متوفر على الموقع http://www.basra-science-journal.org

ISSN -1817 -2695

الاستلام 11-5-٢٠١٧ ، القبول 20-8-٢٠١٧

# عزل أربعة أنواع جديدة من الطحالب الخضر المزرقة وتشخيصها وتنقيتها واكثارها في مياه شط العرب في البصرة جنوبي العراق وبيان قدرتها على انتاج السم العصبي Anatoxin-a والسم الكبدي Microcystin

عماد يوسف عواد السلطان و مروة عبد الكريم عبيد

*كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة / قسم علوم الحياة*

Email: emad_yousif2000@yahoo.com

**الخلاصة Abstract**

تضمنت الدراسة الحالية عزل أربعة أنواع جديدة من الطحالب الخضر المزرقة وتشخيصها وتنقيتها واكثارها في مياه شط العرب في محافظة البصرة جنوبي العراق ويعد التسجيل الأول لتلك الأنواع في العراق والتي شملت *Lyngbya rubida* و *Pseudanabaena limnetica* و *Phormidium Laysanense* و *Stigonema informe* كما تم أختبار قدرة تلك الأنواع علىإنتاج نوعين من السموم بعد تنقيتها منها وتمثلت بالسم العصبي Anatoxin-a والسم الكبدي Microcystin لأول مرة في العراق والعالم أيضاً لتلك الأنواع تحديداً باستعمال طريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA)، إذ أظهر الطحلب *P. limnetica* أعلى إنتاجية للسم العصبي بلغت 1.179 مايكروغرام / لتر تلاه كل من الأنواع *P. laysanense* و *S. informe* و *L. rubida* وبتراكيز بلغت 0.705 و0.635 و0.598 مايكروغرم/لتر على الترتيب . أما فيما يخص انتاجها للسم الكبدي فقد أظهر الطحلب *Ph. Laysanense* الإنتاجية الأعلى للسم الكبدي وبتركيز بلغ 6.209 مايكروغرام/ لتر لكل ٥٠ مليغرام من الوزن الجاف للطحلب و تلاه الطحلب *P. limnetica* بتركيز بلغ 3.701 مايكروغرام/لتر في حين تقارب تركيز السم في كل من الطحلبين *L.rubida* و *S.informe* بتراكيز بلغت 1.753 و 1.309 مايكروغرام / لتر. كما تم تشخيص نوعي السموم المنقاة لبيان أهم المجاميع الفعالة في كلا المركبين باستعمال تقنية الأشعة تحت الحمراء Infra-Red Spectrum (FT-IR) وقياس طيف الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet Radiation (UV) إذ إمتلك السم العصبي المنقى من الطحلب *P. Limnetica* أعلى قمة إمتصاص بلغت ٢٢٦ نانوميتر في حين بلغت ٢٤٠ نانوميتر للسم الكبدي المنقى من الطحلب *Ph. laysanense* .

**الكلمات المفتاحية:** الطحالب الخضر المزرقة ، السم العصبي Anatoxin-a، السم الكبدي Microcystin ،عزل وتنقية وإكثار الطحالب الخضر المزرقة

## المقدمة

تعد الطحالب الخضر المزرقة مجموعة كبيرة ومتنوعة من الكائنات الحية بدائية النواة ذات الانتشار الواسع (Bullerjahn and Post,2014) . تنتج الطحالب الخضر المزرقة مدى واسعاً من الأيوض الثانوية التي تدخل في الكثير من الصناعات و المجالات الحيوية كالصيدلة و الإقتصاد و الطاقة ( Rastogi and Sinha,2009) فضلاً عن ذلك فإن الطحالب الخضر المزرقة تنتج أيوضاً ذات تأثيرات سمية تعرف بسموم الطحالب الخضر المزرقة Cyanotoxins إذ توصف طحالب هذا القسم بأنها كائنات سامة Toxic organismes (Harke *et al.*,2016) ووتتواجد في كل من البيئات المائية العذبة و المالحة و المويلحة و اليابسة, و أن لهذه المركبات تأثيراً ضاراً في كل من أحياء البيئة المائية و البرية والحيوانات الداجنة و الانسان إذ تتسبب سموم الطحالب الخضر المزرقة أضراراً بالغة لتركيبة النظام البيئي المائي ( Huisman *et al.*,2005). تنتج الطحالب الخضر المزرقة عدة انواع من السموم أشهرها السموم الكبدية Hepatotoxins و السموم العصبية Neurotoxins والسموم الخلوية Cytotoxins و السموم الجلدية Dermatotoxins والسموم التحسسية Irritant toxins(Wiegand and Pflugmacher,2005) و لهذه السموم خصائص كيميائية تميزها عن بعضها كالسموم العصبية التي تمتاز بطبيعتها القلويدية و السموم الكبدية ذات الطبيعة الببتيدية ( Sivonen and Jones,1999) , و أن الدور الحيوي لهذه السموم لازال محل جدل و لكن هذا لا يمنع من ظهور عدة فرضيات تفسر السبب الذي يستحث الطحلب لينتج هذه المركبات منها أنها تعد كوسيلة دفاعية ضد العواشب كالهائمات الحيوانية و الأسماك و كذلك وسيلة تنافسية ضد الأجناس الأخرى من الطحالب للظفر بالحيز والمورد أو تؤدي دوراً حيوياً للطحلب ذاته (Neilan *et al.*,2013; Rohrlack *et al.*,2013 ) وفي دراسات أخرى أظهرت أن الطحالب الخضر المزرقة تنتج المركبات ذوات التأثير السام في حالة تعرضها للإجهاد البيئي Ecological Stress (Bláha *et al.*, 2009) . تنتج الطحالب الخضر المزرقة مركبات سامة ذات فعالية حيوية عصبية (Carmichael *et al.*,1979) وقد شخص النوع الأول من هذه السموم وهو السم العصبي Anatoxin-a عام 1960 م و أطلق عليه عامل الموت السريع لقدرته على إحداث الموت في زمن قصير بالفئران المختبرية بعد عزله أول مرة من الطحلب الاخضر المزرق *Anabaena flos-aquae* (Devlin *et al.*,1977) و يعد العالم Campbell *et al.*,1977 أول من شخص التركيب الكيميائي للسم العصبي Anatoxin-a بأستعمال جهاز قياس الأشعة تحت الحمراء Infra-Red Radiation .إن السم العصبي Anatoxin-a مركب حلقي قلويدي وزنه الجزيئي 156دالتون (Duy *et al.*,2000) . ويستهدف هذا السم الجهاز العصبي المحيطي و المركزي في اللبائن (Huber,1972)،إذ وجد أنه يؤدي نفس عمل الناقل العصبي Acetylcholine وله القدرة على الارتباط بمستقبلاته Nicotinic Receptors.عند ارتباط السم العصبي Anatoxin-a بمستقبلات الأستيل كولين فتفتح قنوات الصوديوم و البوتاسيوم لغشاء الخلايا العصبية مما يسبب زوال قطبية الغشاء و تولد سيالات عصبية في منطقة الارتباط العصبي العضلي Neuromuscular Junction وهذا الارتباط يسبب عجزا في امكانية عودة الاستقطاب Repolarization

للخليـــة العصبيـــة لعـــدم قـــدرة أنـــزيم Acetylcholinesterase المحلل للناقل العصبي الأستيل كولين على تحليل السم العصبي Anatoxin-a. مما يؤدي الى توليد تحفيز مستمرHyperpolarization يتسبب في حدوث عجز بعد فترة قصيرة و شلل في العضلة (Carmichael,1994) . و في دراسة Yavasoglu *et al.*,(2008) أظهرت تأثيرات أخرى للسم العصبي على خصى و نطف الفئران أذ وجد أن حقن الفئران بتراكيز مختلفة من السم العصبي (150, 100, 50) مايكروغرام / كيلوغرام / اليوم فأنه ادى الى تغيرات فسلجية في خصى فئران التجربة مقارنة مع مجموعة السيطرة اشتملت التغيرات على حدوث اضمحلال في الانابيب المنوية Seminiferous tubules والخلايا الجرثومية وانتزاعها في تجويف جدار الانبوب و حدوث ظاهرة تكوين الفجوات Vacuolization في خلايا سرتولي.

أما فيما يخص النبات فقد أظهرت دراسة Simon *et al.*,(2004) على كل من النبات المائي الطافـــي *Lemna minor* و الطحلب ألأخضـــــر *Chladophora fracta* أن السم العصبي Anatoxin-a عند التراكيز 5-20 مايكروغرام /مليلتر عمل على تثبيط الأنزيم Glutathione S-transferase بالإضافة الى تسببه في انخفاض نسبة أنتاج الاوكسجين خلال عملية البناء الضوئي عند ذات التراكيز .أن ألأعراض للأصابات الحادة الناجمة عن التعرض للسم العصبي Anatoxin-a سجلت في الكائنات الفقرية وكانت تتضمن شلل في العضلات التنفسية و الهيكلية و اضطراب في التنفس قد يؤدي للعجـــز تنفســـي و الموت خـــلال وقـــت قصير .( Rogers *et al.*, 2005)

اما السموم الكبدية MCs فهي مركبات عالية الأستقرارية (Harada *et al.*,1996) و لقد شخص ما ينتج من الطحالب الخضر - المزرقة ما يقارب من 100نوع وهي عبارة عن مركبات ببتيدية أحادية الحلقة Monocyclic Heptapeptides ذات وزن جزيئي يتراوح من (800-1.100 دالتون). و يتكون السم الكبدي من سبعة أحماض أمينية (Puddick *et al*,.2015). ينتج السم الكبدي بوساطة العديد من أجناس الطحالب الخضرالمزرقة منها *Microcystins flos-aque* و *Hapalosiphon welwitschii* و *Calothrix parietinasp* و *Microcystins aeruginosa* و *Anabaena sp* و *Anabaenopsis sp* و *Nostoc muscurum* و *Phormidium sp* و Challis *et al.*,2000;Anne ) *et al.*,2003 ; AL-Sultan ,2007; AL-Sultan and AL-Ali ,2010; AL-Sultan *et al.*,2010 ,2011; Shishido *et al.*,2013;Piyathilaka *et al.*,2015) .

ينتقل السم الكبدي إلى الكبد عن طريق نظام النقل الخلويOrganic Anion Transport Proteins إذ يعمل هذا السم على تثبيط نشاط أنزيم إزالة الفسفرة Phosphatases(1 & 2A) (Dawson,1998), وأن تثبيط نشاط انزيم إزالة الفسفرة للبروتين يزيد من عملية الفسفرة Phosphorylation داخل الخلية مما يؤدي الى الأضرار بخيوط الهيكل الخلوي Cytoskeletal لخلايا الكبد فيتسبب في تحطم هيكل الخلية ومن ثم تغيير تركيبها مما يؤدي الى حدوث تغايرات كبيرة في تركيب النسيج الكبدي بضمنها حدوث انكماش الخلية الكبدية عن الخلية المجاورة لها و عن الجيوب Sinusoidal سيؤدي الى تمزق الشعيرات الدموية و تجمع الدم في تجاويف الكبد فيسبب الإضرار بالتركيب النسيجي للعضو ومن ثم تعطيل وظيفته الفسلجية وحدوث النزيف Haemorrhagic Shock(AL-Sultan,2017). إن حالات التسمم الحادة بالسم الكبدي قد تسبب الموت السريع لكل من الانسان والحيوان (Jochimsen *et al.*,1998) ، إذ يؤثر في

التركيب النسيجي و الوظائف الفسلجية لعدة أعضاء ومكونات حيوية في جسم الكائن الحي كالكبد و الكلى والقلب والأنزيمات والامعاء (Ji *et al.*,2011; Al-Sultan *et al.*, 2015). أما تأثيره في النبات فقد بينت دراسة Pflugmacher (2002) أن السم الكبدي Microcystin عمل على تثبيط نشاط أنزيم Glutathione S-transferase وتقليل معدل النمو وعملية البناء الضوئي و انخفاض معدل إنتاج الأوكسجين وإضراره في صبغات البناء الضوئي لكل من النباتات المائية *Ceratophyllum demersum* و *Myriophyllum spicatum* .

**الهدف من الدراسة:** تهدف الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص واكثار انواع جديدة من الطحالب الخضر المزرقة غير المدروسة سابقا في العراق في نهر شط العرب وبيان قدرتها على انتاج السموم الكبدية Microcystins والعصبية وخصوصاً النوع Anatoxin-a وتقدير تراكيزها كماً ونوعاً

## المواد وطرائق العمل :

**تحضير الوسط الزرعي السائل و تعقيمه** : استعمل في هذه الدراسة الوسط الزرعي Chu-10 (Chu,1942) المحور من قبل (AL.Mousawi,1984 ) عقم الوسط في جهاز المؤصدة الكهربائية Autoclave من نوع TLE-Danger 300 عند درجة حرارة 121م° و ضغط 15 باوند/أنج$^2$ لمدة 20 دقيقة. في حين حضر محلول فوسفات البوتاسيوم وعقم بشكل مستقل و تمت إضافته إلى الوسط بعد تعقيمه بحجم 1 مليلتر .

**تحضير الوسط الزرعي الصلب و تعقيمه:** حضر الوسط الزرعي الصلب Nutrient agar بإذابة 2غرام من مادة الأكار في 100 مليلتر من الوسط الزرعي السائل Chu-10 و عقم في جهاز الموصدة الكهربائية و أضيف اليه محلول فوسفات البوتاسيوم $K_2PO_4$ بعد التعقيم , صب بعدها الوسط قبل أن يتصلب في أطباق بترية معقمة سعة 9 سنتيمترات و ترك ليتصلب و حفظت الأطباق في الثلاجة بوضع مقلوب حتى وقت الاستعمال (Stein , 1075 ).

**جمع العينات المائية :**جمعت عينات المياه في شهر تشرين الثاني لعام 2015 من نهر شط العرب في محافظة البصرة جنوبي العراق تمثلت بالمنطقة القريبة والمقابلة للكورنيش ونهاية شط العرب في قضاء الفاو وقد استعملت طريقة الجمع المباشر باستعمال قناني بلاستيكية نظيفة ذات سعة 500 مليلتر وكذلك باستعمال شبكة جمع الهائمات النباتية بقطر فتحات ٢٠ مايكروميتر .

**عزل الطحالب وتنقيتها:** بعد أن جلبت العينات الى المختبر عملت شرائح زجاجية من كل عينة لتشخيص الأنواع الطحلبية المتواجدة فيها إذ فحصت باستعمال المجهر الضوئي Olympus CX21 و اعتمدت طريقة التخفيف The dilution method و طريقة التخطيط على الوسط الصلب Streak plate method في عزل الانواع الطحلبية قيد الدراسة كما اعتمدت طريقة Weidman *et al.*(1984) للحصول على العزلات النقية Axenic culture و أتبعت أيضا طريقة Stein (1975) في الزرع على الوسط الصلب Nutrient agar وفحصت

بعد 48 ساعة للتأكد من خلوها من البكتريا و لمدة أسبوع للتأكد من خلوها من الفطريات.

**تنمية الطحالب المعزولة و المنقاة وإكثارها:** نميت العزلات النقية للطحالب الخضر- المزرقة في دوارق زجاجية معقمة بأحجام مختلفة أذ ملئت بالوسط الزرعي Chu-10 ولقحت بالطحالب المنقاة و حضنت المزارع السائلة في الحاضنة الخاصة بالزرع , تحت ظروف الزرع التي تمثلت بدرجة حرارة تراوحت ٢٧- ٣٠ م° و شدة إضاءة تراوحت بين (150-130) مايكروأينشتاين /م$^{2}$/ثا .

**تصنيف الإنواع الطحلبية المعزولة والمنقاة:** صنفت الطحالب الخضر المزرقة المعزولة و المنقاة خلال الدراسة بالإعتماد على (Desikachary,1959; Abed *et al.*,2003a; Abed *et al.*, 2003b; Chrapy *et al.*, 2014; Gongliang *et al.*, 2015)

**الحصاد و تحضير الكتلة الحية :**حصدت المزارع السائلة للعزلات المنقاة بعد إكثارها وعند دخولها في طور السكون Stationary Phase بين مدة نمو تراوحت مابين السادس عشر و الرابع و العشرون باستعمال جهاز الطرد المركزي Centerfuge نوع Hermle لشركة Labnet الماني المنشأ و بسرعة 6000 دورة / دقيقة و لمدة 10دقائق و كذلك باستعمال جهاز الترشيح Vacuum Pressure.جمعت الكتلة الطحلبية الحية للطحالب المحصودة في أطباق بترية معقمة و حفظت في الثلاجة تحت درجة حرارة -4 م° , جفدت بعدها الكتلة الحية باستعمال جهاز التجفيـــد Freezing drier نوع LAB ConCO (18). و طحنت الكتلة المجفدة باستعمال الهاون الخزفي وحفظت في قناني نظيفة محكمة الغلق في مكان جاف إلى وقت أجراء طرائق استخلاص السموم الطحلبية منها (Stein,1975) .

**اســـتخلاص الســـم العصـــبي Anatoxin-a والسموم الكبدية Microcystins:** أتبعت طريقة Harada *et al.*,(1988,1989,1993) في استخلاص كل من السم العصبي Anatoxin-a و السموم الكبدية Microcystins من الأنواع الطحلبية المعزولة و المنقاة , إذ استخلص حوالي 50 مليغرام من الكتلة الحية المجفدة Lyophilized cells لكل نوع من الطحالب المعزولة خلال الدراسة باستعمال حامض الخليك Acetic Acid بتركيز 0.05 مولاري و بحجم 10 مليلتر.

**تنقية السم العصبي Anatoxin-a و السموم الكبدية Microcystins**

نقي السم العصبي و السموم الكبدية المستخلصة في الفقرة باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel Filtration Chromatography والموضحة تفاصيلها في Namikoshii *et al*,(1992;1993) بعد إجراء بعض التحوير فيها. عدل الرقم الهيدروجيني للمستخلص الى pH=10 باستعمال 7% من هيدروكسيد الامونيوم $NH_4OH$ , و حمل بعد ذلك المستخلص في عمود الفصل وغسل بالماء المقطر 10ml ثم بالماء المحمض ( ماء :الكحول المثيلي بنسبة 1:9) تم بعدها فصل السم الكبدي Microcystin بوساطة الكحول المثيلي بتركيز 90% و جمع في قناني نظيفة وحفظت عند درجة حرارة 18- م° . أما السم العصبي فقد غسلت العينة مرة أخرى بالماء المقطر 10 ml و الكحول المثيلي بتركيز 100% تباعا و حورت الطريقة باستعمال المركب Trichloroacetic Acid- methanol بتركيز TCA-MeOH 0.01% و بحجم 20 مليلتر بدلاً عن المركب Trifluoroacetic acid- methanol في تنقية

السم العصبي Anatoxin-a. جمع السم بعدها في قناني زجاجية مانعة للضوء و محكمة الغلق و حفظت في الثلاجة تحت درجة حرارة 18- م ° .

## الكشوفات النوعية والكمية للسم العصبي Anatoxin-a و السموم الكبدية Microcystins

١- **طيف الأشعة تحت الحمراء Infra-Red Spectrum (IR) :** قيس طيف الأشعة تحت الحمراء لكل من السم العصبي Anatoxin-a والسموم الكبدية Microcystin باستعمال جهاز Fourier Transform Infra-Red Spectrophotometer. سجلت أطياف الأشعة تحت الحمراء في المنطقة المحصورة مابين (600-3600) سنتمتر$^{-1}$ .

٢- **طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV) :**قيست قمم الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية للسم العصبي Anatoxin-a والسموم الكبدية Microcystins المستخلصة والمنقاة من الطحالب بوساطة جهاز Spectrometer T80+ UV/VIS وعند الطول الموجي (200-400) نانومتر .

## التشخيص الكمي و النوعي للسم العصبي Anatoxin-a و للسموم الكبدية Microcystin

شخص السم العصبي Anatoxin-a والسم الكبدي Microcystin كمياً و نوعياً باستعمال تقنية الإمتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم و قد اعتمدت عدة المحاليل الجاهز ELSA- Kits المصنعة من شركة Abraxis و أستعمل لغرض القياس الجهاز Reader ELISA نوع Biotek بالإعتماد على طريقتي (Bumke-Vogt *et al.*,1998; Fischer *et al.*, 2001).

**النتائج :**

**أنواع الطحالب الخضرالمزرقة المعزولة و المنقاة:** تم عزل أربعة أنواع سامة تابعة لأربعة أجناس من الطحالب الخضر- المزرقة وتنقيتها و تشخيصها و أكثارها وعدت كتسجيل أول في العراق تمثلت بالطحالب *Lyngbya rubida* و *Pseudanabaena limnetica* و *Phormidium Laysanense* و *Stigonema informe*. بعد ان قورنت بالانواع المسجلة في العراق (Maulood *et al.*, 2013 ).

## وصف الأنواع الطحلبية المعزولة و المنقاة

***Lyngbya rubida* Frémy: طحلب** خيطي أخضر مزرق ، خيوط الطحلب ممتدة طويلة متشابكة ذات نهاية متضيقة مستديرة,. يتكون الخيط من خلايا مستطيلة الشكل أبعادها (5-8) مايكرون طولاً و (3.5-4) مايكرون عرضاً. تفصل بين الخلايا الخضرية للخيط فراغات يظهرخلالها الغشاء المخاطي الشفاف Hyaline (Desikachary,1959) **شكل (1).**

***Pseudanabaena limnetica* (Lemmermann) Komárek: طحلب** خيطي أخضر مزرق. خيوطه منفردة ليست طويلة نسبياً حوالي (10-30) خلية في الخيط الطحلبي الواحد, تكون الخيوط ممتدة أو منحنية قليلاً ,خلاياها واضحة الحدود مستطيلة الشكل ذات أبعاد 2.5 مايكرون عرضاً و 3.5 مايكرون طولاً , تظهر المزرعة بلون أخضر مزرق مضيء أو شفاف Bright Blue Green (Gong liang *et al.*, 2015) ومن خلال الفحص و المتابعة المجهرية لوحظ أن بعض الخيوط تشكل في مرحلة متقدمة من النمو أشكالاً دائرية

والطحلب ذو حركة تزحلقية أو إهتزازية Trembling movement نشطة إذ تتحرك الخيوط الممتدة باتجاه أمامي أو جانبي في حين تتحرك الأشكال الدائرية بحركة دورانية حول نفسها **شكل(2).**

**:*Phormidium laysanense* Lemmermann**

طحلب أخضر مزرق خيطي دقيق أو رفيع Filamentous cyanobacterium delicate و يظهر بهيأة حصيرة Mat Forming ملتصقة في قاع المزرعة السائلة. الطحلب ملون إذ تظهر المزرعة بلون ذهبي براق أو بني مضيء . خلايا الخيوط تكون مستطيلة أو متطاولة ،طولها أكبر من عرضها ذات أبعاد 4 مايكرون عرضاً و 6 مايكـــرون طـــولاً, يمـــتد الغـلاف المخاطي Mucilagenaous sheath لمسافة من نهاية الخيط والخلية الطرفية له مدورة النهاية و قد تظهر في بعض الاحيان الى حد ما مخروطية النهاية بما يشبه Conical calyptra . يعد هذا النوع تسجيل الأول في العـــراق **الشكل (3).**

***Stigonema informe* Bornet and Flahault**

طحلب خيطي أخضر مزرق متفرع تفرعاً حقيقياً ذو طول (1mm) وهو طحلب ملتصق ذو لون بني . يتكون الفرع الرئيس للطحلب من خمسة صفوف من الخلايا فـــي حين الفروع الثانوية تتكون من ثلاثة صفوف . يتكون الخيط من خلايا بأبعاد 14 مايكرون عرضاً و 10 مايكرون طولاً (Desikachary,1959) . ويعد التسجيل الأول للنوع في العراق **شكل (4)** وتخضع الأنواع المعزولة للتصنيف الآتي:

**Division: Cyanophyta**

**Class : Cyanophyceae**

**Order (1): Oscillatoriales**

**A-Family (1): Oscillatoriaceae**

**1- Genus: *Lyngbya rubida* Frémy**

**2-Genus : *Phormidium laysanense* Lemmermann**

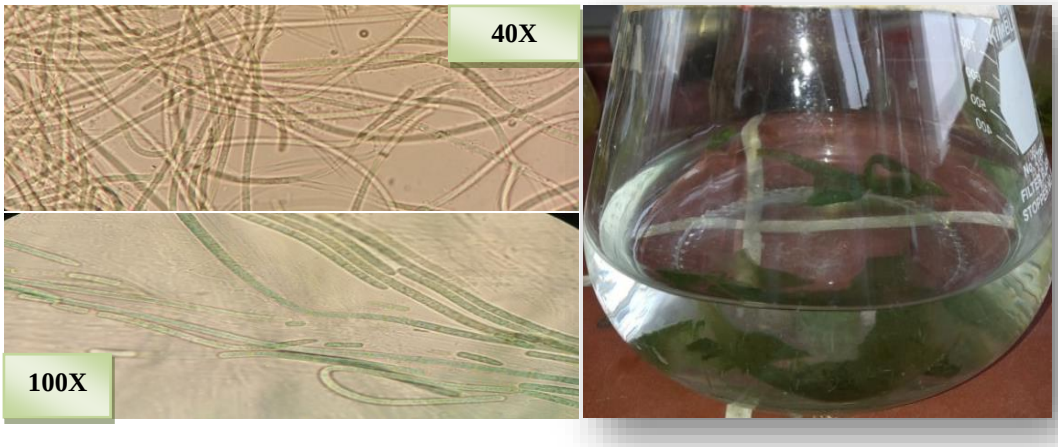
**B- Family (2) : Pseudoanabaenaceae**

**Genus : *Pseudoanabaena limnetica* (Lemmermann)**

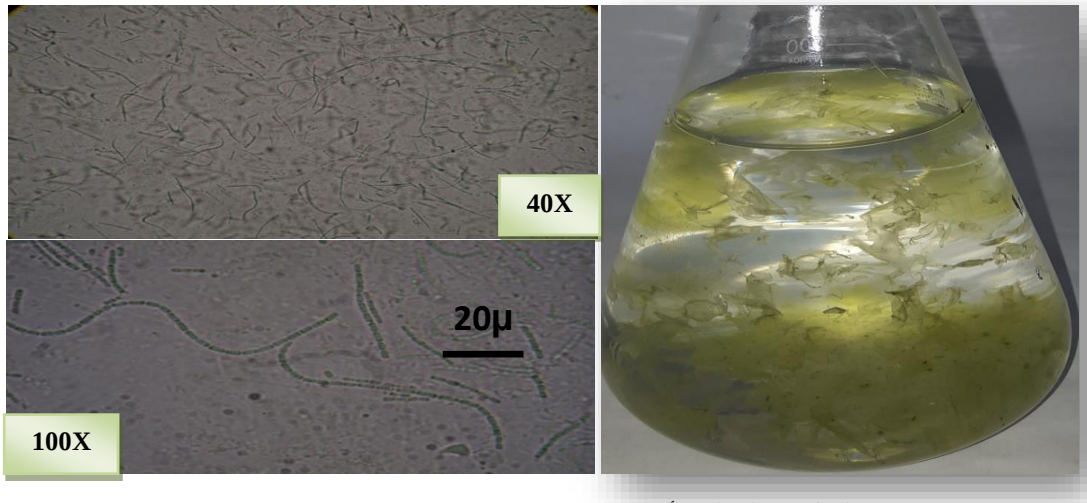
**Order (2) : Nostocales**

**C-Family: Stigonemataceae**

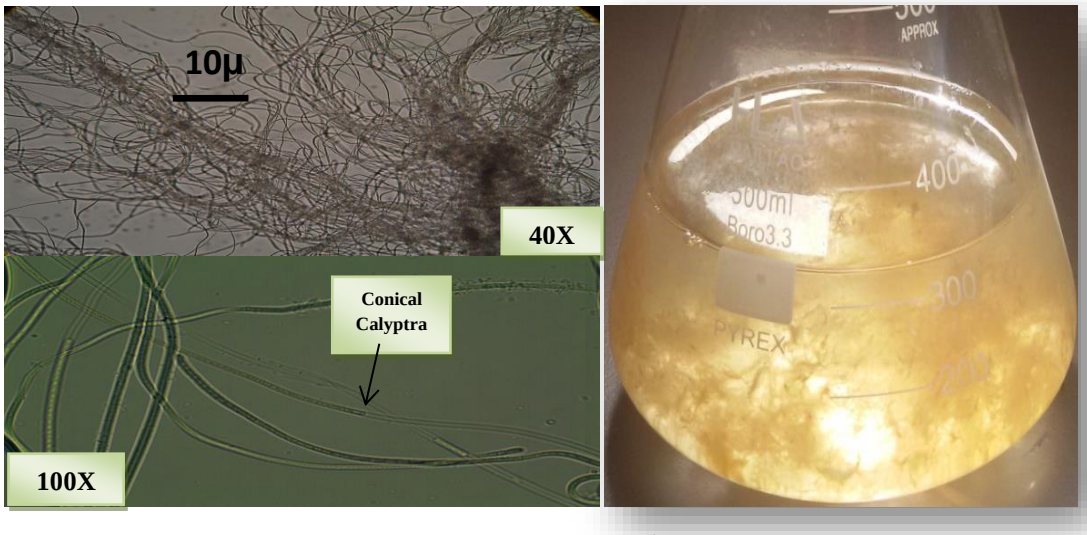
**Genus: *Stigonema informe* Bornet & Flahault**



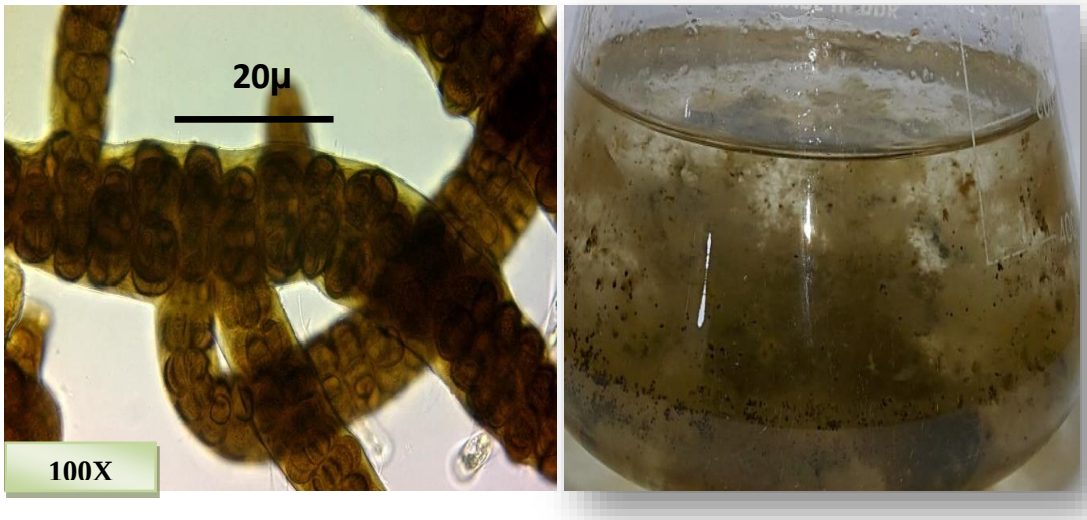

الشكل (1) الطحلب الاخضر المزرق ***Lyngbya rubida***




الشكل (2) الطحلب الأخضر المزرق ***Pseudoanabaena limnetica***




الشكل (3) الطحلب الأخضر المزرق ***Phormidium laysanense***



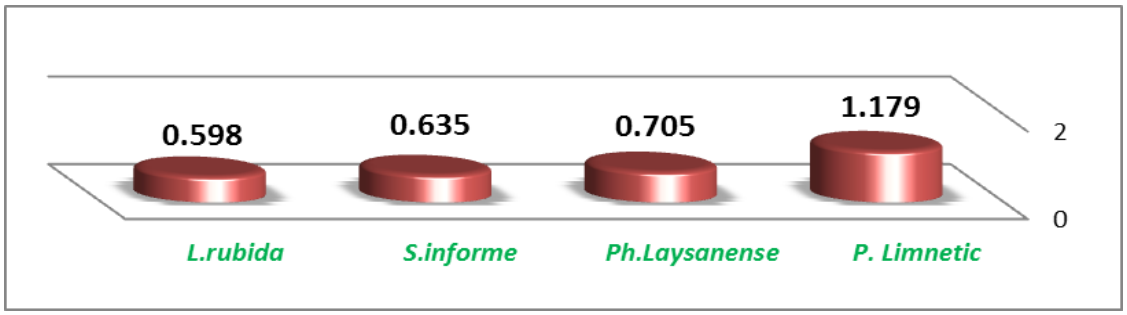

الشكل (4) الطحلب الأخضر المزرق ***Stigonema informe***

**التشخيص الكمي والنوعي للسم العصبي Anatoxin-a:**شخص و حدد تركيز السم العصبي Anatoxin-a لأول مرة محلياً وعالمياً و على وجه التحديد للأنواع المعزولة خلال الدراسة الحالية سواء باستعمال تقنيـــة Enzyme Linked (ELSA) Immunosurbent Assay Technique أو بأي تقنية أخرى .لقد أظهرت النتائج فروقاً معنوية ( t=7.022, P≤ 0.05) في قابلية الطحالب المنقاة على انتاج الســم العصـــبي Anatoxin-a ، إذ أظهر الطحلب *P. limnetica* أعلى إنتاجية للسم العصبي بلغت 1.179 مايكروغرام / لتر تلاه كل من *P. laysanense* و *S. informe* و *L. rubida* بتراكيز بلغت 0.705 و 0.635 و 0.598 مايكروغرم/لتر على الترتيب **شكل (5).**

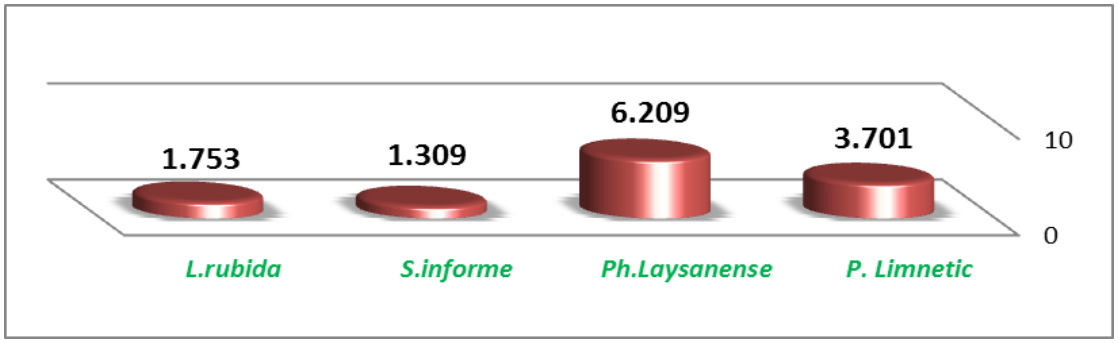
**التشخيـــص الكمـــي والنـــوعي للســـم الكبـــــدي Microcystin:** باستعمـــال تقنيـــة Enzyme Linked Immunosurbent (ELISA) Assay Technique تم التشخيص النوعي و الكمي للسم الكبدي Microcystin المنقى من الأنواع الطحلبية المعزولة و المنقاة و المسجلة لأول مرة العراق ولأول مرة محلياً و عالمياً .لقد أظهرت النتائج فروقاً معنوية (t=11.411,P≤ 0.05) في قابلية أنتاج الطحالب المدروسة للسم الكبدي Microcystin أظهرت النتائج أن الطحلب *Ph. Laysanense* كان أعلى انتاجية للسم الكبـــــدي وبتركيز بلغ 6.209 مايكروغرام/ لتر و تلاه الطحلب *P. limnetica* بتركيز بلغ 3.701 مايكروغرام/لتر في حين تقارب كل من الطحلبين *L. rubida* و *S. informe* بتراكيز بلغت 1.753 و 1.309 مايكروغرام / لتر. **شكل (6).**

**التشخيص النوعي لكل من السم العصبي Anatoxin-a و السم الكبدي Microcystin بوساطة طيف الأشعة تحت الحمراء:**قيست امتصاصية طيف ألأشعة تحت الحمراء لكل من السم العصبي Anatoxin-a المنقى من الطحلب الاخضر المزرق *P. Limnetica* و السم الكبدي Microcystin المنقى من الطحلب الأخضر المزرق *Ph. laysanense* و كانت النتائج كالآتي **جدول (1) و شكل ( ٧ و٨) .**

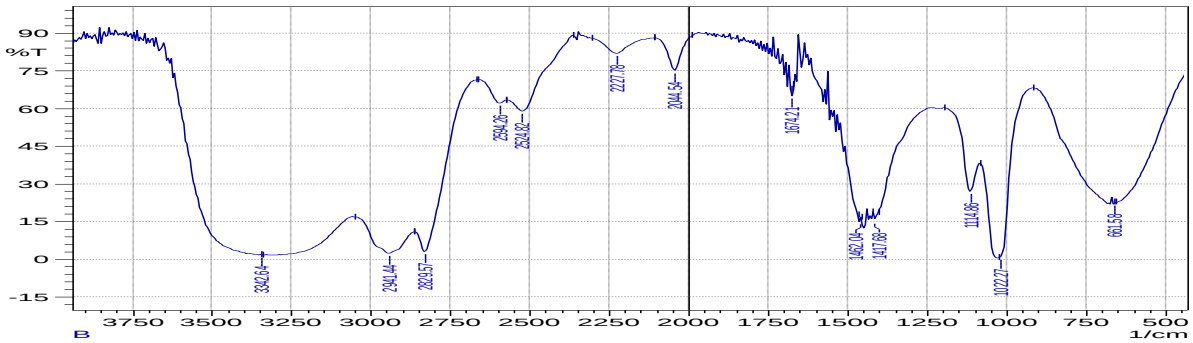
**التشخيص النوعي لكل من السم العصبي Anatoxin-a و السم الكبدي Microcystin بأستعمال طيف الأشعة فوق البنفسجية :**أظهرت نتائج طيف الأشعة فوق البنفسجية أن هناك قمة امتصاص واحدة للسم العصبي Anatoxin-a المنقى من الطحلب الأخضر المزرق *P. Limnetica* عند الطول الموجي 226 نانوميتر وكذلك أظهـــرت نتائج امتصاصية السم الكبدي Microcystin المنقى من الطحلب *Ph. laysanense* أن أعلى قمة امتصاص للسم بلغت عند الطول الموجي 240 نانوميتر. **شكل (٩ و ١٠) .**



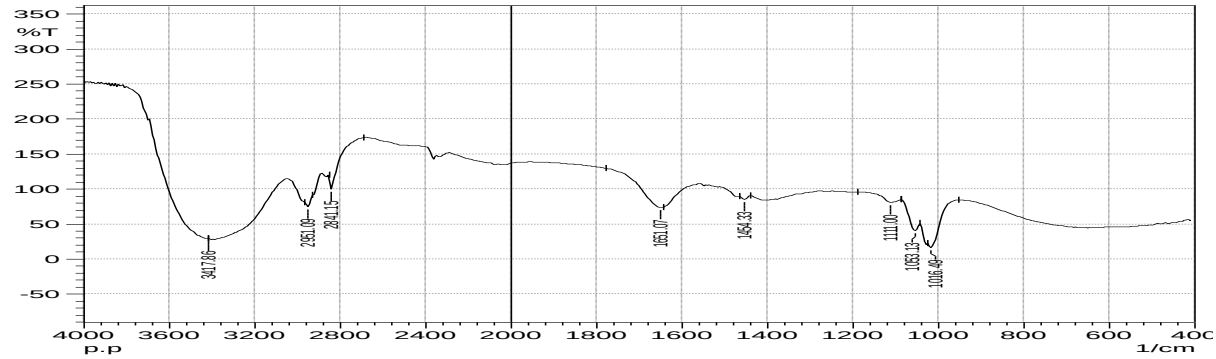

الشكل (5) تراكيز السم العصبي Anatoxin-a المنقى من الطحالب المعزولة و المنقاة مقدراً بوحدات المايكروغرام/ لتر




شكل (٦): تراكيز السم الكبدي Microcystin المنقى من الطحالب المعزولة و المنقاة مقدراً بوحدات المايكروغرام/ لتر



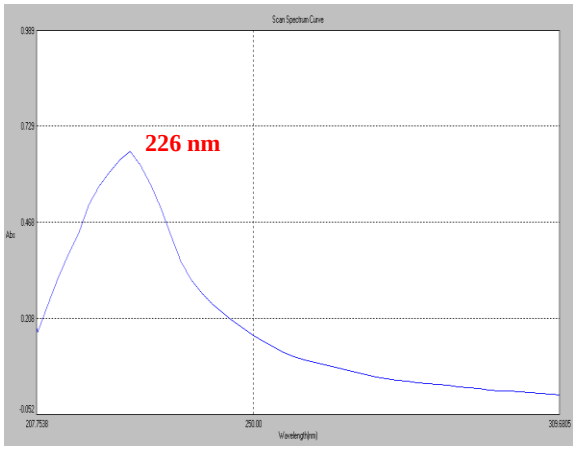

شكل (7): امتصاصية طيف الأشعة تحت الحمراء للسم العصبي Anatoxin-a المنقى من الطحلب *Pseudoanabaena. limnetica*



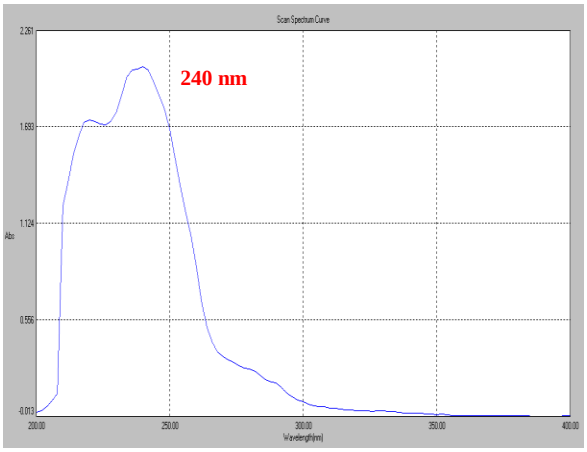

شكل (٨): امتصاصية طيف الأشعة تحت الحمراء للسم الكبدي Microcystin المنقى من الطحلب *Phormidium laysanense*

**جدول (1) تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء لكل من السم العصبي Anatoxin-a و السم الكبدي Microcystin المنقان من الطحلب الأخضر المزرق *P. Limnetica* و *Ph. laysanense* على الترتيب .**

| المجموعة الكيميائية للمركب | السم العصبي Anatoxin-a | السم الكبدي Microcystin |
|---|---|---|
| N-H (Amide A) | 3342.64 | 3417.86 |
| C-H | 2941.44 | 2951.09 |
| $CH_3$ | 2829.57 | 2841.15 |
| C=O (Amide I) | 1674.21 | 1651.07 |
| $CH_2$ | 1462.04 | 1454.33 |
| C-O | 1114.86 | 1053.13 |




شكل (٩)امتصاصية السم العصبي Anatoxin-a المنقى من الطحلب الأخضر المزرق *P. limnetica* لطيف الأشعة فوق البنفسجية




شكل (١٠) امتصاصية السم الكبدي Microcystin المنقى من الطحلب الأخضر المزرق *Ph. laysanense* لطيف الأشعة فوق البنفسجية

**المناقشة**

**عزل الطحالب و تنقيتها**:إن لأزدهارات بعض الطحالب الخضرالمزرقة عواقب سلبية على كل من النواحي الإقتصادية و البيئية و الاجتماعية ، إذ تؤثر في مياه الشرب والزراعة و السياحة و نوعية المياه لما تتسبب به من تغايرات في الخصائص الكيميائية للماء كالنقص في محتواه الأوكسجيني فضلاً عن إنتاجها لمدى واسع من السموم ذات التأثير المرضي لكل من أحياء البيئة المائية واليابسة و بشكل خاص تأثيراتها في الثديات وبضمنها البشـــر وهنـــالك حالات حادة تتسبب فيها الطحالب الخضر المزرقة في أنحاء متفرقة من العالم ولم تسجل بشكل رسمي(Sukenik *et al.*,2015) و نظرا لقلة الدراسات حول هذا الجانب في العراق اهتمت الدراسة الحالية في عزل انواع جديدة لم تسجل سابقاً في العراق تابعة لهذا القسم من بعض المسطحات المائية في محافظة البصرة و تنقيتها و تنميتها بأستعمال الوسط الزرعي Chu-10 و تشخيص سميتها لأول مرة محلياً وعالمياً نوعياً و كمياً وتضمنت كل من الانواع الطحلبية *L. rubida* الـــــذي عــزل من من المياه القريبة لقضـــاء الفـــاو والأنواع الطحلبية *P. Limnetica*

و *Phormidium laysanense* التي عزلت من مياه شط العرب في المنطقة المقابلة للكورنيش والطحلب *Stigonema informe* والذي عزل ملتصقاً في المخلفات الحديدية في مياه شط العرب ايضاً .

**التشخيص الكمي للسم العصبي Anatoxin-a**: نقي و شخص السم العصبي Anatoxin-a و حددت تراكيزه للعزلات المنقاة وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن الطحلب *P. limnetica* وهو الأكثر انتاجية للسم العصبي Anatoxina-a إذ بلغ تركيزه 1.179 مايكروغرام/لتر و قد اتفق هذا مع ما أشارت إليه دراسة Gonzalez-Gil *et al.,* (2016) بأن بعض أنواع هذا الجنس لها قدرة على إنتاج سموم عصبية قوية وقد تلاه في التركيز الطحلب *Ph. laysanense* إذ بلغ 0.705 مايكروغرام/لتر ففي دراسة Gugger *et al.,*(2005) وهي الأولى من نوعها في تشخيص السم العصبي Anatoxin-a في أحد أنهر فرنسا المنتج بوساطة الطحلب الأخضر المزرق *Ph. favosum* وقد تسبب بهلاكات للكلاب في حين تقاربت نتائج قياس تراكيز كل من الطحالب *L. rubida* و*S. informe* التي بلغت 0.598 و 0.635 مايكروغرام / لتر على الترتيب إذ تم قياس تركيز السم العصبي Anatoxin-a لهما لأول مرة عالمياً على مستوى الجنس والنوع .

**التشخيص الكمي للسم الكبدي Microcystin:** نقي وشخص و قيس تركيز السم الكبدي Microcystin لأول مرة عالمياً على مستوى الجنس والنوع لكل من الطحالب الخضر المزرقة المنقاة *L. rubida* و *P. limnetica* و *S. informe* و على مستوى النوع للطحلب المنقى *P. laysanense* . لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية في تحديد تركيز السم الكبدي أن هنالك تفاوتاً ملحوظاً في القابلية الإنتاجية للسم بوساطة الطحالب المنقاة بتثبيت كل من العوامل البيئية و الوسط الزرعي و وزن الكتلة الحية المستخلص منها و قد يعزى هذا التفاوت الى الاختلافات الجينية و الفسلجية لكل طحلب , فقد أظهرت النتائج أن الطحلب *Ph. Laysanense* كان الأعلى تركيزاً إذ بلغ 6.209 مايكروغرام / لتر, وقد أوجدت دراسة Shishido *et al.,* (2013) أن الجنس *Phormidium sp.* و من خلال دراسة التتابع الجيني أنه ينتج نوعاً نادراً من السم الكبدي Microcystin أطلق عليه [D-Leucine[1]] microcystin-LR , و تلاه الطحلب الاخضر المزرق *P. Limnetica* بتركيز بلغ 3.701 مايكروغرام/ لتر في حين أظهرت النتائج تقاربا في تركيز السم الكبدي Microcystin لكل من الطحلبين الخيطيين *S. informe* و *L.rubida* إذ بلغ تركيز السم 1.753 و 1.309 مايكروغرام/لتر على الترتيب.

**التشخيص النوعي لكل من السم العصبي Anatoxin-a و السم الكبدي Microcystin بوساطة طيف الأشعة تحت الحمراء:**أظهرت نتائج جدول (1) و شكل (7) لطيف الأشعة تحت الحمراء للسم العصبي Anatoxin-a المنقى من الطحلب السام *P. limnetica* أنه تميز بظهور حزمة الامتصاص الاتساعية العائدة للأصرة N-H لمجموعة الامايد عند الموقع 3342.64 سم$^{-1}$ و ظهور حزمة في الموقع 1674.21سم$^{-1}$ تعود الى الاهتزاز الاتساعي لمجموعة الكاربونيل الامايدية C=O حيث أن هذه الحزمة تظهر في موقع أقل من كاربونيل الكيتون و ذلك بسبب المزدوج الالكتروني الموجود على ذرة النيتروجين إذ يدخل في رنين مع الاصرة المزدوجة للكاربونيل مما يؤدي إلى أضعاف هذه الاصرة ومن ثم تظهر مجموعة الكاربونيل للأمايد عند تردد بحدود 1650-1680سم$^{-1}$ ويؤكد ذلك ظهور حزمة الامتصاص الاتساعية للآصرة C-O عند موقع 1114.86سم$^{-1}$ .إن ظهور حزمة عند

الموقع 2833.43-2945.30 سم$^{-1}$ يعزى الى الاهتزاز الاتساعي لمجموعة الالكيل C-H التابعة للتمدد المتماثل و غير المتماثل في حين أن ظهور حزمة عند الموقع 1462.04سم$^{-1}$ يعزى إلى الاهتزاز الانحنائي لمجموعة C-H . بينما أظهرت نتائج جدول (١) و شكل ( ٨) لطيف الأشعة تحت الحمراء للسم الكبدي Microcystin المنقى من الطحلب السام *Ph. laysanense* إمتلك عدة مجاميع فعالة تمثلت بالحزمة القوية لمجموعة الامايد N-H الداخلة في تآصر هيدروجيني أظهرتها حزمة الاهتزاز الإتساعي عند الموقع 3417.86سم$^{-1}$ , كما أمكن ملاحظة حزم الامتصاص التي تمثل مجاميع الألكيل C-H ويعزى ذلك إلى الإهتزاز الاتساعي عند الموقع 2841.15-2951.09 سم$^{-1}$ كما أن ظهور حزمة عند الموقع 1454.33سم$^{-1}$ يعزى الى الاهتزاز الانحنائي لمجموعة C-H , و أن ظهور حزمة في الموقع 1674.21سم$^{-1}$ تعود الى الاهتزاز الاتساعي لمجموعة الكاربونيل الامايدية C=O, و يؤكد ذلك ظهور حزمة الامتصاص الاتساعية للآصرة C-O عند موقع 1053.13سم$^{-1}$ (Silverstien *et al.*,1991).

**التشخيص النوعي لكل من السم العصبي Anatoxin-a و السم الكبدي Microcystin بأستعمال طيف الاشعة فوق البنفسجية:** أظهرت نتائج قياس امتصاصية السم العصبي Anatoxin-a المستخلص و المنقى من الطحلب *P. limnetica* لطيف الأشعة فوق البنفسجية أن للمركب قمة امتصاص قدرها 126 نانوميتر و قد اتفق هذا مع كل من دراسة Gugger *et al.*,(2005) و دراسة Ara´oz *et al.*,(2005). في قياس امتصاصية السم العصبي النقي Standard Anatoxin-a لطيف الأشعة فوق البنفسيجة والذي أظهر قمة امتصاص قدرها 127 نانوميتر في حين أظهرت نتائج قياس امتصاصية السم الكبدي Microcystin المستخلص و المنقى من الطحلب *Ph.Laysanense* لطيف الاشعة فوق البنفسجية أن للمركب قمة امتصاص قدرها 240 نانوميتر و اتفقت النتائج مع نتائج دراسة (AL-Sultan, 2007).

**الاستنتاجات والتوصيات:** تبين من الدراسة الحالية أن مياه شط العرب في محافظة البصرة جنوبي العراق قد احتوت أنواعاً جديدة من الطحالب الخضر المزرقة التي لم تشخص سابقاً وتبين ان لها قدره على انتاج السموم العصبية والكبدية وتراكيز عالية وهذا مؤشر خطير قد يهدد البيئة في هذا النهر المهم والحيوي وبالأخص تأثير ذلك في الثروة السمكية وباقي الأحياء المائية ومن ثم الانسان لذ توصي الدراسة الحالية بضروة اجراء دراسات او سع واشمل لتشخيص أنواعاً اخرى من تلك الطحالب واجراء اللازم للحد من انتشارها وبالتعاون مع الجهات ذات العلاقة.

## Reference

**Abed**, R.M.M.; Golubic, S.; Garciapichel, F.; Camoin, G.; and Seong-Joo, L. (2003a). Identity and speciation in marine benthic cyanobacteria: the *Phormidium* complex. J.of Algological Studies, 109: 35–56.

**Abed**, R.M.M.; Golubic, S; Garcia; Pichel, F.; Gilbert, F.; and Lee S, J. (2003b). Characterization of microbialite forming Cyanobacteria in a tropical lagoon: tikehau atoll, tuamotu, french Polynesia. J. of Phycol.39, 862–873.

**AL-Mousawi**, A.H. (1984) .Biological studies on algae in rice - field soil from the Iraqi marshes. Ph.D. Thesis, Univ. Durham. England .361pp.

**AL-Sultan**, E.; AL-Majeed, M.; and Abbas, A. (2015). Study of physiological and histological effects under very low concentration of cyanobacterial toxin MC-LR on Lab. Mice (*Mus musculus*). Research J.of of pharmaceutical, J.of biological and chemical sciences. Page No. 139.

**AL-Sultan**, E.Y.(2007). Bioassy of some toxic microalgae. PH.D thesis, Basrah University, Education College for pure Sciences, Biology Department, PP.127.

**AL-Sultan**, E.Y.A.(2017).Isolation, Purification and Identification of blue-green Alga *Hapalosiphon aureus* and Evalution of Histopathological effects on fresh water snail *Lymnea auricularia* .J. of Applied Scinences.1812-5654.

**AL-Sultan,E**.Y.; AL-Ali,A.; AL-Sultan,F. (2011).Toxic effects of cyanobacterial alga *N. muscurum* on some physiological parameters in blood of *Ctenopharyngodon idella* .J.of VaL.1844.ISSN 1991- 8690.

**AL-Sultan**, E.Y.; AL-Ali (2010). Histopathological and biological effects of toxic algae *Hapalosiphon welwitschii* on molli fish *Poecilia sphenops* Valenc.Basrah J. of Agric.Sci. 23 (special issue 2).

**Al-Suttan,** E.Y.A. (2010). The Isolation, the purification, the identification of hepatotoxin Microcystin-LR from two cyanobacterial species and show biological activity on some aquatic organisims. J. of Basrah Rese. (Sciences). 37(1): 39-57.

**Anne**, R.; David, P.F.; Michael. Leo, R.; Janna, V.; Thomas, B.; and Kaarina, S. (2003).Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis .J.of PNAS.568–573.

**Araoz**, R.; Nghieˆ m, H.; Rippka, R.; Palibroda, N.; Tandeau de Marsac, N.; Herdman, M. (2005). Neurotoxins in axenic Oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. J.of Microbiology. 151, 1263–1273.

**Bláha**, L.; Pavel, B.; Blahoskav, M.(2009).Toxins produced in cyanobacterial water blooms-Toxicity and risks. Interdiscip.J.of Toxicol. 36–41.

**Bullerjahn**, G.S, and Post, A.F. (2014). Physiology and molecular biology of aquatic cyanobacteria. Front.J.of Microbiol. 5:359

**Bumke-Vogt,** C,.; Mailahn, W.; and Chorus, I. (1998). Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in Germanlakes and reservoirs. J.of Environ Toxicol 14:117-125.

**Campbell** H.F.; Edwards O.E.; Kolt R. (1977).Synthesis of nor-anatoxin-a and anatoxin-a. Can.J. of Chem .55:1372-1379

**Carmichae**l, W. W.; Biggs, D. F.; Peterson, M. A. (1979). Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte

*Anabaena flos-aquae* NRC-44-1.J.of Toxicon, 17(3): 229-236.

**Carmichael**, W.W. (1994).The toxins of cyanobacteria.J.of Scientific American .64–72.

**Carmichael**, W.W.; Boyer, G.L. (2016). Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. J.of Harmful Algae 54,194–212.

**Challis**, G.L.; Ravel, J. T; and ownsend, C.A. (2000). Predictive, tructure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. J.of Chem. Biol. 7, 211-224.

**Charpy**, L.; Katarzyna, A. ; Palinska, b.; Raeid, M. M.; Abed, Langlade,J.M.; and Golubic , N.(2014). Factors influencing microbial mat composition, distribution and dinitrogen fixation in three western Indian Ocean coral reefs.Eur. J. of Phycol. 47(1): 51–66.

**Chu**. S.P. (1942). The influence of mineral composition of medium on the growth of phytoplankton algae. J.of Ecol., 30: 284 -325.

**Dawson**, R.M. (1998).The toxicology of microcystins. J.of Toxicon. 36, 953–962.

**Desikachary,** T.U. (1959). Cyanophyta . Indian council of agricultural research, New Delhi, 517pp.

**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. Canadian J. of Chemistry, 55(8): 1367-1371.

**Duy**, T.N.; Lam, P.K.S.; Shaw, G.R.; Connell, D.W. (2000). Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 163: 113-186.

**Fischer**,W.J.;Garthwaite,I.Miles,C.O.;Ross,K.M .;Aggen, J.B.; Chamberlin, A.R.; Towers, N.A.; Dietrich, D.R.(2001).Congener independent immunoassay for microcystins and nodularin .J.of Environ.Sci.Technol.35:4858-4858.

**Gongliang, Y**.; Meng ling, Z.; Youxin, C.; Qianqi an, P.; Wenbo, C.; Renhui, L. (2015). Polyphasic characterization of four species of *Pseudanabaena* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from China and insights into polyphyletic divergence within the *Pseudanabaena* genus. J.of Phytotaxa 192 (1): 001–012.

**Gonzalez**-Gil, S.; Aguilera, A.; Lopez-Rodas, V.; and Costas, E. (2016). Characterization of morpho species and strains of *Pseudanabaena* (Cyanophyceae) from laboratory cultures using antibodies and lectins .J.of Phycol.34: 27±33.

**Gugger**, M.; Lenoir, S.; Berger, C.; Ledreux, A.; Druart ,J.C.; Humbert, J.F.; Guette, C.; and Bernard, C.(2005). First report in a river in France of a benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. J.of Toxicon 45:919-928.

**Harada** ,K.; Nagai, H.; Kimura ,Y.; Suzuki, M.; Park, H.D.; Watanabe, M.F.; *Luukkainen*, R.; Sivonen, K.; and Carmichael, W.W.(1993). Liquid chromatography/ mass spectrometric detection of anatoxin-a, aneurotoxin from cyanobacteria. J.of Tetrahedron 49(41):9251-9260.

**Harada** K.; Ogawa, K.; Kimura, Y.(1991). Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. Chemical Research in J.of Toxicology, 4: 535-540.

**Harada**, K.;Kimura, Y.; Ogawa, K.;Suzuki, M.; Dahlem, A.M.; Beasley, V.R.; Carmichael, W.W. (1989). A new procedure for the analysis and purification of naturally-occurring anatoxin-a from the blue–green alga *Anabaena-Flos-Aquae*. J.of Toxicon 27 (12), 1289–1296.

**Harada**, K.I.; Tsuji, K.; Watanabe, M.F.; and Kondo, F. (1996).Stability of microcystins from cyanobacteria – III. Effect on pH and temperature. J.of Phycologia 35**:** 83–88.

**Harke**, M.; Steffen, M.; Gobler, C.; Otten, T.; Wilhelm, S.; Wood, S.A.; and Pearl, H. A (2016). review of the globalecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, Microcystis. J.of Harmful Algae. 54, 4–20.

**Huber**, C. S. (1972). The crystal structure and absolute configuration of 2, 9-diacetyl-9-azabicyclo [4, 2, 1] non-2,3-ene. *Acta Crystallographica* Section B, B28 (8): 2577-2582.

**Huisman**, J., Matthijs, H. C. P. and Visser, P. M. (2005). J.of Harmful Cyanobacteria. Springer, Dordrecht.

**Ji**, Y.; Lu, G.; Chen, G.(2011). Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF-kappaB/iNOS Pathway in INS-1 Cells. J. of Molecular Sciences, 12(7): 4722-4734.

**Jochimsen**, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E. M.; Antunes, M. B.; de Melo Filho, D. A.; Lyra, T. M.; and Barret, V. S. T., (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. New Engl. J.of Med. 338, 873-878.

**Maulood,** K.M.; Hassan, F.M.; AL-Lami, A.A.; Toma, J.J. and Ismail, A.M. (2013).Checklist of algal flora in Iraq.Ministry of Environment. 100pp.

**Namikoshi**, M.; Choi, B.W. Sun, F. and Rinehart, K.L. (1993). Chemical characterization and toxicity of Dihydro Derivatives of Nodularin and Microcystin - LR potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins .J. of Chem. Res. J.of Toxicol. 92:151 - 158.

**Namikoshi**, M. ; Rinehart , K.L.; Sakai , R. Stotl; s , R.R. ; Dahlem , A.M. ; Beasly , V.R.; Carmichael , W.W. ;Evans , W.R. ( 1992 ) . Identification of 12 hepatptoxins from homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* . Nine new Microcystins. J.of Org. Chem., 57(3): 866 – 872.

**Neilan**, B.A.; Pearson, L.A.; Muenchhoff, J.; Moffitt, M.C.; Dittmann, E. (2013) Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. J.of Environ. Microbiol. 15, 1239–1253.

**Pflugmacher**, S., (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. J.of Environ. Toxicol. 17, 407–413.

**Piyathilaka,** M.A.P.C. Pathmalal, M.M.; Tennekoon, K.H. (2015). Microcystin-LR induced cytotoxicity and apoptosis in human embryonic kidney and human kidney adenocarcinoma cell lines. J. of Microbiology .161, 819–828.

**Puddick**, J., Prinsep, M., Wood, S., et al.(2015). Further Characterization of Glycine-Containing Microcystins from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica. J.of Toxins, 7: 493-515.

**Rastogi**, R.P., and Sinha, R.P. (2009).Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. J.of Biotechnol .Adv. 27, 521–539.

**Rogers**, E.H.; Hunter III, E.S.; Moser, V.C.; Phillips, M.P.; Herkovits, J.; Munoz ,L. ; Hall, L.; Chernoff ,N.(2005).potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin, J.of Appl. Toxicol. 25, 527–534.

**Rohrlack**, T.; Christiansen, G.; and Kurmayer, R.(2013). Putative ant parasite defensive system involving ribosomal and nonribosomal

oligopeptides in cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. J.of Appl Environ Microbiol 79: 2642–2647.

**Shishido**,T.; Kaasalainen,U.; Fewer,D.P.; Rouhiainen,L.; Jokela,J.; Wahlsten,M.; Fiore,M.F.; Yunes,J.S.; Rikkinen,J.; Sivonen,K.(2013). Convergent evolution of [D-Leucine[1]] microcystin- LR in taxonomically disparate cyanobacteria. J.of BMC Evolutionary Biology .13:86.

**Shishido**,T.; Kaasalainen,U.; Fewer,D.P.; Rouhiainen,L.; Jokela,J.; Wahlsten,M.; Fiore,M.F.; Yunes,J.S.; Rikkinen,J.; Sivonen,K.(2013). Convergent evolution of [D-Leucine[1]] microcystin- LR in taxonomically disparate cyanobacteria. J.of BMC Evolutionary Biology 2013, 13:86.

**Silverstien** , R.M. ; basster , G.C.; Morril , T.C. ( 1991 ).Spectrometric identification of organicح compounds 5 th ed. Tohn wily and Sons , Inc. USA. 419 PP.

**Simon**, M.M.; Pflugmacher, S.; Kevin, J.J.; Ambrose, F. (2004). Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants .J.of Aquatic Toxicology. 68, 185–192.

**Sivonen,** K.; Jones, G.J. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. The World Health Organization, E & FN Spon, London, UK, p. 41–111 .

**Stein**, J.R. (1975). Handbook of phycological method .Cambridge University press .J.of Cambridge. 445 pp.

**Sukenik**, A.; Quesada, A.; Salmaso, N.(2015).Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. J. of Biodivers Conserv.24:889–908.

**Weideman**, V.E.; walne, P.R. and Tainor, F.R. (1984). A new technique for obtaining axenic cultures of algae. Can. J.of Bot., 42: 958 - 959.

**Wiegand**, C.; Pflugmacher, S. (2005) .Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. J.of Toxicol Appl Pharmacol.203:201–18.

**Yavasoglu**, A.; Ali Karaaslan, M.; Uyanikgil, Y.; Ferah, S.; Utku, A.; Ulku Karabay Yavasoglu, A. (2008). Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice .J.of Experimental and Toxicologic Pathology.391–396.

# Isolation four new species of blue-green algae and diagnosis, purification, cultivation from the Shatt Al-Arab waters in Basra, southern of Iraq, and evaluation their ability to produce neurotoxins (Anatoxin-a) and hepatotoxin (Microcystin)

Emad Yousif Awad AL-Sultan and Marwa Aid-Al-Kareem Aubaeed,

*Basra University /College of Education for pure Sciences / Biology Dept.*

**Email: emad_yousif2000@yahoo.com**

**Abstract:**

The current study included the isolation four new species of blue-green algae and diagnosis, purification and cultivation from the Shatt al-Arab river water in the province of Basra / southern of Iraq, which is the first registration of those species in Iraq included *Lyngbya rubida*, *Pseudanabaena limnetica*, *Phormidium Laysanense* and *Stigonema informe.* The ability of these species to produce two types of toxins neurotoxin (Anatoxin-a) and hepatotoxin) Microcystin) was studied for the first time in Iraq and the world after purifying them. Enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) was used to determine it. The species *P. limnetica* was highest production of neurotoxin reached 1.179 µg/ L followed by *P. laysanense*, *S. informe* and *L. rubida* with concentrations of 0.705, 0.635 and 0.598 µg/L per 50 milligrams of dry weight respectively. As for its production of hepatotoxin (Microcystins), The algal species *Ph. Laysanense* was showed a higher production of microcystin at a concentration of 6.209 µg /L followed by *P. limnetica* with a concentration of 3.701 µg /L, while converging the concentration of toxin in both *L. rubida* and *S.informe* reached 1.753 and 1.309 µg / L. The two types of purified toxins were identified to show the most active groups in both compounds using Infra-Red Spectrum (FT-IR) and Ultra Violet Radiation (UV) as it reached the highest absorption 226 nm of neurotoxin (Anatoxin-a) purified from species *P. limentica* , While reached 240 nm for microcystin purified from species *Ph. Laysanense.*

**Key wards:** Blue-green algae , Neurotoxins(Anatoxin-a), Hepatotoxin ( Microcystins), Isolation , Purification and cultivation of blue-green algae