مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد التاسع عشر - المجلد الثاني - علوم الحياة - كانون الثاني 2022 م
doi.org/10.52866/esj.2022.02.19.10

فعالية المستخلص الكحولي لطحلب *Enteromorpha chatharata* ضد بعض الاحياء المجهرية المرضية المعزولة من مناطق مختلفة في بغداد

منى كريم محمد جواد*, زبيدة عبداللطيف أسماعيل*, دينا يوسف محمد**
*قسم علوم الحياة /كلية التربية /الجامعة العراقية- بغداد - العراق
** قسم علوم الحياة/كلية العلوم / الجامعة المستنصرية - بغداد -العراق

الخلاصة

تم عزل الطحلب الخيطي الاخضر *Enteromorpha clathrata* من ثلاث مناطق مختلفة في بغداد (الراشدية والجادرية وعرب جبور) وبلغت محصلة الاستخلاص باستخدام الكحول الايثانولي الحار و البارد (8 – 12)٪ على التوالي . تم اختبارها ضد مجموعة من المايكروبات المعزولة من اخماج الجروح والحروق وهي : (*S. aureus* و *S. epidermidis* و *E. coli* و*K. oxytoca* و *A. niger* و *P. digitatum* و *C albican.*) .

حيث كان المستخلص الكحولي الحار لطحلب *E. clathrata* أكفأ في تأثيره على البكتريا و الفطريات بتركيز(200 ملغم / مل) من المستخلص الكحولي البارد، حيث بلغت معدلات أقطار مناطق التثبيط البكتريا (20.00 و 22.67 و23.33 و27.67) والفطريات (29.00 و12.00و 18.67) ملم لكل من :(*S. aureus* و (*S. epidermidis* و(*E. coli* و *K. oxytoca*) (و *A. niger* و *P. digitatum* و *C.. albican*) على التوالي مقارنة مع معدلات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص البارد وللتركيز نفسه (13.33 و 12.67و 12.00 و11.33) والفطريات (23.00 و 9.32 و 13.67) ملم وعلى التوالي. .

بينت نتائج الكشف الاولي للمركبات الكيميائية الفعالة الموجودة في المستخلص الكحولي الحار (الاستخلاص بجهاز السكسوليت)والبارد للطحلب *E. clathrate* احتوائها على المركبات الفينولات و القلويدات والفلافوندات وغياب السيتيرويدات والتانينات في كلا المستخلصين، اما الكلايكوسيدات والكومارينات فقد وجدت في المستخلص الكحولي الحار فقط، في حين ان الصابونيات وجد فقط في المستخلص الكحولي البارد. ولم تظهر نتائج فحص قدرة انحلال الدم للمستخلص الكحولي الحار مقدرة المستخلص على تحلل الدم حتى بعد مرور 24 ساعة الا ان المستخلص البارد اظهره قدرة على تحلل الدم ظهرت بعد 24 ساعة.

كما أظهرت نتائج التحري عن المحتوى الكيميائي من المواد الفعالة باستعمال تقنية الـ GC-Mass Spectrophotometer احتواء مستخلص لطحلب *E. clathrata* الذي أظهر كفاءة عالية في تثبيط نمو الأحياء المجهرية المعزولة من خمجات الجروح والحروق لاحتوائهما على العديد من المركبات أعلاه ذات التأثيرات البايولوجية ضد المايكروبية .

أخيراً، أظهرت نتائج المستخلص الكحولي لطحلب *E. clathrata* احتواءه على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة. وكانت أعلى نسبة مئوية للمساحة للمركب الكيميائي (Tetradecenal) في المستخلص الكحولي الحار والبارد حيث بلغت : 38.89 ٪ و 40.71 ٪على التوالي .

الكلمات المفتاحية: الطحالب الخضراء ، *Enteromorpha clathrata* ، المستخلص الكحولي ، نشاط تثبيطي .

Activity of alcoholic algal extract of *Enteromorpha clatharata* against some infection microbes that isolated from different region in Baghdad

Muna Kareem Mohammed*, Zubaida A.lateef I smail* , Dina Yousif Mohammed**
* Department of Biology., College of Science, Aliraqia University Baghdad-Iraq.
** Department of Biology., College of Science, Mustansiriyah University Baghdad-Iraq

Abstract:

The current study included the isolation and identification of Macro-alga *Enteromorpha clathrate* within its local water environment, from AL- Rashidiya, AL-Jadriya, and Arab Jabour regions (North, Medial and Southern Baghdad). An alcoholic the algal was extracted used hot and cold ethanol solvent , and then effectiveness tested at concentration (25,50,100 and 200) mg/ml by measuring the diameter of the bacteria and fungi inhibition zone growth that isolated from wound infections, namely: *Staphylococcus aureus , Staphylococcus epidermidis ,Escherichia coli ,Klebsiella oxytoca , Aspergillus niger , Penicillum digitatum* .and *Candida albican* .

The percentage yields of extracts of (Hot - Cold) for E. clathrate were Ethanol (8-12) % .

The hot ethanol extract of *E. clathrata* achieved a higher efficiency that the cold extract in its effect on the bacteria and fungi at concentration of 200 mg /ml, the diameter of Inhibition zone were (20.00, 22.67, 23,33 and 27.67) mm and fungi (29.00, 12.00 and 18.67) mm for *S. aureus , S. epidermidis ,E.coli ,K. oxytoca , A. niger , P. digitatum* .and *C.albican*. respectively , compared to diameter of Inhibition zone of cold ethanol extract at the same concentration which were (13.33,12.67.12.00 and 11,33) mm and fungi (23.00, 9.32 and 13.67) mm respectively.

The results of the primary detection of the active chemical compounds in hot and cold *E. clathrata* extract were shown present of Phenols, Alkaloids and Flavonoids, and the absence of Steroids and Tannins in both extracts. The Glycosides and Coumarins were found only in the hot alcoholic extract, while the Saponins were only found in the cold alcoholic extract. The results of the hemolysis ability test of the hot alcoholic algae extract did not show the ability of the extract to blood lysis even after 24 hours, but the cold extract showed the ability to blood lysis appeared after 24 hours.

Finally, the results indicated that the ethanol extract of *E. clathrata* have a lot of active chemical. The highest percentage of the chemical compound area was (Tetradecenal) in hot and cold extracts, were: 38.89 %and 40.71% respectively.

Key words: Green algae, *Enteromorpha clathrata* , Alcoholic extract, Inhibin activity .

المقدمة

تعد الطحالب المنتج الاول والرئيسي للغذاء وللأوكسجين على وجه الأرض، حيث انها كائنات ذاتية التغذية Autotrophic تحول المادة غير العضوية إلى مواد عضوية بعملية البناء الضوئي Photosynthesis وذلك لاحتوائها على صبغة الكلوروفيل(السعدي وسليمان، 2006 و2020 ,.Larkum *et al*). كما تمتاز ببساطة تركيبها من حيث افتقارها لجذر وأوراق وساق، علاوة على عدم وجود الأنسجة الوعائية الناقلة.

(الخشب واللحاء)(مولود وأخرون، 1990) .

أما تراكيبها التكاثرية فهي بسيطة جداً، لا تكون جنين حقيقيا و غير محاطة بجدار عقيم لا ترتقي إلى مستوى التباين الخاص بالنباتات الراقية (Lee, 2019).

إن الانتشار الواسع للطحالب في البيئات المختلفة كونها ذاتية التغذية Autotrophic جعلها مادة اساسية ومهمة للإنسان على المستوى الصناعي والعلاجي وكذلك لها أهمية واسعة للكائنات الأخرى، إذ تحتوي هذه الطحالب على مركبات عدة لها فعاليات أيضية مختلفة تسمى نواتج الأيض الثانوي (Secondary metabolites) فعلى المستوى العلاجي والطبي استخدمت الطحالب في المجال الطبي بنحو 2700 ق.م (Hoppe, 1979). حيث استعملت الطحالب والمواد الناتجة منها في علاج العديد من الامراض مثل أمراض القلب والكلى والمثانة فضلاً عن مساهمة مستخلصاتها في تركيب العديد من الادوية المستخدمة في المجال الطبي ولهذا صنفت الطحالب في السنين الاخيرة بوصفها مصدراً جديداً في علم العقاقير (Dembitsky, 2006و).

وكانت المركبات الفعالة الناتجة من المستخلصات الطحلبية الداخل خلوية Intracellular والمستخلصات الطحلبية الخارج خلوية Extracellular من البدائل القوية التي فرضت نفسها بشدة على الساحة العلاجية، إذ تمتلك تلك المركبات – بعامة– العديد من الخواص العلاجية مثل: مضادات للبكتريا ومضادات للفطريات ومضادات الطحالب فضلاً عن مضادات الأورام ومضادات السرطان أو واقية من أمراض السرطان وغيرها من الأستطبابات العديدة (Kellam et al.,2008).

وبالنظر لكثرة استعمال الطحالب بوصفها مصدراً جيدا للعقاقير وذلك لسهولة استعمالها مقارنة بالأدوية الكيمياوية الصناعية التي لها تأثيرات جانبية، لذا أجريت هذه الدراسة على طحلب *Enteromorpha clathrata* لتحري عن المركبات الفعالة الموجودة في هذا الطحلب الاخضر من خلال عمل مستخلص كحولي (حار وبارد) لمعرفة تأثير وفعاليتها الحيوية ضد الإصابات البكتيرية والفطرية الملوثة للجروح والحروق.

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات

حددت ثلاث مناطق مختلفة من محافظة بغداد والموضح مواقعها في الشكل بدأ بتاريخ 2020/ 7/ 7 وحتى 7/ 9/ 2020 بين الساعة الثامنة وحتى العاشرة صباحا تم جمع عينات الطحالب الكبيرة (Macro algae) من ثلاث مناطق مختلفة (الراشدية، الجادرية وعرب الجبور) شمال و وسط وجنوب مدينة بغداد على التوالي. جمع العينات الطحلب الخيطي الاخضر *Enteromorpha clathrate* يدويًا من مبازل تصريف الري الذي يصرف مياهها مباشرة إلى نهر دجلة، وتم إحضار جميع العينات إلى المختبر في أكياس بلاستيكية تحتوي على الماء لمنع التبخر وتلف العينات وقد غسلت بماء الصنبور عدة مرات لإزالة الرمل

والعصي الخشبية والأوساخ والشوائب والقاذورات. بعدها تم تجفيف العينات الطازجة بالهواء في درجة حرارة الغرفة وطحنها إلى مسحوق باستخدام خلاط كهربائي وتخزينها في أكياس بلاستيكية في مكان جاف لحين الاستخدام.

الشكل (1) يبين مناطق الدراسة

2- تحضير المستخلصات الكحولية:

لتحضير المستخلص الكحولي البارد بإضافة 20 جرام من مسحوق الطحالب المجففة إلى 250 مل من مذيب الكحول الايثانولي بتركيز 99٪ (15درجة مئوية). تم خلط المستخلص جيداً وحفظه في حاضنة هزازة لمدة 72 ساعة. بسرعة 25 دورة في الدقيقة ثم يتم تصفيتها من خلال شاش معقم و ورق ترشيح رقم 1. تم أخذ مادة الترشيح وتركيزها من خلال التبخير في حمام مائي عند 80-70 درجة مئوية ، بينما تم تحضير المستخلصات الكحولية الحار عن طريق استخلاص بجهاز السوكسيليت. في هذه العملية ، تم استخلاص 20 جرام من مسحوق الطحالب المجففة لمدة 5-4 ساعات مع (250 مل) من مذيب الكحول الايثانولي بتركيز 99٪، وتم تجفيف ووزن الرواسب الناتجة عن كل مذيب ثم حفظها في أنابيب اختبار معقمة مخزنة في الثلاجة لحين الاستخدام.

3- تحضير الأوساط الزرعية:

استعملت الأوساط الزرعية لإجراء التجارب تم تحضير المزارع الجرثومية باتباع الخطوات التالية:

1. وزن مسحوق الوسط الجاهز الجاف وحسب التعليمات المثبته على علبه الوسط.
2. اذيبت في حجم الماء المقطر المحدد في التعليمات، وغالباً ما يكون لتر وتتم الاذابة اما بالتحريك او قد يحتاج الى التسخين.
3. وزع المحلول (الوسط) في انابيب اختبار وغطيت .
4. وضعت الانابيب او القارورة (اذا كان الوسط صلبا) في جهاز التعقيم بالبخار لمدة 15دقيقة تحت ضغط 15باوند / انش، ودرجة الحرارة 121م لهدف التعقيم.
5. اخرجت من الجهاز وانتظار حتى تبرد قليلا وتصب في اطباق معقمه من اطباق بتري في جو خال من تيار هوائي على طاولة نظيفه ومعقمة (hood) ومحاطة بلهب بنسون مشتعل،وتبقى الاطباق مفتوحة حتى لايتكثف البخار على غطاء الطبق بعد التجميد تحفظ في الثلاجة اذا كان الوسط سائلا فلا داعي للصب وتخرج الانابيب من جهاز التعقيم، وينتظر حتى تبرد ثم تحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام .

4- تم تحضير محلول المخزون (STOCK) لكل مستخلص

وذلك من خلال اذابة 2 غم بـ 5 مل من DMSO المناسب، ثم يكمل الحجم حتى يصل إلى 10 مل أي ما يعادل 200 ملغم / مل ويتم عمل سلسلة تخافيف نصفية .

اسم الاحياء المجهرية	مصـدر الإصـابة
Aspergillus niger	تقرحات الجلد
Candidia albican	التهاب القدم ، تقرحات الجلد
Penicillium digitatum	تقرحات الجلد
Klebseill oxytoca	الجروح
Escherichia coli	الجروح
Staphylococcus aureus	الجروح
Staphylococcus epidermidis	الحروق

الشكل (2) يبين العزلات البكتيرية والفطرية قيد الدراسة

5- دراسة تأثير المستخلصات الطحلبية في نمو العزلات البكتيرية والفطرية

- اتبعت طريقة الانتشار في الحفر
(The Agar - Well Diffusion Methode)
- بحسب ما يلي وبثلاث مكررات:
(Bonev, 2008).

- لقح سطح أكارالبطاطا والدكستروز (Potato Dextrose Agar) لعزلات الفطرية واكار مولر هنتون (Muller Hinton Agar) لعزلات بكتريا، بوساطة قطينة معقمة (Steril Swab) من مزروع البكتريا الذي بعمر 24 ساعة ومزروع الفطريات بعمر 72 ساعة و الحاوي على (1.5×10^8 خلية / مل).
- عملت حفر بقطر 5 ملم في الوسط المزروع بوساطة الثاقب الفليني المعقم (CorkBorer) بواقع خمسة حفر في الطبق.
- أضيف 0.2 مل من تراكيز المستخلصات المذكورة آنفا لكل حفرة على انفراد بوساطة ماصة دقيقة Micropipete وبالتسلسل وعملت حفرة السيطرة المتمثلة بإضافة ماء مقطر معقم ولكي نسمح لتراكيز المستخلصات بالانتشار عبر الوسط وضعت الأطباق في الثلاجة بدرجة حرارة 4°م ولمدة نصف ساعة و حضنت بعدها اطباق البكتريا بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة .في حين حضنت اطباق الفطريات بدرجة حرارة 2 ± 28°م ولمدة 72 ساعة. وقد تم تحديد الفعالية كل تركيز من المستخلصات بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition 0

6- التأثيرات الحيوية لمستخلص الطحلب

- تأثير مستخلص الطحلبي على أنحلال دم الانسان Hemolysis : وضع 250 مايكرولتر من المستخلص الكحولي (الحار والبارد) للطحلب الى 2 مل من الدم في انابيب حاوية على مانع التخثر لملاحظة تحلل الدم مع استعمال نموذج (سيطرة) بدون استعمال مادة مانعة للتخثر (Noman, 2003).

تأثير مستخلص الطحلبي في وسط قاعدة أكار الدم :

تم أجراء تجربة تأثير المستخلصات على وسط (Blood agar) وتم ملاحظة اقطار التحلل لكل مستخلص وقد استخدم التركيز (200) ملغم/ مل

لمعرفة التأثير السمي للمستخلصات المختلفة خارج الجسم الحي The agar -well Diffusion meth-od أستعمل وسط الاكار بطريقة الانتشار وحسب (In vitro) عملت حفر بقطر 5 ملم على سطح الوسط بواسطة ثاقب فليني ووضعت التراكيز الموجودة لكل مستخلص بمقدار 50 ميكروليتر لكل حفرة مع بقاء حفرة السيطرة تحتوي على ماء المقطر، حضنت الاطباق بدرجة (37) م° لمدة (24)ساعة وحددت فعالية المستخلص بقياس منطقة التحلل حول كل حفرة (Noman, 2003).

7- الكشوفات الكيميائية لبعض المكونات الفعالة

طبقت بعض الكشوفات على المستخلص الطحلبي (الحار والبارد) بالاعتماد على طريقة (Har-bone,1984) المحورة والتي اظهرت فعالية عالية ضد مايكروبية:

1. **الكشف عن الكلايكوسيدات** (Glycosides):

تم إجراء الفحص بإضافة (2) مل من كاشف بندكت إلى (1) مل من المستخلص الموضوع في أنبوبة اختبار ثم رج المحلول جيداً ووضع في حمام مائي مغلي لمدة (5) دقائق، ثم تركت الأنبوبة لتبرد . دل ظهور راسب أحمر على وجود الكلايكوسيدات (Bandiola, 2018).

2. **الكشف عن الفينولات** (Phenols)

كشف عنها باستعمال محلول كلوريد الحديديك (Ferric chloride) والذي حضر بإذابة ملح كلوريد الحديديك في الماء المقطر بنسبة (1٪). يعطي هذا الكاشف لوناً أخضر أو أزرق عند إضافته إلى كمية المستخلص الموجودة في زجاجة الساعة الحاوية على المركبات الفينولية (Kujur et al., 2010).

3. **الكشف عن القلويدات** (Alkaloids)

لإجراء هذا الكشف استعملت إحدى هاتين الطريقتين :-

- كاشف ماركيز الذي يعطي اللون الرمادي المحبب دليلاً على وجود القلويدات .
- كاشف ماير الذي يعطي راسباً ابيضاً دليلاً أيضا على القلويات (Kujur 2010 *et al*,.).

4. **الكشف عن التربينات** (Terpenes) **والستيرويدات** (Steroids) : تمت إذابة (1) مل من المستخلص في قليل من الكلوروفورم بعدها اضيفت إليه قطرة من الاستايل اللامائي (Acetic Anhy-dride)، وقطرة من حامض الكبريتيك المركز، ظهر لون بني دليل على احتواء المستخلص على تربين وإذا ترك المزيج لفترة وظهر لون أزرق داكن دل ذلك على أن المستخلص حاوٍ على الستيرويدات (Ban-diola, 2018).

5. **الكشف عن الراتنجات** (Resins) :

- اتبعت الطريقة التي وردت في (الشيخلي، 1983)، للكشف عن الراتنجات.
- اخذت (10) مل من كل مستخلص وأضيف له(20) مل ماء مقطر محمض بحامض الهايدروكلوريك (4٪) HCl ، وقد استدل على وجود الراتنجات بظهور عكورة (Turbidity)

6. **الكشف عن الصابونينات** (Saponines)

أجري الكشف بحسب ما ورد في (Kujur , 2010 *et al*.,) باتباع الطريقتين في أدناه :

حضر محلول مائي للمسحوق الطحلبي في أنبوبة اختبار ثم رج بشدة، لحين ظهور رغوة كثيفة تبقى لعدة دقائق دلالة على وجود الصابونين. وبإضافة (1 - 3) مل من محلول كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ بتركيز (1٪) على (5) مل من المستخلص الطحلبي، ويعد ظهور راسب أبيض دليل على إيجابية الفحص.

7. **الكشف عن التانينات** (Tannins)

اتبعت الطريقة التي وردت في طريقة (Bandiola, 2018)، للكشف عن التانينات.

تم الكشف بغلي (10) غم من المسحوق الطحلبي في (50) مل من الماء المقطر ثم رشح المحلول وترك ليبرد، بعدها قسم الراشح إلى قسمين أضيف للقسم الأول محلول (1٪) خلات الرصاص Lead acetate للاستدلال على وجود التانينات بظهور راسب أبيض هلامي القوام . بينما أضيف للقسم الثاني محلول (1 ٪) كلوريد الحديديك Ferric Chloride حيث يدل ظهور اللون الأخضر المزرق على وجود التانينات.

8. **الكشف عن الفلافونات** (Flavones)

اعتمدت الطريقة الواردة في (Kujur etal, 2010) للكشف عن الفلافونات ، فقد حُضر محلول الكشف بإضافة (10) مل من الكحول الاثيلي وبتركيز (50٪) إلى(10) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) وبتركيز (50٪) أيضاً، وعند مزج كميات متساوية من هذا المحلول و المستخلص الطحلبي ، يدل ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات.

9. **الكشف عن الكومارينات** (Coumarines) .

كشف عن الكومارين حسب ما ذكر في (Geisman , 1962) .

وضع قليل من المستخلص الطحلبي لكل من المستخلصات المذكورة سابقاً في أنابيب اختبار وغطيت الأنابيب بأوراق ترشيح مرطبة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) المخفف ووضعت الأنابيب في حمام مائي (Water bath) مغلي لبضع دقائق ثم بعد ذلك عرضت أوراق الترشيح إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية، إذ يدل ظهور لون أصفر مخضر براق على وجود الكومارين.

10. **الكشف عن الزيوت** Oil

اتبعت طريقة (Bandiola, 2018) من خلال فحص بقعت الزيت المتكونه حيث توضع كمية 1غم من المستخلص بين ورقتين ترشيح لمدة 10 دقائق ظهور بقعة الزيت على الورق دليل على وجود زيوت ثابتة

8- **تقدير الرقم الهيدروجيني للمستخلص** (pH)

خلط (10) غم من المسحوق الطحلبي الجاف مع (50) مل من الماء المقطر مع الرجّ اليدوي المستمر، ثم تم خلطه ومجانسته باستخدام الخلاط المغناطيسي (Magnetic stirrer) لمدة (10) دقائق، ورُشحّ المحلول و اختبر باستعمال كل من أوراق زهرة الشمس وبجهاز (Shihata,1951) (pH meter).

9- **استعمال تقنية الغاز كروموتوكرافي الكتلية** (GC-Mass)

تم استعمال تقنية (GC-Mass) الموجود في وزارة العلوم والتكنلوجيا للكشف عن المركبات الفعالة الموجودة في مستخلص الايثانولي الحار والبارد للطحلب باتباع نظام حراري خاص .

10- **التحليل الاحصائي**

تم تحليل النتائج احصائياً لدراسة تأثير تركيز المستخلصات الكحولية للطحلب في معدّل أقطار التثبيط (ملم) ونوع البكتيريا والفطريات طبقا لطريقة تحليل التباين للتصميم تام التعشية Complete jRandomized Design(CRD) على وفق ماجاء في الساهوكي ووهيب (1990)، واستخدم لذلك البرنامج الاحصائي الجاهز(ANOVA) نظم الرزمة الاحصائية الاجتماعيةSocial Package Statistical System (SPSS).

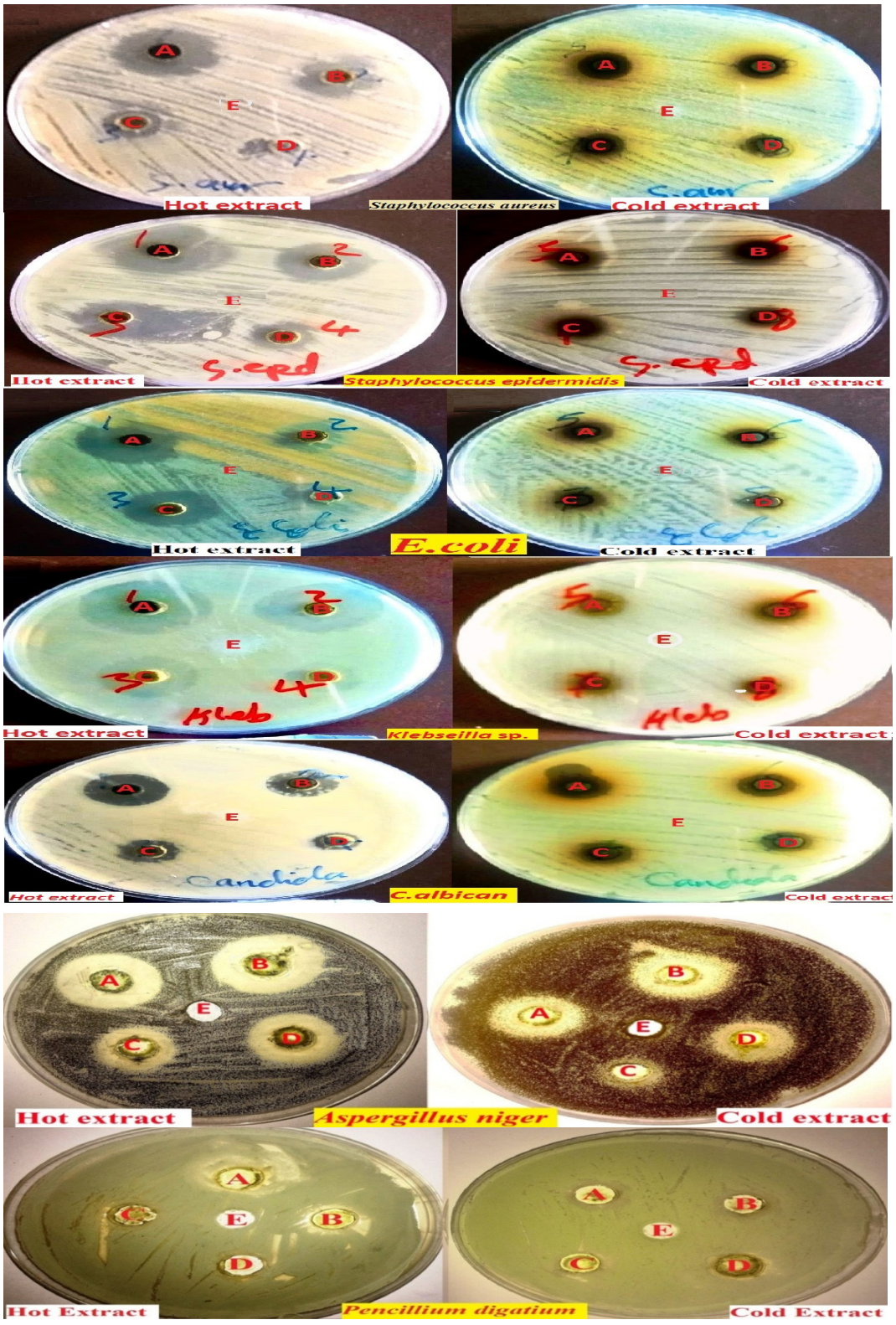
النتائج والمناقشة

يعد طحلب *E.clathrata* والعائد الى عائلة Ulvaceae واحداً من الطحالب الخضر الخيطية المتعددة الخلايا شبيه بالشعر والمتفرعة تفرعا حقيقيا ومتعاقبا يتواجد في المياه العذبة والمالحة ملتصقاً، خلاياه أسطوانية الشكل، أما الأفرع الجانبية فهي أصغر حجماً من المحور الرئيس، وممكن ان يصل طول الخلايا مجتمعة الى اكثر من متر، جدار الخلية مكون من عدة طبقات سليلوزية يكون سميكا والبلاستيدة الخضراء شبكية متعددة البايرونويد ذات لون اخضر مسود او اخضر مائل لبني كما في (الشكل 3و4) وغالبا ما تحتاج الى اجسام صلبة (مثل الصخور) لكي تلتصق بها ثم النمو والاستطاله وهذا يتفق مع ما جاء به كل من Fish and Fish and (1989) .

الشكل (3) طحلب *Enteromorpha clathrata* تحت المجهر (X 10)

ان البكتيريا الموجبة لصبغة كرام المتمثلة بـ *S.aureus* قد أظهرت تحسُسا واضحا لتراكيز المستخلص الكحولي الحار لطحلب *E.clathrata*، يمكن أن يفسّر ذلك لطبيعة جدار البكتيريا الموجبة لصبغة كرام إذ تكون نفاذيته للمواد اكثر من جدار البكتريا السالبة للصبغة (Kandhasmay and Arunachalam, 2018، 2009 ; Taskin *et al.*, 2010) .

إن المادة الفعالة المستخلصة من الطحالب أثرت في البكتريا الموجبة لملون كرام أكثر من تأثيرها في البكتريا السالبة لملون كرام، وهي ذات النتيجة سجلت من قبل Ghasemi *et al*.(2017) والكبيسي وآخرين (2009)، ويعود ذلك إلى أن البكتريا السالبة لملون كرام أقل تحسساً للمركبات الفعالة من البكتريا الموجبة لملون كرام كونها تحتوي على جدارخلية متكوُن من عدة طبقات وهذا يجعلها أكثر صعوبة لأختراق المواد الفعالة ضد جدار الخلية (Ordog *et al*., 2014).



شكل (4) : تأثير مستخلص الايثانولي الحار والبارد لطحلب Enteromorpha clathrata ضد انواع مختلفة من المايكروبات باستخدام طريقة الحفر .

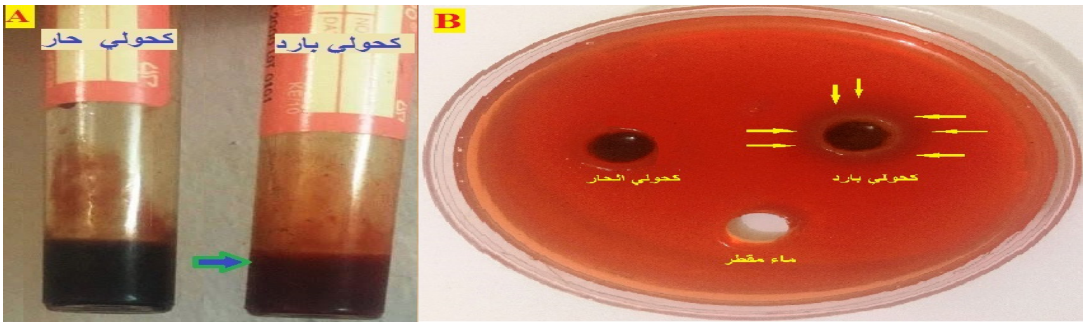
A- التركيز 200 ملغم / مل.
B- التركيز 100 ملغم / مل.
C- التركيز 50 ملغم / مل .
D- التركيز 25 ملغم / مل.
E- السيطرة .

إن ما تم ملاحظته عن عدم حساسية البكتيريا المختبرة لبعض التراكيزقد يكون بسبب إنخفاض المواد الفعالة في التراكيز ونسبة التأثير تتناسب طرديا مع تركيز المستخلص، بحيث كلما زاد تركيز المستخلص ازدادت نسبة التثبيط وهذه النتائج تتفق مع (Elnabris *et al*, 2013).

أن تفوق المستخلصات الطحلبية في التأثير على البكتيريا والفطريات المختبرة أكثر أماناً من المضادات تجعلنا نتجه إلى الطب البديل واستخدام مثل هذه الطحالب في مقاومة الميكروبات بدلاً من استخدام المضادات الحيوية التجارية خصوصاً بعد التقارير والتحذيرات الصادرة عن منظمة الصحة العالمية والتي أشارت إلى الطفرات التي حدثت وما زالت تحدث للخلايا الميكروبية وجعلها اكثر مقاومة لأغلب المضادات الحيوية المعروفة والتي كانت فيما سابق ذات فاعلية كبيرة ضد الميكروبات (منظمة الصحة العالمية WHO, 2020).

تأثيرات الحيوية لمستخلص الطحلبي على أنحلال دم الانسان Hemolysis

أظهرت النتائج فعالية الكشف عن التحلل لكريات الدم الحمراء للإنسان خارج الجسم الحي (في الانابيب المانعة للتخثر)، قدرة المستخلص الكحولي البارد على تحلل الدم خلال مدة 24 ساعة في حين لم يؤثر المستخلص الكحولي الحار على تحلل الدم. تعد هذه النتيجة مطابقة لما ذكر عن سمية المستخلصات (Abdul- Razak, 2011)، بسبب احتواء ها على مواد فعالة منها الصابونيات والتي هي نوع من مجاميع الكلايكوسيدات وهي سامة للإنسان والحيوان (Saad, 2013 وSalem). إذ تعمل على تحلل كريات الدم الحمراء مسببة أزاله الغشاء البلازمي وتذويب او تدمير الأغشية الدهنية لكريات الدم الحمراء، ثم إفرازها الهيموجلوبين في البلازما. هذه العملية هي نتيجة لعمل مادة خاصة من (hemolysin). في حين اظهرت نتائج على وسط اكار الدم، ان المستخلص الايثانولي البارد قد سبب انحلال للدم من نوع الانحلال ألفا (α-hemolysis) او يسمى انحلال الدم غير مكتمل، حيث نلاحظ تلون الأجار بهالة داكنة مخضرة، حيث يبقى الأكار حول المستخلص دون تغيير، وهذا ما يسمى بانحلال الدم من نوع گاما (γ-hemolysis). بالمقارنة مع معاملة السيطرة (ماء مقطر) الذي اظهر كذلك انحلال للدم من نوع گاما (γ-hemolysis) كما في الشكل (5-4). ومن الجدير بالذكر أن نوع انحلالاً بيتا (β-hemolysis) (الانحلال التام) لم يظهر في المستخلصين حيث كان من المفروض ان تبدو المنطقة المحيطة بالمستخلص مخففة (صفراء) و شفافة.



شكل (5) التأثيرات الحيوية لمستخلص الكحولي لطحلب *E.clathrata*
A: تمثل انابيب الاختبار للمستخلص الايثانولي (البارد والحار) (لاحظ تحلل الدم فقط في انبوبة المستخلص الكحولي البارد)
B: وسط اكار دم الحاوي على مستخلص الايثانولي (البارد والحار) لاحظ تكون هالة خضراء حول المستخلص الكحولي البارد.

الكشوفات الكيمائية للمجاميع الفعالة في المستخلصات الكحولية لطحلب *E.clathrata* .

بينت نتائج الكشف الاولي للمركبات الفعالة الموجودة في المستخلص الكحولي الحار والبارد للطحلب *E.clathrata* احتوائها على المركبات الفينولات والقلويدات والفلافوندات وغياب السيتيرويدات والتانينات في كلا المستخلصين، اما الكلايكوسيدات والكومارينات والزيوت الثابتة فقد وجدت في المستخلص الكحولي الحار فقط، في حين ان الصابونيات وجد فقط في المستخلص الكحولي البارد، وهذا يتفق مع كل من (Shankhadarwar, 2015 و2016 Hansen ,*et al.*). حيث تعتبر القلويدات من المواد العضوية التى تحتوى على عنصر النيتروجين فى تركيبها ولها تأثيرات فيسيولوجية قوية، حتى عندما تكون بتراكيز قليلة جداً (Sirbu 2019 ,*et al.*). أما الفينولات فلها خصائص المادة السامه وهو حامضي بعض الشيء، تتركب من حلقة عطرية متصل بها مجموعة واحدة على الاقل من الهيدروكسيل (OH) حيث تعمل بصورة مزدوجة من جهة هي تنشط نمو الطحلب ومن جهة اخرى تعمل على حمايته (*et al.*, 2016 Hansen و 2019 ,*et al.* Akhtar).

ان وجود الفينولات يتفق مع ما ذكره (Adaika-la *et al*., 2017) ، وربما يعود ذلك الى الاختلافات البيئية لمناطق عزل الطحلب وطرق استخلاصه والمذيب المستخدم (Elnabris etal ,2013) (*et al.*, 2016 Raj) و Sirbu (*et al.*, 2019). أما بالنسبة لغياب وجود السيتيرويدات والراتنجات والتانينات فهذا قد يعود اما لخلو المستخلص من هذي المركبات او فقدانها اثناء عملية الاستخلاص (Shankha-darwar *et al.*, 2015) وهذا يفسر انخفاض القلوية الوسط وظهور قيمة الـ pH المنخفضة وميولها نحو الحامضية سبب وجود الفينولات(et al., Akhtar 2019). تعد الكروماتوغرافيا الغازية طريقة فعالة من أجل فصل وتحديد وكشف المركبات العضوية القابلة للتطاير ومزائج غازية من مركبات لا عضوية مختلفة .

بينت نتائج وجود مجموعة من المركبات الكيمائية مثل: الألكانات والاحماض الدهنية والكيتونات واللالديهايدات والكحولات وغيرها من المركبات (Trimm, 2011) حيث اظهرت نتائج الكروماتوغرافيا الغازية (GC-Mass) للمستخلص الكحولي (الايثانولي) الحار لطحلب *E.clathrata* ان المستخلص متكون من 15 قمة.

اما المستخلص الكحولي (الايثانولي) البارد لطحلب *E.clathrata* فقد اظهر 14 قمة ولابد من الاشارة الى ان نسبة مساحة المركبات الضئيل جداً كانت موجودة في المستخلص الكحولي البارد اكثر منها في المستخلص الكحولي الحار، لا تتجاوز نسبتها (0.01–0.27) اعلى قيمة (0.27) وجدت في المركب Pro-pionic acid واقل قيمة (0.01) وجدت في المركب Dimethylamine .

بينت النتائج التي تم ملاحظتها، ان هنالك اربع مركبات مشتركة بين المستخلص الكحولي الحار والبارد للطحلب وهي: Propionic acid و Tri-decanoic acid وTetramethyl-2- hexadecen و acid Dodecanoic (يعرف كذلك بـ Capric acid) اغلبها تعد مركبات ذات فعالية ميكروبية، وهذا يفسر قدرة المستخلصين في تثبيط الاحياء المجهرية المستخدمة قيد الدراسة بدرجات متفاوتة، وقد يعود سبب هذا التفاوت بين المستخلصين الى ظهور مساحات ضئيلة في المستخلص البارد اكثر منها في المستخلص الحار، بالإضافة فأن طريقة الاستخلاص دور مهم وفعال في اجتذاب المركبات الفعالة واظهارها (Vasudevarao,

2017 و Sravanthi و 2021 , ,Imran *et al*.). فبالرغم من وجود مركبات فعالة عديدة في المستخلص الكحولي البارد الا أن فعاليتها لم تظهر بالشكل المطلوب وقد يعود ذلك الى طبيعة الاستخلاص ونوع السلالات الميكروبية بالإضافة الى قلة تركيز المركبات الفعالة في المستخلص (Roy *et al*.., 2016 و Damonte 2018 ,*et al*.). ومن الجدير بالذكر إن النسبة المئوية للارتفاع المركبات الكيميائية تتناسب طرديا مع نسبة المئوية للمساحة .بينما ينتمي مركب Dodecanoic acid إلى صنف الهيدرو كاربونات التي تمتلك العديد من الفعالية الحيوية ومنها تستعمل كعوامل مضادة للاكسدة و كذلك كزيوت تشحيم وتستعمل لإنتاج الفورمونات (هرمونات حشرية) (Vasudevarao, 2017وSravanthi و 2019 ,Santos *et al*., Sánchez-) .كما سجلت المجاميع من الهيدروكربون كمركبات اساسية وشائعة في المستخلصات الكحولية الخام للطحالب الكبيرة مثل *E.clathrata* and *E. ralfsii* وتعد هذه المركبات ذات فعالية ضد مايكروبية ومقللة من تأثير الجذور الحرة المتكونة في الجسم وكذلك تعمل على زيادة القابلية الدفاعية للجسم خلال أخذها كمحفزات للمناعة (Anisimov, 2013) تعد المركبات (Dodecanoic acid و Tetradecanoic acid) من الحوامض الدهنية المشبعة طويلة السلسة الكاربونية ذات ذيل أليفاتي يحتوي على ما بين 13 و21 ذرة كربون. ذات الفعالية المضادة للأحياء المجهرية (Choi et al., 2013) ولاسيما الفطريات إذ أشار (Yousif 2016, و Dwaish, 2016) إلى إن فعالية هذه الحوامض ضد الفطريات وهذا يعتمد على طبيعة الارتباطات الثانوية التي تحصل في هذه الحوامض .

وتأتي هذه النتائج متطابقة مع ما أشارت إليه (Yousif, 2014 وOumask *et al*., our 2012) من احتواء طحلب Enteromorpha على العديد من المركبات ذات فعالية ضد المايكروبية ولاسيما الفطريات.

أيضاً يتفق مع دراسة (Elnabris 2013 ,*et al*.) التي اشار فيها الى امتلاك طحلب الـ *sp. Entero-morpha* العديد من المركبات ضد البكتيرية .

بالنسبة لمستخلص الكحولي الحار فقد يعزى سبب تثبيطه للبكتريا قيد الدراسة الى احتوائها على مركبات دهنية و بروتينية و ستيرويدية و صبغات لها تأثير مثبط للبكتريا أذ اشارت دراسات سابقة الى ان الصبغات ومشتقاتها مثل الكلوروفيل والكاروتين تكون لها فعالية تجاه البكتريا أذ تم تشخيص مركبين هما Chlorophyl-lide و Phaeophytin وأظهرت لهما فعالية تجاه البكتريا كما أشارت دراسات اخرى الى ان الاحماض الدهنية طويلة السلسلة (أكثر من 10ذرات كاربون) لها فعالية مضادة للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام أذ تمتلك الاحماض الدهنية المنفردة أو المجتمعة اما تأثيراً تثبيطياً Bacteriostatic وأما قاتلاً Bacteriocidal في البكتريا (Al Hazzani 2014, ,*et al*., و2018 Mashjoor ,*et al*.). ومما يؤكد ان التأثير التثبيطي اذ ان جدران الخلايا البكتيرية الموجبة لصبغةكرام تكون حاوية على مواقع امتزاز لهذه الاحماض في حين تكون البكتريا السالبة لصبغة كرام مقاومة لفعالية الأحماض الدهنية ولهذا وجد أن البكتريا السالبة لصبغة كرام تعيق اختراق الاحماض الدهنية بواسطة الدهون المتواجدة في جدار الخلية وهذا يفسر قابلية هذه البكتريا على مقاومة المركبات الفعالة الذائبة في الدهون (Breijyeh *et al*.., 2020) في الآونة الأخيرة، تم نشر العديد من الأوراق البحثية التي تناقش طرق تصنيع وتكوين وتأثير المستخلصات الطحلبية (Adaikala *et al*.., 2017، و2019 ,Srimariana، و.Mohamed *et al*

2020 و2020،2021 Rodrigues et al., , *et al.*, Imran). وبصورة عامة فأن تكوين المستخلصات يعتمد بشدة على المادة الخام (الموقع الجغرافي للطحالب المقطوعة وأنواع الطحالب) وكذلك على طريقة الاستخلاص. تشمل المركبات النشطة بيولوجيًا التي يتم نقلها من الكتلة الحيوية للطحالب إلى الطور السائل السكريات والبروتينات والأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة والأصباغ والبوليفينول والمعادن وهرمونات وغيرها. لها تأثير مفيد موثق جيدًا على البشر والحيوانات والنباتات، وذلك أساسًا خلال حماية الكائن الحي من الإجهاد الحيوي (النشاط المضاد للبكتيريا، ونبش الجذور الحرة، ونشاط الدفاع عن العائل، إلخ ...) وخلال ما تقدم نستطيع ان نلاحظ ان هذا الطحلب غني بجميع مركبات الأيض الثانوي والتي تم الكشف عنها بجهاز الـ GCmass مما يؤهله لأن يستخدم طبياً لقيمتة الدوائية، و ويضاف ضمن الأعلاف والأسمدة وغيرها من المجالات.

الاستنتاجات Conclusions

توصلت الدراسة الحالية إلى الاستنتاجات الاتية:

1. كان المستخلص الكحولي (الايثانولي) الحار لطحلب *E. calthrata* اكثر كفاءة المستخلص الكحولي (الايثانولي) البارد في تأثيره في البكتريا والفطريات المسببة لالتهاب الجروح .
2. كانت بكتريا *S. epidermidis* (الموجبة لصبغة كرام) هي الأكثر تأثرا لفعل المستخلصات في حين كانت بكتريا *K. oxytoca* (السالبة لصبغة كرام) هي الأقل تأثرا لفعل المستخلصات.
3. كان الفطر(*Aspergillus niger*) هو الاكثر تأثير لفعل المستخلصات في حين كانت الفطر (*Penicillum digitatum*) هو الأقل تأثرا لفعل المستخلصات.
4. لم يظهر المستخلص الكحولي سواء الحار أي سمية على خلايا الدم.
5. احتواء الطحلب على المجاميع الفعالة وهي: الكلايكوسيدات والفينولات والقلويدات والفلافوندات و الصابونين و الكومارينات وغياب كل من : التربينات والراتنجات والستيرويدات والتانينات حسب ما اظهرت الطرق المستعملة في الكشف
6. باستعمال تقنية GC-Mass مكنت من الكشف عن تركيب العديد من المركبات الكيمائية ذات الفعالية ضد المايكروبية مما يؤهلها لأن تستخدم طبيا او في مجالات مختلفة.

التوصيات Recommendations

1. عزل وتشخيص طحالب اخرى من بيئات مختلفة.
2. تحديد المركب المسؤول عن الفعالية ضد المايكروبية وذلك عن طريق عزل المركبات الكيميائية الفعالة بشكل كل على حدة .
3. التوسع في دراسة تأثير المستخلصات على نمو انواع اخرى الكائنات الحية من بكتريا والفطريات فضلا عن الفايروسات والطفيليات ... الخ .
4. إجراء دراسة لمعرفة امكانية استخدام المستخلصات ضد الممرضات داخل الجسم الحي (In Vivo) والتحري عن سميتها لأجل تصنيعها تجاريا .
5. اجراء دراسة كيمياوية لجميع المركبات الفعالة للحصول على مركبات نقية .
6. أجراء دراسة أثر المستخلص الكحولي للطحلب على الخطوط السرطانية.

المصادر

المصادر العربية.

1. **الساهوكي، مدحت ووهيب، كريمة محمد** (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر، الموصل، ص 488.

2. **السعدي، حسين علي وسليمان، نضال أدريس** (2006). علم الطحالب. دار اليازوري العلمية، عمان الأردن

3. **الشيخلي، محمد عبد الستار؛ العزاوي، فريال حسن وفياض، حسن،** (1993) . الكيمياء التحليلية، الجامعة المستنصرية، ص 323–320 .

4. **مولود، بهرام خضر ونضال، إدريس سليمان وابراهيم، توفيق البصام.** (1990). الطحالب والأكيكونات. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر .بغداد.

المصادر الاجنبية:.

5. Abdul- Razak , A.H.,(2011)."The study effects of cytotoxic of cellular alcohol extract on the mice, type Albino ", Baghdad Science Journal Issue, 2 (8):13-17

6. Adaikala, G. Raj ; Jayaraman, M. ; Krishnamoorthy , S. ; Chandrasekaran, M. and Venkatesalu, V.(2017). Screening of Different Extracts of Marine Macro Green Algae for Larvicidal Activity against Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culiadae). International Letters of Natural Sciences, Vol. 62, pp 44-51.

7. Ahsan, T., Chen, J., Zhao, X., Irfan, M., & Wu, Y. (2017). Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by Streptomyces strain KX852460 for the biological control of Rhizoctonia solani AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. AMB Express, 7(1), 1-9.

8. Akhtar,Mohd,Sayeed, Swamy,Mallappa Kumara, Sinniah, Uma Rani .(2019). Natural Bio-active Compounds. Vol 1 springer nature. ISBN 978-981-13-7154-7

9. Al Hazzani, A.A.; Shehata, A.I.; Moubayed, N.M.S. and Al Houri, H.J. (2014).Antimicrobial and biochemical properties of selected edible brown and red marine macroalgae. J. Pure Appl. Microbiol., 8:1275-1282.

10. Anisimov M. M., Skriptsova, A. V., Chaikina, E. L., & Klykov, A. G. (2013). Effect of water extracts of seaweeds on the growth of seedling roots of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench). International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences, 16(2), 282-287.

11. Bandiola , Teresa May B. (2018). Extraction and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants: A Brief Summary. International Journal of Pharmacy 8(1): (137-143).

12. Bonev, Boyan ; Hooper, James and Parisot, Judicaël.(2008).Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61(6) :1295-13-1.

13. Breijyeh ,Zeinab; Jubeh , Buthaina and Karaman, Rafik.(2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. Molecules. 25, 1340: (1-23).

14. Choi J. S., Park N H., Hwang, S. Y., Sohn, J. H., Kwak, I., Cho, K. K., & Choi, I. S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. Journal of Environmental Biology, 34(4), 673.

15. Damonte, E.B. ; Duarte, M.E.R. (2018) .Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. Carbohyd. Res.343, 3085-3095.

16. Dembitsky, V.(2006). Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids .J. of Phycol ., 41(10), 883-924

17. Elnabris, K.J. Elmanama A.A. and. Chihadeh, W.N(2013). Antibacterial activity of four marine seaweeds collected from the coast of Gaza Strip, Palestine. Mesopot. J. Mar. Sci. 28(1): 81 - 92.

18. Fish,J.D.and Fish,S.(1989). A student's guide to the seashore. Unwin Hyman Ltd ,London.
19. Geisman, T. A., (1962). Chemistry of flavonoids compounds. Macmillan Co. New York. pp. 90-101.
20. Ghasemi, Y.; Ameneh ,M. and Abdol,M. (2017).Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from Paddy Fields of Iran :Characterization of antimicrobial Activity of *Chroococcus disperses* Pharm.Biol.2:211-276.
21. Hansen, R. S. ;Escobido ; M. S. O.& Ronaldo R. O.(2016). Evaluation of the biochemical and phytochemical components of green seaweed *Enteromorpha intestinalis* (Linnaeus) in Initao, Misamis oriental, Mindanao, Philippines. International Journal of Biosciences. 9(4): 114-122.
22. Harbone, J. B., (1984). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed., Chapman and Hall. London. pp: 288.
23. Hoppe, H.A.(1979).Marine algae and their products and constituents in pharmacy. In:marine algae in pharmaceutical science (eds.H.A.Hoppe, Levring,T.and Tanka,Y.) . Walter Gruyter,Berlin.25-119.
24. Imran , Md. Abdus Shukur ; Bhuiyan , F. R.; Ahmed , S. R.; Shanzana , P.M.; Moli, A. ; Shakhawat ,H. F. ; Suma Bala Dabi and Mahmudul ,Hasan.(2021). Phytochemical constituency profiling and antimicrobial activity screening of seaweeds extracts collected from the Bay of Bengal Sea coasts. J Adv Biotechnol Exp Ther. 4(1): 25-34 .
25. ISMAIL, Gehan Ahmed ; GHEDA, Saly Farouk ; ABO-SHADY, Atef Mohamed and ABDEL-KARIM, Omnia Hamdy .(2020). In vitro potential activity of some seaweeds as antioxidants and inhibitors of diabetic enzymes . Food Sci. Technol vol.40 no.3.
26. Kandhasmay, M.; and Arunachalam, K.D(2018).Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. African J. of Biotechnology, 7(12):1958-1961
27. Kellam, S.J.; Cannell, R.J.P; Owsianka ,A.M; Walker, J.M(2008).Results of a large-scale screening programmed to detect antifungal activity from marin and freshwater microalgae in laboratory culture. European J. of Phycology, 23(1):45-47.
28. Kujur, R. S., Singh, V., Yadava, H. N., Singh, K. K., Kumari, S., & Roy, B. K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of Stevia rebaudiana in alloxan-induced diabetic rats. Pharmacognosy Research, 2(4), 258-263.
29. Larkum , Anthony W.D. ; Grossman , Arthur R. &Raven, John A.(2020). Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanism. Springer Nature Switzerland AG. ISBN10 3030333965. P 514.
30. Lee, Robert Edward .(2019). Phycology. 5th edition. Cambridge, United Kingdom. P546.
31. Mashjoor, S.; Yousefzadi, M.; Zolgharnain, H.; Kamrani, E. and Alishahi, M. (2018(. Organic and inorganic nano-Fe3O4: Alga Ulva flexuosa-based synthesis, antimicrobial effects and acute toxicity to briny water rotifer Brachionus rotundiformis. Environ. Pollut., 237:50-64.
32. Munir, N.; Rafique, M.; Altaf, I.; Sharif, N.; Naz, S.(2018). Antioxidant and antimicrobial activities of extracts from selected algal species. Bangladesh J. Bot., 47, 53-61.
33. Noman ,Z..(2003) .The effect toxins of the extract plant RBCS on human . Fatah, journal,. 2(43):144-154).
34. Ördögg, V.;Stirk ,W.A; Lenobel, R.; Bancirova ,M.;Strnad, M.;Van Staden, J.;Szigeti J. and Nemeth L.(2014).Screening microalgae for some Potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. Applied Phycology, 16:309-314.
35. Oumaskour, K.; Boujaber, N.; Etahiri .S. and Assobhei,O.(2012). Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco) . African Journal of Biotechnology 11(104), 16831-16837.
36. Raj,G.A. .; Chandrasekaran, M. ; Jegan, S. and Venkatesalu,V. (2016) . Phytochemical Analysis and Antifungal activity of Ulva

ty of extracted green algae silpau (*Dyctyosphaeria versluysii*). Nusantara Bioscience 11(2): 153-156.

46. Taskin, E., Caki, Z., Ozturk, M. and Taskin, E.(2010). Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. African Journal of Biotechnology, 9(27): 4272-4277.
47. Trimm, Harold H. (2011).Organic Chemistry Structure and Mechanisms 1st Edition. Publisher of Humanities, Social Science & STEM Books .ISBN 9781926692609. Page 384.
48. Vasudevarao, B. and Sravanthi, D.J.(2017). GC/MS analysis and In-vitro Antioxidant activity of methanol extract of *Ulothrix flacca* and its main constituent Dimethyl Sulfone. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. Volume 12, Issue 1 Ver. I (Jan. - Feb.2017), PP 93-104.
49. World Health Organization (WHO). (2020). World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals ISBN 978-92-4-000510-5 (electronic version)..
50. Yousif ,Dina Yousif Mohammed and Dwaish ,Ahmed Sahi (2016). Activity of two green algae (*Zygnema stellinum and Hydrodictyon reticulatum*) extracts against some phytopathogenic fungi. EJBPS, , Volume 5, Issue 10
51. Yousif, D. Y. M. (2014). Anti-Phytopathogenic Activity of Macro-algae Extracts Against Fungi. PhD. thesis, College of Science, University of Baghdad.
52. Yuan-Kun,L.(2015) .Commercial production of microalgae in the Asia-pacific rim. Journal of Applied Phycology 9:403-411.
53. Zafar,M. ;Tauseef, A.; Sohaib A. ; Khan,N. and Naman.D.(2020). Escherichia coli: a rare cause of meningitis in immuno-competent adult. J Community Hosp Intern Med Perspect. 10(1): 69-72.
54. Zhao,C. Yang, C. and Liu, B.(2016). Biological activities of green macro algae *Enteromorpha prolifera* for potential applications. MOJ Food Processing & Technology.23,7: (134-42).

Species from the Kanniyakumari Gulf of Mannar, South Coast India. Natural Products: An Indian Journal. Vol12,Iss 3: (1-17).

37. Rodero MP, Khosrotehrani K.(2010). Skin wound healing modulation by macrophages. Int J Clin Exp Pathol. 2010;3:643-53.
38. Rodrigues ,Lima; ; Tilvi ,Supriya ;Fernandes , T. S; Mahesh S. and Mahesh ,S. Majik .(2020). Isolation and Identification of Tyrosinase Inhibitors from marine algae *Enteromorpha* sp. Organic Chemistry journal.17(5):265-71.
39. Roy , S.; Nayak , B.; Roy , M. ; Mitra, A.; Halder D.; Chatterjee ,A. ; Chakraborty , S. and Chakraborty T.(2016). Antimicrobial and Phytochemical Screening of Seaweeds: *Enteromorpha intestinalis and Ulva lactuca* Collected from Indian Sunderbans Delta Region. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. Volume 11, Issue 4 Ver. II, PP 01-05.
40. Saad, Entsar Ali & Habib, Salem.(2013). Effect of crude extracts of some medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes in vitro. The Journal of Free Radicals and Antioxidants. Photon 139 (2013) 265-272.
41. Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In Antioxidants (pp. 1-29). London: IntechOpen.
42. Shankhadarwar, S. D.(2015). Phytochemical screening of marine algae Ulva lacuta (Linn.) and *Enteromorpha intestinalis* (Linn.). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015, 7(12):419-423.
43. Shihata, I.M., (1951). A pharmalogical study of *Anagllis arvensis*. M.D. Vet. Thesis, Cairo University.
44. Sirbu, R. ; Negreanu-Pirjol , T. ; Mirea, M. B.& Negreanu-Pirjol, S.(2019). Bioactive Compounds from Three Green Algae Species along Romanian Black Sea Coast with Therapeutically Properties . European Journal of Medicine and Natural Sciences. Volume 3, Issue 1: (5-15).
45. Srimariana, E. S.(2019). Antioxidant activi-

55. Zhi-You,W. and Feng,C.(2012).Continuous cultivation of the Diatom *f Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: physiological study and process optimization.J.Biotechnol.Prog. 18:21-28.
56. Zorica, S.; Dragana, C.;Jelica, S.;Maja, K.; Dejan, S.(2018).Antibacterial ,antifungal and cytotoxic activity of Spirogyra strains from Serbia. Science in China Series 51 (10):941-947.