تأثير بعض العوامل البيئية على النمو والنواتج الحيوية في السيانوبكتريا نوع ***Nostoc Linkia*** المعزولة محليا

أيمن عوني سليم[1] ، حميد سلمان خميس[2]، إحسان محمود عبدالله[3]

[1] *المديرية العامة للتربية في صلاح الدين ، تكريت ، العراق*

[2] *كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق*

[3] *كلية الطب ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق*

الملخص

تمت دراسة تأثير بعض العوامل البيئية على أحد أنواع السيانوبكتريا وهي ***Nostoc Linkia*** المعزولة محليا من مدينة تكريت وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها، حيث استخدمت ثلاثة مستويات من درجة الحرارة وهي 16 و26 و36 °م وثلاثة مستويات من الأس الهيدروجيني pH 6.6 و7.6 و8.6 في وسط تنمية السيانوبكتريا ASM-1 وتبين أن أفضل نمو يومي ونواتج حيوية كان في درجة حرارة 26 °م، وpH 7.6. أما بالنسبة لتأثير شدة الإضاءة على النمو اليومي وكمية النواتج الحيوية المستخلصة منها، فتبين أن شدة الإضاءة 2500 lux كانت أفضل شدة إضاءة بالنسبة للنمو اليومي والنواتج الحيوية مما هو عليه من شدتي الإضاءة الاخرتين المستخدمتين وهما 1250 lux و 5000 lux.

أما تأثير إضافة بعض العناصر المغذية الصغرى والكبرى إلى وسط التنمية فلوحظ أن استبدال الـNaCl بـ$NaNO_3$ في وسط التنمية، أدى إلى حصول زيادة في النمو اليومي وكمية النواتج الحيوية المستخلصة من السيانوبكتريا ***Nostoc Linkia*** ، في حين عند إضافة $NaNO_3$ + $FeSO_4.7H2O$ سوية، فقد كانت هناك زيادة أكبر مما في الحالة السابقة لكل من النمو اليومي وكمية النواتج الحيوية المستخلصة من هذا النوع من السيانوبكتريا.

وقد تم تشخيص النواتج الحيوية بأجهزة طيف الكتلة HPLC-MS، وطيف الأشعة تحت الحمراء IR، والرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H NMR، وأظهرت نتائج التشخيص وجود السم الكبدي Microcystin بشكليه: MCYST-YM(O) وMCYST-LR[D-Asp^3,Dha^7] .

المقدمة

تعد السيانوبكتريا أو ما يسمى بالطحالب الخضراء المزرقة من أقدم الكائنات الموجودة على سطح الأرض **[1]**، حيث يمتد وجودها إلى 3,5 بليون سنة مضت **[2]**، وقد اعتبرت المسؤولة عن تراكم الأوكسجين في جو الأرض**[3]**.

تمتلك السيانوبكتريا صفات فريدة من نوعها من بين الأحياء المجهرية مما جعل الباحثين يولون دراستها أهمية خاصة ، ومن بين تلك الميزات قيام بعضها بعملية تثبيت النتروجين الجوي ومنها :- ***Oscillatoria***, ***Aphanizomenon*** , ***Nostoc*** , ***Anabaena*** **[4]**، إضافة إلى قيام بعضها بتحرير الهيدروجين كناتج عرضي لعملية تثبيت النتروجين الجوي مثل أجناس ***oscillatoria*** , ***Nostoc*** , ***Anabaena*** **[5]**.

إضافة إلى ماذكر فأن بعض أنواع السيانوبكتريا تفرز مواد سامة ، إن هذه السموم عباره عن قلويدات Alkaloids والتي هي عباره عن سموم عصبية ومنها Anatoxin-a الذي ينتج من قبل ***Anabaena*** ***flos-aquae*** ، ***Aphanizomenon flos-aquae*** . إضافة إلى بعض السموم الكبدية مثل microcystin بأشكال المتعددة التي تنتج من قبل ***Nostoc***, ***Nodularia*** ,***Anabaena*** و ***Oscillatoria*** **[6]**.

وتعد السيانوبكتريا من مجاميع الأحياء المجهرية القادرة على إنتاج أنواع مختلفة من المضادات الحياتية ، حيث وضح **[7]** قدرة ***Oscillatoria omena*** على إنتاج مضاد حيوي ضد الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام ، فيما تمكن **[8]** من إنتاج مضاد حيوي فعال ضد كل من البكتريا والفطريات من السيانوبكتريا ***Oscillatoria anagustissima*** , ***Calothrix parientina***.

وتتميز السيانوبكتريا بانتشارها العالمي الواسع في مختلف البيئات وذلك لقابليتها على تحمل الظروف البيئية المتطرفة فقد وجد بعضها في ثلوج القطب الشمالي مثل ***Phormidinm*** **[9]**، في حين أن البعض الأخر وجد في درجات حرارة مرتفعة نسبياً مثل ***Oscillatoria*** **[10]**. أما بالنسبة إلى احتياجاتها الضوئية فإن السيانوبكتريا عبارة عن كائنات ذاتية التغذية photoautotrophic فهي إذن تعتمد على الضوء للقيام بعملية التركيب الضوئي**[11]**، ووجود صبغات مثل Phycocyanin و Phycoerythrin مكنتها من استغلال الضوء بأطوال موجية قصيرة إضافة إلى احتوائها على كلوروفيل A، وإلى ذلك يعزى انتشارها إلى أعماق كبيرة نسبيا مقارنة مع بقية الطحالب)، وبالرغم من ذلك فقد وجد أن بعض أنواع السيانوبكتريا تكون Heterotrophic **[12]**.

وتتميز السيانوبكتريا بتفضيلها للأس الهيدروجيني المائل للقاعدية وان الـ pH الملائم لها ينحصر بين 7.5– 8.5 .

أُجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير العوامل البيئية التي شملت درجة الحرارة ، pH ، شدة الإضاءة والمغذيات الصغرى والكبرى على النمو اليومي والنواتج الحيوية للسيانوبكتريا نوع ***Nostoc Linkia*** ، فضلاً عن تشخيص هذه النواتج الحيوية ومعرفة أنواع السموم الموجودة فيها.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت عينات من مناطق بيئية مختلفة في مدينة تكريت وشملت هذه العينات الماء ، التربة والصخور.

وسط تنمية السيانوبكتريا

استخدم الوسط الانتقائي ASM-1 لتنمية السيانوبكتريا والذي يتكون من المكونات التالية (مقاسة بـ مايكرومول / لتر):-

NaCl	200	$CuCl_2.2H_2O$ 0.0008		Na2EDTA	20
$MgCl_2$	145	$MgSO_4.7H_2O$	150	MoO_3	0.1
K_2HPO_4	100	$CaCl_2$	190	$NaHCO_3$	300
HBO_3	6	Na_2HPO_4	100	$CoCl_2.6H_2O$	0.08
$ZnCl_2$	3	$FeCl_3.6H_2O$	9	D.W.	1L

طريقة عزل وتنقية السيانوبكتريا

تمت زراعة العينات المجموعة من البيئات المشار إليها آنفا على وسط **ASM-1** الصلب في أطباق بتري وتركت لتنمو لمدة 4–6 أسابيع في حاضنة ذات درجة حرارة 25°م وشدة إضاءة 2500 لوكس، بعدها تم نقل المستعمرات النامية كل على حدة إلى أطباق بتري محضرة حديثا حاوية على الوسط **ASM-1** وتركت تحت نفس الظروف لتنمو بصورة نقية.

نقلت المستعمرات النقية من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc Linkia*** إلى دوارق زجاجية حجم 250 مل حاوية على الوسط **ASM-1** السائل وحضنت تحت نفس الظروف المشار إليها آنفا، بعدها تم نقلها إلى دوارق سعة (5) لتر حاوية على (3.5) لتر من **ASM-1** وتم تجهيزها بالهواء عبر ماطور هواء وتركت لتنمو تحت نفس الظروف المذكورة من حرارة و PH وشدة إضاءة،وقد تم إجراء الاختبارات التي سيرد ذكرها لاحقا عليها، كما تم استخلاص النواتج الحيوية منها.

قياس معدل النمو اليومي للسيانوبكتريا و كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

تم قياس معدل النمو اليومي للنوع المختار في الوسط السائل **ASM-1** والمحضر حديثا تحت درجة حرارة 25°م وشدة إضاءة 2500 لوكس و pH 7.6 لمدة 23 يوماً بدلالة الكثافة البصرية باستخدام جهاز المطياف الضوئي نوع Spectronic 21 وعلى طول موجي 436 نانوميتر وحسب **[13]**، ثم تم استخلاص النواتج الحيوية بالطريقة التي سيرد شرحها لاحقاً وتم قياس الكميات المستخلصة.

قياس تأثير درجة الحرارة على النمو اليومي للسيانوبكتريا و كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

تمت تنمية نوع السيانوبكتريا المختار ة ***Nostoc Linkia*** في الوسط السائل **ASM-1** ووضع في الحاضنة الهزازة Shaker incubator في درجات حرارة 16± 2°م ، 26±2°م ، 36±2°م كل على حدة تحت شدة إضاءة 2500 لوكس و pH 7.6 وقيس النمو اليومي حسب ما ذكر أعلاه، ثم تم استخلاص النواتج الحيوية بالطريقة التي سيرد شرحها لاحقاً وتم قياس الكميات المستخلصة.

قياس تأثير الأس الهيدروجيني على النمو اليومي للسيانوبكتريا و كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

تم استخدام ثلاثة درجات من الـpH وهي 6.6 ، 7.6 و 8.6 لملاحظة التأثير على نمو السيانوبكتريا ***Nostoc Linkia*** في الوسط السائل **ASM-1** ووضعت في الحاضنة الهزازة كل على حدة تحت درجة حرارة 25°م وشدة إضاءة 2500 لوكس وقيس النمو اليومي حسب الطريقة المشار إليها أعلاه، ، ثم تم استخلاص النواتج الحيوية بالطريقة التي سيرد شرحها لاحقاً وتم قياس الكميات المستخلصة.

قياس تأثير شدة الإضاءة على النمو اليومي للسيانوبكتريا و كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

تم استخدام ثلاثة مستويات من الشدة الضوئية وهي 1500 لوكس ، 2500 لوكس و 3500 لوكس على السيانوبكتريا المعزولة ***Nostoc Linkia*** المنماة في الوسط السائل **ASM-1** والموضوعة في الحاضنة الهزازة تحت درجة حرارة 25°م و 7.6 PH وقيس النمو اليومي كما في أعلاه لمدة 23 يوماً ،، ثم تم استخلاص النواتج الحيوية بالطريقة التي سيرد شرحها لاحقاً وتم قياس الكميات المستخلصة.

دراسة تأثير العناصر المغذية الصغرى والكبرى في الوسط ASM-1 السائل على النمو اليومي للسيانوبكتريا وكمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

زرعت السيانوبكتريا ***Nostoc Linkia*** في الوسط السائل **ASM-1** بعد أن تم استبدال NaCl في الوسط بمادة NaNO3 بتركيز 0.157 ملغم/لتر، وفي دوارق أخرى تمت إضافة مادة كبريتات الحديديك FeSo4.6H2O إلى الوسط ونميت تحت نفس الظروف المشار إليها آنفا وأُ ُخذت قراءات معدل النمو اليومي لكل حالة على حدة، ، ثم تم استخلاص النواتج الحيوية بالطريقة التي سيرد شرحها لاحقاً وتم قياس الكميات المستخلصة.

قياس النواتج الحيوية للسيانوبكتريا

تمت زراعة السيانوبكتريا المعزولة ***Nostoc Linkia*** في دورق زجاجي حجم 5 لتر حاوي على 3.5 لتر من الوسط الزرعي السائل **ASM-1** ووضع في الحاضنة تحت درجة حرارة 25°م وشدة إضاءة 2500 لوكس و pH 7.6 وزود بالهواء الجوي عن طريق مضخة هواء خارج الحاضنة.

استخلاص النواتج الحيوية

بعد الحصول على نمو مستعمرات السيانوبكتريا ***Nostoc Linkia*** جمعت خلاياها باستخدام جهاز الطرد المركزي من شركة Gallen Kamp وبسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم أخذ الراسب وتمت إذابته بالمذيب (الإيثانول) 1غم/10مل **[14]**، ثم حطمت الخلايا باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية (ULTRASONIC) بتسليط 24,000 ذبذبة/ثانية لمدة 15 ثانية متناوبة مع فترات توقف لتبريد الجهاز وللحفاظ على درجة حرارة 4 °م، كررت العملية عدة مرات لتحطيم الخلايا تحطيماً تاماً ، بعدها وضع المحلول في أنابيب

الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم أُخذ الراشح وتم تبخير الإيثانول بدرجة حرارة أقل من 40 °م **[15]**، وأعيدت إذابة المستخلص بالماء المقطر وتم ترسيب البروتينات (النواتج الحيوية) باستعمال تركيز 70% من كبريتات الأمونيوم، ثم فصل الراسب عن الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 4 °م، أخذ الراسب الحاوي على البروتينات وتمت إزالة ملح كبريتات الأمونيوم منها باستخدام طريقة الفرز الغشائي (الديلزة Dialysis).

تم تجفيف البروتين (النواتج الحيوية) باستخدام جهاز التجفيف (Discater) خالي من الهواء وتحت ضغط مخلخل. وحفظ البروتين الحاوي على النواتج الحيوية في الثلاجة لحين الاستعمال.

تشخيص النواتج الحيوية

تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المعزولة بالطرق التالية:

1- تقنية مطيافية الكتلة (HPLC-MS) High-Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

تعد هذه التقنية من أحدث التقنيات الحديثة في مجال تشخيص المركبات الكيمياوية، تتضمن هذه التقنية إذابة العينة في سائل مذيب، ثم يتم تبخيرها مما يؤدي إلى ظهور خليط من جزيئات المذيب والمذاب، وبعد ذلك يتم فصل جزيئات المذيب لتبقى جزيئات المذاب، والتي توجه باتجاه جزء MS الذي يعمل على توليد جزيئات وشظايا جزيئية مشحونة، وحالما تكون الجزيئات مؤينة وفي الطور الغازي يصبح من السهل معالجتها باستعمال تطبيقات كهربائية أو مغناطيسية ليكون بالإمكان كشفها وقياسها وتحديد أوزانها الجزيئية **[16]**. تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المعزولة بواسطة هذه التقنية في مختبرات هيئة الطاقة الذرية السورية.

2- تقنية طيف الأشعة تحت الحمراء Infrared Spectrophotometry (I.R)

تم تحليل العينات في مختبرات قسم الكيمياء بكلية التربية بجامعة تكريت.

3- تقنية مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (NMR) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المعزولة بهذه التقنية في مختبرات هيئة الطاقة الذرية السورية.

التحليل الإحصائي

حللت النتائج إحصائياً باستخدام اختبار F واختبار T واستخدام برنامج Minitab في التحليل، كما قورنت المتوسطات الحسابية للمعاملات وفق اختبار دانكن متعدد الحدود Duncun's Multiple Range test بمستوى معنوية (0.05) **[17]**.

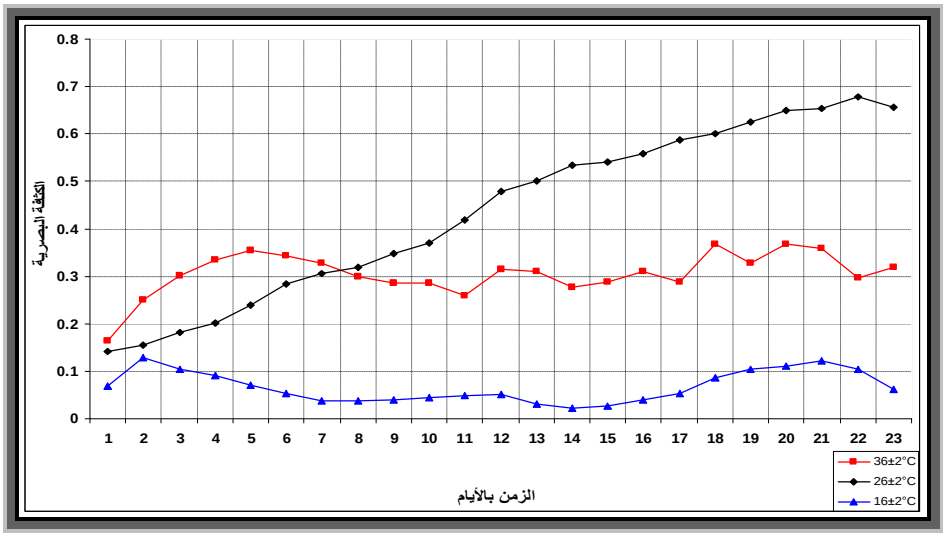
النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص السيانوبكتريا

تم عزل النوع ***Nostoc Linkia*** من مياه نهر دجلة في مدينة تكريت ومن التربة الطينية على حافاته ، وهذا النوع هو من الأشكال الخيطية الحاوية على الحوصلة، وهذا الشكل من السيانوبكتريا هو السائد في البيئة العراقية كما تشير إلى ذلك الدراسات التي أجريت في هذا المجال **[18]**. وقد تم تشخيصه بواسطة مجهر ضوئي ذي كاميرا فوتوغرافية نوع Olympus ياباني الصنع بقوتي تكبير (400x) و(1000x) وقد تم التشخيص اعتماداً على **[19]**،**[20]**.

تأثير درجات الحرارة على النمو اليومي للسيانوبكتريا المعزولة وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

يظهر الشكل (1) تأثير درجات الحرارة المختلفة على النمو اليومي للنوع ***Nostoc Linkia***



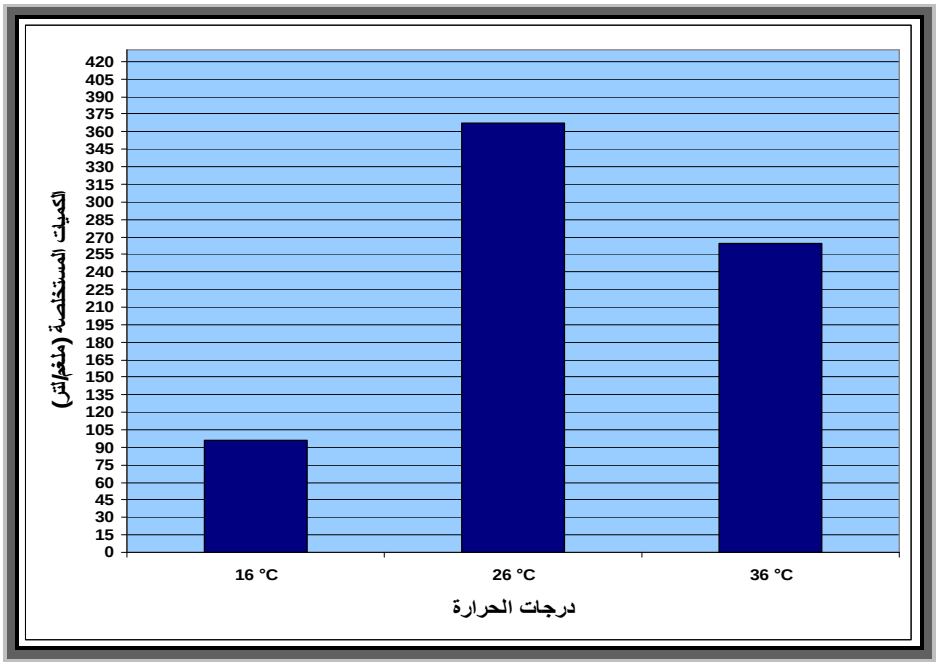
الشكل (1) تأثير درجات الحرارة المختلفة على النمو اليومي للسيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*

نلاحظ أن النمو في درجة حرارة 26°م كان أفضل من النمو في درجة حرارة 16°م ودرجة 36 °م، على الرغم من أن النمو في درجة حرارة 36 °م كان أفضل من النمو في درجة حرارة 16 °م، حيث نلاحظ أن الفرق كنسبة مئوية بين النمو في 16 °م والنمو في 26 °م يقارب

83% أكثر مما هو عليه في 16 °م، وأكثر مما هو عليه في 36 °م بحوالي 50%، وهذا يؤكد أن هذا النوع يفضل درجات الحرارة المعتدلة في النمو.

وقد بلغ معدل النمو اليومي لهذا النوع من السيانوبكتريا ***Nostoc linckia*** في درجة حرارة 26 °م 0.4، وكان النمو منتظماً خلال فترة الاختبار؛ أما في درجة حرارة 36 °م فقد بلغ معدل النمو 0.6 في أيام النصف الثاني من الاختبار، حيث أن النمو في هذه الدرجة الحرارية لم يكن منتظماً، أما في درجة حرارة 16 °م فان معدل النمو ظل واطئا خلال فترة الدراسة ولم يحقق أكثر من معدل نمو 0.1 في الأيام الثلاثة الأخيرة، وهذا يؤيد أن هذا النوع من السيانوبكتريا يفضل الحرارة المعتدلة، ويمكنه العيش في درجات الحرارة العالية نسبياً، ولكنه يتكيف بصعوبة مع درجات الحرارة الواطئة.

أما تأثير درجة الحرارة على كمية الناتج الحيوي للنوع ***Nostoc Linkia*** وكما في الشكل رقم (2)



الشكل (2) تأثير درجات الحرارة المختلفة على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*

فنلاحظ من خلال النتائج أن كمية الناتج الحيوي عند التنمية بدرجة حرارة 16 °م كانت 95.6 ملغم/لتر، وهي الأوطأ وتشكل نسبة 26% من الكمية المنتجة في درجة حرارة 26 °م التي كانت 367.4 ملغم/لتر وهي الأعلى، في حين سجلت كمية الناتج الحيوي قيمة مقدارها 264.4 ملغم/لتر في درجة حرارة 36 °م وبما يعادل 72% من كمية الناتج الحيوي المنتجة في درجة حرارة 26 °م، وهذا يؤكد ما أشرنا إليه آنفاً من أن هذا النوع من الأنواع المفضلة لدرجات الحرارة المعتدلة. و الشكل رقم (3–4) يبين تأثير درجات الحرارة المختلفة على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc linckia***.

يتضح من خلال النتائج للنوع ***Nostoc linckia*** أن النموإليومي كان في أفضل حالاته في درجة حرارة 26 °م، حيث نلاحظ النمو اليومي التصاعدي المتدرج في هذه الدرجة الحرارية، وهذا ربما يعكس تكيف الكائن وتفضيله لتلك الدرجة حيث ينمى فيها بصورة روتينية، وهو ما أكده الباحثان **[10]**، حيث أكدا على أن أنواع السيانوبكتريا المختلفة تختلف في استجابتها لدرجات الحرارة، فيمكن أن توجد السيانوبكتريا نامية على صخور القارة القطبية الجنوبية وفي الينابيع البركانية الساخنة ومع ذلك توجد استثناءات، فمعظم السيانوبكتريا المشكلة لازدهارات مؤذية في المياه العذبة أو المالحة تكون غالبا من خمسة أنواع: ***Anabaena***، ***Aphanizomenon***، ***Microcystis***، ***Noddaria*** و ***Oscillatoria***. إن سعة التركيب الضوئي والمعدل النوعي للتنفس ونسبة النمو لأنواع المياه العذبة الخمسة تكون في أمثل قيمها عند درجة حرارة 25 درجة مئوية أو أكثر، ومع هذا، تختلف استجابة الأنواع والأصناف المختلفة تجاه درجات الحرارة المنخفضة **[10]**.

في حين اختلف النمو اليومي في درجة حرارة 36 °م اذ نلاحظ أنه تصاعد قليلاً حتى اليوم الخامس ثم بدأ بالانخفاض والتذبذب ولم يسجل قيمة مرتفعة حتى نهاية الاختبار، وهذا يدل على عدم تحمله للحرارة العالية.

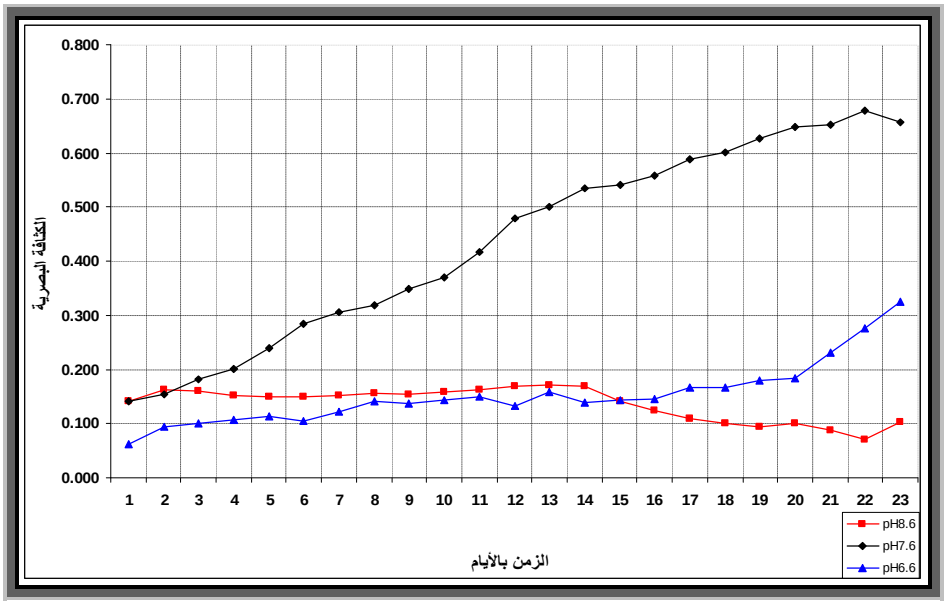
أما في درجة حرارة 16 °م، فنلاحظ أن النمو اليومي كان في أسوأ حالاته مما يدل على أن هذا النوع من الأنواع غير المحبة لدرجات الحرارة الواطئة.

تأثير الأس الهيدروجيني pH في وسط التنمية ASM-1 على نمو السيانوبكتريا المعزولة وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

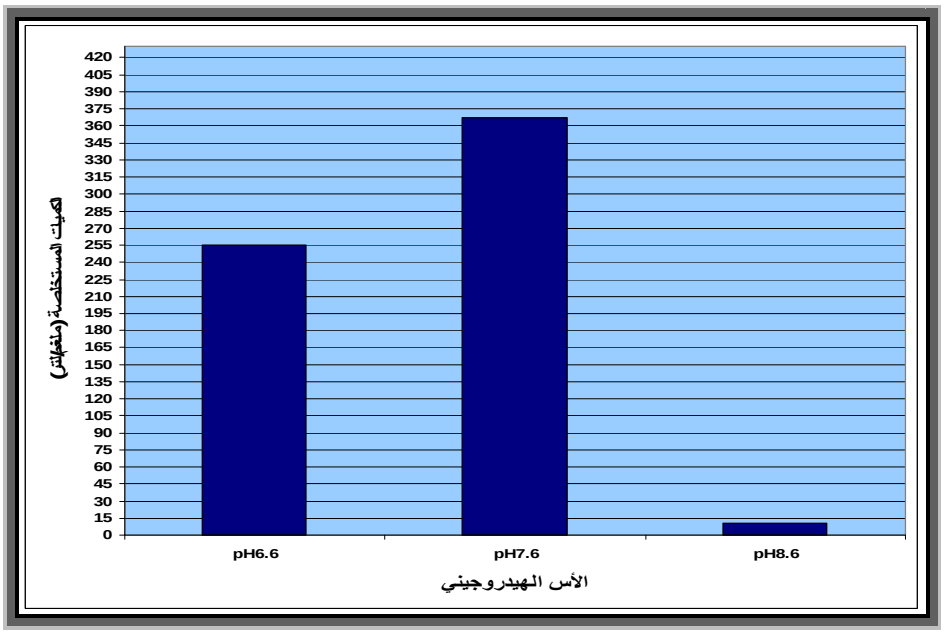
يتبين من خلال الشكل رقم (3–9) أن النوع ***Nostoc linckia*** في pH 8.6م يسجل أي معدل للنمو خلال عمر المزرعة، وا ن أعلى

قراءة مسجلة للنمو اليومي كانت 0.171 ككثافة بصرية في اليوم الثالث عشر، والتي لا تشكل كبير فرق عن ما مسجل في اليوم الثاني من عمر المزرعة وهي 0.168ككثافة بصرية، وا ن هذه القراءة المسجلة للنمو اليومي تحت هذا الـpH لا تشكل أكثر من 25% من أعلى قراءة مسجلة للنمو اليومي تحت 7.6 pH وهي 0.679 ككثافة بصرية، في حين أن أعلى قراءة مسجلة للنمو اليومي تحت 6.6 pH والتي كانت 0.325 ككثافة بصرية تشكل 48% من أعلى قراءة مسجلة للنمو اليومي تحت 7.6 pH، وبمعدل نمو 0.5. وهذا يدل على أن هذا النوع يتحمل الحامضية البسيطة و لا يتحمل القاعدية العالية ونموه الأمثل في القاعدية البسيطة.

يتبين لنا من خلال الشكل رقم (4) أن كمية الناتج الحيوي المستخلصة من هذا النوع من السيانوبكتريا ***Nostoc linckia*** كانت 254.8 ملغم/لتر عندما كان pH الوسط الذي تنمو فيه 6.6، وهذه تشكل نسبة 69.35% من الكمية المستخلصة في 7.6 pH، والتي كانت 367.4 ملغم/لتر، وهي الكمية الأعلى المستخلصة خلال هذا الاختبار، في حين شكلت الكمية المستخلصة عندما كان pH الوسط الذي تنمو فيه 8.6 نسبة 2.94% من الكمية المستخلصة في 7.6 pH، وقد بلغت 10.8 ملغم/لتر، وهي الكمية الأوطأ المستخلصة خلال هذا الاختبار، وهذا يعود إلى ارتباط الكميات المستخلصة بالنمو اليومي لهذا النوع تحت هذه الظروف المختلفة من الـpH.



الشكل (3) تأثير الأس الهيدروجيني على النمو اليومي للسيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*



الشكل (4) تأثير الأس الهيدروجيني على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*

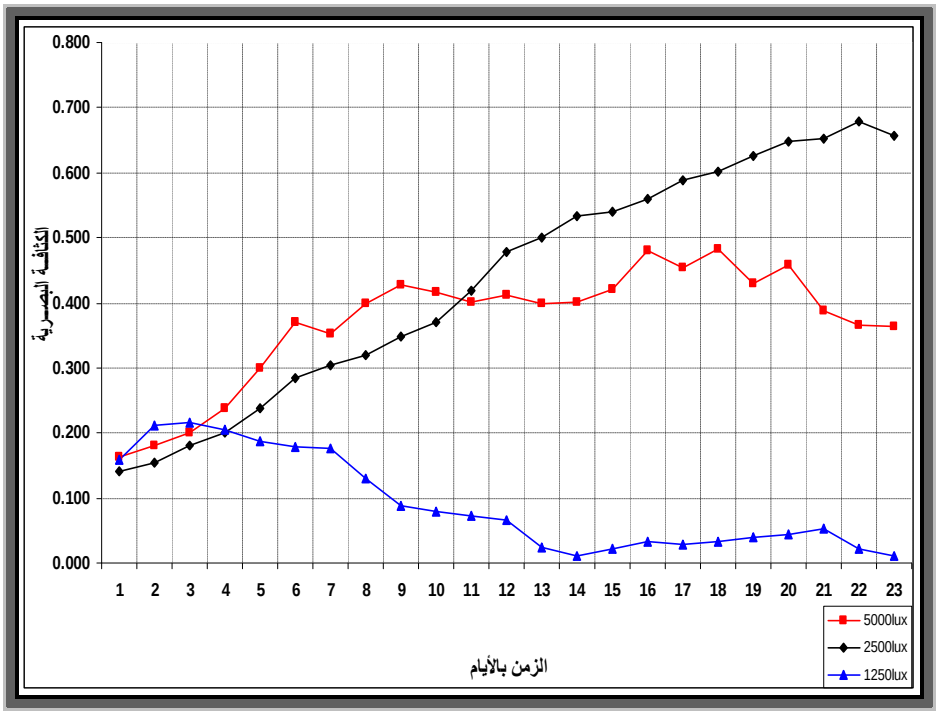
يؤثر الأس الهيدروجيني على نمو السيانوبكتريا وتثبيتها للنتروجين الجوي **[21]** و**[22]**، وقد ذكر **[23]** بأنالسيانوبكتريا تعد مصدراً مهماً للنتروجين في البايوسفير،خصوصاً في الترب المتعادلة إلى قليلة القلوية. كما أشار **[24]** إلى أن السيانوبكتريا تنتشر في الترب القليلة القلوية،و أن الpH الملائم بين 7.5–8.5، وقد وجدت بعض الأنواع مثل ال***Anabaena flos-aqua*** في مياه ذات pH بين 9.0 – 9.5، فضلاً عن أنها قادرة على استعمال كل من الـCO_2 الحر وأيونات البيكربونات كمصدر للكربون اللاعضوي لأجل التركيب الضوئي. **[25]**. في حين أن **[26]** كان قد أثبت أن الأس الهيدروجيني pH الأمثل لفعالية إنزيم النتروجينيز وكفاءته في عملية تثبيت النتروجين الجوي من قبل السيانوبكتريا كان 7.8.

وتتفق نتائج الاختبارات على النوع المختار من السيانوبكتريا وهي ***Nostoc linckia*** مع ما أشار إليه **[27]** من أن السيانوبكتريا أكثر شيوعاً في المياه السطحية المتعادلة إلى القلوية، في حين لا تتفق مع ما استنتجه **[28]** من أن انخفاض الأس الهيدروجيني pH يعتبر من العوامل المحددة لنمو السيانوبكتريا، حيث يبدو واضحا أن ارتفاع الأس الهيدروجيني pHهو العامل الأكثر تأثيراً على نمو السيانوبكتريا، وهذا ربما يعود إلى طبيعة هذا النوع الذي يفضل العيش في وسط متعادل أو قلوي قليلاً كمعظم الأنواع الأخرى، مع إمكانية تحمله العيش في وسط حامضي قليلاً ويتأثر سلبياً بالقاعدية العالية، فضلاً عن أن معظم أنواع السيانوبكتريا تتأثر بطريقة أو بأخرى بالبيئة التي تعيش فيها.

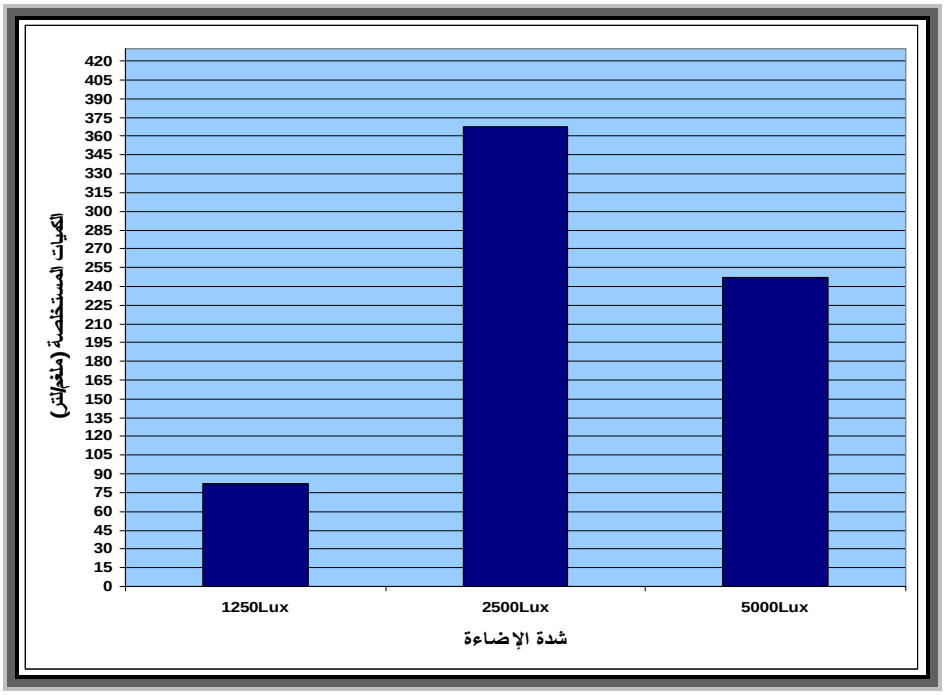
تأثير شدة الإضاءة على نمو السيانوبكتريا المعزولة وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

من ملاحظة الشكل رقم (5) يتبين لنا أن هذا النوع من السيانوبكتريا ***Nostoc linckia*** قد سجل نمواً يومياً متصاعداً بشكل منتظم في شدة إضاءة 2500 lux، حيث كان معدل النمو 0.4، وسجل أعلى قراءة له وهي 0.679 ككثافة بصرية، كما تصاعد النمو اليومي ببطء وبشكل غير منتظم في شدة إضاءة 5000 luxمسجلاً أعلى قراءاته وهي 0.482 ككثافة بصرية وبمعدل نمو 0.33، أما في شدة إضاءة 1250 lux فقد انخفض النمو اليومي من اليوم الرابع وحتى اليوم الأخير من عمر المزرعة، ولم يحقق أي معدل للنمو، بل على العكس فحين سجل نمواً يومياً مقداره 0.215 ككثافة بصرية في اليوم الثالث من عمر المزرعة، لم يسجل أكثر من 0.012 ككثافة بصرية في اليوم الأخير؛ وهذا يدل بصورة قاطعة على أن هذا النوع من السيانوبكتريا لا يمكنه النمو في شدة الإضاءة الواطئة، بل يمكنه النمو في شدة الإضاءة المعتدلة والعالية، والأمثل بالنسبة له هي شدة الإضاءة المعتدلة 2500 lux.

وبالنسبة لنفس النوع ***Nostoc linckia*** فقد أظهرت النتائج أن كمية الناتج الحيوي كانت 82.4 ملغم/لتر عند النمو في شدة إضاءة 1250 lux وهي الكمية الأوطأ المستخلصة خلال هذا الاختبار، وهي تشكل نسبة 22.4% من كمية الناتج الحيوي المستخلصة من نفس النوع من السيانوبكتريا في شدة إضاءة 2500 lux والبالغة 367.4 ملغم/لتر، وهي الكمية الأعلى المستخلصة في هذا الاختبار، في حين بلغت الكمية المستخلصة من نفس النوع في شدة إضاءة 5000 lux 246.8 ملغم/لتر والتي شكلت نسبة 67.2% من مثيلتها في شدة إضاءة 2500 lux؛ وهذا ربما يعود إلى أن النواتج الحيوية تتأثر بشدة الإضاءة كما يتأثر النمو حيث يعتمد على الفعاليات الحيوية الأخرى للسيانوبكتريا، و الشكل رقم (6) يبين ذلك.



الشكل (5) تأثير شدة الإضاءة على النمو اليومي للسيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*



الشكل (6) تأثير شدة الإضاءة على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*

إن السيانوبكتريا بالأساس هي photoautotrophs، بما يعني أنها تعتمد على الضوء خلال نموها لأجل التركيب الضوئي وبالتالي التغذية.**[11]**.

ومن ملاحظة النتائج لهذا النوع من السيانزبكتريا يتبين أن الإضاءة المناسبة لنموه هي 2500 lux حيث تحقق أفضل نمو في شدة الإضاءة هذه، تليها شدة الإضاءة 5000 lux، وآخرها كانت شدة الإضاءة 1250 lux، وبالرغم من الاختلافات في الشدة الضوئية فإن هذا النوع من السيانوبكتريا تمكن من الاستمرار بالحياة تحت الشدة الضوئية الواطئة والعالية، وهذا يتفق مع ما أشار اليه **[29]**،**[30]** من أن بعض أنواع السيانوبكتريا تكون Heterotrophic Photoheterotrophic، ولذلك فهي قادرة على البقاء على قيد الحياة في ظروف الشدة الضوئية الواطئة، كما في قعر منطقة الـeuphotic للبحيرات وفي رواسب البحيرات. وكما في أنواع الـphytoplankton فإن للسيانوبكتريا متطلبات ضوئية على الرغم من أن المستوى الذي يكون عنده التركيب الضوئي محدداً بالضوء للسيانوبكتريا يكون أقل مما هو لغيرها من الطحالب الأخرى كما يؤكد ذلك **[11]**، وذلك لامتلاكها صبغات ضوئية إضافية مثل phycocyanin و phycoerythrin.**[12]**.

إضافة لذلك فأن النتائج توضح أن النمو في الشدة الضوئية الواطئة كان أقل بكثير من النمو في شدة الإضاءة المعتدلة 2500 lux، وأقل أيضاً من النمو في شدة الإضاءة العالية 5000 lux، وهذا لا يتفق مع ما ذهب إليه **[11]**،**[31]** من أن التجمعات السيانوبكتيرية تكون قادرة أيضاً على التكيف مع ظروف تخفيض الضوء خلال النمو، منتجة زيادة في محتوى الكلوروفيل phycocyanin و phycoerythrin وكفاءة نسبية أعظم في التركيب الضوئي. لذلك فإن من المحتمل، أن تكون السيانوبكتريا قادرة على تحقيق نمو photoautotrophic تحت شدة ضوئية منخفضة بصورة نسبية أفضل.

في حين أنه في الشدة الضوئية العالية 5000 lux استطاعت السيانوبكتريا مقاومة هذه الشدة الضوئية والتكيف معها بل وحتى النمو بصورة جيدة، وهذا لايتفق مع ما ذكره **[32]**،**[33]** من أنه عند سطح المياه تتعرض السيانوبكتريا كثيراً لشدة ضوئية عالية أو متطرفة مما يمكن أن يؤدي إلى حصول طفو سطحي flocculation للسيانوبكتريا مؤديا إلى الأكسدة الضوئية لها وبالتالي الموت، ولكنه يتوافق مع رأي **[34]** من أنه بإمكان السيانوبكتريا تجنب الأكسدة الضوئية بإنتاج صبغات كاروتينية واقية.

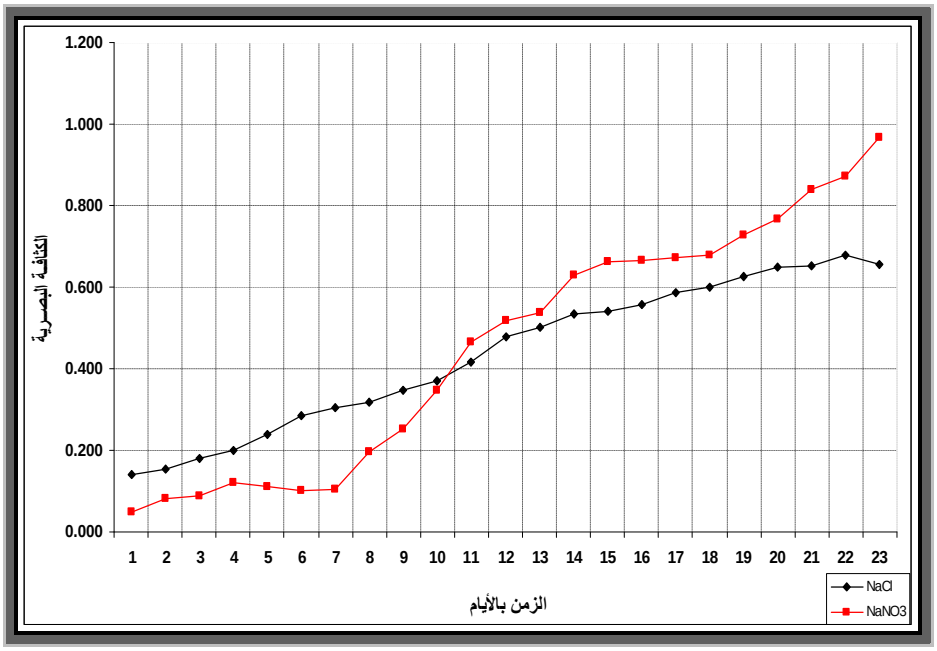
دراسة تأثير العناصر المغذية الصغرى والكبرى في الوسط ASM-1 على نمو السيانوبكتريا المعزولة وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

تأثير إضافة النترات على نمو السيانوبكتريا نوع *Nostoc linckia* المعزولة وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

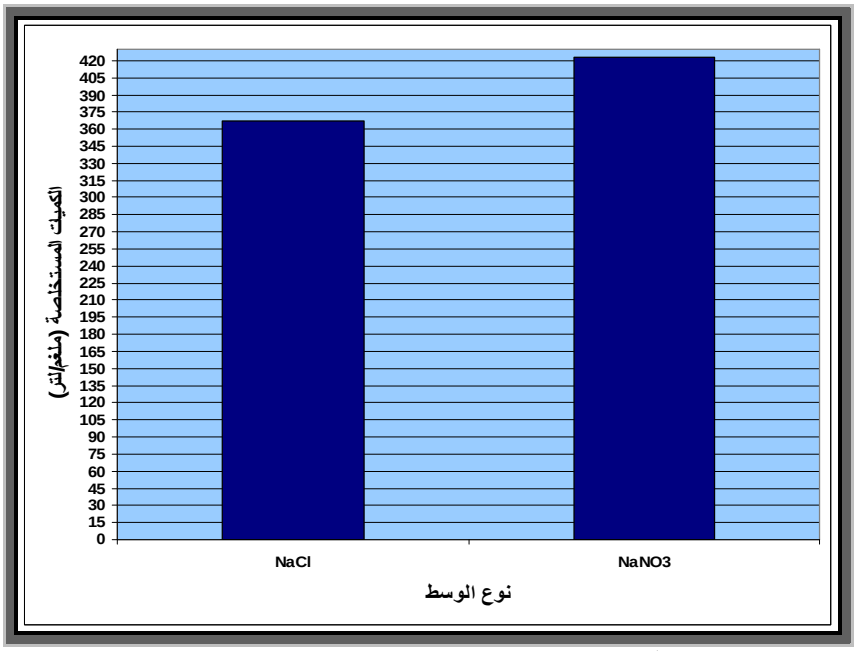
وفيما يخص نوع السيانوبكتريا ***Nostoc linckia*** تبين النتائج (وكما في الشكل 7) أنه عند إضافة $NaNO_3$ بدلاً من NaCl في الوسط الغذائي فان معدل النمو كان 0.67، وأعلى قراءة مسجلة للنمو اليومي هي 0.968 ككثافة بصرية، في حين أنه في الوسط الطبيعي (بوجود NaCl وعدم وجود $NaNO_3$) كان معدل النمو 0.4، وأعلى قراءة مسجلة للنمو اليومي هي 0.679 ككثافة بصرية والتي تقل بنسبة

30% عن مثيلتها مع إضافة $NaNO_3$، كما أن استبدال الـNaCl بالـ$NaNO_3$ قد أدى إلى زيادة النمو اليومي بشكل كبير وواضح.

يبين الشكل رقم (8) تأثير إضافة $NaNO_3$ بدلاً من NaCl على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc linckia***، حيث يظهر أن كمية الناتج الحيوي المستخلصة عند إضافة $NaNO_3$ بدلاً من NaCl في وسط التنمية السائل ASM-1 كانت 422.8 ملغم/لتر، وهي أعلى من الكمية المستخلصة في وسط التنمية الطبيعي (أي بدون تغيير) البالغة 367.4 ملغم/لتر بنسبة 15%، وهذا يؤيد ما ذكرناه من أفضلية تنمية هذا النوع من السيانوبكتريا في وسط مضاف إليه $NaNO_3$ بدلاً من NaCl.



الشكل (7) تأثير إضافة $NaNO_3$ بدلاً من NaCl على النمو اليومي للسيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*



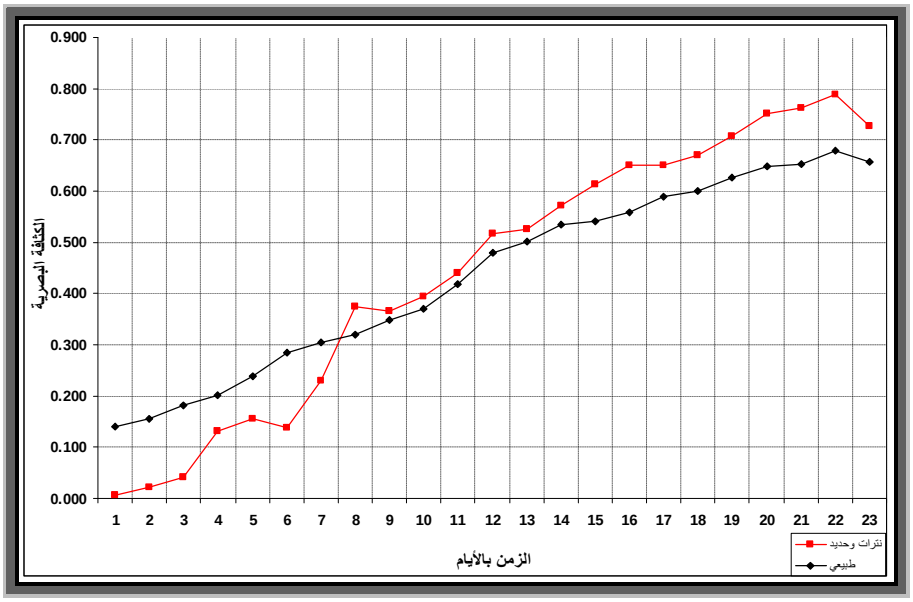
الشكل (8) تأثير إضافة $NaNO_3$ بدلاً من NaCl على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*

تأثير إضافة النترات والحديد على نمو السيانوبكتريا المعزولة وعلى كمية النواتج الحيوية المستخلصة منها

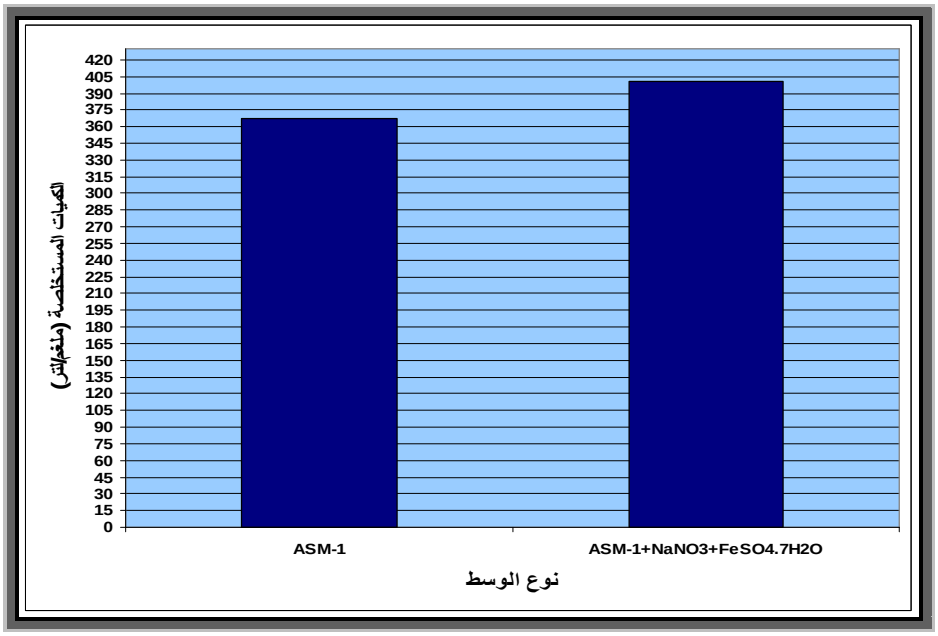
نلاحظ من الشكل رقم (9) تصاعد النمو للنوع ***Nostoc linckia*** في كلتا الحالتين،أي في الوسط المضاف إليه ($NaNO_3$ و$FeSO_4.7H_2O$) والوسط الطبيعي (بدون إضافات) مع ملاحظة أنه في الوسط المضاف إليه ($NaNO_3$ و$FeSO_4.7H_2O$) كان النمو أفضل قليلاً، حيث كان معدل النمو 0.5، في حين كان معدل النمو في الوسط الطبيعي (بدون إضافات) 0.4، وسجلت أعلى قراءة للنمو

اليومي 0.788 ككثافة بصرية في الوسط المضاف إليه ($NaNO_3$ و$FeSO_4.7H_2O$) والتي تزيد عن أعلى قراءة مسجلة للنمو اليومي في الوسط الطبيعي (بدون إضافات) البالغة 0.679 ككثافة بصرية، بنسبة 14%، مما يدل على أن إضافة النترات والحديد إلى وسط التنمية للسيانوبكتريا أفضل من تنميتها في الوسط الطبيعي (أي بدون إضافات).

يبين الشكل رقم (10) تأثير إضافة النترات والحديد إلى الوسط الطبيعي السائل ASM-1 على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc linckia*** حيث يتبين أن الناتج الحيوي المستخلص كان 400.8 ملغم/لتر عند إضافة النترات والحديد، وهو أعلى بـ33.4 ملغم/لتر من كمية الناتج الحيوي عند التنمية في الوسط الطبيعي (أي بدون إضافات)، الذي كان 367.4 ملغم/لتر، أي بنسبة زيادة 8.4%، وهذا يعني أن إضافة النترات والحديد سوية إلى الوسط الغذائي لهذا النوع من السيانوبكتريا يزيد من كمية الناتج الحيوي المستخلص.



شكل (9) تأثير إضافة $NaNO_3$ و$FeSO_4.7H_2O$ إلى الوسط الطبيعي على النمو اليومي للسيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*



شكل (10) تأثير إضافة $NaNO_3$ و$FeSO_4.7H_2O$ إلى الوسط الطبيعي على كمية الناتج الحيوي المستخلصة من السيانوبكتريا نوع *Nostoc Linkia*

إن ما يدعم هذه النتائج أن هناك العديد من البحوث والدراسات التي أجريت على السيانوبكتريا في هذا المجال، حيث أشارت إلى أن من صفات السيانوبكتريا الجديرة بالانتباه هي قدرة بعض أنواعها على تثبيت النتروجين الجوي الذائب في الماء، بالإضافة إلى أن العديد من

الأنواع قادرة على العيش في مياه ذات تراكيز واطئة من مركبات النتروجين اللاعضوي.**[4]**.

في حين يؤكد **[35]**،**[36]** إلى أن النتروجين هو مكون أساسي لجميع الكائنات الحية وداخل بصورة أساسية في تركيب الأحماض الأمينية والبروتينات، حيثرأ النتروجين يتحرك بحرية من وا إلى داخل الأنظمة البيئية المائية في الحالة الجزيئية كغاز ثنائي النتروجين مع الغلاف الجوي باعتباره مصدراً نهائياً. كما أن بإمكانه أيضاً دخول الأجسام المائية في مياه الوديان الجارية كمنتجات تحلل للمواد العضوية بشكل أمونيا، يوريا أو أيونات نترات ونتريت لا عضوية. إن معظم الـphytoplanktonتكون قادر ة على استيعاب واستعمال النتروجين بشكل أمونيوم، نترات، نتريت أو يوريا، بينما تمتلك بعض السيانوبكتريا قابلية إضافية لاستيعاب النتروجين الجزيئي.

وتحتاج السيانوبكتريا ضمن متطلباتها الغذائية إلى العناصر الغذائية المعدنية بتراكيز أثرية، حيث يدخل النحاس في كثير من الإنزيمات، وكذلك المنغنيز ليكونا معززين للنمو السيانوبكتيري مع الحديد والموليبديوم **[37]**، حيث يزيد الحديد من التركيب الضوئي عند الشدة الضوئية الواطئة وهذا يزيد تثبيت النتروجين.**[38]**.

يمكن فهم تأثير الحديد من خلال المركبات الحاوية عليه والمستخدمة في عمليات الأيض داخل الخلايا السيانوبكتيرية وكذلك في دوره الأساسي في النظامين الأكثر تطلباً للطاقة في الخلية، وهما اختزال الكربون واختزال النتروجين بالتركيب الضوئي. يسبب تقييد الحديد بصورة عامة في انخفاض تركيب صبغات التركيب الضوئي، وكذلك يتسبب في تكوين بنية تنظيمية تالفة للأغشية المتعلقة بالتركيب الضوئي، إن كلا هذين العاملين يقودان إلى انخفاض كفاءة التركيب الضوئي وفشل تشكيل الازدهار.**[37]**.

يؤكد الباحثان **[39]** أنه عند غياب الحديد أو عند تراكيز منخفضة له (أقل من أو يساوي 2.5 Mμ)، تنمو بعض أنواع السيانوبكتريا بصورة أبطأ بكثير مما هو عند التركيز الأعلى، ولكن الخلايا يمكن أن تنتج سماً أكثر بنسبة 20–40 بالمائة كما في الـ ***Microcystis aeruginosa***.

يؤكد الباحثان **[38]** إلى أن زيادة نسبة الحديد في الماء تكون منشطة ويمكن أن تؤدي إلى نمو سيانوبكتيري وتشكيل الازدهار، كما إن هناك ما يوحي بأن أهمية الحديد في تثبيت النتروجين تأتي من كونه يقدم للسيانوبكتريا المثبتة للنتروجين ميزة إضافية على السيانوبكتريا غير المثبتة للنتروجين وغيرها من الـphytoplankton في أوضاع ارتفاع تركيز الحديد وانخفاض تركيز النترات.**[37]**.

كما يؤكد **[40]** أن وجود الحديدوالنترات يظهران تأثيراً تعاونياً في تحفيز السيانوبكتريا على إنتاج المضاد الحيوي، وأن زيادة تركيز النترات $NaNO_3$ من 8.8 مايكرومول الى 26.4 مايكرومول ونقصان تركيز الحديد $FeSO_4.6H_2O$ من 15 مايكرومول إلى 3 مايكرومول في الوسط الزرعي للسيانوبكتريا يؤدي إلى زيادة إنتاج المضاد الحيوي. كما تتفق هذه النتائج مع ما توصلت إليه **[41]**.

دراسة تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المعزولة

التشخيص باستخدام جهاز (HPLC-MS)

High-Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

تم تشخيص الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع ***Nostoc linckia*** بواسطة جهاز High-pressure liquid chromatography-mass spectrometry وتبين أن أحد نواتج تفككه بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 3.858 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS هو المركب MCYST-YM(O) ذي الوزن الجزيئي 1035 وهو أحد أنواع السموم الكبدية من نوع Microcystin **[42]** وذلك عند الوزن الجزيئي 1033.8 في قراءات الطيف، كما أظهرت قراءات الطيف وعند الوزن الجزيئي 965.8 وجود السم الكبدي [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR ذي الوزن الجزيئي 966 وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا نوع ***Anabaena Sp.*** **[43]**.

كما تبين أن أحد نواتج تفكك الناتج الحيوي المستخلص من السيانوبكتريا نوع ***Nostoc linckia*** بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 13.834 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS قد أظهر وجود المركب MCYST-YM(O) ذي الوزن الجزيئي 1035 وهو أحد أنواع السموم الكبدية من نوع Microcystin **[42]** وذلك عند الوزن الجزيئي 1033.8 في قراءات الطيف، كما أظهرت قراءات الطيف وعند الوزن الجزيئي 965.8 وجود السم الكبدي [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR ذي الوزن الجزيئي 966 وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا نوع ***Anabaena Sp.*** **[43]**.

التشخيص باستخدام جهاز

Infrared Spectrophotometry (I.R)

تم تشخيص الناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Nostoc Linkia*** بواسطة جهاز Infrared Spectrophotometry وكانت النتائج ومن خلال دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء IR للناتج الحيوي قد أظهرت وجود المجاميع الفعالة التالية:

الحلقة الأروماتية، C=O، NH، C=O للكحولات والفينولات، C=C في الحلقة الأروماتية، N=H، OH للحوامض الكربوكسيلية، NH2، S-H.

وجميع هذه المجاميع تعود لتركيبي السم الكبدي Microcystins بشكليه اللذين وجدا في الناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Nostoc Linkia***.

التشخيص باستخدام جهاز (NMR) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

وللتأكيد على النتائج الواردة أعلاه تم تشخيص الناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Nostoc Linkia*** بواسطة جهاز Nuclear magnetic resonance spectroscopy وقد أظهرت النتائج ومن

خلال دراسة طيف الرنين النووي المغناطيسي (^{1}H NMR) للناتج الحيوي ظهور الحزم المنفردة التي تعزى إلى بروتونات المجاميع التالية:

CH_3-C، CH_3-NH_2، CH_3-C، CH_3-S، SH-CH_3، -CH_3، -$N^+(R)_3$، CH_3-O-CO، CH-O، R-CH_2-O-CO، R-CH=C، الحلقة الأروماتية

إن بروتونات المجاميع الظاهرة آنفاً والموجودة في أشكال الطيف تعود لتركيبي السم الكبدي Microcystins بشكليه اللذين وجدا في الناتج الحيوي للسيانوبكتريا المعزولة وتدعم نتائج التشخيص بتقنيتي طيف الكتلة و طيف الأشعة تحت الحمراء.

لقد أثبتت نتائج التشخيص للنواتج الحيوية للسيانوبكتريا نوع ***Nostoc Linkia*** بتقنيات طيف الكتلة وطيف الأشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي وجود السم الكبدي Microcystin بشكلين من أشكاله السامة وهي كالآتي:

1- (**Microcystines-** MCYST-YM(O) **Methionine-S-oxide tetra hydro tyrosine**)

2- (**Microcystins-** [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR **D-Aspartic$_3$,Dehydroalanine$_7$)-LR**

وهما شكلين من أشكال الـMicrocystins السامة المتعددة، وجدا في الناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Nostoc linckia*** ، وتشير المصادر إلى وجودهما في السيانوبكتريا نوع ***Microcystis aeruginosa*** ونوع ***Nostoc*** **sp**. ونـوع ***Anabaena*** **sp**. **[43]**، **[44]**،**[45]**.

المصادر

1. J. Schopf. Microfossils of the early Archean apex chert: new evidence of the antiquity of live. *J. Science. Vol.* 260. **(1993)**. 640 – 646.

2. J.W. Schopf & M.R. Walter. Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. In: The biology of cyanobacteria. (eds. N.G. Carr& B.A. Whitton). Blackwell Scientific, Oxford. **(1982)**. pp.543-564.

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

4. **G.E.**Fogg**.** The physiology of an algal nuisance. *Pro c. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* 173. **(1969)**. 175-189.

5. **علي صالح حسين**، الجبوري. العوامل المؤثرة في تحرير الهيدروجين بوساطة السيانوبكتريا المثبتة للنتروجين الجوي المعزولة محلياً . أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بغداد. **(1998)**. العراق.

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

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

8. **A. A.**Issa. Antibiotic production by the cyanobacteria ***Oscillatoria angustissima*** and ***Calothrix Paritina.*** Environmental Toxicology and Pharmacology, 8(1). **(1999).** 33-37.

9. **بهرام خضر**، مولود، نضال ادريس، سليمان، ابراهيم توفيق، البصام. الطحالب والاركيكونيات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. **(1989)**.

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

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

12. **N.** Tandeau de Marsac. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bactaiol.* 130(1). **(1977)**. 82-91.

13. **C. E.** Gibson & R. H. Fay. The photosynthesis and growth efficiency of a planktonic Blue Green Algae ***oscillatoria redeke***. Br. Phycol. J. 18. **(1983).** 39-45

14. **ناظم علاوي**، الشاهري. تأثير بعض إفرازات السيانوبكتريا على بعضها وعلى بعض الجراثيم. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة تكريت .**(1997)**. العراق.

15. **إيمان عبد العزيز**، مصطفى. التأثيرات البايولوجية المثبطة لمستخلصات بعض النباتات الطبية في بعض الأحياء الدقيقة المعزولة من قنوات جذور الأسنان غير الحية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل. **(1995)**.

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

17. **خاشع محمود**، الراوي و محمد خلف الله، عبد العزيز. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل– دار الكتب للطباعة والنشر. **(1982)**.

18. **نهاد عبد محمد**، الدوري. دراسة بيئية لبعض أنواع السيانوبكتريا المعزولة من نهر دجلة ضمن محافظة صلاح الدين واختبار فعالية مستخلصاتها على بعض البكتريا المرضية. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة تكريت. **(2005)**. العراق.

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

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

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

34. **H.W.**Paerl, J.Tucker & P.T.Bland. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (***Microcystis aeruginosa***) surface blooms. *Limnol. Oceanogr.* 28. **(1983).** 847-857.
35. **G.W**.Prescott. The algae: a review. Houghton Mifflin Co., Boston. **(1968)**.
36. **H.C.**Bold & M.J. Wynne. Lntroduction to the algae. Structure and reproduction. 2nd ed. Prentice-Hall Inc., Eaglewood Cliffs, N.J. **(1985)**.
37. **J.G**.Reuter & R.R. Petersen. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *N.Z. J. Marine Freshwat. Res.* 21.**(1987)**. 435-445.
38. **J.F.**Elder & A.J.Horne. Biostimulatory capacity of dissolved iron for cyanophycean blooms in a nitrogen-rich reservoir. *Chemosphere* 9. **(1977)**.525-530.
39. **M.** Lukas & R. Aegerter. Influence of trace metals on growth and toxin production of Microcystis aeruginosa. *Toxicon* 3(93). **(1993)**. 293-305.
40. **S.** Bloor & R. R. England. Antibiotic production by the cyanobacterium ***Nostoc muscorum***. *J. Appl. Phycol. Vol.* 1.**(1991)**. 367-372.
41. سهام شكور عبيد، **الصالحي**. تأثير بعض المستخلصات المعزولة من السيانوبكتريا على بعض أنواع البكتريا والفطريات. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات – جامعة تكريت. **(1999)**.العراق.
42. **D.P.** Botes**,** P.L. Wessels, H. Kruger, M.T.C. Runnegar, S.Santikarn, R.J. Smith, J.C.J. Barna and D.H. Williams. Structural studies on cyanoginosins. (**1985**).
43. **K.** Sivonen, M. Namikoshi, W.R.Evans, W.W. Carmichael, F. Sun, L. Rouhiainen, R. Luukkainen & K.L. Rinehart. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus ***Anabaena.*** *App. Env. Microbiol.* 58.**(1992a)**. 2495-2500.
44. **K.**Sivonen, S.I.Niemela, R.M.Niemi, L.Lepisto, T.H.Luoma & L.A.Rasanen. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* 190.**(1990)**.267-275.
45. **K.** Sivonen, M. Namikoshi, W.R. Evans, B. Gromov, W.W. Carmichael & K.L. Rinehart. Isolation and structures of five microcystins from a Russian Microcystis aeruginosa strain CALU 972. *Toxicon* 30(11). **(1992b)**.1481-1485.
22. **A.**Pongtep & H.Orenzen. N2 fixing blue-green algae (Cyanobacteria) of high efficiency from paddy soils of Bankok, Thailand: Characterization of species and N2-fixng capacity in the laboratory. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 63(1). **(1982)**. 53-70.
23. **P. A.**Roger. Cyanobacteria et riziculture; Bull. Soc. Bot. Fr. 136. *Actual. Bot.*1. **(1989)**. 67-81.
24. **W.D.P.**Stewart. Algal fixation of atmospheric nitrogen. Plant and soil. 32. **(1970).** 555-558.
25. **J.F.**Talling. The depletion of carbon dioxide from lake water by phytoplankton. *J. Ecol.* 64.**(1976)**.79-121.
26. **سلمان برهان عبد الحسين**، البلداوي. دراسة عن السيانوبكتريا وتأثيرها المتداخل مع الأسمدة المعدنية في نمو وحاصل نبات الرز (***Oryza sativa L.***) في التربة المغمورة موسمياً. رسالة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. **(1997)**. العراق.
27. **B.**Moss. The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae:An experimental study. 2. The role of pH and the carbon dioxidebicarbonate system. *J. Ecol.* 61. **(1973)**.157-177.
28. **J.K**. Ladha**,** I. Watanabe and P.A. Roger. Biological nitrogen fixation in wetland rice; proceedings of a conference on women in rice farming systems. *IRR. Philippines*. **(1983)**. 481-487.
29. **G.G.**Ganf & R.L. Oliver. Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of green algae by blue-green algae in the plankton of a stratified lake. *J. Ecol.* 70. **(1982)**. 829-844.
30. **M.M.** Tilzer. Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. *N.Z. J. Marine Freshwat. Res.* 21. **(1987**). 401-412.
31.**G.G.** Ganf**,** S.I. Heaney & J. Corry. Light absorption and pigment content in natural populations and cultures of a non-gas vacuolate cyanobacterium Oscillatoria Bourrellyi (Tyckomema bourrellyi). *J. Plank. Res.* 13(5). **(1991)**.1101-1121.
32. **A.**Abeliovich & M.Shilo. Photooxidative death in blue-green algae. *J. Bacteriol.* 111(3). (**1972)**.682-689
33. **J.N**. Eloff, Y. Steinitz & M.Shilo. Photooxidation of cyanobacteria in natural conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 31. **(1976)**.119-126.

Effect of some environmental factors on growth and bioproducts in cyanobacteria *Nostoc Linkia*

Aeman A. Saleem[1], Hammed S. Khamees[2] , Ehssan M. Abdullah[3]
[1] *Salahaldin Education General directorate, Salahaldin, Iraq*
[2] *Education college for women Tikrit university , Tikrit, Iraq*
[3] *Medicine College Tikrit university, Tikrit, Iraq*

Abstract:
Effect of some environmental factors on ***Nostoc Linkia*** (one species of cyanobacteria) which have been isolated from Tikrit city.
Environmental factors have been studied on daily growth and bioproducts of ***Nostoc Linkia***.

Three different level of temperatures were used 16, 26 and 36ºC it has been shown that the best growth and bioproducts under 26ºC for the cyanobacteria ***Nostoc Linkia***, whereas the effect of PH on daily growth and bioproducts shown that the PH 7.6 was better than the PH 6.6 and 8.6.
The effect of light intensity on growth and bioproducts shown that the light intensity of 2500 lux gave better daily growth and bioproducts from the light intensity 1250 and 5000 lux.
The effect of addition of macro and micro nutrients to the growth medium ASM-1 by replacement of NaCl by $NaNO_3$, showed that there is an increase in daily growth and quantity of bioproducts, also addition of $FeSO_4.7H_2O$ and $NaNO_3$ together showed further increase of daily growth and bioproducts quantity in the cyanobacteria ***Nostoc Linkia***.
Identification of bioproduct extracts from the cyanobacteria ***Nostoc Linkia*** by HPLC-MS, IR and NMR shown the presence of the hepatic toxin Microcystin in two structures.