بررسی تاثیر سم خالص‌سازی شده میکروسیستین (Microcystin-RR) از ریز جلبک *Microcystis aeruginosa* (Kützing,۱۸۴۶) بر زنده‌مانی دافنی ماگنا (*Daphnia magna* (Straus, ۱۸۲۰)) و تعیین غلظت کشنده آن ($LC_{۹۶-۵۰h}$)

- **سعید بلالی***: 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 خالص‌سازی شده Microcystin-RR (MC-RR) از ریز جلبک *Microcystis aeroginosa* بر زنده‌مانی دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) و تعیین غلظت کشنده این سم ($LC_{۵۰-۹۶h}$) 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) درنظر گرفته شد. هر تیمار ۳ تکرار داشت. با توجه به نتایج 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 و هیچ‌یک از دافنی ماگناها توانایی زنده ماندن در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم خالص MC-RR به‌مدت ۹۶ ساعت را نداشتند. قابل ذکر است توانایی زنده ماندن دافنی‌ها با افزایش غلظت سم، کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰ میکروگرم برمیلی‌لیترسم، در روز دوم ودرغلظت ۲۰ و ۵۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر سم، در روز اول تمامی دافنی‌ها ازبین رفتند. میزان $LC_{۵۰-۹۶}$، ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR به‌دست 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 aeroginosa*، زنده‌مانی، دافنی ماگنا، $LC_{۹۶-۵۰h}$

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: saeed_balali85@yahoo.com

مقدمه

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 به‌خصوص آب‌های شیرین در طول دهه‌های اخیر بوده است (Park و همکاران، ۲۰۱۰). ورود این منابع به پهنه‌های آبی، از یک‌سو باعث تشدید پدیده‌هایی چون شکوفایی جلبکی و به‌دنبال 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 به‌علت سمی بودن، سمومی را به زنجیره غذایی منتقل می‌کنند که از طریق شبکه غذایی می‌تواند به سایر موجودات ازجمله انسان سرایت کند. حدود ۳۰ گونه از جلبک‌ها شامل داینوفلاژله‌ها، دیاتومه‌ها، هاپتوفیسه‌ها، سیانوباکترها و برخی از سیکلوفلاژله‌ها می‌توانند باعث شکوفایی می‌شوند. در محیط‌های آب‌شیرین،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، به‌طوری‌که 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 تاکسونومیکی مهمی در بین جلبک‌ها برخوردار می‌باشد (Skulberg و Skulberg، ۱۹۸۵). بلوم‌های سیانوباکترها بیش‌تر به‌دلیل 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 درمحیط‌های‌طبیعی به‌طور 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 به‌دلیل مورفولوژی‌برخی‌از‌سیانوباکتری‌هاو حضور مواد سمی می‌باشد (Porter و Orcutt، ۱۹۸۰؛ Lampert، ۱۹۸۱a؛ Nizan و همکاران، ۱۹۸۶). در سال‌های اخیر سمیت بسیاری از گونه‌های سیانوباکترها ازجمله میکروسیستیس روی دافنی‌ها گزارش شده است (Lampert، ۱۹۸۱a؛ Penalozaو همکاران، ۱۹۹۰؛ Jungmann و همکاران، ۱۹۹۱). بسیاری ازدافنی‌ها ازخوردن جلبک‌های سمی ازجمله میکروسیستیس اجتناب می‌ورزند که این روند می‌تواند به‌وسیله اندازه‌گیری نرخ فیلترینگ در دافنی تعیین شود. دافنی‌هایی که تنها منبع غذای آن‌ها در محیط میکروسیستیس می‌باشدو از آن استفاده می‌کنند نسبت به‌دافنی‌هایی 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 به‌حساب آمده و سبب تشکیل شکوفایی جلبکی خواهد شد (Lampert، b و a ۱۹۸۱). بنابراین این موضوع بسیار مهم است که خصوصیات و اثرات ترکیبات سمی برروی مرگ و میر دافنی‌ها به‌عنوان‌دومین‌زنجیره غذایی بیش‌تر مورد مطالعه قرار گیرد. آزمایش با سموم خالص شده، ابزاری برای تعیین‌حساسیت‌های‌فیزیولوژیکی‌به‌سم،درزئوپلانکتون‌موردنظر فراهم خواهد کرد. بنابراین در مطالعه حاضر سمیت سم Microcystin-RR استخراج شده از سیانوباکتر *Microcystis aeroginosa* روی نرخ مرگ و میر و بقای دافنی ماگنا بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این‌تحقیق به‌منظور‌تعیین‌سمیت 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 علوم‌کشاورزی‌ومنابع‌طبیعی گرگان انجام شد. جلبک میکروسیستیس آئروژینوزا از تالاب بین‌المللی آلماگل استان گلستان، به‌کمک میکروپیپت در زیر میکروسکوپ اینورت جداسازی و به‌صورت خالص کشت داده شد (Borwitzka و Borowitzka، ۱۹۸۹). شناسایی با استفاده‌ازمیکروسکوپ اینورت و کلید شناسایی (Janse van Vuuren و همکاران، ۲۰۰۶) صورت پذیرفت (Shih و همکاران، ۲۰۱۲).

شرایط کشت: جهت کشت میکروسیستیس آئروژینوزا به‌میزان زیاد، محیط کشت BG-11، ۲۴ ساعت قبل آماده، استریل و زیر هود لامیناریاکس 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 به‌وسیله دستگاه پی‌اچ‌متر وگتک مدل ۳۰۲۰۰WE اندازه‌گیری گردید.به‌هنگام‌کشت‌دادن‌یک 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

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 g ۱۶۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها از محیط کشت جدا و سپس در فریز درایر خشک شدند و در فریزر ۷۰- (Deep freezer، مدل A-۹۵-۲-fd۸۸، 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 g۹۳۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی برای کارتریج C_{18} مورد استفاده قرار گرفت. کارتریج حاوی میکروسیستین به‌وسیله ۱۰ میلی‌لیتر آب شسته شد. میکروسیستین‌ها در نهایت از کارتریج C_{18} 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 C_{18} و فاز متحرک که متانول- ۰/۰۵ مول در لیتر بافر فسفات (pH=۳) Haradaو 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.

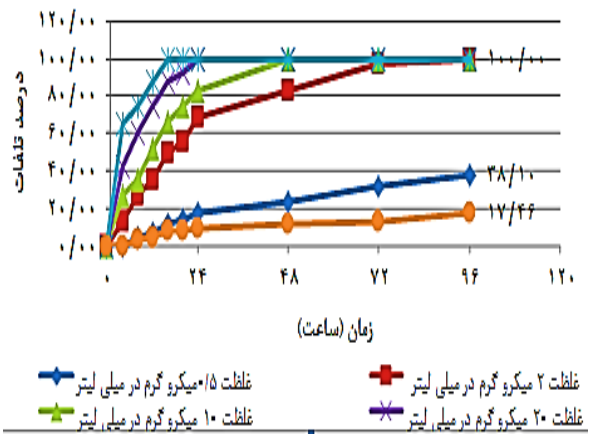
دامنه‌یابی غلظت‌های آزمایشی و مواجهه دافنی ماگنا با این غلظت‌ها: جهت فراهم کردن زئوپلانکتون، با استفاده از تور پلانکتون‌گیری عمودی اقدام به جمع‌آوری آن‌ها از آب بندان شهید صدوقی (واقع در استان گلستان، شهرستان گرگان، روستای محمد آباد) شد. شناسایی دافنی بر پایه خصوصیات موفولوژیکی و ظاهری (Mohammadyari 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 درنظر 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 میلی لیتر) در ابتدا و بعد از ۲۴ ساعت تغذیه شدند. ۳ تکرار برای هر یک از غلظت‌ها درنظر گرفته شد (Fulton و Paerl، ۱۹۸۷). میزان بقا دافنی‌ها در ۲۴ ساعت اول هر ۴ ساعت و بعد از آن روزانه تا روز چهارم بررسی گردید. کلیه شرایط فیزیکوشیمیایی 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 $LC_{۳۰}$، $LC_{۵۰}$، $LC_{۷۰}$، $LC_{۹۰}$ و $LC_{۹۹}$ 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 SPSS۱۸ 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

نداشتند. این توانایی با افزایش غلظت سم کاهش پیدا کرد به‌طوری‌که در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم، در روز دوم و درغلظت ۲۰ و۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم، در روز اول تمامی دافنی‌ها از بین رفتند (جدول ۲). قابل ذکر است در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم در ۱۶ ساعت اولیه در معرض قرارگیری دافنی‌ها، تلفات کامل مشاهده گردید (شکل ۱). همان‌طورکه در جدول ۳ مشاهده می‌شود، میزان $LC_{۹۶-۵۰.h}$، یعنی غلظتی از سم که ۵۰ درصد دافنی‌ها را در مدت ۹۶ ساعت از بین ببرد، ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR به‌دست آمد. در این جدول به‌ترتیب به LCهای ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ در طول چهار روز در معرض قرارگیری دافنی‌ها اشاره شده است. با توجه به نتایج این تحقیق در غلظت ۱/۷۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR،در مدت ۹۶ ساعت، ۹۹ درصد دافنی‌ها تلف می‌شوند. با توجه‌به نتایج، حتی‌درغلظت ۰/۵ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر سم MC-RR، تاثیر کشندگی سم بر دافنی‌ها مشاهده گردید. بنابراین بالاترین غلظت بدون تاثیر سم (NOEC)، صفر می‌باشد و حداقل غلظت موثر سم (LOEC) در تمامی زمان‌ها (در طول ۴ روز)، ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم، به‌دست آمد (جدول ۴).



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

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

غلظت	تعداد تلفات			
(میکروگرم در میلی‌لیتر)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
شاهد (بدون سم)	۲±۰/۰۰ $^{e\,B}$	۲/۳۳±۰/۵۸ $^{d\,B}$	۲/۶۷±۰/۵۸ $^{c\,B}$	۳/۶۷±۰/۵۸ $^{c\,A}$
۰/۵	۳/۶۷±۰/۵۸ $^{d\,C}$	۵/۰۰±۱/۰۰ $^{c\,BC}$	۶/۶۷±۱/۵۳ $^{b\,AB}$	۸/۰۰±۲/۰۰ $^{b\,A}$
۲	۱۴/۳۳±۰/۵۸ $^{c\,C}$	۱۷/۳۳±۰/۵۸ $^{b\,B}$	۲۰/۳۳±۱/۱۵ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$
۱۰	۱۷/۳۳±۰/۵۸ $^{b\,B}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$
۲۰	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$
۵۰	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$	۲۱/۰۰±۰/۰۰ $^{a\,A}$

حروف انگلیسی مختلف کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (P<۰/۰۵). حروف انگلیسی مختلف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

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

غلظت	فاصله اطمینان ۹۵ درصد			
(میکروگرم در میلی‌لیتر)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
$LC_{۳۰}$	۰/۷۳ (۰/۱-۳۲/۲۳)	۰/۵۹ (۰/۰-۳۱/۸۴)	۰/۴۸ (۰/۰-۲۹/۶۵)	۰/۴۵ (۰/۰-۱۸/۵۹)
$LC_{۵۰}$	۱/۵۰ (۰/۲-۸۴/۳۸)	۰/۹۱ (۰/۱-۵۹/۳۲)	۰/۶۶ (۰/۰-۴۷/۹۳)	۰/۵۸ (۰/۱-۴۲/۰۴)
$LC_{۷۰}$	۳/۰۹ (۱/۵-۹۴/۲۳)	۱/۴۰ (۰/۲-۹۸/۴۰)	۰/۹۱ (۰/۱-۶۸/۴۹)	۰/۷۴ (۰/۳-۵۸/۰۶)
$LC_{۹۰}$	۸/۷۱ (۵/۲۰-۱۷/۵۷)	۲/۶۰ (۱/۶-۶۹/۸۰)	۱/۴۲ (۱/۳-۰۰/۴۱)	۱/۰۷ (۰/۱۷-۷۴/۸۷)
$LC_{۹۹}$	۳۶/۴۷ (۱۶/۱۶۵-۴۶/۳۷)	۶/۱۲ (۳/۳۲-۲۰/۰۹)	۲/۶۵ (۱/۱۱-۵۸/۶۴)	۱/۷۵ (۱/۲۱۵-۰۰/۴۴)

جدول ۴: حداقل غلظت موثر و بالاترین غلظت بدون تاثیر سم MC-RR بر دافنی ماگنا و میزان LC_{50} در فاصله زمانی ۲۴ تا ۹۶ ساعت

زمان (ساعت)	حداقل غلظت موثر سم (LOEC)	بالاترین غلظت بدون تاثیر (NOEC)	LC_{50}
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 آب‌شیرین 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 این‌که، عامل اغلب شکوفایی‌های گونه‌های سمی در محیط‌های آب‌شیرین از دسته سیانوباکترها می‌باشد که به‌طور بالقوه‌ای می‌توانند روی بقا، رشد و باروری جمعیت زئوپلانکتون‌ها اثرگذار 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 میکروسیستین -RR است (Carmichael، ۱۹۸۱).

در این تحقیق تاثیر سم میکروسیستین-RR استخراج شده از میکروسیستیس آئروژینوزا بر بقای دافنی ماگنا مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج حاصل از این تحقیق تاثیر کشنده سم میکروسیستین (MC-RR) بر دافنی ماگنا را نشان داد به‌طوری‌که حتی در غلظت ۰/۵میکروگرم 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 به‌مدت 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؛ Fulton و Paerl، 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.، کلادوسر *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 آداپتاسیون انتخابی گونه‌های زئوپلانکتون با سموم سیانوباکتریایی کنترل شود (Ibelings و Havens، ۲۰۰۸؛ Hairston و همکاران، ۲۰۰۱؛ Chislock و همکاران، ۲۰۱۳). این فاکتورها که موجب اجتناب و دوری، کاهش یا حتی افزایش اثرات میکروسیستین 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 ازجمله 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_{50} معادل ۲۱/۴، ۱۱/۶، ۱۰/۷ و ۰/۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت ۴۸ ساعت، می‌باشد. در تحقیق حاضر میزان $LC_{48\text{-}50h}$ برای دافنی ماگنا، ۰/۹۱و میزان $LC_{96\text{-}50h}$، 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 کبد 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 تاثیرگذار سم ۰/۵ میکروگرم بر

میلی‌لیتر و میزان $LC_{۹۶-۵۰h}$، ۰/۵۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم به‌دست آمد. هم‌چنین مشخص گردید در غلظت ۱/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم MC-RR، در طول ۹۶ ساعت، ۹۹ درصد دافنی‌های تلف می‌شوند و بنابراین در غلظت‌های بالاتر تلفات صد درصد مشاهده می‌شود. به‌طوری‌که در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم در روز چهارم و درغلظت‌های بالاتر ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سم به‌ترتیب 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 به‌وسیله سیانوباکترها بر گونه‌های مختلف زئوپلانکتون‌ها در شرایط محیطی مختلف متفاوت است، به‌طوری 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 به‌علت 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* به‌عنوان یکی از سیانوباکترهای غالب موجود در بدنه آب‌های شیرین به‌علت توانایی تولید هپاتوتوکسینی به‌نام 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 بیاندازد (Kuiper-Goodman و همکاران، ۱۹۹۹)، بسیار حائز اهمیت است. برهمین 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 ازجمله دافنی‌ها، راهکاری جهت جلوگیری از ورود آلاینده‌ها و آلوده شدن آب‌ها (به‌ویژه پساب‌های حاوی نیتروژن و فسفر) به منابع آبی اندیشیده شود.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق از هیچ‌گونه کمک و کوششی دریغ نورزیدند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **محبی، ف.؛ محسن‌پورآذری، 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. Cambrige. 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.

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. J**anse 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.

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.; Ghassemzadeh, 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. **Ressom, 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

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. l, pp: 157-174.

۳۲. **Stangenberg, M., 1968.** Toxic effects of *Microcystis aeruginosa* Kg. extracts on *Daphnia longispina* 0. 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.