

الفعالية التثبيطية للمستخلص الإيثانولي والميثانولي للطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* 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 الإدراج 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 ابتدها 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 0.470 غرام وزن جاف / لتر .

أظهرت النتائج أن الاستخلاص بالإيثانول بتركيز 80% في درجة حرارة 80°م لمدة أربع ساعات كان أفضل طريقة لإستخلاص المواد الفعالة الخام من الطحلب الأخضر، كما وجد أن المستخلص الإيثانولي للطحلب الأخضر كانت ذو طيف واسع في تأثيره على الجراثيم الممرضة الموجبة والسالبة لملون كرام والمقاومة لعدد من مضادات الحيوية . وكان أفضل إنتاج للمواد الفعالة في نهاية طور التضاعف الأسي. كما وجد أن التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الإيثانولي للطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* يساوي 9.0 ملغم / 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 Narrow 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* مثلاً 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 & Russell, 1989) .

فيما يخص الطحالب الخضراء فهي تمتاز بلونها الأخضر العشبى 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 الرئيسية فيه هي الكلوروفيل أ،ب Chlorophyll a,b ويحوي صبغة الليوتين Leutein إضافة إلى الكاروتينين Carotein والزانثوفيل Xanthophyll والتي لا توجد في غيره من الطحالب ، كما يتكون جدار الخلية من السليلوز Cellulose والمانوز Manose أو الزايلان Xylan (Atlas,1984 و مولود وآخرين،1990).

تعيش هذه الطحالب في المياه العذبة والترربة الرطبة وعلى الأشجار ، وأغلب هذه الطحالب حرة المعيشة و يعيش بعضها على الحيوانات المائية أو داخل النباتات الأرضية . تتكاثر خضرياً ولاجنسياً أو جنسياً (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 خاصة 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 حالياً 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 لإنتاج 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 subtilis* 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 حين 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 نمو *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسيلين (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 الخضراء والبنية والحمراء (Vlachos et al., 1997). أوضح ميسيمار وأبو سعود , Mesmar & Abussaud (1991) أن بعض طحالب المياه العذبة أظهرت تأثيراً تثبيطياً تجاه كل من *Staphylococcus aureus* و *E.coli* أعلى مما أظهرته 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 أن إنتاج مضادات الجراثيم في البيئة ذي فائدة للكائن المنتج من خلال تنافسه مع الكائنات الأخرى على المكان والغذاء (Bamesemir et al., 2002).

المواد وطرائق العمل .

العينات :

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

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

VanDemark,1981 و Baron & Finegold,1990) . أتبعنا طريقة باور وآخرين (Bauer et al ., (1966) لإختبار حساسية عزلات الجراثيم لبعض مضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في مستشفيات العراق (الجدول 1)

الجدول (1) المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة

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

تم تنمية الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* في وسط Chu 10 وحضن في درجة 25°م (Samejima & Myers, 1958) وشدة اضاءة 32 مايكرواينشتاين/م/2ثا ،

ولغرض الحصول على المزارع الكتلوية تم استخدام المزارع الثابتة (Eppley 1977)، وتم تحديد منحى 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 الآتية :

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

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

أستخدم عدد من عزلات الجراثيم لتحديد الفعالية ضد الجرثومية للمستخلصات الخام بطريقة الانتشار في الوسط الصلب طبقاً لطريقة باور وآخرين (Bauer et al., 1966) والمحورة من قبل منظمة الصحة العالمية (Vandepitte et al., 1991).

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

حدد التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الايثانولي لطحلب *Chlorella vulgaris* إذ حضرت التراكيز (0.9 و 8.1 و 6.3 و 2.7 و 1.4 و 4 و 29 و 58) ملغرام/مل تجاه عدد من عزلات الجراثيم (Collee et al., 1996).

تم اختبار حساسية كل من *E. coli* و *Proteus mirabilis* و *Staphylococcus aureus* للمضاد الحيوي Cephalexin باعتبارها العلاج المختار لهذه الانواع من الجراثيم (Sande & Mandell, 1985) و بحسب طريقة بور وآخين (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	<i>E. coli</i>
S2	Stool	<i>Salmonella sp.</i>
S3	Stool	<i>Shigella flexnerii</i>
4S	Soil	<i>Bacillus subtilis</i>
W1	Wound swab	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
W2	Wound	<i>Klebsiella pneumonia</i>
W3	Wound swab	<i>Proteus vulgaris</i>
E1	Ear swab	<i>Staphylococcus aureus</i>

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

استخدمت العزلات الجرثومية القياسية الآتية:

Pseudomonas ATCC 6790

E.scoli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

شخصت الانواع بإجراء بعض الفحوصات المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية اعتماداً على بعض المصادر العلمية المتبعة لهذا الغرض علماً أن تلك العزلات شخصت أولاً من قبل مختبر مستشفى الرمادي العام أيضاً (الجدول 3).

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

الشكل	صبغة كرام	إنتاج الأندول	أحمر المثلث	فوكس بروسكاور	هضم السترات	إنتاج تريم الكتلير	إنتاج أنزيم الأوكسيديز	تحرير H2S	إنتاج أنزيم اليوريس	إنتاج أنزيم الجيلاتينيز	أختبار الحركة	أكار الماكوتكي	أكار الم	الاختبارات
														عزلات الجرثوم
عصوي	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	شاحب	+	<i>Proeus merabilis E₂</i>
عصوي	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	شاحب	+	<i>Pseudomonas aeruginosa E₃</i>
عصوي	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	شاحب	+	<i>Proteus merabilis E₆</i>
عصوي	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	وردي	+	<i>E.coli S₁</i>
عصوي	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	شاحب	+	<i>Salmonella S₂</i>

عصوي	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	شاحب	+	<i>Shigella flexnrii S₃</i>
عصوي	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	وردي	+	<i>Klebsiella pneumoniae U₁</i>
عصوي	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	وردي	+	<i>E.coli U₃</i>
عصوي	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	وردي	+	<i>E.coli U₄</i>
عصوي	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	شاحب	+	<i>Pseudomonas aeruginosa W₁</i>
عصوي	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	وردي	+	<i>Klebsiella pneumonia W₂</i>
عصوي	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	شاحب	+	<i>Proteus vulgaris W₃</i>

(+) : 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

<i>P. vulgaris W₃</i>	<i>K.pneumoniae W₂</i>	<i>IP.aeruginosa W</i>	<i>E.coli U₄</i>	<i>E.coli U₃</i>	<i>S.aureus U₂</i>	<i>K.pneumoniae U₁</i>	<i>B.subtilis S₄</i>	<i>Shigella S₃</i>	<i>Salmonella S₂</i>	<i>E.coli S₁</i>	<i>P.merabilis E₆</i>	<i>Staph. aureus E₅</i>	<i>Staph. aureus E₄</i>	<i>P.aeruginosa E₃</i>	<i>2P.merabilis E</i>	<i>S.aureus E₁</i>	عزلات الجراثيم مضادات الحيوية
S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	Trimethoprim+ sulfamethoxazole
S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	Nalidixic acid

S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	Cephalexin
R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	Tetracycline
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):مقاومة،(S):حساسية

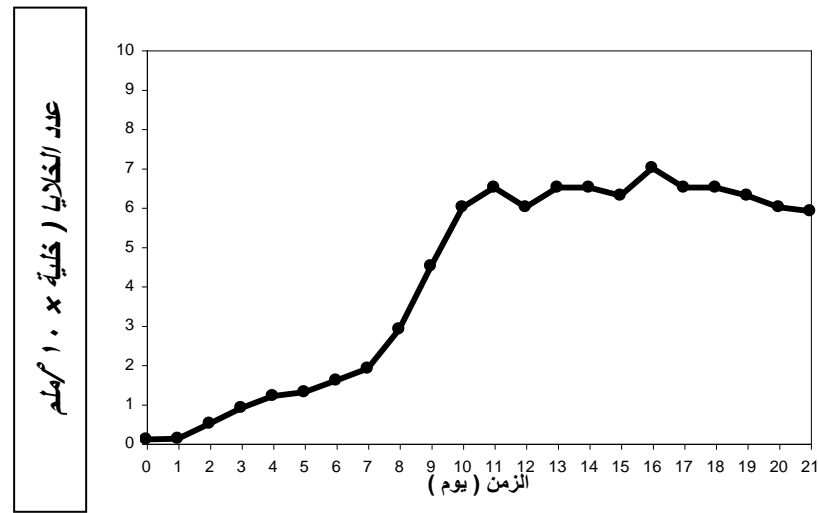
لقد وجد أن أغلب الانواع قد اكتسبت صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وهذا مؤشر خطير يدعو إلى دراسة هذه الحالة بصورة مفصلة والوقوف على أفضل المضادات الحيوية التي يجب إعطائها للمرضى المصابين بهذه الجراثيم، إذ أن ازدياد أعداد الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية تمثل مشكلة صحية حقيقية في جميع أنحاء العالم (Sanders , 1982) وبخاصة بعد تزايد المشاكل المتعلقة بالبنسليين وغيره من مضادات الحيوية (Recio et al.,1984)، إذ وجد في الدراسة الحالية أن *E.coli* U3 كانت مقاومة للمضادين الحيويين الأمبسيلين والسيفالكسين في حين أن *E.coli* S1 و *E.coli* U4 كانتا حساستين للسيفالكسين، ووجد في دراسة أخرى أن *E.coli* كانت مقاومة لكل من الأمبسيلين والسيفالكسين (Jacoby&Han.1996) إن مقاومة هذه الجراثيم لهذين المضادين الحيويين قد يرجع إلى إمكانية امتلاكها أنزيمات البيتا لاكتاميز β - lactamase (Amyes & Cennell.1997).

من جانب آخر وجد أن جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* W1 قيد الدراسة كانت حساسة للمضادين الحيويين نتراتساياكلين والبوليمكسين ب ، في حين كانت مقاومة لبقية مضادات الحيوية وهذا يتفق مع ما ذكره أوكان (Ogan,1992) أن جرثومة

Pseudomonas كانت مقاومة للمضادات الحيوية الستربتومايسين. والبنسيلين والأمبسيلين في حين أنها كانت حساسة للنتراسايكلين، وقد تعزى تلك المقاومة لإنتاج هذه الجراثيم لأنزيمات البيبتاللاكتاميز 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 مختبرية مسيطر عليها إلى أن الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* قد دخل في طور التضاعف الأسّي بعد يوم واحد من الزراعة إذ ازداد النمو بشكل سريع إلى اليوم الحادي عشر ودخل بعدها في طور الثبات الذي أستر إلى اليوم الثامن عشر عندما دخلت المزرعة في طور الانحدار (الشكل 1).



الشكل (1) منحنى نمو الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* المستزرع في 25°م وشدة

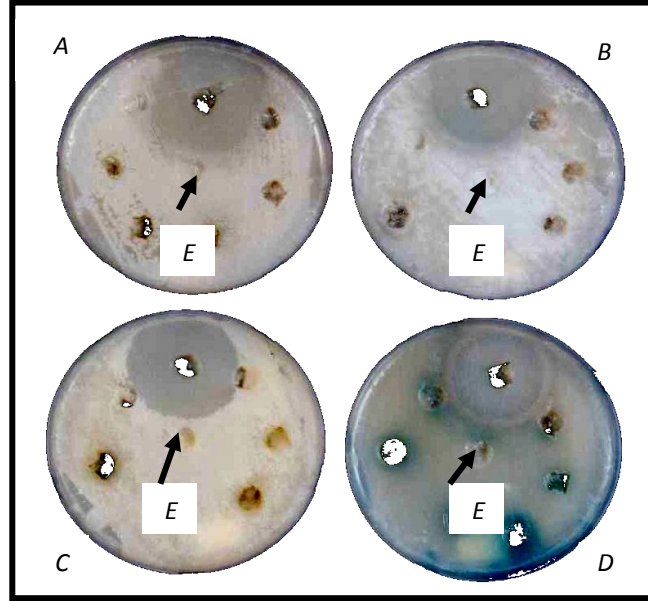
إضاءة 32 مايكروانشتاين /م²/ثا

وفيما يخص نمو مزارع الطحالب فإنها ممكن أن تختلف تبعاً للنوع ولظروف التتمية ، فقد وجد ،ان الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* فقد وصل إلى نهاية طور التضاعف الأسّي 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 التتمية من حرارة وإضاءة وغيرها (Stewart.1974).

كما حصدت مزارع الطحلب الأخضر *C.vulgaris* في اليوم الحادي عشر وكان مقدار وزنه الجاف 047.0 غرام / لتر من الوسط الزراعي . في ظروف مسيطر عليها من حيث درجات الحرارة والإضاءة . إذ تمت التتمية 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 الأسّي 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 35 ملم للجراثيم السالبة لملون كرام *Proteus vulgaris* W3 و 40 ملم لكل من *E.coli* U4 والجراثيم القياسية السالبة لملون كرام *E.coli* ATCC 25922 و 32 ملم للجراثيم الموجبة لملون كرام *S. aureus* U2 ، و 33 ملم للجراثيم الموجبة لملون كرام القياسية *S.aureus* ATCC 25923 . في حين أظهرت طريقة الأستخلاص بالميثانول فعالية تثبيطية ضد جراثيم *S. aureus* U2 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 mirabilis* E2
 -C *Pseudomonas aeruginosa* W1
 -D *Pseudomonas aeruginosa* E3
 -E المقارنة (إيثانول 80%)

الجدول (5): أقطار تثبيط الأنواع الجرثومية (ملم) المعاملة بالمستخلص الايثانولي والميثانولي

للطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris*

طور الميثانول	قطر تثبيط المستخلص إيثانولي + 80% م 80	عزلات الجراثيم
-	-	<i>Staphylococcus aureus</i> E1

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

(-) : عدم وجود الفعالية

لوحظ أن قطر التثبيط للأنواع المختلفة في الدراسة الحالية كانت أكثر مما أظهره نوعان من الطحالب الخضراء (*C. vulgaris* و *C. emersonii*) 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 الخضراء (*Chlorella spp.*) أي تأثير ضد *Staph. aureus* (Kellam & Walker, 1989). أن تأثير الجراثيم الموجبة لملون كرام في الدراستين السابقتين كان واضحاً إذ لم تظهر المستخلصات أي تأثير ضد الجراثيم السالبة لملون كرام المستخدمة. أن التباين في تأثير الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام قد يعود إلى فعالية المادة المستخدمة أو على

الاختلاف في تركيب جدار الخلية للنوعين من الجراثيم (Atlas,1984). كذلك درست حساسية بعض الانواع الجرثومية للمضاد الحيوي سيفالكسين للمقارنة وبلغ أعلى قطر تثبيط 20ملم للعزلة *Staph.aureusE1* ثم (17 و ١٥) ملم للعزلتين *E.coli S1* و *P. merabilis* *E2* على التوالي (الجدول 6).

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

Cephalexin بتركيز ٣0مايكروغرام

الجرثيم	قطر التثبيط (ملم)
<i>Proteus merabilis E2</i>	15
<i>E.coli S1</i>	17
<i>Staphylococcus aureus E1</i>	20

أنضح من خلال الدراسة الحالية أن الحد الأدنى لقطر التثبيط في أنواع الجراثيم المستخدمة هو أعلى من الحد الأعلى لقطر التثبيط في دراسات أخرى Kellam & Walker.1989 و Vlachos et al ., 1999 و Hellio et al ., 2000)،

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

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

Chlorella vulgaris		عزلات الجراثيم
منتصف طور التضاعف الأسي	طور الثبات	

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

(-):عدم وجود

فقد وجد أن الفعالية ضد الجرثومية لمستخلص الطحالب الأخضر *C.vulgaris* انخفضت في منتصف طور التضاعف الأسّي وبلغت 2ملم ضد كل من *E.coli U4* و *P.merabilis E2* و 4ملم 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 الأسّي .

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

وبالرغم من ظهور الفعالية التثبيطية لمستخلص الطحالب الأخضر *C.vulgaris* عند الاستخلاص بأكثر من مذب 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 نافيير وآخرون (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 9.0 ملغرام /مل (الجدول 9).

الجدول (9) : التركيز المثبط الأدنى لمستخلصات الطحلب الأخضر

Chlorella vulgaris

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

أما فيما يخص التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات الخاصة بالطحالب فإن هناك ندرة في الإشارة إليه في البحوث إلا عند إجراء عمليات تنقية للحصول على مركبات نقية ، فقد وجد أن MIC لمركب معزول من طحالب *Styopodium fabelliforms* كان 50 مليغرام /مل ضد *B.subtilis* 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. 3rd, ed. Bailliers. Tindall, London
- Sande, M.A. and Mandell, G.L. (1985). Chemotherapy of Microbial Diseases. Antimicrobial Agents. In: Goodman and Gilman's pharmacological Basis of therapeutics (eds: A. Fred Gilman; L.S. Goodman ; T.W. Rall and F. Murad), 7th ed. Macmillan Publishing Company, New York, 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 . 1st ed. Macmillan. New York
- Hoppe, H.A. (1979). Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In: Marine Algae in Pharmaceutical Science. (eds. H.A. Hoppe; T. Ievring. and Y. Tanaka). Walter de Gruyter, 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. Technol. 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 programmes 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.World Health Organization. Geneva
- Collee, G. ; Fraser, A.G.; Marmion,B.P. and Simmons, A . (1996) . Makie and McCartney. 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 retailoutlets in Nigeria . J.App.Bacteriol,73.(2):175-181s
- Neilands,J.B.and Leong,S.A.(1986). Sinerophores 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 Cyanobacteria: Evolution of extracts and pure compounds. *Plante Medicinale*. 16:321-328.
- Oufdaoui, K.; Mezrioui, N.; Oudra, B.; Loudiki, M.; Barakate, M. and Sbiyyaa, B. (2001). Bioactive compound from *Pseudoanabaena* species (cyanobacteria). *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). Differential antibacterial activity of extracts from selected Southern African macroalgal Thalli. *Botanica Marina*, 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. *Aquaculture*, 174:15-24
- Roveirosa, J. and San-Martin, A.(1997). Antimicrobial activity of the brown alga *Styopodium fiabelliform* constituents . *Fitoterapia*, 68(5):473-475
- Rahman, A. Choudhary, M.I.; Majeed, A.; Shabbir, M.; Ghani, A. and Shameel, M.(1997). A succinyl anthranilic acid ester and other bioactive constituent of *Jollyna Iaminoriodes* *Phytochemistry*, 46(7);1215-1218
- درويش، محمد احمد (2000). عزل وتشخيص الكليسيلا من التربة والحالات المرضية ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية وفعالية أنزيم النيتروجينيز. رسالة ماجستير . جامعة الأنبار

- مولود، بهرام خضر وسليمان، نضال إدريس والبصام، إبراهيم توفيق (١٩٩٠).
الطحالب والاركيونيات . 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 pneumoniae* 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.coli*U3 and *Staphylococcus aureus* U₂.

