تأثير فعالية المركبات المنتجة من الطحلب *Oscillatoria princeps* تجاه البكتريا والكشف عن بعض الأحماض الدهنية

غيداء حسين عبد علي* و دعاء سهيل شوكت

قسم علوم الحياة ,كلية العلوم, الجامعة المستنصرية , بغداد ,العراق.

الخلاصة

تناولت الدراسة عزل وتنقية وتشخيص نوع من الطحالب الخضر المزرقة المحلية *Oscillatoria princpes* من بركة النافورة في الجامعة المستنصرية. 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 دراسة فعالية المستخلص الداخل والخارج خلوي من الطحلب الأخضر المزرق *Oscillatoria princps* المعزول من البيئة المحلية وأختبار فعاليّة تجاه البكتريا الموجبة (*Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidiss* و *Enterococcus faecium* و *Micrococcus luteus*) والسالبة لملون كرام (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *K Klebsiella pneumoniae* و *Shigella flexeneri* و *Serratia sp.*). أستعملت المذيبات العضوية (كلورفروم: ميثانول 95%) وبنسبة 1:2 للحصول على المستخلص الخام الداخل خلوي Intracellular (الكتلة الحية) والخارج خلوي extracellular (الراشح الخلوي). أختبرت فعالية المستخلصات تجاه 10سلالات من البكتريا الموجبة والسالبة لملون كرام بأعتماد طريقة الأنتشار في وسط الأكار. أظهرت النتائج أن المركبات الداخل الخلوية لها أفضل فعالية ضد البكتريا من المستخلص الخارج خلوي، أظهرت البكتريا الموجبة لملون كرام حساسية عالية تجاه المستخلصات الداخل والخارج خلوية أفضل من البكتريا السالبة لملون كرام، إذ سجلت أفضل فعالية تثبيطية اتجاه *Staphylococcus aureus* بمعدل تثبيط 30 مليمتر للمستخلص الداخل خلوية للطحلب *Oscillatoria princeps* في حين سجلت أفضل فعالية تثبيطية اتجاه *Bacillus subtilise* بمعدل قطر تثبيط 28 مليمتر للمستخلص الخارج خلوي كما أظهرت البكتريا السالبة لملون كرام افضل فعالية تثبيطية بمعدل 25 مليمتر أتجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosas* للمستخلص الداخل خلوي. كما تم الكشف على بعض الاحماض الدهنية التي ينتجها الطحلب وهي بالمتيك Palmitic و ستيارك Stearic و أرشيدونكArachidic و أوليك Oleic و لينولك Linoleic و لينولنك Linolenic وكان اعلى نسبة هو الحامض الدهني بالمتك Palmitic 75% للمستخلص الداخل خلوي في حين سجلت نسبة 34% للحامض الدهني Linolenic للمستخلص الخارج خلوي .

ghaidaa_5@yahoo.com*Email:

Influence The Effectiveness of Compounds Produced From Algae *Oscllatoria Princeps* Agains t Bacteria and Detected of Some Fatty Acids

Ghaidaa H. Al.Rubaiee* and dauu Shaukat.
Department of biology , College of Science,Almustansiriah University,Baghdad,Iraq.

Abstract

In this study *Oscillatoria princeps* were isolated ،purified and identification from water canal in Almustansiriah University . BG-11 culture media was used for their cultivation in suitable laboratory conditions (25c°, 200µE/m^2/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 the crude active Intracellular and Extracellular substances, and evaporated down to dryness. Antibacterial activity of these different extracts were evaluated against 10 strains of gram positive bacteria and gram negative bacteria, Agar diffusion method was used in this evaluation. Results showed that the intracellular products which extracted beast than extracellular product. The gram positive bacteria studied revealed higher susceptibility to attack by the intracellular and extracellular extracts comparing with the gram negative bacteria. The intercellular extraction revealed higher antibacterial activity against *Staphylococcus arueus* average of inhibition zone was 30mm. but The extracellular extraction revealed higher antibacterial activity against *Bacillus subtilise* average of inhibition zone was 28 mm. However, Results showed gram negative bacteria intracellular products extract has the antagonistic activity against *Pseudomonas aeruginosas* with 25 mm inhibition zone. also been detected on some fatty acids produced by the algae *O.princeps* which Palmitic , Stearic, Arachidic , Linoleic and Linolenic . the highest rate is fatty acid Palmitic 75% of the extract intercellular while the rate of 34% of the acid fatty Linolenic to extracellular abroad.

Keywords: Blue –green algae ; algae extract; antimicrobial;inhibition

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 بقية صفوف الطحالب الأخرى .اذا تم التركيز على الطحالب الدقيقة بوصفها مصدرا متواصلا للمنتجات الطبيعية ويمكن تنميتها في مفاعلات حيوية لمساحات واسعة .ويمكن السيطرة على نوعية وكفاءة الطحالب الدقيقة من حيث خلوها من المبيد العشبي والحشري والسمي من خلال تزويدها بوسط زرعي نظيف كما تمتاز بتوعها الواسع مقارنة بالنباتات الراقية[1،3،2]

تعد الطحالب الدقيقة ومن ضمنها الطحالب الخضر المزرقة مصدرا للمركبات الأيضة الفعالة حيويا والمهمة طبيا [4،5] اذ تم اختبار المركبات الفعالة ومحاولة تنقيتها وتوصيفها لمعرفة خواصها الكيميائية و الحيوية وتقدير فعالياتها وقيمتها الطبية [6].

أشارت العديد من الدراسات إلى إن الأجناس العائدة لصف الطحالب الخضر المزرقة كانت لها فعالية عالية عند أختبار مستخلصاتها في تثبيط نمو الأحياء المجهرية مقارنة ببقية الصفوف الطحلبية الأخرى . اذ أعطت مستخلصاتها نتائج أيجابية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وبمناطق تثبيط واسعة [2] .

تهدف هذه الدراسة إلى أختبار فعالية المستخلص الداخل والخارج خلوي من الطحلب الخضر المزرقة *Oscillatoria prnecip* المعزولة من البيئة المحلية وأختبار فعالياتها تجاه البكتريا الموجبة (*Bacillus subtilis* و *Staphylococcus*

aureus و *Staphylococcus epidermidiss* و *Enterococcus faecium* و *Micrococcus luteus*) والسالبة لصبغة الكرام (*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *lebsiella sp.* و *Shigella flexeneri* و *Serratia sp.*).

والتعرف عن بعض الأحماض الدهنية الداخل في تركيب الطحلب بأستخدام جهاز ال GC .

المواد وطرائق العمل

1- تحضير مجفف الطحالب

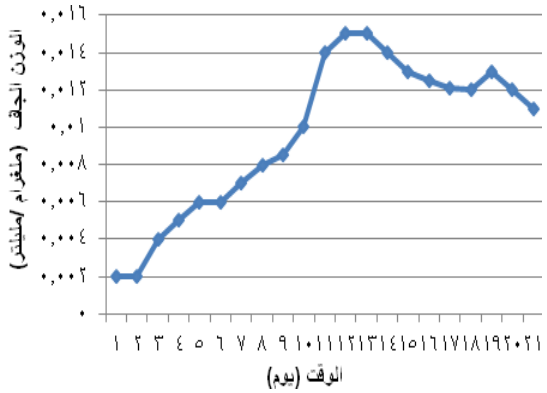
تم عزل الطحلب *O.princeps* من بركة النافورة في الجامعة المستنصرية بأتباع طريقة Streak Plating [7] . تم تشخيص الطحلب بأستخدام المجهر الضوئي المركب Olympus وبأعتماد مصدر التشخيص [8] إذ أستزرع الطحلب في الوسط BG-11 وبأستعمال المزارع المستقرة وفي ظروف مختبرية ثابتة (درجة حرارة 25مْ وشدة إضاءة 200 مايكرو 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 الحادي عشر للطحلب *O.princeps* وذلك بالنبذ المركزي عند سرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة. جمع بعدها الراسب وجفف عند درجة حرارة 40 مْ ولمدة 48 ساعة [10].

2- أستخلاص المواد الفعالة الداخل وخارج خلوية

تم أستخلاص المركبات المنتجة الداخل والخارج خلوية أخذ 0.5 غرام ن المجفف الطحلب *O.princep* في 250 مليلتر من كلورفروم:ميثانول بنسبة 1:2 ثم رج لمدة ساعتان بأستخدام حاضنة هزازة بدرجة حرارة 25 مئوية وبسرعة 70 دورة/دقيقة. ثم نبذ المستخلص مركزيا بسرعة 6000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم جفف الراشح بأستعمال جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40 مْ ثم وزن الناتج من عملية الأستخلاص [10]

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج من منحنى النمو للطحلب *O.princeps* حيث يتضح ان اليوم الأول يمثل طور التأقلم Lag phase اذ لم تكن هناك زيادة واضحة في اعداد الخلايا بينما بدأ طور الزيادة الأسية Exponential phase في اليوم الثاني ولغاية اليوم الحادي عشر وأعتبر اليوم الثالث عشر هو بداية طور الأنحدار phase Stationary ولغاية اليوم الرابع 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] (الشكل 1).



الشكل 1- منحني النمو للطحلب *Oscillatoria princeps* (بدلالة الوزن الجاف)

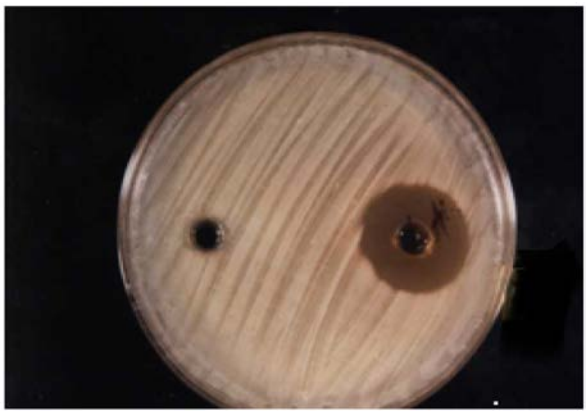
أظهرت نتائج الأختبار فعالية المستخلص العضوي الداخل خلوي للطحلب *O. princeps* فعالية أفضل بأتجاه البكتريا مقارنة بالمستخلص الخارج خلوي، إن جميع السلالات البكتريا الموجبة والسالبة للملون كرام المستعملة في الدراسة اظهرت حساسية تجاه المستخلص بأستثناء بكتريا *Klebsiella sp* و *Shigella flexeneri* التي لم تظهر أي حساسية تجاه المستخلص كما وجد أن أفضل فعالية تجاه البكتريا *S.aureus* بمعدل تثبيط 30 مليمتر (الشكل 2) و 22 مليمتر تجاه *B. subtilise* للمستخلص الداخل (الجدول 1).

كما وجد إن مستخلص العضوي الخارج خلوي للطحلب له فعالية عالية تجاه جميع البكتريا الموجبة لملون كرام بأستثناء بكتريا *S.aureus* التي لم تظهر أي حساسية تجاه المستخلص، كما سجل المستخلص فعالية تجاه البكتريا *S.epidermidis* بمعدل تثبيط 18 مليلتر (الشكل 3) ،كما بينت النتائج فعالية المستخلص تجاه البكتريا السالبة لملون كرام ضعيفة حيث لم يسجل أي تأثير عدا البكتريا *E.coli* و *S.flexeneri* معدل تثبيط 20 مليمتر (الجدول2).

الجدول 1- معدلات أقطارالتثبيط (مليميتر) التي أظهرتها السلالات البكتيرية تجاه مستخلص العضوي الداخل خلوي للطحلب *Oscillatoria princeps* .

العزلات	السيطرة	المستخلص الخارج خلوي
S.aureus	-	-
S.epidermidis	-	18
B.subtilis	-	28
E.faecium		17
M.luteus		15
E.coli	-	20
P.aeruginosa	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-
S.flexeneri	-	-
S.erratia sp.	-	-

(-) عدم وجود تثبيط

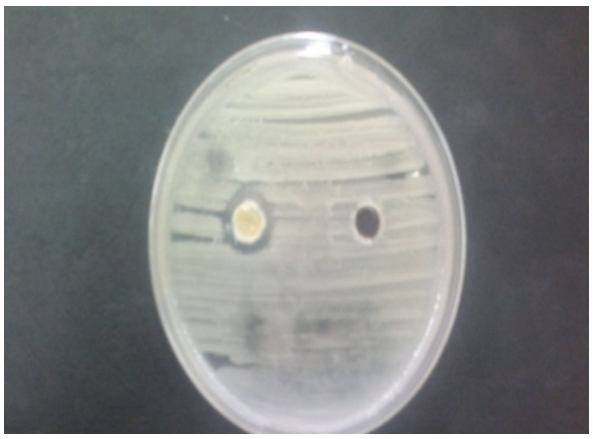


الشكل 2- تأثير مستخلص الداخل خلوي للطحلب *Oscillatoria princeps* في نمو البكتريا *S.aureus*

الجدول 2- معدلات أقطارالتثبيط (مليميتر) التي أظهرته السلالات البكتيرية تجاه مستخلص العضوي الخارج خلوي للطحلب *Oscillatoria pinceps*

العزلات	السيطرة	المستخلص الداخل خلوي
S.aureus	-	30
S.epidermidis	-	26
B.subtilis	-	22
E.faecium		-
M.luteus		14
E.coli	-	20
P.aeruginosa	-	25
Klebsiella pneumoniae	-	-
S.flexeneri	-	-
Serratia sp.	-	20

(-) عدم وجود تثبيط



الشكل 3- تأثير مستخلص الداخل خلوي للطحلب Oscillatoria princeps في نمو البكتريا S.flexeneri

إن اختلاف في الفعالية ضد بعض العزلات البكتيرية للمستخلص العضوي الداخل والخارج خلوي للطحلب *O.princeps*، مما يدل على وجود أكثر من مادة فعالة وأن المادة الفعالة من الممكن أن تتوزع في أكثر من مذيب [15] . وأن المذيبات 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 [16] . 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 المركبات الأيض الثانوي تختلف سلوكها عن مركبات الأيض الاولي [17]. 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 [18،12]، كما أشارت الكثير من الدراسات إن الطحلب *Oscillatoria* sp. ينتج مركب Microcystin والذي يتكون من بيبتيدات حلقية cyclic peptids ولها فعالية تثبيطية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لملون الكرام وذلك من خلال تثبيط الأنزيم Protein phosphotase الذي له دور مهم في عملية ادخال المواد الى داخل جسم الكائن الحي [19].

أظهرت النتائج أن المادة الفعالة المستخلصة من المنتجات الداخل والخارج خلوي للطحالب المدروسة 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 البكتريا الموجبة لملون الكرام لانه تحتوي على جدار خلية من عدة طبقات معقدة وهذا يجعلها أكثر صعوبة لأختراق المواد الفعالة اتجاه جدار الخلية [21]. هناك العديد من العوامل التي تؤثر على طبيعة النتائج التي يحصل عليها الباحث في الأختبارات التي تتعلق بفعالية مستخلصات الطحالب تجاه النشاط النمو البكتيري والفطري ،فقد تكون هناك اختلافات او تناقضات في النتائج التي يتوصل اليها الباحثون عن ذات النوع من الطحالب، وقد يعزى هذا الأختلاف المناطق 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 [23،22]

الجدول.3-أنواع ونسب الأحماض الدهنية للمستخلص العضوي الخارج خلوي للطحلب المحلي *Oscillatoria princeps*

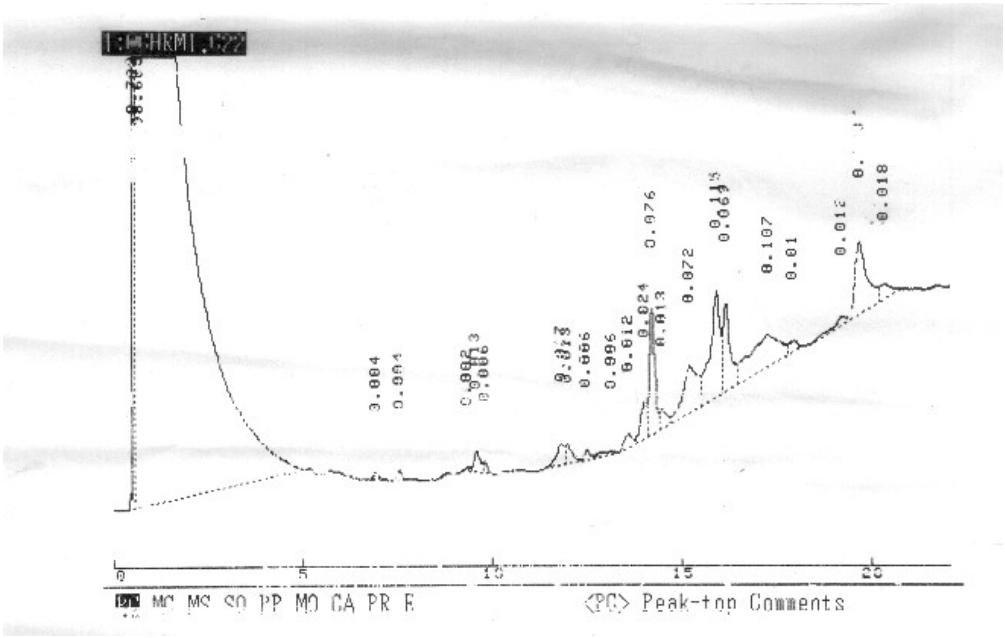
الحامض الدهني	عدد ذرات الكاربون	النسبة المئوية%
بالمتيك Palmitic	16	75
ستيارك Stearic	18	7.5
أرشيدونك Arachidic	20	2.81
أوليك Oleic	18:1	20
لينولك Linoleic	18:2	6.9
لينولنك Linolenic	18:3	10.7

الجدول.4-أنواع ونسب الأحماض الدهنية للمستخلص العضوي الخارج خلوي للطحلب المحلي *Oscillatoria princeps*

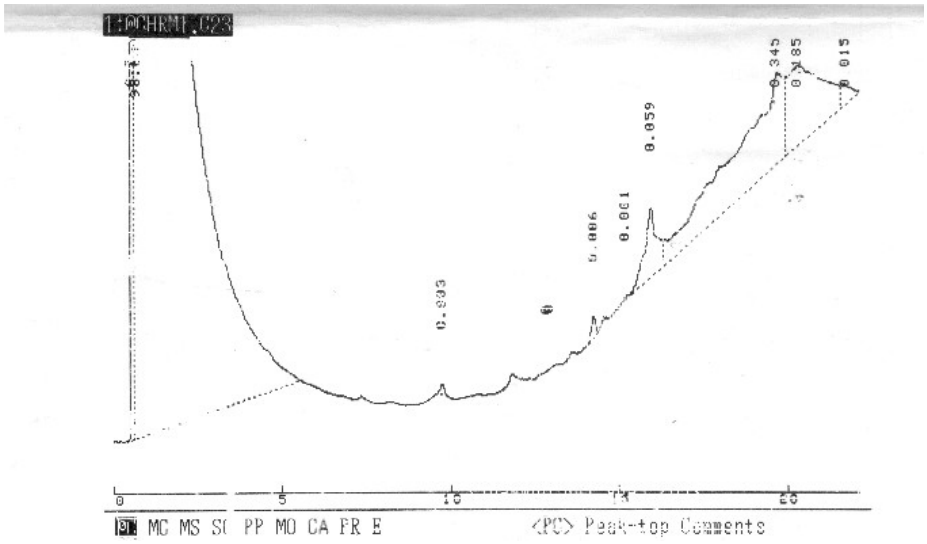
الحامض الدهني	عدد ذرات الكاربون	النسبة المئوية%
بالمتيك Palmitic	16	26
ستيارك Stearic	18	2.2
أرشيدونك Arachidic	20	-
اوليك Oleic	18:1	12
لينولك Linoleic	18:2	5
لينولنك Linolenic	18:3	34

كما تم التشخيص وتقدير بعض الأحماض الدهنية للمستخلص العضوي بأستخدام كروماتوغرافيا –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 الجدول 3 الأحماض الدهنية للمستخلص الداخل خلوي . لقد كانت نسبة الحامض الدهني البالمتيك هي الأعلى 75% مقارنة مع بقية الأحماض الدهنية الأخرى بينما كان أقل نسبة يمثلها الحامض الدهني لينوليك التي بلغت 6.9%(الشكل 4). أما بالنسبة للمستخلص الخارج خلوي كانت نسبة الحامض الدهني الينولك هي الاعلى التي بلغت 34 % الجدول 4 و

الشكل 5 ويتضح من النتائج وجود أختلاف في نسبة الأحماض الدهنية وخاصة ذات 18 ذرة الكاربون حيث تتميز العزلة المحلية بارتفاع نسبة الأحماض الدهني غير المشبعة أن الأختلاف في محتوى الأحماض الدهني لكل المستخلصين الداخل والخارج خلوي قد يختلف لنفس السلالة عند تغيير الظروف المختبرية لتنميتها أضافة الى الأختلاف في محتوى الخلايا من الاحماض الدهنية باختلاف أطوار النمو التي تمر بها الخلية [24].



الشكل 4- الأحماض الدهنية في مستخلص الداخل خلوي للطحلب الأخضر المزرق *Oscilatoria princeps* التي شخصت بجهاز الكروموتغرافي الغاز –السائل GC



الشكل 5- الأحماض الدهنية في مستخلص الداخل خلوي للطحلب الأخضر المزرق *Oscillatoria princeps* التي شخصت بجهاز الكروموتغرافي الغاز –السائل GC

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 Waters.*Academic Press is an imprint of Elsevier* ,pp:99-110.
3. Kaushik, M.P.; Abhishek, C.M ; 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),pp:35-41.
4. Winn-Jung**,**H.;Chun-His l. And Yung-Ling C**.2007.**Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *J.Elsevier* ,377 (2-3) PP:214-223.
5. Zorica, S.; Dragana, C.;Jelica, S.;Maja, K. and Dejan, S**. 2008.** Antibacterial ,antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobac-terial strains from Serbia. *Science in China Series* 51 (10),pp:941-947.
6. الربيعي،غيداء حسين وجواد ،عبد اللطيف محمد والجميلي،عصام فاضل. 2011 .تأير فعاية المركبات المنتجة من الطحلبين *Oscillatoria limnetica* و*Chroococus minor* ضد بعض البكتريا والفطريات.مجلة بغداد للعلوم، مجلد 8(1):2.
7. Stein ,J**. 1973.**Handbook of phycological methods.Culture methods and growth measurements .Cambridge University Press.p:448.
8. Desikachary, T.V**. 1959**.Cyanophyta .Indian council of agricultural research. New Delhi.
9. Rippka ,R.J; Deruelles ,J.; Waterbury, Herdman, M. and anier,R**. 1979.** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria .*J. Gen .Microbiol*.111,pp: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,pp: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,pp:57-6
12. Rania**,** M.A. 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
13. Ghasemi,Y.M.;Tabatabaei,A.;Shafiee,A.;A mini,M.;shokravi,Sh.;and Zarrini G**. 2004.** Parsiguine ,a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambiua*. Pharm.Biol.2,pp :318-322.
14. Rosàrio**,** F.M.; Miguel ,F.R.;Lars H.;Jose, A.S.;Kaja S.; and Vitor, M.V. **2008.** Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria -*Synechocystis* and *Synechococcus* .Mar. Drugs,6(1),pp:1-11.
15. Kreitlow, S.M.; mundt ,S .; Lindequist, U**.** **1999.**Cyanobacteria a potential source of new biologically active aubstances. *J.Biotechnol*.30 (3),pp:61-3.
16. Kellam, S.J. and Walker, J.M. **1988**. Antibacterial activity from marine microalgae in labrotory culure. *Br.Phycol. J*.24,pp:191-194.
17. Eric, V. E. and Friedrich ,J. **1997**. Phosphorus limitation and not light controls extracellular release of allelopathic compounds by Trichormus doliolum (cyanobacteria).*Limnol. Ocemogr*, 42 (8):pp : 1796-1802.
18. Hikmet**,** K.; Yavuz ,B.;Belma, A.; Zehra,Y, and Tahir, A. **2006**. Screening for Antimi-crobial agent production of some microalgae in freshwater. *The Internet J. of Microb*. 2(2),pp:574-645.
19. Hikmet**,** K.; Beril ,S.A. and Tahir ,A. **2004**.Microalgal toxin (s): characteristics and importance. *African J. of Biotech*. 3(12),pp:667-674.
20. 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 .
21. Ördög**,** V.;Stirk ,W.A; Lenobel, R.; Bancirova ,M.;Strnad, M.;Van Staden, J.;Szigeti J. and Nemeth L. **2004**. Screening microalgae for some Potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary

metabolites'. of Applied Phycology,16,pp :309-314.

22. قاسم، ثائرأبراهيم والكبيسي، حارث كامل ويوسف، سامره يونس **2003**. فعالية مستخلص الأيثانول للطحلب العصوي المحلي *Nitzschia palea* (Kutez).W.sm تجاه البكتيريا.مجلة الدراسات ،العلوم الزراعية، 30 (2): 241-245.

23. Tüney,I..;Bilge, HC.;Dilek, U. and Atakan, S. **2006**.Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey).*Turk J .Biol*.30,pp:171-175

24. Chu,W.; Phang ,andGoh,S. **1994**.Studies on production of useful chemicals,especially fatty in the marine diatom Nitzschia conspicua Grunow .Hydrobiol. 285,pp:33-40.