

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۲، پاییز ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۳

ص ۴۴۵-۴۳۷

بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های ریزجلبک *Chlorella vulgaris* جداشده از خلیج چابهار

- ❖ **گیلان عطاران فریمان***: استادیار دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار
- ❖ **علی طاهری**: استادیار دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار
- ❖ **ربابه جعفری**: دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

چکیده

میکروجلبک‌ها منابع زیستی مهمی‌اند که طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی زیست‌فناوری را به خود اختصاص داده‌اند. در این پژوهش تأثیرات ضدباکتریایی عصاره‌های آلی ریزجلبک کلرلا ولگاریس خالص‌سازی شده از خلیج چابهار علیه سه سویه باکتری گرم منفی اشرشیاکلا، ویبریو کلرا و پروتئوس ولگاریس و دو سویه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیژنوس آزمایش شد. عصاره‌های اتانولی و کلروفورمی به دست آمده به دو روش انتشار دیسک و رقت‌های متوالی در لوله به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بررسی شدند. بر اساس نتایج، عصاره اتانولی بیشترین اثر را در باکتری ویبریو کلرا نشان داده است و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری اشرشیاکلا به دست آمد. عصاره کلروفورمی بر باکتری پروتئوس ولگاریس بیشترین اثر را نشان داد و با غلظت‌های متفاوت حداقل غلظت کشندگی برای همه باکتری‌های مورد آزمایش به دست آمد. به طور کلی، ریزجلبک کلرلا ولگاریس بومی ایران دارای اثر ضدباکتری قوی است و عصاره کلروفورمی نسبت به عصاره اتانولی دارای اثر بیش‌تری در باکتری‌ها بود.

واژگان کلیدی: ریزجلبک، کلرلا ولگاریس، فعالیت ضدباکتریایی، MIC، MBC.

۱. مقدمه

جلبک‌ها، که اکثر آن‌ها میکروجلبک‌ها هستند، یک تا ده میلیون تخمین زده شده است (Chu, 2012a).

امروزه در سراسر جهان جلبک‌ها نشان‌دهنده منبع پایان‌ناپذیری از مواد اولیه مورد استفاده در صنعت داروسازی، صنایع غذایی، و لوازم آرایشی محسوب می‌شوند. از این جلبک‌ها برای تهیه آگار، کلاژن، ویتامین‌ها و استروئول‌های مورد نیاز در صنعت داروسازی استفاده می‌شود. جلبک‌ها طیف وسیع و جدیدی از ترکیبات با فعالیت ضد میکروبی، ضد ویروسی و فعالیت‌های ضد سرطانی از خود نشان می‌دهند؛ همچنین به‌منزله ضد التهاب، هیپوکلسترولامیک، آنزیم مهارکننده و بسیاری دیگر از خواص دارویی کاربرد دارند (Borowitzka, 1999).

علاوه بر آن، استفاده از موادی با خاصیت آنتی‌باکتریال و باکتریواستات در جلبک‌های دریایی از سال‌های قبل در طب سنتی رایج بوده است (Victoria et al., 2009).

علاقه رو به رشد به تحقیق درباره استخراج متابولیت‌های جلبک‌ها به کشف بسیاری از ترکیبات مهم در فعالیت‌های بیولوژیکی امیدوارکننده و مفید منجر شده است (Beena and Krishnika, 2011). ریز جلبک کلرلا با توجه به میزان پروتئین (۵۱-۵۸٪ وزن خشک)، کاروتنوئیدها و طیف گسترده‌ای از ویتامین‌ها دارای ارزش غذایی بالایی است. این میکروجلبک دارای تأثیرات مفید دیگر در مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش چربی خون است. محصولات اضافی کلرلا که «فاکتور رشد کلرلا» نامیده می‌شود به‌منزله عامل بهبود رشد باکتری‌های لاکتیکی توزیع شده است. همچنین کلرلا ولگاریس

امروزه افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های بیماری‌زا رو به افزایش است. مصرف بیش از حد دارو و استفاده غیر صحیح از داروهای آنتی‌بیوتیک موجب توسعه و پراکندگی مقاومت در باکتری‌ها شده است؛ علاوه بر این، گسترش نیافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید درمان باکتری‌های مقاوم را با مشکل روبه‌رو کرده است (Perry et al., 2002).

به علت نگرانی روزافزون جهانی درباره افزایش هشداردهنده میزان عفونت‌ها از سوی میکروارگانیزم‌هایی که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند، در سال‌های اخیر تحقیق در مورد ترکیبات طبیعی که فعالیت آنتی‌میکروبی دارند از اهمیت زیادی برخوردار بوده است. ۴۵۰ سال مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت باکتری‌ها در برابر این ترکیبات باعث افزایش بیماری، مرگ‌ومیر و هزینه مراقبت‌های بهداشتی در برابر عفونت‌های باکتریایی شده است. هر چند آنتی‌بیوتیک‌های قوی می‌توانند باعث کاهش مقاومت در باکتری شوند. به هر حال در سه دهه گذشته، محققان علاقه زیادی به محصولات طبیعی استخراج‌شده از گیاهان نشان داده‌اند و سعی می‌کنند تا عوامل جدید ضد میکروبی طبیعی را کشف کنند (Mala et al., 2009). در سال‌های اخیر در زمینه تحقیق درباره ترکیبات فعال زیستی با منشأ گیاهی علاقه زیادی به مطالعه درباره جلبک‌ها به وجود آمده است (Pratt et al., 1944).

میکروجلبک‌ها منابع بیولوژیکی مهمی‌اند که طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی زیست‌فناوری را به خود اختصاص داده‌اند. تعداد گونه‌های

رسوب داده شدند. سپس، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فریزدرایر خشک و جمع آوری شدند و تا زمان مصرف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲.۲. تهیه عصاره

برای تهیه عصاره ریزجلبک با استفاده از روش اصلاح‌شده Kellam and Walker در سال ۱۹۸۹، به ترتیب ۲۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک ریزجلبک کلرلا ولگاریس با حلال‌های کلروفورم و اتانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد سپس، با استفاده از دستگاه اولتراسیون دو دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با قدرت ۴۰۰۰ rpm هموژنایز و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. سپس عصاره‌ها سانتریفیوژ شدند و محلول‌های رویی با غلظت‌های ۱۲۰۰ ppm و ۷۰۰۰ با فیلتر میکروبی ۰/۲۲ میکرون فیلتر شدند و برای ذخیره‌سازی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۳.۲. باکتری‌های مورد بررسی

سویه‌های باکتریایی در این تحقیق شامل ۳ سویه باکتری گرم منفی *V. cholerae*, *P. Vulgaris*, *E. coli* و ۲ سویه باکتری گرم مثبت *L. monocytogenes* و *S. aureus* است که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند.

۴.۲. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره

ریزجلبک کلرلا

به منظور تعیین حساسیت سویه‌های باکتری نسبت به

دارای خواص دارویی از جمله ضدباکتری، ضدقارچ و ضدسرطان است (Chu, 2012b). Priya در سال ۲۰۱۲ طی تحقیقات خود درباره عصاره‌های کلرلا نشان داد خواص ضدباکتریایی کلرلا می‌تواند به دلیل کاروتنوئیدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شده در عصاره آن باشد.

در این پژوهش برای اولین بار در ایران تأثیرات عصاره‌های اتانولی و متانولی فیتوپلانکتون کلرلا ولگاریس بومی دریای عمان، به منظور مطالعات پایه‌ای، در کاربردهای بیوتکنولوژیکی علیه پنج سویه باکتری بیماری‌زا بررسی شد.

۲. مواد و روش کار

فیتوپلانکتون خالص‌سازی شده مورد مطالعه از آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار تهیه شد. به منظور کنترل شرایط محیطی برای رشد فیتوپلانکتون، لوازم و تجهیزات آزمایشگاهی و محیط کشت با اشعه UV، اتوکلاو، فور (Oven)، آب ژاول، تیوسولفات سدیم و شعله ضد عفونی شد.

۱.۲. شرایط رشد ریزجلبک

ریزجلبک کلرلا برای جداسازی ترکیبات با فعالیت بیولوژیکی کشت داده شد. کشت انبوه در حجم صد لیتر آب فیلترشده و اتوکلاو شده دریا در فایکولب با محیط کشت F2 در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد و PH: ۷/۸ با تناوب نوری ۱۲:۱۲ روشنایی و تاریکی با شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس با هوادهی و اضافه کردن محیط کشت در شوری PPT ۳۶ انجام شد. نمونه‌ها بعد از گذراندن طول دوره از طریق سانتریفیوژ (K3Series) با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه

میکرولیتتر از سوسپانسیون باکتری نیم مک‌فارلند اضافه و با سمپلر مخلوط شد و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. آخرین لوله‌ای که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشد به‌منزله حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) باکتری در نظر گرفته شد و برای تعیین حداقل غلظت کشندگی ۱۰۰ میکروگرم از لوله‌هایی که باکتری در آن رشد نکرده بود با ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت آگار به روش پورپلیت کشت داده شد و پلیتی که فاقد رشد باکتری بود به‌منزله MBC یا MFC آن عصاره در نظر گرفته شد.

۶.۲. آنالیز آماری

به منظور مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها علیه باکتری‌های مورد آزمایش از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح آلفای ۰/۰۵ و نرم‌افزار SPSS^{VER.20} استفاده شد.

۳. نتایج

نتایج مربوط به حساسیت به روش انتشار دیسک عصاره‌های اتانولی و کلروفورمی در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج، باکتری ویبریو کلرا با قطر هاله عدم رشد $2/96 \pm 11/5$ میلی‌متر بیش‌ترین حساسیت را به عصاره اتانولی و باکتری پروتئوس ولگاریس با قطر $0/73 \pm 10/18$ بیش‌ترین حساسیت را به عصاره کلروفورمی از خود نشان داد. در این آزمایش عصاره‌های مختلف فاقد اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بودند.

عصاره‌ها از روش اصلاح‌شده انتشار دیسک استفاده شد (Rosaline et al., 2012). بدین ترتیب که از همه سویه‌های باکتریایی سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. سپس با سواب بر محیط کشت آگار کشت داده شد و پس از قراردادن دیسک خام با قطر ۶ میلی‌متر ۱۵ میکرولیتر از عصاره‌ها به دیسک‌ها اضافه شد و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. از آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد جنتامایسین و نیومایسین (ساخت شرکت پادتن طب)، به‌منزله کنترل مثبت، و از حلال، به‌منزله کنترل منفی، استفاده شد. پس از دوره کشت هاله‌های عدم رشد بررسی و با کولیس ورنیه در حد میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

۵.۲. روش رقت‌سازی

حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره تعیین شد (Ragupathi et al., 2012). بدین منظور نخست از هر عصاره غلظت‌های ۱۲۰، ۲۵۰ و ۷۵۰ ppm و برای هر عصاره به ازای هر میکروارگانیزم از یک سری نه‌تایی لوله‌های آزمایش استفاده شد. ۷ لوله برای غلظت‌های مختلف هر عصاره و ۲ لوله به‌منزله کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. به لوله اول به میزان ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت برات و ۱ میلی‌لیتر از عصاره میکروجلبک اضافه شد و پس از مخلوط‌شدن ۱ سی‌سی از لوله اول به لوله دوم اضافه و مخلوط شد و به همین روش تا لوله هفتم ادامه یافت و از لوله آخر ۱ میلی‌لیتر دور ریخته شد. از ۲ لوله دیگر به‌منزله محیط کشت شاهد و کنترل منفی استفاده شد. سپس، به هر کدام از لوله‌ها ۱۰

جدول ۱. حساسیت باکتری‌های مختلف در برابر عصاره‌های کلرلا ولگاریس (قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر)

جنتامایسین	نیومایسین	عصاره کلروفورمی	عصاره اتانولی	باکتری‌ها
۱۸/۵ ± ۳/۵۳ ^a	۹/۵۵ ± ۵/۰۲ ^b	۷/۹۷ ± ۱/۵۸ ^b	۶ ^b	<i>Listeria monocytogenes</i>
۸/۵ ± ۰/۷۰ ^b	۱۱/۹۴ ± ۰/۰۴ ^a	۸/۴۶ ± ۱/۱۸ ^b	۶ ^b	<i>Escherchia coli</i>
۱۴/۵ ± ۹/۳ ^a	۶ ^b	۷/۶ ± ۱/۱۰ ^{ab}	۱۱/۵ ± ۲/۹۶ ^{ab}	<i>Vibrio cholerae</i>
۱۵/۵ ± ۰/۷۰ ^a	۶ ^b	۱۰/۱۸ ± ۰/۷۳ ^{ab}	۸/۹۵ ± ۴/۱۷ ^b	<i>Proteus Vulgaris</i>
۱۰/۵ ± ۰/۷۰ ^a	۹/۱ ± ۴/۳۸ ^{ab}	۷/۱۹ ± ۰/۹۸ ^{ab}	۶ ^b	<i>Staphylococcus aureus</i>

است (Pesando and Gnassia-Garelli, 1979). در بررسی و سنجش اثر ضدباکتریایی در اکثر موارد از دو روش انتشار دیسک و رقیق‌سازی محیط کشت استفاده می‌شود که به‌منزله دو روش مناسب در این زمینه کاربرد دارد. طی این پژوهش خواص ضدباکتریایی عصاره‌های کلروفورمی و اتانولی ریزجلبک کلرلا بررسی شد. تأثیرات ضد میکروبی عصاره *C. vulgaris* در برابر باکتری‌های اشرشیاکلاسی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوزنوس، پروتئوس ولگاریس و ویبریو کلرا با ارزیابی قطر هاله عدم رشد، میزان MIC و MBC سنجش شد. به‌طور کلی، فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های *C. vulgaris* در برابر همه باکتری‌های آزمایش‌شده با توجه به غلظت آن مؤثر بوده است. این نتایج همسو با نتایج آزمایش‌های Debro and Ward در سال ۱۹۷۹ بوده است (Debro and Ward, 1979).

روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده تأثیرات ضد میکروبی عصاره را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عصاره‌هایی که با روش‌ها و حلال‌های متفاوت استخراج می‌شوند می‌توانند تأثیرات

نتایج برای MIC و MBC حاکی از آن است که عصاره کلروفورمی فقط در لوله‌های اول به صورت شفاف دیده شد و با کشت بر محیط کشت جامد مشخص شد که این عصاره با غلظت ۲۵۰ ppm برای باکتری پروتئوس دارای حداقل غلظت کشندگی و برای سایر باکتری‌ها دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بود و با افزایش غلظت به ۷۵۰ ppm حداقل غلظت کشندگی برای دیگر باکتری‌های آزمایش‌شده در لوله اول به دست آمد. همچنین، عصاره اتانولی با غلظت ۲۵۰ ppm در لوله‌های اول برای همه باکتری‌ها دارای حداقل غلظت مهارکنندگی است و با افزایش غلظت به ۷۵۰ ppm مهار رشد باکتری‌ها بیش‌تر شد و تنها برای باکتری اشرشیاکلاسی دارای حداقل غلظت کشندگی بود.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

ریزجلبک‌ها دارای منابع بسیار وسیعی از ترکیبات جدیدند و فعالیت بیولوژیکی دارند. تعداد زیادی از عصاره یا محصولات خارج سلولی ریزجلبک‌ها فعالیت ضد میکروبی دارند، اگرچه ساختار و ماهیت ترکیبات فعال بسیاری از آن‌ها هنوز شناخته نشده

مشاهده شد. با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های دیگر نیز ۷۵۰ ppm اندازه‌گیری شد.

دیگر محققان بیان کردند که اگرچه عصاره کلروفورمی کلرلا ولگاریس در برابر باکتری‌های مورد آزمایش فعالیت ضد میکروبی اندکی داشته است، فعالیت بازدارندگی خوبی در مقابل باکتری سودوموناس نشان داد (Priya, 2012).

مطالعات دیگر تأثیر غلظت عصاره را در فعالیت ضد میکروبی نشان داده است چنان‌که با تغییر میزان غلظت عصاره تأثیرات ضد میکروبی دچار تغییر می‌شود (Kartal et al., 2003).

عصاره اتانولی کلرلا تنها برای باکتری‌های گرم منفی ویبریو و پروتئوس با غلظت ۱۲۰ ppm هاله عدم رشد را نشان داد و با افزایش غلظت به ۲۵۰ باعث مهار رشد همه باکتری‌ها و به طور چشمگیر برای باکتری اشرشیاکلائی شد. به منظور مشخص شدن حداقل کشندگی با افزایش غلظت به ۷۵۰ ppm میزان MBC تنها برای باکتری اشرشیاکلائی به دست آمد، که این مطلب نتایج آزمایش‌های Ördög et al. (2004) درباره عصاره اتانولی کلرلا را تأیید می‌کند که بیش‌تر فعالیت باکتری‌های گرم منفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با وجود این، مطالعات دیگر عصاره اتانولی را دارای حداقل غلظت مهارکنندگی علیه باکتری استفیلوکوکوس اورئوس معرفی کرده است که باکتری‌ای گرم مثبت است (Jayshree et al., 2012).

هر چند پیش از این مطالعه توانایی کلرلا ولگاریس در مهار رشد باکتری‌های مورد آزمایش به اثبات رسیده است، به نظر می‌رسد تاکنون نتایجی

ضدمیکروبی متفاوتی در گونه‌های خاص میکروارگانیزم‌ها از خود نشان دهند (Nostro et al., 2000).

Beena and Krishnika در سال ۲۰۱۱ طی آزمایش‌های خود فعالیت عصاره متانولی ریزجلبک سودوموناس علیه باکتری *Xanthomonas oryzae* را به ثبت رساندند در حالی که عصاره‌های اتانول و هگزان هیچ فعالیتی در غلظت‌های مختلف آزمایش‌شده نشان ندادند. این امر تأثیر حلال‌های متفاوت را به خوبی نشان می‌دهد (Beena and Krishnika, 2011).

عصاره کلروفورمی طی تحقیقات Jayshree et al. (2012) فعالیت پایین و عصاره اتانولی در برابر باکتری‌های باسیلوس سوبتیس، پروتئوس ولگاریس و سودوموناس فعالیت قابل قبولی را نشان داده بودند (Jayshree et al., 2012). طی این آزمایش نشان داده شد که بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به عصاره اتانولی برای باکتری‌های ویبریو کلرا و عصاره کلروفورمی برای باکتری پروتئوس ولگاریس به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۱/۵ و ۱۰/۱۸ میلی‌متر با غلظتی معادل ۱۲۰ ppm بود.

عوامل ضد میکروبی با فعالیت کم در برابر میکروارگانیزم‌ها MIC بالا و ترکیبات ضد میکروبی بسیار فعال MIC کم دارند.

حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های استفیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلائی، ویبریو کلرا، لیستریا مونوسیتوزن ۲۵۰ ppm به دست آمد و برای باکتری پروتئوس ولگاریس میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و میزان حداقل غلظت کشندگی در لوله شماره ۱ به صورت یکسان با غلظت ۲۵۰ ppm

al. (2012). طی آزمایش‌های خود درباره خواص ضدباکتریایی کلرلا با استفاده از روش فتوشیمیایی حضور آکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل، تانن، ترپنوئیدها، ساپونین، و گلیکوزید را نشان دادند که می‌تواند علت خواص ضدباکتریایی آن باشد که با بررسی‌های پیش‌تر می‌توان علت این گونه ریزجلبک بومی را نیز شناسایی کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از کارشناسان محترم آزمایشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار و جناب آقای دکتر هاشمی و زحمات بی‌دریغ خانم بهشته اژدری، که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

درباره میزان حداقل غلظت کشندگی این ریزجلبک بیان نشده است.

نتایج روش رقت‌سازی نشان داد که بین غلظت ماده و حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد. بر اساس نتایج این مطالعه مشاهده شد که درصد حذف باکتری‌ها به وسیله عصاره‌های ریزجلبک متفاوت است. همچنین شدت اثر ضدباکتریایی به نوع باکتری بستگی دارد.

هرچند دیگر محققان (Uma et al., 2011) عنوان کرده‌اند عصاره‌های کلرلا ولگاریس فعالیت متوسطی در برابر باکتری‌ها دارد، این نتایج نشان داد که عصاره کلرلا ولگاریس فعالیت خوبی در برابر میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش داشته است و این نتایج با نتایج مطالعات (Debro and Ward, 1979) و (Ördög et al., 2004) همخوانی دارد.

References

- [1]. Beena, B. N., & Krishnika, A. (2011). Antibacterial activity of freshwater Microalga (*Scenedesmus* sp.) against three bacterial strains. *Journal of Biosciences research*, 2(4), 160-165
- [2]. Borowitzka, M. A. (1999). Patents. *Journal of Applied Phycology*, 11(6), 599-603
- [3]. Chu, Wan-Loy. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education*, 6, S24-S37.
- [4]. Pesando D & Gnassia-Garelli M. (1979). Partial characterization of a specific antibiotic, antifungal substance isolated from the marine diatom *Chaetoceros lauderi* Ralfs CC. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, 447-459.
- [5]. Debro, L. H., & Ward, H. B. (1979). Antibacterial Activity of Freshwater Green Algae. *Planta Med*, 36(08), 375-378
- [6]. Jayshree A., Jayashree Sh., & Thangaraju N. (2012). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Chlorella Vulgaris* Beijerinck *International Journal of Current Research and Review*, 4(7), 33-38
- [7]. Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., & Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 69-73
- [8]. Kellam, Stephen J, & Walker, John M. (1989). Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal*, 24(2), 191-194
- [9]. Mala, R., Sarojini, M., Saravanababu, S., & Umadevi, G. (2009). Screening for Antimicrobial Activity of Crude extracts of *Spirulina Platensis*. *Journal of Cell and Tissue Research*, 9(3), 1951-1955
- [10]. Nostro, A, Germano, MP, D'angelo, V, Marino, A, & Cannatelli, MA. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30(5), 379-384
- [11]. Ördög, V, Stirk, W. A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J, . . . Németh, L. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of applied phycology*, 16(4), 309-314
- [12]. Perry, J. J., Staley, James T., & Lory, Stephen. (2002). *Microbial Life*, Sinauer Associates, Inc.
- [13]. Pratt, R, Daniels TC, Eiler JB, Gunnison JB, & WD, Kumler. (1944). Chlorellin, nN Antibacterial Substance from *Chlorella*. *Science*, 99, 351-352
- [14]. Priya, S. (2012). Analysis of value-added biochemical compounds and antimicrobial activity of green algae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(5), 2577-2579
- [15]. Uma, R., Sivasubramanian, V. & Niranjali D. S. (2011). Preliminary phycochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus Olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(3), 74-81
- [16]. Ragupathi, R. K., Rengasamy A., & Radjasagarin A. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of Indian seagrasses against urinary tract pathogens. *Food Chemistry*, 135(4), 2470-2473

- [17]. Rosaline, X. D., kumar, S., Rajendran, Sh. K., & Janarthan, S. (2012). Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1, Supplement), S140-S146
- [18]. Victoria, B., Doina P. B., Gabriela R., Corneliu A., & Ciprian F. B. (2009). The antibacterial activity evaluation of *Cystoseira barbata* biomass and some alginates upon bacteria from oropharyngeal cavity. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6), 4851-4857

