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

ISSN –1817 –2695

تشخيص المركبات السامة Tributyl acetylcitrate و 1,2–Benzenedicarboxylic acid من الطحلب الأخضر – المزرق *Lyngbya aeruginosa* Menegh. ex Gomont

أحمد محسن عذبي و علي عبد اللطيف العلي و أساور سليم محمدعلي الطائي

قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة البصرة

E-mail:athbi 62 @yahoo.com

الاستلام 2013/12/7 ، القبول 2014/2/23

الخلاصة

عُزل الطحلب الأخضر المزرق *L. aeruginosa* Menegh.ex Gomont من شط العرب في جنوب محافظة البصرة وتم أكثاره على الوسط الزرعي المحور Chu-10 . شخص المركبين Tributyl acetylcitrate و 1,2-Benzenedicarboxylic acid بأستعمال تقنية كروماتوغرافيا الغاز- طيف الكتلة Gas Chromatography Mass [GC-mass] .

الكلمات المفتاحية :الطحلب الأخضر– المزرق *Lyngbya aeruginosa* ، Tributyl acetylcitrate,1,2-Benzenedicarboxylic acid ، تقنية كروموتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة .

1.المقدمة

ينتج من النشاطات الحيوية للطحالب الخضر المزرقة مجموعة من المركبات الأيضية منها مقادير من مركبات الأيض الثانوي secondary metabolites التي يكون لبعضها تأثيرات سلبية على البيئة المائية وعلى الكائنات الحية التي تعيش معها بل وحتى على حياة الأنسان [1,2] من خلال قابلية بعض أنواعها على أنتاج المركبات السامة التي يطلق عليها السموم الطحلبية [3,4,5] ومن أهم الأجناس الطحلبية المنتجة للسموم هي *Lyngbya* و *Microcystis* و *Oscillatoria* و *Nostoc* و *Cylinderospermopsin* [6,7].

يعد جنس *Lyngbya* من الطحالب السامة وغالباً مايكون بشكل خيوط طويلة غير متفرعة يكون طول الخلايا أقصر من عرضها وتحاط الخيوط بغلاف أو غطاء يدعى Sheath يتكون من مادة هلامية Mucilage وكمية قليلة من السليلوز [8] ، وهو أما أحادي الطبقة unilayer أو ثنائي الطبقة bilayer وأوضحت الدراسات أن هذا الغلاف يستخدمه الطحلب كوسيلة تكيفية Adapted لمقاومة الظروف البيئية غير الملائمة [9]. وأن معظم أنواع هذا الجنس تكون أما ملتصقة على المواد القاعية أو طافية على السطح أو هائمة . وقد تم عزل وتشخيص عدد من السموم الطحلبية

من الأنواع التابعة لهذا الجنس ومنها المركب Lyngbyabellin A and B الذي عُزل من النوع *L.majuscula* وهو من السموم الخلوية [10,11] كما تم عزل المركبين Lyngbyatoxin و Aplasiatoxin من هذا النوع أيضاً وهي من السموم الجلدية [12,13] أما النوع *L.wollei* الذي يتواجد في بيئة المياه العذبة فقد تم عزل المركب Saxitoxin منه وهو من السموم العصبية Neurotoxin [14,15] .

ونظراً لأهمية موضوع السموم الطحلبية وتعدد أشكال الضرر الناتجة منها على الكائنات الحية وعلى طبيعة النظام البيئي المتواجدة فيه من جهة ولقلة الدراسات المحلية المتعلقة ببعض أنواع الطحالب الخضر المزرقة السامة وخاصةً جنس *Lyngbya* من جهة أخرى لذا جاءت أهمية الدراسة الحالية في تشخيص المركبات السامة للطحلب الأخضر– المزرق *L.aeruginosa* بتقنية كروماتوغرافيا الغاز– طيف الكتلة .

2.المواد وطرائق العمل

1.2:جمع العينات

جمعت العينات المائية بصورة عشوائية من شط العرب في جنوب محافظة البصرة لغرض عزل الطحلب *Lyngbya* أذ جلبت العينات المائية مباشرة إلى المختبر بواسطة قناني بلاستيكية حجم 500 مل معدة لهذا الغرض وذلك للكشف عن النوع الطحلبي المراد عزله .

2.2:عزل وتنقية الطحلب وتشخيصه

فُحصت العينات بأستخدام المجهر الضوئي نوع Olympus وذلك من خلال تحضير الشرائح المجهرية للتأكد من النوع المراد عزله ثم زرع على الوسط الزرعي الصلب Solid media باستعمال طريقتي التخطيط Streaking method والنشر Spreading method وصولاً إلى المزرعة وحيدة الطحلب وحسب طريقة [16] وقد أستعمل الوسط الزرعي Chu-10 المحور من قبل [17] بعدها شخص الطحلب بالاعتماد على [18] .

Division : Cyanophyta
Class: Cyanophyceae
Order : Oscillatoriales
Family : Oscillatoriaceae
Genus : *Lyngbya*
Species : *Lyngbya aeruginosa*
Menegh. ex Gomont

نُقيت المزرعة الوحيدة الطحلب بالأعتماد على [19] .

4.2:أكثار العزلات وحصادها

تم أكثار العزلات النقية بأستخدام مزارع الوجبات Batch cultures أذ تم تحضير الوسط الزرعي السائل 500ml Chu-10 ولقح بواسطة العزلات النقية 30ml ، نقلت الدوارق حجم 500 مل الى كابينة النمو تحت درجة حرارة (25±2 مه) وإضاءة تراوحت بين (130–150) مايكروانيشتاين / م^2 /ثا ولمدة 16 : 8 ساعة إضاءة : ظلام بعدها رجت المزارع بأستمرار وحصدت في منتصف الطور المستقر وحفظت في قناني زجاجية محكمة الغلق تحت درجة حرارة - 18 مه [20] .

5.2:قياس معدل النمو

تم تحديد منحنى النمو بدلالة الوزن الجاف للطحلب Dry weight اذ تم زرع العزلات الطحلبية في عدد من أنابيب الاختبار وبوقت واحد , وضع في كل أنبوبة 9 مل من الوسط الزرعي السائل Chu- 10 وأضيف اليه 1 مل من العزلة الطحلبية ، حضنت الأنابيب في كابينة النمو تحت ظروف الزرع المشار أليها في الفقرة (2-4) تم تركيز العينات الطحلبية باستخدام جهاز الطرد المركزي اذ وضع الراسب (الوزن الطري للطحلب) على ورقة ترشيح معلومة الوزن ثم نقلت الورقة ومحتوياتها الى فرن كهربائي بدرجة حرارة 70 مه ولمدة 24 ساعة بعدها وزنت بميزان حساس بعد إهمال وزن الورقة ، سجلت القراءات

ابتداءً من وقت التلقيح وبمرور الزمن تم تحديد معدل النمو والذي قدر بطريقة [21] .

6.2:أستخلاص المركبات السامة من الطحلب

تم استخلاص المركبات السامة اذ تم بأخذ وزن قدره 1gm من المادة الطحلبية المجفدة ووضعت في دورق زجاجي يحتوي على 50 مل من الكحول الاثيلي تركيز 80 % والمضاف اليه حامض الخليك لتصبح درجة حامضيته pH=3.5 مزجت العينات جيداً بأستعمال الجهاز الحركي المغناطيسي Magnetic stirrer لمدة (1- 3) ساعة في درجة حرارة الغرفة 30 مº ثم نقل الدورق الى الثلاجة بدرجة حرارة 4 مº لمدة 12 ساعة لغرض التشبع الكامل بعدها تم فصل الراسب عن الراشح بعملية الفلترة باستخدام قمع الترشيح Buchner funnel ، جمع الراشح وركز باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator وحفظ تحت درجة حرارة - 18مº لحين الاستعمال [22] .

7.2:تشخيص المركبات السامة بأستخدام جهاز كروموتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة

تم تشخيص بعض المركبات السامة من الطحلب الأخضر – المزرق *L.aeruginosa* باستعمال تقنية Gas Chromatography [GC-mass] في مختبرات كلية الزراعة / جامعة البصرة .

3.النتائج

1.3:وصف الطحلب

طحلب أخضر مزرق خيطي الشكل يكون بشكل خيوط طويلة غير متفرعة تحاط بغلاف جيلاتيني Sheathعديم اللون مكون من طبقة واحدة ، يتراوح عرض الخلية بين [7.5- 8.1] مايكرومتر وطولها [3- 3.9] مايكرومتر .تكون الخلايا القمية مستديرة Rotund أو قبعية Capitate [الشكل 1]، يتواجد الطحلب في بيئة المياه العذبة ملتصقاً على الصخور الرطبة .

2.3: معدل النمو

لوحظ أن الطحلب يبدأ بالطور الأسي Lag Phase في اليوم الخامس من زراعته والمتمثل بالزيادة المطردة في عدد خلاياه حتى اليوم الثاني عشر أذ نهاية الطور الأسي وبداية طور الأستقرار Stationary phase الذي أستمر الى اليوم السادس عشر ليبدأ طور التناقص Decline Phase بعد ذلك في اليوم السابع عشر[الشكل2] وعليه تم حصاد الطحلب في منتصف طور الأستقرار أي في اليوم الرابع عشر حيث بلغت قيمة ثابت النمو (K) للطحلب 0.287 ، أما زمن تكاثر الجيل (G) فقد بلغ 1.04.

3.3:طيف الكتلة بتقنية كروموتوغرافيا الغاز GC-mass

1 - طيف الكتلة للمركب رقم [1]: يبين الشكل [3] طيف الكتلة للمركب رقم [1] الذي فصل بزمن أحتباس قدره 17.861 دقيقة ومن خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبياً ثبت أنه المركب Tributyl acetylcitrate وصيغته الكيميائية C20H34O8 ووزنه الجزيئي 402 دالتون ويشغل مساحة قدرها 36.24 % من المجموع الكلي لمساحة المركبات المشخصة.

2- طيف الكتلة للمركب رقم [2]: يبين الشكل [4] طيف الكتلة للمركب رقم [2] الذي فصل بزمن أحتباس قدره 22.202 دقيقة ومن خلال مطابقة هذا المركب مع قاعدة المعلومات حاسوبياً ثبت أنه المركب 1,2-Benzenedicarboxylic acid وصيغته الكيميائية C16H22O4 ووزنه الجزيئي 278 دالتون ويشغل مساحة قدرها 13.62% من المجموع الكلي لمساحة المركبات المشخصة .

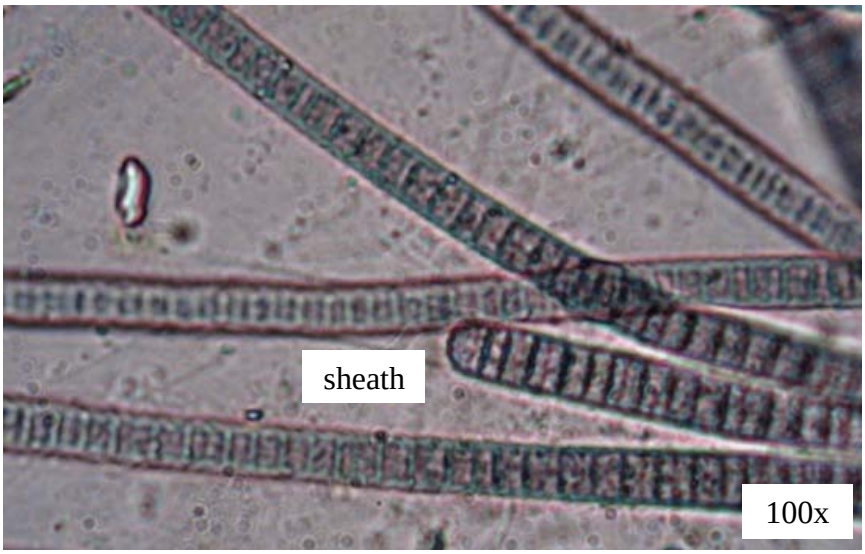
4.المناقشة

يضم جنس *Lyngbya* أكثر من 70 نوعاً [23] ألا أن الدراسات تناولت عدد قليل منها لذا تم في الدراسة الحالية تشخيص نوع واحد منه وهو *Lyngbya aeruginosa* من البيئة المائية المحلية في جنوب محافظة البصرة .

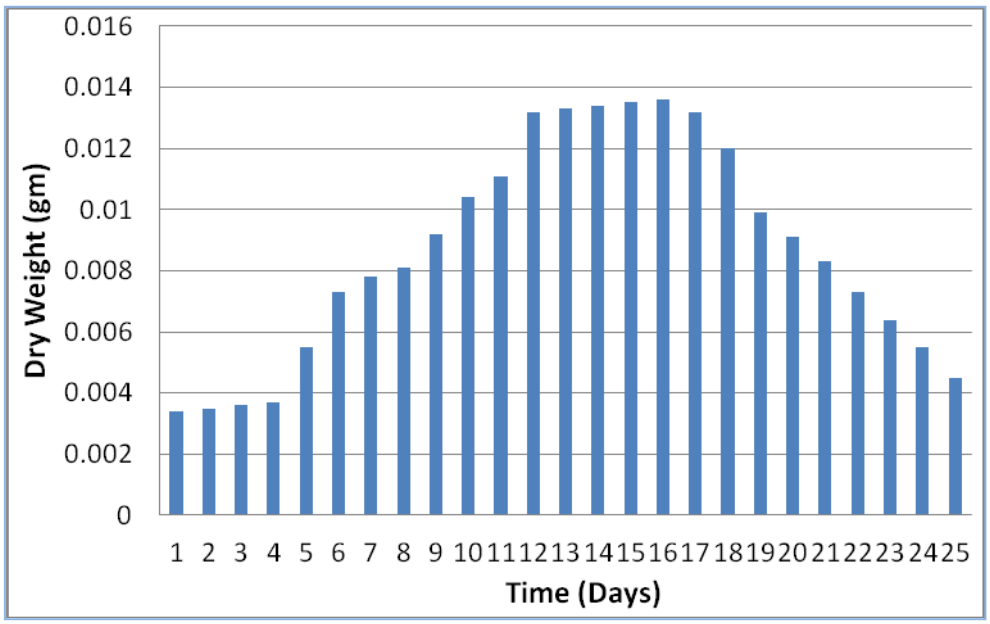
تم قياس معدل النمو بدلالة الوزن الجاف Dry weight أذ لوحظ أن الطحلب بدأ بالطور الأسي Lag phase في اليوم الخامس من زراعته ويستمر لغاية اليوم الثاني عشر بعدها يبدأ طور الأستقرار Stationary Phase في اليوم الثالث عشر ويستمر لغاية اليوم السادس عشر حيث تستقر الخلايا في حجمها ويكاد الأنقسام يكون متوقفاً بعد ذلك يبدأ طور التناقص أو الموت Declin phase في اليوم السابع عشر حيث تستنفذ المغذيات الموجودة في الوسط الزرعي السائل ويتحلل الجدار الخلوي للخلايا الطحلبية وبالتالي يؤدي ذلك الى موت الخلايا وتحللها لذلك تم حصاد العزلة الطحلبية في منتصف طور الأستقرار أي في اليوم الرابع عشر . تم تجفيد المزارع الطحلبية بعد حصادها لغرض أستخدامها في تحضير المستخلص الكحولي لتشخيص المركبات السامة بأستخدام جهاز GC-mass لذلك أثبت التحليل على أساس البيانات المتوفرة في الجهاز المذكور أن المستخلص الكحولي الخام يحتوي على بعض المركبات السامة هي المركب Tributyl acetylcitrate و 1,2-Benzenedicarboxylic acid يمتلك هذين المركبين أكبر مساحة من المجموع الكلي لمساحة المركبات المشخصة بوساطة جهاز GC-mass [24].

أثبتت العديد من الدراسات أن المركبات السامة التي تنتجها بعض الأنواع الطحلبية التابعة الى جنس *Lyngbya* تؤدي الى حدوث تغيرات نسجية مرضية في أعضاء الحيوانات المختبرية أذ أوضح [25] أن النوع *L.majuscula* الذي ينتج المركب Lyngbyatoxin A يؤدي الى حدوث تغيرات نسجية مرضية في خلايا المعدة والأمعاء والرئة للفئران المختبرية المجرعة فموياً بهذا المركب أذ تمثلت التغيرات المرضية في المعدة والأمعاء بحدوث نزف وتآكل Erosion في خلايا المعدة والأمعاء الدقيقة والغليظة والمعي الأعور Cecum بالأضافة الى حدوث أضرار في الشعيرات الدموية لزغابات الأمعاء الدقيقة وقرحة Ulcer في الأمعاء الغليظة بينما تمثلت التغيرات المرضية في الرئة بحدوث ألتهابات ووذمات Odema في مساحات صغيرة من الحويصلات الهوائية Alveoli. وتناولت دراسة [26] تأثير المستخلص الطحلبي *Lyngbya arugineo – coerulea* على كبد الفئران المختبرية المحقونة تحت الغشاء البريتوني أذ لوحظ حالة التسمم الكبدي والتنكس الجيبي الفجوي بالأضافة الى زيادة عدد الخلايا التي تمر بعملية الأنقسام الخيطي Mitosis .

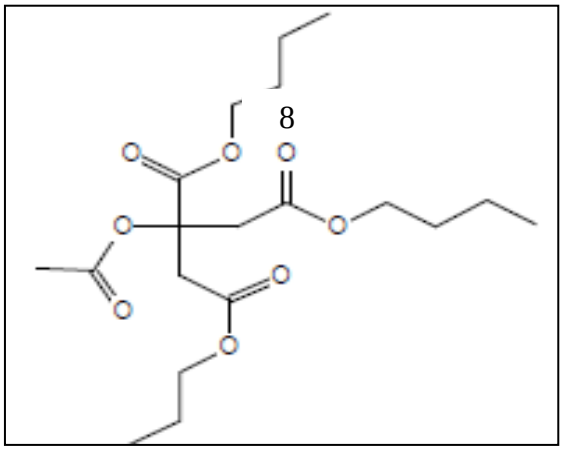
وتناولت دراسة [27] التأثير السمي للطحلب *L. martensiana* على غلاصم وكبد وكلى وأمعاء سمكة سيفية الذنب *Xiphophorus helleri* وأجنتها أذ تمثلت التغيرات النسجية في الغلاصم بأنفصال النسيج الظهاري للصفائح الغلصمية الثانوية وتغير شكلها المستقيم وفي الكبد لوحظ أحتقان في أشباه الجيوب الكبدية وحدوث تنكس فجوي واسع أضافة لحدوث تغيرات في أنوية الخلايا الكبدية كما تنخرت الخلايا الظهارية في النبيبات الكلوية في الكبد والزغابات في الأمعاء على التوالي ولوحظ تجمع لمواد غير حية في سايتوبلازم الخلايا الظهارية للزغابات وفي الأجنة سجلت حالات لتشوه العمود الفقري وحزام الكتف أضافةً الى تغيرات مرضية نسجية حدثت منذ المراحل الجنينية المبكرة تمثلت بأنسدلد القناة العصبية للحبل العصبي وظهور وذمات كبيرة في الجنين .

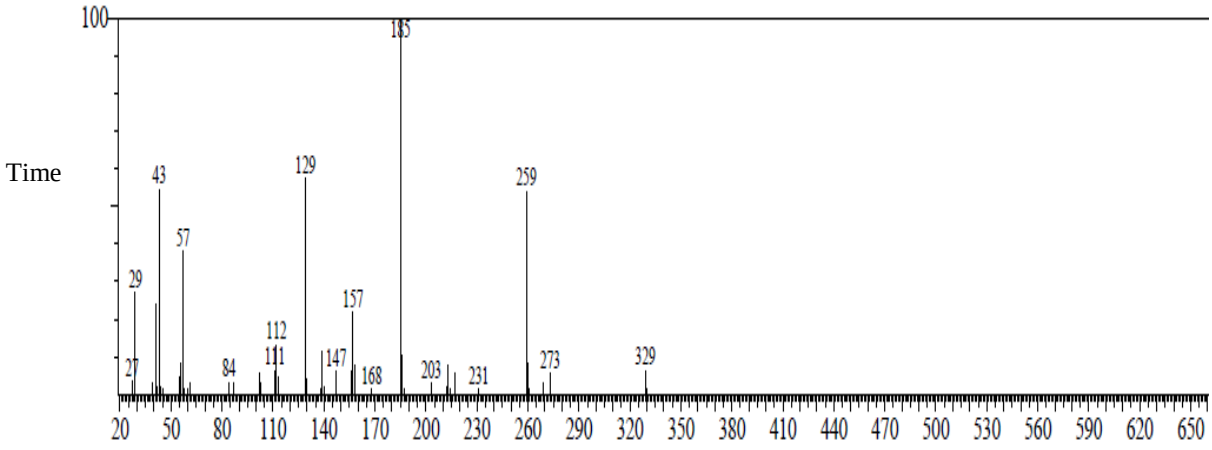


[الشكل1] الطحلب الأخضر المزرق *L.aeruginosa*

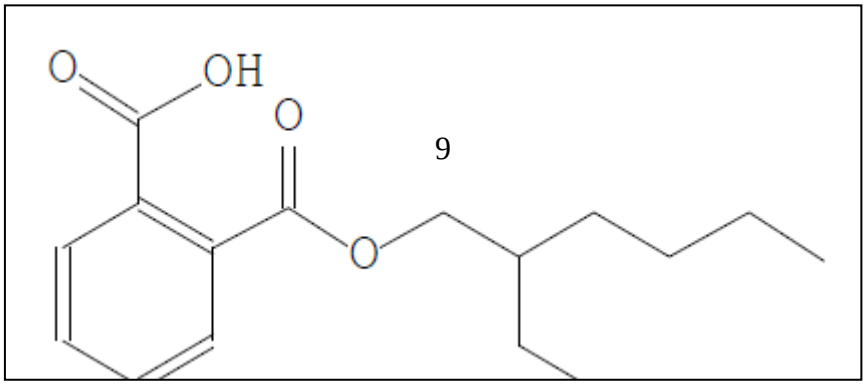


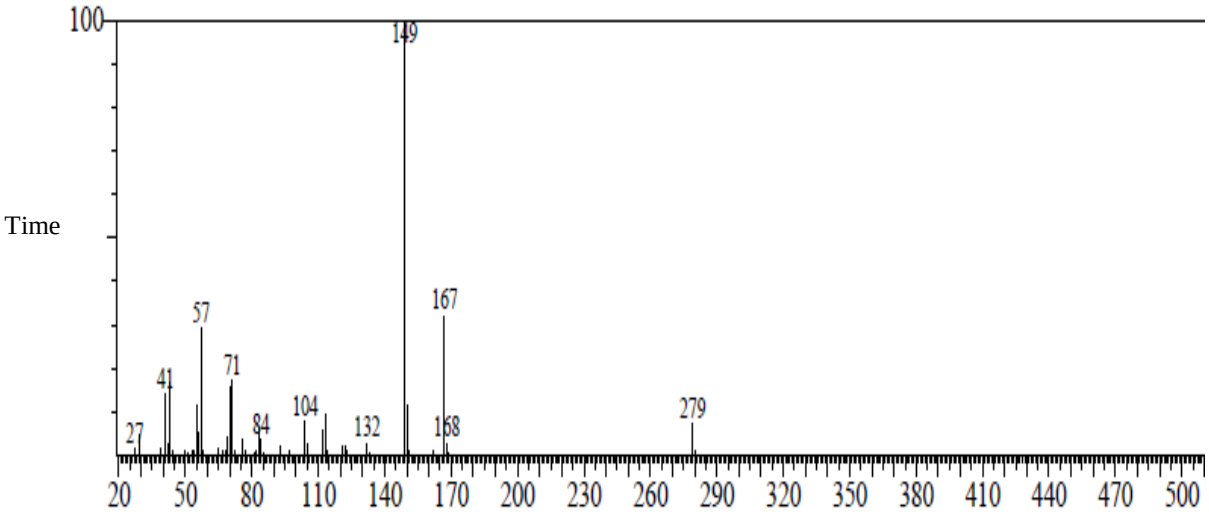
الشكل2 : منحنى النمو مقدراً بطريقة الوزن الجاف للطحلب *L.aeruginosa*





الشكل3: طيف الكتلة للمركب Tributyl acetylcitrate المعزول من الطحلب الأخضر المزرق *L.aeruginosa*
مع تركيبه الكيميائي





[الشكل 4] طيف الكتلة للمركب 1,2-Benzenedicarboxylic acid المعزول من الطحلب الأخضر المزرق *L.aeruginosa* مع تركيبه الكيميائي

References

1. Grima, F.; Fernaandes, F.; Camacho, F. & Chisti, Y. [1990]. Bioreactors: Light regine, mass transfer, and scalen P.J. Biotech. 70: 231-247.
2. Epistein,P.R.[1993].Algal blooms in spread and persistence of Cholera . Biosystems ., 31(2-3): 209 - 221 . (Abstract).
3. Van Dolah,F.M.[2000].Marine algal toxins:origin ,health effects and their increased occurrence.J.Environ.Health Perspect.108(S1),133-141.
4. Sivonen,K. and Jones , G. [1999]. Cyanobactyerial toxins In : Toxic cyanobacteria in water . eds.: I ., Chrus , and J. ,Barton . Giude to their Public Health Consequences , p. 41 - 111 .

5. Codd , G.A. ; Bell , S. G. ; Kayan , K. ; Ward , C. J. ; Beattie ,K.A. and Metcalf, J. S. [1999] . Cyanobacterial toxins exposure routes and human health . Eur . J. Phycol., 34 : 405 - 415 .
6. Chorus,I.& Bartram ,I. [1999]. Toxic cyanobacteria in water : Aguide to their pupilc health consequences, monitoring and management.J.CLEAN – Soil, Air, Water 35: 348–354.
7. Cox, P. A.; Banack, S. A.; Murch, S. J.; Rasmussen, U.; Tien, G.; Bidigare, R. R.; Metcalf, J. S.; Morrison, L. F.; Codd, G. A. and Bergman, B. [2005] . Cyanobacteria produce beta-N-methylamino-alanine, a neurotoxic amino acid. Proc. Natl. sci. USA: 102:5074-5078.
8. Noble, D. R.; Romanovicz, D. K.; and Brown, R. M.[2001]. Cellulose in cyanobacteria. Origin of plant cellulose synthase. Plant Physiol.42:127-529.
9. Fialkowsak E.; Pajdak-Stos A. [2002]. Dependence of cyanobacteria defense mode on grazer pressure, J.Aquat. Microbiol. Ecol. 27: 149–157.
10. Luesch,H.;Yoshida,W.Y.;Moore,R.E.;Paul,V.J.&Mooberry,S.L.[2000].Isolation, structure determination and biological activity of Lyngbyabellin A from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*.J.Nat Prod 63:611-615.
11. Milligan, K.E.; Marquez,B.L.;Williamson,R.T and Gerwick, W.H. [2006]. Lyngbyabellin B, a toxic and antifungal secondary metabolite from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. J. Nat. Prod. 63:1440–1443.
12. Cardellina,J.H.;Marner,F.J.& Moore,R.E.[1979].Seaweed dermatitis:structure of lyngbyatoxin A.Sci.204:193-195.
13. Mynderse,J.;Moore,R.;Kashiwagi,M.& Norton,T.[1977].Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplasiatoxin from Lyngbya.Sci. 196:538-540.
14. Carmichael,W.W.[1997].The Cyanotoxins.Adv.Bot.Res.,27:211-256.
15. Yin,Q.;Carmichael,W.W.& Evans,W.[1997].Factors influencing growth and toxin production by cultures of freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont.J.Appl.phycol.,9:55-63.
16. Duong,V.T.; Yan Li.; Nowak.E. and Schenk.M.P.[2012]. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production.Algae Biotechnology Laboratory, School of Agriculture and Food Sci, 5: 1835-1849.
17. AL-Aarajy, M. [1996] . Studies on the mass culture of some microalgae as food for fish larvae, PH.D Thesis ,Univ. of Basrah . 107 p.
18. Edward G. Bellinger[1] and David C. Sigee [2].[2010]. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. Wiley & Sons, Ltd,[1] Environmental Science and Policy, Central European University, Hungary,[2] Manchester University, UK .
19. Weideman, V.E.; walne, P.R. and Tainor, F.R. [1984]. A new technique for obtaining axenic

11

cultures of algae . Can. J. Bot.,42:958 -959 .

20. Richmond, A., [2002]. Micro algal biotechnology at the turn of the millennium. A personal view. J. Appl. Phycol. 12: 441-451.
21. Fogg, G.E.[1975]. Algal culture and phytoplankton ecology.2nded. Univ. Wisconsin Press, Wisconsin , USA., 175 PP.
22. Yin, Q.; Carmichael, W.W. and Evans, W. [1997]. Factors influencing growth and toxin production by cultures of freshwater cyanobacterium Lyngbya wollei Farlow ex Gomant. J. Appl. Phycol. 9: 55-63.
23. Cronberg, G., Carpenter, E.J., Carmichael, W.W., [2003]. Taxonomy of harmful cyanobacteria. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Unesco Publishing, pp. 523–562.
24. Manilal, A.; Sujith, S.; Seghal, G. and Seven, M. V. [2010]. Evaluation of seaweed bioactives on common aquatic floral and faunal weeds of shrimp ponds. Int. J. Marine Sci., 27 (1): 47-56.
25. Ito, E.; Satake, M. and Yasumoto , T. [2001] . Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. J.Toxicon.40:551–556.
26. Teneva, I.; Asparuhova, D.; Dzambazov, B.; Mladenov, R.and Schirmer, K. [2002]. The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aerugino- coerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. J.Environ. toxicol. 18:9-20.

الرديني، يسرى طارق ياسين.(2013). عزل وتشخيص *Lyngbya martensiana* وأجنتها1760صفحة 0 27.الطحلب المزرق ودراسة تأثيراته النسجية المرضية على أسماك *Xiphophorus helleri* سيفية الذنب

Identification of two Compound Tributyl acetylcitrate and 1,2-Benzenedicarboxylic acid from cyanobacterium *Lyngbya aeruginosa* Menegh.Ex Gomont

Ahmed Muhssin Athbi and Ali Abd Al-Latif Al-Ali and Asawer Salim Mohammedali Al-Taeei

Departement of Biology/College of Education for pure science/University of Basrah

Abstract

The alga *Lyngbya aeruginosa* Menegh. Ex Gomont isolated from shutt Al-Arab river in the south of Basrah city. The alga culturing in the modified medium of Chu-10. Two compound were identificated by using GC-mass which is represented by compound Tributyl acetylcitrate and 1,2-Benzenedicarboxylic acid.

Keywords: *Lyngbya aeruginosa* , Identificated compounds , Gas Chromotography - Mass