مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22 (8) 2017
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

دراسة تأثير المذيبات العضوية للحصول على النواتج الحيوية لجنسي السيانوبكتريا *Anabaena sp.* Tu 65و*Nostoc sp.* Tu 69وتشخيص المركبات السامة في هذه النواتج بواسطة تقنية ال HPLC_MS

أيمن عوني سليم
كلية الصيدلة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

المخلص

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير أنواع المذيبات العضوية (الميثانول، الايثانول، ثنائي أثيل ايثر، الأسيتون والماء) على كمية النواتج الحيوية المستخلصة من جنسي السيانوبكتريا*Anabaena sp.* Tu 65 و *Nostoc sp.* Tu 69 اللذين تم عزلهما ومن ثم تنميتهما وباستخدام الوسط الزرعي الانتقائي ASM-1 السائل بدرجة حرارة (26) °م وأس هيدروجيني 7.6(pH) مع تعريضها إلى إضاءة مستمرة بشدة (2500) لوكس ولمدة (30) يوما، وتم قياس النمو بدلالة الكثافة البصرية Optical density وعلى طول موجي مقداره436نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئيSpectrophotometer، وكانت ظروف التنمية مثالية من خلال قراءات النمو اليومي التي تم تسجيلها، وكان جنس *Anabaena sp.* Tu 65 هو الأفضل نموا من جنس *Nostoc sp.* Tu 69، وبعد إجراء الاستخلاص بالمذيبات العضوية تبين أن الميثانول هو الأفضل بالاستخلاص من باقي المذيبات، يأتي بعده الايثانول ثم ثنائي أثيل ايثر فالAcetone وأخيرا الماء.

وقد تم تشخيص المركبات السامة في النواتج الحيوية لجنسي السيانوبكتريا بواسطة تقنية الHPLC_MS وأظهرت القراءات بالنسبة لجنس *Anabaena sp.* Tu 65وجود السم العصبي Anatoxin a(s) كما أظهرت وجود المركب ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) وهو أحد الأجزاء الرئيسية لكافة أنواع الـMicrocystins والتي تعد من السموم الكبدية المهمة التي تنتجها السيانوبكتريا،كما أظهرت قراءات الطيف وجود السم الكبدي [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا.

أما بالنسبة لجنس*Nostoc sp. Tu* 69 فقد أظهرت قراءات الطيف وجود كل من المركب MCYST-YM(O) ، والمركب [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR وهما نوعين من أنواع السم الكبدي Microcystin ، وكذلك وجود السم العصبي Anatoxin a(s) ويتوقع وجود Anatoxin a الذي ظهر مقاربا في قراءات الطيف.

المقدمة

السيانوبكتريا (وتعرف باسم الطحالب الخضراء–المزرقة) تنتمي إلى مملكة Monera (بدائية النواة)، قسم Eubacteria، صنف Cyanobacteria، هي مكون طبيعي في معظم الأنظمة البيئية المائية, إنها مجموعة قديمة من مجموعات التركيب الضوئي autotrophic بدائية النواة، البعض منها يمتص النتروجين الجوي كما ويظهر عدداً من التكيفات المهمة مع البيئة,ومن هذه التكيفات القابلية على تنظيم طفوها وهذه السمة التي تتسبب في تشكيل ازدهارات كثيفة على سطوح الأجسام المائية. إن السيانوبكتريا مجموعة موغلة في القدم حيث يعود وجودها إلى أكثر من (3.5) بليون سنة استنادا على دراسات بقاياها المتحجرة، وقد وجدت في جميع أنحاء العالم من ترب القطب الجنوبي إلى الينابيع البركانية الساخنة حيث لا يوجد أي نمو نباتي)[1], وهي مجموعة بارزه ومتميزة من الكائنات البدائية ذات انتشار واسع وذات تغذية ضوئية ذاتية Photoautotrophic, وهي المجموعة الأكثر تنوعا ضمن مملكة بدائية النواة في عدد أجناسها وتنوع بيئاتها وخصائصها المظهرية والفسلجية[2].

صنفت السيانوبكتريا سابقا كطحالب خضراء مزرقة من قبل العديد من الباحثين [3];[4], وقد صنف [5] الطحالب إلى مجموعتين, المجموعة الأولى بدائية النواة التي تضم السيانوبكتريا والمجموعة الثانية حقيقية النواة تندرج تحتها باقي أنوع الطحالب المختلفة, لكن بما أن لها صفات وميزات مشابهه للبكتريا فان عددا من الباحثين في اختصاص الأحياء المجهرية صنفوا السيانوبكتريا في مملكة بدائية النواة Prokaryotae Kingdom: مع البكتريا السالبة لصبغة كرام Gram-negative, وضمن صنف البكتريا الضوئية Class: photobacteria, في الصنف الفرعي Sub class: Oxyphotobacteria, رتبة Order: cyanobacteriales , وفي تصنيف [6] الحديث صنفت ال Cyanobacteria ضمن مجاميع البكتريا, ومن جهة أخرى أشار[5]بان تركيبها الداخلي مشابه للتركيب الداخلي للبكتريا أكثر مما هو مشابه لتركيب الطحالب.

إن كونها وحيدة الخلية جعلها تتشارك مع غيرها من نفس النوع في افتقارها إلى النواة وجدارها الخلوي المكون من صفائح. مع هذا وخلافاً لبكتيريا التركيب الضوئي فإن السيانوبكتريا تمتلك بصفة عامة chlorophyll-a مع photosynthetic eukaryotes, كما تحرر الأوكسجين خلال التركيب الضوئي، وقد اعتبرت المسؤولة عن تراكم الأوكسجين في جو الأرض[7].

إن السيانوبكتريا ذات وجود واسع في المياه وتتفاوت بمدى واسع في نسبة الملوحة ودرجات الحرارة، كما أنها توجد في داخل التربة وعلى

سطحها وكذلك على سطوح الصخور وفي داخل تشققاتها. كما أنها تشكل علاقات تعايش مع عدد من الكائنات الحية الأخرى [8]، وعلى العموم، فإنها الأكثر وفرة في مياه ذات PH طبيعي أو قلوي قليلاً [9].

إن العوامل البيئية المؤثرة على نمو السيانوبكتريا هي: درجة الحرارة Temperature[10]،الأس الهيدروجيني pH[11]،الضوء Light[12]، والعناصر الغذائية الكبرى والصغرى Macronutrients و Micronutrients مثل النتروجين والحديد والمولبديوم والفيتامينات والنحاس والمنغنيز [13].

إن للسيانوبكتريا احتياج خاص لعنصر المولبيديوم، وإن نقصه يخفض من نسبة تثبيت النتروجين ويقلل من اختزال النترات [14].وقد برهن [15] أن ***Microcystisaeruginosa*** تحتاج إلى الزنك من أجل نمو وإنتاج المواد السامة بصورة أفضل. كما يؤكد [16] أن وجود الحديد والنترات يظهران تأثيراً تعاونياً في تحفيز السيانوبكتريا على إنتاج المضاد الحيوي وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت إليه [17].

تنتج السيانوبكتريا طيفاً واسعاً من المركبات السامة وإن السموم هي مركبات لها تأثيرات مؤذية على الخلايا والأنسجة بالنسبة للكائنات الأخرى [18].

توجد أنواع عديدة من السيانوبكتريا، قد تم تشخيصها على أنها تمتلك خصائص سامة، ومع هذا فإن عدداً قليلاً منها قد عزل وشخص، إن الأنواع الأكثر شيوعا هي ***Anabaena***, ***Aphanizomenon***, ***Cylindrospermopsis***, ***Gloeotrichia***, ***Lyngbya***, ***Microcystis***, ***Nodularia***, ***Oscillatoria Nostoc***,[19]، وذلك لأن هذه الأنواع يعزى اليها أكثر حوادث التسمم للحيوانات كما تسبب الأمراض للانسان، ومعظم هذه الأنواع تتواجد في المياه العذبة،وبعضها يتواجد في مياه البحار ومياه البحيرات المالحة [19]; [20].

لقد صنفت السموم المنتجة من قبل السيانوبكتريا إلى فئتين رئيسيتين استناداً إلى نوع التأثير البايولوجي:الأولى مركبات سامة للخلايا سميت cytotoxins،والثانية من هذه السموم كان لها تأثير سام للكائن الحي سميت biotoxins، إن الـbiotoxinsهو المسؤول عن معظم حوادث تسمم الحيوانات، إنها تلك الفئة من السموم السيانوبكتيرية التي يتم الإشارة إليها باعتبارها من المخاطر الرئيسية على صحة الإنسان. إن الـbiotoxins السيانوبكتيرية التي عزلت وشخصت تقع أساساً في أربعة أصناف أساسية:السموم العصبية, والسموم الكبدية, السموم غير المتخصصة والـlipopolysaccharides [21].

وتصنف سموم الأعصاب المنتجة بواسطة السيانوبكتريا إلى عدة مجاميع من الناحية الكيميائية وهي:**1 – Anatoxin-a**:وتكون بوزن جزيئي 165 دالتون[22].

2 – Homoanatoxin.3 – Anatoxin-a(s):إن نصف الجرعة القاتلة (LD_{50}i.p.) للـanatoxin-a(s)النقي هي حوالي 20µg/kgمن وزن الجسم (i.p. mouse)[18].**4 – & Saxitoxin Neosaxitoxin**: أن الـLD_{50} لهذا السم هي 30mg/kg من وزن الجسم (i.p.mouse)[23].

فيما تصنف السموم الكبدية التي تنتج من قبل أصناف وسلالات ضمن الأنواع *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* and *Oscillatoria* الى عدة مجاميع وهي : 1− **Microcystins**ووزنه الجزيئي يتراوح بين 909 دالتون و 1044 دالتون اعتماداً على النوع [24]، إن معظمها يمتلك سمية في المدى LD_{50} (i.p. mouse) 60-70µg/kg. بسبب بنيتها فإن الـmicrocystins تكون مستقرة بشكل عال عند درجات الحرارة المرتفعة لفترات طويلة كما لا تفقد طبيعتها بالغليان، كما إنها غير متطايرة، و مقاومة للتغير في pH وقابلة للذوبان في الماء والإيثانول والأسيتون[25]; [26]. 2− **Nodularin**: ووزنه الجزيئي 824 دالتون ولديه LD_{50}60µg/kg من وزن الجسم (i.p. mouse)[27].

أما السموم غير المتخصصة فهي:1− **Cylindrospermopsin** : وله وزن جزيئي 415 دالتون،وإن الـ(i.p. mouse) LD_{50} هي 2.1mg/kg في 24 ساعة و 0.2mg/kg في خمسة إلى ستة أيام. 2−**السم الداخلي lipopolysaccharide**: إن LPSالسيانوبكتريا التي تمت دراستها لحد الآن هي أقل سمية من السموم العصبية والكبدية وقسم من سموم هذه المجموعة تكون ال LD_{50}1.0-1.2mg /kg من وزن الجسم[28].

أما طرق كشف وقياس هذه السموم فلقد تم تطوير عدد من الطرق المختلفة للكشف بالاستناد إلى التحليل الكيميائي والتحليل البيولوجي والتحليل المناعي، وأكثر التقنيات حداثة وتطور هي (HPLC/MS)[29].

المواد وطرائق العمل

الوسط الزرعي ASM-1 السائل والصلب

وهو من أحد الأوساط الانتقائية المهمة المستخدمة في تنمية وعزل السيانوبكتريا المثبتة للنتروجين الجوي [30], ويتكون الوسط المذكور من المواد التالية وبالتركيز المسجل لكل منها بوحدة (مايكرومول/لتر) كما موضح في الجدول التالي:

المادة الكيميائية	التركيز	المادة الكيميائية	التركيز	المادة الكيميائية	التركيز
HBO_3	6	K_2HPO_4 0	100	$CuCl_2.2H_2O$	0.0008
$MgCl_2$	145	Na_2EDTA	20	$MgSO_4.7H_2O$	150
$CaCl_2$	190	$NaHCO_3$	300	$CoCl_2.6H_2O$	0.08
NaCl	200	Na_2HPO_4	100	$FeCl_3.6H_2O$	9
MoO_3	0.1	$ZnCl_2$	3	D.W.	1L

أذيبت مكونات الوسط المذكورة أعلاه في الماء المقطر مع عملية التحريك المستمر باستخدام جهاز Magnetic Stirrer Hotplate للحصول على ذوبان كامل وتجانس مكونات الوسط, وضبط الأس الهيدروجيني الـ pH لهذا الوسط مابين (7.6-7.8) باستخدام بيكاربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) و حامض الهيدروكلوريك المخفف (HCl) (0.1) عياري وتم ضبط الـ (pH) بواسطة جهاز قياس الدالة الحامضية pH meter, ثم تم أخذ حجم (100) مل من الوسط لكل دورق ووضع في دوارق ذات حجم (250) مل وأغلقت فوهات الدوارق بسدادات معدة مسبقا من القطن الطبي والشاش, ثم عقمت باستخدام جهاز التعقيم الرطب Autoclave بدرجة حرارة (121) م°وضغط يبلغ (15 باوند/انج^2) لمدة (20) دقيقة لتصبح معدة لعملية الزرع .أما الوسط الزرعي الصلب ASM-1 فتركيبه نفس تركيب الوسط الزرعي السائل ASM-1 مضافا اليه الاكار بنسبة 1% ويعقم بنفس طريقة تعقيم الوسط السائل ثم يصب في أطباق بتري بواقع (20) مل لكل طبق تحت ظروف التعقيم القياسية و تحفظ الأطباق في الثلاجة لحين الاستخدام.

تنمية وعزل واختيار السيانوبكتريا: تمت عملية زراعة العينات التي تم الحصول عليها من مياه نهر دجلة في مدينة تكريت ضمن محافظة صلاح الدين على أطباق حاوية على الوسط الزرعي ASM-1 الصلب المشار إليه أنفا, وتمت عملية تلقيح الأوساط بالسيانوبكتريا في أجواء معقمة, وقد زرع مكررين لكل عينة لضمان الحصول على أجناس متنوعة, ثم حضنت الأطباق في الحاضنة Cooled Incubator بدرجة حرارة (26±2) °م مع تعريضها إلى إضاءة مستمرة بشدة (2500) لوكس, وبعد مرور شهر يلاحظ نمو السيانوبكتريا على شكل مستعمرات بلون أخضر مزرق وقسم منها بألوان أخرى وبعد عملية التشخيص الأولي تحت المجهر الضوئي للمستعمرات النامية تم تحديد بعض المستعمرات ليتم نقلها إلى أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي ASM-1 الصلب التي تم تحضيرها مسبقا لهذا الغرض كمرحلة أولية من مراحل التنقية لتهيئة الأجناس الملائمة للدراسة, ثم حضنت الأطباق مرة أخرى في الحاضنة تحت ظروف الإضاءة ودرجة الحرارة نفسها وهنا استغرق النمو فترة زمنية اقل من الفترة الزمنية التي استغرقها النمو في المرحلة الأولى من الزرع, وذلك لان السيانوبكتريا قد تكيفت للنمو في الوسط الزرعي ASM-1 الصلب, بعدها نقلت بعض المستعمرات النامية إلى دوارق ذات حجم (250) مل حاوية على (100) مل من الوسط الزرعي ASM-1 السائل, ثم حضنت في الحاضنة الهزازة Orbital shaker incubator بسرعة (100) دورة/دقيقة وفي درجة حرارة (26±2) م° وبشدة إضاءة (2500) لوكس, وخلال أسبوعين إلى ثلاث أسابيع نمت المستعمرات بشكل جيد [31] ، بعدها نقلت إلى دوارق ذات حجم (5) لتر حاوية على 3.5 لتر من الوسط الزرعي السائل ASM-1 لغرض إتمام الدراسة.

تم اختيار نوعين من السيانوبكتريا لدراسة تأثير المذيبات العضوية على كمية النواتج الحيوية المستخلصة منهما وتشخيص المركبات السامة فيهما، وهذين النوعين هما:

1 – ***Anabaena sp.* Tu 65** **2– *Nostoc sp.* Tu 69**

قياس النمو اليومي لنوعي السيانوبكتريا المختارين

تم قياس النمو اليومي لنوعي السيانوبكتريا المختارين اللذين تمت تنميتهما في الوسط السائل ASM-1 المحضر حديثاً والموضوعة في الحاضنة الهزازة Shaker incubator تحت درجة حرارة 26±2°م وكان الأس الهيدروجيني pH للوسط 7.6 فيما كانت شدة الإضاءة 2500 Lux لمدة 30 يوماً وتم قياس النمو بدلالة الكثافة البصرية Opticaldensity وعلى طول موجي مقداره 436 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئيSpectrophotometer حسب [32].

إنتاج النواتج الحيوية من السيانوبكتريا وتشخيص المركبات السامة

1– تمت زراعة نوعي السيانوبكتريا المختارين ***Anabaena sp.* Tu 65**،***Nostoc sp.* Tu 69** في دورقين زجاجيين حجم5 لتريحويان على3.5 لترمن الوسط الزرعي المعقم وبنسبة5سم^3/100سم^3، ثم وضع هذين الدورقين في حاضنة نمو نوع Cooled Incubator، وتزود بالهواء الجوي المرشح عن طريق محرك (ماطور) خارج الحاضنة، تركت بعدها المزارع لتنمو في ظروف ملائمة لإنتاج النواتج الحيوية مع إضاءة مستمرة بشدة2500لوكس ودرجة حرارة26±2 °م[33].

2– بعد الحصول على نمو لمستعمرات السيانوبكتريا من النوعين المختارين جمعت خلاياها باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة3000 دورة/دقيقة لمدة 5دقائق،وأخذ الراسب وتمت إذابته بالمذيبات كلا على حدة وبنسبة 1غم/10مل وبواقع (5) مكررات لكل نوع.

3– بعد إضافة المذيبات الميثانول والايثانول وثنائي أثيل ايثروالأسيتون والماء كلا على حدة إلى الراسب (مستعمرات السيانوبكتريا) بالنسبة المشار إليها في الفقرة السابقة، حطمت الخلايا باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية (ULTRASONIC) بتسليط 24,000 ذبذبة/ثانيةلمدة15 ثانية متناوبة مع فترات توقف لتبريد الجهاز وللحفاظ على درجة حرارة 4°م، كررت العملية عدة مرات لتحطيم الخلايا تحطيماً تاماً، بعدها وضع المحلول في أنابيب الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.

4– أخذت الرواشح وتم تبخير المذيبات بدرجة حرارة أقل من 40°م وأعيدت إذابة المستخلصات بالماء المقطر وتم ترسيب البروتينات (النواتج الحيوية) باستعمال تركيز 70% من كبريتات الأمونيوم[34].

5– ثم فصل الراسب عن الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 4°م،أخذ الراسب الحاوي على البروتينات وتمت إزالة ملح كبريتات الأمونيوم منها بعملية الديلزة Dialysis (الفرز الغشائي) باستخدام كيس الديلزة[35].

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

6 – تم تجفيف البروتين (النواتج الحيوية) باستخدام جهاز التجفيف (Discater) خالي من الهواء وتحت ضغط مخلخل. وتم وزنها بميزان حساس نوع **Sartorius** لمعرفة تأثير نوع المذيب على كمية النواتج الحيوية وأخذ معدل القراءات للمكررات الخمسة ولكل نوع على حدة، ثم حفظت النواتج الحيوية في الثلاجة لحين استخدامها بجهاز **(HPLC-MS)** لمعرفة الأوزان الجزيئية للسموم الموجودة فيها.

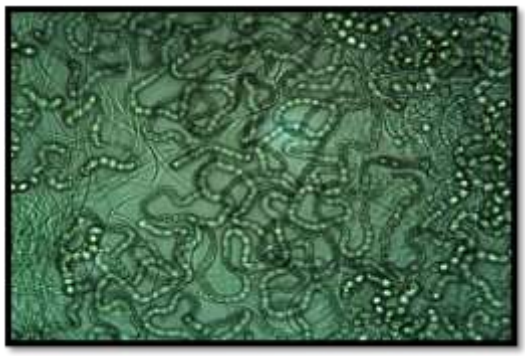
7 – تم تشخيص السموم في النواتج الحيوية باستخدام تقنية مطيافية الكتلة (HPLC-MS)هي عبارة عن تقنية تتداخل فيها تقنية كروماتوكرافيا السائل LC مع تقنية مطيافية الكتلة Mass Spectrometry وهي مشابهة لتقنية كروماتوكرافيا الغاز مع مطيافية الكتلة G C – Mass Spectrometry، [36].

النتائج والمناقشة

تم تشخيص نوعين من السيانوبكتريا لغرض دراسة تأثير المذيبات العضوية على كمية النواتج الحيوية المستخلصة منهما وتشخيص المركبات السامة فيهما، وهذين النوعين هما:

1 – ***Anabaena sp.* Tu 65** 2 – ***Nostoc sp.* Tu 69**

وتم تشخيصهما بواسطة مجهر ضوئي ذي كاميرا فوتوغرافية بقوتي تكبير (400x) و(1000x)، وقد تم التشخيص اعتماداً على [3]; [37].

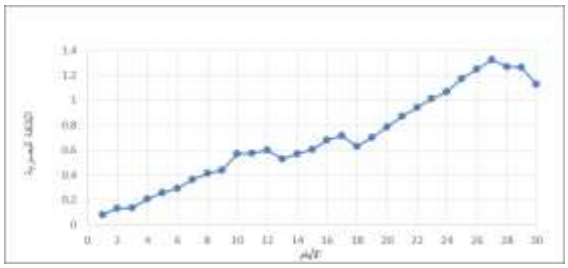


صورة رقم (1) للسيانوبكتريا *Anabaena sp.* Tu 65 بقوة تكبير 40x

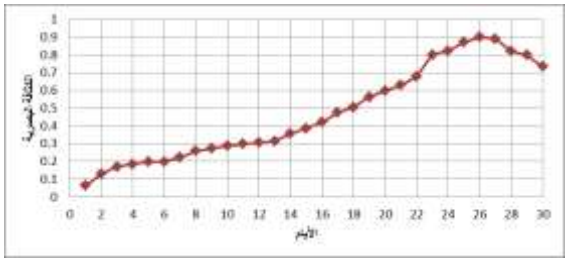
صورة رقم (2) للسيانوبكتريا Nostoc sp. Tu 69 بقوة تكبير 40x

وبالنسبة للنمو اليومي فيتضح من خلال النتائج للنوعين المختارين من السيانوبكتريا ***Anabaena sp.* Tu 65** و**Nostoc sp. Tu 69** في الأشكال (1) و(2) و(3) أن النمو اليومي كان في أفضل حالاته حيث نلاحظ النمو اليومي التصاعدي المتدرج، وقد أظهرت النتائج أيضا عدم وجود اختلاف ملموس بالنمو اليومي بين النوعين المذكورين وهذا ربما يعكس تكيف الكائن وتفضيله للظروف التي نمى فيها من حرارة و pH وشدة إضاءة وعناصر غذائية كبرى وصغرى موجودة ضمن الوسط الغذائي، وهو ما أكده الباحثان [10]، حيث أكدا على أن أنواع السيانوبكتريا المختلفة تختلف في استجابتها لدرجات الحرارة، فيمكن أن توجد السيانوبكتريا نامية على صخور القارة القطبية الجنوبية وفي الينابيع البركانية الساخنة ومع ذلك توجد استثناءات، فمعظم السيانوبكتريا المشكلة لازدهارات مؤذية في المياه العذبة أو المالحة تكون غالبا من خمسة أنواع: ***Anabaena***، ***Aphanizomenon***، ***Microcystis***، ***Noddaria*** و ***Oscillatoria***. إن سعة التركيب الضوئي والمعدل النوعي للتنفس ونسبة النمو لأنواع المياه العذبة الخمسة تكون في أمثل قيمها عند درجة حرارة 25 درجة مئوية أو أكثر، كما يؤثر الأس الهيدروجيني على نمو السيانوبكتريا وتثبيتها للنتروجين الجوي [38]، وقد ذكر [39] بأن السيانوبكتريا تعد مصدراً مهماً للنتروجين في البايوسفير، خصوصاً في الترب المتعادلة إلى قليلة القلوية. كما أشار [40] إلى أن السيانوبكتريا تنتشر في الترب القليلة القلوية، وأن الـpH الملائم بين 7.5–8.5 فضلاً عن أنها تستطيع استعمال الـ CO_2 الحر وأيونات البيكربونات كمصدر للكربون اللاعضوي لأجل التركيب الضوئي.. في حين أثبت [41] أن الأس الهيدروجيني pH الأمثل لفعالية إنزيم النتروجينيز وكفاءته في عملية تثبيت النتروجين الجوي من قبل السيانوبكتريا كان 7.8.وتتفق نتائج الاختبارات على النوعين المختارين من السيانوبكتريا مع ما أشار إليه [9]من أن السيانوبكتريا أكثر شيوعاً في المياه السطحية المتعادلة إلى القلوية، ، وهذا ربما يعود إلى طبيعة هذه الأنواع التي تفضل العيش في وسط متعادل أو قلوي قليلاً كمعظم الأنواع الأخرى، فضلاً عن أن أنواع السيانوبكتريا تتأثر بطريقة أو بأخرى بالبيئة التي تعيش فيها.إن السيانوبكتريا هي Photoautotrophs، بما يعني أنها تعتمد على الضوء خلال نموّها لأجل التركيب الضوئي وبالتالي التغذية [42].ومن ملاحظة النتائج للنوعين المختارين من السيانوبكتريا يتبين أن الإضاءة المناسبة للنمو لهذين النوعين هي 2500 lux حيث تحقق أفضل نمو في شدة الإضاءة هذه، وهذا يتفق مع ما أشار إليه[43]. وكما في أنواع الـPhytoplankton فإن للسيانوبكتريا متطلبات ضوئية على الرغم من أن المستوى الذي يكون عنده التركيب الضوئي محدداً بالضوء للسيانوبكتريا يكون أقل مما هو لغيرها من الطحالب الأخرى كما أكد ذلك [42]، وذلك لامتلاكها صبغات ضوئية إضافية مثل Phycocyanin و Phycoerythrin.كما نلاحظ تذبذبات بسيطة بالنمو اليومي للنوعين المذكورين وربما يعود السبب لانقطاع التيار الكهربائي مما يؤثر على تغيير درجة الحرارة وشدة الإضاءة وهذه الحالة حصلت فعلا أثناء التنمية، كما نلاحظ أن معدل النمو بدأ يتراجع في الأيام الأخيرة وربما يعود ذلك إلى نفاذ العناصر الغذائية في الوسط.

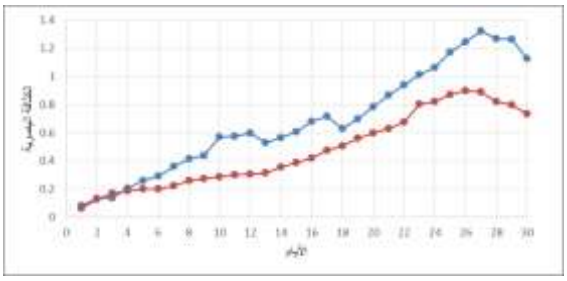
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)



شكل رقم (1) يبين النمو اليومي للسيانوبكتريا *Anabaena sp.* Tu 65

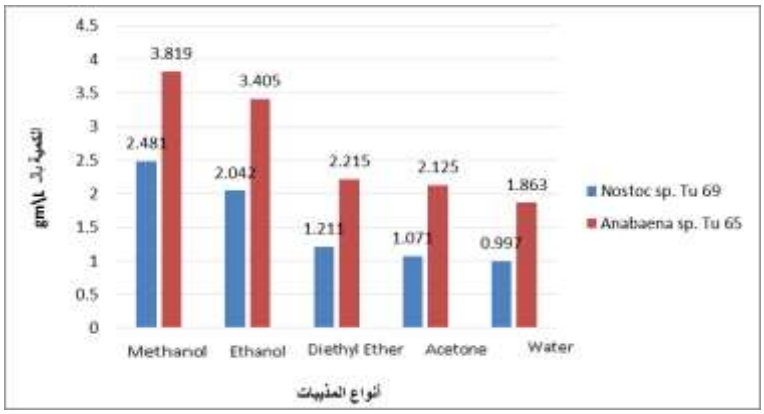


شكل رقم (2) يبين النمو اليومي للسيانوبكتريا Nostoc sp. Tu 69



شكل رقم (3) يبين مقارنة للنمو اليومي بين نوعي السيانوبكتريا *Anabaena sp.* Tu 65 و Nostoc sp. Tu 69

من ملاحظة الشكل رقم (4) أعلاه نلاحظ أن الميثانول كان أفضل المذيبات سواءا بالنسبة لنوع السيانوبكتريا **Anabaena Sp.Tu 65** أو لنوع السيانوبكتريا **Nostoc Sp. Tu 69** بالنسبة لاستخلاص النواتج الحيوية ولهذا يفضل استخدامه [44]،يأتي بعده الايثانول الذي يشكل نسبة استخلاص 89.15% و 82.3%من نسبة استخلاص الميثانول للنواتج الحيوية من **Anabaena Sp.Tu 65** و **Nostoc Sp. Tu 69**على التوالي، و يأتي بعدهما ثنائي أثيل ايثر الذي يشكل نسبة استخلاص 57.99% و 48.81%من نسبة استخلاص الميثانول للنواتج الحيوية من **Anabaena Sp.Tu 65** و **Nostoc Sp. Tu 69** على التوالي، ثم الأسيتون الذي يشكل نسبة استخلاص 55.64% و 43.16%من نسبة استخلاص الميثانول للنواتج الحيوية من **Anabaena Sp.Tu 65** و **Nostoc Sp. Tu 69**على التوالي متقاربا في نسبة استخلاص النواتج الحيوية لنوعي السيانوبكتريا المختارين مع ثنائي أثيل ايثر.



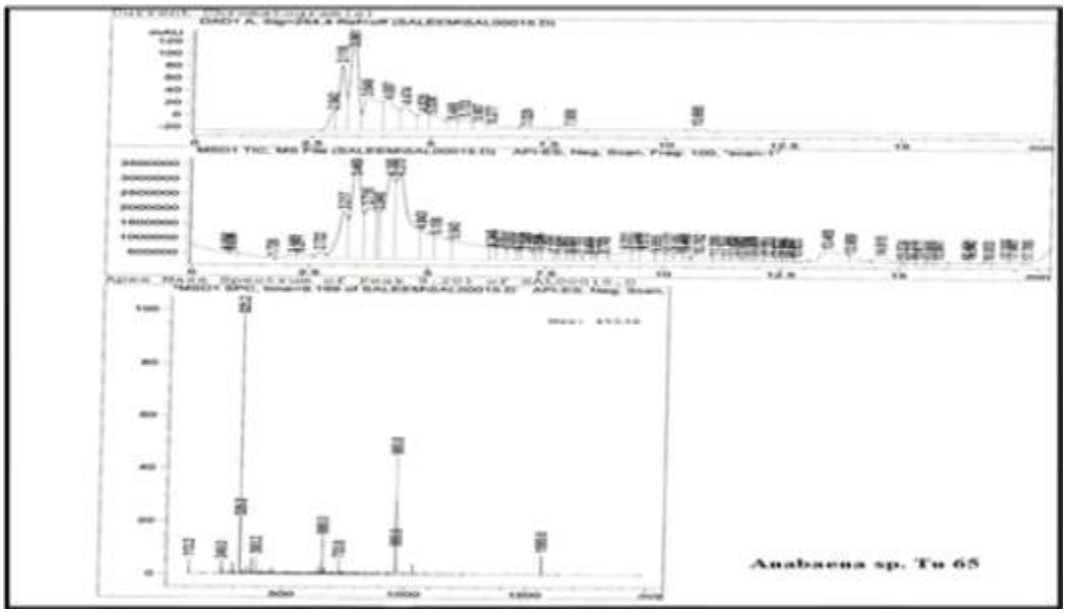
شكلرقم (4) يبين كميات النواتج الحيوية المستخلصة من نوعي السيانوبكتريا **Anabaena Sp.Tu 65** و **Nostoc Sp. Tu 69**

وأخيرا يأتي الماء بالمرتبة الأخيرة في نسب استخلاص النواتج الحيوية والذي يشكل نسبة استخلاص 48.78% و 40.18%من نسبة استخلاص الميثانول للنواتج الحيوية من **Anabaena Sp.Tu 65** و**Nostoc Sp. Tu 69**على التوالي ولهذا لا يستخدم الماء في الاستخلاص إلا في حالة استخلاص الإنزيمات والهورمونات لأن المذيبات العضوية تسبب تلفهما، وربما يعود سبب هذا الاختلاف بين كميات المواد المستخلصة بواسطة هذه المذيبات إلى اختلاف الأوزان الجزيئية ودرجات الذوبان والغليان والكثافة لهذه المذيبات كما في الجدول رقم (1)، فضلا عن كون الميثانول و الايثانول والماء مذيبات عالية القطبية فيما الأسيتون متوسط القطبية بينما ثنائي أثيل ايثر مذيب غير قطبي[45].

جدول رقم (1) يبين بعض مواصفات المذيبات المستخدمة

ت	نوع المذيب	الوزن الجزيئي	درجة الذوبان	درجة الغليان	الكثافة
1	**Methanol**	**32.04 g/mole**	**-97.8°C (-144°F)**	**64.5°C (148.1°F)**	**0.791gm/ml**
2	**Ethanol**	**46.07 g/mole**	**-114.1°C (-173.4°F)**	**78.5°C (173.3°F)**	**0.789gm/ml**
3	**Diethyl ether**	**74.12g/mole**	**-116.3°C (-177.3°F)**	**34.6°C (94.3°F)**	**0.713gm/ml**
4	**Acetone**	**58.08 g/mole**	**-95.35 (-139.6°F)**	**56.2°C (133.2°F)**	**0.786gm/ml**
5	**Water**	**18.02 g/mole**	**Not available**	**100°C (212°F)**	**1.000gm/ml**

تشخيص السموم في النواتج الحيوية باستخدام تقنية الHPLC_MS: تم تشخيص السموم في الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع ***Anabaena sp. Tu* 65** بواسطة جهاز High-pressure liquid chromatography-mass spectrometry وكانت النتائج كما موضحة في الشكل رقم (5).

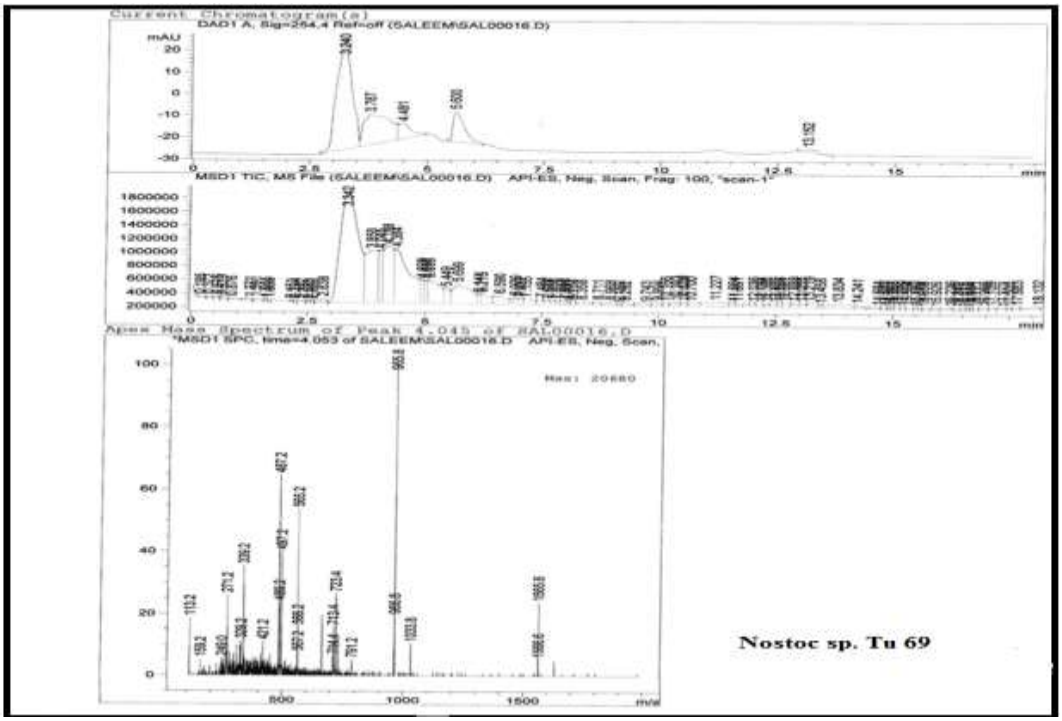


شكل رقم (5) يبين نتائج التحليل بجهاز HPLC وطيف الكتلة MS للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena sp. Tu* 65

حيث يتبين من خلال الشكل أن معظم القراءات ظهرت في الأوزان الجزيئية التي كانت قيمتها أقل من 1000 دالتون وهذا المدى يشمل معظم السموم القلوية مثل Anatoxin a, Anatoxin a(s), Homotoxin Saxitoxins وغيرها من السموم العصبية [46]، ويمكن ملاحظة السم العصبي Anatoxin a(s) الذي وزنه الجزيئي 252 عند الوزن الجزيئي 249 في قراءات الطيف.كما يتبين من خلال الشكل أن أحد نواتج تفكك الناتج الحيوي المستخلص بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 9.201 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS قد أظهر وجود المركب **ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid)** وهذا المركب وزنه الجزيئي 391 كما هو ظاهر في الطيف الكتلي في الشكل المذكور عند القراءة 393.2 ؛ وهو أحد الأجزاء الرئيسية لكافة أنواع الـMicrocystins[46] ، والتي تعد من السموم الكبدية المهمة التي تنتجها السيانوبكتريا، والذي تؤكد البحوث والدراسات وجود أكثر من 40 شكل سام منها [47].

كما أظهرت قراءات الطيف وعند الوزن الجزيئي 965.8 وجود السم الكبدي **[D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR** ذي الوزن الجزيئي 966 وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا نوع ***Anabaena* Sp.** [48].

يبين الشكل رقم (6) أن أحد السموم الناتجة من تفكك الناتج الحيوي المستخلص من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc sp. Tu* 69** بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 4.045 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS قد أظهر وجود المركب **MCYST-YM(O)** ذي الوزن الجزيئي 1035 وهو أحد أنواع السموم الكبدية من نوع Microcystin وذلك عند الوزن الجزيئي 1033.8 في قراءات الطيف، كما أظهرت قراءات الطيف وعند الوزن الجزيئي 965.8 وجود السم الكبدي **[D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR** ذي الوزن الجزيئي 966 وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا[47].



شكل رقم (6) يبين نتائج التحليل بجهاز HPLC وطيف الكتلة MS للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Nostoc sp. Tu* 69

ومن خلال الشكل رقم (6) الذي يظهرالسموم الظاهرة في نواتج تفكك الناتج الحيوي المستخلص من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc sp. Tu*** **69**بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 4.045 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS، يتبين أن معظم القراءات ظهرت في الأوزان الجزيئية التي كانت قيمتها أقل من 1000 دالتون وهذا المدى يشمل معظم السموم القلوية مثل Anatoxin a , Anatoxin a(s), HomotoxinSaxitoxins وغيرها من السموم العصبية [46]، ويمكن ملاحظة السم العصبي Anatoxin a(s) الذي وزنه الجزيئي 252 عند الوزن الجزيئي 249 في قراءات الطيف كما يتوقع وجود Anatoxin a الذي وزنه الجزيئي 165عند الوزن الجزيئي 159.2 في قراءات الطيف.

المصادر

1- Whitton, B.A.& Potts, M., **(2002)**. The Ecology of Cyanobacteria: their diversity in Time and Space. Kluwer Academic Press, Norwell, MA.

2- Houmard, J. (1994). Gene transcription in filamentous cyanobacteria. Microbiology, Vol. 140: 433-441.

3- Desikachary, T.V., **(1959)**. "Cyanophyta" Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.

4- Stafleu, F. A.; Bonner, C. E.; McVaugh, R.; Meikle, R. D.; Rollins, R. C.; Ross, R.; Voss, E. G. **(1972).** International Code of Botanical Nomenclature. A. Oosthoek, Utrecht, The Netherlands.

5- Lee, R. E. (2008). Phycology, Fourth edition. Cambridge University Press, New York .p 24 33.

6- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, Schleifer**,** K., Stackebrandt, E.**, (2006**). The Prokaryotes**.** Third Edition. Springer Science + Business Media, LLC 4:1053-1073.

7- Harlin, M.M.& Darley, W.M., (**1988)**. The algae: an overview. In: Algae and human affairs. (eds. C.A.Lembi&J.R.Waaland). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 3-27.

8- Prescott, G.W., **(1968)**. The algae: a review. Houghton Mifflin Co., Boston.

9- Moss, B., **(1973)**. The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae:An experimental study. 2. The role of pH and the carbon dioxidebicarbonate system. *J. Ecol.* 61,157-177.

10- Robarts, R.D.&Zohary, T., **(1987)**. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N.Z. J. Marine Freshwat. Res.* 21,391-399.

11- Klemer, A.R., Feuillade, J. & Feuillade, M., **(1982)**. Cyanobacterial blooms: carbon and nitrogen limitation have opposite effects on the buoyancy of Oscillatoria. *Science* 215,1629-1631.

12- Paerl, H.W., Bland, P.T., Bowles, N.D.&Haibach, M.E., **(1985)**. Adaptation to high-intensity, low wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium ***Microcystisaeruginosa***. *Appl. Environ. Microbiol.* 49,1046-1052.

13- Reuter, J.G.& Petersen, R.R., **(1987)**. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *N.Z. J. Marine Freshwat. Res.* 21,435-445.

14- Nasev, S., Nasev, D.&Pankow, H., **(1977)**. A statistical evaluation of phytoplankton and nutrient values in the waters of the shallow inlets of Darss and Zingst (Southern Baltic Sea) using nonparametric rank correlation coefficients according to Spearman. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 62(3).337-344.

15- Lukac, M.&Aegerter, R., **(1993)**. Influence of trace metals on growth and toxin production of Microcystisaeruginosa. *Toxicon* 3(93),293-305.

16- Bloor, S.& England, R. R., **(1991)**. Antibiotic production by the cyanobacterium ***Nostocmuscorum***. *J. Appl. Phycol. Vol.* 1:367-372.

17-الصالحي، سهام شكور عبيد. **(1999)**. تأثير بعض المستخلصات المعزولة من السيانوبكتريا على بعض أنواع البكتريا والفطريات. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات – جامعة تكريت – العراق.

18- Carmichael, W.W., **(1992b)**. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72,445-459.

19- Carmichael, W.W., **(1992a)**. A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.

20- Schwimmer, M. & Schwimmer, D., **(1968)**. Medical aspects of phycology. In: Algae, man and the environment. (ed. D.F. Jackson). Syracuse University Press, New York. pp. 279-358.

21- Patterson, G.M.L., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Karuso, H., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D.& Tuang, G.D., **(1991)**. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (***Cyanophyta***). *J. Phytol.* 27, 530-536.

22- Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K.&Stavric, B., **(1977)**. Anatoxin - a, a toxic alkaloid from Anabaena flos-aquae NRC-44h. *Can. j. Chem.* 55,1367-1371.

23- Mahmood, N.A.& Carmichael, W.W., **(1986a)**. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium ***Aphanizomenonflos-aquae*** NH-5. *Toxicon* 24(2),175-186.

24- Carmichael, W.W., Yu, M-J., He, Z-R., He, J-W.& Yu, J-I., **(1988a)**. Occurrence of the toxic cyanobacterium (blue-green alga) Microcystisaeruginosa in Central China. *Arch. Hydrobiol.* 114(1),21-30.

25- Honkanen, R.E., Dukelow, M., Zwiller, J., Moore, R., Khatra, B.S.,& Boynton, A.L., **(1991a)**. Cyanobacterialnodularin is a potent inhibitor of type 1and type 2A protein phosphatases. *Am.. Soc. Pharm. Exper. Therapeut.* 40,577-583.

26- Honkanen, R.E., Zwiller, J., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M. & Boynton, A.L., **(1991b)**. Identification, purification, and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 266(10),6614-6619.

27- Rinehart, K.L., Harada, K-I., Namikoshi, C.C.& Harris, C.A., **(1988)**. Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. *J. Am. Chem. Soc.* 110,8557-8558.

28- Ohtani, I., Moore, R.E.&Runnegar, M.T.C., **(1992)**. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga ***Cylindrospermopsisraciborskii***. *J. Am. Chem. SOC.* 114,7941-7942.

29- Kondo, F, Ikai, Y., Oka, H., Ishikawa, N., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Harada, K-I. & Suziki, M., **(1992).** Separation and identification of microcystinsincyanobacteriaby frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxic011***30(3), 227-237.**

30- Gallon, J.R., Larue, T.A.&Krutz, W.G., **(1978)**. Photosynthesis and nitrogenase activity in the blue-green algae Gloeocapsa. *Can. J.* 20:1633-1637.

31- **وهيب**، علي مؤيد سلطان. **(2009)**. تأثير الأطوال الموجية للضوء المرئي في بعض الفعاليات الفسلجيةللسيانوبكتريا المثبتة للنتروجين الجوي. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات– جامعة تكريت– العراق.

32- Gibson, C. E. & Fay, R. H.**, (1983).** The photosynthesis and growth efficiency of a planktonic Blue Green Algae***oscillatoriaredeke***. Br. Phycol. J. 18: n 39-45.

33- Falch, B. S., Konig, G.M., Wright, A.D., Sticher, O., Angerhofer, C. K., Pezzuto, J.M.& Bachmann, H., **(1995).** Biological activities of cyanobacteria: evalution of extracts and pure compounds. *Plant Medica* 61:321-328.

34- Scopes, R.K**. (1984)**. Protein purification Principles and practice. Springer-verlag. New York Heidelberg Berlin. Second printing. PP: 2-195.

35- **الجوراني**، خضر حسن علي. **(1989)**. أساسيات في علم الحياة الجزيئية. الجزء الأول – العملي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. الجامعة المستنصرية. بغداد. العراق.

36- David, G, Watson,. **(2005)**. Pharmaceutical Analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Second Edition. Univercity of Strathclyde, Glasgow, UK.

37- Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.; Hardman, M. and Stanier, R. (**1979**). "Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria" . J. Can. Microbiol. Vol.111: 1-61.

38- **ياسين، ساهرة خالد**. **(2011)**.تأثير عدد من العوامل البيئية على بعض الفعاليات الحيوية في السيانوبكتريا المثبتة للنيتروجين الجوي و تأثير مستخلصاتها على بعض الفعاليات الفسلجية في ذكور الفئران. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات – جامعة تكريت– العراق.

39- Roger, P. A., **(1989)**. Cyanobacteria et riziculture; Bull. Soc. Bot. Fr. 136. *Actual. Bot.* 1:67-81.

40- Talling, J.F., **(1976)**. The depletion of carbon dioxide from lake water by phytoplankton. *J. Ecol.* 64,79-121.

41- **البلـداوي**، سـلمان برهـان عبـد الحسـين. **(1997)**. دراسـة عـن السيانوبكتريا وتأثيرها المتداخل مع الأسمدة المعدنية في نمو وحاصل نبات الرز (***Oryza sativa L.***) في التربة المغمورة موسمياً. رسالة دكتوراه. كلية الزراعة – جامعة بغداد – العراق.

42- Reynolds, C.S.& Walsby, A.E., **(1975)**. Water-blooms. *Biol. Rev.* 50,437-481.

43- Tilzer, M.M., **(1987)**. Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. *N.Z. J. Marine Freshwat. Res.* 21,401-412.

44- **يحيى**، عبد الغني إبراهيم، **(1989)**، تثبيت النتروجين في حقول الرز. الندوة الثالثة في بايولوجية تثبيت النتروجين، مركز بحوث علوم الحياة/ مجلس البحث العلمي. بغداد. العراق.

45- Hansen, Charles M. (**2007**). Hansen solubility parameters: a user's handbook CRC Press, ISBN 0-8493-7248-8

46- Chorus, I. & Bartram, J. (**1999**). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London and New York. First published 1999 by E & FN Spon, an imprint of Routledge11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE© 1999 WHO Printed and bound in Great Britain by St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk.

47- Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Sun, F., Rouhiainen, L., Luukkainen, R.& K.L. Rinehart, **(1992a)**. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus ***Anabaena.*** *App. Env.Microbiol.*58, 2495-2500.

48- *Harada,* *K.I., Ogawa, K., Matsuura, K., Nagai, H., Murata, H., Suzuki, M., Itezono, Y., Nakayma, N., Shirai, M. and Nakano, M. (**1991b**). Isolation of two* toxic heptapeptidemicrocystins from an axenic strain of Microcystisaeruginosa, K- 139. Toxicon, 29, 479-489.

Astudy of organic solvents to obtain bio-products from two genus of cyanobacteria, Anabaena sp. 65, Nostoc sp. 69 and identification of toxins in these bio-products by Hplc/Ms technique

Aeman Awni Saleem
Pharmacy Collage , Tikrit University , Tikrit , Iraq

Abstract

This study was conducted to determine the effect of the types of organic solvents (Ethanol, Methanol, Diethyl ether, Acetone and water) on the amount of bio-products derived from two genus of cyanobacteria (Anabaena sp. Tu 65 and Nostoc sp. Tu 69) who were isolated and growth on selective media ASM-1 under temperature at (26) °C and pH (7.6) under continuous lighting intensity (2500) Lux for 30 days. The growth were measured by optical density by spectrophotometer at wave length 436 nm. The daily growth of the genus Anabaena sp. Tu 65 showed higher than that of the genus Nostoc sp. Tu 69.Extractionby organic solvents shown that the Methanol is the best solvent for extraction of bio-products from the two genus followed by Ethanol, Diethyl ether, Acetone and water respectively.

Identification the toxic compounds in the bio-products by HPLC_MS technique shown that the bio-products from the genus Anabaena sp. Tu 65, the presence of neurotoxin (anatoxin a (s)) as well as the presence of the compound ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid), one of the key parts for all types of Microcystins which considered as important of liver toxins produced by cyanobacteria, which, as the spectrum readings showed the presence of hepatic toxin [D-Asp3, Dha7] MCYST-LR is one of the types of Microcystins.

While the bio-products from the genus Nostoc sp. Tu 69 shown the presence of the compound (MCYST-YM (O)) which also one of the types of liver toxin Microcystin, as well as the presence of another hepatic toxin [D-Asp3, Dha7] MCYST-LR, whichis another type of Microcystins too, as well as the presence of neurotoxin Anatoxin a(s),also the probability of the presence of another neurotoxin Anatoxin, which appeared in the spectrum readings.