

بررسی سمیت سیانوباکتری آنابنا جدا شده از تالاب بندر انزلی

سهیلا افشاری آزاد^{۱*}، فرزانه حسینی^۲، عباس اخوان سپهی^۳

۱. استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استاد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سیانوباکتری ها گروه میکروارگانیسمی غنی از متابولیت های زیستی به شمار می آیند و توانایی تولید ترکیبات بیواکتیو ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضدویروسی، ضدسرطان، جلبک کش و ایمونوساپرسیو را دارند. در مطالعه ی حاضر سنجش سمیت سیانوباکتری آنابنا واریابیلیس جدا شده از منطقه سرخانکل بر روی موش های نر سوری انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این تحقیق سیانوباکتری آنابنا از منطقه سرخانکل در قسمت مرکزی تالاب بندر انزلی جداسازی و شناسایی با استفاده آنالیز ملکولی SrRNA ۱۶ صورت گرفت. برای تعیین سمیت حاد، ۳۰ سر موش سوری نر به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند، گروه ابتدایی به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند و گروه های اول تا پنجم دوزهای ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم از پودر سیانوباکتری را به صورت تزریق داخل صفاقی و به شکل محلول در نرمال سالین، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به میزان ۰/۵ میلی لیتر دریافت کردند، گروه شاهد ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین ۹٪ به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.

یافته ها: در گروه های شاهد، اول، دوم و سوم پس از تزریق مرگ مشاهده نشد، اما در گروه چهارم پس از تزریق آثار عدم تحرک مشاهده شد و ۳ عدد از موش های این گروه از بین رفتند، در گروه پنجم پس از تزریق آثار عدم تحرک و بی حالی مشاهده شد، تمام موش های این گروه از بین رفتند. در بررسی های آسیب شناسی بافتی در موش های گروه اول بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال، افزایش هپاتوسیت های پلی مورفیسم، وزیکولار شدن هپاتوسیت ها مشاهده شد، در گروه دوم بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره، اتساع سینوزوئیدها و دژنراتیو نکروز سلول ها مشاهده شد، در گروه سوم بافت کبد سگمنته، کانونی از تجمع سلول ها، تراوش آماسی تک هسته ای در فضای پورتال و صفحات نامنظم هپاتوسیت ها مشاهده شد و در گروه چهارم و پنجم بافت کبد بزرگ، دژنره و سگمنته، کانونی از تجمع سلول ها و صفحات نامنظم هپاتوسیت ها مشاهده شد.

نتیجه گیری: سم موجود در این سیانوباکتری از نوع هپاتوتوکسین می باشد، میزان LD50، ۱۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد.

کلمات کلیدی: آنابنا واریابیلیس، آسیب شناسی بافتی، هپاتوتوکسین، کبد، LD50، موش نر

Toxicity measurement of *Anabaena* isolated from *Anzali* wetland

Soheila AfshariAzad^{1*}, Farzaneh Hosseini², AbbasAkhavansepahi³

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran. Iran
2. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran. Iran
3. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran. Iran

Abstract

Background: Cyanobacteria are one of the most diverse prokaryotic groups that are widely spread around the world. These microorganisms possess special metabolic pathways which make them suitable in various aspects such as having access to new compounds with various applications in pharmaceutical industry, conducting of scientific research, producing food for humans and livestock, and having other aquaculture strengthens.

Materials and Methods: For the purpose of this study, the *Cyanobacteria Anabaena* were separated and purified from Sorkhankol area in the central part of Anzali wetland. Valid keys and 16srRNA molecular analysis were carried out as part of the diagnosis process. The toxicity examination of the isolated cyanobacteria was conducted on 30 male mice which were divided randomly into 6 groups. The first group of mice, considered as the control group, received 0.5 ml saline solution, while the other group, considered as the experimental group, received *Anabaena* extract with dosages of 500, 700, 1000, 1300, and 2000 mg/ kg. The extract was dissolved in saline solution at a rate of 0.5 ml and intraperitoneally injected to the mice in the experimental group.

Result: The results obtained from histopathological examination of liver revealed that *Anabaena* toxin is hepatotoxin and its symptoms include; increased hepatocellular polymorphism, vesicular hepatocytes, sinusoid dilatation, degenerative cell necrosis, focal accumulation of cells, mononuclear inflammatory, and irregular hepatic plates.

Conclusion: This result show that Amount of LD50 determined 1250 mg/kg.

Key word: *Anabaena*, histopathologic, hepatotoxin, liver, LD50 , male mice

مقدمه

سیانوباکتریهای آبی قادر به سنتز متابولیت های متنوع فعال ثانویه هستند (۱). این میکروارگانیسمها به عنوان یکی از مهمترین و قدیمی ترین موجودات پروکاریوتی شناخته شده در زمین به شمار می آیند (۲). فعالیت این ترکیبات با آنچه در ویروسها، باکتریها، قارچها و سایر گونه های جلبکی مشاهده میشود متفاوت است (۳،۴،۵،۶). به همین دلیل، سیانوباکتریها پتانسیل زیادی برای تولید داروهای جدید، ساختارهای تازه و متابولیت های دارای فعالیت زیستی دارند (۷). این میکروارگانیسمها متابولیت های اولیه یا ثانویه ای تولید میکنند که به عنوان ترکیبات زیست فعال میتوانند در صنعت استفاده شوند (۸). سیانوتوکسین ها میتوانند حیوانات و انسانها را از طریق تماس با آب (حاوی شکوفایی جلبکی) مسموم کنند. همچنین ممکن است باعث مسمومیت غیرمستقیم از طریق مصرف غذای آلوده شوند (۹،۱۰). مرگومیر حیات وحش در پستانداران خشکی زنی نیز می تواند تحت تأثیر سموم سیانوباکتریایی قرار می گیرد که قادرند در اکوسیستم تجمع پیدا کنند. از جمله سیانوباکتریهای مولد سیانوتوکسین ها می توان به میکروسیستیس آئروژینوزا، آفانیزومنون فلوس آکوا، پلنکتوتریکس آگاردی ای، لینگبیا، نودولاریا، آنابنا و اوسیلاتوریا اشاره کرد (۱۱،۱۲،۱۳). سمیت سیانوباکتری ها را می توان با روش های مختلفی تعیین کرد. یکی از این روش ها،

اندازه گیری سطح سمیت در موشهاست. معمولاً برای ارزیابی سمیت سیانوباکتری ها از موش های نرسوری به عنوان حیوان آزمایشگاهی استفاده می شود. در این روش، سلول های سیانوباکتری به محلول نمکی اضافه و به صورت داخل صفاقی تزریق می شوند. پس از ۲۴ ساعت مشاهده موش ها، آن ها تشریح شده و بافت های آسیب دیده برای تحلیل نتایج بررسی می شوند (۱۴،۱۵).

مواد و روش ها

نمونه آب از منطقه سرخانگل تالاب انزلی برداشت شد. جهت جداسازی سیانوباکتریهای دریایی، حجم ۵۰۰ میلی لیتر نمونه آب از صافی میلی پور با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس کاغذ صافی به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت BG11 انتقال داده شد (Merck Co Germany) (۱۶،۱۷). نمونه ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به عنوان دمای بهینه رشد، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و pH معادل ۷/۵ قرار گرفتند. به منظور هوادهی محیط کشت مایع از شیکر با دور ۱۵۰ rpm و پمپ های هوا استفاده شد (۱۸). آزمون رقت های سریالی انجام شد. سپس محیط کشت BG11 جامد ساخته شد و سپس آنتی بیوتیک نیستاتین به منظور حذف آلودگی های قارچی و نیز آنتی بیوتیک سیکلوهمزامید برای حذف آلودگی های باکتریایی به محیط کشت اضافه شدند. درون ۱۰ پلیت استریل ۱ میلی لیتر از هر کدام از رقت های مربوطه ریخته و به هر کدام ۱۵ میلی لیتر محیط کشت BG11 به پلیت ها اضافه شد و سپس پلیت ها با حرکت دورانی تکان داده شد و در حالت ساکن قرار داده شدند تا خنک شده و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند (۱۹). شناسایی سیانوباکتری با استفاده از کلیدهای معتبر و آنالیز ملکولی SrRNA ۱۶ و ویژگیهای مورفولوژی یا ظاهری آن انجام شد (۲۰،۲۱).

نویسنده مسئول: استادیار، گروه میکروب

شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک :

mdm_358@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۷

زیر میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی $100\times$ بررسی شدند. آنالیز مولکولی با روش Marmur انجام شد (۲۲).

بعد از رشد سیانوباکترها در محیط کشت BG11 ، برای مشاهده مستقیم سیانوباکتری های رشد کرده درون ارلن ها، لام تهیه گردید و با روش رنگ آمیزی ساده رنگ شدند و در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CYAN738 و CAYN1281R برای سیانو باکتری ها انجام شد.

Sequence 5 to 3	Primer Name
ATACCCWGTAGTCCTAGC	CYAN738F
GCAATTACTAGCGATTCCTCC	CYAN1281R

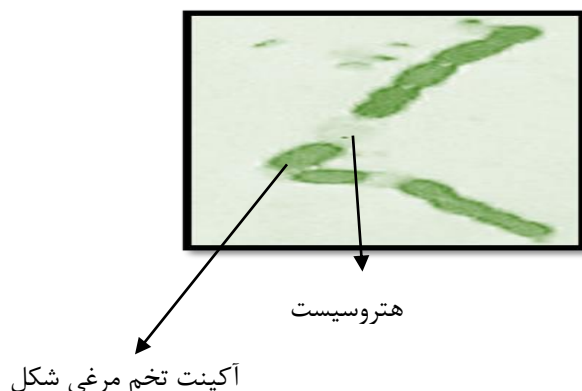
سالین، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به میزان ۰/۵ میلی لیتر دریافت کردند، گروه شاهد ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین ۰/۹٪ به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند، موش ها پس از تزریق تا پایان ۲۴ ساعت از لحاظ رفتاری، میزان مصرف آب و مرگ تحت مراقبت قرار گرفتند (۲۳). موش ها با قطع نخاع بی درد کشته شدند و کبد آن ها برای بررسی بافت شناسی جدا شد. نمونه ها در فرمالین ۱۰٪ ثابت شدند و سپس آگیری، شفاف سازی با زایلن، قالب گیری با پارافین، برش گیری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین انجام شد.

برای مشخص شدن میزان تلفات بین گروه های مختلف با توجه به دوز دریافتی از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

به منظور لیوفیلیزه کردن توده سیانوباکتریایی به توده سیانوباکتری کشت شده گلو تامات سدیم افزوده شد، سپس به دستگاه افزوده شد و منجمد شد و سپس در خلا و در فشار پایین خشک شد، در این مرحله توده سیانوباکتریایی به حالت پودری یکنواخت درآمد.

برای آزمون سنجش حساسیت ۳۰ سر از موش های نر نژاد سوری سفید با وزن تقریبی ۲۵ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند، به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند، گروه ابتدایی به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند و گروه های اول، دوم، سوم و چهارم و پنجم دوزهای ۵۰۰ ، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم از پودر سیانوباکتری (تولید شده توسط عمل لیوفیلیزاسیون) را به صورت تزریق داخل صفاقی و به شکل محلول در نرمال

یافته ها



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی سیانوباکتری: ویژگی های میکروسکوپی سیانوباکتری آنابنا: سلول های رویشی مانند دانه های تسبیح به دنبال هم قرار گرفتند، آکینت تخم مرغی و هتروسیست در لابه لای سلول های رویشی قرار گرفتند، تریکوم ها به صورت مارپیچ است.

نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16 SrRNA نشان دادند سویه مذکور با ۵۳۴ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه آنابنا واریابیلیس قرابت فیلوژنی دارد (۲۴،۲۵).

```
CCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACAT
GTCGCGAATCTTCTTGAAAGGGAAGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATG
GCTGTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCG
TTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTIONA
ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCGTAAACCGTAGCTC
AGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGG
```

۵۳۴ نوکلئوتید توالی یابی شده از ژن 16SrRNA (توالی یابی بر اساس روش sanger انجام گرفت)

علائم آسیب شناسی بافتی در موش های گروه آزمایش:

علائم در موش های گروه شاهد: اندازه کبد طبیعی و شکل آن نرمال است، هیپاتوسیت های طبیعی مشاهده شدند.

علائم در موش های گروه اول: بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال است، افزایش هیپاتوسیت های پلی مورفیک، و زیکولار شدن هیپاتوسیت ها مشاهده شد.

علائم در موش های گروه دوم: بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره است، اتساع سینوزوئیدها و دژنراتیو نکروز سلول ها مشاهده شد.

علائم در موش های گروه سوم: بافت کبد سگمنته شده است، کانونی از تجمع سلول ها، تراوش های آماسی تک هسته ای در فضای پورتال و صفحات نامنظم هیپاتوسیت ها مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی های سنجش سمیت نشان داد، در گروه شاهد (گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی دریافت کردند و دریافت نکردند) و گروه های اول (با میزان دوز دریافتی ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و دوم (با میزان دوز دریافتی ۷۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و سوم (با میزان دوز دریافتی ۱۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پس از تزریق و آنابنا واریابیلیس هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد (در این گروه های تیماری فقط آثار هیستوپاتولوژیکی بافت کبدی مشاهده شد)، اما در گروه چهارم با میزان دوز دریافتی ۱۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پس از تزریق آنابنا واریابیلیس ابتدا آثار عدم تحرک مشاهده شد و در عرض ۲۴ ساعت ۳ عدد از موش های این گروه از بین رفتند، در گروه پنجم (با میزان دوز دریافتی ۲۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پس از تزریق آنابنا واریابیلیس ابتدا آثار عدم تحرک و بی حالی مشاهده شد و در عرض ۲۴ ساعت تمام موش های این گروه از بین رفتند.

علائم در موش‌های گروه چهارم و پنجم: بافت کبد بزرگ، صفحات نامنظم هپاتوسیت‌ها مشاهده شد. دژنره و سگمنته شده است، کانونی از تجمع سلول‌ها و

جدول ۱. نتایج سنجش سمیت

گروه	دوز دریافتی بر حسب میلی گرم	تعداد تلفات	درصد وزن کبد به وزن بدن	علائم ماکروسکوپی	علائم میکروسکوپی
شاهد	سرم فیزیولوژی	-	۰/۰۷	اندازه کبد طبیعی و شکل آن نرمال است	هپاتوسیت‌های طبیعی
اول	۵۰۰	-	۰/۰۸	بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال	افزایش هپاتوسیت‌های پلی مورفیک، وزیکولار شدن هپاتوسیت‌ها
دوم	۷۰۰	-	۰/۱	بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره است	اتساع سینوزوئیدها، دژنراتیو نکروز سلول‌ها
سوم	۱۰۰۰	-	۰/۱۲	بافت کبد سگمنته شده است	کانونی از تجمع سلول‌ها، تراوش‌های آماسی تک‌هسته‌ای در فضای پورتال، صفحات نامنظم هپاتوسیت‌ها

پنجم	۲۰۰۰	۵ عدد	۰/۱۷	بافت کبد بزرگ، دژنره و سگمنته شده است	کانونی از تجمع سلول ها، صفحات نامنظم هیپاتوسیت ها
------	------	----------	------	--	--



تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه شاهد
اندازه کبد طبیعی و شکل آن نرمال است



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲. نتایج آسیب شناسی بافتی

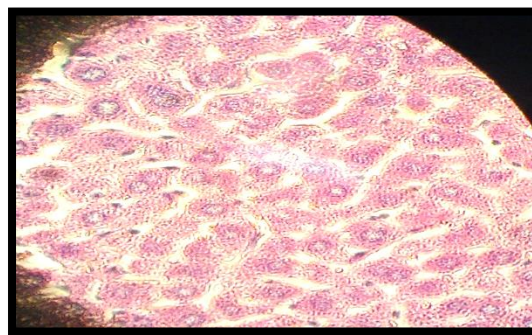
الف) تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه اول (بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال است)

ب) تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه دوم (بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره است)

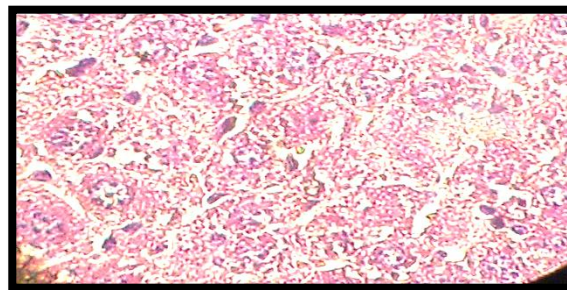
ج) تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه سوم (بافت کبد سگمنته شده است)

آسیب های بافت کبد در گروه های تحت مطالعه بصورت تصادفی انتخاب شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

شکل ۳. رنگ آمیزی برش های تهیه شده از بافت کبد موش های مورد آزمایش



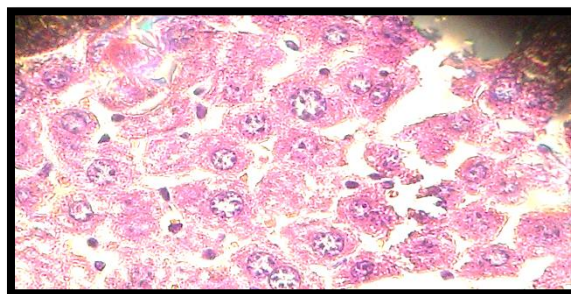
تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه شاهد: هپاتوسیت های طبیعی در شکل مشاهده می شوند



تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه اول:

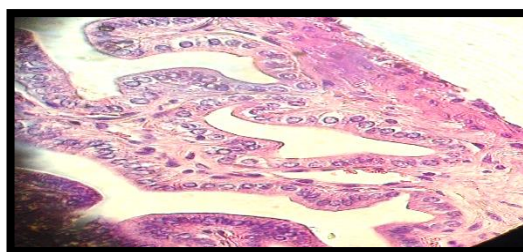
❖ افزایش هپاتوسیت های پلی مورفسم

❖ وزیکولار شدن هپاتوسیت ها



تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه دوم:

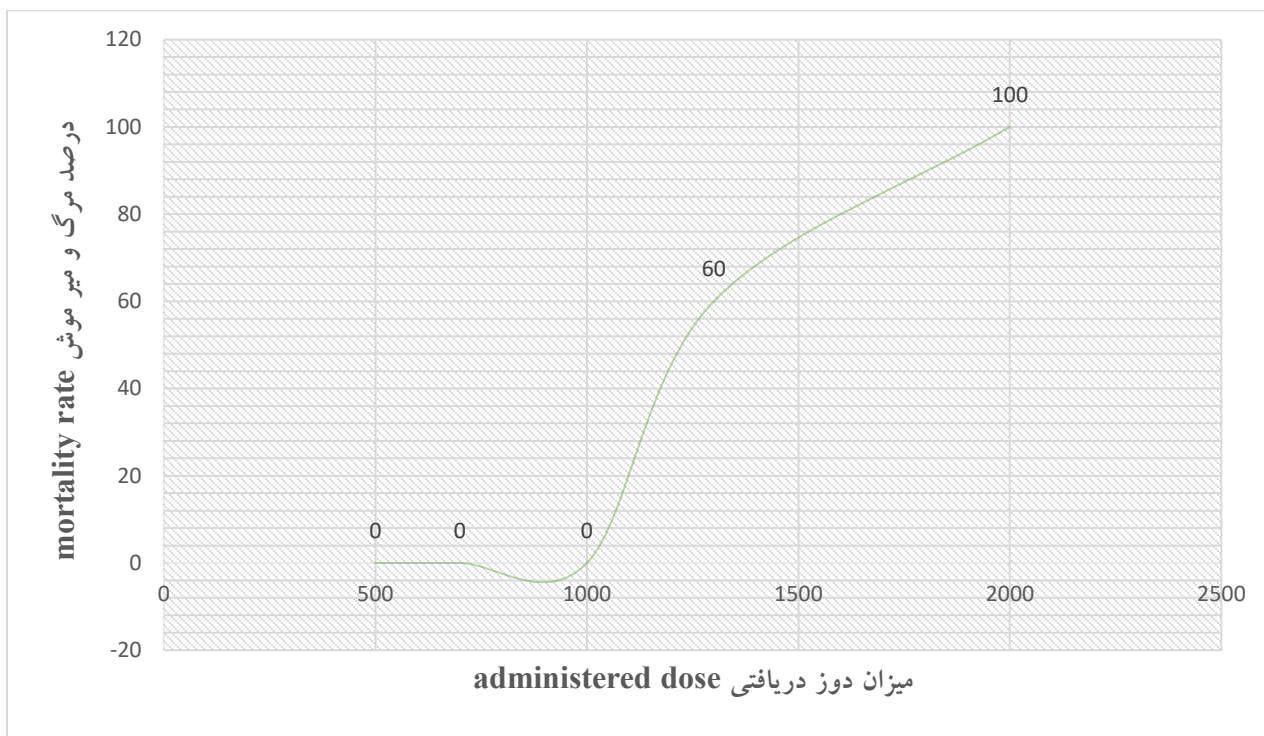
- ❖ اتساع سینوزوئیدها
- ❖ دژنراتیو نکروز سلول ها



تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه سوم:

- ❖ کانونی از تجمع سلول ها
- ❖ تراوش های آماسی تک هسته ای در فضای پورتال
- ❖ صفحات نامنظم هپاتوسیت ها

میزان LD50 سیانوباکتری *آنابنا واریابیلیس* در تزریق داخل صفاقی موش پس از ۲۴ ساعت ۱۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به دست آمد.



شکل ۴. میزان LD50 سیانوباکتری *آنابنا واریابیلیس* بر موش های سوری نر: میزان LD50 در تزریق داخل صفاقی

گردید میزان تلفات در دوز ۲۰۰۰ به صورت معناداری بیشتر از دوزهای ۱۰۰۰ و کمتر است ($p < 0.014$). تفاوت آماری معناداری در میزان تلفات دوز ۱۳۰۰ با دوزهای ۱۰۰۰ و کمتر همچنین دوز ۲۰۰۰ مشاهده نشد ($p < 0.167$).

با توجه به جدول ۲، تفاوت آماری معناداری در میزان تلفات با توجه به میزان دوز دریافتی وجود دارد ($p < 0.0001$). برای مشخص شدن تفاوت بین سطوح مختلف دوز دریافتی، دوزهای مختلف دو به دو با هم مقایسه شدند و آشکار

جدول ۲. مقایسه میزان تلفات موش ها با توجه به میزان دوز دریافتی

گروه	تلفات ندارد		تلفات دارد		آزمون دقیق فیشر P-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
شاهد	۵	۱۰۰	۰	۰	<0/0001
۵۰۰	۵	۱۰۰	۰	۰	
۷۰۰	۵	۱۰۰	۰	۰	

۱۰۰۰	۵	۱۰۰	۰	۰
۱۳۰۰	۲	۴۰	۳	۶۰
۲۰۰۰	۰	۰	۵	۱۰۰

نتیجه گیری

سیانوباکتری‌ها هنوز به طور کامل در زمینه ی فعالیت های ضد قارچی مورد مطالعه قرار نگرفته اند و مطالعات کمی در این خصوص انجام گرفته است، با توجه به فراوانی و اهمیت سیانوباکتری‌ها در میکروفلور تالاب های استان گیلان در این بررسی سیانوباکتری جنس آنابنا، بومی تالاب‌های گیلان جداسازی شد. در مطالعه‌ی انجام شده سیانوباکتری آنابنا از منطقه سرخانکل در قسمت مرکزی تالاب بندر انزلی تا عمق ۵۰ سانتی متری جداسازی شد، قاسمی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ به منظور جداسازی سیانوباکتری‌ها از مناطق ساحلی دریای خزر نمونه‌برداری نمودند و این مناطق را مناسب تر از نواحی دور از ساحل اعلام نمودند (۲). در این پژوهش جهت ازدیاد و رشد سیانوباکتری‌ها از محیط BG11 استفاده شد، اولین بار Stanier و همکاران در سال ۱۹۷۱ از این محیط برای کشت سیانوباکتری‌ها استفاده نمودند و از آن به بعد این محیط کشت بعنوان محیط مغذی جهت رشد و جداسازی سیانوباکتری‌ها معرفی و به کار گرفته شد (۱۶). در پژوهش حاضر سیانوباکتری موجود در نمونه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر و آنالیز ملکولی SrRNA ۱۶ تا سطح جنس و گونه انجام شد، نتایج حاصل از توالی خوانی ژن SrRNA ۱۶ نشان دادند سویه مذکور با ۵۳۴ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه آنابنا واریابیلیس قرابت فیلوژنی دارد. William و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان

داشتند ترکیبی از روش‌های شناسایی بر مبنای خصوصیات ظاهری و روش‌های ملکولی بسیار مناسب می‌باشد، در همین راستا آنها اظهار داشتند اطلاعات ملکولی در سال‌های اخیر اعتبار برخی از جنس‌های سیانوباکتریایی نظیر سودوآنابنا، اسپیرولینا، میکروسیستیس و پلنکتوتریکس را ثابت می‌نماید (۲۶)، درحالیکه Hongmei و همکاران در سال ۲۰۰۵ اظهار داشتند استفاده از اطلاعات ملکولی SrRNA ۱۶ ناسازگاری بین اطلاعات مورفولوژیکی و ملکولی ایجاد می‌نماید (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر سنجش سمیت آنابنا واریابیلیس جدا شده از منطقه سرخانکل بر روی موش‌های نر سوری انجام گرفت، بیشترین میزان مرگ و میر مربوط به دوز دریافتی ۲۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌دست آمد. تفاوت آماری معناداری در میزان تلفات با توجه به میزان دوز دریافتی وجود دارد ($p < 0.0001$). نتایج حاصل نشان داد سم موجود در این سیانوباکتری از نوع هپاتوتوکسین می‌باشد، آسیب‌های بافت کبد در گروه‌های تیمار مورد بررسی قرار گرفتند، علائم شامل: افزایش هپاتوسیت‌های پلی‌مورفیک، وزیکولار شدن هپاتوسیت‌ها، اتساع سینوزوئیدها، دژنراتیو نکروز سلول‌ها، کانونی از تجمع سلول‌ها، تراوش‌های آماسی تک‌هسته‌ای در فضای پورتال، صفحات نامنظم هپاتوسیت‌ها مشاهده شد.

تحقیقات Sivonen در سال ۱۹۹۶ همسو با پژوهش حاضر بود، او بیان نمود سیانوباکتری های جدا شده از دریاچه Ladoga حاوی میکروسیستین با میزان سمیت بالای ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم هستند، همچنین او اظهار داشت اغلب میکروسیستین ها از نواحی کم عمق یوتروفیک قسمت جنوبی دریاچه جدا شده اند (۲۸). در پژوهشی مشابه Abdel-raouf و Ibraheem در سال ۲۰۰۷ نشان دادن عصاره دی اتیل استات سیانوباکتری *آنابنا واریابیلیس* جدا شده از بیابان Koom Osheema در اطراف شهر El-Fayoum دارای اثرات نورو توكسیك بوده و LD50 آن ۲۶۴/۶۷ میلی گرم بر کیلوگرم می باشد (۲۹). نتیجه پژوهش حاضر نشان داد میزان *آنابنا واریابیلیس* LD50 ۱۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد که با توجه به نتایج Lawton و همکاران غیر سمی تلقی می شود، Lawton و همکاران در سال ۱۹۹۴ بیان داشتند میزان LD50 سموم سیانوباکتری به شکل زیر طبقه بندی می شود (۳۰):

بیشتر از ۱۰۰۰ : غیر سمی

۵۰۰-۱۰۰۰ : سمیت کم

۱۰۰-۵۰۰ : سمیت متوسط

کمتر از ۱۰۰ : سمیت بالا

نتایج حاصل از بررسی های هیستوپاتولوژیک نشان داد سم موجود در این سیانوباکتری از نوع هیپاتوتوکسین می باشد، علائم شامل: افزایش هیپاتوسیت های پلی مورفیسیم، وزیکولار شدن هیپاتوسیت ها، اتساع سینوزوئیدها، دژنراتیو نکروز سلول ها، کانونی از تجمع سلول ها، تراوش های آماسی تک هسته ای در فضای پورتال، صفحات نامنظم هیپاتوسیت ها مشاهده شد. همچنین میزان LD50 ۱۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد.

منابع

1. Leflaive J, Ten-Hage L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw Biol.* 2007;52:199-214.
2. Ghasemi Y, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi S, Soltani N, Zarrini G. Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. *J Sci Islam Repub Iran.* 2003;14:203-9.
3. Carmichael W. Cyanobacterial secondary metabolites – the cyanotoxins: a review. *Freshw Biol.* 1992;15:1453-63.
4. Mundt S, Teuscher E. Blue–green algae as a source of pharmacologically active compounds. *Pharmazie.* 1988;43:809-15.
5. Patterson GML, Larsen LK, Moore RE. Bioactive natural products from blue-green algae. *J Appl Phycol.* 1994;6(2):151-7.
6. Skulberg OM. Microalgae as a source of bioactive molecules: experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol.* 2000;12:341-8.
7. Singh S, Bhushan K, Banerjee U. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol.* 2005;25(3):73-95.
8. Tuney I, Cadirci BH, Nal D, Sukatar A. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla. *Turk J Biol.* 2006;30:171-5.
9. Falconer IR, Bartram J, Chorus I, Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd GA. Safe levels and safe practices. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London: E&FN Spon; 1999. p.155-78.
10. Iochimeen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med.* 1998;338:873-8.
11. Banack SA, Johnson HE, Cheng R, Cox PA. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacteria. *Mar Drugs.* 2007;5:180-96.
12. Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 1:113-22.
13. Rao PV, Gupta N, Bhaskar AS, Jayaraj R. Toxins and bioactive compounds of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea. *J Microbiol Biotechnol.* 2002;16(2):240-6.
14. Mattsson C, Puu G. Toxiska blågröna alger. FOA Rapport. 1997;C40098-C1:8.
15. Willén T, Mattsson R. Water blooming and toxin producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981-1995. *Hydrobiologia.* 1997;353:181-92.
16. Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev.* 1971;35:171-205.
17. Summers ML, Wallis JG, Campbell EL, Meeks JC. Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate

- dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J Bacteriol.* 1995;177(21):6184-94.
18. Hanan M, El-Kassas Y. Active substances from some blue-green algal species used as antimicrobial agents. *Afr J Biotechnol.* 2010;9(19):2789-800.
19. Andersen RA. Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005. p.589.
20. Desikachary TV. Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research; 1959. p.684.
21. Prescott GW. Algae of the western Great Lakes area. Dubuque: W.C. Brown; 1962. p.977-85.
22. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol.* 1961;3:208-18.
23. Underdal B. Blågrønnalgetoksin – påvisning og egenskaper. *Vann (Norsk Vannforening).* 1984:359-63.
24. Altsch SF, Madden TL, Schaeffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402.
25. Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia.* 1996;35:12-24.
26. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. Introducing EZTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:716-21.
27. Williams R, Boute CH, Grubisic S, Wilmette A, Komárek J, Hoffmann L. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Appl Phycol.* 2006;42:1312-22.
28. Hongmei J, Aitchison JC, Lacap DC, Peerapornpisal Y, Sompong U, Pointing SB. Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China, the Philippines and Thailand. *Extremophiles.* 2005;9:325-32.
29. Ibraheem IBM, Abdel-Raouf N. Allelopathic activity of some local cyanobacterial extra-metabolites against some pathogenic bacteria. *Egypt J Phycol.* 2007;8:120-9.
30. Lawton LA, Beattie KA, Hawser SP, Campbell DL, Codd GA. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E, editors. Detection methods for cyanobacterial toxins. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1994. p.111-6.