تأثير فعالية المركبات المنتجة من الطحلب *Gloeocapsa punctata* تجاه بعض البكتريا والكشف عن بعض الأحماض الدهنية فيه

The effects of intracellular and extracellular compound produced by *Gloeocapsa punctata* against Bacteria and detection on some fatty acids

غيداء حسين عبد علي دعاء سهيل شوكت علي رزاق لفتة
كلية العلوم/ جامعة المستنصرية
Ghaidaa H. Al-Rubaiee Duaa S. Shawket Ali R. Laftah
College of Science/ Al-Mustansiriyah University

المستخلص

تناولت الدراسة عزل وتنقية وتشخيص نوع من الطحالب الخضر المزرقة المحلية *Gloeocapsa punctata* من حديقة المنزل الكائن في زيونة. استعمل الوسط الزرعي BG-11 في مزرعة مستقرة في ظروف مختبرية ثابتة 25 مْ وشدة استضاءة 200 مايكروانشتاين \م^2\ثا ولمدة 8:16 ساعة اضاءة: ظلام حصدت المزرعة في نهاية طور التضاعف الأسي. تهدف هذه الدراسة إلى أختبار فعالية المستخلص الداخل خلوي Intracellular الكتلة الحية والخارج خلوي Extracellular الراشح الخلوي وأستعمل المستخلص العضوي كلورفروم: ميثانول 95% وبنسبة 1:2 وأختبرت فعالياتها تجاه 10 سلالات من البكتريا وهي: *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidiss* و *Enterococcus faecium* و *Micrococcus luteus* و *Escherichia coli*و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae.* و *Shigella flexeneri* و *Serratia sp* بأعتماد طريقة الأنتشار في وسط الأكار. أظهرت النتائج أن المركبات الخارج الخلوية لها أفضل فعالية ضد البكتريا من المستخلص الداخل خلوي، وأظهرت جميع البكتريا الموجبة لملون كرام حساسية تجاه المستخلصات الداخل والخارج خلوية أفضل من البكتريا السالبة لملون كرام، إذ سجلت أفضل فعالية تثبيطية اتجاه *Staphylococcus epidermidiss* بمعدل تثبيط 28 مليمترا للمستخلص الخارج خلوي في حين سجلت أفضل فعالية تثبيطية اتجاه *Enterococcus faecium* بمعدل قطر تثبيط 22 مليمترا للمستخلص الداخل خلوي كما أظهرت البكتريا السالبة لملون كرام افضل فعالية تثبيطية بمعدل 22 مليمترا أتجاه بكتريا *Klebsiella pneumoniae* للمسخلص الخارج خلوي. كما تم الكشف على بعض الاحماض الدهنية التي ينتجها الطحلب وهي بالمتيك Palmitic و ستيارك Stearic و أرشيدونك Arachidic و أوليك Oleic و لينولك Linoleic و لينولنك Linolenic وكان اعلى نسبة هو الحامض الدهني لينولك Linoleic 57% للمستخص الخارج خلوي في حين سجلت نسبة 30% للحامض الدهني ارشيدونك Arachidic للمستخلص الداخل خلوي .

الكلمات المفتاحية: طحالب خضراء مزرقة، مستخلصات طحلبية، مضاد للاحياء المجهرية، مركبات مثبطة

Abstract

In this study *Gloeocapsa punctata* was isolated, purified and identified from the object of the home garden in Zayouna. BG-11 culture media was used for their cultivation in suitable laboratory conditions 25c°, 200µE/m2/sec for 16:8 hrs. Light: dark. Each culture was harvested at the end of exponential phase. Organic solvents used for extraction was Chloroform: methanol at 2:1 to extract, study aims to test the effectiveness of extracted interacellular (biomass) and overseas cellular Extracellular filtrate cellular and used solvent organic (Chlorferom: Methanol 95%) and by 1:2 and test their effectiveness against 10 strains of bacteria which: Bacillus *subtilis* , *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidiss*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexeneri* and *Serratia sp*. Agar diffusion method was used. Results showed that the extracellular products which extracted was best than intercellular product.

The gram positive bacteria studied revealed higher susceptibility to attack by the intracellular and extracellular extracts comparing with the gram negative bacteria. The extracellular extraction revealed higher antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidiss* the of inhibition zone was 28 mm. But the intercellular extract revealed higher antibacterial activity against *Enterococcus faecium* and the average inhibition zone was 22 mm. However, results showed that gram negative bacteria extracellular products extract has the antagonistic activity against *Klebsilla pneumonia* with 25 mm inhibition zone. Also been detected on some fatty acids produced by the algae *G. punctata* which Palmitic, Stearic, Arachidic, Linoleic and Linolenic. The highest rate is fatty acid Linoleic 57% of the extract intercellular while the rate of 30% of the acid fatty Arachidic to intercellular abroad.

Key words: Blue-greenish algae, Algae extraction, antibacterial, inhibitor

المقدمة

أن الانتشار الواسع لصنف الطحالب الخضر المزرقة كونها تمثل جزءا مهما و كبيرا من الطحالب هو ما جعلها مدارا لبحوث ودراسات كثيرة للتعرف على فوائدها وإمكانية الأستعمال التطبيقي لها وخاصة في المجال الطبي والصيدلاني أسوة ببقية صفوف الطحالب الأخرى. اذا تم

التركيز على الطحالب الدقيقة بوصفها مصدرا متواصلا للمنتجات الطبيعية ويمكن تنميتها في مفاعلات حيوية لمساحات واسعة [1،2،3]. لقد تم أستخلاص العديد من المركبات الفعالة مثل السكريات المتعددة والألجينات والفيتامينانت والصبغات والمضادات الحيوية والمركبات الهالوجينية والمثبطات الفينولية وغيرها من ا لمركبات الموجودة في العديد من طحالب المياه العذبة والمالحة والتي أستعملت في مجالات الطب[4]. اذ تم اختبار المركبات الفعالة ومحاولة تنقيتها وتوصيفها لمعرفة خواصها الكيميائية والحيوية وتقدير فعالياتها وقيمتها الطبية [5]. تعتبرالطحالب الخضر المزرقة ذات كفاءة عالية في أنتاج مجموعة من المضادات الحيوية ذات التأثير المباشر على البكتريا المرضية المقاومة للمضادات الحيوية، اذ تنتج الطحالب نوعين من المركبات الفعالة Intracellular products الموجودة داخل خلاياها و Extracellular products خارج خلاياها وتستخلص المركبات الفعالة بأستخدام المذيبات المتنوعة التي قد تكون منفردة أوبشكل خليط أو سلسلة متتالية من المذيبات مثل :الأسيتون والميثانول والايثانول والهكسان وكلوريد المثلين والايثر البترولي وغيرها [6]. تهدف هذه الدراسة إلى أختبار فعالية المستخلص الداخل والخارج خلوي من الطحلب الأخضر المزرق *Gloeocapsa punctata* المعزول من البيئة المحلية وأختبار فعالياته تجاه البكتريا الموجبة لملون كرام (*Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidiss* و *Enterococcus faecium* و *Micrococcus luteus*) والسالبة لملون الكرام (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* و *Shigella flexeneri* و *Serratia sp.*).

المواد وطرائق العمل

1- تحضير مجفف الطحالب

تم عزل الطحلب *G. punctata* من حديقة المنزل الكائن في زيونة بأتباع طريقة Patterson Method [7]. تم تشخيص الطحلب بأستخدام المجهر الضوئي المركب Olympus وبأعتماد مصدر التشخيص [8] إذ أستزرع الطحلب في الوسط BG-11 وبأستعمال المزارع المستقرة وفي ظروف مختبرية ثابتة (درجة حرارة 25م وشدة إضاءة 200 مايكرو أنشتاين /م^2/ ثا ولمدة 6:18 ساعة إضاءة : ظلام [9]. تم تحديد منحني النمو لغرض التعرف على اطوار النمو. ثم تم ترسيب المزارع في نهاية طور التضاعف الأسي Exponential phase في اليوم العاشر وذلك بالنبذ المركزي عند سرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة . جمع بعدها الراسب وجفف عند درجة حرارة 40 م ولمدة 48 ساعة [10] .

2- أستخلاص المواد الفعالة الداخل وخارج خلوية

تم أستخلاص المركبات المنتجة الخام الداخل والخارج خلوية بأستعمال جهاز الأستخلاص Soxhelat، إذ تم وزن 1 غرام من الطحلب المجفف وأضيف له 250 مليمترا من كلورفروم:ميثانول بنسبة 1:2 95% وتركت العينة 2 ساعة لكي يتشبع المسحوق بالمذيب ثم أجري الأستخلاص ولمدة 4 ساعة ثم جفف الراشح بأستعمال جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40 م ثم وزن الناتج من عملية الأستخلاص (10) .

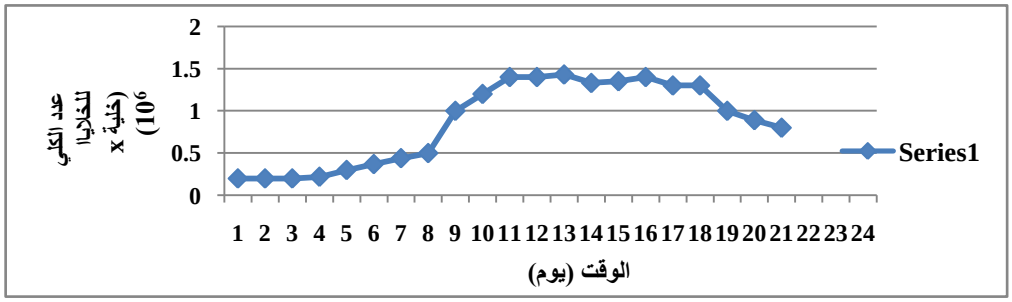
3- تحديد فعالية المركبات الداخل والخارج خلوي تجاه البكتريا

أختبرت حساسية 10 سلالات بكترية مرضية، حيث تشمل خمسة أنواع من البكتريا الموجبة لملون كرام وهي. *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidiss* و *Enterococcus faecium* و *Micrococcus luteus* وخمسة انواع من البكتريا السالبة لملون كرام *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella sp.* و *Serratia sp.* و *Shigella flexeneri*

وحددت الفعالية المضادة للبكتريا بأستعمال طريقة الأنتشار في وسط الأكار Agar diffusion method، إذ تمت تنمية عزلات البكتريا في وسط المرق المغذي Nutrient broth لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 37م ثم نشر العدد التقريبي 10 ^{5}خلية/ مليمتر على وسط مولر هنتون اكار الصلب . وضع 100 مايكروليتر من مستخلص الطحلب في احدى حفرتين والأخرى وضع بها نفس الحجم من المذيب كمقارنة. حفظت الأطباق في 4 مئوية لمدة ساعتين وذلك للسماح للمستخلص بالأنتشار في وسط الأكار ثم حضنت اطباق المزارع البكتيرية بدرجة 37م ولمدة 18-24 ساعة تم بعدها قياس اقطار التثبيط ان وجدت [10] .

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج أن منخنى النمو للطحلب *G. punctata* ان ثلاث أيام الأولى يمثل طور التأ قلم Lag phase اذ لم تكن هناك زيادة واضحة في اعداد الخلايا بينما بدأ طور الزيادة الأسية Exponential phaseفي اليوم الرابع ولغاية اليوم العاشر وأعتبر اليوم السادس عشر هو بداية الطور الأستقرار Stationary phase ولغاية اليوم الثامن عشر حيث لوحظ انخفاض في اعداد الخلايا الحية اشارة الى وصولها طور الموت Decline phase ويعزي هذا الأختلاف الى نوع الطحلب والظروف البيئية وأستهلاك المواد الغذائية [11] شكل(1).



شكل(1): منحني النمو للطحلب *Gloeocapsa punctata* (بدلالة الوزن الجاف)المستزرع في الوسط الزرعي BG-11 بدرجة حرارة 25 ±2م وشدة أضاءة 200 مايكروأنشتاين / م^2 /ثا وبنظام ضوئي 16: 8 ساعة أضاءة: ظلام لمدة عشرين يوماً .

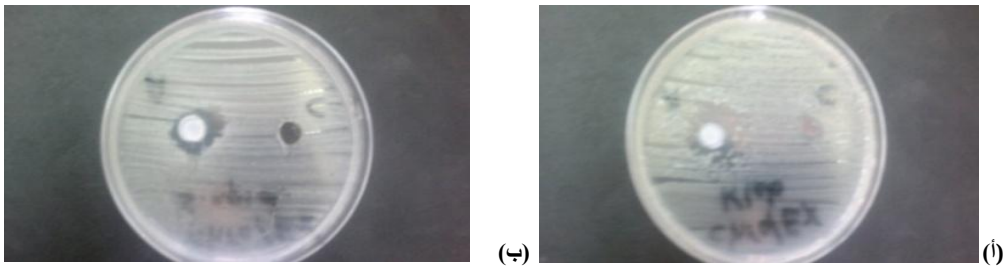
أظهرت نتائج الأختبار فعالية المستخلص العضوي الخارج خلوي للطحلب أفضل أتجاه البكتريا مقارنة بالمستخلص الداخل خلوي جدول (1)، إن جميع سلالات البكتريا الموجبة والسالبة لملون كرام المستعملة في الدراسة اظهرت حساسية تجاه المستخلص الخارج خلوي بأستثناء بكتريا *Shigella flexeneri* التي لم تظهر أي حساسية تجاه المستخلص كما وجد أن أفضل فعالية تجاه البكتريا *S. epidermidiss* و *Enterococcus faecium* بمعدل تثبيط 28 و25 مليلترا على التوالي. كما سجل أفضل فعالية تثبيطية ضد البكتريا *Klebsiella pneumonia* بمعدل تبيط 22 مليمتر للمستخلص الخارج خلوي كما في شكل (2).

كما وجد إن المستخلص العضوي الداخل خلوي للطحلب له فعالية عالية تجاه جميع البكتريا الموجبة لملون كرام أظهرت النتائج أن أفضل فعالية تجاه البكتريا *Enterococcus faecium* بمعدل تثبيط 22 مليلترا يظهر شكل (2) تأثير فعالية المستخلص تجاه البكتريا *S. epidermidis* بمعدل تثبيط 18مليلتر. في حين لم يسجل أي فعالية ضد البكتريا السالبة لملون كرام بأستثناء بكتريا *E.coli* و*Serratia sp.* وكانت فعالية تثبيطية ضعيفة .

جدول (1): معدلات أقطارالتثبيط (مليمتر)التي أظهرتها السلالات البكتيرية تجاه المستخلص العضوي الخارج والداخل خلوي للطحلب*Gloeocapsa punctata*.

العزلات	السيطرة	المستخلص الخارج خلوي	المستخلص الداخل خلوي
S.aureus	-	**18**	**16**
S.epidermidis	-	**28**	**18**
B.subtilis	-	**15**	**16**
E.faecium		**25**	**22**
M.luteus		**18**	**15**
E.coli	-	**16**	**16**
P.aeruginosa	-	**18**	**-**
Klebsiella pneumoniae	-	**22**	**-**
S.flexeneri	-	**-**	**-**
Serratia sp.	-	**20**	**15**

(-) عدم وجود تثبيط



(ب) (أ)

شكل (2): أ- تأثير المستخلص الداخل خلوي للطحلب *G. punctata* على نمو البكتريا *Klebsiell pneumonia*

ب- تأثير المستخلص الداخل خلوي للطحلب *G. punctat* على نمو البكتريا *S.epidermidis*

إن الأختلاف في الفعالية ضد بعض العزلات البكتيرية للمستخلص العضوي الداخل والخارج خلوي للطحلب *G. punctata* ، يدل على وجود أكثر من مادة فعالة وأن المادة الفعالة من الممكن أن تتوزع في أكثر من مذيب [12] . وأن المركبات العضوية لها تأثير إيجابي عند أستخلاص الطحالب وخصوصا الكلورفروم ، وهذا ربما يعكس الطبيعة الكيميائية للعامل الفعال، وكذلك فأن المذيبات العضوية تميل الى إزالة المركبات الكارهة للماء من سطح الخلية [13] أشارت النتائج الى أختلاف في فعالية المستخلصات الداخل والخارج خلوية تجاه البكتريا ،ويرجع السبب في ذلك إلى أن مركبات نواتج الأيض الاولي مثل الأحماض الأمينية والأحماض الدهنية وغيرها لها اهمية في بناء ونمو الخلايا الطحلبية في حين إن مركبات الأيض الثانوي تختلف في سلوكها عن مركبات الأيض الاولي [14]. تشير الدراسة الحالية إلى أن المستخلص العضوي له فعالية تثبيطية واضحة على البكتريا سواء كان المستخلص داخل أم خارج خلوي ويرجع السبب لأحتوائها على بيبتيدات حلقية والقلويدات والسكريات المتعددة [15]، كما أشارت الكثير من الدراسات إن الطحلب *Chroococcus sp.* له نوعين من التأثيرات على البكتريا النوع الأول تحرر المواد الكيميائية ذات فعالية تثبيطية ضد البكترياوالفطريات التي تظهر دائما في الوسط الزرعي ،أما النوع الثاني فقد أظهر فعالية عندما يكون الطحلب بتماس مباشر مع البكتريا والفطريات فقط [16].أظهرت النتائج أن المادة الفعالة المستخلصة من المنتجات الداخل والخارج خلوية للطحالب أثرت في البكتريا الموجبة لملون كرام أكثر من تأثيرها في البكتريا السالبة لملون الكرام ويعزى السبب في ان البكتريا السالبة الملون الكرام أقل تحسسا من المركبات الفعالة من بكتريا الموجبة لملون الكرام لانها تحتوي على جدار خلية من عدة طبقات معقدة وهذا يجعلها أكثر صعوبة لأختراق المواد الفعالة تجاه جدار الخلية [17].

هناك العديد من العوامل التي تؤثر على طبيعة النتائج التي تم الحصول عليها في الأختبارات التي تتعلق بفعالية مستخلصات الطحالب تجاه النشاط النمو البكتيري والفطري، وقد يعزى هذا الأختلاف الى المنطقة ووقت الجمع وطرائق حفظ العينات المستعملة في الأختبار قبل الأستخلاص وأختلاف اوساط النمو المستعملة والعوامل البيئية السائدة ، و مرحلة نمو الطحالب عند حصاد المزرعة ونوع المذيب المستعمل في الأستخلاص وطريقة الأستخلاص [18].

كما تم تشخيص وتقدير بعض الأحماض الدهنية للمستخلص العضوي بأستخدام الكروماتوغرافيا –السائل Gas-Liquid Chromatography. تم التعرف على ستة أحماض دهنية، ثلاثة مشبعة وهي Palmitic و Stearic و Arachidic وثلاثة غير مشبعة وهي Oleic و Linoleic و Linolenic لكل من المستخلصين الداخل والخارج خلوي. ويبين جدول (2) الأحماض الدهنية للمستخلص الخارج خلوي. لقد كانت نسبة الحامض الدهني لينولك هي الأعلى 57% مقارنة مع بقية الأحماض الدهنية الأخرى بينما كان أقل نسبة يمثلها الحامض الدهني لينوليك التي بلغت 11% شكل (4). أما بالنسبة للمستخلص الخارج خلوي كانت نسبة الحامض الدهني الينولك هي الاعلى التي بلغت 30 % جدول (3) وشكل (5) ويتضح من النتائج وجود أختلاف في نسبة الأحماض الدهنية وخاصة ذات ال - 18 ذرة كاربون حيث تتميز العزلة المحلية بارتفاع نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة.

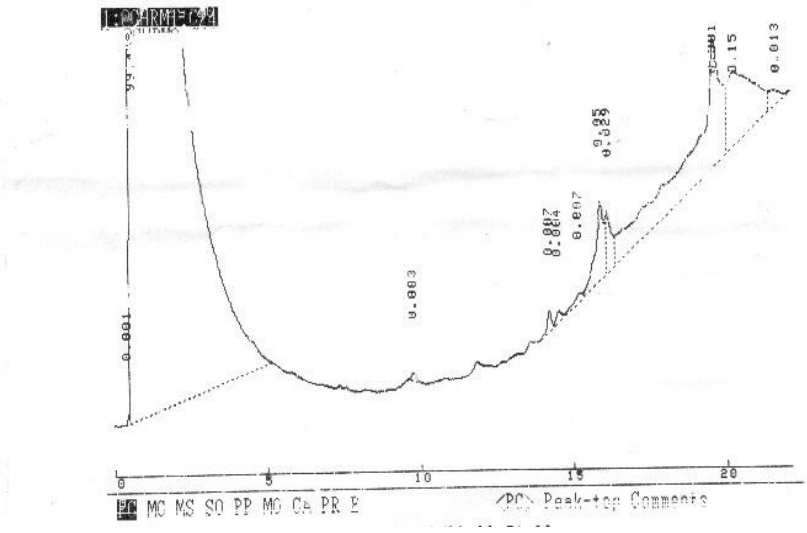
جدول(2): أنواع ونسب الأحماض الدهنية للمستخلص العضوي الخارج خلوي للطحلب المحلي *Gloeocapsa punctata*

الحامض الدهني	عدد ذرات الكاربون	النسبة المئوية%
بالمتيك Palmitic	16	13
ستياركStearic	18	35
أرشيدونكArachidic	20	31
أوليك Oleic	18:1	3.7
لينولكLinoleic	18:2	57
لينولنكLinolenic	18:3	11

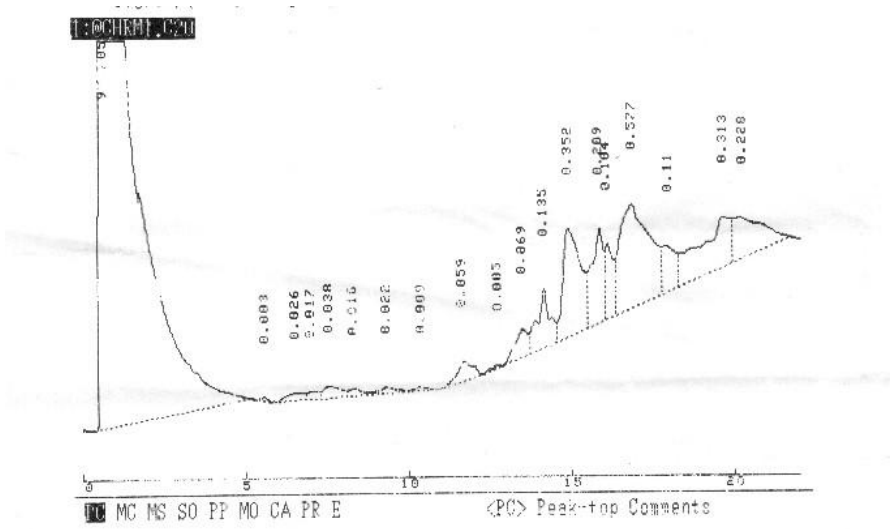
جدول (3): أنواع ونسب الأحماض الدهنية للمستخلص العضوي الداخل خلوي للطحلب المحلي *Gloeocapsa punctata*

الحامض الدهني	عدد ذرات الكاربون	النسبة المئوية%
بالمتيك Palmitic	16	0.7
ستياركStearic	18	0.6
أرشيدونكArachidic	20	30
اوليك Oleic	18:1	-
لينولكLinoleic	18:2	2.8
لينولنكLinolenic	18:3	-

أن الأختلاف في محتوى الأحماض الدهنية لكل من المستخلصين الداخل والخارج خلوي قد يختلف لنفس السلالة عند تغيير الظروف المختبرية لتنميتها أضافة الى الأختلاف في محتوى الخلايا من الاحماض الدهنية باختلاف أطوارالنمو التي تمر بها الخلية [20] .



شكل (4): الأحماض الدهنية في مستخلص الداخل خلوي للطحلب الأخضر المزرق *C.minutus*التي شخصت بجهاز الكروموتغرافي الغاز –السائل GLC



شكل (5): الأحماض الدهنية في مستخلص الخارج خلوي للطحلب الأخضر المزرق *C.minutus* التي شخصت بجهاز الكروموتغرافي الغاز –السائل GLC

المصادر

1. Edward**,** G.B. and David, C.S. (2010). Freshwater Algae.printed in Great Britain by Antony Rowe. Ltd Chippenham, Wilts, Wiley Blackwell.

2. Gene, E.L. (2010). Plankton of inland Water. Academic Press is an imprint of Elsevier. pp 99-110.

3. Kaushik, M.P., Abhishek, CM, Garima, M. and Pankal, M. (2008). Evaluation of *Nostoc commune* for potential antibacterial activity and UV-HPLC analysis of methanol extract. the Internet J. of Microbiology. 5(1):35-41.

4. Zorica, S., Dragana, C., Jelica, S., Maja, K., Dejan, S. (2008). Antibacterial ,antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. Science in China Series. 51 (10):941-947.

5. Reichelt, JL. and Borowitzka, MA. (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large –scale screening programmed. Hydrobiol.1 16/ 117:158-166

6. الحسيني، أحمد عيدان ومهدي، زينة محمد وعلي، أنعام نوري. (2011). معالجة المياه صرف الصناعي من التلوث

7. Stein, J. (1973). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. pp:448.

8. Desikachary, TV. (1959). Cyanophyta. Indian council of agricultural research. New Delhi.

9. Rippka, RJ, Deruelles, J., Waterbury, H M. and Anier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria .J. Gen .Microbiol.111:1-61

10. Taskin, E., Ozturk, M. and Kurt, O. (2007). Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African Journal of Biotechnology. 6:2746-2751.

11. Dumas, A., Ialiberte, G. ,Lessard, P. and Dela Noüe, j. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohner*. Aquacul. Eng. 17, 57-68

12 Rania, MA. and Halla, M T. (2008). Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae evolution of medium component by Placket-Barman Design for Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis*. Global Journal of Biotecnology and Biochemistry. 3:22-31.

13. Ghasemi, YM.,Tabatabaei, A., Shafiee, A., Amini, M., Shokravi, Sh., and Zarrini, G. (2004). Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambiua*. Pharm. Biol. 2:318-322.

14. Rosàrio, FM., Miguel, FR., Lars, H., Jose, AS., Kaja, S., and Vitor, MV. (2008). Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria -*Synechocystis* and *Synechococcus.* Mar. Drugs. 6(1):1-11.

15. Mathivanan, K. ,Ramamuthy,V.,and Rajaram, R. (2010). Antimicrobial activity of *Oscillatoria princeps* and *Lyngbya majuscule* against pathogenic microbes. International Journal of Current Research. 5. pp.097-101.

16. Kellam, SJ. and Walker, JM. (1988). Antibacterial activity from marine microalgae in labrotory culure. Br. Phycol.J. 24:191-194.

17. Eric, VE. and Friedrich, J. (1997). Phosphorus limitation and not light controls extracellular release of allelopathic compounds by *Trichormus doliolum* (cyanobacteria). Limnol. Ocemogr. 42 (8): 1796-1802.

18. Hikmet**,** K., Yavuz, B., Belma, A., Zehra,Y, and Tahir, A. (2006). Screening for Antimicrobial agent production of some microalgae in freshwater. The Internet J. of Microb. 2(2):574-645.

19. بنية، حارث كامل وقاسم، ثائر أبراهيم وبنية، أحمد كامل. (2009). فعالية مستخلص الدايتوم *Nitzschia palea* (Kuetz.)W.Sm. المضادة للبكتريا. المجلة العراقية للتقنات الأحيائية. 8 (2):563-566 .

20. Chu, W. and Goh, S. (1994). Studies on production of useful chemicals, especially fatty in the marine diatom Nitzschia conspicua Grunow. Hydrobiol. 285:33-40.