عزل وتشخيص المضاد الحيوي الـ Cryptophycin من السيانوبكتريا *Nostoc muscorum* المعزولة من تربة عراقية

[1]موسى جاسم الاعرجي، [2]طهران سيد زيارة، [3]منى عبد الامام المازني

[1] مركز علوم البحار/ جامعة البصرة /[2،3] قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة البصرة

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص 8 انوع من السيانوبكتريا من 12 عينة تربة جمعت من منطقتي الكرمة وابي الخصيب في مدينة البصرة وتم تنميتها وتنقيتها واكثارها في ظروف مختبرية تمثلت بدرجة حرارة 27±2 °م وشدة اضاءة (150-175) مايكروانيشتاين. م$^{-2}$ / ثا$^{-2}$ ولمدة 8:16 ساعة اضاءة:ظلام. اختبرت فعالية تلك الانواع تجاه كل من الجرثومة المرجعية *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) (الموجبة لملون كرام) و*Escherichia coli* (NCTC 5933) (السالبة لملون كرام)، وقد اظهرت العزلة *Nostoc muscorum* فعالية مثبطة لكل منها وبقطر تثبيط واسع مقارنة مع بقية العزلات.

اختبرت قابلية العزلة *N. muscorum* في انتاج المضادات الحيوية في ثلاثة اوساط تخمرية مختلفة وتبين وجود تفاوت في افراز المضادات الحيوية بين الاوساط الثلاثة أظهرالوسط التخمري الثالث اعلى قابلية على الافرازمن خلال الاختلافات في فعالية المضاد المستخلص تجاه العزلات الجرثومية المذكورة. نقي المضاد الحيوي بتقنية كروماتوغرافيا العمود واكدت تنقيته باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC. شخص المضاد المنتج كونه الكربتوفايسين باخضاعه لاختبارالانصهار MP ، الذائبية، تقدير الوزن الجزيئي والاختبارات الكيميائية الاخرى فضلاً عن طيف الاشعة فوق البنفسجية UV وطيف الاشعة تحت الحمراء IR اذ تشابه المضاد المنتج مع الكربتوفايسين القياسي.

المقدمة

تعد السيانوبكتريا Cyanobacteria من مجاميع الاحياء المجهرية القادرة على انتاج انواع مختلفة من المضادات الحيوية، اذ عزلت منها العديد من المضادات الحيوية ذات الاستعمالات التطبيقية المختلفة ومواد ايضية ثانوية اخرى (Burja *et al.*, 2001).

تنتشر السيانوبكتريا بشكل واسع في الطبيعة فهي قادرة على النمو في معظم البيئات كالترب والمياه العذبة والمالحة كما يعيش بعضها في الينابيع الحارة ذات درجات الحرارة العالية Thermophilic

حيث تصل درجة حرارتها الى اكثر من70 ºم ومنها ما يعيش في البيئات المتجمدة kryophilic، وبعضها يعيش في مستوى ملوحة عالية جداً فيتواجد في عمق الصحاري .(Tamagnini *et al. 2002)*

تركزت معظم الدراسات عن السيانوبكتريا في العراق للفترة الماضية حول الجوانب البيئية والتصنيفية وكانت هناك بعض الدراسات الفسلجية، منها دراسة (Al-Aarajy, 1996)، ودراسة المحتوى البايوكيميائي (الركابي، 2003)، وعزل وتشخيص بعض السموم منها متمثلة بدراسة (الركابي، 2002 والشاهين، 2002)، فضلاً عن دراسة محتواها من الفيتامينات (الجعفر، 2004) وحول الفعالية الحيوية للسيانوبكتريا كمضاد حيوي كانت دراسة (Mehdi and Al-Mosawi, 1999)، لهذا السبب ولظهور المقاومة الجرثومية للمضادات الحيوية قد شكل المشكلة الاساسية في العلاج المضاد للجراثيم وساهم بالحاجة الماسة لتطوير مضادات حيوية جديدة غير معروفة مسبقاً (Katzung, 1989)، لذا فقد وضعت الدراسة الحالية لتكون من الابحاث الجادة في العراق حول امكانية تطويع الاحياء المجهرية وخاصة السيانوبكتريا لانتاج مضادات حيوية نافعة جديدة ممكن ان تستخدم كبدائل محلية لبعض الادوية .

عزل المضاد الكريبتوفايسين لاول مرة من قبل Merch عام 1990 من العزلة (*Nostoc* sp. ATCC 53789) بشكل depsipeptide ذات فعالية قاتلة وسمية عالية تجاه الفطريات fungicide خاصة جنس *Cryptococcus* واستعمل في الحقول الصيدلانية Pharmaceutical والزراعية Agricultured (Schwartz *et al.*, 1990). اطلق فيما بعد على هذا المضاد أسم الكربتوفايسين Cryptophycin (Hirsch *et al.,* 1990).

يتميز هذا المضاد بتركيبه المعقد جداً فضلا عن صعوبة انتاجه صناعياً وغلاء ثمنه فهو يحتاج الى خمسة وثلاثين خطوة لانتاجه لذلك استمر الباحثون بالبحث لايجاد طريقة لتقصير الانتاج او ايجاد مصدر لانتاجه الطبيعي، واكتشفوا سلالات اخرى لها القدرة على انتاج الكربتوفايسين بصورة طبيعية (Moore *et al.*, 1996). يعمل الكربتوفايسين ضد التكاثر antiproliferative وضدالانقسامات الخيطية antimitotic للخلية الحقيقية وبذلك يمنع دورة الخلية من الانقسام الخيطي خلال الطور المتوسط (Panda *et al.*, 1997 ; Smith and Zhang, 1996) فوصف انه مضادٌ لاورام الرئة والبنكرياس والقولون والبروستات والدماغ عند الانسان (Pratt., 1994).

المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية المرجعية

استخدمت عزلتان جرثوميتان مرجعيتان احداهما موجبة لملون كرام *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) والاخرى سالبة لملون كرام *Escherichia coli* (NCTC 5933).لاجراء الغربلة الاولية Primary Screening وتقييم الفعالية البايولوجية للمضاد الحيوي المنتج.

تم الحصول على هاتين العزلتين من مختبر ابحاث التقنية الحيوية في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/جامعة البصرة.

الاوساط الزرعية المجهزة

أ- الوسط الزرعي السائل Chu-10

استخدم الوسط الزرعي Chu-10 الموضحة مكوناته من قبل (Al-Mousawi, 1984).

ب- الوسط الزرعي الصلب Chu-10

حضر الوسط من مكونات الوسط الزرعي السائل Chu-10 بعد اضافة الاكار Agar له بتركيز 1.5 - 2% بعدها عقم الوسط بجهاز الموصدة الكهربائية بدرجة حرارة 121 ^{o}م وضغط 1جو ولمدة 20 دقيقة.

ج- اوساط التخمر Fermentation media (FM)

استخدمت ثلاثة اوساط تخمرية مختلف اعتماداً على الطريقة المذكورة من قبل (Back and Liang, 2005).

أ- وسط التخمر الاول FM1

حضر هذا الوسط من المكونات التالية: محلول ارنون Arnon's solution (0.12 مل/ لتر)، كلوريد الامونيوم (0.19 مل/ لتر)، فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين المائية (0.175 مل/ لتر)، كبريتات المغنسيوم المائية (0.2 مل/ لتر)، كلوريد الكالسيوم المائي (0.1 مل/ لتر)، نترات الصوديوم (2.3 مل/ لتر) 4-morpholine propane-sulfonic acid (0.625 g / L)، محلول المعادن النزرة (1 مل/ لتر) ثم عدل الاس الهيدروجيني الى7.

ب- وسط التخمر الثاني FM2

حضر الوسط من المكونات التالية: نترات الصوديوم (1 غم/ لتر)، كاربونات الصوديوم (0.2 مل/ لتر)، فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين المائية(0.175 مل/ لتر)، كبريتات المغنسيوم المائية (0.3 مل/ لتر)، كلوريد الكالسيوم المائي (0.25 مل/ لتر)، 4-morpholine propane-sulfonic acid (0.625 g / L)، محلول المعادن النزرة (1 مل/ لتر) وعدل الاس الهيدروجيني الى7.

ج- وسط التخمر الثالث FM3

حضر هذا الوسط من المكونات التالية: نترات الصوديوم(1.5غم/ لتر)، كاربون الصوديوم (0.2 غم/ لتر)، فوسفات البوتاسيوم احادية النيتروجين المائية(0.04 غم/ لتر)، كبريتات المغنسيوم المائي(0.075 غم/ لتر)، كلوريد الكالسيوم المائي(0.036 غم/ لتر)، حامض السترك (0.006 غم/ لتر)، نترات امونيوم الحديديك (0.006 غم/ لتر)، ثنائي الصوديوم- اثيلين- ثنائي- امين رباعي حامض الخليك (0.001 غم/ لتر)، محلول المعادن النزر (1مل/ لتر)، وعدل الاس الهيدروجيني الى 7.

طرائق العمل

جمع العينات وفحصها

جمعت 6 عينات تربة من منطقة كرمة علي و6 عينات تربة اخرى من منطقة ابي الخصيب بصورة عشوائية، اذ جمعت الكتل المرئية للطحالب النامية على سطح التربة مباشرة باستخدام ملعقة نظيفة.ووضعت في اكياس نايلون نظيفة، جلبت بعد ذلك الى المختبر مباشرةً لغرض التحري عن انواع السيانوبكتريا المراد عزلها وتشخيصها وذلك بفحصها تحت المجهرالضوئي المركب نوع Bausch and Lomb بتحضير شرائح زجاجية نظيفة .

وقد تم قياس درجة حرارة التربة حقلياً باستعمال محرار زئبقي Mercuric thermometer وقيست نسبة الملوحة حقلياً باستخدام جهاز Jenway (4070) taban وكذلك تم قياس الأس الهيدروجيني بطريقة العجينة المشبعة Saturated paste method.

العزل والتشخيص

لغرض عزل انواع السيانوبكتريا اتبعت طريقة التخطيط Streaking method للوسط الزرعي الصلب وطريقة التخفيف Dilution method للوسط الزرعي السائل والموضحتين من قبل Stein (1973). تم عزل 8 انواع من السيانوبكتريا التي تمثلت

بـ (*Lyngbya diguetii*، *Oscillatoria limnetica*، *Oscillatoria tenuis*، *Nostoc commune*، *Nostoc muscorum*، *Lyngbya martensiana*، *Nostoc ellipsosporum*، *Nostoc linkia*) والتي شخصت اعتماداً على المصادر التالية (McGuire ,1984; Prescott,1975; Desikachary,1959) بعد ذلك تم استزراع العزلات بحقن عدد من الدوارق الزجاجية الحاوية على 70 مل من الوسط المعقم Chu-10 بعزلات السيانوبكتريا ثم اغلقت فوهات الدوارق بالقطن المعقم ونقلت الى كابينة النمو تحت درجة حرارة 27 ±2 °م واضاءة (150 -175) مايكروانيشتاين. م^{2} ثا^{2} ولمدة 8:16 ساعة اضاءة : ظلام على التوالي، وحسب طريقة (Weideman *et al.*,1984) ثم تم تنقيتها للحصول على عزلات نقية Axenic cultures بعدها تم اكثار العزلات وحصادها وحفظها.

الغربلة الاولية واختبار قابليةالانواع على افراز مضادات حيوية

تم اختبار قابلية 8 انواع من السيانوبكترياعلى انتاج مضادات حيوية باتباع طريقة (Biondi *et al.*, 2004). اذ حضر المستخلص الخام للانواع بحصاد المزارع خلال فترة طور الثبوت Stationary- phase باستعمال جهاز الطرد المركزي Auto Bench centerfuge نوع IV صنع شركة baird and Tatlack بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة، فصلت بعد ذلك الكتلة الحية biomass عن راشح كل مزرعة وحفظت في الثلاجة بدرجة حرارة (-20) °م لحين الاستخدام بعدها جفدت بوساطة جهاز التجفيد Freezing drier نوع LABCONCO (18)، اخذ 1غم من الكتلة الحية المجفدة ومزجت مع 50 مل من الميثانول المطلق في دورق زجاجي معقم اغلقت فوهته باشرطة البرافين لمنع التبخر ورج لمدة 24 ساعة باستخدام جهاز الهزاز Shaker بسرعة 70 دورة / دقيقة، ثم نبذ المستخلص مركزياً لمدة 5 دقائق للتخلص من البقايا الخلوية وبعدها تم التخلص من المذيب بالتبخير بدرجة حرارة الغرفة.

اختبرت الفعالية البايولوجية لمستخلصات الانواع باتباع طريقة الانتشار بالاكار Agar Diffusion Method وبوساطة عمل حفر Wells في الوسط الزرعي الصلب (Irobi *et al.*, 1996).

اختبار قابلية العزلة على انتاج مضادات حيوية في الاوساط التخمرية

اختبرت قابلية العزلة *Nostoc muscorum* على انتاج مضادات حيوية في ثلاثة اوساط انتاجية (FM1، FM2، FM3)، اذ تخلط كمية معينة من معلق العزلة مع وسط الاستزراع

Chu-10 الصلب بدرجة حرارة 40°م ويصب بسرعة قبل تصلبه في اطباق بتري معقمة، ثم تحضن في كابينة النمو تحت درجة حرارة 27 ±2 °م وشدة اضاءة بلغت 150-175 ميكروانشتاين.م$^{-2}$ / ثا$^{-2}$ لمدة 8:16 ساعة اضاءة : ظلام لمدة 7 ايام، تلقح دوارق زجاجية سعة 500مل محتوية على 200 مل من وسط الاستزراع Chu-10 السائل باقراص ذات قطر 6ملم ماخوذة بوساطة ثاقب الفلين coek borer المعقم من مستعمرات العزلة النامية في وسط الاستزراع chu-10 الصلب، وقد عملت ثلاثة مكررات، ثم وضعت الدوارق الزجاجية بجهاز الهزاز ونقلت الى كابينة النمو تحت نفس الظروف السابقة الذكر ولمدة 5-7 ايام (Mehdi and Al-Mousawi, 1999)، حضرت دوارق زجاجية سعة 500 لتر يحتوي كل منها على 250مل من اوساط الانتاج الثلاثة المعقمة (FM1، FM2، FM3)، ثم لقحت بـ 50 مل من وسط الاستزراع السائل بواقع ثلاثة مكررات لكل وسط انتاج، اغلقت فوهات الدوارق بسدادة من القطن المعقم ثم وضعت الدوارق الزجاجية بجهاز الهزاز بسرعة 100 دورة / دقيقة ونقلت الى كابينة النمو تحت الظروف السابقة الذكر، حصدت المزارع بعد مرور 10- 18 يوم بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة (Back and Liang, 2005).

اختبار الفعالية الحيوية للمضاد الحيوي المنتج في اوساط التخمر

بعد الانتهاء من فترة التخمر ركز معلق العزلة باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة، فصل بعد ذلك المعلق عن الخلايا المترسبة وجفف باستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer ثم خزن بدرجة حرارة - 10 °م لحين الاستخدام، ثم اختبرت قابلية العزلة على انتاج مضادات حيوية في وسط الانتاج باذابة كميات متساوية من المعلق المجفف بـ 4 مل من مزيج Water : dimethyl sulfoxide بنسبة (1:9) على التوالي (Ghasemi *et al.*, 2003)، اتبعت طريقة الانتشار على السطح الصلب Agar diffusion method لاختبار الفعالية الحيوية للعزلة (Irobi, 1996)، اذ لقحت اطباق بتري معقمة حاوية على الوسط الصلب MHA بالجراثيم المرجعية *S. aureus* (NCTC 6571) و*E. coli* (NCTC 5933) بعمر 6 ساعات (عدد الخلايا 10^6 خلية والكثافة الضوئية (O.D) = 0.1 عند طول موجي 540 نانوميتر (Barry, 1990)، ثم تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق. عمل بعد ذلك حفر wells بقطر 6 ملم باستخدام ثاقب الفلين المعقم في الوسط الصلب ثم اضيف 100 مايكروليتر من المعلق الى كل

حفرة باستخدام ماصة ميكانيكية دقيقة Micro pipette، مع استخدام طبق زرع كسيطرة اضيف في حفرته 100 مايكرولتر من مزيج الاذابة بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ثم سجلت النتائج بقياس اقطار منطقة التثبيط.

اختيار افضل عزلة وافضل وسط انتاج

بعد اجراء عملية الغربلة الاولية لاختبار قابلية عزلات السيانوبكتريا على افراز مضادات حيوية وعملية اختبار الفعالية الحيوية للمضاد المنتج في اوساط التخمر الثلاثة، اختيرت العزلة *Nostoc muscorum* والوسط التخمري الثالث (FM3) على انتاج المضاد الحيوي.

استخلاص وتنقية وتشخيص المضاد الحيوي المنتج

أ- استخلاص المضاد الحيوي

بعد الانتهاء من فترة التخمر فصلت الخلايا عن راشح المزرعة بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة، تمت عملية الاستخلاص باستخدام قمع فصل Separatory funnel، إذ اضيف 150 مل من كلوريد المثيلي الى 1000 مل من راشح المزرعة، رجت الطبقة العضوية مع الطبقة المائية كلياً وتركت لتستقر لمدة 24 ساعة.

فصلت الطبقة العضوية عن الطبقة المائية ورشحت خلال القطن المكتظ لازالة أي راسب ربما قد تكون، ثم اضيف 3-6 غم كبريتات المغنسيوم اللامائية anhydrous magnesium sulfate الى الطبقة العضوية المرشحة ومزج جيداً ثم ترك لساعات عدة بعدها رشح خلال القطن المكتظ لازالة كبريتات المغنسيوم بشكل راسب، ثم ترك الراشح النازل في طبق بتري ليجف (Back and Liang, 2005). بعد ذلك تم تنقية المضاد الحيوي واختبار نقاوته باتباع طريقة (Back and Liang, 2005).

ب- تنقية المضاد الحيوي المستخلص

تم تنقية المضاد الحيوي المستخلص باستعمال تقنية كروماتوغرافيا العمود Column chromatography، إذ استخدم عمود زجاجي ابعاده (1.5× 35) سم وملئ العمود بمستحلب هلام السليكا Silica gel (mesh 230-400 µm) بواقع 1.5 غم من مادة هلام السليكا في كلوريد المثيلي الذي يمثل الطور الثابت، اذيب 0.1 غم من المادة المستخلصة المحتوية على المضاد الحيوي في 5 مل من كلوريد المثيلي واضيف بلطف في العمود بعدها تم حقن العمود بالسائل المفرق Eleunt وهو عبارة عن مزيج من (ethyl acetate:isopropanol) بنسبة (4:1) على التوالي والذي يمثل الطور المتحرك لحين انتهاء

عملية الفصل، وكان معدل الجريان Flow Rate في العمود 0.5 مل/ دقيقة. وقد تم جمع نواتج الفصل النازل من العمود في انابيب اختبار وبواقع 1 مل لكل انبوبة ثم اختبرت نقاوة تلك الانابيب باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) (Back and Liang, 2005).

ج- اختبار نقاوة المضاد الحيوي المستخلص

اختبرت نقاوة المضاد الحيوي المستخلص باستخدام تقنية كرموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) (Sherman and Fried, 1986)،
إذ استخدمت في هذه التقنية صفائح زجاجية رقيقة مغطاة بهلام السليكا جل وبابعاد (2× 10) سم، وقد تم تنشيط هذه الصفائح بوضعها في فرن بدرجة حرارة 100ºم لمدة ساعة. حمل مايقارب 5 مايكرولتر من المضاد الحيوي المستخلص على صفائح TLC ثم وضعت في حوض زجاجي مشبع بابخرة نظام التصعيد المكون من (ethyl acetate:hexane) وبنسبة (1:1). ثم استظهرت الصفائح باستخدام الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolat (UV) وباستخدام بخار اليود Iodine Vapor،
حُسب بعد ذلك معدل الجريان (R_f) للبقعة المستظهرة اعتماداً على القانون التالي:

$$\text{معدل الجريان } (R_f) = \frac{\text{المسافة التي قطعتها المادة من نقطة البداية}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب من نقطة البداية}}$$

جفف المضاد الحيوي المستخلص بوضعه في اطباق بتري نظيفة ومعقمة وبدرجة حرارة الغرفة. ثم اجريت اختبارات التشخيص الكيميائي المتمثلة بقياس الذائبية، درجة الانصهار، تقدير الوزن الجزيئي، طيف الاشعة فوق البنفسجية وطيف الاشعة تحت الحمراء (Vishnoi, 1979 ؛ Fieser and Williamson, 1975).

تحديد فعالية المضاد الحيوي المنتج

بعد اتمام عملية الاستخلاص والتنقية للمضاد الحيوي المستخلص تم تحديد فعاليته البايولوجية تجاه الجرثومتين *S. aureus* (NCTC 6571) و *E. coli* (NCTC 5933) باتباع طريقة Disk diffusion method (Bauer *et al.*, 1966)، إذ ذوب 100 ملغم من المضاد الحيوي في 10 مل من المحلول المعقم (DMSO:water) بنسبة (9:1) على التوالي، ثم تغمس اقراص ورقية معقمة بالفرن Oven بدرجة 100ºم لمدة ساعة في المضاد

واخرى في مزيج الاذابة وترك لمدة 24 ساعة للتشبع. يحضر وسط MHA وبعد تعقيمه يصب في اطباق زجاجية معقمة تلقح الاطباق بالعزلتين الجرثومتيين (NCTC 6571) *S. aureus* و (NCTC 5933) *E. coli* وبالطريقة السابقة الذكر، توضع الاقراص الورقية المشبعة بالمضاد وبمزيج الاذابة باعتبارها اقراص سيطرة بواسطة ملقط معقم فوق الوسط والملقح بالعزلات الجرثومية وتحضن الاطباق بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة سجلت النتائج بقياس اقطار منطقة التثبيط.

التحليل الاحصائي

تم التحليل الاحصائي للنتائج باستخدام اختبار تحليل التباين ANOVA test وباستخدام برنامج Minitab (الراوي وخلف الله، 1980).

النتائج

الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات التربة

اظهرت نتائج تحديد الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات التربة التي جمعت اثناء الدراسة، وجود تشابه في صفات تلك البيئات، إذ ظهرت انها متعادلة من ناحية الاس الهيدروجين ومعتدلة الملوحة ومتقاربة في درجة الحرارة، وكما مبين في جدول (1).

جدول(1): الصفات الفيزيائية والكيميائية لعينات التربة.

العينة	درجة الحرارة (°م)	الاس الهيدروجيني (pH)	الملوحة (موز/ سم^2)
تربة كرمة علي	31	7.4	1.42
تربة ابي الخصيب	33	7.2	1.38

عزل وتشخيص انواع السيانوبكتريا المعزولة خلال الدراسة

اظهرت نتائج عزل وتشخيص انواع السيانوبكتريا المعزولة من تربة منطقتي كرمة علي وابي الخصيب بوجود 8 انواع ،كما موضح في الجدول (2).

جدول (2): انواع السيانوبكتريا المعزولة من عينات التربة.

ت	انواع السيانوبكتريا
1	*Oscillatoria tenuis*
2	*Oscillatoria limnetica*
3	*Lyngbya diguetii*
4	*Lyngbya martensiana*
5	*Nostoc muscorum*
6	*Nostoc commune*
7	*Nostoc linkia*
8	*Nostoc ellipsosporum*

الغربلة الاولية لاختبار قابلية انواع السيانوبكتريا على انتاج مضادات حيوية

تباينت انواع السيانوبكتريا المختبرة في مدى فعاليتها الحيوية المضادة لكل من الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام جدول (3)، اذ امتلكت العزلات *Nostoc muscorum* و *N. commune* و *N. linkia* و *Oscillatoria tenuis* و *Lyngbya diguetii* فعالية مثبطة لجرثومة *S. aureus* (NCTC 6571) اما بقية العزلات فلم تظهر اي فعالية تثبيطية تجاهها. اما بالنسبة لجرثومة *E. coli* (NCTC 5933) فقد بلغ عدد العزلات المثبطة لها هو عزلتين فقط وهما *N. muscorum* و *N. commune* من اصل 8 عزلات.

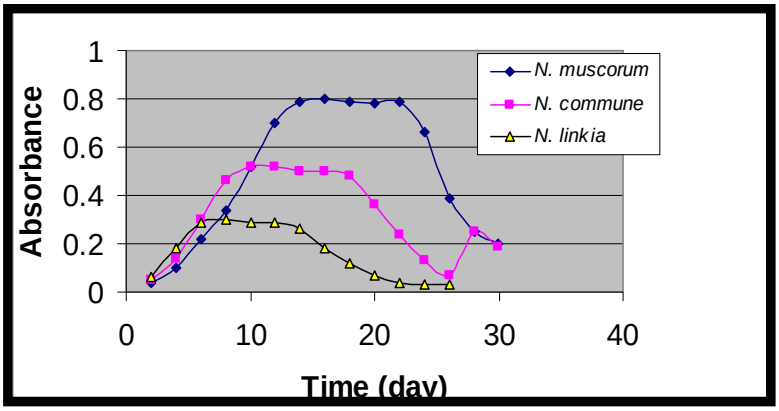
جدول(3) اختبار الفعالية التثبيطية لانواع السيانوبكتريا تجاه جرثومتي *S. aureus* (NCTC 6571) و *E. coli* (NCTC 5933)

ت	النوع	الفعالية التثبيطية	
		S.aureus (NCTC6571)	*E.coli* (NCTC5933)
1	*Nostoc muscorum*	+	+
2	*Nostoc commune*	+	+
3	*Nostoc linkia*	+	-
4	*Nostoc ellipsosporum*	-	-
5	*Oscillatoria tenuis*	+	-
6	*Oscillatoria limnetica*	-	-
7	*Lyngbya diguetii*	+	-
8	*Lyngbya martensiana*	-	-

(+): وجود فعالية تثبيطية . (-): عدم وجود فعالية تثبيطية .

ثم ركزت الدراسة الحالية على ثلاث انواع تعود الى جنس *Nostoc* وهم *Nostoc muscorum* و *N . commune* و *N. linkia* العائدة الى عائلة Nostocaceae ضمن الرتبة Nostocales .

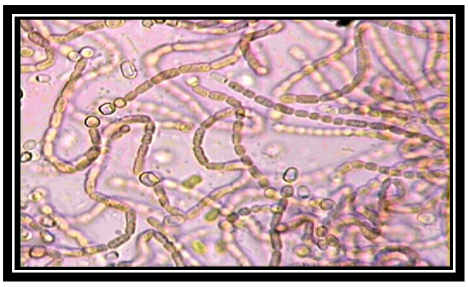
والمخطط التالي يوضح معدل النمو للعزلات الثلاثة :-



منحنى النمو للعزلات *N. muscorum* و *N. commune* و *N. linkia*

وصف جنس *Nostoc muscorum*

يتواجد هذا النوع بهيئة مستعمرات بنية اللون محاطة بمادة هلامية تظهر الخيوط بشكل كثيف ذات نهايات بيضوية الشكل،عادة الخلايا الخضرية شبه اسطوانية او شبه كروية الشكل يتراوح طولها ما بين (5-6) مايكروميتروعرضها (3-3.5)، اما بالنسبة الى الحويصلة المغايرة فتكون كروية او كروية مضغوطة الشكل، ويتواجد عادة على الترب الرطبة وفي المستنقعات الضحلة (صورة1).



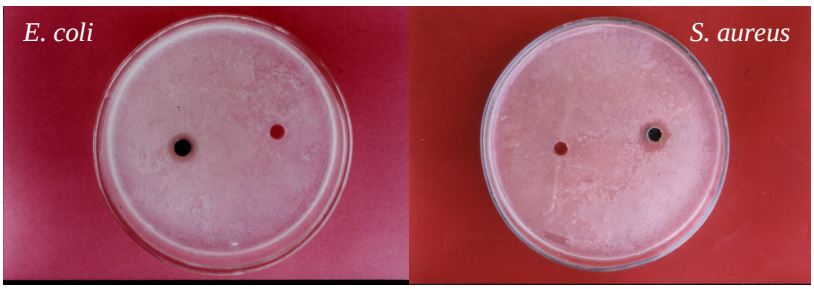
صورة (1): *Nostoc muscorum*. قوة التكبير (400x)

اختبار قابلية الانواع الثلاثة على افراز مضادات حيوية

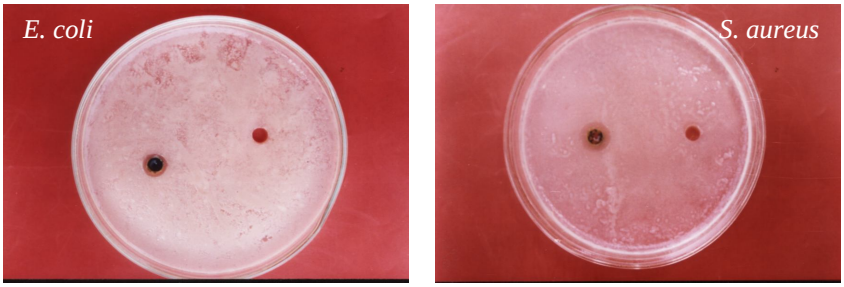
اوضحت النتائج المبينة في جدول (4) بان المستخلص الخام للعزلات الثلاثة *N. muscorum*، *N. commune* و *N. linkia* ذو فعالية بايولوجية متباينة تجاه كل من العزلات الجرثومية المرجعية الموجبة والسالبة لملون كرام، إذ امتلك النوع *N. muscorum* فعالية عالية تجاه جرثومة *S. aureus* (NCTC 6571) وبقطر تثبيط بلغ 12.5 ملم، يليه النوعين *N. commune* و *N. linkia* وبقطر تثبيط بلغ 9 ملم لكل منهما. اما بالنسبة لجرثومة *E. coli* (NCTC 5933) فقد امتلك النوع *N. muscorum* اعلى قطر تثبيط بلغ (10) ملم، يليه النوع *N. commune* بقطر تثبيط بلغ 7 في حين لم يمتلك النوع *N. linkia* أي فعالية تثبيطية (صور 2، 3، 4). واظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين الانواع الثلاثة وعند مستوى احتمالية ($p < 0.05$) حيث كانت العزلة *N.muscorum* ذات قدرة تثبيطية اعلى من بقية العزلات. اما العزلتين *Oscillatoria tenuis* و *Lyngbya diguetii* فقد اظهرت فعالية تثبيطية تجاه جرثومة *S. aureus* (NCTC 6571) وبقطر تثبيط بلغ 7 ملم لكل منهما ولم يمتلكا اي فعالية تثبيطية تجاه جرثومة *E. coli* (NCTC 5933).

جدول (4): تحديد فعالية المستخلص الخام لانواع السيانوبكتريا تجاه نمو السلالات الجرثومية.

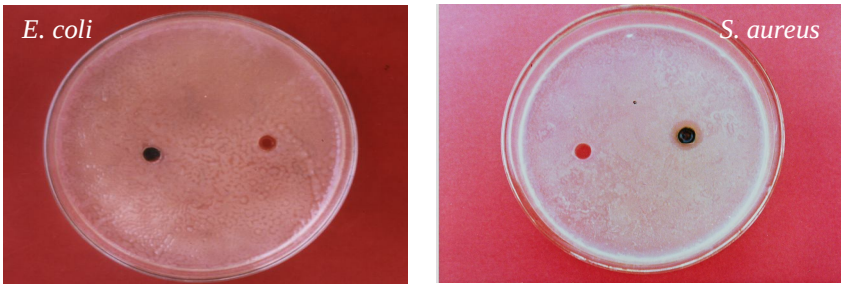
العـزلة	قطر منطقة تثبيط النمو (iz)mm	
	S. aureus (NCTC 6571)	*E. coli* (NCTC 5933)
N. muscorum	12.5	10
N. commune	9	7
N. linkia	9	0
O. tenuis	7	0
L. diguetii	7	0



صورة (2): الفعالية الحيوية لمستخلص العزلة *N. muscorum* تجاه الجراثيم



صورة (3): الفعالية الحيوية لمستخلص العزلة *N. commun* تجاه الجراثيم



صورة (4): الفعالية الحيوية لمستخلص العزلة *N. linkia* تجاه الجراثيم

اختبار افضل وسط تخمري

اظهرت نتائج اختبار قابلية العزلة *N. muscorum* على انتاج مضادات حيوية في الاوساط التخمريـة الثلاثـة (FM1، FM2، FM3) كفـاءة الوسـط التخمـري الثالـث FM3 مقارنـة مـع الوسطين الاخريين وكما مبين في الجدول (5)، اذ اظهر الوسط FM3 اعلى فعالية تثبيطية تجاه كل من العزلات الجرثومية المرجعية الموجبة لملون كرام (NCTC 6571) *S. aureus* والسالبة لملون كرام (NCTC 5933) *E. coli* وبقطر تثبط بلغ (15,18) ملم على التوالي، يليه الوسط الثاني FM2 والذي بلغت قيمة فعاليته التثبيطية تجاه جرثومة *S. aureus* (NCTC 6571) 14.5 ملم و12.5 ملم تجاه جرثومة (NCTC 5933) *E. coli*، اما الوسط FM1 فقد اظهر اقل فعالية تثبيطية مقارنة بالوسطيين الثاني والثالث وبلغت قيمتها (9 - 7.5) ملم تجاه كل من العزلات الموجبة والسالبة لملون كرام على التوالي، اما اطباق السيطرة فلم تظهر اي فعالية تثبيطية تجاه كل من الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام. كما اظهرت نتائج التحليل الاحصائي بوجود فروقات معنوية بين الاوساط الثلاثة وعند مستوى احتمالية ($p < 0.05$) اذ ان الوسط الانتاجي الثالث ذات كفاءة تثبيطية اعلى من بقية الاوساط.

جدول (5): الفعالية المضادة للجراثيم للمضاد المستخلص في الاوساط الانتاجية الثلاثة.

العزلة	الاوساط التخمرية	قطر منطقة تثبيط النمو mm(iz)	
		S. aureus (NCTC 6571)	*E. coli* (NCTC 5933)
N. muscorum	FM1	9	7.5
	FM2	14.5	12.5
	FM3	18	15

اختبار نقاوة المضاد الحيوي

اظهرت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ان المادة الفعالة هي عبارة عن مركب واحد نتيجة لظهور بقعة واحدة تعود للمضاد الحيوي المستخلص وبمعدل جريان R_f بلغ قيمته 0.52 كما مبين في صورة (5) وكان مشابهاً للمضاد الحيوي القياسي (الكربتوفايسين) والتي بلغت قيمة R_f له 0.53.

صورة (5): كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمضاد الحيوي المستخلص

التشخيص الكيميائي

أ- الذائبية

امتلك المضاد الحيوي المنتج ذائبية في كل من الماء، الميثانول، الايثانول، الاسيتون، خلات الاثيل، كلوريد المثلين، ثنائي مثيل سلفوكسايد، الكلوروفورم، البنزين والهكسان وغير ذائب في الايثر.

ب - درجة الانصهار

تراوحت درجة انصهار المضاد الحيوي المنتج (123- 124) °م وقد قورنت النتائج مع درجة انصهار المضاد الحيوي القياسي والتي بلغت (123) °م.

ج - تقدير الوزن الجزيئي

اظهرت نتائج تقدير الوزن الجزيئي للمضاد الحيوي المنتج ان وزنه الجزيئي يعادل (630.2) وكان مقارب للمضاد الحيوي القياسي والذي يعادل وزنه الجزيئي (638.5).

د- طيف الاشعة فوق البنفسجية

اشارت نتائج امتصاص طيف الاشعة فوق البنفسجية التي يظهرها المضاد المنتج والموضحة

في شكل (1) حيث بلغت اعلى امتصاصية عند الاطوال الموجية (218) نانوميتر و(280) نانوميتر و (315) نانوميتر.

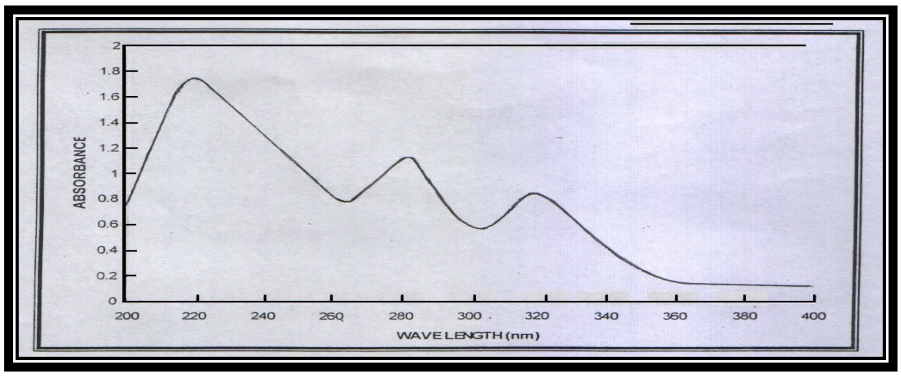
هـ - طيف الاشعة تحت الحمراء

سجل طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد المنتج كما في شكل (2) ويوضح الجدول (6) حزم الامتصاص والمجاميع التركيبية العائدة لها.

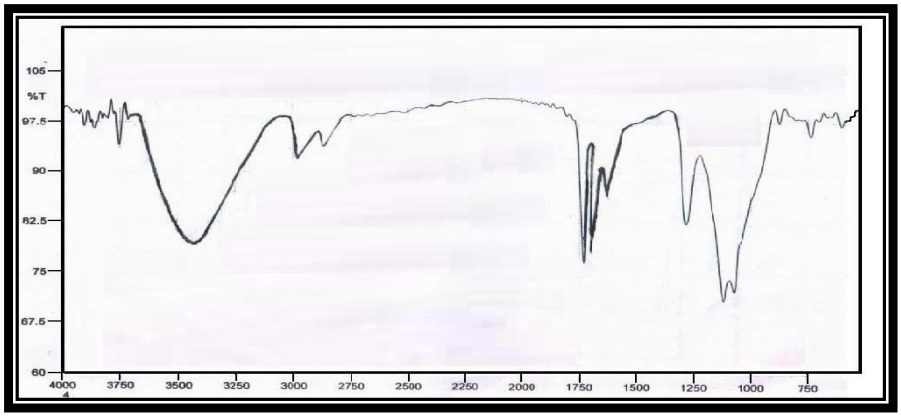
جدول (6): مواقع اهم حزم الامتصاص والمجاميع التركيبية العائدة لها في طيف الاشعة تحت الحمراء لكل من المضاد الحيوي القياسي والمنتج.

Band shape and frequency (cm^{-1})		Band	Mode of vibration	Functional group
Standard antibiotic	Extracted antibiotic			
3417(m)	3419(m)	N-H	Stretch	Amine group in amide bond
2961 and 2884(w)	2956 and 2878 (w)	C-H	Stretch	CH_2 and CH_3
1735 (s)	1730 (s)	C=O	Stretch	Carbonyl group in ester bond
1640 (s)	1645 (s)	C=O	Stretch	Carbonyl group in amide bond
1634 (m)	1625 (m)	C=C	Stretch	Double bond
1280 (m)	1278 (m)	C-O-C	Stretch	Asymmetrical in ether bond
1161 (s)	1150 (s)	C-O	Stretch	C-O group in ester bond
1079 (s)	1074 (s)	C-O-C	Stretch	Symmetrical in ether bond

s=strong m= medium w= weak



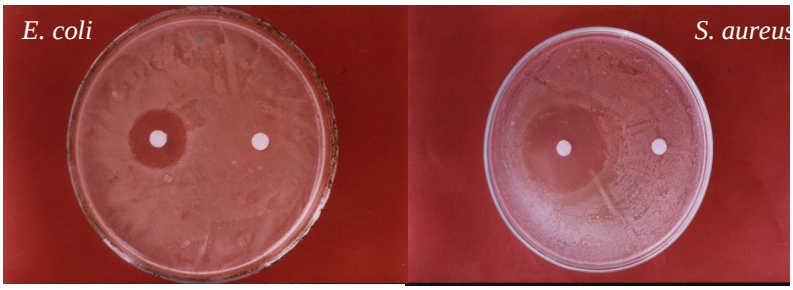
شكل (1): طيف الاشعة فوق البنفسجية للمضاد الحيوي المنتج.



شكل (2): طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد الحيوي المنتج.

تحديد فعالية المضاد الحيوي المنتج

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي (ANOVA) وجود فروقات معنوية عالية فيما بين فعالية المضاد الحيوي المستخلص في عملية الغربلة الاولية وبعد تنقيته، فقد لوحظ فعاليته بعد التنقية اكفأ مما عليه في الغربلة الاولية تجاه الجراثيم المرجعية الموجبة لملـــــون كرام *S. aureus* (NCTC 6571) والجراثيم المرجعية السالبة لملون كرام *E. coli* (NCTC 5933) وعند مستوى احتمالية ($p<0.05$)، فقد بلغ قطر منطقة التثبيط للمضاد الحيوي المنتج تجاه الجراثيم المرجعية الموجبة والسالبة لملون كرام (28 و22)ملم على التوالي (صورة 6).



صورة(6): فعالية المضاد الحيوي المنتج من العزلة *N. muscorum* تجاه الجراثيم

المناقشة

الغربلة الاولية واختبار قابلية العزلات على افراز المضادات الحيوية

اجريت عملية الغربلة الاولية لـ 8 انواع من السيانوبكتريا جدول (2) لاختبار قابليتها على افراز المضادات الحيوية وذلك لان انواع السيانوبكتريا لها القدرة العالية على انتاج مضادات حيوية ذات اهمية طبية (Soltani *et al.,*2005 ; Ehrenreich, 2003)، إذ تعد عملية الغربلة الاولية للمستخلصات الخام طريقة فعالة لمعرفة الكائنات الحية المنتجة للمضادات الحيوية (Burja *et al.*, 2001).

اعتمدت عملية استخلاص المركبات الفعالة من العزلات على اساس استخلاص مادة صلبة باستخدام مذيب سائل وفي هذه الحالة فان درجة ذوبان المركبات الفعالة في المذيب المستخدم تعد عاملاً اساسياً في تحديد مدى نجاح عملية الاستخلاص (الساجدي ومحمد علي، 1987)، وبالاعتمادعلى هذا المبدأ فقد استخدم مذيب الميثانول المطلق في استخلاص مجفف العزلات، اذ يعد الميثانول المطلق من المذيبات المستخدمة بنطاق واسع في استخلاص المواد والمركبات الفعالة من السيانوبكتريا(Ostensvik *et al.* , 1998 ;Ghasemi *et al*., 2003) لكونه ذات قطبية عالية فيعد مذيبا فعالا لكثير من المركبات فضلاً عن ان درجة غليانه 64.7 ^{o}م مما يتيح امكانية التخلص منه بسهولة (Rivere, 1977). تم تحديد الفعالية البايولوجية للمستخلص بطريقة الانتشار في الاكار كونها طريقة شائعة الاستعمال في اختبار فعالية مستخلصات السيانوبكتريا ضد الجراثيم (Al-Aarajy and Al-Deelami, 1997) وتعطى هذه الطريقة نتائجا واضحة لفعالية المستخلصات بسبب تركز المركبات الفعالة حول جوانب الحفرة

(Vlachos *et al.*, 1996). وقد بينت نتائج الجدولين (3 و4) ان العزلة *N. muscorum* قد اظهرت فعالية تثبيطية عالية وذات فرق معنوي ($p<0.05$) ضد نمو السلالات المرجعية المستخدمة اعلى من بقية العزلات فقد ذكر Bloor and England, (1989) ان هذا النوع له القدرة على انتاج المضادات الحيوية مثل Muscoride.

عملية التخمر

تتم عملية انتاج المضاد الحيوي بوساطة الكائن المجهري النامي في الوسط الغذائي السائل لكونه يعطي صورة افضل للاستجابات الغذائية والفيزيائية والانتاجية للكائن الحي المجهري الى الظروف الفعلية للانتاج (Kim, 2004)، فالوسط الزرعي يجب ان يكون ذا صفات ومكونات معينة لكي يكون فعالاً في انتاج المنتوج المرغوب (Maria, 2001). إذ تلعب ظروف المزرعة دوراً كبيراً في تغير كمية ونوعية المنتجات، فمن الممكن زيادة انتاج المضادات الحيوية او انتاج مضادات حيوية جديدة بتغير مكونات الوسط اوالظروف الزرعية مثل الاس الهيدروجيني pH ودرجة الحرارة والتهوية وفترة الحضن (Mehdi *et al.*, 2002 ; Iwai and Omura, 1982). كما ان وجود بعض المحفزات في الوسط يؤثر ايضاً في عملية انتاج المضادات الحياتية (Kamei *et al.*, 1991). فيجب اختيار وسط زرعي ملائم لغرض زرع الاحياء المجهرية فمن خلاله يتم الكشف عن قدرة الاحياء على انتاج مواد ايضية مضادة للاحياء المجهرية (Egrove, 1985)، لذلك استخدمت في عملية الانتاج ثلاثة اوساط تخمرية (FM1، FM2، FM3) للتحري عن انتاج مضادات حيوية من قبل العزلة *N. muscorum*. وقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية (جدول 5) ان الوسط التخمري الثالث FM3 المستخدم لانتاج المضاد الكربتوفايسين من العزلة *N. muscorum* كان اكثر ملائمة للانتاج مقارنةً مع الوسطين الاخرين (FM1, FM2)، وهذه النتيجة مشابهة لنتيجة كلاً من (Back and Liang, 2005 ; Tius, 2002) (عند دراستها على السلالتين *Nostoc* sp. (ATCC53789) و *Nostoc* sp. (GSV224) لانتاج المضاد الحيوي المضاد للاورام الكربتوفايسين باستعمال الوسط التخمري الثالث، فقد ذكروا انه افضل الاوساط لانتاج هذا المضاد، لانه غني بمصدر النتروجين المتمثل بنترات الصوديوم ($NaNO_3$) بنسبة 1.5غم/ لتر، يليه الوسط FM2 ثم الوسط FM1 بنسبة 1غم/ لتر من نترات الصوديوم و0.205غم/ لتر من نترات الصوديوم وكلوريد الامونيوم (NH_4Cl) على التوالي، لذلك اعتمد الوسط FM3 في التجارب اللاحقة لانتاج المضاد الحيوي الكربتوفايسين.

ومما يؤكد هذه النتيجة ما اشار اليه الركابي (2002) ان زيادة نترات الصوديوم في الوسط سوف تزيد من معدل النمو، وقد ذكر Egorov (1985) انه غالباً ما يحصل اقصى انتاج من المضادات الحيوية بعد بلوغ اكبر وزن من الكتلة الحيوية. فالنتروجين يدخل في تراكيب متعددة لاجزاء الخلية لذلك يجب ان يتوفر في المزرعة مصدر يحتوي على النتروجين تتمكن الاحياء المجهرية من استغلاله، وتلعب هذه المصادر (نترات الصوديوم) دوراً مهماً في تركيب الاحماض الامينية والبروتين والنيوكليوتايد وبعض الفيتامينات فهو يشكل حوالي 8-14 % من الوزن الجاف للخلايا (السعد،1982 ; الخفاجي, 1990). ويتفق ذلك مع دراسات سابقة اجريت من قبل الباحثين El-Sheekh *et al*. (2006) الذين ذكروا ان زيادة تركيز النتروجين في وسط العزلة *N. muscorum* تؤدي الى زيادة انتاج المضادات الحيوية، وبين الباحث Golden (2004) ان الفعالية القاتلة للجراثيم bactericidal ترتبط مع زيادة مكونات النتروجين في وسط السيانوبكتريا.

استغرقت عملية الانتاج 20 -23 يوم بدرجة حرارة تراوحت 27±2 °م واس هيدروجيني 7.2- 7.0 وشدة اضاءة 50 -75 Lux لمدة 8:16 ساعة أضاءة : ظلام وهذه الظروف الزرعية توافق الظروف المثلى لانتاج العديد من المضادات الحيوية من جنس *Nostoc* (Bloor and England ,1989 ؛ Ghasmi *et al.*, 2003).

استنتاج التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي المنتج

اعتماداً على النتائج المبينة على اساس الاختبارات الكيميائية والفيزيائية والتشخيصية والطرائق الطيفية التي اجريت على المضاد الحيوي المنتج ومقارنتها مع المضاد الحيوي القياسي. نستنتج ان المضاد الحيوي المنتج هو نفسه المضاد الحيوي القياسي الكربتوفايسين Cryptophycin، إذ ساهمت مكونات الوسط الانتاجي وظروف الزرع المستخدمة من اس هيدروجيني ودرجات حرارة وفترة حضن في تخليق المضاد حيوياً بوساطة العزلة *N. muscorum*.

تحديد فعالية المضاد الحيوي المنتج

اظهرت النتائج زيادة ملحوظة في فعالية المضاد الحيوي بعد تنقيته تجاه كل من العزلات الجرثومية الموجبة والسالبة لملون كرام مؤشرة زيادة في اقطار التثبيط وبفروق معنوية مقارنة مع المستخلص الخام لان عملية التنقية تخلصت من معظم المركبات والمواد الموجودة في المستخلص الخام وابقت المركبات ذات الفعالية العالية تجاه الجراثيم

(Naviner *et al.*, 1999) . وكما يعد الكربتوفايسين من المضادات الواسعة التاثير Broad spectrum لانه يؤثر على كل من الجراثم الموجبة والسالبة لملون كرام واتفق هذا مع ما توصل اليه الباحث (Yang, 2001).

المصادر

الجعفر، أحمد محسن عذبي جعفر (2004). دراسة محتوى بعض الطحالب الدقيقة من الفيتامينات. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة البصرة.

الخفاجي، زهرة محمود (1990). التقنية الحيوية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز، محمد خلف الله (1980). تصميم وتحليل التجارب الزرعية. كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل. دار الكتب للطباعة والنشر.

الركابي، حسين يوسف خلف (2003). استعمال المزارع الكتلوية لبعض انواع الطحالب الدقيقة في تغذية الدجاج، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة البصرة.

الركابي، واثق جاسم محمد (2002). دراسة بيئية فسلجية لطحلب *Microcystis aeruginosa*. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل.

السعد، مها رؤوف (1982). مبادئ فسلجة الاحياء المجهرية، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

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

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

Al-Aarajy, M. and Al-Deelami, A. (1997). Bioassay on the activity of water extract of certain cyanobacteria. Marina Mesopotamica 12(2):303-314.

Al-Mousawi, A. (1984). Biological studies on algae in Rice-field soil from the Iraq marshes. Ph.D. Thesis, Univ. Durham. England.

Back, S. and Liang, J. (2005).Production of cryptophycin from blue-green algae. J. of Young Investigator,13 (4).

Barry, A. (1990). Procedure for Testing Antibiotics in Agar media: Theoretical Consideration. In: Lorian, V. (ed.). Antibiotics in Laboratory Medicine, 1-23. Williams and Williams and Wilkins. Baltimore. London.

Bauer, A.; Kinby, W.A. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardization single discs. Amer. J. Clin. Pathol, 45:493-496.

Biondi, N.; Piccardi, R. ;Margheri, M. ;Rodolifi, L. ;Smith, G. and Tredici, M. (2004). Evalution of *Nostoc* strain ATCC 53789 a patential source of natural pesticides. Appl. Environ. Microbio., 70 (6):3313.

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

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

Desikachary, T.V. (1959). Cyanophyta. Indian concil of agricultural research. New Delhi. India.

Egorov, N.S. (1985). Antibiotics scientific approach. 1st ed. Mir publishers, Moscow, 440.

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

El-Sheekh, M.M.; Osman, M.E.; Dyab, M.A. and Amer, M.S. (2006). Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum.* Environmental Toxicology and Pharmacology.12 (1):42-50.

Fieser, L.F. and Williamson, K.L. (1975). Organic Experiment. 3rded. D.C. Health and company. Lexington, Masschusetts, Toronto, London, 366-368.

Ghasemi, Y.; Tabatabae, M.; Shokravi, S.; Soltani, N. and Zarrini, G. (2003). Antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 14(3):203-209.

Goldin, E.B. (2004). Antibacterial activity of pure cultures of cyanobacteria and algae. Microbiol, 65(4):68-76.

Hirsch, C.; Liesch, J.; Salvatore, M. and Sesin, D. (1990). Antifungal fermentation product and method.USA., Patent, 4:836-946.

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

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

Kamei, H. Nishiyama, Y.; Takahashi, A. and Obi, Y. (1991). Dynamics,new antibiotics with the 1.5 diynzene and anthraquinone sub unit-11.J.Antibiot., 44:1311.

Katzung, B.G. (1989). Basic and clinical pharmacology. 4thed.East Norwalk. Appleton and longe, 79-85.

Kim, S. (2004). Industrial application of biotechnology. Chem. And Bio. Eng. (Intern

Maria, F.; Tima, V.Q.; Carios, E. and Nei, P.J. (2001) .A chemical defined medium for production of Actinomycin D by *Streptomyces parvulus.* Braz. Biol. Technol., 44(3).

Mc Guire, R.F. (1984).Numerical taxonomic study of *Nostoc* and *Anabaena.* J. Phycol., 20:454-460.

Mehdi, K.H. and Al-Mousawi, N.J. (1999). Isolation and activity of antibiotic agent produced by *Oscillatoria amoena.* Marina Mesopotamica, 14(2):257-264.

Mehdi, K.H.; Al-Hejuje, M.M.; Al-Mousawi, N.J. (2002). Utilization of chemical and physical mutagens for increasing antibiotic production from *Oscillatoria amoena* isolated from Shatt Al-Arab. Iraqi Journal of Biology. 2(2):469-478.

Moore, R.; Smith, D.; Patterson, M. and Susan, L. (1996). The search for new anti-tumor drugs from blue-green algae. Current Pharmaceutical Design, 2:317-330.

Naviner, M.; Berge, J.B.; Durand, P. and Lebris, H. (1999).

Antibacterial activity of the marine diatom *Skeleletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture.174:15-24.

Ostensvik, O.; Skulberg, O.M.; Underdal, B. and Hormazabal, V. (1998). Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria-a comparative study of bacterial bioassays. Journal of Applied Microbiology, 84:1117-1124.

Panda, D.; Himes, H.; Moore, E.; Wilson, L. and Jordan, A. (1997). Mechanism of action of unusually patent microtubule inhibitor cryptophycin. Biochemistry, 36:12948-12953.

Pratt, W. (1994). The anticancer drugs. 2nded. Oxford Univirsity, New York.

Prescott, G. (1975). The Algae: A review. 1sted. Thomas Nelson and Sons Ltd., London. 135-155.

Riviere, J. (1977). Industrial application of microbiology. Surry University press in association with internationaltextbook company.

Schwartz, R.; Hirsch, C.; Sesin, D.; Flor, J.; Chartrain, Yudin, K. (1990). Pharmaceuticals from cultured algae. J. Ind. Microbiol., 5:113-124.

Smith, C. and Zhang, X. (1996). Mechanism of action of cryptophycin. J.B.C., 271(11):6192-6198.

Soltani, N.; Khavari-Nejad, R.; Tabtabaei, M.; Shokravi, E. and Fernadez, V. (2005). Screening of soil cyanobactria for antifungal and antibacterial activity. Formmerly Inernational Journal of Pharmacognosy, 43:5.

Stein, J.R. (1973). Handbook of Phycological methods. Cambridge Univ. Press., Cambridge, 445.

Tamagnini, P.; Axelsson, R.; Lindberg, P.; Oxelfelt, F.; Wunschiers, R. and Lindblad (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66(1):1-20.

Tius, M.A. (2002). Synthesis of the cryptophycin. Tetrahedron, 58, 4343.

Vishnoi, N. (1979). Advanced practical organic chemistry. Printed at Skylark Printers, India, 411-437.

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

Weidman, V.E.; Walne, P.R. and Tainor, F.R. (1984). Anew technique for obtaining axinic culture of algae. Can.J.Bot., 42:985-995.

Yang, Z. (2001). Trip Report: 35thMidwest Regional Meeting of the American Chemical Society Saint Louis. Albany Molecular Researh, 5(18):1-8.

Isolation and Identification of Antibiotic Cryptophycin from Cyanobacteria *Nostoc muscorum* Isolated from Iraqi Soil

[1]Al-Aarajy, M.K., [2]Zeara, S.T., [3]Al-Mazini, M.A.

[1]Center of Marine Science- University of Basrah. [2,3]Department of Biology- College of Science University of Basrah.

Abstract

The study is included isolation and identification of eight species of cyanobacteria from 12 soil samples from Garmat-Ali and Abu-Alkhaseeb in Basrah city. The isolated species have been grown and multiplicated at laboratory condition:Temperature (27±2) ºC and illumination (150-175) Lux for (16:8) hours light : dark cycle. The ability of these species of these species to produce antibiotics against reference strains of the gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) (gram positive) and the gram negative bacteria, *Escherichia coli* (NCTC 5933) (gram negative) was tested. Isolate of *N*ostoc *muscorum* show inhibition activity with wilde inhibition diameter compared with other isolates.

The ability of *N.muscorum* to secrete antibiotics in the three different fermentation media was tested, the results showed differences in the production of the antibiotiocs between the three different media and the higher productivity was clear in the third medium which showed remarkable activity against bacterial isolates.

The antibiotic was purified by using column chromatography technique and assistance the purification of antibiotic was done by using thin layer chromatography (TLC). The produced antibiotics were identified as cryptophycin by determination of: melting point MP), molecular weight and other chemical tests in addition to ultra-violet UV) and infra red spectroscopy (IR). The results of all above tests were showed the similarity between the produced antibiotic aest standard cryptophycin.