



ارزیابی سمیت سیانوباکترهای جداسازی شده از اکوسیستم مانگرو خور خوران بر لارو میگو

احمد زاهری^{۱،۲}، نیما بهادر^{۳*}، مرتضی یوسف زادی^۳، میترا آرمان^۴

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس

^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

^۴ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۹/۰۵/۱۳

اصلاح: ۹۹/۰۶/۲۳

پذیرش: ۹۹/۰۶/۲۳

کلمات کلیدی:

تنوع زیستی

سیانو باکتری

سیانوتوکسین

مانگرو

تغییرات اقلیمی و مداخلات انسانی موجب روند فزاینده وقوع شکوفایی سیانوباکتریایی مضر در اکوسیستم‌های مانگرو گردیده که می‌تواند به عنوان یک تهدید برای حیات گونه‌های گیاهی و جانوری موجود در این اکوسیستم ارزیابی گردد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی الگوی تنوع زیستی جمعیت‌های سیانوباکتری‌های ساکن در جنگل‌های مانگرو خور خوران و بررسی سمیت سیانوتوکسین‌های استخراج شده بر لارو میگو بود. نتایج جداسازی باکتری‌ها از ۳ ایستگاه نمونه‌برداری آب و رسوب با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت منجر به جداسازی ۱۵۰ جدایه گردید. الگوی تنوع زیستی سیانوباکتری‌ها بر اساس شناسایی مورفولوژیک، حضور ۵ جنس غالب متمایز شامل *Oscillatoria*، *Spirulina*، *Phormidium*، *Anabaena* و *Microcystis* را تأیید نمود. سیانوتوکسین‌های استخراج شده از بیومس سویه‌های ۲A، ۷A و ۱۴C دارای سمیتی با LC_{50} به ترتیب معادل ۱۷۳/۲، ۲۸۳/۱ و ۲۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل آرتمیا بودند. LC_{50} این توکسین‌ها در مقابل لارو میگو به ترتیب معادل ۳۱۰/۳، ۲۹۹/۳ و ۲۳۴/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شد. نتایج ارائه شده بیانگر وجود تنوع بالایی از سیانوباکتری‌ها و حضور سویه‌های توکسیژنیک در منطقه مورد بررسی بود. از این‌رو اجرای برنامه‌های پایش مستمر در زیستگاه‌های مانگرو به ویژه اکوسیستم حفاظت شده خور خوران پیشنهاد می‌گردد.

مقدمه

جنگل‌های مانگرو به عنوان منبع اصلی تأمین‌کننده مواد آلی نقش تعیین‌کننده‌ای در تعادل اکوسیستم‌های ساحلی ایفا می‌نمایند (Soper et al., 2019). این زیستگاه‌ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری سراسر دنیا مشاهده می‌شود و تنوع زیستی آن‌ها می‌تواند حتی از برخی جنگل‌های بارانی گرمسیری نیز بیشتر باشد (Osland et al., 2017; Rastegar and Gozari, 2017). تجمع کربن و مواد مغذی در این اکوسیستم موجب بازسازی بیومس دریایی گردیده و توسعه زنجیره‌های

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: bahador@iaushiraz.ac.ir

غذایی در این اکوسیستم را ممکن ساخته است (Elwin *et al.*, 2019). در نتیجه عملکرد طبیعی این اکوسیستم، گروه‌های مختلف موجودات زنده این محیط را به عنوان زیستگاه انتخاب نموده‌اند.

سیانوباکترها به عنوان گروهی از باکتری‌های گرم منفی فتواتوتروف با انعطاف اکولوژیک بالایی که دارند در طیف گسترده‌ای از شرایط محیطی فعالیت می‌کنند (Ji *et al.*, 2017). این باکتری‌ها به عنوان تولیدکنندگان اصلی در اکوسیستم‌های مانگرو نقش مهمی ایفا می‌نمایند. همچنین نقش آن‌ها در چرخه‌های بیولوژیک عناصر به ویژه تثبیت نیتروژن به خوبی شناخته شده است. میانکنش‌های سیانوباکتری‌ها با سایر موجودات اکوسیستم مانگرو در مطالعات متعددی بررسی شده است. توانایی سیانوباکتری‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع و پیچیده از قبیل سیانوتوکسین‌ها، اثرات آن‌ها را در این میانکنش‌های متقابل تشدید می‌نماید. وقوع پدیده‌هایی مانند شکوفایی سیانوباکتریایی مضر (HCBs) که عمدتاً به صورت فصلی و در نتیجه تکثیر سریع و تجمع سیانوباکترها در یک منطقه ایجاد می‌شود به عنوان یک تهدید بیولوژیک بالقوه برای یک اکوسیستم به شمار می‌رود (Weber *et al.*, 2020). مطالعات اخیر، گسترش فزاینده فراوانی و انتشار جغرافیایی این پدیده را در سراسر دنیا نشان داده است، که اثرات مضر شکوفایی‌های سیانوباکتریایی اغلب می‌تواند به دلیل تولید سیانوتوکسین‌ها باشد (Huisman *et al.*, 2018) که متأسفانه با توجه به مخاطرات احتمالی ناشی از سیانوباکتری‌های توکسیژنیک، مطالعات محدودی در این زمینه به خصوص در اکوسیستم‌های مانگرو انجام شده است.

سیانوتوکسین‌ها دارای ساختار متنوع بوده و تجمع زیستی آن‌ها موجب ایجاد تأثیرات مخرب بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده می‌شود. سمیت‌های پوستی، کبدی و عصبی از انواع مهم سمیت ایجاد شده توسط سیانوتوکسین‌ها هستند (Codd *et al.*, 2016). در این میان تنها بیش از ۷۰ نوع از آنالوگ‌های مختلف میکروسیستین شناسایی شده است. میکروسیستین در بسیاری از موجودات آبی به ویژه در ماهی، صدف و غذاهای دریایی تجمع می‌یابد (Preece *et al.*, 2017). تجمع این سموم در زنجیره‌های غذایی به ویژه در زمان شکوفایی موجب تقویت اثرات نامطلوب آن در اکوسیستم می‌شود (Pham and Utsumi, 2018). در مطالعه‌ی انجام شده توسط Al-Shehri و Mohamed، تنوع و سمیت سیانوباکتری‌ها در سه منطقه مختلف مانگرو در دریای سرخ بررسی شد. آن‌ها در کل ۳۴ گونه متعلق به ۱۵ جنس و پنج خانواده ثبت نمودند که تنها عصاره ۹ گونه در مقابل آرتمیا سالینا سمیتی به میزان $LC_{50}=0.3-5.1 \mu\text{g/ml}$ نشان دادند. همچنین از بین جدایه‌های به دست آمده چهار گونه مولد *Microcystis* و سه گونه حاوی سم ساکسی توکسین بودند (Mohamed and Al-Shehri, 2015).

اکوسیستم مانگرو زیستگاه قابل توجهی از آبزیان تجاری از قبیل میگو می‌باشد. شواهد متعدد بیانگر آن است که اکوسیستم جنگل‌های مانگرو خور خوران به عنوان نوزادگاه یا هجری جمعیت‌های میگو عمل نموده و این جمعیت‌ها بعد از تکثیر به سایر زیستگاه‌ها مهاجرت می‌نمایند. از این‌رو حفاظت از این منطقه در مقابل تهدیدات مختلف از جمله شکوفایی مضر سیانوباکتری‌های سمی ضروری می‌باشد (Mirza *et al.*, 2019) و عدم توجه به تهدیدات زیست محیطی این اکوسیستم حساس می‌تواند امنیت غذایی و بازار این آبی در کشور را دچار اختلال نماید.

منطقه حفاظت شده مانگرو و تالاب بین‌المللی خور خوران تنها منطقه حفاظت شده جنگل‌های مانگرو است که بیشترین تراکم پوشش را دارد. این ذخیره‌گاه بین طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۲۱ دقیقه تا ۵۵ درجه و ۵۰ دقیقه شرقی و ۲۶ درجه و ۴۱ دقیقه تا ۲۶ درجه و ۵۹ دقیقه عرض شمالی قرار دارد (Zahed *et al.*, 2010). بنابراین با توجه به اهمیت این منطقه از بعد تجاری و زیست محیطی هدف از مطالعه حاضر تعیین الگوی تنوع زیستی سیانوباکترهای منطقه مورد مطالعه در اکوسیستم مانگرو خور خوران و بررسی سمیت سیانوتوکسین‌های استخراج شده از آن‌ها بر لارو میگوی *Litopenaeus vanammei* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از آب و رسوبات

در این مطالعه از آب و رسوبات پیرامون ریشه‌های حرا نمونه‌برداری شد و جهت جداسازی سیانوباکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. اگرچه در برخی مطالعات سیانوباکتری‌ها از سایر اندام‌های گیاهان نیز جداسازی شده‌اند اما با توجه به اهداف مطالعه که پایش سویه‌های توکسیژنیک و دارای پتانسیل شکوفایی مضر می‌باشد جداسازی از منابع مذکور صورت گرفت. سه ایستگاه نمونه‌برداری به صورتی انتخاب شد که بیانگر تنوع زیستی منطقه باشد و از هر ایستگاه نمونه آب و رسوبات با سه تکرار جمع‌آوری گردید. مختصات جغرافیایی هر ایستگاه جهت پیاده‌سازی روی نقشه ثبت شد (جدول ۱). نمونه‌های آب در بطری‌های شیشه‌ای قهوه‌ای استریل جمع‌آوری شد. حداقل ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه آب از عمق ۲۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شدند. همچنین ۲۰۰ گرم نمونه رسوبات مانگرو به صورت کاملاً خیس در بسته‌های پلی‌اتیلنی جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌برداری کلیه نمونه‌ها بلافاصله جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند (Gozari et al., 2016a; Stephenson, 1994).

جدول ۱. مختصات و عمق ایستگاه‌های نمونه‌برداری رسوبات و آب

ایستگاه	عمق (متر)	عرض جغرافیایی (شمالی)			عرض جغرافیایی (شرقی)		
		ثانیه	دقیقه	درجه	ثانیه	دقیقه	درجه
۱	۲/۵	۳۴	۱۰	۲۷	۷	۱۹	۵۶
۲	۲/۵	۲۲	۱۰	۲۷	۲۹	۲۰	۵۶
۳	۷/۵	۴۷	۰۴	۲۷	۵۷	۲۳	۵۶

جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها

جداسازی سیانوباکتری‌ها با استفاده از کشت نمونه‌های رقیق‌سازی شده روی محیط BG 11 صورت پذیرفت. بدین منظور رقت‌های متوالی تا رقت 10^{-4} تهیه و از هر رقت ۲۰۰ میکرولیتر با استفاده از روش پخش کردن در سطح محیط کشت تلقیح شد. محیط کشت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور یخچال دار تجهیز شده با لامپ فلورسنت با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس گرماگذاری شدند. نوردهی به صورت متناوب ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. جدایه‌های به دست آمده با استفاده از تکنیک کشت متوالی و بر اساس مشاهدات میکروسکوپی خالص‌سازی شدند (Meriluoto et al., 2017).

شناسایی مورفولوژیک سیانوباکتری‌ها

شناسایی مورفولوژیکی سیانوباکتری‌های جداسازی شده پس از کشت با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد و تاکسونومی بر اساس مورفوتایپ بر پایه Desikachary و همکاران صورت گرفت (Meriluoto et al., 2017). برای مطالعه مورفولوژی ریشه‌ها و سلول‌ها از میکروسکوپ نوری دوربین‌دار شرکت نیکون استفاده شد. در بررسی‌های ریخت‌شناسی و بیومتری، شکل کلنی‌ها و رنگ آن‌ها، ابعاد سلول‌های رویشی و سلول‌های تخصصی مانند هتروسیست‌ها و شکل آن‌ها، شکل سلول انتهایی و وجود یا عدم وجود غلاف مورد بررسی قرار گرفت (Gugger and Hoffmann, 2004). در نهایت الگوی تنوع زیستی سیانوباکتری‌ها در منطقه نمونه‌برداری تعیین شد.

تولید و استخراج متابولیت‌ها از سویه‌های سیانوباکتری

در این مرحله جدایه‌های سیانوباکتری به صورت انبوه در محیط کشت BG11 broth تلقیح و در دمای ۲۸ °C درون انکوباتور یخچال دار تجهیز شده با لامپ فلورسنت با شدت نور متناوب ۲۰۰۰ لوکس گرماگذاری گردید. پس از اتمام دوره گرماگذاری

به مدت ۵ روز، بیومس هر سویه با استفاده از روش فیلتراسیون جمع‌آوری شد. به دنبال آن استخراج متابولیت‌ها با استفاده از حلال متانول انجام شد. متابولیت‌های استخراج شده پس از خشک کردن با دستگاه تبخیر در خلاء برای آزمون‌های بعدی نگهداری شد (Zare et al., 2015).

بررسی تأثیر متابولیت‌های استخراج شده بر لارو آرتمیا

فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده از سیانوباکتری‌های توکسیژنیک با استفاده از روش cytotoxicity method Brine-Shrimp microwell مورد سنجش قرار گرفت (Atta-ur-Rahman, 2001). از سوسپانسیون ناپلی *Artemia franciscana* تهیه شده از شرکت INVE بلژیک (حاوی ۱۰ تا ۱۵ ناپلی در ۱۰۰ μl) به ۱۰۰ μl محلول متابولیت‌های استخراج شده با غلظت نهایی ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ در هر چاهک افزوده شد. پس از گرماگذاری در 25°C به مدت ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده و مرده بر اساس مشاهدات میکروسکوپی ثبت گردید (Gozari et al., 2019). از متانول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نمودار دوز پاسخ هر نمونه با استفاده از برنامه Graphpad prism 6 ترسیم شد.

$$\text{درصد فعالیت سیتوتوکسیک} = [(N_{\text{control}}) - (N_{\text{test}}) / (N_{\text{control}})] \times 100$$

N_{test} : تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار شده

N_{control} : تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشده

بررسی تأثیر توکسین‌های استخراج شده بر لارو میگو

در این آزمون لاروهای میگوی وانامی در مرحله پست لارو ۹ روزه از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان تهیه و در یک تانک ۵ لیتری حاوی ۲ لیتر آب دریا نگهداری شد. سپس ۱۰ عدد لارو به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر آب منتقل شد. توکسین‌های استخراج شده با غلظت‌های نهایی ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ به ارلن‌های محتوی لارو تلقیح شد. میزان مرگ و میر لاروهای مورد آزمون تا ۶ روز بررسی شد و LC_{50} ناشی از توکسین‌های استخراج شده با استفاده از معادله زیر محاسبه شد. این آزمون با سه تکرار انجام شد. عصاره آلی محیط کشت به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Gozari et al., 2016).

$$\text{درصد فعالیت سیتوتوکسیک} = [(N_{\text{control}}) - (N_{\text{test}}) / (N_{\text{control}})] \times 100$$

N_{test} : تعداد لارو زنده در تانک تیمار شده

N_{control} : تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشده

آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گرفت. نتایج جداسازی باکتری‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شد. نتایج بررسی الگوی تنوع زیستی به صورت درصد فراوانی ارائه گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Microsoft Excell 2013 انجام شد (Microsoft, Seattle, WA). جهت بررسی معنادار بودن اختلاف میانگین‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح $p < 0.05$ در نرم افزار SPSS 24 استفاده شد. نتایج سنجش فعالیت ضد جلبکی به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) ارائه شد. LC_{50} در سطوح اطمینان ۹۵٪ به وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار (GraphPad Software, Graphpad prism 6 Inc.) محاسبه شد.

نتایج

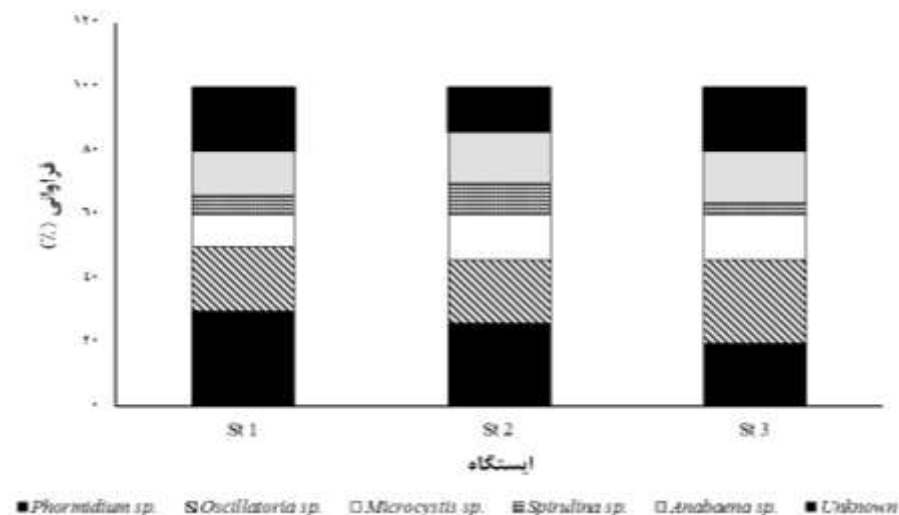
نتایج شناسایی مورفولوژیک سیانوباکتری‌های جداسازی شده از ۳ ایستگاه منتخب واقع در خور خوران تا سطح جنس نشان داد در هر سه ایستگاه نمونه برداری جنس‌های *Anabaena*، *Microcystis*، *Oscillatoria*، *Spirulina*، *Phormidium* و *Anabaena* در ساختار جمعیت سیانوباکتری‌ها غالب بودند. در مجموع ۱۵۰ جدایه سیانوباکتری جداسازی گردید. الگوی به دست آمده بر اساس مشاهدات میکروسکوپی سیانوباکتری‌های موجود ترسیم گردید. مقادیر به دست آمده میانگین درصد فراوانی سیانوباکتری‌های موجود در سه تکرار از نمونه‌های یک ایستگاه می‌باشد (شکل ۱).

نتایج شناسایی مورفولوژیک نشان داد از ۱۵۰ جدایه به دست آمده ۳۸ جدایه متعلق به جنس *Phormidium* بودند که به ترتیب به میزان ۳۰، ۲۶ و ۲۰ درصد از ایستگاه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ جداسازی شدند (شکل ۱). این جدایه‌ها دارای رشته‌های انفرادی به صورت تک و کم و بیش کوتاه بودند. آرایش این رشته‌ها صاف یا نامنظم یا اسکرو لایک (پیچدار) بود. در جدایه‌های مورد بررسی معمولاً تالوس (کلونی سیانوباکتریایی) کم و بیش گسترش یافته و به صورت نازک یا یکدست مشاهده شد و رشته‌ها دارای خمیدگی متفاوت بودند. تصاویر میکروسکوپی نشان داد جدایه‌های متعلق به *Phormidium* ساختار شاخه‌های کاذب نداشت و معمولاً کمی تا قسمتی موجدار با پیچ‌های نامنظم بودند. غلاف‌ها محکم یا نازک، بی‌رنگ، چسبیده به تریکوم و لایه‌بندی نشده مشاهده شد. تریکوم‌ها استوانه‌ای شکل، عمدتاً طویل و دارای ۲/۵ تا ۱۱ میکرومتر پهنا بودند. حداقل یک دیواره عرضی در هر تریکوم مشاهده شد. سلول‌ها به طور معمول کوتاه‌تر یا طولانی‌تر از عرض و بدون آبروتوپ‌ها (خوشه‌های وزیکول‌های گازی) بودند. سلول‌ها توسط شکافت عرضی تقسیم شدند (شکل ۲A).

نتایج نشان داد در میان سیانوباکتری‌های جداسازی شده ۱۹ جدایه متعلق به جنس *Microcystis* بودند که به ترتیب به میزان ۱۰، ۱۴ و ۱۴ درصد از ایستگاه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ جداسازی شدند (شکل ۱). جدایه مشاهده شده دارای کلنی‌های میکروسکوپی نامنظم بود که به صورت شناور آزاد، جمع و جور یا چشمی قرار گرفته بودند. این سلول‌ها به صورت متراکم قرار گرفته و به طور نامنظم سازمان یافته بودند. سلول‌ها دارای موسیلاژ، بی‌رنگ و پراکنده بوده و حاشیه وسیعی را در اطراف خود تشکیل می‌دادند. سلول‌ها پس از تقسیم به صورت کروی یا نیمکره و رنگ آبی مایل به سبز بودند اما به دلیل آبروتوپهایی که رنگ آبی-سبز پروتوپلاست را می‌پوشانند قهوه‌ای مشاهده شدند. اندازه قطر سلول‌ها ۰/۸ تا ۰/۶ میکرومتر بودند (شکل ۲B).

همچنین نتایج بیانگر آن بود که در میان جدایه‌های سیانوباکتری، ۱۰ جدایه متعلق به جنس *Oscillatoria* بودند که به ترتیب به میزان ۶، ۱۰ و ۴ درصد از ایستگاه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ جداسازی شدند (شکل ۱). این رشته‌ها کم و بیش کوتاه، بدون غلاف و ایزوپولار مشاهده شدند.

سلول‌های موجود در تریکوم استوانه‌ای شکل یا کروی بودند و تریکوم‌ها کم و بیش استوانه‌ای، بلند و بعضی اوقات در میان یک دیواره قرار گرفته بودند. تالوس معمولاً مسطح، ماکروسکوپی، صاف، لایه‌بندی شده، به ندرت چرمی مشاهده شد. تریکوم‌ها به



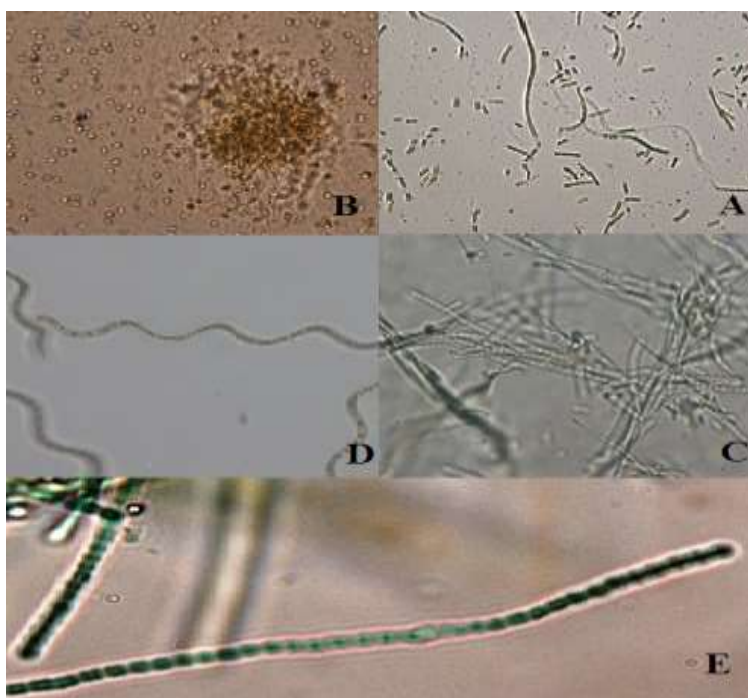
شکل ۱. تنوع زیستی سیانوباکتری‌ها در ایستگاه‌های نمونه برداری شده

طور مستقیم یا کمی نامنظم موجدار، استوانه‌ای، گاهی اوقات در انتها پیچ مانند و معمولاً پهن‌تر از ۷ میکرومتر (حداکثر تا ۷۰ میکرومتر) بودند. غلاف‌ها مشاهده نشدند. سلول‌ها کوتاه و صفحه مانند و همیشه با طول کمتر از نیم تا یک یازدهم از عرض آن‌ها بودند. محتویات سلولی بدون آبروتوپ یکدست بوده و یا گاه گرانول برجسته بزرگی در آن‌ها مشاهده شد (شکل ۲C).

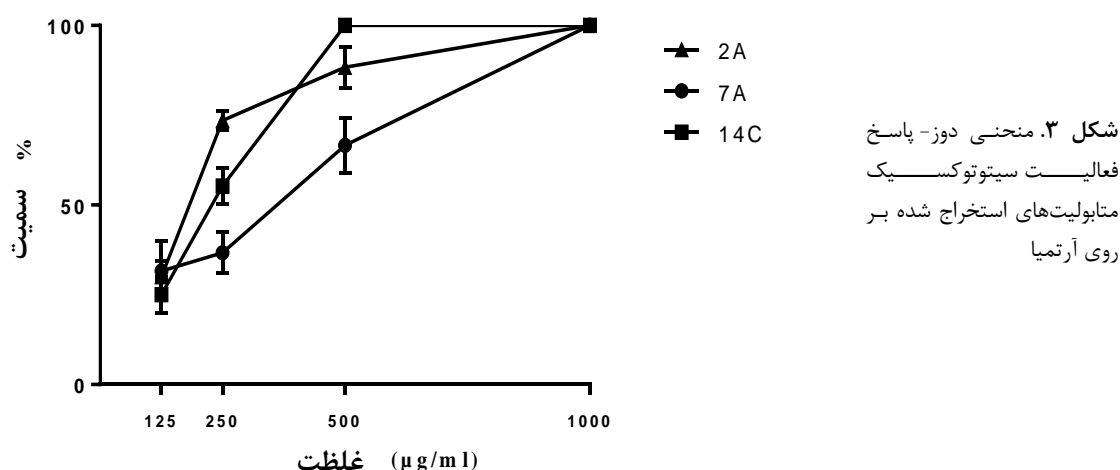
ویژگی‌های مورفولوژیک ۱۰ جدایه به دست آمده بیانگر تعلق آن‌ها به جنس *Spirulina* بود که به ترتیب به میزان ۶، ۱۰ و ۴ درصد از ایستگاه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ جداسازی شدند (شکل ۱). مشاهده پیچ‌های متصل به یکدیگر، تریکوم‌های استوانه‌ای و پیچ‌خورده با عرض ۳/۳ تا ۵/۵ میکرومتر و با طول متغیر تأیید کننده این نتیجه بود. تریکوم‌ها به صورت انفرادی بود و یا مت‌های موسیلاژی تشکیل دادند. رنگ آن‌ها از آبی، سبز تا خاکستری و سبز متغیر بود. پیچ‌ها به صورت‌های مختلف فشرده و یا با فاصله مشاهده شدند. غلاف‌ها یا پوشش‌های موسیلاژی مشاهده شد و دیواره‌های عرضی سلول‌ها به ندرت قابل مشاهده بود. سلول‌ها اکثراً به صورت هم قطر و محتوای آن‌ها به صورت یکدست و بدون آبروتوپ بود (شکل ۲D).

نتایج نشان داد در میان جدایه‌های سیانوباکتری ۲۳ جدایه متعلق به جنس *Anabaena* بودند که به ترتیب به میزان ۱۴، ۱۶ و ۱۶ درصد از ایستگاه‌های شماره ۱، ۲ و ۳ جداسازی شدند (شکل ۱). نتایج شناسایی مورفولوژیک این جدایه‌ها نشان داد تریکوم‌ها به صورت تک و پلانکتونی قرار داشتند. اغلب دارای آبروتوپ بودند. تریکوم‌ها اغلب به صورت مستقیم و در مواردی به صورت منحنی یا پیچ خورده قرار گرفته بودند. تریکوم‌ها به ندرت در دسته‌هایی با رشته‌های موازی‌گرا قرار داشتند. غلاف‌ها مستحکم نبوده و به صورت غلاف‌های موسیلاژی بی‌رنگ مشاهده شدند. دیواره‌های عرضی غیر متمایز و ایزوپلار (دارای دو قطب یکسان) مشاهده شدند. سلول‌ها به صورت بیضی و استوانه‌ای کوتاه یا بلند، خم شده (یکنواخت)، کمرنگ به رنگ آبی روشن - سبز یا زرد - سبز مشاهده شدند. هتروسیست‌ها در بین فواصل قرار گرفته و به صورت انفرادی، در فواصل نسبتاً منظم در امتداد رشته واقع شده بودند. آکینت‌ها کروی، بیضوی، استوانه‌ای، خمیده، بین‌دانه‌ای، انفرادی یا در گروه‌های دو تا پنج تایی، گاهی با رنگ زرد، در برخی از گونه‌های مجاور هتروسیت‌ها مشاهده شد (شکل ۲E).

پس از استخراج متابولیت‌ها از بیومس سیانوباکتریایی جدا شده، سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های آن‌ها در مقابل ناپلی آرتمیا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد سوبه‌های ۲A، ۷A و ۱۴C دارای فعالیت سیتوتوکسیک در مقابل ناپلی آرتمیا بودند. بررسی منحنی دوز پاسخ نشان داد فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده در مقابل ناپلی آرتمیا



شکل ۲. تصویر جدایه‌های سیانوباکتری جداسازی شده؛ (A) جدایه *Phormidium* (B)، *Oscillatoria* (C)، *Microcystis* (D)، *Spirulina* (E).



به صورت وابسته به غلظت است (شکل ۳). همچنین نتایج تعیین LC_{50} نشان داد جدایه‌های ۲A در غلظت ۱۷۳/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به از بین بردن ۵۰ درصد لاروهای آرتمیا بود. این میزان برای ایزوله ۷A معادل ۲۸۳/۱ و برای ایزوله ۱۴C میزان LC_{50} ۲۰۹ تشخیص داده شد (جدول ۲).

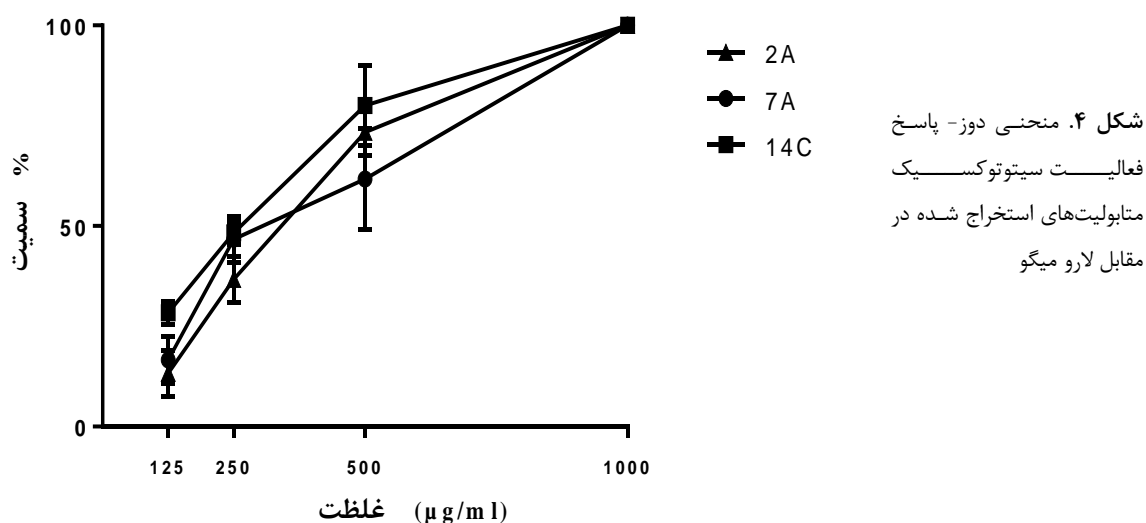
سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده از جدایه‌های مورد بررسی نشان داد سوبه‌های ۲A، ۷A و ۱۴C متعلق به جنس *Microcystis*، لاروهای میگو را از بین بردند. درحالی‌که متابولیت‌های استخراج شده از این ایزوله‌ها دارای اثر کشندگی بر لاروهای مورد بررسی بودند (شکل ۴). بررسی منحنی دوز پاسخ نشان داد این ایزوله‌ها به صورت وابسته به غلظت فعالیت سیتوتوکسیک در مقابل لاروهای میگو نشان دادند و با افزایش غلظت توکسین در آب تعداد بیشتری از میگوها تلف شدند (شکل ۴). نتایج تعیین LC_{50} نشان داد ایزوله ۲A در غلظت ۳۱۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به از بین بردن ۵۰ درصد لاروهای میگو بود. این میزان برای ایزوله ۷A معادل ۲۹۹/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شد. درحالی‌که ایزوله ۱۴C در غلظت ۲۳۴/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیر کشندگی نشان داد (جدول ۳).

جدول ۲. تعیین LC_{50} فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده بر روی لارو آرتمیا

سویه	$LC_{50} \pm SE$ ($\mu\text{g/ml}$)	سطوح اطمینان ۹۵٪
۲A	173.2 ± 8.36	۱۹۱/۸ تا ۱۵۴/۵
۷A	283.1 ± 30.26	۳۵۰/۵ تا ۲۱۵/۶
۱۴C	209.0 ± 11.15	۲۳۳/۸ تا ۱۸۴/۱

جدول ۳. تعیین LC_{50} فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده بر روی لارو میگو

سویه	$LC_{50} \pm SE$ ($\mu\text{g/ml}$)	سطوح اطمینان ۹۵٪
۲A	310.3 ± 14.07	۳۴۱/۷ تا ۲۷۹/۰
۷A	299.3 ± 28.42	۳۶۲/۶ تا ۲۳۶/۰
۱۴C	234.1 ± 16.60	۲۲۶/۶ تا ۲۰۱/۵



شکل ۴. منحنی دوز- پاسخ
فعالیت سیتوتوکسیک
متابولیت‌های استخراج شده در
مقابل لارو میگو

بحث

بررسی تنوع زیستی و پایش سیانوباکتری‌های توکسیژنیک به‌ویژه در اکوسیستم‌های مانگرو حفاظت شده از ابعاد مختلف حائز اهمیت و حیاتی است. با توجه به اهمیت اکوسیستم مانگرو حفاظت شده خور خوران از نظر نقش مهم آن در میزبانی تنوع گسترده‌ای از حیات جانوران و گیاهان به‌ویژه نقش بی‌بدیل آن به عنوان نوزادگاه آبزیان تجاری از قبیل میگو نتایج این مطالعه می‌تواند چشم‌اندازی از وضع موجود را نمایان سازد. با توجه به اینکه سیانوباکترها در طی تکامل قابلیت‌های ویژه‌ای در سازش با تغییرات ژئوشیمیایی و آب و هوایی یافته‌اند و از سوی دیگر پدیده گرمایش جهانی تأثیرگذاری عمیقی بر تنوع زیستی سیانوباکترها داشته است، امکان غلبه آن‌ها را نسبت به سایر فیتوپلانکتون‌ها به‌ویژه در اکوسیستم‌های دریا فراهم خواهد نمود (Paerl and Otten, 2013). از این‌رو پیش بینی می‌شود در آینده با افزایش تصاعدی وقوع پدیده‌های شکوفایی سیانوباکتریایی مضر در محیط‌های دریایی و اکوسیستم‌های مانگرو به ویژه در مناطقی مانند خلیج فارس به دلایل اختصاصات اقلیمی این منطقه باشیم. چنانکه در مطالعات قبلی انجام شده توسط محققین نیز کاهش تنوع زیستی سیانوباکترها و غلبه سیانوباکتری‌های توکسیژنیک گزارش شده است (Richerson et al., 2008).

در مطالعه حاضر ۱۵۰ جدایه سیانوباکتری از آب و رسوبات منطقه مورد مطالعه جداسازی شد. اگرچه مطالعات اندکی در زمینه حضور سیانوباکترها در زیستگاه‌های مانگرو انجام شده است، اما نتایج تعیین الگوی تنوع زیستی سیانوباکتری‌ها در منطقه مورد مطالعه بیانگر حضور غالب پنج جنس *Anabaena*، *Microcystis*، *Oscillatoria*، *Spirulina*، *Phormidium* و *Microcystis* در اغلب ایستگاه‌های نمونه‌برداری بود. سایر مطالعات نیز در زمینه تعیین ساختار جمعیت سیانوباکتری‌ها بیانگر حضور غالب این جنس‌ها بوده است. برای نمونه در مطالعه ایی ۱۵ جنس از ۸ خانواده سیانوباکتری جداسازی شده از جنگل مانگرو در مصب رودخانه مارانها در برزیل شناسایی شد که ۵ جنس متعلق به خانواده *Phormidiaceae*، ۲ جنس از خانواده *Pseudanabaenaceae*، ۲ جنس از خانواده *Synechococcaceae*، ۲ جنس از خانواده *Scytonemataceae* و از خانواده‌های *Chroococcaceae*، *Xenococaceae*، *Oscillatoriaceae* و *Hilaceae* هر کدام یک جنس شناسایی شد (Lopes et al., 2019). در مطالعه دیگری از حاشیه جزیره کاردوسو در جنوب سائوپائولو ۱۹ جنس از سیانوباکتری‌ها گزارش شد که اغلب توالی‌های شناسایی شده به جنس‌های *Nostoc* و *Oscillatoriales* تعلق داشتند. نتایج نشان داد سیانوباکترها در این اکوسیستم جنگلی حرا تحت تأثیر شرایط محیطی قرار داشتند (Rigonato et al., 2012). علاوه بر این در مطالعه دیگری مجموعه‌ای از سیانوباکتری‌ها از *Rhizophora Avicennia germinans* ریشه‌های هوایی و در محل جزر و مد یک جنگل حرا واقع شده در تالاب در حاشیه ساحل شرقی باجا کالیفرنیا شناسایی شدند. در مطالعه مذکور ۲۱ گونه سیانوباکتری جدا شد و مورفوتیپ‌های دو سیانوباکتری *Heteroleibleinia* و *Johanesbaptistia* برای اولین بار در این زیستگاه ثبت شدند (Pérez-

(Estrada et al., 2012). در مطالعه دیگری سیانوباکترهای دریایی از نمونه‌های خاک ریزوسفر جداسازی شدند. در این مطالعه ۳۹ سیانوباکتری متعلق به ۱۲ خانواده از سه جنس مانگرو واقع در جنوب شرقی هند جداسازی و شناسایی شد (Silambarasan et al., 2012). در این مطالعه نیز جنس‌های *Phormidium*، *Oscillatoria* غالب بودند. در مطالعه دیگری (Mohamed and Al-Shehri, 2015) تنوع زیستی سیانوباکترهای تشکیل دهنده مت‌های میکروبی در سطح خاک و پنوماتوفورهای^۱ حرا در سه منطقه مختلف حرا در دریای سرخ در ساحل جنوبی عربستان سعودی مورد بررسی قرار گرفت. در کل ۳۴ گونه متعلق به ۱۵ جنس و پنج خانواده ثبت شد. نتایج، شباهت بالای گونه‌ها به میزان ۶۷/۶ تا ۹۷/۷ درصد بین مناطق مختلف حرا را نشان داد. علاوه بر این ۷ زیستگاه مانگرو در هندوستان از نظر تنوع زیستی سیانوباکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۳۱ گونه سیانوباکتری جدا شده متعلق به ۱۰ جنس و ۴ خانواده بودند. در این میان جنس *Oscillatoria* با حداکثر توزیع شامل ۱۳ گونه شناسایی شد و پس از آن *Nostoc* با ۵ گونه و *Lyngbya* با ۳ گونه ثبت شدند. در این مطالعه از هر کدام از جنس‌های *Aphanocapsa*، *Microcoleus*، *Scytonema* و دو گونه و از جنس‌های *Aphanothece*، *Chroococcus*، *Merismopedia* و *Phormidium* یک گونه شناسایی شد. در اغلب مناطق مانگروی مورد بررسی سه گونه *Oscillatoria* *ornata*، *salina* و *Oscillatoria vizagapatensis* غالب بودند (Ram and Shamina, 2017). میکروارگانیسم‌ها به میزان بالایی تحت تأثیر نوسان دما، شوری، میزان نور و میزان اکسیژن در اکوسیستم مانگرو قرار داشته و ضمن سازش با این شرایط و نوسانات در تنوع زیستی تعادل شیمیایی این اکوسیستم مهم را کنترل می‌نمایند.

در تحقیق حاضر سمیت سیانوباکترهای جداسازی شده با استفاده از بررسی تأثیر آن‌ها بر لارو آرتیمیا مورد سنجش قرار گرفت. از آنجا که استفاده از آرتیمیا یک روش ساده، ارزان، متداول و معتبر در مطالعات سم شناسی و فارماکولوژیک است از آرتیمیا به عنوان شاخصی جهت سنجش سمیت استفاده گردید (Lopes et al., 2010). نتایج مطالعه حاضر نشان داد سوبه‌های ۲A، ۷A و ۱۴C دارای فعالیت سیتوتوکسیک در مقابل آرتیمیا بودند. هر ۳ سوبه دارای سمیت متعلق به جنس *Microcystis* بودند. بررسی منحنی دوز پاسخ نشان داد متابولیت‌های استخراج شده به صورت وابسته به غلظت فعالیت سیتوتوکسیک در مقابل آرتیمیا نشان دادند. همچنین نتایج تعیین LC₅₀ نشان داد جدایه‌های ۲A در غلظت ۱۷۳/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به از بین بردن ۵۰ درصد لاروهای آرتیمیا بود. این میزان برای ایزوله ۷A معادل ۲۸۳/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای ایزوله ۱۴C میزان LC₅₀ ۲۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشخیص داده شد (جدول ۲). در راستای تحقیق انجام شده سایر محققین نیز نشان دادند که عصاره *Geitlerinema* sp. CNP 1019 سمیت بسیار بالایی در مقابل آرتیمیا داشته و LC₅₀ آن معادل ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شده است. امروزه بحث‌های قابل ملاحظه‌ای در زمینه تأثیر سیانوتوکسین‌های دریایی بر آبزیان وجود دارد که به ویژه در مواقع شکوفایی جلبکی بسیار نگران کننده تشخیص داده شده‌اند (Maruthanayagam et al., 2013).

مطالعات مختلف نشان داده است سیانوتوکسین‌ها در مرحله اول در داخل سلول در مرحله رشد نمایی تولید می‌شوند لیکن رها شدن سموم به داخل آب در هنگام مرگ سلولی یا پیری اتفاق می‌افتد. این فرایند می‌تواند ناشی از شرایط تکاملی یا واسطه محیطی مانند آللوپاتی یا محدودیت نسبی و ناگهانی مواد مغذی باشد (Merel et al., 2013). در همین زمینه (Mohamed and Al-Shehri, 2015) نیز در مطالعه خود به بررسی تأثیر سیانوتوکسین‌ها بر آرتیمیا پرداختند. در این مطالعه سمیت سموم سیانوباکتری‌های تشکیل دهنده مت‌های میکروبی در سطح خاک و پنوماتوفور گیاهان مانگرو در دریای سرخ مورد سنجش قرار گرفت. در کل ۳۴ گونه متعلق به ۱۵ جنس و پنج خانواده ثبت شد. عصاره این گونه‌ها در مقابل *Artemia salina* به میزان LC₅₀ معادل ۰/۳ تا ۵/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سمیت نشان دادند. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که این سموم می‌توانند در شبکه‌های غذایی آبزیان در مناطق استوایی به سطوح بالاتر منتقل و تجمع یابند. از این رو در این مطالعه نیز بر وجود سیانوباکتری‌های سمی و سموم آن‌ها در مناطق حرا و مخاطرات احتمالی آن‌ها برای موجودات دریایی تأکید گردید (Jaramillo and O'Shea, 2019).

¹ Pneumatophores

در دومین سطح از بررسی سمیت سیانوتوکسین‌های جداسازی شده تأثیر آن‌ها بر لارو میگو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده از جدایه‌های مورد بررسی نشان داد سویه‌های ۲A، ۷A و ۱۴C لاروهای میگو را از بین بردند. بررسی منحنی دوز پاسخ نشان داد این ایزوله‌ها به صورت وابسته به غلظت فعالیت سیتوتوکسیک در مقابل لاروهای میگو داشته و با افزایش غلظت توکسین در آب تعداد بیشتری از میگوها تلف شدند (شکل ۴). نتایج تعیین LC₅₀ نشان داد ایزوله ۲A در غلظت ۳/۳۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به از بین بردن ۵۰ درصد لاروهای میگو بود. این در حالی است که میزان برای ایزوله ۷A معادل ۳/۲۹۹ و برای ایزوله ۱۴C غلظت ۱/۲۳۴ ثبت گردید (جدول ۳). این نتایج مؤید سمیت سیانوتوکسین‌های استخراج شده در مقابل آرتمیا نیز می‌باشد. اگرچه مطالعات کمی در زمینه تأثیرات سیانوتوکسین‌ها بر لارو میگو انجام شده است اما اثرات حاد، مزمن، تغییرات بیوشیمیایی و رفتاری متنوعی گزارش شده است. به دلیل پیامدهای مخاطره‌آمیز تجمع زیستی و انتقال این سموم از طریق زنجیره غذایی تحقیقات اخیر بر این موضوع متمرکز شده‌اند. در همین زمینه یک مطالعه نشان داد در مناطق حاره‌ای سموم تولید شده در نتیجه شکوفایی جلبکی به میزان بیشتری تجمع یافته و پایدار می‌مانند. پیش بینی شده که تجمع زیستی این سموم به سطوح غذایی بالاتر منتقل شده و می‌تواند مخاطرات شدیدی برای سلامت انسان داشته باشد (Ferrão-Filho and Kozłowsky-Suzuki, 2011). از این رو با توجه به اثبات سمیت سیانوتوکسین‌های استخراج شده بر لارو میگو در مطالعه حاضر و امکان شکوفایی سیانوباکتری‌های جداسازی شده از خور خوران احتمال متأثر شدن لاروهای میگوی این منطقه به عنوان نوزادگاه بخشی از میگوهای منطقه وجود دارد. در صورت وقوع این پدیده خطرات جبران ناپذیر اقتصادی و اکولوژیک در منطقه ساحلی ایجاد خواهد شد. ورود *Microcystis* به چرخه غذایی ماهیان پلانکتون خوار ۳/۵ برابر ماهیان ژئوپلانکتون خوار است. برای نمونه این سم در کبد ماهی *Osmerus eperlanus* به میزان ۸۷۴ میکروگرم بر گرم ثبت شد (Ibelings et al., 2005). از سوی دیگر سیانوتوکسین‌های تولید شده خطری بالقوه برای سایر بی‌مهرگان از جمله صدف‌ها را ایجاد می‌نماید. با توجه به پالیده خواری صدف‌ها از طریق فیلتر کردن آب، بخشی از توکسین‌های تولید شده جذب بافت صدف گردیده و برای مصرف کنندگان این آبی مخاطره‌آمیز خواهد بود.

در مجموع مطالعه حاضر از جنبه‌های اکولوژیک، اقتصادی و امنیت غذایی دارای اهمیت می‌باشد. این مطالعه درک جدیدی از ارزیابی سمیت سیانوباکتری‌های جداسازی شده از اکوسیستم مانگرو خورخوران در مقابل لارو میگو ایجاد نمود. بخش قابل توجهی از میگوهای موجود در ذخایر اصلی صید میگو در منطقه شمال خلیج فارس در مرحله نوزادگاهی در این اکوسیستم دوران نوزادگاهی خود را گذرانده و پس از طی مراحل لاروی اقدام به مهاجرت می‌نمایند. تجزیه سلول‌های سیانوباکتری‌های توکسیژنیک در این منطقه می‌تواند عوارض و آسیب‌هایی را به این اکوسیستم تحمیل نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله پژوهشی بخشی از پایان نامه با عنوان "ارزیابی الگوی تنوع زیستی، ردیابی ژنتیکی و فعالیت سیتوتوکسیک سیانوتوکسین‌های سیانوباکتری‌های جدا شده از جنگل‌های مانگرو بندر خمیر" می‌باشد.

منابع

- Atta-ur-Rahman, C.M., Thomsen, W.J. 2001. Bioassay Techniques for Drug Development, Harwood Academic Publishers, Australia.
- Codd, G.A., Meriluoto, J., Metcalf, J.S. 2016. Introduction: Cyanobacteria, cyanotoxins, their human impact, and risk management. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Wiley Online Library. pp. 1-8.
- Elwin, A., Bukoski, J.J., Jintana, V., Robinson, E.J., Clark, J.M. 2019. Preservation and recovery of mangrove ecosystem carbon stocks in abandoned shrimp ponds. Scientific Reports. 9(1): 1-10.
- Ferrão-Filho, A.D.S., Kozłowsky-Suzuki, B. 2011. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. Marine Drugs. 9(12): 2729-2772.

- Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A.R., Mortazavi, M.S., Hamzehei, S., Eftekhari, E. 2019. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the Oman Sea sediments. *Acta Oceanologica Sinica*. 38(12): 84-90.
- Gozari, M., Mortazavi, M., Bahador, N., Rabbaniha, M. 2016. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 15(2): 630-644.
- Gozari, M., Mortazavi, M., Ebrahimi, M., Dehghani, R. 2016b. Isolation, Identification and Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 25(1): 81-94.
- Gugger, M.F., Hoffmann, L. 2004. Polyphyly of true branching cyanobacteria (*Stigonematales*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(2): 349-357.
- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M., Visser, P.M. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*. 16(8): 471-483.
- Ibelings, B.W., Bruning, K., De Jonge, J., Wolfstein, K., Pires, L.D., Postma, J., Burger, T. 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology*. 49(4): 487-500.
- Jaramillo, M., O'Shea, K.E. 2019. Analytical methods for assessment of cyanotoxin contamination in drinking water sources. *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 7: 45-51.
- Ji, X., Verspagen, J.M., Stomp, M., Huisman, J. 2017. Competition between cyanobacteria and green algae at low versus elevated CO₂: who will win, and why? *Journal of Experimental Botany*. 68(14): 3815-3828.
- Lopes, V., Costa, P., Rosa, R. 2019. Effects of Harmful Algal Bloom Toxins on Marine Organisms. *Ecotoxicology of Marine Organisms*. CRC Press. pp. 42-88.
- Lopes, V.R., Fernandez, N., Martins, R.F., Vasconcelos, V. 2010. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: Toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine Drugs*. 8(3): 471-482.
- Maruthanayagam, V., Nagarajan, M., Sundararaman, M. 2013. Cytotoxicity assessment of cultivable marine cyanobacterial extracts in *Artemia salina* (brine shrimp) larvae and cancer cell lines. *Toxin Reviews*. 32(1): 1-9.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*. 59: 303-327.
- Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. 2017. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. John Wiley & Sons.
- Mirza, R., Moeinaddini, M., Pourebrahim, S., Zahed, M.A. 2019. Contamination, ecological risk and source identification of metals by multivariate analysis in surface sediments of the khouran Straits, the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*. 145: 526-535.
- Mohamed, Z.A., Al-Shehri, A.M. 2015. Biodiversity and toxin production of cyanobacteria in mangrove swamps in the Red Sea off the southern coast of Saudi Arabia. *Botanica Marina*. 58(1): 23-34.
- Osland, M.J., Feher, L.C., Griffith, K.T., Cavanaugh, K.C., Enwright, N.M., Day, R.H., Stagg, C.L., Krauss, K.W., Howard, R.J., Grace, J.B. 2017. Climatic controls on the global distribution, abundance, and species richness of mangrove forests. *Ecological Monographs*. 87(2): 341-359.
- Pérez-Estrada, C.J., León-Tejera, H., Serviere-Zaragoza, E. 2012. Cyanobacteria and macroalgae from an arid environment mangrove on the east coast of the Baja California Peninsula. *Botanica Marina*. 55(2): 187-196.
- Pham, T.-L., Utsumi, M. 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Management*. 213: 520-529.
- Preece, E.P., Hardy, F.J., Moore, B.C., Bryan, M. 2017. A review of microcystin detections in estuarine and marine waters: environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*. 61: 31-45.
- Ram, A.T., Shamina, M. 2017. Cyanobacterial diversity from seven mangrove environments of Kerala, India. *World News of Natural Sciences*. 9: 91-97.
- Rastegar, S., Gozari, M. 2017. Effect of mangrove plant extract on growth of four fungal pathogens. *Journal of Paramedical Sciences*. 8: 2008-4978.

- Richerson, P.J., Suchanek, T.H., Zierenberg, R.A., Osleger, D.A., Heyvaert, A.C., Slotton, D.G., Eagles-Smith, C.A., Vaughn, C.E. 2008. Anthropogenic stressors and changes in the Clear Lake ecosystem as recorded in sediment cores. *Ecological Applications*. 18(sp8): A257-A283.
- Rigonato, J., Alvarenga, D.O., Andreote, F.D., Dias, A.C.F., Melo, I.S., Kent, A., Fiore, M.F. 2012. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. *FEMS Microbiology Ecology*. 80(2): 312-322.
- Silambarasan, G., Ramanathan, T., Kathiresan, K. 2012. Diversity of marine cyanobacteria from three mangrove environment in Tamil Nadu Coast, south east coast of India. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 4(3): 235-238.
- Soper, F.M., MacKenzie, R.A., Sharma, S., Cole, T.G., Litton, C.M., Sparks, J.P. 2019. Non-native mangroves support carbon storage, sediment carbon burial, and accretion of coastal ecosystems. *Global Change Biology*. 25(12): 4315-4326.
- Stephenson, G.L. 1994. Guidance Document on Collection and Preparation of Sediments for Physicochemical Characterization and Biological Testing. Vol. 29. Environment Canada.
- Weber, S.J., Mishra, D.R., Wilde, S.B., Kramer, E. 2020. Risks for cyanobacterial harmful algal blooms due to land management and climate interactions. *Science of The Total Environment*. 703: 1-14.
- Zahed, M.A., Rouhani, F., Mohajeri, S., Bateni, F., Mohajeri, L. 2010. An overview of Iranian mangrove ecosystems, northern part of the Persian Gulf and Oman Sea. *Acta Ecologica Sinica*. 30(4): 240-244.
- Zare, M., Bahador, N., Salehi, M.B. 2015. Isolation of cyanobacteria producing saxitoxin from Kor River located in Marvdasht, Fars Province, Iran. *International Journal of Life Sciences*. 9(5): 54-57.