پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال نوزدهم، شماره ۲، پی در پی ۹۸، صفحات ۹۹ تا ۱۰۶
خرداد و تیر ۱۳۹۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲

تشخیص سیانوباکتری‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین در تالاب انزلی با استفاده از روش PCR

سام مساحی[۱*]، دکتر مژگان امتیازجو[۲]، دکتر حسن شاه‌حسینی[۳،۴]*

۱. گروه بیولوژی آبزیان، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲. دانشیار، گروه بیولوژی آبزیان، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران
۴. مؤسسه پژوهشی ایرانیان ژن فناور، بزرگراه اشرفی اصفهانی، تهران

چکیده

سابقه و هدف: شکوفایی سیانوباکتری‌ها در آب‌های سطحی منجر به تولید سیانوتوکسین‌های خطرناکی مثل میکروسیستین می‌شود که مشکلات قابل توجهی ایجاد می‌کنند. در مطالعه‌ی حاضر، از یک آزمون PCR بهینه شده برای شناسایی سیانوباکتری‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین موجود در تالاب انزلی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری آب از ۲۰ ایستگاه واقع در نواحی شرقی، مرکزی و غربی تالاب انزلی صورت گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت DNG-Plus انجام گرفت. آزمون PCR برای پرایمرهای جهانی سیانوباکتری‌ها (23S30R و CYA106F) و پرایمر اختصاصی ژن کُدکننده‌ی میکروسیستین (mcyA-Cd1F و mcyA-Cd1R) بهینه شده و حساسیت و اختصاصیت آن ارزیابی گردید. سپس، آزمون PCR بهینه شده برای نمونه‌های تالاب انزلی به کار گرفته شد. فرایند کلونینگ محصولات PCR با توجه به رهنمودهای سازنده‌ی کیت انجام گرفت.

یافته‌ها: مناسب‌ترین دما برای مرحله‌ی انیلینگ، واکنش ۵۶ درجه سانتی‌گراد بود. بیشترین میزان تکثیر DNA زمانی در غلظت ۰/۴ میکرومولار پرایمرها مشاهده شد. به کارگیری آزمون PCR بهینه شده روی نمونه‌های تالاب انزلی آشکار کرد که همه‌ی ایستگاه‌های مورد مطالعه، آلوده به سیانوباکتری بودند که از بین آنها، سیانوباکتری‌های تولید کننده‌ی میکروسیستین در ۱۰ ایستگاه حضور داشتند. محصولات PCR با موفقیت کلون شده و برای مطالعات آتی ذخیره گردید.

نتیجه‌گیری: ممکن است تالاب انزلی در معرض خطر غلبه سیانوباکتری‌ها قرار گرفته باشد. از آزمون PCR بهینه شده در این مطالعه می‌توان به عنوان یک ابزار کارآمد به منظور مونیتورینگ و کنترل سیانوباکتری‌ها، به خصوص جهت شناسایی سویه‌های تولید کننده‌ی میکروسیستین در تالاب‌ها و یا سایر منابع آبی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آب، ایران، سیانوباکتری، میکروسیستین، واکنش PCR

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Massahi S, Emtyazjoo M, Shahhossieni H. Diagnosis of microcystin-producing cyanobacteria of Anzali Lagoon using an optimized PCR method. Pejouhandeh 2014;19(2):99–106.

مقدمه

سیانوباکتری‌ها، جلبک‌های سبز- آبی پروکاریوتی فتوسنتزکننده‌ای هستند که در آب‌های گرم، شیرین و یوتروفیک (eutrophic) حضور دارند. شکوفایی سیانوباکتری‌ها در آب‌های بومی با تولید سموم خطرناکی موسوم به سیانوتوکسین، باعث ایجاد مشکلاتی در مقیاس جهانی می‌شود (۱). همچنین، بسیاری از این گونه‌های سیانوباکتری‌ها در خورها، رودخانه‌ها، دریاچه‌های آب شیرین، اقیانوس‌ها و آب‌های ذخیره‌ای و آشامیدنی، مشکلات قابل توجهی ایجاد می‌کنند (۲). بنابراین، برای حفاظت از مصرف‌کنندگان آب، از مسمومیت و در معرض قرار گرفتن سموم سیانوباکتری‌ها، لازم است منابع آب از نظر حضور این سموم خطرناک به طور کمی و کیفی بررسی شده و از خطرات احتمالی ناشی مصرف آنها، پیشگیری شود.

*نویسنده مسؤول مکاتبات: **سام مساحی**؛ شماره ۵۳، کوچه مینا، خیابان دربند، میدان قدس، تهران؛ تلفن: ۲۲۷۲۳۸۸۴ (۰۲۱)، ۰۹۱۲۶۸۷۳۵۲۴؛ **پست الکترونیک:** Sam.massahi@gmail.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]

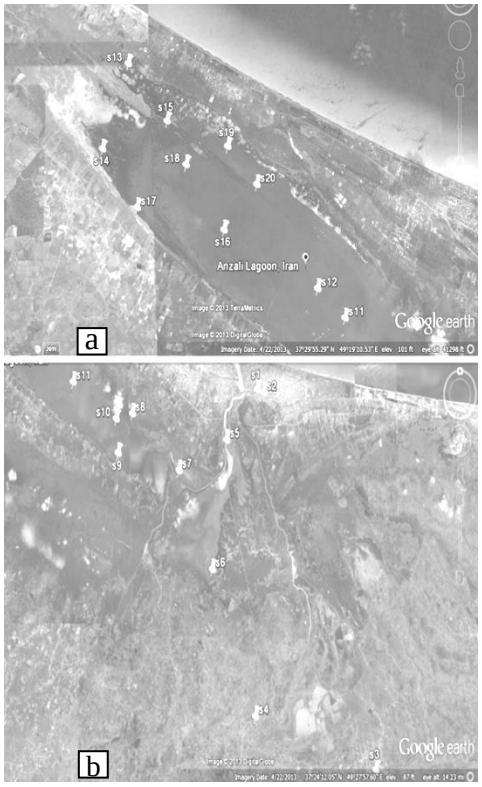
میکروسیستین (Microcystin) یکی از معروف‌ترین و شایع‌ترین انواع سیانوتوکسین‌ها می‌باشد که اغلب توسط گونه‌های مربوط به جنس میکروسیستیس (*Microcystis*)، آنابنا (*Anabaena*) و پلانکتوتریکس (*Planktothrix*) سیانوباکتری‌ها تولید می‌شود. این سم، یک هپاپپتید تک حلقوی و غیر ریبوزومی، محلول و پایدار در آب و حاوی چندین اسید آمینه‌ی غیر رایج می‌باشد (۳ و ۴). میکروسیستین توسط ژن mcy کد شده و به واسطه‌ی آنزیم میکروسیستین سنتتاز (Microcystin synthetase) تولید می‌گردد (۵ و ۶).

امروزه، روش‌های گوناگونی برای شناسایی سیانوباکتری‌های تولید کننده‌ی میکروسیستین و افتراق انواع مختلف سیانوتوکسین‌ها به کار گرفته می‌شود. از جمله این روش‌ها می‌توان به شامل الایزا (ELISA)، روش ممانعتی پروتئین فسفاتاز (PPIA)، شناسایی توکسین به روش جذب در فاز جامد (SPATT)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی مایع- اسپکتروفتومتری جرمی (LC/MS) اشاره کرد (۹-۷). با این حال، هرکدام از این روش‌ها، مزایا و معایب خاص خود را دارند. به عنوان مثال، روش الایزا اغلب با نتایج مثبت کاذب همراه بوده و یا روش HPLC مستلزم ابزارهای فوق‌العاده گران‌قیمت می‌باشد (۹). علاوه بر این، به دلیل شباهت ژنتیکی نزدیک بین سویه‌های سیانوباکتری تولیدکننده و غیر تولیدکننده‌ی میکروسیستین، امکان شناسایی سویه‌های تولیدکننده براساس معیارهای مورفولوژیک وجود ندارد (۱۰). اخیراً، پیشنهاد شده است که از روش‌های مولکولی نظیر PCR می‌توان به عنوان ابزاری مؤثر جهت شناسایی سیانوباکتری‌ها و ژن‌های کُدکننده‌ی توکسین آنها بهره برد (۱۲-۱۰). به عنوان مثال، هیسبرگوس و همکاران، با استفاده از PCR توانستند سویه‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین مربوط به جنس آنابنا، میکروسیستیس و پلانکتوتریکس را با کارایی بالاتری، شناسایی نمایند (۱۰). علاوه بر این، آنالیز ژنتیکی سویه‌های میکروسیستیس در نمونه‌های محیطی مشخص کرده است که تعداد معدودی از این میکروارگانیسم‌ها، ژن‌های کُدکننده‌ی میکروسیستین سنتتاز را دارا بوده و اغلب این سویه‌ها نیز به دلیل وقوع جهش‌های ژنتیکی، توانایی تولید میکروسیستین را از دست می‌دهند (۱۳ و ۱۴).

تالاب انزلی با مساحت ۱۵ هزار هکتار در قسمت شمالی بندر انزلی در استان گیلان واقع شده است و از جالب‌ترین و بزرگترین زیستگاه‌های طبیعی جانوران ایران محسوب می‌شود. این تالاب از لحاظ اکولوژیک، تحت تأثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله سیانوباکتری‌های تولیدکننده‌ی سیانوتوکسین قرار گرفته است (۱۵)؛ ولی تاکنون ژن‌های کُدکننده‌ی این سموم در این تالاب شناسایی و بررسی نشده است. همان‌طور که پیش‌تر اشاره گردید، روش PCR به عنوان یک تکنیک کمک‌کننده، جهت شناسایی سویه‌های سمی سیانوباکتری‌ها و سموم آنها از جمله میکروسیستین مطرح می‌باشد. به همین دلیل در مطالعه‌ی حاضر، این ابزار جهت شناسایی ژن مسؤول تولید میکروسیستین در تالاب انزلی، به‌کار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور نمونه‌گیری، ۲۰ ایستگاه در قسمت‌های غربی، مرکزی و شرقی تالاب انتخاب گردید (شکل ۱). آب سطحی از هر ایستگاه در بطری‌های دو لیتری پلاستیکی استریل مجزا برداشت و در جعبه حاوی یخ-ژل قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها در شرایط دور از نور سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه، هر کدام از نمونه‌ها در ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس، مایع رویی (سوپرناتانت) دور انداخته شد و پلت (pellet) حاصل با ۵۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه (deionized water) مخلوط گردید.



شکل ۱. تصویر ماهواره‌ای از ایستگاه‌های انتخاب شده برای نمونه‌گیری واقع در نواحی غربی (a)، مرکزی و شرقی (b) تالاب انزلی.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]

استخراج DNA با استفاده از کیت DNG-Plus و طبق رهنمودهای شرکت سازنده انجام گرفت (شرکت سیناژن، ایران). به طور خلاصه، ۱۰۰ µl آب دیونیزه حاوی نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول DNG در یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری مخلوط شده و روی heater block به مدت ۴ ساعت حرارت داده شد. سپس، سانتریفوژ در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد، سوپرناتانت برداشت و در یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری جدید با ۵۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم مخلوط گردید. پس از آن، مخلوط حاصله مجدداً با سرعت ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ شد و سوپرناتانت در میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری جدید با ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد، مخلوط گردید. مخلوط حاصله در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس دکانته شده و با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ مخلوط گردید. برای بار دوم، سانتریفوژ در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام و دکانته گردید. سپس، جهت برطرف سازی الکل، میکروتیوب‌ها روی heater block حرارات داده شده و نمونه حاوی DNA، خشک گردید. در نهایت، با ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط شده و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی سیانوباکتری و ژن کدکننده‌ی میکروسیستین.

ژن	طول محصول PCR	توالی پرایمر
CYA359F	۴۸۷	5'-GGGGAATYTTCCGCAATGGG-3'
CYA781R		5'-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3'
mcyA-Cd1R	۲۹۷	5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'
mcyA-Cd1F		5'AAAATTAAAAGCCGTATCAAA-3'

با به‌کارگیری DNA استاندارد سویه‌ی PCC7806 میکروسیستیس آئروژینوزآ (*Microcystis aeroginosa*) و پرایمرهای جهانی مورد استفاده برای شناسایی سیانوباکتری‌ها (23S30R و CYA106F) و نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن کدکننده‌ی میکروسیستین (mcyA-Cd1F و mcyA-Cd1R) واکنش PCR برای هر جفت پرایمر بهینه‌سازی شد (جدول ۱). جهت تعیین میزان حساسیت آزمون PCR بهینه شده، این آزمون روی سری رقت‌های مختلف حاوی میزان مشخصی از DNA استاندارد سویه‌ی PCC7806 میکروسیستیس آئروژینوزآ اعمال گردید. جهت ارزیابی اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده، پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA سیانوباکتری و ژن تولید کننده‌ی میکروسیستین و DNA گرفته شده از سایر موجودات از قبیل گونه‌های استافیلوکوکوس (*Staphylococcus*)، استرپتوکوکوس (*Streptococcus*)، ای‌کولای (*E.coli*)، لژیونلا پنوموفیلا (*Legionella pneumophila*)، سوموموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeroginosa*)، انسان و موش و DNA نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی مورد استفاده قرارگرفت.

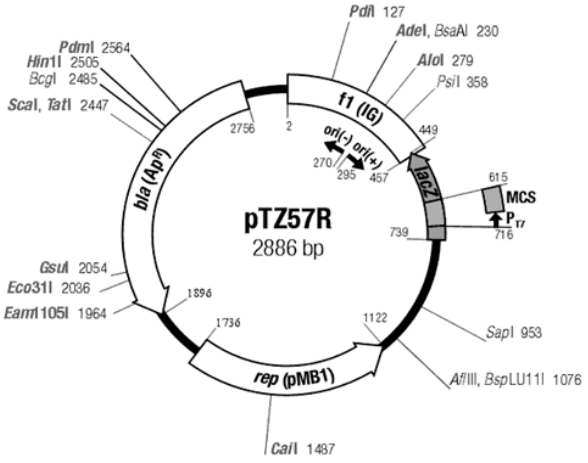
واکنش PCR بهینه‌سازی شده برای شناسایی سیانوباکتری‌ها و ژن‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین موجود در نمونه‌های گرفته شده از تالاب انزلی، به‌کار گرفته شد. در گام بعدی، ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر لودینگ ×6 به چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی رنگ سایبر گرین (CYBR Green dye) اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۷۰ ولت، الکتروفورز انجام گردید. در نهایت، محصولات PCR روی ژل الکتروفورز با استفاده از ترانس‌لومیناتور فرابنفش (Ultraviolet transilluminator) رویت گردید.

جهت خالص‌سازی، ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR در داخل یک لوله اپندورف با ۵ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار و ۱۲۵ میکرولیتر الکل مطلق سرد مخلوط شده و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه گردید. سپس، نمونه‌ها از فریزر خارج شده و در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن، دکانته شده و با ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ سرد مخلوط، ده بار وارونه شده و برای بار دوم در در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس، مایع رویی دور ریخته شد و پلت حاصله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ الی ۴۰ دقیقه انکوبه شد تا خشک گردد. در نهایت، محصول با ۲۰ µl آب مقطر، ذخیره گردید.

علاوه بر شناسایی ژن کُدکننده‌ی میکروسیستین در نمونه‌های گرفته شده از تالاب انزلی، محصولات PCR، خالص‌سازی و با استفاده از پلازمید pTZ57R (شکل ۲)، باکتری *E.coli* JM107 و کیت T/Acloning (شرکت فرمنتاز) طبق رهنمودهای شرکت سازنده کیت کلون گردید. کلون‌های نوترکیب به صورت کلنی‌های آبی/ سفید روی پلیت مشخص شدند. اگر insert به درستی در جایگاه کلونینگ که

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]

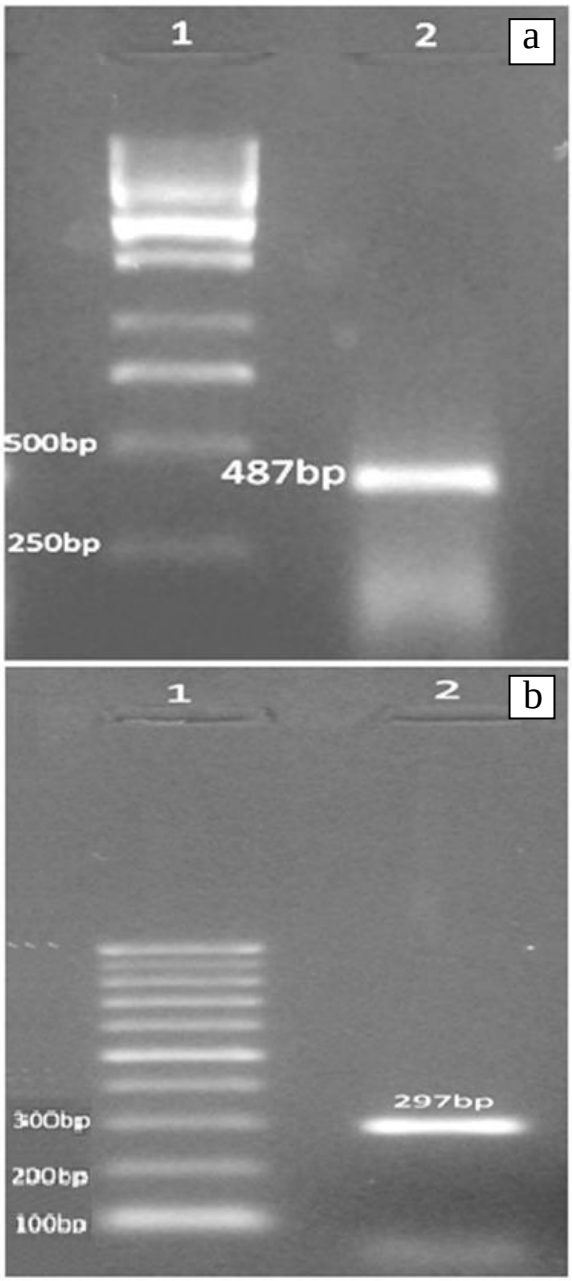
درون ژن Lac Z است، در جهت صحیح وارد شده باشد، کلنی‌های سفید رنگ روی پلیت ظاهر می‌شود. اگر insert درون وکتور پلاسمیدی درست وارد نشده باشد، در اثر تجزیه‌ی X-Gal در مجاورت IPTG، کلنی‌های آبی رنگ روی محیط LB Agar + Amp رشد می‌کنند. پس از کلونیگ، چندین کلنی سفید، انتخاب و مجدداً داخل پلیت‌های حاوی LB+Amp کشت داده شدند. سپس، از بین کلنی‌های حاصله، چند کلنی مناسب انتخاب و پلازمیدهای آنها با روش جوشاندن استخراج گردید. به طور خلاصه، داخل یک لوله، یک کلنی مجزا در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و با ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی مخلوط گردید. سپس درپوش لوله، بسته و با پارافیلم پوشانده شد. پس از آن، لوله در داخل آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس با سرعت ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ گردید. در ادامه، مایع زیرین روغن که حاوی پلازمید بود، به لوله‌ی دیگری منتقل و با استفاده از PCR بهینه شده، حضور یا عدم حضور DNA مورد نظر، بررسی گردید. پس از تأیید حضور قطعه‌ی DNA مورد نظر، کلنی مربوطه در پلیت‌های کشت، تکثیر و پلازمیدهای آنان به روش فوق‌الذکر استخراج و برای مطالعات بعدی ذخیره گردید.



شکل ۲. ساختار پلازمید pTZ57R خریداری شده از شرکت فرمنتاز جهت کلونیگ.

یافته‌ها

بهینه نمودن پروفایل چرخه‌ی حرارتی (thermal cycling profile) به روش گرادیانت (خصوصاً زمان و دمای انیلینگ)، مطالعه و مشخص گردید که فاصله‌ی دمای بین ۵۱ تا ۶۱ درجه، مناسب‌ترین دما برای مرحله انیلینگ واکنش ۵۶ درجه سانتی‌گراد بود. برای بهینه کردن مقدار پرایمرها، واکنش غلظت‌های بین ۰/۱ تا ۱ میکرومولار از پرایمرها در واکنش، آزمایش شد که بیشترین میزان تکثیر DNA زمانی در غلظت ۰/۴ میکرومولار مشاهده گردید. همچنین، بهترین غلظت برای $MgCl_2$، ۱/۵ میلی‌مولار و برای dNTPs، ۰/۵ میلی‌مولار بدست آمد. در الکتروفورز محصول PCR، باندهای اختصاصی حاصل از آمپلیکون پرایمرهای اختصاصی سیانوباکتری ۴۸۷ جفت باز طول و برای پرایمرهای اختصاصی ژن کُدکننده میکروسیستین، ۲۹۷ جفت باز طول داشتند (شکل ۳).

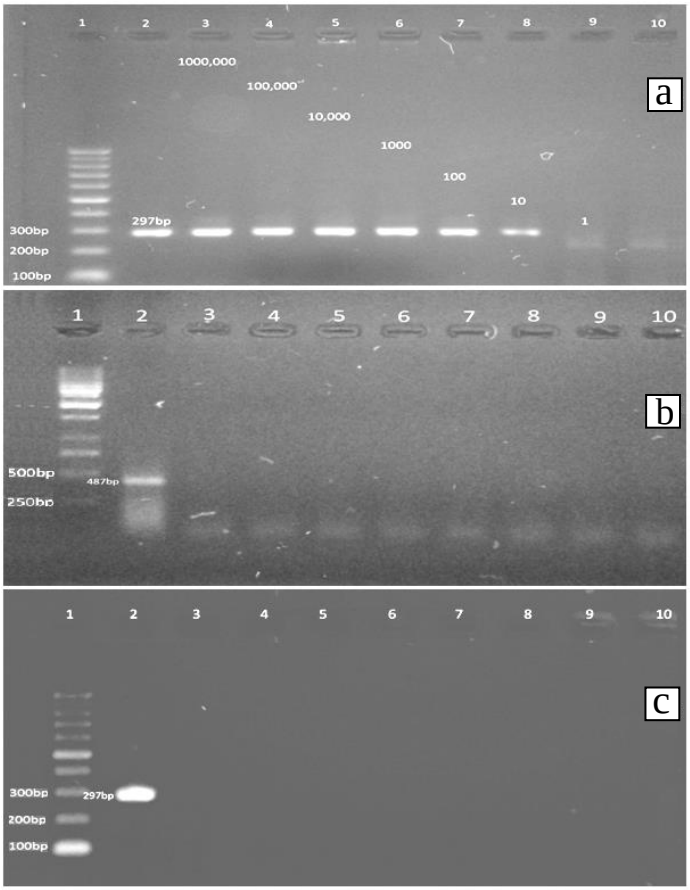


شکل ۳. آزمون PCR بهینه شده جهت شناسایی سیانوباکتری‌ها (a) و ژن کد کننده میکروسیستین (b).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]

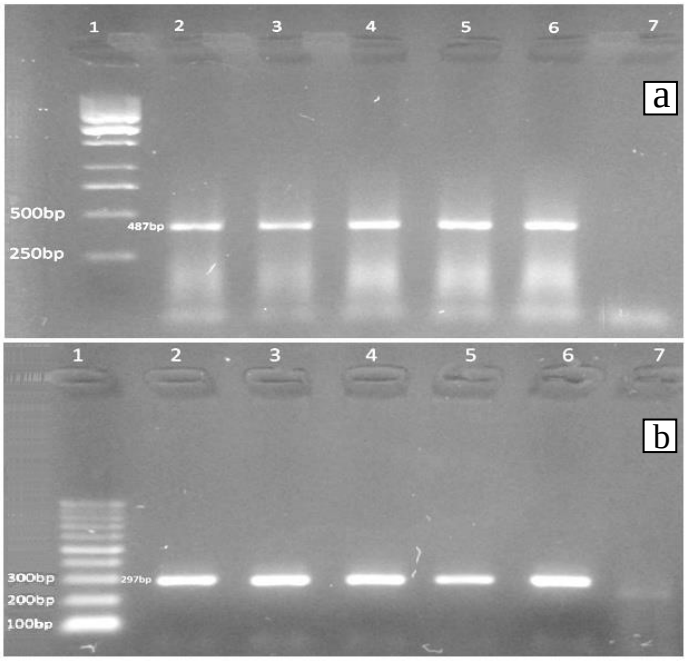
حساسیت آزمون PCR یا به عبارت دیگر حد تشخیص این آزمون، ۱۰ باکتری (یعنی ۱۰ کپی از ژنوم) محاسبه گردید. نتیجه‌ی حاصل از PCR برای تعیین حساسیت آزمون PCR بهینه‌شده با استفاده از رقت‌های سری که تعداد ژنوم در هرکدام از آنها مشخص است، به همراه یک نمونه کنترل منفی و نمونه‌ی کنترل مثبت با الگوی DNA استخراج شده از سوش استاندارد، روی ژل الکتروفورز در شکل ۴a آورده شده است.

ارزیابی اختصاصیت آزمون PCR، نشان داد این تست به درستی قادر به شناسایی سیانوباکتری‌ها و همچنین ژن تولیدکننده‌ی میکروسیستین بوده، حال آنکه DNA مربوط به سایر موجودات کنترل از قبیل گونه‌های استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، ای‌کولای، لژیونلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا، انسان و موش، توسط پرایمرهای این آزمون، قابل تکثیر نبودند (شکل ۴b و ۴c). این مشاهدات حاکی از اختصاصیت بالای این پرایمرها می‌باشد که می‌توان با اطمینان از آنها جهت تشخیص سیانوباکتری‌ها و ژن تولیدکننده‌ی سم آنها استفاده نمود. زمانی که آزمون PCR بهینه شده جهت شناسایی سیانوباکتری‌ها روی نمونه‌های DNA گرفته شده از تالاب انزلی (به همراه نمونه‌های کنترل مثبت و منفی) به کار گرفته شد، مشاهده گردید که سیانوباکتری‌ها در همه‌ی ۲۰ ایستگاه مورد مطالعه حضور دارند (شکل ۵a). همچنین، به‌کارگیری آزمون PCR بهینه شده جهت شناسایی ژن کُدکننده‌ی میکروسیستین روی این نمونه‌ها نشان داد که از ۲۰ ایستگاه مورد مطالعه، تنها در ۱۰ ایستگاه سیانوباکتری‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین وجود دارد که شامل ۶ ایستگاه در قسمت شرقی، ۳ ایستگاه در قسمت مرکزی و یک ایستگاه در قسمت غربی تالاب می‌باشد (شکل ۵b). نتایج آزمون PCR روی کلنی‌های سفید حاصل از کلونیگ نشان داد که همه‌ی کلنی‌ها دارای پلازمید نوترکیب مورد نظر می‌باشند. روی ژل الکتروفورز، هر دو پلازمید نوترکیب حاوی قطعه‌ی ژنی مربوط به تشخیص سیانوباکتری، و پلازمید نوترکیب حامل قطعه‌ی ژنی مربوط به تشخیص میکروسیستین، به دلیل سنگینی نسبت به پلازمید غیرنوترکیب pTZR57، حرکت کمی داشتند. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی موفقیت‌آمیز بودن کلونینگ و استخراج صحیح پلازمیدها می‌باشد. محصولات کلونینگ جهت مطالعات بعدی، ذخیره گردید.



شکل ۴. حساسیت آزمون PCR بهینه شده برای شناسایی میکروسیستین (a)، اختصاصیت PCR بهینه شده برای شناسایی سیانوباکتری‌ها (b) و میکروسیستین (c).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]



شکل ۵. شناسایی سیانوباکتری‌ها و میکروسیستین در تالاب انزلی. a) نتایج آزمون PCR بهینه شده جهت شناسایی سیانوباکتری‌ها روی نمونه‌های DNA گرفته شده از تالاب انزلی نشان داد که سیانوباکتری‌ها در همه ۲۰ ایستگاه مورد مطالعه حضور دارند. b) به‌کارگیری آزمون PCR بهینه شده جهت شناسایی ژن کدکننده‌ی میکروسیستین نشان داد که از ۲۰ ایستگاه مورد مطالعه، تنها در ۱۰ ایستگاه سیانوباکتری‌های تولید کننده میکروسیستین وجود دارد.

بحث

تعیین حضور سیانوباکتری‌ها و توکسین‌های خطرناک آنها در آب، به عنوان یک مشکل اساسی در جهان مطرح می‌باشد. شکوفایی سیانوباکتری‌ها در آب‌های یوتروفیک، مسایل و مشکلات حیاتی ایجاد می‌کند. به عنوان مثال، برآورد شده است که در رودخانه‌ی آلبرتا یا سایر رودخانه‌های کانادا، ۵۹٪ شکوفایی که در طول تابستان رخ می‌دهد، سمی و خطرناک می‌باشد (۱۲، ۱۷ و ۱۸). علاوه بر این، گزارش شده است که شکوفایی نوعی سیانوفیت (cyanophyte) موسوم به نودولاریا اسپومیگنا (*Nodularia spumigena*) در دریای خزر، باعث تجمع ۴۶ گونه فیتوپلانکتون (Phytoplankton) می‌شود که این پدیده، آثار مخرب جدی در دریا و زیستگاه‌های سایر موجودات، برجای می‌گذارد (۱۹). میکروسیستین با ۶۵ ایزوفرم، شایع‌ترین سیانوتوکسینی می‌باشد که در بین همه‌ی سیانوتوکسین‌ها، بیشترین مطالعات روی آن انجام گرفته است (۲۰). مصرف آب‌های آلوده به این سم، می‌تواند برای سلامت انسان خطرناک باشد (۲۱). به عنوان مثال، در سال ۱۹۹۳، Teixeira و همکاران گزارش کردند که گونه‌های آنابنا و میکروسیستیس در شهر باهیا (Bahia) در برزیل، منجر به مرگ ۸۸ کودک شده است (۲۲).

روش‌های مختلفی برای شناسایی میکروسیستین ارایه شده است ولی هر کدام از این روش‌ها محدودیت‌های خاص خود را دارند (۷، ۸، ۹ و ۲۳). به همین دلیل، روش‌های مولکولی از قبیل PCR جهت شناسایی سیانوباکتری‌ها و ژن‌های کُدکننده‌ی توکسین آنها، از اهمیت بالایی برخودارند (۱۲-۱۰). به عنوان مثال، Rantala و همکاران، فراوانی تولیدکنندگان میکروسیستین در ۷۰ رودخانه‌ی فنلاند را با پرایمرهای اختصاصی mcyE مورد ارزیابی قرار دادند (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، برای نخستین بار یک آزمون PCR بهینه شده برای شناسایی سیانوباکتری‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین در ۲۰ ایستگاه تالاب انزلی طراحی و اجرا گردید. یافته‌های این مطالعه نشان داد که روش PCR بهینه شده، قابلیت شناسایی میکروسیستین در غلظت‌های بسیار پایین سیانوباکتری‌ها را دارد که نشان‌دهنده‌ی حساسیت بالای این روش در مقایسه با سایر روش‌های شناخته شده می‌باشد. همچنین، این روش PCR بهینه شده، اختصاصیت قابل توجهی برای ژن‌های سیانوباکتری‌ها نشان داد، به طوری‌که قادر به شناسایی ژن‌های سایر موجودات نبود. علاوه بر این، در این مطالعه به طور موفقیت آمیزی قطعات ژنی مورد بررسی، کلون شده و برای مطالعات بعدی ذخیره گردید.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]

با به‌کارگیری آزمون PCR بهینه شده روی نمونه‌های گرفته شده از ایستگاه‌های مختلف تالاب انزلی، مشخص گردید که سیانوباکتری‌ها در همه‌ی ایستگاه‌ها و سیانوباکتری‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین در ۱۰ ایستگاه مورد مطالعه وجود دارند. این امر می‌تواند به عنوان علامت خطر جدی محسوب شده و باید توسط سایر دانشمندان و ارگان‌های دولتی مرتبط، مورد توجه قرار گیرد. بر اساس یافته‌های Kurmayer و همکاران، توانایی تولید میکروسیستین توسط یک سیانوباکتری، به وجود ژن‌های mcy در آن بستگی دارد. به عبارتی دیگر، سیانوباکتری‌هایی که قادر به تولید این سم نیستند، فاقد ژن mcy می‌باشند (۲۴). بنابراین، بر اساس یافته‌های این مطالعه، تخمین زده می‌شود که نیمی از نمونه‌های گرفته شده از تالاب حاوی سیانوباکتری‌های فاقد ژن کُدکننده‌ی میکروسیستین هستند.

ژن‌های کُدکننده‌ی میکروسیستین به طور گسترده جهت شناسایی سیانوباکتری‌ها به کار گرفته شده‌اند (۲۵ و ۲۶). در سال ۲۰۱۰، Valerio و همکاران جهت جبران نتایج مثبت کاذب حاصل از تست الایزا، یک آزمون جدید بر پایه‌ی PCR برای شناسایی همزمان سه ناحیه‌ی ژنی mcyA، mcyA-B و mcyB در سویه‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین طراحی کرده و نشان دادند که این روش می‌تواند به عنوان یک ابزار مطمئن برای مونیتورینگ میکروسیستین در نمونه‌های محیطی، به کار گرفته شود (۲۷). پرایمرهای مورد استفاده توسط آنان جهت ناحیه‌ی ژنی mcyA، همان پرایمری بود که در مطالعه‌ی حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

همچنین، Pedro و همکاران، با به‌کارگیری هر دو پرایمر mcyA-Cd1F و mcyA-Cd1R، دریافتند که ۳۳٪ از نمونه‌های آبِ گرفته شده از رودخانه‌ی موزامبیک (Mosambik)، آلوده به سیانوباکتری تولیدکننده‌ی میکروسیستین بوده است (۲۸). حال آنکه، استفاده از پرایمرهای مذکور در این مطالعه، حضور این نوع سیانوباکتری‌ها را در ۵۰٪ نمونه‌های آبِ گرفته شده از تالاب انزلی، آشکار کرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که ممکن است تالاب انزلی در معرض خطر غلبه‌ی سیانوباکتری‌ها بر سایر فلور طبیعی حاضر در اکوسیستم باشد. بنابراین، شناسایی و کنترل این جمعیت میکروبی، امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. به خصوص سویه‌های واجد سم، ضرورت کنترل بیولوژیکی این تالاب را دو چندان می‌نماید. در این مطالعه، با توجه به نتایج آزمون PCR بهینه شده، می‌توان از آن به عنوان یک ابزار کارآمد به منظور مونیتورینگ و کنترل سیانوباکتری‌ها، به خصوص جهت شناسایی سویه‌های تولیدکننده‌ی میکروسیستین در تالاب‌ها و یا سایر منابع آبی، استفاده کرد.

REFERENCES

1. de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJ, Pereira MJ. Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. Ecotoxicol Environ Saf 2004;59(2):151–63.

2. Cheung MY, Liang S, Lee J. Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: a review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. J Microbiol 2013;51(1):1–10.

3. Botes DP, Kruger H, Viljoen CC. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Toxicon 1982;20(6):945–54.

4. Oliveira AC, Magalhaes VF, Soares RM, Azevedo SM. Influence of drinking water composition on quantitation and biological activity of dissolved microcystin (cyanotoxin). Environ Toxicol 2005;20(2):126–30.

5. Dittmann E, Neilan BA, Erhard M, von Dohren H, Borner T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Mol Microbiol 1997;26(4):779–87.

6. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chem Biol 2000; 7(10):753–64.

7. Sangolkar LN, Maske SS, Chakrabarti T. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. Water Res 2006;40(19):3485–96.

8. Zhao H, Qiu J, Fan H, Li A. Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins. J Chromatogr A 2013;1300:159–64.

9. Singh S, Srivastava A, Oh HM, Ahn CY, Choi GG, Asthana RK. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. Toxicon 2012;60(5):878–94.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]

10. Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Borner T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. Arch Microbiol 2003;180(6):402–10.

11. Tillett D, Parker DL, Neilan BA. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (mcyA) of the cyanobacterial genus Microcystis: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. Appl Environ Microbiol 2001;67(6):2810–8.

12. Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, Lepisto L, Rintala J, Mankiewicz-Boczek J, *et al*. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (mcyE) PCR and associations with environmental factors. Appl Environ Microbiol 2006;72(9):6101–10.

13. Kaebernick M, Rohrlack T, Christoffersen K, Neilan BA. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on Daphnia. Environ Microbiol 2001;3(11):669–79.

14. Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, *et al*. Natural variation in the microcystin synthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in Microcystis strains. J Bacteriol 2003;185(9):2774–85.

15. Khatib-Haghighi S, Khodaparast H. Survey of the gram-negaive bacterial pollution in some areas of Anzali Lagoon. J Mar Sci Technol 2011;10(3):57–61.

16. Nubel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl Environ Microbiol 1997;63(8):3327–32.

17. Rolland A, Bird DF, Giani A. Seasonal changes in composition of the cyanobacterial community and the occurrence of hepatotoxic blooms in the eastern townships, Québec, Canada. J Plankton Res 2005;27:683–94.

18. Fortin N, Aranda-Rodriguez R, Jing H, Pick F, Bird D, Greer CW. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. Appl Environ Microbiol 2010;76(15): 5105–12.

19. Nasrollahzade HS, Makhlough A, Pourgholam R, Vahedi F, Qanqermeh A, Foong SY. The study of *Nodularia spumigena* bloom in the southern Caspian sea. Appl Ecol Environ Res 2011;9(2):141–55.

20. Bagu JR, Sonnichsen FD, Williams D, Andersen RJ, Sykes BD, Holmes CF. Comparison of the solution structures of microcystin-LR and motuporin. Nat Struct Biol 1995;2(2):114–6.

21. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, *et al*. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. J Cancer Res Clin Oncol 1992;118(6):420–4.

22. Teixeira Mda G, Costa Mda C, de Carvalho VL, Pereira Mdos S, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. Bull Pan Am Health Organ 1993;27(3):244–53.

23. Zeck A, Weller MG, Niessner R. Multidimensional biochemical detection of microcystins in liquid chromatography. Anal Chem 2001;73(22):5509–17.

24. Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). Microb Ecol 2002;43(1):107–18.

25. Ouellette AJ, Handy SM, Wilhelm SW. Toxic Microcystis is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities. Microb Ecol 2006;51(2):154–65.

26. Schatz D, Eshkol R, Kaplan A. Molecular monitoring of toxic cyanobacteria. Adv Limnol 2000;55:45–54.

27. Valerio E, Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P, Tenreiro R. Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. Environ Toxicol 2010;25(3):251–60.

28. Pedro O, Correia D, Lie E, Skåre JU, Leão J, Neves L, *et al*. Polymerase chain reaction (PCR) detection of the predominant microcystin-producing genotype of cyanobacteria in Mozambican lakes. Afri J Biotechnol 2011;10(83): 19299–308.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-22]