Biological activity of Spirogyra on Candida albicans and Leishmania tropica

Dr.Seraoos Mohammad*
Frdous Korjak**

(Received 2 / 10 / 2023. Accepted 28 / 1 /2024)

□ ABSTRACT □

Three species of *Spirogyra* moss, *S. variformis, S. fluviatilis*, and *S. crassa*, were collected from the Derverver and Hour Ain areas in the Damascus countryside governorate, Extraction was carried out with methanol and chloroform solvents, and the total content of phenols and flavonoids was measured. The effect of varying concentrations of the extracts on *Candida albicans* and the *Leishmania tropica* parasite was studied. The highest content of phenols reached 236.60 ± 0.89 mg/g, and flavonoids reached 86.47 ± 0.14 mg/g in the methanolic extract of *S.fluviatilis*. The largest diameter of the inhibition corona was determined to be 24.5 ± 0.5 mm at a concentration of 60 mg/g of the methanolic extract of *S. fluviatilis* on *C. albicans*. While the half maximal inhibitoy concentration (IC_{50}) of the *Leishmania* parasite *L. tropica* was less than 125 µg/ml of the methanolic extract of *S. fluviatile* after 48 hours, the half maximal inhibitoy concentration (IC_{50}) of the species *S. variformis* ranged between 500 and 750 µg/ml, and the concentration value was The IC50 for *S. cracca* is higher than 750 µg/ml at the same time.

key words: *S. variformis* - *S. fluviatilis* - *S. crassa – Candida albicans* - *Leishmania tropica* - phenols - flavonoids

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Associate Professor, Department of Plant Biology Faculty of Science - Damascus University - Damascus - Syria. seraoosmohamad@yahoo.com**
****Postgraduate Student(PhD) -Plant Biology Faculty of Science - Damascus University - Damascus - Syria. frdous.korjak@gmail.com**

الفعالية الحيوية لطحلب *Spirogyra* على المبيضات البيض *Candida albicans* وطفيلي اللشمانيا المدارية *Leishmania tropica*

د. سيراؤوس محمد*

فردوس كورجك**

(تاريخ الإيداع 2 / 10 / 2023. قبل للنشر في 28 / 1 / 2024)

□ ملخّص □

جُمعت ثلاثة أنواع من طحلب *Spirogyra*هي *S. variformis*، *S. fluviatilis* و*S. crassa* من منطقتي دير العصافير وحور عين في محافظة ريف دمشق، وأجري الاستخلاص بمذيبي الميثانول والكلوروفورم وقيس المحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات ودُرس تأثير التراكيز المتدرجة للخلاصات على كل من المبيضات البيض *Candida albicans* وطفيلي الليشمانيا *Leishmania tropica*. حيث بلغ أعلى محتوى للفينولات والفلافونوئيدات في الخلاصة الميثانولية لطحلب *S. fluviatilis* فقط بنسبة 236.60 ± 0.89 ملغ/غ للفينولات، 86.47 ± 0.14 ملغ/غ للفلافونوئيدات. حُدد أكبر قطر لهالة التثبيط 24.5 ± 0.5 مم عند التركيز 60 ملغ/غ من الخلاصة الميتانولية للنوع *S. fluviatilis* على المبيضات البيض *C. albicans*. في حين كان التركيز القاتل للنصف IC_{50} لطفيلي الليشمانيا *L. tropica* أقل من 125 ميكرو غرام/مل من الخلاصة الميتانولية للنوع *S. fluviatile* بعد 48 ساعة، وتراوح التركيز القاتل للنصف IC_{50} للنوع *S. variformis* بين 500 و750 ميكرو غرام/مل، وبلغت قيمة التركيز القاتل للنصف IC_{50} للنوع *S. cracca* أعلى من 750 ميكرو غرام /مل عند نفس الزمن.

بلغ أعلى محتوى للفينولات والفلافونيدات في الخلاصة الميتانولية لطحلب الـ *S,flaviatilis* فقط بنسبة *للفينولات، و ....للفلافونيدات والفلافونوئيدات*

الكلمات المفتاحية: طحلب *Spirogyra*، *Candida albicans* ، *Leishmania tropica* - الفينولات - فلافونوئيدات.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

*أستاذ مساعد –قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق – دمشق – سورية. seraoosmohamad@yahoo.com

**طالبة دكتوراه –قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق – دمشق – سورية. frdous.korjak@gmail.com

مقدمة :

الطحالب الخضراء أحياء ذاتية التغذية تحوي على العديد من المركبات الفعالة حيوياً كالبروتينات، الدسم، الفيتامينات، السكريات والأصبغة والتي يمكن أن تظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة وتأثيراً مضاداً للفطريات والجراثيم (Thomas and Kim, 2013)، وعادة تكون السكريات المتعددة هي المكون الرئيس في الطحالب الخضراء، وتشمل النشاء، والآغار والألجينات والأولفان وغيرها، والتي تحفز على الحماية ضد الالتهابات الفيروسية والفطرية والجرثومية (Shannon and Abu Ghannam, 2016). تعد الطحالب مصدراً واعداً للعديد من المركبات الفعالة حيوياً، حيث ذكرت العديد من الدراسات وجود مركبات مستخلصة من الطحالب ذات فعالية حيوية مما يدل على قدرتها على إنتاج مستقلبات ثانوية مختلفة عن تلك الموجودة في النباتات الأرضية ذات خصائص علاجية وحيوية متنوعة (Chanda *et al*., 2010). دخلت العديد من منتجات الطحالب التطبيق الفعلي منذ حين من الزمن في المجال الطبي والصيدلاني والتجميل والأغذية والصناعة، وتسعى الدراسات الحالية إلى البحث عن بدائل علاجية غير تقليدية للعديد من الأمراض المنتشرة على نطاق واسع ومنها داء المبيضات وداء الليشمانيات.

داء الليشمانيات مرض منتشر في جميع أنحاء العالم وله عدة مظاهر سريرية؛ آفات جلدية تقرحية، التهاب مخاطي وعدوى حشوية، تحدث العدوى في مناطق لدغات ذبابة الرمل المصابة (Aronson *et al*., 2016)، ويحتاج طفيلي الليشمانيا المسبب لداء الليشمانيات خلال دورة حياته عائلين فقاري (الإنسان) ولافقاري وهو العامل الناقل (ذبابة الرمل)، ويتعاقب خلال دورة حياته شكلين إعاشيين هما الشكل المتحرك المسوط الذي يوجد في ذبابة الرمل والشكل غير المتحرك عديم السوط ويوجد في الخلايا البالعة للعائل الفقاري (Organization, 2010)، أما داء المبيضات البيض الذي تسببه خميرة المبيضات البيض *Candida albicans* من الفطريات وهي أحياء دقيقة تكون بشكل خمائر مستديرة أو بيضوية وتشكل أغشية حيوية تتكون من خلايا متعددة (Lindsay and Hogan, 2014)، حيث تستعمر عدة بيئات في الجسم بدون أعراض بما في ذلك الجهاز الهضمي، الجهاز التناسلي الأنثوي، تجويف الفم والجلد. تُعد *C. albicans* كائن متعايش غير ضار إلا أن التغيرات في البيئة الداخلية كتحولات الرقم الهيدروجيني والغذاء أو استعمال مضادات حيوية يمكن أن تمكن المبيضات من التكاثر مسببةً العدوى التي تظهر على شكل التهابات في الغشاء المخاطي والجلد السطحي مثل مرض القلاع وعدوى الخميرة المهبلية (Nobile and Mitchell, 2005).

السبيروجيرا *Spirogyra* طحلب خيطي غير متفرع يعيش في المياه العذبة، ينتمي إلى شعبة الطحالب الخضراء Chlorophyta، رتبة Zygnematales ، فصيلة Zygnemataceae ، (Ansari *et al*., 2012). ويحوي العديد من المركبات الفعالة حيوياً كالبروتينات، والدهون، الفيتامينات، ومضادات الأكسدة من الفينولات، الفلافونوئيدات، الصابونينات والقلويدات (Peerapornpisal, 2008, Rutikanga *et al*., 2014)، كما يحوي أصبغة الكلوروفيل والكاروتينات (Pinto *et al*., 2018)، وتعد هذه المركبات مضادات للجراثيم والفطريات (Al-Radadi *et al*., 2022).

أهمية البحث وأهدافه:

أشارت منظمة الصحة العالمية في دراستها وتقاريرها الدورية إلى أهمية دراسة المبيضات البيض وطفيلي الليشمانيا على المستوى الوطني والإقليمي كونها عوامل ممرضة منتشرة على نطاق واسع، إذ يعتمد العلاج في الوقت الحالي لأمراض الليشمانيا على الأنتيمون الخماسي التكافؤ مثل البنتاميدين والأمفوتريسين ب اللذان يظهران سمية عالية عند الجرعات

العلاجية الفعالة (Tasdemir *et al*., 2006). كما يستعمل الأمفوتريسين الشحمي ب والنستاتين لعلاج المبيضات البيض، إلا أن هذه العلاجات مكلفة وطويلة الأمد ولا تخلو من الأعراض السمية الكبدية والكلوية (Vila *et al*., 2017)، لذا كان لا بد من البحث عن علاجات قصيرة الأمد آمنة وأكثر فعالية من العلاجات السابقة وغير مكلفة وتعد الطحالب الخضراء الكبيرة ومنها طحلب السبيروجيرا *Spirogyra* الغني بالمستقلبات الثانوية مصدراً واعداً للحصول منه على بدائل علاجية لداء المبيضات البيض وداء الليشمانيات.

هدف البحث :

1. الكشف الكمي عن الفينولات والفلافونوئيدات في الخلاصة الميتانولية والكلوروفورمية لثلاث أنواع من طحلب *Spirogyra.*
2. دراسة تأثير الخلاصة الميتانولية والكلوروفورمية للأنواع المدروسة على كل من فطر المبيضات البيض *C. albicans* وطفيلي الليشمانيا المدارية *L. tropica*.

طرائق البحث ومواده:

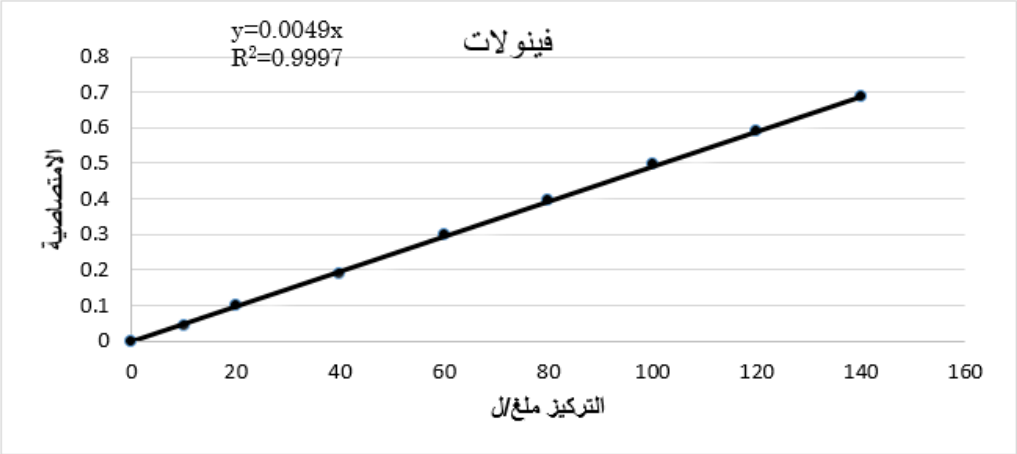
جمع العينات والاستخلاص Sample collection and extraction

جُمعت عينات الطحالب المدروسة في شهري تموز وأب من عام 2022 من نبع الفيض في قرية دير العصافير ونبع عين حور قرب سرغايا في محافظة ريف دمشق، جُففت العينة ضمن فرن عند درجة حرارة 50 مْ في مختبر الدراسات العليا في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، ثُم طُحنت على شكل مسحوق ناعم.

أخذ وزن 10 غ من مسحوق الكتلة الجافة ووُضعت في زجاجة سعة 250 مل، وأُضيف 100مل من المذيب (الميثانول 100%، كلوروفورم 100%) كلاً على حدا، ومن ثم عُرضت للأمواج فوق الصوتية لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة ثابتة تبلغ 35 مْ (Champa *et al*., 2016)، ونُقلت الزجاجيات إلى هزازة لمدة 48 ساعة عند 140 هزة/ دقيقة في حرارة الغرفة (Klavina and Kviesis, 2015). رُشحت العينات ثم أزيل المذيب باستعمال المبخر الدوار عند الدرجة 50 مْ، ووضعت في حاضنة هزازة في الدرجة 40 مْ لإزالة بقايا المذيب وحُفظت الخلاصات الجافة في عبوات زجاجية عند الدرجة 0 مْ.

– قياس محتوى الفينولات الكلي **Measurement of total phenol content**

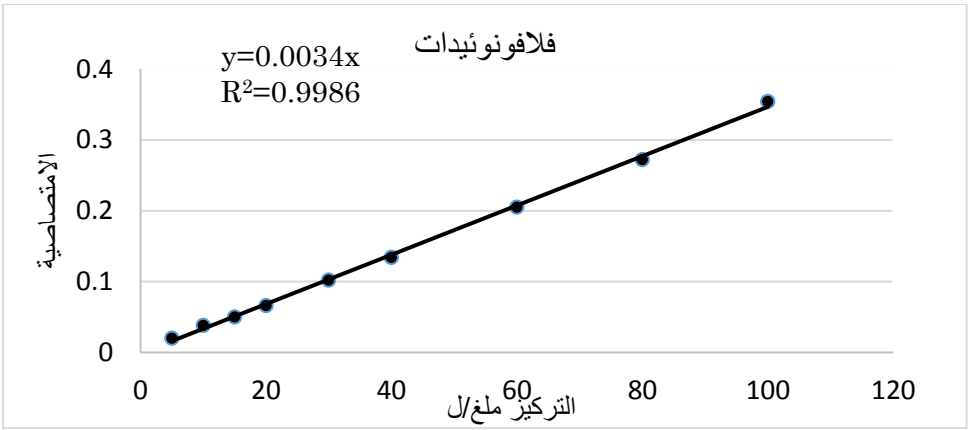
استعملت طريقة فولين سيكالتيو Folin cicaltio لتعيين الفينولات الكلية، حيث تُرجع الفينولات بحمض فوسفو موليبدات التنغستين (الكاشف) في وسط قلوي فينتج عنه محلول أزرق اللون يقاس امتصاصه عند طول موجة 760 نانومتر، أخذ 0.01 غ خلاصة وحُلت في 10 مل ميثانول وكلوروفورم كلاً على حدا، أُخذ منها 1 مل وأُضيف إليها 4.8 مل ماء مقطر و0.2 مل كاشف الفولين و4 مل كربونات الصوديوم 7.5% (Shaghaghi *et al*., 2008, Al-Hafez *et al*., 2014)، تم تحديد تركيز الفينولات الكلية في العينة بإسقاط قيمة امتصاصية العينة على المنحنى العياري الخطي لحمض الغاليك Gallic acid في الإيثانول 70 % بعدة تراكيز 0 140 ملغ/ل (الشكل 1)، وقدرت التراكيز بواحدة ملغ/غ مكافئ من حمض الغاليك من الوزن الجاف للخلاصة.



الشكل 1. السلسلة العيارية لحمض الغاليك.

قياس محتوى الفلافونوئيدات Measurement of flavonoid content

تم حل 0.01غ من الخلاصة الميثانولية الجافة في 10 مل ميثانول وأخذ 0.5 مل من المحلول وأُضيف له 0.1 مل كلوريد الألمنيوم 10% و0.1 مل خلات البوتاسيوم 1 مولية و4.3 مل ماء مقطر. وضع المحلول في الظلام لمدة 30 دقيقة. قيست الامتصاصية عند طول الموجة 415 نانو متر، وتم تحديد تركيز الفلافونوئيدات الكلية في العينة بإسقاط قيمة الامتصاصية السابقة على المنحنى العياري الخطي للكيرسيتين بعدة تراكيز 0–100 ملغ/ل (الشكل 2)، وقدرت التراكيز بواحدة ملغ/غ مكافئ من الكيرسيتين من الخلاصة الميثانولية الجافة (Kosasu *et al*.,2015).



الشكل 2. السلسلة العيارية للكرستين.

الفعالية الحيوية المضادة للمبيضات البيض Anti-*Candida albicans* bioactivity

تم الحصول على المبيضات البيض *C. albicans* من مختبرات الدراسات العليا في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، وتم اختبار الفعالية الحيوية لمستخلصات الأنواع الثلاثة من طحلب *Spirogyra* على فطر المبيضات البيض بوساطة طريقة الانتشار في الآجار الموصوفة في دستور الأدوية الأوروبي على وسط (SDA) Sabouraud Dextrose Agar (HIMEDIA, india). حُضر اللقاح من الخمائر بواسطة جهاز مكفرلاند حيث أخذ العدد 0.5×10^8 خلية/مل وتم التمديد إلى10^6خلية/ مل وزرع بوساطة ماسحة قطنية معقمة على سطح أطباق بيتري

قطر 9 سم. صُنعت الآبار بوساطة حفارة معدنية قطر 5 مم ووضع في كل بئر 50 ميكرو ليتر من كل تركيز للخلاصة، حُضنت الأطباق لمدة 48 ساعة عند الدرجة 27 مْ. تم قياس قطر هالات التثبيط والتعبير عنها بالمليمتر (Pokharkar *et al*., 2008). واستعمل الصاد Nystatin كشاهد إيجابي عند تركيز 100 وحدة دولية/مل.

تأثير خلاصات طحلب *Spirogyra* في الأشكال المتحركة لطفيلي اللشمانيا المدارية The effect of *Spirogyra* extracts in promastigots of *Leishmania tropica* parasite

تمت الدراسة على طفيلي اللشمانيا *L. tropica* المأخوذ من مختبر مركز الدراسات الوبائية والحيوية لطفيليات اللشمانيا– جامعة دمشق. نُمي وأُكثر على أوساط سائلة RPMI-1640 (Sigma -Aldrich, Germany) المضاف إليها 10٪ من المصل البقري الجنيني (FBS) fetal bovine serum (Cytogen, Germany).

حُضرت عينات اللشمانيا للدراسة بكثافة 5×10^5 طفيلي /100 ميكروليتر من وسط الزرع بعد عدها بصفيحة نيوباور Neubauer (Marienfeld-Germany). بعد ذلك عولجت بالتراكيز المتدرجة للخلاصات 25، 125، 250، 725 ميكروغرام/ مل حيث جهز ثلاث مكررات لكل تركيز مع إضافة عينة شاهدة غير معالجة وحُضنت في الظلام وبدرجة حرارة 26 مْ ضمن حاضنة خاصة بالطفيليات ولمدة 48 ساعة (Bafghi *et al*., 2017).

التلوين بملون الـ MTT Coloring by MTT

أُضيف ملون MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) للعينات بنسبة 10% من حجم العينة وحُضنت لمدة 2 ساعة في درجة حرارة 26 مْ، وقُرئت الكثافة الضوئية في قارئ الإليزا ELISA على طول موجة 540 نانومتر لمعرفة نسبة العيوشية في العينات المعالجة (Fouladvand *et al*., 2011).

الدراسة الإحصائية Statistical study

أُجريت الدراسة الإحصائية بعمل ثلاث مكررات للتجربة الواحدة، واستعمل برنامج SPSS 22 لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها وبرنامج الاكسل لرسم المنحنيات البيانية وتحديد الارتباط بين العيوشية والتراكيز المستعملة، كما أُعتمد اختبار تحليل التباين ثنائي الاتجاه Tow Way Analysis Of Variance (ANOVA) لدراسة الفروق المعنوية بين متوسطات قطر الهالات عند استعمال تراكيز مختلفة من الخلاصة الميتانولية والكلوروفورمية لثلاث أنواع من طحلب *Spirogyra*، كما أُستعمل اختبار المقارنات المتعددة Post Hoc Multiple Comparisions بطريقة الفرق المعنوي الأصغر Significant Differencr(LSD)، وعُدت القيمة $P<0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً بمستوى ثقة 95%.

النتائج والمناقشة:

المحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات Total content of phenols and flavonoids

يبين الجدول (1) نتائج المحتوى الكمي من الفينولات والفلافونوئيدات لكل من الخلاصة الميثانولية والكلوروفورمية لثلاث أنواع *S. cracca*، *S. variformis* و*S. fluviatile* حيث كانت الخلاصات الميثانولية أفضل من الخلاصات الكلوروفورم، كما احتوت مستخلصات النوع *S. fluviatile* على نسبة أعلى من الفينولات والفلافونوئيدات مقارنةً مع النوعين الآخرين. وبلغ محتوى الفينولات في مستخلص الميثانول لكل من *S. variformis*، *S. fluviatilis* و *S. crassa* 141.56 ± 5.7، 236.60 ± 0.89 و120.81 ± 1.27 ملغ/غ على التوالي. بينما كان محتوى مستخلص الكلوروفورم 51.56 ± 2.86، 74.01 ± 2.43 و23.06 ± 1.22 ملغ/غ خلاصة على التوالي. بينما محتوى

الفلافونوئيد في مستخلص الميتانول للأنواع *S. variformis*، *S. fluviatilis* و *S. crassa* 72.05 ± 0.14، 86.47 ± 0.14 و32.48 ± 0.84 ملغ/غ على التوالي. وفي مستخلص الكلوروفورم وصلت إلى 12.01 ± 0.11، 24.37 ± 0.11 و6.53 ± 0.13 ملغ/غ خلاصة على التوالي للأنواع *S. variformis*، *S. fluviatilis* و *S. crass* .

الجدول رقم (1). المحتوى الكلي من الفينولات والفلافونوئيدات في الخلاصات.

النوع	الخلاصة	الفينولات الكلية ملغ/غ	الفلافونوئيدات الكلية ملغ/غ
S. variformis	ميتانول	5.72 ± 141.56	0.14 ± 72.05
	كلوروفورم	2.86 ± 51.56	0.11 ± 12.02
S. fluviatile	ميتانول	0.89 ± 236.6	0.14 ± 86.47
	كلوروفورم	2.43 ± 74.01	0.11 ± 24.37
S. cracca	ميتانول	1.27 ± 120.81	0.84 ± 32.84
	كلوروفورم	1.22 ± 23.06	0.13 ± 6.53

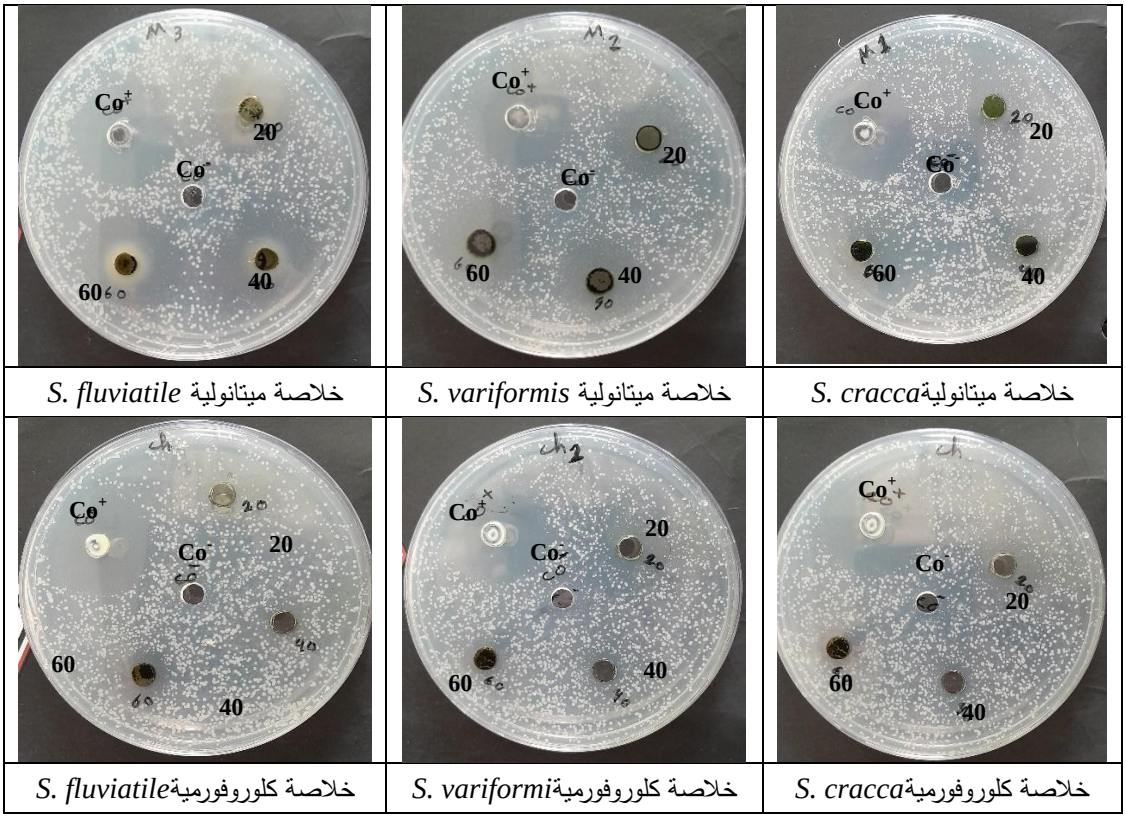
توافقت نتائج الدراسة مع العديد من الدراسات التي تبين وجود محتوى عالي من الفينولات في طحلب *Spirogyra* كدراسة Junthip و Chimsook عام 2013 حيث بلغت كمية الفينولات في المستخلص المائي والميتانولي 346.58 ± 1.61 و586.77 ± 1.65 ملغ/غ على التوالي (Junthip and Chimsook, 2013). وكذلك بينت دراسة Kosasu وآخرون عام 2015 أن محتوى الفينولات في الخلاصة الميتانولية 155.82 ± 3.28 ملغ/غ، واختلفت نتائج الدراسة من حيث محتوى الفلافونوئيدات حيث بلغ 2.64 ± 0.36 ملغ/غ من الخلاصة (Kosasu *et al*., 2015). كما توافقت النتائج مع دراسة Mridha وآخرون عام 2017 على أنواع أخرى من *Spirogyra* من حيث محتوى الفينولات التي بلغت 134.23 ± 4.45، 107.29 ± 3.25 ملغ/غ في الخلاصة الميتانولية لكل من النوعين *Spirogyra triplicate* و *Spirogyra hymerae* (Mridha *et al*., 2017). قد يعود سبب الاختلاف في محتوى المركبات الفعالة إلى اختلاف الظروف البيئية والتعرض للإجهاد من شدة ضوئية ودرجة الحرارة وكمية المغذيات.

الفعالية المضادة للمبيضات البيض Anti-*Candida albicans* activity

يظهر الجدول (2) والشكل (1) قطر هالات التثبيط لكل من الخلاصة الميثانولية والكلوروفورمية للأنواع *S. variformis*، *S. fluviatilis* و *S. crass* على *Candida albicans* حيث بلغ أكبر قطر لهالة التثبيط 24.5 ± 0.5 مم عند التركيز 60 ملغ/غ من الخلاصة الميتانولية للنوع *S. fluviatilis* وكان أصغر قطر هالة تثبيط 8.8 ± 0.34 مم عند نفس التركيز من الخلاصة الميتانولية للنوع *S. crass*، وبالنسبة للخلاصة الكلوروفورمية بلغ أكبر قطر هالة تثبيط 9.73 ± 0.25 مم عند التركيز 60 ملغ/مل للنوع *S. fluviatilis* ولم تبدي الخلاصة الكلوروفورمية للنوعين *S. variformis*، *S. crass* أي تأثير مثبط عند نفس التركيز.

الجدول 2. قياس أقطار هالات التثبيط (مم) للخلاصة الميثانولية والكلوروفورمية لثلاث أنواع من طحلب *Spirogyra* على فطر المبيضات البيض.

النوع	التركيز (ملغ/مل)	قطر هالة التثبيط (مم)	
		خلاصة ميتانول	خلاصة كلوروفورم
S. cracca	20	0.25 ± 6.26	0
	40	0.32 ± 7.63	0
	60	0.34 ± 8.8	0
S. variformis	20	0.57 ± 16.66	0
	40	0.57 ± 20.66	0
	60	0.51 ± 22.33	0
S. fluviatile	20	0.5 ± 21.46	0.25 ± 7.23
	40	0.28 ± 23.83	0.11 ± 8.23
	60	0.5 ± 24.5	0.25 ± 9.73
Nystatin	100 وحدة	0.11 ± 26.26	0.4 ± 25.23



الشكل (1). قطر هالات التثبيط للخلاصات الميتانولية والكلوروفورمية لثلاثة أنواع من *Spirogyra* على *C. albicans*.

ويتبين أن الفعالية الحيوية للأنواع المستعملة في دراستنا كانت أفضل من تلك المستعملة في دراسة Patil وآخرون عام 2011 حيث لم تبد الخلاصة الميثانولية لـ *Spirogyra sp.* أي تأثير مضاد للمبيضات وكان المستخلص بمثابة محفز للنمو (Patil *et al.*, 2011). كما كان قطر هالة التثبيط للنوعين *S. fluviatile*، *S. variformis* أكبر من قطر هالة

التثبيط في دراسة Dey عام 2018 على نفس النوع من المبيضات حيث بلغ قطر الهالة 20.63 ± 0.55 مم (Dey, 2018). وقد يعود السبب إلى المحتوى العالي من الفينولات في الخلاصة الميتانولية للأنواع المدروسة، والتي تُعد مضادات للجراثيم والفطريات (Al-Radadi *et al*., 2022).

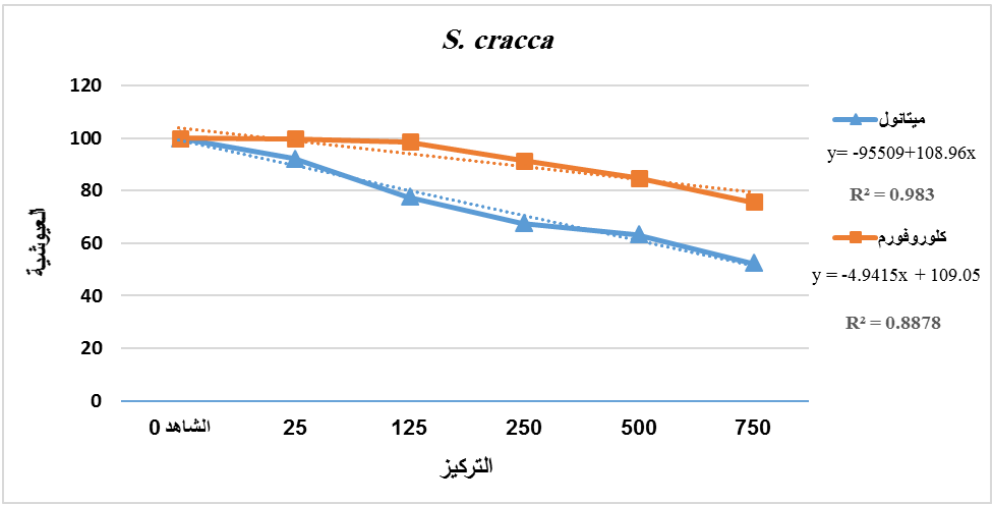
تأثير الخلاصات في الأشكال المتحركة لطفيلي اللشمانيا المدارية The effect of extracts in promastigots of *Leishmania tropica* parasite

حددت قراءة قيم الامتصاصية للعينات المعالجة بالتراكيز 25، 125، 250، 500 و750 ميكرو غرام/مل التركيز القاتل للنصف بشكل تقريبي كما هو موضح في الجدول (3) كالآتي: كان التركيز القاتل للنصف IC_{50} للأنواع الثلاثة بشكل تقريبي بالنسبة للنوع *S. fluviatile* بمذيب الميتانول بعد 48 ساعة أقل من 125 ميكرو غرام/مل، بينما تراوح التركيز القاتل للنصف IC_{50} للنوع *S. variformis* بين 500 و750 ميكرو غرام/مل، أما قيمة التركيز القاتل للنصف IC_{50} للنوع *S. cracca* كانت أعلى من 750 ميكرو غرام /مل عند نفس الزمن. أما بالنسبة لقيمة التركيز القاتل للنصف IC_{50} للخلاصة الكلوروفورمية بعد 48 ساعة كانت أعلى من 750 ميكرو غرام/مل للنوعين *S. fluviatile* و *S. variformis* ولم تبدي الخلاصة الكلوروفورمية للنوع *S. cracca* تأثير كبير على العيوشية عند التركيز 750 ميكرو غرام/مل حيث بلغت نسبة التثبيط 24.3 % بعد 48 ساعة.

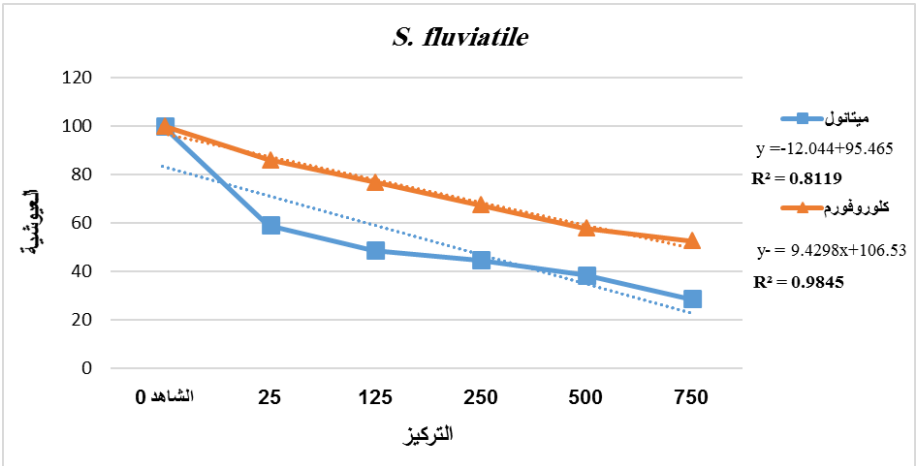
الجدول رقم (3). تأثير خلاصتي الميتانول والكلوروفورم لثلاث أنواع من طحلب *Spirogyra* على طفيلي الليشمانيا المدارية في الطور المسوط لمدة 48 ساعة.

الأنواع	التركيز (ميكروغرام/مل)	العيوشية (%)	
		خلاصة ميتانول	خلاصة كلوروفورم
الشاهد	0	100	
S. cracca	25	2.37 ± 92.14	1.42 ± 99.84
	125	1.92 ± 77.70	2.13 ±98.55
	250	2.31 ± 67.57	1.07 ± 91.42
	500	1.84 ±63.31	0.92 ±84.91
	750	0.87 ± 51.46	2.42 ±75.79
S. variformis	25	2.62 ±75.63	1.83 ±90.67
	125	3.09 ± 68.32	0.86 ± 80.90
	250	1.61 ± 59.31	1.67 ±77.70
	500	0.96 ± 54.74	2.04 ± 68.69
	750	0.89 ±41.59	1.93 ±57.58
S. fluviatile	25	1.79 ±59.08	2.11 ±86.05
	125	2.71 ± 48.66	0.83 ±76.90
	250	1.37 ± 44.79	1.25 ± 67.50
	500	1.09 ± 38.51	1.38 ± 57.91
	750	0.96 ± 28.80	0.91 ±52.75

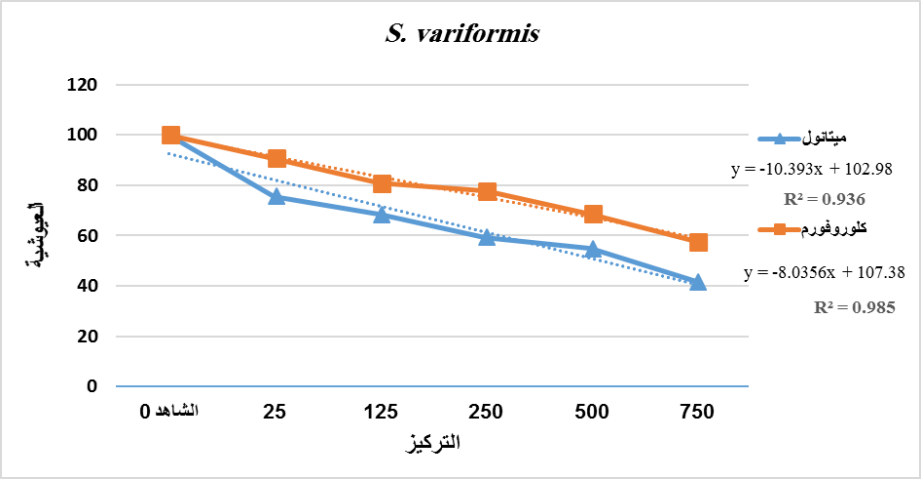
تؤكد النتائج تأثير الخلاصات على عيوشية طفيلي الليشمانيا، حيث وجد ارتباط عكسي معنوي قوي بين كل من الخلاصتين المستعملتين في المعالجة لكل من الأنواع الثلاثة للطحلب وهذا ما توضحه الأشكال (2)، (3) و(4). يمكن أن يكون سبب الفعالية المضادة لليشمانيا المدارية عائداً لقدرة الميتانول على حل واستخلاص مجموعة واسعة من المركبات ذات الخاصية المضادة للأكسدة منها الفينولات والفلافونوئيدات، فقد أظهرت الدراسات المختبرية السابقة أن المركبات الفينولية كانت فعالة ضد الليشمانيا في مرحلتي حياة الطفيلي (Kolodziej and Kiderlen, 2005). توافقت نتائج دراستنا في القدرة على تثبيط طفيلي الليشمانيا مع دراسة Fouladvand وآخرون عام 2011 على الطحالب ضد الليشمانيا حيث كان IC_{50} للطحلب الأخضر *Caulerpa sertularioides* عند التركيز 125 ميكرو غرام/مل لخلاصة الماء الساخن. وكذلك دراسة Bafghi عام 2017 التي أظهرت أن خلاصة طحلب *Spirogyra* لها قدرة على تثبيط طفيلي الليشمانيا (Bafghi *et al.*, 2017).



الشكل رقم (2). منحني بياني يوضح الارتباط بين العيوشية والتركيز للنوع *S. cracca* لمذيبي الميتانول والكلوروفورم.



الشكل رقم (3). منحني بياني يوضح الارتباط بين العيوشية والتركيز للنوع *S. fluviatile* لمذيبي الميتانول والكلوروفورم



الشكل رقم (4). منحني بياني يوضح الارتباط بين العيوشية والتركيز للنوع *S. variformis* لمذيبي الميتانول والكلوروفورم

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1. بلغت أعلى قيمة للفينولات 236.60 ± 0.89 ملغ/غ وللفلافونوئيدات 86.47 ± 0.14 ملغ/غ في الخلاصة الميتانولية للنوع *S. fluviatilis*.
2. تفوق الخلاصة الميتانولية للنوع *S. fluviatilis* في التأثير على كل من فطر *Candida albicans* وطفيلي *Leishmania tropica* من الخلاصة الميتانولية للنوعين *S. variformis* و *S. crassa* .
3. الخلاصة الميتانولية لأنواع الطحالب الثلاثة أكثر فعالية من الخلاصة الكلوروفورمية.
4. وجود مركبات فعالة تعمل كـ مضادات للفطريات والطفيليات في خلاصة طحلب *Spirogyra*.

التوصيات:

1. تحديد المركبات الفعالة وتركيزها في أنواع طحلب *Spirogyra* باستعمال HPLC.
2. دراسة تأثير مستخلصات طحلب *Spirogyra* في تثبيط أنواع فطريات ممرضة للنبات.
3. دراسة تأثير طحلب *Spirogyra* في علاج مرض الليشمانيا المدارية في الخلايا الحية.

References:

ALHAFEZ, M., KHEDER, F., & ALJOUBBEH, M. *Polyphenols, flavonoids and (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions*. Nutrition & Food Science, Vol. 44, No. 12, 2014, 455-463.

AL-RADADI, N. S., HUSSAIN, T., FAISAL, S., & SHAH, S. A. R. *Novel biosynthesis, characterization and bio-catalytic potential of green algae (Spirogyra hyalina) mediated silver nanomaterials*. Saudi Journal of Biological Sciences, Vol. 29, No. 1, 2022, 411-419.

ANSARI NAIK A, HEMAVANI C AND THIPPESWAMY B, "*Evaluation of antimicrobial property of Spirogyra species"*, International Multidisciplinary Research Journal, Vol. 2, No. 2, 2012, pp. 13-15.

ARONSON, N., HERWALDT, B. L., LIBMAN, M., PEARSON, R., LOPEZ-VELEZ, R., WEINA, P., ... & MAGILL, A. *Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice*

guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Clinical infectious diseases, Vol. 63, No. 12, 2016, 202-264.

ARUMUGAM, G., RAJENDRAN, R., KHALEELULLAH, N. S., & RAMANATHAN, S. (2019). *Anti-candidal and anti-virulence efficiency of selected seaweeds against azole resistance Candida albicans.* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Vol. 20, No. 5, 2019, 101-119.

BAFGHI, A. F., SAMIMI, H., JAMSHIDI, H. R., DEHGHANI, A., & ZAREZADEH, R. *Antileishmanial activity of Yazd Spirogyra spp. extracts against Leishmania (L.) major [MRHO/IR/75/ER] promastigotes: an in-vitro study*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. Vol. 9, No. 1, 2017, 112-117.

CHAMPA, P., WHANGCHAI, N., JATURONGLUMLERT, S., NAKAO, N., & WHANGCHAI, K. *Determination of phytochemical compound from Spirogyra sp. using ultrasonic assisted extraction*. Geomate Journal, Vol. 11, No. 24, 2016, 2391-2396.

CHANDA, S., DAVE, R., KANERIA, M., & NAGANI, K. *Seaweeds: a novel, untapped source of drugs from sea to combat infectious diseases*. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Vol. 1, No. 3, 2010, 473-480.

DEY, H. *Antimicrobial screening of naturally occurring freshwater filamentous green algae Spirogyra sp*. Dulal De. Ph. D Sovan Roy. Ph. D Gopal Chandra Bera. Ph. D, Vol. 22, No 76, 2018, 46-58.

FOULADVAND, M., BARAZESH, A., FAROKHZAD, F., MALEKIZADEH, H., & SARTAVI, K. *Evaluation of in vitro anti-Leishmanial activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. Eur. Rev.* Med. Pharmacol. Sci, Vol. 15, No. 6, 2011, 597-600.

JUNTHIP, R., AMORNLERDPISON, D., & CHIMSOOK, T. *Phytochemical screening, antioxidant activity and total phenolic content of Spirogyra spp*. Advanced Materials Research. Vol. 69, No. 6, 2013, 693-697.

KLAVINA, L., & KVIESIS, J. *Solid Phase Extraction of Bryophyte Lipids*. Material Science & Applied Chemistry. Vol. 32, No. 1, 2015, 52- 63.

KOLODZIEJ, H., KIDERLEN, A.F. *Antileishmanial activity and immune odulatory efects of tannins and related compounds on leishmania parasitized* RAW 264.7 cells. Phytochemistry. Vol. 66, No. 14, 2005, 2056–2071.

KOSASU, T., WONGKLOM, A., & MOONSIN, P. *Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of fresh water macroalgae from Ubon Ratchathani,* Thailand. Journal of Food Science and Agricultural Technology (JFAT). Vol. 1, No. 13, 2015, 207-210.

LINDSAY, A. K., & HOGAN, D. A. *Candida albicans: molecular interactions with Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*. Fungal Biology Reviews. Vol. 28, No. 4, 2014, 85-96.

MRIDHA, A., NANDI, C., PAL, R., & PAUL, S. *Studies on few fresh water green algal species reveals Spirogyra triplicata as the repository of high phenolic and flavonoid content exhibiting enhanced anti-oxidant property.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. Vol. 6, No. 4, 2017, 1291-1297.

NOBILE, C. J., & MITCHELL, A. P. *Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p*. Current Biology. Vol. 15, No. 12, 2005, 1150-1155.

ORGANIZATION, W. H. *World health statistics 2010.* World Health Organization. 2010, 86-99.

PATIL, K. J., PATIL, V. A., MAHAJAN, S. R., & MAHAJAN, R. T. *Bio-activity of algae belonging to Bhusawal region, Maharashtra*. Current Botany. Vol. 2, No. 1, 2011, 856-969.

PEERAPORNPISAL Y. *Edible freshwater macroalgae in Northern Thailand.* J Fish Technol Res. Vol. 1, No. 5, 2008, 178–189

PINTO T, GOUVEIA L, ORTIGUEIRA J, SARATALE GD, MOURA P. *Enhancement of fermentative hydrogen production from Spirogyra sp. by increased carbohydrate accumulation and selection of the biomass pretreatment under a biorefinery model*. J Biosci. Bioeng. Vol. 126, No. 2, 2018, 226–234.

POKHARKAR, R., FUNDE, P. E., PINGALE, S. S., GAVSHETE, S. L., AND KISHOR, V. *Chlorophyta Spirogyra Ethanolic Extract to the Antifungal Activita of Yeasts and Dermatophytes*. Pharmacologyonline, Vol. 3, No. 9, 2008, 40-45.

RUTIKANGA A, GITU LM, OYARO N. *Mineral composition, antioxidants and antimicrobial activities of freshwater algae (Spirogyra genus) from Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology (JKUAT).* World Rural Observ. Vol. 6, No. 11, 2014, 86–91.

SAGAR, A., SAYYED, R. Z., RAMTEKE, P. W., SHARMA, S., MARRAIKI, N., ELGORBAN, A. M., & SYED, A. *ACC deaminase and antioxidant enzymes producing halophilic Enterobacter sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress*. Physiology and Molecular Biology of Plants. Vol. 26, No. 7, 2020, 1847-1854.

SHAGHAGHI, M., MANZOORI, J. L., & JOUYBAN, A. *Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method*. Food chemistry. Vol. 108, No. 2, 2008, 695-701.

SHANNON E AND ABU-GHANNAM N. *Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications.* Mar Drugs 14, 2016, 1–23

TASDEMIR, D., KAISER, M., BRUN, R., YARDLEY, V., SCHMIDT, T. J., TOSUN, F., & RÜEDI, P. *Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies*. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 50, No. 4, 2006, 1352-1364.

THOMAS, N. V., AND KIM, S. K. *Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals*. Marine drugs. Vol. 11, No. 1, 2013, 146-164.

VILA, T., ROMO, J. A., PIERCE, C. G., MCHARDY, S. F., SAVILLE, S. P., & LOPEZ-RIBOT, J. L. *Targeting Candida albicans filamentation for antifungal drug development*. Virulence. Vol. 8, No. 2, 2017, 150-158.