المجلة العراقية للعلوم

Iraqi Journal of Science

الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص الطحلب العصوي *Nitzschia palea*

حارث كامل الكبيسي*، سامرة يونس يوسف**، ثائر إبراهيم قاسم***

*قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة الانبار.

**قسم التقنيات الاحيائية – كلية العلوم – جامعة بغداد.

***قسم الأسماك – الدائرة الزراعية والبايلوجية – منظمة الطاقة الذرية بغداد – العراق.

الاستلام:2003/3/17 القبول:2003/9/1

الخلاصة

درست الفعالية التثبيطية لمستخلص الطحلب العصوي المحلي*Nitzschia palea* تجاه البكتريا السالبة لملون كرام القياسية *Pseudomnas aeruginosa* ATCC 6750 والبكتريا الموجبة لملون كرام القياسية *Micrococcus luteus* ATCC 8553 . أجريت عملية تنقية جزئية للمستخلص الخام بأستخدام المذيبات العضوية ، أظهر المستخلص المنقى جزئياً فعالية أعلى تجاه البكتريا المختبرة .

تم تشخيص الأحماض الدهنية للمستخلص الخام والمنقى جزئياً بأستخدام كروماتوغرافيا الغاز– السائل وأظهر التحليل احتوائه على الأحماض الدهنية : البالمتيكPalmitic acid والستياريك Stearic acid و الاوليك Oleic acid واللينولك Linoleic acid .

Abstract

The crud extract of the locally isolated Nitzschia *palea* was shown to have an inhibitory effect upon both gram positive standard strain *Micrococcus luteus* ATCC 8553 and the gram negative standard strain *Pseudomnas aeruginosa* ATCC 6750.
Ahigher inhibitory effect was obtained when the extract was partially purified by organic solvents.
Fatty acid analysis of both crud and partially purified extracts by gas – liquid chromatography showed the presence of Palmitic, Stearic, Oleic, Linoleic fatty acid.

المقدمة

تركزت الدراسات في السنوات الأخيرة حول إيجاد مصادر جديدة للمضادات الحيوية بسبب مقاومة البكتريا للمضادات الشائعة وخاصة بكتريا *Pseudomonas*. وكانت الأحياء المائية واحدة من هذه المصادر إذ تعمل الأحياء المائية على بناء العديد من المركبات الكيميائية الجديدة الفعالة حيوياً[1]. حيث تم اختيار المركبات الفعالة ومحاولة تنقيتها وتوصيفها لمعرفة خواصها الكيميائية والحيوية وتقدير فعاليتها وقيمتها الطبية [2].

يعد النشاط المضاد للنمو البكتيري واحد من هذه النشاطات ، حيث لمستخلصات معظم صفوف الطحالب نشاطا مضادا للنمو البكتيري وخاصة الطحالب العصوية التي تشكل الجزء الأكبر من الطحالب . إذ بينت الدراسات أن مستخلصات الأجناس العائدة لهذا الصف كانت ذات فعالية عالية في تثبيط نمو

الأحياء المجهرية وأعطت نتائج موجبة ضد البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام وبمناطق تثبيط واسعة[4,3] .

تهدف هذه الدراسة الى استخلاص المركبات الفعالة من الطحلب العصوي *Nitzschia palea* المعزول من البيئة المحلية وتنقية المركبات الفعالة في المستخلص واختبار فعاليته تجاه البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام.

المواد وطرائق العمل

1 – تحضير مجفف الطحلب:

تم عزل الطحلب العصوي *Nitzschia palea* من التربة الرطبة باستخدام طريقة Sterile Pasteur type pipette [5]. استزرع الطحلب في وسط Chu 10 المحور من قبل [6] بأستخدام المزارع الثابتة Batch culture وفي ظروف مختبرية (درجة حرارة 22±2 مئوية وشدة إضاءة 268 مايكرو انشتاين /م2 / ثا ولفترة 6:18 ساعة إضاءة:ظلام).

تم ترسيب المزارع في نهاية طور التضاعف Exponential phase في اليوم الثامن من عمر المزرعة وذلك بنبذها مركزيا بسرعة 3000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق. جمع بعدها الراسب وجفف عند درجة حرارة 50 لمدة 48 ساعة وكانت حصيلة الكتلة الحية هي 58 ملغم وزن جاف / لتر.

2– استخلاص المواد الفعالة الخام من الطحلب:

تم استخلاص المواد الفعالة الخام من الطحلب بأستخدام الايثانول 95 % ، حيث علق 250 ملغم من مجفف الطحلب في 10 مللتر من الايثانول، ثم رج المعلق لمدة 30-45 دقيقة، نبذ بعدها المستخلص مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة للتخلص من البقايا الخلوية، كررت العملية ثلاث مرات وبنفس الطريقة. جمع المستخلص الكحولي النهائي وتم التخلص من الكحول بالتبخير. أضيف إلى الراسب 2 مللتر من الماء المقطر و5 مللتر من كلوريد الميثيلين ورج جيدا لنحصل على طبقتين تم فصلهما باستخدام قمع الفصل. تم جمع الجزء العضوي وتركيزه بدرجة حرارة الغرفة [7].

3– تنقية المستخلص الخام:

اتبعت طريقة [7] للحصول على مركبات نقية جزئيا ذات فعالية عالية تجاه البكتريا، حيث اضيف 5 مللتر من هيدروكسيد الصوديوم (0.5 عياري) الى الجزء العضوي (المستخلص الخام)، جمع الجزء المائي وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.0 بوساطة حامض الهيدروكلوريك ويفصل مرة اخرى بكلوريد الميثيلين ، يؤخذ الجزء العضوي ويذوب في 10 مللتر من (1:9) ميثانول: ماء ويفصل ب 10 مللتر من الهكسان ،جزء الهكسان يطرح جانبا" ويضاف الماء الى ان نصل الى نسبة (3-7) ميثانول: ماء، يفصل الجزء الاخير بكلوريد الميثيلين (5) مللتر ويجمع الجزء العضوي ويركز ويحفظ بدرجة 4 مئوية.

4– تحديد الفعالية التثبيطية للمستخلص الخام والمنقى جزئيا تجاه البكتريا:

أستخدمت سلالتين قياسيتين الاولى موجبة لملون كرام*Micrococcus luteus* ATCC 8553والثانية سالبة لملون كرام *Pseudomnas aeruginosa* ATCC 6750 . تم تحديد فعالية المستخلص الخام والمنقى جزئيا باستخدام طريقة الانتشار في وسط الاكار المغذي الصلب [4] .

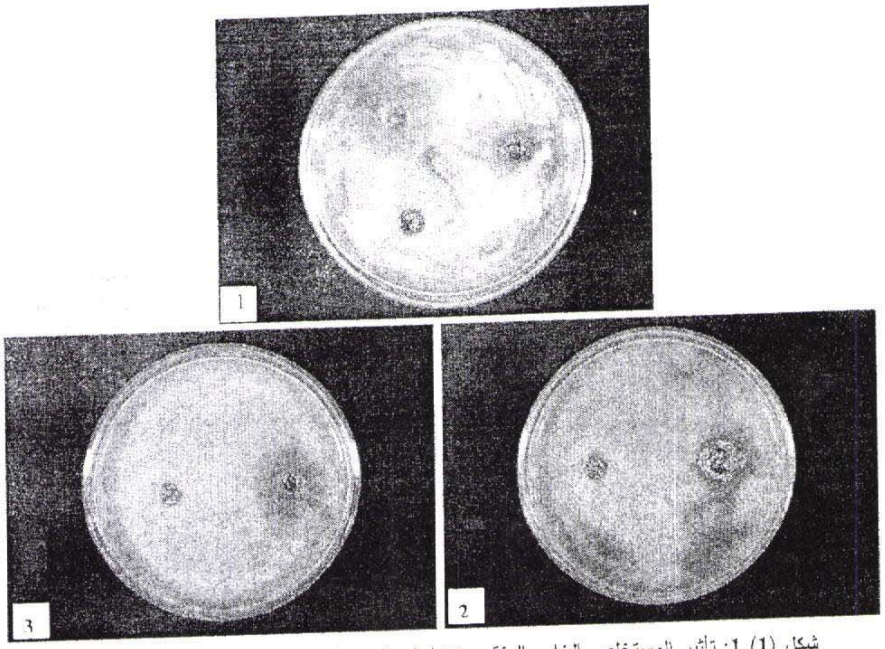
النتائج و المناقشة

يتضح من النتائج المبينة في جدول (1) والشكل(1) ، تأثر البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام بالمستخلص الخام للطحلب العصوي *N. plea* ولوحظ زيادة في فعالية المستخلص بعد تنقيته بصورة جزئية بزيادة اقطار التثبيط. حيث كان قطر التثبيط للمستخلص المنقى جزئيا 22 ملمتر للبكتريا الموجبة لملون كرام في حين كان 15 ملمتر للمستخلص الخام. واعطت البكتريا السالبة لملون كرام قطر تثبيط بلغ 27 ملمتر للمستخلص المنقى جزئيا في حين كان قطر التثبيط 16 ملمتر للمستخلص الخام. وهذه النتائج تتفق مع ما حصل عليه [7] في دراستهم على مستخلص الطحلب العصوي *Skeletonema costatum* حيث لاحظوا زيادة في اقطار تثبيط نمو البكتريا *Listonella* من 9 ملمتر الى 15.

جدول (1) أقطار التثبيط للمستخلص الخام والمنقى جزئيا للطحلب العصوي *Nitzschia palea* في نوعين من السلالات البكتيرية

السلالات المختبرة	المستخلص الخام	المستخلص المنقى
Micrococcus luteus ATCC 8553	15	22
Pseudomnas aeruginosa ATCC 6750	16	27

المجلة العراقية للعلوم، المجلد46، العدد1، 2005، الصفحة 121-124



شكل (1) 1: تأثير المستخلص الخام والمنقى جزئياعلى البكتريا *M. luteus* ATCC 8553

2: تأثير المستخلص الخام على البكتريا *P. aeruginosa* ATCC 6750

3: تأثير المستخلص المنقى جزئيا على البكتريا *P. aeruginosa* ATCC 6750

تعزى فعالية مستخلصات الطحالب العصوية الى الاحماض الدهنية ، لكون الطحالب العصوية وخاصة الريشيات منها غنية بالاحماض الدهنية والزيوت حيث تشكل حوالي 20-60 % من الوزن الجاف الكلي لها (8). واشارت الدراسات الى ان هذه المركبات لها فعالية مضادة للبكتريا السالبة والموجبة لملون كرام، وتمتلك الاحماض الدهنية المنفردة أو المجتمعة أما تأثير تثبيطي Bacterostatic أو قاتل Bactericidal على البكتريا [9، 10، 11، 12].

يلاحظ من تحليل الأحماض الدهنية للمستخلص الخام والمنقى جزئيا" لهذه الدراسة (جدول 2) اختلاف في نسب هذه الأحماض بين المستخلصين، اذ كونت الأحماض الدهنية المشبعة 19.63 و87.56% في كل من المستخلص الخام والمنقى على التوالي. وكانت النتيجة معكوسة في الأحماض الدهنية غير المشبعة إذ كونت 80.35 % للمستخلص الخام و 12.34% للمنقى جزئياً.

جدول(2) انواع ونسب الاحماض الدهنية في المستخلص الخام والمنقى جزئيا للطحلب العصوي *Nitzschia palea*

الحامض الدهني	عدد ذرات الكاربون	النسبة المئوية	
		الخام	المنقى
Palmitic acid البالمتك	16:0	18.05	79.6
Stearic acid الستيارك	18:0	1.58	7.96
Oleic acid الاوليك	18:1	15.95	–
Linoleic acid اللينولك	18:2	64.4	12.43

أن الاختلاف في الفعالية بين المستخلص الخام والمنقى جزئيا قد تعزى الى وجود مركبات أخرى تحيط بالجزء الفعال وتتداخل معه وبالتالي تقلل من فعاليته المضادة للبكتريا، لذا فأن مراحل التنقية تكون ضرورية لاظهار فعالية المركب بصورة أدق[13].

References:

1. Metting,B. and Pyne,J.W.(**1986**).*Biologically active campounds from microalgae*. Enzyme Microbio. Technol. 8: 386- 394.
2. Reichelt,J.L. and Borowitzika,M.A. (**1984**). *Antimicrobial activity from marine algae*: Result of a large – scale screening program. Hydrobiol.116/ 117: 158:166.
3. Duff,D.B.C.; Bruce,D.I. and Anita,N.J.(**1966**). *The antimicrobial activity of marine planktonic algae* . Can. J. Microbiol. 12: 877-884.
4. Kellam, S.J. and Walker,J.M. (**1989**). *Antibacterial activity from marine microalgae in labrotoray culture*. Br. Phycol. J. 24:191-194.
5. Hoshaw,R.W. and Roswski,J.R.(**1979**). *Method of Microscopicalgae. In:Handbook of phycological methods, Culture methods and measurements* (ed.J.R.Stein) Univ. of Cambridge Press.pp.53-86.
6. Kassim,T.I.;Al-saadi,H. and Salman,N.A.(**1999**). *Production of some Phyto- and Zooplankton and their use as live food for fish larvae* .Iraqi J. Agric. Proc. Of 2nd Sci. confer. Nov. 1999 4(5): 188-201.
7. Naviner,M.;Berg,J.P.;Durand,P. and Le bris,H.(**1999**).*Antibacterial activity of the marin Diatom Skeletonema costatum aginst aquacultural pathogens.Aquaculture* .174:15-24.
8. Regan,D.L.(**1988**). *Other microalgae .In: Micro-algal Biotechnology* (eds. M.A.Borowitzika and L.J. Borowitzika) Cambridge Univ. press. pp135-150.
9. Galbraith,H.; Miller,T.B.; Paton,A.M. and Thomson,J.K. (**1971**). *Antibacterial activity of long chain fatty acid and reversal with calcium, magnesium, ergociferol and cholesterol*. J. Appl. Bact. 34(4):803-813.
10. Aubert,M.;Aubert,J. and Gauthher, M. (**1979**). *Antibiotic substance from marine flora .In: Marine algae in pharmaceutical science* (eds. H.A. Hoppe ; T. Levring and Y. Tanaka).Walter de Gryter, Berlin. pp.276-292.
11. Cooper,S.; Battat,A.; Marto,P. and Sylvester,M. (**1983**). *Production of antibacterial activites by two Bacillariophyceae grown in dialysis culture*. Can. J. Microbiol.29:338-341.
12. Findlay,J.A. and Patil,A.D. (**1984**). *Antibacterial constituents of the Diatom Navicula delogeni*. J. Nat. prod. 47:815-818.
13. Vlachos,V.; Critchley,Y.T.; and Holy,A. (**1997**). *Antimicrobial activity of extracts from selected southern African macroalgae*. south.Africa. J. sci. 93:328-332.