مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (6) العدد (4) 2022

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (6) No. (4) 2022

الفعالية البيولوجية لمستخلص صدفة الرخوي *Corbicula fluminea* على العزلتين الجرثوميتين *Escherichia coli* و*Staphylococcus aureus*

أ.م إقبال فاضل*

أ.د اميمة ناصر**

رهف مصطفى***

(تاريخ الإيداع 18/5/ 2022 – تاريخ النشر28/7/ 2022)

□ ملخّص □

تمت دراسة الفعالية الحيوية لمستخلص صدفة الرخوي *Corbicula fluminea* المضادة لنوعين من الجراثيم الممرضة المعزولة من مخبر مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية خلال شهري تشرين الثاني وكانون الأول.

جمعت عينة الرخوي *Corbicula fluminea* من منطقتي ستخيرس والشلفاطية في شهري آب وايلول لعام ٢٠٢١ . تم الحصول على الخلاصة الكحولية والمائية لصدفة الرخوي. ودرست فعالية المستخلصات على الجراثيم المعزولة بطريقة الانتشار بواسطة الأقراص.

أظهرت النتائج تأثر العزلة الجرثومية (A) (*Escherichia coli*) بالخلاصة الإيتانولية، وسجلت قطر تثبيط ١٩ ملم عند التركيز ٤٠ ملغ/مل، بينما سجلت قطر تثبيط ١٤ملم عند التركيز ٣٠ ملغ/مل. بينما سجلت على العزلة الجرثومية (B)*Staphylococcus aureus*) قطر تثبيط ١٤ملم عند التركيز ٤٠ ملغ/مل، وقطر تثبيط ١٢ملم عند التركيز ٣٠ملغ/مل .وسجلت الخلاصة المائية على العزلة الجرثومية (*E.coli*) قطر تثبيط ١٢ملم عند التركيز ٤٠ ملغ/مل، وقطر ١٠ملم عند التركيز ٣٠ملغ/مل، بينما سجلت على العزلة الجرثومية (*Staphy. aureus*) قطر تثبيط ٨ ملم عند التركيز ٤٠ ملغ/مل، ولم يظهر قطر تثبيط عند التركيز ٣٠ ملغ/مل.

أظهرت الخلاصة الإيتانولية فعالية أكثر من الخلاصة المائية عند التراكيز المستخدمة ذاتها تجاه الأنواع الجرثومية الممرضة المدروسة، وبذلك يمكن أن تكون خلاصة الرخوي مصدراً للصادات الحيوية الطبيعية في المستقبل داعماً صادات الحيوية الكيميائية .

الكلمات المفتاحية:الرخوي*Corbicula fluminea*،*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* ،مستخلص إيتانولي ، مستخلص مائي.

*أ.م ، قسم علم الحياة الحيوانية، ،اختصاص بيئة مائية حيوانية ، كلية العلوم ،جامعة تشرين

**أ.د، قسم الوقاية البيئية ، اختصاص أحياء دقيقة، المعهد العالي لبحوث البيئة ، جامعة تشرين

***طالبة ماجستير، اختصاص بيئة مائية حيوانية،قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة تشرين

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (6) العدد (4) 2022

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (6) No. (4) 2022

Study of The Anti-Efficacy of Extract *Corbicula fluminea* Shell on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Dr.ekbal fadel *
Dr.omiema nasser**
Rahaf mustafaa***

(Received 18/5/2022.Accepted 28/7/2022)

□ABSTRACT □

The biological activity of the extract *Corbicula fluminea* shell against some types of pathogenic bacteria isolated from the laboratory of Tishreen University Hospital in Lattakia was studied.

The *Corbicula fluminea* sample was collected from the St-Khairs and El Shalavia regions in August and September 2021 .The extract was obtained by both alcoholic and aqueous methods. The effect of these extracts on isolated bacteria from Tishreen University Hospital in Lattakia during November and December, by the method of dispersal by discs.

The results showed the effect of bacterial isolation (A) (*Escherichia coli*) was affected by the ethanol extract inhibition diameter of 19 mm at concentration 40 mg/ml and diameter of 14 mm at concentration 30 mg/ml .And the effect of bacterial isolation (B) (*Staphylococcus aureus*)showed the inhibition diameter of 14mm at concentration 40 mg/ml and diameter of 12mm at concentration 30 mg/ml .

The aqueous extract on bacterial isolation (*Escherichia coli*) gave an inhibition diameter of 12mm at concentration 40mg/ml and a diameter of 10mm at concentration 30mg/ml.on bacterial isolation (*Staphylococcus aureus*) diameter 8mm at concentration 40mg/ml , and no inhibition diameter at concentration 30mg/ml.

the ethanol extract has been shown to be more effective than aqueous extract at the same concentrations used for pathogenic bacterial species, so mollusk extract could be a source of natural antibiotics in the future instead of chemical antibiotics.

Keywords : Mollusk*Corbicula fluminea*,*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Ethanol extract , Aqueous extract

***pro in the department of animal biology-faculty of science-tishreen university.
****pro in the department of environmental protection-higher institute of environmental-tishreen university.
*****mastar`s student in aquatic animal environmental- department of animal biology-faculty of science-tishreen university.

المقدمة :

تشكل الرخويات Mollusca ثاني أكبر شعبة بعد شعبة مفصليات الأرجل من حيث النمط الشكلي والبيئي (برية ومائية) والسلوك الغذائي المختلف، وتقسم الرخويات إلى سبع صفوف أهمها صف بطنيات القدم Gastropoda ،وصف ثنائيات المصراع Bevalvia .

تؤدي الرخويات Mollusca دور هام في النظم البيئية والسلاسل والشبكات الغذائية، والتنقية البيولوجية للمياه الملوثة (Cataldo *et al.* 2001b ,Inza *et al.*1997 , Doherty 1990)، ويتم استخدامها في مجالات اقتصادية وطبية وصناعية وغذائية، وتستخدم بعض أنواعها كمؤشرات حيوية لبعض أنواع التلوث وخاصة العضوي، ويساهم بعضها في مجال المكافحة الحيوية. تتمتع بعض أنواع الرخويات المائية العذبة بأهمية صحية، حيث يشكل بعضها مضيفات وسيطة أو نهائية لبعض أنواع الديدان التي تتطفل على الحيوان والإنسان مثل *Echinostoma sp.*تم اكتشافها لأول مرة في النوع *corbicula sp* (Bonne c,1941).

تعد الرخويات ثنائية المصراع Bivalivia أهم الأحياء البحرية اقتصادياً، حيث تستخدم في غذاء الإنسان في بعض الدول ،ومصدر للعلاجات التقليدية منذ القدم، وحلي للزينة وفي مواد التجميل، ولها دور هام في عملية الترشيح البيولوجي سواء للتخلص من المعادن الثقيلة (Moreschi *et al* ,2020)، أو ترشيح الملوثات العضوية (Martinez and Diaz,2020) و لها دور هام في التخلص من الأحياء الدقيقة الممرضة، وتمتلك مستخلصاتها بعض الأنشطة الدوائية الواضحة، أو غيرها من الخصائص المفيدة في الطب.

أثبتت دراسات عديدة وجود فعالية مضادة تجاه جراثيم سالبة غرام وموجبة غرام لمستخلصات عدة أنواع من الرخويات منها: *Achantina fulica* (Kubota *et al.*, 1985; Iguchi *et al.*, 1985), *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Geukensia demissa* (Anderson and Beaven, 2001), *Dicathais orbita* (Benkendorff *et al.*, 2001), *Dolabella auricularia* (Vennila *et al.*, 2011), *Perna viridis, Nerita albicilla* (Kiran *et al.*, 2014), and *Pomacea insularium* (Packia Lakshmi *et al.*, 2014)

أظهرت دراسات سابقة إن مستخلص *Corbicula fluminea* مفيد لصحة الإنسان، وله دور في خفض الدهون ،واستخدم مسحوق الصدفة كعامل طبيعي مضاد للميكروبات، وكان له تأثير مثبط بشكل كبير على الجراثيم (sawai *et al*,2001 ;Yang*et al*, 2019)

Corbicula fluminea:

سجل لأول مرة في الساحل السوري عام٢٠١٤ من قبل (رجب ،٢٠١٤)، يوجد قوقعة ثنائية المصراع شكلها مدور وعريض ،متوسط الطول (٣٠-٤٠) مم الاسنان الجانيبة مسننة بوضوح السطح الداخلي للقوقعة مائل للبياض (Hubenov *et al*,2013) الحيوان خنثى تحوي مناسله على خصى ومبايض، وقد يكون الإخصاب ذاتي(Smith,2001)، تم تصنيفه إلى

صف(Bivalvia) تحت رتبة (Heterodonta)، رتبة (Veneroida)، فصيلة (Corbiculidae).

أهمية البحث:

١. يعد من الأبحاث الهامة في الوقت الحاضر في مجال استخلاص مواد طبيعية ذات أهمية علاجية.

٢. اكتشاف مركبات طبيعية ذات تأثيرات جانبية قليلة على الإنسان مقارنة مع المركبات الكيميائية.

٣. دراسة مستخلص صدفة جنس (*Corbicula Fluminea*) في تثبيط نمو بعض الجراثيم الممرضة للإنسان نظراً لعدم وجود دراسات محلية لمستخلصاته، ولأهمية المستخلصات الطبيعية في مجال العقاقير الطبية.

أهداف البحث :

١- عزل وتصنيف جراثيم ممرضة من مستشفى تشرين الجامعي.

٢- تحضير مستخلصين كحولي ومائي من النوع *Corbicula fluminea* المنتشر في بعض الأوساط المائية العذبة في محافظة اللاذقية.

٣- اختبار فعالية المستخلصين في القضاء على بعض أنواع الجراثيم الممرضة المعزولة.

مواد البحث وطرائقه :

١-جمع العينات

a. عينات الرخوي*Corbicula fluminea*

جمعت عينات الرخوي (*Corbicula fluminea*) من محطتين على المجرى السفلي لنهر الكبير الشمالي

المحطة الأولى : محطة الستخيرس قرب التقاء نهر القش بنهر الكبير الشمالي.

المحطة الثانية : محطة الشلفاطية على رافد نهر القش.

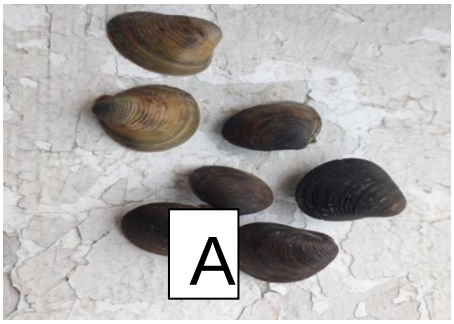
جمعت الرخويات بشبكة خاصة بها، ثم غسلت بمياه النهر لإزالة الطمي والطين من القواقع ووضعت في عبوات زجاجية مملوءة بماء النهر من مكان جمع العينات، ثم نقلت مباشرة إلى مختبر الدراسات في كلية العلوم لإجراء العمل المخبري والحصول على مستخلصاتها العضوية.

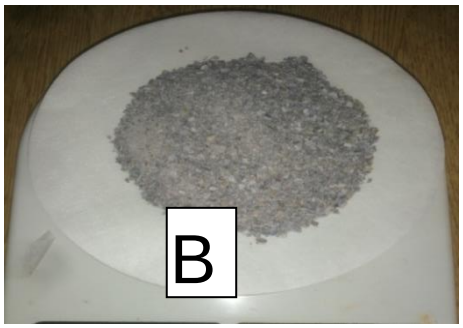
b. عينات الجراثيم الممرضة :

جمعت العينات المرضية (بول ، مسحة سره) الواردة إلى مستشفى تشرين الجامعي، ونقلت إلى مختبر الوقاية البيئية في المعهد العالي للبيئة في جامعة تشرين في اللاذقية .

٢-تحضير مستخلصات صدفة الرخوي *Corbicula fluminea*

- كسرت الصدفة وأزيلت الأجسام الرخوة، غسلت بالماء المقطر جيداً، جمعت قطع الصدفة ووزنت، وحضرت على شكل مسحوق خشن.
- نقع المسحوق في حمض بيروكسيد الهدروجين(H_2O_2) للتخلص من الطبقة القرنية لمدة٢٤ ساعة,ومن ثم غسل بالماء المقطر لمدة ساعة .
- جففت في الفرن بدرجة ٨٠مْ ،ثم طحنت على شكل مسحوق ناعم بواسطة خلاط بلندر معقم . (Yang *et al.*,2019)
- حضر مستخلصين عضوي ومائي (إيتانول وماء مقطر) للنوع الرخوي، وبشكل منفرد، حيث نقع المسحوق الرخوي بالمذيب وبمعدل ١٠٠مل من المذيب المستخدم لكل ٢٠غرام من مسحوق الرخوي الجاف، وبنسبة (V/W 5:1) في حوجلة سعة ٥٠٠ مل ضمن حاضنة على جهاز هزاز ١٣٠ هزة في الدقيقة لمدة ٧٢ ساعة ، فصلت الرشاحة عن المذيب بالترشيح، ورشح المذيب بأوراق ترشيح واستخدم جهاز المبخر الدوار تحت ضغط منفصل للتخلص من المذيب العضوي والماء المقطر كلا على حدا، ووضعت عينات في الحاضنة على درجة ٣٧ لمدة ٢٤ ساعة للحصول على كتلة مصمغة من المستخلصات، كما هو موضح بالشكل (١)





الشكل ١ : (A)الرخوي *Corbicula fluminea*في المختبر ،(B) مسحوق الرخوي بعد الطحن .

٣-عزل الجراثيم الممرضة :

عزلت الجراثيم الممرضة وزرعت على الأوساط العامة النوعية والتفريقية والانتقائية مثل Eosin ،Nutrient Broth, Macconky Agar Mantinol Salt Agar,Nutrient Agar Methylene Broth

. (Garrity *et al.*,2004; Garrity *et al.*,2005)

طبقت طريقة تلوين غرام لتمييز الجراثيم هل هي موجبة صبغة غرام أم سالبة صبغة غرام، أجريت الاختبارات البيوكيميائية الأتية:

- اختبار استهلاك السترات: يستخدم لمعرفة الجراثيم التي تستهلك سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون واملاح الامونيا كمصدر وحيد للنتروجين و تتغير درجة PH الوسط فيتحول لون الوسط من أخضر الى أزرق.

- اختبار تحلل النشاء: يستعمل لتمييز الجراثيم التي تفرز أنزيم الأميلاز الذي يحلل النشاء، فيتحول لون الوسط عند إضافة الكاشف من لون أزرق إلى بني .
- اختبار الأندول: يستعمل هذا الاختبار لمعرفة الجراثيم التي تفرز أنزيم Tryptophanase الذي يحلل التربتوفان لتكوين الإندول، وعند إضافة كاشف كوفاكس تظهر حلقة وردية اللون مائلة للأحمر على سطح المزرعة السائلة المنتجة للأنزيم .
- اختبار الخثراز: يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين المكورات العنقودية الذهبية (موجبة الخثراز) التي تنتج أنزيم Coagulase وبقية المكورات العنقودية الاخرى(السالبة).
- اختبار الأوكسيداز: يحدد هذا الاختبار وجود أنزيم سيتوكروم أوكسيداز في الجراثيم لتشخيص جراثيم العائلة المعوية Enterobacteriaceae السالبة الأكسيداز، وتمييزهاعن العصيات الأخرى السالبة لصبغة غرام.
- الحركة : يستخدم هذا الاختبار لتحديد الجراثيم المتحركة،ا لتي تمتلك سياطاً للحركة، حيث يلقح وسط الآغار شبه الصلب بعمق بوساطة ناقل معدني مستقيم بطريقة الطعن، الجراثيم المتحركة تنمو ممتدة خارج خط الطعن(التلقيح).
- اليوريا: يستعمل هذا الاختبار لتحديد قدرة الجراثيم على إنتاج أنزيم Urease الذي يحلل اليوريا مائياً.
- الكاتالاز: يميز هذا الاختبار المكورات الدقيقة، وأنواع المكورات العنقودية إيجابية الكاتالاز من أنواع المكورات العقدية سلبية الكاتالاز.
- إطلاق غاز كبريت الهيدروجين: يستعمل هذا الاختبار لتميز الجراثيم التي تطلق غاز كبريتيد الهيدروجين.
- إرجاع النترات : يجرى هذا الاختبار للتعرف على قدرة الجراثيم لاختزال النترات إلى نتريت .

٤-اختبار حساسية الجراثيم تجاه الصاد الحيوي Ciprofloxacine

أجريت اختبارات تحسس الجراثيم المعزولة لصاد حيوي قياسي السيبروفلوكساسين (Ciprofloxacine) بطريقة الانتشار بواسطة الأقراص، وحددت الحساسية والمقاومة لها وفقا لمعايير (Salem *et al.*, 2013)، بعد قياس أقطار حلقات منع النمو بواسطة مسطرة ميلمترية على وسط Mueller Hinton Agar (Biemer, 1973; Matuschek *et al.*, 2014;).

٥-اختبار فعالية مستخلص صدفة (*C. fluminea*) تجاه الجراثيم الممرضة المعزولة :

أجري اختبار لمستخلصات صدفة الرخوي (*C.fluminea*)تجاه بعض الجراثيم الممرضة المعزولة بطريقة الانتشار بواسطة الأقراص .

تم إذابة المستخلصات الجافة في محلول ثنائي ميتيل السلفوكسيد DMSO بتراكيز مختلفة لكل مذيب حيث أذيبت الخلاصة الايتانولية لتركيزين (٣٠ / ٤٠) ملغ/مل، وأذيبت الخلاصة المائية لتركيزين (٣٠/٤٠) ملغ/مل، ثم شربت أقراص ترشيح قطرها ٥ مم بمقدار ٢٠ ميكرومتر، وتركت لتجف بدرجة حرارة المختبر من (٢٣ – ٢٥) درجة مئوية حضر معلق جرثومي لكل نوع من الجراثيم الممرضة المعزولة، وذلك بأخذ مسحة جرثومية من Nutrient agar عمرها ٢٤ ساعة، ونقلها إلى وسط Nutrient Broth ، ووضعت بالحاضنة وبعد مرور ٢٤ ساعة، تم نقل ٠,٥ من الوسط السائل، وفرشت فوق سطح Mueller Hinton agar بماسحة قطنية وبعد ١٥ دقيقة وزعت الأقراص المشربة بالمستخلصات فوق سطح الوسط الزرعي بلمقط معقم،

وحضنت الأطباق على الدرجة ٣٧ لمدة ٢٤ ساعة، قرأت النتائج بعد انتهاء فترة الحضن بقياس أقطار حلقات التثبيط بواسطة مسطرة ميليمترية, وقدر بـ مم نفذت التجربة بواقع ثلاثة مكررات (Matuschek *et al.*, 2014; Pirbalouti *et al.*, 2010; Klancnik *et al.*, 2010)

٦-التحليل الإحصائي:

استخدم برنامج SPSS، وطبق تحليل T-TEST عند مقارنة كل تركيزين للعزلة الجرثومية ذاتها.

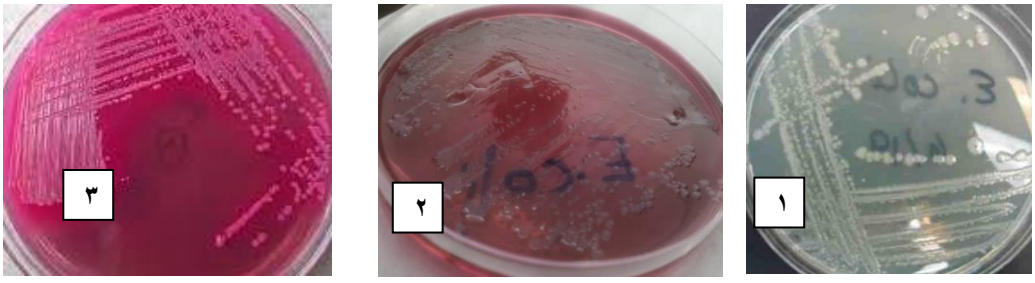
النتائج والمناقشة:

١. نتائج عزل وتنميط الجراثيم:

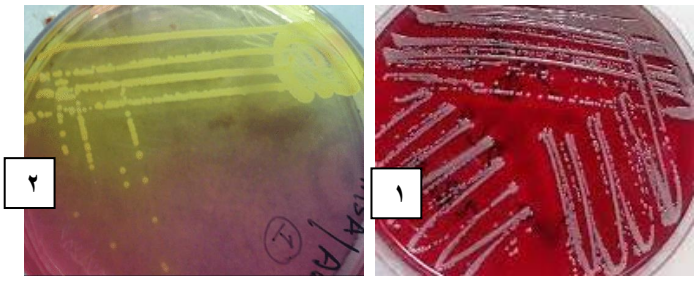
I. التنميط تبعاً لصفات وخصائص المستعمرات الجرثومية النامية:

عزلت الجراثيم وتم الكشف عن هويتها اعتماداً على خصائص النمو على الأوساط المغذية الانتقائية والنوعية الذي حدد العزلة الجرثومية A هي عصيات سالبة غرام، والعزلة الجرثومية B هي مكورات إيجابية غرام.

حيث نمت العزلة الجرثومية A على وسط الآغار المغذي بشكل مستعمرات بلون كريمي، وأعطت مستعمرات بنفسجية اللون مائلة للسواد ذات لمعة معدنية على وسط E.M.B ، بينما على وسط ماكونكي آغار كانت المستعمرات ذات لون وردي، كما هو موضح في الشكل(٢)، بينما العزلة الجرثومية B نمت على وسط شابمان بشكل مستعمرات صفراء اللون، وتميزت بتحليلها للدم عند زرعها على الآغار المدمى، كما هو موضح في الشكل(٣) .



الشكل (٢) : العزلة الجرثومية A على وسط : (1) الاغار المغذي،(٢) E.M.B Agar ، (٣) ماكونكي اغار

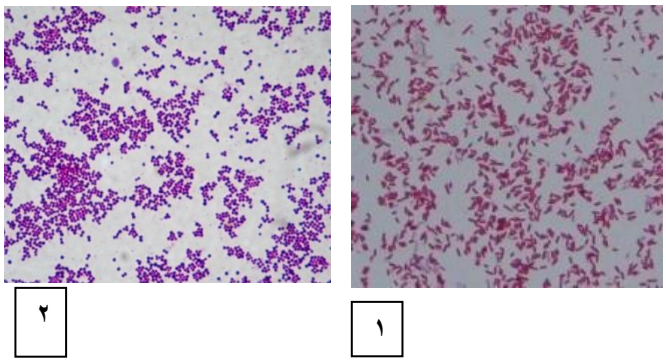


الشكل (٣): العزلة الجرثومية B على: (١)وسط شابمان،(٢)وسط الآغار المدمى

A. التنميط تبعا لصبغة غرام:

تم اعتماد تلوينها بطريقة صبغة غرام وفحصها على المجهر، كما يظهر في الشكل (٤)، حيث تبين العزلة

الجرثومية Aهي عصيات سالبة غرام، والعزلة الجرثومية B هي مكورات إيجابية غرام، الجدول(١) .



الشكل (٤) : (١)العزلة الجرثومية A ،(٢)العزلة الجرثومية B

الجدول(١)الصفات الشكلية والمجهرية للعزلات الجرثومية

العزلة الجرثومية / الاختبار	A	B
شكل الخلية	عصوي	كروي
التجمع	مفرد	عنقودي
تلوين غرام	سالب (أحمر)	موجب (بنفسجي)
الحركة	متحركة	غير متحركة

B. التنميط تبعا للاختبارات البيوكيميائية :

بينت النتائج أن العزلة الجرثومية(A) تتميز بالصفات الآتية: كما هو مبين في الجدول (2)، حيث أنها تخمر الغلوكوز والمانتينول والسوربيتول والرامنوز والآرابينوز، في حين لم تخمر السكروز والاينوزيتول و،سلبية الأوكسيداز ، تخمر اللاكتوز، لم تحول الارجنين إلى سيترولين ، حولت الليزين إلى كادافيرين ، تحول الاورنيثين إلى بوتريسين، ولاتستهلك السترات، ولاتفكك البولة لذلك URE سلبي، و لم تنتج غاز الهيدروجين فهي

H_2S سلبي ، لم تحول التربتوفانإلى أندول بيروفيك و لم تنتج الاندول ، VP سلبي لم تشكل الأسيتوئين بالإضافة إلى أن GELسلبي لأنها لا تميع الجيلاتين، كما هو موضح في الجدول (٢).

وتميزت العزلة الجرثومية(B) بالصفات الكيميائية الآتية: كما هو موضح في الجدول (٣) حيث أنها تخمر الغلوكوز والمانتينول والفركتوز والمانوز والسكروز والمالتوز واللاكتوز والأرجنين لا تخمر السوربيتول والارابينوز والرافينوز. وتبين أنها تخثر البلاسما فهي إيجابية الكواغلولاز، وايجابية الكاتلاز لإظهارها فقاعات ،وسلبية الأوكسيداز، ولاتستهلك السترات ولم تنتج غاز H_2S ولم تنتج الاندول ، تفكك البولة، VP ايجابي فهي تشكل الاسيتوئين، بالإضافة إلى أن GEL ايجابي فهي تميع الجيلاتين، كماهو موضح في الجدول(٣).

الجدول ٢ :نتائج الاختبارات البيوكيميائية للعزلة الجرثومية (A)

١	٢	٣	٤	٥	٦
Motility	Catalase	Oxidase	Arginine	Ornithine	Nitrate
+	+	−	−	−	+
٧	٨	٩	١٠	١١	١٢
Mr	Vp	Indol	H_2S	Acetate	Citrate
−	−	+	−	+	−
١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨
Tartrate	Esculine	Gelatine	Urea	Phy-alan	Arabinose
−	−	−	−	−	+
١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤
Cellebios	Dulcitol	Glycerol	Glucose	Inositol	Lactose
−	−	−	+	−	+
٢٥	٢٦	٢٧	٢٨	٢٩	٣٠
Maltose	Mannitol	Mannos	Raffinose	Sorbitol	Sucrose
−	+	−	−	+	−
٣١	٣٢	٣٣			
Xylose	Fructose	Hemolysis			
−	−	+			
Escherichia coli					

+ : التفاعل إيجابي، − التفاعل سلبي

الجدول ٣ :نتائج الاختبارات البيوكيميائية للعزلة الجرثومية (B)

١	٢	٣	٤	٥	٦
Motility	Catalase	Oxidase	Arginine	Ornithine	Nitrate
–	+	–	+	–	+
٧	٨	٩	١٠	١١	١٢
Mr	Vp	Indol	H_2S	Acetate	Citrate
+	+	–	–	–	–
١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨
Tartrate	Esculine	Gelatine	Urea	Phy–alan	Arabinose
–	–	+	+	–	–
١٩	٢٠	٢١	٢٢	٢٣	٢٤
Cellebios	Dulcitol	Glycerol	Glucose	Inositol	Lactose
–	–	+	+	–	+
٢٥	٢٦	٢٧	٢٨	٢٩	٣٠
Maltose	Mannitol	Mannos	Raffinose	Sorbitol	Sucrose
+	+	+	–	–	+
٣١	٣٢	٣٣	٣٤		
Trehalose	Xylose	Fructose	Hemolysis		
+	–	+	+		
Staphylococcus aureus					

+ : التفاعل إيجابي، – التفاعل سلبي

بينت النتائج التي أجريت للعزلات الجرثومية المدروسة، اعتماداً على الخصائص الشكلية والمزرعية، والاختبارات البيوكيميائية وتخمير السكريات والتلوين بغرام أن العزلتين الجرثوميتين هما :

العزلة الجرثومية A: *Escherichia coli* جراثيم عصوية سالبة غرام.

العزلة الجرثومية B : *Staphylococcus aureus* جراثيم كروية إيجابية غرام.

٢. نتائج فعالية مستخلص صدفة *C. fluminea* تجاه العزلات الجرثومية :

بينت النتائج كما هو مبين في الشكل (5) حدوث تأثير مثبط لنمو الجراثيم للخلاصة الايتانولية بتركيز (٣٠/ ٤٠) ملغ/مل لصدفة الرخوي*C. Fluminea* تجاه العزلتين الجرثوميتين المختبرتين، إذ بلغ متوسط قطر هالة تثبيط الخلاصة الإيتانولية على جراثيم *Staphy..aureus* (١٢) ملم عند التركيز ٣٠ ملغ/مل، وبلغ قطر التثبيط

للخلاصة ذاتها، وعند نفس التركيز على جراثيم *E.coli*(١٤) ملم، بينما عند التركيز ٤٠ ملغ /مل بلغ قطر تثبيط الخلاصة الايتانولية على جراثيم *Staphy..aureus*(١٤) ملم، وبلغ قطر التثبيط للخلاصة ذاتها، وعند التركيز ذاته على جراثيم *E.coli* (١٩) ملم وذلك بعد مرور ٢٤ ساعة على الحضن.

ظهر تأثير الخلاصة المائية على جراثيم*E.coli*عند التركيز ٣٠ ملغ/مل بقطر تثبيط (١٠)ملم ،ولم يحدث تأثير تثبيطي لنفس الخلاصة ونفس التركيز على جراثيم *Staphy..aureus*.

بينما بلغت الخلاصة المائية عند التركيز (٤٠)ملغ /مل قطر تثبيطي (١٢)ملم على جراثيم *E.coli*،وبلغ قطر التثبيط (٨) ملم عند نفس التركيز على جراثيم *Staphy..aureus* ، كما هو مبين في الشكل (6).

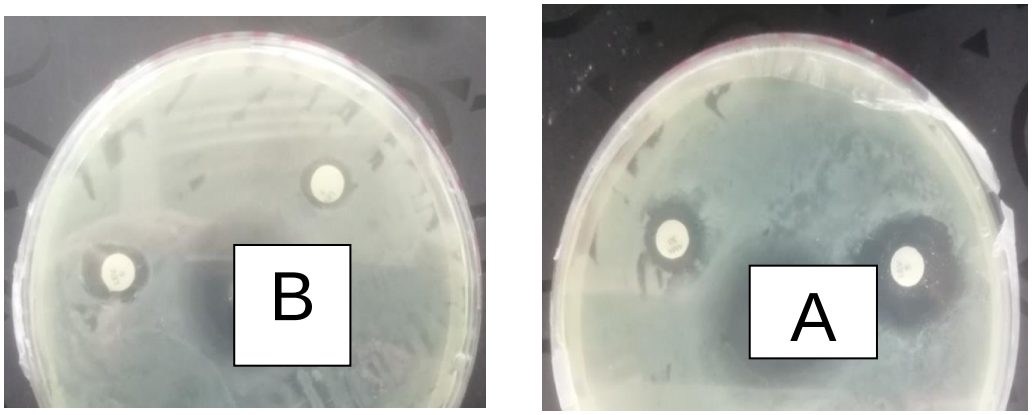
يبين الشكل (6)عدم حدوث تأثير تثبيطي للخلاصة المائية عند التركيز (٣٠)ملغ/مل على جراثيم *Staph..aureus*، وقد يفسر ذلك بسبب التراكيز المنخفضة من هذه الخلاصة، بالإضافة إلى أن جراثيم *Staph. aureus* أكثر مقاومة لمسحوق الصدفة من *E.coli* (Sawai *et al* .,2001) تبعاً لاختلاف تركيب جدار الخلايا الجرثومية Brayner *et al*.,2006)

توافقت نتائج (Yang *et al.,*2019) مع هذه الدراسة، حيث أظهرت الخلاصة المائية قطر تثبيط (١٤.٧) ملم على جراثيم *E.coli* وبلغ في هذه الدراسة قطر التثبيط(١٤)ملم عند التركيز(٤٠)ملغ/مل ، وبلغ قطر التثبيط(١١) ملم عند التركيز(٣٠)ملغ/مل، حسب (Yang *et al.,*2019) بينما في هذه الدراسة(١٠) ملم.حسب (Yang *et al.,*2019) الخلاصة المائية أظهرت قطر تثبيط (١٠)عند التركيز (٤٠) ملغ/مل ملم، بينما في هذه الدراسة بلغ(٨) ملم على جراثيم *Staphy..aureus*.

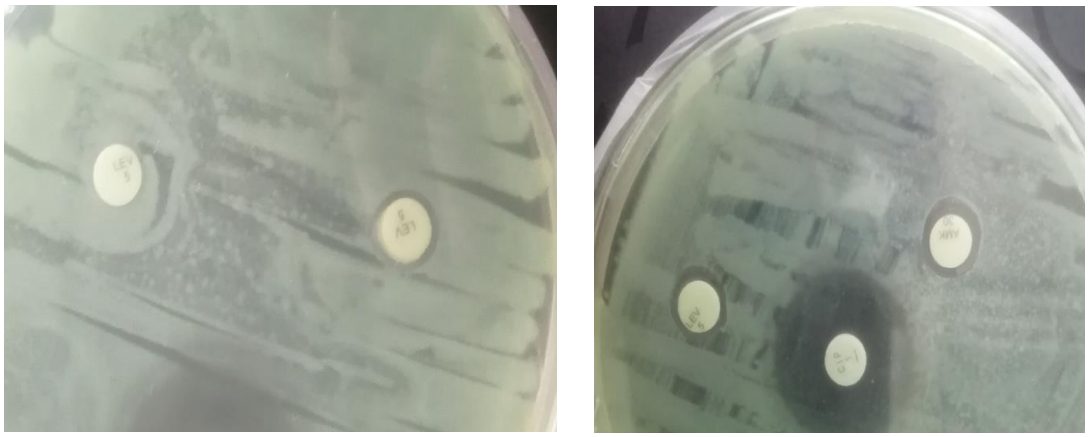
تعزى نتائج قدرة مسحوق صدفة الرخوي على تثبيط الجراثيم إلى أن المكون الرئيس في الصدفة هو كربونات الكالسيوم، والذي يحول عند تعرضه للحرار.ة وتكليسه إلى أكسيد الكالسيوم الذي يتلف الحمض النووي الجرثومي .

حيث أثبتت الدراسات أن المضادات الحيوية التي تعتمد آلياتها على أكاسيد المعادن تتلف الحمض النووي الجرثومي بسبب رفع مستوى درجة الPH (Ohshima *et al*., 2015; Kubo *et al*., 2013)

الذي يسبب تأثير مدمر على بنية ونشاط البروتينات وبالتالي يضر بجدران الخلايا الجرثومية ويؤدي إلى موت الجراثيم;(Kwon *et al*., 2004; Cabiscol *et al*., 2000; Ezraty *et al*., 2017; Stankic *et al*., 2016; Lam *et al*.,2010).



الشكل5: تأثير الخلاصة الإيتانولية (A)على *E.coli*, (B) على *Staphy.aureus*



الشكل6 : تأثير الخلاصة المائية (A) على جراثيم *E.coli* ،(B) على *Staphy..aureus*

٣. نتائج تحسس الجراثيم الممرضة المختبرة للصاد الحيوي Ciprofloxacine:

اختبرت حساسية الجراثيم *E.coli* و *Staphy..aureus* تجاه الصاد الحيوي CIP (كشاهد إيجابي) والمستخدم لعلاج الإنتانات الناجمة عن هذه الأنواع في الإنسان وذلك لمقارنة فعالية المستخلصات مع فعالية هذا الصاد ولإظهار فعالية مستخلص الرخوي تجاه هذه الجراثيم، إذ بلغ قطر حلقة تثبيط CIP لجراثيم *E.coli* القيمة ١٨ملم، وكانت النتيجة متقاربة من قطر حلقة تثبيط الصاد ذاته لجراثيم *Staphy..aureus* والذي بلغ القيمة ١٦ملم.

بينت النتائج أن فعالية مستخلص الرخوي تجاه جراثيم *E.coli* متقاربة من فعالية الصاد الحيوي المدروس أكثر من جراثيم *Staphy..aureus* ويمكن تفسير ذلك باختلاف تركيب الجدار الخلوي لجراثيم *E.coli* (سالبة صبغة الغرام)عن الجدار الخلوي لجراثيم *Staphy..aureus* (موجبة صبغة الغرام) (Brayner *et al.*,2006)

٤. نتائج التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS :

أولاً: استخدام تحليل T-TEST عند مقارنة كل تركيزين للعزلة الجرثومية ذاتها:

تم استخدام تحليل T-TEST نتيجة وجود مجموعتين (تركيزين) فقط نريد المقارنة بينهما لكل عزلة جرثومية.

١) المقارنة بين التراكيز بعد 24 ساعة بالنسبة للعزلة الجرثومية *E.coli*:

الجدول(4):المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للعزلة الجرثومية *E.coli*

Paired Samples Statistics

Group Statistics

	TRK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
E.coli	30	2	13.00	1.414	1.000
	40	2	14.50	6.364	4.500

الجدول(5):اختبار T-test للعزلة الجرثومية E.coli بعد 24 ساعة

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
E.coli	30	-.325	2	.776	-1.500	4.610	-21.334	18.344
	40	-.325	1.099	.796	-1.500	4.610	-49.007	46.007

بينت النتائج كما هو موضح في الجدول (4) أنّ قيمة المتوسط الحسابي للتركيز 40 ملغ/مل بلغت (14.50) ملم، وبلغت قيمة المتوسط الحسابي للتركيز 30ملغ/مل (13)ملم، كما يبين الجدول (5) أنّ قيمة احتمال الدلالة Sig.=0.7 وهي أكبر من مستوى الدلالة 0.05، وبالتالي لا يوجد فرق دال إحصائياً بين التركيزين بعد 24 ساعة بالنسبة للعزلة الجرثومية *E.coli*.

٢) المقارنة بين التراكيز بعد 24 ساعة بالنسبة للعزلة الجرثومية *Staphy..aureus*

الجدول(6): المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للعزلة الجرثومية *Staphy..aureus*

Group Statistics

	terk	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
s.aureus	30	2	6.0000	8.48528	6.00000
	40	2	11.0000	4.24264	3.00000

الجدول(7): اختبار T-test للعزلة *Staphy..aureus* بعد 24 ساعة

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
Staphy. aureus	30	-.745	2	.534	-5.00000	6.70820	-33.86307	23.86307
	40	-.745	1.471	.557	-5.00000	6.70820	-46.51114	36.51114

يبين الجدول (6) أنّ قيمة المتوسط الحسابي للتركيز 40ملغ/مل بلغت (11)ملم، وبلغت قيمة المتوسط الحسابي للتركيز 30ملغ/مل (6)ملم، كما يبين الجدول (7) أنّ قيمة احتمال الدلالة Sig.=0.5 وهي أكبر من مستوى الدلالة 0.05، وبالتالي لا يوجد فرق دال إحصائياً بين التركيزين بعد 24 ساعة بالنسبة للعزلة الجرثومية *Staphy..aureus*

الاستنتاجات :

١. تم عزل وتنميط الجراثيم *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* من العينات المرضية المختبرة في مستشفى تشرين الجامعي نتيجة عمليات الزرع والتلوين والاختبارات البيوكيميائية.

٢. أظهر التركيز ٤٠ ملغ/مل للخلاصة الإيتانولية لصدفة الرخوي *C.fluminea* فعالية تجاه الجراثيم الممرضة المختبرة *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، بينما لم تظهر الخلاصة المائية عند التركيز ٣٠ ملغ/مل فعالية تجاه الجراثيم الممرضة المختبرة *Staphylococcus aureus* .

التوصيات :

١. دراسة معمقة للتعرف على المركبات الفعالة الموجودة في الصدفة والتعرف على تأثير كل مركب على حدة.

٢. دراسة تأثير المستخلصين العضوي والمائي للنوع الرخوي المدروس تجاه انواع جرثومية وفطرية ممرضة اخرى.

المراجع :

- رجب، ايفا. ٢٠١٤، دراسة بيئية وتصنيفية لرخويات الماء العذب في المجرى السفلي لنهر الكبير الشمالي وبعضا من روافده . أطروحة ماجستير . جامعة تشرين . سورية .
- Anderson, R.S. and Beaven, A.E., 2001. *Antibacterial activities of oyster (Crassostrea virginica) mussel (Mytilus edulis and Geukensia demissa) plasma*. Aquat. Living Resour., 14, 343-349.
- Benkendorff, K., Bremner, J.B. and Davis, A.R., 2001. *Indole derivatives from the egg masses of Muricid molluscs*. Molecules, 6, 70-78.
- Bonne,c.,1941.*zoetwate mosselen en echinostomasis.*Nedelandish-India,101(6),176-179.
- Biemer, J. J. 1973. *Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method*. Annals of Clinical & Laboratory Science, Vol. 3, NO. 2, 135-140.
- Brayner, R.; Ferrari-Iliou, R.; Brivois, N.; Djediat, S.; Benedetti, M.F.; Fievet, F. 2006.*Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium*. Nano Lett. 6, 866–870.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros. J. 2000. *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int. Microbiol., 3, 3–8.
- Cataldo D., Colombo J.C., Boltovskoy D., Bilos C. & Landoni P.2001b. *Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of Corbicula fluminea (Bivalvia) early juveniles*. Environ. Pollut., 112, 379-389.
- Doherty F.G. 1990. *The Asiatic clam, Corbicula spp, as a biological monitor in freshwater environments*. Environ. Monit.Assess., 15, 143-181.
- Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N.R. and Staley, J. T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Springer, USA, 2nd Edition, Vol. 2, P. 1-1135.
- Garrity, G. M.; Bell, J. A. and Lilburn, T. G. 2004. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition, Springer, New York Berlin-Heidelberg, , 401.
- Hubunov ,Z. Trichkova ,T. Kenderov ,L. Kozuharov,D.2013.*Distribution of Corbicula fluminea (Mollusca: Corbiculidae) over an Eleven-Year Period of its Invasion in Bulgaria*. Acta zool. bulg., 65 (3), 315-326p.
- Inza B., Ribeyre F., Maury-Brachet R. & Boudou A. 1997. *Tissue distribution of inorganic mercury, methilmercury and cadmium in the Asiatic clam (Corbicula fluminea) in relation to the contamination levels of the water column and sediment.Chemosphere*, 35, 2817-2836.

- Kubota, Y., Watanabe, Y., Otsuka, H., Tamiya, T., Tsuchiya, T. and Matsumoto, J., 1985. *Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus*. *Comp.* Biochem. Physiol., *82, 345-348.*
- Kiran, N., Siddiqui, G., Khan, A.N., Ibrar, K. and Tushar, P., 2014. *Extraction and screening of bioactive compounds with antimicrobial properties from selected species of mollusk and crustacean*. Clini. Cell. Immunol., 5(1).
- Kwon, H.B., Lee, C.W., Jun, B.S., Yun, J.D., Weon, S.Y., and Koopman, B. 2004. *Recycling waste oyster shells for eutrophication control*. Resour. Conserv. Recycl., 41, 75–82.
- Kubo, M., Ohshima, Y., Irie, F., Kikuchi, M., and Sawai, J. 2013. *Disinfection treatment of heated scallop-shell powder on biofilm of Escherichia coli ATCC 25922 surrogated for E. coli O157:H7*. J. Biomater. Nanobiotechnol., 4, 10–19.
- Klancnik, A.; Piskernik, S.; Jersek, B. and Mozina, S.S. 2010. *Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts*. Journal of Microbiological Methods, Vol. 81, P. 121–126.
- Lam, G.Y.; Huang, J.; Brumell, J.H. 2010. *The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity*. *Semin. Immunopathol.* 32, 415–430.
- Matuschek, E.; Brown, D. F. and Kahlmeter, G. 2014. *Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories*.Clinical Microbiology and Infection, Vol. 20, No.4, 255-266.
- Moreschi,C.A., Callil,T.C., Christo,W.S., Junior,F.L.A., Nardes,C. de Faria,E., Girard,P. 2020. *Filtration, assimilation and elimination of microplastics by freshwater bivalves*. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering.
- Martínez,A.V.G., Díaz,M.L.M.,2020. *A multibiomarker approach to assess toxic effects of wastewater treatment plant effluents and activated defence mechanisms in marine (Ruditapes philippinarum) and fresh water (Corbicula fluminea) bivalve species.* Ecotoxicology.
- Ohshima, Y., Takada, D., Namai, S., Sawai, J., Kikuchi, M., and Hotta, M. 2015. *Antimicrobial characteristics of heated eggshell powder*. Biocontrol Sci., 20, 239–246.
- Packia Lakshmi, N.C.J., Viveka, S., Anusha, S., Jeeva, S., Rajabrindha, J. and Selva Bharath, M., 2014. *Antibacterial activity of fresh water crab and snail and isolation of antibacterial peptides from hemolymph by SDS-PAGE*. Int. J. Pharm. Sci., 7(1), 109-114.
- Pirbalouti, A.G.; Malekpoor, F.; Enteshari, S.; Yousefi, M.; Momtaz, H.; Hamedi, B. 2010. *Antibacterial Activity of Some Folklore Medicinal Plants Used by Bakhtiari Tribal in Southwest Iran*. International Journal of Biology, Vol. 2, No. 2, P. 55-63.

- Sawai, J.; Shiga, H.; Kojima, H.2001. *Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder*.Int. J. Food Microbiol. 71, 211–218.
- Sawai, J., Shiga, H., and Kojima, H.2001. *Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder*. Int. J.Food Microbiol., 71,211-218.
- Sawai, J., Satoh, M., Horikawa, M., Shiga, H., and Kojima, H.2001.*Heated scallop-shell powder slurry treatment of shredded cabbage.* J. Food Prot., 64, 1579-1583 .
- Stankic, S., Suman, S., Haque, F., and Vidic, J. 2016. *Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties*. J. Nanobiotechnol., 14, 73.
- SMITH, G, D. Pennak,s.2001. *freshwater invertebrates of the United States: Porifera to crustacean*.4th ed. P327-400.
- Vennila, R., Kumar, RK., Kanchana, S, Arumugam, M. and Balasubramanian, T., 2011. *Investigation of antimicrobial and plasma coagulation property of some molluscan ink extracts: Gastropods and cephalopods.* Afr. J. Biochem. Res., 5, 14-21.
- Yang,S., Peng,Z., Wang,L., Wang,T. Yang,C., 2019.*Calcinated Shell Powder from Corbicula fluminea as a Natural Antimicrobial Agent for Soybean Curd (Tofu) Preservation* . Japanese Society for Food Science and Technology . 25 (4), 545_553.