مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (1) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (1) 2011

دراسة النشاط المضاد للأحياء الدقيقة لدى نوعين اسفنجيين متوسطيين *Axinella polypoides*و *Spongia officinalis* من شاطئ اللاذقية

الدكتورة ازدهار عمار*

الدكتور مفيد ياسين**

ألمى شبار***

(تاريخ الإيداع 26 / 8 / 2010. قبل للنشر في 21 / 2 / 2011)

□ ملخّص □

يظهر هذا البحث النشاط المضاد للأحياء الدقيقة لدى بعض الاسفنجيات التي تم جمعها من شاطئ اللاذقية .تم دراسة تأثير خلاصات خام لنوعين اسفنجيين مختلفين مورفولوجياً وهما *Axinella polypoides* و*Spongia officinalis*على ثمانية عوامل ممرضة مشفوية جرثومية وفطرية،الجرثومية و كانت العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* والأسينيتوباكتر *Acinetobacter meningitis* ،الكليبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumonia* ،الإشيريكيا القولونية *Escherichia coli* ،الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ،الأسينيتوباكتر *Acinetobacter septicus* ،المتقلبات الاعتيادية *Proteus vulgaris* ،أما العامل الممرض الفطري فقد كان خميرة المبيضات البيض *Candida albicans*.تم الحصول على خلاصات الخام باستخدام محلات مختلفة القطبية (Larsen,2005) .لوحظ أن جراثيم *A. meningitis* و *S. aureus* و *K. pneumonia*و *E.coli* تمتلك تحسساً عالياً للخلاصة الميتانولية الخام للاسفنج *Axinella polypoides* .أظهرت جراثيم *Acinetobacter meningitis* تحسساً عالياً للخلاصة الميتانولية الخام للاسفنج *Spongia officinalis* ، في حين أظهرت جراثيم الـ *Staphylococcus aureus* تحسساً متوسطاً وجزئياً للخلاصة الميتانولية الخام لهذا الاسفنج، لدى مقارنة مدى الفعالية الحيوية للخلاصتين الميتانوليتين للنوعين الاسفنجيين على الجراثيم المدروسة مع مدى فعالية الصادات الحيوية المستخدمة حالياً لاختبار التحسس الجرثومي في المشفى ووفقاً للتراكيز المحددة تماثل تأثير الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* مع تأثير الصادات Ceftriaxone وAzithromycin و Gentamicinتجاه *Staphylococcus aureus* و مع تأثير الصادات Ceftriaxone و Ciprofloxacinو Azithromycinتجاه جراثيم *Acinetobacter meningitis* و مع تأثير Azithromycin تجاه *Klebsiella pneumonia* في حين رجح على تأثير تلك الخلاصة على تأثير Ciprofloxacin تجاه الجراثيم نفسها، كما رجح تأثير الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* على تأثير Trimethoprim sulfamethoxazole تجاه جراثيم *Escherichia coli* في حين تماثل مع تأثير الصادات Ceftriaxone و Ciprofloxacin و Nalidixic acid تجاه الجراثيم نفسها.

الكلمات المفتاحية: *Axinella polypoides*، *Spongia officinalis* ، نشاط الاسفنجيات البحرية المضاد للأحياء الدقيقة، العوامل الممرضة المشفوية.

* مدرسة – قسم البيولوجيا البحرية– المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

**أستاذ مساعد– قسم الكيمياء الغذائية والتحليلية، كلية الصيدلة– جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

*** طالبة ماجستير– قسم البيولوجيا البحرية– المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (1) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (1) 2011

Studying the Antimicrobial Activity of two Mediterranean Sponges of Latakian Coast: *Axinella polypoides* & *Spongia officinalis*

Dr. Izdihar Ammar *
Dr. Moufid Yassine**
Alma Shabbar***

(Received 26 / 8 / 2010. Accepted 21 / 2 /2011)

□ ABSTRACT □

The antibacterial and anticandidal activities of sponges collected from Latakian coast were closely examined. The crude extracts of two sponge species *Axinella polypoides* and *Spongia officinalis* were tested against eight isolated nosocomial pathogens: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Acinetobacter meningitis, Klebsiella pneumonia, Acinetobacter septicus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa and the yeast Candida albicans.* It's been found that methanolic crude extract of *Axinella polypoides* had antimicrobial activity against both Gram positive and Gram negative bacteria; that is, *A. meningitis, S. Aureus,* K. *pneumonia* and *E.coli* showed high susceptibility to MeOH crude extract of *Axinella polypoides*. While *Acinetobacter meningitis* showed high susceptibility to methanolic crude extract of *Spongia officinalis, Staphylococcus aureus* had partial moderate sensitivity to the same crude extract. Furthermore, the findings of antibacterial activity of MeOH crude extracts of both studied sponges were compared to the efficiency of some antibiotics that were tested against the same bacteria at given concentrations. In result, it was found that MeOH crude extract of *Axinella polypoides* ,Ceftriaxone, Azithromycin, Gentamicin were equally efficient against *Staphylococcus aureus*. While MeOH crude extract of *Axinella polypoides* was as efficient as Azithromycin against *Klebsiella pneumonia*. Ciprofloxacin was less efficient than the mentioned extract against the same bacteria. MeOH crude extracts of both of *Axinella polypoides* and *Spongia officinalis* were similar in activity to Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Azithromycin against *Acinetobacter meningitis* .As for *E.coli* , MeOH crude extract of *Axinella polypoides* , Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Nalidixic acid were similar in activity while Trimethoprim sulfamethoxazole less active than the same extract against *E.coli*.

Keywords: *Axinella polypoides, Spongia officinalis*, Antimicrobial activity of marine sponges, Nosocomial pathogens

* **Assistant prof., Dept of Marine biology at HIMR, Tishreen University, lattakia, Syria.**
**** Associate professor, Dept of Food Biotechnology, School of Pharmacy, Tishreen University, lattakia, Syria.**
*****postgraduate Student in Marine biology at HIMR, Tishreen University, lattakia, Syria.**

مقدمة:

تعد المستقلبات الثانوية Secondary metabolites التي يتم عزلها من الأحياء الدقيقة و النباتات من المستحضرات العلاجية التي تستخدم حالياً والمتوفرة في الأسواق.استخدمت المركبات الطبيعية علاجيا بشكلها المستخلص، كما استخدمت في الصناعة الدوائية بشكلها المصنع [1].وتعتبر الاسفنجيات وبخاصة الغروية المصدر الأكبر لتلك المركبات مقارنة مع غيرها من الاسفنجيات وغيرها من الكائنات البحرية[2] . تصنف المركبات الطبيعية حسب وظيفتها العلاجية إلى مضادات التهاب Anti-inflammatories ومثبطات مناعة Immunosuppressives ومضادات أورامAntitumors ومضادات فيروسيةAntivirals ومضادات للجراثيم Antibacterials و مضادات فطرية Antifungal وهناك مركبات ذات خصائص علاجية مختلفة .[3]

تعرف أفراد شعبة الاسفنجيات بتطبيقاتها الطبية فهي مصدر هام للمركبات الكيميائية التي تستخدم في الطب التقليدي (4;1) .تمثل الاسفنجيات مجموعة من الكائنات المتنوعة متعددة الخلايا، فجسم الاسفنج يتألف من عدة طبقات خلوية متخصصة وظيفيا ،كما أن بنيتها المثقبة ونمط تغذيتها التشريحية تمكنها من إنتاج تنوع هائل من المركبات الكيميائية الفعالة حيوياً والتي تستخدم كوسائل دفاعية [8;7;6;5].تم الاستفادة تطبيقياً من تلك الخاصية في عزل العديد من المركبات الفعالة من الأسفنجيات وبخاصة الاسفنجيات الغروية ،حيث تم عزل العديد من المركبات ذات الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة من عدد كبير من الاسفنجيات البحرية [9 ;10].

يتميز الاسفنج *Axinella* ببنية فريدة ذات ثقوب دقيقة جداً توفر ملجأً آمناً للكائنات الدقيقة والتي يفترض أنها تلعب دوراً في انتاج المستقلبات الثانوية ذات الأهمية الدفاعية تجاه الكائنات الدقيقة المحيطة و الممرضة للاسفنج [11;10 ;12 ;13].لوحظ أن الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة يمكن أن تتأثر بشكل الاسفنج، حيث تعدّ الأشكال المتفرعة وذات النمو الكتلي للاسفنج أكثر من الاسفنجيات ذات النمو القشري وذكر أهمية النوع *Spongia officinalis* [5 ;14].تم دراسة النشاط الحيوي للاسفنجيات على عدد من العوامل الممرضة المشفوية Nosocomial pathogens والمسؤولة عن ظهور الأخماج المشفوية Nosocomial infections التي تنشأ وتحدث في المشافي Hospital- acquired infections، والتي تنتج بشكل رئيسي عن الجراثيم الانتهازيةopportunistic pathogens ويعتبر مرضى المستشفيات (Hospitalized patients) والمثبطين مناعياً أكثر عرضة للإصابة بها. تحدث الأخماج المشفوية غالباً في الجهاز البولي والجروح الناجمة عن الجراحة والجهاز التنفسي و الجلد (الحروق الجلدية) و تجرثم الدم و الجهاز المعد معوي و الجهاز العصبي المركزي .تتميز العوامل الممرضة المكتسبة من المشافي بأنها أكثر مقاومة للصادات الحيوية [15 ;16] .

أهمية البحث وأهدافه:

تهدف هذه الدراسة إلى الكشف عن الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة للخلاصات الخام لنوعين اسفنجيين مختلفين مورفولوجياً تم جمعهما من شاطئ اللاذقية ودراسة مدى تأثيرها على العوامل الممرضة المشفوية بالمقارنة مع تأثير الصادات الحيوية المستخدمة حالياً، وتحديد الاسفنج الذي يملك نشاطاً واسع الطيف .وتعزى أهمية هذا البحث من إمكانية عزل مركبات طبيعية ذات فائدة علاجية من مصدر بحري بالإضافة لمصادرها التقليدية البرية.

طرائق البحث ومواده:

1. جمع العينات وتحضيرها:

تم جمع نوعين اسفنجيين مختلفين مورفولوجياً هما *Axinella polypoides* و *Spongia officinalis* كما في الشكلين (1،2) ينتميان إلى صف الاسفنجيات الغروية Demospongia من على عمق 10-30 م عن طريق الغطس بالاسطوانة Scuba diving ، وذلك خلال النصف الأول من شهر شباط عام 2007 من محمية فنارابن هاني من شاطئ اللاذقية وفق الإحداثيات (35°35'37"N 35°45'20"E) الشكل رقم(3) بعدها نظفت من الأحياء المرافقة لها ووضعت في أكياس وحفظت في درجة حرارة (−20°م) لحين الاستخلاص. تم انتقاء الاسفنجين الـ *Axinella polypoides* والـ*Spongia officinalis* كونهما يمثلان أنموذجين من الاسفنجيات الغروية من ناحية اختلافهما المورفولوجي بهدف دراسة تأثير هذا الاختلاف على النشاط الحيوي للاسفنجين.وقد تم دراسة اختلافهما هما من الناحية التصنيفية والمورفولوجية [17 ;18] كما هو مبين في الجدول رقم**(1)**

الجدول (1) الوضع التصنيفي والصفات العامة لكل من النوعين المدروسين

النوع	الرتبة	الفصيلة	الوصف
Axinella polypoides (Schmidt,1862)	Halichondrida	Axinellidae	إسفنج مرن البنية ذو حجم متوسط نموه قائم متفرع بشكل مروحي، الفروع إصبعية الشكل و غير منتظمة القطر تتصل مع بعضها بسويقة.السطح مخملي، هو برتقالي اللون وقد تم جمعه من منطقة البحث عن عمق 10 م.
Spongia officinalis (Linnaeus,1758)	Dictyoceratida	Spongiidae	إسفنج لحمي البنية ذو شكل كتلي مع نموات مزودة بسطح خشن ومشوك. تتوضع الفتحات الزفيرية غالباً على السطح، وهو ذو لون بني محمر، وقد تم جمعه من منطقة البحث عن عمق 30م

شكل (1): النوع *Axinella polypoides*

شكل (2): النوع *Spongia officinalis*

شكل (3): محمية فنار ابن هاني

2. تحضير الكائنات الدقيقة:

تم الحصول على الأحياء الدقيقة من مستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية، وقد عزلت العوامل الممرضة المشفوية من عينات مرضية مختلفة مأخوذة من مرضى المستشفى وقد تم تنقية وعزل الأنواع الجرثومية وفطر الكانديدا باستخدام أوساط زرعية مختلفة، وأجريت اختبارات تفريقية لبعض أنواع الجراثيم باستخدام جملة تنميط جرثومي API-20E، بعد أن تم تكثيرها باستخدام وسط ثيوغليكولات سائل. تشتمل الأحياء الآتية التي تم اختبارها عدداً من الجراثيم بالإضافة إلى فطر مرضي كما هو مبين في الجدول رقم (2):

جدول (2) يوضح مصدر الأحياء الدقيقة التي تم اختبارها

الأحياء الدقيقة المختبرة	مصدر العينة
المبيضات البيض*Candida albicans*	مسحة بلعوميه (حواضن)
العنقوديات الذهبية*Staphylococcus aureus*	مسحة سره
أسينيتوباكتر *Acinetobacter meningitis*	سائل دماغي شوكي
الكلبسيللا الرئوية*Klebsiella pneumonia*	سائل دماغي شوكي
الايشيريكيا القولونية*Escherichia coli*	بول
الزوائف الزنجارية*Pseudomonas aeruginosa*	مفرزات معدة(حواضن)
أسينيتوباكتر *Acinetobacter septicus*	مسحة سره
المتقلبات الاعتيادية*Proteus vulgaris*	دم

3. الحصول على الخلاصة الأسفنجية الخام:

اتبعت طريقة Larsen المرجعية في طريقة الحصول على الخلاصة الاسفنجية [11] وقد أجريت بعض التعديلات على خطوات الحصول على الخلاصة الخام . تتضمن عملية الحصول على الخلاصة الخام عدة مراحل وهي تحضير الاسفنج و الاستخلاص وتبخير الخلاصة بالمبخر الدوار.

مرحلة تحضير الأسفنج:

تركت العينات الاسفنجية في جو المختبر لحين ذوبان الجليد ثم غسلت بالماء المقطر وأزيلت عنها الأجسام الغريبة ثم وزنت و تركت لمدة يومين ضمن ساحبة هواء Fume hood للتخلص من الماء – قدر الإمكان– بعدها وزنت وتم تقطيع كل نوع اسفنجي إلى قطع صغيرة بحجم 1سم^3 بوساطة مقص معقم.

مرحلة الاستخلاص:

تم استخدام ثلاثة محلات عضوية (قطبية، قطبية متوسطة، لاقطبية) وهي الميتانول و الايتيل أسيتات والهكسان.يعادل حجم المحل المستخدم وزن الأسفنج.تشتمل عملية الاستخلاص على نقع للقطع الاسفنجية لمدة 24ساعة في مكانٍ مظلمٍ ضمن ساحبة هواء وبدرجة حرارة الغرفة في البداية باستخدام الميتانول(محل قطبي) ثلاث مرات وفي المرحلة الثانية باستخدام الايتيل أسيتات(محل متوسط القطبية) ثلاث مرات وفي المرحلة الثالثة باستخدام الهكسان(محل لا قطبي) لمرة واحدة في المرحلة الرابعة تم سحق و مجانسة القطع الاسفنجية بواسطة خلاط ونقعت لمرة واحدة بالإيتيل أسيتات لمدة 24 سا في مكانٍ مظلمٍ ضمن ساحبة هواء وبدرجة حرارة الغرفة ، وقبل كل عملية نقع كان يتم تجفيف القطع الاسفنجية لكل نوعٍ ضمن ساحبة هواء وفصل القطع الاسفنجية عن الخلاصة الاسفنجية بالترشيح و حفظ الخلاصات الناتجة بدرجة –4°م، و في النهاية تم جمع ثلاث مجموعات من الخلاصات لكل نوع اسفنجي وهي الخلاصات الميتانولية و خلاصات الايتيل أسيتات و خلاصات الهكسان

مرحلة الحصول على الخلاصة الاسفنجية الخام(باستخدام المبخر الدوار)

تم فصل الخلاصات الاسفنجية لكل نوع عن المذيب باستخدام المبخر الدوار .Rota.Vap، حيث كانت درجة الحرارة للمحم المائي ضمن مجال (30–40°م) وتحت تأثير ضغط 600 مم زئبقي وسرعة دوران متوسطة لإزالة ما أمكن من المذيب .تم بالنتيجة الحصول على ثلاث مجموعات من الخلاصات الخام لكل نوع اسفنجي وهي الخلاصات الميتانولية و خلاصات الايتيل أسيتات و خلاصات الهكسان تم وضعها في فيالات (عبوات صغيرة) وحفظت بدرجة حرارة –4°م لحين استخدامها في اختبار التحسس الجرثومي طريقة كيربي باور Kirby-Bauer أو الانتشار القرصي Disk diffusion.

زرع الأطباق Inoculation:

ملئت أطباق بتري بالغراء (آغار مولر هنتون وهو منم عام للجراثيم و Yeast Potato Dextrose منم عام لنمو الفطور)، بعد تنمية الأحياء الدقيقة المدروسة باستخدام وسط سائل (الثيوكليكولات للجراثيم و سابوراد للفطر) تم غمر إبرة ذات عقدة في كل أنبوب من الأنابيب التي نمت عليها السلالات الجرثومية وفي أنبوب سابوراد الذي نما عليه الفطر ، ثم غمرت ضمن أنابيب تحوي 5مل من مصل ملحي فيزيولوجي(تم تعقيمها بالأوتوكلاف) وتجانس معه، بعدها أخذ مقدار 1مل من المستحلب (لكل سلالة جرثومية وفطرية) بوساطة ممص باستور وفرش على سطح الأطباق الزرعية الحاوية على آغار مولرهنتون(بسماكة 4 ملم) بالسلالات الجرثومية السبعة، كما تم فرش الأطباق الحاوية على آغار YPD بفطر *Candida albicans*.

اختبار التحسس الجرثومي Susceptibility test:

اعتمد في هذه الدراسة حجم 20 µl من الخلاصة الخام لكلا النوعين الاسفنجيين بغية إجراء دراسة تأكيدية للتحسس الجرثومي تجاهه بالمقارنة مع بعض الصادات الحيوية، وذلك بعد أن تم سابقاً إجراء اختبار تحسس عند حجم 10 µl و20 µ l ودون ظهور أي تحسس جرثومي تجاه الخلاصة الاسفنجية الخام للنوعين الاسفنجيين لدى الحجم

الأول بينما ظهر تحسس جراثيم *A. meningitis* و *S. aureus* و *K. pneumonia* و *E.coli* لحجم 20 µl من الخلاصة الخام الميتانولية للاسفنج

تم تشريب الأقراص الورقية المعقمة (Whatman, No.1) قطر 6ملم بـ(20 µl) من Impregnated الخلاصات الخام لكل نوع أسفنجي، وتركت حتى الجفاف للتخلص من آثار الميتانول المتبقية، ثم وضعت على الأوساط المفروشة(Inoculated) بالسلالات الجرثومية ،واستخدم قرص شاهد معقم غير مشرب بأي مادة، بعدها حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة بالنسبة للجراثيم ،وبدرجة حرارة 27°م لمدة 24ساعة للفطر.

قراءة النتائج Findings Interpretation:

تم قياس قطر منطقة التثبيط بالمسطرة وسجلت النتائج وقد اعتمدت دلالة قياس الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة أو التحسس الجرثومي والفطري بالنسبة للخلاصات الاسفنجية [9]على النحو الآتي:

- عدم وجود هالة تثبيط ⇔ سلالة مقاومة(−)
- وجود هالة تثبيط بقطر 8− 10 مم ⇔ تحسس ضعيف (+)
- وجود هالة تثبيط بقطر 11−15 مم ⇔ حساسية متوسطة(++)
- وجود هالة تثبيط بقطر > 15 مم ⇔ حساسية عالية(+++)

تم انتقاء مجموعة من الصادات الحيوية المدرجة ضمن الخطة المنهجية لاختبار التحسس الجرثومي في المشفى تبعاً لنوع العامل الممرض والمرض والعمر بغية إجراء مقارنة بين فعاليتها وفعالية الخلاصة الميتانولية الاسفنجية تجاه الجراثيم التي ثبت تحسسها لتلك الخلاصة .

- **Ceftriaxone (30 µg)**: سيفالوسبورين جيل ثالث ينتمي لمجموعة B-lactams ويتميز بأنه صاد واسع الطيف وقد استخدم للمقارنة لدى اختبار تحسس جراثيم (*Staphylococcus aureus*، *Acinetobacter Meningitis*، *Escherichia Coli*)
- **Azithromycin (15 µg)** : ينتمي للميكروليدات Macrolides وقد استخدم للمقارنة لدى اختبار تحسس جراثيم (*Staphylococcus aureus* ، *Acinetobacter meningitis*، *Klebsiella pneumonia*)
- **Gentamicin** (10 µg): ينتمي للأمينوغليكوزيدات Aminoglycoside وقد استخدم للمقارنة لدى اختبار تحسس جراثيم *Staphylococcus aureus*
- **Nalidixic acid** (30 µg) :ينتمي للكينولونات Quinolones وقد استخدم للمقارنة لدى اختبار تحسس جراثيم (*E.coli*)
- **Ciprofloxacin (5 µg)** :ينتمي للفلوروكينولونات Fluoroquinolones وقد استخدم للمقارنة لدى اختبار تحسس جراثيم (*Escherichia Coli*، *Acinetobacter Meningitis*، *Klebsiella pneumonia*)
- **Trimethoprim sulfamethoxazole** (1.25 µg): ينتمي إلى السلفونواميدات وقد استخدم للمقارنة لدى اختبار تحسس جراثيم (*E.coli*)

النتائج والمناقشة:

تم اختبار الفعالية الحيوية للخلاصات الميتانولية و الايتيل أسيتات و الهكسانولية لكلا النوعين الاسفنجيين تجاه الجراثيم المشفوية المعزولة من عينات مرضية مختلفة مأخوذة من مرضى المستشفى، حيث تشير الدراسات المرجعية إلى أن البنية الكيميائية للمركبات الموجودة في الخلاصة الاسفنجية الخام والتي تمتلك نشاطاً مضاداً للأحياء الدقيقة يمكن أن تؤثر على الغشاء الخلوي للجراثيم وتحافظ على فعاليتها تجاه البكتيريا المقاومة للصادات الحيوية المعروفة [19]وهذا ما دفعنا إلى مقارنة مدى تأثيرها مع تأثير الصادات الحيوية المستخدمة في معالجة حالياً.تم تقييم النشاط المضاد للأحياء الدقيقة للخلاصة الاسفنجية بحالتها الخام يعود السبب في ذلك بالدرجة الأولى إلى انخفاض الفعالية نتيجة التجزيء المتعدد للقطفات بعمود الكروماتوغرافيا[9] ولوحظ من نتائج اختبار التحسس إلى أن الاسفنج *Axinella polypoides* قد أظهر فعالية أكبر بالمقارنة مع الاسفنج الثاني المختلف مورفولوجياً *Spongia officinalis* ، وهذا ما أشارت إليه الدراسات المرجعية من حيث تأثير مورفولوجية الاسفنج وشكل نموه على فعاليته الحيوية فالنمط المتفرع ذو فعالية أعلى من النمط الكتلي [6;5] وأظهرت دراسات أهمية الخلاصات الميتانولية حيث يمكن للميثانول اختراق الأغشية الخلوية [16]، كما أن المستقلبات القطبية ذات المنشأ السطحي سهلة الاستخلاص وتستخدم في الدفاع عن الأسفنج قبل المستقلبات متوسطة القطبية و المستقلبات اللاقطبية [7; 20] ، وبدراسة تأثير الخلاصات الخام على الأنواع البكتيرية و الكانديدا لوحظ أن تأثير الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* أعلى من الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Spongia officinalis* على الأحياء الدقيقة المدروسة و يعود ذلك للاختلاف المورفولوجي، فالاسفنج *Axinella polypoides* ذات نمو قائم وبالتالي فهو أكثر عرضة للكائنات المهاجمة وبفضل الثقوب الدقيقة العديدة والموزعة على كامل الجسم فهو يسمح للتيارات المائية المحملة بالكائنات الدقيقة بالدخول بينما الاسفنج*Spongia officinalis* ذات نمو كتلي وعدد الثقوب قليل وغير منتظمة التوزع فضلاً عن أن النوع الأسفنجي الأول يوجد على عمق 10م ، أما النوع الاسفنجي الثاني فهو موجود على عمق أكثر من30 م ، حيث يقل تأثير الكائنات الدقيقة المحيطة المهاجمة مما تنخفض الحاجة لإنتاج تلك المستقلبات الثانوية السطحية التي تلعب دوراً مضاداً للأحياء الدقيقة وهذا ما يتضح باختبار التحسس حيث تظهر نتائج اختبارات تحسس جراثيم الـ*S.aureus* للخلاصة الميتانولية الخام لكل من النوعين الاسفنجيين *A.polypoides* و *S. Officinalis* ، حيث أظهرت جراثيم *S .aureus* ايجابية الغرام تحسساً عالياً وبقطر تثبيط >21مم تجاه الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* شكل رقم (5) جدول (3) وتحسساً متوسطاً وجزئياً وبقطر تثبيط 12ملم تجاه الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Spongia officinalis* شكل رقم (4) جدول (3) وبالمقارنة مع الصادات الحيوية Ceftriaxone، Azithromycin، Gentamicin ، فقد أظهر الـ Ceftriaxone (صاد حيوي واسع الطيف– سيفالوسبورين جيل ثالث) فعالية عالية تجاه جراثيم *S .aureus* عند تركيز 30 µg وبقطر تثبيط أعلى من 21 مم كما نجد أن كلاً من الـ Azithromycin وهو ماكرولايد يستخدم لمعالجة انتانات الأنسجة الرخوة التي تسببها العنقوديات الذهبية وكذلك الـ Gentamicin وهو أمينوغليكوزيد قد أظهرا فعالية عالية تجاه الـ *Staphylococcus aureus* عند تركيز(15 µg) وبقطر تثبيط أعلى من 21 مم للأول و 19 مم للثاني شكل رقم (11) جدول (3)

أظهرت جراثيم *Acinetobacter meningitis* وهي جراثيم سالبة الغرام تحسساً عالياً لكلٍ من الخلاصة الميتانولية لـ*Axinella polypoides* و*Spongia officinalis* قطر التثبيط >21مم جدول (4) الشكلين(7،6) ، فقد أظهر الـ Ceftriaxone فعالية عالية تجاه تلك الجراثيم قطر التثبيط 20 مم عند تركيز (30 µg)،أما

الـAzithromycin فقد أظهر فعالية عالية تجاه تلك الجراثيم قطر التثبيط 20 مم عند تركيز (15 µg) كذلك اظهر الـCiprofloxacin فعالية عالية تجاه هذه الجراثيم بقطر تثبيط **19** مم عند تركيز 5µg شكل رقم (12)جدول (4)

أبدت جراثيم *Klebsiella pneumonia* وهي جراثيم سالبة الغرام تحسساً عالياً وبقطر تثبيط 20 مم للخلاصة الميتانولية لـ*Axinella polypoides* ولكن لم تتحسس تجاه الخلاصة الميتانولية لـ *Spongia officinalis*جدول(5) الشكل(8)، وبالمقارنة مع كل من الـ Azithromycinو الـ Ciprofloxacin فقد أظهر الأول فعالية عالية تجاه تلك الجراثيم عند تركيز (15 µg) وبقطر تثبيط 20مم، أما الثاني فقد أظهر فعالية متوسطة عند تركيز (30 µg) وبقطر تثبيط15مم جدول(5) الشكل رقم (13). أظهرت الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* فعالية عالية تجاه جراثيم الـ ***E.coli*** و بقطر التثبيط 20 مم، في حين لم تظهر الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Spongia officinalis*فعالية تجاه تلك الجراثيم جدول(6) الشكل (9)، لقد أظهر الـ Ceftriaxone فعالية عالية تجاه جراثيم الـ *E.coli* بقطر تثبيط 20 مم عند تركيز(µg 30)، كذلك أظهر الـNalidixic acid وهو مطهر بولي ينتمي إلى الكينولونات فعالية عالية عند تركيز(µg 30) وبقطر تثبيط أعلى من 21 مم كما أظهر الـ Ciprofloxacin الذي ينتمي إلى الفلوروكينولونات فعالية عالية بقطر تثبيط 20 مم عند تركيز (5 µg)، إلا أن الـ Trimethoprim sulfamethoxazole أبدى فعالية متوسطة بقطر تثبيط 15 مم عند تركيز(1.25µg) جدول(6) الشكل (14)، في حين لم تظهر جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* و*Acinetobacter septicus* و*Proteus vulgaris* و كذلك فطر الـ*Candida albicans* تحسساً للخلاصة الميتانولية لكل من الـ*Axinella polypoides* والـ *Spongia officinalis* جدول (7)، أما بالنسبة لخلاصة الايتيل أسيتات للاسفنج *Spongia officinalis*، فقد أظهرت فعالية متوسطة وجزئية تجاه جراثيم *S .aureus* بقطر تثبيط 14 مم جدول (8) الشكل (10)، في حين لم تبد بقية الأنواع الجرثومية و الكانديدا تحسساً لتلك الخلاصة، كما أن خلاصة الايتيل أسيتات للأسفنج ***Axinella polypoides*** لم تبد أي تأثير على جميع السلالات الجرثومية والفطر جدول(**8**)، كذلك الأمر لم تؤثر الخلاصات الهكسانولية للاسفنجين***Axinella polypoides*** والـ*Spongia officinalis* على أي من الأنواع الجرثومية و الكانديدا المدروسة جدول رقم(9).

جدول(3) نتائج اختبار تحسس جراثيم الـ*S.aureus* للخلاصة الميتانولية الخام

لكل من *A.polypoides*و *S.officinalis* بالمقارنة مع بعض الصادات الحيوية

Gentamicin (15 µg)	Azithromycin (15 µg)	Ceftriaxone (30 µg)	*Spongia officinalis* 20 ul)(	*Axinella polypoides* (20 ul)	
19 +++	>21 +++	>21 +++	12 ++	>21 +++	*Staphylococcus aureus*

جدول(4) نتائج اختبار تحسس جراثيم *Acinetobacter meningitis* للخلاصة الميتانولية الخام

لكل من *A.polypoides* و *S.officinalis* بالمقارنة مع بعض الصادات الحيوية

Azithromycin(15µg)	Ciprofloxacin(5µg)	Ceftriaxone (30µg)	*Spongia officinalis* (20 ul)	*Axinella polypoides* (20 ul)	
20 +++	19 +++	20 +++	>21 +++	>21 +++	*Acinetobacter meningitis*

جدول(5) نتائج اختبار تحسس جراثيم *Klebsiella pneumonia* للخلاصة الميتانولية الخام

لكل من *A.polypoides* و *S.officinalis*بالمقارنة مع بعض الصادات الحيوية

Azithromycin (15µg)	Ciprofloxacin (5µg)	*Spongia officinalis* (20 ul)	*Axinella polypoides* (20 ul)	
20 +++	15 ++	_	20 +++	*Klebsiella pneumonia*

جدول(6) نتائج اختبار تحسس جراثيم الـ *E.coli* للخلاصة الميتانولية الخام
لكل من *A.polypoides* و *S.officinalis* بالمقارنة مع بعض الصادات الحيوية

Trimethoprim+ sulfamethoxazole (1.25µg)	Nalidixic acid (30µg)	Ciprofloxacin (5µg)	Ceftriaxone (30µg)	*Spongia officinalis* (20 ul)	*Axinella polypoides* (20 ul)	
15 ++	>21 +++	20 +++	21 +++	-	20 +++	*E.coli*

جدول(7)النتائج السلبية لاختبار تحسس بعض الجراثيم و الكانديدا لخلاصة الميتانولية الخام
لكل من *A.polypoides* و *S.officinalis*

Proteus vulgaris	*Acinetobacter septicus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Candida albicans*	
–	–	–	–	*Axinella polypoides* (20 ul)
–	–	–	–	*Spongia officinalis* (20 ul)

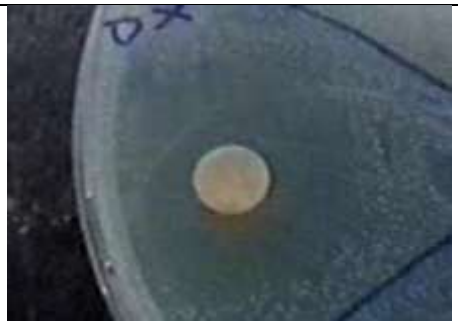
جدول(8) نتائج اختبار تحسس الأنواع الجرثومية و الكانديدا لخلاصة الايتيل أسيتات الخام لكل من *A.polypoides* و *S.officinalis*

K.pneumonia	*S.aureus*	*C. albicans*	*P.vulgaris*	*A.septicus*	*P.aeruginosa*	*A.meningitis*	*E.coli*	
-	14 ++	-	-	-	-	-	-	*S. officinalis* **(20 ul)**
-	-	-	-	-	-	-	-	*A.polypoides* **(20 ul)**

جدول(9) نتائج اختبار تحسس الأنواع الجرثومية و الكانديدا للخلاصة الهكسانولية الخام لكل من *A.polypoides* و *S.officinalis*

K.pneumonia	*S.aureus*	*C. albicans*	*P.vulgaris*	*A.septicus*	*P.aeruginosa*	*A.meningitis*	*E.coli*	
-	-	-	-	-	-	-	-	*S. officinalis* (20 ul)
-	-	-	-	-	-	-	-	*A.polypoides* (20 ul)

شكل (4)التحسس المتوسط والجزئي لجراثيم *S.aureus*
للخلاصة الميتانولية الخام لـ*S.o*

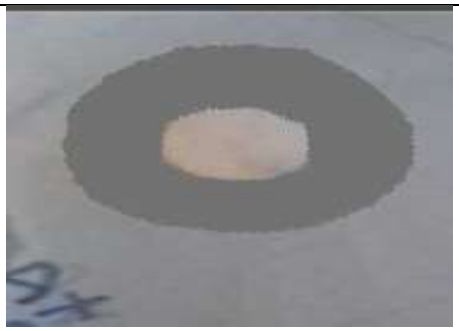


شكل(5)التحسس القوي لجراثيم *S.aureus*
للخلاصة الميتانولية الخام لـ*Axp*

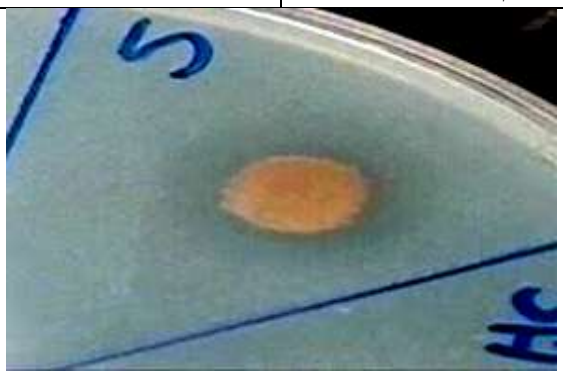
شكل (6) التحسس القوي لجراثيم *A. meningitis*
للخلاصة الميتانولية الخام لـ*Axp*

شكل(7) التحسس القوي لجراثيم *A. meningitis*
للخلاصة الميتانولية الخام لـ*S.o*

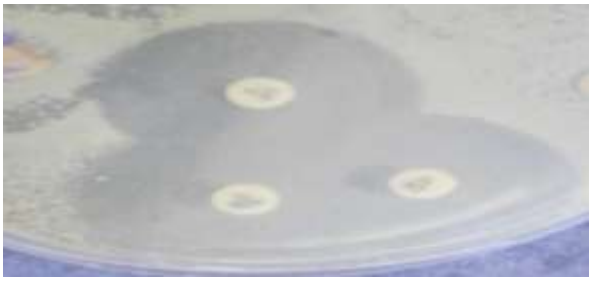
شكل(8) التحسس القوي لجراثيم *K.pneumonia*
للخلاصة الميتانولية الخام لـ*Axp*



شكل(9) التحسس القوي لجراثيم*E.coli*
للخلاصة الميتانولية الخام لـ*Axp*

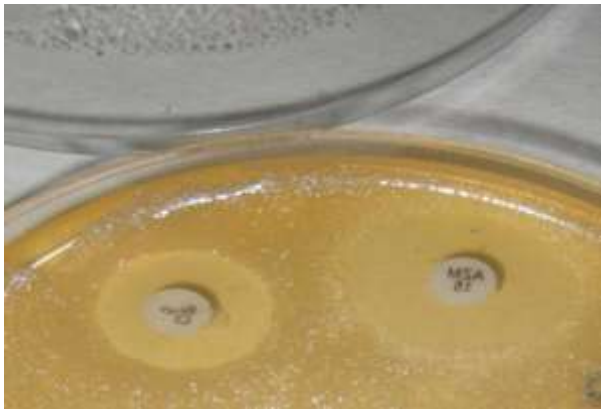


شكل (10): التحسس المتوسط والجزئي لجراثيم *S.aureus*
لخلاصة الايتيل أسيتات الخام لـ*So*
Axp :Axinella polypoides So: Spongia officinalis



شكل (11) يظهر مدى تحسس الـ *S.aureus* لأقراص الصادات الحيوية وهي من اليمين لليسار:
الـ Gentamicinو الـ CeftriaxoneوالـAzithromycin

شكل (12) يظهر مدى تحسس الـ *Acinetobacter meningitis* لأقراص الصادات الحيوية وهي من اليمين لليسار الـ Ciprofloxacin
والـ Ceftriaxone والـAzithromycin



شكل (13) يظهر مدى تحسس الـ *Klebsiella pneumonia* لأقراص الصادات الحيوية:
لليسار الـCiprofloxacin, ولليمين Azithromycin

شكل (14) يظهر مدى تحسس الـ *E.coli* لأقراص الصادات الحيوية وهي من اليمين لليسار
الـ Trimethoprim sulfamethoxazole والـCeftriaxone والـ Ciprofloxacinوالـ والـNalidixic acid

الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من خلال ما تقدم أن النشاط المضاد للأحياء الدقيقة المشفوية للخلاصات الاسفنجية يتأثر بشكل الاسفنج وأسلوب نموه ؛ النمط المتفرع ذو فعالية أعلى من النمط الكتلي فالخلاصة الميتانولية للنوع الاسفنجي *Axinella polypoides* الذي يتميز بنموه القائم و ثقوبه الدقيقة والموزعة بانتظام على كامل الجسم ذات فعالية أكبر من الخلاصة الميتانولية للنوع الاسفنجي *Spongia officinalis* ،الذي يتميز بنموه الكتلي وثقوبه السطحية غير المنتظمة، كما تبين بأن الخلاصة الميتانولية الخام للنوع الاسفنجي*Axinella polypoides* ذات طيف أوسع من الخلاصة الميتانولية النوع الاسفنجي*Spongia officinalis* تجاه جراثيم ايجابية وسلبية الغرام. لوحظ من الدراسة المقارنة للنشاط المضاد للأحياء الدقيقة للخلاصتين الميتانوليتين الخام للاسفنجين *Axinella polypoides* و*Spongia officinalis* مع الصادات(Ceftriaxone،Azithromycin ، Gentamicin،Ciprofloxacin ، Trimethoprim sulfamethoxazole، Nalidixic acid) و بالتراكيز المحددة وهي على التوالي(µg 30، µg 10،15 µg، 5 µg، 30 µg، 1.25 µg) مع تأثير حجم(20µl) من الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* تماثل تأثير الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* مع تأثير الصادات Ceftriaxone و Azithromycin و Gentamicin تجاه *Staphylococcus aureus* و مع تأثير الصادات Ceftriaxone و Ciprofloxacin و Azithromycin تجاه جراثيم *Acinetobacter meningitis* و مع تأثير Azithromycin تجاه *Klebsiella pneumonia* في حين رجح على تأثير تلك الخلاصة على تأثير Ciprofloxacin تجاه نفس الجراثيم، كما رجح تأثير الخلاصة الميتانولية للاسفنج *Axinella polypoides* على تأثير Trimethoprim sulfamethoxazole تجاه جراثيم *Escherichia coli* في حين تماثل مع تأثير الصادات Ceftriaxone و Ciprofloxacin و Nalidixic acid تجاه الجراثيم نفسها، أما بالنسبة للخلاصة الميتانولية الخام للاسفنج *Spongia officinalis* فقد تماثلت فقط في فعاليتها عند حجم(20µl) مع فعالية كل من الصادات الحيوية الـ Ceftriaxone والـAzithromycin والـ Gentamicin تجاه جراثيم الـ *Acinetobacter meningitis*

تعتبر النتائج التي تم التوصل إليها خطوة أولية هامة في مجال استثمار الكائنات البحرية والاستفادة مما تنتجه من المركبات الطبيعية البحرية الفعالة حيوياً وعزل وتنقية تلك المركبات الفعالة حيوياً ، وتحديد هويتها الكيميائية، بالإضافة لإجراء دراسات أوسع تشمل التعرف على النشاط لكل مركب على حدا وتحديد الزمر الوظيفية المسؤولة عن هذا التأثير ومقارنتها مع التراكيب الكيميائية المعروفة للصادات الحيوية.

المراجع:

1. SIPKEMA, D; FRANSSEN, C.R.M; OSINGA, R; TRAMPER, J. *Marine sponges as pharmacy*. Marine Biotechnology. Vol. 7, 2005 , 142–162
2. MULLER, E. G.M, BATEL, R; SCHRODER, C.H, MULLER, M.I. *Traditional and Modern Biomedical Prospecting*: *Part I—the History Sustainable Exploitation of Biodiversity (Sponges and Invertebrates) in the Adriatic Sea in Rovinj*. Evid Based Complement Alternat Med. vol.1, No.1, 2004,p 71–82.
3. BAHKUNI, D. S; RAWAT.D.S. *Bioactive Marine Natural Products*. Springer. 2005, 392p.
4. KELMAN, D; KASHMAN,Y; ROSENBERG,E; ILAN ,M; IFRACH,I. *Antimicrobial activity of the reef sponge Amphimedon viridis from the Red Sea:*

evidence for selective toxicity. AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY. vol. 24, 2001, 9–16.

5. URIZ, M.J; MARTIN, D; ROSSEL, D. *Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean littoral sponges* .Marine Biology, vol. 113.No. 2, 1992, 287-297.
6. K UNG LEE, Y; HYUN LEE, J; K UMLEE, H. *Microbial Symbiosis in Marine Sponges*. The Journal of Microbiology. Vol. 39. No. 4, 2001, 254-264.
7. DOBRESTOV, S; DAHMS, H.U; QIAN, P.Y. *Anti larval and antimicrobial activity of waterborne metabolites of the sponge Callyspongia (Euplacella pulvinata: evidence of allelopathy*. MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES.vol. 271, 2004, 133–146.
8. RUZICKA, R; GLEASON, F.D. *Sponge community structure and anti-predator defenses on temperate reefs of the South Atlantic Bight*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology .vol. 380, 2009, 36–46.
9. CONCEPCION, P. G; CARAAN, B.G; LAZARO, E. J; CAMUA. *The antibacterial antifungal activity demonstrated in some Philippine sponges and tunicates*. Phil J Microbial Infect Disorders Philippine.vol. 24 ,No.1, 1994,6-19
10. JADUCLO, C.R. *Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Sponges and Sponge-derived Fungi*. A dissertation, university of Würzburg, 2002, 172p.
11. LARSEN, L.C.E. *Bounty from the Deep An investigation of the antimicrobial properties of two species from the phylum Porifera*. A dissertation, University of Winnipeg, 2005, 40p.
12. MURTI, B.Y. *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from sponges collected at Ujungpandang and in the Bali Sea, Indonesia* .A thesis university of Düsseldorf, 2006, 170p.
13. YALCIN, F.N. *Biological activities of the marine sponge Axinella*. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. Vol.27. No.1, 2007, 47-60.
14. HASSAN, W; EDRADA, R.A; EBEL, R; WRAY, V; PROKSCH, P. *New alkaloids from the Mediterranean Sponge Hamigera hamigera*, Marine Drugs.vol 2, 2004, 88-100.
15. MCLEAN, E. *Ecology of the Encrusting Sponge Demmaspsma Anchora*.A dissertation, University of Puerto Rico, 2006, 65p.
16. RELLO, J. *Importance of appropriate initial antibiotic therapy and de-escalation in the treatment of nosocomial pneumonia* .EUROPEAN RESPIRATORY REVIEW.vol 16, 2007, 33-39.
17. RIEDL, R. Fauna and Flora DasMittelmeeres. Verlag Paul Pareg Hamburg Berlin, 1983, (832) p.
18. HAYWORD, P; SMITH, T; SHIELDS, E. *sea shore of Britain* .Europe Harper Collins publisher, 1996,352 p.
19. MANCINI, I; DEFANT, A; GUELLA, G. *Recent Synthesis of Marine Natural Products with Antibacterial Activities.* Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry. Vol. 6, 2007. 17-48.
20. KUBANEK, J ; KRISTEN, E; ENGEL, S.W; KELLY, R .S; HENKEL, P. T; FENICAL.W ; PAWLIK,R.J . *Multiple defensive roles fortriterpene glycosides from two Caribbean sponges* COMMUNITY ECOLOGY, 131,2002, 125–136