تأثير مستخلص الطحلب (Chlorella vulgaris) المعزول من بيئة مياه مدينة الموصل على نمو الفطر (Tricophyton mentagrophytes)

ناظم علاوي الشاهري حميد سلمان خميس خليل ابراهيم بندر
كلية النور الجامعة جامعة تكريت / كلية التربية للبنات جامعة تكريت / كلية العلوم

Abstract

The algae samples were collected from 10 sites of Tigris river in Mosul city during March to June 2011. And cultured in solid Chu 10 media. A series of concentration of the extract 1, 2.5, 5, 7.5, and 10 mg/ml . To used for assessing the inhibitory effect C. vulgaris extract on growth of T.mentagrophytes in vitro.

The TLC show three spots in RF which correspond to the free fatty acid, phospholipid, and cholesterol-ester. the alcoholic extract of C. vulgaris in a concentration of 7.5 mg/ml is effective in inhibiting the growth of T. mentagrophyte in vitro.

الخلاصة

جمعت عينات الطحالب من ١٠ مواقع على طول نهر دجلة في مدينة الموصـــل خلال الفترة من اذار الى حزيران ٢٠١١ وتم زراعتها على الوسط الغذائي (كيو ١٠) الصلب تم استخدام التراكيز ١، ٢,٥، ٥، ٧,٥، ١٠ ملغم/لتر لمعرفة التركيز المثبط لنمو الفطر

اظهرت نتائج تقنية كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة وجود ثلاثة بقع تمثل الدهون المفســـفرة والأحماض الدهنية الحرة واســترات الكولســترول وأظهرت النتائج ان المســتخلص الكحولي للطحلب عند التركيز ٧،٥ ملغم / لتر كان هو التركيز الفعال والمثبط لنمو الفطر

المقدمة

الطحالب تضــم مجاميع مختلفة من الكائنات الحية القادرة على البناء الضــوئي وحيدة الخلية أو متعددة الخلايا وتختلف في أحجامها من دقيقة جدا لاترى بالعين المجردة (1مايكرو متر) إلى كبيرة جدا تصـــل في أطوالها إلى أكثر من (50 م) وتندرج ضـــمن مملكة الطليعيات (Protista) وهي كائنات حقيقية النواة (Eukaryota) وتتواجد في بيئات مختلفة (البيئة المائية بأنواعها العذبة و المالحة و المويلحة والهواء وملتصـــقة على (النباتات Epiphytic

والصخور Epilithic والطين Epipelic والرمال Epipsamic) ولها مدى واسعا لتحمل الظروف البيئية (من البيئات المتجمدة Karyophilic الى البيئات ذات درجات الحرارة المرتفعة جدا Thermophilic في البراكين والينابيع الحارة) والتصنيف يعتمد على نوعية المواد الغذائية المخزونة وطبيعتها الكيميائية وعلى الاسواط التي تعد صفة تصنيفية مهمة من حيث عددها ومظهرها الخارجي ولاسيما في الوحدات التكاثرية (السبورات و الامشاج) ويعد التركيب الكيميائي لجدار الخلية من الأسس المهمة في عملية التصنيف (1)

وتمتلك معدل نمو سريع وعالي وعلى مدار السنة في مناخ معتدل لهذا تعد أكثر المنتجات كفاءة لإنتاج الكتلة الحيوية كما استعملت الطحالب أو مستخلصاتها كاضافات غذائية سواء لغذاء الإنسان أو لعلائق الحيوانات المختبرية أو الاقتصادية ، ولما تقدم فقد حظيت بأهتمام واسع لمعرفة تركيبها الكيميائي وخصائصها الفسلجية متزامنا" مع تطور تقنيات التحليل الكيميائي حيث بينت الدراسات احتوائها على البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والعناصر المعدنية بالإضافة إلى الأحماض الامينية والأحماض الدهنية والستيرول والفيتامينات حيث تحتوي الطحالب باختلاف مجاميعها على الدهونوالتي تقسم بشكل عام الى جزء مصوبن(Saponifiable83 %) وغير مصوبن (Non-saponifiable%17) والمكون الرئيسي للدهونفيالطحالبهو Phosphatdyl glycerol و Insitol و Glycerol و Triglyceride phosphotidyl و Sulphoquinovosyl diglycerid وGlycerol – esters و Fatty acids ذاتاعدادذراتكاربونتتراوحبين (12-20) وكل من هذه الحوامض عبارة عن سلسلة غير مستقيمة (2)

وتأتي أهمية الطحالب من تداخلها بنشاطات عدة مع الحياة اليومية للإنسان والحيوانفقد وجد ان قسما" منها ينتج أنواعاً مختلفة من المضادات الحيوية (Antibiotics) القادرة على معالجة العديد من الأمراض التي تسببها الأحياء المجهرية المرضية (3)

وقسم اخر منها ينتج أنواعاً مختلفة من السموم (Toxins) العصبية والكبدية وغيرها من السموم المسببة لهلاك الحيوانات والإنسان عند شرب المياه الملوثة بهذه السموم (4)

من هنا جاء اهتمام الباحثون بدراسة تأثير المستخلصات النباتية في تثبيط الكائنات البكتيرية والفطرية المسببة للإصابات الجلدية عند الإنسان وعلى الحيوانات والنباتات والحشرات حيث اشارت الدراسات الى ان المادة الفعالة المستخلصة من النباتات تعطي نتائج افضل من المادة نفسها المصنعة كيميائيا والتي قد ترافقها تأثيرات جانبية سمية ، فالأعشاب والنباتات الطبية هي كنز الطبيعة الذي واكب تطور الإنسان حضاريا منذ آلاف السنين ولاهمية الطحالب من الناحية الغذائية ولما تحتويه من مركبات مهمة متعددةومنهاالمحتوى الدهني والحوامض لدهنية ارتاينا ان نقوم باستخلاص وتشخيص هذه المركبات للطحلب الاخضر Chlorella vulgaris(5)

طرق العمل

- جمع العينات

جمعت العينات من – ماء وتربة طينية وصخور مغمورة بالمياه – لـــ (10) مواقع ضمن مدينة الموصل على امتداد نهر دجلة ابتداء" من (سد الموصل شمالا" وانتهاء" بقضاء حمام العليل جنوب مدينة الموصل) للفترة من آذار 2011 ولغاية حزيران 2011 واستخدمت لجمع العينات قناني زجاجية معقمة محكمة الغلق وتقشط عينات الترب الطينية والصخور بمقشط حديدي معقم ونظيف وتوضع في القناني الزجاجية لحين أخذها للمختبر.

اما بالنسبة لعينة الفطر الجلدي T. mentagrophytes فقد جمعت من المرضى المراجعين لمستشفى (السلام وابن سينا التعليمي) من الجلد والراس والاظافر وتزرع على وسط (SDA) مضاف اليه (السايكلوهكسومايد والكلورامفينيكول) تحُضِنْ عند (28 مْ) ولمدة (7–14) يوم وتشخص اعتمادا علىعدد الأيام التي يستغرقها الفطر لبدء النمو وشكل المستعمرة الظاهري ولونها ونسجتها (مسحوقيه ، قطنية ، زغبي) (6 ، 7).

*استزراع الطحلب

بعد الوصول إلى المختبر تزرع العينات على الوسط ألزرعي (Chu 10 medium) الصلب وتحضن في الحاضنة بدرجة (25±2 مْ) وشدة إضاءة (32Lux) وبعد مرور (6 – 4) سنلاحظ نمو لمستعمرات صغيرة تفحص وهي بداخل طبق البتري وتعلم ثم تنقل إلى طبق جديد وتترك لتنمو ثانية ونكرر العملية لحين الحصول على عزلة نقية ومن ثم تنقل المستعمرات إلى وسط (Chu 10) السائل المحفوظ في دوارق زجاجية حجم (250) سم^{3}يحتوي كل منها على (100) سم^{3} من الوسط وتترك للنمو في (Shaker Incubator) بنفس شدة الاضاءة ودرجة الحرارة اعلاه . (8)

Phylum : Protesta
Division: Chlorophycophyta
Order : Chlorococales
Family : Ooscystaceae
Chlorellavulgaris

استخلاص الأحماض الدهنية من الطحالب الخضراء

اشارت العديد من الدراسات الى ان المركبات الفعالة للطحالب الخضراء هي احماض دهنية (Faty acid) لهذا انصب الاهتمام باستخلاص الاحماض الدهنية فبعد الحصول على نمو لمستعمرات (*C. volcaris*) وتم استخلاص الدهون وكما يلي :-

١- تم وزن (5) غم من العينات الطحلبية المجفدة والمسحوقة ووضعت في وعاء ورقي (thumble)

٢- نقعت لمدة تتراوح من (4-6) ساعات بـ (250) مل من المذيب الهكسان (n-hexan)

٣- استخلصت الدهون بجهاز (Soxholet) لمدة (24) ساعة

٤- تم التخلص من المذيب الهكســـان (n-hexan) بجهاز المبخر الدوار (Rotary evaporator) بدرجة حرارة (40°م) للحصـول على سائل لزج القوام بعدها نقوم بعملية الصـوبنة Saponification للحصـول على الاحماض الدهنية الحرة .

تقدير الاحماض الدهنية بتقنية كروماتوغرافيا الغاز (GC)

١- اخذ مامقداره (20-25) ملغم من الاحماض الدهنية الحرة وتحويلها الى استرات المثيل

٢- تم اضـافة (1) مل من الكاشـف المتكون من (20) مل ميثانول ويضـاف اليه (0.1) مل كلوريد الاسـتيل Acetylchloride وتوضع في انبوبة محكمة الغلق

٣- تغلق الانبوبة باحكام وتسخن في حمام مائي تحت درجة حرارة (100°م) لمدة (25) دقيقة يبرد بعدها ويحقن في جهاز (GC) للحصــول على الاحماض الدهنية التي تشــخص بالمقارنة مع الاحماض الدهنية القياســية المتمثلة بحامض الاوليك والبالمتيك في ظروف الفصل نفسها

تحضير تراكيز مختلفة من مستخلص *C. volcaris*

تتم اذابة 1mg/ml من مسـحوق المسـتخلص في (5) مل من .D.W المعقم للحصـول على تركيز (200 mg/ml) كمحلول قياســي وباســتخدام قانون التخفيف في الكيمياء التحليلية $N_1\ V_1 = N_2\ V_2$ يتم الحصول على التراكيز والحجمg/ml (10 , 7.5 , 5 , 2.5 , 1) (9).

اختبار التاثير المثبط للمستخلص على الفطر *T. mentagrophyte*

اخذت الحواف الخارجية لمسـتعمرات الفطر بعمر(7) ايام ومحضــن بدرجة (2 ±25 ° م) على شـكل اقراص بقطر (5 mm) ثم زرعت في وسط كل طبق من (SGA) الممزوج مع المستخلص وحسب التراكيز اعلاه وطبق حاوي على (SGA) فقط كعينة مقارنة (Control) واســتخدمت ثلاثة مكررات لكل فطر وجميع الخطوات اجريت في ظروف التعقيم ثم حضـــنت الاطباق بدرجة (30 ° م) ولمدة (14) يوماً اخذت النتائج بحساب متوسط قياس كل قطرين متعامدين لكل مستعمرة فطرية (10) .

النتائج والمناقشة

وصف الطحلب

وحيد الخلية خضراء اللون صغيرة الحجم بيضوية الشكل وذات بلاستيدة كاسية تملا معظم حجم الخلية يتراوح حجمها مابين (5–8.5) مايكروميتر وتتواجد في المياه العذبة شكل (1) يوضح شكل الطحلب.

اما الفطر *T. mentagrophyte* فيظهر مستعمرة بيضاء اما ظهر المستعمرة ذات لون اصفر مائل الى الاحمر الغامق والكونيدات الكبيرة نادرة وذات جدار رقيق حاوية على (3–4) اما الكونيدات الصغيرة غزيرة العدد موجودة على طول الهايفات اما مفردة او عنقودية شكل (2) يوضح شكل المستعمرة .

شكل (١) الطحلب الكلوريلا C.volcaris شكل (٢) الفطر T.mentagrophyt

اختبار تاثير تراكيز مختلفة لمستخلص *C. vulgaris* في تثبيط الفطر *T. mentagrophyt*

أظهر مستخلص *C.vulgaris* فعالية تثبيطية تجاه الفطر *T. mentagrophyt* المعزولة خلال الدراسة إذ ثبط نموه تثبيطاً تاماً عند التركيز (7.5 ملغم/مل) (جدول 1) وشكل (3) تبين من خلال الدراسة إن المستخلص الكحولي كان ذا تاثير اكبر على نمو الفطريات المعزولة من المستخلص المائي وقد يعود السبب في ذلك إلى احتواء الطحالب على العديد من المواد الفعالة (16) حيث أجريت العديد من الدراسات لمعرفة تأثير مستخلصات النباتات على نمو الأحياء المجهرية ومنها الفطريات بضمنها الدراسة التي قامت بها (17) التي أكدت بان مستخلصات النبات بتركيز (2.5 ملغم/مل) أدى إلى حدوث تثبيط في نمو أمامية السوط للشمانيا الاستوائية *Leishmania tropica* بنسبة تثبيط (71.9%) كما وجد (18) إن مستخلص الأوراق المائي بتركيز (4 ملغم/مل) كان ذو فعالية تثبيطية عالية حيث اعتبر من أكفأ المستخلصات في تثبيط الفطر *T. mentagrophytes* ومنها الدراسة التي قامت بها الباحثة (11) إذ درست تأثير مستخلص الأزهار على نمو فطريات جلدية معزولة من مرضى مصابين بها وقد أظهرت هذه المستخلصات نسبة تثبيط عالية تجاه الفطران *T.mentagrophytes* و *M.gypseum* إذ ثُبِّطَ نموهما تماماً عند التركيز 20 ملغم/مل .

كما أظهرت مستخلصات بعض الطحالب الخضر (*Cladophora prolifera* و *Bryopsis myosuroides* و *Halimeda cuneata* و *Pseudocodium de-vriesei* و *Caulerpa zeyheri* و *Codium dutheae* و *Codium platylobium* و *Codium tenue* و *Codium capitatum*) فعالية ضد الفطريات (12) أما دراسة (13) والتي قام بها على الطحلب الاخضر *C. vulgaris* فقد ثبط نمو الفطر *Rhizoctonia sp.* جزئياً وكذلك الحال بالنسبة للطحلب العصوي *N. cryptocephala* الذي ثبط نمو الفطر *Aspergillius sp.* جزئياً من هذا تبين أن للاحماض الدهنية تاثيراً مثبطاً للبكتريا والفطرياتومن المتوقع أن تحدث عملية امتزاز للاحماض الدهنية على سطح الخلية البكتيرية تغيرات غير راجعة في جدار الخلية البكتيرية وبالتالي تؤدي الى قلة اخذ المغذيات وانتاج الطاقة وبالتالي موت الخلية البكتيرية والفطرية

جدول (1)تاثير تراكيز مختلفة لمستخلص *C.vulgaris* في تثبيط الفطر *T. mentegrophyte*

التراكيز ملغم/مل	1	2.5	5	7.5	10	السيطرةالموجبة	السيطرةالسالبة
T. mentegrophyte	21	14	9	0	0	0	30

السيطرة الموجبة : معدل نمو مستعمرة الفطر عند إضافة المضاد الفطري ketoconazole وبتركيز (1ملغم/مل) إلى الوسط الزرعي

السيطرة السالبة : معدل نمو مستعمرة الفطر بدون إضافة أي مادة إلى الوسط الزرعي.

شكل (3) تاثير تركيز الستخلص على نمو الفطر *T. mentegrophyte*

فصل الدهون بتقنية(TLC)

تم فصل الدهون المستخلصة في الطحالب المعزولة بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(TLC)(أتجاه واحد) بأستخدام مسترد محضر من (Hexane,diethylether) و بنسبة (8:2) أظهرت النتائج ان المستخلص الدهني للطحلب*C.vulgaris*متكون من ثلاث مركبات دهنية جدول (2) حيث ظهرت ثلاث بقع خلال الفصل والتي كانت تمثل(Chlestrol–ester و phospholipids و free fatty acid) وحسب قيمة الـ (Rf) لكل منها وكما هو موضح في الشكل (5)وهذا اتفق مع (14) حيث أوضحوا في دراستهم ان الدهون في الطحالب تتألف من المركبات نفسها التي تم التوصل اليها في الدراسة .

جدول (2) المكونات الدهنية للمستخلص الدهني في الطحلب*C.vulgaris*

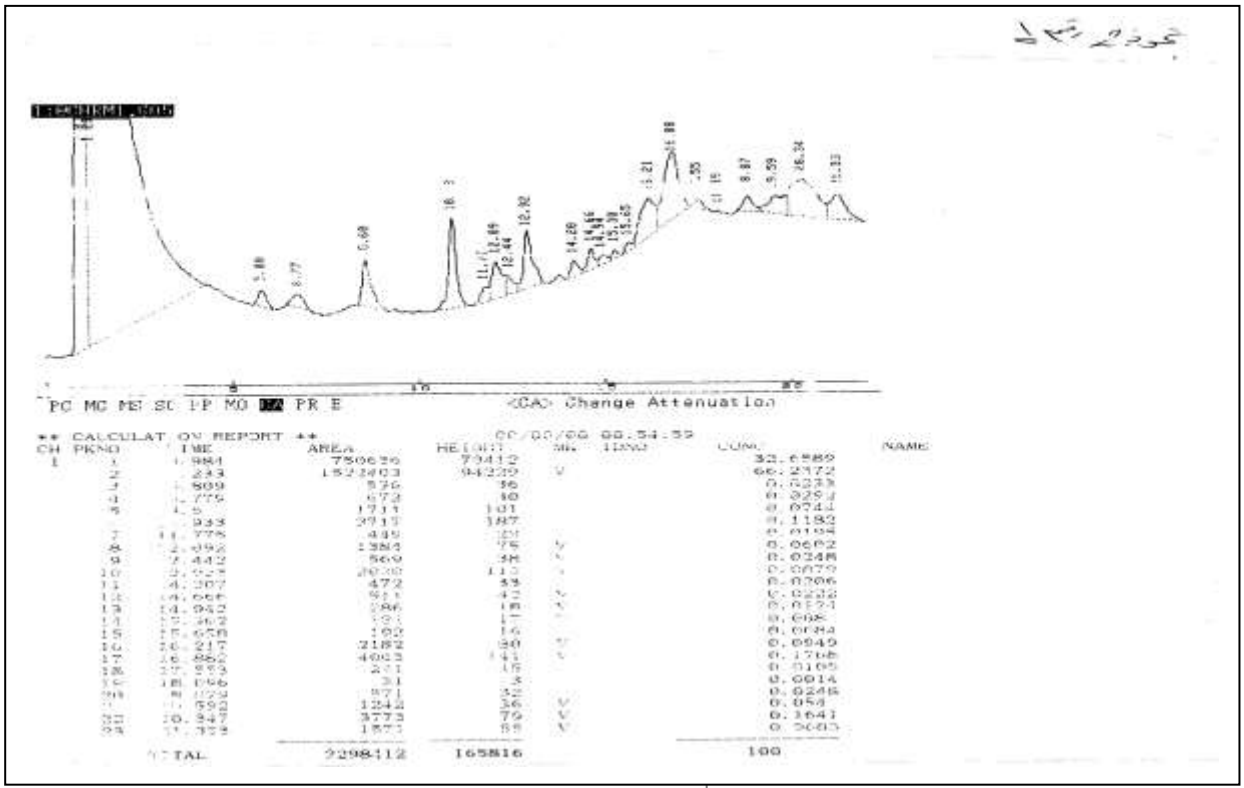
الدهن المتوقع	قيمة (Rf)	*C.vulgaris*
Chlestrol-ester(CE)	8	+
FreeFattyacid (FA)	2.3	+
Phosphor lipid (PL)	0.0	+

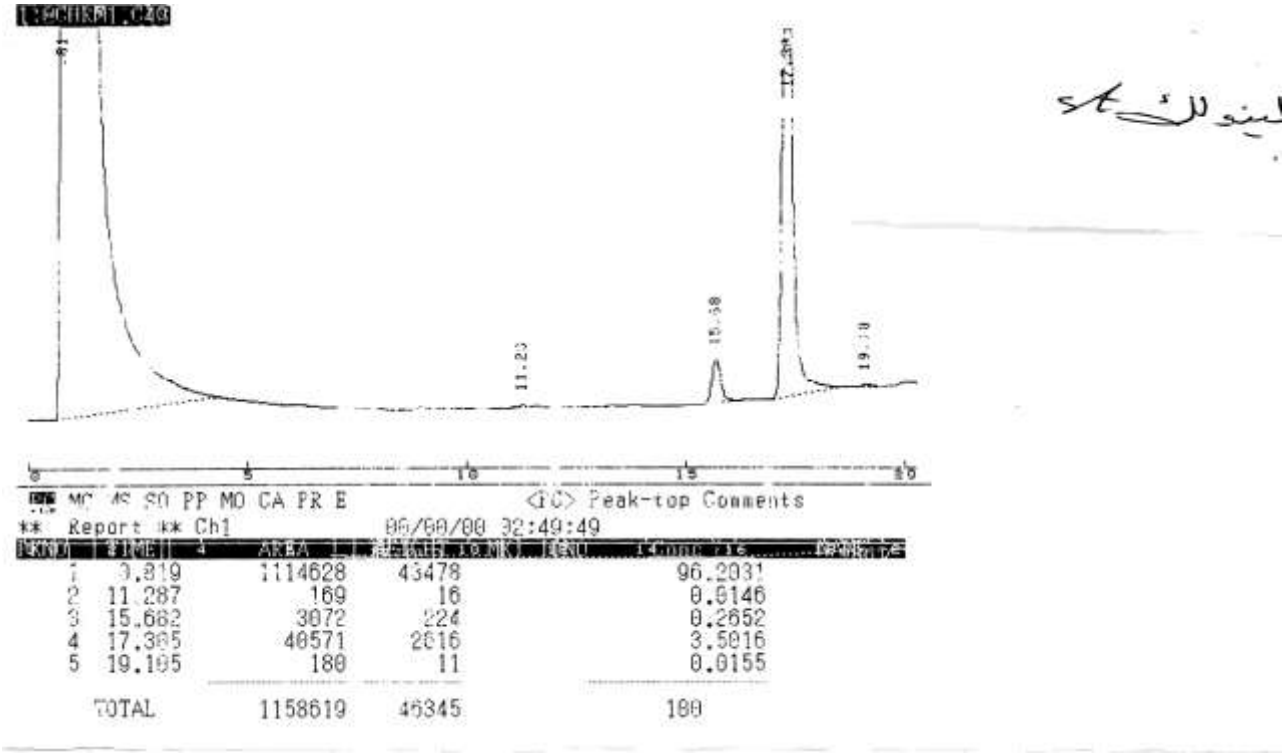
الشكل (5) البقع التى ظهرت على الطبقة الرقيقة (TLC)

التشخيص باستخدام جهاز (GC)

خلال دراستنا تم عزل و تشخيص بعض الأحماض الدهنية من الدهون الكلية المعزولة من العزلات الطحلبية قيد الدراسة بتقنية الـــ(GC)والمتمثلة بالحامض الدهني البالمتيكPalmatic و الأوليكOleic واللذان يعتبران من المواد المؤثرة في القيمة الغذائية فقد أظهرت النتائج ان الطحلب قيد الدراسة الحالية يحتوي على الحوامض الدهنية اعلاه والشـكل (6 و 7) يظهر فصـل الحوامض الدهنية القياسـية للطحلب قيد الدراسـة بتقنية الـ (GC)، وقد اشـار (14) الى ان الطحلب الاخضـر *C.vulgaris* ينتج مادة الكلورينChlorellinوالتي هي عبارة عن عدد من الاحماض الدهنية غير المشـــبعة ولتي تثبط العديد من الاحياء المجهرية وان هذه النتائج تتفق مع دراسـة(15) حيث اوضـح في دراسـته ان احتواء انواع من الطحالب الخضـراء على نفس الحوامض الدهنية ذات اعداد كاربون C:18 , C:16 واتفقت ايضـا" هذه النتائج مع دراسـة (16) في احتواء الطحلب *C.vulgaris* على الحامض الدهني البالمتيك والأوليك على الرغم من ان النســـبة المئوية للحامض الدهني الأوليك في الطحلب لم تكن متماثلة نوعا ما.

شكل (6) يظهر فصل الحوامض الدهنية للطحلب*C.vulgaris*بتقنية الـ (GC)





PEAK	TIME	AREA	HEIGHT	AREA %
1	3.819	1114628	43478	96.2031
2	11.287	169	16	0.0146
3	15.682	3072	224	0.2652
4	17.385	40571	2816	3.5016
5	19.195	180	11	0.0155
	TOTAL	1158619	46345	100

المصادر

1) Round,F.E.(1975).The biology of algae . (2nd Ed) Edward Arnold (publisher) .Ltd.
2) Kane , J .; and Summerbell , R.C. (1999) . Trichophyton , m , EpidermaphMicrosporuyton and agent of Superficial mycosis . In : Mannual of Clinical Microbiology 17th (ed). Edited by Murrage ,P.R. (ed.) , Washington

محل جزء او كل المركزالبروتيني في العلائق على Cladophora crispate العلي ، جبار طارش احمد، إحلال الطحلب 3)

2004 كفاءة أداء فروج اللحم وبعض صفات الدم . رسالة– ماجستير . كلية الزراعة – جامعة البصرة .

4) deHoog, G.S. &Guarro, J. (1995). Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor schimmelcultures, Netherlands. Pp:720.

5) Orcutt,D.M. and Patterson , G.W.(1974).Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* . Lipid.9:1000-1003.

6) Rook, A.J.;Wikinson,D.S. & Ebling, F.G. (2003) .Mycology In: Textbook of Dermatology.Vol.2. 6th ed. Blackwell ,Sci. Pub., Oxford .

7) Emmons, W.G.; Binford, C.; Utz, J.& Kown-chung, K. (1977). Medical mycology: 3rd. ed. Lea and febiger. Philadelphia, U.S.A.P: 147-167.

8) Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.; Hardman, M. and Stanier, R. (1979). "Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria" . J. Can. Microbiol. Vol.111: 1-61.

9) Rios ,J.L., Recio ,M.C. & Villar ,A.(1988). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area .J. Ethnopharmacol .21: 139-152.

10) Kwon- chung, K.J. and Benntt, J. E.(1992) . Medical Mycology.Williams and wilkins, pp.105- 161.

١١) الطائي ،سعاد ريحان عواد(2001) .تأثير مستخلصات نباتية على نمو فطريات جلدية معزولة من مرضى مصابين بامراض جلدية وعلى نمو بعض أنواع البكتريا المرضية .رسالة ماجستير ،كلية التربية ،جامعة تكريت .العراق.

12) Hellio, C.;bremer, G.;Pons,M.A. and LeGal, Y.(2000). Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brttany, France, Applied- Microbiology. Biotechnology,54:543-549.

١٣) الجراح ، سلمان زين العابدين (2003) .دراسة فعالية مستخلصات بغض انواع السيانوبكتريا والطحالب كمضاد ميكروبي . اطروحة دكتوراه . كلية العلوم –جامعة الانبار – العراق

١٤) نوري ، انفال وعبدالرزاق ، مكارم وعلي ، داؤد سلمان (2010) استخلاص وتشخيص الدهون الكلية وبعض الحوامض الدهنية من الطحلب لاخضر (Chlorophyta *Chlorella vulgais (*

15) Heiba, H. I., Al-Easa, H.S. and Rizk,A.M. (1997) . Fatty acid composition of Eleven algae from the costal zones of Qater, plant foods for Human Nutrition, 51:27-34.

16) Venkatarman, L.V. and Becker , E.W.(1985). Biotechnology and utilization of The algae.