وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة البصرة
كلية التربية للعلوم الصرفة

عزل و تشخيص احد قلويدات الأيض الثانوي لبعض الطحالب و دراسة فعاليته الحيوية

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة البصرة
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتواره فلسفة
في علوم الحياة ـ التقنية الحيوية
تقدمت بها

انفال نوري عباس اللفته

ماجستير طحالب 2008

بأشراف

أ.م. د احمد محسن عذبي أ. م .د أقبال جاسم الأسدي

رمضان 1435 هـ حزيران 2015 م

بسم الله الرحمن الرحيم

(وَلَقَدْ آتَيْنَا دَاوُودَ وَسُلَيْمَانَ عِلْمًا وَقَالَا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي فَضَّلَنَا عَلَى كَثِيرٍ مِّنْ عِبَادِهِ الْمُؤْمِنِينَ)

صدق الله العلي العظيم

النمل (آية - 15)

توصية الأستاذين المشرفين

نشهد ان اعداد هذه الأطروحة جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة كجزء من متطلبات نيل درجة دكتواه فلسفة في علوم الحياة (تقنية حيوية) .

اسم المشرف : د. احمد محسن عذبي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التوقيع :

د . اقبال جاسم الأسدي

استاذ مساعد

التوقيع :

التاريخ : التاريخ :

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية المقدمة من قبل الأستاذين المشرفين احيل هذه الأطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

رئيس القسم : أ.د صبيح هليل المياح

المرتبة العلمية : استاذ

التوقيع :

التاريخ :

الأهداء

الى كل قطرة دم غالية سقطت على تراب وطني الحبيب

اهدي جهدي المتواضع

أنفال

الشكر و التقدير

الحمدلله قبل الأنشاء و الأحياء و الأخر بعد فناء الأشياء و الصلاة و السلام على سيد المرسلين محمد و اله الطيبين الطاهرين ..

يطيب لي و انا اضع اللمسات الأخيرة لأطروحتي ان اتقدم بالشكر و الأمتنان الى الأستاذ المساعد الدكتور احمد محسن عذبي و الأستاذ المساعد الدكتور اقبال جاسم الأسدي على ما قدماه من دعم علمي و متابعة مستمرة في سبيل اكمال البحث و على سعة صدرهما و اتمنى لهم التوفيق و السداد .

كما اتقدم بخالص الشكر الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة و رئاسة قسم علوم الحياة متمثلة برئيس القسم الأستاذ الدكتور صبيح هليل المياح وجميع اساتذة القسم الذين لم يبخلوا بأي مساعدة و اخص بالذكر الدكتور باسم هاشم و الدكتور ضياء خليف و الدكتور حسين خلف و الدكتور عماد يوسف و الدكتور فارس شاكر و الدكتور مفيد قاسم فلهم مني جزيل الشكر و الأمتنان.

و اشكر زملائي طلبة الدراسات العليا و بالأخص الصديقات امل صالح و زينب خلف و فله عبد الستار و امل علي ويسرى طارق و اسماء عبد الزهرة و ماجدة صباح .

و بأمتنان صادق اتقدم بالشكر الى عائلتي امي و ابي و اخواتي و اولادي و ما تحملوه معي من الصعوبات و بفضل دعواهم وفقني الله .

اقف عاجزة عن شكر زوجي المرحوم منتظر للمجهود الهائل الذي بذله لمساعدتي في انجاز دراستي و ادعوا الله ان يرحمه بواسع رحمته و يدخله فسيح جنانه .

ختاما فمسكه يكون لمن فاتني ذ كره و غاب عن بالي فضله وفق الله الجميع .

الباحثة

الخلاصة

تم عزل و تنقية ثلاثة انواع من الطحالب اثنان منها يعودان للطحالب الخضر المزرقة و هما الطحلب *Oscillatoria brevis* الذي عزل من شط العرب موقع جامعة البصرة (كرمة علي) والطحلب *Nostoc carneum* الذي عزل من تربة احدى المناطق الزراعية في منطقة ابي الخصيب و نوع اخر يعود الى الطحالب الخضر وهو نوع *Enteromorpha intestinalis* و قد تم عزله من شط العرب من موقع الجامعة (كرمة علي) .

حضر المستخلص الكحولي لهذه الطحالب لمعرفة ما تحتوية من مركبات كيميائية والمستخلص القلويدي لاختبار الفعالية الحيوية و السمية اذ اختبرت السمية الخلوية للمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* تجاه كريات الدم الحمر للأنسان و عند تراكيز مختلفة و لم تظهر اي سمية طول فترة المراقبة ، اما المستخلص القلويدي لطحلب *O.brevis* والطحلب*N. carneum* فقد اظهرا سمية تجاه كريات الدم الحمر للأنسان.

كما اختبرت فعاليته الحيوية لأظهار قابلية المستخلص على تثبيط نمو البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام ، اذ اظهر المستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum* فعالية عالية تجاه البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام بمنطقة تثبيط بلغت 30 مليمتر لكلا نوعي البكتريا تلاه المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* اذ كان مقدار التثبيط 25 مليمتر اما المستخلص القلويدي لطحلب *O. brevis* فقد كان اقلها فعالية اذ بلغ مقدار التثبيط تجاة البكتريا السالبة لصبغة كرام *Escherichia coli* 13 مليمتر اما مقداره تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* فكانت 3 مليمتر وقدر التركيز المثبط الأدنى (MIC) Minimal Inhibitory Concentration تجاه العزلتين البكتريتين المذكوره اعلاه ، بلغ المثبط الأدنى MIC للمستخلص القلويدي الخام للطحلب *E.intestinalis* 12.5 مايكروغرام /مليمتر تجاه البكتريا *E.coli* اما ضد البكتريا *S. aureus* فكانت 6.5 مايكروغرام / مليمتر ، اما

التركيـز المثـبط الأدنـى MIC للمسـتخلص القلويـدي للطحلـب *N. carneum* بلـغ 6.5 مـايكروغرام /مليلتـر ضـد البكتريـا *E.coli* امـا ضـد البكتريـا *S. aureus* فكانـت 6.5 مايكروغرام / مليلتر .

اختبرت فعالية الراشح لطحلبين *N. carneum* و *O.brevis* ضد نمو عزلتي الفطرين *Fusarium spp.* و *Alternaria alternata* ، اظهر الراشح الطحلبي قدرة تثبيطية عالية في تقليص قطر المستعمرة الفطرية في كل التراكيز المختبره .

تباينت المستخلصات القلويدية للطحالب في الدراسة الحالية و المركب القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis* في فعاليتها الضد تأكسدية مقارنة بفيتامين C،اذ كان المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* اعلاهابنسبة مئوية 58 % يليه المركب القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis* بنسبة 55 % و من ثم المستخلص القلويدي للطحلب *N. carneum* بنسبة 40 %.

تم تحديد اختبار الفعالية ضد الخلايا السرطانية العضلية نوع Rhabdo (RMS) myosarcoma cell line لمستخلص القلويدي لطحلب *E. intestinalis* و قد اظهر فعالية و بتراكيز واطئة وصلت الى 0.78 مليغرام/ مليلتر لفترة 24 ساعة اما بالنسبة لفترة 72 ساعة فكان اقل تركيز فعال 1.56مليغرام/ مليلتر ، كما اظهر المستخلص القلويدي للطحلب *E. intestinalis* القابلية على تخفيض الكوليسترول والكليسريدات الثلاثية و الدهون المنخفضة الكثافة و الدهون المنخفضة الكثافة جدا في الأرانب المصابة بأرتفاع نسبة الكوليسترول .

تم تشخيص القلويد المستخلص لطحلب *E.intestinalis* بأستخدام تقنية الأشعة تحت الحمراء Infrared Spectroscopy (IR) وتقنية كرموتوغرافيا الغاز- طيف الكتلة Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-Mass) و اتضح ان المستخلص القلويدي يضم عدد من المركبات و التي تشغل اكبر نسبة مئوية تمثلت بـ Hexadecanamide الذي امتلك نسبة مئوية قدرها 32.98 و زمن احتباس قدره 10.563 دقيقة و Methenamine والذي كانت نسبة المئوية له قدرها 18.64 و زمن الأحتباس 3.839 دقيقة و مركب 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl est والذي امتلك نسبة مئوية 15.16 و زمن احتباس قدره 15.463 دقيقة، اما المستخلص القلويدي لطحلب *N.carneum* يحتوي على ثلاث مركبات متمثلة بالمركبات 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyles, و 9-Octadecenamide (Z)-) و Didecyl phthalate التي لها فعالية مضادة للبكتريا و مضادة للأكسدة .

تـم تنقيـة المركـب القلويـدي Hexadecanamide مـن المسـتخلص القلويـدي لطحلـب *E.intestinalis* على هيئة مادة لزجة نقية و عزل وشخص هذا المركب اعتمادا على الصفات الكيميائية و الفيزيائية للحصول على مكونـة واحدة وقد اظهر هذا المركب فعالية ضد الجراثيم

ت	العنوان	الصفحة

السالبة و الموجبة لصبغة كرام كما اظهر فعالية ضد تاكسدية .

المحتويات

	الفصل الأول : المقدمة و استعراض المراجع	
1-1	المقدمة	1
2-1	الطحالب	5
3-1	الأيوض الثانوي في الطحالب	6
4-1	مركبات الأيض الثانوي المنتجة من الطحالب	9
1-4-1	القلويدات Alkaloid compounds	9
2-4-1	الفينولات Phenolic compounds	10
3-4-1	التربينات Terpenes compounds	11
5-1	دور الطحالب في انتاج المركبات الفعالة حيويا	11
1-5-1	دور الطحالب كمضادات للبكتريا Antibacterial	12
2-5-1	دور الطحالب كمضادات للفطريات Antifungal	14
3-5-1	دور الطحالب كمضادات للأكسدة Antioxidants	17
4-5-1	دور الطحالب كمضادات للسرطانAnti-cancer	18
5-5-1	دور الطحالب كمضادات لأرتفاع الكولسترول Anti hypercholesterolemia	20
	الفصل الثاني : المواد و طرائق العمل	
1-2	تنظيف و تعقيم الزجاجيات	23
2-2	الأوساط الزرعية	23
3-2	جمع العينات المائية	24
4-2	طرق عزل الطحالب	25
1-4-2	طريقة التخفيف	25
2-4-2	طريقة النشر	25
5-2	استزراع الطحلب	26
6-2	تنقية العزلات	26
7-2	تقدير معدل النمو	27
8 -2	اكثار العزلات	27
9-2	تحضير المستخلصات الطحلبية	28
1-9-2	تحضير المستخلص الكحولي الحار	28
2-9-2	تحضير المستخلص القلويدي	28
10-2	الكشوفات الأولية النوعية للمستخلصات	29
1-10-2	كشف الأحماض الأمينية و الببتيدات	29
2-10-2	كشف البروتينات	29
3-10-2	كشف الكاربو هيدرات	29
4-10-2	كشف الكلايكوسيدات	30
1-4-10-2	قبل التحلل الكلايكوسيدي	30
2-4-10-2	بعد التحلل الكلايكوسيدي	30
5-10-2	كشف الفينولات	30
6-10-2	كشف القلويدات	30
1-6-10-2	كاشف دراكندروف	30
2-6-10-2	كاشفا (ماير وواكنر)	31
7-10-2	كشف التانينات	31
8-10-2	كشف الصابونيات	31

9-10-2	كشف الكيومارينات	31
10-10-2	كشف الفلافونيدات	31
11-10-2	كشف التربينويدات الثلاثية	31
12-10-2	كشف الستيرولات	32
11-2	تحديد السمية الخلوية للمستخلصات الطحلبية	32
12-2	الغربلة الأولية للمستخلصات الطحلبية لأختبار فعاليتها الحيوية	32
13-2	اختبار تأثير راشح المزرعة السائلة للطحلبين *Oscillatoria brevis* و*Nostoc carneum* على نمو بعض المزارع الفطرية :	33
14-2	تحديد التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات القلويدية لطحلب *Nostoc carneum* و لطحلب *E.intestinalis*	34
15-2	اختبار الفعالية الضد تأكسدية (قابلية اقتناص بيروكسيد الهيدروجين) للمستخلصات الطحلبية:	35
16-2	عزل و تشخيص المركبات الفعالة للمستخلصات القلويدية بأستعمال جهاز كروموتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة GC-Mass:	35
17-2	فصل مكونات المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* بأستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	35
18-2	عزل مكونات المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* بأستعمال تقنية كروماتوغرافيا العمود	36
19-2	التشخيص الكيميائي للمركب القلويدي المستخلص من الطحالب	36
1-19-2	التشخيص بمطياف الأشعة تحت الحمراء	36
2-19-2	قياس درجة الأنصهار	37
3-19-2	كشف الصهر بالصوديوم	37
1-3-19-2	الكشف عن النتيروجين	37
2-3-19-2	الكشف عن الكبريت	37
3-3-19-2	كشف الحامض الكربوكسيلي	38
4-3-19-2	كشف الذائبية	38
20-2	تأثير المستخلص القلويدي الخام للطحلب *Enteromorpha intestinalis* ضد الخلايا السرطانية	38
21-2	الأختبارات السريرية على الحيوانات المختبرية	40
1-21-2	حيوانات التجربة	40
2-21-2	استحداث حالة ارتفاع الكوليسترول Induced Hyper Cholesteremia	40
3-21-2	تأثير القلويد المستخلص من الطحلب *Enteromorpha intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الحيوانات	41

	المصابة بأرتفاع الكوليسترول	
22-2	الأختبارات الكيميوحيوية	42
1-22 -2	تحديدالكوليسترول الكلي	42
2-22-2	قياس الكليسيريدات الثلاثية	44
3-22-2	قياس مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة	46
4-22-2	قياس البروتينات المنخفضة الكثافة جدا	47
23-2	التحليل الأحصائي	47
	الفصل الثالث : النتائج	
1-3	وصف الطحالب المعزولة	48
1-1-3	الطحلب الأخضر المزرق *Oscillatoria brevis*	48
2-1-3	الطحلب الأخضر المزرق *Nostoc carneum*	49
3-1-3	الطحلب الأخضر *Enteromorpha intestinalis*	50
2-3	معدل النمو	50
3-3	الكشوفات النوعية للمستخلصات الكحولية للطحالب المعزولة	52
4-3	الكشوفات النوعية للمستخلصات القلويدية	54
5-3	اختبار السمية الخلوية للمستخلصات القلويدية:	54
6-3	الغربلة الأولية و اختبار فعالية القلويد المعزول من الطحالب	55
7-3	تأثير راشح المزارع الطحلبية على نمو الفطريات	58
8-3	الفعالية التثبيطية للمركب المعزول من الطحلب*E. intestinalis*	63
9-3	تحديد التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات القلويدية للطحالب	64
10-3	الفعالية الضد تأكسدية (اختبار اقتناص بيروكسيد الهيدروجين) للمستخلصات القلويدية للطحالب المعزولة:	65
11-3	مكونات المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* :	66
12-3	تنقية المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* بأستخدام عمود الفصل :	66
13-3	التشخيص الكيميائي للمستخلصات و المركب المعزول :	67
1-13-3	اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء(FT-IR) :	67
2-13-3	الكشوفات الكيميائية و الفيزيائية للمركب القلويدي	71
14-3	طيف الكتلة : GC – Mass Spectrum	71
1-14-3	طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *N.*	71

	carneum	
2-14-3	طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول للطحلب ***E.intestinalis***	73
3-14-3	طيف الكتلة للمركب القلويدي المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب ***E.intestinalis*** :	75
15-3	الفعالية الحيوية الضد السرطانية للمستخلص القلويدي للطحلب الأخضر ***E.intestinalis***	76
16-3	تأثير المستخلص القلويدي للطحلب على مستوى الكوليسترول في بلازما الأرانب المرتفع الكوليسترول	78
17-3	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب ***E.intestinalis*** على مستوى الكليسيردات الثلاثية في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	80
18-3	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب ***E.intestinalis*** على مستوى الدهون المرتفعة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول :	81
19-3	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب ***E.intestinalis*** على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول :	82
20-3	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب ***E.intestinalis*** على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة جدا في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول :	83
	الفصل الرابع : المناقشة	
1-4	الأنواع الطحلبية المعزولة خلال الدراسة	82
2-4	معدل النمو	82
3-4	الكشوفات النوعية للمستخلصات	84
4-4	السمية الخلوية	85
5-4	الغربلة الأولية و اختبار فعالية للمستخلص القلويدي المعزول من الطحالب	86
6-4	تأثير راشح المزرعة الطحلبية على نمو الفطريات	89
7-4	تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC :	90

8-4	الفعالية الضد تأكسدية (اختبار اقتناص بيروكسيد الهيدروجين) :	91
9-4	طيف الكتلة للمركبات المفصولة بتقنية كروموتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة GC- mass	92
10-4	عزل مكونات المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* بأستعمال تقنية كرموتوغرافيا العمود	93
11-4	الفعالية الحيوية ضد السرطانية للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis* :	94
12-4	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	95
	الأسنتاجات و التوصيات	
	الأستنتاجات	97
	التوصيات	98
	المصادر العربية و الأجنبية	99
	المصادر العربية	99
	المصادر الأجنبية	101

قائمة الصور

ت	العنوان	الصفحة
1	الطحلب الأخضر المزرق *O.brevis*	48
2	لطحلب الأخضر المزرق *N. carneum*	49
3	الطحلب الأخضر *E. intestinalis*	50
4	تأثير المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* A. :B . *S. aureus* : *E.coli*	56
5	تأثيرالمستخلص القلويدي للطحلب *N. carneum* A. *E.coli* :B. *S. aureus :*	57
6	تأثيرالمستخلص القلويدي للطحلب *O.brevis* A. *E.coli* :B. *S. aureus :*	57
7	تأثير راشح مزرعة الطحلب *N.carneum* على نمو الفطر *A. alternate*	59

8	تأثير راشح مزرعة الطحلب *N. carneum* على نمو الفطر *Fusarium*	60
9	تأثير راشح مزرعة الطحلب *O.brevis* على نمو الفطر *A. alternate*	61
10	تأثير راشح مزرعة الطحلب *O.brevis* على نمو الفطر *Fusarium*	62
11	تأثيرالمركب القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على A. B . S. *aureus* : *E.coli*	63
12	مكونات المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis*	66

قائمة الجداول

ت	العنوان	ص
1	الجدول (1) مكونات الوسط الزرعي Chu-10 و المحور من قبل Al-Aarajy ,(1996)	24
2	الكشوفات النوعية للمستخلصات الكحولية الطحلبية	53
3	يوضح الكشوفات النوعية للمستخلصات القلويدية للطحالب المعزولة	54
4	يوضح اختبار السمية للمستخلصات القلويدية للطحالب المعزولة	55
5	اقطار تثبيط النمو للعزلات البكترية القياسية مقدرة بـوحدات ملميمتر للمستخلص القلويدي للطحالب المعزولة	56
6	تأثير راشح مزرعة الطحلب *N. carnum* على نمو المستعمرات الفطرية مقدرا بـوحدات المليمتر	61
7	تأثير راشح مزرعة الطحلب *O.brevis* على نمو الفطريات مقدرا بـ(ملميتر)	62
8	التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات القلويدية	64
9	طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum*	68

10	طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis*	69
11	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي A المعزول من طحلب *E.intestinalis*	70
12	نتائج الكشوفات الفيزيائية و الكيميائية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis*	71
13	طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *N. carneum*	73
14	طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis*	75
15	يوضح الفعالية السرطانية للمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* لفترة 24 ساعة	76
16	يوضح الفعالية السرطانية للمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* لفترة 72 ساعة	77
17	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الأرانب ذات التراكيز المرتفعة الكوليسترول	78
18	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكليسيردات الثلاثية في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	80
19	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المرتفعة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	81
20	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	82
21	تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة جدا في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	83

قائمة الأشكال

ت	العنوان	الصفحة
1	التصنيع الحيوي لمركبات الأيض الثانوية	8
2	يوضح منحنى نمو الطحلب *O. brevis*	51
3	يوضح منحنى نمو الطحلب *N. carneum*	52
4	قابلية المركبات و المستخلصات المعزولة لأقتناص بيروكسيد الهيدروجين	65
5	طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي للطحلب *N. carneum*	68
6	طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis*	69
7	طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي المعزولA من طحلب *E.intestinalis*	70
8	طيف الكتلة للمركب 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyles المعزول من المستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum*	71
9	طيف الكتلة للمركب 9-Octadecenamide المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *N. carneum*	71
10	طيف الكتلة للمركبDidecyl phthalate المعزول من المستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum*	71
11	طيف الكتلة للمركب Hexadecanamide المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis*	74
12	طيف الكتلة للمركبMethenamine المعزول من المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis*	74
13	طيف الكتلة للمركب Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl estالمعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis*	74
14	طيف الكتلة للمركب القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis*	75

15	تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول	79
16	اتاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكليسريدات الثلاتية في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول ،	80
17	الشكل (17) تأثير المستخلص القلويدي لطحلب الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المرتفعة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول	81
18	تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول	82
19	تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة جدا في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول	83

الفصل الاول

المقدمة

واستعراض المراجع

Introduction and literature Review

1-1المقدمة:

ان البحث عن مركبات من اصل طبيعي والتي تكون امنة و غير سامة و فعالة ضد مسببات الأمراض تعد من الأهداف العالمية في الآونة الأخيرة إذ ان الأستعمال الخاطئ للمضادات الحيوية ادى الى ظهور بكتريا مقاومة لها و بذلك لابد من تشخيص مركبات كيميائية فعالة بديلة تستعمل كمضادات حيوية جديدة و قد توالت الدراسات و الأبحاث حول تشخيص مضادات عديدة بعد اختبار فعاليتها الحيوية و معرفة تركيبها الكيميائي (Robbers *et al.*,1996 ; Stephenand Horace, 2000).

منذ اكتشاف البنسليين من قبل العالم Alexander Fleming في اوائل القرن العشرين توالت الأكتشافات للعديد من المركبات الفعالة ذات الاصل الطبيعي من قبل الشركات المصنعة للأدوية ضد مسببات الامراض من الكائنات المجهرية المتمثلة بالبكتريا و الفطريات.(Beutler,2009), ان هذه الجهود ادت الى اكتشاف العديد من الادوية المهمة سريريا و التي استعملت كمضادات حيوية و مضادات للسرطان و غيرها و بالفعل اصبحت هذه المركبات الفعالة المشتقة من اصل طبيعي ادوية فعالة في مختلف مجالات علم الصيدلة ومن

الواضح ان المنتجات الطبيعية لعبت دورا محوريا في انتاج الادوية الجديدة خلال القرن الماضي و الى يومنا هذا.(Koehn and Carter ,2005).

ان المنتج الطبيعي له صفات فريدة و مميزة عن الأدوية الصناعية احدها انه متكون من الكاربون و الأوكسجين و الهيدروجين و بنسبة اقل من النيتروجين و عناصر اخرى مقارنة بالأدوية الصناعية و لها وزن جزئي واطئ (500 دالتون) تقريبا (Ganesan,2008)، و ان اغلب المركبات الفعالة التي اصلها طبيعي هي من منتجات الأيض الثانوي وانها تعتمد على عمليتي التنفس و البناء الضوئي في انتاجها و يتجه العالم اليوم الى التوسع في استخدام النواتج الطبيعية لتصنيع المستحضرات الدوائية بدلا من المركبات ذات الأصل الكيميائي و التي لها اثار جانبية (Perry and Staley , 1997).

ان اكتشاف هذه الادوية يعطينا دروسا قيمة حول كيفية تصاميم الطبيعة للمركبات الكيميائية ذات الفعالية الأحيائية و انها لازالت مستمرة بتزويدنا بمركبات ذات اصل طبيعي فريدة من نوعها و التي لم يتم انتاج مشابه لها من قبل و التي تكون ذات قيمة دوائية جيدة فضلا عن انها تزودنا بمعلومات لفهم النظم الأحيائية للكائنات الحية المنتجة لها و ان غالبية هذه المركبات منتجة في النباتات من خلال عدد من المسارات الايضية و بالأخص من مسارات الأيض الثانوي و التي تعتمد بشكل اساسي على المركبات المنتجة من عملية الأيض الأولي و التي من خلالها يتم الحصول على الكاربون المستعمل في بناء مركبات الأيض الثانوي النشطة بايولوجيا،اشارت بحوث التقانات الحيوية الى ان الكائنات المجهرية ومن ضمنها الطحالب لها القدرة على انتاج العديد من المركبات الفعالة كنواتج للأيض الثانوي و ان اغلب الأنواع التابعة الى الطحالب الخضر المزرقة و الخضر و الحمر و البنية تعد مصدرا غنيا للعديد من المواد الكيميائية الفعالة دوائيا لذا زاد الأهتمام بها حديثا(Burja *et al.*,2001).

ان المركبات المعزوله من الطحالب جذبت الانتباه في السنوات الاخيرة و التي عرفت بأنتاجها مركبات داخل و خارج خلوية ذات فعالية بيولوجية متعددة مثل مضادات البكتريا و مضادات الفطريات و مضادات الفيروسات (Noaman *et al.*,2004) ، ولقد دخلت العديد من المركبات الكيميائية ذات الأصل الطحلبي ذات الفعالة البايولوجية العالية في تطوير الصناعات الدوائية او في صناعة ادوية جديدة (Lima-Fiho *et al.*, 2002; Febles *et al.*, 1995)

ان اول مضاد حيوي تم عزلة من الطحلب الأخضر *Chlorella vulgaris* و الذي يدعى Chlorellin الذي هو مزيج من الأحماض الدهنية ويتميز بفعاليتة ضد البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام و بهذا الأنجاز دخلت الطحالب مع الأحياء الأخرى عالم جديد كونها تعد من المصادر الجديدة و الجيدة لانتاج المضادات الحيوية ضد الممرضات (Pratt *et al.*,1994) ، و تشمل مركبات الأيض الثانوي المنتجة من قبل الطحالب الأحماض الأمينية Amino acids و التربينات Terpenoids و الفلورتانينات phlorotannins و الستيرويدات Steroids و المركبات الفينولية phenolic compounds و الأحماض الدهنية Fatty acids و القلويدات Alkaloids والكلايكوسيدات Glycosids و غيرها من المركبات الفعالة Mtolera (and Semes,1996).

تمثل الطحالب و خاصة ذات الأصل البحري منها فرصة مهمة لإنتاج متأيضات جديدة , ان معدل ما تنتجه الكائنات الحية الأخرى من مركبات جديدة هو اقل من 5% اما الطحالب فأنها تنتج اكثر من 90% من المركبات الجديدة كونها تمتلك قدرة مهمة تتمثل بمرونة الأيض لديها و الذي يعتمد على حالتها الفسلجية (حالة الاجهاد او غير حالة الأجهاد) stressed or not stressed و علاوة على ذلك فانها يمكن ان تتغلب على حالات الأجهاد التي تتعرض لها مثل قلة النيتروجين في الوسط الذي تعيش فيه (Miranda *et al*., 1998).

و تعد اعشاب البحر Seaweeds من المصادر المهمة و التي استخدمت منذ القدم ووفرت امكانات علاجية مذهلة لكلا التطبيقات العلاجية الخارجية و الداخلية على حد سـواء . (Smit, 2004) وان البحث عن مركبات امنة منتجة طبيعيا و غير سامة و فعالة ضد مسببات الامراض تعد من الاهداف العالمية في الأونة الأخيرة و عليه جاءت هذه الدراسة لتحقق بعض هذه الأهداف و ذلك لتأكيد ان العديد من المركبات ذات الأصل الطحلبي فعالة للغاية في تطوير الصناعة الدوائية او في صناعة عقاقير جديدة.

أهداف الدراسة

1. تشخيص و عزل بعض انواع الطحالب الخضر و الخضر المزرقة المتواجدة في بيئة المياة العذبة والتربة و تنقيتها و اكثارها و حصادها.

2. استخلاص و عزل و تشخيص بعض الأيوض الثانوية الفعالة للطحالب المعزولة باستعمال تقنيات التشخيص المتمثلة IR و GC – mass .
3. دراسة الفعالية البايلوجية للأيوض تجاه البكتريا و الفطريات بعد تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) و السمية الخلوية لها .
4. تنقية بعض الأيوض الثانوية من الطحالب المعزولة و بيان قابليتها على خفض الكوليسترول و اختبار فعاليتها كمضادات للأكسدة و السرطان.

2-1 الطحالب Algae:

تظهر الطحالب الكثير من التنوع البيولوجي في اشكالها الخضرية فهي يمكن ان تكون على شكل خلايا مفردة ،او بشكل مستعمرات منتظمة او غير منتظمة أو خيوط متفرعة او غير متفرعة او اشكالا برنكيمية او سايفونية وتمثل هذه الكائنات الأساس في السلسلة الغذائية داخل النظم البيئية المائية و اليابسة اذ أنها تمتلك القدرة الذاتية لأنتاج المركبات العضوية المعقدة من خلال أخذ الماء و ثاني اوكسيد الكاربون بوجود الطاقة الشمسية،و التي يتراكم بعضها في وقت لاحق او تطرح الى محيطها الخارجي،في عمليات الأيض الأولي أو الثانوي. وهي تتواجد في مختلف البيئات كونها تكيفت للبقاء رغم وجود الكثير من الضغوط البيئية–المتمثلة بالتفاوت الكبير بدرجات الحرارة و الجفاف والملوحة و المغذيات و الحامضية فضلا عن التعرض للأشعة فوق البنفسجية (Tandeau-de-Marsac,1993) و عليه فإنها تكيفت للنمو في ظل جميع الظروف البيئية المتاحة،و بدءا من المياه العذبة و المويلحة إلى المالحة،كما يمكنها البقاء على قيد الحياة في الأماكن الرطبة،و تتواجد كعناصر أساسية في الشعاب المرجانية . و ان تواجدها و

انتشارها في الكثير من الأنظمة البيئية ساهم في امكانية انتاجه العدد كبير من المركبات الكيميائية الفعالة ، و أن معظم الطحالب تنتج مجموعة متنوعة و كثيرة من المركبات الثانوية التي غالبا ما تكون ذات فعالية بيولوجية عالية(Kim and Lee , 2006) .

لطالما استعملت الطحالب للأغراض العلاجية. فقد اصبحت في العقد الماضي محورا واسعا في البحث لإيجاد مركبات فعالة جديدة قد تدخل في صناعة ادوية مفيدة علاجيا(Cardozo *et al*,. 2007) ، تعد السيانوبكتريا من الموارد الطبيعية الواعدة التي تقدم ثروة من المواد الكيميائية الفعالة و لكنها لاتزال غير مكتشفة بشكل كبيرو بالتالي فأن امكانية اكتشاف أدوية جديدة يعد امرا في متناول اليد،ومن الجدير بالذكر ان الدراسات بين عامي 1983و1994 توصلت الى اكتشاف ادوية جديدة و التي وصلت إلى80٪ من الأدوية المستعملة ضد البكتيريا و امراض السرطان من المنتجات الطبيعية و قد تم التركيز على الميكروبات و الفطريات كمنتجي للأدوية التقليدية في البحوث الصيدلانية لعقود من الزمن الأ ان معدل اكتشاف مركبات فعالة من هذه الكائنات بدا يتناقص لذا حان الوقت للأنتقال الى الطحالب و استغلال امكاناتها في هذا المجال (Kim and Lee 2006).

و في غضون ذلك،تم تشخيص عدد من المضادات الحيوية من بعض الطحالب الدقيقة التي اثبتت فعالية واضحة ضد الجراثيم Antibacterial والفطريات Antifungal فضلا عن احتوائها على مركبات مضادة للسرطانAnticancer و مضادة للأكسدةAntioxidant ومضادة للطفليليات Antiparasite (Ghasemi *et al*,. 2004) .

ان فعالية الطحالب و خاصة الدقيقة منها كانت نتيجة إلى احتوائها على عدد من مركبات الأيض الثانوي المتمثلة بالأندولات Indoles، والتربينات Terpenes والقلويدات Alkaloid و الاستوجينات Acetogenins والفينولات Phenols،الأحماض الدهنية Fatty Acids و الكلايكوسيدات و التانينات والهيدروكربونات الهالواجينية المتطايرة Volatile Halogenated Hydrocarbons(Mayer *et al*,. 2010; Cardozo *et al*., 2007).

3-1 الأيوض الثانوية في الطحالب:

ان عملية الأيض هي اساس الحياة كونها تسمح للخلايا بالنمو و التكاثر و المحافظة على تراكيبها و الأستجابة الى بيئاتها ، و يقسم الأيض الى نوعين من التفاعلات هما تفاعلات الهدم Catabolism و التي من خلالها تنتج الطاقة إذ يتم تحطيم المواد الغذائية خلال عملية التنفس الخلوي اما النوع الأخر فهي عمليات البناءAnabolism التي تستغل تلك الطاقة الناتجة عن تفاعلات الهدم لتكوين مركبات مهمة للخلية مثل البروتينات و الكاربوهيدرات والدهون والأحماض النووية (Kliebenstein,2004).

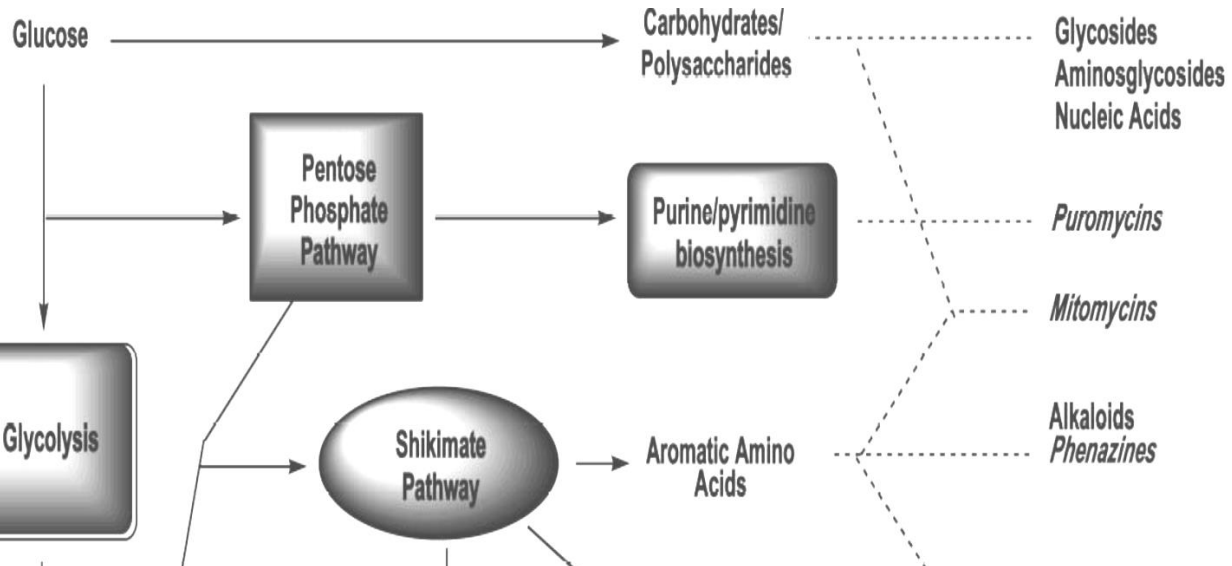
تنتج الأحياء المجهرية ايوض اولية كالأحماض الأمينية و البروتينات و الكاربوهيدرات و الدهون و الفيتامينات و الأيوض الثانوية كالمضادات الحيوية و السموم و القلويدات و التربينات و الفينولات و الستيرولات و غيرها إذ يبدأ انتاجها خلال مرحلة الطور

اللوغارتـــــــــــــمي ExponentialPhase او خـــــــلال طـــــــور الأستقـــــــرار Stationary Phase (Wu *et al*., 2005) كما هو موضح في الشكل (1).

ولابد من الإشارة الى ان الطحالب قد اثبتت انها من المصادر المهمة للمركبات الفعالة بايلوجياً التي يمكن ان تستعمل للسيطرة البيولوجية على الممرضات وتعد السيانوبكتريا من المصادر الغنية بالمركبات التي تستمل في المعالجة الدوائية على نحو واسع و مصدرا للعديد من المركبات المهمة الناتجة من عملية الأيض الثانوي وقد عزل مؤخرا اكثر من 13000 مركب طبيعي وفعال من الطحالب البحرية والعذبة (Burja *et al*,.2001)، اضافة الى ذلك هنالك الكثير من الدراسات التي اختبرت فيها مستخلصات انواع عديدة من الطحالب والتي اظهرت نتائج جيدة ومشجعة لاتخاذها مصدرا لأنتاج المضادات الحيوية (Gademan and Portman, 2008).

و قد جذبت هذه المركبات الكيميائية الفعالة الأنتباة في الأونة الأخيرة للبحث عن مركبات جديدة من الطحالب و الذي يعد من الأهداف المهمة في صناعة الأدوية ذات الفعالية ضد الممرضات المختلفة (Ladygina *et al*.,2006) و ان بعض الطحالب تقوم بأنتاج هذه المركبات من أجل البقاء في بيئة تنافسية كأستراتيجية من استراتجيات البقاء في البيئات المالحة و المويلحة و العذبة والتي تؤدي إلى حدوث مستوى كبيرمن التنوع في المسارات الأيضية المختلفة و بالتالي بناء المركبات الكيميائية الفعالة (Barros *et al*., 2005 ; Puglisi *et al*., 2004) .

ان البحث والاستكشاف في مجال الطحالب لغرض التوصل الى مركبات كيميائية فعالة يمكن استعمالها و ادخالها في الصناعات الدوائية وبالتالي الحصول على نماذج لأدويةمنها فضلا عن تحفيزها من خلال استعمال تقنيات متطورة في الهندسة الوراثية وبناء المركبات الجديدة ذات التطبيقات في الطب الحيوي. علاوة على ذلك تعتبر الطحالب من الكائنات الواعدة بتوفير وبناء المركبات الفعالة بيولوجيا والمركبات الضرورية لتغذية الإنسان (Burja *et al*., 2001 ; Mayer and Hamann, 2004) ولذلك فان هناك حاجة إلى البحوث المتزايدة على مستخلصات الطحالب و مركباتها النقية (Dos Santos *et al*., 2005)



(الشكل 1) التصنيع الحيوي لمركبات الأيض الثانوية (Burja *et al*., 2001)

4-1 مركبات الأيض الثانوي المنتجة من الطحالب:

1-4-1 القلويدات Alkaloid compounds

القلويدات مركبات عضوية قاعدية و تحتوي على حلقة غير متجانسة Heterocyclic nitrogenous وعادة تكون قليلة الى متوسطة الوزن الجزيئي (<1000) دالتون (Katircioğlu *et al*., 2004) ، تكون على هيئة مواد بلورية اللون تتميز بكفاءتها العلاجية وأهميتها من الناحية الطبية كونها ترتبط بالحامض النووي DNA للميكروبات مما يعطيها قدرة تثبيطية عالية تجاه العديد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام، كما انها تعمل على تثبيط الخلايا السرطانية (Marr *et al*., 1999).

و ان هناك تنوع بنائي واضح في المركبات القلويدية وعليه فهي تساهم في بناء و صناعة العديد من الأدوية و العلاجات ذات المنشأ الطبيعي بما يقارب 60% من الأدوية هي ذات اصل طبيعي و المتمثل بالقلويدات .(Walsh ,2003)، تنتج هذه المركبات في معظم انواع الطحالب وعرفت الطحالب الخضر المزرقة بقابليتها على تخليقها ضمن ايوضها الثانوية وقد تم تشخيص البعض منها كمضادات حيوية و فطرية (Paul *et al*.,2005)، بعضها مضادات للسرطان (Chen *et al*.,2003) وللملاريا و تقوم الطحالب الخضر بإنتاج القلويدات كإحدى نواتج الأيض الثانوي وقد اوضحت البحوث احتواءها على مجموعات من القلويدات اهمها Pronueiferine و

Glaucine و Nuciferine و Anuomrthine وEvodianin و التي تعمل كمضادات للأتهابات(Radwan *et al* ., 2007; Calixto *et al*.,2000)، و عزل المركب القلويدي شبيه N-methylcystine لأول مرة من الطحلب *Hapalosiphon aureus* (الموسوي ،2007) وكذلك عزل المركب القلويدي شبية Calothrixin-A لأول مرة من الطحلب *Cladophora crispata*(الناصر, 2010).

اما الطحالب الحمر فقد احتوت على مواد اولية للمركبات القلويدية مثل TyraminHordenine و Mescaline و Papavarine و ان انواع منها تستخدم كعلاجات ضد الأكتئاب منها N-acetyphenylethylanin و بعضها لها فعالية ونشاطا مضادا للسرطان منها المركبين القلويدين Lophocladin –B , Lophocladin –A (Radwan *et al*., 2007).

2-4-1 الفينولات: Phenolic compounds

الفينولات مركبات عضوية تمثل مجموعة كبيرة من المركبات المنتجة من قبل النباتات و الأحياء المجهرية و (Tan and Vanitha , 2004) ، تتكون الفينولات البسيطة من حلقة بنزين مرتبطة بواحدة او اكثر من مجموعة الهيدروكسيل و التي تعمل كحوامض ضعيفة و وظيفتها الأساسية هي حماية النبات ضد الأشعة الفوق بنفسجية و مسببات الأمراض فضلا عن دورها في عمليات التكاثر و النمو.(Zern and Fernandez, 2005; Manach *et al*., 2004)

تنتج الفينولات في الطحالب البنية على شكل مركبات الفلوورتانينات Phlorotannins و بكمية اقل في الطحالب الحمرred algae اذ تعد من مكونات الجدار الخلوي و لها وظائف مهمة في حماية الطحلب من الأشعة الفوق بنفسجية و فضلا عن اهميتها في عمليات التكاثر و حماية ضد مسببات الأمراض و لها الكثير من التطبيقات العلاجية كمضادات سرطانية ومضادات اكسدة و مضادات بكتيرية و مضادات للحساسية و مضادات الألتهاب (Li *et al*., 2011) فضلا عن انها مضادات اكسدة طبيعية (Yuan and Walsh, 2006) ، طورت الطحالب اليات لحماية الخلية الطحلبية من التحطم الأوكسجيني بأنتاج انواع من المركبات الفينولية و التي تلعب دورا مهما كمضادات اكسدة طبيعية Liu *et al*, (2011) ، وذلك لقدرتها على منح ذرة هيدروجين او الكترون وبذلك تكون واهبة للإلكترون للجذور الحرة (Sushanth and Rajashekhar, 2015)

3-4-1 التربينات: Terpenes compounds

و هي مركبات طبيعية و متنوعة التركيب و واسعة الأنتشار بين الأحياء الحقيقية و بدائية النواة ، و ان مركب Isoperene المتكون من خمس ذرات كاربون هو الوحدة الأساسية لبناء الهيكل الكاربوني للتربينات ، تشارك هذه المركبات في وظائف عديدة منها عملية البناء الضوئي كونها تدخل في صبغات الكاروتينات و الكلوروفيلات فضلا عن بعضها يعد من الهرمونات المنظمة للنمو مثل الجبرلين Giberellic Acid كما تدخل في تركيب الغشاء مثل الستيرولاتSterols و قد تعطي طعما و رائحة مميزة للنبات لذا تكون مواد طاردة او جاذبة للحشرات اما من الناحية الكيميائية فأن التربينات عديمة اللون بأستثناء الكاروتينات وهي مركبات ذائبة في الدهون (Harborne , 1984) . اما من الناحية الطبية فقد امتازت بفعاليتها المضادة للأحياء المجهرية و خاصة التربنويدات الثنائية Diterpenoids المنتجة من الطحالب الحمر و البنية (Fenical and Paul , 1984).

ان معظم الطحالب البنية تكون نواتج ايوضها الثانوية هي تربينات و فلوراتانين (Blunt *et al* ., 2008). ان الطحلب *Dictyotasp.* من اكثر الطحالب المنتجة لهذه المركبات اذ يعد ثروة واسعة لأنتاج المواد الكيميائية (Blunt *et al.*,2005)، تمتاز عوائل الطحالب البنية Dictyotaceae و Cytoseriaceae و Sargassaceae بتكوين المعقدات التربينويدية الثنائية Diterpenoids Complexes و هذه المركبات تمتاز بفعاليتها ضد الجراثيم و الفطريات كمضادات حيوية (Fenical and Paul, 1984).

1-5 دور الطحالب في انتاج المركبات الفعالة حيويا:

ان التطبيقات السابقة للمركبات الكيميائية المعزولةمن الأنواع الطحلبية المختلفة تمثلت بمجالين هي المنتجات الطبيعية والسموم،اما الاتجاهات الحديثة فتمثلت بالبحث عن علاجات و ادوية من مصاد رطبيعية وأن الطحالب هي المجموعةالقادرة على أنتاج المواد الفعالة بايلوجيا Cabrita *et al.*, Blunt *et al*., 2008; Singh *et al*., 2005; Burja *et al*., 2001), 2010)و التي تعمل كمضادات للبكتريا antibacterial و الفطريات Antifungal و الفايروسات Antiviral و الطفيليات Antiparasites فضلا عن استعمالها كمضادات للألتهاب Anti-inflamatory و مضادات للأكسدة Antioxidant و مضادات مناعية immunological و طارد للديدان Antihelmintic ومثبطات انزيمية Enzyme inhibitors (Singh *et al*., 2005).

1-5-1 دور الطحالب كمضادات للبكتريا Antibacterial:

بدا اكتشاف المضادات الحيوية عن طريق الصدفة و ذلك في عام 1927 اذ لاحظ العالم Alexander fleming عدم نمو المكورات العنقودية في المنطقة المجاورة لنمو الفطر *Penicillium notatum* و قد عزى ذلك الى المضاد الحيوي البنسلين Pencillin المنتجة من قبل الفطر و التي لها تأثير مثبط لنمو الجراثيم (Demain ,1999 ; Milton , 1990) ، في عام 1942 استعمل مصطلح المضادات الحيوية Antibiotics من قبل العالم Waksman للمركبات الكيميائية التي تنتجها بعض الأحياء المجهرية بصورة عرضية خلال عمليات الأيض الثانوي و التي غالبا ما تكون ليس لها وظيفة واضحة في الخلية التي تنتجها ولها تأثير مثبط لنمو الجراثيم و غيرها من الأحياء المجهرية و تنتج هذه المركبات خلال طور الثبات Stationary

phase، (Walker , 1974) توالت الدراسات و الأبحاث حول اكتشاف مضادات عديدة بعد اختبار فعاليتها الحيوية و تشخيصها و معرفة تركيبها الكيميائي (Stephen and Horace , 2000) ، وذلك بسبب ازدياد مقاومة سلالات من البكتريا والفطريات المرضية للمضادات الحيوية المستعملة (Robbers *et al* ., 1996)، ظهرت في العقود الثلاثة الأخيرة عزلات من البكتيريا المرضية المقاومة لفعل المضادات الحيوية نتيجة لأمتلاكها لعدد من الأليات ،اذ ان بعض انواع البكتريا لها القابلية على تغيير التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي بينما تمتلك انواع أخرى القابلية على اعادة اخراج المضاد الحيوي او تغير في تركيب مادتها الوراثية من خلال الطفرات الوراثية ،فضلا عن الاستعمال الخاطئ للمضادات الحيوية(Waldvogel , 2004) جميع هذه العوامل ادت الى البحث عن انواع جديدة من المضادات الحيوية ، اذ ان مقاومتها تعد من المشاكل المصاحبة للتطورو عليه لابد من البحث عن مصادر جديدة للمضادات الحيوية و اصبحت هذة من اهم المشاكل الصحية في العالم (Chowdhury *et al* 2015) ومن المعروف ان الطحالب من المصادر الغنية بالمواد الفعالة (Ely *et al* ., 2004).

ان طبيعة المركبات المضادة للجراثيم المنتجة من الطحلب *Nostoc commune*، هي تربينات ثنائية Diterpenoid وقد اشارت دراسة(Jaki *et al*,. 1999) الى ان طحلب *Nostoccommune* ينتج مادة خارج خلوية هي Noscomin وهي من التربينات الثنائية Diterpenoid تم عزلها من المزرعة السائلة للطحلب و عليه فهي مادة خارج خلوية،وقد اظهرت نشاطا مضاد البكتيريا*Bacillus cereus* و *Staphylococcus epidermidis* و *Escherichia coli*.، و قد استطاع El-Sheekh *et al*., (2006) من عزل مركبات فينولية والتي اظهرت فعالية عالية تجاة الجراثيم الموجبة و السالبة لملون كرام و ضد الفطريات الخيطية من الطحلب*Nostoc muscrom*، وكذلك اوضحت الدراسات (Abdel-Raouf,2004 Hassan , 2007 ;Volk and Furkert , 2006)، ان غالبية النواتج الأيضية في الطحالب الخضر المزرقة تتراكم في الكتلة الحيوية لها فضلا عن انتاجها مركبات خارج خلوية الى البيئة التي تتواجد فيها و لذلك يطلق عليهاExo-Metabolites ، اذ عزل المضاد الحيوي Nostodions من راشح مزرعة *Nostoc commune* المعزول من التربة و لوحظ ان له فعالية مضادة للفطريات (Bohm *et al*., 1995).

كما لابد من الأشارة ان للطحلب *Oscillatoria splendid* القدرةعلى انتاج مواد لها فعالية مضادة للجراثيم ، و ان انواع اخرى من الطحالب تحرر مثبطات لنمو كائنات اخرى في وسطها سميت بالمثبطات الذاتية Autoinhibitors كما هو الحال في طحلب *Nostoc punctiforme*. (Venkataraman, 1998)

وفي دراسة على الفعالية البايلوجية لأنواع من الطحالب البحرية عزلت من ساحل كراتشي (باكستان)،وجد ان هناك نشاط مضاد للبكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام للمستخلص الميثانولي و كذلك فعالية مضادة للفايروسات و منها HIV-1و للديدان الطفيلية في المختبر(Tuney *et al*. 2006 ;Bhakuni and Rawat , 2005)،لوحظ ان مستخلص خلات الإثيل لطحلب*Spirulina platensis* يتألف من مركبات فعالة تمثلت Heptadecane وTetradecane اللذان يمكنها ان تثبط نمو بعض انواع البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام وكذلك يثبطان نمو الفطر *Candida albicans* (Ozdemir *et al*., 2006).

و قد عزل Ghasemi *et al*., (2004) عدد من المركبات تعود إلى مجموعات من الببتيدات و الأميدات والقلويدات من الطحلب *Fischerella ambigua* ولها فعالية بيولوجية ضد مسببات الأمراض كما لوحظ ان الطحلب *Anabaena* Spp يقوم بإنتاج عددمن المركبات النشطة بايلوجيا تمثلت بالببتيدات الدهنية lipopeptides التي لها فعالية مضادة للطحالب Antialgal وفضلا عن انها مضادات للسرطان(Burja *et al*., 2001 ;Fujii *e al*.,2002)، تبين ان الطحلب *Oscillatoria* sp. ينتج الأحماض الدهنية Fatty acids، ورباعي الأمين Tetraamine والسبرمينSpermine ومشتقاتPiperazine و التي تظهر نشاطا مضادا للميكروبات Mundt *et al*,. 2003) Shanab and Essa, 2007)، كما تم عزل نوعين من المركبات التي تعود للأيوض الثانوية لطحلب *Scytonema hofmanni* و هما A وBScyptolin Matern *et al*., 2003)، كما اوضحت دراسة (Mehdi *et al*. 2002) امكانية زيادة انتاجية المضاد الحيوي من العزلة *Oscillatoria omena* بتعريضها الى عوامل كيميائية و فيزيائية للحصول على عزلات مطفرة ذات انتاجية عالية ، و قد اوضح (Austin *et al*., 1992) أن الأيوض الخلوية التي تنتجها طحلب *Nosto cmuscorm* تمنع نمو بكتريا*Basullas.circulans*.

2-5-1 دور الطحالب كمضادات للفطريات Antifungal

أن الإصابة بالأمراض و تدهور الظروف البيئية غالبا ما يؤدي الى خسائر اقتصادية فادحة (Bondad-Reantaso *et al*., 2005) و تعتبر الفطريات من اهم العوامل المسببة لأمراض النباتات كما ان معظم المبيدات الفطرية المستعملة اصبحت اقل فعالية و مصدر للتلوث الكيميائي و لتسمم الفاكهة و الخضروات التي تعتبر مصدر مهم في غذاء الأنسان و يعتبر التضاد البايوكيميائي Allelopathy من الظواهر الشائعة في الطبيعة و قد عرفت من قبل مؤسسة التضاد الحيوي العالمية International Allelopathy Society على انها اي عملية تتضمن انتاج مركبات الأيض الثانوي من قبل النباتات و الجراثيم و الفايروسات و الفطريات التي تؤثر على نمو و تطور النظام الزراعي و البايولوجي و التي تشمل التأثيرات الأيجابية و السلبية و من المعروف ان الأحياء المجهرية في التربة من العوامل المهمة لأنتاج المتأيضات Allelopathy و بذلك فان الطبيعة تجهز الأنسانية بأستمرار بمركبات جديدة تدخل في الصناعات الدوائية (El-Mahmood and Ameh ,2007)، لابد من الإشارةالى ان الباحثين مستمرين بالبحث عن طريق وسائل امنة بيئيا للسيطرة على مسببات الأمراض و قد ظهر مؤخرا العديد من التقارير التي تؤكد استعمال الفطريات العدائية في السيطرة على الأمراض النباتية مثل استعمال الفطر *Trichodarma* sp. (Gachomo and Kotchoni, 2008).

وقد استعمل الراشح للمزرعة الطحلبية *Microcoleus vaginatus* ضد الفطر *Meloidogyne incognita* على نبات الطماطة في البيوت الزجاجية .(Khan *et al*,. 2005) و قد اظهرت بعض الأنواع الطحلبية التابعة للأجناس مثل *Oscillatoria* و*Anabaena* و*Microcystis* و *Nadularia* و *Nostoc* قدرتها على انتاج الببتيدات الحلقية Cyclic Peptide المتمثلة بالسموم الكبدية Hepatotoxin و كذلك انتاج السموم العصبية القلويدية Neurotoxin Alkaloid و التي اظهرت فعالية كمبيدات للطحالب Algicidal

ومبيدات الفطريات Fungicidal و مبيـــــــدات حشرية (Namikoshi and Rinehart , 1996) Pesticidal.

تعد الطحالب أحدى اهم العوامل البيولوجية الرئيسية التي تم دراستها من اجل السيطرة على الفطريات المسببة للأمراض النباتية (Hewedy et al.,2000) ، فمثلا بعض السيانوبكتريا و بعض الطحالب الحقيقة النواة تنتج المركبات الفعالة بيولوجيا التي لها نشاط مضاد للفطريات الممرضة للنبات (Kulik , 1995) المضادات الحـــــــيوية و السامة (Kiviranta *et al*., 2006) ضـــــــد الممرضات النباتية Plant Pathogens كما في الطحلب *Anabaena* spp (Moore *et al*., 1986) ، و الطحلـــب *Scytonema* spp و Nostoc spp (Chetsumon *et al* ., 1993 ;) , و اوضح Bloor and England , 1989 ان راشح المزرعة السائلة لبعض انواع من السيانوبكتريا تنتج مركبات فعالة في السيطرة على مرض الخمود، فضلا عن سيطرتها على نمو فطريات التربة ومنها*Cunninghamella blakeleana* حيث ان لها القدرة على حماية البذور من مرض الخمود الذي تسببه بعض الفطريات *Fusarium* sp., و*Pythium* sp. و *Rhizoctonia solani* . (Kulik, 1995) وفي دراسة اخرى تمملاحظة الفعالية المضادة للفطريات في29 سلالة من مجموع 298 سلالة الطحالب الدقيقة التي تم اختبارها. (Kim and Lee 2006) .

و لقد لاحظ(De- Caire *et al*., 1990) أن المنتجات خارج الخلوية من الطحلب *Nostoc muscorum* ذات فعالية للمكافحة البيولوجية لخمود الشتلات Seedlings Damping Off في نباتSoybean, كما اوضحت دراسة(2007).Abo-Shady *et al* الكفاءة العالية لراشح ثلاث انواع من الطحالب ثلاثة *Anabaena subcylindrica* و *Nostoc muscorum* و*Oscillatoria angusta*) على السيطرة على الفطريات الممرضة المعزولة من الجذور والسيقان والأوراق للنباتات الفول*Faba Bean* .

لاحظ (Hewedy et al., 2000) وجود الأحماض الدهنية في مستخلص الهكسان وخلات الإثيل لطحلب *Trichodesmium erythraeum* والذي أظهر فعالية مضادة للميكروبات من خلال السيطرة البيولوجية على بعض مسببات الأمراض النباتية وبذلك فأنها تعد من الإمكانيات المهمة لاستعمالها بدلا من المواد الكيميائية لتجنب التلوث البيئي،والطحالب احدى العوامل البيولوجية المهمة التي تم دراستها من أجل السيطرة على مسببات الأمراض النباتية كالفطريات.

3-5-1 دور الطحالب كمضادات للأكسدة: Antioxidants

تعرف مضادات الأكسدة على انها مركبات لها القدرة على تخليص الجسم من الجذور الحرة التي تنشأ في جسم الأنسان بصورة تلقائية نتيجـــة للنشاطـــات الأيضـــــية المختلفة (Arora and Chandra , 2010) و يمكن تعريفها على انها مركبات يمكنها اقتناص الجذور الحرة حتى تعادل المواد المؤكسدة او الجذور الحرة المتكونة في الجسم و بتراكيز قليلة مقارنة مع المادة المؤكسدة فانها تؤخر او تمنع اكسدة تلك المادة و تمنع التحطم الذي تسببه الجذور الحرة و توصف بأنها مركبات حامضية مثل الفينولات و تستخدم كمواد حافظة للطعام و مواد تجميل و غيرها ،اذ يعد الأوكسجين عنصرا اساسيا و مهما في انتاج الطاقة عن طريق اكسدة الغذاء ، و

مع ذلك فأن اختزال العنصر لا يكون كاملا حتى تحت الظروف الطبيعية اذ تنشأ مجموعة وسطية من المركبات الكيميائية النشطة الطبيعية من عمليات التحول الغذائي و يطلق عليها الجذور الحرة و التي عند تجمعها بكميات كبيرة في الجسم تسبب تأثير ضار يؤدي الى زيادة الفعل التأكسدي و بالتالي حدوث خلل في جزيئات الأحماض النووية DNA و RNA فضلا عن البروتينات و اللبيدات مما يؤدي الى عدم قيام هذه الجزيئات بوظائفها الحيوية و يزيد من مخاطر الأصابة ببعض الأمراض مثل السرطان و امراض القلب (Cuvelier 2001; Murthy *et al.*, 2011) و تشمل الجذور الحرة ايون الهيدروكسيد-OH الذي يكون فعالا للغاية و بعضها اقل فعالية مثل جذر فوق الأوكسيد-O_2 و بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2

و من الصفات الواجب توفرها في مضادات الأكسدة يجب ان تكون فعالة عند التراكيز القليلة ان تكون غير سامة و غير مشعة حتى بعد الخزن الطويل و هي عديمة اللون و الطعم ،و ان ناتج تفككها غير سام غير مشع ان تكون مستقرة و فعالة بمدى واسع من الدالة الحامضية pH و ان تكون مركبات متعادلة وخاملة كيميائيا (Sarma *et al.*, 2010).

و تقدر نسبة مرضى السرطان الذين يستخدمون مضادات الأكسدة بنحو يتراوح من-87 13% وان هذا المدى الواسع ربما يعزى الى اختلاف انواع السرطان و العمر و الثقافة و الحالة الأقتصادية .وربما يتناول المرضى مضادات الأكسدة اثناء العلاج الكيميائي لتخفيف التأثيرات الجانبية وزيادة فعالية العلاج الكيميائي فضلا عن انها تساعد على تقليل العلاج الكيميائي حتى في الجرع العالية و نتيجة لذلك يزداد معدل استجابة الورم للدواء الأ ان البعض انتقد تناول مضادات الأكسدة اثناء العلاج بسبب تأكيدات انها تدخل في ميكانكية عمل العلاج .(Block *et al.*,2008) ، غالبا ما تضاف الكثير من المركبات الصناعية الى المواد الغذائية كمواد مضادة للتأكسد و لكن تبين ان لهذه المركبات مخاطر صحية و اثار سمية اذ ان بعضها من المواد ذات التأثير المسرطن (Arora *et al*,.2011)، لذلك زاد الأهتمام في الوقت الحاضر بالحصول على مركبات مضادات للتأكسد من مصادر طبيعية ومنها المستخلصات الطحلبية، ولابد من استعمال مضادات الطبيعية بدلا من مضادات الاكسدة المصنعة كيميائيا و التي تمتاز بكونها مركبات سامة و مسرطنة وان الدراسات حول استعمال الطحالب الدقيقة كمضادات للأكسدة قليلة و التي تعتبر من المصادر المتجددة للمواد الطبيعية(Srinivasan *et al*,.2013).

اشارت دراسة (Hua-Bin *et al.*,(2007 الى العلاقة بين النسبة المئوية للمحتوى الفينولي للمستخلصات الطحلبية والفعالية المضادة للأكسدة والتي تكون طردية كما لاحظ (Mukund *et al.*,2013) ان المستخلص الميثانولي للطحلب *Oscillatoria terebriformis* يمتلك فعالية مضادة للأكسدة و قد كانت العلاقة بين المحتوى الفينولي المضادة للأكسدة واضحة جدا، اما في دراسة,(Al-Amoudi*et al.*,2009) فقد اظهرت ان المحتوى الكيميائي للطحلب له دور مهم في كونه ذي فعالية مضادة للأكسدة من خلال احتوائه على السكريات و حامض اليورنك و الكبريتات والأحماض الأمينية و ان الطحالب تتفاوت في نسب احتوائها على هذه المركبات التي لها ذات الفعالية المضادة للأكسدة ، ان صبغة البيتا-كاروتين المنتجة من طحلب *Dunaliella salina* تعتبر أكثر فعالية بكثير من مضادات الأكسدة الاصطناعية .(Chidambara *et al*,.2005)

و ان هنالك أدلة قوية توصل اليها الباحثين ان إنتاج الجذور الحرة و البيروكسيد الدهني Lipid Peroxidation يعتبر كبداية في تصلب الشرايين. وبالتالي التعرف على مضادات الأكسدة،والتي يمكن أن تؤخر عملية تكون بيروكسيد الدهون من خلال منع توليد الجذور الحرة، وقد اكتسبت أهمية في السنوات الأخيرة، و اشارت الدراسات الى ان مضادات الأكسدة قد تعمل على رفع مستويات الدفاع الذاتية عن طريق التعبير عن الجينات التي تشفر لبعض الإنزيمات مثل Superoxide Dismutase (Surapaneni and Venkataramana , 2007).

و لاحظ Miranda *et al* . (1998) ان الطحلب *Spirulina maxima* الذي يمتلك قيمة غذائية عاليه اذ يحتوي نسبة عالية من البروتين و المغذيات الأساسية الأخرى و الأحماض الفينولية و التوكوفيرول و البيتا – كاروتين و المستخلص الميثانولي لهذا الطحلب امتلك صفات مضادة للأكسدة ،اذ يوجد هناك علاقة طردية بين محتوى الطحلب من المركبات الفينولية و النسبة المئوية للأكسدة ، كلما زاد المحتوى الفينولي للطحلب كلما كانت قدرت المستخلص على الأكسدة اعلى (Colla *et al*., 2007).

4-5-1 دور الطحالب كمضادات للسرطان Anti-cancer

يعد مرض السرطان تهديداً حقيقياً لصحة الأنسان وان المعالجة الكيميائية لازلت هي الطريقة التقليدية لعلاجة كون ان اغلب الأدوية المستخدمة في المعالجة الكيميائية سامة للخلايا السليمة و تسبب التسمم المناعي و لذلك بدا الأهتمام بالبحث عن مواد يمكن ان تستخدم في علاج الأمراض السرطانية ليس لها تأثيرا على صحة الأنسان و بالأخص على الجهاز المناعي الذي اصبح الهدف الأساس للعديد من الدراسات و منها استخدام الأيوض الثانوية التي تنتجها الكائنات الحية المجهرية في علاج الأورام السرطانية (Xu *et al*., 2009)

و لتحقيق هذا الهدف تم التوجه بالاهتمام الى المواد الطبيعية المنتجة في النبات و الأحياء البحرية و الأحياء المجهرية اذ اتجة الباحثون منذ بداية الخمسينيات من القرن الماضي لاكتشاف و تطوير ادوية ذات اصل طبيعي لعلاج السرطان ومنها القلويدات (Newman *et al* ., 2003)

ان من الصعب ايجاد علاج يزيل الخلايا السرطانية دون ان يؤثر على الخلايا السليمة للجسم لذلك كان الأتجاه في علاج الأورام السرطانية هو بتحفيز الجهاز المناعي للجسم بأستعمال مواد يمكن ان تكون كمعدلات للأستجابة الحيوية للجسم Biological Response (BRM) Modulators ، و ان اهمية هذه المواد تكمن بمنع تحول الخلايا السليمة الى خلايا سرطانية Caracinogenesis و كذلك تحث الخلايا السرطانية على التوقف في الأنقسام مما يقلل انبثاقها في اماكن اخرى من الجسم و تتصف السكريات المتعددة و التي تتواجد في اغلب انواع الطحالب بهذا النوع من التأثير المحفز للجهاز المناعي للجسم اذ تعد الطحالب من المصادر الطبيعية الغنية في النظام البيئي و التي تحتوي على الكثير من المركبات الفعالة بيولوجيا و التي يمكن اعتبارها من المصادر المهمة في الغذاء و انتاج الأعلاف و في الصناعات الدوائية و حتى الوقت الحالي تم عزل اكثر من 2400 من المنتجات الطبيعية البحرية و التي عزلت من الطحالب البحرية من المناطق الأستوائية و شبة الأستوائية (Manilal *et al*.,2009).

توصـــــل(Zandi *et al*.(2010 الـــــى ان المستخـــلص الخـــــام لطحـلب *Gracilaria corticata* ذا فعالية مضادة لسرطان على Molat-4human Cancer Cell line في المختبر و التي يمكن تطويرها للتوصل الى عوامل مضـادة للسرطان و انتاج علاجات ذات تـأثير اقل علـى صـحة الأنسان ، اما في دراسة (Lawson(2010 فقد تمكنت من عزل عشر مركبات جديدة من اصل طحلبي تعود الى الطحالب الحمر و البنية والتي لها فعالية تثبيطية لسرطان الثدي Breast Cancer الذي يعتبر من الأمراض الخطيرة التي تصيب النساء و تسبب موت الكثير منهن و بذلك فقد وضعت اولى الخطوات لعلاج هذا المرض من مركبات ذات اصل طبيعي ، و تمكن (Sheih *et al*., (2010 من عزل مركب بروتيني من طحلب *Chlorella vulgaris* و الذي اظهر فعالية تثبيطية in vitro لخلايا سرطان الرئة ، و يعتبر الطحلب *Dunaliella salina* من الطحالب الخضر التي تستهلك كغذاء و دواء ، اذ اظهر هذا الطحلب فعالية للأكسدة و للسرطان من خلال ارتباطة بأنتاج مادة البيتاكاروتين المهمة تحت ظروف الأجهاد مقارنة بالظروف الأعتيادية و قد تم التركيز على الفعالية المضادة للسرطان من خلال المستخلص الأيثانولي للطحلب على خلايا سرطان الجلد و قد اظهرت فعالية تثبيطية عالية لها .(Emtyazjoo *et al*., 2011)

اكدت دراسة (Kim *et al*., (2010 ان مركب Fucoxanthin المعزول من طحلب *Fucus* الذي هو عبارة عن سكر متعدد كبريتي ذا فعالية مضادة للسرطان ، كما تمكن Eggen and Georg (2002) مـن عـزل المضـاد الحيـوي المضـاد لـلأورام الكربتوفايسـين Cryptophycin المضاد للأورام من سلالة الطحلب (*Nostoc* sp. (ATCC 53789.

5-5-1 دور الطحالب كمضادات لأرتفاع الكولسترول:Anti-hypercholesterolemia

يطلق مصطلح جزيئات الدهون Lipid profile، على الكولسترول الكلي Total Cholesterol و البروتينات الدهنية عالية الكثافة (High Density Lipoprotein(HDL والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة Low Density Lipoprotein (LDL) والبروتينات الدهنية منخفضة جدا الكثافة Very Low Density Lipoprotein (VLDL) والكليسيريدات الثلاثية (Triglycerides(TG. (Griffin,2009) ، تنقل الدهون إلى مجرى الدم بواسطة البروتينات الدهنية وهي جسيمات كروية تتألف من جزءدهني (كليسيريدات ثلاثية (TG)، والكولسترول مؤستر و تحيط به طبقة من الدهون الأحادية (دهون مفسفرة) Phospholipid و الكوليسترول الغير مؤستر Uneestrified Cholesterol وبروتين خاص ويدعى Apolipo proteines (Wasan and Cassidy ,1998) البروتينات الدهنية تختلف فيما بينهامن خلال كثافتها تنقسم إلى عاليةالكثافة (HDL) ومتوسطة الكثافة (LDL) و منخفض الكثافة جدا (VLDL) (Schumaker ,1994)،ان ارتفـــاع مســـتوى الكولســـترول Hypercholesterolemia عامل خطير يؤدي الى الأصابة بأمراض الأوعية القلبية المزمنة (Heidrich *et al*.,2004) ان سبـــب ارتفاع الكولسترول Hypercholesterolemia العديد من العوامل منها بيئية فضلا عن الاستعداد الجيني الوراثي، (Moher *et al*., 2004).وقد أعرب بعض الباحثين عن قلقهم من أن الوجبات الغذائية العالية بالبروتين الحيواني والقليلة الألياف قد تزيد خطر الاصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية Hypercholesterolemia

وبالتالي فإن الأغذية مثل البروتين النباتي والأحماض الدهنية غير المشبعة والألياف الغذائية تلعب دورا هاما في انخفاض مستوى الكولسترول في الدم (Iwamoto *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 1998)

و قد استعملت الأرانب كأول نموذج تجريبي لدراسة ارتفاع مستوى الكوليسترول وأمراض تصلب الشرايين اذ تم تزويدها بنسبة أقل من 2٪ من الكولسترول. مما ادى الى سرعة زيادة تركيزه في البلازما (Kritchevsky,1970).

و قد لاحظ (Xu *et al* .,2009) أن تغذية الفئران على تركيز 0.1%من الكوليسترول لمدة سبعة أشهر لم تسفر عن ارتفاعه بالمقارنة مع الأرانب التي عوملت بتركيز0.1% من الكوليسترول في مستواه في البلازما، و قد لاحظ (2009) ,.Abdl- Mageid *et al* ان مستخلص الفينولي من الطحلب *Sargassum vulgare* له تأثير فعال في خفض مستوى الكوليسترول في بلازما دم في الفئران التي تغذت على نظام غذائي يحتوي على الكوليسترول مع المستخلص الفينولي للطحلب مما تعكس خصائص المستخلص المضادة للأكسدة.

لوحظ أن تغذية الأرانب على صفار البيض ادى الى ارتفاع مستويات الكوليسترول الكلي،و الدهون الثلاثية وLDL،في حين لم تتأثرHDL. وأظهر النظام الغذائي مع بذور نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* آثار ضئيلة على مصل الكوليسترول،و الدهون الثلاثية والكولسترول. كما لوحظ زيادة كبيرة للبروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL بعد تغذيتها على بذور الحبة السوداء..(Tembhurne *et al*., 2014)

اوضحت دراسة (Joshi *et al*., 2012) أن نبات الكزبرة *Coriandrum Sativum* يمثل عامل قوي ضد ارتفاع الكوليسترول و كذلك يوفر الحماية ضد الاكسدة. و لوحظ ان خفض تركيز مستخلص نبات الكزبرة يؤدي الى ترسيب الكوليسترول في الشريان الأورطي من خلال تغذية حيوانات التجربة (الجرذان) على نظام مرتفع الكوليسترول، أشار(Bansal and Jaswal, (2009 ان للطحلب *D. salina* دور وقائي من حيث الحفاظ على مستوى الأساس للكوليسترول في الدم، و ان التغذية على هذا الطحلب تكون مفيدة ضد تطور اضطرابات الكولسترول ذات الصلة.

الفصل الثاني

مواد العمل و طرائقه

Materials And Methods

2- 1 تنظيف و تعقيم الزجاجيات:

غسلت الزجاجيات المراد استعمالها في تحضير الأوساط الزرعية بحامض الهيدروكلوريك تركيز20%، بعدها غسلت بماء الحنفية ثم بالماء المقطر لعدة مرات و عقمت بواسطة الفرن الكهربائي تحت درجة حرارة 180 م° و لمدة ساعتين و استعملت الدوارق المخروطية سعة 250 و 500 و1000 مليلتر بعد غلقها بالقطن النظيف و المعقم في تجارب عزل الطحالب ، و استعملت اطباق بتري بلاستيكية معقمة فيما يتعلق بالأوساط الزرعية الصلبة.

2-2 الأوساط الزرعية:

الوسط الزرعي السائل :

تم تحضير الوسط الزرعي (Chu-10) و المحور من قبل (1996) Al-Aarajy لتنمية العزلات الطحلبية الموضحة مكوناته في الجدول رقم (1)، تم تحضير الوسط الزرعي بشكل محاليل خزينة Stock solutions و التي حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م ° و بدون تعقيم لحين استعمالها اذ تم خلط كميات محدودة من المحاليل الخزينة عند تحضير الوسط الزرعي ثم اكمل الحجم بالماء المقطر حسب الكمية المطلوبة ، بعدها عدل الرقم الهيدروجيني بين (7.0-7.6) عند زراعة الطحالب في الدراسة الحالية بأضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH تركيز 0.2 عياري بأستعمال جهازpH-meter نوع (Ph2100- OKION) ،تم تعقيم جميع الأوساط الزرعية بأستعمال بالموصدة الكهربائية Autoclave نوع Hirayama على درجة حرارة 121مº و ضغط 0.1 ميكا باسكال و لمدة 20 دقيقة بعدها اضيف الفسفور ، تركت الأوساط الزرعية لتبرد بدرجة حرارة المختبر ، اما الوسط الزرعي الصلب فحضر بمكونات الوسط الزرعي السائل نفسها بعد اضافة الأكار اليه بتركيز2 % بعدها صب في اطباق بتري جافة و معقمة في كابينة الزرع Growth chamber قرب لهب بنزن ترك بدرجة حرارة الغرفة لكي يتصلب و حفظت الأطباق بعد تصلبها في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م ° بصورة مقلوبة لحين الأستعمال.

الجدول (1) مكونات الوسط الزرعي Chu-10 و المحور من قبل (1996), Al-Aarajy

المركب	محلول الخزن غرام / لتر	المركب	محلول الخزن غرام / لتر
$NaNO_3$	53.3	$MnCl_2.4H_2O$	0.045
K_2HpO_4	10	$(NH_4)Mo7O_{24}.4H_2O$	0.007
$CaCl_2.2H_2O$	40	$ZnSO_4.7H_2O$	0.056
$FeCl_3.6H_2O$	1.46	$CuSO_4.5H_2O$	0.02
$Na_2.EDTA$	31.8	$CoCl_2.6H_2O$	0.01
$MgSO_4.7H_2O$	25	H_3PO_3	0.72
$Na_2.SiO_3.9H_2O$	6.2		
$NaHCO_3$	25		

3-2 جمع العينات الطحلبية:

جمعت العينات الخاصة بالطحلب الأخضر المزرق *Nostoc carneum* من تربة من منطقتة مهيجران في قضاء ابي الخصيب و ذلك بقشط الطبقة السطحية من التربة الحاوية على النمو الطحلبي و بعد ذلك وضعها في قناني بلاستيكية محكمة الغلق حاوية على وسط زرعي Chu-10 معقم لحين فحصها في المختبر، بينما الطحلبان *Oscillatoria brevis* و

Enteromoropha intestinalis فقد تم جمع العينات الخاصة بهما من شط العرب منطقة الجامعة في قضاء كرمة علي ، بالنسبة للطحلب الأخضر المزرق *Oscillatoria brevis* *فقد* جمع بقشط الطبقة الحاوية على النمو للصخور القريبة من الساحل *من ثم* وضعها في قناني بلاستيكية محكمة الغلق و اضافة الماء لها من منطقة الجمع ، اذ جلبت العينات مباشرة الى المختبر للتحري عن الأنواع الطحلبية المراد عزلها اما بالنسبة لطحلب *Enteromoropha intestinalis* فقد جمع باليد ككتلة حيوية من شط العرب موقع الجامعة / كرمة علي في اكياس بلاستيكية و غسل عدة مرات بماء الحنفية و بعد ذلك غسل بماء مقطر معقم و جفد بجهاز التجفيد Freeze drier نوع LAB Conco 18 ، حفظت العينات المجفدة في قناني زجاجية نظيفة و معقمة و محكمة الغلق تحت درجة حرارة -18م° لحين الأستعمال .

اما بالنسبة لوقت جمع العينات فكان في شهر ايلول من عام 2012 لكل من الطحلب *Nostoc carneum* و*Oscillatoria brevis* و العينات الخاصة بطحلب *Enteromoropha intestinalis* في شهر تشرين الثاني من العام نفسه .

4-2 طرق عزل الطحالب:

1-4-2 طريقة التخفيف

تم تحضير عشرة أنابيب اختبار، تحتوي كل منها على حجم قدره 9 مليلتر من الوسط الزرعي السائل، اخذ واحد مليلتر من العينة المائية و نقل الى الأنبوبة رقم 1 ثم اخذ حجم 1 مليلتر منها و نقل الى الأنبوبة رقم 2 و هكذا الى انبوبة رقم 10 ، بعدها حضنت انابيب الأختبار في كابينة النمو بدرجة حرارة 2 ± 25 م° و اضاءة تراوحت بين(150-130) مايكروانشتاين /م2/ثا و لمدة 8:16 ساعة اضاءة : ظلام حتى تم الحصول على عزلة وحيدة الطحلب .

2-4-1 طريقة النشر

تم اخذ قطرة او قطرتين من راشح العينة المراد عزل و تنقية الطحالب منها على سطح طبق بتري يحتوي على الوسط الزرعي الصلب وتم نشرها على السطح الصلب للطبق ، وحضنت الأطباق مدة تراوحت بين (4-8) أيام في كابينة النمو و تحت ظروف النمو المذكورة في اعلاه بعد نمو الطحلب على وسط الصلب، تم عزله بوساطة إبرة نقل إلى وسط صلب آخر وتمت اعادة هذه العملية حتى تم الحصول على مزارع طحلبية وحيدة الطحلب Unialgal cultures (Stein , 1975) ، بعدها صنفت الطحالب بالأعتماد على المصادر التصنيفية(Prescott,1975; Desikachary , 1959)

Division : Cyanophyta

Class : Cyanophyceae

Order : Nostocales

Family : Nostocaceae

Genus : *Nostoc*

Species : *Nostoc carneum* Agardh

Family : Oscillatoriaceae

Genus : *Oscillatoria*

Species : *Oscillatoria brevis* Gomont

Division : Chlorophyta

Class : Ulvophyceae

Order : Ulvales

Family : Ulvaceae

Genus : *Enteromoropha*

Species : *Enteromoropha intestinalis* (L.) Link

2-5 استزراع الطحلب:

بعد عملية العزل و التشخيص نقلت الطحالب الى الوسط الزرعي السائل بوساطة ماصة معقمة في حالة الوسط السائل و بواسطة اللاقح Loop المعقم في حالة الوسط الصلب او من كلا الوسطين الى عدد من الدوارق الزجاجية حجم 100 مليلتر يحتوي كل دورق على 70 مليلتر من الوسط الزرعي المعقم واغلقت الفوهات الدوارق بالقطن المعقم و نقلت الى كابينة النمو تحت الظروف التي ذكرت سابقا بعدها رجت المزارع و استمرت عملية الزرع لحين الحصول على نمو جيد (Stein , 1975).

2-6 تنقية العزلات الطحلبية:

لغرض الحصول على عزلة طحلبية خالية من الجراثيم اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل (Weidman *et al.*,1984)، أذ غسلت الطحالب بالماء المقطر المعقم ثم نبذت مركزيا بسرعة 3000 دورة/ دقيقة و لمدة دقيقة ونصف اخذ الراسب و اعيد مزجه بالماء المقطر المعقم ، كررت العملية اثنا عشر مرة على الأقل و للتأكد من نقاوة العزلات اتبعت الطريقة الموضحة من قبل (Stein , 1973) المتضمنة الفحص المجهري للعزلات بعد زرعها على وسط الأكار المغذي Nutrient agar و حضنت بدرجة حرارة 37 مº و لمدة 18 ساعة ، بعدها فحصت المزرعة للتأكد من خلوها من الجراثيم و اعتبرت عزلة طحلبية نقية Axenic cuture.

2- 7 تقدير معدل النمو:

قدر معدل النمو عن طريق قياس كثافة الخلايا الضوئية Optical density بأستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع Spectro Sc-USA عند طول موجي 650 نانوميتر و حسب طريقة (Stein , 1973)، اذ تم تحديد الفترة التي يمر فيها كل طور ، و ذلك من خلال تهيئة وسط زرعي بحجم 200 مليلتر في دورق مخرطي سعة 500 مليلتر و اضيف له حجم قدره 20 مليلتر من المزرعة كلقاح ابتدائي و بعدها حضنت المزرعة في كابينة النمو

و قيست الكثافة الضوئية للخلايا من وقت التلقيح (الزمن =0) و في كل 24 ساعة و لمدة اربعة اسابيع ، اعتمدت طريقة (Fogg,1975) لحساب ثابت النمو K و حسب المعادلة التالية :

$$K=\text{Log } Nt - \text{Log } No / t$$

حيث :K = معدل النمو ،t = الزمن كل (24) ساعة ،Nt = الامتصاية بعد زمن t، No = الأمتصاصية في بداية التجربة

اما زمن تضاعف الجيل G فقد حسب من المعادلة التالية:

$$G = 0.301/K$$

2-8 اكثار العزلات:

تم اكثار العزلات الطحلبية قيد الدراسة بطريقة المزارع الثابتة Batch culture للحصول على الكتلة الحية ، اذ يمتاز هذا النوع من المزارع بأنه غير متجدد و ذو حجم ثابت اذ تم تحضير وسط زرعي حجمه 700 مليلتر في قناني حجمية سعة (1لتر) شفافة و معقمة و مغلقة بسداد قطني اضيف اليها اللقاح بحجم 70 مليلتر في ظروف معقمة و بعد وصول المزرعة الى منتصف الطور المستقر تم حصادها بأستعمال تقنية الطرد المركزي لسرعة 4000 دورة /الدقيقة بعدها جفدت العينات بجهاز التجفيد Freeze drier نوع LAB Conco 18 ، حفظت العينات المجفدة في قناني زجاجية نظيفة و معقمة و محكمة الغلق تحت درجة حرارة -18م° لحين الأستعمال (Epply ,1977).

2-9 تحضير المستخلصات الطحلبية:

2-9-1 تحضير المستخلص الكحولي الحار:

حضر المستخلص الكحولي 70% حسب طريقة السعيد (2002) اذ تم مزج وزن قدره 10 غرام من الطحلب المجفد مع 100 مليلتر من الكحول الأثيلي تركيز70% في دورق حجمي سعة 250 مليلتر .اجريت عملية التصعيد العكسي Reflux في درجة حرارة 40 م° لفترة 24 ساعة ثم ترك المحلول ليبرد و رشح تحت ضغط مخلخل بإستعمال اوراق ترشيح نوع Whattman No.1 ،و بعدها ركز المحلول بأستعمال جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة حرارة 50م ° اذ تم الحصول على مادة صلبة القوام وزنها 1 غرام من الطحلب *E.intestinalis* ذات لون اخضر غامق، و مادة صلبة القوام وزنها 0.5 غرام من الطحلب*O. brevis* ذات لون اخضر اما المادة التي تم الحصول عليها من الطحلب *N. carneum* فكان وزنها 0.5 غـــرام ذات ، لون بـــني حفظت العينات في الثلاجـــة بدرجة حـــرارة - 20م° لحين الأستعمال .

2-9-2 تحضير المستخلص القلويدي:

حضر المستخلص القلويدي تبعا لطريقة (السامرائي، 1983) اذ تم مزج وزن قدره 10غم من الطحلب المجفد منزوع الدهن مع 250 مليلتر من الكحول الأثيلي المحمض بتركيز 10%

من حامض الخليك Acetic acid في دورق زجاجي و اجريت عمليلترية الأستخلاص بأستعمال جهاز التصعيد الترجيعي المستمر بعدها رشح المحلول بأستعمال اوراق ترشيح نوع Whattman No.1 ذات فتحات قطرها 0.2 مايكروميتر، ركز الراشح الى ربع حجمة بأستعمال المبخر الدوار بدرجة حرارة 50 م° و عدل الرقم الهيدروجيني له الى 9 بوساطة الأمونيا NH_3 بتركيز 25 %و بعدها نقل المحلول الى قمع الفصل و اضيف له 250 مليلتر من الكلوروفورم و رج المحلول جيدا و ترك لفترة من الزمن و عزلت مكونات القلويد عن الماء و كررت العملية خمس مرات بدرجة حرارة المختبر و تم الحصول على مادة لزجة القوام حفظت بدرجة حرارة المختبر (25 م°) ، اذ تم الحصول على مادة لزجة القوام بوزن قدره 1.5 غرام من الطحلب *E.intestinalis* ذات لون اخضر غامق، و مادة لزجة القوام وزنها 0.3 غرام من الطحلب *O. brevis* ذات لون اخضر اما المادة التي تم الحصول عليها من الطحلب *N. carneum* فكان وزنها 0.5 غرام ذات لون بني غامق ، حفظت العينات في الثلاجة بدرجة حرارة 20-م° لحين الأستعمال .

2-10 الكشوفات الأولية النوعية للمستخلصات الطحلبية:

تم اجراء العديد من الكشوفات على المستخلصات المحضرة سابقا و حسب ما يلي:

2-10-1 كشف الأحماض الأمينية و الببتيدات:

تم الكشف عنها حسب طريقة (Harborne ,1984)،و ذلك بأستعمال كاشف النهيدرين Nihydrine بتركيز 1% اذ اضيف 1 مليلتر منه الى 1 مليلتر من المستخلص مع التسخين لمدة 10 دقائق بأستخدام الحمام المائي ، ان ظهور اللون البنفسجي دلالة على وجود الببتيدات و الأحماض الأمينية .

2-10-2 كشف البروتينات:

استعمل كاشف بيوريت Biurete و ان ظهور اللون البنفسجي دلالة على ايجابية التفاعل (Harbrone ,1984).

2-10-3 كشف الكاربوهيدرات:

استعمل كاشف مولش Molish reagent لهذا الغرض ،اذ تم اضافة خمس قطرات من محلول الفا-نفثول الكحولي α-Naphthol alcohol الكحولي الى 1 مليلتر من المستخلص ، بعدها اضيفت عدة قطرات من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 ، ان ظهور الحلقة البنفسجية دلالة على ايجابية التفاعل (Harbrone ,1984).

2-10-4 كشف الكلايكوسيدات:

2-10-4-1 قبل التحلل الكلايكوسيدي

مزج 1مليلتر من المستخلص مع كاشف بندكت في انبوبة اختبار و سخنت في حمام مائي على درجة حرارة 100م° لمدة 10 دقائق ، ان تكون راسب احمر او بني دلالة على وجود السكريات المختزلة ، (Al- Khazrajy , 1991)

2-10-4-2 بعد التحلل الكلايكوسيدي:

اضيفت بضع بقطرات من حامض الهيدروكلوريك المركز الى حجم قدره 5 مليلتر من المستخلص الكحولي للطحالب سخنت في حمام مائي بدرجة حرارة 40 م° لمدة 25 دقيقة لكسر الآصرة الكلايكوسيدية ، و عدل الرقم الهيدروجيني للمحلول بأضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز 2 مولاري ، بعدها اضيف له حجم مساو من كاشف بندكت و سخن المزيج لمدة 10 دقائق و ان تكون راسب احمر او بني دلالة على وجود الكلايكوسيدات (Al- Khazrajy, 1991).

2-10-5 كشف الفينولات:

رطبت ورقة الترشيح بحجم قدره 2 مليلتر من المستخلص الطحلبي و اضيف لها عدة قطرات من محلول كلوريد الحديديك $FeCl_3$ تركيز 1% وعرضت الى بخار الأمونيا و ان ظهور اللون الأخضر المزرق دلالة على ايجابية التفاعل (Harborne ,1984).

2-10-6 كشف القلويدات:

تم الكشف عنها بأستخدام عدة كواشف و حسب طريقة (Harbone ,1984) منها :

2-10-6-1 كاشف دراكندروف

اضيفت عدة قطرات من الكاشف الى حجم قدره 1 مليلتر من المستخلص الطحلبي و ان تكون الراسب البرتقالي دلالة على ايجابية التفاعل .

2-10-6-2 كاشفا (ماير وواكنر)

اضيف 1 مليلتر من كلا الكاشفين على حدة الى حجم قدره 1 مليلتر من المستخلص الطحلبي و ان ظهور العكارة دلالة على ايجابية التفاعل .

2-10-7 كشف التانينات

اضيف 1 مليلتر من خلات الرصاص تركيز 1 % الى1 مليلتر من المستخلص الطحلبي و ان تكون راسب بني فاتح دلالة على ايجابية التفاعل (Jawad,1997) .

2-10-8 كشف الصابونيات

استخدم كلوريد الزئبقيك تركيز 5 % اذ اضيف حجم 1مليلتر منه الى 1 مليلتر من المستخلص الطحلبي ، و ان تكون راسب ابيض دلالة على ايجابية التفاعل Harborne (,1984).

2-10-9 كشف الكيومارينات:

رطبت ورقة ترشيح بمحلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز 5% و وضعت فوق فوهة انابيب اختبار تحتوي على 5 مليلتر من المستخلص الطحلبي بعدها وضعت في حمام مائي بدرجة الغليان لبضع دقائق و عرضت الى الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي قدره 366 نانوميتر و ان ظهور اللون الأزرق دلالة على ايجابية التفاعل(Harborne ,1984).

2-10-10 كشف الفلافونيدات

اضيف حجم قدره 1 مليلتر من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي KOH تركيز 0.5 عياري الى 1 مليلتر من المستخلص و ان ظهور الراسب الأصفر دلالة على ايجابية التفاعل (Al-Khazrajy , 1991).

2-10-11 كشف التربينويدات الثلاثية

اضيف 1مليلتر من حامض الكبريتيك المركز الى 1 مليلتر من المستخلص الطحلبي المذاب في الكلوروفورم و ان تكون اللون الأحمر – الأرجواني دلالة على وجود التربينويدات الثلاثية (Harborne , 1984)

2-10-12 كشف الستيرولات

تم الكشف عنها بو اسطة كاشف Liberman- Burchard وان ظهور اللون الأخضر المزرق دلالة على وجود التربينويدات الثلاثية و الستيرولات (Harborne ,1984).

2-11 تحديد السمية الخلوية للمستخلصات الطحلبية:

تم تحديد السمية الخلوية للمستخلصات الطحلبية حسب طريقة Xian-gno and Ursulla (1994)، على كريات الدم الحمر للأنسان اذ تم اضافة حجم قدره 10 مليلتر من محلول كلوريد الصوديوم Nacl الفسيولوجي بتركيز 0.9 الى حجم قدره 0.5 مليلتر من الدم المسحوب من الأنسان مضاف الية مادة مانعة لتخثر الدم EDTA، ثم حضرت سلسلة من التخافيف للمستخلصات القلويدية للطحالب بأستعمال محلول كلوريد الصوديوم Nacl تركيز 0.9 كالتالي (1000:1,100:1,10:1,1:1) ثم وضع حجم قدره 0.8 مليلتر من كل تركيز مخفف في انبوبة اختبار معقمة و اضيف لكل انبوبة 0.2 مليلتر من (محلول كلوريد الصوديوم Nacl +دم الأنسان) ليصبح الحجم النهائي لكل انبوبة 1 مليلتر بعدها حضنت الأنابيب لمدة 30 دقيقة عند

درجة حرارة 37 م°، و استخدام (محلول Na cl+دم الأنسان) كمعاملة سيطرة ثم ملاحظة التحلل الدموي من عدمه لكريات الدم الحمر.

12-2 الغربلة الأولية للمستخلصات الطحلبية لأختبار فعاليتها الحيوية:

اتبعت طريقة الأنتشار على السطح الصلب Plate Agar Dick Diffusion Method (Sydney and Ellen, 1986) لغرض اجراء الغربلة الأولية ، اذ اخذت اقراص ذات اقطار 6 مليلترم من ورق الترشيح Whattman No.1 لغرض اجراء الغربلة الأولية و شربت بالمستخلصات القلويدية للطحالب في الدراسة الحالية ثم تركت لتجف بدرجة حرارة المختبر و تحت ظروف معقمة ، لقحت اطباق بتري الحاوية على وسط Muller-Hinton Agar (MHA) و بطريقة النشرSpreading Method بحجم 0.1 مليلتر وسط المرق المغذي Nutrient broth المزروع بالجراثيم المرجعية بعمر ست ساعات بحيث تكون مواصفات المزرعة بكثافة ضوئية قدرها 0.1 عند طول موجي 540 نانومتر، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة بعدها لوحظ تكون الهالة الشفافة حول الأقراص المشربة بالمستخلصات القلويدية و التي تمثل قطر منطقة التثبيط مقدرة بالمليلتريمتر و قورنت النتائج مع مجموعة السيطرة .

13-2 اختبار تأثير راشح المزرعة السائلة للطحلبين *Oscillatoria brevis* و *Nostoc carneum* على نمو بعض المزارع الفطرية:

استعمل في هذه التجربة راشح المزعتين السائلتين للطحلبين *Oscillatoria brevis* و *Nostoc carneum* و ذلك بعد زراعتها بالمزرعة السائلة و ان الوسط الزرعي المستخدم هو Chu-10 ، فصلت الكتلة الحيوية للطحلبين عن الوسط السائل بوساطة الطرد المركزي 4000 دورة/ دقيقة لمدة (40) دقيقة تحت ظروف معقمة ، تم الحصول على الفطريات الممرضة للنبات من مختبر ابحاث الفطريات في قسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة وقد نميت الفطريات على وسط Potato Dextrose Agar (PDO) الذي تم تحضيرة حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وبعد الحصول على راشح المزرعة الطحلبية السائلة تحت الشروط المعقمة تم اضافة الى وسط Potato Dextrose Agar (PDO) المعقم بواسطة Autoclave وبالنسب الأتية 10 و 50 و 70 % حجم/ حجم من الراشح الطحلبي وفي ظروف معقمة، بعدها صبت في اطباق بتري وبعد تصلبها تم تلقيحها بالفطريات الممرضة للنباتات *Fusarium* Sp. و *Alternaria alternate* ، اما اطباق السيطرة فهي خالية من الراشح الطحلبي فقط وسط (POD) ، حضنت الأطباق بعد ذلك بدرجة حرارة 25م° لفترة تراوحت من (5-7) ايام و قيس معدل نمو الفطريات وذلك بقياس قطر المستعمرة الفـــــــــــــطرية Colony growth diameters (Abedin and Taha, 2008).

14-2 تحديد التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات القلويدية لطحلب *Nostoc carneum* و لطحلب *E.intestinalis*

استعملت في هذه الدراسة نوعان من الجراثيم المرجعية و التي تم الحصول عليها من مختبر ابحاث البكتريا / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة و هي:

1 .*Escherechia coli* (ATCC25922)،2.*Staphylococcus aureus* (ATCC25923)

و استعملت الأوساط الزرعية:

A. وسط الأكار المغذي Nutrient Agar (NA) ، وسط المرق المغذي Nutrient Broth (NB) ، وسط مولر –هنتون Muller Hinton Agar (MHA)

لتحديد التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات القلويدية من الطحالب المعزولة ، حضر المحلول الخزين لكل مستخلص بأذابة 8 مليلترغم من مستخلص الطحلب في 4 مليلتر من المذيب العضوي Dimethylsulphoxide ليصبح تركيز المحلول 2000 مايكروغرام /مليلتر ثم حضرت سلسلة من التخافيف (3, 7 , 15 , 32.5 , 65 , 125, 250 , 500 , 1000)مايكروغرام / مليلتر بعد ذلك اخذ 2 مليلتر من كل تخفيف و اضيف الى قناني حاوية على 18 مليلتر من وسط MHA قبل تصلبه ليكون التركيز النهائي لكل قنينة (0.3, 0.7 , 1.5 , 3.1, 6.5, 12.5 , 25 ,50,100 , 200) مايكروغرام / مليلتر ثم سكب محتوى كل قنينة في طبق بتري معقم و ترك ليتصلب ، لقح كل طبق بحجم قدره 0.1 مليلتر من البكتريا المرجعية المذكوره اعلاه و المنماة على وسط NB لمدة 24 ساعة و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مº ثم حدد التركيز المثبط الأدنى لكل مستخلص على اساس اقل تركيز لا يظهر فيه نمو (Irobi *et al.*,1996).

15-2 اختبار الفعالية الضد تأكسدية (النسبة المئوية لأقتناص بيروكسيد الهيدروجين) للمستخلصات الطحلبية:

اتبعت الطريقة التي اوردها Ruch *et al.*,(1989) لتقدير قابلية المستخلصات الطحلبية على اقتناص بيروكسيد الهيدروجين و ذلك بخلط 1مليلتر من المستخلصات الطحلبية بتركيز 5 مليلترغم /مليلتر ، مع حجم قدره 0.6 مليلتر من بيروكسيد الهيدروجين تركيز 2 مليلتريمول المحضر في محلول منظم الفوسفات و الرقم الهيدروجيني 7.4 و بعدها قيست الأمتصاصية عند الطول الموجي 230 نانومتر وبعد مرور 10 دقائق حضرت العينة الضابطة من 1 مليلتر محلول منظم الفوسفات دون اضافة المستخلصات الطحلبية و استعمليلتر حامض الأسكوربك للمقارنة ، استعمليلترت المعادلة الأتية لحساب فعالية المركبات في اقتناص البيروكسيد

.

$$\text{النسبة المئوية لأقتناص البيروكسيد} = \frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{الأمتصاصية للعينة الضابطة}} \times 100$$

2-16 عزل و تشخيص المركبات الفعالة للمستخلصات القلويدية بأستعمال جهاز

كروموتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة GC-Mass:

تم عزل و تشخيص بعض المركبات الكيميائية الفعالة من المستخلصت القلويدية للطحالب المعزولة في الدراسة الحالية في مختبرات جامعة طهران – جمهورية ايران الأسلامية في طهران و ذلك بأستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز- طيف الكتلة و كان نوع الجهاز المستخدم Agilent Technologies GC 7890 GC System.

2 -17 فصل مكونات المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* بأستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Harborne 1984)، اذ استخدمت صفائح من الألمنيوم المطلية بهلام السليكا ذات ابعاد (20×20) سم كطور ثابت و مطلية بهلام السليكا بسمك 0.25 مليلتر ، تم تحميل 10 مايكرولتر من المستخلص القلويدي و باستخدم الميثانول النقي كطور متحرك استغرقت عملية التصعيد 30 دقيقة ، بعدها جففت العينة بالهواء الساخن ، و ظهرت البقع المفصولة بالمظهرات (مصباح الأشعة الفوق البنفسجية عند الطول الموجي 254 نانومتر وبخار اليود) ثم حدد معدل الجريان النسبي Rate flow Rf للبقع المفصولة .

2-18 عزل مكونات المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* بأستعمال تقنية كروماتوغرافيا العمود

اتبعت طريقة (Harborne 1948) لهذا الغرض اذ استعملت عمود زجاجي ابعاده (1.5×50) سم مملوء بمستحلب هلام السليكا بواقع 25 غرام من مادة السليكا جل ذات حبيبات بقطر (100-200) مايكرون، مذابة في 30 مليلتر من السائل المفرق وهو عبارة عن ميثانول نقي ، اذيب 0.2 غرام من المستخلص القلويدي للطحلب في حجم قدره 5 مليلتر من السائل المفرق ثم جمعت مكونات العينة المفصولة من نهاية العمود بأنابيب الأختبار ،اختبرت مكونات كل عينة بوساطة تقنية TLC و جمعت العينات ذات معدل جريان نسبي متفاوت ، كررت العملية عدة مرات للحصول على الوزن المطلوب .

2-19 التشخيص الكيميائي للمركب القلويدي المستخلص من الطحالب

2-19-1 التشخيص بمطياف الأشعة تحت الحمراء

سجل طيف الأشعة تحت الحمراء IR للقلويد المستخلص و ذلك بأستعمال جهاز مطياف ألأشعة تحت الحمراء IR- spectrophotometer نوع Spectrophotometer Model No. 4800صنع في الياپان (Japan)، اذ مزجت كمية من المادة المستخلصة جيدا مع كمية قليلة من بروميد البوتاسيوم KBr analar و ضغطت بشكل اقراص صغيرة ووضعت في جهاز مطياف الأشعة تحت الحمراء و سجلت اطياف الأشعة تحت الحمراء في المنطقة المحصورة بين (500-4000) سنتمتر$^{-1}$ ، في قسم الكيمياء / كليةالتربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة .

2-19-2 قياس درجة الأنصهار Melting Point measurment

تم تحديد درجة الأنصهار للمستخلص القلويدي وذلك بوضع كمية من المادة المستخلصة في انبوبة شعرية مسدودة من احد طرفيها ثم وضعت في جهاز قياس درجة الأنصهار Thermo 9100 صناعة في بريطانيا .

3-19-2 كشف الصهر بالصوديوم:

تم اجراء الكشف حسب طريقة (Fieser and Williamson , 1975) اذ اخذت قطعة صغيرة من الصوديوم ووضعت في انبوبة اختبار جافة و نظيفة و سخنت على اللهب لمدة (2-3) دقيقة لحين الاحمرار ، بعد ذلك اخذت كمية من المركب القلويدي المستخلص (اقل من كمية الصوديوم) و وضعت في انبوبة اختبار و اعيد التسخين على اللهب لمدة ثلاث دقائق بعدها تركت انبوبة الأختبار بدرجة حرارة الغرفة ، اضيف لها عدة قطرات من الأيثانول و اضيف الماء المقطر الى النصف و سخنت بلهب بنزن و رشحت بأستعمال اوراق ترشيح نوع Whattman No.1 لأستعمالها في الكشوفات التالية :

1-3-19-2 الكشف عن النتيروجين:

وضع 1 مليلتر من الراشح الناتج من منصهر الصوديوم في انبوبة اختبار ثم اضيف اليه بلورات من كبريتات الحديدوز الأمونياكية مع الرج و التسخين حتى الغليان بعدها اضيف اليه حامض الكبريتيك المخفف ، ان ظهور اللون الأخضر المزرق دلالة على وجود النيتروجين .

2-3-19-2 الكشف عن الكبريت:

وضع 1 مليلتر من الراشح من منصهر الصوديوم في انبوبة اختبار ثم اضيف اليه عدة قطرات من محلول نتروبروسيد الصوديوم Sodium nitroprusside ان ظهور الراسب القهوائي – الأسود او تلون المحلول باللون البنفسجي او الأرجواني دلالة على وجود الكبريت .

3-3-19-2 كشف الحامض الكربوكسيلي

استخدمت بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$ تركيز 10% ، و ان ظهور الفقاعات مع ازيز وفوران دلالة على وجود مجاميع الكاربوكسيل (Shriner , 1980)

4-3-19-2 كشف الذائبية

تم الكشف عن الذائبية بأستخدام انواع مختلفة من المذيبات القطبية و الغير قطبية (الماء و الأيثانول و الميثانول و الداي مثيل سلفوكسيد DMSO)، اذ اخذ 0.005 غم من المكونة و اضيف اليها 1 مليلتر من المذيبات السابقة .

20-2 تأثير المستخلص القلويدي الخام للطحلب ***E.intestinalis*** **ضد الخلايا السرطانية:**

اجري هذا الاختبار على الخط الخلوي السرطاني لخلايا السرطانية العضلية نوع RD Rhabdomyosarcoma cell line في مختبر الشركة العراقية للتقنيات الحيوية/بغداد حسب طريقة (Hussain *et al.*,2014) وتضمن الاختبار مرحلتين:

المرحلة الأولى: تهيئة خطوط الخلايا السرطانية

تم ذلك بأضافة حجم قدره 2 مليلتر من محلول التربسين- فرسين الى وعاء الزرع النسيجي حجم 50 مليلتر الحاوي على الخلايا بعد تفريغه من الوسط الزرعي وغسله بمحلول Phosphate buffer saline المعقم ثم رج الوعاء برفق ثم وضع الوعاء في الحاضنة عند درجة حرارة 37°م لمدة تراوحت من (1 -2) دقيقة لكي ينفك التصاق الخلايا بعضها عن بعض الأخر و تحت جدار الوعاء و ذلك لأجل الحصول على خلايا منفردة, بعدها أضيف الى الوعاء الحاوي على الخلايا المفككة 5 مليلتر من الوسط الزرعي RPMI-1640 المحضر من 90% من RPMI-1640 و 10% من المصل البقري Fetal bovine serum (FBS) و 100 IU/ml من المضاد الحيوي البنسلين penicillin و 100 مايكروغرام / مليلتر من المضاد الستربتومايسين streptomycin مع تحريك الوعاء لمزج الخلايا المفككة مع الوسط الزرعي الجديد , بعدها أفرغت نصف محتويات هذا الوعاء الى وعاء زرعي آخر وبذلك تم الحصول على المزرعة الثانوية أو التمريره الجديدة subculture or Passage وبعدها حضنت بدرجة حرارة 37°م و5% ثاني اوكسيد الكاربون CO_2 ولمدة يومين وعندما اصبحت الخلايا ذات نمو جيد اذ تتكون طبقة أحادية كامليترة من الخلايا monolayer خالية من التلوث عومليلترت الدوارق بانزيم التربسين لفصل الخلايا بعدها حضر عالق من الخلايا بتركيز 4×10^4 خلية/ مليلتر اذ تم حساب الخلايا باستعمال جهازعد الخلايا Haemocytometer وبذلك تكون الخلايا جاهزة للاستعمال لإجراء الاختبار.

المرحلة الثانية: اختبار الفعالية الضد سرطانية:

بعد ان جهز عالق الخلايا اخذ منها 100 مايكرومول و وضعت في طبق الزرع النسيجي ذي القعر المسطح والبالغ عددها 96 حفرة 96-microtiter plate باستعمال ماصة دقيقة micropipette ولثلاثة صفوف , تركت الاطباق في الحاضنة في درجة حرارة 37 مº لمدة تراوحت مابين (12– 18) ساعة الى حين التصاق الخلايا بالحفرة , بعدها تم التخلص من الوسط الزرعي في الحفر وأضيف 200 مايكرومول من وسط زرعي جديد خالي من المصل serum – free medium والحاوي على حجوم من مستخلص القلويدي الخام كما تم عمل صف يمثل مكرر السيطرة تم فيه اضافة الوسط الزرعي فقط الى خلايا RD , حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م بعد مرور فترة التعرض المحددة للحضن 48 ساعة و 72 ساعة ، أخرجت الاطباق وأضيف إليها بعد التخلص من الوسط 200 l مايكرو مليلتر من صبغة MTT -2,5-(3,[4,5-dimethylthiazole-2-yl]

(diphenyl-tetrazolium bromide بتركيز 0.5 مايكرو غرام لكل حفرة وأعيد الطبق الى الحاضنة لمدة 4 ساعات بعدها اخرج الطبق واضيف 50 مايكرو مليلتر من مادة DMSO وقرأت النتائج باستخدام جهاز ELIZA microplate reader عند طول موجي 540 نانوميتر اذ ان القراءة تمثل نسبة اختزال الصبغة الى شكل Formazon , تم تحديد معدل تثبيط النمو للخلايا السرطانية من خلال تحويل التراكيز (الحجوم) المثبطة للمستخلص الخام الى نسب مئوية وكالاتي:

Inhibition Rate (IR) %=(A-B/A) x100

اذ أن:IR: النسبة المئوية لمعدل للتثبيط ، A : عدد الخلايا قبل اضافة المستخلص ،

B: عدد الخلايا بعد اضافة المستخلص

2-21 الأختبارات السريرية على الحيوانات المختبرية

1-21-2 حيوانات التجربة:

استخدمت في هذه التجربة ارانب عددها سبعة و عشرون ارنبا ذات اوزان تتراوحت 1100-(1000)غم تم جلبها من الأسواق المحلية بعدها وضعت في اقفاص خاصة اعدت لهذا الغرض و غذيت على الخضروات ، لمدة عشرة ايام (فترة التكيف). تم الحفاظ على درجة الحرارة والرطوبة عند 25 درجة م^{o} ، و رطوبة قدرها 60 %على التوالي، مع توفير كميات كافية من الطعام والماء.

2-21-2 استحداث حالة ارتفاع الكوليسترول : Induced Hyper Cholesteremia

استخدمت في هذه التجربة عددها سبعة و عشرون ارانبا و التي قسمت عشوائيا الى مجموعتين :

المجموعة الأولى : جرعت المجموعة الأولى (500) مليلترغم/ كغم من الكوليسترول الذائب بالزيت لمدة اسبوعين وذلك لأستحداث حالة ارتفاع الكوليسترول Hypercholesteremia .

المجموعة الثانية : تم تجريعها بمحلول المغذي كلوريد الصوديوم بتركيز(0.9). (Colla *et al*., 2002)

2-21-3 تأثير المستخلص القلويدي من لطحلب *E. intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الحيوانات المصابة بأرتفاع الكوليسترول:

استخدمت في هذه التجربة حيوانات مصابة بارتفاع الكوليسترول HyperCholesteremia عددها ثمانية عشر ارنبا تم تقسيمها الى مجموعتين كما يلي :

المجموعة الأولى : تحتوي هذه المجموعة على ارانب مصابة ارتفاع الكوليسترول عددها ستة ارانب تم تجريعها فمويا بالمستخلص القلويدي للطحلب *E. intestinalis* (1.5) مليلترغم / يوم و لمدة 4 اسابيع .

المجموعة الثانية : تحتوي هذه المجموعة على ارانب مصابة ارتفاع الكوليسترول عددها ستة تم تجريعها فمويا بحجم قدره 2 مليلتر من المحلول المنظم و لمدة اربعة اسابيع و التي اعتبرت مجموعة سيطرة موجبة .

المجموعة الثالثة : تحتوي هذه المجموعة على حيوانات طبيعية غير مصابة بأرتفاع الكوليسترول عددها ستة ارانب تم تجريعها فمويا حجم قدره 2 مليلتر من المحلول المنظم و لمدة اربعة اسابيع و التي اعتبرت مجموعة سيطرة سالبة .

أخذ عينات دم في كل أسبوع (للتجربة)، تم جمعها من الوريد الأذني الحافي باستخدام حقنة حجمها 3 مليلتر ونقلها فورا إلى أنابيب حاوية على EDTA ، و بعد ذلك تم طردها مركزياعند 4000 دورة /الدقيقة لمدة عشرة دقائق لإزالة خلايا الدم الحمراء و الحصول على البلازما ، وبعدها استخدم البلازما في الأختبارات الكيمو حيوية. (Colla *et al*., 2002)

2- 22 الأختبارات الكيميوحيوية:

2-21-1 تحديد الكوليسترول الكلي:

اعتمدت طريقة Fasce and Vandelinde (1972) في القياس و التي اعتمدت مبدا التفاعل على تحويل الكوليسترول المؤستر الى الكوليسترول و احماض دهنية حرة بمساعدة انزيم

Cholesterol esterase بعد ذلك تم اكسدة الكوليسترول ليتكون مركب H_2O_2 الذي يكون مع مركب (4-aminoantipyrine) ذو اللون الوردي و ان شدة لونه يدل على تركيز الكوليسترول في مصل الدم كما في المعادلات التالية :

Solution	Sample	Standard	Blank
Sample	10 µl		
Standard		10 µl	
Reagent	1ml	1ml	1ml

تخلط مكونات الأنابيب و تترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق و لمدة 10 دقائق في الحاضنة عند درجة حرارة 37 م° بعدها تم قياس الأمتصاصية لكل انبوب عند طول موجي قدره 550 نانوميتر

Cholesterol ester $\xrightarrow{\text{Cholesterol esterase}}$ Cholesterol +free fatty acid

Cholesterol+O_2 $\xrightarrow{\text{Cholesterol oxidase}}$ Cholest +4-en-3-one+H_2O_2

2H2o2+ phenol+4amino-antipyrine $\xrightarrow[\text{Peroxidase Pink}]{\text{POD}}$ Quinoneimine+4H20

1. Reagents composition تتكون من عدة الكواشف وهي:

أ . الكاشف المتعادل Reagent R1 و يتكون من :

1. Phosphate buffer (100 mmol /l)
2. Chloro -4-phenol (5 mmol/l)
3. Sodium Cholate (2.3 mmol/l)
4. Triton × 100 Perservative (1.5 mmol/l)

ب . الكاشف الأنزيمي Reagent R2

1. Cholestrol Oxidase (≥ 100 IU/L)
2. Cholestrol esterase (≥ 170 IU/L)

3. Peroxidase (≥ 1200 IU/L)

4. 4-Amino-antipyrine (AAP) (0.25 mmol/l)

5. Poly ethylene glycol (PGE) 6000(167µmol/l)

ج . المحلول القياسي Standard R3

يتمثل بالمحلول القياسي للكوليسترول بتركيز 5.17 mmol/L

2. طريقة القياس Measurement Method

$$\text{تركيز الكوليسترول (mmol/L)} = \frac{\text{الأمتصاصية لعينة المصل}}{\text{الامتصاصية للمحلول القياسي}} \times \text{التركيز القياسي}$$

2-22-2 قياس الكليسيريدات الثلاثية:

اعتمدت طريقة Trinder (1969) لهذا الغرض اذ تحلل الكليسيريدات بواسطة انزيم lipase الى كليسرول و ثلاث احماض دهنية و بعد سلسلة من التفاعلات تكون محلول من Quinoneimine ذو اللون الوردي هو الذي يستدل من شدة لونه على تركيز الكليسيريدات الثلاثية و توضح المعادلات التالية طريقة التفاعل :

Solution	Sample	Standard	Blank
Sample	10 µl		
Standard		10 µl	
Reagent	1ml	1ml	1ml

$$\text{Triglycerides} \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Glycerol + free fatty acids}$$

$$\text{Glycerol + ATP} \xrightarrow{\text{Glycerol Kinase}} \text{Glycerol -3- phosohate + ADP}$$

1. مكونات الكواشف Reagents composition تتكون الكواشف المستخدمة في القياس من:

أ. الكاشف المتعادل Reagent R1 و يتكون من :

1. Piperayine -N- N-bis(2-ethan sulfonic acid (PIPES)(100 mmol/l)
2. Magnesium chloride (9.8 mmol/l)
3. Chloro-4-phenol Preservative (3.5 mmol/l)

ب . الكاشف الأنزيمي Reagent R2 و يتكون من :

1. Lipase (≥ 1000 IU/L)
2. Peroxidase (POD) (≥ 1700 IU/L)
3. Glycerol 3 phosphate oxidase (GPO) (≥ 3000 IU/L)
4. Glycerol kinase (GK) (≥660 IU/L)
5. 4-Amino-antipyrine (AAP) (0.5 mmol/l)
6. Adenosine triphosphate Na (ATP) (1.3mmol/l)

ج . المحلول القياسي Standard R3 :

يحوي على المحلول القياسي للكليسيردات بتركيز 2.28 mmol/l

طريقة القياس Measurement method :

رجت الأنبوبتين و حفظت بدرجة حرارة 37 مº لمدة 10 دقائق ثم قيست الأمتصاصية للمحلول بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند طول الموجي 500 نانوميتر ، تم تحديد تركيز الكليسيردات الثلاثية من المعادلة ادناة :

$$\text{تركيز الكليسيريدات الثلاثية (mmol/L)} = \frac{\text{الأمتصاصية لعينة المصل}}{\text{الامتصاصية للمحلول القياسي}} \times \text{التركيز القياسي}$$

2-21-3 قياس مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة:

تم قياس تركيز HDL في البلازما بالأعتماد على طريقة Friedwald(1979) اذ ان البروتينات منخفضة الكثافة (LDL) وكذلك جزيئات Chylomicron تترسب بأضافة حامض Phosphotungstic acid بوجود أيونات المغنيسيوم في درجة حرارة الغرفة. بينما HDL تبقى عالقة فيه وبذلك يمكن قياس تركيز الكولسترول في الراشح المتبقي .

Solution	Sample	Standard	Blank
D.W			50µl
Reagent2 (Calibrating solution		50µl	
Supernatant	50µl		
Cholesterol RTU	1ml	1ml	1ml

1. مكونات الكواشف Reagent composition استخدمت الكواشف التالية في التحليل لقياس مستوى الكوليسترول عالي الكثافة:

أ . الكاشف المتعادل Reagent R1 و يتكون من :

1. Phosphotungstic acid (0.55 mmol/L)
2. Magnesium Chloride (25 mmol/L)

ب . المحلول القياسي Standard

تحوي على المحلول القياسي للبروتينات الدهنية عالية الكثافة بتركيز (5.24 (mml/L.

2. طريقة القياس:

بعد مرور خمس دقائق وضعت الأنابيب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ، بعدها اخذ الراشح و قيس فرق الامتصاصية له خلال ساعة كاملة بواسطة جهاز المطياف الضوئي اذ استخرج تركيز HDL ، من خلال المعادلة التالية :

$$\text{تركيز HDL ملليتريمول/لتر} = \frac{\text{الفرق بالأمتصاصية لعينة المصل}}{\text{الفرق بالامتصاصية للمحلول القياسي}} \times \text{التركيز القياسي}$$

كما تم حساب تركيز (LDL) من خلال المعادلة التالية :

$$LDL=TC-(HDL+TG)/5$$

4-22-2 قياس البروتينات المنخفضة الكثافة جدا:

تم قياسها تبعا لطريقة (Friedwald ,1979) و ذلك بتقسيم TG على (5).

VLDL=TG/5

23-2 التحليل الأحصائي:

استخدم البرنامج الأحصائي الجاهز(SPSS) Statistical Package for Social Science في تحليل البيانات احصائيا و بأستخدام جدول تحليل التباين one – way A nova و تحت مستوى احتمال $P \leq 0.05$. وبالاعتماد على الراوي و خلف الله (1980).

الفصل الثالث

النتائج

Results

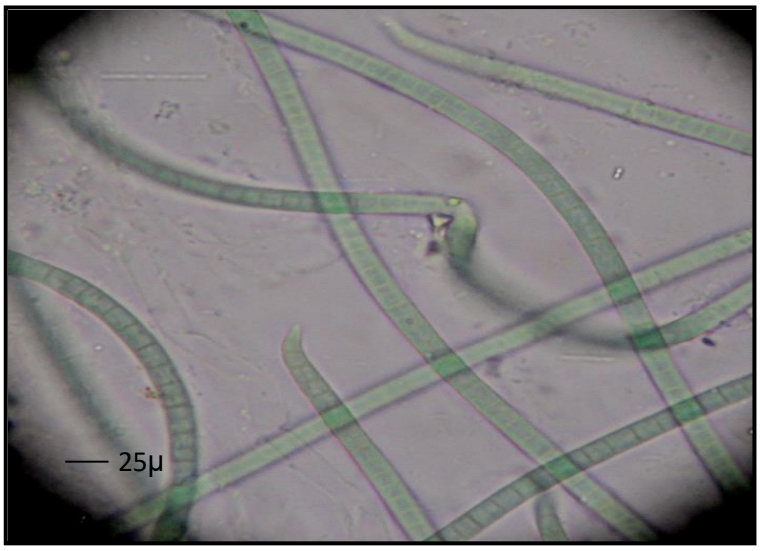
3-النتائج :

1-3 وصف الطحالب المعزولة

تم في الدراسة الحالية عزل وتنقية و استزراع نوعين من الطحالب الخضر المزرقة و هما *Oscillatoria brevis* و*Nostoc carneum* و نوع اخر يعود الى الطحالب الخضر *Enteromorpha intestinalis*

1-1-3 الطحلب الأخضر المزرق *Oscillatoria brevis*

طحلب خيطي بسيط غير متفرع و يمتاز هذا الطحلب بأنه يكون على شكل شعيرات Trichomes ذات لون اخضر مزرق الى اخضر وهذه الشعيرات غير متفرعة مستقيمة و في بعض الأحيان تكون منحنية قليلا تشكل مع بعضها حصيرة مسطحة و اما خلاياها فأنها مستطيلة عرضها اكبر من طولها اذ يتراوح عرضها (3-1.5) مايكرميتر اما طولها فيتراوح من(4-6.5)مايكروميتر، و الخلية القمية تتميز مخروطية مستدقة الطرف ، الشكل صورة رقم (1) .



صورة (1) الطحلب الأخضر المزرق *O.brevis*

2-1-3 الطحلب الأخضر المزرق *Nostoc carneum*

طحلب خيطي غير متفرع ، الحويصلات المغايرة وسطية الموقع و تلاحظ ايضا طرفية وذات حجم اكبر قليلا من الخلايا الخضرية خلاياه تكون كروية في بداية النمو ثم تصبح الخلايا اسطوانية متطاولة الشكل طول الخلية اكثر بمرة او مرتين من عرضها ، اذ يتراوح طول الخلية من (6-9) مايكروميتر و عرضها من (5.5-6) مايكروميتر تتغاير الخيوط في الوانها بين الأخضر-المزرق الى البني صورة رقم (2).

صورة (2)الطحلب الأخضر المزرق *N. carneum*

3-1-3 الطحلب الأخضر *Enteromorpha intestinalis*

طحلب أنبوبي الشكل يعود الى الطحالب الخضر و ينمو من قاعدة قرصية صغيرة و يشكل اشرطة fronds يتراوح طولها من (10-30) سم اما قطرها من (6-18) ملمتر و عرضها يتراوح (0.24-0.71) ملمتر و تكون الأشرطة مستديرة وفي بعض الأحيان يكون هذا الطحلب متفرع خاصة عند ارتفاع نسبة الملوحة في المسطح المائي صورة رقم (3)

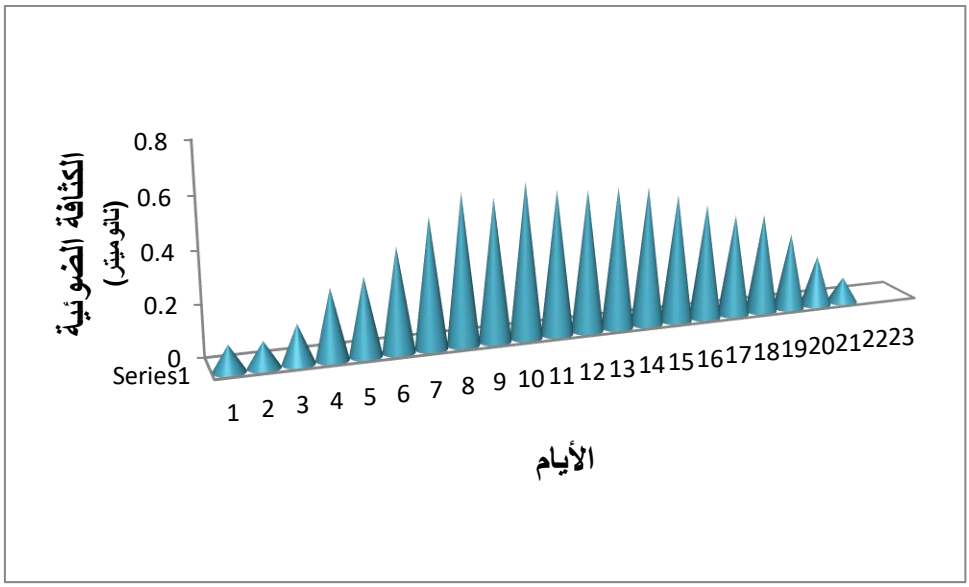
صورة (3)توضح الطحلب الأخضر *E. intestinalis*

2-3 معدل النمو

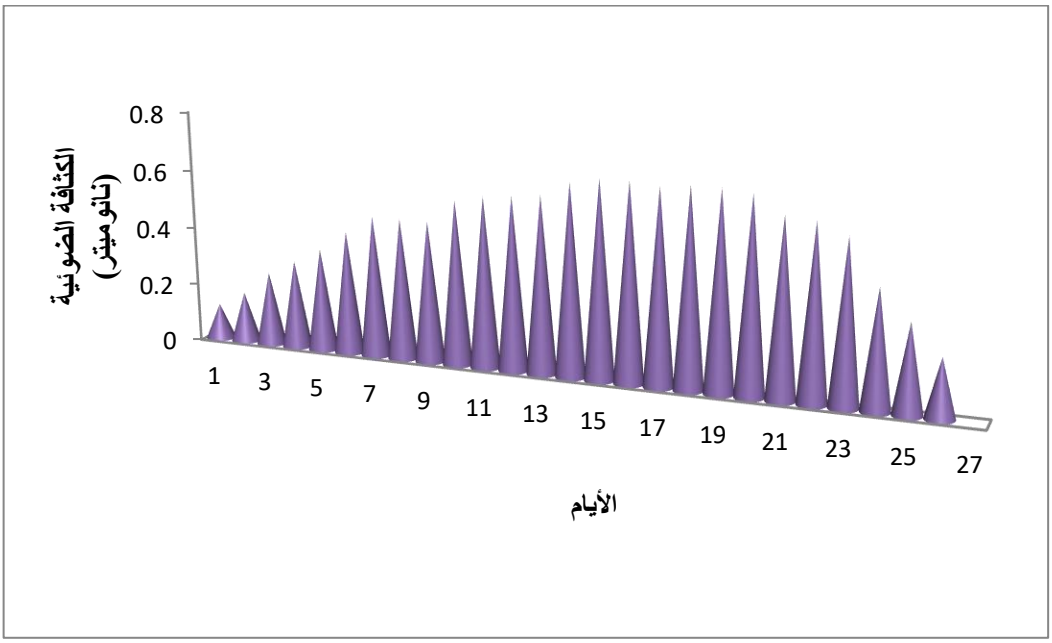
يشير معدل النمو الى تضاعف الكتلة الحية خلال وحدة زمنية معينة و قد تم قياسه بدلالة الكثافة الضوئية اذ ان زيادة العكورة لمعلق الطحلب يشير الى النمو الجيد للطحلب مع تقدم الزمن ، اظهر الطحلب*O. brevis* فترة تأقلم Lag phase لمدة يومين ثم ازداد النمو بشكل مضطرد و الذي يمثل الطور الأسي Exponential phase لغاية اليوم الثامن وليأتي بعدها طور الأستقرار Stationary phase الذي استمر لغاية اليوم الخامس عشر ليبدا بعد ذلك طور التناقض Decline phase ،اما ثابت النمو النسبي و معدل تضاعف الجيل فقد بلغ 0.23 و 1.4 يوم على الترتيب و علية فقد حصد هذا الطحلب في منتصف طور الأستقرار له في اليوم الحادي عشر .

اما بالنسبة لطحلب *N. carneum* فقد كان طور التأقلم له يومين اما طور النمو الأسي لهذا الطحلب فقد بدا من اليوم الثالث بزيادة مضطردة والذي استمر لغاية اليوم الرابع عشر ليبدأ

بعدها طور الأستقرار الذي استمر لغاية اليوم العشرين وبعد ذلك بدا طور التناقص و كان ثابت النمو النسبي(K) للطحلب 0.27 اما وقت تضاعف الجيل (G) فقد بلغ . 1.05 يوم وعليه فأن الطحلب تم حصاده في اليوم السادس عشر.



الشكل (2) يوضح منحنى نمو الطحلب الأخضر المزرق *O. brevis*



الشكل (3) يوضح منحنى نمو الطحلب الأخضر المزرق *N. carneum*

3-3 الكشوفات النوعية للمستخلصات الكحولية للطحالب المعزولة:

اظهرت نتائج الكشوفات النوعية باستعمال المستخلص الكحولي (70%) احتواء الطحلبين المعزولين *O.brevis* و *N. carneum* على مجموعة القلويدات و الببتيدات و البروتينات و الكاربوهيدرات و الفينولات و و الفلافونيدات و عدم احتوائهما على الصابونينات و التانينات و التربينات و الصابونينات و الكلايكوسيدات و الكيومارينات ، امابالنسبة للطحلب الأخضر *E. intestinalis* فقد احتوى على القلويدات و الببتيدات و البروتينات و الكاربوهيدرات و الفينولات والتانينات والتربينات و الكلايكوسيدات و الفلافونيدات و وعدم احتوائة على الصابونينات و الكيومارينات و كما في جدول(2).

جدول(2) يوضح الكشوفات النوعية للمستخلصات الكحولية الطحلبية

العزلات الطحلبية / المجاميع الكيميائية	*O.tenuis*	*N. carneum*	*E.intestinalis*
القلويدات	+	+	+
الببتيدات	+	+	+
البروتينات	+	+	+
الكاربوهيدرات	+	+	+
الفينولات	+	+	+
الصابونين	-	-	-
التانينات	-	-	+
التربينات	-	-	+
الكلايكوسيدات قبل التحلل	-	-	+
الكلايكوسيدات بعد التحلل	-	-	+
الكيومارينات	-	-	-
الفلافونيدات	+	+	+

4-3 الكشوفات النوعية للمستخلصات القلويدية

اجريت عدد من الكشوفات النوعية على المستخلصات القلويدية المعزولة من الطحالب في الدراسة الحالية و كما في جدول (3).

جدول(3) يوضح الكشوفات النوعية للمستخلصات القلويدية للطحالب المعزولة

E.intestinalis	***N. carneum***	***O.tenuis***	العزلات الطحلبية / الكشف
+	+	+	Dragendorff
+	+	+	Wagner
+	+	+	Mayer

5-3 اختبار السمية الخلوية للمستخلصات القلويدية:

لم يظهر المستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis* في الدراسة الحالية اي قدرة على تحلل كريات الدم الحمر عند التراكيز المختبرة(1000:1,100:1,10:1,1:1) مايكروغرام/مليلتر ، بينما لم يظهر التحلل في معامل السيطرة الحاوي على phosphate buffer saline., اما القلويد المستخلص من الطحلب *O. brevis* فقد امتلك سمية تجاة كريات الدم الحمر و القلويد المستخلص من الطحلب *N. carnum* ايضا امتلك سمية تجاة كريات الدم الحمر ، اذ ادى المستخلص القلويدي الى تحلل كريات الدم الحمر مما يشير الى سميتة كما هو موضح في الجدول (4).

جدول(4) يوضح اختبار السمية للمستخلصات القلويدية للطحالب المعزولة

N. carnum	*O. tenuis*	*E.intestinalis*	العزلات الطحلبية / التركيز

T	T	NT	1:1
T	T	NT	10:1
T	T	NT	100:1
T	T	NT	1000:1
NT	NT	NT	Control دم + phosphate buffer saline

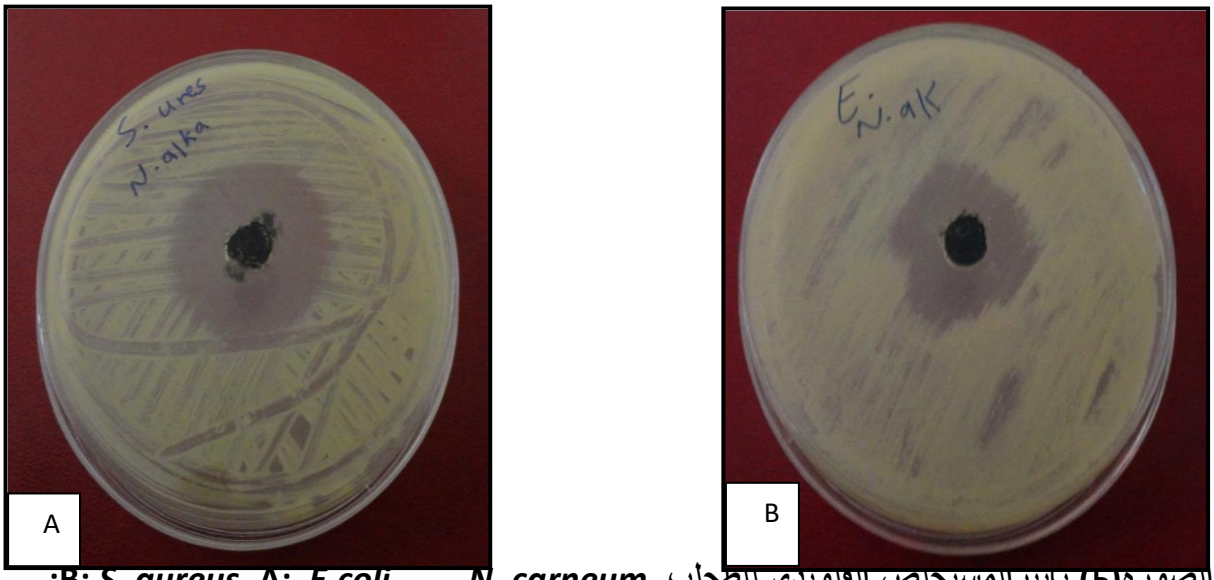
NT = Non toxic ، T = Toxic

6-3 الغربلة الأولية و اختبار فعالية القلويد المعزول من الطحالب

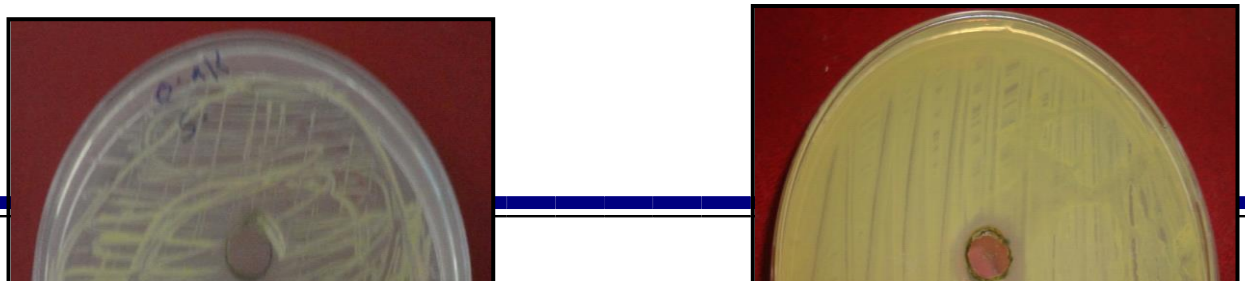
تفاوتت المستخلصات القلويدية المعزولة من الطحالب في الدراسة الحالية في مدى فعاليتها لكل من الجراثيم الموجبة و السالبة لصبغة كرام ، اذ امتلك المستخلص القلويدي المعزول من الطحالب قيد الدراسة فعالية تثبيطية تجاة البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام اذ بلغ قطر منطقة التثبيط للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis* (25) ملميمتر تجاة البكتريا *E.coli* و *S. aureus* بينما القلويد المعزول من الطحلب *N. carneum* فقد بلغ (30) ملميمتر لكلا نوعين البكتريا المستخدمة في الدراسة *E.coli* و *S. aureus* اما القلويد المستخلص من الطحلب*O.brevis* فقد كان قطر منطقة التثبيط تجاة *E.coli* (13)ملميمتر و تجاة بكتريا *Staphylococcus aureus* كان (3) ملميمتر فقط و كما هو مبين في الجدول (5) والصور (6-4) .

جدول (5) يبين اقطار تثبيط النمو للعزلات البكترية القياسية مقدرة بوحدات ملميمتر للمستخلص القلويدي للطحالب المعزولة .

S. aureus	*E.coli*	المستخلص القلويدي
25	25	*E.intestinalis*
30	30	*N. carneum*
3	13	*O.brevis*



الصورة(5) تاثيرالمستخلص الفلويدي للطحلب *N. carneum* A: *E.coli* B: *S. aureus*:



الصورة (6) تأثيرالمستخلص القلويدي للطحلب *O.brevis* A: *E.coli* : B: *S. aureus* :

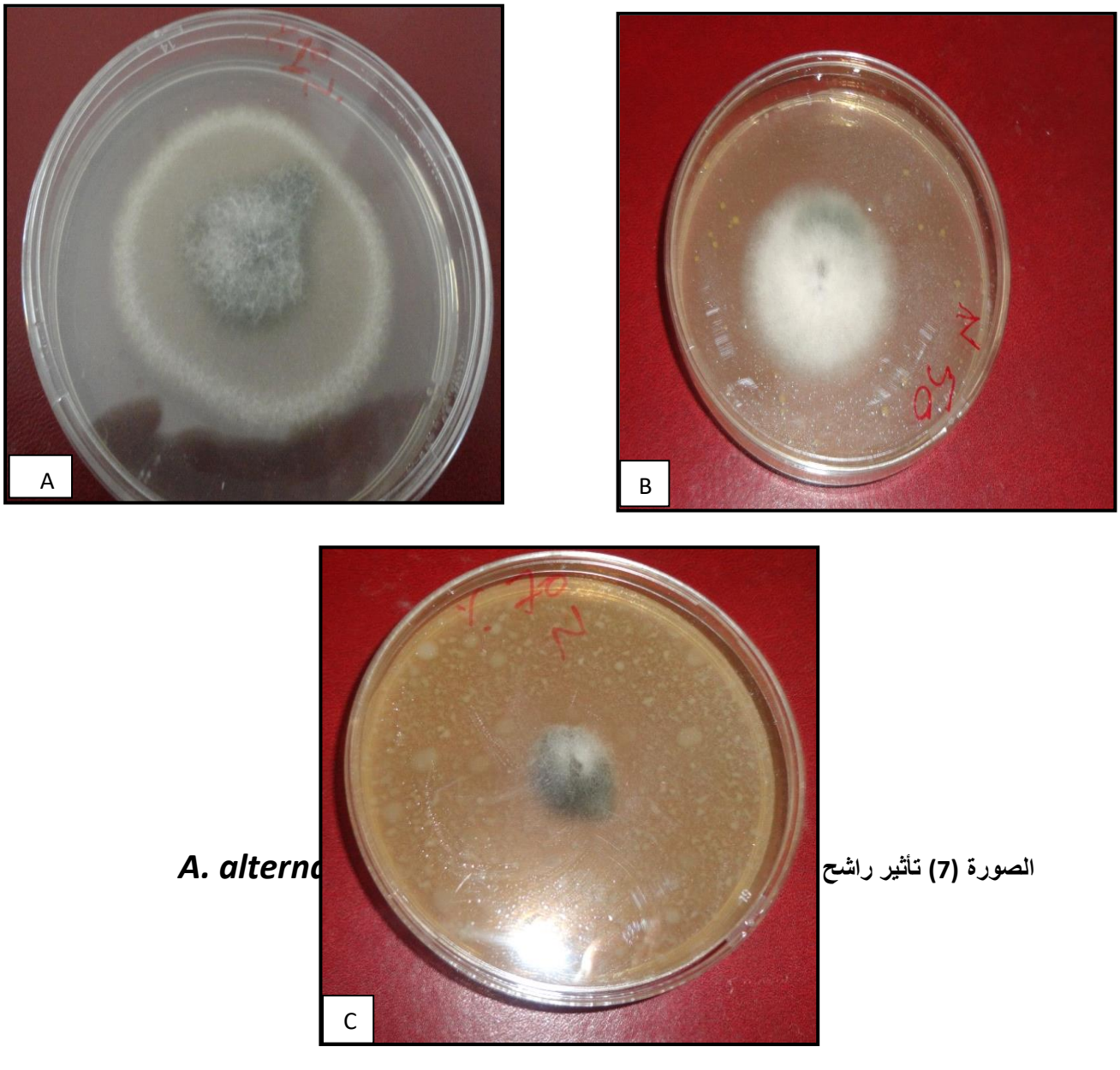
7-3 تأثير راشح المزارع الطحلبية على نمو الفطريات

امتلك الراشح الزرعي للأوساط الزرعية لكل من الطحالب المعزولة في الدراسة الحالية قدرة تثبيطية عالية على نمو الفطريات وفي كل التراكيز المستخدمة في الدراسة حيث تسبب في تقليص قطر المستعمرة الفطرية كما ماهو موضح في الجداول6 و 7 و الصور 7 و 8 و 9 و 10 ، اذ ان مع ازدياد تركيز الراشح الطحلبي لكلا النوعين في الدراسة الحالية ازداد التأثير على قطر المزرعة ،و كان اكثرها فعالية التركيز 70 % للراشح الطحلبي لكلا النوعين من الطحالب*O.brevis* و *N. carnum* على الفطر *Fusarium* وكان كذلك بالنسبة للفطر *A. alternata*لوحظ الراشح الطحلبي للمزرعة السائلة للطحلب *N. carnum* كان ذو تأثير على نمو الفطر *A. alternata* ،اذ قلل من نمو المستعمرة الفطرية اذ في تركيز 70 % كان نمو المزرعة الفطرية 20 ملم اما في التركيز 50% كان نمو المزرعة الفطرية 40 ملميمتر و كان اقلها تأثيرا التركيز 10% اذ كان نمو المزرعة قد وصل في هذا التركيز الى 50 ملميمتر .

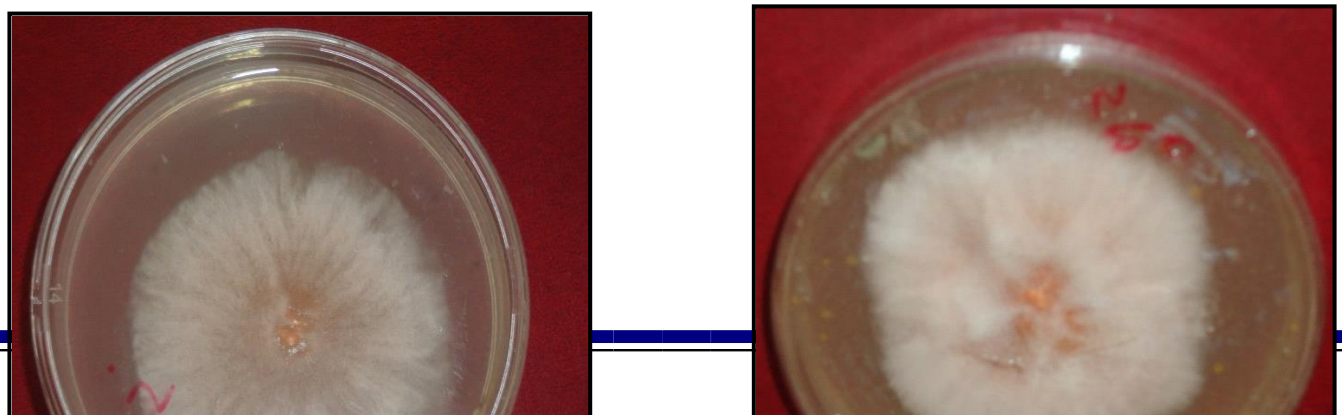
اما تأثير الراشح على نمو الفطر *Fusarium* كان اقل من التأثير على نمو الفطر *A. alternata* فكان نمو المزرعة الفطرية 30 ملميمتر في التركيز 70 % اما في تركيز 50% كان مقدار النمو 55 ملميمتر و كان اقلها تأثيرا التركيز 10 % اذ كان النمو 60 ملميمتر .

اما بالنسبة لراشح مزرعة الطحلب *O.brev*is كان له ايضا تأثير على نمو المزارع الفطرية في التجربة ،اذ كان التركيز 70 اكثرها تأثيرا ووصل نمو المستعمرة للفطر*A. alternata* الى 13 ملميمتر اما في التركيز 50 % فكان النمو للفطر 15 ملميمتر ، اما اقلها تأثير فكان التركيز 10% حيث بلغ قطر المزرعة الفطرية الى 45 ملم ، و كذلك كان هنالك تأثير على نمو الفطر *Fusarium* ايضا اذ ان عند التركيز 70% للراشح بلغ قطر المستعمرة الفطرية 25 ملميمتر اما في التركيز 50% فبلغ قطر المستعمرة الفطرية 50 ملميمتر و التركيز 25 % كان قطر المزرعة الفطرية قد بلغ 70 ملميمتر و اقلها تأثير على نمو المزرعة الفطرية التركيز 10% اذ كان نمو المزرعة الفطرية 60 ملميمتر ، ومن الملاحظ من النتائج ان هناك علاقة

عكسية بين نمو المزرعة الفطرية و التركيز اذ ان كلما زاد تركيز الراشح الطحلبي كلما قل نمو المزرعة الفطرية .



الصورة (7) تأثير راشح *A. alterna*

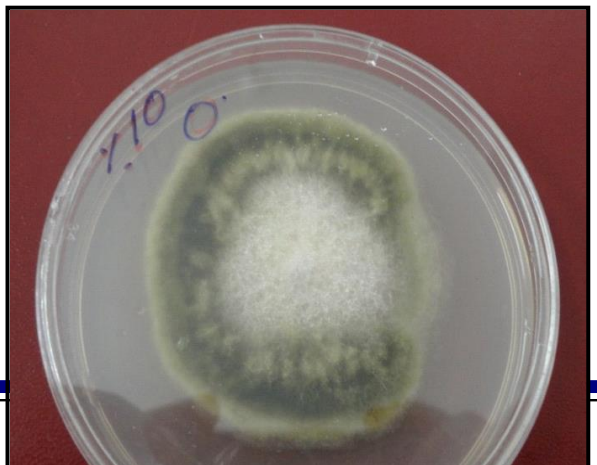


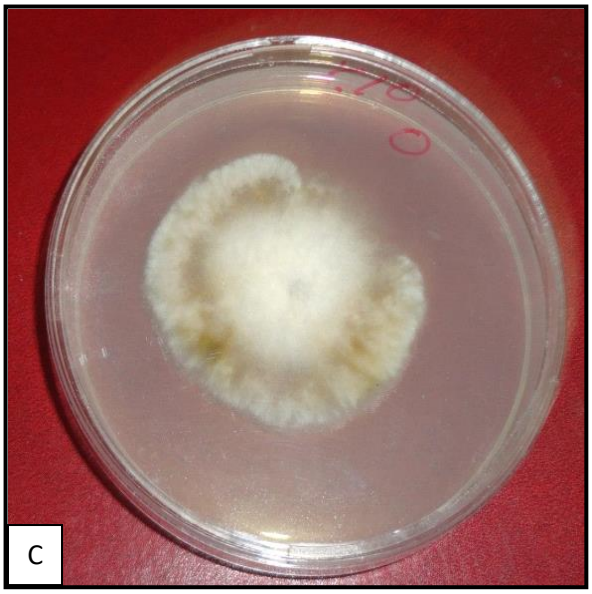
الصورة (8) تأثير راشح مزرعة الطحلب *N. carneum* على نمو الفطر *Fusarium*

***A*.10% : B.50% : C . 70%**

جدول (6) تأثير راشح مزرعة الطحلب *N. carnum* على نمو المستعمرات الفطرية مقدرا بـوحدات المليمتر

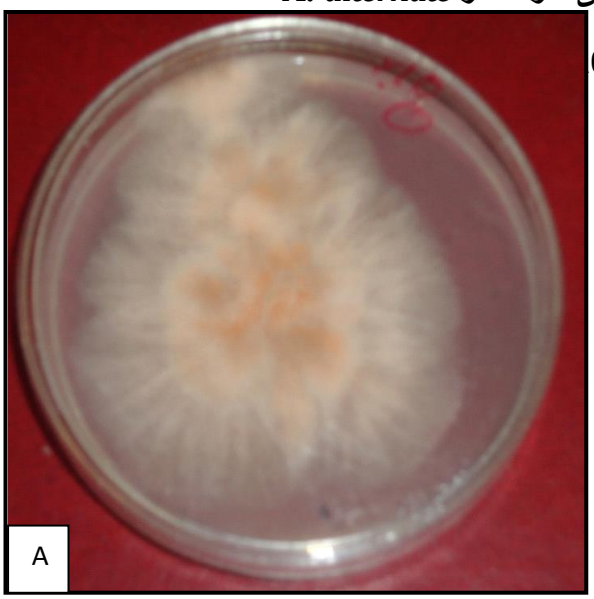
نمو ***Fusarium***	نمو ***A. alternate***	التراكيز %
60	50	10
55	40	50
30	20	70

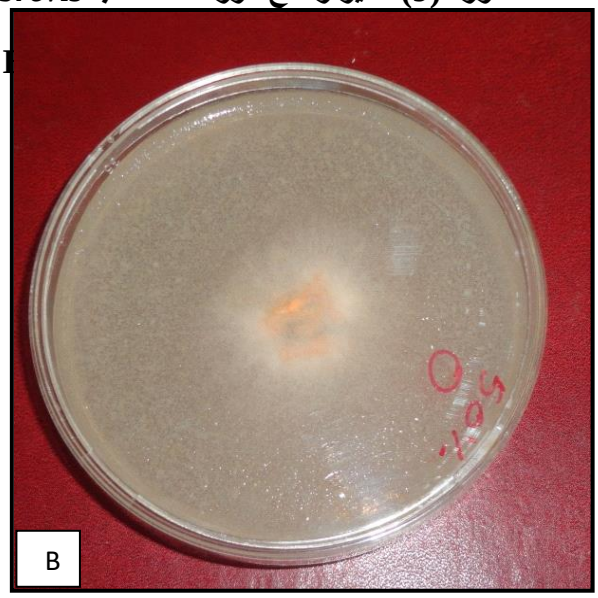


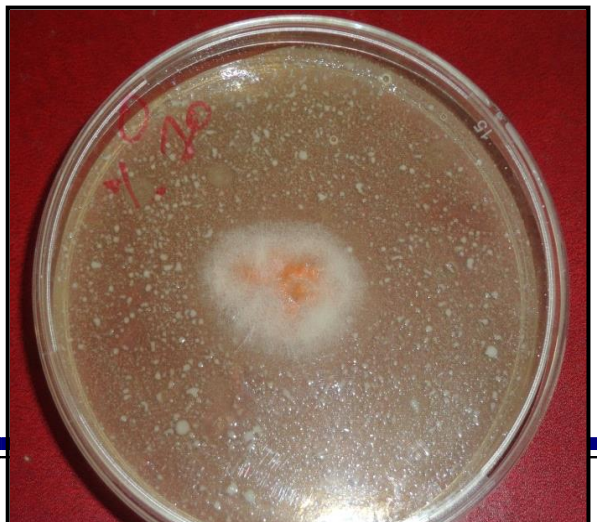


الصورة (9) تأثير راشح مزرعة الطحلب *O.brevis* على نمو الفطر *A. alternate*

0% : I





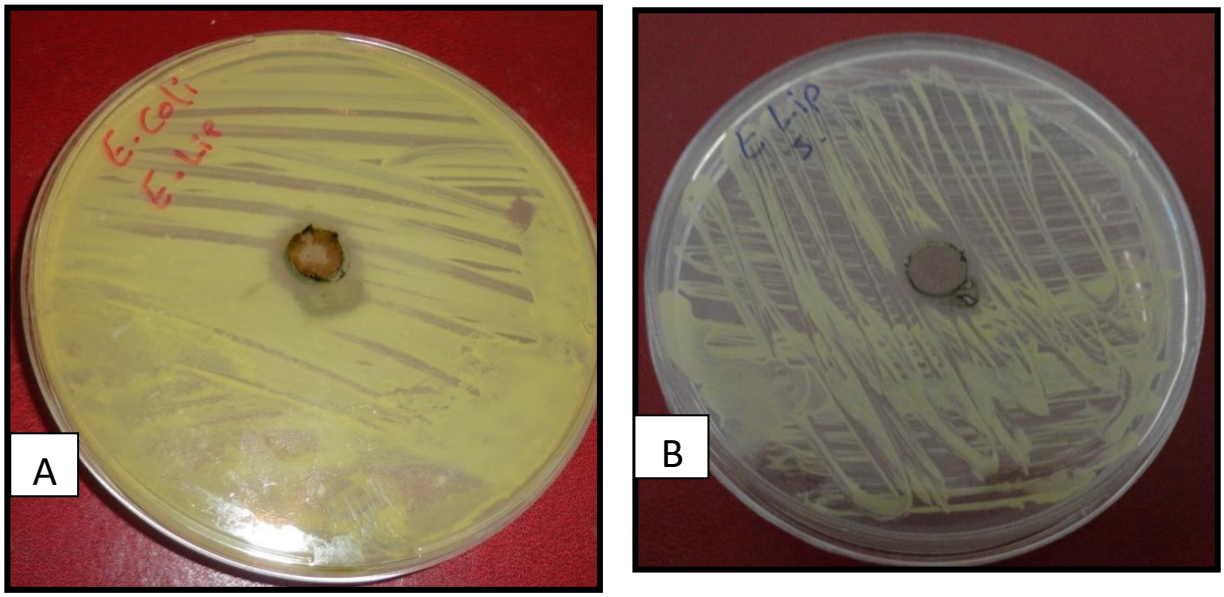


جدول (7) تأثير راشح مزرعة الطحلب *O.brevis* على نمو الفطريات مقدرا بـ(ملميتر)

التراكيز %	نمو *A. alternate*	نمو *Fusarium*
10	45	60
50	15	50
70	13	25

8-3 الفعالية التثبيطية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis*

تم تحديد الفعالية التثبيطية للمركب القلويدي المعزول تجاه البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام اذ بلغ قطر منطقة التثبيط للمركب القلويدي (10) مليمترتجاة بكتريا *E.coli* و (5) مليمتر *Staphylococcus aureus* كما في الصورة (11).



الصورة (11) تأثيرالمركب القلويدي لطحلب *E.intestinalis*

B . S. *aureus* : A. *E.coli* على

3-9 تحديد التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات القلويدية للطحالب

اوضحت النتائج ان التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص القلويدي الخام للطحلب *E.intestinalis* هو 12.5 مايكروغرام /مليلتر ضد البكتريا *E.coli* امـــا ضد البكتريا *S. aureus* فكانت 6.5 مايكروغرام / مليلتر .

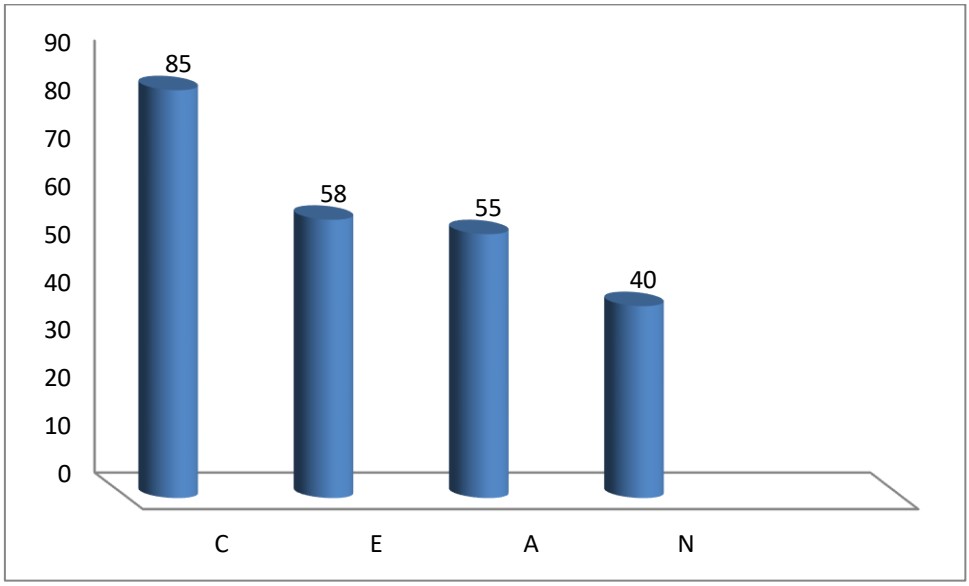
بينت النتائج ان التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص القلويدي للطحلب *N.carneum* هو 6.5 مـايـكروغرام /ملـيلـــتر ضد كل من البكتريا *E.coli* بـكتريا *S. aureus* فكانت 6.5 مايكروغرام / مليلتر كما في الجدول (8).

جدول(8) التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات القلويدية

المستخلص القلويدي	*E.coli*	*S. aureus*
E.intestinalis	12.5	6.5
N. carneum	6.5	6.5

10-3 الفعالية الضد تأكسدية (اختبار اقتناص بيروكسيد الهيدروجين) للمستخلصات القلويدية للطحالب المعزولة:

اظهرت النتائج قابلية المستخلصات القلويدية و المركبات القلويدية المعزولة من الطحالب قيد الدراسة على اقتناص بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 5 ملغم / مل مع حامض الأسكوربيك ascorbic acid ، و تلاه المستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis* 58% و تلاه المركب A 55 % و اخيرا المستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum* فكانت نسبته 40 % على التوالي ، كما في الشكل(4) :



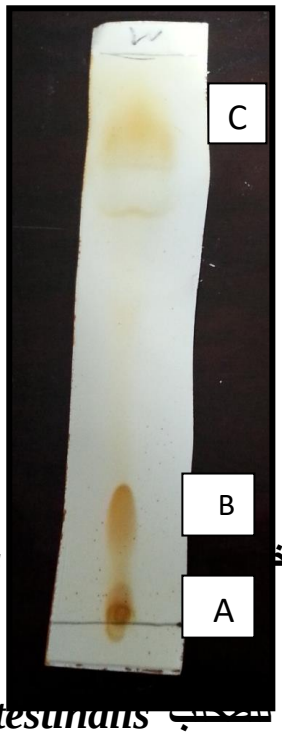
شكل (4) قابلية المركبات و المستخلصات المعزولة لأقتناص بيروكسيد الهيدروجين

C: Ascorbic Acid ،A: المركب القلويدي المعزول *E.intestinalis* ، E : المستخلص القلويدي المعزول من طحلب *E.intestinalis* ، N : المستخلص القلويدي من طحلب *N. carneum*

11-3 مكونات المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* :

اظهرت نتائج كروموتوغرافيا الرقيقة TLC للمستخلص القلويدي لطحلب ***E .intestinalis*** عن وجود ثلاث بقع ذات قيم (Rf) 0.1 و 0.35 و0.83 عند استخدام نظام التصعيد الميثانول

النقي و استغرقت مدة التصعيد 20 دقيقة و تم الكشف عنها بواسطة بخار اليود كما في الصورة (12):



صورة (12) مكونات المستخ ***E .intestinalis***

12-3 تنقية المستخلص القلويدي للطحلب *E . intestinalis* بأستخدام عمود الفصل :

اظهرت نتائج الفصل للمستخلص القلويدي لطحلب ***E .intestinalis*** بأستخدام عمود الفصل عن تنقية مركب واحد Hexadecanamide.

13-3 التشخيص الكيميائي للمستخلصات و المركب المعزول:

1-13-3 اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR):

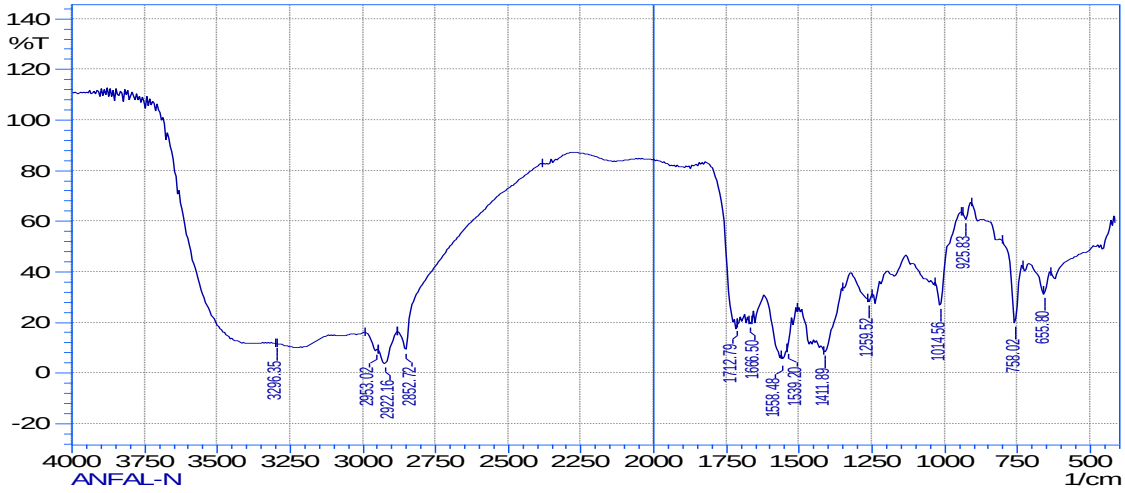
1- **طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي للطحلب *N. carneum*:**

سجل طيف تحت الحمراء للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *N. carneum* شكل (5) و الجدول (9) ، حزم الأمتصاص و المجموعات الفعالة فيه يشير طيف (FT-IR) لهذا المستخلص الى ظهور حزمة امتصاص عريضة عند الطول الموجي 3385.07Cm نانوميتر و قد تعود الى مجموعة الفينول ، و حزمة امتصاص متوسطة عند الاطول الموجية 2854.65 ,و 2926.01و2956.87 نانوميتر و التي تعود الى مجموعة الألكان و كانت حزمة امتصاص اخرى متوسطة القوة عند طول الموجي 1714.72 نانوميتر و التي تعود الى الحامض الكاربوكسيلي ، و كذلك ظهرت حزم اخرى منها 1626نانوميتر و كانت متوسطة تمثل مجموعة H-C=N ، و كذلك عند الطول الموجي 1388.75 نانوميترو كانت متوسطة و التي تمثل CH2-CH3 ، و حزمة قوية جدا عند الطول الموجي 759.95 نانوميتر و المتمثلة بمجموعة

C=O ، و كانت الحزمة ضعيفة جدا عند و حزمة ضعيفة عند الطول الموجي 665.8 و المتمثلة بمجموعة O-H.

جدول (9) طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum*

مقدار الأمتصاص	نوع الحزمة	نوع الأصرة	المجموعة الفعالة
3296.35	عريضة	Str-o-H H-bouder	الفينول
2963-2854	متوسطة	CH_3-CH_2	
1712-1666	متوسطة	C=O	الحامض الكاربوكسيلي
3000-2840	متوسطة	Str-Cu	الكان
1566-1539	قوية	Benzene ring	حلقة بنزين
1411	متوسطة	C-N	امايد
1014	متوسطة	CH in ring cycle compound	
1666.5	متوسطة	C=O	الحامض الكاربوكسيلي
1539.20	متوسطة	C=C	
788.02	قوية جدا	C=C R Cu=Cu R	
665.80	ضعيفة جدا	O-H	

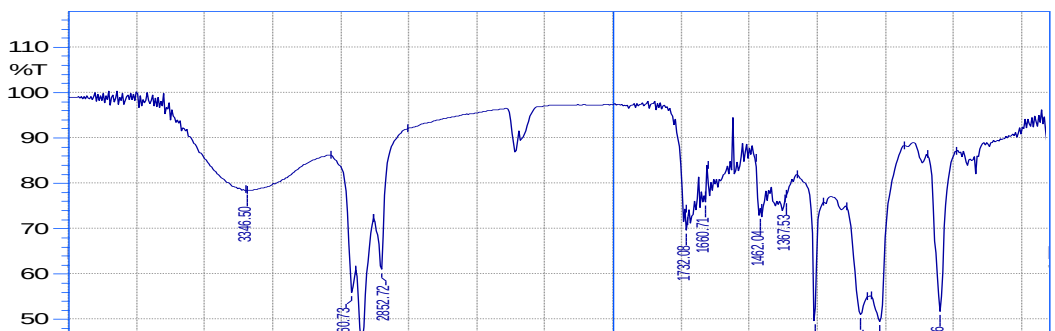


2- طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي للطحلب *E .intestinalis*:

سجل طيف تحت الحمراء للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E .intestinalis* الجدول (10) و الشكل(6).

جدول (10) طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis*

مقدار الأمتصاص	نوع الحزمة	نوع الأصرة	المجموعة الفعالة
3346.50	عريضة	Str-o-H H-bouder	الفينول
2960. 73	متوسطة	Str-Cu	الكان
2852.72	متوسطة	Str-Cu	الكان
1732.08	متوسطة القوة	C=O	لحامض كاربوكسي
1660.71	متوسطة	C=O	
1462.04	متوسطة	C=C	
1367.53	متوسطة	CH2-CH3	
1259.52	قوية جدا	C-N	
800.46	ضعيفة جدا	C-O	



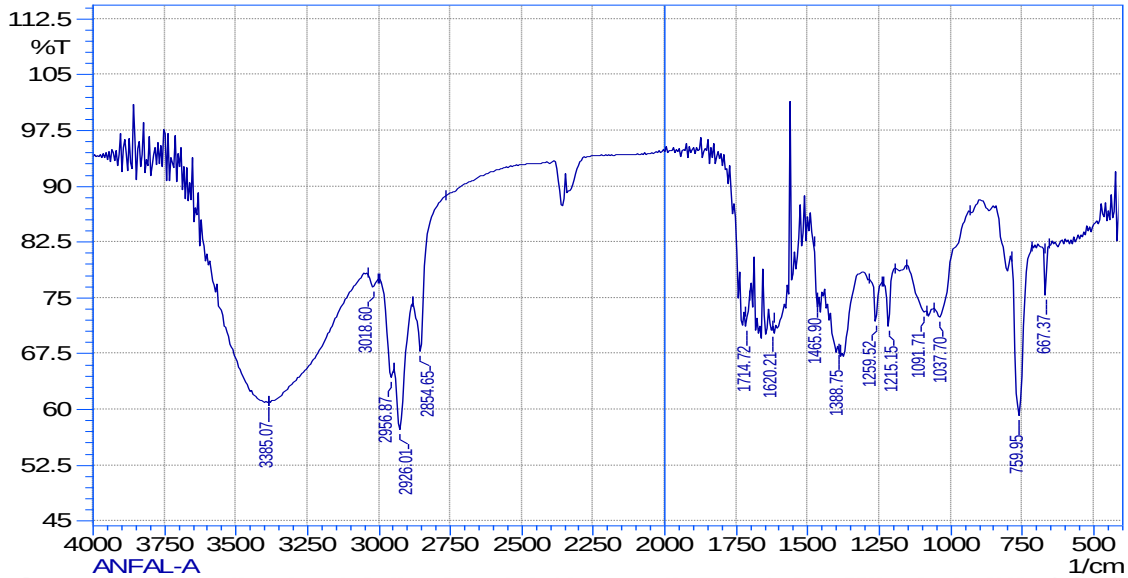
الشكل (6) طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis*

3- طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي A المعزول من الطحلب *E . intestinalis* :

سجل طيف تحت الحمراء للمركب القلويدي المعزول من الطحلب *E .intestinalis* شكل (7) و الجدول (11) ، حزم الأمتصاص و المجموعات الفعالة فيه .

جدول (11) طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي A المعزول من طحلب *E. intestinalis*

مقدار الأمتصاص	نوع الحزمة	نوع الأصرة	المجموعة الفعالة
3385.07	عريضة	Str-o-H H-bouder	الفينول
1714.72	متوسطة القوة	C=O	لحامض كاربوكسي
1626	متوسطة	C=N	
1388.75	متوسطة	CH2-CH3	
759.95	قوية جدا	C=O R Cu=Cu R	
667.37	ضعيفة جدا	O-H	



شكل (7) طيف الاشعة تحت الحمراء للمركب القلويدي المعزول A من طحلب *E. intestinalis*

3-13-2 الكشوفات الكيميائية و الفيزيائية للمركب القلويدي

تم اختبار المكونة القلويدية المعزولة بمجموعة من الكشوفات الفيزيائية منها الذائبية و درجة الأنصهار و كشوفات كيميائية مثل الكشف عن النتيروجين و الكبريت و الكشف عن الحوامض الكربوكسيلية كما في الجدول(12) :

جدول (12) نتائج الكشوفات الفيزيائية و الكيميائية للمركب القلويدي المعزول من الطحلب *E .intestinalis*

الكشف	نتائج المكونة القلويدية
كشف الذائبية	ذائب في الأيثانول ، الميثانول وذائب جزئيا في الماء، DMSO
درجة الأنصهار	135
الكشف عن النيتروجين	ظهور اللون الأخضر
الكشف عن الكبريت	عدم ظهور اللون الأرجواني
الكشف عن الحامض الكربوكسيلي	ظهور فقاعات سريعة

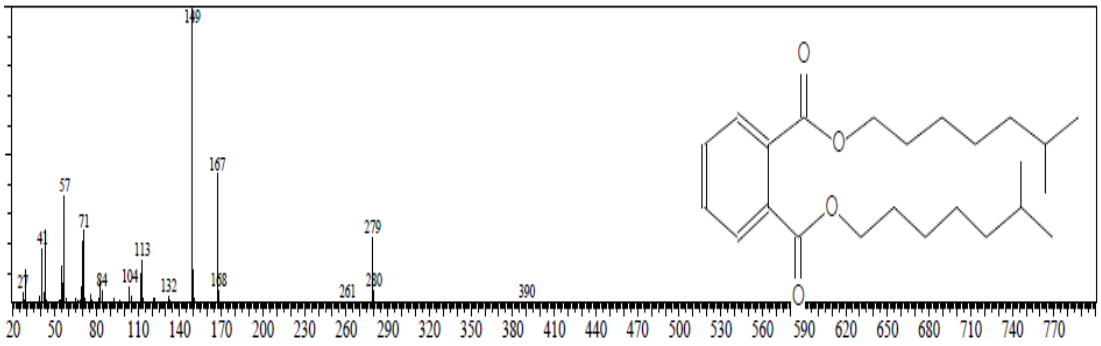
14-3 طيف الكتلة :GC – Mass Spectrum

1-14-3 طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *N. carneum*

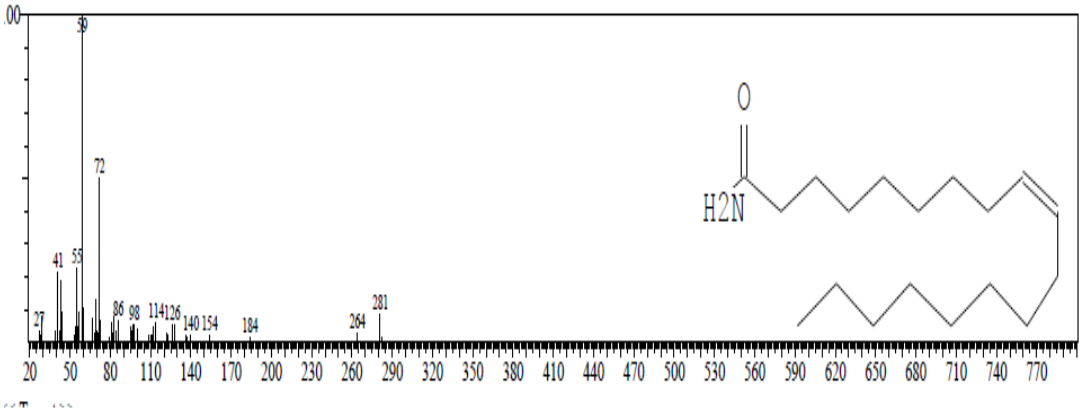
يوضح الشكل (8) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 15.439دقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyles و صيغته الكيميائية$C_{24}H_{38}O_4$ و وزنه الجزيئي 390 دالتون و يشغل مساحة قدرها 13.85% من المجموع الكلي لمساحة المركبات المعزولة من المركب القلويدي .

يوضح الشكل (9) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 13.256 دقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب 9-Octadecenamide و صيغته الكيميائية $C_{18}H_{35}NO$ و وزنه الجزيئي 281 دالتون و يشغل مساحة قدرها 11.79% من المجموع الكلي لمساحة المركبات المعزولة من المركب القلويدي.

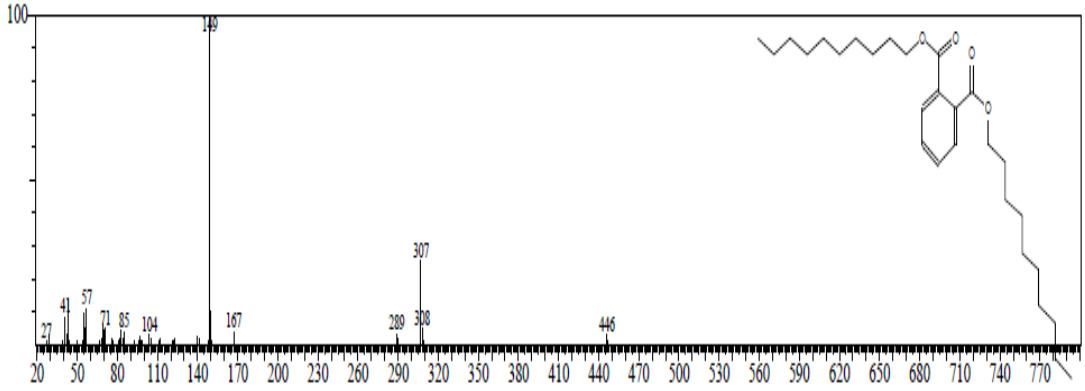
يوضح الشكل رقم (10) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 20.795 دقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب Didecyl phthalate و صيغته الكيميائية $C_{28}H_{46}O_4$ و وزنه الجزيئي 446 دالتون و يشغل مساحة قدرها 11.80 % من المجموع الكلي لمساحة المركبات المعزولة من المركب القلويدي



شكل (8) طيف الكتلة للمركب 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyles المعزول من المستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum*



شكل (9) طيف الكتلة للمركب 9-Octadecenamide المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *N. carneum*



شكل (10) طيف الكتلة للمركب Didecyl phthalate المعزول من المستخلص القلويدي لطحلب *N. carneum*

جدول (13) طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *N. carneum*

الوزن الجزيئي	المركب	النسبة المئوية	وقت الأحتجازR.T
390	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl est	%13.85	15.439
281	9-Octadecenamide, (Z)-	%11.79	13.256
446	Didecyl phthalate	%11.80	20.795

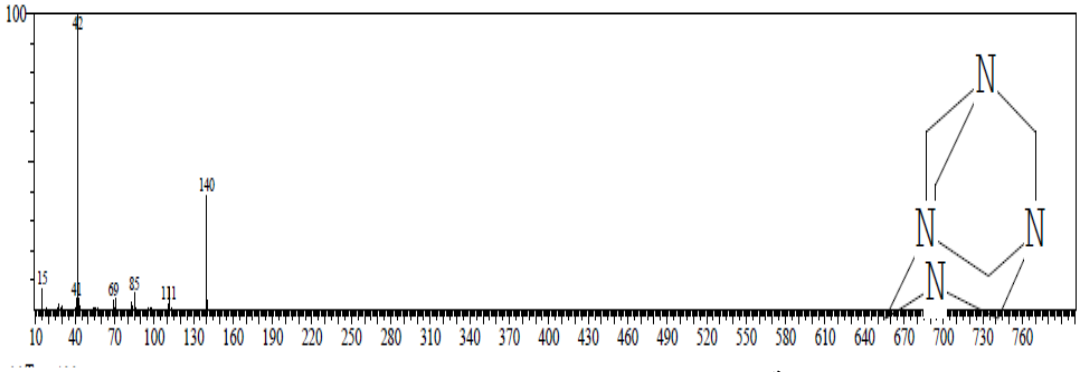
3-14-2 طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis*

يبين الشكل رقم(11) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 10.563 دقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب Hexadecanamide و صيغته الكيميائية $C_{16}H_{33}NO$ و وزنه الجزيئي 255.4 دالتون و يشغل مساحة قدرها 32.98% من المجموع الكلي لمساحة المركبات المعزولة من المستخلص القلويدي.

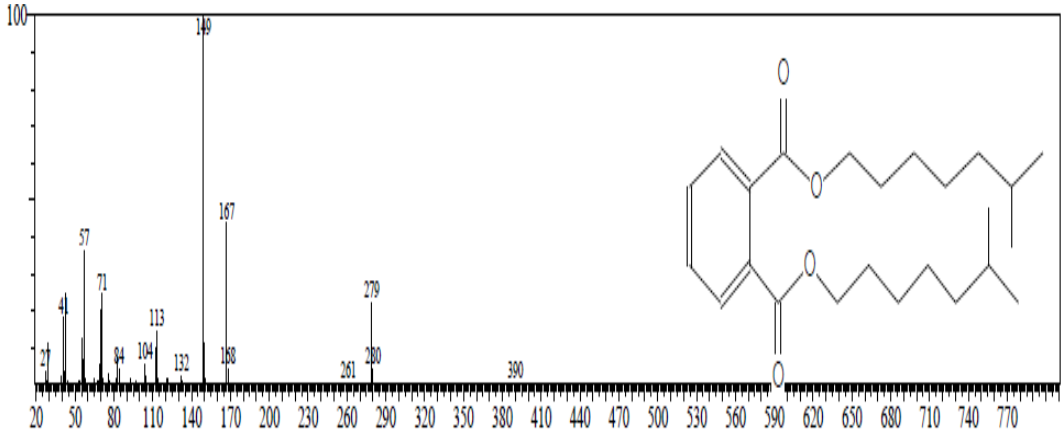
يبين الشكل رقم(12) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 3.839 دقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب Methenamine و صيغته الكيميائية $C_6H_{12}N_4$ و وزنه الجزيئي 140 دالتون و يشغل مساحة قدرها 18.64%من المجموع الكلي لمساحة المركبات المعزولة من المستخلص القلويدي.

يبين الشكل رقم(13) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 15.463 دقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl est و صيغته الكيميائية $C_{24}H_{38}O_4$ و وزنه الجزيئي 390 دالتون و يشغل مساحة قدرها 15.16 %من المجموع الكلي لمساحة المركبات المعزولة من المستخلص القلويدي.

شكل (11) طيف الكتلة للمركب Hexadecanamide المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis*



الشكل (12) طيف الكتلة للمركبMethenamine المعزول من المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis*



شكل (13) طيف الكتلة للمركبBenzenedicarboxylic acid, diisooctyl est المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis*

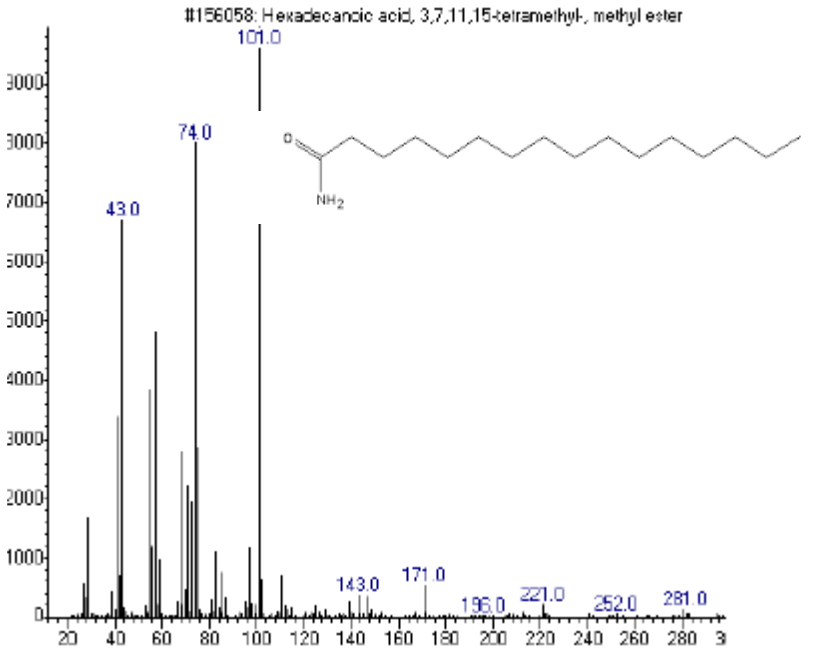
جدول (14) طيف الكتلة للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E.intestinalis*

الوزن الجزيئي	المركب	النسبة المئوية	وقت الأحتجازR.T

10.563	%32.98	Hexadecanamide	255.4
3.839	%18.64	Methenamine	140
15.463	% 15.16	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl	390

3-14-3 طيف الكتلة للمركب القلويدي المعزول من المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* :

يوضح الشكل رقم(14) طيف الكتلة للمركب الذي فصل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز بزمن احتباس قدره 12.677ادقيقة و من خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبيا في الجهاز ثبت انه المركب Hexadecanamide و صيغته الكيميائية $C_{16}H_{33}NO$ و وزنه الجزيئي 255.4 دالتون



الشكل (14) طيف الكتلة للمركب القلويدي المعزول من الطحلب *E. intestinalis*

3-15الفعالية الحيوية الضد سرطانية للمستخلص القلويدي للطحلب الأخضر *E. intestinalis*:

اظهرت النتائج ان المستخلص القلويدي الخام للطحلب *E .intestinalis* امتلك فعالية ضد سرطانية (سرطان العضلي البشري) و بتراكيز واطئة وصلت الى 0.78 ملغرام / مليلتر لفترة 24 ساعة اما اعلى تركيز فقد كان 50 ملغرام / مليلتر ،اما بالنسبة لفترة 72 ساعة فقد كان اقل تركيز فعال وصل الى 1.56 ملغرام / مليلتر اما اعلى تركيز فعال فقد كان 25 ملغرام / مليلتر كما في جدول 15 و16 .

جدول(15) يوضح الفعالية السرطانية للمستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis* لفترة 24 ساعة

الحجم (ملغرام / مليلتر)	معدل النسبة المئوية لنمو الخلايا	معدل التثبيط للمستخلص	السيطرة
100	26.7	73.3	99.9
50	26	74.0	99.7
25	52.3	47.7	100
12.5	79.5	20.5	99.8
6.25	79.5	20.5	99.9
3.13	85.2	14.8	99.5
1.56	74.0	26.0	99.6
0.78	98.6	1.40	99.6
0.39	100	0	99.8

جدول (16) يوضح الفعالية السرطانية للمستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis* لفترة 72 ساعة

الحجم (ملغرام / مليلتر)	معدل النسبة المئوية لنمو الخلايا	معدل التثبيط للمستخلص	السيطرة
100	43.9	56.1	99.7
50	43.2	56.8	99.7
25	37.9	62.1	99.9
12.5	38.8	61.1	99.8

100	10.3	89.7	6.25
100	5.9	91.4	3.13
99.6	4.2	95.8	1.56
99.5	0	100	0.78
99.9	0	100	0.39

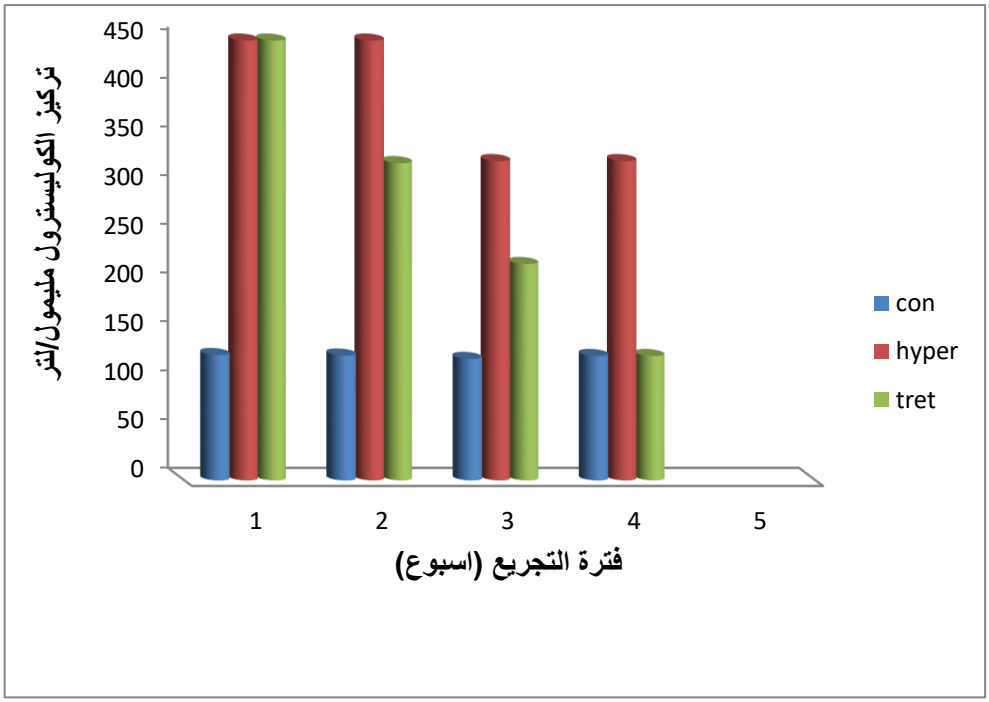
16-3 تأثير المستخلص القلويدي لطحلب *E. intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الأرانب ذات التركيز المرتفع الكوليسترول:

اوضحت النتائج ان استعمال المستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis* قد ادى الى انخفاض معنوي لمستوى الكوليسترول عند مستوى احتمالية $P\leq 0.05$ في البلازما عند تجريع الحيوانات بالمستخلص القلويدي عند تركيز (1.5) ملغرام/يوم بالمقارنة مع السيطرة فقد كان في الأسبوع الأول غير معنويا مع المرتفعة الكوليسترول و في الاسبوع الثاني و الثالث و الرابع كان معنويا بالمقارنة مع السيطرة المرتفعة الكوليسترول اذ وصلت تقريبا الى المستوى الطبيعي مما يشير الى ان المستخلص القلويدي للطحلب المستعمل في التجربة له فعالية كمضاد لأرتفاع الكوليسترول في الحيوانات ذات الكوليسترول المرتفع كما في الجدول (17) و الشكل (15).

جدول (17) تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E .intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الأرانب ذات التراكيز المرتفعة الكوليسترول

الأسابيع	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة	المعاملة
1	129	450	450
2	128.5	450	325
3	125	327	222

128	327	128	4



الشكل(15) تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول ، معاملة:T ، السيطرة المرتفعة الكوليسترول:hyper ،السيطرة:con

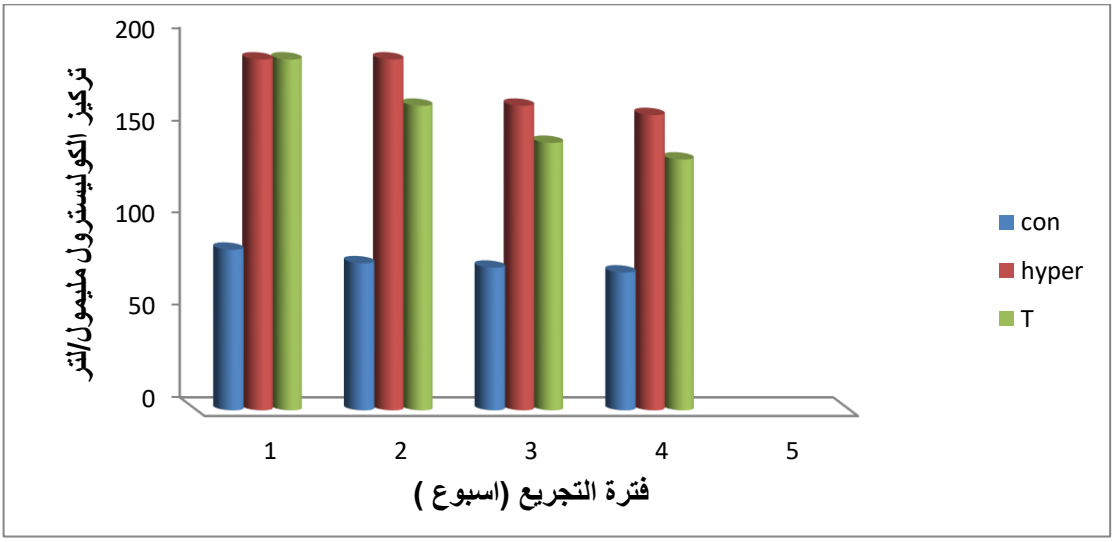
17-3 تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E .intestinalis* على مستوى الكليسيردات الثلاثية في بلازما الأرانب ذات التركيز المرتفع الكوليسترول:

اما بالنسبة للكليسيردات الثلاثية فقد اظهرت نتائج معاملة الحيوانات المصابة بأرتفاع الكوليسترول بالمستخلص القلويدي للطحلب *E .intestinalis* انخفاضا معنويا عند مستوى

احتمالية $P \leq 0.05$ بالنسبة للكليسيردات الثلاثية خلال فترة المعاملة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة المرتفعة الكوليسترول من الأسبوع الثاني الى نهاية فترة المعاملة و قد كانت غير معنوية خلال الأسبوع الأول و هذه نتيجة منطقية كما في الجدول (18) و الشكل (16).

جدول (18) تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E .intestinalis* على مستوى الكليسيردات الثلاثية في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول

الأسابيع	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة	المعاملة
1	87.3	190	195.60
2	80	190	156
3	77.6	165	145
4	75	160	136



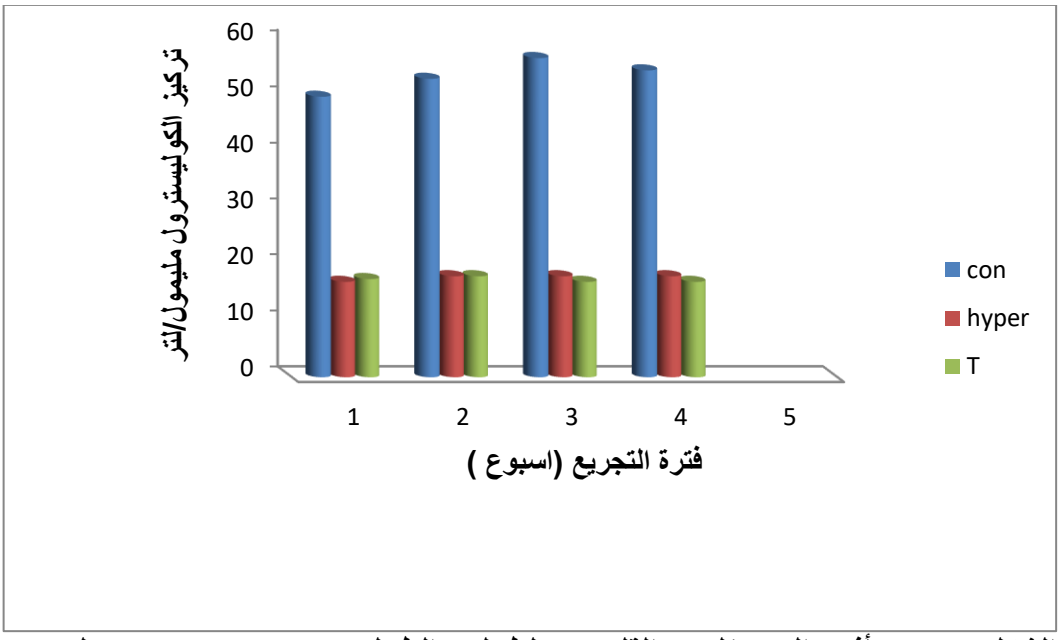
الشكل(16) تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكليسريدات الثلاتية في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول ، معاملة:T ، السيطرة المرتفعة الكوليسترول hyper:، السيطرة:con

18-3 تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المرتفعة الكثافة في بلازما الأرانب ذات التركيز المرتفع الكوليسترول:

لم تتأثر مستويات الدهون المرتفعة الكثافة بالمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* خلال فترة المعاملة بالمستخلص و لكل الأسابيع كما هو موضح في الجدول (19) و الشكل (17):

جدول (19) تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المرتفعة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول

الأسابيع	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة	المعاملة
1	50	17	17.5
2	53.2	18	18
3	56.9	18	17
4	55.7	18	17



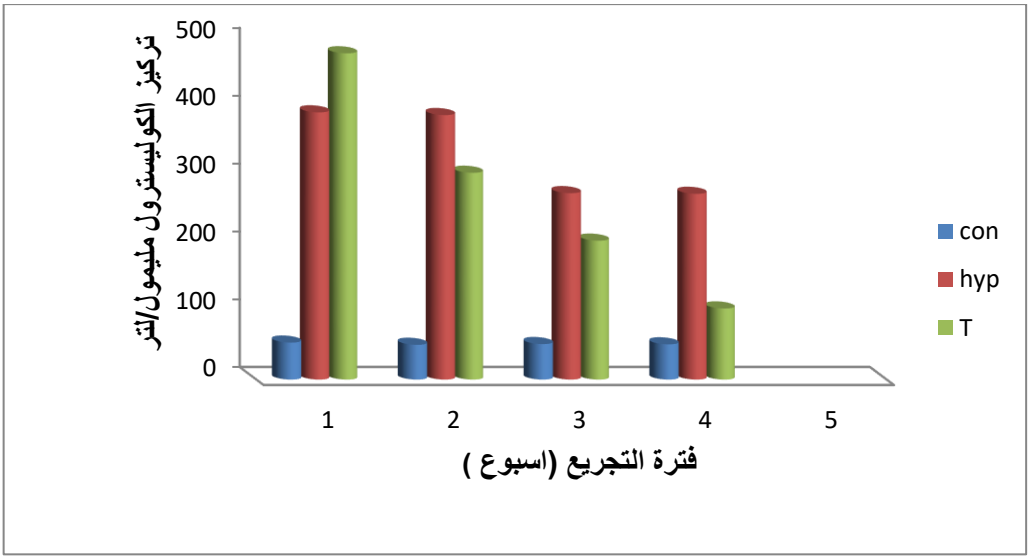
الشكل (17) تأثير المستخلص القلويدي لطحلب الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المرتفعة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترولمعاملة:T ، السيطرة المرتفعة الكوليسترول:hyper، السيطرة:con

19-3 تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في بلازما الأرانب ذات التركيز المرتفع الكوليسترول:

ان مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في البلازما قد تأثر بالمستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* اذ انخفض معنويا خلال فترة المعاملة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة المرتفعة الكوليسترول كما هو موضح في الجدول (20) و الشكل (18).

جدول (20) تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول

الأسابيع	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة	المعاملة
1	54.6	394	481
2	51.3	390	365
3	52.4	275	205
4	52	274	105



الشكل (18) تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول

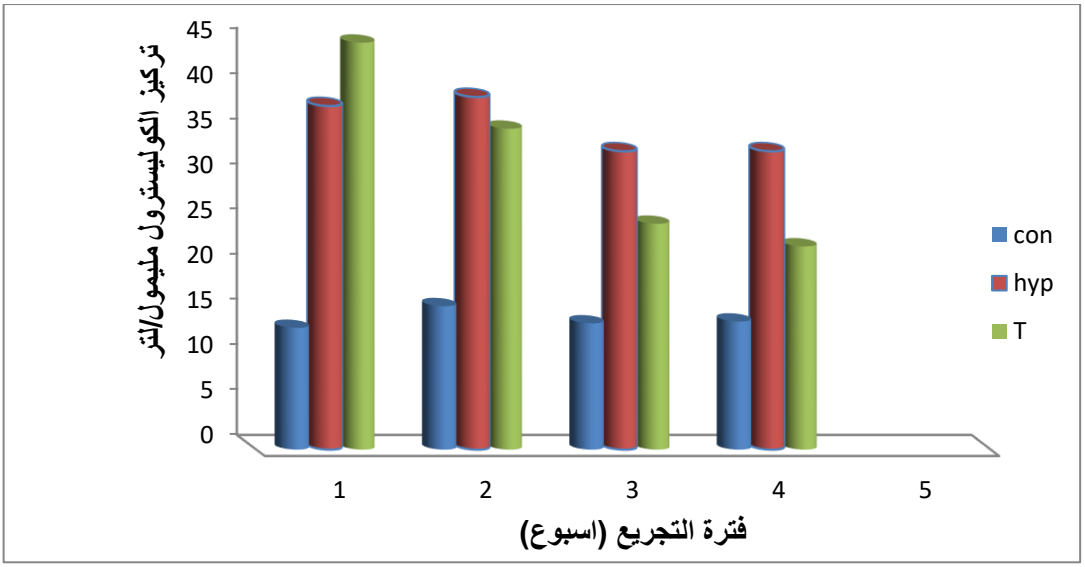
con:السيطرة، **hyper:**السيطرة المرتفعة الكوليسترول ، **T:**معاملة

20-3 تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة جدا في بلازما الأرانب ذات التركيز المرتفع الكوليسترول:

لقد اظهرت النتائج ان الدهون المنخفضة الكثافة جدا كانت فيها الفروقات معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ خلال فترة المعاملة عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة المرتفعة الكوليسترول كما هو موضح في الجدول (21) و الشكل (19) ادناه .

جدول (21) تأثير المستخلص القلويدي من الطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة جدا في بلازما الأرانب المرتفعة الكوليسترول

الأسابيع	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة	المعاملة
1	13.5	38	45
2	15.9	39	35.5
3	14	33	25
4	14.2	33	22.5



الشكل (19) تاثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الدهون المنخفضة الكثافة جدا في بلازما دم الارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول

معاملة:T ، السيطرة المرتفعة الكوليسترول:hyper ، السيطرة:con

الفصل الرابع

المناقشة

Discussion

4-1الأنواع الطحلبية المعزولة خلال الدراسة

تم عزل الطحالب في الدراسة الحالية بعد اختيار عينات مائية و واخرى من التربة كونها البيئات الملائمة لتواجد الأنواع الطحلبية وخاصة انواع السيانوبكتريا المنتشرة بشكل واسع في البيئة و تم عزل نوعين يعودان الى الطحالب الخضر المزرقة و هما *N. carnum* و *O. brevis* في الدراسة الحالية، و ان ان الأنتشار الواسع لهذه الأنواع في بيئتنا المحلية شجع على عزلها و تنقيتها و استخلاص بعض المركبات الكيميائية منها لمعرفة اهميتها من الناحية الطبية ، و قد اكد العديد من الباحثين العراقيين في دراستهم على القيمة الطبية لعدد من الطحالب منهم (الكبيسي ،2001 ; المازني،2007 ; الموسوي ،2007 ; الناصر ،2010 ; Shareef ,2009 ; Khalaf,2012) .

اما بالنسبة للطحلب الأخضر *E .intestinalis* فقد جمع باليد من شط العرب منطقة جامعة البصرة / كرمة علي على شكل كتلة حيوية بأكياس بلاستكية .

2-4 معدل النمو

يعد معدل النمو من معايير النمو السريعة والذي يشير الى تضاعف الكتلة الحية خلال وحدة زمنية معينة (Stein, 1973) ، حصدت الطحالب المدروسة في منتصف الطور المستقر اعتمادا على منحنى النمو المقاس بطريقة الكثافة الضوئية بسبب زيادة حجم الخلايا نتيجة تراكم المركبات الكيميائية الناجمة من عملية الأيض والمواد الغذائية المصنعة بوساطة عملية التركيب الضوئي .

بينما الطور الأسي هو الطور الخاص بأنقسام الخلايا و تكاثرها وعليه فأن هذه المرحلة تحتاج الى صرف طاقة مما يؤدي الى هدم بعض المركبات الكيميائية الغنية بالطاقة مثل الكاربوهيدرات و البروتينات و الدهون، و عليه يعتبر الطور المستقر هو الطور المناسب للحصاد كونه طور الأنتاج للمركبات الأيضية اكثر من هدمها ، لأن الكائن المجهري يصل الى اقصى انتاج للمواد الأيضية الثانوية في منتصف الطور المستقر على الرغم من انها تنتج هذه المواد قبل هذه الفترة في بعض الأحيان و هذا يتفق مع ما ذكره Iwai and Omura (1982) و المازني (2007) و الموسوي ،2007 ; الناصر ،2010 ; Khalaf,2012 ; Shareef ,2009) ، بعدها بدأ النمو بالتناقص بسبب أستهلاك أغلب المغذيات وطرح بعض المركبات غير المرغوب فيها من قبل الطحلب نتيجة للفعاليات الأيضية كما يحصل التنافس على بقية متطلبات النمو ليبدأ طور الموت Decline phase بعد ذلك ، ان نتائج الدراسة الحالية بخصوص اطوار النمو كانت قريبة الشبة مع نتائج الجعفر (2004) و السلطان (2007) و الموسوي ،2007 و طالب (2013) اذ اشاروا الى ان فترة الأستقرار كانت بعد مضي 14 يوما من بدء زراعتها ، اذا وصلت الطحالب الخضر المزرقة *Spirulina platensis* و *Hapalosiphon wehwitschi* و *Calothrix parietina* و قد اختلفت نتائج هذه الدراسة مع دراسة الشاهين (2002) و الحلفي (2007) اذ وصل الطحلبان *Microcystis aeruginosa* و*Oscillatoria* و *O. brevis* الى مرحلة الأستقرار بعد مرور 24 و يوما من بدء الزرع.

ان الأختلاف في درجات الحرارة و شدة الأضاءة من العوامل المهمة التي تلعب دورا في التأثير في زمن كل طور من اطوار النمو وقد اشار Issa (1999) الى ان معدل النمو يزداد بأرتفاع درجة الحرارة الى اكثر من 30 مº للطحالب *Calothrix sp.* و *Oscillatoria sp.* .

اما فيما يخص معدل النمو (K) و زمن تكاثر الجيل (G) فقد لوحظ ان النوعين قيد الدراسة امتلكا معدلات نمو عالية و متقاربة و زمن اقل لتكاثر الجيل ، مما يدل على ملائمة الوسط الزرعي لنمو الأنواع المعزولة اذ اظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن زمن تكاثر الجيل للطحلب *N. carnum* بلغ (G=1.05) و قد بلغ ثابت النمو للطحلب (K=0.27) وهو مقارب لما حصل علية السلطان (2007) و يختلف نوعا ما لما حصلت عليه المازني (2008) و التي سجلت زمن تضاعف الجيل 0.77 و ثابت معدل النمو 0.38 وكذلك لما حصل عليه طالب (2013) اذ سجلت زمن تكاثر الجيل G=2.06 و ثابت نمو K=0.146، اما بالنسبة للطحلب

و*O. brevis* فقد سجل زمن تكاثر الجيل G=1.4 و ثابت نمو K=0.23 و هو مقارب لما سجلته (الموسوي، 2007).

3-4 الكشوفات النوعية للمستخلصات

اظهر المستخلص الكحولي 70% للعزلاتين الطحلبيتين *N. carnum* و *O. brevis* عن وجود مجموعة القلويدات و الأحماض الأمينية و الببتيدات و الفينولات و الكاربوهيدرات و الفلافونيدات و عدم احتوائهما على الكلايكوسيدات و الكيومارينات و التانينات و الصابونينات و التربينات اذ يعمل هذا المذيب على استخلاص المركبات المتوسطة القطبية (Harborne ,1984), اذ ان استخدام الكحول الأثيلي في الأستخلاص يعمل على اذابة العديد من المركبات الفعالة حياتيا منها القلويدات و الكلايكوسيدات .

اما بالنسبة للطحلب *E.intestinalis* فان المستخلص الكحولي 70% فقد احتوى على القلويدات و الأحماض الأمينية و الببتيدات و التانينات و الكاربوهيدرات و الكلايكوسيدات و الفلافونيدات والتربينات وعدم احتوائة على الكيومارينات و الصابونينات كما في الجدول (2) وهو مقارب لما حصلت عليه الناصر (2010) في دراستها على نوع من الطحالب الخضر *Cladophora crispata* في احتوائه على القلويدات و الكاربوهيدرات و الكلايكوسيدات و البروتينات و التربينات و الستروديات وكذلك متوافق مع ماحصلت عليه (Khalaf,2012) ; ولما توصل اليه (Shareef ,2009) في دراسته و بهذا فان هذه النتائج متوافقة مع البحوث و الدراسات و التي تشير بأن الطحالب تنتج العديد من المركبات الكيميائية و التي تكون نتاجا للأيض الثانوي و الأولي ولها الكثير من التطبيقات .

قد استعمل الكحول المتمثل بالايثانول في استخلاص القلويدات كون هذا المذيب قادر على اذابة هذه المركبات بشكل افضل من الماء ، و قد احتوى المستخلص القلويدي على مركبات قلويدية اظهرتها الكواشف المستخدمة كراسب برتقالي اللون في حالة كاشف دراكندروف و راسب ضبابي في استعمال كاشفي واكنر و ماير دلالة على التركيز العالي لهذه المركبات داخل المستخلص القلويدي و هذا اتفق مع نتيجة

(Radwan *et al.*, 2007; الناصر, 2010 ; Khalaf, 2012).

تعد الطحالب الدقيقة و منها طحالب السيانو بكتريا مصادر معروفة لأنتاج المركبات ذات الأهمية التجارية، مثل Asproteins والأحماض الدهنية والفيتامينات و الأصباغ (Borowitzka, 1988a, b, 1995). كما أنها تنتج مجموعة واسعة من مركبات الأيض الثانوي ذات الفعالية البيولوجية و ان هذا يتفق مع ما توصل الية (Jaki *et al*,. 1999) في بحثه الذي أوضح فيه ان الطحلب *Nostoc commune* ينتج مادة خارج خلوية هي

Noscomin وهي عبارة عن diterpenoid وهي مادة تم عزلها من المزرعة السائلة للطحلب و توصل Ozdemir *et al.*, (2004) عند دراستهم على مستخلص خلات الإثيل من طحلب *Spirulina platensis* الذي يتألف من مركبات Heptadecane وTetradecane التي يمكنها ان يثبطا نمو بعض انواع البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام و كذلك ما توصل اليه (El-Sheekh *et al.*, (2006 اذ عزل في دراسته مركب فينولي من الطحلب *muscrom N.* قد عزل Ghasemi *et al.*, (2004) عدد من المركبات تنتمي إلى مجموعات من الببتيد البروتينية والأميدات و القلويدات من الطحلب *Fischerella ambigua*

4-4السمية الخلوية

تمتلك العديد من المركبات الفعالة و المضادات الحيوية سمية تجاة الخلايا الحية نتيجة للتفاعلات الفسيولوجية الحاصلة بينها و بين مركب معين في الخلية (Perry and Staley (1997,، و تعد طريقة اختبار السمية للمركبات المستخلصة من النباتات الطبية او المحضرة مختبريا تجاة كريات الدم الحمراء للأنسان من الطرائق الشائعة و ذات نتيجة سريعة ومقبولة ،لذلك يجب اجراء هذا الأختبار للتاكد من عدم سمية المركبات الفعالة حيوياعلى كريات الدم الحمراء لأمكان استخدامها داخل جسم الكائن الحي بأستعمال عدة تراكيز منه وكان هناك تدرجاً واضحاً في تحلل كريات الدم الحمر Hemolysis من التراكيز العالية للمستخلص الى التراكيز الواطئة وهذا يدل على أن التحلل بشكل قوي يكون في التراكيز التي تكون فيها كمية المركبات السامة عالية ويقل تدريجياً في تلك التراكيز التي تكون فيها واطئة مما يؤدي الى خروج الهيموكلوبين الى خارج الكريات بسبب تحطم غشاء الكريات الحمر التي ربما يحدث نتيجة للأرتباط التساهمي بين المركبات السامة والجذر الحر لبروتين الگلوتاثيون (Nair *et al.*,1989).

استخدم اختبار السمية الخلوية من قبل العديد من الباحثين منهم (الموسوي ,2007) لمعرفة سمية القلويد المستخلص من الطحلب *H. aureus* وكذلك من قبل (الناصر ،2010) لتحديد سمية القلويد المستخلص من الطحلب *Cladophora crispata* و قد اظهرت النتائج ان القلويد المستخلص من الطحلب *E.intestinalis* لا يمتلك اية سمية في التراكيز المستخدمة في الدراسة الحالية اذ لم يلاحظ اي تأثير على خلايا كريات الدم الحمراء خلال فترة المراقبة و بالتالي امكانية استعماله كمضاد حيوي او دخوله ضمن الصناعات الدوائية كونه منتج طبيعي غير سام و له فعالية ضد الممرضات المجهرية.

اما القلويد المستخلص من الطحلبين *O. brevis* و*N. carnum* فقد امتلكا سمية تجاة كريات الدم الحمر و مما اديا الى تحللها كما في الجدول (4)، و هناك الكثير من التغيرات التي تطرأ على الوظيفة الخلوية نتيجة لتأثير تلك المواد السامة منها تغيرات في نفاذية الغشاء الخلوي و ما يترتب عليه من تأثير على انتقال المواد من و الى الخلية و كذلك تغيرات في نفاذية الغشاء الخلوي و ما يترتب عليه من تأثير على انتقال المواد من و الى الخلية و التغيرات في النشاطات الأنزيمية في الخلية مما يؤدي الى تغيرات في معدل العمليات التنفسية للخلية و من ثم في معدل توفر جزيئات الطاقة و كذلك تغيرات في معدلات الأنقسام الخلوي و تصنيع الأحماض النووية و ما يرافق ذلك من تغيرات في طبيعة تصنيع البروتينات ، و قد يتطور لحدوث طفرة وراثية

(Shosevov *et al*., 2004;Eisenbrand *et al* ., 2002)، لذا لابد من اجراء اختبار السمية للمادة سواء كانت مركبا كيميائيا او منتجا طبيعيا كدواء تمهيدا للاختبار الدوائي لمعرفة التأثيرات الضارة او المحتملة على النظام الحيوي للحيوان او الأنسان (Manahan , 2002) .

5-4 الغربلة الأولية و اختبار فعالية للمستخلص القلويدي المعزول من الطحالب

تم تحديد الفعالية البايولوجية للمستخلصات في الدراسة الحالية بطريقة الأنتشار في الوسط الصلب (الأكار)، كونها طريقة شائعة الأستعمال في اختبار فعالية المستخلصات الطحلبية ضد الجراثيم (AL- Aarajy and AL-Deelami,1997)،و تعطي هذه الطريقة نتائج واضحة لفعالية المستخلصات بسبب تركز المركبات الفعالة حول جوانب القرص حسب ما توصل الية (Vlachos *et al*.,1996) .

ظهر من النتائج ان المستخلص القلويدي لكل من الطحلبين *N. carnum* و *E.intestinalis* اكثر فعالية من المستخلص القلويدي لطحلب *O. brevis* وان المستخلص القلويدي للطحلب *N. carnum* كان اكثرها فعالية تجاة الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام حيث بلغت اقطار تثبيط النمو 30 مليمتر مقارنة بالمستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* الذي امتلك فعالية تثبيطية وصلت الى (25) مليمتر وعلى البكتريا الموجبة و السالبة على التوالي ، اما المستخلص القلويدي للطحلب و*O. brevis* فقد كان اقلها فعالية حيث بلغ قطر التثبيط (13) مليمتربالنسبة للبكتريا السالبة لصبغة كرام و(3) مليمتر للموجبة لصبغة كرام كما موضح في نتائج جدول(5) ، وان وجود هذه الفعالية المضادة للبكتريا يشير و يؤكد على وحود مركبات لها القابلية على تثبيط البكتريا و هذا يتفق مع البحوث التي اشارت الى قابلية الطحالب على انتاج مركبات منتجة من قبل الأيض الثانوي الفعالة و لها القابلية على السيطرة على نمو البكتريا (Faulkner,2002) ومنها القلويدات وهي مركبات طبيعية تنتج كأيوض ثانوية في الأحياء المجهرية يعتقد بأن لها دور في الدفاع عن خلايا الكائنات المنتجة لها تتميز بكفائتها العلاجية و اهميتها من الناحية الطبية اذ ترتبط المركبات بالحامض النووي DNA للمايكروبات مما يعطيها قدرة تثبيطية عالية تجاة العديد من الجراثيم الموجبة و السالبة لصبغة كرام، و ان التغاير و الأختلاف في كفاءة المستخلصات كمضادات حيوية تكون نتيجة للطريقة المستعملة و المذيبات المستعملة كذلك الفصل الذي جمعت به العينات (Kandhasamy and Arunachalam , 2008) ، قد اجريت عملية الغربلة الأولية Primary screening لمعرفة انتاج المواد الفعالة من المستخلص القلويدي ضد البكتريا الموجبة و السالبة لصيغة كرام و قد اشارت المصادر الى ان بعض المستخلصات الطحلبية لها فعالية مضادة للجراثيم (Biondi *et al*.,; Burja *et al*.,2001;Issa,1999; 2004)، لابد من الأشارة الى ان انواعا من السيانو بكتريا لها القدرة العالية على انتاج المركبات الفعالة ذات الأهمية الطبية اذ تعد عملية الغربلة الأولية واحدة من الطرق المهمة في معرفة الكائنات الحية القادرة على انتاج المضادات الحيوية . (Burja *et al*., 2001; Ehrenreich , 2003) Soltani and Tabatabaei, 2005;

ان الفعالية الضد ميكروبية للمستخلصات الطحلبية تجاة البكتريا و الفطريات لوحظت من قبل العديد من الباحثين و قد تساهم العوامل البيئية في الحصول على مثل هذه النتيجة و قد تم التوصل

ايضا الى ان المركبات المستخلصة من الطحالب العملاقة لها فعالية عالية تجاة ممرضات اذ ان المركبات ذات الأصل الطبيعي تعد من المصادر المهمة للحصول على المركبات الفعالة بسبب خصائصها الطبيعية كمضادات للبكتريا و الفايروسات و التخثر و الألتهابات و قد تم الحصـــــــــــــــــــــول على الكثير من المركبات ذات الأصل الطبيعي خلال العقد الماضي (Mayer *et al*., 2010) .

ذكـــــــــــــــــــــــــــــــر Bloor and England (1989) ان الـــــــــــــــــــــــــــنوع *Nostoc muscorm* له قدرة عالية على انتاج المواد الفعالة و هذا يتفق على ما توصلت اليه الدراسة الحالية ،و قد ترجع فعالية المستخلص القلويدي الخام الى الفعل التأزري لمجموعة من المركبات الفعالة و اختلاف السلاسل الجانبية ما يعطيها مرونة عالية في العمل على اهداف عديدة من الخلية الجرثومية (Hugo and Russel,1987)، ان النتيجة التي تم التوصل اليها في الدراسة الحالية اتفقت مع ماتوصلت الية نتائج دراسة (الموسوي ,2007) حول فعالية و تأثير المركب القلويدي من الطحلب *Hapalosiphon aureus* و ايضا مع (السعيد ،2002) حول تأثير المواد القلويدية من نبات الشنان على البكتريا ، وكذلك ما توصلت الية (الناصر ،2010) و كذلك الى ما توصل آلية (Soltani *et al*, 2011) في بحثة على الطحلب *E.intestinalis* الذي اظهر فعالية عالية تجاه البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام و تتفق النتائج التي تم الحصول عليها مع العديد من الدراسات التي تؤكد فعالية المستخلصات الطحلبية ضد الممرضات البكتيرية و بالتالي امكانية استعمالها كمنتجات طبيعية بديلة في الصناعات الدوائية (2009) Kaushik *et al*. الذي توصل في بحثه الى ان المستخلص الميثانولي للطحلب *Anabaena. variabilis* له فعالية تثبيطية عالية تجاه البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام (2006) Tuney *et al*. وGhosh *et al*. (2008) و و يمكن اعتبار المستخلص القلويدي المعزول من الطحالب من المواد الفعالة الواسعة الطيف بسبب تأثيره على البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام و الذي يعتقد انه يعمل على تحطيم الغشاء الخلوي للكائن المجهري مما يؤدي الى تغيير نفاذية الغشاء. (El-Sheekh *et al*,.2006).

6-4 تأثير راشح المزرعة الطحلبية على نمو الفطريات:

ان ظاهرة التضاد Allelopathy هي ظاهرة شائعة في الطبيعة و قد عرفت بوساطة مؤسسة التضاد الحيوي العالمية International Allelopathy Society (Torres , 1996) بأنها اي عملية تتضمن انتاج الأيوض الثانوية Secondary metabolites بوساطة النبات و الأحياء المجهرية و الفطريات و الفايروسات ذات تأثير على النمو و تطور الأنظمة الزراعية و البيولوجية (بأستثناء الحيوانات) ، و يكون ذا تأثيرات ايجابية او سلبية على ألأحياء المجهرية المتواجدة في التربة عرفت بأهميتها في تحديد فعالية ظاهرة التضاد البايوكيميائي .

ان الطبيعة مستمرة بأنتاج وتوفير مركبات طبيعية و ذات فعالية عالية ضد مسببات الأمراض و التي يمكن ان تستخدم في الصناعات الدوائية (El-Mahmood and Ameh ,2007)، و في الوقت الحالي تم البحث من قبل الباحثين عن طرق تكون صديقة للبيئة و امنة للسيطرة على الممرضات و منها الفطريات المرضية *Fusamrium* spp *F.solani* و *F. moniliformae* و الممرضات الأنتهازية التي تؤدي الى العديد من الهلاكات (Arikan *et al.*,1999)، و من البحوث الحديثة هي استخدام الفطريات العدائية في السيطرة على الأمراض النباتية و التي اجريت عليها العديد من الدراسات و منها استخدام انواع من الفطريات و منها *Trichoderma sp.* (Gachomo and Kotchoni, 2008).

ومن الملاحظ من النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية ان هناك علاقة عكسية بين نسبة الراشح الطحلبي و نمو المستعمرات الفطرية فمن الواضح ان الراشح الطحلبي للمزارع السائلة للطحلبين *N. carnum* و *O. brevis* كانا ذا تاثير على نمو المستعمرات الفطرية و تقليص نموها و ان هذه النتائج مشابهة لنتائج الدراسات Cano *et al.* (1990) و Caire *et al.*, (1993) و Fish and Cood (1994) و Stratmann *et al.*, (1994) في تأثير الراشح الطحلبي على نمو الفطريات الممرضة للنبات .

ان الأيوض الثانوية للطحالب الدقيقة قد جذبت الأنتباة في الأوانة الأخيرة لانها مصدرا للأدوية الجديدة و السموم وبالأخص المواد المطروحة للوسط التي تعيش فيه و التي يمكن اعتبارها من المبيدات الطبيعية ، وبذلك جاءت هذة النتائج لتدعم ماتوصل اليه الباحثين من امكانية استخدام الأيوض الثانوية في السيطرة البيولوجية لبعض الممرضات الفطرية وانه كلما زاد تركيز الراشح الطحلبي زادت الفعالية على تثبيط نمو المستعمرات الفطرية ، وقد لوحظ ان الطحالب تنتج موادا تمتلك فعالية تثبيطية تجاه الفطريات و هذا ما اكدته الدراسة الحالية في قابلية الطحالب المدروسة على انتاج المركبات الخارج خلوية و التي لها تأثير واضح على نمو الفطريات المختبرة و بالتالي امكانية استخدامها كمبيدات طبيعية بدلا من المركبات الكيميائية ذات السمية العالية و التأثيرات الأخرى على البيئة . ; Ördög and Pulz, 1996)

. (Stirk *et al.*, 1999

7-4 تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC

يعرف التركيز المثبط الأدنى (MIC) انه اقل تركيز من المضاد قادر على تثبيط نمو الجراثيم بعد فترة حضن مقدارها 24 ساعة (Vandepitte *et al.*,1991)، اظهرت النتائج ان المستخلص القلويدي للطحلبين *E.intestinalis* و *N. carnum* يمتلك فعالية عالية تجاة الجراثيم السالبة و الموجبة لصبغة كرام مما يدل على ان المستخلص له القدرة على اختراق كلا النوعين من الجدر للبكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام ، اما المستخلص القلويدي للطحلب *O. brevis* فقد امتلك فعالية اعلى تجاة الجراثيم الموجبة لصبغة كرام مقارنة مع مثيلاتها السالبة لصبغة كرام و هذا التفاوت في التأثير قد يعود الى طبيعة الأختلافات بين الجراثيم نفسها من حيث تركيب و سمك الجدار الخلوي و بذلك يكون هنالك اختلاف في حساسيتها و تأثرها بالعوامل المضادة للأحياء المجهرية (Jawetz *et al.*,1998) ، ولقد تطورت تقنيات اختبار حساسية الأحياء الدقيقة المسببة للأمراض تجاه المركبات الكيميائية المصنعة و المستخلصة من

الأحياء الأخرى فهناك العديد من التقنيات لتحديد ادنى تركيز مثبط للمضادات و لعلها اكثرها شيوعا طريقة التخفيف بالوسط الصلب او الوسط السائل .

8-4 الفعالية الضد تأكسدية (اختبار اقتناص بيروكسيد الهيدروجين):

تمتلك الطحالب العديد من المركبات الفعالة حيويا التي لها القابلية على اقتناص الجذور الحرة و العمل كمضادات اكسدة طبيعية Natural antioxidants كالمركبات الفينولية و الفلافونيدات و التايينات و السكريات المتعددة و القلويدات تجعلها تؤدي دورا مهما في التقليل من الأصابة بالعديد من الامراض كالسرطان و امراض القلب و امراض الجهاز العصبي (Wang *et al.*, 2009; Matanjun *et al.*, 2008; Diaz *et al.*, 2006;Yukimoto, 2003)،اذ تنتجها الطحالب كآليات دفاع ضد التحطم الأوكسجيني و لكنها غير مستغلة و التي تعد من اهم المركبات المضادة للأكسدة الطبيعية ، اوضحت النتائج جدول (10) و شكل (8) بأن المركبات والمستخلصات المعزولة من الطحالب قيد الدراسة لها فعالية ضد تأكسدية تعمل على اقتناص الجذور الحرة حيث تكون كمركبات واهبه للهيدروجين وبالتالي التفاعل مع الجذور الحرة لتحويلها الى مركبات اكثر ثباتا ومن ثم انهاء سلسة تفاعلها (Romero *et al* ., 2004) ان اعلى نسبة للأقتناص سجلها المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* وهي (58%) و اقل نسبة اقتناص سجلها المستخلص القلويدي لطحلب *N.carneum* و هي(40%) ، و عليه فأن هذه المركبات تخضع للنظرية القائلة أن وجود مجموعة معوضة مانحة للألكترون في المركبات يزيد من فعالية هذه المركبات في اقتناص الجذور الحرة ، و يمكن ان تعزى قابلية المركبات لقنص الجذور الحرة لكونها مختلفة بالنسبة المكونات المضادة للأكسدة و ان المستخلص يحتوي على عدة مواد (Rivera *et al.*,2006) ، و قد يعود الأختلاف في الفعالية الضد تأكسدية للمستخلصات و المركبات المعزولة من الطحالب قيد الدراسة الى اختلاف نوعية المجاميع الفعالة و الواهبة للألكترون مثل مجموعة الهيدروكسيل او الأصرة المزدوجة (Müller *et al* ., 2011) و بذلك يمكن ان تعد المستخلصات القلويدية للطحالب قيد الدراسة كمضادات اكسدة طبيعية ، و لابد من الأشارة الى ان ظروف النمو الطحالب تلعب دورا مهما في انتاجها مركبات ذات طبيعة مضادة للأكسدة لأنها تنتج هذه المركبات للوقاية من الظروف البيئية منها التعرض للأشعة الفوق البنفسجية و درجات الحرارة العالية و قلة الأوكسجين مثل فلوروتايينات و الكاروتينات و توكوفيرول و حامض الأسكوربك (Heo *et al*. 2009; Zubia *et al*. 2009).

9-4 طيف الكتلة للمركبات المفصولة بتقنية كروماتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة GC-mass:

من اهم الطرق الكيميائية التي تستخدم لتشخيص المركبات الأيضية تتضمن تقنيات كروموتوغرافيا و تشمل (Gas chromatography , HPLC ,TLC)،

(Onji *et al*.,2002;Akyiama *et al*.,1996)؛ و كذلك استخدمت طرق التشخيص الأخرى منها الأشعة تحت الحمراء و طيف الكتلة GC-Mass ، و لقد اوضحت الدراسات السابقة ان المركبات المعزولة من الطحالب الخضر chlorophyta تتضمن التربينات الثنائية كما في الطحلب *Udotea flabellum* و الطحلب *Halimeda* sp. و *sesquiterpenoid* *rhipocephanal* المعزول من الطحلب *Rhipocephalus phoenix* الذي يثبط الانقسام الخلوي في بيوض قنفذ البحر sea urchin eggs(Fenical and Paul , 1984)، كما تم عزل Pronueiferine و Anuomrthine وGlaucine و Nuciferine و Yeserpin و Evodianin و Caulerpine و Leptoclinidamin -A , و Halimedin كمركبات قلويدية عزلت من انواع من الطحالب و التي لها فعالية مضادة للأكسدة و للبكتريا و الفطريات و السرطان (Radwan *et al*.,2007 ; Carrol *et al*.,2007 ; Calixto *et al*.,2000 Everton *et al*.,2009)، و كذلك عزلت (الناصر ،2010) مركب قلويدي من الطحلب *Cladophora crispata* المشابه بتركيبة Calothrixin و الذي له فعالية مضادة للبكتريا ، و كذلك عزلت المركبات القلويدية من الطحالب الخضر المزرقة cyanophyta مثل Lyngbyatoxin–A و Hydroxyquinoline و Calothrixin-A و Methylcystine و التي لها فعالية مضادة للأكسدة و للبكتريا و الفطريات و السرطان (Gerwick,1997 ; Orjata and; Chen *et al*.,2003) و (الموسوي , 2007) ، و في الدراسة الحالية اوضح طيف الكتلة GC-Mass للمستخلصين القلويديين ان المستخلص القلويدي للطحلب *Nostoc carneum* يحتوي على ثلاث مركبات متمثلة بالمركبات 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyles, و 9-Octadecenamide, (Z)- و Didecyl phthalate التي لها فعالية مضادة للبكتريا و مضادة للأكسدة ، و قد اوضح Manilal *et al*.,(2010) ان مركب الذي يعطي اكبر نسبة مئويةمن المساحة الكلية للمركبات المشخصة بواسطة جهاز GC-mass تعزى الية الفعالية الحيوية و عليه فأن فعالية المستخلص القلويدي للطحلب *Nostoc carneum* تعود الى احتوائة على مركب 1,2Benzenedicarboxylic acid diisooctyles, و كونه شغل مساحة بلغت 13.85% من المساحة الكلية و هذا المركب اثبت فعاليته مع العديد من المركبات المستخلصة من اوراق نبات *Hugonia mystax* ضد الميكروبات (Igwe and Okwu , 20113) ، اما المستخلص القلويدي للطحلب *E .intestinalis* فقد احتوى على ثلاث مركبات 1,2-Benzenedicarboxylic acid, و Methenamine و Hexadecanamide diisooctyl est ، و التي لها فعالية مضادة للبكتريا و الأكسدة و السرطان و كذلك لها فعالية على مستويات الكوليسترول العالية في الأرانب المرتفعة الكوليسترول ، اما عند تنقية المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* لوحظ انه يحتوي على مركب Hexadecanamide و الذي له فعالية مضادة للبكتريا و مضادة للأكسدة ، فأن فعالية

المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* الى احتوائة على مركبين هما Hexadecanamide و 1,2Benzenedicarboxylic acid diisooctyles, فقد امتلك مركب Hexadecanamide اعلى مساحة في المستخلص القلويدي للطحلب المذكور و علية امتلك فعالية مضادة للبكتريا ، و كذلك اوضح Rocha *et al*.,(2011) في دراسته على الطحلب *Centroceras clavulatum* العائد للطحالب الحمر ان المستخلص الهكساني لهذا الطحلب يحتوي على Hexadecanamide و له فعالية مضادة للبكتريا.

10-4عزل مكونات المستخلص القلويدي لطحلب *E .intestinalis* بأستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود:

تستعمل طريقةTLC (Thin Layer chromatography) بشكل واسع في العديد من المختبرات لأنها تعد طريقة سريعة و غير مكلفة مقارنة بالطرق التشخيصية الأخرى (Oancea and Stoia , 2008) ، اذ جمعت المكونات القلويدية من نهاية العمود الحاوي على مادة السليكا جيل لكونها سريعة في عملية الفصل و غالبا ما تستعمل للمواد قليلة الذوبان في الماء كما في المركبات التي تم عزلها في الدراسة الحالية (Harborne , 1984).

واستعمل في الدراسة الحالية نظام التصعيد المتكون من الميثانول النقي لفصل مكونات المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* اذ تم فصل ثلاث مكونات من المستخلص القلويدي لهذا الطحلب.

11-4 الفعالية الحيوية ضد السرطانية للمستخلص القلويدي المعزول من الطحلب *E .intestinalis*:

بينت نتائج الدراسة الحالية الموضحة في جدول 17 و 18لفترة 24 و 72 ساعة ان المستخلص القلويدي له تأثير واضح على خلايا السرطانية العضلية اذ ادى الى قتل الخلايا بتراكيز واطئة و هذا يتفق مع العديد من الدراسات التي اكدت ان الطحالب مصدرا مهما للمركبات المضادة للسرطان (Emtyazjoo *et al*., 2011; ،Xu *et al* ,. 2004; حتى الان تم عزل اكثر من 2400 مركب طبيعي من اعشاب البحر seaweeds من المناطق الأستوائية و الشبة الأستوائية (Manilal *et al*., 2009) ، و قد استعملت الطحالب في الطب الشعبي في الصين لمعالجة السرطان ، العديد من الدراسات طورت لتحديد المواد الفعالة المنتجة من قبل الطحالب البحرية ، و منها المركبات ذات الفعالية المضادة للسرطان و التي هي من اهم ميزات الطحالب البحرية والتي تمثلت ببعض المتأيضات مثل فينولات البروم Bromophenol و الستيرويدات التي عزلت و نقت من بعض الطحالب و التي لها فعالية ضد بعض انواع السرطان (Xu *et al*., 2004) ، زاد الاهتمام بالمكونات الفعالة (مركبات الايض الثانوي) بوصفها علاجاً للسرطان كونها تمتلك تلك المركبات خصائص علاجية تختلف في تأثيراتها في الخلية السرطانية اذ قد تكون لهذه المركبات فعالية تثبيطية تؤدي إلى قتل الخلايا المكونة للورم أو إيقاف نموها (Schmidt and Bastians , 2007) ، ومن هذه المركبات التي أثبتت فعاليتها المثبطة لتكاثر الخلايا السرطانية هي القلويدات وتعد من أهم وأكثر المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية و الطحلبية، إذ تمتاز بسميتها العالية للخلايا نتيجة تأثيرها في عدة آليات

في الخلية ومنها الانقسام الخلوي أو في مرحلة تسبق الانقسام أو تحفيز الخلايا السرطانية للدخول في مرحلة الموت المبرمج Apoptosis كما أشار (Mukherjee *et al*., 2001) ، وليس بالضرورة أن تعمل هذه المركبات كمضادات للورم فقط وأنما قد تؤثر على أداء الجهاز المناعي فتنشطه وبذلك تعمل كمنشطات مناعية ، ومن الأمور التي يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار بجانب الفعالية ضد السرطان ،هي ظاهرة الموت المبرمج التي قد تستحثها المستخلصات الخام حيث تحصل إزالة سريعة للخلايا المعانية من الموت المبرمج . وقد ذكرت دراسات أخرى قد يكون للمستخلص تأثير كابح على عدد من العوامل التي أدت الى تثبيط عاملي NFκB وAP-1 والتي تنظم التعبير الجيني gene expression لعدد من الجينات التي تلعب دورا مهما في الموت المبرمج للخلايا apoptosis كما اشار (Pathake *et al*.,2000) كما تعمل نواتج الأيض الثانوي كعوامل وقاية من الأصابة بمرض السرطان بوصفها مركبات لها القابلية العمل كمضادات اكسدة طبيعية اذ تحد من تشكيل الورم السرطاني، و قد تستعمل القلويدات في العلاج الكيميائي لمرض للسرطان (Mijatovic *et al*. 2005; Nagle *et al*. 2004; Haefner, 2003).

12-4 تأثير المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* على مستوى الكوليسترول في بلازما الأرانب مرتفعة الكوليسترول:

ان التجريع الفموي للمستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* قيد الدراسة للارانب المصابة بأرتفاع الكوليسترول في البلازما ادى الى زيادة الأنخفاض بزيادة عدد اسابيع المعاملة و هذا متوافق الدراسات السابقة على الطحالب الأخرى. (Ble-Castillo *et al*., 2002; Abdel- Mageid *et al* 2009; Colla *et al*., 2008).

وقد يعود السبب الى التأثير المثبط لبناء الكوليسترول لهذا المستخلص او قد يعزى ذلك لأرتباط جزيئات المستخلص مع احماض الصفراء في الأمعاء و بالتالي تثبط عمل حوامض الصفراء و طرح الكوليسترول مع الفضلات و ان ذلك يؤدي الى زيادة تحول الكوليسترول الى احماض الصفراء في الكبد،و كذلك بالنسبة للكلسيريدات الثلاثية فان المستخلص القلويدي للطحلب قيد الدراسة ادى الى تثبيط بناء الكليسيريدات الثلاثية وهذا متوافق مع دراسة (Yeh and Liu 2001; Alwan , 2005) و اللذان اوضحا في دراستهما ان المستخلصات النباتية لها دور فعال في تثبيط بناء الكليسيردات الثلاثية و ذلك من خلال ثبيط انتاج الحوامض الدهنية

اما بالنسبة لتأثير المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* على مستوى البروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة فأنه كان مثبط لها حيث عادت الى حالتها الطبيعية نوعا ما يعود ذلك لأستجابة امتصاص الكبد لهذه الجزيئات (Khudiar, 2001) ، و كذلك بوساطه تنظيم مستقبلات LDL في خلايا الكبد (Maron *et al* ., 2003).

بينت نتائج الدراسة الحالية ان المستخلص القلويدي للطحلب قيد الدراسة له فعالية مثبطة لمستويات VLDL مع الوقت خلال فترة المعاملة وصولا الى الحدود الطبيعية و يعود السبب الى ذلك كبت بناء الكوليسترول في الكبد و انخفاض في انتاج الاحماض الدهنية القصيرة السلسلة

يرافقه انخفاض في تكوين TG ، (Kannar *et al.*, 2001:Rahman ,2001) ، اما بالنسبة HDL فأن المستخلص القلويدي في الدراسة الحالية لم يؤثر معنويا على زيادته و ان هذا لا يتوافق مع دراسة (Alwan , 2005) .

ومن المعروف ان من صفات مضادات الأكسدة الطبيعية Natural antioxidants لها القابلية على التأثير على مستويات الكوليسترول المرتفعة و منها الطحالب اذ لاحظ Colla *et al.*, 2008) ان الطحلب *Spirulina plantensis* يمتلك هذه القابلية و المستخلص القلويدي للطحلب *E.intestinalis* له فعالية مضادة للأكسدة كما هو مبين في النتائج و كذلك له تأثير على على مستويات الكولسترول المرتفعة في الدم فمن الملاحظ خلال الدراسة بانه عند تجريع الأرانب المصابة بأرتفاع مستويات الكوليسترول في الدم بدات بالأنخفاض التدريجي خلال فترة المعاملة و كذلك بالنسبة للكلسيريدات الثلاثية و البروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة و البروتينات المنخفضة الكثافة جدا اذ ان التركيز العالي للكولسترول هو مؤشر على ارتفاع الجذور الحرة في الجسم و بالتالي يقوم الجسم بإنتاج الكولسترول داخليا في الكبد الذي يعمل على اكسدة الجذور الحرة و ان انخفاض تركيز مستوى الكوليسترول و الكلسيريدات الثلاثية في بلازما دم الارانب التي جرعت بالمستخلص القلويدي اذ يعمل كمحفز بالأرتباط بالأنزيم Hydroxy-3,3-methyl glutaryl co enzyme و بالتالي يقلل من انتاج الكوليسترول من الكبد و زيادة انتاج انزيم تحطيم الدهون Lipo protein lipase (LPL) و كذلك ان المستخلص القلويدي ربما يقوم بمنع امتصاص الدهون من الأمعاء (Rochelle *et al* .,2004).

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusioons and Recommendatioons

الأستنتاجات و التوصيات

الأستنتاجات:

1. لوحظ ان الطحالب المعزولة في الدراسة الحالية تحتوي على عدد من المركبات ذات الأهمية الطبية و منها القلويدات ، و التي تمتلك فعالية حيوية من خلال قابليتها على تثبيط نمو كل من البكتريا و الفطريات و ان طحلب *N carneum* . امتلك فعالية اكبر مقارنة بطحلب *E. intestinalis* و *O.Brevis* .
2. امتلك المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* فعالية عالية للحد من نمو الخلايا السرطانية و يعود ذلك الى امتلاكة بعض المركبات الفعالة .

3. اظهر المستخلص القلويدي لطحلب *E.intestinalis* امكانية واضحة لتقليل مستوى الكوليسترول في دم الأرانب المختبرة .
4. امتلك مركب Hexadecanamide فعالية لابأس بها ضد الجراثيم و كمضاد للأكسدة و يمكن اعتباره من المركبات الواعدة في الصناعات الدوائية.

التوصيات

1. التوسع في دراسة عزل و استزراع انواع اخرى من الطحالب ذات الأهمية الطبية و العمل على انشاء مزارع خارجية مفتوحة كبيرة للحصول على كتلة طحلبية كبيرة .
2. عزل و تشخيص مركبات كيميائية فعالة اخرى غير القلويدات مثل الفينولات و التربينات من الطحالب المعزولة و من انواع اخرى .
3. دراسة امكانية ادخال مجاميع كيميائية فعالة الى المركبات التي تم عزلها و تشخيصها و جعلها اكثر فعالية في معالجة الأمراض المختلفة و خاصة الأمراض السرطانية .
4. امكانية استعمال المستخلص القلويدي من الطحلب *E. intestinalis* كمضاد حيوي او دخوله ضمن الصناعات الدوائية كونه منتج طبيعي غير سام و له فعالية ضد الممرضات المجهرية .

المصادر

References

المصادر العربية

). دراسة بعض التأثيرات الحيوية للسم المنتج من الطحلب **2007ألحلفي ، وصال عودة حسن (** *Microcystic aeroginosa* Kutz (Cyanobacteria) ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة البصرة .

) دراسة محتوى بعض الطحالب الدقيقة من الفيتامينات . **2004الجعفر ، احمد محسن عذبي (** أطروحة دكتوراه ، كلية التربية ، جامعة البصرة.

) . دراسة تأثير بعض مستخلصات نبات الشنآن 2002**السعيد ، أروى حميد محمود (** H*aloxylo*m sp. على مستوى السكر في دم الأرنب الطبيعية و المصابة بفرط السكر المحدث بوساطة الالوكسان . العراق ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة البصرة .

) . الاختبارات الحيوية لبعض أنواع الطحالب المجهرية **2007السلطان ، عماد يوسف عواد (** السامة . أطروحة دكتوراه ، كلية التربية ، جامعة البصرة.

) . التكوين النوعي للطحالب و قابليتها على انتاج السموم في **2002الشاهين ، ميثم عبد الله (** محطات مياه الشرب في مدينة البصرة . العراق ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة البصرة .

) . دراسة تشريحية مقارنة لبعض الأعضاء لنوعين من الأسماك **2013طالب ، سجى جعفر (** المنتج للسموم *Nostoc carneum* العظمية عند تغذيتها على الطحلب الأخضر المزرق . ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة البصرة . Microcystins الكبدية

. الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي من الطحلب العصوي (2001)**الكبيسي ، حارث كامل بنية** في السلالات البكترية . رسالة ماجستير , كلية العلوم ، جامعة *Nitschia palea* المحلي بغداد .

Cryptophycin) . عزل وتشخيص المضاد الحيوي **2007المازني ، منى عبد الأمام احمد (** المعزولة من تربة عراقية و دراسة فعاليتها *Nostoc muscorum* من السيانو بكتريا الضد ميكروبية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة البصرة .

) . عزل و تشخيص بعض المركبات الفعالة من بعض **2007الموسوي ، نداء جاسم محمد (** و اختبار فعاليتها الحيوية المضادة للجراثيم و Cyanophyta الطحالب الخضر المزرقة الاعفان الفطرية . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة البصرة.

) . عزل و تشخيص بعض المركبات الفعالة من بعض الطحلب **2010الناصر ، أريج فرج احمد (** و اختبار فعاليتها الحيوية . العراق ، رسالة ماجستير ، *Cladophora crispate* الأخضر كلية التربية ، جامعة البصرة

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

. تصميم و تحليل التجارب **(1980)الراوي ، خاشع محمود و خلف الله ، عبد العزيز محمد** الزراعية . كلية الزراعة و الغابات – جامعة الموصل .

المصادر الأجنبية

Abd el-Raouf , N. (2004). Antimicrobial activity of *Chlorella vulgaris* culture filtrate against some pathogenic microorganisms . Egypt. J. Biomed . Sci. 15: 355-370 .

Abd-el Mageid , M. ; Salama , N. ; Saleh , M. and Abo-Taleb , H. (2009). Antioxidant and antimicrobial characteristics of red and brown algae extracts. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture.

Abedin Rania , M. A. and Taha Hala , M. (2008). Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of Spirulina platensis. J. Biochem. 3(1):22-31.

Abo-Shady, A.M.; Al-Ghetto , B.A.; Rahhal , M.H. and Abd-El Monem , H.A. (2007). Biological control of faba bean pathogenic fungi by three Cyanobacterial filtrates. Biol. Sci.; 10: 3029-3038.activity of some medicinal plant extracts. J. Nat. Med. 62: 259-262.

Akyiama , H.; Chen , D.; Miyahara , M. ; Toyoda , M. and Saito , Y. (1996). Simple HPLC determination of alfatoxins B1 ; B2 ; and G2 in nuts And corn ; J. Food Hygienic soc. Jpn.37;P.195.

Al- Aarajy ,M . (1996). Studies on the mass clture of some microalgae as food for fish larvae .Ph.D. thesis ; Univ. Basrah ; Iraq.

Al-Aarajy , M. and Al-Deelami ; A.(1997) . Bioassay on the activityof water extract for certain cyanobecteria . Marina Mesopotamica ; 12 (2):303-314.

Al-Amoudi ,O. ; Mutawie, H.; Patel , A. and ; Blunden , G. (2009).Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah corniche algae. Saudi Journal of Biological Sciences. 2009; 16: 23–29

Al-Khazraji , S . M . (1991). Biopharmacological study of Artemisia herba alba. M.Sc.Thesis; Pharmacy Coll.; Baghdad Univ .

Alwan , N. A. (2005). Study of the Effect of alcoholic extract of Taraxacum officinale on Plasma lipids Profile in male domestic rabbits (Lepus cuniculus).MSC. Thesis ; College of Veterinary Medicine . University of Basra.

Arikan , S.; Lozano-Chiu M.; Paetznick, V.; Nangia , S. ; Science, J. and Rex, J.H. (1999) . Micro dilution susceptibility testing of amphotericin B; itraconazole and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. J. Clin. Microbiol.; 37: 3946-3951.

Arora , D. S. and Chandra , P. (2010) .A assay of antioxidant potential of two aspergillus isolates by different methods under Various physio-chemical condition . Brazilian J. of Microbiology ; 41:765-777.

Arora, M. ; Poe, S. L.; Ray , A.; and Ray , P. (2011). LPS-induced CD11b(+)Gr1(int)F4/80(+) regulatory myeloid cells suppress allergen-induced airway inflammation. Int Immunopharmacol 11; 825-830.

Austin , B. ; Baudet , E. and Stobie , M. (1992). Inhibition of bacteria fish pathogens by Tetraselmis suecica . J. of fish Diseases .15 : 53-61 .

Bansal, M. and Jaswal , S. (2009) . Hypercholesterolemia Induced Oxidative Stress Is Reduced in Rats with Diets Enriched with Supplement from *Dunaliella salina* Algae American J. of Bio. Sciences ISSN: 1937-9080.

Barros , MP .; Pinto , E.; Sigaud-Kutner , TCS . ; Cardozo ,HM . and Colepicolo , P.(2005) . Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. Biol Rhythm Res 2005;36: 67- 82.

Beutler , J . A . (2009). Natural product as a foundation for drug discovery . Current protocols in pharmacology/ editorial board ; S.J. Enna . 46 ; 911 1-9 11 21 .

Bhakuni , D . and Rawat , D. (2005). Bioactive Marine Natural Products; Anamaya Publishers; New Delhi; India.

Biondi , N . ; Piccurdi , R ; Margheri , M. C. ; Rodolifi , L. ; Smith and Tredici ,M .R. (2004). Evaluation of Nostoc strain ATCC53789 as potential source of pesticides .Applied .Environ . Microbial 70 (6): 3313-3320. E. mail :trcdici@unifi.it.

Blé-Castillo, J. ; Rodriguez-Hernandez, A. ; Miranada-Zamora ,R.; Juárez-Oropeza, M.A. and Díaz-Zagoya, J.C. (2002);*Arthospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the administration of simvastatin; ethanol and a hypercholesterolemic diet to mice. *Life Sciences* 70; 2665-2673.Champe; P.

Block , K.I. Koch ; Mead , A. C. ; Tothy , M. N. ; and Newman , R. A. (2008) . Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity : A systematic review of the evidence from randomized controlled trials . Int .J. 22Cancer : 123;1227-1239.

Bloor, S.and England , R.R. (1989). Antibiotic production by the cyanobacteria *Nostocmuscorum* . Journal of Applied Phycology ; 1:367-372 .

Blunt , JW . ; Copp , BR . ; Munro, MH. ; Northcote ,PT . ; Prinsep , MR . (2005) Marine natural products. Nat Prod Rep 22:15–61

Blunt , J . W. ; Copp , B.R. ; Hu , W.P. ; Munro , M. H. ; Northcote ,P.T. and Prinsep , M.R. (2008) . Marine natural products . Natural product Reports .25 : 35-94 .

Böhm, G. A.; Pfleiderer , W.; Böger , P.; and Scherer ,S. (1995). Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*.J. Biol. Chem. 270: 8536 - 8539.

Bondad-Reantaso, M.; Subasinghe , R.P. ; Arthur , J.R. ; Ogawa, S. Chinabut, Adlard , R. ; Tan , Z. and M. Shariff; .(2005). Disease and health management Technolog in Asian aquaculture. Vet. Parasitology; 132: 249-272

Borowitzka , M.A.(1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J. Appl. Phycol. 7:3-15 .

Borowitzka ; M.A. (1988a). Vitamins and fine chemical from micro-aglae . In: Borowitzka ; M.A. and Borowitzka ; L.J. (Eds.); Micro-algael Biotechnology . Cambridge University Press ; Cambridge ; UK. 211-217 .

Borowitzka ; M.A. (1988b). Fats ; oils and hydrocarbons . In: Borowitzka ; M.A. and Borowitzka ; L.J. (Eds.); Micro-algael Biotechnology . Cambridge University Press ; Cambridge ; UK. 257-287 .

Burja , A.M. ; Banaigs , B. ; Abou-Mansour , E.; Grant Burgess, J. and Wright, P.C. (2001). Marine cyanobacteria-aprolific source of natural products. Tetrahedron; 57:9347-9377 .

Cabrita , M.T.; Vale , C. and Rauter , A. P.; (2010).Halogenated compounds from marine algae. Mar. Drugs;8: 2301-2317.

Caire, G. Z. de, Cano, M. M. S. de, Mula, M. C. Z., de and Halperin,D. R. de. (1993). Screening of cyanobacteria bioactive compounds against human pathogens. Phyton (Buenos Aires)54:59-65.

Calixto , J. B; Beirith , A. ; Ferreir , J .; Santos , A .S; Cechenial , V. ; and Yunes ,R. A. (2000). Naturally accruing antinocieptiv substance from plants Rws; 14:401-418 .

Cardozo , K. H. M. ; Guaratini , T. ; Barros , M. P. ; Falcão , V. R.; Tonon , A. P.; Lopes , N. P.; Campos , S.; Torres , M. A.; Souza , A. O.; Colepicolo , P. and and Pinto , E. (2007); Review: Metabolites from algae with economical impact. Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol.Toxicol. 146; 60 – 78.

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

Chen; X. ; Smith ,G.D. and Waring ,P.(2003). Human cancer cell killing bycyanobacterial metabolite Calothrix . Appli.Phyco.; 15:269-277.

Chetsumon , A. ; Fujieda , K.; Hirata ; Y. and Miura , Y. (1993). Optimization of Biochemical and pharmacological investigation of selected cyanobacteria . In. J. Hyg . Environ. Health .203 : 327-334 .

Chidambara , K. N. ; Vanitha , A . ; Rajesha , J. ; Mahadeva , M . ; Sowmya , P. R.; and Ravishankar, A. ; 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* a green microalga.*Life Sciences;*76; 1381-1390.

Chowdhury , M. ; Khadizatul , K. Mohammad , M. ; Tahsina , J . and Reazul ,M. (2015) . Screening of Antibacterial and Antifungal Activity of Freshwater and Marine Algae as a Prominent Natural Antibiotic Available in Bangladesh. International J. of Pharmacology 11 (7): 828-833; 2015 ISSN 1811-7775 © 2015 Asian Network for Scientific Information .

Colla ; L . ; Muccillo-Baisch , A.L. and Costa , J. (2008).*Spirulina platensis* Effects on the Levels of Total Cholesterol;HDL and Triacylglycerols in Rabbits Fed with aHypercholesterolemic Diet. Vol.51; n. 2 : pp.405-411; March-April 2008 ;ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.

Colla , L . ; Alvarez , J. ; Prato , C., Baisch-Muccillo , A . and Costa, J. (2002); Utilização da Spirulina platensis como inibidor da hipercolesterolemia experimental em coelhos. Dissertação Mestrado; Fundação Universidade de Rio Grande; Rio Grande.

Colla , L. ; Furlong , B. ; Costa , V. (2007). Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes Vol.50; n. 1 : pp.161-167; January 2007 ISSN 1516-8913 Printed in Brazil .

Crisswell , D . (2004) .the evaluation of antibiotic resistance .www. Icv.org.pdf/imp/.

Cuvelier , M. (2001). Antioxidants. In: Morais R (ed) Functional Foods: An introductory course. Escola Superior de Biotecnologia/UCP; Porto; Portugal; pp 97–108.

Davidson , M . H. ; Maki ,K .C .;Kong, J. C .; Dugon ,L. D.; Torri , S.A. and Hall, H .A. (1998). Long –term effects consuming foods containing psyllium seed husk on serum lipids in subjects with hypercholesterolemia . Am.J. Clin.Nutr.; 67:367-376.

De Caire , G.Z. ; de Cano , M.S. ; de Mule , M.C.Z. and de Halperin ; D.R. (1990) . Antimycotic products from the cyanobacterium *Nostoc muscorum* against Rhizoctonia solani . Phyton 51:1-4 .

De Cano , M.M.S. ; de Mule , M.C.Z. ; de Caire , C.Z. and de Halperin, D.R. (1990). Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compound from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum* . J. Appl. Phycol. 2: 79-82 .

Demain , A . L .(1999). Microbial natural products : alive and well in 1998. Nat .Biotechnol. 16:3-4.

Demirel , Z ; Yılmaz-Koz ,F .; Karabay-Yavasoglu, N. ; Ozdemir, G. and Sukatar, A. (2009). Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea.*J. Serb. Chem. Soc.* **74**: 619-628.

Desikachary , T. V. (1959) . Cyanophyta Indian . Concil of Agricultural Research. New Delhi , India .

Diaz, A . R .T . ; Cabello-Pasini , A. ; Perez-Rodriguez , E.; Alvarez , R.M.C. and Figueroa , F.L.(2006). Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in Cystoseira tamariscifolia (Phaeophyta). Mar. Biol.; 148: 459-465. DOI: 10.1007/s00227-005-0102-6

Dos Santos, M. D.; Guaratini, T.; Lopes, J. L. C.; Colepicolo, P. and Lopes, N. P. (2005). Plant cell and microalgae culture. In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Research Signpost; Kerala; India

Eggen, M .and Georg , GI. (2002). The cryptophycins: their synthesis and anticancer activity. Med. Res. Rev.; 22(2): 85-101.

Ehrenreich , I. (2003). Characterizing secondary metabolite production by cyanobacteria .Microbiology ; 196:207-214.

Eisenbrand , G. ; Zobel ,P.;B; Baker , V. ; Blaauboer , B.M. ; Boobis , B.J.; Carere ,A.; Kevekordes , A. ; Lhuguenot , S. ; Piters ,J. and Keiner , R. .(2002) . Methods of in vitro toxicology ; food Chem ; Toxicol ; 40:pp.193-236(2002).

El-Mahmood , A . And Ameh , J . M . (2007) . The in vitro antibacterial activity of Parkiabiglobosa (Jacq.) root bark extract against some microorganism associated with urinary tract infections .African J. Biotech. 6(11): 57-60.

El-Sheekh , M.M. , Osman ; M.E. H. ; Dyab , M.A. and Amer , M. S. (2006). Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium Nostoc muscorum. Environ. Toxicol.Pharmacol. 21: 42-50. EM-memory bits in water. Med. Biol. Eng. Comput.; 32: 175-180.

Ely, R.; T. Supriya and Naik , C.G. (2004). Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.; 309: 121-127.

Emtyazjoo , M .; Moghadasi , Z.; Rabbani ,M. ; Samadi S. and Mossaffa N.(2011) Anticancer effect of Dunaliella salina under stress and normal conditions against skin carcinoma cell line A431 in vitro; Iranian Journal of Fisheries Sciences 11(2[283-293 2012.eriantha. Carbohydr.Pol. 78: 316-322.

Epply , R. (1977). The growth and culture of diatoms .in:he Biology of diatoms (ed.werner;D.)Botanical Monographs ; 13:24-64.

Ernawita , E .(2008). Bioassay –guided fractionation and identification of antioxidant and antimicrobial compounds from Callistemon viminalis (Gaertn.) G. Don(M.SC.)Thesis ; school of Biological Sciences ; Nanggroe Aceh ; Darussalam .

Everton , T ; Paysianne , P. ; Aline ,G. ; Diogo, J.; Anansa;B.; Elian,A.; Vitor; P; George ;E.;Joao;A. ;Maria; C. ;liveira ;C. and Magna , S .(2009). The Antinocieptive and Anti-inflammatory Activities of Carpina ule a Bisindole Alkaloid . Isolated from seaweeds of the Genus Caulerpa sp. Mar.Drugs ; 7:689-704 .

Fasce ,C . F .and Vandeline , R. E . (1972). Factors affecting the results of serum cholesterol determination : an interlaboratory evaluation . Clin.Chem .18 : (901 – 908)

Faulkner, D. J. (2002). Marine natural products. Nat. Prod.Rep.; 19: 1-48.

Febles, CI; Arias A .and Gil-Rodriguez , M.C .(1995). In vitro study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta; Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife (in Spanish). Anuario del Estudios Canarios 34: 181-192; 1995.

Fenical , W . and Paul , V.J. (1984). Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteacea .Hydrobiologia ;116-117 : 135-140 .

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

Fish, S. A. and Codd, G. A.(1994). Bioactive compound production by thermophilic and themotolerent cyanobacteria (bluegreen algae). World J. Microbiol. Biotechnol. 10:338-341.

Fogg , G . E . (1975). Algal culture and phytoplankton ecology .175PP.2nd .ed.University of Wisconisn press .wisconisn ; U.S.A.

Friedwald ; (1979) . Clinical guide to laboratory test .Clin.Chemi .18(499).

Fujii . K.; Sivonen , K.; Nakano , T. and Harada , K. I. (2002). Structural elucidation of Cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in Anabaena species . Tetrahedron ; 58 : 6863-6871.

Gachomo, E.W. and Kotchoni , S.O. (2008). The use of .*Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential agents against peanut microflora and their Antimycotic products from effectiveness in reducing aflatoxin contamination of the Cyanobacterium *Nostoc muscorum* against infected kernels. Biotechnology; 7: 439-447.

Gademan , K. and Portman , C . (2008). Secondary metabolites from Cyanobacteria; complex structures and powerful bioactivities. Current Organic Chemistry 12 326-341.

Ganesan , A . (2008). The Impacts of natural products upon modern drug discovery ; J. curr Opin Chem Biol ;2008Jun ; 12(3):306-17 .doi:10.1016/j cbpa.2008.30.016.

Ghasemi, Y. ; Yazdi, M.T. ; Shafiee , A. ; Amini , M. ; Shokravi , S. ; Zarrini , G. and Parsiguine ,H. (2004). A novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua* .Pharmaceutical Biology. 42: 318-322 .

Ghosh, A. ; Das, BK . ; Roy , A. ; Mandal , B; and Chandra , G. (2008). Antibacterial Goel Cholesterol lowering effects of rhubarb fiber in hypercholesterolemic men ; J. Am. College of Nutr . ; 16 : 600-604.

Griffin , B . A . (2009). Lipid metabolism . Surgery .27(1):1-5. grown culture of *Spirulina platensis.* Ind. J. Microbiol.p. 48.

Haefner , B. (2003) .Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. Drug Discover Today 8: 536 – 544.

Harborne , J. B. (1984). Phytochemical Methods : a guide to modern techniques of plant analysis . Chapman and Hall ; London ;UK.; pp288

Hassan , N . A .M . (2007). Studies on the algae flora distributed at Wadi- Sannur of the Eastern-desert of Egypt . M.Sc. Thesis ; Faculty of Science ; Beni-Suef University ; Egypt .

Heidrich , J. ; Contos, L. M. ;Hunsuker, L.A.; Deck , L.M. and Vander-jagt , D.L.(2004) . Inhibition of pancreatic cholesterol esterase reduces cholesterol absorption in the hamster . BMC Pharmacology ; 4:1421-2210.

Heo , SJ. ; Ko ,SC.; Cha ,SH.; Kang ,DH.; Park, HS.; and Choi YU .(2009). Effect of phlorotannins isolated from Ecklonia cava on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. Toxicology in Vitro. 2009; 23:1123– 1130

Hewedy ,M.A.; Rahhal ,M. M.H. and Ismail , I.A.(2000). Pathological studies on soybean damping –off disease . Egypt ;J.Appl.Sci.2000;15:88-102.

Hua-Bin, Li .; Ka-Wing , C. ; Chi-Chun ,W. ; King-Wai , F.; Feng , C. and Yue , J. ; (2007): Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry; 102: 771–776

Huang , D. ; Ou , B . and Prior; R. L.(2005) . The Chemistry behid Antioxident capacity assays . Department of chemistry ; National University of Singapore ; Singapore.

Hugo , W.B. and Russell , A.D.(1987). Pharamaccutical microbiology. Backwell Scientific Publication Oxford London ; 511PP.

Hussain ,E. Butt G.Y ; Malik ,R. and Siddiq , S.S.(2014) Evaluation of Cytotoxic Activity of Sargassum and Iyengaria sp on Lung Cancer Cell Line through MTT Assay Test ; ISSN 2286-4822 ;European Academic Research Vol.IdeI; Issue2/ May2014.

Igwe , O. U. and Okwu , D. E. (2013) . Gc- mass evaluation of bioactive compounds and antibacterial activity of the oil fraction from the seeds of *Brachstegia eurycoma (*Harms) . Asian J of plant Sci. and research ; 3:47-54.

Irobi , O.N. ; Moo-Young , M., and Anderson , W.A.(1996). Antimiccrobial activity of annatto (Bixa orellana) extract . International ;J.Pharmacol .;43(2):87-90.

Issa , A.A. (1999). Antibiotic production by the Cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina* . Environ Toxicol. Pharm. 70 :61-63.

Iwai , Y and Omura , S. (1982) . Culture conditions for screening of new antibiotics . J. Antibiot.; 35:123-141.

Iwamoto , M. ; Saba ; M. ; Kono , M. ; Hirooka , Y. ; Sakai , K. ; Takeshiba ,A. and Imaizumi.(2000). Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and woman . J. Nut.;130(2):171-176.

Jaki , B. ; Heilmann , J. and Sticher , O.(2000). New antibacterial metabolites from the cyanobacterium Nostoc commune (E A W A G 122b). J. of Natural Products; 63:1283-1288.

Jaki , B., Orjala , J. and Sticher , O. (1999). A noval extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium Nostoc commune . J. Nat. Prod. 62 : 502-503 .

Jawad , A.A. (1997). Ethological studies in assessing the anti aggressive effect of some Iraqi medicinal plant in laboratory mice ; M.S.C.thesis;Educ.Coll.; Basrah Univ .

Jawetz , E. ; Melinck , J. and Adlberg , E. (1998). Review of medical microbiology . Appleton and Lange . 21st ed .;740 .

Joshi , S. ; Sharma , I. ;And Sharma , P. (2012). Antioxidant And Lipid Lowering Effects Of *Coriandrum Sativum* In Cholesterol Fed Rabbits ; International J. Of Pharm. And Pharmaceutical Sciences ISSN- 0975-1491 Vol 4; Suppl 3; 2012.

Kandhasamy, M.; Arunachalam K. (2008). Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. Afr. J.Biotechnol.; 7(12): 1958-1961.

Kannar , D. ; Wattanapeaiboon ,N. ; Savige ,G. S. and Wahlqvist , M. (2001).hypercholesterolemic effect of an enteri hypercholesterolemic c – coated garlic supplement . J. American College of Nutrition ; 201 (3): 225-231.

Katircioğlu , H ; Akin , BS ; and Atici ,T. (2004) Microalgal toxin(s): characteristics and importance. Afr J Biotechnol 3(12):667–674

Kaushik ,P.; Chauhan ,A.; Chauhan , G. and Goyal P. (2009) . Antibacterial potential and UV-HPLC analysis of laboratory-grown culture of Anabaena variabilis. International J. of Food Safety; 11: 11-18.

Khalaf , A. ; K . (2012). The bioactivity of secondary metabolites extract from some algae against hydatid disease in vitro and vivo Ph.D. thesis ; Univ. Basrah ; Iraq.

Khan , Z. ; Park , S.D., Shin ; S.Y. ; Bae , S.G. ; Yeon , I.K. and Seo ; T.J. (2005). Management of *Meloidogyne incognita* on tomato by root –dip treatment in culture filtrate of the bule-green algae ; Microcoleus vaginatus . Bioresource Technology . 96: 1338-1341 .

Khudiar , K.K. (2000) . The role of aqueous extract of olive (*Oleaeuopaea*) leaves and garlic (*Allium sativum*)in ameliorating the effect of experimentally atherosclerosis in rats . Ph.D. Thesis ; College of Veterinary Medicine . University of Baghdad .

Kim , KN . ; Heo , SJ . ; Kang , SM. (2010). Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicol In Vitro*; **24**; 1648-54.

Kim, J . D. and Lee , C.G. (2006). Diversity of heterocystous filamentous cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential

susceptibility to ten fungicides used in Korea . J. Microbiol.Biotechnol. 16:240-246.

Kliebenstein ; D. J. (2004). Secondary metabolites and plant /environment interaction : a view through *Arabidopsis thalians* glasses . Plan ; cell environment. 27 (6) : 675 -684 .

Koehn , F.E. and Carter , G.T.(2005). The evolving role of natural products in drug discovery . Nat. Rev. Drug Discov. 4: 206-220 .

Kolanjinathan , K ; Ganesh , P; and Govindarajan M. (2009). Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens; European Rev. Med. Pharmacol. Sci.; 13: 173-177.

Kritchevsky , D.(1970). Role of cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis . Am. Clin. Nutr.; 23:1105-1110.

Kulik , M. M .(1995). The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. European J. of Plant Pathology. 101:585-599.

Ladygina , N. ; Dedyukhina , E. G. and Vainshtein, M. B. (2006).A review on microbial synthesis of hydrocarbons.Process Biochem 41; 1001– 1014.

Lawson , J. (2010) Analysis of the anti –cancer activity of novel indigenous algal compounds in breast cancer :towards the development of a model for screening anti-cancer stem cell activity ; Masters ; Rhodes university.

Li , Y.X. ; Wijesekara , I. ; Li, Y. ; and Kim , S.K.(2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae.*Process Biochem.***2011**; *46*; 2219–2224.

Lima-Filho , J.V.M. ; Carvalho , A.F.F.U. ; Freitas , S.M. and Melo , V.M.M. (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brasilian coast . In Brazilian J. of Microbiology ; Vol. 33 : 311-314

Liu , J.G.; Hou, C.W.; Lee, S.Y.; Chuang, Y.; and Lin; C.C.(2011) . Antioxidant effects and UVB protective activity of Spirulina (Arthrospira platensis) products fermented with lactic acid bacteria.Process Biochem. 2011; 46; 1405–1410.

Manach , C. ; Scalbert , A. ; Morand , C. ; Rémésy , C. ; and Jiménez , L . (2004) . Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.***2004**; *79*; 727–747.

Manahan, S.E. ;(2002). Toxicological Chemistry and biochemistry .3rd 2oo2; Lewis pubisher .

Manilal, A. ; S. Sujith , Kiran , G. S. ; Selvin , J. ; Shakir , C. ; Gandhimathi , R.and Lipton, A. P. (2009). Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from the South west coast of India tested against shrimp; human and phytopathogens. *Ann. Microbiol.;* 59(2): 207-219.Manual for its Promotion; pp. 89-94; Rome; FAO Soils Bulletin No.46; ISBN 9251011079

Maron , D. J. ; Lu , G.P. ; Cai , N.S. ; Wu, Z.G. ;Li, Y.H. and Chen , H. (2003). Cholesterol- lowering effect of theaflavin- enriched green tea extract .Arch. Intern.Med.; 163:1448-1453.

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 the interaction within DNA.J.;Nat .Prod .;54:1542-1550.

Matanjun , P.; Mohamed , S.; Mustapha , N.M.; Muhammad , K. and Ming , C.H.(2008) . Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. J. Applied Phycol.; 20: 367-373. DOI: 10.1007/s10811-007-9264-6

Matern , U.; Oberer L; Erhard, M .; Herdman , M .and Weckesser , J. (2003). Hofrnannolin a cyanopeptolin from Scytonema hofmanni PCC 7110. Phytochemistry; 64: 1061-1067.

Mayer ,A . and Hamann , M. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with anti-bacterial; anti-coagulant; anti-fungal; antiinflammatory; anti-malarial; antiplatelet; antituberculosis; and antiviral activities; affecting the cardiovascular; immune; and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. Mar. Biotechnol . 6: 37-52.

Mayer, A . ; Glaser , K . ; Cuevas , C . ; Jacobs , R. ; Kem , W. ; Little , RD; McIntosh, J .; Newman , D . ; Potts , B . and Shuster , D. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. Trends Pharmacol Sci 31: 255-265.

Mehdi , K. H. ; Al- Hejuje , M. M. and Al –Mousawi , N. J. (2002) . Utilization of chemical and physical mutagens for increasing antibiotic production from *Oscillatori aomena* isolated from Shat Al-Arab. Iraq J. Biol.; 2:469- 478

Mijatovic , S . ; Maksimovic-Ivanic , D. ; Radovic , J. ; Miljkovic , D. ; and Kaludjerovic , G . N . ; Sabo , T . J .and Trajkovic , V. (2005). Aloe emodin decreases the ERK-dependent anticancer activity of cisplatin. Cellular Mol. Life Sci. 62; 1275–1282.

Milton , W. (1990). Miracle cure : The story of penicillin and the golden age of antibiotics . Basil Blak Well ; Oxford.

Miranda , M . S . ; Cintra , R.G. ; Barros , S.B.M. and Mancini-Filho, J.(1998). Antioxidant activity of the microalgae Spirulina maxima . Braz. J. Med. Biol. Res. 31: 1075-1079 .

Moher , M. ; Kempt , M. and Rathklb , B . (2004). Hypercholesterolemia in ENU-induced mouse mutants .J.of Lipid Research ; 12:560-579.

Moore ; B . S . ; Patterson , G .M . L . ; Mynderse ; J . S .and Barchi , J. (1986). Toxins from cyanophytes belonging to the scytonemataceae. Pure and Appl. Chem. 58: 263-171 .

Mtolera , M. S.P. and Semes , A. K.(1996). Antimicrobial activity of extracts from six green algae from Tanzania ;current trends in Marine Botanical Research in East African. 1996.P.211-218.

Mukherjee ,A . ; Sourar , B .; Nabainta , S. and Anil , C. (2001).Advance in canser therapy with plant based natural product.curent medicinal chem..1467-1486.

Mukund , S . ; Sivasubramanian , V . and Senthilkumar , N . S .(2013). Determination of the Flavonoids from *Oscillatoria terebriformis* and

Chroococcus turgidus Extract by High Performance Liquid Chromatography J. Algal Biomass Utln. 4 (4): 60–66 ISSN: 2229- 6905.

Müller ,L . ; Frhlich , K . and Bhm , V . (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP); ABTS bleaching assay (αTEAC); DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. Food Chem 129:139–148 .

Mundt, S. ; Kreitlow , S. and Jansen , R. (2003).*Oscillatoria redekei* HUB 051. J. of Appl. Phycology. 15(2-3): 263-267.

Murthy , N.K. ; Pushpalatha , K.C. and Joshi , C.G. (2011) . Antiooxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *lobelia nicotianifolia* .J. Chem. Pharm. Rrs.; 3:218-225.

Nagle D. G . ; Zhou Y. D. ; Mora , D. and Kim , Y . (2004). Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. Curr Med Chem 11:1725–1756

Nair , M ; G. , Mishar , A. R . ; Musks , M. H. ; Taft , W . H. ; Kesller , J. E. ; Miller , J . R . ; Zhn , P . P. ;Meihart , J. D. and Lyum , G . D. (1989) . Faerifungin ; a new broad spectrum antibiotic from Streptomyces var . autotrophics. J. Natural Proudcts. 52:779-809.

Namikoshi , M. and Rinehart , K. L . (1996) . Bioactive compounds produced by cyanobacteria . J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 17: 373-384.

Newman , D.J. ; Cragg , G. M. and Snader , K. M. (2003). Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. J. Natural Products .66 : 1022-1037 .nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. Bot. Bull. Acad. Sin.; 42:

Noaman , NH. ; Khaleafa , AF. and Zaky , SH.(2004). Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis* .Microbiol. Res. 159: 395-402 .

Oancea , S. and Stoia , M. (2008). Mycotoxins : A Review of Toxicology ; Analytical methods and health Risk . acta Universitaitis cibiniensis series E : Food Technology Vol.xll (2008).

Onji , Y; Okayama , A. ; Yasumura , K. and Tamaki , M.(2002). Two-dimensional liquid chromatographic separation of alfatoxins B1 ; B2 ; and G2 in spices ; Mycotoxins ; 2002; 52;P115.

Ördög, V. and Pulz, O. (1996). Diurnal changes of cytokinin-like activity in a strain of Arthronema africanum (Cyanobacteria),determined by bioassays. Algolog. Stud. 82:57-67.,

Orjata , J. and Gerwick , W .H.(1997). Phytochemistry ;45:1087-1090 . in Burja et al.;(2001).

Ozdemir , G.; Karabay , N.U.; Dalay M.C.; and Pazarbasi B. (2004): Antibacterial activity of volatile components and various extracts of Spirulina platensis. Phytotherapy Research; 18: 754–757.

Ozdemir , G.; Hozum , Z. ; Sukatar ; A. and Karabay- Yavasoglu , N.U. (2006). Antimicrobial activates of volatile components and various extracts of dictyoperis membranaceae and Cystosira barata from the cost of Izmir ; Turkey . Pham. Biol. 44: 183-188 .

Pathake , S. ; Multani , A . S . ; Narayan , S. ; Kumar , V. ; and Newman , R.A. (2000). Anvirzel ™; an extract of *Nerium oleander*; induced cell death in human and mouse cancer cells. Anticancer drag; 11: 455-463.

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

Perry , J.J. and Staley , J.T.(1997). Microbiology :Dynamic and diversity Harcourt brace publishers . New York ; London . Sydney ; Tokyo ; 911.

Pratt , R. ; Mautner , R.; Gardener , G.M. ; Sha , Y. and Dufrenoy , J. (1994). Report on antibiotic activity of seaweed extracts. J. Amer. Pharm. Asst. Sci. 40: 579-

Prescott, G.W. (1975) . *Algae of the Western Great Lake area*. W.Mc. Brown company publishers, Iowa

Prescott , G.W. (1962) . Algae of the Western Great Lake Areas . W.M.C. Bromn Company Publisher ; Dubuqe. Iowa.

Puglisi , MP; Tan , LT; Jensen , PR; and Fenical W. (2004) . Capisterones A and B from the tropical green alga Penicillus capitatus: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen Lindra thallasiae. Tetrahedron 2004;60:7035-9.

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

Rahman , K. (2001) . Historical of perspective on garlic and cardio vascular disease . J. Nutr . ; 131: 977S-979S

Rivera, D.; Obo´n, C.; Heirich, M.; Inocencio, C.; Verde, A. and Fajardo, J. (2006). Gathered Mediterranean food plants–ethnobotanical investigation and historical development.In Heinrich; M.; Mu¨ller; W. E. and Galli; C. (Eds.); Local Mediterranean food plants and nutraceuticals. Forum Nutrition 59:18–74.

Robbers, J .E . ; Speedie , M . K .and Tyler , V . E .(1996).*Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology.*Williarns and Wilkins; Baltimore; 337 pp.

Rocha , P. ; Felício , D. ; Rodrigues , B. ; Ambrósio , D.; Yokoya , S.and Debonsi , M. (2011). Chemical Profile and Biological Potential of Non-Polar Fractions from *Centroceras clavulatum* (C. Agardh)Montagne (Ceramiales; Rhodophyta).J. *Molecules* 2011; *16*; 7105-7114; doi:10.3390/ molecules 16087105.

Rochelle, M.; Enslen, M.; Hager, C.; Groux , M.; Tavazzi , T.; Godin; J. P.; Berger , A.; Metairon , S.; Quaile, S. ; Piguet Welsch , C. ; Sagalowicz, I.; Green, H . and Fay; L. B. (2004) . Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of β-carotene and α-tocopherol in normal cholesterelemic humans; *American Journal of clinical Nutrition*; 2004; 30; 171-177.

Romero, N; Robert , P; Masson , L ; Ortiz , J; Pavez , J; Garrido, C; Foster, M and Dobarganes MC. (2004) . Effect of a-Tocopherol and a-Tocotrienol on

the performance of Chilean Hazelnut Oil (G*evuina avellana mol*) at high temperature.*J. Sci. Food Agric.* **84**; 943-948.

Ruch , R. J. ; Cheng. , S. J. and Klainig , J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular; communication by antioxidant acatechins isolated from Chinese green tea. Carcinogen.; 10:1003-1008

Sarma , A . D. ; Mallick , A. R. and Ghosh , A. K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions : An Overview .International J. of pharma sciences and Research (ijpsr) vol.1(3);185-192.

Schmidt , S. , and Bastians , H. (2007) Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. Drug Resist Updat 10:162–181

Schumaker , V. N.(1994). Advanced in protein chemistry. : Lipoprotein ; apolipoprotein and lipases. Vol.45;Acad . Press.; Inc.Pp.155-384.

Shanab , S. M . and Essa , A . M.(2007). Heavy metals tolerance ; biosorption and bioaccumulation by some microalgae (Egyptian isolatates) N. Egypt. J. Microbiol. 17:65-77 .

Shareef , A . A .(2009). Antibacterial activity of some cyanobacteria green algae and aquatic plant in Basrah Governorate .PH.D.thesis ; Education coll.;Basrah Univ.

Sheih , I. C. ; Fang , T. J. ; Wu , T. K. and Lin ,P. H. (2010). Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein in waste. J. Agric. Food Chem. 58:1202-1207

Shosevov, B. ; Vincour, W. and Altman , A . (2004). Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the a biotic stress response ; Trends Plant Sci; 9:pp.244-252; (2004).

Shriner , C . F . (1980). The systemic identification of Organic compounds . 8thed . John Wiley and Sons Inc.; New York . USA.

Singh ; S.; Kate ; B.N. and Banerjee ; U. C. (2005). Bioactive compounds from Cyanobacteria and Microalgae : An overview . Crit. Rev. Biotechnol. 25: 73-95 .

Smit , J. (2004) Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweeds natural products. J. of Applied phycology .August 2004;v.16 ; issue 4;pp.245-262

Solatni , K-N. and Tabatabaei ; Y.(2005). Screening of soil Cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. Pharm. Biol. 43: 455-459.

Soltani , S. ;Saadatmand , S. ; Khavarinejad , R. and Nejadsattari , T. (2011). Antioxidant and antibacterial activities of Cladophora glomerata (L.)KUtz .in Caspian Sea Coast ; Iran. Afr.J. Biotechnol. 10(39):7684-7689 .

Srinivasan , M. ; Steffi , A. ; and Pulikodan , F . (2013) Anti-Cancer Mechanism and Possibility of Nano-Suspension Formulation for a Marine Algae Product Fucoxanthin; *OI:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.201 3.14.4.2213 Anti-Cancer Mechanisms and Nano-Suspension Formulation for the Marine Algae Product Fucoxanthin*

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

Stein , J.R. (1975). Hand book of phycological methods. Cambridge Univ; Press.Cambridge ; 445pp.

Stephen , J.C. and Horace , G.C.; (2000) . Biologically active natural products: pharmaceutics; CRC Press; New York .

Stirk, W. A., Ördög, V. and Staden, J. (1999). Identification of cytokinin isopentenyladenine in a strain of Arthronema africanum (Cyanobacteria). J. Phycol. 35:89-92.

Stratmann, K., Moore, R. E., Bonjouklian, R., Deeter, J. B.,Patterson, G. M. L., Shaffer, S., Smith, C. D. and Smitka, T. A.(1994). Welwitindolinones, unusual alkaloids from the bluegreen-algae Hapalosiphon welwitschii and Westiella intricata -relationship to Fischerindoles and Hapalindoles. J. Am. Chem.Soc. 116:9935-9942.

Surapaneni , K . and Venkataramana G. (2007). Status of lipid peroxidation; glutathione; ascorbic acid; vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. Indian J. Med. Sci. 61(1): 9-14.

Sushanth , V. and Rajashekhar , M. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities in the four species of marine microalgae isolated from Arabian sea Karnataka cost ; Indian j. of Geo-marine scinces v.44(1) ; 2015.

Sydney , M. ; and Ellen , J.B. (1986). Bailey and Scotts Diagnostic microbiology ; Methods for testing antimicrobial effectiveness ; 17th ed.C.V.Mosby company. Missori.;173-200.

Tan, B.K.H. and Vanitha , J. (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: A review. Curr. Med. Chem.; 11: 1423-1430.

Tandeau-de-Marsac , H.J. (1993). Adaptation of Cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. FEMS Microbiology Reviews.104 :119-190 .

Tembhurne , S. V. ; Feroz , S. ; . More , B. H and Sakarkar, D. M. (2014) . A review on therapeutic potential of Nigella sativa (kalonji) seeds. Vol. 8(3); pp. 167-177; 17 January; 2014 DOI: 10.5897/JMPR10.737 ISSN 1996-0875 ©2014 Academic J. http://www.academicjournals.org/JMPR.

Torres , A . ; Oliva, R. M. ; Castellano; D. and Cross, P. (1996). First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future.; pp. 278. SAI (University of Cadiz). Spain; Cadiz.

Trinder , P. (1969) . Laboratory test .Ann .Clin .Biochem . 6 (27) : 23-32 .

Tuney , I . ; Cadirci , B . H . ; Unal, D. and Sukatar , A.(2006). Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir ; Turkey). Turk. J. Biol. 30 : 171-175 .

Vandepitte , J. ; Engbaek , K. and Heuck, C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology . 1sted . World health ; Organization Geneva

Venkataraman , L. V.(1998). Cyanobacterial biotechnology (267-281) In : G. Submanian ; B.C. kouhik and G.S. Venkataraman (eds) . Oxford and IBH Publishing Co. Put .Ltd . New Delhi ; India

Vlachos , V. ; Critchley , A. T. and Holy , A. (1996). Establishment of aprotocol for testing antimicrobial activity in southern African macroalgae . Microbios; 88:115-123.

Volk , RB .; Furkert , FH . (2006). Antialgal; antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth.Microbiol. Res.; 161: 180-186.

Waldvogel, F.A. (2004). Infectious diseases in the 21st century:old challenges and new opportunities. Int. J. Infect. Dis.;8: 5-12.

Walker , J.B. (1974). Biosynthesis of the monoguanidinated in ositol moiety of bluensomycin apossible evolutionary precursor of *Streptomycin*.J.Biol .Chem.; 299 : 2397-2404.

Walsh, G. (2003). Biopharmaceuticals : Biochemistry and Biotechnology . 3rd .; John Wiley and Sons Inc.; New York ; USA.

Wang, T. ; Jonsdottir , R. and Olafsdottir , G. (2009). Total phenolic compounds; radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chem.; 116: 240-248. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.041.

Wanke M, ; Skorupinska-Tudek ; K and Swiezewska E. (2001) . Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-Cmethyl- D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway .Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warszawa, Poland Vol. 48 No. 3/2001 663.672

Wasan , K. M. and Cassidy, S. M. (1998). Role of plasma lipoproteins in modifying the biological of hydrophobic drugs . J. Pharm Sci.; 87:411-424.

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

Welch , A.M. (1962). Preliminary survey of fungistatic properties of marine algae. J. Bacteriol. 83: 97-99 .

Wu, L-C . ; Ho, J-A A .; Shieh M-C; and Lu, I-W. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. J Agric Food Chem 53:4207–4212.

Xian-gno , H. and Ursula , M.(1994) . Antifungal compound from Solanum nigrescens. Jou of Ethnopharma ; 43:173-177.

Xu , N.; Fan , X. and Yan , C. K.(2004). Screening marine algae from china for their antitumor activities ; JAppl ;Phycol ; volume 16 ;2004;pp.451-456.

Xu ,H .; Yao , L . ; Sung , H; and Wu , L . (2009). Chemical composition and ntitumor activity of different polysaccharides from the roots *Actinidia eriantha*.Carbohydr.Pol. 78: 316-322.

Yeh , Y.Y. and Lin , L.(2001). Cholestrol- lowering effect of garlic extract and organ ; osulfur compounds : Human and animal studies . J. Nutr. ;131 :989S-993S.

Yuan, Y.V. and Walsh , N.A.(2006) . Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds.*Food Chem. Toxicol. 44*; 1144–1150.

Zandi ,K. ; Tajbakhsh , S. Nabipour , I. ; Rastian , Z.; Yousefi, F. ; Sharafian, S. and Sartavi, K.(2010). In vitro antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga[against Jurkat and molt-4 human cancer cell lines; African J. of Biotechnology Vol. 9(40[; pp. 6787-6790; 4 October; 2010 Available online at http://www.academicjournals.org /AJB ISSN 1684–5315 © 2010 Academic Journals .

Zern , T.L. and Fernandez, M.L.(2005) . Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* **2005**; *135*; 2291–2294 .

Zhang, Z.; Zhang, P.; Hamada, M.; Takahashi, S.; Xing, G.; Liu, J. and Sugiura, N.(2008). Potential chemoprevention effect of dietary fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line.Oncol. Rep. 2008; 20; 1099–1103.

Zubia, M.; Fabre , M.S.; Kerjean , V.; Lann , K.L.; Stiger-Pouvreau , V.; Fauchon , M. and Deslandes , E.(2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. Food Chem.; 116: 693-701.

Summary

The current study includes an isolation, Identification and purification of three species of algae, two of them belonging to cyanobacteria they are *Oscillatoria brevis* and *Nostoc carneum* . The third one was *Enteromorpha intestinalis* which belong to green algae which was from different location in Basrah .

There are two extract were prepared from the algal species Alcohol , and alkaloid extracts , Alcoholic extract prepared to know what was compound it had and alkaloid extracts to test bioactivity of algae Cytotoxcity also was carried out on human red blood cells, the results revealed that alkaloid extract from *E.intestinalis* was nontoxic, whereas bioactive compounds isolated from O.*brevis* , *N.carneum*. Showed hemolytic action .

The bioactivity of alkaloid extract was examined to elucidate their on ability to inhibit the growth of gram Positive and negative bacteria. .Biological activity of alkaloid extracts of three algae isolated were determined by using the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) againsttwo bacterial isolates. And also test the effect of filtrate pure algal culture on growth of plant pathogenic fungi ,also apparently that the algal alkaloid extract and isolated compounds exhibits antioxidant.

The antitumor activity of the algal alkaloid extract from *E.intestinalis* against Rhabdo myosarcoma cell line was examined. The results showed that crude alkaloid extract possessed an antitumor bioactivity at low

concentration 0.78mg / ml .In this study also was carried out to investigate the possibility of preventing the hypercholesterolemia by using alkaloid extract of *E.intestinalis* .it also aimed to study the effect of use this extract in reducing the Plasma Total Cholesterol (TC) , Triglyceride (TG), Low-Density Lipoprotein (LDL) , Very Low-Density Lipoprotein (VLDL) and no effect on High-Density Lipoprotein (HDL).

The identification of the compound was made depending on the active groups test and spectroscopic analyses including: Infrared (IR) and Gas Chromatography / Mass spectrum (GC-MS). The results of such analyses showed that alkaloid extract from *E.intestinalis*a has three compound these are Hexadecanamide , Methenamine and Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl est and alkaloid extract from *N.carneum* showed that has three compound 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyles, 9-Octadecenamide, (Z)-) and Didecyl phthalate .

Hexadecanamide purification from alkaloid extract of *E.intestinalis* depended on physical and chemical properties The identification of the compound was made depending on the active groups test and spectroscopic analyses including : Infrared (IR); Gas Chromatography / Mass spectrum (GC-MS) and this component showed bioactivity on gram. Positive and negative bacteria and it has also antioxidant activity.

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Basra University / College of Education For Pure Science/ Biology Department

Isolation and identification one alkaloid of secondary metabolites from some algae and study of biological activity

A thesis

Submitted to the council of the College

of Education For Pure Science- University of Basra in Partial Fulfillment for the Requirements for

the Degree Science of Philosophy Doctor in

Biology - Biotechnology

By

Anfal Noori Abbas

MSC. In Biology – Basra

2008

Supervised by

Asst. Prof Ahmed Muhsin Athbi **Asst. Prof Dr. Aqbal Jassim Al-Assadi**

June 2015