

**بررسی تاثیر سم خالص سازی شده میکروسیستین (Microcystin-RR) از ریز جلبک  
*Microcystis aeruginosa* (Kützing, ۱۸۴۶) بر زنده‌مانی دافنی ماگنا  
*Daphnia magna* (Straus, ۱۸۲۰) و تعیین غلظت کشنده آن (LC<sub>۵۰-۹۶</sub>)**

- سعید بالالی\*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- سیدعباس حسینی: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- رسول قربانی: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

### چکیده

این تحقیق جهت بررسی تاثیر سم خالص سازی شده Microcystin-RR (MC-RR) از ریز جلبک *Microcystis aeruginosa* بر زنده‌مانی دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) و تعیین غلظت کشنده این سم (LC<sub>۵۰-۹۶</sub>) انجام شد. برای انجام این آزمایش تعداد ۲۱ عدد دافنی ماگنا در هر تکرار، در معرض غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR قرار گرفتند و میزان بقای دافنی‌ها برای مدت ۲۴ تا ۹۶ ساعت مورد محاسبه قرار گرفت. هم‌چنین یک تیمار به‌عنوان تیمار شاهد (بدون سم) در نظر گرفته شد. هر تیمار ۳ تکرار داشت. با توجه به نتایج این تحقیق، سم میکروسیستین (MC-RR) تاثیر کشنده بر دافنی ماگنا داشت به طوری که حتی در کم‌ترین غلظت (غلظت ۰/۵) حدود ۳۸ درصد تلفات مشاهده گردید و هیچ‌یک از دافنی ماگناها توانایی زنده ماندن در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم خالص MC-RR به مدت ۹۶ ساعت را نداشتند. قابل ذکر است توانایی زنده ماندن دافنی‌ها با افزایش غلظت سم، کاهش پیدا کرد، به طوری که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم، در روز دوم و در غلظت ۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم، در روز اول تمامی دافنی‌ها از بین رفتند. میزان LC<sub>۵۰-۹۶</sub>، ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که در غلظت ۱/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر MC-RR، در مدت ۹۶ ساعت، ۹۹ درصد دافنی‌ها می‌میرند.

**کلمات کلیدی:** میکروسیستین، *Microcystis aeruginosa*، زنده‌مانی، دافنی ماگنا، LC<sub>۵۰-۹۶</sub>



## مقدمه

Penalzo و همکاران، ۱۹۹۰؛ Jungmann و همکاران، ۱۹۹۱). بسیاری از دافنی‌ها از خوردن جلبک‌های سمی از جمله میکروسیستیس اجتناب می‌ورزند که این روند می‌تواند به وسیله اندازه‌گیری نرخ فیلترینگ در دافنی تعیین شود. دافنی‌هایی که تنها منبع غذای آن‌ها در محیط میکروسیستیس می‌باشد و از آن استفاده می‌کنند نسبت به دافنی‌هایی که گرسنه می‌باشند و تغذیه نمی‌کنند با سرعت بیشتری می‌میرند، این موضوع ثابت کرد که سلول‌های میکروسیستیس حاوی ترکیبات سمی، برای دافنی می‌باشند (Lampert, ۱۹۸۱a). سمیت یک گونه از سیانوباکترها و توانایی آن در کاهش فشار چرای زئوپلانکتون‌ها اشاره بر این موضوع دارد که این فرایند یک دفاع جلبکی به حساب آمده و سبب تشکیل شکوفایی جلبکی خواهد شد (Lampert, ۱۹۸۱a و b). بنابراین این موضوع بسیار مهم است که خصوصیات و اثرات ترکیبات سمی بر روی مرگ و میر دافنی‌ها به عنوان دومین زنجیره غذایی بیش تر مورد مطالعه قرار گیرد. آزمایش با سموم خالص شده، ابزاری برای تعیین حساسیت‌های فیزیولوژیکی به سم، در زئوپلانکتون مورد نظر فراهم خواهد کرد. بنابراین در مطالعه حاضر سمیت سم *Microcystin-RR* استخراج شده از سیانوباکتر *Microcystis aeruginosa* روی نرخ مرگ و میر و بقای دافنی ماگنا بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور تعیین سمیت سم *Microcystin-RR* استخراج شده از سیانوباکتر میکروسیستیس آئروژینوزا و تاثیر آن بر بقای دافنی ماگنا در آزمایشگاه فایکولب گروه شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. جلبک میکروسیستیس آئروژینوزا از تالاب بین‌المللی آماگل استان گلستان، به کمک میکروپیپت در زیر میکروسکوپ اینورت جداسازی و به صورت خالص کشت داده شد (Borowitzka و Borowitzka, ۱۹۸۹). شناسایی با استفاده از میکروسکوپ اینورت و کلید شناسایی (Janse van Vuuren و همکاران، ۲۰۰۶) صورت پذیرفت (Shih و همکاران، ۲۰۱۲).

**شرایط کشت:** جهت کشت میکروسیستیس آئروژینوزا به میزان زیاد، محیط کشت BG-11، ۲۴ ساعت قبل آماده، استریل و زیر هود لامینارباکس قرار داده شد تا با محیط هم‌دما شود. هم‌چنین شرایط فیزیکی و شیمیایی اتاق کشت جلبک نیز تنظیم گردید (جدول ۱). دما توسط دماسنج و پی‌اچ به وسیله دستگاه پی‌اچ متر و گتک مدل WE ۳۰۲۰۰ اندازه‌گیری گردید. به هنگام کشت دادن یک قطره از محیط کشت مادر در زیر میکروسکوپ بررسی شد و پس از تایید خالص بودن آن، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از استوک مذکور در هر یک از ظروف کشت مورد آزمایش (ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰

در عصر حاضر یکی از نگرانی‌های بزرگ جوامع انسانی، مشکلات ناشی از آلودگی منابع آب است (Abdel-Raouf و همکاران، ۲۰۱۲). تخلیه فاضلاب‌های شهری، صنعتی و دامداری تصفیه نشده، زه‌آب سیستم‌های کشاورزی و خروجی سیستم‌های تصفیه فاضلاب شهری به آبراهه‌ها و پهنه‌های آبی عوامل اصلی آلوده‌کننده منابع آبی به خصوص آب‌های شیرین در طول دهه‌های اخیر بوده است (Park و همکاران، ۲۰۱۰). ورود این منابع به پهنه‌های آبی، از یک سو باعث تشدید پدیده‌هایی چون شکوفایی جلبکی و به دنبال آن برهم خوردن تعادل اکولوژیک پهنه‌های آبی و از سوی دیگر باعث کاهش کیفیت آب می‌گردد. افزایش وقوع شکوفایی جلبکی در پهنه‌های آبی، در پی افزایش میزان شکل‌های قابل جذب فسفر و نیتروژن صورت می‌گیرد. در عین حال بعضی از گونه‌های جلبکی به علت سمی بودن، سمومی را به زنجیره غذایی منتقل می‌کنند که از طریق شبکه غذایی می‌تواند به سایر موجودات از جمله انسان سرایت کند. حدود ۳۰ گونه از جلبک‌ها شامل داینوفلاژله‌ها، دیاتومه‌ها، هاپتوفیسه‌ها، سیانوباکترها و برخی از سیکلوفلاژله‌ها می‌توانند باعث شکوفایی می‌شوند. در محیط‌های آب شیرین، عامل اغلب شکوفایی‌ها، گونه‌های سمی از دسته سیانوباکترها می‌باشد. سیانوباکترها تنوع بسیار زیادی از لحاظ مورفولوژی، ساختار و وظایف و فنوتیپ از خود نشان می‌دهند، به طوری که جمعیت‌های پیچیده‌ای را نمایان می‌سازند که سبب بیان ژنوتیپ‌های ویژه‌ای می‌شود. تقریباً ۴۰ گونه از سیانوباکترها که دارای توانایی تولید سم می‌باشند، مورد شناسایی قرار گرفته است. قابلیت تولید این سموم از اهمیت تاکسونومیک مهمی در بین جلبک‌ها برخوردار می‌باشد (Skulberg و Skulberg, ۱۹۸۵). بلوم‌های سیانوباکترها بیش تر به دلیل افزایش بیش از حد تراکم جلبک‌های *Microcystis spp.*, *Oscillatoria rubescens* و *Anabaena flos-aquae* صورت می‌گیرد که در منابع آبی شیرین در ایران (محبی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Mohebbi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Mohebbi و همکاران، ۲۰۱۶)، استرالیا، ژاپن و آفریقای جنوبی گزارش شده است (O'Neil و همکاران، ۲۰۱۲). سیانوباکتری‌ها در محیط‌های طبیعی به طور بالقوه‌ای می‌توانند روی بقا، رشد و باروری جمعیت زئوپلانکتون‌ها اثر منفی داشته باشند. فاکتورهای متعددی برای توضیح این اثرات جانبی پیشنهاد شده است که شامل عدم کیفیت غذایی، دخالت در دستگاه تغذیه‌ای به دلیل مورفولوژی برخی از سیانوباکتری‌ها و حضور مواد سمی می‌باشد (Porter و Orcutt, ۱۹۸۰؛ Lampert, ۱۹۸۱a؛ Nizan و همکاران، ۱۹۸۶). در سال‌های اخیر سمیت بسیاری از گونه‌های سیانوباکترها از جمله میکروسیستیس روی دافنی‌ها گزارش شده است (Lampert, ۱۹۸۱a؛

پلانکتون‌گیری عمودی اقدام به جمع‌آوری آن‌ها از آب بندان شهید صدوقی (واقع در استان گلستان، شهرستان گرگان، روستای محمد آباد) شد. شناسایی دافنی بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی و ظاهری (Mohammadyari و همکاران، ۲۰۱۷) صورت گرفت. پس از جمع‌آوری مقدار دافنی ماگنا مورد نیاز، برای تعیین سمیت سموم جلبکی، بر اساس نتایج تحقیقاتی که سمیت میکروسیستین را بر موجودات نشان می‌داد هم‌چنین مقایسه این نتایج با سمیت دیگر سموم بر موجودات مشابه و نیز پس از انجام آزمایشات دامنه‌یابی، تیمارهای حاوی ۰، ۰/۵، ۲، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر MC-RR در هر ظرف شیشه‌ای ۴۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۱ دافنی در نظر گرفته شد. سپس میزان مرگ و میر دافنی در مدت ۲۴ تا ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. دافنی‌ها در طی آزمایش با *Chlamydomonas* sp. (۲۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر) در ابتدا و بعد از ۲۴ ساعت تغذیه شدند. ۳ تکرار برای هر یک از غلظت‌ها در نظر گرفته شد (Paerl و Fulton، ۱۹۸۷). میزان بقا دافنی‌ها در ۲۴ ساعت اول هر ۴ ساعت و بعد از آن روزانه تا روز چهارم بررسی گردید. کلیه شرایط فیزیکی و شیمیایی آب و محیط هم‌چون pH، دما و سایر فاکتورها در طی آزمایش کنترل می‌شد تا ثابت بماند و تاثیری در نتیجه آزمایش نداشته باشد.

**آنالیز آماری:** پس از انجام آزمایش‌ها، سمیت حاد و میزان مرگ و میر دافنی‌ها در فاصله زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت و بر اساس آن درصد تغییرات مرگ و میر دافنی‌ها نسبت به شاهد محاسبه شد. سپس جهت تجزیه تحلیل داده‌ها از آنالیز رگرسیون و آزمون پروبیت استفاده و مقادیر  $LC_{50}$ ،  $LC_{25}$ ،  $LC_{75}$ ،  $LC_{90}$  و  $LC_{99}$  محاسبه گردید. هم‌چنین برای آزمون تاثیر غلظت‌های مختلف سم بر میزان تلفات دافنی در زمان‌های مختلف، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفت. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ مشخص شد.

## نتایج

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، سم میکروسیستین (MC-RR) تاثیر کشنده بر دافنی ماگنا داشت به‌طوری‌که حتی در کم‌ترین غلظت (غلظت ۰/۵) حدود ۳۸ درصد تلفات مشاهده گردید که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد بود. اگرچه در این غلظت تلفات به ۱۰۰ درصد نرسید. در سایر تیمارها تا روز چهارم تمامی دافنی‌ها تلف شده بودند (تلفات ۱۰۰ درصد) (شکل ۱). نتایج این تحقیق نشان داد هیچ‌یک از دافنی ماگناها توانایی زنده ماندن در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم خالص MC-RR به‌مدت ۹۶ ساعت را

سی‌سی محیط کشت) تزریق گردید، جلبک‌ها در محیط ذکر شده ۲ هفته رشد داده شدند.

### جدول ۱: شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت

عامل	مقدار
دما (درجه سانتی‌گراد)	۳۰±۱
دوره نوری	۱۲ ساعت روشنایی - ۱۲ ساعت تاریکی
pH	۷/۵-۸
شدت نور (با استفاده از لامپ‌های فلورسنت با نور سفید سرد)	۱۵۰ (میکرومول بر مترمربع در ثانیه)

### آنالیز و استخراج سموم: روش HPLC به‌طور گسترده برای

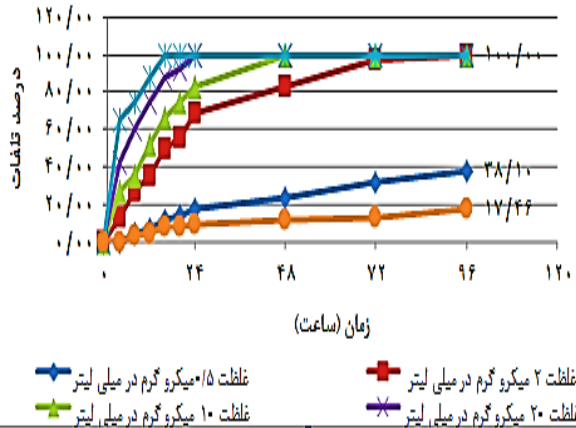
جداسازی و اندازه‌گیری میکروسیستین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش استخراج و اندازه‌گیری برطبق روش Lee و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. جهت آنالیز میکروسیستین، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه برداشته و به‌وسیله سانتریفیوژ با دور ۱۶۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها از محیط کشت جدا و سپس در فریز درایر خشک شدند و در فریزر -۷۰ (Deep freezer، مدل ۸۸fd-۲-۹۵-A، ساخت ایران) برای آنالیزهای بعدی نگه‌داری شدند. از مواد سلولی فریز درای شده، میکروسیستین‌ها سه مرتبه به‌وسیله ۱۰ میلی‌لیتر اسیداستیک ۵ درصد (V/V) که به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفته بودند عصاره‌گیری شد. سپس عصاره با دور ۹۳۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی برای کارتریج C18 مورد استفاده قرار گرفت. کارتریج حاوی میکروسیستین به‌وسیله ۱۰ میلی‌لیتر آب شسته شد. میکروسیستین‌ها در نهایت از کارتریج C18 با ۱۰ میلی‌لیتر متانول شسته شدند. محلول حاصل تحت کاهش فشار تبخیر شد و سپس باقی‌مانده در ۱ میلی‌لیتر متانول حل گردید. در نهایت محلول با دستگاه HPLC آنالیز شد. دستگاه HPLC (Merck-Hitachi، ساخت کشور ژاپن) با یک پمپ جریان ثابت و طول موج‌یاب متغیر که در ۲۳۸ نانومتر عمل کند تجهیز گردید. جداسازی بر روی یک ستون برگشتی نوکلئوزیل C18 و فاز متحرک که متانول - ۰/۰۵ مول در لیتر بافر فسفات (pH=۳) Harada و همکاران (۱۹۸۸) بود انجام شد. میکروسیستین‌ها با استفاده از طیف‌های UV و زمان‌های نگه‌داری (retention times) و با استفاده از یک نمونه با یک استاندارد خالص میکروسیستین MC-LR، MC-RR و MC-YR شناسایی شدند. علاوه بر این پیک‌های میکروسیستین به‌وسیله بزرگی طیف‌های آن‌ها جدا و شناسایی گردیدند. همه آنالیزها با سه تکرار انجام شد. غلظت میکروسیستین به شکل وزنی (به‌عنوان مثال میلی‌گرم سم در گرم وزن خشک) بیان گردید.

### دامنه‌یابی غلظت‌های آزمایشی و مواجهه دافنی ماگنا با

این غلظت‌ها: جهت فراهم کردن زئوپلانکتون، با استفاده از تور



سم (LOEC) در تمامی زمان ها (در طول ۴ روز)، ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر سم، به دست آمد (جدول ۴).



شکل ۱: روند تاثیر سم خالص MC-RR بر بقای دافنی ماگنا در مدت ۹۶ ساعت

نداشتند. این توانایی با افزایش غلظت سم کاهش پیدا کرد به طوری که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سم، در روز دوم و در غلظت ۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر سم، در روز اول تمامی دافنی ها از بین رفتند (جدول ۲). قابل ذکر است در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر سم در ۱۶ ساعت اولیه در معرض قرارگیری دافنی ها، تلفات کامل مشاهده گردید (شکل ۱). همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، میزان LC<sub>۹۶-۵۰h</sub>، یعنی غلظتی از سم که ۵۰ درصد دافنی ها را در مدت ۹۶ ساعت از بین ببرد، ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر سم MC-RR به دست آمد. در این جدول به ترتیب به LCهای ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ در طول چهار روز در معرض قرارگیری دافنی ها اشاره شده است. با توجه به نتایج این تحقیق در غلظت ۱/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر سم MC-RR، در مدت ۹۶ ساعت، ۹۹ درصد دافنی ها تلف می شوند. با توجه به نتایج، حتی در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر سم MC-RR، تاثیر کشندگی سم بر دافنی ها مشاهده گردید. بنابراین بالاترین غلظت بدون تاثیر سم (NOEC)، صفر می باشد و حداقل غلظت موثر

جدول ۲: تعداد تلفات دافنی ماگنا تحت تاثیر سم MC-RR در فاصله زمانی ۲۴ تا ۹۶ ساعت (n= ۲۱)

تعداد تلفات				غلظت
۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	(میکروگرم در میلی لیتر)
۳/۶۷±۰/۵۸ cA	۲/۶۷±۰/۵۸ cB	۲/۳۳±۰/۵۸ dB	۲±۰/۰۰ cB	شاهد (بدون سم)
۸/۰۰±۲/۰۰ bA	۶/۶۷±۱/۵۳ bAB	۵/۰۰±۱/۰۰ cBC	۳/۶۷±۰/۵۸ dC	۰/۵
۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۰/۳۳±۱/۱۵ aA	۱۷/۳۳±۰/۵۸ bB	۱۴/۳۳±۰/۵۸ cC	۲
۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۱۷/۳۳±۰/۵۸ bB	۱۰
۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۰
۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۲۱/۰۰±۰/۰۰ aA	۵۰

حروف انگلیسی مختلف کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار در هر ستون می باشد (P<۰/۰۵). حروف انگلیسی مختلف بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار در هر ردیف می باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۳: غلظت های کشنده MC-RR در فاصله زمانی ۲۴ تا ۹۶ ساعت بر دافنی ماگنا

فاصله اطمینان ۹۵ درصد				غلظت
۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	(میکروگرم در میلی لیتر)
۰/۴۵ (۰/۱-۱۸/۵۹)	۰/۴۸ (۰/۰-۲۹/۶۵)	۰/۵۹ (۰/۰-۳۱/۸۴)	۰/۷۳ (۰/۱-۳۲/۲۳)	LC <sub>۳</sub>
۰/۵۸ (۰/۱-۴۲/۰۴)	۰/۶۶ (۰/۰-۴۷/۹۳)	۰/۹۱ (۰/۱-۵۹/۳۲)	۱/۵۰ (۰/۲-۸۴/۳۸)	LC <sub>۵</sub>
۰/۷۴ (۰/۳-۵۸/۰۶)	۰/۹۱ (۰/۱-۶۸/۴۹)	۱/۴۰ (۰/۲-۹۸/۴۰)	۳/۰۹ (۱/۵-۹۴/۲۳)	LC <sub>۷</sub>
۱/۰۷ (۰/۱۷-۷۴/۸۷)	۱/۴۲ (۱/۳-۰/۴۱)	۲/۶۰ (۱/۶-۶۹/۸۰)	۸/۷۱ (۵/۲-۱۷/۵۷)	LC <sub>۹</sub>
۱/۷۵ (۱/۲۱۵-۰/۴۴)	۲/۶۵ (۱/۱۱-۵۸/۶۴)	۶/۱۲ (۳/۳۲-۲۰/۰۹)	۳۶/۴۷ (۱۶/۱۶۵-۴۶/۳۷)	LC <sub>۹۹</sub>



جدول ۴: حداقل غلظت موثر و بالاترین غلظت بدون تاثیر سم MC-RR بر دافنی ماگنا و میزان LC<sub>50</sub> در فاصله زمانی ۲۴ تا ۹۶ ساعت

زمان (ساعت)	حداقل غلظت موثر سم (LOEC)	بالاترین غلظت بدون تاثیر (NOEC)	LC <sub>50</sub>
۲۴	۰/۵	۰	۱/۵
۴۸	۰/۵	۰	۰/۹۱
۷۲	۰/۵	۰	۰/۶۶
۹۶	۰/۵	۰	۰/۵۸

## بحث

با توجه به اهمیت استراتژیک آب شیرین و مشکلات ناشی از آلودگی منابع آن در عصر حاضر و افزایش یوتریفیکاسیون و شکوفایی فیتوپلانکتون‌های سمی و غیرسمی که با ورود انبوه نیتروژن و فسفر مرتبط می‌باشد و با توجه به این که، عامل اغلب شکوفایی‌های گونه‌های سمی در محیط‌های آب شیرین از دسته سیانوباکترها می‌باشد که به‌طور بالقوه‌ای می‌توانند روی بقا، رشد و باروری جمعیت زئوپلانکتون‌ها اثر گذار باشند، توجه به اثرات مخرب این سموم بر زئوپلانکتون‌ها بیش از پیش حائز اهمیت است. تاکنون ۵۱ گونه از جنس میکروسیستیس شناسایی شده‌اند (Komárek و همکاران، ۲۰۱۴) که تعدادی از این گونه‌ها توانایی تولید سم دارند (Davis و همکاران، ۲۰۰۹)، یکی از این سموم میکروسیستیس RR- است (Carmichael، ۱۹۸۱).

در این تحقیق تاثیر سم میکروسیستیس RR- استخراج شده از میکروسیستیس آئروژینوزا بر بقای دافنی ماگنا مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج حاصل از این تحقیق تاثیر کشنده سم میکروسیستیس (MC-RR) بر دافنی ماگنا را نشان داد به‌طوری‌که حتی در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مرگ و میر مشاهده شد ولی در طول ۹۶ ساعت تلفات در این غلظت به ۱۰۰ درصد نرسید. نتایج این تحقیق نشان داد هیچ‌یک از دافنی ماگناها توانایی زنده ماندن در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم خالص MC-RR به مدت ۹۶ ساعت را نداشتند. مطالعات متعدد نشان داده است غلظت‌های بیش‌تری از سیانوباکتری‌های سمی منجر به ایجاد مرگ و میر سریع‌تری می‌شود (Lampert، ۱۹۸۷ a, b؛ Paerl و Fulton، ۱۹۸۷). در این تحقیق نیز با افزایش غلظت سم میزان بقا کاهش یافت به‌طوری‌که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم در روز دوم، در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم، در ۲۴ ساعت اول و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم در ۱۶ ساعت اولیه در معرض قرارگیری دافنی‌ها، تلفات کامل مشاهده گردید. Stangenberg (۱۹۶۸) نشان داد که عصاره خام میکروسیستیس آئروژینوزا می‌تواند در *Daphnia longispina*

تلفات ایجاد کند. هم‌چنین Penaloza و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که کپه پد *Boeckella sp.* کلاوسر *Chydorus sphaericus*، دو گونه روتیفر (*Keratella sp.* و *Trichocerca similis*) و ماهی *Gambusia affinis* حساسیت مشابهی به یک نوع پپتید نیمه خالص استخراج شده از فیتوپلانکتون‌ها با غالبیت *Microcystis sp.* از خود نشان دادند. Gilbert (۱۹۹۰) دریافت که غلظت کم عصاره خام *Anabaena affinis* (تقریباً ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر وزن خشک سلول) می‌تواند منجر به تلفات در دافنی پولکس *D. pulex* و *D. ambigua* در طول ده روز شود.

در طبیعت مصرف سیانوتوکسین‌ها به‌وسیله زئوپلانکتون‌ها می‌تواند به‌وسیله چندین فاکتور مانند انتخاب غذا، شرایط زئوپلانکتون، دما و آدپتاسیون انتخابی گونه‌های زئوپلانکتون با سموم سیانوباکتریایی کنترل شود (Havens و Ibelings، ۲۰۰۸؛ Hairston و همکاران، ۲۰۰۱؛ Chislock و همکاران، ۲۰۱۳). این فاکتورها که موجب اجتناب و دوری، کاهش یا حتی افزایش اثرات میکروسیستیس و دیگر سموم می‌شود، می‌تواند تفاوت‌ها را در نتایج مشاهده شده در شرایط آزمایشگاهی و مطالعات مبتنی بر محیط طبیعی توضیح دهد. Demott و همکاران (۱۹۹۱) در طی آزمایشی اثر مقادیر متفاوتی از LR microcystin بر چند گونه دافنی از جمله دافنی پولیکاریا (*Daphnia pulicaria*)، دافنی هیالینا (*Daphnia hyalina*)، دافنی پولکس (*Daphnia pulex*) و *Diaptomus birgei* را بررسی کردند و مشاهده کردند که سم مورد نظر به‌ترتیب دارای LC<sub>50</sub> معادل ۲۱/۴، ۱۱/۶، ۱۰/۷ و ۰/۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت ۴۸ ساعت، می‌باشد. در تحقیق حاضر میزان LC<sub>50</sub>-۵۰h برای دافنی ماگنا، ۰/۹۱ و میزان LC<sub>50</sub>-۹۶h، ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR به‌دست آمد. با توجه به نتایج بالاترین غلظت بدون تاثیر سم MC-RR (NOEC) بر دافنی ماگنا، صفر و حداقل غلظت موثر سم ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در مقابل De Bernardi و همکاران (۱۹۸۱) گزارش کردند گونه‌های میکروسیستیس که هیچ سمیتی بر روی دافنی ندارند و می‌توانند یک منبع غذایی پایدار در شرایط بحران کمبود مواد غذایی برای دافنی باشند. Gliwicz و Lampert (۱۹۹۰) دریافتند که عصاره خام سلولی از گونه *Cylindrospermopsis raciborskii* که اثرات سمی روی کبک موش نشان داده بود نتوانست تلفاتی روی سه گونه دافنی با غلظت ۵۶۰ میکروگرم سلول در میلی‌لیتر (تقریباً ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر وزن خشک) ایجاد کند.

به‌طور کلی در تحقیق حاضر مشخص شد سم MC-RR استخراج شده از میکروسیستیس آئروژینوزا دارای اثر سمی و خاصیت کشندگی روی دافنی ماگنا است. حداقل غلظت تاثیر گذار سم ۰/۵ میکروگرم بر



## تشکر و قدردانی

در پایان از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق از هیچ گونه کمک و کوششی دریغ نوزیدند تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

۱. محبی، ف.؛ محسن پور آذری، ع. و عاصم، ع.، ۱۳۹۱. بررسی جمعیت فیتوپلانکتونی و شاخص‌های جمعیتی در دریاچه سد ارس. مجله زیست‌شناسی ایران. دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات ۳۱۶ تا ۳۲۸.
۲. Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A. and Ibraheem, I., 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. Vol. 19, No. 3, pp: 257-275.
۳. Borwitzka, M. and Borowitzka, L., 1989. Micro-algae biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge. 476 p.
۴. Carmichael, W.W., 1981. Freshwater Blue-Green Algae (Cyanobacteria) Toxins- A Review. In: Carmichael W.W., (eds) The Water Environment. Environmental Science Research. Springer, Boston, MA. pp: 121-147.
۵. Chislock, M.F.; Sarnelle, O.; Jernigan, L.M. and Wilson, A.E., 2013. Do high concentrations of microcystin prevent *Daphnia* control of phytoplankton? Water Research. Vol. 4, No. 7, pp: 1961-1970.
۶. De bernardi, R.; Giussani, G. and Lasso Pedretti, E., 1981. The significance of blue-green algae as food for filterfeeding zooplankton: Experimental studies on *Daphnia* spp. fed *Microcystis aeruginosa*. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen. Vol. 21, pp: 477- 483.
۷. Demott, R.W.; Zhang, Q. and Carmichael, W.W., 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. Limnology and Oceanography. Vol. 36, No. 7, pp: 1346-1357.
۸. Fulton, R. and Paerl, H., 1987. Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* in herbivorous zooplankton. Journal of Plankton Research. Vol. 9, No. 5, pp: 837-855.
۹. Gilbert, J.J., 1990. Differential effects of *Anabaena afinis* on cladocerans and rotifers: Mechanisms and implications for zooplankton community structure. Ecology. Vol. 71, No. 5, pp: 1727-1740.

میلی لیتر و میزان ۵۰h-۹۶LC<sub>۵۰</sub>/۵۸ میکروگرم بر میلی لیتر سم به دست آمد. هم چنین مشخص گردید در غلظت ۱/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر سم MC-RR، در طول ۹۶ ساعت، ۹۹ درصد دافنی‌های تلف می‌شوند و بنابراین در غلظت‌های بالاتر تلفات صد درصد مشاهده می‌شود. به طوری که در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر سم در روز چهارم و در غلظت‌های بالاتر ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر سم به ترتیب در ۴۸، ۲۴ و ۱۶ ساعت پس از در معرض قرارگیری دافنی‌ها، تمامی دافنی‌ها از بین رفتند. مقایسه نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که تاثیر سموم مختلف تولید شده به وسیله سیانوباکترها بر گونه‌های مختلف زئوپلانکتون‌ها در شرایط محیطی مختلف متفاوت است، به طوری که یک نوع سم بر گونه‌های مختلف موجودات از یک جنس (همانند تاثیر سم میکروسیستین بر گونه‌های مختلف جنس دافنی)، تاثیر متفاوتی دارد.

شکوفایی سیانوباکترهای سمی بیش از ۱۰۰ سال است که در آب‌های شیرین و شور در اثر تغییر شرایط محیطی (تغییر فصل، کاهش دمای هوا و آب دریا و متلاطم شدن آب دریا، افزایش مواد مغذی و فلزات سنگین، افزایش اکسیژن محلول آب و...) و در مناطق آلوده به علت فعالیت‌های انسانی نظیر ورود فاضلاب‌های انسانی، صنعتی، زه‌آب سیستم‌های کشاورزی و خروجی سیستم‌های تصفیه فاضلاب شهری مرسوم، آب توازن شناورها، آلودگی‌های نفتی و سایر آلودگی‌ها ایجاد می‌شود (Sun و همکاران، ۲۰۱۶؛ Abdel-Raouf و همکاران، ۲۰۱۲) توجه به شکوفایی *Microcystis aeruginosa* به عنوان یکی از سیانوباکترهای غالب موجود در بدنه آب‌های شیرین به علت توانایی تولید هپاتوتوکسینی به نام میکروسیستین (MCs)، که می‌تواند منجر به سرطانی شدن سلول‌های کبدی شود (Kuiper-Goodman و همکاران، ۱۹۹۹)، مرگ و میر حیوانات وحشی و اهلی را در سراسر جهان ایجاد کند (Ressom و همکاران، ۱۹۹۴) و سلامت انسان‌هایی را که برای تفریح یا آشامیدن از چنین آب‌هایی استفاده می‌کنند را به مخاطره بیندازد (Kuiper-Goodman و همکاران، ۱۹۹۹)، بسیار حائز اهمیت است. بر همین اساس سازمان بهداشت جهانی (WHO) استاندارد MC-LR در آب آشامیدنی را ۱ میکروگرم در لیتر بیان نموده است (World Health Organization، ۱۹۹۸). بنابراین با توجه به آلوده شدن روز افزون آب‌های شیرین، این موضوع بسیار مهم می‌باشد که علاوه بر بررسی بیشتر خصوصیات و اثرات ترکیبات سمی آن‌ها بر موجودات مختلف از جمله دافنی‌ها، راهکاری جهت جلوگیری از ورود آلاینده‌ها و آلوده شدن آب‌ها (به ویژه پساب‌های حاوی نیتروژن و فسفر) به منابع آبی اندیشیده شود.



۲۰. Lee, S.J.; Jang, M.H.; Kim, H.S.; Yoon, B.D. and Oh, H.M., 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N: P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 89, No. 2, pp:323-329
۲۱. Mohammadyari, A.; Ghassenzadeh, F.; Mirshamsi, O.; Aliabadian, M. and Atashbar, B., 2017. Phylogeny of Iranian species of the genus *Daphnia* O. F. Müller, 1785 (Crustacea: Branchiopoda: Anomopoda) based on morphological characters. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*. Vol.13, No. 1, pp: 77-106.
۲۲. Mohebbi, F.; Riahi, H.; Sheidaei, M. and Shariatmadari, Z., 2016. Phytoplankton of Aras dam reservoir (Iran): an attempt to assess water quality. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. Vol. 15, No. 4, pp: 1318-1336.
۲۳. Mohebbi, F.; Riahi, H.; Sheidaei, M.; Shariatmadari, Z. and Manaffar, R., 2015. Environmental control of the dominant phytoplankton in Aras Reservoir (Iran): A multivariate approach. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*. Vol. 20, No. 3, pp: 206-215.
۲۴. Nizan, S.; Dimentman, C. and Shilo, M., 1986. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography Journal*. Vol. 31, No. 3, pp: 497-502.
۲۵. O'Neil, J.; Davis, T.; Burford, M. and Gobler, C., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*. Vol. 14, pp: 313-334.
۲۶. Park, J.; Jin, F.; Lim, B.; Park, K. and Lee, K., 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga: *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. Vol. 101, No.22, pp: 8649-8657.
۲۷. Penaloza, R.; Rojas, M.; Vila, I. and Zambrano, F., 1990. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. *Freshwater Biology*. Vol. 24, No. 2, pp: 233-240.
۲۸. Porter, K. and Orcutt, J., 1980. Nutritional adequacy, manageability and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue green algae for *Daphnia*. In: Kerfoot WCH, editor. *Evolution and ecology of zooplankton*. Hanover, NH: Communities University Press. pp: 282-291.
۲۹. Ransom, R.; Soong, F.S.; Fitzgerald, J.; Turczynowicz, L.; El Saadi, O.; Roder, D.; Maynard, T. and Falconer, I., 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (Blue-Green
۱۰. Gliwicz, Z.M. and Lampert, W., 1990. Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. *Ecology*, Vol. 71, No. 2, pp: 691-702.
۱۱. Hairston, N.G.Jr.; Holtmeier, C.L.; Lampert, W.; Weider, L.J.; Post, D.M.; Fischer, J.M.; Fox, J.A. and Gaedke, U., 2001. Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: evolution of phenotypic plasticity? *Evolution*. Vol. 55, No. 11, pp: 2203-2214.
۱۲. Harada, K.I.; Matsuura, K.; Suzuki, M.; Oka, H.; Watanabe, M.F.; Oishi, S.; Dahlem, A.M.; Beasley, V.R. and Carmichael, W.W., 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 448, pp:275-283.
۱۳. Ibelings, B.W. and Havens, K.E., 2008. Cyanobacterial toxins: a qualitative meta-analysis of concentrations, dosage and effects in freshwater, estuarine and marine biota. In: Hudnell, H.K., (eds) *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 619, pp: 675-732.
۱۴. Janse van Vuuren, S.; Taylor, J.; Gerber, A. and Van Ginkel, C., 2006. Easy identification of the most common freshwater algae. A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters. ISBN 0-621-35471-6.
۱۵. Jungmann, D.; Henning, M. and Juttner, F., 1991. Are the same compounds in *Microcystis* responsible for toxicity to *Daphnia* and inhibition of its filtering rate? *International Review of Hydrobiology*. Vol. 76, No. 1, pp: 47-56.
۱۶. Komárek, J.; Kastovsky, J.; Mares, J. and Johansen, J.R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia*. Vol. 86, pp: 295-335.
۱۷. Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I. and Fitzgerald, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management*. Chorus, I. and Bartram, J. editors. London: WHO E and FN Spon Publishers. pp: 113-153.
۱۸. Lampert, W., 1981a. Inhibitory and toxic effects of blue-green algae on *Daphnia*. *International Review of Hydrobiology*. Vol. 66, No. 3, pp: 285-298.
۱۹. Lampert, W., 1981b. Toxicity of blue-green *Microcystis aeruginosa*: Effective defense mechanism against grazing pressure by *Daphnia*. *International Association of Theoretical & Applied Limnology*. Vol. 21, pp: 1436-1440.



- Algae) National Health and Medical Research Council, Canberra: Australian Government Publishing Service. 108 p.
۳۰. **Shih, P.M.; Wu, D.; Latifi, A.; Axen, S.D.; Fewer, D.P.; Talla, E.; Calteau, A.; Cai, F.; Tandeau de Marsac, N.; Rippka, R.; Herdman, M.; Sivonen, K.; Coursin, T.; Laurent, T.; Goodwin, L.; Nolan, M.; Davenport, K.W.; Han, C.S.; Rubin, E.M.; Eisen, J.A.; Woyke, T.; Gugger, M. and Kerfeld, C.A., 2012.** Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. PNAS. Edited by Robert Haselkorn. University of Chicago. 60 p.
۳۱. **Skulberg, O. and Skulberg, R., 1985.** Planktic species of *Oscillatoria* (Cyanophyceae) from Norway. characterization and classification. Archiv fur Hydrobiologie. Vol. 71, No. 1, pp: 157-174.
۳۲. **Stangenberg, M., 1968.** Toxic effects of *Microcystis aeruginosa* Kg. extracts on *Daphnia longispina* O. F. Muller and *Eucypris virens* Jurine. Hydrobiologia, Vol. 32, No. 1-2, pp: 81-87.
۳۳. **Sun, L.W.; Jiang, W.J.; Sato, H.; Kawachi, M. and Lu, X.W., 2016.** Rapid Classification and Identification of *Microcystis aeruginosa* Strains Using MALDI-TOF MS and Polygenetic Analysis. PloS one. Vol. 11, No. 5, p: e0156275.
۳۴. **World Health Organization. 1998.** Guidelines for drinking water quality: Addendum to Volume 2 2nd Ed Geneva: Health criteria and other supporting information.

