Bas.j.Vet.Res. Vol.10, No.2, 2011

عـزل وتشخيــص الطحلـب *Oscillatoria tenuis var.natans* Gomont من الميـاه العراقيـة ودراسة قابليتـه على انتـاج السموم وتأثيراتها الحيويـة على الفئران المختبرية

ميثم عبدالله غالي الشاهين و فرحان بدن حاجم السلطان
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة البصرة
(الاستلام 29 حزيران 2011، القبول 16 تشرين الاول 2011)

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص الطحلب الاخضر- المزرق *Oscillatoria tenuis var.natans* Gomont من نهر كرمة علي في البصرة جنوب العراق. أذا مكن الحصول على مزرعة نقية منة واختبرت قابلية هذا الطحلب على إنتاج السموم بأستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC والتي أثبتت بأن الطحلب *O.tenuis var.natans* له القابلية على إنتاج احد انواع سموم المايكروسستينات المسمى MC-LR [Dha^7]، والمايكروسستينات هي سموم تعود للسموم الكبدية والتي تنتج عادة من عدة انواع تابعة للطحالب الخضر المزرقة (البكتريا الخضر المزرقة) ، كما اجري الاختبار الحيوي على الفئران المختبرية بحقنها تحت البريتون بالمستخلص الكحولي للطحلب المعزول للتعرف على الجرعة القاتلة الوسطى و التأثيرات المظهرية والسلوكية للسمية المستخلص و كذلك التغييرات النسيجية للكبد والكلية للفئران المعاملة . وأظهرت النتائج أن السم يمتلك جرعة قاتلة وسطى بلغت (1455) ملغم خلايا جافة \ كغم وزن حيوان ، وقد تم اختيار الجرعة (1500) ملغم \ كغم باعتبارها الأقرب للجرعة القاتلة الوسطى وسجلت التغييرات المظهرية والسلوكية التي ظهرت عليها ومن أهمها الخمول وشحوب لون الإذنين والذنب وكذلك قلة الشهية وبعض حالات الاسهال. اما الدراسة النسيجية لأكباد وكلى الفئران المختبرية المعاملة بالجرعة (1500) ملغم \ كغم فقد أثبتت نتائجها وجود حالة الورم الحبيبي وتجمع للخلايا الدفاعية والنزف الدموي وتحلل بعض انويه وخلايا الكبد فضلا" عن عملقة بعض الخلايا الكبدية والتنكس للخلايا . اما فيما يخص الكلية فقد سجلت الدراسة الحالية حالة النزف الدموي الشديد وتنكس لخلايا النبيبات الكلوية وتحلل جزئي في الكبيبات وكذلك تحلل لبعض الخلايا الكلوية. واعتمادا" على مجمل هذه النتائج تعد الدراسة الحالية التسجيل الأول من نوعه في العراق لقابلية الطحلب *O.tenuis var. natans* لإنتاج سم المايكروسستين.

المقدمة

تعرف البيئة المائية بتنوعها الإحيائي الكبير والواسع ، وتعد الطحالب واحدة من تلك الإحياء والتي لا يكاد مسطح مائي يخلو منها ، وتمتلك الطحالب تأثيرات سلبية وايجابية على الماء والكائنات الحية التي تعيش معها ومن بين تأثيراتها السلبية الخطرة هي انتاجها للسموم بأنواعها الثلاثة : السموم الكبدية Hepatotoxins، والسموم الخلوية Cytotoxins، والسموم العصبية Neurotoxins (27,13). تعد السموم الكبدية من أقوى واخطر السموم الحيوية المنتجة من قبل الطحالب السامة (10) وهي تنتج من قبل العديد من الانواع التابعة لقسم الطحالب الخضر المزرقة Cyanophyta (والتي تدعى ايضاً بالبكتريا الخضراء المزرقة Cyanobacteria) خصوصاً بعض الأنواع التابعة للاجناس *Nostoc* , *Anabaena* ، *Microcystis* ،*Oscillatoria* (27,13) واحد أنواع السموم الكبدية العضوية يدعى بالمايكروسستين Microcystin ويكتب اختصارا" (MCYST) (54 ,57) أو (M C) في دراسات أخرى (66,65 , 70). وهذا السم مسؤول عن الاختلال الصحي وموت الكثير من الكائنات الحية التي تتعرض له عن طريق المياه كالحيوانات البرية والأليفة (69,35,13,12) والأسماك (42 ,57) وكذلك فان لهذه السموم تأثيرات سلبية خطرة على صحة الإنسان وقد تسببت فعلا" في موت بعض الاشخاص في البرازيل (6 ,15) ومما تجدر الاشارة اليه بأن حالات التسمم للحيوانات والانسان ترتبط مع حدوث حالات الازدهار Blooming للطحالب الخضر المزرقة في المياه ، اذ ان سموم هذه الطحالب تكون سموم داخلية وليست سموم خارجية ولكن بعد موت الطحالب تتحلل خلاياها فتنطلق سمومها للبيئة مسببة اضرارها الصحية على الكائنات الحية (13 ,15,25,27).

وقد اشارت العديد من الدراسات وجود علاقة بين سموم السيانوتوكسين و سرطان الكبد الابتدائي PLC (Primary Liver Cancer) أذ سجلت هذه الحالات في الانسان متزامنة مع وجود السموم الكبدية في مياه الشرب (66,65 , 70). ، وكذلك فأن تلوث المياه بهذه السموم تؤدي إلى نشؤ السرطان في أكباد الفئران المختبرية (26,25) ولها تأثيرات سمية مزمنة وشديدة لأكباد الفئران المختبرية (23). اما موت الفئران المختبرية فقد يحدث بعد حقن الفئران بالمايكروسستينات بسبب الفشل الكبدي (8) ، كما سجل تضرر بقية الأعضاء كالكلية والأمعاء والرئة وكذلك القلب (9 ,17 , 41).

ولذلك تعد سموم المايكروسستينات من أكثر سموم الطحالب الخضر المزرقة شيوعاً في النظم المائية المختلفة وهي خطرة على الإنسان والحيوان إلى درجة الموت (34).وقد أشار (13) و (27) بان هنالك العديد من أنواع الطحالب بإمكانها إفراز أنواع كثيرة من المايكروسستينات مثل MC-LR و MC-RR و MC-YR اذ يشير المقطع MC الى مختصر السم المايكروسستين Microcystin اما الحرفين LR , RR , YR في مختصر لأسم أثنين من الاحماض الامينية المميزة لنوع السم(13,12,10)

كما ذكر (28) بأن المايكروسستينات من اكثر سموم الطحالب الخضر المزرقة Cyanotoxins شيوعا" وانتشارا" ، وهناك أكثر من 80 نوعا مشخصا" من هذه السموم في العالم حاليا"(32).

تعد دراسة (2) أول دراسة في هذا المجال في العراق إذ استطاعت تشخيص ستة أنواع من الطحالب السامة في مياه محطات تصفية مياه الشرب في مدينة البصرة وشخصت نوعين من سمومها هما MC-LR وMC-YR ، ولاحظت دراسة (1) التأثيرات الحيوية والنسيجية للسم المنتج من الطحلب *M. aeruginosa* على الفئران المختبرية، واخيرا" سجلت دراسة (3) التغيرات المرضية النسيجية في بعض اعضاء اسماك الكارب العشبي بفعل تغذيتها على الطحلب السام *Nostoc muscurum*.

وعلى الرغم من اهتمام الباحثين في العالم بدراسة التأثيرات الحيوية لسموم الطحالب إلا أنها تركزت في الغالب على السموم المنتجة من الطحلب *M. aeruginosa* (13, 62)، ولذلك جاءت الدراسة الحالية لمعرفة التأثيرات المظهرية والسلوكية على الفئران المختبرية فضلا" عن دراسة التأثيرات النسيجية الناتجة من السم المنتج من قبل الطحلب *Oscillatoria tenuis var.natans* .

2. المواد وطرائق العمل

1.2.جمع العينات

جمعت عينات الطحالب الملتصقة على الصخور والطين خلال شهر ايار 2010 من نهر الكرمة المقابل لموقع جامعة البصرة بطريقة القشط بآلة حادة ثم وضعت في قناني بلاستيكية نظيفة وثبتت بعض عينات الطحالب باستخدام الفورمالين بتركيز 4% لتشخيصها مختبريا" و اعتمدت المصادر(18 ,60) للتشخيص.

2.2. عزل وتنقية الطحالب

لغرض الحصول على مزرعة وحيدة الطحلب Unialgae تم الاعتماد على طريقتي التخطيط والنشر Streaking and Spreading method على الوسط الزرعي 0 الصلب وكما موضح من قبل (64).وقد اعتمد الوسط الزرعي Chu-10 الموصوف من قبل (4).

ولتنقية الطحالب المعزولة من الجراثيم والفطريات فقد اعتمدت طريقة (68) والمتضمنة غسل الطحالب بالماء المقطر المعقم لـ 12 مرة على الأقل ثم التأكد من خلو العزلة من البكتريا والفطريات بزرعها على الوسطين Nutrient Agar و Potato Carrot Agar.

3.2. اكثار العزلة

تمكنت الدراسة الحالية من عزل وتنقية الطحلب السام *Oscillatoria tenuis var.natans* ، ولغرض اكثار العزلة فقد زرعت في دوارق زجاجية سعة 2 لتر حاوية على لتر واحد من الوسط الزرعي chu-10 المعقم بواسطة المؤصدة. وضعت الدوارق في كابينة النمو على حرارة (27±2) درجة مئوية ولفترة

اضاءة – ظلام متعاقبة (8:16) وبشدة إضاءة (50– 75) لوكس ورجت المزارع وغيرت مواقعها يومياً لغرض التهوية وتقليل فرق الإضاءة . اعتمدت طريقة قياس الوزن الجاف لقياس معدل النمو (64). حصدت المزارع بعد وصولها للفترة المحصورة بين نهاية الطور الاسي وبداية الطور المستقر (اي بعد مرور 24-26 يوما" من الزرع) وذلك بواسطة جهاز الطرد المركزي Auto Bench centrifuges نوع IV صنع شركة Baird and Tatlock بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق ، ثم جفد المحصول باستعمال جهاز التجفيد Lyophilizer إنتاج شركة Labconco تحت درجة حرارة – 100 ْم وضغط 0.006 جو لمدة 24 ساعة، حفظت العينات المجفدة في الثلاجة بدرجة 4 ْم .

4.2. استخلاص وتنقية السموم

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (51) ، إذ خلطت عينة الطحلب المجفده 1 غم مع المزيج العضوي Methanol- n-Butanol -Water (MBW) بالنسب (4:1:15) في دورق زجاجي وكانت نسبة الخلط 25 مل مزيج عضوي / 1 غم خلايا جافة .أغلقت فوهت الدورق بشريط البرافين لمنع التبخر ورجت العينة جيدا" لمدة ساعة واحدة ثم طردت مركزيا" لجمع الراشح وكررت العملية اعلاة لثلاث مرات بعدها جمع الراشح الكلي وركز باستخدام تيار هوائي جاف ليصل حجم الراشح النهائي الى 3-2 مل.

ولتنقية السم المستخلص اعلاه فقد اعتمدت تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography الموضحة من قبل (56,55) والمتضمنة استخدام عمود زجاجي ذو قياس (3×20) سم ملئ بهلام السليكا Silica gel (100– 200 mesh) بنسبة 10 غم سيليكا / 1 غم خلايا جافة. مرر الراشح المركز خلال عمود الفصل وغسل بثلاث مذيبات وهي على التوالي: الماء المقطر ، الميثانول (20%) ، الميثانول (80%) وبمعدل جريان 2 مل / دقيقة ، وأهملت نواتج فصل المذيبين الاول والثاني واعتمدت نواتج الفصل للمذيب الثالث والتي ركزت الى حجم 3 مل بالتيار الهوائي الجاف.

5.2. الكشف عن المادة السامة

تم الكشف عن المادة السامة ودرجة نقاوتها باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) اذ استخدمت صفائح Silica gel بحجم (2×10) سم وحمل عليها10 مايكروليتر تقريبا" من نواتج الفصل للمذيب الميثانول(80%) بعدها وضعت الصفائح في وعاء زجاجي ذو غطاء محكم الغلق مشبع بأبخرة نظام التصعيد. إذ اعتمد نظامين للتصعيد خلال الدراسة الحالية ، كان النظام الاول متكون من (Water - Ethyl acetate - 1- Propyl alcohol) بنسبة (3:3:4) حجما" على التوالي ،بينما النظام الثاني تكون من (Water - Ethyl acetate - 1- Propyl alcohol) بنسبة (2:4:4) حجما" على التوالي (59)، تركت الصفائح لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم كشف عن موقع المادة السامة باستخدام مصباح الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet lamp فضلا" عن استخدام حامض الفوسفومولبديك.

6.2. الاختبارات الحيوية

قيست الجرعة القاتلة الوسطى للطحلب *O. tenuis var. natans* وذلك بأستخدام ذكور فئران مختبرية بيضاء Albino mise سلالة Balb/c تراوحت اوزانها بين(25– 30) غم اعتمادا على الطرق الموضحة من قبل (47) ، قسمت الفئران الى خمس مجاميع ضمت كل مجموعة خمسة فئران، إذ أخذت أوزان مختلفة من الخلايا الجافة الطحلب *O. tenuis var.natans* للحصول على التراكيز التالية (2000,1500,1000,500) ملغم خلايا جافة / كغم وزن حيوان، واستخلصت المادة السامة من خلايا الطحلب باستخدام الميثانول (95%) لثلاث مرات ولمدة ساعة واحدة لكل مرة باستعمال Magnetic stirrer ، ثم جمع الراشح بواسطة الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة/دقيقة بعدها جفف الراشح باستعمال تيار هوائي جاف. اذيبت المادة المستخلصة لكل وزن على حده في 1 مليليتر من المحلول الفسيولوجي الملحي (0.9%) من ملح كلوريد الصوديوم ، وحقنت اربع مجاميع من الفئران المختبرية تحت البريتون Intraperitone (ip) بواحد مليليتر من التراكيز الأربعة أعلاه بينما حقنت المجموعة الخامسة بواحد مليليتر من المحلول الفسيولوجي فقط و اعتبرت كمجموعة سيطرة، ولتحديد قيمة الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) للطحلب السام قيد الدراسة اجري التحليل الإحصائي من خلال استخدام جدول تحويل النسب المئوية للوفيات الى القيم المقابلة لها من وحدات الاحتمالية ثم استخراج قيمة الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) (5) وحسب ورقة الاحتمالية (شكل 1) . خضعت الفئران للمراقبة لمدة48 ساعة، وسجلت التغيرات المظهرية والسلوكية والوفيات الحاصلة وشرحت الحيوانات بعد نهاية مدة المراقبة لغرض دراسة التغيرات النسيجية لكل من الكبد والكلية .

7.2. الدراسة المرضية النسيجية

تحضير الأنسجة

حضرت الانسجة لدراسة التغيرات النسيجية في أنسجة الكبد Liver و الكلية Kidney للفئران المختبرية المستخدمة في اختبار(LD_{50}) وكذلك حيوانات السيطرة ، اذ اختيرت الحيوانات المعاملة بالجرعة (1500) ملغم/كغم باعتبارها الأقرب إلى الجرعة القاتلة الوسطى المستخرجة حسب الطريقة أعلاه والتي بلغت(1455) ملغم/كغم ، إذ تم اخذ الكبد والكلية من الحيوانات التي ماتت خلال التجربة اما الحيوانات التي لم تمت فقد تم قتلها بعد مرور 48 ساعة من الحقن، وقد شرحت جميع الحيوانات لاخذ العضويين الكبد و الكلية وقطعا بحجم 0.5 سم ، ثم حضرت المقاطع النسيجية بأتباع طريقة شمع البرافين للفحص بالمجهر الضوئي حسب الطريقة الموضحة من قبل (50).

3.النتائج

1.3. عزل وتنقية الطحالب

استطاعت الدراسة الحالية من عزل وتنقية الطحلب السام *O. tenuis var.ntans* Gomont من ساحل نهر الكرمة ولوحظ انة يتبع الوصف التالي: وهو احد الطحالب الخضر المزرقة الخيطية غير القطبية وغير المتفرعة ويتالف الخيط من عدد من الخلايا المتراصة و يتميز بوجود خلية قمية شبة مدورة والخلايا كانت بعرض (7.4– 8.6) مايكرون وطول(3.8–4.2) مايكرون ، وهو يتبع التصنيف التالي :

Division: Cyanophyta

Class: Cyanophyceae

Order: Oscillatoriales

Family: Oscillatoriaceae

Genus: *Oscillatoria*

Species: *tenuis var.natans*

2.3. الكشف عن المادة السامة ونقاوتها

بينت نتائج تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بأن المادة المستخلصة من الطحلب *O. tenuis var.natans* تحوي مادة ظهرت بشكل بقعة واحدة خلال استخدام كلا نظامي التصعيد سابقي الذكر. اذ امتلكت المادة قيمة (R_f) بلغت(0.71) عند استخدام نظام التصعيد الأول بينما كانت قيمة (R_f) قد بلغت (0.63) باستخدام نظام التصعيد الثاني .

3.3. الاختبارات الحيوية

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام ورقة الاحتمالية بأن قيمة الجرعة القاتلة الوسطى لراشح الطحلب *O.tenuis var.natans* بلغت (1455) ملغم خلايا جافة/ كغم وزن حيوان (شكل 1).

4.3. التغيرات المظهرية والسلوكية

اظهرت النتائج بأن هناك تغيرات مظهرية وسلوكية لوحظت على فئران التجربة والمرافقة للجرعة المعطاة (1500) ملغم/كغم خلال الدراسة الحالية اذ انها عانت من الخمول او النعاس، وكذلك شحوب لون الاذنين والذنب ، كما لوحظت حالة قلة الشهية او الامتناع عن الأكل كلياً مع بعض حالات الاسهال.

5.3. الدراسة النسيجية

اثبتت نتائج الدراسة النسيجية للفئران المعاملة بمستخلص الطحلب *O. tenuis var.natans* حصول تغييرات مرضية نسيجية في الأعضاء المدروسة (الكبد و الكلية) للجرعة(1500) ملغم/كغم المعطاة للفئران المختبرية مقارنة" مع نماذج السيطرة (الصور 1--8).

الكبد Liver

أوضحت المقاطع النسيجية لكبد الفئران المعاملة بالجرعة(1500) ملغم/كغم حالة الورم الحبيبي Granuloma وتجمع الخلايا الدفاعية في متن الكبد و النزف الدموي وحالة التنكس الضبابي كما هو موضح بالصور (3,2)، وكذلك تحلل الانوية وبعض الخلايا الكبدية وتحبب في السايتوبلازم Granulation وزيادة في أعداد خلايا Kupffer المناعية ، فضلا" عن عملقة بعض الخلايا الكبدية صورة (4).

الكلية Kidney

أوضحت المقاطع النسيجية لكلية الفئران المعاملة حالة النزف الكلوي الشديد وتنخر النبيبات الكلوية صورة (6)، وكذلك تحلل جزئي في الكبيبات وتنكس لبعض خلايا النبيبات الكلوية صورة (7)، والاضمحلال شبة الكامل في الكبيبات وتنكس النبيبات الكلوية صورة (8) .

المناقشة

الكشف عن السموم

يعد اختبار كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(TLC) من الاختبارات الكيميائية الناجحة في تشخيص السموم الكبدية للطحالب وخصوصا" المايكروسستينات بل وتحديد انواع سموم المايكروسستينات المختلفة وبدقة عالية خصوصا" مع استخدام مصباح الاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 238 نانومتر وهو الطول الموجي الذي يحدث عنده اعلى امتصاصية للسموم الكبدية وخاصة" لسموم المايكروسستينات وبذلك اصبح مميزا" لها، وكذلك فأن هذا الاختبار يعد اختبارا" سهلا" وقليل التكلفة ويمكنه تحقيق نتائج مماثلة لما يتم الحصول علية من تشخيص لأنواع المايكروسستينات بواسطة التقنيات الأخرى مثل ELISA Kit , HPLC , PPIA وغيرها والتي تتميز بارتفاع كلفتها وطول الوقت اللازم لإجرائها (59,58) .

بينت نتائج هذا الاختبار بان عزلة الطحلب *O. tenuis var.natans* منتجة للسموم الكبدية من نوع المايكروسستينات ، اذ امتلكت المادة المستخلصة من عزلة الطحلب قيمة R_f مقاربة جدا" للمصادر وحسب كلا نظامي التصعيد المستخدمين في الدراسة الحالية . أذ عند مقارنة نتائج الدراسة الحالية مع المصادر يتبين بأن كلا نظامي التصعيد المستخدمين قد أعطى نتائج تشير الى نفس نوع السم وهو MC-LR [Dha^7].اذ يمتلك هذا السم قيمة R_f تساوي (0.70) حسب نظام التصعيد الاول (59) وهذه نتيجة قريبة جدا" من قيمة R_f للدراسة الحالية والبالغة (0.71) ، وكذلك فأن نفس السم MC-LR [Dha^7] يمتلك قيمة R_f تساوي (0.61) عند استخدام نظام التصعيد الثاني (59) وهذا قريب من قيمة R_f للدراسة الحالية والبالغة (0.63). وبذلك وعلى الرغم من استخدام نظامين مختلفين للتصعيد لتشخيص نوع المادة المستخلصة في الدراسة الحالية فأن كلاهما أكدا وجود نفس النوع من السم الكبدي

التابع للمايكروسستينات وهوMC-LR [Dha^7]. وبهذه النتيجة فضلا"عن نتائجنا للدراسة المظهرية والنسيجية تعد الدراسة الحالية اول تسجيل في العراق لقابلية الضرب var. natans التابع للجنس O.tenuis لانتاج السموم الكبدية من نوع المايكروسستين اذ لم يسجل سابقا" انتاج السموم الا من الجنس O. tenuis وليس هذا الضرب (19,7,2).

الاختبارات الحيوية

الجرعة القاتلة الوسطى

إن الاختبار الحيوي هو الاختبار الأمثل والأول للكشف الأولي عن سموم الطحالب، إذ يمتلك هذا الاختبار العديد من المميزات التي تجعله في مقدمة الاختبارات منها قلة تكلفته وسهوله العمل نسبياً، كما انه بإمكان هذا الاختبار التمييز بين السموم الكبدية - خصوصا" المايكروسستينات وتأثيراتها على الكبد- والسموم العصبية من خلال الإعراض والوقت اللازم لظهورها على الحيوانات المختبرية (13,12).

الاختبارات الحيوية باستخدام الفئران، من خلال حقنها تحت البريتون (ip) بمستخلصات الطحالب الخضر المزرقة أو بالسموم النقية، تعد من التطبيقات الشائعة لتمييز سمية المايكروسستينات (52, 46,29,21) اذ اكدت دراسة (15) على أفضلية استخدام الحقن تحت البريتون بدلا" من الجرعة الفموية وذلك لان الجرعة الفموية تحتاج الى كمية اكبر من السموم او الطحالب السامة حتى يمكن ملاحظة مظاهر وعلامات التسمم على الحيوانات المختبرية فضلا" عن ضياع كمية كبيرة من السموم خلال القناة الهضمية والفضلات ، وكذلك فقد أوضحت دراسة (29) بأن استخدام الحقن تحت البريتون افضل (30-100) مرة من التجريع الفموي للسم MC-LR .كما أشارت الكثير من الدراسات على أفضلية استخدام ذكور الفئران في مثل هذه الاختبارات (21، 23، 46 ،67). وقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية لاختبار(LD_{50}) بأن عزلة الطحلب قيد الدراسة امتلكت قيمة بلغت (1455) ملغم خلايا جافة / كغم وزن حيوان وهذه القيمة تعد ضمن المدى القياسي للجرعة القاتلة الوسطى للطحالب السامة التي اشارت لها الدراسات والتي حددت أعلى القيم لهذا الاختبار والتي يعد فيها الطحلب ساما" تصل الى (1600) ملغم خلايا جافة/كغم وزن حيوان والقيم الأعلى من ذلك يعد فيها الطحلب غير سام (47,46,45).

ان اختيار الدراسة الحالية للجرعة (1500) ملغم/كغم لدراسة التغييرات المظهرية والسلوكية وكذلك النسيجية جاء بسبب ان هذه الجرعة هي الأقرب للجرعة القاتلة الوسطى المستخرجة والبالغة (1455) ملغم/كغم وكذلك للتركيز على دراسة تأثيرات هذه الجرعة على الحيوانات المختبرية.

التغييرات المظهرية والسلوكية

إن التغييرات المظهرية والسلوكية الملاحظة على فئران التجربة والمرافقة للجرعة (1500) ملغم/ كغم المعطاة خلال الدراسة الحالية، فقد تمثلت بالاضطراب والخمول أو النعاس، وكذلك شحوب لون الإذنين والذنب والذي يترافق عادةً مع نزف الكبد والذي يؤدي إلى سحب الدم من الدورة الدموية المحيطية وهذا يتوافق مع الدراسات (22 ,45 , 63) كما لوحظت حالة قلة الشهية او الامتناع عن الاكل كلياً مع بعض حالات الاسهال وهذا يتفق مع الدراسات (22,12,11) التي سجلت مثل هذه الإعراض.

وبشكل إجمالي فأن الإعراض والتغيرات المرضية والسلوكية التي ظهرت على حيوانات التجربة خلال الدراسة الحالية كانت مطابقة لما يحدث عند التعرض للسموم الكبدية إذ انه لم تلاحظ حالات الموت السريع والمميزة للسموم العصبية المصحوبة بالتشنجات العضلية والشلل، وهذا يتفق مع الدراسات التي عدت الطحلب *O. tenuis* كأحد الأنواع المنتجة للسموم الكبدية من نوع المايكروسستينات (7 , 19).

الدراسة المرضية النسيجية

أظهرت نتائج الفحص المجهري لأنسجة الكبد في للفئران المعاملة بمستخلص الطحلب *O. tenuis var.natans* للجرعة (1500) ملغم/كغم حصول تغييرات مرضية نسيجية ، اذ ان الكبد هو العضو المستهدف الاول من قبل السموم الكبدية وخصوصا السموم من نوع المايكروسستينات اذ ذكر (21,20) بان الدراسات المختبرية والملاحظات الحقلية لتسمم الحيوانات في بيئتها كان فيها الكبد هو الهدف الرئيس للسموم. وقد أظهرت الدراسات بان كمية سموم المايكروسستينات تزداد بشكل كبير في اكباد الفئران المختبرية خلال مدة تتراوح بين دقائق لتصل أقصاها بعد ثلاث ساعات (40,39). وقد لاحظت الدراسة الحالية وجود حالة النزف في انسجة الكبد فضلا" عن التنخر والتنكس الحاصل لخلاياه بسبب التأثير الضار لسموم المايكروسستينات وهذا يتفق مع العديد من الدراسات (41,34,1) التي اشارت الى ان حالة النزف الكبدي هي احدى مميزات سموم المايكروسستينات والذي يحدث نتيجة تنخر او تنكس خلايا الكبد ثم يأتي الموت بعد ذلك بسبب الصدمة النزفية (11 ,17 , 38) ، فضلا" عن ذلك فأن هذه الدراسات اعزت سبب تنخر الكبد بعد تضخمة الى النزف الداخلي للكبد ، اذ ان التنخر يبدأ في منطقة centrilobular ثم يستمر محيطيا" وتصبح الخلايا الكبدية مكورة ثم تتفكك واخيرا" تتنخر. اما السبب الرئيسي للنزف فهو يعود لقدرة سموم المايكروسستينات على تثبيط انزيم البروتين فوسفاتيز وبالتالي تحطم الهيكل الداخلي الساند للخلايا الكبدية (37,13). وقد سجل (48) ظهور حالة النزف في اكباد وخياشيم الأسماك المحقونة بسموم المايكروسستينات، وقامت دراسة (30) ببحث مناعي لأحد أنواع الأسماك مختبريا" لتتبع ازدياد تركيز وتراكم السم MC-LR في الكبد وسجلت ذلك فضلا" عن ملاحظة النزف الكبدي و حالة موت الخلايا الكبدية(Apoptotic cell death).

وكذلك فقد لوحظ خلال الدراسة الحالية تجمع الخلايا الدفاعية بين فصيصات الكبد وهذا ما سجلته العديد من الدراسات (25 ,34) ويبدو ان تجمع الخلايا الدفاعية في انسجة الكبد جاء كرد فعل مناعي تجاه سموم المايكروسستينات (36).

ومن الاعراض الاخرى التي ظهرت على النسيج الكبدي خلال الدراسة الحالية هي تحلل الانوية وبعض الخلايا الكبدية فضلا" عن تحبب السايتوبلازم وهذا مخالف لما ذكرته دراسة (16) من ان خلايا الفئران والجرذان المصابة بالسموم قد احتفظت بأنويتها والمايتوكوندريا ولكنها اصبحت منتفخة ، وقد اثبتت الدراسات على قدرة السمين MC-LR و MC-YR على تحطيم الـ DNA لخلايا الكبد والكلية وغيرها من الأعضاء للفئران و الجرذان المختبرية (44,33,32,31) وفضلا" عما سبق من أسباب فربما يكون موت الخلايا والتخر والتنكس الحاصل لها هو بسبب تحطم ال DNA ، وكذلك فأن دراسة (34) قد سجلت اختفاء المادة الكروماتينية من الخلايا الكبدية للفئران المعاملة بسموم المايكروسستينات. من جهة أخرى فأن زيادة خلايا kupffer المسجلة في الدراسة الحالية جاءت متطابقة مع دراسة (1) والتي أكدت بأن هذه الخلايا كانت تملاء الفراغات بين خلايا الكبد.ومن الجدير بالذكر بأن خلايا kupffer هي خلايا مناعية من نوع Monocyte وهي ثابتة في الكبد ووظيفتها التهامية وتزداد خلال الالتهابات وزيادتها في الكبد يدل على الالتهابات في انسجتة بسبب التأثير الضار للسم على الخلايا الكبدية. وأخيرا" فقد لاحظت الدراسة الحالية ظهور حالة عملقة الخلايا الكبدية وهو ما يتفق مع الدراسات التي سجلت ظهور الخلايا الكبدية المتضخمة فضلا" عن التضخم النووي والذي ربما يكون بسبب زيادة المادة النووية وهذا قد يشير الى قابلية سموم المايكروسستينات على سرطنة الخلايا (36). وقد أشارت عدة دراسات الى العلاقة بين سموم المايكروسستينات وتحفيز الورم (tumour promotion) وسرطان الكبد الابتدائي (primary liver cancer) في الإنسان والحيوانات (25 ,26, 60, 66)

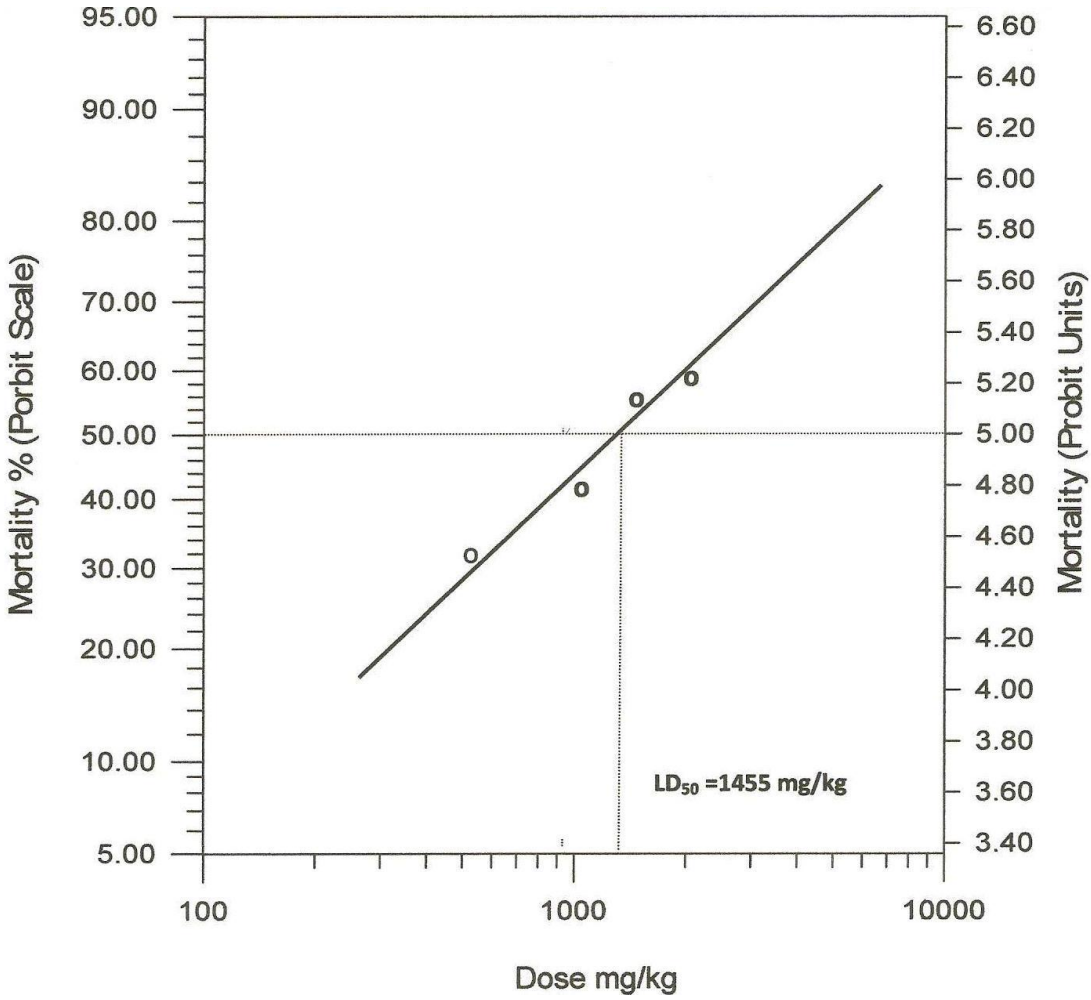
أما فيما يخص الكلية فقد ركزت الدراسة الحالية على هذا العضو المهم بسبب ان الكلية تعمل على تصفية الدم الحامل للسموم وتزداد كمية السموم فيها خلال نفس الفترة التي يحدث فيها تضرر للكبد (21,20). اذ سجلت الدراسة الحالية وجود حالة النزف الكلوي الشديد وتحلل لبعض الخلايا الكلوية وهذه النتيجة تتفق مع ملاحظات (1) والتي بينت امتلاء النبيبات الكلوية بالدم فضلا" عن الاحتقان وتنخر النبيبات والنزف وتحلل بعض النبيبات الكلوية، وقد يعود السبب في ذلك لنفس الالية التي ادت لنفس التأثيرات في الكبد والناتجة من تحطم الهيكل الداخلي الساند للخلايا بفعل تثبيط الانزيمات الخاصة بها بفعل التأثير السمي البالغ لسموم المايكروسستينات ، وقد ذكرت دراسة (49) بأن أضرار الكلية في ذكور الفئران المختبرية كانت غير حادة مع اتساع نبيبات القشرة (Cortical tubules) وانها تحوي على خلايا

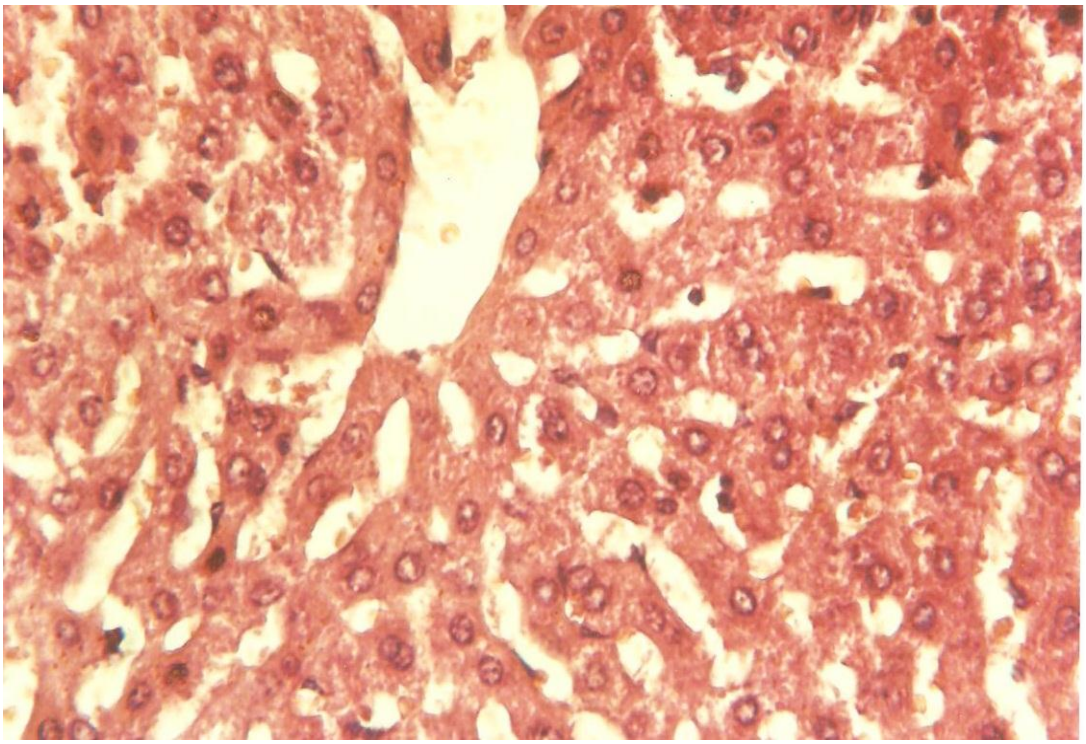
الدم البيضاء الحامضية ، كما ان التحلل الواسع في الخلايا المبطنة للنبيبات يعزى لقدرة سموم المايكروسستين على تحطيم هذه الطبقة من الخلايا.

كما بينت نتائج دراستنا الحالية اضمحلال وتنخر في النبيبات الكلوية وزيادة في الحيز بينها وكذلك تجمع للخلايا الدفاعية حول الاوعية الدموية وهذا يتطابق مع دراسة (52) والتي اختبرت تأثير نوعين من سموم المايكروسستينات هما MC-LR و MC-YR على الجرذان المختبرية ولاحظت حدوث ضرر كبير في طبقتي القشرة واللب فضلا" عن تحطم واضمحلال النبيبات الكلوية وكان بعض النبيبات مملوءه بالخلايا الدفاعية ، وسجلت دراسة اخرى نفس الاضرار في انسجة كل من الكبد والكلية للجرذان كموت الخلايا و التنخر وأرجعت الدراسة السبب في ذلك الى تحطم الهيكل الخلوي الداخلي الساند للخلايا(53). كما اشارت دراسة (30) الى ان السم المايكروسستين MC-LR قد تسبب في تحطيم خلايا النبيبات الملتويه في كلى اسماك الكارب، كما سجلت دراسة محلية التأثير الواضح للسموم الطحلبية على انسجة الكبد والكلية لاسماك الكارب العشبي (3) . وعلى الصعيد الخلوي فقد لاحظت دراسة (43) تغيرات كثيرة في التركيب الداخلي لخلايا كبدية وكلوية والخلايا المولدة للألياف fibroblast معزولة من الجرذان المختبرية شملت تأثر الغشاء البلازمي والشبكة البلازمية الداخلية والمايتوكوندريا فضلا" من تفكك الروابط بين الخلايا وتكورها وسجلت الدراسة تأثر المادة النووية لخلايا الكلية والخلايا الليفية فقط .

وبالرغم من تسجيل الدراسة الحالية للعديد من التغيرات النسيجية في الكلية نتيجة تأثرها بسموم المايكروسستينات الا ان ذلك لايتفق مع دراسة (38) التي لم تلاحظ اي ضرر في الكلية ، وكذلك فأن دراسة (14) لاحظت عدم تأثر الكلية بهذه السموم وأعزت السبب في ذلك الى قصر المدة التي خضعت لها فئران التجربة للسموم وكذلك إعطاء جرعة السموم عن طريق الفم وهذه الطريقة غير مفضلة لاختبار السمية بسبب ضعف الامتصاص لهذه السموم في الأمعاء (15) فضلا" عن ضياع كمية كبيرة من السموم خلال القناة الهضمية وطرحها مع الفضلات .

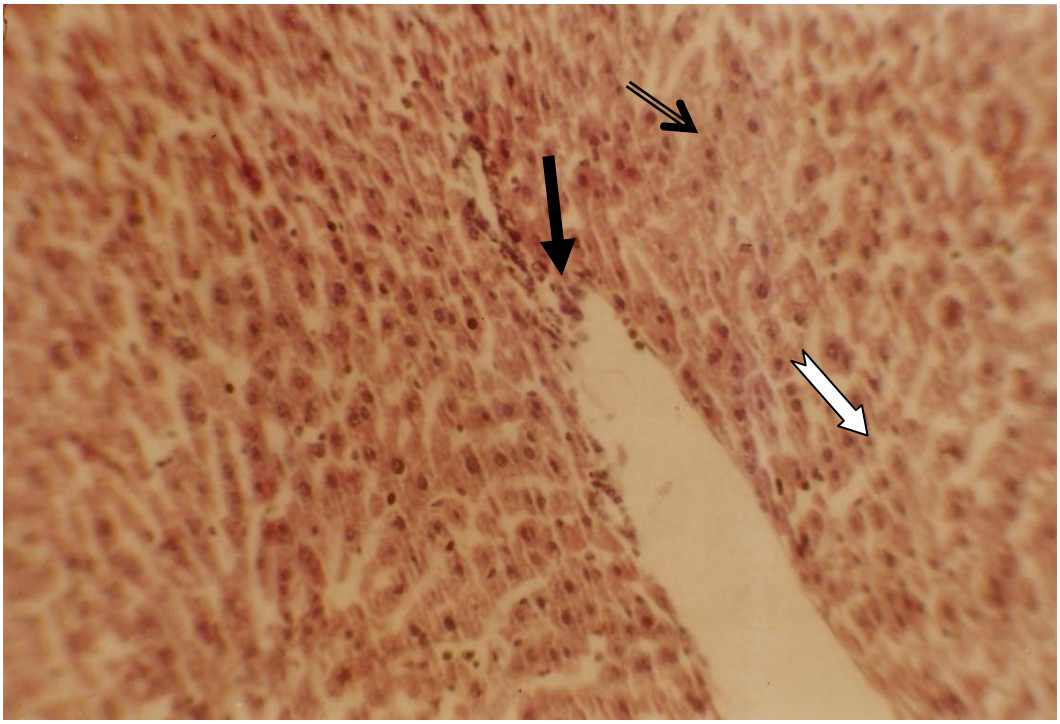
شكل (1) : ورقة الاحتمالية المتضمنة تعيين الجرعة القاتلة الوسطى (LD_{50}) للمستخلص الكحولي للطحلب *O.tenuis var. natans*



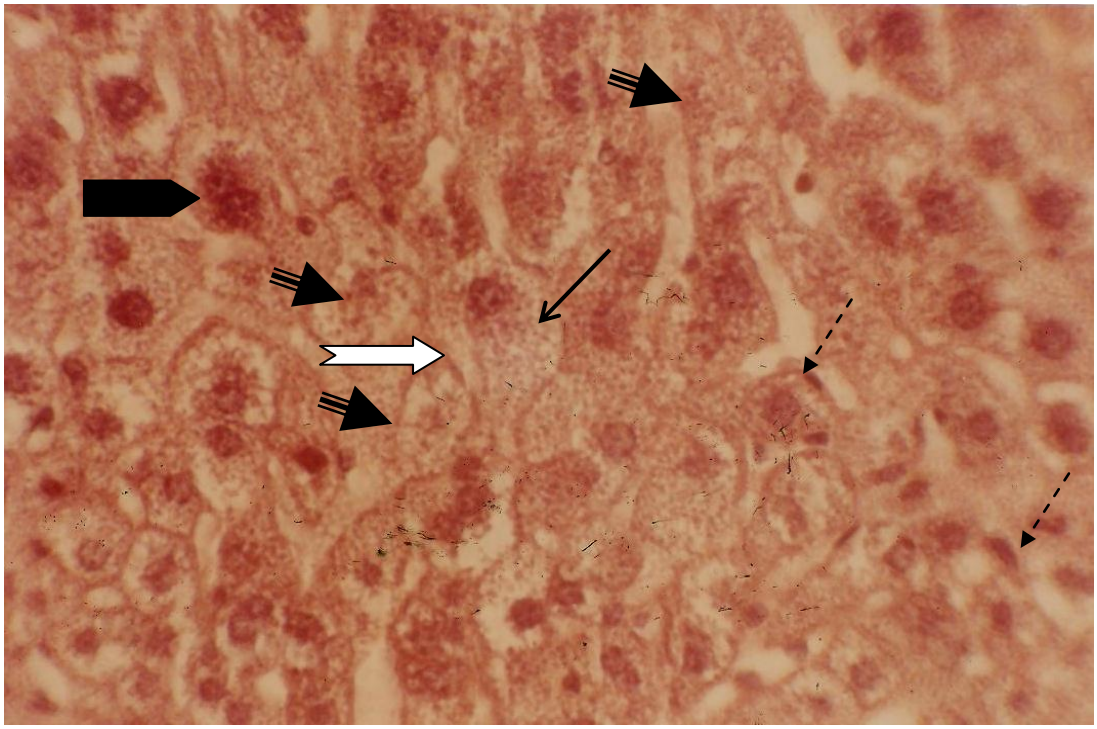


صورة (1): مقطع في نسيج الكبد لفأر السيطرة (Control).قوة التكبير 387.6X.

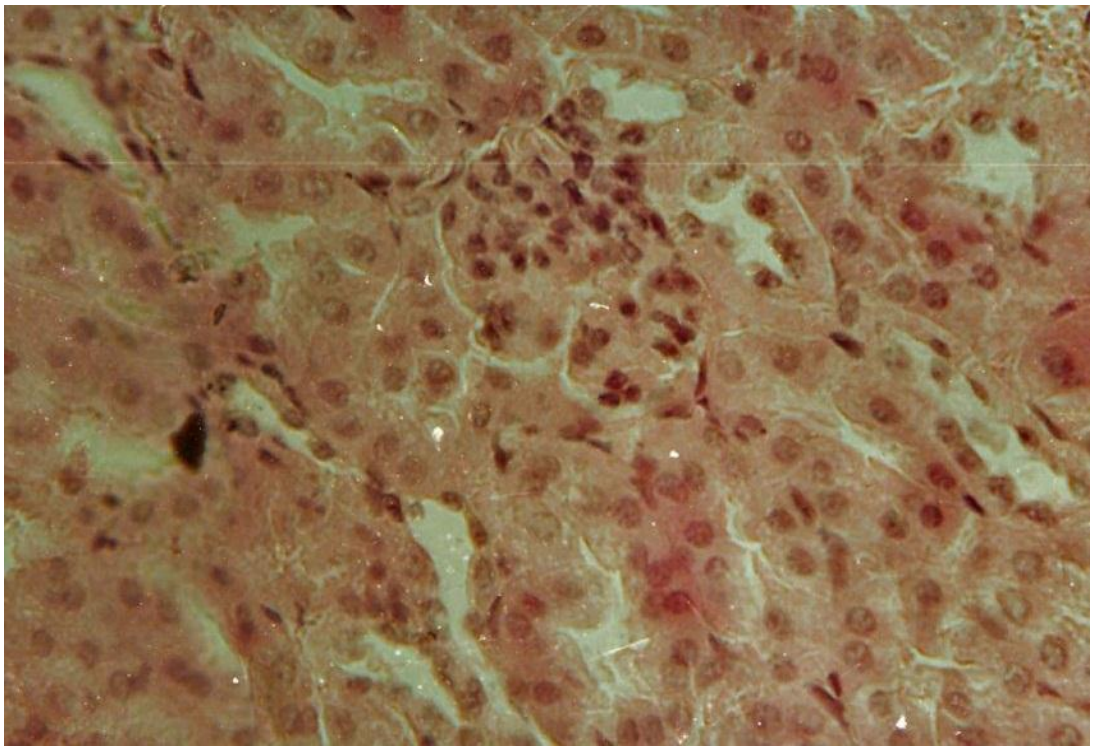
صورة (2): مقطع في نسيج الكبد في الفار المعامل بالجرعة (1500) ملغم / كغم للمستخلص الكحولي للطحلب *O. tenuis var. natans* إذ يلاحظ الورم الحبيبي granuloma (⟹) انتشار الخلايا الدفاعية في متن الكبد (➔) والنـــزف الدمـــوي (- - - ▸). قوة التكبير 387.6X.



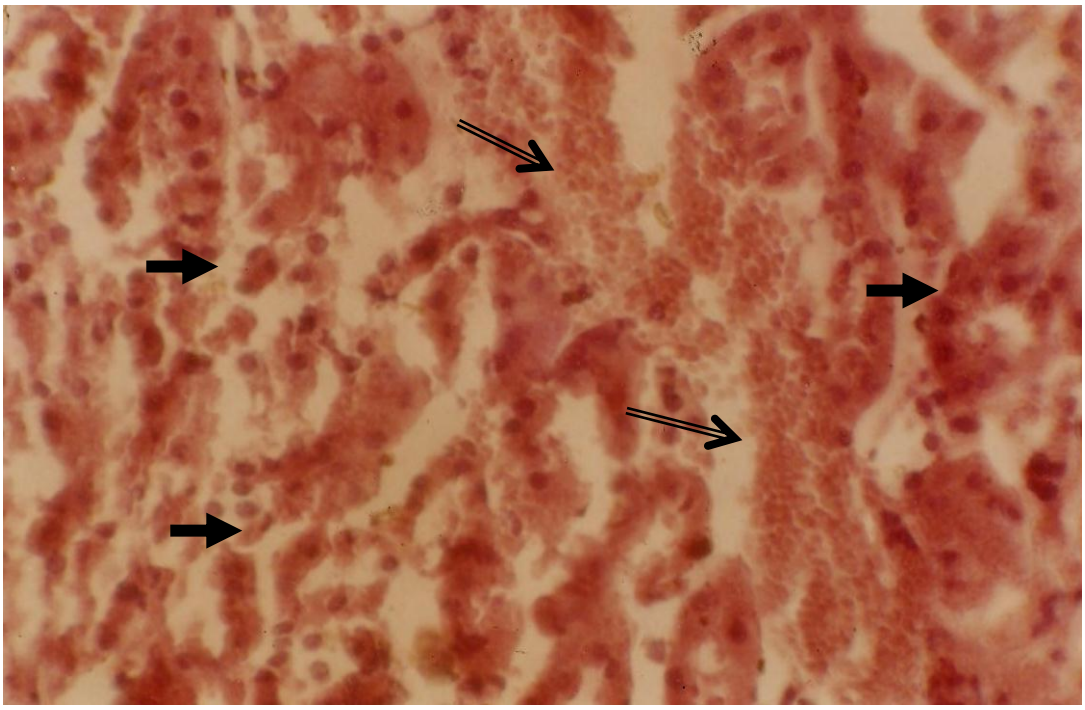
صورة (3): مقطع في نسيج الكبد في الفار المعامل بالجرعة (1500) ملغم / كغم للمستخلص الكحولي للطحلب *O. tenuis var. natans* ويظهر تحلل الخلايا الكبدية (⇒) والتنكس الضبابي (⇨) وتجمع لبعض الخلايا الدفاعية (➡) قوة التكبير 193.8X.



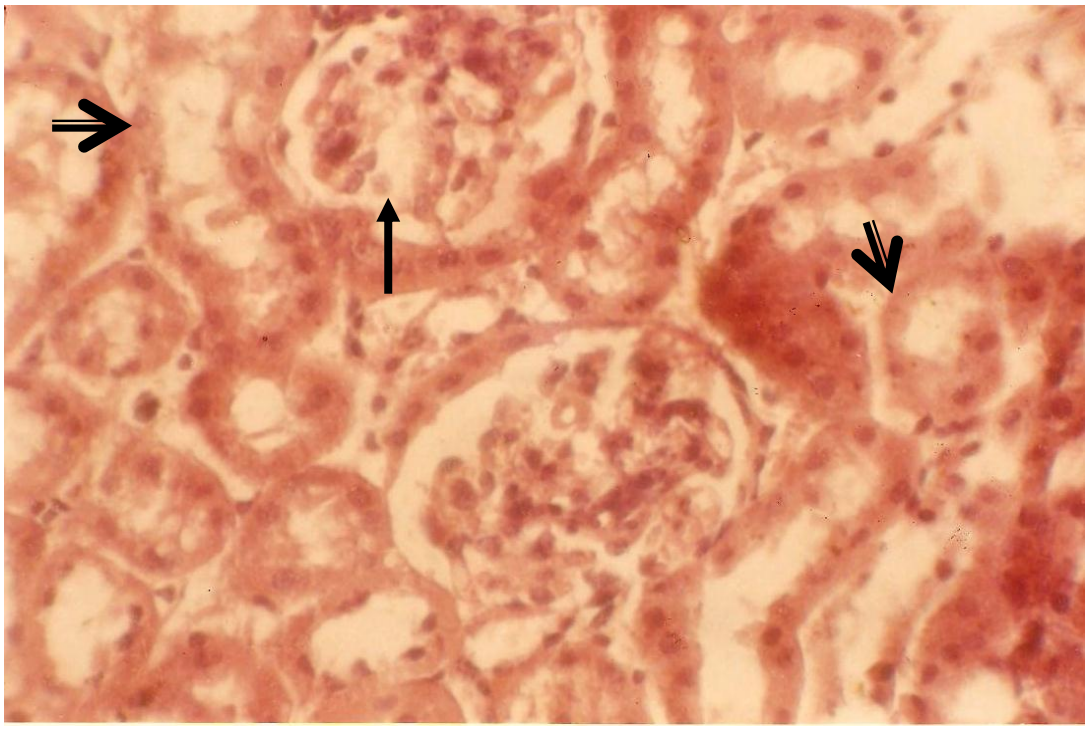
صورة (4): مقطع في نسيج الكبد في الفار المعامل بالجرعة (1500) ملغم / كغم للمستخلص الكحولي للطحلب *O. tenuis var. natans* ويظهر تحلل الانوية (⟹) وتحلل بعض الخلايا الكبدية(⇨) وتحبب في السايتوبلازم (granulation) (➡) وزيادة في أعداد الخلايا Kupffer(⇢) فضلاً عن عملقة في بعض الخلايا الكبدية (→) .قوة التكبير 775.2X.



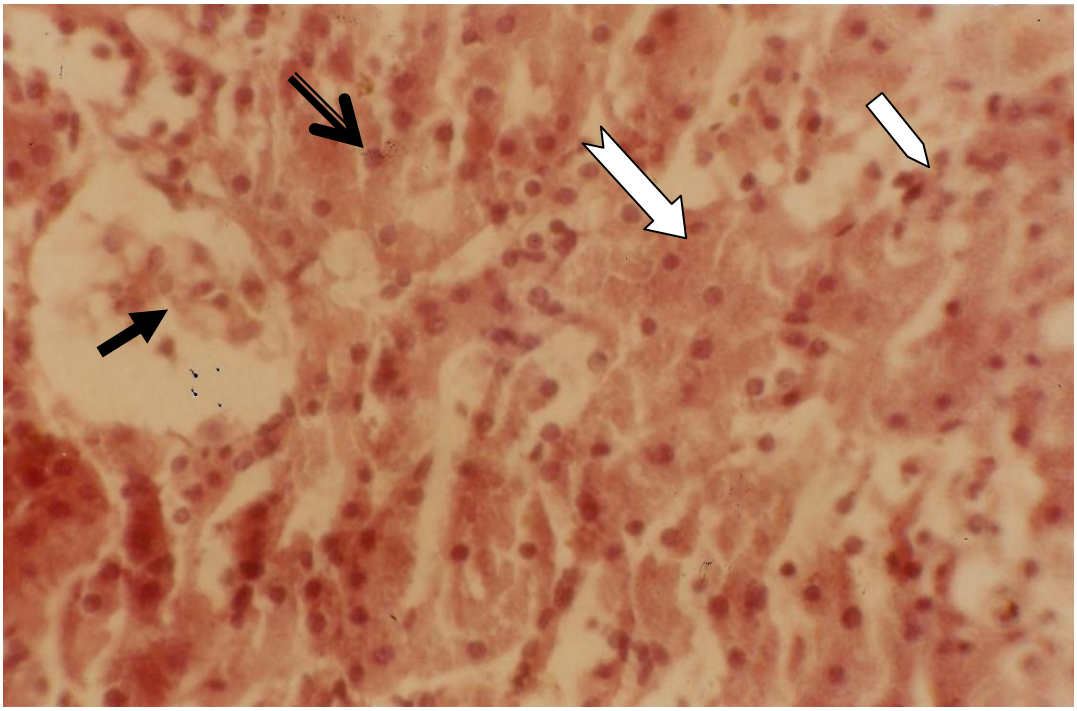
صورة (5):مقطع في كلية فأر السيطرة (Control). قوة التكبير 775.2X.



صورة (6) : مقطع في كلية الفار المعامل بالجرعة (1500) ملغم / كغم للمستخلص الكحولي للطحلب *O. tenuis var. natans* ويظهر حالة النزف الكلوي الشديد (⟹) وتنخر النبيبات الكلوية (➡) قوة التكبير 775.2X.



صورة (7): مقطع في كلية الفار المعامل بالجرعة (1500) ملغم / كغم للمستخلص الكحولي للطحلب *O. tenuis var. natans* اذ يلاحظ تحلل جزئي في الكبيبات (➡) وتنكس لبعض خلايا النبيبات الكلوية (⇒) .قوة التكبير 775.2X.



صورة (8): مقطع في كلية الفار المعامل بالجرعة (1500) ملغم / كغم للمستخلص الكحولي للطحلب *O. tenuis var. natans* ويلاحظ الاضمحلال شبه الكامل في الكبيبات (➡) وتنكس النبيبات الكلوية (⇒) وفرط تنسج الخلايا الطلائية النبيبية مع تنكسها (⇨) والتنخر في الخلايا (⇨) قوة التكبير 775.2X.

المصادر

المصادر العربية

1. الحلفي ، وصال عودة حسن (2007). دراسة بعض التأثيرات الحيوية للسم المنتج من الطحلب (Cyanobacteria) *Microcystis aeruginosa* Kutz. رسالة ماجستير. كلية العلوم – جامعة البصرة.
2. الشاهين ، ميثم عبدالله غالي (2002). التكوين النوعي للطحالب وقابليتها على انتاج السموم في محطات مياه الشرب في مدينة البصرة ، العراق. رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة البصرة.

المصادر الاجنبية

3. Al-Ali, A.A.A.; Al-Sultan, E.Y.A. and Al-Sultan, F.A.(2011).Histopathological effects of toxic alga *Nostoc muscurum* on juvenile grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella* Val. 1844).Marsh Bulletin, 6(1): 32-61.

4. Al-Mousawi, A. H. (1984). Biological studies on algae in rice-field soil from the Iraqi marshes. Ph. D. thesis, Univ. Durham, England
5. Armitage, P. (1971). Statistical Method in Medical Research. Blackwell Scientific Publications, USA.
6. Azevedo, S.M.F.O.; Carmichael, W.W.; Jochmson, E.M.; Rinehart, K.L.; Lau, S.; Shaw, G.R. and Eaglesham, G.K.(2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru- Brazil . Toxicol., 181-182:441-446.
7. Brittain, S.; Mohamed, Z.A.; Wang, J.; Lehmann, V.K.B.; Carmichael, W.W. and Rinehart, K.L.(2000). Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. Toxicon, 38:1759-1771.
8. Brooks, W.P. and Codd, G.A. (1987).Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. Pharmacol. Toxicol., 60, 187-191.(Cited by : Falconer, I. R. (1993). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press Ltd., London).
9. Carmichael, W. W. (1995). Cyanobacterial toxins. In: Hallegraeff, G. M.; Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (eds.). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manual and Guides no. 33, UNESCO, Paris, pp. 165-177.

10. Carmichael, W. W. (1996). Toxic *Microcystis* and the environment. In: Watanabe, M. F.; Harada, K.-I.; Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (eds.). Toxic Microcystis. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-11.
11. Carmichael, W. W. and Falconer, I. R. (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Falconer, I. R. (ed.). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press Ltd., London, pp. 187-209.
12. Carmichael, W.W.(1992). Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol., 72:445-459.
13. Carmichael, W.W.(1997). The cyanotoxins. . In: Callow, J. A. (ed.). Advances in Botanical Research, Academic Press Ltd., London, pp. 211-256.
14. Carvalho, E. G.; sotero-santos, R. B. ; martinez, C. B. R. ; freitas, E. C. ; fenerich-verani, N. ; dellamano-oliveira M. J. and rocha O. (2007). Kidney histology of mice after seven days oral intake of cyanobacterial extract. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 2(1) : 39-43.
15. Chorus, I. and Bartram, J.(1999).Toxic cyanobacteria in water : A Guide to their public Health consequences , Monitoring and Management . World Health Organization, E & FN spon, Routledge, London.
16. Dabholkar, A.S. and Carmichael, W.W. (1987). Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. Toxicon,25(3):285-292.
17. Dahlem, A.M.; Hassan, A.S.; Swanson, S.P.; Charmichael, W.W. and Beasley, V.R. (1989). A model system for studying the bioavailability of intestinally administered Microcystin - LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Pharmacology &Toxicology, 64: 177–181.
18. Diesikachary, T. U. (1959). Cyanophyta. Indain Council of Agricultural Research, New Delhi, 517 pp.
19. El Herry, S.; Fathalli, A.; BenRejeb ,A.J. and Bouaïcha, N.(2008). Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia .Water Research,42(4-5): 1263-1273.
20. Falconer, I. R. (1993 a). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press Ltd., London. (Cited by: Falconer, 1999).
21. Falconer, I. R. (1993 b). Measurement of toxins from blue-green algae in water and food stuffs. In: Falconer, I. R. (ed.). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press Ltd., London, pp. 165-175.

22. Falconer, I. R., Jackson, A. R. B., Langley, J. V., and Runnegar, M. T. C. (1981). Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa.* Aust. J. BioI. Sci., 34: 179-187. (Abstract).
23. Falconer, I. R.; Smith, J. V.; Jackson, A. R.B.; Jones, A. and Runnegar, M. T. C. (1988). Oral toxicity of a bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. J. Toxicol. Environ. Health, 24: 291-305 (Abstract).
24. Falconer, I.R. and Bukley, T.H.(1989). Tumor promotion by microcystis sp., a blue-green algae occurring in water supplies . Med. J. Aust., 150:351.
25. Falconer, I.R. and Humpage, A.R. (1996) . Tumor promotion by cyanobacterial toxins . Phycologia, 35:74-79.
26. Falconer, I.R.(1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Environ. Toxicol. Water Qual., 6:177-184.
27. Falconer, I.R.(1999). An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water . Environ. Toxicol., 14: 5-12.
28. Fastner, J.; Codd,G.A. and Metcalf, J.S. (2002). An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin LR and microcystin in cyanobacterial field material. Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry 374(3):437-444.
29. Fawell, J.K.; Mitchell, R.E.; Everett, D.J. and Hill, R.E. (1999). The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse : I microcystin- LR. Human Exp. Toxicology,18(3):162-167. (Abstract).
30. Fischer, W. J. and Dietrich D. R. (2000).Pathological and Biochemical of Characterization Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). Toxicology and Applied Pharmacology ,164(1): 73-81.
31. Filipič,M.; Žegura, B.; Sedmak, B.; Horvat-Žnidaršič,I.; Milutinovič,A. and Šuput, D. (2007). Subchronic exposure of rats to sublethal dose of microcystin -YR induces DNA damage in multiple organs. Radiol Oncol 41(1): 15-22.
32. Gaudin,J.; Hegarat,L.L. ; Nesslany,F. ; Marzin,D. and Fessard,V.(2009). In Vivo Genotoxic Potential of Microcystin – LR : A Cyanobacterial Toxin, Investigated Both by the Unscheduled DNA Synthesis (UDS) and the Comet Assays After Intravenous Administration, Environ Toxicol 24: 200–209
33. Gaudin,J.; Huet,S.; Jarry,G. and Fessard ,V. (2008). In vivo DNA damage peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. Mutation Research , 652(1): 65-71.

34. Gupta, N.; Pant, S.C.; Vijayaraghavan, R. and Lakshmana Rao, P.V. (2003). Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. Toxicology, 188(2-3):285-296.
35. Gupta,S. (1998). Cyanobacterial toxins : microcystin-LR .In: Guidelines for drinking water quality, Addendum to volume 2, Health criteria & other supporting information. Geneva, World Health Organization.127pp.
36. Guzman, R.E. and Solter, P.F.(2002). Characterization of sublethal microcystin-LR exposure in mice . Vet Pathol., 39 (1) :17-26. (Abstract).
37. Heinze, R.(1996).A biotest for hepatotoxins using primary rat hepatocytes. Phycologia, 35(6):89-93.
38. Hooser, S. B.; Beasley, V. R.; Lovell, R. A.; Carmichael, W. W. and Haschek, W. M. (1989). Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide heptatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. Vet. Pathol., 26: 246-252.
39. Hooser, S. B.; Beasley, V. R.; Waite, L. L.; Kuhlenschmidt, M. S.; Carmichael, W. W. and Haschek, W. M. (1991a). Actin filament alterations in rat heptaocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. Vet. Pathol., 28: 259-266.
40. Hooser, S.B.; Kuhlenschmidt, M.S.; Dahlem, A.M.; Beasley,W.M.; Carmichael, W. W. and Haschek,W.M.(1991b).Uptake and subcellular localization of tritiated dihydero- microcystin-LR in rat liver. Toxicon, 29(6):589-601.
41. Ito, E.; Kondo; F. and Harada, K., -I. (2001). Intratrachael administration of microcystin-LR, and it's distribution. Toxicon, 39: 265-271.
42. Jewel, M.A.S.; Affan, M.A. and Khan, S. (2003). Fish mortality due to cyanobactrial bloom in aquaculture . Pac. J, Biol. Sci., 6(12): 1046-1050.
43. Khan, S.A.; Ghosh, S.; Wickstrom, M.; Miller, L.A.; Hess, R.; Haschek, W.M. and Beasley, V.R. (1995). Comparative pathology of microcystin-LR in cultured hepatocytes, fibroblasts, and renal epithelial cells. Natural Toxins, 3(3):119-128. (Abstract)
44. Laksmana, P.V. and Bhattacharya, R.(1996).The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. Toxicology, 114(1):29-36. (Abstract).

45. Lanaras, T.; Tsitsamis , S.; Chlichlia, C. and Cook, C. M. (1989). Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters J. Appl. Phycol., 1: 67-73.
46. Lee, T.-H.; Chen, Y.-M. and Chon, H.-N. (1998). First report of microcystins in Taiwan. Toxicon, 36(2): 247-255.
47. Lee, T.-H.; Chen, Y.-M. and Chon, H.-N. (1999). Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. Acta Zoologica Taiwanica, 10 (1): 1-9.
48. Li, D.; Xie, P.; Zhang, X. and Zhao, Y. (2009).Intraperitoneal injection of extracted micricystins results in hypovolemia and hypotention in crucian carp (*Carassius auratus*).Toxicon,53(6):638-644.
49. Lovell, R.A.; Schaeffer, D.J.; Hooser, S.B.; Haschek,W.M.; Dahlem, A.M.; Carmichael, W.W. and Beasley, V. R.(1989).Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice. Journal of Enviromental Pathology and Toxicology. Oncol, 9:221-238.
50. Luna, L.G. (1968). Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd Ed. McGraw-Hill Book Company, New York,USA, 258pp.
51. Luukkainen, R.; Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Fardig, M.; Rinehart, K. L. and Niemelä, S. I. (1993). Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. Appl. Environ. Microbiol., 59(7): 2204-2209.
52. Milutinovic, A.; Sedmak, B.; Horvatznidarsic, I. and Suput, D.(2002). Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins . Cell. Mol. Biol. Lett., 7(1):139-141.
53. Milutinović, A.; Zivin, M.; Zorc- Pleskovic, R.; Sedmak , B. and Suput, D. (2003). Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. Toxicon.;42(3):281-288.(Abstract).
54. Mohamed, Z.A.; Carmichael, W.W. and Hussein, A.A. (2003). Estimation of microcystins in the freshwater fish Oreochromis niloticus in an Egyptian fish farm containing a Microcystis bloom. Environ Toxicol., 18(2):137-141.
55. Namikoshi, M.; Choi, B. W.; Sun, F.; Rinehart, K. L.; Evans, W. R. and Carmichael, W. W. (1993) . Chemical characterization and toxicity of dihydroderivatives of nodularin and microcystin-LR, potent

cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins . Chem. Res. Toxicol. 6(2): 151-158.

56. Namikoshi, M.; Rinehart, K. L.; Sakai, R.; Stotts, R. R.; Dahlem, A. M.; Beasley,V. R.; Carmichael,W.W. and Evans, W.R. (1992). Identification of 12 hepatotoxins from Homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis* and *M. wesenbergii*: Nine new microcystins. J. Org. Chem., 57(3):866-872.
57. Papadimitriou, T.; Kagalou, I.; Bacopoulos, V. and Leonardos, I.D. (2010). Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek Lakes. Environmental Toxicology, 25 (4):418–427.
58. Pelander, A.; Ojanperä, I.; Lahti, K.; Niinivaara, K. and Vuori, E. (2000) . Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis . Water Res., 34(10): 2643-2652.
59. Pelander, A.; Sivonen, K.; Ojanperä, I. and Vuoreia, H. (1997). Retardation behavior of cyanobacterial hepatotoxins in the irregular part of the 'PRISMA' model for thin layer chromatography . J. Planer Chromato., 10: 434-440.
60. Prescott, G. W. (1975). Algae of The Western Great Lake Area. 6th ed., William C. Brown Co. Publishers. Dubugue, Towa, 977 pp.
61. Shunzhang, Y. and Gang, C. (1994). Blue – green algae toxin and liver cancer. Cancer research, 6 (1): 9-17.
62. Sivonen, K. (1990). Toxic Cyanobacteria in Finnish Freshwater and The Baltic Sea. (Cited by: Falconer, I. R. (ed.). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water . Academic Press Ltd., London, pp. 145-164.
63. Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W., Sun, F.; Rouhiainen, L.; Luukkainen, R. and Rinehart, K. L. (1992). Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. Appl. Environ. Microbiol., 58 (8): 2495-2500.
64. Stein, J. R. (1973). Handbook of Phycological Methods. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 445 pp.
65. Svirče, Z.; Baltić, V.; Gantar ,M. ; Jukovič,M.; Stojanovič, D.and Balti, M.(2010). molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and

hepatocarcino- genesis. Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews , 28(1) : 39 – 59. (Abstract).

66. Uneo, Y.; Nagata, S. ; Tsutsumi, T.; Hasegawa, A.; Watanabe, M.F.; Park, H.-D.; Chen, G.C.; Chen, G. and Yu, S.-Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui , endemic areas of primary liver cancer in China , by highly sensitive immunoassay. Carcinogenesis, 7(6):1317-1321.
67. Watanabe, M. F. and Oishi, S. (1982). Toxnic substance from a natural bloom of *Microcystis aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 43(4): 819-822.
68. Weideman, V. E.; Walne, P. R. and Tainor, F. R. (1984). A new technique for obtaining axenic cultures of algae. Can. J. Bot., 42: 958-959.(Cited by Al-Mousawi, 1984).
69. Wood, S.A.; Heath, M.W.; Holland, P.T.; Munday, R.; McGregor, G.B. and Ryan, K.G.(2010). Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. Toxicon,55(4):897-903. (Abstract).
70. Yu, S.; Zhao, N. and Zi, X.(2001). The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond – ditch water and primary liver cancer in China. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,23 (2): 96-99.(IN CHINESE). (Abstract).

Bas.j.Vet.Res. Vol.10, No.2, 2011

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Oscillatoria tenuis var.natans* Gomont FROM IRAQI WATER AND STUDY OF IT IS ABILITY TO PRODUCE TOXINS AND THEIR BIOLOGICAL EFFECTS ON LABORATORY MICE

MAITHAM ABDULLAH GHALEY AL-SHAHEEN
AND
FARHAN BEDEN HACHEM AL-SULTAN
BIOLOGY DEPARTMENT / COLLAGE OF SCIENCE / UNIVERSITY OF BASRAH

ABSTRACT

Present study included isolated and identified a Blue green algae species *Oscillatoria tenuis var.natans* Gomont from Al-karmah River in Basrah, Southern Iraq. This species was isolated in laboratory as an axenic culture then detected for producing the toxins by gel filtration and TLC technique that showed the species *O. tenuis var.natans* can produce one type of the toxins microcystins called MC-LR [Dha^7] as a type of hepatotoxins can produced by cyanophyta (cyanobacteria) species. Also, bioassay were done for alcoholic extract of the species *O. tenuis var.natans* cells to determined the LD_{50} and to recording the symptoms of their toxicity to libratory mice and the histological changes in liver and kidney of it. The results showed that LD_{50} value of above toxin is (1455) mg dry cells / Kg of body weight , present study selected the nearest dose to LD_{50} is (1500) mg/kg and recording the symptoms of poisoning to mice are show as restlessness, hypoactivity, pale of the ears and tails, anorexia and some cases suffering of diarrhea . The histological study for the liver and the kidney of mice of the dose (1500) mg/kg showed the granuloma, aggregation of defense cells, hemorrhage, lyses of some nuclei and hepatocytes and also enlargement of some cells. While the kidney tissue suffering from severe hemorrhage, tubules necrosis, partial lyses in renal glomerulus and lyses of some cells. Depending on the overall results of the current study, this is the first record of the ability of species *Oscillatoria tenuis var.natans* to produce the toxin microcystin in Iraq.