

Antibacterial properties of the organic extract of the brown alga *Cystoseira trinodis* and the green alga *Halimeda tuna* of the Oman Sea against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*

Abdolrahman Mollazehi Sabet¹, Mostafa Ghaffari^{2*}, Ali Taheri², Yosef Arish³

¹ M.Sc. student, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

² Associate Professor, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

³ Ph.D. student, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Received: 4 June 2021 Accepted: 9 December 2021

Abstract

Background and Aim: Resistance to multiple drugs during antibiotic treatment is a new problem. According to research, seaweed extracts have antimicrobial properties. The aim of this study was to investigate the antibacterial properties of organic extracts of *Cystoseira trinodis* (brown algae) and *Halimeda tuna* (green algae) of the Oman Sea on *E. coli*, *L. monocytogenes* and *P. aeruginosa*.

Methods: The algae were dried and the extraction was performed by sonication with ethyl acetate solvent. Antibacterial effects were determined by disk agar diffusion methods, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by microdilution method and the minimum lethal concentration (MBC) was determined by purplate method.

Results: The antibiotics gentamicin, ampicillin and neomycin showed a significant difference with most of the extracts and had more inhibitory power ($P < 0.05$). Ethyl acetate extract of *C. trinodis* against *P. aeruginosa* did not show a significant difference with neomycin antibiotic in the ratio of 1.5 w/v with the diameter of the growth inhibition zone of 11.91 mm ($p < 0.05$). The diameter of the growth inhibition zone of this extract against *E. coli* was 10.33 mm. The diameter of the growth inhibition zone of *H. tuna* against *E. coli* and *P. aeruginosa* was 12.01 and 11.3 mm, respectively. MIC of 3.08 mg/ml for *C. trinodis* extract and MBC of 9.75 mg/ml for *H. tuna* extract was found against *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* showed the highest susceptibility to extracts among the three bacteria and *L. monocytogenes* showed no susceptibility to extracts.

Conclusion: Ethyl acetate extract of brown algae *C. trinodis* has an antibacterial effect against *P. aeruginosa*; equivalent to the antibiotic neomycin and ethyl acetate extract of *H. tuna* algae has a lethal effect against *P. aeruginosa*.

Keywords: Brown Algae, Green Algae, Antibacterial Properties, Oman Sea.

*Corresponding author: Mostafa Ghaffari, Email: mgmostafaghaffari@gmail.com
Address: Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

خواص ضد باکتریایی عصاره آلی جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis* و جلبک سبز *Halimeda tuna* دریای عمان بر باکتری‌های *Listeria*، *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* و *monocytogenes*

عبدالرحمان ملازهی ثابت^۱، مصطفی غفاری^{۲*}، علی طاهری^۲، یوسف اریش^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۲ دانشیار گروه مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۳ دانشجوی دکتری، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۳/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۹/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت در برابر داروهای متعدد در طول درمان آنتی بیوتیکی مشکل جدیدی است. بر اساس تحقیقات، عصاره‌های جلبک دریایی دارای خواص ضد میکروبی هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره آلی جلبک‌های *Cystoseira trinodis* و *Halimeda tuna* دریای عمان بر باکتری‌های *E. coli*، *L. monocytogenes* و *P. aeruginosa* بود.

روش‌ها: جلبک‌ها خشک گردید و عصاره‌گیری به روش امواج فراصوت با حلال اتیل استات انجام شد. اثرات ضدباکتریایی به روش‌های انتشار در آگار به وسیله دیسک، روش میکرودايلوشن برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و روش پورپلیت برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) انجام شد.

یافته‌ها: مقایسه آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، آمپی‌سیلین و نتومایسین با اکثر عصاره‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد و از قدرت مهارکنندگی بیشتری برخوردار بودند ($P < 0.05$) (عصاره اتیل استاتی جلبک *C. trinodis* علیه باکتری *P. aeruginosa* با آنتی بیوتیک نتومایسین در نسبت ۱ w/v به ۵ با قطر هاله عدم رشد ۱۱/۹۱ میلی‌متر اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$). قطر هاله عدم رشد این عصاره علیه *E. coli* ۱۰/۳۳ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد عصاره اتیل استاتی جلبک *H. tuna* علیه *E. coli* و *P. aeruginosa* به ترتیب ۱۲/۰۱ و ۱۱/۳ میلی‌متر بود. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) ۳/۰۸ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره *C. trinodis* و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ۹/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر در عصاره *H. tuna* علیه *P. aeruginosa* دیده شد. بیشترین حساسیت در برابر عصاره‌ها را در میان سه باکتری، باکتری *P. aeruginosa* نشان داد و باکتری *L. monocytogenes* در برابر عصاره‌ها هیچ گونه حساسیتی نشان نداد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* علیه باکتری *P. aeruginosa* معادل آنتی بیوتیک نتومایسین اثر ضدباکتریایی دارد و عصاره اتیل استاتی جلبک *H. tuna* علیه *P. aeruginosa* اثر کشندگی دارد.

کلیدواژه‌ها: جلبک قهوه‌ای، جلبک سبز، خواص ضد باکتریایی، دریای عمان.

*نویسنده مسئول: مصطفی غفاری. پست الکترونیک: mgmostafaghaffari@gmail.com

آدرس: گروه مهندسی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

مقدمه

جلبک‌های دریایی با دارا بودن خواص منحصر به فرد مورد توجه علوم دارویی، پزشکی و صنایع غذایی هستند (۱،۲). از جلبک‌ها برای تولید صنعتی برخی ترکیبات همچون آلزینات، کاراگینان و آگار نیز استفاده می‌شود (۳). همچنین برخی از ترکیبات متابولیک زیست‌فعال ریزجلبک‌ها و جلبک‌ها مثل برومینات‌ها (Brominates)، ترکیبات آروماتیک، نیتروژن‌های ناجور حلقه (Nitrogen heterocyclic)، استرول‌ها، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ها بسیار مورد توجه می‌باشند (۴). از زمان‌های بسیار دور جلبک‌ها و ریزجلبک‌ها به‌عنوان دارو استفاده می‌شدند و تحقیقات گسترده‌ای بر ارزیابی خواص درمانی این ارگانیزم‌های یوکاریوتی صورت گرفته است (۵). برای مثال خواص آنتی‌اکسیدان جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinousa* (۶)، خواص ضدتوموری عصاره آبی *Sargassum micracanthum* و *Gracilaria corticata* (۷،۸)، خواص ضدباکتری *baccata* *Cystoseira* (۹)، فعالیت ضدپروتوزوا در ترکیبات جلبک قرمز *Aspuragopsis* علیه *Leishmania* (۱۰) و خواص ضدویروسی *Symphyodadia latiuscula* (۱۱) از جمله این مطالعات می‌باشد. امروزه، به دلیل تغییر فرم مقاومتی باکتری‌ها و مقاوم شدن آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها، گرایش به جایگزینی آنها با آنتی‌بیوتیک‌های نوین وجود دارد (۱۲). جلبک‌ها منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند و تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال در صنایع دارویی تبدیل شوند (۱۳). جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis* متعلق به خانواده *Phaeophyceae* می‌باشد و در سواحل جنوبی ایران مخصوصاً مناطق ساحلی بوشهر و خلیج فارس قابلیت رشد دارد (۵). این جلبک حاوی ترکیبات شیمیایی گوناگونی است، برای مثال پلی‌فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها، مروت‌پروئیدها و ترپنوئیدها گروه‌های شیمیایی عمده در جلبک‌های قهوه‌ای به شمار می‌آیند (۱۴). در مطالعاتی نیز مشخص شده ترپنوئیدها و استروئیدهای استخراج شده از گونه *Cystoseira* دارای خواص ضدپاتوژنی هستند (۱۵). خانواده *Cystoseira* حدوداً شامل ۲۹۴ گونه است (۱۶). گسترش و پراکندگی این خانواده در سطح دنیا چیزی حدود ۸۰٪ می‌باشد که از سواحل مدیترانه تا سواحل اقیانوس اطلس را در بر می‌گیرد (۱۷). جلبک سبز *Halimeda tuna* از خانواده *Halimedecae* می‌باشد که ۴۴ گونه دارد و در نقاط حاره‌ای و بخش‌های دارای ریف‌های مرجانی رشد می‌کند (۱۸).

باکتری *E. coli* ساکن طبیعی روده اکثر حیوانات، همچنین انسان‌ها است. گاهی *E. coli* می‌تواند باعث طیف گسترده‌ای از بیماری‌های روده‌ای و خارج روده‌ای مانند اسهال، عفونت‌های

دستگاه ادراری، سپتی سمی و مننژیت نوزادان شود (۱۹). باکتری *Pseudomonas aeruginosa* یک باکتری گرم منفی و دارای سازگاری گسترده متابولیک است که آنها را قادر به رشد در طیف وسیعی از محیط‌ها می‌کند. همچنین یک پاتوژن فرصت طلب بسیار موفق است که باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از عفونت‌های حاد و مزمن شده است (۲۰). باکتری *Listeria monocytogenes* همه جا حضور داشته و در تمام مراحل زنجیره غذایی ممکن است یافت شود. *L. monocytogenes* بر انسان و حیوان تأثیر می‌گذارد (۲۱). لیستریوزیس در حیواناتی مانند پرندگان، گوسفند، اسب و خوک باعث بیماری شده و سپتی سمی، آنسفالیت، مننژیت، مننگوآنسفالیت و بیماری‌های گوارشی ایجاد می‌کند (۲۲).

عصاره جلبک‌های دریایی دارای خواص ضد باکتریایی است که می‌توان به تحقیقات منتشر شده عصاره جلبک قهوه‌ای *Sargassum cristaeifolium* و *Dictyota cervicornis* علیه باکتری‌های *E. coli*، *L. monocytogenes* و *P. aeruginosa* عصاره جلبک سبز *Halimeda sp.* علیه پاتوژن‌های میکروبی *S. aureus* و *E. coli*، *P. aeruginosa* و عصاره جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderiae* و *Sargassum angustifolium* علیه برخی پاتوژن‌های انسانی اشاره نمود (۲۳-۲۵). با توجه به گستردگی پراکنش جلبک‌های دریایی در دریای عمان و نیاز به بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های آلی جلبک‌های دریایی بر باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر ضد باکتریایی عصاره اتیل استاتی جلبک‌های *C. trinodis* و *H. tuna* علیه برخی باکتری‌های پاتوژن انجام گرفت.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

برای انجام این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا نمونه‌برداری از جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* و جلبک سبز *H. tuna* از ایستگاه‌های جزر و مدی سواحل صخره‌ای و شنی رمین در چابهار انجام شد (شکل-۱ و جدول-۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده در کیسه‌های نایلونی حاوی مقدار کمی آب دریا نگهداری شد و سپس به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلانی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل گردید. ابتدا جلبک‌ها کاملاً شسته و سپس زیر سایه به مدت ۵-۱۰ روز خشک و توسط آسیاب برقی کاملاً پودر شدند.

جدول-۱. مختصات جغرافیایی ایستگاه‌های مورد مطالعه		
ایستگاه	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)
ایستگاه ۱	۲۵°۲۱'۲۲"	۶۰°۱۶'۰۷"
ایستگاه ۲	۲۵°۱۹'۵۵"	۶۰°۱۵'۱۳"

سانتی‌گراد تعیین گردید. قطر این هاله اندازه‌گیری و نتایج میانگین ۳ بار تکرار محاسبه شدند. لازم به ذکر است که در کنترل منفی از حلال دی‌متیل سولفو کساید و از آنتی‌بیوتیک نئومایسین، جنتامایسین و آمپی‌سیلین نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۲۸).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشنده

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشنده (MBC Minimum bactericidal concentration)، از روش اصلاح شده مایکروداپلوشن استفاده شد. در این روش غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، درصد عصاره‌های جلبک در محیط مولر-هینتون براث تهیه گردید. به طوری که حجم نهایی برابر با ۲ میلی‌لیتر بود. سپس از سوسپانسیون باکتری، مقدار ۲۰ میکرولیتر به هریک از لوله‌ها اضافه گردید و بلافاصله عمل شمارش باکتری صورت گرفت تا تعداد اولیه باکتری‌ها در زمان صفر در واحد حجم بدست آید. سپس تمام لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از این مدت با مشاهده لوله‌های فاقد کدورت MIC تعیین گردید. MIC عبارت است از حداقل غلظتی از عصاره که در آن کدورت حاصل از رشد دیده نمی‌شود. به منظور تعیین MBC، به روش پور پلیت از لوله‌های فاقد کدورت کشت تهیه شد و تعداد باکتری‌های زنده شمارش گردید. MBC عبارتست از حداقل غلظتی که در آن کاهش تعداد باکتری‌ها بیشتر از یک هزارم تعداد باکتری‌ها در زمان صفر باشد (۲۹).

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی دانکن (Duncam Multiple Range Test) انجام شد. تمامی مقادیر به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است.

نتایج

یافته‌های آزمون حساسیت به روش انتشار دیسک عصاره اتیل استاتی در جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* و جلبک سبز *H. tuna* بر باکتری‌های *E. coli* و *P. aeruginosa* در نمودارهای ۱ تا ۴ ارائه شده است. لازم به ذکر است که عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* و جلبک سبز *H. tuna* بر باکتری *L. monocytogenes* هیچ گونه تأثیری نشان نداد.

بر اساس نتایج به دست آمده، نسبت w/v ۱۵:۱ عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* با قطر هاله عدم رشد $10/33 \pm 1/16$ میلی‌متر بیشترین تأثیر را علیه باکتری *E. coli* داشت. کمترین مقدار تأثیر نیز در نسبت w/v ۱۰:۱ با هاله عدم



شکل-۱. موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های مورد مطالعه

عصاره‌گیری با امواج فراصوت

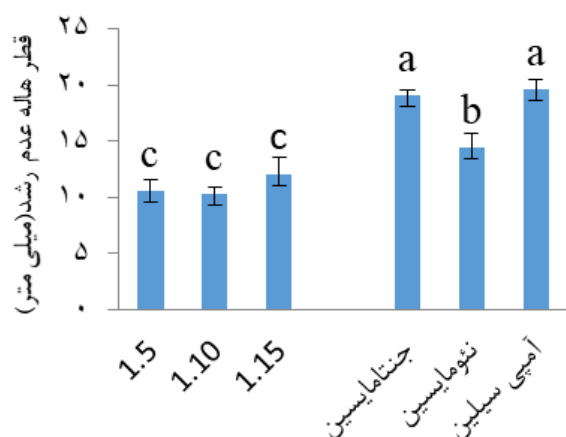
عصاره‌گیری با هموژنایزر اولتراسونیک انجام شد. استخراج با نسبت جلبک به حلال (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۵) با استفاده از حلال اتیل استات انجام شد. عصاره‌گیری توسط دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک (فناوری ایرانیان پژوهش نصیر، ایران) برای ۱۰ دقیقه با قدرت ۵۰ وات و فرکانس ثابت ۳۰ کیلوهرتز و حداکثر دمای ۲۷ درجه سانتیگراد انجام گرفت (۲۶). عصاره‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به دست آمده توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر و در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۲۷).

تهیه سویه‌های باکتری، کشت اولیه و آزمون انتشار دیسک

سویه‌های باکتریایی *E. coli*، *L. monocytogenes* و *P. aeruginosa* از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. از تمام سویه‌های باکتریایی با روش خطی پلیت تهیه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا باکتری‌ها رشد کنند. سپس در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله از پلیت کشت باکتری، تک کلونی برداشته و به لوله‌های حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث انتقال داده شدند. جهت رشد باکتری، لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. غلظت هر نمونه بر اساس کدورت نیم مک‌فارلند در حدود $10^8 \times 1/5$ واحد کلونی باکتری در میلی‌لیتر تنظیم شد (۲۸).

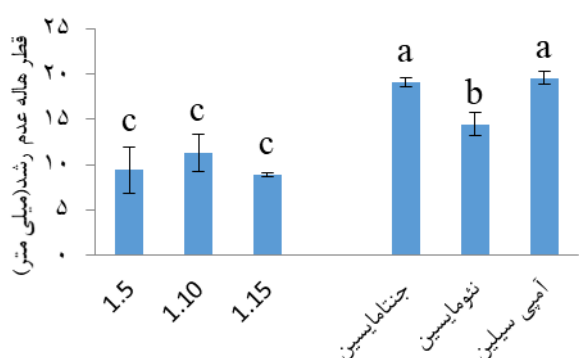
برای بررسی اثرات ضد باکتریایی از آزمون حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار دیسک استفاده گردید. پس از تلقیح باکتری روی محیط آگار، دیسک‌های آماده بلانک به ظرفیت ۲۰ میکرولیتر به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متری از یکدیگر و از لبه پلیت به وسیله پنس استریل به دقت روی سطح آگار قرار گرفتند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از عصاره‌های فیلتر شده با غلظت مختلف تهیه شد و به دقت به دیسک‌های بلانک تزریق گردید. قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه

عدم رشد با $1/01 \pm 10/06$ میلی‌متر تاثیر آنتی باکتریایی علیه پاتوژن *E. coli* در نسبت ۵:۱ w:v مشاهده گردید. نتایج آماری تاثیر قطر هاله عدم رشد بر روی پاتوژن *E. coli* به ترتیب در سه نسبت ۵:۱، ۱۰:۱ و ۱۵:۱ نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$). بین نتومايسين، جنتاميسين و آمپي سيلين و نسبت‌های مختلف عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0/05$) (نمودار-۳).



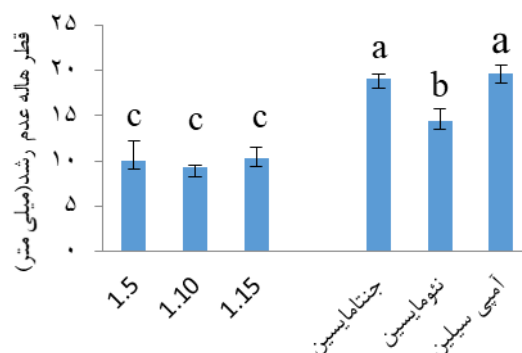
نمودار-۳. اثر ضدباکتری عصاره ایتیل استاتی جلبک *H. tuna* علیه باکتری *E. coli*. حروف غیرهمسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

اثر ضدباکتری عصاره ایتیل استاتی جلبک *H. tuna* علیه باکتری *P. aeruginosa* نیز مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین قطر هاله عدم رشد در نسبت ۱۰:۱ w:v با مقدار $11/30 \pm 2/02$ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد در نسبت ۱۵:۱ w:v با مقدار $8/90 \pm 0/26$ میلی‌متر ثبت گردید. تاثیر قطر هاله عدم رشد بر روی پاتوژن به ترتیب در سه نسبت ۵:۱، ۱۰:۱ و ۱۵:۱ نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$). همچنین بین نتومايسين و نسبت‌های مختلف و جنتاميسين، آمپي سيلين اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p > 0/05$) (نمودار-۴).



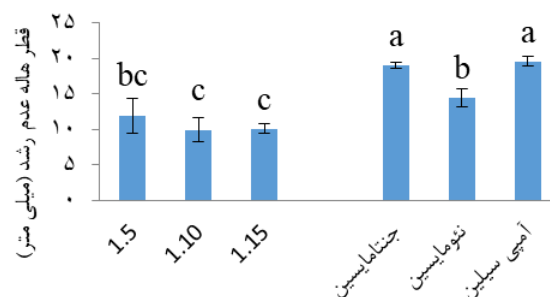
نمودار-۴. اثر ضدباکتری عصاره ایتیل استاتی جلبک *H. tuna* علیه باکتری *P. aeruginosa*. حروف غیرهمسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

رشد $9/29 \pm 0/20$ میلی‌متر مشاهده گردید. طی بررسی‌های آماری قطر هاله عدم رشد بین نسبت‌های مختلف ۵:۱، ۱۰:۱ و ۱۵:۱ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). بین نتومايسين، جنتاميسين و آمپي سيلين و نسبت‌های مختلف عصاره اختلاف معنی‌داری ثبت گردید ($p < 0/05$) (نمودار-۱).



نمودار-۱. اثر ضدباکتری عصاره ایتیل استاتی جلبک *C. trinitatis* علیه باکتری *E. coli*. حروف غیرهمسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

نتایج نمودار-۲ تاثیر ضدباکتری عصاره ایتیل استاتی جلبک *C. trinitatis* علیه باکتری *P. aeruginosa* را نشان می‌دهد. طبق این نمودار قطر هاله عدم رشد عصاره جلبک *C. trinitatis* در نسبت ۱۰:۱ w:v با مقدار $9/95 \pm 1/75$ میلی‌متر کمترین تاثیر را علیه باکتری *P. aeruginosa* و در نسبت ۵:۱ w:v با قطر هاله عدم رشد $11/91 \pm 1/16$ میلی‌متر بیشترین تاثیر را علیه این باکتری داشته است. همچنین از لحاظ آماری نسبت ۵:۱ w:v نسبت به دو نسبت ۱۰:۱ و ۱۵:۱ اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0/05$). آنتی بیوتیک نتومايسين نیز با نسبت ۵:۱ w:v اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$). ولی اثر آنتی باکتریایی دو نسبت ۱۰:۱ و ۱۵:۱ با جنتاميسين، نتومايسين و آمپي سيلين اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0/05$).



نمودار-۲. اثر ضدباکتری عصاره ایتیل استاتی جلبک *C. trinitatis* علیه باکتری *P. aeruginosa*. حروف غیرهمسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

عصاره ایتیل استاتی جلبک سبز *H. tuna* در نسبت ۱۵:۱ w:v با قطر هاله عدم رشد $12/01 \pm 0/56$ میلی‌متر بیشترین تاثیر آنتی‌باکتریایی را علیه پاتوژن *E. coli* داشت. کمترین قطر هاله

اتیل استاتی جلبک *C. trinodis* در نسبت ۷:۱ w:v با قطر هاله عدم رشد $1/16 \pm 11/91$ میلی‌متر بیشترین تاثیر را علیه باکتری *P. aeruginosa* داشته است.

Razak و همکاران (۲۴) فعالیت ضدباکتریایی عصاره جلبک سبز (*Halimeda sp.*) در برابر پاتوژن‌های میکروبی را مورد مطالعه قرار داد. فعالیت‌های ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های میکروبی که باکتری‌های گرم مثبت (*B. cereus* و *B. subtilis*, *S. aureus*) و باکتری گرم منفی (*P. aeruginosa*, *E. coli*) را به روش انتشار دیسک انجام شد، نتایج نشان داد که عصاره متانولی *Halimeda sp.* می‌تواند رشد *B. subtilis*, *S. aureus* و *B. cereus* را مهار کند. بالاترین سطح مهارکنندگی در مقابل *S. B. subtilis* 12 ± 0.0 mm و $9/67 \pm 0.58$ mm به ترتیب با *B. cereus* و *aureus* در غلظت ۳۵۰ mg/mL با ترتیب ۳۵۰ mm و $9/67 \pm 0.58$ mm ثبت شد.

در تحقیق حاضر MIC عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* در غلظت $3/08$ میلی گرم بر میلی لیتر علیه باکتری *P. aeruginosa* اثر داشت. درخشش و همکاران (۲۵) به بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderiae* و *Sargassum angustifolium* علیه پاتوژن‌های انسانی پرداختند. نتایج بدست آمده از تحقیق آنها در باکتری *S. mutans* بیشترین حساسیت نسبت به عصاره‌های کلروفرمی جلبک‌های *snyderiae* و *L. angustifolium* با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۸ و ۱۹ میلی‌متر نشان داد ($p < 0.05$). حداقل غلظت بازدارنده در تحقیق آنها برای عصاره‌های کلروفرمی $3/75$ میلی گرم در میلی لیتر و برای عصاره‌های متانولی $7/5$ میلی گرم در میلی لیتر بود. این مقدار نسبت به نتیجه تحقیق حاضر علیه باکتری *P. aeruginosa* بیشتر بود. در تحقیق حاضر بیشترین میزان MIC $27/77$ میلی گرم بر میلی لیتر در *E. coli* مشاهده شد که نشان از مقاومت زیاد این باکتری بیماری‌زا دارد. میزان MIC برای جلبک سبز *H. tuna* در هر دو باکتری *P. aeruginosa* و *E. coli* غلظت $9/25$ میلی گرم بر میلی لیتر ثبت گردید. در تحقیق درخشش و همکاران (۲۵) اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آلی جلبک‌ها در باکتری *S. salivaris* اختلاف معنی‌داری نشان نداد و حداقل غلظت بازدارنده ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. در باکتری *S. sanguis* قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف ۱۴، ۱۸ و ۱۹ میلی‌متر گزارش شد. حداقل غلظت بازدارنده برای باکتری *P. vulgaris* و *S. flexniu* برای تمامی عصاره‌ها $7/5$ میلی گرم در میلی لیتر ثبت گردید. دلیل تفاوت تحقیق درخشش و همکاران می‌تواند به دلیل تفاوت در روش عصاره‌گیری یا نوع جلبک و حلال باشد. در تحقیق پولادی و همکاران (۲۳) کمترین میزان MIC عصاره‌های متانولی و اتیل استاتی جلبک *Sargassum cristaefolium* علیه باکتری *E. coli* $0/22$ میلی گرم بر میلی لیتر بود و در جلبک *Dictyota cervicornis* کمترین میزان MIC علیه باکتری *E. coli* $0/11$ میلی گرم بر میلی لیتر بود که نسبت به نتایج تحقیق حاضر بسیار

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

کمترین میزان MIC عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* در غلظت $3/08$ میلی گرم بر میلی لیتر در باکتری *P. aeruginosa* و بیشترین میزان MIC $27/77$ میلی گرم بر میلی لیتر در *E. coli* مشاهده شد. میزان MIC برای جلبک سبز *H. tuna* برای هر دو باکتری *P. aeruginosa* و *E. coli* غلظت $9/25$ میلی گرم بر میلی لیتر ثبت گردید. اما عصاره اتیل استاتی دو جلبک بر روی باکتری *L. monocytogenes* تأثیری نداشت.

نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC)

مقدار MBC عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* در هیچ کدام از غلظت‌ها برای سه سویه باکتری بدست نیامد. برای جلبک سبز *H. tuna* در دو باکتری *L. monocytogenes* و *E. coli* هیچ گونه MBC ثبت نشد اما برای *P. aeruginosa* در غلظت $9/25$ میلی گرم بر میلی لیتر MBC به دست آمد.

بحث

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره‌های آلی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* و جلبک سبز *H. tuna* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مانند آمپی‌سیلین، نتوماکسین و جنتامایسین انجام شد. عصاره‌های اتیل استاتی این دو جلبک اثر آنتی‌باکتریایی کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری داشت. عصاره اتیل استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* با قطر هاله عدم رشد $1/16 \pm 10/33$ میلی متر بیشترین تاثیر را علیه باکتری *E. coli* داشت. عصاره اتیل استاتی جلبک *C. trinodis* علیه باکتری *P. aeruginosa* در نسبت ۷:۱ w:v با قطر هاله عدم رشد $11/91 \pm 11/16$ میلی‌متر عملکرد بهتری نسبت به باکتری *E. coli* نشان داد. عصاره اتیل استاتی جلبک سبز *H. tuna* در نسبت ۷:۱ w:v با قطر هاله عدم رشد $15/1$ با قطر هاله عدم رشد $12/01 \pm 11/56$ میلی متر بیشترین تاثیر آنتی باکتریایی را علیه پاتوژن *E. coli* داشت. در عصاره اتیل استاتی جلبک *H. tuna* علیه باکتری *P. aeruginosa* بیشترین قطر هاله عدم رشد در نسبت ۷:۱ w:v با مقدار $11/30 \pm 2/02$ میلی‌متر مشاهده گردید.

در تحقیق مشابهی، پولادی و همکاران (۲۳) به بررسی اثر ضدباکتریایی جلبک قهوه‌ای *Sargassum cristaefolium* و *Dictyota cervicornis* دریای عمان علیه باکتری‌های *E. coli*، *P. aeruginosa* و *L. monocytogenes* با عصاره‌گیری به دو روش خیساندن و اولتراسوند با حلال‌های آلی متانول، ان هگزان، اتیل استات، آب-متانول و آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد پرداختند. عصاره‌ی هگزانی جلبک *Dictyota cervicornis* با نسبت ۷:۱ w:v با هاله عدم رشد $10/66 \pm 0/8$ میلی متر بیشترین تاثیر را علیه باکتری *P. aeruginosa* داشته و با آنتی‌بیوتیک نتوماکسین اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). در تحقیق حاضر نیز عصاره

کمتر بود. در آن تحقیق عصاره‌های آن هگزانی، متانولی، آب متانولی و اتیل‌استاتی در جلبک *Dictyota cervicornis* کمترین میزان MIC علیه باکتری *P. aeruginosa* با مقدار ۰/۰۵ میلی- گرم بر میلی‌لیتر نشان داد. تحقیق آنها نیز بر خلاف تحقیق حاضر علیه *L. monocytogenes* بسیار موثر بود که دلیل آن می‌تواند در تفاوت بین حلال‌ها و جلبک‌های مورد مطالعه باشد. Tajbakhsh و همکاران (۵) اثر ضدباکتری جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* را گزارش نمودند. فعالیت ضدباکتریایی جلبک *C. trinodis* از خلیج فارس در برابر باکتری‌های *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* و *P. aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه مذکور، حلال‌های مورد استفاده برای استخراج، نمونه جلبکی دی اتیل اتر، اتانول و آن‌هگزان بودند. Tajbakhsh و همکاران (۵) بیان کردند که بهترین حلال در مطالعه آنها دی اتیل‌اثر بوده است. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی MIC در تحقیق آنها ۴/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *E. coli*، ۱/۰۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *S. aureus*، ۶/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *P. aeruginosa* و ۰/۶۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *S. epidermidis* گزارش شد که برای *E. coli* کمتر از تحقیق حاضر بود.

در تحقیق حاضر مقدار MBC عصاره اتیل‌استاتی جلبک سبز *H. tuna* برای *P. aeruginosa* در غلظت ۹/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. برای دیگر باکتری‌ها هیچ‌گونه MBC مشاهده نشد. همچنین برای جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* در هیچ‌کدام از غلظت‌ها برای سه نوع باکتری MBC ثبت نگردید. در تحقیق پولادی و همکاران (۲۳) در عصاره اتیل‌استاتی جلبک *Dictyota cervicornis* ۰/۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. Indira و همکاران (۳۰) بررسی خصوصیات ضد میکروبی جلبک دریایی *H. tuna* سواحل جنوب شرقی هند علیه ۱۰ گونه باکتریایی پرداختند. عصاره متانولی در آن مطالعه طیف گسترده‌تری از فعالیت ضد میکروبی در مقایسه با عصاره اتانولی و کلروفرم نشان داد. مقادیر MIC از ۳۱/۲۵ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای عصاره کلروفرمی و اتانولی و ۱۵/۶۲ تا ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای عصاره متانول به دست آمد. MBC عصاره کلروفرم نشان داد که به استثنای آزمایشات ضدباکتری در برابر *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *paratyphi* تمام عصاره‌ها MBC را در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند. فعالیت ضدباکتریایی عصاره جلبک سبز *Halimeda sp.* توسط Razak و همکاران (۲۴) مورد بررسی قرار گرفت. مقدار MBC در تحقیق آنها برای باکتری‌های *B. subtilis*, *S. aureus* و *B. cereus* به ترتیب ۱۸/۷۵، ۹/۳۸، ۹/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ثبت شد. در تحقیق حاضر نیز مقدار MBC در جلبک سبز *H. tuna* با مقدار ۹/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تقریباً مشابه مطالعه Razak و

همکاران (۲۴) بود. استخراج ترکیبات ضد میکروبی از ماکرو جلبک‌ها وابسته به حلال است (۳۱). بر اساس یافته‌های Cox و همکاران (۳۲)، استون حلال کارآمد برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی از جلبک‌های سبز است اما برای جلبک‌های قرمز و قهوه‌ای متانول کارآمدتر است. بر اساس یافته Arulkumar و همکاران (۳۱) متانول ۷۰ درصد نسبت به دی متیل سولفوکساید برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی از جلبک‌های *G. corticata* و *G. edulis* کارآمدتر بود. مطالعات کمتری روی عصاره اتیل‌استاتی جلبک‌ها گزارش شده است. میزان قطبیت حلال‌هایی چون اتیل‌استات فعال متانول با هم متفاوت است و در نتیجه ترکیبات زیست فعال مستخرج توسط آنها نیز متفاوت خواهد بود که می‌تواند اصلی‌ترین دلیل تفاوت فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف باشد. برای مثال گزارش شده است که عصاره متانولی *Laurencia papillosa* و *Jania coeniculata* ممکن است به دلیل حضور اسیدهای چرب تترادکانوئیک، هگزادکانوئیک، هگزادکانوئیک ۹ اکتادکانوئیک و تتراکوزونیک اسید باشد. حضور سسکوئی ترپنوئیدها در جلبک‌های قرمز دلیل فعالیت ضدباکتریایی است (۳۳). همچنین در مطالعه Arkumar و همکاران (۳۱) دلیل فعالیت ضد میکروبی جلبک‌ها حضور اسیدهای چرب و ترکیباتی چون سولفوروس اسید، یوگنول، بنزن و فتالیک اسید در عصاره گزارش شد. حضور فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، ترپن‌ها و فلوروئانین در عصاره جلبک‌های قهوه‌ای و قرمز نیز دلیل فعالیت ضدباکتریایی است (۳۴، ۳۵). در مطالعه حاضر بررسی ترکیبات موثر عصاره انجام گرفت تا ارتباط فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتیل‌استاتی جلبک‌ها با ترکیبات موجود بحث گردد. بررسی ترکیبات زیست‌فعال عصاره با کروماتوگرافی گازی مجهز به اسپکترومتری جرمی (GC-MS) می‌تواند تحقیقات آینده این مسیر را کامل نماید. همچنین پیشنهاد می‌گردد مطالعه سایر عصاره‌های آلی و آبی جلبک‌های مورد مطالعه این تحقیق انجام گردد و اثر آنها علیه سایر باکتری‌های عامل بیماری‌های غذازاد نیز بررسی شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* علیه باکتری *P. aeruginosa* معادل آنتی‌بیوتیک نئومايسين اثر ضد باکتریایی دارد اما عصاره‌های اتیل-استاتی جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* و جلبک سبز *H. tuna* تاثیر معنی‌داری بر روی باکتری‌های *L. monocytogenes* و *E. coli* نداشتند.

تشکر و قدردانی: از همه اساتیدی که در غنای مطالب

حاضر یاری‌رسان بودند، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نقش نویسندگان: ملازهی ثابت، نویسنده مقاله و پژوهشگر عملیاتی؛ غفاری مسئول مکاتبات، راهنمای اول پایان نامه، روش شناس، پژوهشگر اصلی؛ طاهری، راهنمای دوم پایان نامه، پژوهشگر کمکی، ویراستار علمی مقاله؛ اریش، مشاور پایان نامه، پژوهشگر آماری، بررسی مقاله اولیه و اصلاحات. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید

منابع

- Sandsdalen E, Haug T, Stensvåg K, Styrvold OB. The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003; 19(8): 777-782. doi:10.1023/A:1026052715260
- Tuney İ, Cadirci BH, Ünal D, Sukatar A. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*. 2006; 30(3): 171-175.
- Rajasulochana P, Dhamotharan R, Krishnamoorthy P, Murugesan S. Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. *Journal of American Science*. 2009; 5(3): 20-25.
- Kolanjinathan K, Stella D. Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. *Recent Research in Science and Technology*. 2009; 1(1): 020-022.
- Tajbakhsh S, Ilkhani M, Rustaiyan A, Larijani K, Sartavi K, Tahmasebi R. Antibacterial effect of the brown alga *Cystoseira trinodis*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5(18): 4654-4657. doi:10.5897/JMPR.9000128
- Lekameera R, Vijayabaskar P, Somasundaram ST. Evaluating antioxidant property of brown alga *Colpomenia sinuosa* (Derb. Et sol). *African Journal of Food Science*. 2013; 2(11): 126-130.
- Zandi K, Ahmadzadeh S, Tajbakhsh S, Rastian Z, Yousefi F, Farshadpour F, et al. Anticancer activity of *Sargassum oligocystum* water extract against human cancer cell lines. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2010; 14(8): 669- 673.
- Zandi K, Tajbakhsh S, Nabipour I, Rastian Z, Yousefi F, Sharafian S, et al. In vitro antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against Jurkat and molt-4 human cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(40): 6787-6790.
- de Sousa CB, Gangadhar KN, Morais TR, Conserva GA, Vizetto-Duarte C, Pereira H, et al. Anti leishmanial activity of meroditerpenoids from the macroalgae *Cystoseira baccata*. *Experimental parasitology*. 2017; 174: 1-9. doi:10.1016/j.exppara.2017.01.002
- Genovese G, Faggio C, Gugliandolo C, Torre A, Spanò A, Morabito M, et al. In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine environmental research*. 2012; 73: 1-6. doi:10.1016/j.marenvres.2011.10.002
- Park HJ, Choi JS, Chung HY. The Antioxidant Activity in Extracts of *Symphyclocladia latiuscula*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1998; 31(6): 927-932.
- Mimica-Dukić N, Bugarin D, Grbović S, Mitić-Čulafić D, Vuković-Gačić B, Orčić D, et al. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and anti-mutagenic agents. *Molecules*. 2010; 15(4): 2759-2770. doi:10.3390/molecules15042759
- Taskin E, Ozturk M, Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African journal of Biotechnology*. 2007; 6(24): 2746-2751. doi:10.5897/AJB2007.000-2439
- Gazor R, Lashgari AP, Almasi S, Ghasemi S. Effect of Brown Algae *Cystoseira trinodis* Methanolic Extract on Renal Tissue. *Pharmaceutical Sciences*. 2016; 22(1): 49-53. doi:10.15171/PS.2016.09
- Spavieri J, Allmendinger A, Kaiser M, Casey R, Hingley-Wilson S, Lalvani A, et al. Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (phaeophyceae) from British and Irish waters. *Phytotherapy Research*. 2010; 24(11): 1724-1729. doi:10.1002/ptr.3208
- Gouveia C, Kreusch M, Schmidt ÉC, Marthiellen RDL, Osorio LK, Pereira DT, et al. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis*. *Microscopy and Microanalysis*. 2013; 19(3): 513-524. doi:10.1017/S1431927613000317
- Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal of Applied Phycology*. 2001; 13(5): 403-407. doi:10.1023/A:1011972230477
- Guiry MD, Guiry GM. *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2016. URL: http://www.algaebase.org
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environmental Microbiology*. 2000; 66(10): 4555-4558. doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
- Jeukens J, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Tucker NP, Levesque RC. Genomics of antibiotic-resistance prediction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of the New York Academy of*

- Sciences, 2019; 1435(1): 5-17. doi:10.1111/nyas.13358
21. Pernin A, Guillier L, Dubois-Brissonnet F. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. Food Microbiology. 2019;80:18-24. doi:10.1016/j.fm.2018.12.010
22. Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S, Malik SVS, et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. Veterinary Quarterly. 2015; 1-25. doi:10.1080/01652176.2015.1063023
23. Pooladi S, Ghaffari M, Taheri A. Antibacterial effect of *Sargassum cristaeifolium* and *Cervicornis Dictyota* of Makran Sea on *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aerogynosa*. Ms.C. project of Chabahar Maritime University. 2016; P:91.
24. Razak W, Ross R, Rahim NFA, Faridon BS, Radzun KA. Antimicrobial activity of marine green algae extract against microbial pathogens. Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 20018; 21(2): 43-47.
25. Derakhshesh B. Antibacterial effects of seaweeds "*Laurencia snyderiae*" and "*Sargassum angustifolium*". M.Sc. Project of Hormozgan University. 2007; p:79.
26. Tavakoli S, Hong H, Wang K, Yang Q, Hashemi Gahrue H, Zhuang S, et al. Ultrasonic-assisted food-grade solvent extraction of high-value added compounds from microalgae *Spirulina platensis* and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. Algal Research. 2021; 60 :102493. doi:10.1016/j.algal.2021.102493
27. Wang L, Weller LC. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology. 2006; 17(6):300-312. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004
28. Arman M, Soleimani S, Zarei Z, Sohrabipoor J, Asadzadeh M. Assessment of antibacterial effect of some marine macroalgae against human pathogen. Journal of Aquatic Ecology. 2015; 5(2):139-144. (in Persian)
29. Owlia P, Sadari H, Matloob F, Rezaee M. Antimicrobial Effect of *Zataria multiflora* Boiss Extract and Oxacillin against *Staphylococcus aureus*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 2006; 22(1): 22-26. doi:10.22092/ijmapr.2006.114996
30. Indira K, Balakrishnan S, Srinivasan M, Bragadeeswaran S, Balasubramanian T. Evaluation of in vitro antimicrobial property of seaweed (*Halimeda tuna*) from Tuticorin coast, Tamil Nadu, Southeast coast of India. African Journal of Biotechnology. 2013; 12(3): 284-289. doi:10.5897/AJB12.014
31. Arulkumar A, Rosemary T, Paramasivam S, Rajendran RB. Phytochemical composition, in vitro antioxidant, antibacterial potential and GC-MS analysis of red seaweeds (*Gracilaria corticata* and *Gracilaria edulis*) from Palk Bay, India. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2018; 15: 63-71. doi:10.1016/j.bcab.2018.05.008
32. Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. International Food Research. 2010; 17: 205-220.
33. Bansemir A, Blume M, Schroder S, Lindequist U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture. 2006; 252: 79-84. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.051
34. Sandsdalen E, Haug T, Stensvag K, Styrvold O. The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2003; 19: 777-782. doi:10.1023/A:1026052715260
35. Wang T, Jonsdottir R, Kristinsson H, Thorkelsson G, Jacoben C, Yuca Hamaguchi P. Inhibition of haemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod muscles and cod protein isolates by *Fucus vesiculosus* extract and fractions. Food Chemistry. 2010; 123: 321-330. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.038