مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (3) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (3) 2011

الفعالية الصادة لمستخلصات بعض الطحالب البحرية السورية تجاه بعض الأحياء الدقيقة الممرضة

الدكتورة أسمهان زينب *
الدكتور آصف عباس **
الدكتور أحمد قرة علي***

(تاريخ الإيداع 2 / 6 / 2011. قبل للنشر في 4 / 7 / 2011)

☐ ملخّص ☐

اختُبرت الفعالية الصادة لمستخلصات *Pterocladiella capillacea* (من الطحالب الحمراء) و*Padina pavonica* (من الطحالب السمراء) بالمحلات العضوية كثنائي كلور الميتان، وثنائي إيتيل الإيتر، وإيتيل أسيتات والهكسان لطيف من الجراثيم الممرضة السالبة والموجبة بصبغة غرام، وعزلة واحدة من الفطريات الممرضة *Candida albicans* في الزجاج بطريقة الانتشار بوساطة الأقراص.

أثرت مستخلصات *P. pavonica* في معظم الجراثيم الممرضة السالبة والموجبة بصبغة غرام وفي العصيات المعزولة من البحر، باستثناء جراثيم *Proteus vulgaris* و *Salmonella* sp.، كما أثرت خلاصة ثنائي كلور الميتان وثنائي إيتيل الإيتر في جراثيم *Acinetobacter* sp. المقاومة للصادات الحيوية، حيث وصفت قدرة التأثير بالمتوسطة والعالية على التوالي.

أظهرت نتائج مستخلصات *P. capillacea* فعالية تجاه جميع الجراثيم الإيجابية بصبغة غرام المدروسة، وأثرت جميع مستخلصات الطحلب في جراثيم *Escherichia coli*، وكانت قدرة التأثير عالية لخلاصة إيتيل أسيتات، وغابت في جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* وجراثيم *Klebsiella pneumoniae* باستثناء الهكسان ولكن بدرجة ضعيفة.

وأثرت خلاصة ثنائي إيتيل الإيتر لطحلب *P . capillacea* في الفطريات الممرضة *Candida albicans* فقط بشكل متوسط، وهكذا يبدو أن مستخلصات الطحالب المدروسة ذات تأثير أفضل من بعض الصادات الحيوية تجاه الجراثيم الممرضة.

الكلمات المفتاحية: الطحالب البحرية، مستخلصات الطحالب، التضاد الجرثومي، الأحياء الدقيقة الممرضة، الصادات الحيوية.

* مدرسة في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.
** مدرس في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.
*** مدرس في قسم الكيمياء البحرية – المعهد العالي للبحوث البحرية – جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (3) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (3) 2011

Antimicrobial Activity of Some Syrian Marine Algae Extracts Against Some Pathogenic Microorganisms

Dr. Asmahan Zeinab*
Dr. Assef Abbas**
Dr. Ahmad Khara Ali***

(Received 2 / 6 / 2011. Accepted 4 / 7 /2011)

□ ABSTRACT □

Dichlorometane, diethyl ether, ethyl acetate and n-hexane which extract from two algal species *Pterocladiella capillacea* (Rhodophyceae) and *Padina pavonica* (Phaeophyceae) were tested in vitro for their antimicrobial activity against a spectrum of pathogenic Gram-positive and negative bacteria and one fungus *Candida albicans* with disc diffusion method.

Extracts of *Padina pavonica* have antibacterial activity against most of gram-positive and negative bacteria, except *Proteus vulgaris* and *Salmonella* sp., also extracts of dichlorometane and diethyl ether have antibacterial activity against *Acinetobacter* sp. which is resistant to antibiotics, with intermediate and high effect respectively.

Extracts of *Pterocladiella capillacea* have antibacterial activity against all of gram-positive bacteria, all extracts of *Pterocladiella capillacea* have activity against *Escherichia coli* especially extracts of ethyl acetate with high effect.

The activity was absent from *Pterocladiella capillacea* against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* except hexane with weak activity.

Extract of diethyl ether of *Pterocladiella capillacea* only has intermediate activity against *Candida albicans*, so the marine algal extracts have better effect than some antibiotics.

Keywords: Marine algae, Algal extracts, Antimicrobial activity, Pathogenic microorganisms, Antibiotics.

***Assistant prof. in department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, lattakia, Syria.**
**** Assistant prof. in department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, lattakia, Syria.**
***** Assistant prof. in department of marine chemistry, High Institute of Marine Research, Tishreen University, lattakia, Syria.**

مقدمة:

أدى الاستخدام الواسع والعشوائي للصادات الحيوية (مجالات طبية وغير طبية كالزراعة والبيطرة والصناعات الغذائية) إلى انتخاب وانتشار السلالات الجرثومية الأكثر مقاومة للصادات الحيوية المستخدمة التي أصبحت تشكل خطراً وبائياً epidemiological في البيئة المحيطة (Bansemir *et al.*, 2006).

تناول الكثير من الدراسات أنواع جراثيم فصيلة الأمعائيات *Enterobacteriaceae* هدفاً للصادات الحيوية والعوامل المضادة للجراثيم بشكل عام لمسؤوليتها عن الكثير من الأمراض الإنتانية و لاتساع انتشارها وتوزعها في البيئة (Guardabassi *et al.*, 1998; Goni-Urriza *et al.*, 2000; Hamelin *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008)

ونظراً لانتشار السلالات الجرثومية المقاومة للصادات في البيئات المختلفة وخطرها على الصحة البشرية بالدرجة الأولى، ظهرت حاجة ملحة للبحث عن مركبات فعالة جديدة بتركيب فريد للتحكم في الأحياء الدقيقة المقاومة، ولذلك ارتفعت في السنوات الأخيرة وتيرة الدراسات العالمية في البحث عن صادات طبيعية من مصادر جديدة مثل الأحياء البحرية الحيوانية والنباتية التي تعدّ مصدراً غنياً بالمستقلبات الفعالة حيوياً، وذات أهمية كبيرة في الصناعات الصيدلانية ((Xu *et al.*, 2003; Freile-Pelegrin and Morales 2004; Bansemir *et al.*, 2006; Bazes *et al.*, 2006).

تعدّ الطحالب البحرية من أهم المصادر الرئيسة للمستقلبات الثانوية التي تتمتع بفعاليات صادة للجراثيم Antibacterial و/أو الفطريات Antifungal أو الفيروسات Antiviral (Abourriche *et al.*, 1999; Bansemir *et al.*, 2006; Dubber and Harden 2008)، وامتلاكها وسائل أو آليات دفاع ضد هذه الأحياء (Puglisi *et al.*, 2007).

عُرفت جملة من المركبات الفعالة الطحلبية التي تعدّ صادة للجراثيم مثل مشتقات الكلوريلين chlorellin derivatves، وحمض الأكريليك acrylic acid، ومركبات أليفاتية للهالوجينات halogenated aliphatic compounds (Espeche *et al.*, 1984; Abourriche *et al.*, 1999; Hellio *et al.*, 2001).

تناول معظم الدراسات استخلاص المواد الفعالة الطحلبية (الطحالب الحمراء، والخضراء والسمراء) باستخدام محلات عضوية متعددة كالميتانول، والايتانول، والهكسان، وثنائي كلور الميتان، والكلوروفورم، وثنائي إيتيل الايتر وإيتيل أسيتات (Espeche *et al.*, 1984; Robles-Centeno *et al.*, 1996; Abourriche *et al.*, 1999; Vlachos *et al.*, 1999; Charles 2003; Xu *et al.*, 2003; Kelman *et al.*, 2006; Engel *et al.*, 2006; Puglisi *et al.*, 2007;Plouguerne *et al.*, 2008) وأظهرت فعالية صادة في الزجاج تجاه الجراثيم الإيجابية بصبغة غرام والسلبية بصبغة غرام، وفعالية تجاه الفطريات.

ونظراً لعدم وجود أي دراسة بخصوص الفعالية الصادة لمستخلصات الطحالب البحرية السورية حتى الآن ما عدا الحصر الأولي للطحالب البحرية السورية ذات الأهمية الاقتصادية (ميهوب، 1991)، (ميهوب وعباس، 1992) ودراسة (داؤود ومسطو، 1997) حول بعض الطحالب البحرية ودراسة (زينب وعباس، قيد النشر) حول الجراثيم الفوقية للطحالب البحرية.

أهمية البحث وأهدافه:

تكمن أهمية البحث في تحديد الفعالية الحيوية لمستخلصات بعض الطحالب البحرية المنتشرة على شاطئ مدينة اللاذقية وجبلة تجاه الأحياء الدقيقة الممرضة، والموازنة بينها وبين نتائج حساسيتها لبعض الصادات الحيوية، لتقدير أهمية الطحالب وإمكان استخدامها في معالجة الأمراض الإنتانية الجرثومية مستقبلاً.

ويهدف البحث إلى:

1-استخلاص المواد الفعالة من الطحلب الأسمر ***P. Pavonica*** و الطحلب الأحمر ***P. capillacea*** باستخدام المحلات العضوية (الهكسان، ثنائي كلور الميتان، ثنائي إيتيل الإيتر، إيتيل أسيتات).

2-الحصول على بعض عزلات الأحياء الدقيقة الممرضة من عينات بشرية مرضية، ودراسة حساسيتها ومقاومتها للصادات الحيوية.

3-دراسة الفعالية الصادة لمستخلصات الطحالب تجاه الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة والموازنة بينها وبين بعض الصادات الحيوية.

طرائق البحث ومواده:

جمع عينات الطحالب:

جُمعت عينات الطحلب الأحمر *P . capillacea* من شاطئ جبلة والطحلب الأسمر *P . pavonica* من شاطئ بستان الباشا شمال جبلة وتم تصنيفها اعتماداً على معطيات الدراسات التصنيفية السابقة للطحالب البحرية السورية (ميهوب، 1991)، (ميهوب و عباس، 1992)، (Mayhoob, 1976)

غُسلت الطحالب جيداً بماء البحر بعد جمعها مباشرة لإزالة الرمل، وبعض الشوائب والأحياء الفوقية، ثمّ وضعت في الظل حتى تجف تماماً (Lima-Filho *et al.*, 2002; Ibtissam *et al.*, 2009).

أُنجز هذا البحث في معهد البحوث البحرية و في قسم علم الحياة النباتية من كلية العلوم بجامعة تشرين، خلال الفترة 2009/10/1 حتى 2011/4/20.

تحضير المستخلصات الطحلبية:

- أُخذت كمية من الطحالب المجففة ووضعت في حاضنة خاصة مدة ساعتين درجة حرارتها 37° م للتخلص من أي رطوبة في العينة.
- طُحنت العينات باستخدام طاحونة كهربائية (grinder) حتى أصبحت بشكل بودرة ناعمة.
- نُقع 50 غ من المسحوق في حوجلة سعة 500 مل بإضافة كل مرة إحدى المحلات العضوية الآتية: (n-hexane, ethyl acetate, diethyl ether, dichlormethan).
- تركت العينات بعيداً عن الضوء مدة 15 يوماً.
- رشحت الخلاصة وكُثفت المادة الفعالة بالتخلص من المحل العضوي بوساطة المبخر الدوار ضمن درجة حرارة أقل من 37° م، ثمّ حفظت في المجمدة في درجة حرارة −20° م لحين استخدامها.
- أُعيدت الخطوات السابقة لمسحوق الطحالب المدروسة والمحلات العضوية المذكورة بمعدل ثلاثة مكررات لكل منها. (Robles-Centeno *et al.*, 1996; Tovar and Ballantineb 2000; Freile-Pelegrin and Morales 2004; Engel *et al.*, 2006; Tuney *et al.*, 2006; Taskin *et al.*, 2007; Ibtissam *et al.*, 2009).

عزل الأحياء الدقيقة الممرضة:

تمّ عزل الأحياء الدقيقة الممرضة من عينات مرضية مأخوذة من مختبر مستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية، وأُستخدم العديد من الأوساط لزراعة الجراثيم وتنقيتها من العينات المرضية مثل وسط MacConky Agar – وسط إيوزين أزرق المتيلين EMB Agar – وسط M-FC Agar – وسط SS Agar – وسط M-Enterococcus Agar – وسط KF-Streptococcus Agar – وسط شابمان آغار لزراعة العنقوديات – وسط Pseudomonas agar p Base– وسط الآغار الدموي لكشف التحلل الدموي وزراعة الجراثيم الحساسة كالمكورات الرئوية – وسط Acetamide agar لتمييز أنواع *Pseudomonas* القادرة على نزع الأمين من الأسيت أميد – وسط (PDA) Potato Dextrose Agar لزراعة فطريات *Candida albicans* إضافة إلى الآغار المغذي والمرق المغذي (APHA, 2000)، وجميع الأوساط المستخدمة من شركة Merck.

أمكن تصنيف الجراثيم المعزولة من العينات المرضية والجراثيم المعزولة من مياه البحر بعد إجراء كامل الاختبارات الحيوية الكيميائة اللازمة (الأوكسيداز ، الكاتالاز، الإندول، أحمر الميتيل، السترات، فوجس بروسكاور، الحركة، اليوريا، تخمر السكاكر، إطلاق H_2S، تحلل الجيلاتين والنشاء، إرجاع النترات، نزع الكربوكسيل من الحموض الأمينية، المختزاز coagulase) ثمّ بالاعتماد على دليل بيرجي (Garrity *et al.*, 2005; Garrity *et al.*, 2004; Sneath *et al.*, 1986; Krieg and Holt 1984) وأحياناً أُستخدمت أنظمة تحديد الجراثيم (BioMérieux API Staph, API 20 Strep, API 20E System, France).

وتمّ اختبار حساسية الجراثيم المعزولة ومقاومتها تجاه الصادات الحيوية الآتية، بطريقة الانتشار بوساطة الأقراص، وحددت الحساسية والمقاومة وفقاً لمعايير (NCCLS, 2004) بعد قياس أقطار حلقات عدم النمو بوساطة مسطرة ميليمترية على وسط Mueller Hinton agar (Merck).

Antibiotic	Code	Antibiotic	Code
1-Penicillin G	P: 10 mcg	11-Ceftriaxone	CRO: 30 µg
2-Oxacillin	OX: 1µg	12-Cefepime	FEP: 30 µg
3-Amoxicillin/Clavulanic acid	AMC: 20/10 mcg	13-Sulfaprime	SXT: 25 µg
4-Ampicillin/Sulbactam	SAM: 10/10 mcg	14-Norfloxacin	NOR: 10 µg
5-Cephalothin	KF: 30 µg	15-Azithromycin	AZM: 15 µg
6-Piperacillin/Tazobactam	TZP: 100 µg +10 µg	16-Amikacin	AK: 30 µg
7-Cefadroxil	CFR: 30 mcg	17-Gentamycin	CN: 10 µg
8-Cefaclor	CEC: 30 µg	18-Aztreonam	ATM: 30 µg
9-Cefuroxime	CXM: 30 µg	19-Imipenem	IPM: 10 mcg
10-Cefotaxime	CTX: 30 µg	20-Vancomycin	VA: 30 µg

اختبار فعالية مستخلصات الطحالب في الأحياء الدقيقة الممرضة:

اختُبرت فعالية مستخلصات الطحالب في الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة بطريقة الانتشار بوساطة الأقراص لتحديد قدرة التأثير (Hellio *et al.*, 2001 ; Xu *et al.*, 2003; Bansemir *et al.*, 2006; Ibtissam *et al.*, 2009)، حيث أُذيبت المستخلصات الجافة بمحلول 1 مل من Dimethyl sulfoxide (DMSO) تركيز 5% المعقم بالترشيح، ثمّ شُربت أقراص ترشيح قطرها 6 مليمتر (Whatman, No.1, mm) بمقدار 25 ميكرومتراً من المستخلص الطحلبي، وتركت لتجف في درجة حرارة المختبر، وتمّ استخدام أقراص ترشيح مشربة بمقدار 25 ميكرومتراً

من محلول (DMSO=Dimethyl sulfoxide) 5% بوصفه شاهداً سلبياً للاختبار، واستُخدمت الصادات المقاومة بوصفها شاهداً سلبياً أيضاً والصادات المتحسسة بوصفها شاهداً إيجابياً للنوع الجرثومي.

بعدها أُخذت مستعمرات جرثومية عدة من كل مزرعة جرثومية من وسط Nutrient agar (Merck) ومزرعة الفطريات من وسط PDA agar عمرها 24 ساعة، وضعت في محلول فيزيولوجي بحيث تعطي عكارة 0.5 ماكفرلاند McFarland Standard ما يعادل 1.5×10^{8} خلية/ مل، ثمّ أُخذ 0.5 مل من المعلق الخلوي ووضع فوق وسط Mueller Hinton agar (Merck) وفرش بماسحة قطنية، وبعد 15 دقيقة وزعت الأقراص المشربة بمستخلصات الطحالب فوق سطح الوسط الزرعي بملقط معقم وحُضنت في الدرجة 37° م مدة 24 ساعة، إن ظهور مناطق التثبيط واضحة في الآغار حول الأقراص دليل واضح على تثبيط النمو الجرثومي، وسجلت أقطار التثبيط بعد انتهاء الحضن بوساطة مسطرة ميليمترية، أُنجزت التجربة بواقع ثلاثة مكررات. واعتماداً على أقطار مناطق تثبيط النمو وُصفت استجابة الأحياء الدقيقة الممرضة والبحرية لمستخلصات الطحالب وفقاً للآتي: مقاومة (R, Resistant) + (7–10 ملم) تحسس قليل، ++ (10.1–15 ملم) تحسس متوسط، +++(15.1–31 ملم) تحسس عالٍ.

النتائج والمناقشة:

تمّ الحصول على إحدى عشرة عزلة جرثومية وعزلة واحدة من الفطريات من عينات مرضية ، إضافة إلى عزلة واحدة من المياه البحرية (الجدول رقم 1).

الجدول–1– الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة ومصدر العينة.

الأحياء الدقيقة المعزولة	مصدر العينة
Escherichia coli	بول
Proteus vulgaris	بول
Serratia marcescens	دم
Klebsiella pneumoniae	دم
Salmonella sp.	دم
Acinetobacter sp.	جرح
Pseudomonas aeruginosa	مفرزات رغامى
Streptococcus faecalis	رتج خلفي
Streptococcus pneumoniae	سائل دماغي شوكي
Staphylococcus aureus	رتج خلفي
Staphylococcus albus	بول
Bacillus sp.	مياه بحر
Candida albicans	بول

إن نتائج اختبار حساسية الأحياء الدقيقة المعزولة تجاه الصادات الحيوية المستخدمة موضحة في الجدول رقم 2-، حيث يلاحظ أن معظم الجراثيم المعزولة مقاومة لصاد حيوي واحد على الأقل أو اثنين أو أكثر، ومنها ما هو مقاوم لكل الصادات المستخدمة كجراثيم *Acinetobacter* sp.، ومعروف أن الفطريات لا تعالج بالصادات الحيوية فهي مقاومة لجميع الصادات الجرثومية.

الجدول-2- نتائج اختبار حساسية الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة ومقاومتها تجاه الصادات الحيوية المستخدمة.

الأحياء الدقيقة الممرضة	حساسة (S)	متوسطة الحساسية (I)	مقاومة (R)
Escherichia coli	AK, CN, IPM		AMC, SXT, CRO
Proteus vulgaris	AK, FEP		CH, SXT
Serratia marcescens	ATM, FEP, SXT	SAM	AMC, CFR
Klebsiella pneumoniae	SXT, IPM	FEP	AK, CN, CXM
Salmonella sp.	IPM, AK, FEP		
Acinetobacter sp.		SAM, IPM	ATM, AK, CN, FEP, TZP, CRO
Pseudomonas aeruginosa	AK, FEP		CN, CXM, CTX
Streptococcus pneumoniae	AMC, P, AMC, CRO		SXT
Streptococcus faecalis	AMC, CXM, CEC, CRO, CFR, NOR, AZM		SXT
Staphylococcus aureus	CN, IPM, VA	AMC, CRO	CEC, CFR
Staphylococcus albus	CN, VA, TZP		P, OX
Bacillus sp.	CN, VA, CRO		OX, ATM, SAM
Candida albicans	مقاومة لكل الصادات الحيوية		

Susceptible=S حساسة، Intermediate=I متوسطة الحساسية، Resistant=R مقاومة

نتائج اختبار الفعالية الصادة لمستخلصات الطحالب في الأحياء الدقيقة المعزولة:

يتميز بعض مستقلبات خلايا الطحالب البحرية الكبيرة المنحلة بالمذيبات العضوية المختلفة بخصائص صادة في الجراثيم الممرضة (Bansemir *et al*., 2006; Lima-Filho *et al*., 2002)، والجراثيم البحرية (Hellio *et al*., 2001) ، فبعضها يمتلك فعالية قاتلة Bacteriocidal أو مثبطة لنمو الجراثيم Bacterostatic (Taskin *et al*., 2007; Freile-Pelegrin and Morales 2004).

إن نتائج الفعالية الصادة لمستخلصات الطحالب المدروسة في الجراثيم والفطريات الممرضة المعزولة من عينات مرضية، وفي جراثيم العصيات المعزولة من المياه البحرية مبينة في الجداول 3 و4.

يبين الجدول رقم 3- أن المستخلصات الأربعة لطحلب *P . capillacea* أظهرت فعالية في جراثيم *Escherichia coli* بقطر راوح بين 9.3 – 19.66 ملم، وأظهرت خلاصة الهكسان فقط فعالية في جراثيم *Klebsiella pneumoniae* بقطر 9.66 ملم و *Pseudomonas aeruginosa* بقطر 9.33 ملم، وأثرت خلاصة إيتيل أسيتات وثنائي إيتيل الإيتر فعالية في جراثيم *Acinetobacter* sp. بقطر 10.33 و9.3 ملم على التوالي، ولم تؤثر بقية المستخلصات لهذا الطحلب في أنواع الجراثيم السالبة بصبغة غرام الأخرى.

أظهرت مستخلصات المحلات العضوية الأربعة لهذا الطحلب فعالية في جميع الجراثيم الإيجابية بصبغة غرام باستثناء خلاصة إيتيل أسيتات التي لم تؤثر في جراثيم *Bacillus sp.*

أظهرت خلاصة ثنائي إيتيل الإيتر لهذا الطحلب الأحمر فقط فعالية في الفطريات الممرضة *Candida albicans* بقطر 14.33 ملم.

الجدول-3- تأثير مستخلصات طحلب *P . capillacea* في الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة.

الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة	ثنائي كلور الميتان	ثنائي إيتيل الإيتر	إيتيل أسيتات	هكسان
Escherichia coli	14.33 *	9.3	19.66	10
Proteus vulgaris	0	0	0	0
Serratia marcescens	0	0	0	0
Klebsiella pneumoniae	0	0	0	9.66
Salmonella sp.	0	0	0	0
Acinetobacter sp.	0	9.3	10.33	0
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	9.33
Streptococcus pneumoniae	20.33	23.33	27.33	14.33
Streptococcus faecalis	30.33	20	27.66	18.33
Staphylococcus aureus	10	8.3	9.66	10.66
Staphylococcus albus	9.3	10.33	9.3	10
Bacillus sp.	9.3	9	0	9.66
Candida albicans	0	14.33	0	0

* متوسط قطر حلقة تثبيط النمو بالملم

يبين الجدول رقم 4- فعالية مستخلصات الطحلب الأسمر *P . pavonica* في الأحياء الدقيقة الممرضة، حيث أظهرت مستخلصات المحلات الأربعة لهذا الطحلب فعالية في جراثيم *Klebsiella pneumoniae* بقطر راوح بين 11.33 حتى 19.33 ملم وجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* بقطر راوح بين 11 و19.33 ملم، وكانت نتائج فعالية مستخلصات المحلات الثلاثة إيتيل أسيتات و ثنائي إيتيل الإيتر و ثنائي كلور الميتان إيجابية في جراثيم *Escherichia coli*، وراوحت أقطار حلقات التثبيط بين 11.33 و15.66 ملم، وأثرت المستخلصات المذكورة في جراثيم *Serratia marcescens* بأقطار راوحت بين 11.33 و16 ملم، وأثرت خلاصة المحل العضوي ثنائي إيتيل الإيتر وثنائي كلور الميتان في جراثيم *Acinetobacter* sp. بقطر 18.66 و12 ملم على التوالي، على حين لم تؤثر مستخلصات هذا الطحلب في جراثيم المتقلبات الشائعة *Proteus vulgaris* و*Salmonella* sp. فقط من الجراثيم السالبة بصبغة غرام.

والملاحظ من الجدول أن جميع مستخلصات هذا الطحلب قد أثرت في الجراثيم الإيجابية بصبغة غرام باستثناء خلاصة المحل العضوي ثنائي إيتيل الإيتر حيث كانت سالبة التأثير في جراثيم العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*.

ولم تظهر مستخلصات الطحلب الأسمر *P .pavonica* أي فعالية في فطريات *Candida albicans*.

تعتمد الفعالية الصادة على نوع الطحلب المدروس، وعلى كفاءة طريقة استخلاص المواد الفعالة ونوع المحل المستخدم (Lima-Filho *et al.*, 2002).

الجدول-4- تأثير مستخلصات طحلب *P . pavonica* في الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة.

الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة	ثنائي كلور الميتان	ثنائي إيتيل الإيتر	إيتيل أسيتات	هكسان
Escherichia coli	*15.66	13	11.33	0
Proteus vulgaris	0	0	0	0
Serratia marcescens	16	15.66	11.33	0
Klebsiella pneumoniae	12.33	14.66	11.33	19.33
Salmonella sp.	0	0	0	0
Acinetobacter sp.	12	18.66	0	0
Pseudomonas aeruginosa	19.33	14.66	11	11
Streptococcus pneumoniae	14.66	12.66	0.73	0.8
Streptococcus faecalis	17	15.66	11.33	10.33
Staphylococcus aureus	7	0	7.3	7.6
Staphylococcus albus	11.66	10	11.66	18.66
Bacillus sp.	13	11.33	9.3	11
Candida albicans	0	0	0	0

* متوسط قطر حلقة تثبيط النمو بالملم

والملاحظ من الجدول رقم 5- أن بعض مستخلصات الطحالب المدروسة ذات قدرة تأثير في الأحياء الدقيقة الممرضة المعزولة من العينات المرضية وأفضل من بعض الصادات الحيوية المستخدمة، فجراثيم *Escherichia coli* تحسست لمستخلصات الطحالب المدروسة بدرجة عالية خاصة الطحلب الأسمر *P . pavonica* بالمحل ثنائي كلور الميتان والطحلب الأحمر *P . capillacea* بالمحل إيتيل أسيتات، على حين تبين أن هذه الجراثيم مقاومة تجاه الأموكسيسلين/حمض الكلافولانيك AMC، والسلفابريم SXT، والسيفترياكسون CRO كما هو موضح في الجدول رقم 2-، وتحسست جراثيم *Serratia marcescens* لجميع مستخلصات طحلب *Padina pavonica* باستثناء الهكسان بدرجة عالية للمحل ثنائي كلور الميتان وثنائي إيتيل الإيتر ومتوسطة للمحل إيتيل أسيتات، وسجلت الجراثيم المذكورة مقاومة تجاه الصادات الأموكسيسلين/حمض الكلافولانيك والسيفادروكسيل CFR، وتحسست جراثيم الكليبسلة الرئوية *Klebsiella pneumoniae* لجميع مستخلصات الطحلب الأسمر *P . pavonica* فقط بدرجة عالية للهكسان ومتوسطة للمحلات الثلاثة الباقية، على حين كانت مقاومة للصاد الحيوي الأميكاسين AK، والجنتاميسن CN، والسيفوروكسيم CXM.

وتحسست جراثيم *Acinetobacter* sp. لمستخلصات الطحلب الأسمر *P . pavonica* بدرجة عالية بالمحل ثنائي إيتيل الإيتر ومتوسطة بالمحل ثنائي كلور الميتان، وتحسست لمستخلصات الطحلب الأحمر *P. capillacea* بدرجة متوسطة وضعيفة بالمحلات إيتيل أسيتات وثنائي إيتيل الإيتر على التوالي، على حين تبين أن تلك الجراثيم مقاومة لمعظم الصادات الحيوية مثل ازتريونام ATM، والأميكاسين AK، والجنتاميسن CN، والسيفيبريم FEP، والبيبراسيللين/تازوباكتام TZP، والسيفترياكسون CRO.

الجدول -5- قدرة تحسس مستخلصات الطحالب ومقاومتها تجاه الأحياء الدقيقة المعزولة الممرضة.

الأحياء الدقيقة المعزولة الممرضة	P .capillacea				P .pavonica			
	ثنائي كلور الميتان	ثنائي إيتيل الإيتر	إيتيل أسيتات	الهكسان	ثنائي كلور الميتان	ثنائي إيتيل الإيتر	إيتيل أسيتات	الهكسان
Escherichia coli	++	+	+++	+	+++	++	++	R
Proteus vulgaris	R	R	R	R	R	R	R	R
Serratia marcescens	R	R	R	R	+++	+++	++	R
Klebsiella pneumoniae	R	R	R	+	++	++	++	+++
Salmonella sp.	R	R	R	R	R	R	R	R
Acinetobacter sp.	R	+	++	R	++	+++	R	R
Pseudomonas aeruginosa	R	R	R	+	+++	++	++	++
Streptococcus pneumoniae	+++	+++	+++	++	++	++	+	+
Streptococcus faecalis	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Staphylococcus aureus	+	+	+	++	+	R	+	+
Staphylococcus albus	+	++	+	+	++	+	++	+++
Bacillus sp.	+	+	R	+	++	++	+	++
Candida albicans	R	++	R	R	R	R	R	R

R= Resistant مقاومة أي سلبي، + (7-10 ملم) تحسس قليل، ++ (10.1-15 ملم) تحسس متوسط، +++(15.1-31 ملم) تحسس عال.

و تبين أن جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة تجاه صادات الجنتاميسن وسيفوروكسيم والسفوتاكسيم CTX كما هو موضح في الجدول رقم 2-، على حين تحسست الجراثيم المذكورة لجميع مستخلصات طحلب *P . pavonica* وبدرجة عالية للمحل ثنائي كلور الميتان ومتوسطة للمحلات الثلاثة، و أبدت حساسية ضعيفة لمستخلص الطحلب الأحمر *P . capillacea* لمحل الهكسان.

وكانت جراثيم *Streptococcus pneumoniae* و *Streptococcus faecalis* مقاومة تجاه الصاد الحيوي السلفابريم، بينما تحسست الجراثيم المذكورة لمعظم مستخلصات الطحالب المدروسة وبدرجة عالية للطحلب الأسمر والأحمر الجدول رقم 5-

وكانت جراثيم المكورات العنقودية الذهبية مقاومة للصادين السيفاكلور CEC والسيفادروكسيل CFR، ولكنها تحسست لجميع مستخلصات الطحلب الأحمر بدرجة متوسطة، كما أنها تحسست لمستخلصات الطحلب الأسمر بدرجة ضعيفة باستثناء المحل ثنائي إيتيل الإيتر فكانت مقاومة له.

كما أن جراثيم *Staphylococcus albus* كانت مقاومة للبنسيلين P والأوكسيسلين OX، على حين تحسست لجميع مستخلصات الطحالب المدروسة وبدرجة متوسطة في معظمها وضعيفة أحياناً باستثناء مستخلص الهكسان للطحلب الأسمر بدرجة عالية.

و تبين أن جراثيم العصيات مقاومة للصادات الحيوية الأوكسيسلين وازتريونام وأمبيسيلين/سولباكتام SAM، على حين تحسست لجميع مستخلصات الطحلب الأسمر ومعظم مستخلصات الطحلب الأحمر باستثناء إيتيل اسيتات ولكن بدرجة ضعيفة.

أما فطريات *Candida albicans* الممرضة والمقاومة للصادات الحيوية، فقد تحسست لمستخلص الطحلب الأحمر *P . capillacea* للمحل ثنائي إيتيل الإيتر بدرجة متوسطة فقط.

والنتيجة الواضحة من الجدول رقم 5- أن مستخلصات الطحلب الأسمر *P . pavonica* ذات فعالية عالية في طيف واسع من الجراثيم الممرضة المعزولة الإيجابية والسلبية بصبغة غرام، تبعه في الفعالية والتأثير مستخلصات الطحلب الأحمر *P . capillacea* وهو الطحلب الوحيد الذي أثر في الفطريات، وهذا يتفق مع ما ذكره Kumar (2008) وزملاؤه في دراستهم إذ لاحظوا أن الفعالية الصادة العالية تنتشر بدرجة كبيرة في الطحالب السمراء Phaeophyta أولاً، ثمّ الطحالب الحمراء Rhodophyta .

ويتضح أن الجراثيم السلبية بصبغة غرام أكثر مقاومة لمستخلصات الطحالب المدروسة، فجراثيم المتقلبات الشائعة *Proteus vulgaris* وجراثيم السلمونيلة *Salmonella* sp. كانت مقاومة لجميع مستخلصات الطحالب، على حين الجراثيم الإيجابية بصبغة غرام أكثر حساسية لمستخلصات الطحالب، وهذا يتفق مع دراسة (Kumar *et al*., 2008).

وتعزى الفعالية الصادة لمستخلصات الطحالب المدروسة في الجراثيم الممرضة إلى احتوائها على مزيج معقد ومختلط من المركبات المتعددة، ويمكن أن تكون المواد الفعالة بكميات قليلة جداً (Kumar *et al*., 2008; Bansemir *et al*. 2006) ولذلك لابدّ من دراستها وتحديد طبيعتها وتركيزها.

وهناك مجموعة من العوامل الحيوية- كطور نمو الطحلب (Robles-Centeno *et al*., 1996) وعمر المشرة والجزء المدروس (Vlachos *et al*., 1999)- تتضافر مع العوامل اللاحيوية مثل التغيرات الفصلية والموقع الجغرافي، تؤثر جميعها في المواد الاستقلابية الثانوية ثم في الفعالية الصادة لمستخلصات الطحالب في الأحياء الدقيقة (Kumar and Rengasamy 2000).

الاستنتاجات والتوصيات:

يمكن أن يكون بعض الطحالب البحرية المدروسة في هذا البحث مصدراً محتملاً للمركبات الفعالة حيوياً وصادة للجراثيم والفطريات الممرضة وأفضل من كثير من الصادات الحيوية، لذلك لابدّ من دراسة هويتها وطبيعتها الكيميائية ثم تنقيتها للحصول على صادات حيوية طبيعية من الطحالب البحرية السورية في المستقبل بديلة للصادات المستخدمة في الوقت الحالي.

كلمة شكر:

أُنجز هذا البحث بفضل الدعم المالي المقدم من الهيئة العليا للبحث العلمي من خلال العقد رقم 9 تاريخ 2009 المبرم مع جامعة تشرين، وبهذا الصدد يتقدم فريق البحث بالشكر الجزيل إلى الهيئة العليا للبحث العلمي- الدكتور غسان عاصي والدكتور حسين صالح- وإدارة جامعة تشرين.

المراجع:

1. داؤود، نزيه ومسطو، بسام. *مساهمة في الكشف عن الخصائص الصادة للميكروبات لدى بعض الطحالب البحرية السورية*. مجلة جامعة دمشق للبحوث الأساسية. العدد الثاني. المجلد 13، 1997، 109-116.
2. زينب، أسمهان وعباس، آصف. *الجراثيم الفوقية المرتبطة بالطحالب البحرية: مصادر محتملة للمواد الصادة للجراثيم*. مجلة جامعة تشرين للعلوم البيولوجية.2010، قيد النشر.
3. ميهوب، حامد وعباس، آصف. *الطحالب ذات الأهمية الاقتصادية والطبية في سورية. 2-الطحالب السمراء والخضراء*. مجلة جامعة دمشق. 8، 1992، 51-72.
4. ميهوب، حامد. *الطحالب البحرية ذات الأهمية الاقتصادية والطبية في سورية. 2-الطحالب الحمراء*، مجلة جامعة تشرين، المجلد 13 (3)، 1991 العدد3، 85-103.
5. APHA, AWWA and WEF, *Standard Methods for Examination of water and wastewater*. 20th edition. American Public Health Association, Inc., Baltimore, M.D. USA. 2000.
6. ABOURRICHE, A.; CHARROUF, M.; BERRADA, M.; BENNAMARA, A.; CHAIB, N. and FRANCISCO, C. *Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga Cystoseira tamariscifolia.* Fitoterapia 70, 1999, 611-614.
7. BANSEMIR, A.; BLUME, M.; SCHRODER, S. and LINDEQUIST, U. *Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria*. Aquaculture, 252, 2006, 79-84.
8. BAZES, A.; SILKINA, A.; DEFER, D.; BERNEDE-BAUDUIN, C.; QUEMENER, E.; BRAUD, J-P.; BOURGOUGNON, N. *Active substances from Ceramium botryocarpum used as antifouling products in aquaculture.* Aquaculture, 2006, 258, 664-674.
9. CHARLES, S. V. *Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, Laurencia majuscule (Rhodomelaceae, Ceramiales).* Biomolecular Engineering 20, 2003**,** 255-259.
10. DUBBER, D. and HARDER, T. *Extracts of Ceramium rubrum, Mastocarpus stellatus and Laminaria digitata inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations.* Aquaculture 274, 2008, 196-200.
11. ENGEL, S.; PUGLISI, P. M.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. *Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes*. Marine Biology 149, 2006, 991-1002.
12. ESPECHE, M. E.; FRAILE, E. R. & MAYER, A. M. S. *Screening of Argentine marine algae for antimicrobial activity*. Hydrobiologia 116/117, 1984, 525-528.
13. FREILE-PELEGRIN, Y. and MORALES, J. L. *Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico.* Botanic Marina, 47, 2004, 140-148.
14. GARRITY, G. M.; BELL, J. A. and LILBURN, T. G. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd Edition, Springer, New York Berlin-Heidelberg, 2004, 401.
15. GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG N.R.; STALEY, J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Springer, USA, 2nd Edition, Vol. 2, 2005, P. 1-1135.
16. GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P. and QUENTIN, C. *Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine*

Enterobacteriaceae and Aeromonas spp., APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 66, N°. 1, 2000, p. 125-132.

17. GUARDABASSI, L.; PETERSEN, A.; OLSEN, J. E. and DALSGAARD, A. *Antibiotic Resistance in Acinetobacter spp. Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant.* APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 64, N°. 9, 1998, p. 3499-3502.
18. HAMELIN, K.; BRUANT, G.; EL-SHAARAWI, A.; HILL, S.; EDGE, S. A.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J.; MAYNARD, G.; MASSON, L. and BROUSSEAU1, R. *Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in Escherichia coli Isolates from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas.* APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 73, N°. 2, 2007**,** p. 477-484.
19. HELLIO, C.; DE LA BROISE, D.; DUFOSSE, L.; LE GAL, Y. and BOURGOUGNON, N. *Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints*. Marine Environmental Research. 52, 2001, 231-247.
20. IBTISSAM, C.; HASSANE, R.; JOSÉ, M-L.; FRANCISCO, D. S. J. F.; ANTONIO, G. V. J.; HASSAN, B. and MOHAMED, K. *Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco*. African Journal of Biotechnology, Vol. 8, N°. 7, 2009, p. 1258-1262.
21. JUNG, W. K.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H. and PARK1, Y. H. *Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli.* APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 47, N°. 7, 2008, p. 2171-2178.
22. KELMAN, D.; KASHMAN, Y.; ROSENBERG, E.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y. *Antimicrobial activity of Red Sea corals*. Marine Biology 149, 2006, 357-363.
23. KRIEG N.R. AND HOLT J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Lippincott William & Wilkins, Baltimore, M.D. USA. Vol. 1, 1984, P. 1 – 964.
24. KUMAR, C. S.; SARADA, D. V. L. and RENGASAMY, R. *Seaweed extracts control the leaf spot disease of the medicinal plant Gymnema sylvestre.* Indian Journal of Science and Technology, Vol. 1, , N°. 3, 2008, P. 1-5.
25. KUMAR, K. A. and RENGASAMY, R. *Evaluation of Antibacterial Potential of Seaweeds Occurring along the Coast of Tamil Nadu, India against the Plant Pathogenic Bacterium Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Ishiyama) Dye.* Botanic Marina, Vol. 43, 2000, pp. 409-415.
26. LIMA-FILHO, J. V. M.; CARVALHO, A. F. F. U.;, FREITAS, S. M.; MELO V. M. M. *Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian Coast.* Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 33, 2002, p. 311-313.
27. MAYHOOB, H., *Recherches sur la végétation marine de la cote syrienne. Etude experimental sur la morphpgénse et le development de quelques espèces peu connues these Doctorat d' Etat*. Caen. France, 1976, 1- 286.
28. NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; fourteenth informational supplement. M100-S14 Vol.24, N°.1, January 2004.
29. PLOUGUERNE, E.; HELLIO, C.; DESLANDES, E.; VERON; B. and STIGER-POUVREAU, V. *Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: Grateloupia turuturu and Sargassum muticum.* Botanic Marina, 51, 2008, 202-208.

30. PUGLISI, M. P.; ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. *Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes*. Mar. Biol. 150: 2007, 531-540.
31. ROBLES-CENTENO, P. O.; BALLANTINE, D. L. & GERWICK, W. H. *Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history*. Hydrobiologia 326/327: 1996, 457-462.
32. SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. and HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Lippincott William & Wilkins, Baltimore, M.D. USA. Vol. 2, 1986, P. 965 – 1599.
33. TASKIN, E.; OZTURK, M.; TASKIN, E. and KURT, O. *Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey).* African Journal of Biotechnology. Vol. 6 (24), 2007, pp. 2746-2751.
34. TOVAR, C. Z. and BALLANTINE D. L. *Multiple Antimicrobial Activities of the Marine Alga Spyridia filamentosa (Ceramiaceae, Rhodophyta)*. Botanic Marina, Vol. 43, 2000, pp. 233-238.
35. TÜNEY, I.; CADIRCI, B. H.; ÜNAL D.; SUKATAR, A. *Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey)*. Turk. J. Biol. Vol. 30, 2006, P. 171-175.
36. VLACHOS, V.; CRITCHLEY, A. T. and HOLY, A. V. *Differential Antibacterial Activity of Extracts from Selected Southern African Macroalgal Thalli.* Botanic Marina Vol. 42, 1999, pp. 165-173.
37. XU, N.; FAN, X.; YAN, X.; LI, X.; NIU, R. and TSENG, C.K. *Antibacterial bromophenols from the marine red alga Rhodomela confervoides*. Phytochemistry 62, 2003, 1221-1224.