تأثير مستخلصات الطحلب الدقيق *Chlorella* sp. في عزلات بعض الأحياء الدقيقة الممرضة

د. محمد بشير عرنوس*

الملخص

تعدّ الطحالب الدقيقة مصدراً غنياً بالمركبات الفعالة بيولوجياً وذات دور محتمل في تثبيط نمو الأحياء الدقيقة الممرضة للإنسان. دُرس في هذا البحث تأثير أربع خلاصات لمذيبات عضوية مختلفة (البروبانول، الميتانول، الكلوروفورم والأسيتون) للجنس *Chlorella* sp. من الطحالب الدقيقة الخضراء على عزلتين جرثوميتين موجبة لصبغة غرام (*Staphylococcus aureus, Micrococcus* sp.) وثلاث عزلات جرثومية سالبة لصبغة غرام (*Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa, Klebsiella* sp.) وعزلة فطرية (*Candida* sp.) من البيئة المحلية. بعد عزل جنس *Chlorella sp.* بطريقة التخطيط على الآغار، نُمّي الطحلب في إرلينات حاوية على الوسط المغذي ضمن حاضنة تنمية الطحالب، تمت عملية التعداد اليومي للخلايا الطحلبية وحدد منحني النمو، وحصدت الكتلة الحيوية في نهاية طور النمو اللوغاريتمي في اليوم العاشر. أُجري الاستخلاص بطريقة التعطين Maceration للمذيبات الأربعة وطبقت الخلاصات على العزلات الممرضة المختلفة بطريقة الانتشار بالآبار ثم قيس قطر هالة تثبيط النمو لكل منها.

بينت النتائج أن المردود الأعلى كنسبة مئوية لخلاصات *Chlorella sp.* كانت مع الميتانول والكلوروفورم بنسبة (4,4 و4%)على الترتيب، بينما سجلت النسبة الأدنى

* قسم علم الحياة النباتية . كلية العلوم . جامعة دمشق.

لكل من الأسيتون والبروبانول بنسبة (1,9 و1,8%) على التوالي. سجلت الخلاصات ذات المردود الأدنى فعالية تثبيطية مرتفعة تجاه الجراثيم الممرضة، فسجلت جراثيم .*Klebsiella* sp التأثر الأكبر بالخلاصة الأسيتونية، وبلغ متوسط قطر هالة تثبيطها (2.5±0.2 cm). كما تأثرت جراثيم .*Micrococcus* sp بشكل كبير بالخلاصة البروبانولية وبلغ متوسط قطر هالة التثبيط (2±0.6 cm)، بينما كان الأثر التثبيطي الأقل في جراثيم *P. aeruginosa* وبمتوسط قطر هالة التثبيط (1.3±0.3 cm). بالمقابل فقد أبدت العزلة *E.coli* مقاومة تامة لجميع الخلاصات، وكذلك فطر .*Candida* sp باستثناء فعالية ضعيفة للخلاصة الميتانولية في نموه. كما لوحظ أن قيم التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص الأسيتوني لطحلب *Chlorella* أقل على الجراثيم موجبة صبغة غرام وبذلك فهي ذات حساسية أكبر تجاه المستخلص الأسيتوني من الجراثيم سالبة صبغة غرام.

الكلمات المفتاحية: طحلب *Chlorella* – خلاصات – مضاد أحياء دقيقة– عزلة جرثومية ممرضة – تثبيط نمو.

The effect of microalgae extracts *Chlorella* sp. in some pathogenic microbes

Dr. M. Bachir Arnous*

Abstract

Microalgae are a rich source of biologically active compounds and have a potential role in inhibiting the growth of human pathogens. In this study, the effect of four extracts of different organic solvents (propanol, methanol, chloroform and acetone) of green microalgae *Chlorella* sp. was tested on two Gram positive strains (*staphylococcus aureus, Micrococcus sp*.), three Gram negative strains (*Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa, Klebsiella* sp.) And fungal strain (Candida sp.) from local environment. After the isolation of the species *Chlorella* sp. by using streaking agar method, algae was grown in flasks containing the algae culture medium within an algae incubator. The daily cell count was performed and the growth curve was determined, biomass was harvested at the end of the exponential growth phase on the tenth day. Extraction was made by the four solvents and applied on the different bacterial strains by diffusion wells, then the growth inhibition aura diameter was measured for each of them.

Results indicated that the highest extraction yield as a percentage of *Chlorella* sp. was recorded with methanol and chloroform at (4.4 and 4%) respectively, while the lowest was for acetone and propanol (1.9 and 1.8%), respectively. The extracts with the lowest yield had recorded high inhibition activity and the greatest influence of acetone extract was on *Klebsiella* sp. with average diameter of its inhibitory aura (2.5 ± 0.2) cm. *Micrococcus* sp. significantly affected by propanol extracts with average of (2 ± 0.6) cm, while the lower

*Department of Plant science-Faculty of Sciences-Damascus University.

inhibitory effect on *P. aeruginosa* an average diameter of (1.3 ± 0.3) cm. In contrast, the *E. coli* strain exhibited complete resistance to all extracts, as well as *Candida* sp. except for the weak effectiveness of the methanol extract in its growth. It has also been observed that (MIC) Minimal Inhibitory Concentrations of acetone extract of *Chlorella* algae are less on Gram positive strains, thus they are more sensitive to acetone extracts than Gram negative strains.

key words: *Chlorella* microalgae - extracts - pathogenic bacterial strains – antimicrobial- growth inhibition

المقدمة Introduction:

تعد الطحالب الدقيقة Microalgae كائنات حية متنوعة جداً ليس فقط من الناحية الشكلية أو التصنيفية ولكن أيضاً من الناحية الاستقلابية، حيث تحتوي العديد من المستقلبات الثانوية secondary metabolites ذات الفعالية الحيوية المهمة (Aneiros et al., 2003; Singh et al., 2005 ; Akgül et al., 2013)، والتي يمكن أن تكون مركبات داخل خلوية Intracellar Products أو خارج خلوية Extracellular Products (Kim, *et al.*, 2006). استخدمت الطحالب الدقيقة لأغراض مختلفة منذ عام 1950، وتركز الجهود الأخيرة على إيجاد مركبات جديدة ذات دور علاجي مفيد (Mendes et al., 2003; Cardozo et al., 2007). على الرغم من التقدم الكبير في مجالات الصحة ما تزال الأمراض السارية المسببة من قبل الجراثيم والفطريات والفيروسات تشكل تهديداً كبيراً للصحة العامة، إضافة إلى التطور المستمر للعوامل الممرضة الدقيقة تجاه مقاومة الصادات الحيوية مما يتطلب إيجاد مركبات جديدة مضادة لهذه الميكروبات. تشكل الطحالب الدقيقة مصدراً طبيعياً محتملاً للمركبات الجديدة المضادة للجراثيم وخياراً جيداً لمكافحة الجراثيم المقاومة للصادات الحيوية ومناطق العدوى الفطرية (زينب وآخرون، 2011: عبد علي وآخرون 2012) (Ghasemi *et al*., 2004; Ely et al., 2004 ; Prakash *et al*., 2011; Salem *et al.*, 2014). أظهرت العديد من أنواع الطحالب الدقيقة فعالية مضادة للجراثيم لاحتوائها على مجموعات مختلفة من المستقلبات مثل الإندول indoles، التيربين terpenes، الفينولات phenols، الهيدروكربونات الطيارة volatile hydrocarbons والحموض الدسمة غير المشبعة ذات السلاسل الطويلة long chains unsaturated fatty acids، حيث يمكن الاستفادة من هذه المواد ذات الأصل الطحلبي لتحضير أدوية جديدة توفر بديلاً مناسباً ضد العوامل الممرضة

المقاومة للمضادات الحيوية (Naviner *et al*., 1999; Herrero *et al*., 2006; Jyotirmayee *et al*., 2011).

أجريت العديد من الدراسات على الطحالب الدقيقة المعزولة من المياه البحرية والعذبة لاختبار فعاليتها المضادة للعوامل الممرضة (Ely *et al*., 2004 ; Reham G. *et al*., 2013; Abdel-Raouf*et al*., 2015)، وأشار عدد منها إلى أن الأجناس العائدة لشعبة الطحالب الخضراء كان لها الفعالية الأعلى عند اختبار مستخلصاتها في تثبيط نمو الأحياء الدقيقة مقارنة بأنواع الطحالب الأخرى، إذ أعطت مستخلصاتها نتائج إيجابية ضد الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة غرام فضلاً عن الفطريات (Oranday et al., 2004 ; Ghasemi et al., 2007; Salem *et al*., 2014; Elkomy *et al*., 2015 ; Corona *et al*., 2016). ولما يتمتع به من أهمية طبية محتملة تم إنجاز عدد من الأبحاث على طحلب *Chlorella* من الطحالب الخضراء الدقيقة (Ordog *et al*., 2004 ; Cannell *et al*., 1988، عبد علي وآخرون، 2012)، وتم تسجيل أول صاد حيوي طحلبي المسمى الكلورلين Chlorellin منه (Pratt *et al*., 1944)، وتبين أنه مكون من عدد من الأحماض الدسمة غير المشبعة ويتركب من: 77.35% كربون، 11.6% هيدروجين، 10.99% أوكسجين (Kim *et al*., 2006).

يهدف البحث إلى عزل الطحلب الأخضر الدقيق *Chlorella* من البيئة المحلية واستزراعه ضمن المختبر للحصول على كتلة حيوية كافية، ومن ثم تحضير مجموعة من المستخلصات باستعمال مذيبات عضوية مختلفة (البروبانول، الميتانول، الكلوروفورم، الأسيتون) لدراسة الأثر الصّادي المحتمل ضد عدد من السلالات الجرثومية الموجبة لصبغة غرام (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp.) والسالبة لصبغة غرام (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Klebsiella* sp.) والفطرية (*Candida* sp.) المعزولة من البيئة المحلية.

المواد والطرائق: Materials and methods

الاعتيان وعزل وتنمية جنس *Chlorella*

جُمعت عينات مائية من نهر بردى في منطقة الربوة بدمشق في ربيع عام 2017 ضمن عبوات بلاستيكية نظيفة ومن ثم نقلت إلى المختبر مباشرة في حافظة حرارية. تم عزل جنس *Chlorella* من باقي الأجناس الموجودة في العينات بطريقة التخطيط على الآغار streaking cells across agar، هذا وقد أُجريت جميع مراحل العزل والتنقية في ظروف عقيمة وفق المراحل الآتية (Andersen, 2005):

تم تحضير وسط مرق استنبات الطحالب Algae Culture Broth المصلب بالآغار وفق تعليمات الشركة المصنعة (Fluka, India) على أطباق بتري بلاستيكية قياس 90 mm. كما حُضرت سلسلة تخفيفات من عينة الماء وذلك بتخفيفها بالوسط المغذي السائل المعقم، وزُرعت كمية 0.5 ml من التخفيف 10^{-5} على الوسط المغذي بطريقة الفرش. ومن ثم حُضنت الأطباق المزروعة في حاضنة الطحالب وفق الشروط الآتية: (الحرارة: 25 C^0، الإضاءة: 3000 لوكس والمدة: 16 ساعة ضوء: 8 ظلام) حتى ظهور المستعمرات ولمدة 7–10 أيام. تم فحص المستعمرات النامية على الأطباق مجهرياً لتحديد مستعمرات *Chlorella* والتي نقلت بعد التأكد منها من الوسط المغذي الصلب إلى الوسط السائل المعقم في أرلينات سعة 250 ml بهدف الإكثار وضمان عدم التلوث بطحالب أخرى وحضنت بالشروط السابقة نفسها إضافة للتهوية المستمرة.

بعد الحصول على مزارع نقية تماماً والتأكد من ذلك مجهرياً، نُميت الكتلة الحيوية للجنس *chlorella* في أرلينات 500 ml تحتوي الوسط المغذي المعقم Algae Culture Broth وفي الحاضنة وبالشروط ذاتها. تمت عملية التعداد اليومي للطحلب أثناء الحضن (حتى اليوم 18 من بدء الزراعة)، وذلك بأخذ 1 ml من العينة والعد تحت المجهر باستخدام صفائح neubower، وذلك من أجل تحديد منحني النمو وحصد الكتلة الحيوية في نهاية طور النمو الأسي logarithmic phase، هذا ولم

يتم تعويض وسط النمو المأخوذ بعينات العد بإضافة كمية من الوسط الخام وذلك لقلة الكمية المسحوبة فهي لا تشكل سوى 3,6% من إجمالي الوسط (Andersen, 2005). ثفلت المزارع (5/5000 min rpm) لترسيب الكتلة الحيوية، ومن ثم تركيز الخلايا والحصول عليها بهيئة تشبه المعجون (Ranjan *et al.*, 2010).

استخلاص *Chlorella* بالمذيبات:

استعملت أربعة مذيبات عضوية لاستخلاص المواد الفعالة من الكتلة الحيوية لطحلب *Chlorella* وهي الميتانول، البروبانول، الكلوروفورم، والأسيتون، أجري الاستخلاص بطريقة نقع الكتلة الحيوية الطحلبية الرطبة (المحصودة) مع المذيب بنسبة 1 (كتلة حيوية) إلى 10 (مذيب) وبدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر في الهزازة. فُصلت بعد ذلك الخلاصة عن الكتلة الحيوية بالتثفيل ونقلت الخلاصات إلى بيشر نظيف وتم تبخير المذيبات في الحاضنة الهزازة بدرجة 45 م^0 للحصول على الخلاصة بشكل نقي (Turkmen *et al.*, 2006).

تم حساب المردود من خلال العلاقة:

المردود = وزن الخلاصة / وزن الكتلة × 100

دراسة فعالية الخلاصات المختلفة لطحلب *Chlorella* sp. على الأحياء الدقيقة المختبرة:

تم تطبيق الخلاصات على كل من العزلات الجرثومية موجبة صبغة الغرام (*Staphylococcus aureus, Micrococcus*) وسالبة صبغة الغرام (*Escherichia coli, Psudomonas aeroginosa, Klebsiella*) وعزلة فطر (*Candida* sp.) المعزولة من مرضى محليين، وتم الحصول عليها من مختبر الأحياء الدقيقة في كلية الطب–جامعة دمشق.

تمت عملية الزرع ضمن الحجرة العقيمة حيث جهزت أطباق بتري حاوية على 20 ml من وسط مولر–هينتون الصلب Mueller-Hinton agar، كتب على كل منها

الاسم ونوع الخلاصة. أخذت كمية 0.5 ml من كل معلق جرثومي تم تحضيره مسبقاً بتركيز 0.5 ماكفرلاند العياري (Cockerill *et al*., 2012)، وتم زرعه في الأطباق بطريقة الفرش Spreading باستخدام الماسحة القطنية بغية الحصول على نمو جرثومي متجانس في كل الأطباق. تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة مدة 15 دقيقة وبعدها تم عمل آبار بقطر 7 mm في الآغار المغذي (طريقة الانتشار بالآبار well diffusion) باستخدام ثاقبة فلين معقمة (Devillers *et al.*, 1989). وبالوقت نفسه تم حل الخلاصات النقية بمحلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) لتحضير محلول بتركيز 0.5 g/ml من كل خلاصة. بعد ذلك وباستخدام ماصة دقيقة تم حقن 200 µl من الخلاصة المحددة في البئر وتركت الأطباق بعد ذلك لمدة 30 دقيقة في حرارة الغرفة للسماح للخلاصة بالانتشار في الآغار. ومن ثم لُفّت جميع الأطباق بالبارافيلم ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ و25مْ لكل من الجراثيم والفطريات على الترتيب ولمدة 24 ساعة. وأخيراً قيست أقطار هالات التثبيط zones of inhibition بعد الحضن. هذا وقد تم عمل طبق شاهد Control لكل نوع جرثومي يحتوي على DMSO فقط.

تحديد التركيز الأدنى المثبط للنمو (MIC) minimum inhibitory concentration:

تم تحديد التركيز الأدنى المثبط للنمو MIC بطريقة الانتشار بواسطة الأقراص Agar diffusion Disk، لخلاصة الأسيتون فقط ذات التأثير التثبيطي الأكبر على الجراثيم الممرضة. إذ تم تحميل تراكيز مختلفة (100، 50، 25، 12,5، 6,25%) حتى التشبع من الخلاصة على أوراق ترشيح (Whatman) بقطر 6 mm، ثم تركت لتجف ووزعت على أطباق بتري حاوية على وسط مولر–هنتون آغار مزروعة بعزلات الجراثيم (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas aeroginosa*, *Klebsiella* sp.) وبطريقة الفرش، وقد وُضع في كل طبق أربعة أقراص وكررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز، حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة، ومن ثم قيست أقطار هالات التثبيط حول الأقراص (Warren, 2008).

الدراسة الإحصائية:

أجريت جميع التجارب السابقة بعمل ثلاثة مكررات وسجلت النتائج كمتوسط حسابي وانحراف معياري ($\bar{x} \pm SD$)، وتم استخدام برنامج SPSS لحساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لأقطار هالات التثبيط وفي عمليات المقارنة بين فعالية الخلاصات المختلفة ضد الجراثيم والفطريات المدروسة.

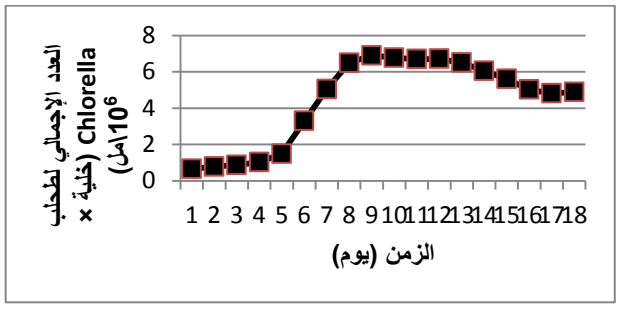
النتائج والمناقشة Results and discussion:

عزل وتنمية طحلب *Chlorella*:

تم الحصول بطريقة العزل بتخطيط الخلايا على الوسط الصلب على مستعمرات طحلب *Chlorella* خضراء اللون قرصية الشكل ذات حواف تامة لامعة وبأقطار من 4–8 مم. امتازت خلايا المستعمرات تحت المجهر بشكل كروي إلى بيضوي مفردة وأحياناً في تجمعات غير متحركة ذات صانعة فنجانية الشكل تحتوي بيرينوئيد وقد يكون غائباً في بعضها وهذا يتوافق مع الشكل النموذجي (Algaebase, 2017). بعد التأكد من عملية تحديد الطحلب بدقة تمت عملية التنمية والإكثار للخلايا بغية الحصول على الكتلة الحيوية والاستخلاص بالمذيبات. تعد طريقة العزل لطحلب *Chlorella* المستعملة من الطرائق المفضلة لعزل الطحالب وحيدة الخلية المستعمرية وطحالب التربة، ليس بسبب سهولتها فحسب وإنما لإعطائها مزارع طحلبية نقية من أي تلوث دون الحاجة لعمليات تنقية أخرى، ولكن بشرط أن تكون هذه الأنواع قادرة على النمو في الأوساط الصلبة (Andersen, 2005).

كما هو موضح في الشكل (1) (منحني نمو طحلب *Chlorella*) بينت النتائج أن اليوم العاشر كان نهاية طور النمو اللوغاريتمي وبتعداد إجمالي ($1.23 \pm 6.89 \times 10^6$) خلية/مل ليبدأ باليوم الحادي عشر طور الثبات stationary phase مما يؤكد صحة موعد حصاد الكتلة الحيوية والذي تم في اليوم العاشر لاستخلاص المواد الفعالة من الطحلب. يشابه منحني النمو في هذه الدراسة ما توصل له عبد علي

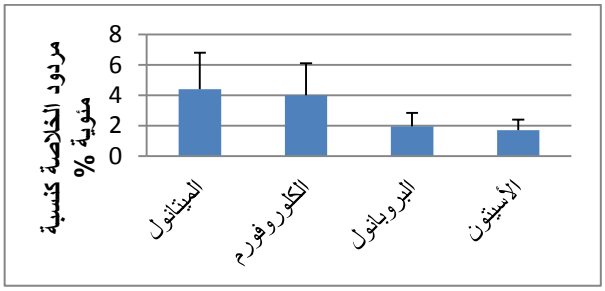
وزملاؤه (2012) إذ سُجل في اليوم الحادي عشر من الزرع بداية طور الثبات لطحلب *C. vulgaris* المعزول من نهر دجلة، كما تعد نتائج هذه الدراسة متقاربة مع ما توصل له Elkomy وزملاؤه (2015) عندما سُجل في اليوم الثالث عشر بداية طور الثبات لطحلب *C. marina* المعزول من البحر المتوسط. قد يعزى هذا الاختلاف عموماً لنوع الطحلب والظروف البيئية واختلاف وسط الاستنبات واستهلاك المغذيات من قبل الطحلب. في حين بلغ محتوى الكربون العضوي في طحلب *C. vulgaris* المعزول من المحيط الهندي أعلى مستوى له في اليوم العشرين من الاستزراع (Sampathkumar *et al.*, 2017)، وقد يعود هذا الاختلاف الواضح للبيئة البحرية الخاصة بالطحلب المعزول، وكذلك وسط وشروط الاستنبات التي اتبعت في الدراسة المذكورة.



الشكل (1): منحني نمو طحلب *Chlorella* المستزرع في الوسط المغذي Algae culture broth ضمن حاضنة الطحالب وفق الشروط الآتية: (الحرارة: 25 C^0، شدة الإضاءة: 3000 لوكس ومدة الإضاءة 16 ساعة ضوء: 8 ظلام)

مردود الخلاصات بالمذيبات المختلفة :

تم حساب مردود الخلاصات بالمذيبات المختلفة كنسبة مئوية من الكتلة الحيوية الإجمالية، وكانت الخلاصة الميتانولية ذات المردود الأعلى، تليها خلاصة الكلوروفورم بنسبة (4,4 و4%)على الترتيب، فيما كانت الخلاصتين البروبانولية والأسيتونية الأقل مردوداً بنسبة (1,9 و1,8%) على التوالي، الشكل (2).



الشكل (2): متوسط مردود أوزان الخلاصات الطحلبية كنسبة مئوية

عملية الاستخلاص المتبعة تضمن الحصول على المركبات الطحلبية داخل الخلوية (وكذلك ما تبقى من المركبات خارج الخلوية العالقة في الكتلة الحيوية بعد التثفيل) من الكتلة الحيوية الرطبة وبدرجة حرارة منخفضة نسبياً لضمان عدم تخرب المركبات للحرارة التي يمكن أن تفسد المواد الفعالة فيها (Kim, *et al.*, 2006). يتمتع الميتانول بقطبية عالية قادرة على حل العديد من المركبات داخل الخلوية وخارجها، وبخاصة الحموض الدسمة والموجودة بكميات كبيرة في *Chlorella*، مما جعل الخلاصة الميتانولية هي الأكبر مردوداً بين المحلات المستخدمة. وعلى الرغم من كون الكلورفورم مذيباً غير قطبي إلا أنه يعمل أيضاً على حل كل المركبات العضوية وبخاصة الدهون من الخلايا، مما يفسر ارتفاع مردود خلاصته. يتمتع الأسيتون بقطبية نسبية متوسطة، ولذلك فإنه يعد مذيباً قوياً ويقوم بحل الأصبغة بما فيها اليخضور والكاروتينات والكزانتوفيل، ونظراً لانخفاض محتوى خلايا *Chlorella* من هذه الأصبغة فإن ذلك تجلى في كون أن الخلاصة الأسيتونية هي الأقل مردوداً (Turkmen et al., 2006).

حساسية الأحياء الدقيقة الممرضة المختبرة تجاه الخلاصات الطحلبية:

أظهرت النتائج أن كلاً من خلاصة الأسيتون والبروبانول لها القدرة على تثبيط النمو الجرثومي لجميع الجراثيم الممرضة المختارة ما عدا جراثيم *E. coli* وكذلك فطر *Candida* sp.، بينما لم تملك خلاصات الميتانول والكلوروفورم أي تأثير تثبيطي في

نمو الجراثيم الممرضة المختبرة، وكانت خلاصة الميتانول الوحيدة القادرة وبفعالية متوسطة على تثبيط نمو فطر الخميرة *Candida* sp. (الجدول 1). سجلت جراثيم *Klebsiella* sp. التأثر الأكبر بالخلاصة الأسيتونية، إذ بلغ قطر هالة التثبيط 2.5±0.2 cm، بينما كانت عزلة *S. aureus* الأقل تأثراً بالخلاصة ذاتها وبقطر الهالة 1.3±0.4 cm الشكل (3). بينما كانت الخلاصة البروبانولية ذات التأثير التثبيطي الأكبر، وبفعالية قوية ضد جراثيم *Micrococcus* sp. إذ بلغ قطر هالة التثبيط 2±0.6 cm، بينما كان الأثر التثبيطي الأقل في جراثيم *P. aeruginosa* وبقطر 1.3±0.3 cm. هذا وتعد جراثيم *E. coli* مقاومة لجميع المستخلصات المدروسة، إذ لم تسجل أي هالات تثبيط على الأطباق، وكذلك فطر *Candida* sp. باستثناء فعالية ضعيفة للخلاصة الميتانولية في نمو هذا الفطر (الجدول 1).

الجدول (1): متوسط أقطار هالات التثبيط مقدرة بـ cm، والتي تحدد حساسية العزلات الجرثومية الممرضة المختبرة ضد الخلاصات الطحلبية المختلفة (حيث–لا يوجد تأثير، قطر الهالة 0.8-0.1 ضعيف الفعالية، قطر الهالة 1.2-0.8 متوسط الفعالية، قطر الهالة > 1,2 قوي الفعالية).

المذيب	الجراثيم سالبة صبغة غرام			الجراثيم موجبة صبغة غرام		فطريات
	E. coli	*P. aeruginosa*	*Klebsiella* sp.	*S. aureus*	*Micrococcus* sp.	*Candida* sp.
الشاهد (DMSO)	-	-	-	-	-	-
الميتانول	-	-	-	-	-	0.8±0.1
الأسيتون	-	1.5±0.2	2.5±0.2	1.3±0.4	1.8±0.1	-
الكلوروفورم	-	-	-	-	-	-
البروبانول	-	1.3±0.3	1.6±0.4	-	2±0.6	-

هذا وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل له Salem وزملاؤه (2014) حيث إن الخلاصة الأسيتونية لطحلب *C. vulgaris* هي الأكثر فعالية في تثبيط نمو العزلات الجرثومية *S. aureus* و *Klebsiella* sp. وسجلت هالات تثبيط بمقدار (1.7 و 1.4) cm على الترتيب، وكذلك تتفق مع كون هذه الخلاصة لم تؤثر في فطر *Candida* sp. وكذلك تتفق نتائج هذه الدراسة مع Elkomy وزملائه (2015) بكون الخلاصة الميتانولية لم تظهر أي فعالية صادية على العزلات الجرثومية. بالمقابل فقد تباينت

نتائج هذه الدراسة مع نتائج عبد علي وزملائه (2012) إذ سجلت الخلاصة الميتانولية أفضل تأثير في الجراثيم المدروسة، وكذلك ما ذكره Sampathkumar وزملاؤه (2017) بأن الخلاصة الميتانولية لطحلب *C. vulgaris* كانت الأفضل من حيث التأثير والتي ثبطت نمو جراثيم *E. coli* بقطر هالة 0.8 cm وهذه الأخيرة التي تعدّ من الجراثيم التي لم تتأثر بخلاصات *Chlorella* المختلفة في العديد من الدراسات.

عزلة جراثيم *Klebsiella* sp.

عزلة جراثيم *S. aureus*

الشكل (3): تأثير الخلاصة الأسيتونية لطحلب *Chlorella* وظهور هالات التثبيط

بينت نتائج الدراسة أن أقل قيمة للتركيز المثبط الأدنى للنمو MIC للمستخلص الأسيتوني لطحلب *Chlorella* كانت 12,5% لعزلتي *Micrococcus* sp. و*Staphylococcus aureus* وبلغت 25% لعزلة *Klebsiella* sp. في حين بلغت 50% لعزلة *P. aeruginosa*. ووفقاً لهذه النتيجة لوحظ أن قيم التركيز المثبط الأدنى أقل على الجراثيم موجبة صبغة غرام ومن ثمَّ فهي أكثر حساسية تجاه المستخلص الأسيتوني من الجراثيم سالبة صبغة غرام، وهذا ما توافق مع نتائج عبد علي وزملائه (2012) إذ كانت قيم التركيز المثبط الأدنى لنمو الجراثيم موجبة أقل مما هي عليه في الجراثيم سالبة صبغة غرام.

هذا ويمكن أن تعزى فعالية الخلاصة الأسيتونية والبروبانولية في التثبيط إلى وجود بعض المركبات الفعالة حيوياً، إذ أثبتت الدراسات لخلاصات مختلفة من طحلب *Chlorella* وجود عدد من المركبات الفعالة بيولوجياً مثل: الفلافانوئيدات، التانينات، المركبات الفينولية، التربينات، الغليكوزيدات، الصابونينات، السكريات وحتى الأصبغة اليخضورية. كما أن المستخلصات الطحلبية بمختلف مذيباتها لها فعالية تثبيطية واضحة على الجراثيم سواء كان المستخلص داخل أم خارج خلوي، ويرجع السبب لاحتوائها على بيبتيدات حلقية وقلويدات وسكريات دهنية متعددة (Singh, 2005; Kellam, *et al.*, 2008; Salem et al., 2017). يعزى تأثير مستخلصات طحلب *Chlorella* في الجراثيم الموجبة لصبغة غرام أكثر من تأثيرها في الجراثيم السالبة لصبغة غرام كون الجراثيم السالبة أقل حساسية للمركبات الفعالة من الجراثيم الموجبة نتيجة لبنية جدارها الخلوي المكون من عدة طبقات معقدة من السكريات الدهنية المتعددة، وكذلك الغلاف الفوسفولبيدي الخارجي والذي يجعل من الصعوبة بمكان اختراق المواد الفعالة لهذا الجدار الخلوي ومن ثمَّ القضاء عليها وتثبيط نموها (ÖrdÖg. *et al.*, 2004).

كنتيجة يوجد العديد من العوامل التي تؤثر في طبيعة النتائج التي تتعلق بفعالية مستخلصات الطحالب تجاه نشاط النمو الجرثومي، ويمكن أن تصل إلى اختلاف أو حتى تناقض في النتائج المذكورة في أكثر من بحث عن النوع ذاته من الطحالب، يعزى ذلك لاختلاف البيئة ووقت الجمع وطرائق حفظ العينات واختلاف أوساط النمو المستعملة، ومرحلة نمو الطحالب عند الحصاد ونوع المذيب المستعمل في الاستخلاص، وكذلك طريقة الاستخلاص (Tüney *et al.*, 2006).

التحليل الإحصائي:

بدراسة منحني العلاقة بين أقطار هالات التثبيط للجراثيم الممرضة ومردود الخلاصات المختلفة، تبين عدم وجود ارتباط أو فروق معنوية بين متوسطات هالات

التثبيط ومردود الخلاصات مما يؤكد عدم وجود علاقة ثابتة بين ارتفاع مردود الخلاصات وازدياد الأثر التثبيطي للخلاصة المحددة.

الاستنتاجات:

1. سُجل المردود الأعلى لخلاصات *Chlorella sp.* مع الميتانول والكلوروفورم بنسبة (4,4 و4%)على الترتيب، بينما سجلت النسبة الأدنى لكل من الأسيتون والبروبانول بنسبة (1,9 و1,8%) على التوالي.
2. سجلت الخلاصات ذات المردود الأدنى فعالية تثبيطية مرتفعة تجاه الجراثيم الممرضة، فسجلت جراثيم *Klebsiella* sp. التأثر الأكبر بالخلاصة الأسيتونية.
3. تأثرت جراثيم *Micrococcus* sp. بشكل كبير بالخلاصة البروبانولية وبلغ متوسط قطر هالة التثبيط (2±0.6 cm).
4. أبدت العزلة *E.coli* مقاومة تامة لجميع الخلاصات، وكذلك فطر *Candida* sp. باستثناء فعالية ضعيفة للخلاصة الميتانولية في نموه.
5. وفقاً لقيم التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص الأسيتوني لطحلب *Chlorella* تبين أن الجراثيم موجبة صبغة غرام ذات حساسية أكبر تجاه هذا المستخلص من الجراثيم سالبة صبغة غرام.

المراجع References:

1. زينب، أسمهان وعباس، آصف وقرة علي، أحمد. (2011). الفعالية الصادة لمستخلصات بعض الطحالب البحرية السورية تجاه بعض الأحياء الدقيقة الممرضة. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية، المجلد 33، العدد 3.
2. عبد علي، غيداء حسين ومحمد جواد، عبد اللطيف والجميلي، محمد فاضل. (2012). تأثير فعالية المركبات المنتجة من الطحلبين *Scenedesmus quadricauda* و*Chlorella vulgaris* ضد بعض البكتيريا والفطريات. مجلة جامعة بابل، العلوم الصرفة والتطبيقية، العدد 4، المجلد 20.
3. Abdel-Raouf. N. Al-Enazi, N.M., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem.IBM. Al-Othman,MR. and Hatamleh, A.A., 2015. Antibacterial b-amyrin isolated from Laurenciamicrocladia. Arabian Journal of Chemistry. 8,32-37.
4. Akgül, R., Süerdem, T.B. and Akgül, F., 2013. Antimicrobial Activities of Some Marine Algae and Some Cyanobacteria from Çanakkale (Turkey), J. Algal Biomass Utln, 4 (3): 35–40.
5. Andersen, R.A. (Ed.). 2005. Algal culturing techniques. Academic press.
6. Aneiros, A. and Garateix, A., 2004. Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.; 803(1):41-53.
7. Cardozo K H M, Guaratini, T., *et al*., 2007. Metabolites from algae with economical impact. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol; 146(1-2):60-78.
8. Channell, R.j.p., Owsianka, A.M. and Walker J.M., 1988. Result of Large-Scale Screening Programme to Detect Antibacterial Activity from Freshwater Algae. Br. Phycol . J. 23: 41-44.
9. Cockerill III, Franklin R., *et al.* 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI. p. 12.

10. Corona, E., Fernandez-Acero, J. and Bartual, A., 2017. Screening study for antibacterial activity from Marine and freshwater microalgae. International Journal Pharmacology Biology Scinces 8(1): (P) 189 – 194.
11. Devillers, J., Steiman, R., Seigle-Murandi. F., 1989. The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. Chemosphere. Volume 19, Issues 10–11, Pages 1693-1700.
12. Elkomy R., Ibraheem I.B.M. Shreadah M., Mohammed R. and Ismael A., 2015. Antimicrobial Activity of Three Microalgae Isolated from Mediterranean Sea Coast, Egypt. journal of pure and applied microbiology. Vol. 9(4), p. 2751-2758.
13. Ely R., Supriya, T. and Naik, C.G., 1997. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. Journal of European Pharmacopoeia. Mikrobiologische Wertbestimmung von Antibiotika, Diffusions method. Deutscher-Apotheker-Verlag, Stuttgart, 6th Ed.; section 2.7.2. Experimental Marine Biology and Ecology; 309(1): 121-127.
14. Ghasemi Y., Yazdi M.T., Shafiee A., Amini M., Shokravi S. and Zarrini, G., 2004. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. Pharmacology and Biology; 42(4-5):318-322.
15. Guiry M.D. and Guiry, G.M., 2017. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org.
16. Herrero M., Ibanez, E., Cifuentes, A., Reglero, G. and Santoyo, S., 2006. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. Journal of Food Protection; 69(10):2471-2477.
17. Jyotirmayee P., Sachidananda D. and Basanta Kumar, D., 2014. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. African Journal of Pharmacology; 8(32): 809-818.
18. Kellam,S.J., Cannell, R.J.P., & Walker J.M., 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture, British Phycological Journal, 23:1, 45-47.

19. Kim P., Dong J. and Lee C.G., 2006. Influence of extracellular products from Haematococcus pluvialis on growth and bacteriocin production by three species of Lactobacillus. Microbiol. Biotechnol. 16(6): 849-854.
20. Mendes R.L, Nobre B.P., Cardoso M.T, Pereira A P, Palabra A F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. Inorg Chim Acta. 2003; 356:328-334.
21. Naviner M., Berge J., Durand P., Le Bris H., 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture; 174(1-2):15-24.
22. Oranday MA., Verde-Star M., Martínez-Lozano SJ., and Waksman NH., 2004. Active fractions from four species of marine algae. Journal of Phyton. 53 (5): 165-170.
23. 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, 16:309-314.
24. Prakash J.W., Johnson M. and Solomon J., 2011. Antimicrobial activity of certain fresh water microalgae from Thamirabarani *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 1(2):170- 173.
25. Pratt R., Daniels T.C. Eiler J.B. Gunnison J. B. and Kumler W. D. (1944). Chlorellin, an antibacterial substance from Chlorella. Science, 99: 351-352.
26. Ranjan A., Patil, C., and Moholkar V. S. (2010). Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. Industrial & Engineering Chemistry Research, 49(6), 2979-2985.
27. Reham G.E., Abdel Hameed M.S., Hassan S.H. and MohammedR., 2013. Isolation and Characterization of Antimicrobial Active Compounds from the Cyanobacterium Nostoc commune Vauch. Journal of pure and applied microbiology; 7(1):109-116.
28. Salem Olfat M.A., Hoballah E.M., Ghazi Safia M., Hanna SuzyN., 2014. Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasize on Nostoc sp. Life Science Journal;11(12).

29. Sampathkumar P., Dineshkumar R. and Kumaravel R., 2017. Cultivation of Efficient Marine Microalgae and Their Biochemical Composition and Its Antibacterial Activity against Human Pathogens. Journal of Aquaculture & Marine Biology. Volume 5 Issue 4 – 2017.
30. Singh S., Kate B.N. and Banecjee U.C. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. Critical Review of Biotechnology; 25(3):73- 95.
31. Tüney I., Bilge H.C., Dilek U. and Atakan S., 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). Turk Journal of Biology; 30:171-175.
32. Turkmen N., Sari F. and Velioglu Y., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black Mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry., 99(4):835-841.
33. Warren Levinson. 2008. Review of medical microbiology and immunology. London. Eleventh edition. P: 79-80.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2020/06/08.
تاريخ قبوله للنشر 2020/09/02 .