الفعالية التثبيطية للمستخلص الايثانولي والميثانولي للطحلب الاخضر *Chlorella vulgarsi* ضد بعض سلالات الجراثيم

صلاح سلمان زين العابدين * ، حسن علي عبد الرضا ** ، ثائر ابراهيم قاسم***

جامعة كركوك-كلية العلوم

****جامعة بغداد- كلية الطب البيطري *****جامعة بغداد- معهد الهندسة الوراثية والتقانة الاحيائية**

الخلاصة

إستخدام الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* ، لدراسة فعالية مستخلصاتها كمضاد حيوي ضد بعض عزلات الجراثيم الممرضة إذ عزلت وشخصت بعض السلالات الممرضة من نماذج مرضية مختلفة شملت الإدرار والخروج ومسحات الأذن والجروح إضافة إلى عينة تم عزلها من التربة . حددت عزلات الجراثيم ذات المقاومة المتعددة لبعض المضادات الحيوية قيد الدراسة.إذ وجد أن أقل مقاومة ابدتها جرثومة *Staphylococcus aureus E4* تجاه ست من المضادات الحيوية المستخدمة في حين أظهرت *Klebsiella pneumoniae U1* المقاومة تجاه كافة المضادات الحيوية المستخدمة.

تم تتبع نمو الطحالب في مزارعها واختير نهاية طور التضاعف الأسي لحصاد المزارع إذ أعطت كل مزرعة كتلة حية مقدارها 047.0غرام وزن جاف / لتر .

اظهرت النتائج أن الاستخلاص بالإيثانول بتركيز 80% في درجة حراة ْ80م لمدة أربع ساعات كان أفضل طريقة لإستخلاص المواد الفعالة الخام من الطحلب الأخضر، كما وجد أن المستخلص الإيثانولي للطحلب الأخضركانت ذو طيف واسع في تأثيره على الجراثيم الممرضة الموجبة والسالبة لملون كرام والمقاومة لعدد من مضادات الحيوية . وكان اقضل انتاج للمواد الفعالة في نهاية طور التضاعف الأسي. كما وجد أن التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الإيثانولي للطحلب الأخضرChlorella vulgaris يساوي 9.0ملغم / سم3 ضد كل من *E.coli* و *Staphylococcus aureus*.

المقدمة :

إن استعمال المضادات الحيوية بشكل واسع أدى إلى مقاومة الجراثيم لها بسبب امتلاكها آليات مختلفة في المقاومة(Jawetz *et al.* , 1995) . ذكر فرانكلين (Franklin , 1987) وهوك وروسيل (Hugo & Russell, 1989) أن هناك نوعين من المقاومة هي المقاومة الموروثة

Inherent أو الطبيعية، والمقاومة المكتسبة. تمتلك العصيات السالبة لملون كرام مقاومة للعديد من مضادات الحيوية بسبب امتلاكها الغشاء الخارجي الذي قد يؤثر في نفاذية تلك المضادات إلى داخل الخلية إلا إن المشكلة الكبرى تكمن في المقاومة المكتسبة والتي تضاعفت بشكل سريع.

وهناك العديد من المضادات الحيوية تم تصنيعها وتنقيتها واستخدمت علاجاً للعديد من الاخماج الجرثومية ، وتختلف هذه المضادات في قوة تأثيرها، فقسم منها ضيقة طيف التأثير Narow spectrum مثل مضاد Penicillin G الفعال ضد الجراثيم الموجبة لملون كرام (Atlas , 1984) . والبعض الآخر واسع طيف التأثير ضد الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام مثل Chloramphenicol و Streptomycin (Thomas , 1973) .

وتتباين الجراثيم في مقاومتها للمضادات الحيوية فجرثومة *Staphylococcus aureus* مثلا تظهر المقاومة لمضاد الـ Penicillin بعد مدة قصيرة من استخدام العلاج في حين أن *Neisseria gonorrhoeae* تكون بطيئة في إظهار المقاومة إذ قد تصل إلى عشرين سنة وذلك من خلال تكوين أنزيم Penicillinase بشكل مفاجئ (Sand & Mondell, 1985) .

إن مقاومة المضادات الحيوية قد تكون ناتجة عن أنزيمات تعمل على تحطيم المضاد الحيوي كإنتاج أنزيم Penicillinase الذي يعمل ضد مضادات β – Lactames (Frobisher et al., 1974) أو بالتغيير في الموقع الحساس للمضاد الحيوي أو التقليل من نفاذية الخلية للمضاد الحيوي أو بإنتاج مواد وسطية تتنافس مع المضاد الحيوي في الخلية الحساسة (Hugo & Rassell,1989) .

فيما يخص الطحالب الخضراء فهي تمتاز بلونها الأخضر العشبي وتظهر بأشكال مختلفة فقد تكون أحادية الخلية متحركة أو غير متحركة أو تظهر

بشكل مستعمرات متحركة أو غير متحركة وقد تكون شريطية متفرعة أو غير متفرعة ، إلا أن أغلبها يكون وحيد الخلية يخزن الغذاء على شكل نشأ في البلاستيدة، والصبغة الرئيسة فيه هي الكلوروفيل أ،ب Chlorophyll a,b ويحوي صبغة الليوتين Leutein إضافة إلى الكاروتينCarotein والزانثوفيل Xanthophyll والتي لا توجد في غيره من الطحالب ، كما يتكون جدار الخلية من السليلوز Cellulose والمانوزManose أو الزايلان Xylan (Atlas,1984و مولود وآخرين،1990).

تعيش هذه الطحالب في المياه العذبة والتربة الرطبة وعلى الأشجار ، وأغلب هذه الطحالب حرة المعيشة و يعيش بعضها على الحيوانات المائية أو داخل النباتات الأرضية . تتكاثر خضرياً ولاجنسياً أوجنسياً (مولود وآخرين، 1990).

يعود أول تسجيل لاستخدام الطحالب في المجال الطبي إلى حوالي(2700 ق.م (Hoppe, 1979) حينما استخدمت في علاج الكثير من أمراض سوء التغذية وأمراض الغدة الدرقية وذلك لاحتواء هذه الطحالب على كمية من البروتين والفيتامينات والعناصر المعدنية الأخرى بخاصة في الطحالب البحرية، فضلاً عن ذلك فقد استخدمت هذه الطحالب في معالجة الإسهال والسعال والحمى(Evans 1986 و Vlachos *et al*., 1997).

أن معظم مضادات الحيوية المستخدمة حاليًا تنتج من قبل البكتيريا الخيطية إلا أن بعض الحالات الممرضة الناجمة عن بعض الإصابات الجرثومية بقيت صعبة المعالجة كتلك الناتجة عن الإصابة بـ *Pseudomonas* وذلك لكون معظم أنواع هذه الجراثيم مقاومة للمضادات الحيوية (Metting & Pyune , 1986)

تعد الطحالب من المصادر الجيدة لانتاج مضادات الجراثيم، فقد أشارت العديد من الدراسات إلى إنتاج مواد مضادة للجراثيم من هذه الكائنات(Kreitlow *et al* ., 1999 و Schlegel *et al*., 1999 و Mundt *et al*., 2001). أظهرت إحدى الدراسات التي شملت 300 سلالة من طحالب المياه العذبة إن 36 سلالة من الطحالب كانت فعالة ضد جراثيم *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilus* الموجبة لملون كرام ، في حين لم تظهر تلك الفعالية ضد جرثومة *E.coli* السالبة لملون كرام(Cannell. *et al* .,1988).

وجد في دراسة أخرى شملت 132 سلالة من الطحالب البحرية وحيدة الخلية أن 28 سلالة كانت قد أظهرت فعالية ضد جرثومة *Staphylococcus aureus* الموجبة لملون كرام في حيــن لم تظهر الفعالية ضد كل من *E.coli* و *Strptococcus faecalis* و *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas sp.* (Kellam &Walker, 1989) . وتناولت دراسة أخرى شملت 306 سلالة من الطحالب البحرية إن 64 سلالة منها تأثر في نمـــو *Staphylococcus aureus* المقاومـــة للمثيسيليــن (Horikawa *et al* .,1999) .وكانت الجراثيم الموجبة لملون كرام أكثر حساسية من السالبة لملون كرام عند استخدام مستخلصات 56 نوع من الطحالب البحرية ضمن شعبة الطحالب الخضر والبنية والحمر (Vlachos *et al* ., 1997) . أوضح ميسيمار وأبو سعود Mesmar & Abussaud , (1991) أن بعض طحالب المياه العذبة أظهرت تأثيراً تثبيطيا تجاه كل من *Staphylococcus aureus* و *E.coli.* أعلى ممأظهرته الطحالب البحرية والتي كانت فعالة فقط ضد *Staphylococcus aureus*.

عليه أصبح من الضروري البحث عن مواد علاجية جديدة من مصادر مختلفة . وتعد المنتجات الطبيعية مركبات فعالة جديدة ممكن أن تتطور إلى مواد علاجية (Bernan, 2002) ،كما أ ن إنتاج مضادات الجراثيم في البيئة ذي فائدة للكائن المنتج من خلال تنافسه مع الكائنات الآخرى على المكان والغذاء (Bamesemir *et al* ., 2002) .

المواد و طرائق العمل .

العينات :

تم الحصول على عزلة الطحلــب الأخضـــــر *Chlorella vulgaris* (Beyrinck)5 (AUFRC) من قسم الأسماك في دائرة البحوث الزراعية والبيولوجية – منظمة الطاقة الذرية العراقية السابقة ، أما نماذج الجراثيم فقد عزلت من مختبرات مستشفى الرمـــادي العام .

تم إجراء التشخيص التأكيدي على عزلات الجراثيم المشخصة أوليا في مختبرات مستشفى الرمادي العام ، حسب الطرق المتبعة (Vollum *et al*.,1970 و Seeley &

VanDemark,1981 وBaron & Finegold,1990) . أتبعت طريقة باور وآخرين(1966)., Bauer *et al* لإختبار حساسية عزلات الجراثيم لبعض مضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في مستشفيـــات العراق (الجدول 1)

الجدول(1) المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز مايكروغرام μg	الشركة المجهزة
Trimethoprim+sulphomthaxazol	SXT	1.25+23.75	مصنع الرازي
Nalidixic acid	NA	30	Oxoid
Chloramphenicol	C	30	Oxoid
Nitrofuronatoin	FT	300	مصنع الرازي
Tetracycline	TE	30	مصنع الرازي
Cephalexin	Ceph	30	مصنع الرازي
Ampicillin	Am	10	Oxoid
Polymxin B	PB	30	Oxoid
Vancomycin	Vanc	30	Oxoid
Lincomycin	Line	15	مصنع الرازي
Penicillin G	PG	10.IU	مصنع الرازي
Amoxillin	Amox	10	مصنع الرازي
Ampiclox	AX	30	Oxoid

تم تنمية الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* في وسط Chu 10 وحضن في درجة ْ25م (Samejima & Myers, 1958) وشدة اضاءة 32 مايكرواينشتاين/م2/ثا ،

ولغـــرض الحصول على المزارع الكتلوية تـــم استخدام المزارع الثابتـــــة (Eppley ,1977) ، وتم تحديد منحنى النمو من خلال إحتساب عدد الخلايا يومياً وعلى مدى ثلاثة أسابيع وتم تحديد المدة الزمنية التي يمر بها كل نوع.

استخلاص المواد الفعالة الخام من الطحلب الاخضر (Hadi,1981) Chlorella vulgaris:

الاستخلاص باستخدام المذيبات آلاتية :

أ. الإيثانول 80% في ْ80م لمدة 4 ساعات ، تم االأستخلاص بالإيثانول 80% في ْ80م لمدة 4ساعات وهي تحوير لطريقة (Vlachos *et al.*, 1996) إذ تم إذابة 250ملغم من المجفف المطحون بشكل جيد في 10مل من الأيثانول 80% فـــي قنينة زجاجية محكمة الغلق ووضعت في الحمام المائي لمدة 4 ساعات في ْ80م. بعدها تم عرض المستخلص للنبذ في 3000دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة للـــتخلص من البقايا الخلوية ، بعدها بخر الراشح بالمبخر الدوار في ْ50م ثم جفف للحصول على المستخلص بالشكل الجاف. ثم حضر المستخلص الاولي بتركيز 250ملغـــم /مل باستخدام نفس المذيب للبحث الاولي للفعالية.

ب. تم سحق المجفف بشكل جيد ثم وزن 250ملغم منه وذوب في الميثـــانول 98% بعدها تم عرض المستخلص للنبذ في 3000دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة للـــتخلص من البقايا الخلوية ، بعدها بخر الراشح بالمبخر الدوار في ْ50م ثم جفف للحصول على المستخلص بالشكل الجاف. ثم حضر المستخلص الاولي بتركيز 250ملغـــم /مل باستخدام نفس المذيب للبحث الاولي للفعالية

أستخدم عدد من عزلات الجراثيم لتحديد الفعالية ضد الجرثومية للمستخلصات الخـــام بطريقـــة الانتشار فـــي الوســـط الصلب طبـــقاً لطريقـــة باور وآخـــرين (Bauer *et al.*, 1966) والمحورة مـــن قـــبل منظمـــــة الصحـــــة العالمـــــية (Vandepitte *et al* ., 1991.

كما درس تأثير عمر المزرعة في الفعالية المضادة للجراثيم ،إذ تم حصاد المزرعة في كل من الطور اللوغاريتمي Logarithmic phase وطور الثبات Stationary phase،ثم درست الفعالية ضد الجرثومية كما في الفقرة السابقة .

حدد التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الايثانولي لطحلب *Chlorella vulgaris* اذ حضرت التراكيز(0. 9 و8.1 و3. 6 و2.7 و 14. 4 و 29و 58) ملغرام/مل تجاه عدد من عزلات الجراثيم (Collee *et al* .,1996).

تم اختبار حساسية كل من *E.coliU* و *Proteus mirabilis E* و *Staphylococcus aureus E1* للمضاد الحيوي Cephalexin باعتبارها العلاج المختار لهذه الانواع من الجراثيم (Sande &Mandell , 1985) و بحسب طريقة بور وآخرين (Bauer *et al.*, (1966 والمحورة من قبل منظمة الصحة العالمية (Vandepitte *et al* .,1991) .

النتائج والمناقشة :

جمعت نماذج ممرضة مختلفة من مستشفى الرمادي العام و عزلت منها بعض العزلات الجرثومية .أستخدم الحرف الأول من كلمة النموذج الذي عزلت منه الجرثومة للدلالة على مصدر العزلة الجرثومية (الجدول 2).

الجدول(2) : انواع الجراثيم المعزولة قيد الدراسة ومصادر عزلها

الرمز	المصدر	عزلات الجراثيم
S1	Stool	*E.coli*
S2	Stool	*Salmonella sp.*
S3	Stool	*Shigella flexnerii*
4S	Soil	*Bacillus subtilus*
W1	Wound swab	*Pseudomonas aeruginosa*
W2	Wound	*Klebsiella pneumonia*
W3	Wound swab	*Proteus vulgaris*
E1	Ear swab	*Staphylococcus aureus*

E2	Ear swab	*Proteus mirabilis*
E3	Ear swab	*Pseudomonas aeruginosa*
E4	Ear swab	*Staphylococcus aureus*
E5	Ea swab	*Staphylococcus aureus*
E6	Ear swab	*Proteus merabilis*
U1	Urine	*Klebsiella pneumonia*
U2	Urine	*Staphylococcus aureus*
U3	Urine	*E.coli*
U4	Urine	*E.coli*

استخدمت العزلات الجرثومية القياسية الأتية:

Pseudomonas ATCC 6790

E.scoli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

شخصت الانواع بإجراء بعض الفحوصـــات المجهريـــة والزرعيـــة والاختبارات الكيموحيويـــة اعتمـــاداً على بعض المصادر العلمية المتبعة لهذا الغرض علماً أن تلك العزلات شخصت أولياً من قبل مختبر مستشفى الرمادي العام أيضا(الجدول 3).

الجدول (3): الاختلافات الشكلية والكيموحيوية للانواع قيد الدراسة.

الاختبارات / عزلات الجراثيم	أكار الدم	أكار الماكونكي	أختبار الحركة	إنتاج أنزيم الجيلاتينيز	انتاج انزيم اليوريس	تحرير H2S	إنتاج أنزيم الأوكسيديز	إنتاج انزيم الكتليز	هضم السترات	فوكس بروسكاور	أحمر المثيل	إنتاج الأندول	صبغة كرام	الشكل
Proeus merabilis E_2	+	شاحب	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	-	عصوي
Pseudomonas aeruginosaE_3	+	شاحب	+	+	−	−	+	+	+	−	+	-	-	عصوي
Proteus merabilis E_6	+	شاحب	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	-	عصوي
E.coli S_1	+	وردي	+	−	−	−	−	+	−	−	+	+	-	عصوي
Salmonella S_2	+	شاحب	+	−	−	+	−	+	+	−	+	−	-	عصوي

Shigella flexnrii S_3	+	شاحب	−	−	−	−	−	−	−	+	+	-	عصوي
Klebsiella pneumoniaeU_1	+	وردي	−	-	+	−	−	+	+	−	−	-	عصوي
E.coli U_3	+	وردي	+	−	−	−	+	−	−	+	+	-	عصوي
E.coli U_4	+	وردي	+	−	−	−	+	−	−	+	+	-	عصوي
Pseudomonas aeruginosaW_1	+	شاحب	+	+	−	−	+	+	−	−	+	-	عصوي
Klebsiella pneumoniaW_2	+	وردي	−	-	+	+	+	−	−	−	−	-	عصوي
Proteus vulgaris W_3	+	شاحب	+	+	−	−	+	−	+	+	+	-	عصوي

(+) : نتائج موجبة، (−):نتائج السالبة.

أن جميع النماذج المدروسة كانت حاوية على الجراثيم الممرضة ، إذ يلاحظ مثلاً سيادة النوع E.coli في عينات البراز والإدرار .عزلت السالمونيلا والشيكلا من نماذج البراز أيضاً في حين أن الجروح كانت ملوثة بالزوائف الزنجارية والمتقلبات،وعزلت المكورات الذهبية من نماذج مسحات الأذن.

حساسية عزلات الجراثيم للمضادات الحيوية:

درست حساسية عزلات الجراثيم للمضادات الحيوية وحددت العزلات التي تمتلك ظاهرة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (الجدول 4).

الجدول(4): حساسية الانواع الجرثومية لبعض مضادات الحيوية

عزلات / الجراثيم / مضادات الحيوية	*S.aureus E1*	*2P.merabilis E*	*P.aeroginosa E.3*	*Staph. aureus E4*	*Staph. aureus E5*	*P.merabilis E6*	*E.coli S1*	*Salmonella S2*	*Shigella S3*	*B.subtilas S4*	*K.pneumoniae U1*	*S.aureus U2*	*E.coli U3*	*E.coli U4*	*IP.aeruginosa W*	*K.pneumoniae W2*	*P.vulgaris W3*
Trimethoprim+ sulfsamethoxazole	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S
Nalidixic acid	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S

S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	Cephalexin
R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	Tetracyline
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	Ampecillin
R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Polymyxin B
R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Chloramphenicol
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Voncomycin
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	Lincomycin
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	Penicillin G
R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	Furonatoin
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	Ampiclox
R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	Amoxacillin

(R):مقـــاومـــة،(S):حساسة

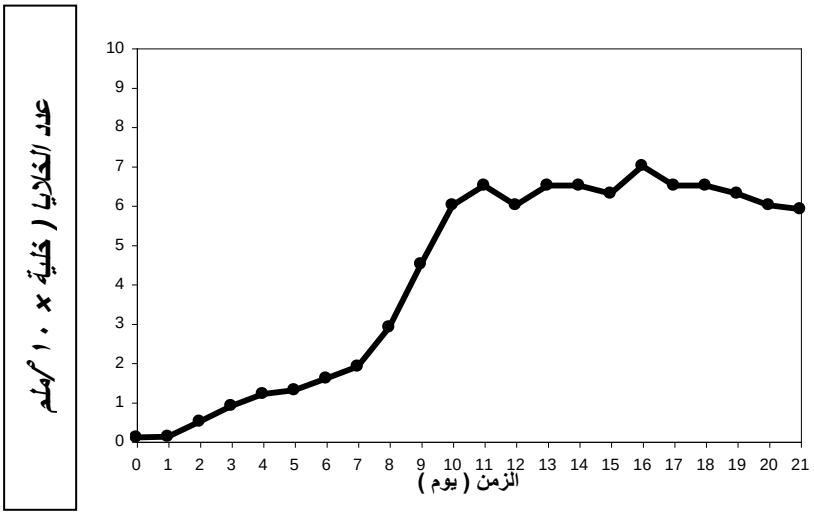
لقد وجـــد أن أغلب الانواع قـــد اكتسبت صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيويـــة وهذا مؤشر خطير يدعو إلى دراسة هذه الحالة بصورة مفصـــلة والوقـــوف علـــى أفضـــل المضادات الحيـــوية التي يجب إعطائها للمرضى المصابين بهـــذه الجـــراثيم،إذ أن ازديـــاد أعداد الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية تمـــثل مشكلة صحية حقيقية في جميـــع أنحـــاء العالم (Sanders , 1982) وبخاصة بعد تزايد المشاكل المتعلقـــة بالبنســـيلين وغيـــره مـــن مضادات الحيوية (Recio *et al.*,1984)،إذ وجد في الدراسة الحالية أن *E.coliU3* كانـــت مقاومة للمضادين الحيويين الأمبسيلين والسيفالكسين في حـــين أن E.coli U4 و *E.coli S1* كانتا حساستين للسيفالكسين، ووجد في دراسة أخرى أن E.coli كانت مقاومة لكـــــل مـــن الأمبسيلين والسيفالكسين(Jacoby&Han.1996)إن مقاومة هذه الجراثيم لهذين المضاديـــن الحيوييـــن قـــــد يرجـــع إلى إمكانيـــة امتلاكهـــا أنزيـــمات البيتالاكتـــاميزlactamase – β .(Amyes & Cennell.1997)

من جانب آخر وجد أن جرثومة *Pseudomonas aerugenosa* W1 قيد الدراسة كانت حساسة للمضادين الحيويين تتراسايكلين والبوليمكسين ب ، في حين كانت مقاومة لبقية مضادات الحيويـــة وهـــذا يتفـــق مـــع مـــا ذكـــره أوكـــان (Ogan,(1992 أن جرثومـــة

Pseudomonas كانت مقاومة للمضادات الحيوية الستربتومايسين. والبنسيلين والأمبسيلين في حين أنها كانت حساسة للتتراسايكلين ،وقد تعزى تلك المقاومة لإنتاج هذه الجراثيم لأنزيمات البيتالاكتاميز أو لإنتاج المركبات الخالبة للحديد Siderophores (Neiland & Leong. 1986 و Amyes&Cannell,1997).

كما أظهرت الدراسة الحالية أن *Klebsiella pneumoniae U1* كانت ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية ،إذ لم تظهر حساسية تجاه مضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة وهذه النتيجة مماثلة لما توصل إليه درويش، (2000) لنفس الجرثومة .

أشارت نتائج زراعة الطحالب في ظروف مختبريه مسيطر عليها إلى أن الطحلب الأخضر Chlorella vulgaris قد دخل في طور التضاعف الأسي بعد يوم واحد من الزراعة إذ ازداد النمو بشكل سريع إلى اليوم الحادي عشر ودخل بعدها في طور الثبات الذي أستمر إلى اليوم الثامن عشر عندما دخلت المزرعة في طور الانحدار (الشكل 1).



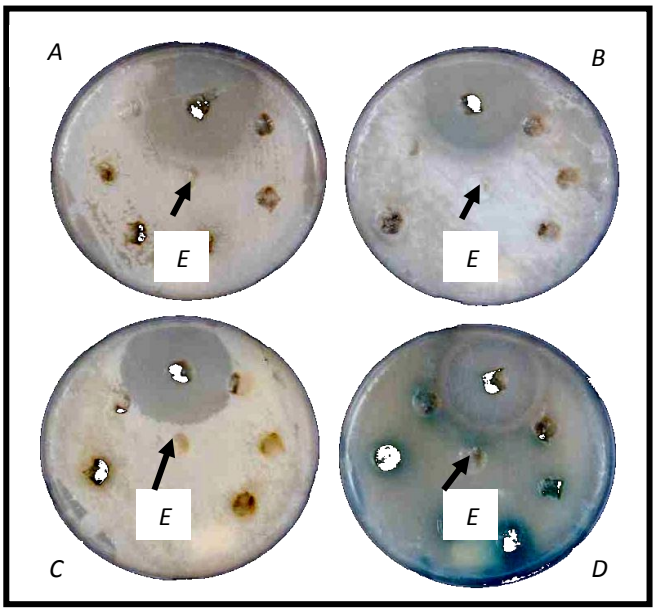
الشكل (1) منحني نمو الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* المستزرع في 25° م وشدة إضاءة 32 مايكروانشتاين /م2/ثا

وفيما يخص نمو مزارع الطحالب فأنها ممكن أن تختلف تبعاً للنوع ولظروف التنمية ، فقد وجد ،ان الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* فقد وصل إلى نهاية طور التضاعف الأسي في اليوم الحادي عشر.أن الاختلاف في الوصول إلى أطوار النمو بين مزارع الأنواع المختلفة من الطحالب يعود إلى عدة عوامل منها تركيز المغذيات وزمن الجيل وقابلية الأنواع المختلفة على سرعة الاستفادة منها واستهلاكها إضافة إلى مديات تحمل النوع لظروف التنمية من حرارة وإضاءة وغيرها (Stewart.1974).

كما حصدت مزارع الطحلب الأخضر *C.vulgaris* في اليوم الحادي عشر وكان مقدار وزنه الجاف 047.0غرام / لتر من الوسط الزرعي . في ظروف مسيطر عليها من حيث درجات الحرارة والإضاءة . إذ تمت التنمية عند شدة إضاءة 32 مايكرواينشتاين / م2/ثا وقد تم تجهيز الإضاءة بشكل مستمر اعتماداً على Falch *et al*,.(1995) و (Piccardi *et al*.,2000

وجد أن مزرعة الطحلب الأخضر *C.vulgaris* قد أعطت وزناً جافاً قدره 047.0 غرام / لتر، لقد حصدت مزارع الطحالب في نهاية طور التضاعف الأسي إذ أن المواد الفعالة تكون أكبر في هذه المدة وأن النمو يكون عندئذ في طوره الأعلى (Copper *et al* ., 1983 و Oufdau *et al* ., 2001) .

أشارت النتائج إلى أن الأستخلاص بالأيثانول بتركيز 80% في درجة حرارة 80°م لمدة أربع ساعات هو أفضل الطرائق لإستخلاص المواد الفعالة الخام من الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* .إذ وصل قطر التثبيط إلى 35ملم لجراثيم السالبة لملون كرام W3 *Proteus vulgaris* و40 ملم لكل من U4 *E.coli* والجرثومة القياسية السالبة لملون كرام 25922 *E.coli ATCC* و32 ملم للجراثيم الموجبة لملون كرام U2 S. aureus ،و33 ملم للجراثيم الموجبة لملون كرام القياسية 25923 *S.aureus ATCC*. في حين أظهرت طريقة الأستخلاص بالميثانول فعالية تثبيطية ضد جراثيم U2 S. aureus وبقطر 10ملم (الشكل 2 والجدول 5).



الشكل(2) الفعالية التثبيطية للمستخلص الايثانولي للطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* في بعض الجراثيم قيد الدراسة المرضية.

A- *Staphylococcus aureus E1*
B- *Proteus merabilis E2*
C- *Pseudomonas aeruginosa W1*
D- *Pseudomonas aeruginosa E3*
E- المقارنة (ايثانول 80 %)

الجدول(5):أقطار تثبيط الانواع الجرثومية(ملم)المعاملة بالمستخلص الايثانولي والميثانولي للطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris*

عزلات الجراثيم	قطر تثبيط المستخلص ايثانولي + 80 % 80 مْ	طورالميثانول
Staphylococcas aureus E1	-	-

-	34	*Proteus merabilis E2*
-	30	*E.coli S1*
-	30	*Bacillus subtilus S4*
-	-	*Klesiella pneumoniae U1*
١٠	32	*Staphylococcus aureus U2*
-	35	*E.coli U3*
-	40	*E.coli U4*
-	28	*Pseudomonas aeruginosa W1*
-	-	*Klebsiella pneumoniae W2*
-	35	*Proteus vulgaris W3*
-	40	*E.coli ATCC 25922*
-	33	*Staphylococcus aureus ATCC 25923*
-	40	*Pseudomonas ATCC6790*

(–): عدم وجود الفعالية

لوحظ أن قطر التثبيط للانواع المختلفة في الدراسة الحالية كانت أكثر مما أظهره نوعان من الطحالب الخضر (*C. emersonii* و *C.vulgaris*) والذي بلغ 1 و 4 ملم على التوالي ضد B. subtilus (Cannell *et al* .,1988) . كما وجد في دراسة أخرى أن قطر التثبيط الذي أظهره مستخلص الطحلب الأخضر *C.stigmatophora* كان 5.1 ملم ضد *Staph..aureus* ولم يظهر نوع آخر من الطحالب الخضر (*Chlorella* spp .) أي تأثير ضد *Staph.aureus* (Kellam & Walker. 1989). أن تأثر الجراثيم الموجبة لملون كرام في الدراستين السابقتين كان واضحاً إذ لم تظهر المستخلصات أي تأثير ضد الجراثيم السالبة لملون كرام المستخدمة .أن التباين في تأثر الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام قد يعود إلى فعالية المادة المستخدمة أو على

الاختلاف في تركيب جـــدار الخلية للنوعين مــن الجراثيم (Atlas,1984). كذلك درست حساسية بعض الانواع الجرثومية للمضاد الحيوي سيفالكسين للمقارنة وبلغ أعلى قطر تثبيط 20ملم *للعزلة Staph.aureusE1* ثم (17و١٥) مام للعزلتين *E.coli S1* و *P. merabilis E2* على التوالي (الجدول 6).

الجدول(6): قطر التثبيط لبعض الجراثيم الحساسة للمضاد الحيوي

Cephalexin بتركيز ٣٠مايكروغرام

الجراثيم	قطر التثبيط(ملم)
Proteus merabilis E2	15
E.coli S1	17
Staphylococcus aureus E1	20

أتضح من خلال الدراسة الحالية أن الحد الأدنى لقطــر التثبيط في أنــواع الجــراثيم المستخدمة هو أعلى مــن الحد الأعلى لقطر التثبــيط فــي دراســات أخــرى Kellam & Walker.1989) و Vlachos *et al* ., 1999 و Hellio *et al* ., 2000)،

لم تسجل فعالية مضادة للجراثيم للمستخلصات في منتصف طور التضاعف الأســي وأن الفعالية تبقى في طور الثبات ولو بكفاءة أقــل مما هي عليــه في نهاية طور التضــاعف الأسي(الجدول7).

الجدول(7):أقطار التثبيط (ملم) لمستخلصات الطحالب في طوري التضاعف ألاسي والثبات للانواع الجرثومية المختلفة. الفعالية.

عزلات الجراثيم	Chlorella vulgaris	
	طور الثبات	منتصف طور التضاعف الأسي

4	4	*Pseudomonas ATCC 6790*
-	-	*E.coli ATCC25922*
-	-	*Staphylococcus aureus ATCC 25923*
-	5	*Staphylococcus aureus E1*
2	3	*Proteus merabilis E 2*
-	7	*E.coli S1*
-	5	*Bacillus subtilus S4*
-	2	*Klebsiella pneumoniae U1*
-	7	*Staphylococcus aureus U2*
2	3	*E.coli U4*
-	7	*Pseudomonas aeruginosa W1*

(–):عدم وجود

فقد وجد أن الفعالية ضد الجرثومية لمستخلص للطحلب الأخضر *C.vulgaris* انخفضت في منتصف طور التضاعف الأسي وبلغت 2ملم ضد كل من *E.coli* U4 و *P.merabilis E2* و4 ملم ضد *Pseudomonas* ATCC 6790.في حين ظهرت الفعالية ضد العديد من عزلات الجراثيم في طور الثبات وانحصرت أقطار التثبيط بين 2–7 ملم باختلاف أنواع الجراثيم .إلا أن معدل التثبيط هو أقل مما ظهر في نهاية طور التضاعف الأسي .

أن فعالية مستخلصات الطحالب ضد الجراثيم تكون أكبر في نهاية طور التضاعف الأسي إذ تكون الأحياء المجهرية في هذه الفترة فتية ايضيا وحياتياً عليه تمتلك فعالية أيضية عالية (Frobisher *et al.*, 1974).

وبالرغم من ظهور الفعالية التثبيطية لمستخلص الطحلب الأخضر *C.vulgaris* عند الاستخلاص بأكثر من مذيب فأنه من المحتمل أن هناك أكثر من مادة فعالة

ولكل منها مذيب خاص أو أن المادة الفعالة هي نفسها إلا أنها تركزت باستخدام الحرارة 80 م وبالتالي أصبحت ذات تأثير أكبر إذ أن زيادة تركيز المادة الفعالة يؤدي إلى زيادة الفعالية . فقد أشار نافينير وآخرين (Naviner *et al*.,1999) إلى أن قطر التثبيط للطحلب *Skeletonema costatum* زاد من 9 ملم ضد *Listolonella augullainum* إلى 15 ملم للمستخلص المنقى.

وجد أن التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الإيثانولي للطحلب الأخضر *C.vulgaris* كان 9.0ملغرام /مل (الجدول 9).

الجدول (9) : التركيز المثبط الأدنى لمستخلصات الطحلب الأخضر

Chlorella vulgaris

عزلات الجراثيم	التركيز المثبط الأدنى(ملغم/مل)
	C.vulgaris
Klebsiella pneumoniae W2	-
E.coli U3	0.9
Staphylococcus aureus U2	0.9

أما فيما يخص التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات الخاصة بالطحالب فأن هناك ندرة في الإشارة إليه في البحوث إلا عند إجراء عمليات تنقية للحصول على مركبات نقية ، فقد وجد أن MIC لمركب معزول من طحلب *Stypopodium fabelliforms* كان 50 مليغرام /مل ضد *B.subtilus* و *S.epidermidis* (Rovirosa & San-Martin,1997) ، في حين كان MIC لمستخلص الطحلب *Jolyna laminoroides* 175.0 مليغرام /مل تجاه *Staph.aureus* و *Shigella duysenteriae* (Rahman *et al*.,1997). أما في الدراسة الحالية فوجد إن التركيز المثبط الأدنى للطحلب الأخضر *C.vulgaris* كان 9.0 مليغرام/مل وضد عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام لذا نتوقع أن تكون المادة الفعالة واسعة الطيف في تأثيراتها التثبيطية .

References

- Jawetz,M.; Adelberg,E.;Brook,G.F.; Butel, J.S.;Melink,J.and Ornston, L.N.(1995).Medical Microbiology.20ed: Appleton and Lange.
- Franklin, J.J.(1987). Bacterial resistance to antibiotics. In: Pharmaceutical Microbiology(eds: W.B ,Hugo, and A.D .Russell,).4th ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford ,London.
- Hugo,W.B. and Russell, A.D.(1989). Pharmaceutical microbiology . 4th ed . Black Well Scientific Publication. Oxford,London
- Thomas,G.C.(1973).Medical Microbiology. 3 rd, ed. Bailliers.Tindall, London
- Sande,M.A.and Mandell,G.L.(1985). Chemotherapy of Microbial Diseases. Antimicrobial Agents.In: Goodman and Gilmans pharmacological Basis of theraputics(eds: A.fred Gilman;L.S.Goodman ;T.W.Rall and F. Murad), 7th ed. Macmillan Publishing Company, Newyork, Toronto, London
- Frobisher, M.; Hinsdill, R.D.; Crubtree, K.T.and Good heart, C.R.(1974). Fundamentals of Microbiology. 9th ed .W.B.Saunders Company . Philadelphia,London
- Atlas, R,M.(1984). Microbiology . Fundamental and Applications . 1 st .ed.Macmillan. New york
- Hoppe,H.A.(1979). Marine algae and their products and constituents in pharmacy.In: Marine Algae in Pharmacutical Science. (eds. H.A.Hoppe; T. levring.and Y. Tanaka). Wlter de Gryter, Berlin .
- Evans, L.V.(1986) .Seaweed. Bioproducts . Science Progress.70:287-303.
- Vlachos,V;Critchley,A.T.and Van-Holy,A.(1997).Antimicrobial activity of extracts from selected Southern African marine algae. South African J. Science,Vol.93.328-332.
- Metting, B. and Dyne, J.W.(1986).Biologically active compound from microalgae. Enzyme Microb.Tecnol.8:386-394
- Kreitlow,S.M.;Mundt,S.;Lindequist,U.(1999).Cyanobacteria a potential source of new biologically active substances. J.Biotechnol,30(1-3):61-3
- Schlegel, I; Doan ,N.T; Chazal, N. D .and Smith. G .D.(1999).Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from

Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. J .Appl .phycol, 10:471-479.

- Mundt,S.;Kreitlow,S.;Nowotny,A.and Effmert,U.(2001).Biochemical and pharmacological investigation of selscted cyanobnacteria. International J. Hygien and Environmental Health,203(4):327-334
- Cannell , R.J.P.; Owsianka, A.M .and Walker, J.M.(1988). Results of a large-Scale Screening programms to detect antibacterial activity from fresh water algae .Br.Phycol , 23:41-44
- Kellam, S.J .and Walker , J.M.(1989).Antibacterial activity from microalgae in laboratory culture. Br.Phycol, 24:191-194
- Horikawa, M.; Nora, T. and Kamei, Y.(1999). In vitro Anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus activity found in extracts of marine algae indigenous to the coast line of Japan. J. Antibiotics, 52. (2).186-189
- Mesmar,M.N.and Abussaud,M.(1991).The antibiotic activity of some algal extracts from Jordan.Qatar University Science Bulletin, 11 (10): 155-160
- Bernan , V.S.(2002) . Mining Marine Microorganisms as source of new natueal products. In: Book of Abstracts. Natural products from marine microorganism. An international symposium held under auspices of the European Society of Marine Biotechnology. Greifswald,Germany.

- Banesemir , A. ; Holldorf , S. ; Lindequist , U . (2002) . Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria . In: Books of Abstracts . An natural products from marine microorganism. International Symposium held under auspices of the European Society of Marine Biotechnology. Greifswald, Germany

- Vollum,R.V;Jamison,D.G.and Cummins,C.S.(1970).Fairbrothers Text book of Bacteriology.Tenth.ed.Willium Heineman.Medical Book LTD.
- Baron , E.J . and Finegold , S . M .(1990).Baily and Scott's Diagnostic Microbiology .8 th ed .C . V Mosby Comp.USA.

- Seeley,H.W.and Van Demark,P.J.(1981).Microbs in action.Alaboratory Mannul of Microbiology.3rd ed,Freeman and Company. Newyork
- Bauer , A.W. ; Kirby , W.A.M. ; Sherris , J. S. and Turk, M.(1966).Antibiotic susceptibility testing by a standardized singl disk method. Amrican .J .Clin. Pathol, 45:493-496
- Samejima,H.and Myers,J.(1958).On the Heterotrophic growth of Chlorella Pyrenoidosa.J.Gen.Microbiol,18:107-117
- Eppley,R.W.(1977).The growth and culture of diatom. in: The Biology of Diatom (ed. D. Wermer,) Botanical Monograph.13.Univ. of California press,Berkely
- Hadi,R.A.M.(1981).Algal studies of the River USK,Ph.D.Thesis, Univ. College,cardiff
- Vlachos,V:Critchley,A.T.and Van Holy,A.(1996).Establishment of protocol for testing antimicrobial activity in Southern African macroalgae. Microbios,88:115-123
- Vandepitte,J;Engbaek,K;Piot,P.and Heuck,C.C.(1991).Basic laboratory procdures in clinical bacteriology.Warld Health Organization. Geneva
- Collee, G. ; Fraser, A.G.; Marmion,B.P. and Simmons, A . (1996) . Makie and MeCartney. Practical Medical Microbiology. 14th edition.New-york
- Sanders,J.R.(1982).Genetics and evolution of antibiotic resistance .British Medical Bulletin,40(1):54-60.
- Recio,M.C;Rios,J.L.and Viller,A.C.(1984).A reviw of some antimicrobial compound isolated from medical plants.Reported in the Litreture (1978-1988). Phytotherapy Res,3(4);117-123
- Jacoby, G.A . and Han,P.(1996).Detection of extended spectrum lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and E.coli. J.Clin .Microbiol, 34: 908-911.
- Amyes, S. and Genmell, C. C. (1997).Antibiotic resistance: Review . J.Med .Microbiology, 46: 436-470.
- Ogan,M.T.(1992).Microbiological quality of bottled sold in retialoutlets in Nigeria . J.App.Bacteriol,73.(2):175-181s
- Neilands,J.B.and Leong,S.A.(1986). Sirerophores in relation to plant disease .Ann.Rev.plant.physiol.37:187-208

- Stewart,W.D.P.(1974). Algal physiology and biochemistry. Botanical Monographs.California press
- Piccardi,R.;Frosini,A.;Tredici,M.R.and Morgheri,M.C.(2000)Bioactivity in free-living and Symbiotic cyanobacteria of the genus Nostoc.J . Applied Phycology.12:543-547
- Falch,B.S.;Konig, G.M.;Wright,A.D.;Sticher, O.;Angerhofer, C.K.; Pezzuto , J .M. and Bachman,H.(1995). Biological activity of Cyanob acteria: Evolution of extracts and pure compound. Plante .medicin.16:321-328.
- Oufdau,K.;Mezrioui,N.;Oudra,B.;Loudiki,M.;Barakate,M.and Sbiyyaa,B. (2001).Bioactive compound from Pseudoanabaena species (cyanobactria).Microbiology,106:21-29
- Cooper, S .;Battat, A.;Marto, P.and Sylvester, M.(1983).Production of an antibacterial activity by the Bacillariophyceae grown in dialysis culture. Canadian.J.Microbiology,29:338-341.
- Hellio, C.; bremer, G.;Pons, M.A. and LeGal, Y.(2000).Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France , Applied-Microbiology. Biotechnology,54:543-549
- Vlachos, V; Critchley, A.T. and Van-Holy, A. (1999). Defferential antibacterial activity of extracts from selected Southern African macroalgal Thalli. Botanica Marine, 42:165-173.
- Naviner,M.:Berge,J.B.;Durand,P.and Bris,H.(1999).antibacterial activity of the marine diatom Skeletonema costatum against aquacultural pathogens. Aquaclture,174:15-24
- Roveirosa,J.and San-Martin,A.(1997). Antimicrobial activity of the brown alge Stypopodium fiabelliform constituents . Fitoterapia,68(5):473-475
- Rahman,A.Choudhary,M.I.:Majeed,A.:Shabbir,M.;Ghani,A.and Shameel,M.(1997).Asuccinyl anthranilic acid ester and other bioactive constituent of Jollyna Iaminoriodes Phytochemistry, 46(7);1215-1218
- درويش، محمد احمد (2000). عزل وتشخيص الكليبسيلا من التربة والحالات المرضية ودراسة حساسيتها للمضادات الحياتية وفعالية أنزيم النيتروجينيز.رسالة ماجستير . جامعة الأنبار

- مولود، بهرام خضر وسليمان، نضال إدريس والبصام، إبراهيم توفيق (١٩٩٠). الطحالب والاركيكونيات . مطبعة دار الحكمة، بغداد.

Antibacterial activity of ethanolic and methanolic extracts of green algae against some bacteria

Salah S. Zain Al Abdeen Hassan A. AbdAlredha** Raaer Ibrahim Kassim****

**Kirkuk Univ.College of Science*

***Baghdad Univ. College of Veternary *** Baghdad Univ. Genetic Engeneering and biotechnology institute*

Abstract

The study was conducted to evaluate the antibacterial , activities of the extracts of the green algae, Chlorella vulgaris.

The pathogenic bacteria was isolated and identified from different samples including urine , stool , ear swab , wound swab and one bacteria isolated from soil .The multiple antibiotic resistance of bacterial isolates was examined against different antibiotics used in this study , the results showed that Staphylococcus aureus E4 resistant to six antibiotics, where as Klebsiell pneuomoniae U1 appear resist to all antibiotics used .

The growth phases of algae were determined and the cultures were harvested at the end of logarithmic phase .The cultures of green algae gave 0.047gm/L..

Results showed that the extraction by ethanol 80% at 80C° for 4 h is the best method for extraction of crude materials from green algae .In spite of the appearance of some activity in the stationary phase ,results indicated that ethanolic extract of the green algae at the end of logarithmic phase have broad effects on gram positive and gram negative bacteria,which are resistant to different antibiotics .The results also showed that MIC of of ethanolic extract from the green algae Chlorella vulgaris is 0.9 mg/ml aginst E.coliU3 and Staphylococcus aureua U_2.