لمجلة العراقية للأستزراع المائي المجلد (8) العدد (1) – 2011 : 53 – 80

عزل وتشخيص مركب قلويدي Calothrixin-A من الطحلب الاخضر *Cladophora crispata* (Roth.) Kützing

احمد محسن عذبي[1] و اقبال جاسم الاسدي[2] و اريج فرج الناصر[1]

[1] جامعة البصرة / كلية التربية / قسم علوم الحياة
[2]جامعة البصرة / كلية العلوم / قسم الكيمياء

الخلاصة

تضمنت الدراسة استخلاص وتشخيص مركب قلويدي شبيه Calothrixin-A لأول مرة من الطحلب الاخضر *Cladophora crispata* الذي عزل من نهر كرمة علي في البصرة. العراق حيث تم تنقية العزلة الطحلبية واكثارا في الوسط الزرعي (Chu -10). سجل ثابت النمو أعلى قيمة له (K= 1.3) وأقل زمن لتكاثر الجيل (G=0.23). عزل المركب القلويدي على هيأة مادة لزجة نقية وشخص اعتماداً على الصفات الكيميائية والفيزيائية له وذلك باستخدام عدد من التقنيات تمثلت بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكروماتوغرافيا العمود ودرست الاطياف لهذا المركب متضمنة طيف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية وطيف الاشعة حت الحمراء، كما تم تحديد درجة الانصهار له واختبرت ذائبيته في المذيبات العضوية واللاعضوية. حدت الفعالية الحيوية للمركب القلويدي المعزول بتقدير التركيز المثبط الادنى تجاه عزلتين جرثوميتين مرجعيتين تمثلت ببكتريا موجبة *Staphylococcus aureus* (ATCC25922) والسالبة *scherichia coli* (ATCC25923)، اذ سجلت هذه العزلات ادنى ركيز مثبط بلغ (5.5) مايكروغرام / سم^3 للجراثيم الموجبة و(6) مايكروغرام / سم^3 لجراثيم السالبة كما اختبرت السمية الخلوية للمركب القلويدي المنتج تجاه كريات الدم الحمر للانسان ولم يظهر المركب القلويدي أي تأثير يذكر كطوال مدة المراقبة.

المقدمة

ثبت استعمال الطحالب في التطبيقات الطبية منذ العصور القديمة ويعد أول تسجيل لاستخدامها في هذا المجال في الصين منذ حوالي 2700 سنة قبل الميلاد (Hoppe, 1979).إذ تم استعمالها كعلاج لأمراض سوء التغذية كونها غنية بالبروتينات والفيتامينات والعناصر المعدنية، كما استخدمت الطحالب في مجال الطب والصيدلة كونها تعتبر مصدراً مهماً للمركبات

الكيميائية الفعالة وخاصة المركبات القلويدية التي تعتبر نواتج ثانوية لعملية البناء الحيوي للبروتينات وتتميز بكفاءتها العلاجية لامتلاكها قدرة تثبيطية عالية تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام كما إنها تعمل على تثبيط الخلايا السرطانية (Marr *et al.*, 1999; Pezzuto *et al.*, 1991).

عُرفت الطحالب الخضر المزرقة (السيانوبكتريا) بقابليتها على تحوير وتخليق هذه المركبات ضمن ايوضها الثانوية. فقد تم عزل المركب القلويدي Lyngbyatoxin-A من الطحلب *Langbya majuscule* والذي يستعمل على نطاق طبي واسع لعلاج الأمراض الجلدية (Paul *et al.*, 2005). كما تم عزل المركب القلويدي Calothrixin-A من الطحلب *Calothrix* الذي يعمل مضاداً لنشاط الأورام السرطانية (Chen *et al.*, 2003)، وتمكنت الموسوي (2007) من عزل المركب القلويدي شبيه N-methyle cystine من الطحلب *Hapalosiphon aureus*. كما تم عزل المركبين Lophocladin- A و Lophocladin-B من الطحلب الأحمر *Lophocladia* sp. واللذين أظهرا نشاطاً مضاداً للأورام السرطانية Harold *et al.* (2009).

أما الطحالب الخضر فلا تقل أهمية عن مجاميع الطحالب الاخرى في امتلاكها للمركبات القلويدية فقد احتوت على Prounueiferine و Glaucine و Nuciferine و Anuomrthine و Evodianin و Yeserpin والتي تعمل كمضادات للالتهابات (Radwan *et al.*,2007; Calixto *et al.*,2005). وامتلك طحلب *Cladophora glomerata* على عدد من المركبات القلويدية ومنها مركب Decahydroquinolin الذي يستخدم كعلاج في تنظيم ضربات القلب (Bagwell *et al.*, 1973)، كما تم عزل المركب القلويدي Leptoclinidamin-A

من الطحلب *Cladophora fracta* الذي ثبت أنه مضاداً للبكتريا والفطريات (Carrol *et al.*, 2007).

ونظرا لاهمية الطحالب في الجانب الطبي والصيدلاني هدفت الدراسة الحالية إلى استخلاص مركب قلويدي من الطحلب الاخضر *Cladophora crispata* ذو الاهمية الطبية.

مواد وطرق العمل

جمعت عينات المياه من نهر كرمة علي في مدينة البصرة / العراق، استعملت قناني بلاستيكية نظيفة محكمة الغلق سعة (500) سم^3 أعدت لهذا الغرض وجلبت بعد ذلك الى المختبر مباشرة لغرض التحري عن النوع الطحلبي المراد عزله وتشخيصه وهو الطحلب الاخضر *Cladophora crispata*.

عزل الطحلب وتشخيصه

اعتمدت طريقة التخطيط Streaking method للوسط الزرعي الصلب، وطريقة التخفيف Dilution method والموضحتان من قبل Stien (1973) بعدها صنف الطحلب اعتماداً على المصادر التصنيفية التالية: (Prescott, 1975; Bourrely, 1980).

Division : Chlorophyta
Class : Chlorophyceae
Order : Cladophorales
Family : Cladophoraceae
Genus : Cladophora
Species : *Cladophora crispata* (Roth.) Kützing

أستزراع الطحلب

بعد عملية التشخيص للطحلب تم نقله الى الوسط السائل بواسطة ماصة معقمة أو من الوسط الصلب بواسطة اللاقح (Loop) المعقم أو من كلا الوسطين الى عدد من الدوارق الزجاجية المعقمة حجم (100) سم^3 يحتوي كل دورق على (70) سم^3 من الوسط الزرعي المعقم (Chu-10) (Chu, 1942)، واستمرت عملية الزرع لحين الحصول على نمو جديد.

تنقية العزلة

تم تنقية الطحلب المعزول من الجراثيم اعتماداً على الطريقة الموصوفة من قبل (Weidman *et al*., 1984) وعليه تم الحصول على عزلة نقية Axenic culture.

تقدير معدل النمو

أتبعت الطرق القياسية الموضحة في (Stein , 1973) لتقدير النمو حيث قيست كثافة الخلايا من خلال الكثافة الضوئية (Optica density) باستعمال جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) نوع (Uviko810) عند طول موجي 650 نانومتر .وعبر عن

معدل النمو (Growth rate) بثابت النمو (K) والذي قدر حسب معادلة (Fogg, 1975) التالية:

$$K = \frac{\text{Log } N_t - \text{Log } N_o}{T}$$

إذ ان K = معدل النمو (ثابت النمو)، N_t = المحصول بعد (t) يوم، N_o = المادة الطحلبية عند بداية التجربة، t = الوقت (بالايام) .

أما بالنسبة لوقت التضاعف Generation time (G) فقد حسب وفق المعادلة التالية :-

$$G = \frac{0.301}{K}$$

إكثار العزلة وحصادها

استعملت دوارق زجاجية جافة ونظيفة سعة (2) لتر، أضيف لكل دورق (1.4) لتر من الوسط الزرعي المعقم ولقح كل دورق بـ (140) سم^3 من المزرعة وفي الطور اللوغاريتمي

للحصول على كميات كافية من الكتلة الحية biomass بعدها حصد الطحلب وجفد بجهاز التجفيد وحفظت في الثلاجة لحين إجراء الإختبارات.

تحضير المستخلص القلويدي للطحلب

تم تحضير المستخلص القلويدي حسب طريقة السامرائي (1983).

الغربلة الأولية للمستخلص القلويدي حول اختبار فعاليته الحيوية

أتبعت طريقة الانتشار على السطح الصلب Plate Agar Dick Diffusion Method (Spooner and Sykes, 1972) لغرض إجراء الغربلة الأولية.

تحديد عدد مكونات المستخلص القلويدي باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل(1984) Harborne في تحديد مكونات المستخلص القلويدي.

عزل مكونات المستخلص القلويدي باستعمال كروماتوغرافيا العمود

استخدمت طريقة (1984) Harborne في عزل مكونات المستخلص القلويدي.

اختبار الفعالية الحيوية للمركب القلويدي المعزول بتقنية كروماتوغرافيا العمود

تم اختبار الفعالية الحيوية للمركب القلويدي كما ذكر في الغربلة الأولية.

التشخيص الكيميائي للمركب القلويدي المستخلص من الطحلب

التشخيص بمطياف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية

أذيب القلويد المستخلص في الايثانول وسجل طيف الأشعة فوق البنفسجية باستعمال UV-Visible spectrophotometer نوع (Pye-unicam sp.8-100) لمدى من الأطوال تتراوح من (200 – 400) نانومتر للاشعة فوق البنفسجية و(400–580) نانومتر للاشعة المرئية.

التشخيص بمطياف الأشعة تحت الحمراء

سجل طيف الأشعة تحت الحمراء IR للقلويد المستخلص وذلك بإستعمال جهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء IR-Spectrophotometer نوع FTIR-84005-Fourier Transform

في المنطقة المحصورة بين (500–4000) سم على هيئة أقراص NaCl.

كشف الحرق

وضع 0.005 غم من المركب المعزولة في ملعقة صغيرة وتم تعريض المادة إلى اللهب من وقت إلى آخر.

كشف الذائبية

تم الكشف عن الذائبية باستخدام أنواع مختلفة من المذيبات القطبية وغير القطبية (الماء والإيثانول والميثانول والداي مثيل سلفوكسيد DMSO وداي أثيل إيثر وخلات الأثيل والهكسان) إذ أخذ 0.005 غم من المكونة وأضيف إليها 1 مل من المذيبات السابقة.

كشف الرائحة

عرضت المكونة للشم المباشر من قبل مجموعة من الأشخاص و سجلت نتائج الإختبار

درجة الانصهار

قيست درجة الانصهار للمركب القلويدي المستخلص باستخدام جهاز المواد الصلبة والبلورات

Melting Point Apparatus نوع Gallen Kambi England.

كشف الصهر بالصوديوم

تم إجراء الكشف حسب طريقة (Fieser and Williamson, 1975).

كشف المجاميع الألديهايدية و الكيتونية

تم الكشف عنها بإستعمال كاشف 2,4 – dinitrophenyl hydrazine reagent حيث حضر هذا الكاشف بإذابة 3 غم من المادة أعلاه مع 15 مل من حامض الكبريتيك المركز ثم أضيف مع التحريك المستمر 20 مل من الماء المقطر و70 مل من الإيثانول المطلق وبعد مزج المحلول جيداً رشح وأضيف 3 مل من محلول الكاشف إلى 2 مل من المادة المعزولة وأن تكوّن راسباً برتقالياً أي وجود مجاميع الألديهايد والكيتون (Shriner, 1980).

كشف الحامض الكربوكسيلي

استخدمت بيكاربونات الصوديوم$NaHCO_3$ 10% ويدل ظهور الفقاعات مع ازيز وفوران على وجود مجاميع الكاربوكسيل (Shriner, 1980).

الاختبارات الحياتية

تحديد التركيز المثبط الأدنى للمركب القلويدي

استعمل في هذه الدراسة نوعان من الجراثيم:

1. *Escherichia coli* (ATCC25923):
2. *Staphylococcus aureus* (ATCC25922)

كانت الأوساط الزرعية المستعملة:

1. وسط الاكار المغذي(Nutrient Agar(NA
2. وسط المرق المغذي (Nutrient Broth(NB
3. وسط مولر –هنتون(Mueller Hinton Agar(MHA

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى للمركب القلويدي المستخلص حسب الطريقة الموصوفة من قبل Sydney and Ellen (1986) والتي حضرت عدد من التراكيز من خلال اخذ الأوزان التالية من المركب القلويدي (5، 5.5، 6، 6.5، 7، 7.5، 8، 8.5، 9، 9.5، 10، 10.5، 11، 11.5، 12) مايكروغرام حيث أذيب كل وزن بحجم قدره 100 مل محلول داي مثيل سلفوكيد ثم لقحت أطباق بتري حاوية على وسط (MHA) بطريقة النشر لـ 0.1 مل من المرق المغذي (NB) المزروع بجرثومة *Staph. aureus* وجرثومة *E. coli* بعمر 6 ساعات تقريباً (عدد الخلايا 10^6 خلية / مل)، ثم تركت الأطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق، وزعت الأقراص المحملة بالتراكيز السابقة باستعمال ملقط معقم ويتم مراعاة ترك مسافة بين قرص وآخر وتركت الأطباق لمدة 15 دقيقة لتأخذ الأقراص استقرارها ثم نقلت إلى الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24ساعة، بعدها تم تحديد أقل تركيز مثبط.

السمية الخلوية Cytotoxicity

تم تحديد السمية الخلوية للمركب القلويدي المستخلص من الطحلب حسب طريقة Xian-gno and Ursella (1994).

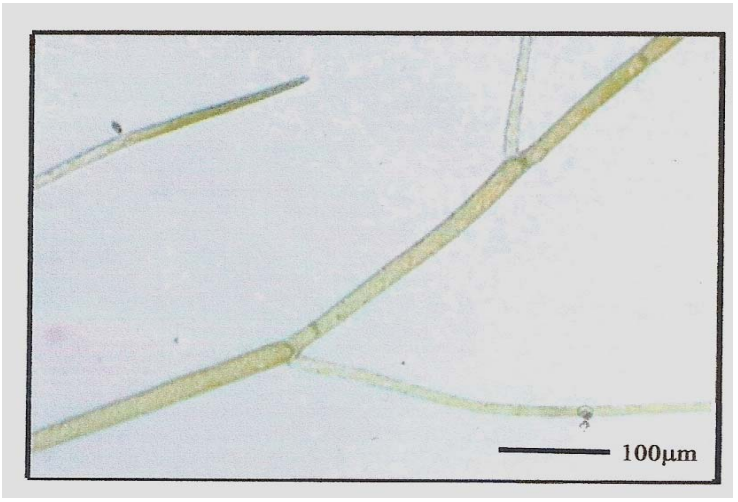
معدل النمو:

تم قياس معدل النمو للطحلب حيث بدأ بالطور الأسي في اليوم الثامن من زراعته وحصلت زيادة مطردة في عدد خلاياه، والذي استمر إلى اليوم الثلاثين، ثم بدأ طور الاستقرار الذي
استمر الى اليوم الثاني والأربعين وبعدها بدأ طور التناقص في اليوم الثالث والأربعين ولذلك حصد هذا الطحلب في اليوم السابع والثلاثين في منتصف طور الاستقرار ولقد أظهر الطحلب ثابتاً للنمو مقداره (K=1.3) بينما قيمة زمن تكاثر الجيل هو (G=0.23) كما في الشكل 2 والجدول 1.

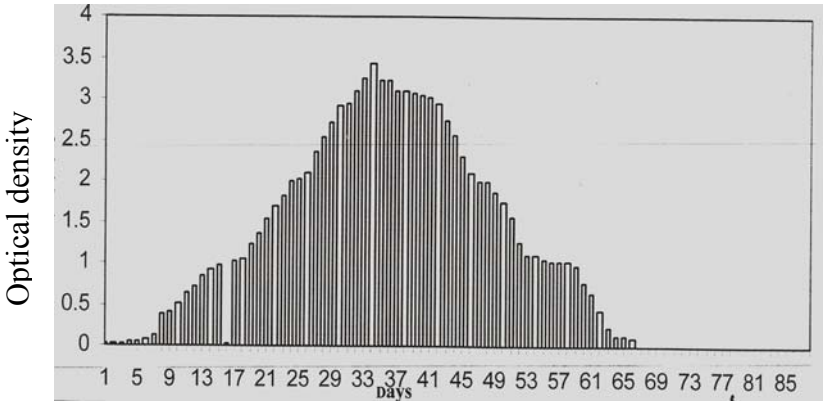
النتائـج والمناقشة

وصف الطحلب

هو احد الطحالب الخضر الخيطية المتعددة الخلايا والمتفرعة تفرعاً حقيقياً ومتعاقباً، يتواجد في المياه العذبة والضحلة ملتصقاً أو حراً طافياً، خلاياه اسطوانية الشكل، والمحور الرئيسي ذو قطر يتراوح بين (40 – 75) مايكروميتر، أما الأفرع الجانبية فهي أصغر حجماً من المحور الرئيسي ذات قطر يتراوح بين (20 – 35) مايكرميتر، جدار الخلية يكون سميكاً مكون من عدة طبقات سليلوزية متكونة من لويفات مرتبة بشكل مغزلي والبلاستيدة الخضراء شبكية متعددة البايرونويد كما في (الشكل 1).



(شكل 1) الطحلب *Cladophora crispata*



(شكل 2) منحني نمو الطحلب *Cladophora crispata*

(جدول 1) يبين قيمة ثابت النمو (K)، وزمن تكاثر الجيل (G)، والفترة الزمنية للنمو والحصاد لطحلب *Cladophora crispata*

العزلات الطحلبية	فترة الطور التمهيدي	فترة الطور الأسي	فترة طور المستقر	فترة الحصاد	ثابت النمو (K)	زمن تكاثر الجيل (G)
Cladophora crispata	0 – 8	8 – 30	30 – 42	36 – 37	1.3	0.23

نتائج الكشوفات النوعية للمستخلص القلويدي

أظهرت نتائج الكشوفات النوعية للمستخلص القلويدي بانه يحتوي على مركبات قلويدية أظهرتها الكواشف المستخدمة فقد ظهر الراسب البرتقالي اللون في حالة اضافة كاشف دراكندروف وراسب ضبابي عند اضافة كاشفي واكنر ومايردلالة على وجود المركبات القلويدية داخل المستخلص واتفقت هذه النتيجة مع دراسة Radwan *et al.* (2007) من احتواء طحلب *C. prolifera* على مركبات قلويدية بتراكيز عالية، واتفقت أيضاً مع (الموسوي، 2007) في دراسة حول المركبات القلويدية المستخلصة من طحلب *Hapalosiphon aureus*.

(الجدول 2) الكشوفات النوعية للمستخلص القلويدي

المستخلص الكاشف	المستخلص القلويدي	الكشف الموجب يدل على
دراكندروف ماير واكنر	++ ++ ++	وجود القلويدات
كلوريد ألزئبقيك المائي تركيز 5 %	-	وجود الصابونينات
$FeCl_3$ 1 % + بخار الامونيا	-	وجود الفينولات
هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي5%	-	وجود الفلافونيدات
خلات الرصاص 1 %	-	وجود التانينات
هيدروكسيد الصوديوم 5 %	-	وجود الكيومارينات
حامض الكبريتيك المركز + كلوروفورم	-	وجود التربينويدات الثلاثية
بايوريت	-	وجود البروتينات
النهيدرين 1 %	-	وجود الببتيدات و مجاميع الأمين الحرة
ليبرمان بورخارد	-	وجود التربينات الثلاثية والسيترولات
موليش	-	وجود الكاربوهيدرات
بندكت بعد التحلل	-	وجود الكلايكوسيدات

الغربلة الأولية للمستخلص القلويدي واختبار فعاليته الحيوية

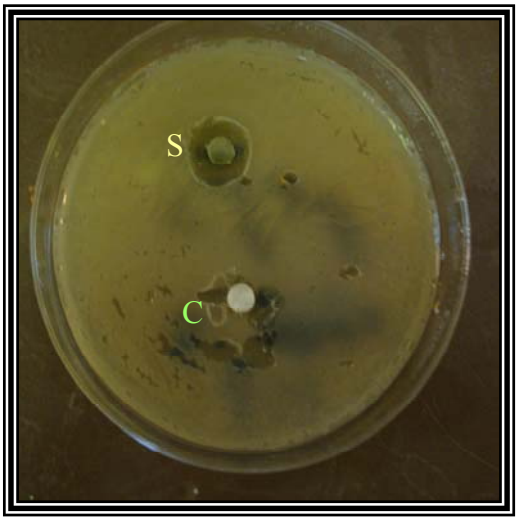
يتضح من (الجدول 3) و(الشكلين 3 و4) بأن المستخلص القلويدي امتلك قطر تثبيط قدره 15 ملم اتجاه البكتريا الموجبة و10 ملم اتجاه البكتريا السالبة اما المركب القلويدي المعزول فقد امتلك قطر تثبيط بكتيري قدره 17 ملم اتجاه البكتريا الموجبة و13 ملم تجاه البكتريا السالبة(الجدول 3) و(الشكلين 5 و6) ويعزى السبب في تغلب فعالية المستخلص القلويدي تجاه البكتريا الموجبة مقارنة بالسالبة إلى الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي لهما حيث يحتوي على نسبة قليلة من الدهون في حالة الموجبة مقارنة بالسالبة وبالتالي

تتمكن المركبات الموجودة في المستخلص القلويدي من اختراق جدارهـــا وتثبيط نموها أما السالبة لصبغة كرام فتحتوي على نسبة عالية من الدهون والتي تعمل على مقاومة مرور المركبات إلى داخل البكتريا (أبو الذهب، 1997) كما تغلبت فعالية المركب القلويدي تجاه البكتريا الموجبة، وربما يعود ما ذكر أعلاه الى طبيعة جدار الخلية البكتريية وتركيبه أو ربما امتلاك الخلية البكتيرية السالبة الى الكثير من الميكانيكيات لمقاومة دخول المركب القلويدي كإخراج المضادات خارج الخلية البكتيرية وفق آلية الضخ المعاكس أو عن طريق تغيير شكل الرايبوسومات بحيث تمنع من ارتباط المضاد مع الرايبوسوم (Criswell, 2004). وهذه النتيجة اتفقت مع ما توصل إليه الموسوي (2007) حول فعالية المركب القلويدي المستخلص من طحلب *Hapalosiphon aureus*، وأيضاً مع السعيد(2002) حول تأثير المواد القلويدية المستخلصة من نبات الشنان على الجراثيم الموجبة أكثر من السالبة. ويلاحظ من النتائج إن فعالية المستخلص القلويدي أقل فعالية مقارنة بالمركب القلويدي المعزول منه ويعزى السبب إلى الفعل التضادي لمجموعة المركبات الكيميائية المتواجدة في المستخلص والتي ربما نجدها من فعالية مجموعة دون أخرى (Hugo and Rusell,1987).

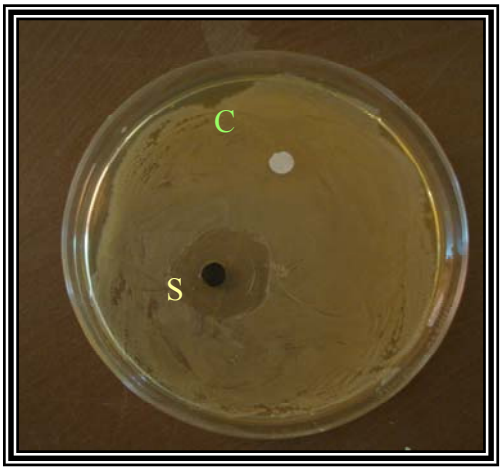
شكل (3) فعالية المستخلص القلويدي تجاه جرثومة *Staphylococcus aureus*

الجدول 3) أقطار تثبيط النمو مقدرة بالمليمتر للمستخلص والمركب القلويدي

المستخلصات / العزلات المرجعية	المستخلص القلويدي	المركب القلويدي
E. coli (ATCC25923)	10 ملم	13 ملم
Staph. aureus (ATCC25922)	15 ملم	17 ملم
Control (DMSO) **داي مثيل سلفوكساييد**	–	–



شكل (4) فعالية المستخلص القلويدي تجاه جرثومة *Escherichia coli*



شكل (5) فعالية المركب القلويدي تجاه جرثومة *Staphylococcus aureus*

شكل (6) فعالية المركب القلويدي تجاه جرثومة *Escherichia coli*

تحديد عدد مكونات المستخلص القلويدي باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

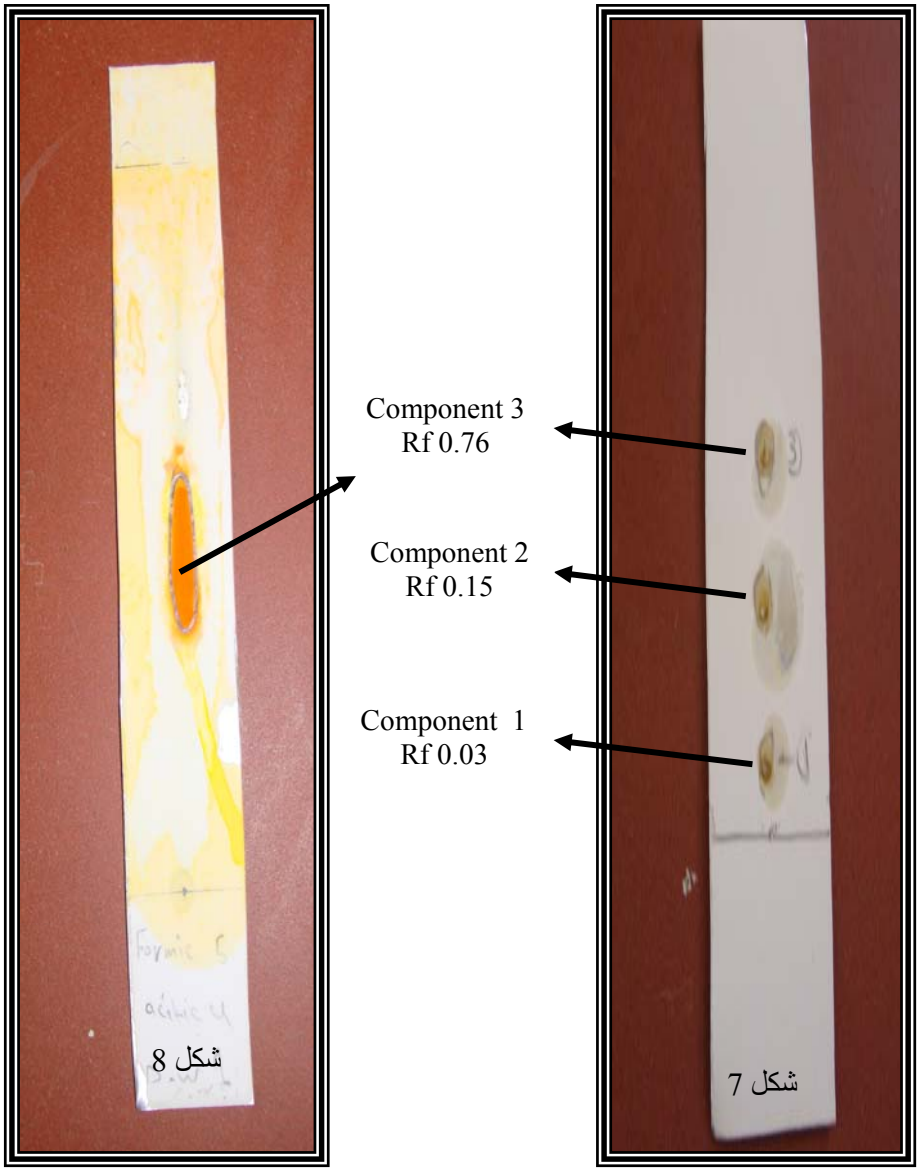
أظهرت نتائج كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمستخلص القلويدي وجود ثلاث مكونات برتقالية اللون (الشكل7) ذات قيم R_f 0.03 ، 0.15 ، 0.76 **تم** الكشف عنها بمصباح الأشعة فوق البنفسجية UV وكاشف ماير وكاشف دراكندروف وبخار اليود (الجدول 4).

عزل مكونات المستخلص باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود

تم جمع المكونة القلويدية من نهاية العمود الحاوي على مادة السليكا جيل واختبرت بتقنية TLC مرة اخرى حيث تم الحصول على بقعة واحدة (الشكل 8) ويعود السبب لاستخدام مادة السيليكا جيل لكونها سريعة في عملية الفصل وغالباً ما تستعمل للمواد قليلة الذوبان في الماء عادة كما هو الحال في طبيعة المركب الذي تم استخلاصه في الدراسة الحالية (Harborne, 1984).

(الجدول 4) نتائج كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمركب القلويدي المعزول من الطحلب الأخضر *Cladophora crispata*

الكاشف	المستخلص القلويدي	**قيم** RF	الملاحظات
دراكندروف	1 - spot	0.76	دلالة على وجود القلويدات
ماير	1 - spot	0.76	دلالة على وجود القلويدات
بخار اليود	1 - spot	0.76	دلالة على وجود مركبات عضوية غير مشبعة
UV– 254 nm	1 - spot	0.76	دلالة على وجود الآصرة المزدوجة



(الشكل 7) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمستخلص القلويدي

(الشكل 8) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمركب القلويدي المعزول بكروماتوكرافيا العمود

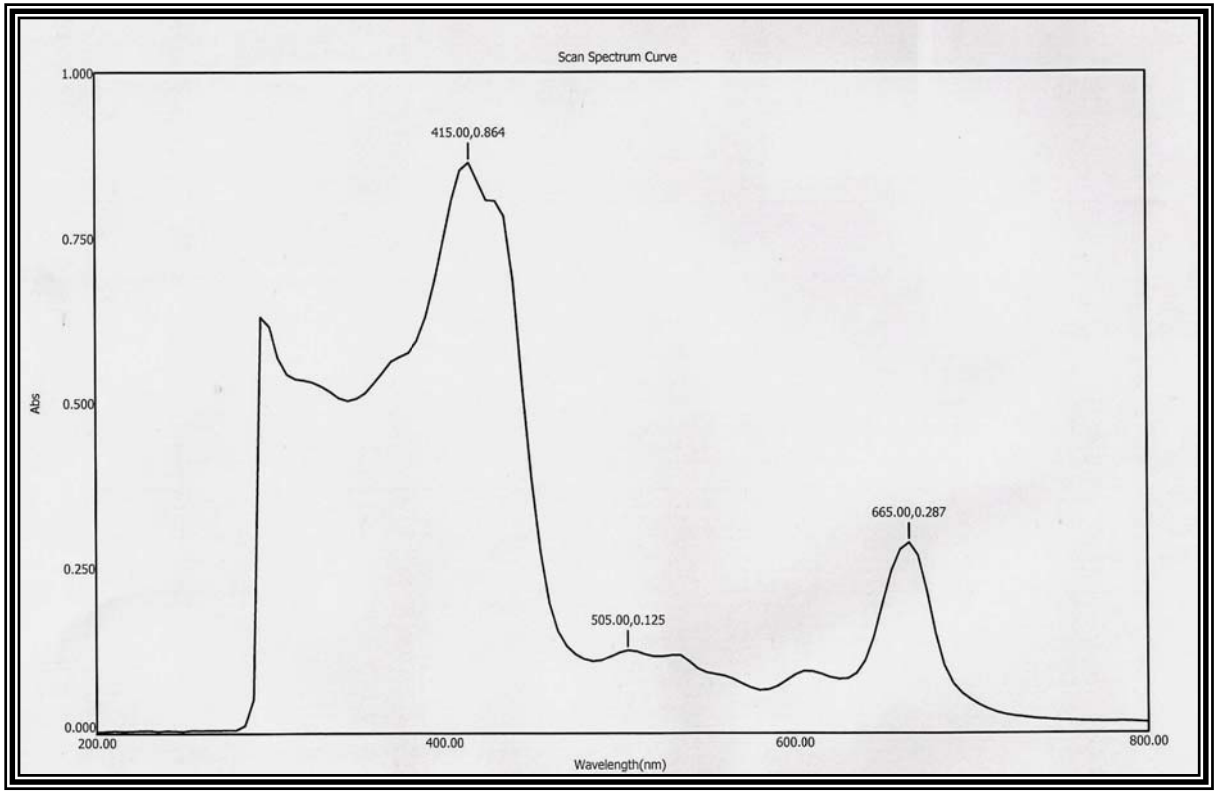
التشخيص الكيميائي والفيزيائي للمركب القلويدي

التشخيص بمطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية

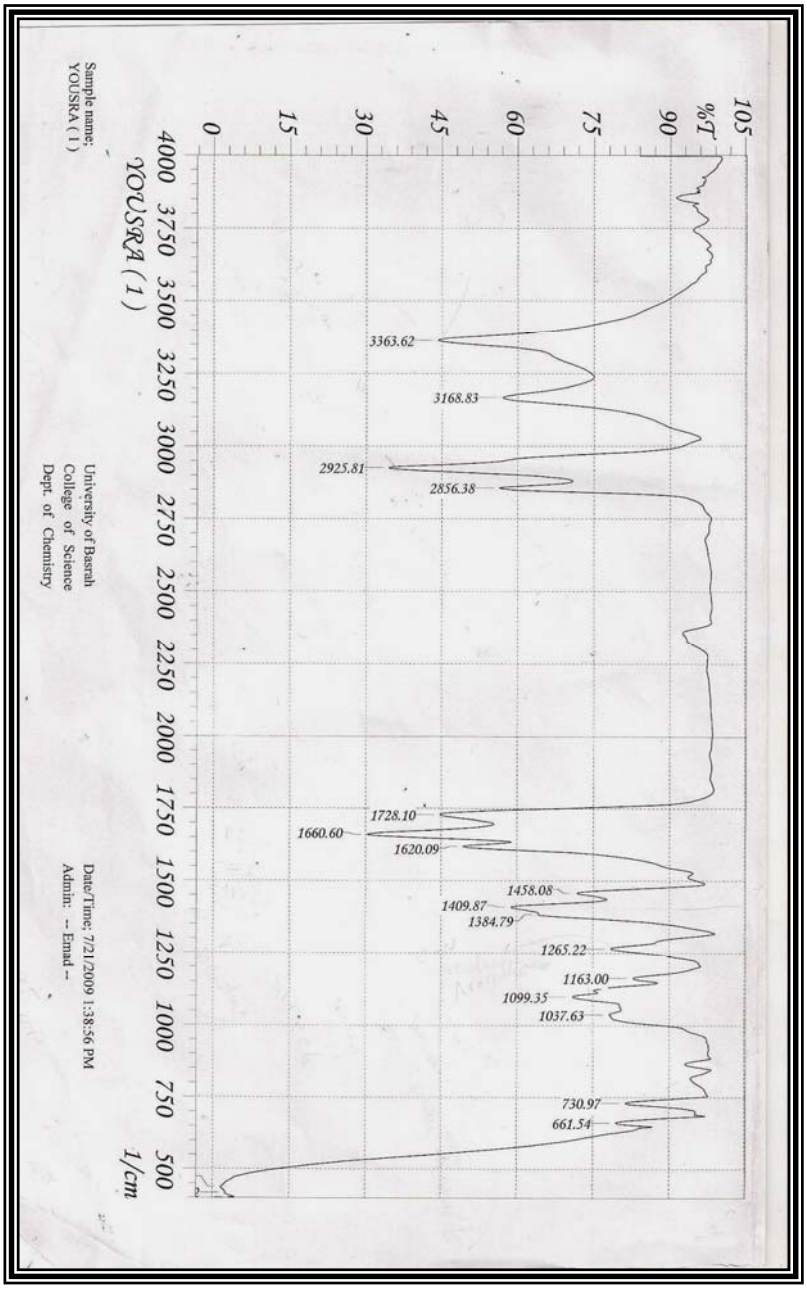
سجل طيف الأشعة فوق البنفسجية للمكونة القلويدية المعزولة لمدى من الأطوال الموجية (200–500) نانومتر (الشكل 9) ثلاث حزم امتصاص الأولى عند الطول ألموجي (298) نانومتر التي تعزى إلى الانتقال الالكتروني ($\pi^* - \pi$) المميزة للمركبات غير المشبعة المحتوية على أواصر مزدوجة (Silverstein *et al.*,1982)، والثانية عند الطول ألموجي **(**415) نانومتر عائدة الى الانتقال الالكتروني نوع ($n - \pi^*$) المميزة للمركبات المحتوية على مزدوجات الكترونية غير تآصرية.

التشخيص بمطيافية الأشعة تحت الحمراء

نلاحظ من طيف الأشعة تحت الحمراء للمكونة القلويدية في (الشكل 10) و(الجدول 5) أن المكونة القلويدية أعطت حزمة عند التردد (3363.62) سم$^{-1}$ والتي تدل على وجود مجموعة (N-H) العائدة إلى الأمين الثانوي، أما الحزمة (3168.83) سم$^{-1}$ تعود إلى (C-H) الأروماتية مما يثبت أن للمركب تركيباً اروماتياً، وحزمة عند التردد (2925.81) سم$^{-1}$ تعود إلى مجموعة (C-H) الأليفاتية وحزمة عند التردد (1728.10) سم$^{-1}$ عائدة إلى مجموعة الكاربونيل (C=O) والتي تكون حزمة مميزة للمجاميع الكاربونيلية وحزمة عند التردد (1660.60) سم$^{-1}$ عائدة لمجموعة **(** C - N) المميزة لمركبات الامايد وحزمة عند التردد (1458.08) سم$^{-1}$ عائدة لمجموعة (C=C) في نظام حلقة البنزين وحزمة عند التردد (730.97) سم$^{-1}$ عائدة لمجموعة (C-H) الأروماتية مما يثبت بشكل قاطع أن للمركب تركيباً أروماتياً وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه Chen *et al.*(2003) لمركب Calothrixin –A المعزول من طحلب *Calothrix*.



(الشكل -9-) طيف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب الأخضر *Cladophora crispata*



(الشكل 10) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي المعزول من للطحلب الأخضر *Cladophora crispata*

(الجدول 5) نتائج طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي المعزول من الطحلب الاخضر *Cladophora crispata*

BAND FREQUENCY CM^{-1}	BAND SHAPE	BAND	FUNCTIONAL GROUP
3363.62	Sh	N-H	NH_2 secondary amine
168.833	M-Sh	C-H	CH- aromatic
2925.81	Sh	C-H	CH-Asym aliphatic
2856.38	M-Sh	C-H	C-H- symal aliphatic
1728.10	M-Sh	C=O	Sterch carbonyl group
1660.60	Sh	C-N	Amide
1620.09	M-Sh	H-N	H-N- bending
1458.08	M-Sh	C=C	C=C- ring stretch
1265.22	M-Sh	C-N	C-N stretch
1099.35	M-Sh	C-H	C-H bend out of plaine aromatic
730.97	M-Sh	C-O	C-O- in plane

Sh= Sharp M= medium

الكشوفات الكيميائية والفيزيائية للمركب القلويدي

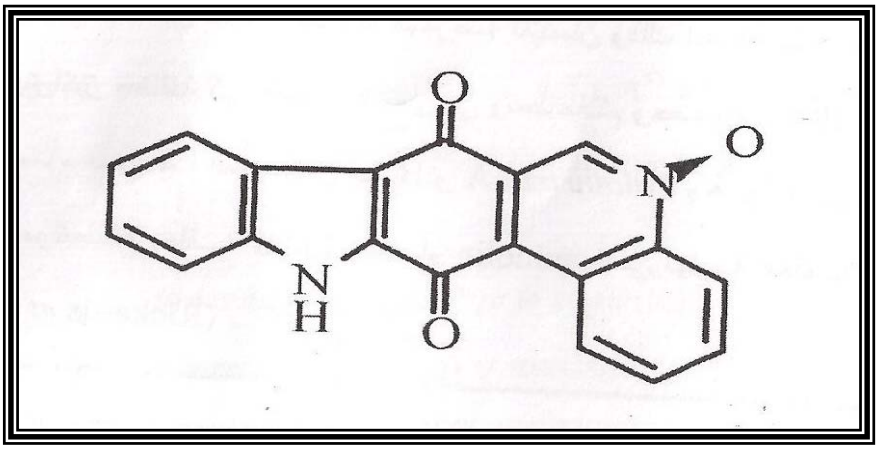
تم إختبار المكونة القلويدية المعزولة بمجموعة من الكشوفات الفيزيائية منها الذائبية ودرجة الإنصهار وكشوفات كيميائية مثل كشف الحرق الكشف عن المجاميع الألديهايدية والكيتونية، الكشف عن الحوامض الكاربوكسيلية والكشف عن النتروجين والكبريت ويوضح (الجدول 6) هذه الاختبارات، اذ تم التوصل الى ان المركب حاوي على الالديهايد والكيتون وخالي من الكبريت والحوامض الكاربوكسيلية وحاوي على النتروجين وله القابلية على الذوبان في العديد من المذيبات وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه Chen *et al.* (2003)

(الجدول 6) نتائج الكشوفات الفيزيائية والكيميائية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب الاخضر *Cladophora crispata*

الكشف	نتائج المكونة القلويدية
كشف الحرق	دخان اسود
كشف الذائبية	ذائب في الإيثانول، الميثانول و DMSO وذائب جزئيا في الماء وغير ذائب في الهكسان وخلات الاثيل
درجة الانصهار	130M.P
الكشف عن النتروجين	ظهور لون أخضر
الكشف عن الكبريت	سالب
الكشف عن المجاميع الأديهايدية والكيتونية	تكون راسب برتقالي دلالة على وجود المجاميع الألديهايدية والكيتونية
الكشف عن الحامض الكربوكسيلي	عدم ظهور فقاعات سريعة من غاز CO_2

تحديد التركيب المتوقع للمركب القلويدي

يمكن من خلال الحقائق التي تم التوصل إليها وجود أوجه تشابه بين معظم القياسات الفيزيائية والكيميائية للمركب المعزول مع مركب Calothrixin –A المعزول من الطحلب الأخضر المزرق *Calothrix* والذي استخدم كمضاداً للملاريا ومضاداً للأورام وانه يعزل لأول مرة من الطحلب الأخضر *C. crispata* حسب المصادر المتوفر لدينا كونه يحتوي على مجموعة C=O في الموقع 1728.10 سم$^{-1}$ كما يحتوي على مجموعة H–N في الموقع 3363.62 سم$^{-1}$ كما تشير النتائج إلى احتواء المركب على حلقة بنزين وكذلك مجموعة C-N في الموقع 1660.60 سم$^{-1}$ أما من ناحية طيف UV تشير النتائج إلى إن المركب المعزول يحتوي على الانتقالات من نوع (π - π^*) وهذا يتفق مع مركب Calothrixin –A باحتوائه على مجاميع N-H و C-O وأيضا احتوائه على الانتقال نوع (n- π^*) ضمن مجاميع C=C (الشكل 11).



(الشكل 11) التركيب الكيميائي للقلويد المعزول والمتوقع تشابهه مع مركب Calothrixin–A

الاختبارات الحياتية

تحديد التركيز المثبط الأدنى

أسفرت نتائج تحيد قيمة التركيز المثبط الأدنى للمركب القلويدي المستخلص تجاه الجراثيم السالبة لصبغة گرام متمثلة ببكتريا *E. coli* والموجبة لصبغة كرام *Staph. aureus* بأنه امتلك أدنى تركيز مثبط بلغ (5.5) مايكرو غرام امل للموجبة و (6) مايكرو غرام امل للسالبة ، ودلت النتائج أن الفعالية تكون أكبر تجاه البكتريا الموجبة من السالبة ويعزى ذلك إلى الاختلاف في طبيعة الجدار الخلوي بين النوعين إذ أن كثافة الطبقات الدهنية والمكونة من معقدات دهنية منها Protein – lipid, lipoprotein, lipopolysacharides الموجودة في جدران البكتريا السالبة لصبغة كرام تقلل من نفاذية هذه المركبات إلى داخل الكائن ألمجهري مقارنة مع البكتريا الموجبة التي تمتاز بقلة محتواه ألدهني وبالتالي يكون اكبر نفاذية لهذه المركبات وبالتالي تعطي قدرة تثبيط أعلى لهذا النوع من البكتريا وقد اتفقت هذه النتيجة مع المازني (2007).

السمية الخلوية Cytotoxicity

أظهرت نتائج اختبار السمية الخلوية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب الاخضر *Cladophora crispata* تجاه كريات الدم الحمر للإنسان أنه لا يحمل أية سمية عند التراكيز (1:1، 10:1، 100:1، 1000:1) مايكروغرام / مل (الجدول 7). وأن هذه النتيجة تجعل هذا المركب ذو أهمية طبية عند استخدامه على شكل مركبات صيدلانية، وقد اتفقت هذه النتيجة مع الموسوي(2007) والمازني(2007).

(الجدول 7) نتائج اختبار السمية الخلوية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب الأخضر *Cladophora crispata*

التركيز مايكرو غرام/ مل	السمية تجاه RBC
1:1	NT
1: 10	NT
1: 100	NT
1: 1000	NT
Control negative دم + DMSO	NT
Control Positive دم+ ماء حنفية	T

T = Toxic NT=Non toxic

المصادر :

أبو الذهب، مصطفى كمال (1997). علم البكتريا. الجزء الأول، مطبعة دار المعارف، القاهرة.

السامرائي، خلود وهيب عبود (1983). توزيع القلويدات و أهميتها التصنيفة في بعض الأنواع البرية من العائلة الباذنجانية Solanaceae في العراق. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

السعيد، أروى حميد محمود (2002). دراسة تأثير بعض مستخلصات نبات الشنان *Haloxylom* sp. على مستوى السكر في دم الأرانب الطبيعية والمصابة بفرط السكر المحدث بواسطة الألوكسان. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة البصرة.

المازني، منى عبد الإمام أحمد (2007). عزل وتشخيص المضاد الحيوي Cryptophycin من السيانوبكتريا *Nostoc muscorum* المعزولة من تربة عراقية و دراسة فعاليته الضد ميكروبية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة البصرة.

الموسوي، نداء جاسم محمد (2007). عزل وتشخيص بعض المركبات الفعالة من بعض الطحالب الخضر – المزرقة Cyanophyta وإختبار فعاليتها الحيوية المضادة للجراثيم والأعفان الفطرية. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة البصرة.

Barry, A.L. (1980). Procedure for testing antibiotics in agar media: theoretical consideration. (1-23)In: Lorians, V. (ed). Antibiotics in the laboratory medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, London.

Bagwell, E.E., Polster, P., E.M. and Ughan, W. (1973). Isolated decahydroquinolin from *Cladophora* sp. J. Nat. Prod., 20:1277-1282.

Bourrly, P. (1980). Les Algues deuu douce, initiation ala systematigue. Soc. Nouv. Edite. Boubee, Paris,. 517pp (cited by Venkatarman and Becker, 1985).

Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreir, J., Santose, A.S., Cechenial, V. and Yunes, R.A. (2005). Naturally accruing antinocieptiv substance from plants Rws, 14: 401 -418.

Carrol, A.R., Veiry, C., and Vick, M. (2007). Leptoclinidamines A indol alkaloid from the Australian ascidian Leptoclinide drug, 15:498-505.

Chen, X., Smith, G.D. and Waring, P. (2003). Human cancer cell (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite *calothrix*. J. applied. Phycol., 15:269-277.

Chosh, P., Adhikari, U., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B. and Ray, B. (2004). *In vitro* herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa* . Photochem., 21: 3151 – 3157.

Chu, S. (1942). The influence of the mineral on the growth of phytoplanktonic algae. J. Ecol., 30: 284 – 325.

Fieser, L.F. and Williamson, K.L. (1975). Organic experiment. 3rd ed. D.C. Health and company. Lexington, 366-368.

Fogg, G.E. (1975). Algal culture and phytoplankton ecology. 2nd ed. Univ. of Wisconsin Press, Wisconsin, USA.

Gonzalez delval, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suag, I., Vicente, F., Portillo, E., Jimenez del Rio, M., Garcia, R. G. and Pelaez, F. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green, and brown macro-algae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Int. Microbial., 4: 35 – 40.

Harold, G., Douglas, E., Goeger, C., Patric, H., Susan, L., Mooberry, D.L., Ballantin, T., Fredric, F. and William, H. (2009). Lophcladinees Bioactive alkaloid from the red alga *Lophocladia* sp. J., Nat. Prod 69:640-644.

Harborne, J.B. (1984). Photochemical methods. 2nd ed. Chapman and Hall, London, New York. 284 pp.

Hoppe, H.A. (1979). Marine algae and their product and constituents in pharmacy. (25 – 199). In: Hoppe; H.A. Levring T. and Tanka, Y. (eds.) marine algae in pharmaceutical science. Watter de Grugter, Berlin.

Hugo, W.B. and Russell, A.D. (1987). Pharmaccutical microbiology Backwell Scientific Publication Oxford London,. 511 pp.

Marr, W., Tan, G.T., Gordal, G.A. and Pezzuto, J.M. (1999). Biological activity of novel Macrocytic alkaloid from Albiza amara on the basis of interaction within DNA J., Nat. Prod., 54:1542-1550.

Paul, V.J., Thacker, R.W., Banks, K. and Golubic, S. (2005). Benthic cyanobacterial bloom impacts the reefs of South Florida (Broward County, USA). Coral Reefs 24:693-697.

Pezzuto, J.M., Che, T.C., Mcferson, O.D. and Zhn, J.P. (1991). DNA as an affinily prob. Useful in the detection and

isolation of biologically active natural product. J. Nat. Prod., 54: 1522-1530.

Prescott, G.W. (1975). Algae of the western great lake area 6th ed. William, C. Brwon Co.Publisher Dubugue Towa, 977 pp.

Radwan, M.A., Ragab, E.A., Sabry, N.M., and El-Shenawy S.M. (2007). Synthesis and biological evolution of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents Biol. Med. Chem., 15: 3832-3841.

Shriner, C.F. (1980). The systemic identification of organic compounds. 8th ed. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.

Silverastein, B., Bassler, D. and Morri (1982). Spectrometric identification organic compounds, 4th ed J.Welleyand sons.Inc-New York.U.S.A.

Spooner, D.F. and Sykes, G. (1972). Laboratory assessment of antibacterial activity (211 – 272) In: Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (ed). Methods in microbiology. Academic Press Inc. London Ltd.

Stein, J.R. (1973). Hand book of phycological methods. Cambridge Univ. Press. Cambridge., UK.

Weidman, V.E., Walne, P.R. and Tainor, F.R. (1984). A new technique for abtaining axinic cultures of algae. Can. J. Bot., 42: 958-959.

Xian – gno, H. and Ursella, M. (1994). Antifungal compounds from *Salonum nigrescence* . J. Ethno-pharm., 43: 173 – 177.

Isolation and identification of an alkaloidic compound similar to Calothrixin-A from green alga *Cladophora crispata* (Roth.) Kützing

Ahmed M. Athbi [1] **Eqbal J. AL-Assedi** [2] **Areej F. AL-Nassir**[1]

Dept. Biology / Education College / [1]Basrah University
Dept. Chemistry / Science College/ [2]Basrah University

Abstract

The isolation and identification of an alkaloidic compound similar to Calothrixin-A for were done here first time from the green algae (Chlorophyta) *Cladophora crispata*, isolated from Garmat-Ali river in Basrah in Iraq, purified and cultivated in Chu-10 medium. The growth rate was K=1.3 and the generation time G=0.23. The identification of the compound was made depending on its chemical and physical properties by using thin layer chromatoghraphy (TLC) and column chromatoghraphy. A single compound was isolated and tested by University and IR spectra. The melting point and solubility of the purified compound were determined using organic and inorganic solvents.

The minimal inhibitory concentration (MIC) value was 5.5 µg /cm^3 against G-positive bacteria *Staphylococcus aurrus* (ATCC25922) and 6 µg/cm^3 against G-negetive bacteria *Escherichia coli* (ATCC25923). The toxicity of the alkaloidic compound was examined against human red blood cells and no toxic effect was detected.

Key words: Isolation, Identification, alkaloidic compound.