در دمای‌مناسب، نواحی عدم‌رشد در اطراف دیسک‌ها ظاهر گردید. طبق دستورالعمل‌های استاندارد CLSI، قطر هاله بیش از ۲۱ میلی‌متر در این آزمون نشان‌دهنده‌ی وضعیت حساس محسوب می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون دیسک دیفیوژن، هر دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین حساس بودند، در ناحیهٔ کنترل منفی هیچ گونه هاله‌ای مشاهده نشد، که صحت عملکرد روش آزمایش، عدم آلودگی و پایداری شرایط رشد باکتری را تأیید می‌کند. هم‌چنین عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما توانست هاله‌های مهاری قابل‌مشاهده‌ای در برابر هر دو گونه باکتری ایجاد کند؛ به طوری که میزان مهاررشد عصاره در *S. aureus* بیشتر از *E. coli* بود (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما توسط باکتری های مورد مطالعه. (الف) *E. coli* ، (ب) *S. aureus*.

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های مقاوم به دارو، چالش فزاینده‌ای را برای سلامت جهانی ایجاد می‌کنند. مرکز اروپایی پیشگیری و کنترل بیماری‌ها تخمین می‌زند که مقاومت ضدمیکروبی سالانه منجر به بیش از ۲۵۰۰۰ مرگ در سراسر اروپا می‌شود. برای جلوگیری از افزایش مقاومت باکتریایی جهانی، باید عوامل ضدباکتری با مکانیسم‌های دارویی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌های سنتی توسعه داده شوند. مطالعات آزمایشگاهی در این بررسی، نویدبخش اثربخشی مشابه در داخل بدن هستند[۲]. هم موجودات دریایی و هم موجودات زمینی متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید می‌کنند که آنها را از عفونت‌های باکتریایی محافظت می‌کند. خوشبختانه این متابولیت‌ها علیه بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا که بر انسان‌ها و حیوانات تأثیر می‌گذارند نیز فعالیت دارند. عصاره‌های جلبک دریایی، همراه با عصاره‌های گیاهان زمینی مانند اسطوخودوس و روغن درخت چای، در طول تاریخ به عنوان ضدمیکروب‌های طبیعی و به عنوان دارو در Pharmacognosy مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از آنجایی که موجودات دریایی و زمینی با چالش‌های زیست‌محیطی بسیار متفاوتی روبرو هستند، ویژگی‌های ساختاری و فعالیت دارویی متابولیت‌های آنها بسیار متفاوت است. پیشنهاد شده است که برخی از ترکیبات ضدباکتری دریایی، از موجوداتی مانند جلبک‌ها، اثر ضدباکتریایی بیشتری نسبت به ترکیبات حاصل از منابع زمینی دارند. این امر به تعداد بیشتر سلول‌های باکتریایی در آب دریا در مقایسه با هوا و نیاز به موجودات بی‌حرکت برای جلوگیری از رسوب زیستی سطحی در اقیانوس نسبت داده شده است[۲].

در مطالعه‌ای توسط Wang و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت باکتریواستاتیک و باکتری‌کشی فلوروتانین‌های استخراج‌شده با متانول از جلبک *Ascophyllum nodosum* با تانن‌های قابل هیدرولیز و متراکم از دو درخت، (*Schinopsis balansaei*) *Quebracho* و سماق چینی (*Rhus semialata*)مقایسه شد. چهار سویه از اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) مقاوم به آمپی‌سیلین، کانامایسین و نالیدیکسیک اسید برای اندازه‌گیری مهار در OD 600 استفاده شد. در غلظت تنها ۲۵ گرم در میلی‌لیتر، فلوروتانین‌های *Ascophyllum nodosum* اثرات باکتریواستاتیک را بر روی سه سویه تا ۲۴ ساعت اعمال کردند، پس از آن دو سویه رشد خود را از سر گرفتند. فلوروتانین‌ها در غلظت ۵۰ گرم در میلی‌لیتر در مورد دو سویه و در غلظت ۱۰۰ گرم در میلی‌لیتر در مورد دو سویه دیگر، به طور کامل باکتری‌کش بودند. تانن‌های هیدرولیزپذیر و متراکم‌شده از عصاره‌های درختی در غلظت‌های یکسان در برابر دو سویه از اشریشیا کلی مقایسه شدند. با این حال، تانن‌های متراکم‌شده اثر باکتری‌کشی در برابر هیچ‌کدام از دو سویه اعمال نکردند و فقط به مدت ۶ ساعت فعالیت باکتریواستاتیک در برابر یک سویه داشتند. تانن‌های هیدرولیزپذیر هیچ فعالیت باکتری‌کشی یا باکتریواستاتیکی در برابر هیچ‌کدام از دو سویه نداشتند. سلول‌های اشریشیا کلی تیمار شده و تیمار نشده با میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شدند. ساختار غشایی سلول‌های تیمار نشده صاف و یکدست بود. عملکرد تانن‌ها بر روی دیواره‌های سلولی نمونه‌های تیمار شده، به ویژه در مورد*Ascophyllum nodosum* ، که در آن ساختارهای نامنظم و رسوبات رسوبی متراکم الکترونی قابل مشاهده بودند، آشکار بود. تفاوت‌های قابل توجه نشان داده شده بین تانن‌های جلبک دریایی و خشکی ممکن است به ساختار شیمیایی آنها

نسبت داده شود. اگرچه همه تانن‌ها از گروه‌های فلوروگلوسینول حلقوی تشکیل شده‌اند، تانن‌های قابل هیدرولیز و متراکم زمینی حداکثر سه حلقه دارند، در حالی که فلوروتانین‌های جلبکی تا هشت حلقه دارند. این بدان معناست که فلوروتانین‌ها گروه‌های هیدروکسیل بیشتری دارند که آنها را قادر می‌سازد در شرایط هوازی پراکسید هیدروژن بیشتری تولید کنند. پراکسید هیدروژن برای باکتری‌ها سمی است. گروه‌های هیدروکسیل همچنین می‌توانند با پروتئین‌های روی سطح باکتری پیوندهای هیدروژنی تشکیل دهند و باعث دناتوراسیون بیشتر سلول شوند. اگرچه این مطالعه توسط Wang و همکاران (۲۰۰۹) به وضوح فعالیت مقایسه‌ای ترکیبات ضد باکتریایی جلبک دریایی در مقابل ترکیبات ضد باکتریایی زمینی را نشان می‌دهد، اما مقایسه‌ها و تحقیقات بیشتر در این زمینه با طیف گسترده‌ای از کلاس‌های شیمیایی مورد نیاز است [۱۷].

ترکیبات زیست‌فعال در مراحل مختلف چرخه زندگی جلبک، غلظت‌های متغیری دارند. علاوه بر این، توزیع در هر بخش مجزا از تال، یعنی پایه نگهدارنده، تیغه و ساقه، متفاوت است. نمونه‌برداری از هر بخش از تال و تجزیه و تحلیل گونه‌های مشابه در نقاط مختلف در طول سال، دقت بیشتری را فراهم می‌کند. روشی که ترکیبات ضدباکتریایی جلبکی از زیست‌توده خام استخراج می‌شوند، بر اثربخشی دارویی آنها تأثیر می‌گذارد. روش استخراج و انتخاب حلال بر خواص فیزیکی و شیمیایی عصاره تأثیر می‌گذارد. پروتکل‌های استخراج مختلفی برای بازیابی مواد ضدباکتریایی از جلبک‌های دریایی گزارش شده است. برخی شامل خشک کردن انجمادی، استخراج سوکسله و استفاده از حلال‌های آلی، آنزیم‌ها یا تخمیر باکتریایی هستند. پروتکل‌ها از دماها، زمان‌ها، محدوده‌های pH و غلظت‌های مختلف استخراج استفاده می‌کنند. همه این متغیرها بر اثربخشی محصول ضدباکتریایی نهایی تأثیر می‌گذارند. قطبیت حلال استخراج عمیقاً بر نحوه تعامل عصاره با گروه‌های عاملی روی سطوح باکتریایی تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، بسته به قطبیت حلال مورد استفاده، گروه‌های عاملی استخراج شده ممکن است قطبی آبدوست یا غیرقطبی لیپوفیل باشند. این امر بر توانایی عصاره جلبک برای تأثیر بر غشای سلولی و سایر اجزای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیر می‌گذارد [۲].

در یک مطالعه Moorthi و Balasubramanian (2013) استخراج استون، متانول و کلروفرم به روش سوکسله را در ارزیابی اثربخشی ضدباکتریایی جلبک دریایی قهوه‌ای Sargassum muticum برداشت شده در هند مقایسه کردند. از روش‌های انتشار دیسک برای اندازه‌گیری اثربخشی آن در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی ناشی از غذا مانند سالمونلا پاراتیفی (*Salmonella paratyphi*) ، استافیلوکوکوس اپیدرمیس (*Staphylococcus epidermis*) ، انتروباکتر آئروژنوس (Enterobacter aerogenus) ، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*)، شیگلا فلشنری (*Shigella fleschneri*) ، پروتئوس ولگاریس (*Proteus vulgaris*) ، MRSAو سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella typhimurium*) استفاده شد. در غلظت‌های ۳۰ لیتر بر میلی‌لیتر، عصاره‌های استونی به طور قابل توجهی قوی‌تر از عصاره‌های کلروفرم یا متانول در برابر سالمونلا پاراتیفی، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و شیگلا فلشنری بودند. تجزیه و تحلیل شیمیایی عصاره‌های استونی سارگاسوم موتیکوم وجود تانن‌ها را نشان داد. اثربخشی استون برای استخراج مواد ضد باکتری از جلبک‌های *Sargassum wightii*و *Caulerpa scalpelliformis* قبلاً گزارش شده است و به توانایی استون قطبی در اتصال به فلوروتانین‌های آبدوست در جلبک دریایی نسبت داده می‌شود که همانطور که بحث شد، فعالیت ضد باکتریایی قوی دارند [۱۸].

بازده استخراج نیز تحت تأثیر انتخاب حلال قرار می‌گیرد که به نوبه خود بر اثربخشی ماده ضدباکتری تأثیر می‌گذارد. Rajauria و همکاران (۲۰۱۲) گزارش دادند که ترکیبات مختلف متانول و آب (۲۰ تا ۸۰ درصد) تأثیر قابل توجهی بر بازده ترکیبات پلی فنلی ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی از جلبک قهوه‌ای ایرلندی *Himanthalia elongata* دارند. بیشترین بازده (۶/۸ درصد) با استفاده از متانول ۶۰ درصد، در مقایسه با کمترین بازده (۱/۲ درصد) با استفاده از متانول ۱۰۰ درصد به دست آمد. آزمایش‌های انتشار دیسک و رقت در محیط مایع نشان داد که عصاره متانول ۶۰ درصد با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، قوی‌ترین مهارکننده لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) گرم مثبت و انتروکوک فکالیس (*Enterococcus faecalis*) و سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) گرم منفی است [۱۹].

Cox و همکارانش (۲۰۱۰) همچنین دریافتند که فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های پلی فنلی جلبک‌ها وابسته به حلال است. متانول برای جلبک‌های قهوه‌ای *Himanthalia elongata* ، *Laminaria digitata* و *Saccharina latissima* مؤثرترین بود؛ در حالی که استون

و اتانول برای گونه‌های سبز *Enteromorpha* ، *Spirulina* و گونه‌های قرمز *Palmaria palmata* و *Chondrus crispus* مؤثرتر بودند[۲۰].

بازده عصاره‌گیری متانولی جلبک سبز زیگنما در مطالعه حاضر برابر با ۱۰درصد از وزن خشک نمونه بود. این میزان بازده، در محدوده بازده‌های گزارش شده برای گونه‌های دیگر جلبک سبز مانند *Chlorella* و *Scenedesmus* که معمولاً بین ۵ تا ۱۵درصد متغیر است، قرار می‌گیرد [۲۱]. نوع حلال و درجه قطبیت آن نقش مهمی در میزان استخراج ترکیبات زیست‌فعال دارد، به‌طوری‌که حلال‌های قطبی‌تر، به‌ویژه متانول، توانایی بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نشان می‌دهند. علاوه‌براین، حلال‌ها عمدتاً ترکیباتی با قطبیت مشابه خود را استخراج می‌کنند [۲۲،۲۳]. بنابراین، بازده بالاتر عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما می تواند بیانگر غنای این جلبک از ترکیبات فنولی و سایر متابولیت‌های ثانویه با ماهیت قطبی باشد.

نتایج حاصل از بررسی کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما نشان داد که این جلبک شامل ترکیبات عمده‌ای از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، الکل‌های ترپن و استرهای زیست‌فعال ، از جمله هگزادکانوئیک‌اسیدمتیل‌استر، فیتول، متیل‌لینولنات، گاما–سیتوسترول و ایزوفوکواسترول است، این ترکیبات بیش از ۶۸ درصد کل ترکیبات عصاره را تشکیل می‌دهند که در جدول ۱ نشان داده شده است. این ترکیبات درمطالعات پیشین که برگونه های جلبکی صورت گرفت به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌اند[۲۴]. درواقع داده‌های حاصل از پژوهش حاضر با یافته‌های گزارش شده در عصاره‌های جلبکی مانند *Sargassum muticum* و *Codium fragile* همسو است که نشان داده‌اند ترکیبات زیست‌فعال در جلبک‌ها اثرات ضدمیکروبی و ضدالتهابی دارند. این الگوی ترکیبی نشان‌دهنده غلبه‌ی لیپیدها و مشتقات چربی در عصاره است که مطابق با گزارش‌های پیشین در جلبک‌های سبز است. مقایسه نتایج ما با مطالعه‌ی Taş و همکاران (۲۰۱۵) نشان می‌دهد که در حالی‌که هر دو مطالعه حضور استرها، الکان‌ها و الکل‌های بلندزنجیر را گزارش کرده‌اند، نسبت و تنوع ترکیبات متفاوت است که احتمالاً به تفاوت گونه‌ای، حلال استخراج و شرایط زیست‌محیطی مربوط می‌باشد[۲۵].

نتایج آزمون DPPH به‌وضوح نشان‌داد که عصاره متانولی جلبک سبز *زیگنما* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی و وابسته‌به غلظت است نزدیک‌بودن عملکرد عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما (۸۱ درصد) به یک آنتی‌اکسیدان خالص و شناخته‌شده مانند آسکوربیک اسید (۹۲درصد) ، شاهدی قوی بر پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی جلبک سبز زیگنما است. در واقع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره، منبع غنی از ترکیبات فعال‌زیستی شامل مولکول‌های لیپیدی و نیمه‌قطبی شناسایی شده در آنالیز GC-MS است که قادربه هدایت پروتون یا انتقال الکترون به رادیکال‌های آزاد DPPH و خنثی‌سازی آن‌ها هستند. نتایج مطالعه حاضر با پژوهش‌های پیشین در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های سبز رشته‌ای همسو است. در مطالعه‌ای که بر روی گونه‌های *O. angustistomum* ، *U. variabilis* و *M. pulchella* انجام شد، مشخص گردید که عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های قطبی‌تر از جمله استون، متانول و آب، دارای مقدار بالاتری از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بوده و فعالیت قابل توجهی در مهار رادیکال‌های آزاد از جمله DPPH نشان می‌دهند. همچنین در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌صورت وابسته به غلظت گزارش شد که با نتایج پژوهش حاضر در مورد افزایش درصد مهار رادیکال‌ها با افزایش غلظت عصاره همخوانی دارد. در پژوهش‌های پیشین نیز گزارش شده‌است که عصاره‌های متانولی جلبک‌های سبز به دلیل توانایی بالای متانول در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به حلال‌های کم‌قطب از خود نشان می‌دهند[۲۶]. Nazarudin و همکاران (۲۰۲۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی *H. opuntia* را با آزمون DPPH بررسی کردند و نشان دادند که این عصاره کاهش رادیکال DPPH را در محدودهٔ ۵۶/۲۹ تا ۶۳/۹۱ درصد ایجاد می‌کند. بیشترین کاهش در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با مقدار ۶۳/۶۱ درصد مشاهده شد و مقدار IC_{50} عصاره برابر با ۲۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر برآورد شد. نتایج آن‌ها مؤید ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه این جلبک سبز بود[۱۱]. از آن جایی که جلبک‌های دریایی حاوی ترکیبات زیست‌فعال مانند پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها هستند که می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی داشته باشند. مطالعه‌ای توسط Alghazeer و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که عصاره‌های چند گونه جلبک از ساحل غربی لیبی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است به

طوری که میزان IC_{50} در تست آنتی‌اکسیدانی DPPH درگونه *C. tomentosum* برابر با ۳۵/۳۸±۳۰۰/۱۷ گزارش گردید. این اثر به ترکیبات فنولی و فلاونوئید موجود در عصاره‌ها نسبت داده شد و نشان می‌دهد جلبک‌ها می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای توسعه داروها باشند[۲۷]. Aldbass و همکاران (۲۰۲۱) نیز گزارش دادند که در عصاره متانولی*Cladophora glomerata* ، محتوای کل ترکیبات فنولی ۱/۸ ± ۴۹/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره اندازه‌گیری شده است، که نشان دهنده حضور ترکیبات زیست‌فعال با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در این عصاره می‌باشد. همچنین در این مطالعه گزارش کردند که که در عصاره متانولی*Saussurea lappa* ، بازده استخراج حدود ۹/۵۵ درصد بوده و محتوای کل ترکیبات فنولی حدود ۱/۲ ± ۱۲۲/۸۲ میلی گرم گالیک‌اسید در هر گرم عصاره اندازه‌گیری شده است[۲۸].

Yongkhamcha و Buddhakala (2023)، نشان دادند که عصاره متانولی *Spirogyra neglecta* دارای درصد بالایی از کربوهیدرات و میزان قابل توجهی پروتئین است؛ به‌طوری‌که مقدار کل پروتئین ۴/۵۲ ±۲۱/۶۸ درصد از وزن خشک عصاره (بیشترین مقدار در عصاره پروپیلن گلیکول) و مقدار کل کربوهیدرات ۳/۸۹ ± ۴۷/۳۶ درصد از وزن خشک عصاره (بیشترین مقدار در عصاره متانولی) گزارش گردید[۲۹]. در پژوهش حاضر نتایج فیتوشیمیایی و ترکیبات مغذی عصاره نشان داد که کلروفیل a و b و کلروفیل کل (a+b) و همچنین کاروتنوئیدها در مقادیر قابل توجهی وجود دارند، که می‌تواند نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا عصاره باشد. مقادیر بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با فعالیت ضد میکروبی عصاره در مطالعات قبلی همخوانی دارد. علاوه بر این، میزان پروتئین بالای عصاره ۲۹/۱۸ درصد نشان‌دهنده ارزش غذایی بالای جلبک است و می‌تواند نقش مهمی در تقویت سلامت سلولی و توانایی بازسازی بافت‌ها داشته باشد[۳۰]. ترپن‌ها ترکیباتی هستند که از واحدهای ایزوپرن تکرارشونده، اغلب با گروه‌های جانشین، تشکیل شده‌اند. ترپن‌هایی با فعالیت دارویی با موفقیت از گیاهان خشکی‌زی استخراج شده‌اند. تعدادی از ترکیبات ترپن از جلبک‌ها، مانند بروموفیکولیدهای دی‌ترپن–بنزوات، مانع رشد باکتری‌ها می‌شوند. زانتوفیل‌ها، مانند لوتئین و آستاگزانتین، ترکیبات تتراترپن حاوی اکسیژن هستند که به عنوان رنگدانه‌های جذب نور در گیاهان و جلبک‌ها عمل می‌کنند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها به طور گسترده مستند شده است، اما در برابر باکتری‌ها نیز مؤثر هستند[2] . مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عصاره‌های جلبکی، به‌ویژه جلبک‌های سبز آب شیرین، دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل‌توجهی هستند و شدت این اثر به عواملی مانند گونه جلبک، نوع حلال استخراج و نوع باکتری هدف بستگی دارد [۳۱]. Ahmed و همکاران (۲۰۲۴) نیز اثر ضدباکتریایی دو گونه جلبکی *S. varians* و *R. hieroglyphicum* را بر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بررسی کردند. نتایج نشان‌داد که عصاره‌ها توانایی مهار رشد باکتری‌ها را دارند و R. hieroglyphicum فعالیت قوی‌تری نسبت به S. varians نشان داد. شدت اثر به گونه جلبک، نوع حلال استخراج و نوع باکتری هدف بستگی دارد[۳۲]. Alsalamah و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که نانوذرات اکسید مس سنتز شده با عصاره *Zygnema* sp. کروی و با قطر متوسط حدود ۳۰ نانومتر هستند و اثر ضد باکتریایی قوی دارند. این نانوذرات رشد باکتری‌ها را به‌طور مؤثر مهار کردند؛ به‌گونه‌ای که بیشترین اثر بر *E. faecalis* حدود (۰/۱ ± ۳۷)، *E.coli* (۰/۱ ±۳۶) ، *S. aureus* (۰/۱±۳۲) وS. typhi (۰/۲ ± ۲۷) مشاهده‌شد[۳۳]. در مطالعه حاضر، عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما بر رشد باکتری‌های گرم‌مثبت S. aureus و گرم‌منفی *E. coli* مورد بررسی قرارگرفت. نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که عصاره توانست هاله‌های مهاری قابل‌مشاهده‌ای ایجاد کند؛ به‌طوری که اثر آن نسبت‌به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در E. coli کمتر بود، اما در *S. aureus* حتی بیشتر از آنتی‌بیوتیک مشاهده شد. این تفاوت به ساختار متفاوت دیواره سلولی این دو باکتری مرتبط است. این یافته‌ها با مطالعات قبلی مبنی بر اثر ضدباکتریایی جلبک‌های سبز و ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها، از جمله استرول‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه، همخوانی دارد و نشان‌می‌دهد که جلبک سبز زیگنما می‌تواند به عنوان منبع بالقوه ترکیبات طبیعی ضدمیکروبی، به ویژه در درمان عفونت‌های پوستی، مورد توجه قرار گیرد.

گزارش شده است که اسیدهای چرب آزاد جلبک به عنوان مهارکننده‌های زنجیره انتقال الکترون و فسفوریلاسیون اکسیداتیو طبیعی در غشای سلول‌های باکتریایی عمل می‌کنند. این امر با انتقال انرژی آدنوزین تری فسفات تداخل می‌کند و آنزیم‌هایی مانند ردوکتاز پروتئین حامل انوئیل–آسیل باکتریایی را که برای سنتز اسیدهای چرب در سلول باکتریایی ضروری است، مهار می‌کند. سپس لیز سلول و تشکیل محصولات تخریب پراکسیداسیون و خوداکسیداسیون رخ می‌دهد[۲]. El Shafay و همکارانش (۲۰۱۶) اسیدهای چرب ضد باکتری، سیکلوپنتان استیک اسید و

۱۰،۱۳-اکتادآدینوئیک اسید را به عنوان اجزای اصلی سارگاسوم ولگار (*Sargassum vulgare*) استخراج شده با اتانول و سارگاسوم فوزیفورم (*Sargassum fusiforme*)استخراج شده با دی اتیل اتر شناسایی کردند. از میکروسکوپ الکترونی عبوری برای اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) که با این عصاره‌های جلبک دریایی قهوه‌ای تیمار شده بودند، استفاده شد. دیواره‌های سلولی هر دو باکتری سوراخ شده بودند که منجر به پارگی دیواره سلولی، نشت سیتوپلاسمی، کوچک شدن پروتوپلاسم، واکوئله شدن سیتوپلاسمی، پراکندگی کروماتین، تغییر شکل سلول بیرونی و کاهش اندازه سلول شد[۳۴]. Cermakو همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که اسیدهای چرب بلند زنجیره ضد باکتریایی موجود در میکروجلبک سبز *Planktochlorella nurekis* مهارکننده‌های قابل توجهی برای*Campylobacter jejuni* ، *Escherichia coli*، *Salmonella enterica var. Enteritidis*، *enterica var. Infantis*، *Salmonella* *Arcobacter butzleri*و *Lactobacillus johnsonii* با استفاده از محدوده غلظت سوسپانسیون ۰/۷۵-۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هستند. این مطالعه پیشنهاد کرد که میکروجلبک‌های سبز می‌توانند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی برای جلوگیری از بیماری در دام و طیور و حفظ ایمنی میکروبی محصولات حیوانی در زنجیره غذایی انسان استفاده شوند [۳۵].

فعالیت ضدمیکروبی اسیدهای آمینه به شکل پپتیدهای زنجیره کوتاه یا پروتئین‌های بزرگتر و پیچیده‌تر، در تعدادی از مطالعات اخیر نشان داده شده است. ساختار آمفی‌پاتیک پپتیدها آنها را قادر می‌سازد تا به جایگاه‌های قطبی و غیرقطبی روی غشاهای سیتوپلاسمی باکتری‌ها متصل شوند و در نتیجه در فرآیندهای سلولی و تکثیر اختلال ایجاد کنند. به عنوان مثال، لکتین‌ها گروه متنوعی از پروتئین‌ها هستند که در حیوانات، گیاهان، جلبک‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها وجود دارند. در انسان، آنها عملکردهای بیولوژیکی متعددی از جمله اتصال کربوهیدرات، چسبندگی سلولی، تنظیم پروتئین خون و دفاع ایمنی دارند. توانایی لکتین‌ها در اتصال انتخابی به لیپوپلی‌ساکاریدها، بتاگلوکان‌ها و پپتیدوگلیکان‌ها روی سطح سلول باکتری ها، خواص باکتری‌کشی به آنها می‌دهد، زیرا فرآیندهای طبیعی سلولی مانند جذب مواد مغذی مسدود می‌شوند. چندین گروه عملکردی در این امر دخیل هستند. پیوندهای هیدروژنی بین بخش‌های قطبی اسیدهای آمینه در لکتین‌ها و گروه‌های هیدروکسیل پلی‌ساکاریدها، همراه با برهمکنش‌های واندروالسی، و بسته‌بندی نواحی پلی‌ساکاریدی آبگریز در برابر گروه‌های آروماتیک اسید آمینه در لکتین‌ها تشکیل می‌شوند[2] . Holanda و همکارانش (۲۰۰۵) اثر مهاری عصاره‌های لکتین از جلبک قرمز *Solieria filiformis* را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی و گرم مثبت ارزیابی کردند. در غلظت ۱۰۰۰ گرم در میلی‌لیتر، عصاره رشد گونه‌های گرم منفی*Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterobacter aerogenes*، *Serratia marcescens*، *Salmonella typhi*، *Klebsiella pneumoniae* و گونه‌های *Proteus* را مهار کرد. اعتقاد بر این بود که اتصال لکتین با مانان روشی است که رشد از طریق آن مهار می‌شود. مانان یک پلیمر خطی از مونومر ساکارید مانوز است و در سطح سلولی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد. مانان پس از اتصال به مولکول بزرگ لکتین به عنوان یک هاپتن عمل می‌کند و باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود. با این حال، هیچ مهار رشدی در برابر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) مشاهده نشد، احتمالاً به دلیل جایگاه‌های نامناسب اتصال لکتین‌پلی‌ساکارید روی سطوح سلولی این گونه‌ها است. [۳۶].

استفاده از ترکیبات زیست‌فعال طبیعی در داروسازی به عنوان یک روش مؤثر شناخته شده است. در واقع، عصاره‌های موجودات زنده (گیاهان و حیوانات) و میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، جلبک‌ها، قارچ‌ها) منابع شناخته‌شده‌ای از ترکیبات با خواص بیولوژیکی و درمانی جالب هستند. به عنوان مثال، بیش از ۷۵ درصد از داروهای مورد استفاده برای درمان بیماری‌های عفونی از منابع طبیعی مشتق شده‌اند. از این منظر، نشان داده شده است که جلبک‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای غیر از متابولیت‌های تولید شده توسط موجودات زمینی تولید می‌کنند. بنابراین، آنها به عنوان منبعی از ترکیبات مورد توجه زیست‌پزشکی شناخته شده‌اند [۳۷]. بنابراین، با توجه به مشکلات درمانی فعلی ناشی از وجود سویه‌های مقاوم، شناسایی مولکول(های) فعال می‌تواند یک دیدگاه درمانی بسیار مورد توجه باشد. مطالعات بیشتر برای شناسایی فارماکوفورهای (pharmacophores) مسئول فعالیت

ضدمیکروبی و روشن کردن مکانیسم‌های عملکرد این عصاره‌های جلبکی مورد نیاز است. در واقع، تعدادی از ترکیبات با ویژگی‌های دارویی جالب در موجودات دریایی کشف شده‌اند و تحقیقات در این زمینه در حال انجام است. به طور قابل توجهی، میکروجلبک‌های دریایی و آب شیرین به عنوان منبع غنی از ترکیبات شیمیایی متنوع با کاربرد بالقوه به عنوان ترکیبات زیست فعال و عوامل ضدمیکروبی شناخته می‌شوند. بنابراین، زیست‌توده مشتق‌شده از ریزجلبک‌ها منبعی از ترکیبات شیمیایی ارزشمند محسوب می‌شود که می‌تواند در تغذیه انسان و دام، کشاورزی و صنایع دارویی و آرایشی کاربرد داشته باشد. بنابراین، توسعه ابزارهای بیوتکنولوژیکی برای اطمینان از تأمین زیست‌توده جلبکی با کیفیت و کمیت کافی برای برآوردن تقاضای رو به رشد مطلوب است. در آسیب‌شناسی انسانی، مقاومت مکرر به آنتی‌بیوتیک‌ها که در درمان چندین بیماری عفونی مشاهده می‌شود، چالشی برای داروسازی مدرن است. بر اساس آنچه در بالا گزارش شد و با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های باکتریایی، افزایش موارد عفونت‌های بیمارستانی و در نتیجه افزایش درخواست برای داروهای ضدمیکروبی جدید برای درمان بیماری‌های عفونی، تحقیق در مورد داروهای ضدمیکروبی مشتق‌شده از جلبک‌ها ممکن است در آینده‌ای نزدیک یک پشتوانه درمانی ارزشمند باشد که چشم‌اندازهای جدیدی را برای استفاده از منابع دارویی جدید و هنوز استفاده نشده باز می‌کند [۳۷].

نتیجه گیری نهایی

عصاره متانولی جلبک سبز زیگنما حاوی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، کاروتنوئیدی، کلروفیل و مشتقات لیپیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی قابل توجه است و بیشترین اثر مهاری را علیه *S. aureus* نشان داد. این مطالعه برای نخستین بار ترکیب شیمیایی و فعالیت زیستی عصاره متانولی جلبک زیگنما از زیستگاه‌های طبیعی شمال ایران را به‌طور جامع بررسی کرده و نشان می‌دهد که این جلبک می‌تواند منبعی طبیعی از ترکیبات زیست‌فعال با پتانسیل کاربرد در صنایع دارویی و درمانی باشد. با این حال، نتایج محدود به آزمایش‌های in vitro بوده و بررسی طیف گسترده‌تری از میکروارگانیسم‌ها، اثرات وابسته به غلظت و مطالعات in vivo برای تأیید پتانسیل درمانی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی عمیق خود را از دانشکده علوم پایه- دانشگاه گیلان بابت فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی، زیرساخت‌های پژوهشی و حمایت علمی در طول انجام این تحقیق ابراز می‌دارند.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: مهرنوش صحرائی (نویسنده اول)، کارهای آزمایشگاهی، فراهم آوردن داده‌ها، تحلیل داده‌ها و نگارش اولیه; فاطمه مرادی(نویسنده دوم)، ارائه طرح پژوهش و نگارش اولیه; محمودرضا آقامعالی (نویسنده سوم) استاد راهنما و مسئول پروژه، راهنمایی‌های علمی و تصحیح نهایی مقاله.

منابع

[1] Al-Abboodi, A. K. A., Al-Rubiaee, G. H., & Zaki, N. H. (2018). Effects of green algae, Chlorella Vulgaris, extracts and its bioactive substances on the biofilm-producing microorganism, Internatinal Journal of Research in Pharmaceutical Science , 9(1), 165-173.

[2] Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. Marine drugs, 14(4), 81.

[3] Minhas, L. A., Kaleem, M., Farooqi, H. M. U., Kausar, F., Waqar, R., Bhatti, T., ... & Mumtaz, A. S. (2024). Algae-derived bioactive compounds as potential pharmaceuticals for cancer therapy: A comprehensive review. Algal Research, 78, 103396.

[4] Moulazadeh, A., Ranjbar, R., Dakhili, A. A., Keshavarzi, A., Karimzadeh, F., Rahnavard, M., & NAJAFIPOUR, S. (2021). Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and cytotoxic effects of Ulva lactuca and Hypnea musiformis marine algae on MDA-MB-468 cell line.

[5] Husni, A., Gazali, M., Nurjanah, N., Syafitri, R., Matin, A., & Zuriat, Z. (2024). Cytotoxic activity of green seaweed Halimeda tuna methanolic extract against lung cancer cells. Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science, 4(1), 16-29.

[6] Baghel, R. S., Choudhary, B., Pandey, S., Pathak, P. K., Patel, M. K., & Mishra, A. (2023). Rehashing our insight of seaweeds as a potential source of foods, nutraceuticals, and pharmaceuticals. Foods, 12 (19), 3642.

[7] Trumhová, K., Klimešová, V., & Pichrtová, M. (2023). Seasonal dynamics of Zygnema (Zygnematophyceae) mats from the Austrian alps. Microbial Ecology, 86(2), 763-776.

[8] Long, C. E. (2021). Effects of light intensity on the morphology, growth rate and phenolic content of Zygnema.

[9] Fitzek, E., Orton, L., Entwistle, S., Grayburn, W. S., Ausland, C., Duvall, M. R., & Yin, Y. (2019). Cell wall enzymes in Zygnema circumcarinatum UTEX 1559 respond to osmotic stress in a plant-like fashion. Frontiers in plant science, 10, 732.

[10] Chi-Ming Yang, Kuo-Wei Chang, Ming-Horng Yin, and Hsu-Men Huang. "Methods for the Determination of the Chlorophylls." Taiwania 43, no. 2 (1998): 116-122.

[11] Nazarudin, M. F., Yasin, I. S. M., Mazli, N. A. I. N., Saadi, A. R., Azizee, M. H. S., Nooraini, M. A., ... & Fakhrulddin, I. M. (2022). Preliminary screening of antioxidant and cytotoxic potential of green seaweed, Halimeda opuntia (Linnaeus) Lamouroux. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(4), 2698-2705.

[12] Ferdous, U. T., Nurdin, A., Ismail, S., & Yusof, Z. N. B. (2023). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of crude extracts from marine Chlorella sp. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 47, 102551.

[13] Du, T., Niu, J., Su, J., Li, S., Guo, X., Li, L., ... & Kang, J. (2018). SmbHLH37 functions antagonistically with SmMYC2 in regulating jasmonate-mediated biosynthesis of phenolic acids in Salvia miltiorrhiza. Frontiers in plant science, 9, 1720.

[14] Kobayashi, Naoko, Eric A. Noel, Austin Barnes, Andrea Watson, Julian N. Rosenberg, Galen Erickson, and George A. Oyler. "Characterization of three Chlorella sorokiniana strains in anaerobic digested effluent from cattle manure." Bioresource technology 150 (2013): 377-386.

[15] Wulandari, D. D., Pasaribu, Y. P., Fakurazi, S., Fadlan, A., & Santoso, M. (2025). Untargeted Metabolomics Profiling of Ethanolic Extract of Garcinia microphylla Merr. Stem Bark and Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities.

[16] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis, 6(2), 71-79

[17] Wang, Y., Xu, Z. B. S. J., Bach, S. J., & McAllister, T. A. (2009). Sensitivity of Escherichia coli to seaweed (Ascophyllum nodosum) phlorotannins and terrestrial tannins. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 22(2), 238-245.

[18] Moorthi, P.V.; Balasubramanian, C. Antimicrobial properties of marine seaweed, Sargassum muticum against human pathogens. J. Coast. Life Med. 2015, 3, 122–125.

[19] Rajauria, G.; Jaiswal, A.K.; Abu-Ghannam, N.; Gupta, S. Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed Himanthalia elongata from western coast of Ireland. J. Food Biochem. 2012, 37, 322–335.

[20] Cox, S.; Abu-Ghannam, N.; Gupta, S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. Int. Food Res. J. 2010, 17, 205–220.
[21] Chen, Q., Zhang, L., Han, Y., Fang, J., & Wang, H. (2020). Degradation and metabolic pathways of sulfamethazine and enrofloxacin in Chlorella vulgaris and Scenedesmus obliquus treatment systems. Environmental Science and Pollution Research, 27(22), 28198-28208.
[22] Emu, S. A., Dulal, M. A., Kali, T. D., Chadni, M. S., Rasul, M. G., Mondal, M. N., ... & Shah, A. A. (2023). Effects of extracting solvents on phytochemical, antioxidant, and antibacterial activity of some seaweeds from the Bay of Bengal offshore Island. Food and Humanity, 1, 1157-1166.
[23] Wakeel, A., Jan, S. A., Ullah, I., Shinwari, Z. K., & Xu, M. (2019). Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of Isatis tinctoria. PeerJ, 7, e7857.
[24] Salih, R., Bajou, K., Shaker, B., & Elgamouz, A. (2023). Antitumor effect of algae silver nanoparticles on human triple negative breast cancer cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 168, 115532.
[25] Taş, B., Ertürk, Ö., Yılmaz, Ö., Çol Ayvaz, M., & Ertürk, E. Y. (2015). Chemical components and biological activities of two freshwater green algae from Ordu, Turkey/Türkiye'nin Ordu ilinden iki tatlı su yeşil alglerinin kimyasal bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri. Turkish Journal of Biochemistry, 40(6), 508-517.
[26] Sruthy, E. S., & Baiju, E. K. C. (2025). Green treasures: phytochemical screening and antioxidant potential of freshwater species of Oedogonium, Ulothrix and Mougeotia (Chlorophyceae). Applied Phycology, 6(1), 74-95.
[27] Alghazeer, R., Enaeli, M., & Howell, N. K. (2016). Anticancer and antioxidant activities of some algae from western Libyan coast, preprints.org,1-24.
[28] Aldbass, A., Amina, M., Al Musayeib, N. M., Bhat, R. S., Al-Rashed, S., Marraiki, N., ... & El-Ansary, A. (2021). Cytotoxic and anti-excitotoxic effects of selected plant and algal extracts using COMET and cell viability assays. Scientific Reports, 11(1), 8512.
[29] Yongkhamcha, B., & Buddhakala, N. (2023). Phytochemical compositions, nutritional contents, cytotoxicity and anti-inflammatory activity of different extracts from Spirogyra neglecta (Hassall) Kützing. Trends in Sciences, 20(4), 6528-6528.
[30] Jacobsen, C., Sørensen, A. D. M., Holdt, S. L., Akoh, C. C., & Hermund, D. B. (2019). Source, extraction, characterization, and applications of novel antioxidants from seaweed. Annual Review of Food Science and Technology, 10(1), 541-568.
[31] Kumar, S. M., Liu, S., Lu, H., Zhang, H., Zhang, P. J., Gimotty, P. A., ... & Xu, X. (2012). Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. Oncogene, 31(47), 4898-4911.
[32] Ahmed, S. M., Hameed, H., Tariq, M., Hameed, A., Sharif, M. S., Al Farraj, D. A., ... & Waheed, A. (2024). Symbiotic Synergies: A Comprehensive Analysis of Antibacterial Potency, Antioxidant Proficiency, and Phytochemical Composition in Rhizoclonium hieroglyphicum and Spirogyra varians from Distinct Aquatic Habitats.
[33] Alsalamah, S. A., Alghonaim, M. I., Bakri, M. M., & Abdelghany, T. M. (2024). Zygnema sp. as creator of copper oxide nanoparticles and their application in controlling of microbial growth and photo-catalytic degradation of dyes. Applied Biological Chemistry, 67(1), 47.
[34] El Shafay, S.M.; Ali, S.S.; El-Sheekh, M.M. Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. Egypt. J. Aquat. Res. 2016, 42, 65–74.
[35] C˘ ermák, L.; Pražáková, Š.; Marounek, M.; Skr˘ivan, M.; Skr˘ivanová, E. Effect of green alga Planktochlorella nurekis on selected bacteria revealed antibacterial activity in vitro. Czech J. Anim. Sci. 2015, 60,427–435.
[36] Holanda, M.L.; Melo, V.M.M.; Silva, L.M.C.M.; Amorim, R.C.N.; Pereira, M.G.; Benevides, N.M.B. Differential activity of a lectin from Solieria filiformis against human pathogenic bacteria. Braz. J. Med. Biol. Res. 2005, 38, 1769–1773.
[37] Pane, G., Cacciola, G., Giacco, E., Mariottini, G. L., & Coppo, E. (2015). Assessment of the antimicrobial activity of algae extracts on bacteria responsible of external otitis. Marine drugs, 13(10), 6440-6452.

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume14, Issue4, Winter 2026
Pages: 312-330

Investigation of the Antioxidant and Antibacterial Activities of Phytochemical Compounds in *Zygnema* Green Algae Extract from the Aquatic Habitat of Northern Iran

Mehrnoush Sahraei Roudabadi[1], Fatemeh Moradi[2], MahmoudReza AghaMaali[3]*

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3-Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

A B S T R A C T

Microalgae are recognized as promising sources for the development of pharmaceutical compounds and the discovery of natural antibiotics to combat antibiotic resistance, due to their ability to produce a wide range of bioactive metabolites. However, despite limited reports on the biological activities of microalgae, comprehensive and systematic data regarding the phytochemical composition and the antioxidant and antibacterial activities of the green alga *Zygnema*, particularly in its natural habitats in northern Iran, remain insufficient. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity using the DPPH method and the antibacterial activity of phytochemical compounds in the methanolic extract of the green alga *Zygnema* collected from aquatic habitats in northern Iran against two common human pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative), using the agar well diffusion method. Phytochemical screening and GC–MS analysis showed that the methanolic extract of *Zygnema* contained hexadecanoic acid methyl ester, methyl linolenate, phytol, gamma-sitosterol, and isofucosterol, as well as phenolic, flavonoid, carotenoid, chlorophyll, and lipid-derived compounds, exhibiting strong antioxidant activity (81%). Antibacterial evaluation revealed that the methanolic extract showed the highest inhibitory effect against *S. aureus* with a maximum inhibition zone of 32 mm, while an inhibition zone of 23 mm was observed against *E. coli*. In conclusion, due to the presence of effective bioactive compounds, the methanolic extract of the green alga *Zygnema* exhibits significant antioxidant and antibacterial activities and may be considered a promising multi-target natural agent with potential application in therapeutic strategies.

KEYWORDS: *Zygnema* algae, Bioactive compounds, Antioxidant, Antibacterial.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received:
2026/12/21
Revised:2026/01/10
Accepted:
2026/02/19

ePublished:
2026/03/06

* Corresponding Author:
Email address: aghamaali@guilan.ac.ir
Tel: 09111832094
© Published by Tarbiat Modares University
ISSN: 2322-5513