تأثير مستخلص الايثانول لطحلب *Nostoc linkia* على نمو بعض أنواع البكتريا المعزولة من المياه الملوثة

أحمد عيدان لمياء عبد أمل حمزة رويدة فاهم غنية عيال
الحسيني السادة حمود كامل حمدان
مركز بحوث ومختبرات المياه قسم التقنيات الإحيائية- دائرة بحوث وتكنولوجيا البيئة ومعالجة المياه/ وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة

أختبر تأثير مستخلص الايثانول لطحلب *Nostoc linkia* في خفض نمو ثلاثة أنواع من بكتريا *Escherichia coli* و*Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من المياه الملوثة في ظروف مختبرية عند درجة حرارة 37 م بفترة معاملة 72 ساعة بتراكيز مختلفة 0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم/ لتر، أذ تبين مستخلص الايثانول لطحلب *Nostoc linkia* كفاءة عالية في خفض الأعداد البكتيرية بنسبة إزالة 98.9% بعد 72 ساعة بتركيز 1 ملغم /التر، لبكتريا *Escherichia coli* و 75.3، 94.6 % بتركيز 0.75 و 1 ملغم /التر على التوالي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و80.1 ، 94.7 % بتركيز 0.75 و 1 ملغم/التر على التوالي لبكتريا *Staphylococcus aureus*، مع وجود فروقات معنوية لتركيزي (0.75 و 1 ملغم/التر)، وخفض العدد الكلي للإعداد البكتيرية بنسبة إزالة 90.8% بتركيز 1 ملغم/ لتر لمستخلص الايثانول طحلب *Nostoc linkia* بعد 24 ساعة من التجربة.

The effect ethanolic extract of *Nostoc linkia* algae on growth of some bacterial species which isolated from waste water

Ahmed Aidan Al-Hussieny | **Lamyia A. Thijar** | **Ameal H. Hmood** | **Roeda F. Kamel** | **G. A. Hamdan**

Center and Department Water research and Directorate of water Treatment Technology and Ministry of Science & Technology

Abstract

The effeciency of ethanolic extract of *Nostoc linkia* algae has been tested in reducing three species of bacteria *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* which isolated from contamination water in Laboratory conditions 37 ˚C in period treatment 72 hour in different concentration (0.25 , 0.5 , 0.75 , 1 mg/l). It became obvious that the ethanolic extract of *Nostoc linkia* algae has high effeciency in reducing different bacterial number in removing ratio 98.9% after 72 hour . in concentrate 1 mg/l for bacteriaa *Escherichia coli* and 94.6, 75.3% in concentrate 1 and 0.75 mg/l respectivelly for bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and 94.7, 80.1% in concentrate 1 and 0.75 mg/l respectivelly for bacteria *Staphylococcus aureus* . associated with different significant for two concentrate 1 and 0.75 mg/l . The total bacterial number reducing in removing ratio 90.8% in concentrate 1 mg/l of ethanolic extract of *Nostoc linkia* algae after 24 hour of experiment.

المقدمة

تنتج الطحالب الخضر المزرقة مركبات فعالة لها مدى واسع من الفعالية الحيوية وتتضمن المضادات الحيوية ومبيدات الفطريات ومبيدات الطحالب، كما لاحظ ذلك (22) أن لبعض الطحالب الخضر المزرقة القدرة على أفراز مـواد ذات تـأثير مثـبط لنمـو البكتريا، إذ تختلف المواد المنتجة من الطحالب في طبيعة فعاليتها حسب درجة الحـرارة والرقم الهيدروجيني ومكونات الوسط الزرعي المستخدم ومدة الاستزراع و شدة ألإضاءة وجميعها تعد عوامـل مهمـة فـي أنتـاج المـواد المـضادة للميكروبـات، إذ ينـتج طحلب *Fischerella* sp. مادة Parsigaine التي لها مدى واسع بوصفها مادة مـضادة للبكتريا ومضادة للفطريات، وفي دراسة (1) أن لمستخلص طحلـب *Chara* sp مـواد مثبطة للبكتريا والتي هي عبارة عن أنزيم Lipoxygenase وحامض دهنـي Stearic acid مع صبغات مثبطة لنمو البكتريا مثل صبغة الكاروتين و ليكوبين و زيازانثين، مـع كميات قليلة من الأحماض الامينية والببتيدات، كما ويمتلـك طحلـب *Oscillatoria* sp مركبات فعالة من خلال مستخلصة العضوي ذات تأثير ضد الفطر *Candida albicans* **(**14**)**، اذ تتعرض المياه وخصوصاً السطحية منها إلى أخطـار التلـوث بـالكثير مـن المسببات المرضية كالبكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وكذلك الفايروسات عند رميها إلى المياه السطحية بدون معالجة مناسبة، حيث تعمل هذه الملوثات على تغيير الـصفات الصحية للمياه وتجعلها غير صالحة للاستهلاك البشري أو الحيواني، وقد تزايـد الطلـب على مواد معقمة بديلة طبيعية للمياه عـن المعقمـات الكيميائيـة الحاليـة والتـي أدت الاستخدامات الواسعة لها ولفترات طويلة إلى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لها فـضلا عن تأثيراتها الجانبية **(**9**)**، لذا تعد الطحالب من الكائنات المجهرية ذات الكفاءة العالية في أنتاج مجموعة من المضادات الحيوية ذات التأثير المباشر على إزالة الكثير من البكتريـا المرضية مثل *Pseudomonas* المقاومة للمضادات الحيوية، إذ تنتج الطحالب نوعين من المركبات الفعالة الموجودة داخل خلاياها والتي تدعى بالـ intracellular Products أو خارج خلاياها فتسمى Extracellular Products، وتكون مستخلصات الطحالـب ذات طبيعة مختلفة بحسب اختلاف تركيبها الكيماوي من أحماض أمينيـة ودهنيـة، إذ ينـتج طحلب *Prototheca* حامض Lactic acids مع كميات قليلة من حامض Succinic acids وطحلب *Chlorella* له القدرة على إنتـاج حـامض Lactic acids و Acetic acids، وتنتج الطحالب *Chlorella* ، *Anabaena* كميات مـن الأحمـاض الامينيـة

والببتيدات (Peptides و Amino acids)، ويعد مركب الكلورلين Chlorellin المنتج من طحلب *Chlorella* أول تسجيل للمواد المضادة للبكتريا من الطحالب الذي يتكون من عدد من الأحماض الدهنية غير المشبعة والمكـون مـن 77.35% كـاربون و 11.6% هيدروجين و 10.99% أوكسجين، (15) ويعتقد أن هذا المركب يتكون كناتج لتفـاعلات وسطية داخل الخلية وهو منشط لبعض الأحياء المجهرية في التراكيز الواطئة ولكنه مثبط في التراكيز العالية، أما الدايوتومات تحتوي على نسبة غير قليلة من الأحماض الدهنيـة الأساسية Essential Fatty Acid (EFA) وخـصوصاً غيـر المـشبعة منهـا مثـل Arachidonic acid و Linolenic acid و Linoleic acid و Eicosapentaenoic acid (19)، لذا فقد هدفت الدراسة إلى التخلص مـن بكتريـا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* الموجـودة فـي ميـاه الصرف الصحي باستعمال مستخلص الايثانول لطحلب *Nostoc linkia*.

المواد وطرائق العمل

زرع وتجفيف عزلة الطحالب:

تم الحصول على عزلة الطحلب ***Nostoc linkia*** المنقاة من بنك الطحالب فـي وحدة زراعة الطحالب في مركز بحوث ومختبرات المياه قسم التقنيات الإحيائية دائـرة بحوث وتكنولوجيا البيئة ومعالجة المياه وزارة العلوم والتكنولوجيا، إذ نمي الطحلب فـي مزارع كبيرة الحجم للحصول على كتلة حيوية أكبر باستخدام المزارع الثابتة، ويمتاز هذا النوع من المزارع بكونه غير متجدد وذي حجم ثابت (11) وكما يأتي:

1. يتم تحضير عدد من المزارع الصغيرة بحجم 10 مل لاسـتخدامها كلقـاح أبتـدائي للمزارع الأكبر حجما.
2. التدرج في زيادة حجم المزرعة أبتداء من 10 و 100 و 200 مل.
3. يحضر وسط زرعي بحجم 2 و 8 لتر في أوعية زجاجية شفافة مغلقة بـسداد قطنـي وأضيف إليها اللقاح، وتزود المزرعة بالهواء 100 لتر/ دقيقة من خـلال إمـرار أنبوب مطاطي ينتهي بحجر فقاعات Air stone لتزويد المزرعة بالهواء مخلوطا مع CO_2 بنسبة 1– 2% وتحضن المزرعة في غرفة الزرع.

4. يتم حصاد المزرعة بعد 8– 9 أيام ويتم فصل الخلايا الملتصقة على الجدار والقعر بإمرار تيار هوائي قوي على جدران الحاوية الزجاجية.
5. ترسب المزرعة بوساطة النبذ المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق ويجمع الراسب في جفنة خزفية، ويجفف باستخدام الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 50 م لمدة 48 ساعة، ويوضع بعدها مجفف الطحالب في قنينة زجاجية وتحفظ في درجة حرارة 4 م لحين الاستخدام.

أستخلاص المواد الفعالة من الطحالب:

أستخلصت المواد الفعالة من طحلب *Nostoc linkia* حسب طريقة (4)، إذ تم الحصول على 189 ملغم– وزن جاف/ لتر بعد أكثار الطحلب في الوسط الزرعي المغذي وكما يأتي:

1. يذاب 250 ملغم من مجفف الطحالب في 10 مل من الايثانول 95% ثم يرج المذيب لمدة 30– 60 دقيقة بأستخدام حاضنة هزازة بدرجة حرارة 25 م وبسرعة 70 دورة/ دقيقة.
2. ينبذ المستخلص مركزيا بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة للتخلص من البقايا الخلوية ويوضع الراشح في انبوبة نظيفة ويعاد نبذه بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق.
3. تكرر عملية أستخلاص مجفف الطحالب ثلاث مرات بنفس الطريقة لاستخلاص معظم مكونات الطحالب.
4. يجمع المستخلص الكحولي النهائي ويتم التخلص من المذيب باستخدام المبخر الدوار بدرجة حرارة 40 م لنحصل بعدها على المستخلص فقط بشكل مسحوق أخضر غامق.
5. يضاف 2 مل من الماء المقطر إلى الراسب ويرج جيدا ثم يضاف بعدها 5 مل من كلوريد المثلين ويرج جيدا للحصول على طبقتين يتم فصلهما باستخدام قمع الفصل، يجمع الجزء العضوي ويتم تركيزه بدرجة حرارة الغرفة للحصول على المستخلص.

عزل وتشخيص العزلات البكتيرية:

تم عزل *Escherichia coli* من مياه التصريف النهائي لمحطة الرستمية لمعالجة مياه الصرف الصحي في بغداد وحسب الطرق القياسية (7)، وعزلت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* من مياه المجاري وحسب طريقة (21) ونميت العزلات البكتيرية على وسط Nutrient agar، واخذ 1 لوب من العزلة النقية إلى دوراق زجاجية معقمة حاوية على وسط Nutrient broth وحضنت في درجة حرارة 37 م لإكثار الأعداد البكتيرية وتكوين العالق البكتيري.

تحضير العالق البكتيري وتراكيز المستخلص:

اخذ 1 مل من العالق البكتيري ولكل من العزلات البكتيرية المعزولة *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* ووضع في دورق زجاجي معقم سعة 100 مليلتر حاوي على تراكيز مختلفة من مستخلص الطحالب(0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم/ لتر) المحضرة من التركيز الأساسي بواسطة طريقة التخافيف ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بمياه الصرف الصحي المعقمة وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة بكتيرية إضافة إلى معاملة السيطرة الخالي من مستخلص الطحالب، وحضنت الدوارق في درجة حرارة 37 م ولفترة 72 ساعة (18).

حساب العدد الكلي للبكتريا Total plate Count (TPC):

أضيف واحد مل من عينة الصرف الصحي غير المعقمة للتراكيز المحضرة أعلاه والمخففة وصبت في أطباق زجاجية معقمة وبحجم 20 مل لكل طبق بالوسط Nutrient agar، حضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م بعدها حسب العدد الكلي للبكتريا بأستخدام المعادلة الآتية: حسب طريقة (5).

* العدد الكلي للبكتريا TPC = عدد المستعمرات البكتيرية في الطبق الواحد × معكوس التخفيف.

حساب عدد الخلايا البكترية: حسبت أعداد الخلايا البكتيرية في 1 مل من العالق البكتيري باستخدام طريقة Hemocytometer (counting chamber) (10) بعد 24 و 48 و72ساعة من المعاملة باستخدام المعادلة الآتية:

عدد البكتيريا (وحدة تكوين مستعمرة/مل Colony formation unity) أو (CFU/ مل) = عدد الخلايا في 4 مربعات × 10

* نسبة الخفض = A – B / A × 100

A = عدد البكتريا قبل المعاملة ، B = عدد البكتريا بعد المعاملة

Colony formation unity

التحليل الإحصائي للبيانات:

تم أستخدام تحليل التباين (ANOVA) للنتائج لمعرفة معنوية تأثير المعاملات المختلفة وأختبرت معنوية الفروق بين المعاملات بمقارنتها مع معاملة السيطرة بأستخدام أختبار دنكن Duncan's multiple range test (3).

النتائج والمناقشة

تخفيض عدد بكتريا *Staphylococcus aureus*:

خفضت أعداد مستعمرات بكتريا *Staphylococcus aureus* خلال 24 ساعة بأستخدام المستخلص الكحولي لطحلب *Nostoc linkia* بتراكيز 0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم/ لتر، إذ وصلت أعداد خلاياها الى334، 313، 143، 92 CFU/ مل على التوالي مقارنةً بأعداد الخلايا قبل المعاملة التي كانت حوالي 317 CFU / مل، وبعد 48 ساعة خفضت إلى 316، 231، 97، 34 CFU/ مل، أما بعد 72 ساعة وصل خفض الخلايا البكتيرية إلى 311، 210، 78، 18 CFU/ مل، (الجدول ،1)، وقد بين التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي عند مستوى ($P<0.05$) بين تركيز (0.75 و 1 ملغم/ لتر) وقبل المعاملة.

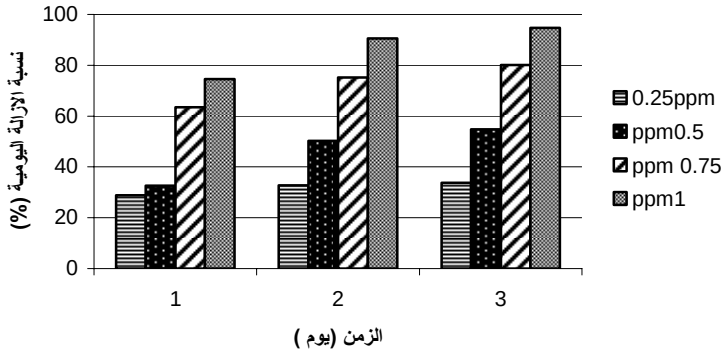
جدول (1) : خفض اعداد بكتريا *Staphylococcus aureus* بتراكيز مختلفة لمستخلص طحلب *Nostoc linkia* الكحولي(Mean± S.D).

تراكيز (ملغم/ لتر)	عدد البكتيريا قبل المعاملة (CFU/ مل)	عدد البكتيريا بعد المعاملة (CFU / مل)		
		24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
Control	78.78±317	78.78±580	78.78±1420	78.78±3465
0.25	78.78±470	22.50±334	21.73±316	19.40±311
0.50	78.78±465	23.09±313	26.76±231	27.18±210
0.75	78.78±392	*20.0±143	**32.15±97	**20.82±78
1	78.78±363	**10.00±92	**10.41±34	**3.71±18

*** تعني وجود فرق معنوي ضمن مستوى أحتمالية P < 0.05.**

**** تعني وجود فرق معنوي ضمن مستوى أحتمالية P < 0.01 .**

أنخفضت أعداد خلايا بكتريا *Staphylococcus aureus* بتركيزي 0.75 و 1 ملغم /لتر خلال 24 ساعة بنسبة إزالة مقدارها 63.5% و74.6% على التوالي وبعد 48 ساعة خفضت الأعداد البكتيرية إلى 75.2% و 90.6% على التوالي، وخفضت البكتريـا بتراكيز 0.5 و 0.75 و 1 ملغم/ لتر بعد 72 ساعة إلـى 54.8% و 80.1% و 94.7% على التوالي (الشكل ،1).



شكل (1): نسبة الإزالة اليومية بمستخلص طحلب *Nostoc linkia* الكحولي بخفض بكتريا *Staphylococcus aureus*

كما تطابقت النتائج مع الدراسة التي أجراها (13) بالمزرعة السائلة لبكتريا *Staphylococcus aureus* بإزالة مقدارها 38.6% بعد 24 ساعة من بدء التجربة بتركيز 0.5 ملغم/ لتر بمستخلص كحولي لطحلب أخضر مزرق *Lyngbya majuscula* و*Spirulina platensis* لاحتواء الأخير على 62% حامض Oleic و 91% حامض Linoleic و 75% حامض Linolenic من وزنها الجاف، كما تؤكد الدراسات إن للمركبات الفعالة المتواجدة بمستخلص الطحالب الخضراء المزرقة تأثيراً تضاديا تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وضد فطر *Candida albicans* للدراسة التي أجراها (23)، كذلك يمتلك مستخلص طحلب *Nostoc linkia* المستخدم بالدراسة الحالية على مركب فعالة 2,4-dichlorophyenoxyacetic acid والذي يعمل مع أنزيم النتروجنيز المتواجد في الحويصلة المغايرة للطحلب في أذابة الجدار الخارجي للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، ويمتلك الحامض 2,4-dichlorophyenoxyacetic على سلسلة طويلة من الكاربون مما مكنه من السيطرة على تثبيط خلايا البكتريا، كذلك له القدرة على السيطرة في نمو الطحالب بحالة غياب النتروجين في المحيط البيئي (24).

تخفيض بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* :

يوضح (الجدول ،2) خفض أعداد بكتريـا *Pseudomonas aeruginosa* بمـستخاص طحاب *Nostoc linkia* الكحولي بتراكيزه 0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم/ لتر.

جدول (2): خفض اعـداد بكتريـا *Pseudomonas aeruginosa* بتراكيـز مختلفـة لمستخاص طحاب *Nostoc linkia* الكحولي(Mean± S.D).

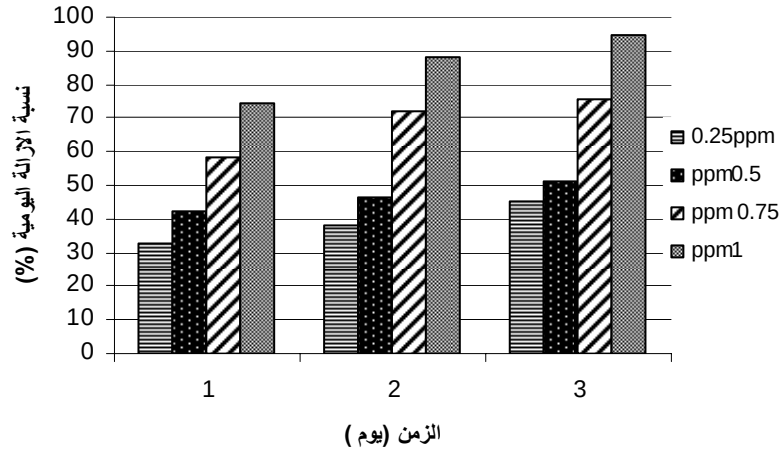
تراكيز (ملغم/ لتر)	عدد البكتيريا قبل المعاملة (CFU/ مل)	عدد البكتيريا بعد المعاملة (CFU/ مل)		
		24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
Control	97.98±320	97.98±1396	97.98±2439	97.98±4505
0.25	97.98±466	15.18±314	16.44±289	18.03±255
0.50	97.98±393	20.82±226	22.55±211	50.32±192
0.75	97.98±378	*20.21±158	**20.82±106	**10.00±93
1	97.98±396	**15.28±100	**30.55±46	**7.63±21

*** تعني وجود فرق معنوي ضمن مستوى أحتمالية P < 0.05.**

**** تعني وجود فرق معنوي ضمن مستوى أحتمالية P < 0.01 .**

أنخفضت أعداد خلايا بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وخلال 24 ساعة بتراكيز المستخاص الكحولي (0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم / لتـر) إلـى 314، 226، 158، 100 CFU/ مل على التوالي، مقارنة بعدد الخلايا البكتيرية قبل المعاملـة 320 CFU/ مل، وأستمر أنخفاض الخلايا البكتيرية إلى 289، 211، 106، 46 CFU/ مـل بعد 48 ساعة، وبعد 72 ساعة وصلت أعداد خلايا البكتريـا إلـى 255، 192، 93، 21 CFU/ مل، وتشير التحليلات الإحصائية بوجود فروقات معنوية للتركيـزين 0.75 و 1 ملغم/ لتر والسيطرة لأيام المعاملة 48 و 72 ساعة، وقد أنخفض العدد البكتيري لخلايـا *Pseudomonas aeruginosa* بعد 24 ساعة لتركيز0.75 و 1 ملغم/ لتر إلى 58.2% و 74.7% على التوالي وبنسبة 94.6 % لتركيز 1 ملغم/ لتر بعد 72 ساعة مـن بـدء التجربة، وبأقل نسبة إزالة في تركيز 0.25 ملغم/ لتر حيث وصلت الإزالة إلـى 32.6 و

37.9 و 45.2% بعد 24 و 48 و 72 ساعة من المعاملة مع وجود فروقات معنوية بين تركيز 0.75 و 1 ملغم /لتر في معاملة 48 و 72 ساعة و (الشكل، 2).



شكل (2): نسبةالازالة اليومية لمستخلص طحلب *Nostoc linkia* بخفضها لاعداد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

يمتلك مستخلص الطحالب الكحولي بشكل عام مركبات فعالة كثيرة، منها الأحماض الدهنية ذات تأثير في خفض الأعداد البكتيرية ونمو الأحياء المجهرية، من خلال تغيير نفاذية جدار الخلية الناتج من تفاعل الأحماض الدهنية للمستخلص الكحولي مع بروتينات جدار الخلية البكتيرية مسببة تشوهاً في تركيبة وفعالية (17)، كما تم إزالة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بالدراسة التي أجراها (6) بمستخلص طحلب *Sargassum vulgare* بعد 48 ساعة بنسبة إزالة 66.5% لاحتواء المستخلص على الأحماض الدهنية مسبب تثبيط لعملية اخذ الأوكسجين وبالتالي تقليل أنتاج مركبات الطاقة ATP ومن ثم موت الخلية، فضلا عن تثبيط تصنيع البروتين والأحماض النووية التي تحتاجها الخلية بصورة أساسية أو تثبيط تصنيع الغشاء البلازمي.

تخفيض بكتريا *Escherichia coli*:

أستخدم مستخلص طحلب *Nostoc linkia* بتراكيز مختلفة 0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم/ لتر في خفض البكتريا أعلاه بمياه الصرف الصحي خلال ثلاثة أيام من المعاملة، وتبين أن تركيز 1 ملغم/ لتر كان أكثر التراكيز تأثيراً على أعداد خلايا البكتريا حيث أنخفضت من 463 CFU/ مل الى114، 46، 5 CFU/ مل بعد24، 48، 72 ساعة على التوالي من المعاملة، يلي ذلك التركيز 0.75 ملغم/ لتر أنخفضت الخلايا البكتيرية من 388 CFU/ مل إلى 150، 113، 80 CFU/ مل بعد 24، 48، 72 ساعة على التوالي، أما تركيز 0.5 ملغم/ لتر سجل أنخفاض في عدد الخلايا من 406 CFU/ مل إلى 218، 194، 178 CFU/ مل بعد 24، 48، 72 ساعة على التوالي، وتركيز 0.25 ملغم/ لتر كان أقل التراكيز تأثيراً من 453 CFU/ مل الى 300، 225، 215 CFU/ مل بعد 24، 48، 72 ساعة على التوالي، (الجدول، 3).

جدول (3): تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص طحلب *Nostoc linkia* على بكتريا *Escherichia coli* (Mean ±S.D) .

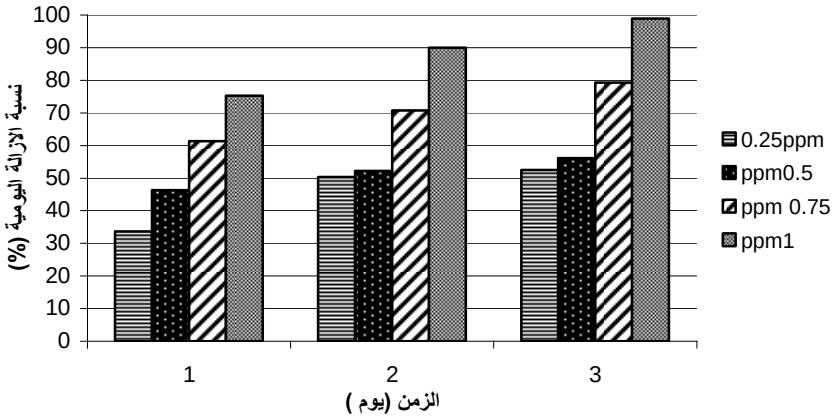
تراكيز (ملغم/ لتر)	عدد البكتيريا قبل المعاملة (CFU/ مل)	عدد البكتيريا بعد المعاملة (CFU/ مل)		
		24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
Control	108.78± 325	108.78± 1573	108.78± 2815	108.78± 4126
0.25	108.78± 453	19.50± 300	21.46± 225	7.51± 215
0.50	108.78± 406	41.63± 218	46.51± 194	55.07± 178
0.75	108.78± 388	*40.01± 150	**50.33± 113	**25.66± 80
1	108.78± 463	**25.17± 114	**25.17± 46	**10.01± 5

*** تعني وجود فرق معنوي ضمن مستوى أحتمالية P < 0.05.**

**** تعني وجود فرق معنوي ضمن مستوى أحتمالية P < 0.01 .**

بلغت أعلى نسبة إزالة يومية لتركيز 1 ملغم/ لتر، 75.3% بعد 24 ساعة من المعاملة، كما أنخفضت أعداد بكتريا *Escherichia coli* بتراكيز المستخلص الكحولي 0.75 و 1 ملغم/ لتر بنسبة إزالة بلغت 70.8% و 90% على التوالي بعد 48 من بدء التجربة للمياه الملوثة، كذلك خفضت أعداد خلايا البكتريا إلى 98.9% بعد 72 ساعة

لتركيز 1 ملغم/ لتر كأعلى نسبة إزالة وبأقل نسبة إزالة سجلها التركيز 0.25 ملغم/ لتـر لأيام المعاملة بلغت 33.73 و 50.3 و 52.5% بعد 24 و 48 و 72 ساعة على التوالي وتشير التحليلات الإحصائية بعدم وجود فروق معنوية للتركيزين 0.25 و0.5 ملغم/ لتـر في أعداد البكتريا قبل المعاملة وبعد المعاملة، أما التركيزين الآخرين 0.75 و 1 ملغـم/ لتر وجود فروق معنوية بين أيام المعاملة والسيطرة لتركيز 0.75 و 1 ملغم/لتر (الشكل، 3).



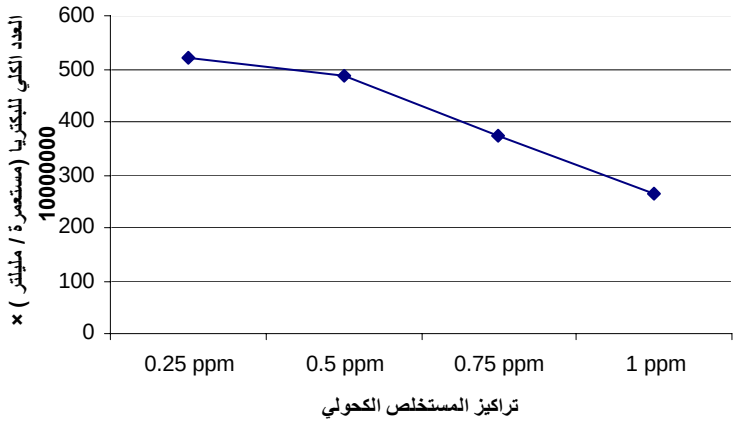
شكل (3): نسبة الإزالة اليومية لمستخلص طحاب *Nostoc linkia* الكحـولي بخفـض اعداد خلايا بكتيريا *Escherichia coli*

يعزى التأثير التثبيطي لإعداد البكتريا للأحماض الدهنية المتواجدة في مستخلص الطحاب الذي يسبب أمتزاز على سطح الخلية البكتيرية وتغيرات في جدار الخلية البكتيرية مما يؤدي إلى تحلل نهائي للخلية البكتيرية كما سجلها (16)، كذلك تطابقت دراستنا مع بتركيز *Oscillatoria* sp 1 براشح طحاب *Bacillus subtilis*(4) في خفض بكتريا ملغم/ مللتر بقطر تثبيط مقدارة 12 ملم وبنسبة إزالة 85% بعد 24 ساعة من بدء التجربة، كما أكد (2) أن للمستخلص الكحولي فعالية تثبيطية في كل من البكتريا *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* . بنسبة إزالة 60 و 75 *Escherichia coli*واتفقت النتائج مع دراسة (20) بخفض بكتريا لعينة مياه *Aphanocapsa* sp و95% خلال 24 و 48 و 72 ساعة بمستخلص طحاب

موادأ خارج خلوية تتضمن *Fischerella ambigna* الصرف الصحي، كما ينتج طحاب البروتينات والدهون والأحماض العضوية والأحماض الدهنية التي تؤثر على البكتريا *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhi*.**(8)**

أنخفاض العدد الكلي للبكتريا:

أنخفض العدد الكلي للبكتريا من مياه الصرف الصحي الغير معقمة بمستخلص طحاب *Nostoc linkia* بتراكيز0.25 و0.5 و 0.75 و1 ملغم/ لتر إذ وصل عدد الخلايا البكتيرية إلى 520 و485 و374 و263 ×10^7 مستعمرة/ مل على التوالي بعد 24 ساعة من المعالجة مقارنةً بمعاملة قبل المعالجة الذي وصلت عدد البكتريا بعد 24 ساعة إلى 2874 ×10^7 مستعمرة/ مل (الشكل، 4).



شكل (4): خفض المستخلص الكحولي لطحاب *Nostoc linkia* للعدد الكلي للبكتريا لعينة مياه الصرف الصحي الغير معقمة بعد 24 ساعة.

خفض مستخلص طحاب *Nostoc linkia* البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام للعدد الكلي للبكتريا بعد 24 ساعة من التجربة بتركيز 1 ملغم/ لتر 90.8% كنسبة إزالة يومية، وهذا ما أكده (22) الذي وجد أن معالجة بركة للسباحة ملوثة بكتيريا بكثافة مقدارها 10^8 CFU/ مل بمادة Chlorine المستخلصة من طحلب *Chlorella*

pyrenoidosa بتركيز 0.5 ملغم/ لتر مع تركيز 0.4 ملغم/ لتر من مادة NH_4-N_2 بزمن يتراوح بين 40- 55 دقيقة، كما أكدت ذالك دراسة (12) بخفض العدد الكلي للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام بمستخلص كحولي للطحالب البحرية.

المصادر

1. الحسيني، أحمد عيدان؛ مهدي، زينة محمد؛ علي، أنعام نوري وعبد السادة، عذراء. (2011). معالجة مياه الصرف الصناعي من التلوث البكتيري بأستخدام مستخلص الطحالب الكحولي. مجلة جامعة أسيوط للبحوث البيئية. مجلد 14 . العدد الأول.

2. الزبيدي، لبيب أحمد كاظم. (2005). الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات القرفة (الدارسين) ضد بعض الأحياء الدقيقة لاستخدامها في حفظ اللحم المفروم. رسالة ماجستير. معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا. جامعة بغداد.

3. العقيلي، صالح رشيد والشايب، محمد سامر. (1998). أستخدام البرنامج الإحصائي spps. مطبوعات جامعة بغداد. دار الشرق للطباعة. 358.

4. صادق، أيمان محمد. (2009). تقييم فعالية منتجات بعض الطحالب الخارج خلوية Extracellular Products ضد الأحياء المجهرية الممرضة. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات- قسم علوم الحياة – بيئة. جامعة بغداد.

5. الحديثي، هديل توفيق. (1983). أساسيات علم البكتريا، كلية العلوم – جامعة البصرة، مطبعة جامعة البصرة. 53.

6. Abd El Mageid, M. M.; Salama, N. A.; Saleh M. A. M. and Abo Taleb, H. M. (2009). Antioxidant and Antimicrobial Characteristics of red and Brown Algae extracts. Conference on Recent Technologies in Agriculture.

7. APHA. (2005). Standard method for the examination of water and wastewater, 21th ed., American public Health Association, American water works Association and water pollution control federal, Washington, D.C.

8. Asthana, R. K.; Srivastava, A.; Singh, A. P.; Deepali, S. P.; Nath, G.; Srivastava, R. and Srivastava, B. S. (2006). Idintification of an antimicrobial entity from the cyanobactrium *Fischerella* sp. Isplated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. J. Appl. Phyco. 18: 33-39.

9. Cervenka, L.; Peskova, I.; Foltynova, E.; Pejchalova, M.; Brozkova, I. and Vytrasova, J. (2006). Inhibitory effect of some spices and herbs extracts against *Aerobacter butzleri, A. cryaerophilus and A. akirrowii*. Current Microbial. 53: 435-439.

10. Dahiru, D. and Obidoa, O. (2007). Pretreatment of albino rats with aqueous leaf extract of *Ziziphus mouritiana* protect against alcohol-induced liver damage. Nigeria. Journal of Pharmaceutical research. 6(2): 705-710.

11. Eppley, R. W. (1977). The Growth and Culture of Diatoms. In:The Biology of Diatoms (ed., By: Werner, D.). Botanical Monographs .Univ. Calif. Press, Berkeley. 25-65.

12. Abd-Elnaby, H. (2010). Bacteria-Algae lnteraction in Abu-Qir marine Ecosystem and Some Applied Aspects of Algae Extracts. Journal of Applied Sciences Research. 6(4): 345-357.

13. Kachroo, D.; Shaneen, M. and Singh, J. (2006). Modulation of unsaturated fatty acids content in algae *Spirulina platensis* and *Chlorella minutissima* in response to herbicide SAN 9785. Electronic Journal of Biotechnology. Vol.9: No.4.

14. Katircioglu, H.; Beyatli, Y.; Aslim, B.; Yüksekdag, Z. and Atici, T. (2006). Screening for Antimicrobial Agent Production of Some Microalgae in Freshwater. The Internet Journal of Microbiology. Vol. 2: No. 2.

15. Kim**,** P.; Dong, J. and Lee, C. G. (2006). Influence of extracellular products from H.P. on growth and bacteriocin production by three species of Lactobacillus. Microbial. Biotechnol. 16(6): 849-854.

16. Martins, R. F.; Ramos, M. F.; Herfindal, L.; Sousa, J. A.; Skarven, K. and Vasconcelos, V. M. (2008). Antimicrobial and Cytotoxic Assessment of Marine Cyanobacteria-Synechocystis and Synechococcus. Mar. Drugs. 6(1): 1-11.

17. Mundt**,** S.; Kreitlow, S. and Jansen, R. (2003). Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. J. Appl. Phycol. 15: 263-267.

18. Motamedi, H.; Safary, A.; Maleki, S. and Seyyednejad, S. M. (2009). *Ziziphus spina*-christi, a native plant from Khuzestan, Iran, as a potential source for discovery new antimicrobial agents. Asian J. Plant Sci. 8: 187-190.

19. Naviner, M.; Berge, J. B.; Durand, P. and Le Bris, H. (1999). Antibacteril activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aqua cultural Pathogens. Aqua culture. 174 : 15-24.

20. Patra, J. K.; Rath, S. K.; Jena, K.; Rathod V. K. and Thatoi, H. (2008). Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activity of

Seaweed (Sargassum sp.) Extract: A Study on Inhibition of Glutathione-S-Transferase Activity. Turk. J. Biol. 32: 119-125.

21. Prescott, L. M.; Harly, J. P. and Klien, D. A. (2002). Microbiological. 5th ed., London. MC Graw Hill companies.

22. Safonova, E. and Reisser, W. (2005). Growth promoting and inhibiting effects of extracellular substances of soil microalgae and cyanobacteria on *Escherichia coli* and *Micrococcus leuteus*. Phycol. Res. 53: 189-193 .

23. Shyam, R.; Thajuddin, N. and Venkateswari3, C. (2010). Antibacterial activity of cyanolichen and symbiotic cyanobacteria against some selected microorganisms. African Journal of Microbiology Research. 4(13): 1408-1411.

24. Tiwari, D. N.; Pandey, A. K. and Mishra, A. K. (2007). Action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and rifampicin on heterocyst differentiation in the blue-green algae, *Nostoc linckia*. J. Bio. sci. 3(1): 33-39.