



مجله زیست‌شناسی کاربردی

بهار ۱۴۰۰

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

سردبیر: دکتر محمدرضا صعودی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

مدیر مسئول: دکتر مهوش سیفعلی، استادیار دانشگاه الزهرا (س)

دبیر تخصصی: دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

اعضای هیأت تحریریه

دکتر مهناز اقدسی، دانشیار دانشگاه گلستان

دکتر نرگس حسینمردی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

دکتر فرشاد درویشی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر عدرا صبورا، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)

دکتر زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران

دکتر تورج ولی نسب پوری، استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

اعضای هیأت تحریریه بین‌المللی

دکتر حسین رجایی، استاد موزه تحقیقات جانورشناسی الکساندر کونینگ آلمان

دکتر شهرام شهابی، استاد، مدیر پژوهش کمپانی داروسازی هایلند و عضو هیات علمی وابسته کالج پزشکی

نچروپاتی ساوت وست

مدیر اجرایی: شهربانو برجیان

ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)

ویراستار: خانم معصومه اصلانزاده

چاپ و صحافی: انتشارات دانشنگاران اوج

ترتیب و انتشار: فصلنامه

شمارگان: ۱۰ نسخه

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

این فصلنامه علمی - پژوهشی با مجوز شماره ۵۲۴۷۴ / ۸۹/۳/۱۱ - در تاریخ ۸۹/۹/۸ منتشر می‌گردد.

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست‌شناسی ایران منتشر می‌شود.

این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می‌شود: www.Isc.gov.ir

نشانی: تهران، ونک، ده ونک، دانشگاه الزهرا (س) معاونت پژوهشی، کد پستی ۱۹۹۳۸۹۱۱۷۶. تلفن و نمابر: ۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir

راهنمای تدوین و شرایط پذیرش مقاله‌ها

هدف

مجله تخصصی زیست‌شناسی کاربردی با نام انگلیسی Applied Biology، نشریه علمی-پژوهشی وابسته به دانشگاه الزهراء، به منظور انتشار نتایج پژوهش‌ها، افزایش آگاهی و ترویج دانش تخصصی در زمینه علوم کاربردی سالی ۴ بار منتشر می‌شود.

موضوعات مرتبط با مجله

مجله مقالاتی را که نتیجه‌ی تحقیقات در زمینه‌ی زیست‌شناسی کاربردی است پس از داوری دقیق به صورت "مقاله کامل" به چاپ می‌رساند.

قوانین نشر

- مقالات ارسال شده به مجله، نباید قبلاً در سایر مجلات چاپ و یا همزمان به مجلات دیگر ارسال شده باشد. مقالاتی که فقط چکیده‌ی آنها در مجامع علمی داخلی و خارجی ارائه و چاپ شده‌اند، مستثنی هستند.
- مقالات باید دارای متن کامل فارسی و خلاصه انگلیسی باشند.
- اعضای هیئت تحریریه در پذیرش، عدم پذیرش یا هر گونه ویرایش مقاله، اختیار کامل دارند.
- مسئولیت علمی مطالب ارائه شده، به عهده نگارنده (گان) مقاله می‌باشد.
- اسامی نگارندگان می‌تواند تحت نظر نویسنده مسئول تغییر کند.
- مقالاتی که مطابق راهنمای نگارش مقاله تهیه نشوند، به نگارندگان عودت داده می‌شوند.
- مقالات دریافت شده پس از داوری توسط داوران تخصصی و پذیرش علمی از سوی اعضای هیئت تحریریه، با رعایت نوبت به چاپ می‌رسند.

پیش از ارسال مقاله حتماً به نکات زیر توجه فرمایید:

- مقاله به زبان فارسی پذیرفته خواهد شد.
- مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله (<http://jab.alzahra.ac.ir>) به دبیرخانه ارسال شود. مقالاتی که از طریق به جز سایت ارسال شوند، در جلسه هیئت تحریریه بررسی نخواهند شد. تمامی مراحل داوری نیز از طریق سایت مجله قابل پیگیری است.
- نگارندگان همزمان با ارسال مقاله، فرم تعهدنامه را در سایت مجله، تکمیل و پس از امضای تمام نگارندگان و اسکن فرم، آن را به همراه مقاله از طریق سایت مجله ارسال نمایند.
- در مقاله‌های ارسالی باید تمامی نکات مربوط به شیوه صحیح نگارش از جمله اصول نقطه‌گذاری، رسم جدول، شکل، نوشتن منابع و... به دقت رعایت شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی باشد، این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد (استادان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.
- به دانشجویان محترم توصیه می‌شود پیش از ارسال مقاله، از استاد راهنمای خود تقاضا نمایند که آن را مطالعه و کاستی‌های آن را رفع نمایند.
- در متن مقاله، اعداد صفر تا نه به حروف و اعداد ۱۰ به بالا به عدد نوشته شوند (به استثنای اعداد جداول، شکل‌ها، شماره منابع و شماره‌گذاری فرمول‌ها).
- در متن مقاله، علامت % با کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جدول‌ها و شکل‌ها که علامت % در سمت چپ اعداد قرار گیرد).
- در متن مقاله (به جز جداول، شکل‌ها و چکیده‌ی انگلیسی که بر اساس سال میلادی بیان می‌شوند)، اسال شمسی برای مقالات فارسی و سال میلادی برای مقالات انگلیسی بیان شوند.
- اسامی علمی (از جمله نام گیاهان، جانوران، میکروارگانیسم‌ها) باید بر اساس سیستم دوفامی طبق جدیدترین طبقه‌بندی‌های

سیستماتیکی و با حروف ایتالیک نوشته شوند. این اسامی در عنوان و چکیده بدون ذکر نام‌گذار (author) درج شوند، اما در متن، آنجا که برای اولین بار ذکر می‌شود، همراه ذکر مخفف نام‌گذار (به عنوان مثال. L به معنی Linnaeus) و به صورت غیر ایتالیک نوشته شوند و در صورت تکرار در متن، دیگر به نام‌گذار اشاره نشود. اسم نام‌گذار باید طبق استانداردهای مربوطه نوشته شود.

- میان کلمه و نقطه (.)، کاما (،)، علامت سوال (؟) و پرانتز () فاصله نباشد و بعد از این علامت‌ها یک فاصله (Space) منظور شود.

- در نگارش مقاله تا حد امکان، از واژه‌های فارسی استفاده شود.

در موارد ضروری، اصطلاح خارجی در متن مقاله به زبان فارسی نگاشته و خواننده به زیرنویس (Footnote) صفحه که واژه مورد نظر به زبان اصلی نوشته شده، هدایت شود. عدد هر زیرنویس در قسمت بالا و سمت چپ زیرنویس مربوطه و با قلم Times New Roman نازک درج شود. اعداد زیرنویس در هر صفحه از عدد ۱ آغاز شوند.

- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003). در صورتی که منبع مورد استفاده دو نگارنده داشته باشد، نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (Kells & Tharp, 2001). در منابع با بیش از دو نگارنده، تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه et al. و سپس سال انتشار ذکر شود (Fernandes et al., 2001). در متن مقاله می‌توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به عنوان مثال، پتراک (1953 Petrak)، معتقد است..... و یا به اعتقاد شیمی و همکارا (Shimi et al., 2005).

- *et al.* واژه‌ای لاتینی است و حتما باید ایتالیک و به نقطه ختم شود.

- متن مقاله با نرم افزار Microsoft Word 2007 و با پسوند *.doc تهیه شود.

- مقاله به صورت الکترونیک روی کاغذ سفید به ابعاد ۲۹/۷ × ۲۱ سانتی‌متر (A4) با حاشیه ۲/۵ سانتی‌متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (به جز جداول، شکل‌ها و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم شماره گذاری شود و در هر صفحه شماره خط نوشته شود.

- تعداد صفحات قابل قبول مقاله، حداکثر ۱۵ صفحه می‌باشد. شماره هر صفحه در وسط و پایین صفحه و با قلم نازنین معمولی و فونت ۱۲ باشد.

- قلم فارسی مورد استفاده، نازنین و قلم انگلیسی Times New Roman باشد. منظور از قلم توپر، Bold و قلم نازک، غیر Bold است.

- اندازه قلم انگلیسی در تمام موارد، دو سایز از قلم فارسی کوچکتر است.

- ابتدای هر پاراگراف به صورت تورفته (Indent) به اندازه ۱/۲۷ سانتی‌متر باشد.

تدوین مقاله با شرح جزییات

- عناوین (اختیاری)، منابع و Abstract انگلیسی.

- عناوین اصلی فارسی: راست چین، ۱۴ توپر، انگلیسی: چپ چین، ۱۲ توپر

- پس از عناوین اصلی، نیازی به استفاده از دو نقطه (:) نیست. مانند مقدمه (نه مقدمه:).

- سایر عناوین، عناوین درجه دوم و سوم محسوب می‌شوند.

- پس از عناوین اصلی و درجه دوم، ادامه متن از سطر جدید آغاز شود. اما عناوین درجه سوم، با دو نقطه (:) از مطلب جدا شوند.

اصلی به ترتیب: چکیده، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث (با هم)، نتیجه‌گیری کلی، سپاسگزاری

- تمام عناوین اعم از اصلی، درجه دوم و سوم، توپر باشند.

۱- عنوان مقاله: فارسی: وسط چین، ۱۴ نازنین توپر، انگلیسی: وسط چین، Times new Roman ۱۲ توپر

۲- نام نگارندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ توپر، با ویرگول از هم جدا شوند. شماره هر نگارنده، ۱۱ توپر در سمت چپ و بالای

نام خانوادگی (به صورت superscript)، درج علامت ستاره (*) در سمت راست و بالای (superscript) نام نگارنده مسئول

مکاتبه، انگلیسی: ۹ توپر با ویرگول از هم جدا شوند. قبل از آخرین نگارنده از حرف ربط and استفاده شود. شماره هر نگارنده در سمت چپ و بالای نام خانوادگی (به صورت superscript)،

۳- آدرس نویسندگان: فارسی: وسط چین، ۱۱ نازک، انگلیسی: وسط چین، ۹ نازک در پاورقی

۴- چکیده: فارسی: ۱۲ نازک و ایتالیک تنها در یک پاراگراف، حداکثر ۳۰۰ تا ۳۰۰ کلمه، فاقد علائم اختصاری مبهم. پس از ذکر اهمیت موضوع در یک سطر، اشاره‌ای به اهمیت پژوهش، روش و نتایج شود. انگلیسی (Abstract): ۱۲ نازک و تنها در یک پاراگراف، ترجمه دقیق و علمی چکیده فارسی، فاقد علائم اختصاری مبهم.

۵- واژه‌های کلیدی: فارسی: (۱۲ توپر و ایتالیک)، انگلیسی (Key words): (۱۰ توپر).

- واژه‌های کلیدی فارسی و انگلیسی، به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.

۶- مقدمه: ۱۲ معمولی، محتوی بررسی منابع کامل با تاکید به آن موضوع خاص و با استناد به جدیدترین منابع، اشاره دقیق به اهمیت تحقیق و هدف بررسی.

۷- مواد و روش‌ها: ۱۲ معمولی، توضیح دقیق مواد و روش‌ها از جمله محل و سال اجرای تحقیق، محل جمع آوری نمونه، شرح دقیق روش کار. در صورت استفاده از روش‌های متداول، نیازی به ذکر کامل روش نیست و تنها به منبع مورد استفاده اشاره شود.

۸- نتایج و بحث: ۱۲ معمولی، به جدیدترین منابع مرتبط با آن موضوع اشاره شود. تحلیل کاملی از نتایج، انجام و نتایج حاصل از آزمایش با نتایج سایر پژوهش‌ها مقایسه شود.

- برای بیان اوزان و مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.

- نکات ضروری برای تهیه جداول و شکل‌ها

- استفاده از جدول و شکل تنها هنگامی مجاز است که نتوان اطلاعات به‌دست آمده (نتیجه) را به‌راحتی بیان کرد.

عنوان جدول و شکل باید گویا باشد به نحوی که نیاز به مراجعه به متن مقاله نباشد. علائم اختصاری یا زیرنویس‌ها در پایین جدول یا شکل معرفی شوند.

- داده‌ها یا بصورت جدول و یا شکل نمایش داده شوند، یعنی داده‌هایی نباشند که به هر دو صورت شکل و جدول ارائه شوند.

- شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند، بصورت سیاه و سفید، با بافت ساده طراحی و شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند، بدون سایه و با کیفیت بالا، ارسال شوند.

- در هر قسمت که به یک جدول یا شکل اشاره می‌شود، حتی المقدور بلافاصله ارائه شوند و ارائه آنها به صفحات بعد موکول نشود.

- ابعاد جدول یا شکل طوری تنظیم شود که حداکثر در یک صفحه مجله جا بگیرد.

- جدول با ۳ خط افقی رسم شود. (دو خط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول) و بقیه‌ی خطوط عمودی و افقی غیر فعال شوند.

- تمامی اعداد و متن درون جداول و شکل‌ها، انگلیسی (وسط چین، ۱۰ نازک) باشد. اعداد در صورت اعشاری بودن، تنها تا دو رقم اعشار ادامه داشته باشد.

- عنوان جدول (در بالای جدول) و شکل (در پایین شکل) به زبان فارسی باشد. عنوان وسط چین ۱۱ توپر (Bold)

- زیرنویس و علائم اختصاری زیر جداول و شکل‌ها، فارسی نازنین ۸ نازک باشد.

- شکل‌ها در جای مناسب در متن ارائه شود.

- کادر اطراف شکل‌ها حذف شود.

۹- سپاسگزاری: اختیاری است، نازنین ۱۲ معمولی.

۱۰- منابع: ۱۲ معمولی.

- تمام منابع پایان مقاله، بدون شماره باشند، بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشند.

- عنوان مجله‌ها کامل نوشته شوند.

(برای استفاده از نام‌های اختصاری استاندارد یا کامل مجلات علمی، به سامانه مجلات مربوطه مراجعه شود .

- بین حروف اختصاری نام‌های اول یک نگارنده، فاصله نباشد (مثال: A.D.C).

- برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده‌اند، به جای ذکر سال، از عبارت *under publishing* استفاده شود.

- بر حسب نوع منبع، فقط مطابق الگوی زیر عمل و حتماً به علائم جداکننده و ویرایشی توجه شود.

نشریات

الف) با یک نویسنده: نام خانوادگی، نام (ها). (سال انتشار) عنوان مقاله. عنوان نشریه، جلد (شماره): شماره صفحات.

Wilson, R.G.J. (1981) Weed control in established dryland Alfalfa (*Medicago sativa*). Weed science 29: 615-618.

ب) با دو نویسنده:

Pline, W.A. and Wilcut, J.W. (2007) Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Agriculture Food and Chemistry 50: 506-512.

ج) با بیش از دو نویسنده: مشابه بالاست، جز این که بعد از نام کوچک نویسنده اول، ویرگول بیاید.

Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998) Weed control in established Alfalfa (*Medicago sativa*) with posremergnce herbicides. Weed Technology 3: 424-428.

کتاب

الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار) نام کتاب. ناشر، تعداد صفحات.

ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار)، نام کتاب، ذکر تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات و سپس Pp که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک استو سپس شهر محل انتشار.

Ahrens, W.H. (1994) Herbicide Handbook. 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America Pp 224 . los Angeles.

ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، طریقه‌ی نوشتن نویسندگان آن، مشابه نشریات خواهد بود.

-مقاله‌ای در یک کتاب: نام خانوادگی، نام (ها) (سال انتشار) نام مقاله مورد نظر. تعداد صفحات مقاله، عنوان کتاب. ناشر

(کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ).

Baver, L.D. and Gardner, W.H. (1972) Flow in stratified soil systems. Pages 343-345 in Baver LD, ed. Soil Physics New York: Academic Press.

- خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی: نام خانوادگی، نام (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه)، شهر، کشور.

Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005) Effect of extracts of Persian and Berseem clover on – peroxidase activity of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) hypocotyl. Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, 21-26 August, Wagga Wagga, Australia.

-گزارش علمی مستخرج از طرح تحقیقاتی: نام خانوادگی، نام، سال انتشار، عنوان پروژه تحقیقاتی. ذکر سالیانه یا نهایی بودن گزارش، نام موسسه تحقیقاتی، تعداد صفحات.

Shimi, P. (2003) Management of *Cynanchum acutum* in apple orchard. Final Report. Iranian Research Institute of Plant Protection 25 Pp.

-منابع بی‌نام: بهتر است این منابع استفاده نشود اما اگر اجتناب ناپذیر بود به صورت زیر عمل شود:

بی‌نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

Anonymous, (2001) Project Summary Comparative Genomics of Domestication Traits in Lettuce and Sunflower. <http://veghome.ucdavis.edu/faculty/michelmore/projectssummary.htm>. Accessed August 23, 2001.

-استفاده از سایت اینترنتی: نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت که به واژه htm ختم شود.

تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

Agriculture and Agri-Food Canada.(1999) Market and Industry Services Branch, Horticulture and Special Crops Division. http://www.Agr.ca/misb/spcrops/bean_e.html. Accessed: January 29, 2001.

- وقتی مقاله‌ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.
- در پایان نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که براساس راهنمای حاضر تهیه شده و در سایت مجله موجود است به عنوان الگو استفاده نمایند.

مقایسه ریخت‌شناسی گونه‌های جنس *Cobitis* در آب‌های داخلی ایران با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی
سپهیل ایگدری، عطا مولودی صالح ۹

بررسی فیتوشیمیایی سرخس عقابی (*Pteridium aquilinum*) در گرادیان ارتفاعی ماسال استان گیلان
رضا تمرتاش، محمدرضا طاطیان، هانیه اندرزچمنی، سید حسن زالی، سیده محدثه احسانی ۲۱

تأثیر عوامل اکولوژیکی و ادافیکی بر مواد مؤثره‌ی گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major L.*)
ناصر جعفری، مهدیه فغانی پنبه زاری، اباصلت حسین زاده کلاگر، محمدعلی ابراهیم زاده ۳۸

بهینه‌سازی شرایط تولید اگزوپلی ساکارید توسط لوکونوستوک دکسترانیکوم جدا شده از پنیر سنتی سوریه
مهند حاج مصطفی، بسام العقلة، قاسم عاشوری ۵۶

تفاوت‌های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در جوانه‌زنی و سبز شدن بذر سه گونه هفت‌بند (*Polygonum*)
مرجان دیانت ۷۲

ارزیابی سلامت رودخانه کارده با استفاده از شاخص‌های زیستی و جوامع ماکروبنتوز
سمیه سرگلزایی، آریتا فراشی، امید صفری، حمیدرضا احمدنایای مطلق ۹۳

ارزیابی رفتار شناگری و ترجیحات رنگی در ماهی زبرا بالغ (*Danio rerio*) با استفاده از مدل T-maze
سعید شفیعی ثابت، شقایق جامی، فاطمه علیزاده لادمخی ۱۱۰

جداسازی مخمر با ویژگی‌های پروبیوتیکی از پوست انسان
محدثه غفاری، فرشاد درویشی، سنبل ناظری ۱۲۹

سنتز نانو ذرات متخلخل اکسید آهن و بررسی اثرات زیستی آن بر روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های لوسمی
میلونیدی مزن (K۵۶۲)

معصومه محرایی، محمد فائزی قاسمی، بهنام راستی، مجتبی فلاحتی، امیر میرزایی ۱۴۸

حذف زیستی اورانیوم از محلول های آبی توسط جاذب زیستی تیمار شده به عنوان یک استراتژی کارآمد در زیست
پالایی اورانیوم

نساء نامداریان ، پریسا تاجرمحمد قزوینی، اکرم سادات طباطبایی بفرویی ۱۶۳

مقایسه ریخت‌شناسی گونه‌های جنس *Cobitis* در آب‌های داخلی ایران با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی

سهیل ایگدري^{۱*}، عطا مولودی صالح^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۲۷

چکیده

این مطالعه با هدف یافتن صفات ریختی برای تفکیک گونه‌های جنس *Cobitis* در ایران با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد. برای این منظور تعداد ۶۵ قطعه از رودخانه‌های سفیدرود (*C. saniae*)، سیاه (*C. faridpaki*)، ملوسجان (*C. linea*) و گاماسیاب (*C. avicennae*) توسط الکتروشوک‌ر صید و برای استخراج داده‌های حاصل از شکل بدن بر روی عکس‌های گرفته شده در نرم‌افزار *tpsDig2* تعداد ۱۴ نقطه لندمارک تعریف و رقومی سازی شد. داده‌های حاصل پس از آنالیز پروکراست با استفاده از آنالیزهای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (*PCA*)، آزمون واریانس چندمتغیره تجزیه همبستگی کانونی (*MANOVA/CVA*) و آنالیز خوشه‌ای (*CA*) مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بین گونه‌های مورد مطالعه از لحاظ شکل بدنی حاصل از آنالیز *MANOVA/CVA* تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$). نتایج آنالیز خوشه‌ای نیز گونه *C. avicennae* را در یک خوشه و جدا از سه گونه دیگر قرار داد. نتایج همچنین آشکار کرد که اعضای این جنس با تغییر در ارتفاع بدن، اندازه سر و موقعیت پوزه، طول ساقه دم و جایگاه‌های باله‌های پشتی، منحنی و سینه‌ای خود را با شرایط زیستی در زیستگاه‌های مختلف سازگار نموده‌اند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز خوشه‌ای، جویبارماهی خاردار، شکل بدن، ریخت‌سنجی

۱- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

* (نویسنده مسئول: soheil.eagderi@ut.ac.ir)

۲- دانشجوی دکترا گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

مقدمه

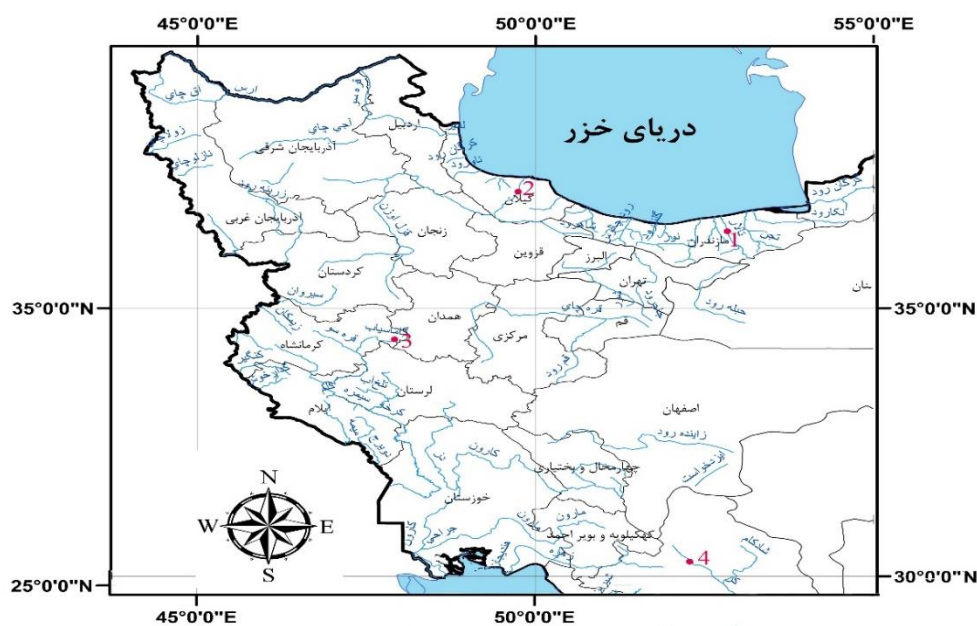
ریخت‌شناسی یکی از ابزارهای کارآمد در مطالعه جمعیت‌ها و گونه‌های ماهی است (Niecieza, 1995)، که به طور گسترده برای شناسایی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Buj et al., 2008). علاوه بر تفاوت ژنتیکی، فاکتورهای محیطی نیز شکل بدن ماهی‌ها را تحت تأثیر قرار داده و شانس بقا و تولید مثل را از طریق انتخاب صفات مطلوب در آن‌ها بیشتر کرده است و در نهایت سبب ایجاد جمعیت‌ها با صفات جدید می‌گردد (Spoljaric & Reimchen, 2007). ریخت‌سنجی هندسی بر پایه لندمارک از جمله روش‌های نوین در مطالعات ریختی است که بر اساس نقاط لندمارک ویژگی‌های شکل بدن را استخراج و شکل هندسی اشکال زیستی را بررسی می‌کنند (پیشگاه‌پور و همکاران، ۱۳۹۸؛ جمالی آشتیانی و همکاران، ۱۳۹۳؛ صالحی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۵).

اعضای جنس جوببارماهیان خاردار *Cobitis Linnaeus, 1758* یکی از پراکنده‌ترین ماهی‌های آب شیرین منطقه پالنارکتیک می‌باشند (Sawada, 1982; Coad, 2019)، که در اروپا، شمال آفریقا و آسیای جنوبی یافت می‌شوند (Eschmeyer & Fong, 2011). مطالعات مختلفی بر روی اعضای این جنس صورت گرفته است که منجر به معرفی گونه‌های جدید شده است تا جایی که بیش از ۵۰ گونه از این جنس شناخته شده است (جلیلی و همکاران، ۱۳۹۳). در ایران بر اساس آخرین فهرست گونه‌های منتشر شده (Esmaeili et al., 2018)، چهار گونه از این جنس وجود دارد که گونه *C. avicennae* در حوضه دجله، *C. faridpaki* در شرق حوضه جنوب دریای خزر و رودخانه کرج (حوضه دریاچه نمک) (Eagderi et al., 2017a)، *C. linea* در حوضه‌های رودخانه کر و هرمز و *C. saniae* در بخش غربی حوضه جنوبی دریای خزر پراکنش دارند (Esmaeili et al., 2018). اعضای این جنس، بدن کشیده و فشرده از پهلوها، فلس‌های کوچک، خط جانبی نامشخص، یک جفت خار زیرچشمی، باله دمی گرد و سه جفت سیبک دارند (Eagderi et al., 2017; Coad, 2019). تغذیه گونه‌های این جنس از بی مهرگان، سخت پوستان و پوده است (Keivany et al., 2016). اعضای این جنس دارای دو شکلی جنسی به واسطه وجود فلس‌های تغییر شکل یافته بر روی اولی شعاع باله سینه‌ای در جنس نر هستند. این گونه‌های کفزی دارای یک الگوی رنگی شامل یک ردیف پشتی از خال‌ها و چهار ردیف طولی از نواحی رنگی Z1 تا Z4 تحت عنوان نواحی گامبتا (Gambetta zone) همراه لکه‌های تیره در پایه باله دمی‌اند که در شناسایی اعضای این جنس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kottelat & Freyhof, 2007). باتوجه به اینکه ریخت‌سنجی هندسی کارایی بالایی در تفکیک ریختی ساختارهای زیستی داشته و قادر به شناسایی کمترین تفاوت‌های ریختی در مقایسه با روش ریخت‌سنجی سنتی است (Mouludi-Saleh et al., 2019; Nasri et al., 2019؛ ایگدری و همکاران، ۱۳۹۸)، از این‌رو مطالعه حاضر به منظور یافتن صفات ریختی برای تفکیک گونه‌های جنس *Cobitis* در ایران با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

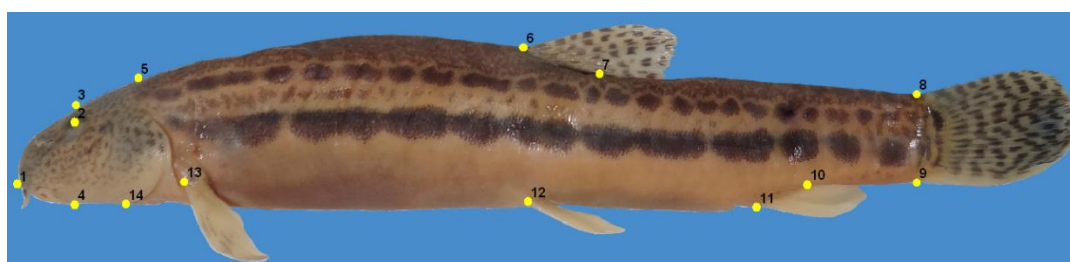
در این مطالعه تعداد ۱۷ قطعه گونه *C. faridpaki* از رودخانه سیاه‌رود (E ۵۲°۵۳'۴۲", N ۳۶°۲۶'۴۰")، ۱۸ قطعه گونه *C. avicennae* از رودخانه گاماسیاب (E ۴۷°۲۶'۴۳", N ۳۴°۲۶'۴۸")، ۱۳ قطعه از *C. linea* از رودخانه ملوسجان (شاخه فرعی رودخانه کر) (E ۵۲°۲۸'۲۲", N ۲۹°۵۲'۲۳") و ۱۷ قطعه *C. saniae* از رودخانه سفیدرود (E ۴۹°۳۷'۴۹", N ۳۷°۰۰'۱۱") به وسیله دستگاه الکتروشوکر نمونه‌برداری گردید (شکل ۱). نمونه‌ها پس از صید و بیهوشی در محلول گل میخک، به منظور مطالعات بیشتر در فرمالین ۱۰ درصد بافری تثبیت و به آزمایشگاه زیست‌شناسی و تکوین دانشگاه تهران منتقل شدند. با توجه به مطالعات قبلی در مورد دوشکلی جنسی در اعضای جنس *Cobitis* تنها به تفاوت در داشتن فلس‌های کانسترتینی در ابتدای باله سینه‌ای اشاره شده است و تفاوت معنی‌داری بین دو جنس در مورد صفات ریختی وجود ندارد (Eagderi et al., 2017,) (2017a).

به‌منظور استخراج داده‌های حاصل از شکل بدن در روش ریخت‌سنجی هندسی از سمت چپ سطح جانبی نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال Kodak با قدرت تفکیک شش مگاپیکسل عکس‌برداری شد. سپس تعداد ۱۴ نقطه لندمارک (شکل ۲) تعریف و با استفاده از نرم‌افزار tpsDig2 بر روی تصاویر دو بعدی رقمی گردید. داده‌های حاصل از شکل بدن گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از آنالیزهای چندمتغیره تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و آزمون واریانس چندمتغیره/تجزیه همبستگی کانونی (MANOVA/CVA) و آنالیز خوشه‌ای (CA) با انتخاب الگوریتم‌های Paired group و Euclidean با استفاده از نرم‌افزار PAST (Hammer et al., 2001) 2.17b مورد تحلیل قرار گرفتند. همچنین فواصل ماهالانوبیس و پروکراست به‌عنوان درجه تمایز گونه‌ها مورد مطالعه در آنالیز MANOVA/CVA استخراج گردید. مصورسازی تغییرات شکل بدن بر اساس میانگین شکل جمعیت‌ها نسبت به شکل میانگین کل (Consensus configuration) با استفاده از شبکه تغییر شکل در نرم‌افزار MorphoJ صورت پذیرفت (Klingenberg, 1998).



شکل ۱: موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری گونه‌های جنس *Cobitis* مورد مطالعه (۱. رودخانه سیاه‌رود، ۲. رودخانه سفیدرود،

۳. رودخانه گاماسیاب و ۴. رودخانه ملوسجان (شاخه فرعی رودخانه کر))



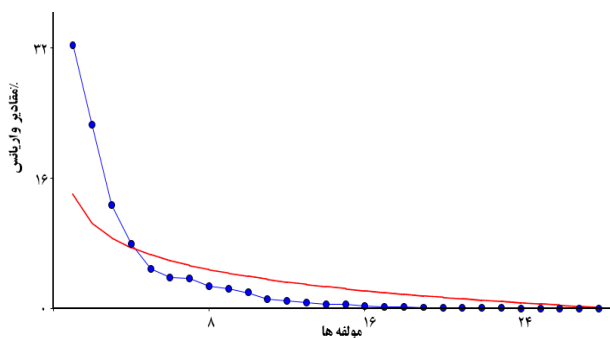
شکل ۲: نقاط لندمارک تعریف شده برای استخراج شکل بدن در گونه‌های جنس *Cobitis* مورد مطالعه

- ۱- قدامی‌ترین بخش پوزه در قسمت فک بالا، ۲- مرکز چشم، ۳- محل تقاطع امتداد خط عمود بر مرکز چشم با لبه بالایی سر، ۴- محل تقاطع امتداد خط عمود بر مرکز چشم در سطح شکمی سر، ۵- انتهای سر، ۶- ابتدای قاعده‌ی باله‌ی پشتی، ۷- انتهای قاعده‌ی باله‌ی پشتی، ۸- انتهای بالایی ساقه دم در محل اتصال به باله دم، ۹- انتهای پایینی ساقه دم در محل اتصال به باله دم، ۱۰- انتهای قاعده‌ی باله‌ی مخرجی، ۱۱- ابتدای قاعده‌ی باله‌ی مخرجی، ۱۲- ابتدای قاعده‌ی باله‌ی شکمی، ۱۳- قدامی‌ترین نقطه‌ی قاعده‌ی باله‌ی سینه‌ای و ۱۴- بخش شکمی شکاف آبششی (شکل مربوط به گونه

C. avicennae است).

نتایج

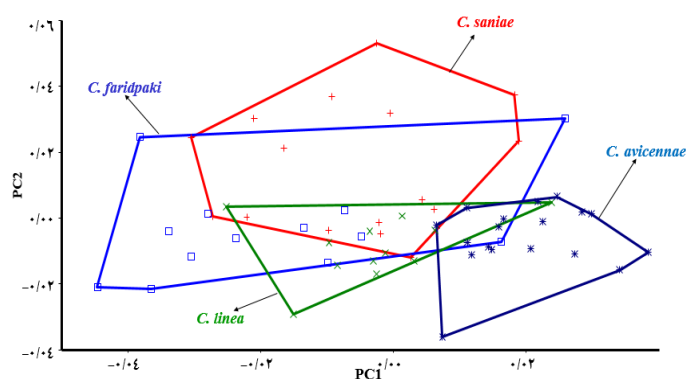
بر اساس نتایج PCA، تعداد ۲۸ مؤلفه استخراج شد، که چهار مؤلفه بالاتر از خط برش جولیف (Jolliffe, 2002) قرار داشتند (شکل ۳) که مقدار ۷۵/۴۷ درصد واریانس را به خود اختصاص دادند (جدول ۱). پراکنش گونه‌های مورد مطالعه نیز بر اساس دو مؤلفه اول در شکل ۴ ارائه شده است. بر این اساس بین گونه‌های مورد مطالعه هم‌پوشانی وجود دارد، به عبارت دیگر گونه‌های مورد مطالعه از یکدیگر تفکیک نشده‌اند. تحلیل همبستگی کانونی نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P < 0.0038$) Wilks از سایر گونه‌ها جدا افتاده بود و سه گونه دیگر از یکدیگر تفکیک شده بودند (شکل ۵). نتایج فواصل ماهالانوبیس و پروکراست به‌عنوان درجه تمایز شکل بدن حاصل از آنالیز تجزیه همبستگی کانونی (CVA) گونه‌های مورد مطالعه در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج حاصل بیشترین فاصله بین گونه‌های *C. faridpaki* و *C. avicennae* و کمترین بین گونه‌های *C. faridpaki* و *C. saniae* وجود دارند.



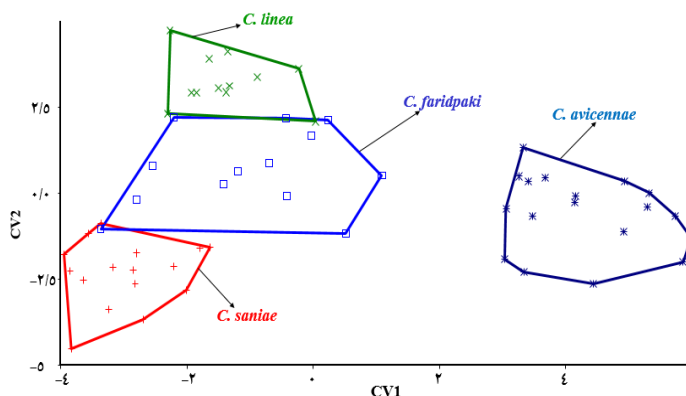
شکل ۳: نمودار scree plot تحلیل مؤلفه‌های اصلی و نمایش خط برش جولیف (خط قرمز رنگ) که نشان‌دهنده مرز مؤلفه‌های اصلی معنادار است.

جدول ۱: واریانس و مقادیر ویژه چهار مؤلفه اصلی اول در تحلیل شکل بدن گونه‌های مورد مطالعه جویبار ماهی خاردار.

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	واریانس
۱	۰/۰۰۰۴	۳۲/۰۹
۲	۰/۰۰۰۲	۲۲/۵۸
۳	۰/۰۰۰۱	۱۲/۶۹
۴	۰/۰۰۰۰۹	۷/۸۹
جمع		۷۵/۴۷



شکل ۴: نمودار تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) شکل بدن گونه‌های مورد مطالعه



شکل ۵: نمودار تحلیل همبستگی کانونی (CVA) شکل بدن گونه‌های مورد مطالعه

نتیجه آنالیز خوشه‌ای الگوریتم‌های Paired group و Eucclidean نشان داد که گونه‌های مورد مطالعه در دو خوشه مجزا قرار گرفتند که گونه *C. avicennae* با صد درصد درخت‌های احتمالی به تنهایی در یک خوشه قرار گرفته و بیشترین تمایز را با سایر گونه‌های مورد مطالعه داشت (شکل ۶). سایر گونه‌ها نیز در یک خوشه (دو گونه *C. saniae* و *C. faridpaki* در یک زیر خوشه) مجزا قرار گرفتند. ضریب کوپرنیک ۰/۸۹۷ به دست آمد که هر چه این مقدار به ۱ نزدیک‌تر باشد نشان‌دهنده قرار گرفتن صحیح خوشه‌ها و ترتیب مناسب آن‌ها بر روی دندوگرام می‌باشد.

مصورسازی تفاوت گونه‌ها در شبکه تغییر شکل نشان داد که گونه *C. avicennae* بیشترین تفاوت را با گونه‌های دیگر دارد. بیشترین جابجایی نقاط لندمارک در گونه *C. avicennae* مربوط به جابجایی خلفی موقعیت پوزه (موقعیت لندمارک ۱)، داخلی لندمارک‌های پیرامون سر، قدامی باله سینه‌ای و خلفی ساقه دم بود. همچنین الگوهای جابجایی لندمارک‌ها در گونه *C. linea* جابجایی قدامی موقعیت لندمارک‌های پیرامون سر و خلفی باله سینه‌ای و قدامی باله مخرجی و در گونه *C. faridpaki* جابجایی شکمی پوزه و پشتی باله سینه‌ای بودند. همچنین گونه *C. saniae* نسبت به شکل میانگین دارای موقعیت پشتی پوزه،

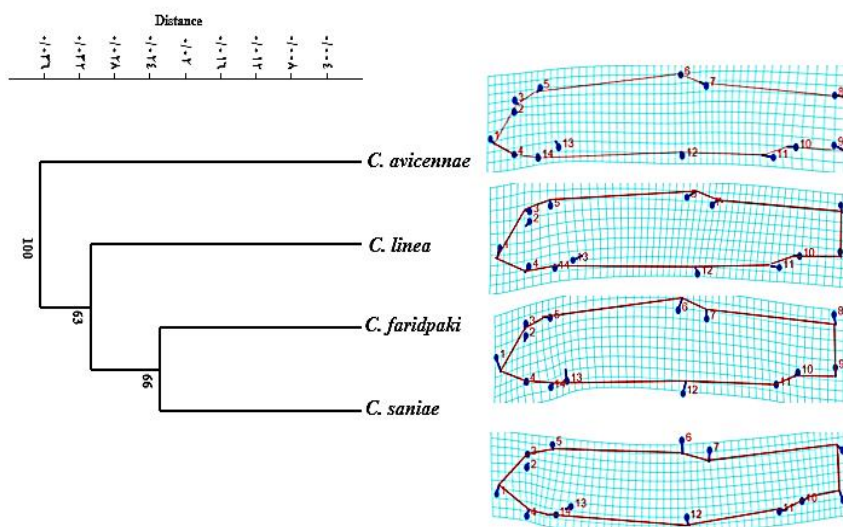
و لندمارک‌های ناحیه شکمی سر، قدامی باله سینه‌ای و سرپوش آبششی و موقعیت قدامی لندمارک‌های انتهایی ساقه دمی بود و در آنالیز خوشه‌ای با گونه *C. faridpaki* در یک خوشه قرار گرفتند.

جدول ۲: فواصل ماهالانویسی شکل بدن حاصل از آزمون CVA در گونه‌های مورد مطالعه

<i>C. saniae</i>	<i>C. linea</i>	<i>C. avicennae</i>	
		۶/۴۷۰	<i>C. linea</i>
	۵/۳۶	۶/۴۷۷	<i>C. saniae</i>
۴/۶۶	۴/۶۵	۶/۵۵۹	<i>C. faridpaki</i>

جدول ۳: فواصل پروکراست شکل بدن حاصل از آزمون CVA در گونه‌های مورد مطالعه

<i>C. saniae</i>	<i>C. linea</i>	<i>C. avicennae</i>	
		۰/۰۳۲	<i>C. linea</i>
	۰/۰۳۰۴	۰/۰۳۶۷	<i>C. saniae</i>
۰/۰۲۲۸	۰/۰۳۰۹	۰/۰۴۰۲	<i>C. faridpaki</i>



شکل ۶: دندوگرام آنالیز خوشه‌ای گونه‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

براساس نتایج، گونه‌های مورد مطالعه به لحاظ ریختی از یکدیگر قابل تفکیک بودند به طوری که گونه *C. avicennae* کاملاً جدا از سایر گونه‌ها قرار گرفت. بیشترین فاصله ریختی بین دو گونه *C. avicennae* و *C. faridpaki* یافت شد و عمده تفاوت‌های مشاهده شده مربوط به موقعیت پوزه، عمق سر، موقعیت باله‌های سینه و شکمی و موقعیت شکمی سرپوش آبششی

بود. اعضای جنس *Cobitis* به‌طور معمول در بسترهای ماسه‌ای و گلی جایی که در طول شب از ذرات عالی ریز و موجودات کفزی تغذیه می‌کنند، به‌سر می‌برند. این ماهیان بستر را حفر کرده و در طول روز مخفی می‌شوند و همچنین در بین گیاهان حاشیه‌ای رودخانه نیز یافت می‌شوند (رستمیان و همکاران، ۱۳۹۵). شکل بدن ماهی‌ها اساساً در ارتباط با عملکرد آن‌ها به‌واسطه شنا و تغذیه در زیستگاه‌های مختلف می‌باشد (Langerhans et al., 2003; Mouludi-Saleh et al., 2019). ایگدری و همکاران، (۱۳۹۲) ولی در گونه‌های تخصص‌گرا از قبیل اعضای جنس *Cobitis* به‌واسطه اینکه در محدوده خاصی از زیستگاه زندگی می‌کنند تفاوت ریخت اندک بوده و ریخت یکسانی را از خود نشان می‌دهند، به‌عبارت‌دیگر ویژگی‌های زیستگاهی تأثیر اندکی در مقایسه شکل بدن ماهیان عام‌گرا از خود نشان می‌دهند (Mouludi-Saleh et al., 2019). با توجه به این ریخت‌سنجی هندسی، به دلیل قابلیت بالای تفکیک ساختارهای زیستی (Mouludi-Saleh et al., 2019)، در مطالعه حاضر توانست به خوبی گونه‌های جنس *Cobitis* در ایران را به لحاظ ریختی تفکیک نماید. رستمیان و همکاران (۱۳۹۵)، مطلوبیت زیستگاهی جویبار ماهی خاردار سانیا در رودخانه توتکابن (شاخه فرعی رودخانه سفیدرود) را با استفاده از مدل جمعی تعمیم یافته مورد مطالعه قرار دادند و بیان داشتند که زیستگاه انتخابی این گونه، مناطقی با سرعت بیشتر آب، بستر ماسه‌ای-گلی (حاصل از ته نشست رسوبات معلق)، با عرض زیاد و ارتفاع و عمق کم است. با توجه به این، مطالعات نشان داده‌اند گونه‌هایی که در آب‌های کم عمق و با جریان سریع زیست می‌کنند، در انتخاب شرایط زیستگاهی بسیار تخصصی عمل کرده و به‌نوعی تخصصی شده‌اند و این قبیل گونه‌ها به احتمال زیاد نسبت به تغییر شرایط هیدرولیک بسیار حساس هستند (Casatti et al., 2005; Teresa & Casatti, 2013). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که جویبار ماهیان خاردار از جمله ماهیان تخصصی شده در زیستگاه هستند.

نتایج حاصل از آنالیز خوشه‌ای نیز *C. avicennae* به تنهایی با ۱۰۰ درصد درخت‌های احتمالی در یک خوشه و جدا از سایر گونه‌ها (۶۳ درصد درخت‌های احتمالی) قرار گرفت. در مطالعه برومندی و همکاران (۱۳۹۷) روی مقایسه شجره‌شناسی گونه *Cobitis saniae* در رودخانه‌های بارکیلی رود و چالکه‌رود حوضه خزر با سایر گونه‌های ایرانی خانواده Cobitidae عنوان شد که گونه‌های *C. faridpaki*، *C. saniae* و *C. avicennae* یک گروه تک شجره‌ای با ضریب ۶۴ درصد را تشکیل دادند و دو گونه متعلق به حوضه خزر با ضریب بوتسترپ ۹۹ درصد در یک خوشه قرار گرفتند.

از آن جا که یکی از اهداف اصلی مطالعه ریختی جداسازی گونه‌ها است، در این مطالعه روش ریخت‌سنجی هندسی به خوبی توانست گونه‌های مورد مطالعه را جدا کند. بر اساس نتایج، گونه *C. avicennae* به‌واسطه سر کوچک‌تر، ساقه دمی درازتر و موقعیت قدامی باله مخرجی، گونه *C. linea* به‌واسطه موقعیت شکمی تر پوزه و چشم، عمق بیشتر سر، موقعیت خلفی پایه باله سینه‌ای، موقعیت خلفی باله پشتی و قدامی باله مخرجی، گونه *C. faridpaki* به‌واسطه طول و عمق کمتر سر، موقعیت بالاتر پایه باله سینه‌ای و قاعده کوتاه‌تر باله مخرجی و گونه *C. saniae* به‌واسطه عمق کمتر سر و بدن، سر کوچک‌تر و موقعیت خلفی تر باله

مخرجی قابل شناسایی هستند. تنوع ریختی تحت تأثیر شرایط زیستگاهی، می‌تواند منجر به ایجاد جمعیت‌های مجزا و گونه‌های جدید شود (Gunawickrama, 2008). تمام مدل‌های آلوپاتریکی، تفاوت در شرایط محیطی زیستی و غیر زیستی را به‌عنوان عوامل تأثیرگذار روی انتخاب طبیعی بیان می‌دارند که نتیجه آن پیدایش آرایه‌های جدید است (Postl et al., 2008). بنابراین به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان داشت که اعضای این جنس با تغییر در ارتفاع بدن، اندازه سر و موقعیت پوزه، طول ساقه دم و جایگاه‌های باله‌های پشتی، مخرجی و سینه‌ای با شرایط زیستی در زیستگاه‌های مختلف سازگار شده‌اند.

قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران به انجام رسیده است.

منابع

- ایگدری، س.، اسماعیل زادگان، ا.، مداح. ع. (۱۳۹۲). بررسی تغییرات شکل بدن در جمعیت‌های ماهی خیاطه (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) در حوضه دریای خزر با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. ۵ (۱۴): ۸-۱.
- ایگدری، س.، مشیدی، م.، نصری، م. (۱۳۹۸). بررسی تنوع ریختی چهار جمعیت شاه‌کولی ارومیه (*Alburnus atropatena*) در حوضه دریاچه ارومیه با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی. فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی. ۷ (۴): ۲۸-۱۹.
- برومندی، الهام، هاشم زاده سقرلو. ا.، اشرف زاده، م. و رحیمی، ر.، ۱۳۹۷، مقایسه شجره‌شناسی گونه‌ی *Cobitis saniae* در رودخانه‌های بارکیلی رود و چالکه رود حوضه خزر با سایر گونه‌های ایرانی خانواده Cobitidae. کنفرانس حفاظت از ماهیان بومزاد اکوسیستم‌های آب‌های داخلی ایران، کرج- دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات دانشگاه تهران - انجمن ماهی‌شناسی ایران.
- پیشگاه‌پور، ز.، پورباقر، ه.، ایگدری، س. (۱۳۹۸). مقایسه کارایی ریخت‌سنجی سنتی و هندسی در تفکیک جوامع ماهی *Alburnus doriae* (De Filippi, 1865) در حوضه‌های مرکزی و غربی ایران. نشریه علمی پژوهشی پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی. ۷ (۲): ۱-۱۲.
- جلیلی، پ.، ایگدری، س.، موسوی ثابت، ح.، مفاخری، پ. (۱۳۹۳). توصیف ساختار استخوان‌شناسی سگ‌ماهی خاردار فریدپاکی

- جمال‌آشتیانی، ع.، ایگدری، س.، خراسانی، ن.، زمانی فرادنبه، م. (۱۳۹۵). مقایسه ویژگی‌های شکل بدن جمعیت‌های سس ماهی کورا (*Barbus lacerta*, Heckel 1834) در سه حوضه خزر، دجله و ارومیه با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی. فصلنامه محیط زیست جانوری. ۷ (۴): ۱۴۳-۱۵۰.
- رستمیان، ن.، سعید پور، ب.، ایگدری، س.، رامین، محمود. (۱۳۹۵). بررسی مطلوبیت زیستگاهی سگ ماهی خاردار کیوان *Cobitis keyvani* Mousavi-Sabet et al., 2012 در رودخانه توتکابن (شاخه فرعی رودخانه سفیدرود) با استفاده از مدل جمعی تعمیم یافته (GAM). نشریه علمی پژوهشی پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی. ۴ (۴): ۱-۱۲.
- صالحی‌نیا، د.، ایگدری، س.، خراسانی، ن.، زمانی فرادنبه، م. (۱۳۹۵). مطالعه اثر سد سنگبان بر ویژگی‌های ریختی جمعیت‌های سیاه ماهی (*Capoeta gracilis*) با استفاده از دو روش ریخت‌سنجی هندسی و سنتی. فصلنامه محیط زیست جانوری. ۸ (۲): ۹۷-۱۰۴.
- Buj, I., Podnar, M., Mrakovcic, M., Caleta, M., Mustafic, P., Zanella, D. and Marcic, Z. (2008). Morphological and genetic diversity of *Sabanejewia balcanica* in Croatia. *Folia Zoologica*, 57 (1-2): 100-110.
- Casatti, L., Rocha, F.C. and Pereira, D.C. (2005). Habitat use by two species of *Hypostomus* (Pisces, Loricariidae) in southeastern Brazilian streams. *Biota Neotropica*, 5: 157-165.
- Coad, B.W. (2019). Fresh water fishes of Iran. Available at <http://www.briancoad.com>.
- Eagderi, S., Jouladeh-Roudbar, A., Jalili, P., Sayyadzadeh, G. and Esmaeili, H.R. (2017a). Taxonomic status of the genus *Cobitis* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Cobitidae) in the southern Caspian Sea basin, Iran with description of a new species. *FishTaxa*, 2 (1): 48-61.
- Eagderi, S., Jouladeh-Roudbar, A., Nasri, M., Sayyadzadeh, G. and Esmaeili, H. R. (2017). Taxonomic status of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae) in the Namak Lake basin, Iran. *Iranian Journal of Ichthyology*, 4 (2): 131-139.
- Eschmeyer, W.N. and Fong, J.D. (2011). Pisces. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.). *Animal biodiversity: An outline of higher level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa*, 3148: 26-38.
- Esmaeili, H.R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. and Abbasi, K. (2018). Checklist of freshwater fishes of Iran. *FishTaxa*, 3(3): 1-95.
- Gunawickrama, K.S. 2008. Intraspecific variation in morphology and sexual dimorphism in *Puntius singhala*

- (Teleostei: Cyprinidae). *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*. 37(2): 167-175.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. and Ryanm, P. D. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis". *Palaeontol. Electron*, 4(4): 1-9.
- Jolliffe, I.T. (2002). *Principal component analysis*. – Springer, New York. USA. pp: 150-166.
- Keivany, Y., Nasri, M., Abbasi, K. and Abdoli, A. (2016). *Atlas of inland water fishes of Iran*. Iran Department Environment Press. 218 p.
- Klingenberg, C.P. (1998). Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews*, 73: 79-123.
- Langerhans, R.B., Layman, C.A., Langerhans, A.K. and Dewitt, T. J. (2003). Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(4): 689-698.
- Mouludi-Saleh, A., Eagderi, S., Poorbagher, H. and Kazemzadeh, S. (2019). The Effect of Body Shape Type on Differentiability of Traditional and Geometric Morphometric Methods: A Case Study of *Channa gachua* (Hamilton, 1822. *European Journal of Biology*, 78(2): 165-168.
- Nasri, M., Eagderi, S., Farahmand, H. and Nezhadheydari, H. (2019). Interspecific morphological variation among members of the genus *Cyprinion* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Iran, using landmark-based geometric morphometric technique. *Iranian Journal of Ichthyology*, 6(1): 54-64.
- Nicieza, A.G. (1995). Morphological variation between geographically disjunct populations of *Atlantic salmon*: the effects of ontogeny and habitat shift. *Functional Ecology*, 9: 448-456.
- Postl, L., Herler, J., Bauer, C., Maderbacher, M., Makasa, L. and Sturmbauer, C. (2008). Geometric morphometric applied to viscerocranial bones in three populations of the Lake Tanganyika cichlid fish *Tropheus moorii*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(3), 240-248.
- Sawada, Y. (1982). Phylogeny and zoogeography of the superfamily Cobitoidea (Cyprinoidei, Cypriniformes). *Memoirs of the Faculty of Fisheries of Hokkaido University*, 28(2): 65-223.
- Spoljaric, M. and Reimchen T. (2007). 10000 years later: Evolution of body shape in *Haida gwaii* three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 70(5): 1484- 1503.
- Teresa, F.B., and Casatti, L. (2013). Development of habitat suitability criteria for Neotropical stream fishes and an assessment of their transferability to streams with different conservation status.

Morphological comparison of the *Cobitis* species from Iranian inland waters using geometric morphometric method

S. Eagderi^{1*}, A. Mouludi-Saleh²

Received:2020.7.5
Accepted:2020.8.17

Abstract

This study aimed to find morphological traits to discriminate four species of the genus *Cobitis* in Iran using geometric morphometric method. For this purpose, a total of 65 specimens were captured from Sefid (*C. saniae*), Siah (*C. faridpaki*), Maloosjan (*C. linea*) and Gamasiab (*C. avicennae*) rivers using electrofishing device. To extract the body shape data of the studied taxa, 14 Landmarks-point were defined and digitized using tpsDig2 software. Data after generalized procrust analysis were analyzed using principal component analysis, multivariate analysis of variance /canonical variate analysis and cluster analysis. The results showed a significant difference in the body shape between the studied species ($P < 0.001$). Cluster analysis positioned *C. avicennae* in one clade, distinguish from others. The results also revealed that the members of this genus can adapt themselves to the environmental parameters of their habitats by alternations in the body depth, head size and snout position, length of the caudal peduncle and positions of the dorsal, anal and pectoral fins.

Keywords: Body shape, Cluster analysis, Morphometric, Spined loach

1- Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran

*(Corresponding author: soheil.eagderi@ut.ac.ir)

2- PhD Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran

بررسی فیتوشیمیایی سرخس عقابی (*Pteridium aquilinum*) در گرادیان ارتفاعی ماسال استان گیلان

رضا تمر تاش^{۱*}، محمدرضا طاطیان^۲، هانیه اندرز چمنی^۳، سید حسن زالی^۴، سیده محدثه احسانی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱۴

چکیده

گونه‌های مهاجم تهدیدی برای اکوسیستم‌های سرتاسر جهان محسوب می‌شوند و نگرانی بوم‌شناسان در مورد گیاهان مهاجم رو به افزایش است. سرخس عقابی (*Pteridium aquilinum*) از جمله گیاهان مهاجم است که بیشترین پراکنش را در جهان دارد. این مطالعه به بررسی فیتوشیمیایی گونه سرخس عقابی در گرادیان مختلف ارتفاعی پرداخته است. در این پژوهش، نمونه‌برداری به صورت تصادفی در سه طبقه‌ی ارتفاعی (۷۰۰-۰، ۷۰۰-۷۰۰، ۱۴۰۰-۷۰۰ و ۱۴۰۰-۲۱۰۰) با ۳ تکرار در دو مرحله‌ی رشد و زایشی از پوشش گیاهی و خاک انجام شد. در مرحله رویشی ترکیب *Linalool* (لینالول) در طبقه ارتفاعی ۷۰۰-۰ با ۱/۰۹ دارای بیشترین درصد بود. طی مرحله زایشی ترکیبات *Sabinene* (سابینن) و α -*Thujene* (آلفا توجن) به ترتیب با ۰/۱۵ و ۰/۱۳ درصد دارای بیشترین مقدار در طبقه ارتفاعی ۷۰۰-۰ بودند. میزان اسانس در مرحله رویشی بیشتر از مرحله زایشی بود در نتیجه می‌توان بیان نمود مرحله رشد گیاه تاثیر بسزایی در میزان ترکیبات اسانس خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: اسانس، گیاه مهاجم، سرخس عقابی، ماسال

۱- دانشیار، گروه مرتعداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
*نویسنده مسئول: reza_tamartash@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه مرتعداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- مربی، گروه مرتعداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۵- دکتری علوم مرتع، گروه مدیریت مرتع، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

مقدمه

پراکنش گیاهان مهاجم، کارکرد بوم‌سازگان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از تأثیرات زیستی گونه‌های مهاجم می‌توان به افزایش تولید اولیه، کاهش فراوانی و تنوع گونه‌های موجود اشاره نمود (Vila et al., 2011). گسترش فعالیت‌های انسانی در سال‌های اخیر موجب هجوم گیاهان مهاجم شده است (Wang et al., 2015). اگرچه هجوم گیاهان به طور طبیعی صورت می‌گیرد ولی دخالت انسان نیز سبب سرعت بخشیدن به آن می‌شود (Schneider & Frenando, 2010). گیاهان مهاجم با تشکیل توده‌های یکنواخت، ابتدا بر جوامع متنوع و دارای غنای بالا اثر می‌گذارند و سپس گونه‌های بومی را کاهش و مواد غذایی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ehrenfeld, 2003; Yimer et al., 2006). هجوم گیاهان مهاجم در مراتع از نظر مشکلاتی که برای دامدار ایجاد می‌کند، دارای اهمیت بسیار بالایی است. از جمله این مشکلات، مدیریت عملیات چرا، کاهش کیفیت علوفه، افزایش هزینه‌های مدیریت، کاهش وزن دام، کاهش کیفیت محصولات دامی و مسمومیت دام است (Dantonio & Chompers, 2006). سرخس عقابی با نام علمی (*Pteridium aquilinum*) یکی از گونه‌های مهاجم است که با هجوم به منطقه و از بین بردن گونه‌های بومی، سبب ایجاد مشکلات حفاظتی می‌گردد. سرخس عقابی با سیستم ریزومی گسترده زیرزمینی به سرعت تکثیر شده و ایجاد پایه‌های جدید می‌نماید. با ایجاد سایه و لاشبرگ فراوان، زیست را برای سایر گونه‌ها مختل می‌نماید (ادبی فیروزجانی و همکاران، ۱۳۹۴). این دسته از گیاهان به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی نظیر آلکالوئیدها، تانن، اسانس‌ها و... برای دام مضر بوده و کاربرد علوفه‌ای ندارند اما در مراتع دیده می‌شوند (نبوی و همکاران، ۱۳۹۴).

محققان بسیاری جهت بررسی‌های فیتوشیمیایی گیاهان، شناسایی و تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس گونه‌ها را مورد توجه قرار می‌دهند (Harborne, 1988; Midgley, 1988; Hall, 1980; Havsteen, 1983). در بررسی فیتوشیمی یک گیاه، هدف بهره‌برداری از مواد مؤثره و اسانس آن‌ها است و برای پی‌بردن به عوامل مؤثر در افزایش یا کاهش این مواد باید بررسی‌های مختلفی صورت گیرد. از مهم‌ترین عوامل بوم‌شناختی که بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی تأثیرگذار است می‌توان به شرایط اقلیمی، ویژگی‌های خاکی و عوامل توپوگرافی اشاره نمود (کریمی و همکاران، ۱۳۹۶؛ امید بیگی، ۱۳۸۸؛ صالحی سورمقی، ۱۳۸۵).

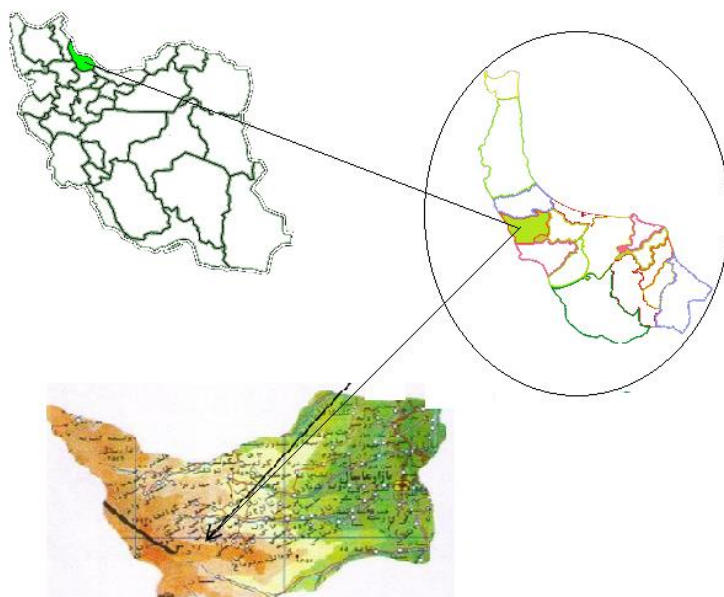
نتایج محققان نشان می‌دهد که ارتباط نزدیکی بین شرایط رویشگاه و برخی از ترکیبات شیمیایی گونه‌های گیاهی وجود دارد. ارتفاع از سطح دریا، شیب، عوامل توپوگرافی و خصوصیات خاک نقش اساسی در رشد و تولید گیاهان در اکوسیستم‌ها و رویشگاه‌های طبیعی مختلف ایفا می‌کند و از جمله عوامل تعیین‌کننده‌ی کمیت و کیفیت اسانس گیاه است (Parnbam, Kesselring & 1985).

در اقلیم شمالی ایران گیاه سرخس عقابی به‌عنوان یک مانع و مزاحم برای رشد گونه‌های دیگر است، به‌طور گسترده پراکنش یافته و موجب کاهش پوشش گیاهی شده است (بانج شفیعی و همکاران، ۱۳۸۲). این گونه در شهرستان ماسال استان گیلان، در ارتفاعات مختلف به‌وفور دیده می‌شود و در فصل زایش خود ایجاد توده‌های عظیم می‌کند. با توجه به اهمیت مقابله با گیاهان مهاجم و پراکنش قابل توجه این گونه در ارتفاعات ماسال گیلان از طرفی و از طرف دیگر استفاده از گیاهان اسانس‌دار و معطر که نقش مهمی در چرخه اقتصاد جهانی دارد، نخستین گام شناسایی دقیق گونه‌های دارویی و اسانس‌دار است که با توجه به اقلیم هر منطقه دارای تنوع و غنای متفاوتی است. لذا پژوهش حاضر در نظر دارد با بررسی ترکیبات اسانس و خواص آن‌ها، در جهت برنامه‌ریزی صحیح برای استفاده درست از منابع اکولوژیکی محیط که امری بسیار ضروری است، گام بردارد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

منطقه مورد مطالعه در شهرستان ماسال در شمال غربی استان گیلان و در ۵۵ کیلومتری از مرکز استان واقع شده است. از شمال به شهرستان رضوانشهر، از غرب و جنوب غربی به خلخال استان اردبیل، از جنوب به شهرستان فومن و از شرق به شهرستان صومعه سرا محدود می‌شود (شکل ۱). این شهرستان از نظر موقعیت جغرافیایی بین $48^{\circ} 42'$ تا $49^{\circ} 42'$ طول شرقی و $37^{\circ} 15'$ تا $37^{\circ} 29'$ عرض شمالی استان گیلان واقع شده و دارای مساحت ۶۳۳ کیلومترمربع است. حداقل و حداکثر ارتفاع منطقه مورد مطالعه به ترتیب ۱۰۰ و ۲۱۰۰ متر است. به‌منظور تجزیه و تحلیل اقلیم منطقه، از آمار و اطلاعات نزدیک‌ترین ایستگاه‌های هواشناسی به منطقه، ایستگاه هواشناسی رشت، استفاده شد. این منطقه دارای آب و هوای معتدل و مرطوب در مناطق جلگه‌ای و نیمه مرطوب کوهستانی در مناطق مرتفع است. بارش سالیانه در این منطقه ۱۰۰۰ الی ۱۴۰۰ میلی‌متر است (حامیان و همکاران، ۱۳۹۴).



شکل ۱: نقشه موقعیت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه

روش نمونه برداری

در این تحقیق ابتدا طبقات ارتفاعی به کمک دستگاه GPS تعیین، سپس نمونه برداری به صورت تصادفی در سه طبقه‌ی ارتفاعی ۰-۷۰۰ متر، ۷۰۰-۱۴۰۰ متر و ۱۴۰۰-۲۱۰۰ متر انجام گرفت. با توجه به تغییرات ارتفاعی به ازای هر ۷۰۰ متر ۱ نمونه با ۳ تکرار در دو مرحله‌ی رویشی و زایشی از اندام‌های هوایی (مجموعاً ۱۸ نمونه گیاهی) برداشته شد. سپس در هوای آزاد خشک و توسط دستگاه خردکن برقی به صورت پودر شده جهت اسانس‌گیری آماده شدند. همچنین به منظور تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و ارتباط آن‌ها با کمیت و کیفیت اسانس گونه‌ی مورد مطالعه، نمونه‌های خاک در هر طبقه ارتفاعی، از زیر پایه‌های گیاهی و به عمق ۰-۳۰ سانتی‌متر با ۳ تکرار برداشت شد. در مرحله بعد نمونه‌های خاک جمع‌آوری و جهت آنالیز به آزمایشگاه خاکشناسی منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های خاک از الک دو میلی متری عبور داده شدند. در بررسی تجزیه شیمیایی خاک، میزان اسیدیته خاک در گل‌اشباع با pH متر (Thomas, 1996)، پارامترهای درصد کربن و مواد آلی (Walkely & Black, 1934)، درصد آهک، بافت، پتاسیم، درصد ازت کل، درصد فسفر قابل جذب (Olsen *et. al.*, 1954) اندازه‌گیری شدند.

اسانس‌گیری

اسانس‌گیری گیاه مورد مطالعه از روش تقطیر به کمک آب با دستگاه اسانس‌گیری کلونجر انجام شد و برای شناسایی ترکیبات موجود در اسانس گیاه مورد مطالعه، از دستگاه کروماتوگرافی جرمی (GC/MS) استفاده شد. این دستگاه جداسازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس را به‌طور همزمان انجام می‌دهد. در بررسی اسانس نمونه‌های مورد نظر گونه

سرخس عقابی از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل HP-۶۸۹۰ و طیف سنج جرمی HP-۵۹۷ و همچنین از ستون جداسازی HP-۵ms با ابعاد ۳۰m * ۰/۲۵ mm * ۰/۳۲ mm استفاده شد. همچنین دمای دریچه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود و برنامه‌ریزی دمای ستون نیز از ۶۰ تا ۲۶۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۵ درجه سانتی گراد در دقیقه متغیر بود (کلوندی و همکاران، ۱۳۹۲).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور مطالعه خصوصیات خاک و بررسی ترکیبات شیمیایی در طبقات مختلف ارتفاعی از آزمون تجزیه‌واریناس یکطرفه و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. همچنین جهت بررسی تاثیر خصوصیات خاک بر کمیت و کیفیت اسانس از آنالیز همبستگی پیرسون استفاده گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده گردید.

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در گرادیان ارتفاعی مختلف

نتایج تجزیه‌واریناس بررسی خصوصیات خاک در گرادیان مختلف ارتفاعی نشان داد که بین درصد مواد آلی، درصد آهک، نیتروژن و فسفر اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد و بین پارامتر اسیدیته و شن با طبقات مختلف ارتفاعی، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۱).

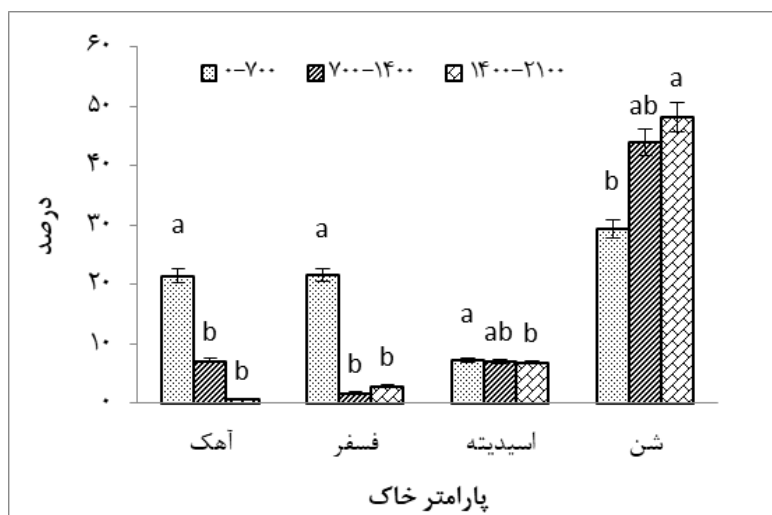
جدول ۱: نتایج تجزیه‌واریناس پارامترهای خاک در گرادیان مختلف ارتفاعی

F	۲۱۰۰-۱۴۰۰	۱۴۰۰-۷۰۰	۰-۷۰۰	پارامتر خاک
۱۶/۴۲**	۱/۸	۰/۳۶	۰/۲۰	مواد آلی
۲۲/۹۸**	۰/۵۸	۷/۴۲	۲۱/۵۰	آهک
۰/۹۳ ^{ns}	۲/۵۸	۰/۴۱	۰/۳۴	شوری
۳/۹۶*	۶/۸۹	۶/۹۷	۷/۲۸	اسیدیته
۵۴/۵۶**	۰/۱۷	۰/۰۴	۰/۰۳	نیتروژن
۲۴۷/۹۴**	۲/۸۷	۱/۷۵	۲۱/۶۳	فسفر
۳/۱۱ ^{ns}	۱/۷۸	۲/۴۶	۳/۷۷	پتاسیم
۸/۳۹*	۴۸/۶۳	۴۴	۲۹/۳۲	شن
۳/۱۳ ^{ns}	۱۵/۹۶	۳۱/۲۶	۳۳/۲	رس
۱/۲۲ ^{ns}	۲۵/۴۱	۲۴/۷۲	۳۷/۴۷	سیلت

**، * و ^{ns} به ترتیب وجود تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری

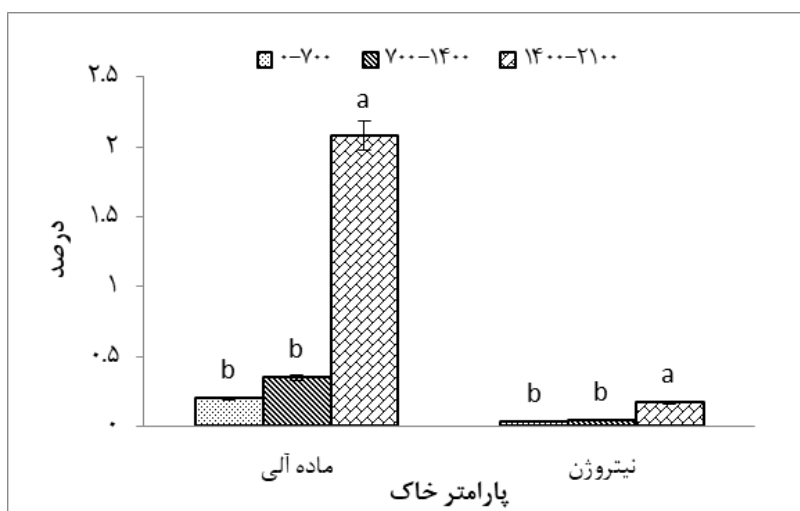
نتایج مقایسه میانگین پارامترهای خاک در طبقات مختلف ارتفاعی نشان می‌دهد که بیشترین درصد آهک و فسفر در طبقه ارتفاعی ۰-۷۰۰ به ترتیب با ۲۱/۵ و ۲۱/۶۳ درصد که اختلاف معنی‌داری نیز با طبقات ۱۴۰۰-۷۰۰ و ۲۱۰۰-۱۴۰۰ نیز

داشته‌اند. بیشترین میزان اسیدیته در طبقه ارتفاعی ۰-۷۰۰ بود که اختلاف معنی‌داری با طبقه ارتفاعی ۷۰۰-۱۴۰۰ نشان نداد اما با طبقه ارتفاعی ۱۴۰۰-۲۱۰۰ اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین و بیشترین درصد شن به ترتیب برای طبقات ۰-۷۰۰ و ۱۴۰۰-۲۱۰۰ به ترتیب با ۲۹/۳۲ و ۴۸/۲۵ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج مقایسه میانگین پارامترهای آهک، فسفر، اسیدیته و شن در طبقات مختلف ارتفاعی (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است)

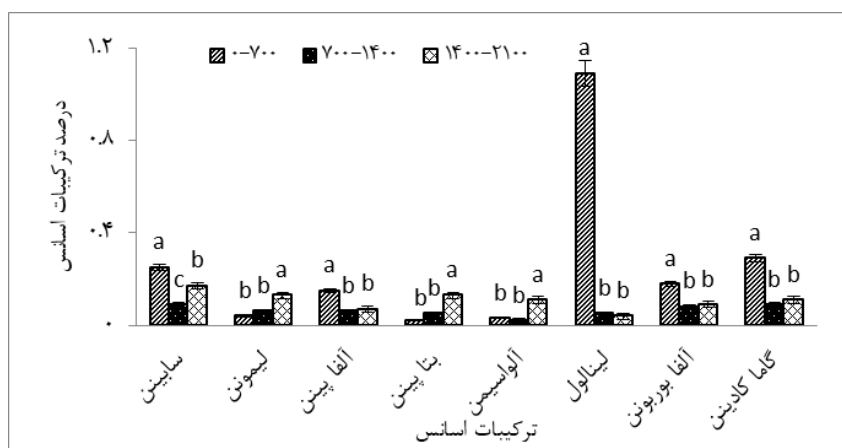
نتایج مقایسه میانگین درصد ماده آلی و نیتروژن نیز مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. بر این اساس بیشترین درصد ماده آلی و نیتروژن برای طبقه ارتفاعی ۱۴۰۰-۲۱۰۰ به ترتیب با ۲/۰۸ و ۰/۱۷ درصد بود که اختلاف معنی‌داری نیز با سایر طبقات نشان داد (شکل ۳).



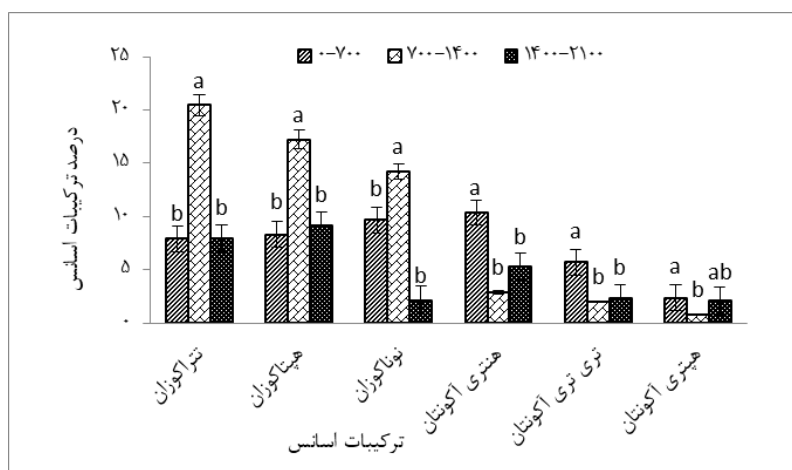
شکل ۳: نتایج مقایسه میانگین پارامترهای ماده آلی و نیتروژن در گرادیان مختلف ارتفاعی (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است)

ترکیبات اسانس سرخس عقابی در مرحله رویشی

با مطالعه بر روی ترکیبات اسانس گیاه سرخس عقابی در مرحله رویشی، در مجموع ۲۹ ترکیب مشاهده شد. نتایج مقایسه‌میانگین نشان دادند در مرحله رویشی گونه سرخس عقابی، ترکیب Linalool (لینالول) در طبقه ارتفاعی ۷۰۰-۷۰۰ با ۱/۰۹، دارای بیشترین درصد بود که اختلاف معنی‌داری نیز نسبت به سایر طبقات نشان داد. همچنین نتایج نشان دادند ترکیب β -Pinene (بتا پینن) در طبقه ۱۴۰۰-۲۱۰۰ با ۰/۱۳ درصد دارای بیشترین درصد بود و اختلاف معنی‌داری را با سایر طبقات داشت. همچنین بیشترین ترکیب Nonacosane (نوناکوزان)، Heptacosane (هپتاکوزان) و Tetracosane (تتراکوزان) در طبقه ۷۰۰-۱۴۰۰ به ترتیب با ۱۴/۲۴، ۱۷/۲۳ و ۲۰/۴۳ درصد بدست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر طبقات ارتفاعی نشان داد (شکل ۴ و ۵).



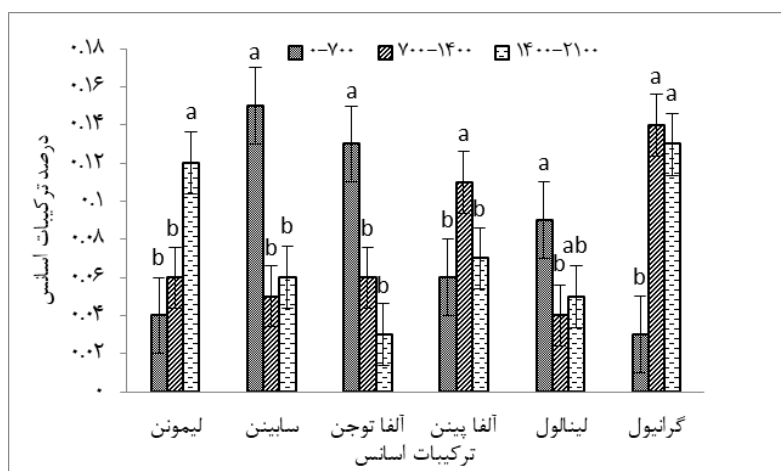
شکل ۴: مقایسه میانگین درصد ترکیبات اسانس گونه سرخس عقابی، در مرحله رویشی (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است)



شکل ۵: مقایسه میانگین درصد ترکیبات اسانس گونه مورد مطالعه، در مرحله رویشی (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است)

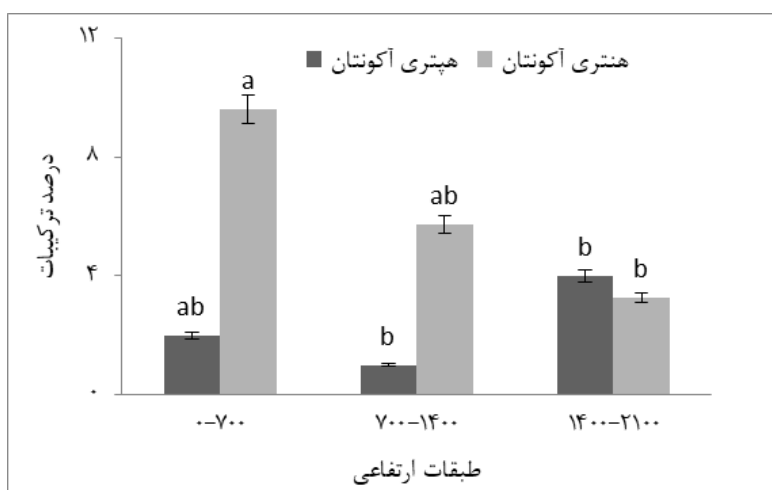
ترکیبات اساسی سرخس عقابی در مرحله زایشی

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات اساسی طی مرحله زایشی گونه سرخس عقابی نشان می‌دهد که Sabinene (سابینن)، α -Thujene (آلفا توجن) و Linalool (لینالول) به ترتیب با ۰/۱۳، ۰/۱۵ و ۰/۰۹ درصد دارای بیشترین مقدار در طبقه ارتفاعی ۰-۷۰۰ است که اختلاف معنی‌داری نیز با طبقه ۷۰۰-۱۴۰۰ و ۱۴۰۰-۲۱۰۰ نشان داد. بیشترین درصد ترکیب Granial (گرانول) برای طبقات ۱۴۰۰-۷۰۰ و ۱۴۰۰-۲۱۰۰ بود که اختلاف معنی‌دار نیز با یکدیگر نشان ندادند (شکل ۶).



شکل ۶: مقایسه میانگین درصد ترکیبات مختلف در اساس گونه مورد مطالعه، طی مرحله زایشی (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است)

نتایج تجزیه و تحلیل ترکیبات Hentriacontane (هنتری‌آکونتان) و Heptriacontane (هپتری‌آکونتان) نشان دادند که بیشترین مقدار هنتری‌آکونتان برای طبقه ۰-۷۰۰ با ۹/۶۱ درصد است که اختلاف معنی‌داری با طبقه ۱۴۰۰-۲۱۰۰ داشت. همچنین بیشترین مقدار هپتری‌آکونتان برای طبقه ۱۴۰۰-۲۱۰۰ بوده که اختلاف معنی‌داری با طبقات دیگر نشان نداد (شکل ۷).



شکل ۷: مقایسه میانگین درصد ترکیبات هنتری آکوتان و هپتری آکوتان در اسانس گونه مورد مطالعه، طی مرحله زایشی (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است)

همبستگی بین ترکیبات اسانس و پارامترهای خاک در گرادیان ارتفاعی مختلف طی مرحله رویشی

نتایج همبستگی پیرسون نشان داده بین ترکیب Sabinene (سابینن) با پتاسیم و فسفر خاک همبستگی معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. همچنین نتایج نشان داده که ترکیب Linalool (لینالول) با آهک، پتاسیم و فسفر در سطح ۱ درصد همبستگی دارد. Nonacosane (نوناکوزان) با پارامتر ماده‌آلی همبستگی منفی در سطح ۱ درصد و با پارامترهای اسیدیته، آهک، پتاسیم، فسفر، نیتروژن و سیلت نیز همبستگی معنی‌داری داشت (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج همبستگی پیرسون بین پارامترهای خاک و ترکیبات اسانس در مرحله رویشی

ترکیبات	ماده‌آلی	اسیدیته	شوری	آهک	پتاسیم	فسفر	نیتروژن	رس	شن	سیلت
سابینن	-۰/۰۴	۰/۴۳۲	-۰/۲۵۰	۰/۵۴	۰/۶۸۰*	۰/۸۳۹*	-۰/۰۹۷	۰/۱۳۱	-۰/۴۴۲	۰/۷۹۱*
لیمونن	۰/۷۴۹*	-۰/۵۶۰	۰/۴۸۷	-۰/۷۱۲*	-۰/۰۵۰	-۰/۵۳۸	۰/۷۳۹*	-۰/۵۰۱	-۰/۳۳۷	-۰/۵۱۵
آلفا پینن	-۰/۴۳۸	۰/۶۷۵*	-۰/۲۲۴	۰/۸۱۴**	۰/۸۳۳**	۰/۹۰۸**	-۰/۴۰۶	۰/۲۵	-۰/۲۰۱	۰/۸۷۲**
بتا پینن	۰/۷۵۹*	-۰/۵۸۴	۰/۳۹۶	-۰/۷۸۱*	-۰/۲۲۲	-۰/۶۰۴	۰/۷۸۷*	-۰/۴۴۹	-۰/۲۶۹	-۰/۵۶۹
آلواسیمین	۰/۸۵۹**	-۰/۳۱۹	۰/۳۰۱	-۰/۵۳۵	-۰/۰۳۲	-۰/۳۴۱	۰/۸۹۱**	-۰/۶۸۵*	-۰/۴۵۸	-۰/۲۸۹
آلفا توجن	۰/۷۰۶*	-۰/۴۸۷	۰/۱۱۴	-۰/۵۹۸	-۰/۳۶۲	-۰/۴۰۸	۰/۵۸۱	-۰/۳۶۵	-۰/۱۶۲	-۰/۳۸۲
لینالول	-۰/۵۶۴	۰/۷۳۳*	-۰/۴۲۴	۰/۸۹۵**	۰/۸۰۰**	۰/۸۹۸**	-۰/۵۵۰	-۰/۴۴۰	-۰/۱۳۳	۰/۹۷۶**
آلفا بوربونن	-۰/۴۳۰	۰/۶۷۰*	-۰/۴۹۳	۰/۸۵۴**	۰/۶۲۰	۰/۸۴۳**	-۰/۳۲۶	۰/۲۹۰	-۰/۳۹۱	۰/۸۸۷**
گاما کادینن	-۰/۴۹۱	۰/۶۵۴*	-۰/۴۱۴	۰/۸۴۸**	۰/۸۵۰**	۰/۹۷۵**	۰/۸۴۹	۰/۴۲۸	-۰/۲۵۳	۰/۹۶۷**
تتراکوزان	-۰/۳۲۰	-۰/۰۲۶	-۰/۱۷۱	-۰/۱۲۵	-۰/۷۲۷*	-۰/۴۴۵	-۰/۴۰۵	۰/۱۰۱	۰/۷۴۰*	-۰/۴۱۳
نوناکوزان	-۰/۷۱۸*	۰/۷۳۰*	-۰/۳۳۲	۰/۸۶۷**	۰/۷۳۷*	۰/۸۷۲**	-۰/۷۰۵*	۰/۴۶۰	۰/۰۹۸	۰/۸۳۵**
تری-آکوتان	۰/۶۲۲	-۰/۳۵۸	۰/۲۰۰	-۰/۷۱۳*	۰/۶۳۷	-۰/۶۷۵*	۰/۴۳۷	-۰/۶۰۴	۰/۴۴۳	-۰/۶۵۱

ترکیبات	ماده آلی	اسیدیته	شوری	آهک	پتاسیم	فسفر	نیتروژن	رس	شن	سیلت
هنتری- آکونتان	-۰/۲۸۴	۰/۵۵۹	-۰/۳۵۶	۰/۷۰۲*	۰/۸۲۲**	۰/۸۶۰**	-۰/۲۸۹	۰/۱۷۷	۰/۳۲۰	۰/۸۴۲**
تری-تری- آکونتان	-۰/۳۸۴	۰/۳۳۶	-۰/۲۸۴	۰/۶۱۸	۰/۶۸۱*	۰/۸۲۴**	-۰/۴۴۴	۰/۵۴۶	-۰/۲۵۸	۰/۷۷۰*
هپتری- آکونتان	۰/۱۳۳	۰/۲۷۲	-۰/۲۰۶	۰/۲۶۷	۰/۶۶۵*	۰/۵۰۳	۰/۱۹۷	-۰/۱۸۲	-۰/۴۰۱	۰/۴۶۲

همبستگی بین ترکیبات اسانس و پارامترهای خاک در گرادیان ارتفاعی مختلف طی مرحله زایشی

نتایج آنالیز همبستگی پیرسون پارامترهای خاک و ترکیبات اسانس در مرحله زایشی نشان دادند که Sabinene (سابینن) همبستگی مثبت و معنی داری را با اسیدیته، آهک، فسفر و سیلت برقرار نموده است. α -Thujene (آلفا توجن) همبستگی مثبت و معنی داری با آهک، ماده آلی، پتاسیم، فسفر، نیتروژن، رس، شن و سیلت نشان داد. Hepteriacontane (هپتری آکونتان) همبستگی مثبت و معنی داری را فقط با نیتروژن برقرار نمود (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج همبستگی پیرسون بین پارامترهای خاک و ترکیبات اسانس در مرحله زایشی

ترکیبات	ماده آلی	اسیدیته	شوری	آهک	پتاسیم	فسفر	نیتروژن	رس	شن	سیلت
سابینن	-۰/۴۰۰	۰/۷۸۷*	-۰/۴۴۶	۰/۶۳۹*	۰/۶۶۰*	۰/۷۵۵*	-۰/۴۲۵	-۰/۰۳۱	-۰/۳۴۹	۰/۷۵۶*
لیمونن	۰/۸۰۸*	-۰/۵۳۷	۰/۴۸۴	-۰/۷۷۹	-۰/۳۳۲	-۰/۵۹۸	۰/۸۶۵*	-۰/۵۹۸	۰/۷۰۳*	-۰/۶۱۹
آلواسیمین	۰/۶۵۱*	-۰/۶۹۱*	۰/۵۰۷	-۰/۷۰۶*	-۰/۵۳۸	-۰/۵۶۵	۰/۵۸۳	-۰/۲۱۰	۰/۴۲۲	-۰/۶۰۲
آلفا توجن	-۰/۷۳۹*	۰/۴۹۸	-۰/۳۹۸	۰/۸۳۴**	۰/۶۶۴**	۰/۸۵۲**	۰/۷۰۸*	۰/۶۹۹*	-۰/۸۹۱**	۰/۸۱۰**
گرانبول	-۰/۳۳۴	-۰/۵۴۵	۰/۱۷۵	-۰/۶۸۵*	-۰/۶۱۷	-۰/۶۸۶**	۰/۳۹۸	-۰/۲۸۶	۰/۵۵۸	-۰/۷۸۱*
لینالول	-۰/۳۲۵	۰/۵۶۹	-۰/۲۵۹	۰/۶۸۷*	۰/۶۰۱	۰/۷۰۷*	-۰/۱۸۱	-۰/۱۰۰	-۰/۳۷۳	۰/۶۸۷*
گاما کادینن	۰/۴۳۸	-۰/۳۷۴	۰/۵۲۵	-۰/۵۹۴	-۰/۳۵۴	-۰/۵۵۴	۰/۴۷۵	۰/۳۱۶	۰/۶۵۰*	-۰/۶۳۳
تتراکوزان	-۰/۴۵۷	۰/۴۴۴	-۰/۳۸۰	-۰/۶۱۴	-۰/۶۱۷	۰/۷۰۰*	-۰/۵۰۱	۰/۳۷۸	۰/۷۴۰*	۰/۶۵۱*
تری آکونتان	۰/۷۵۷*	۰/۶۴۹*	-۰/۳۸۸	۰/۷۷۶*	۰/۳۳۱	۰/۵۹۱	۰/۷۰۶*	۰/۳۳۴	-۰/۴۹۹	۰/۵۵۸
هنتری آکونتان	-۰/۶۴۳	۰/۶۳۴	-۰/۵۲۱	۰/۸۲۹**	۰/۳۸۴	۰/۷۸۹*	-۰/۲۸۹	۰/۷۲۵	-۰/۷۵۵	۰/۸۰۸**
هپتری آکونتان	۰/۶۵۲	۰/۲۲۰	-۰/۲۷۶	-۰/۳۰۱	۰/۱۰۴	۰/۱۳۰	۰/۸۲۲**	-۰/۴۸۰	-۰/۴۲۰	۰/۱۰۹

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در گرادیان ارتفاعی مختلف در منطقه مورد مطالعه بیانگر این است که پارامترهای درصد مواد آلی، درصد آهک، میزان نیتروژن و فسفر در سطح یک درصد و میزان اسیدیته خاک و درصد شن خاک در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی داری در طبقات ارتفاعی مختلف هستند. یافته‌های این تحقیق با نتایج حاصل از بررسی‌های دادگر و همکاران (۱۳۹۱)؛ Gartan و همکاران (۱۹۹۹)؛ سروری و همکاران (۱۳۹۴) و Curado و همکاران (۲۰۰۶) همخوانی دارد. به نظر می‌رسد که برخی ویژگی‌های خاکی با تغییرات ارتفاع تغییر می‌کنند که این عمل ناشی از تاثیرات عوامل اقلیمی است. طبق نتایج با افزایش ارتفاع، درصد مواد آلی، میزان نیتروژن و درصد شن افزایش و درصد آهک، فسفر و هدایت الکتریکی خاک کاهش می‌یابد. می‌توان بیان نمود افزایش میزان مواد آلی به دلیل کم بودن میزان پوسیدگی و تجزیه در ارتفاعات

بالا همراه با کاهش دما باشد. همچنین کاهش درصد آهک به دلیل فرسایش و آبشویی بالای خاک در ارتفاعات است که منجر به افزایش انحلال سنگ آهک در خاک می‌شود که با نتایج دادگر و همکاران (۱۳۹۱)؛ Gartan و همکاران (۱۹۹۹) و کباری و همکاران (۱۳۹۴) مطابقت دارد. اما طبق نتایج سروری و همکاران (۱۳۹۴) بیان نمودند با افزایش ارتفاع درصد مواد آلی خاک کاهش می‌یابد.

تغییرات میزان نیتروژن در این پژوهش با نتایج آذرنیوند و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت دارد به طوری که با افزایش ارتفاع، میزان نیتروژن نیز افزایش می‌یابد. می‌توان بیان نمود با افزایش ارتفاع، تغییرات شرایط آب و هوایی بر عناصر خاک تاثیر می‌گذارند. به طوری که با افزایش ارتفاع شرایط دما و رطوبت برای جذب رطوبت بیشتر توسط خاک، مناسب تر است بنابراین میزان نیتروژن خاک نیز افزایش می‌یابد. منبع مهم تولید نیتروژن، ماده آلی است و در ارتباط مستقیم با آن است. میزان فسفر قابل جذب وابسته به عمق خاک است. با افزایش ارتفاع و با توجه به اینکه از عمق خاک کاسته می‌شود، کاهش میزان فسفر خاک مشاهده می‌شود که با نتایج صفائی (۱۳۹۶)، کباری و همکاران (۱۳۹۴)، Wu و همکاران (۲۰۰۸)، گودرزی و همکاران (۱۳۹۱)، آذرنیوند و همکاران (۱۳۸۸) همخوانی دارد.

Nwiloh و همکارانش (۲۰۱۴)، ترکیبات اسانس سرخس عقابی را در کشور نیجریه مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها ۴۲ ترکیب در این گیاه شناسایی نمودند و اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس آن را، ترکیبات Tetratriacontane (تتراآکونتان)، Triacontane (تری‌آکونتان)، Heptacosane (هپتاکوزان) اعلام کردند. Awe & Amobi (۲۰۱۵)، بر روی گونه سرخس عقابی مطالعاتی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره متانولی این گیاه دارای ترکیبات اگزالات، کوئینین‌ها، کاروتینوئیدها، ساپونین‌ها، فلوپاتانین‌ها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، تانن‌ها، گلیکوزیدها و آلکالوئیدها هستند که ممکن است برخی از این ترکیبات در فعالیت‌های ضدباکتریایی نقش مهم و بسزایی داشته باشند. علت تفاوت‌ها در مقادیر ترکیبات اسانس این گونه در مطالعات دیگران با پژوهش حاضر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های اکولوژیک مناطق رویشی این گونه باشد. به طوری که با توجه به این پژوهش به نظر می‌رسد که این تغییرات می‌تواند ناشی از تاثیر عوامل خاکی و ارتفاع از سطح دریا باشد. با افزایش ارتفاع، به دلیل تابش بیشتر نور خورشید در مراتع ییلاقی میزان اسانس افزایش می‌یابد. چرا که افزایش زمان تابش نور موثرترین عامل در ترکیبات اسانس است و کاهش نور در طول رویش گیاه سبب کاهش اندازه گل‌ها و در نهایت مقدار اسانس موجود در آن‌ها شده است. برخی از محققان نیز وجود ارتباط بین خصوصیات روشنایی و تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهان دارویی را اثبات کردند و بیان کردند که در بسیاری از گیاهان افزایش زمان نوردهی باعث افزایش ترکیبات و تغییر در ساختار اسانس می‌شود (Bernath, 2000).

برخی از پارامترهای خاک، دارای اثر معنی داری بر تعدادی از ترکیبات اسانس سرخس عقابی هستند. این نتایج در مورد سایر گونه های گیاهی با یافته های Xiufeng Yan و همکاران (۲۰۰۴)، David & Zbigniew (۲۰۱۰)، صفائی و همکاران (۱۳۹۶) مطابقت داشت. تفاوت گونه های مورد مطالعه، همچنین وجود برخی از تفاوت ها در نتایج این تحقیق با تحقیقات دیگران می تواند ناشی از تغییرات ارتفاع از سطح دریا و خصوصیات خاک مناطق جمع آوری نمونه های گیاهی باشد. می توان گفت که گونه های مختلف واکنش های متفاوتی نسبت به عوامل محیطی از جمله ارتفاع از سطح دریا، از خود نشان می دهند. بطوریکه براساس نتایج این تحقیق و پژوهش های دیگران می توان بیان نمود عملکرد گیاهان در اکوسیستم ها تحت تاثیر عوامل مختلفی چون نوع خاک، درجه حرارت، رطوبت نسبی و ارتفاع از سطح دریا قرار دارد که هر یک از این عوامل می توانند تاثیر بسزایی بر کمیت و کیفیت اسانس گونه ها داشته باشند (Yimer et al., 2006).

با توجه به بررسی همبستگی ترکیبات اسانس گیاه سرخس عقابی و خصوصیات مختلف خاک در گرادیان ارتفاعی مختلف در مرحله رویشی گیاه می توان گفت که طبقه ارتفاعی بر میزان اسانس گیاه در مرحله رویشی اثر معنی داری داشت. بین طبقات ارتفاعی منطقه مورد بررسی و میزان برخی از ترکیبات اسانس در این مرحله از رشد گیاه تفاوت معنی دار وجود داشت که با یافته های حبیبی و همکاران (۱۳۸۵)، محمدنژاد گنجی و همکاران (۱۳۹۳) و نیکخواه و همکاران (۱۳۹۶) همخوانی دارد. مقایسه ترکیب های موجود در اسانس سرخس عقابی با گونه های گیاهی بیانگر وجود تغییرات زیاد در ترکیب شیمیایی اسانس این گیاه است و این تغییرات می تواند خواص و کاربرد اسانس را تحت تاثیر قرار دهد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق می توان بیان نمود که مهمترین عوامل موثر بر ترکیبات اسانس گونه سرخس عقابی ارتفاع از سطح دریا، ماده آلی، فسفر، آهنک و نیتروژن است. همچنین میزان اسانس در مرحله رویشی بیشتر از مرحله زایشی است. در نتیجه می توان بیان نمود مرحله رشد گیاه تاثیر بسزایی در میزان ترکیبات اسانس خواهد داشت.

منابع

آذرنیوند، ح.، قوام عربانی، م.، سفیدکن، ف.، طویلی، ع. (۱۳۸۸). بررسی تاثیر ویژگی های اکولوژیک (خاک و ارتفاع) بر کمیت و کیفیت اسانس گل و برگ *Achillea millefolium* L subsp. *Millefolium*. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان داروئی و معطر ایران، ۲۵ (۴): ۵۵۶-۵۷۱.

ادبی فیروزجائی، ر.، قربانی، ج.، زالی، س.ح.، (۱۳۹۴). گونه‌های گیاهی مهاجم خطری برای اکوسیستم‌های طبیعی (مطالعه موردی: وضعیت هجوم گیاه سرخس عقابی در مراتع ییلاقی دامنه شمالی البرز)، سومین همایش ملی پژوهش‌های محیط زیست و کشاورزی ایران، صفحه ۱۰-۱.

امید بیگی، ع. (۱۳۷۹). رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی، ۱(۲): ۴۶ص.

امیدبیگی، ر. (۱۳۷۴). رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات فکر روز، ۱: ۲۸۳ص.

امیدبیگی، ر. (۱۳۸۸). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. چاپ پنجم. انتشارات آستان قدس رضوی. ۱: ۴۰۰ص. جلد اول.

بانج شفیعی، ع.، عزیزی، پ.، جلالی، س.غ. (۱۳۸۲). بررسی تاثیر مقادیر مختلف سرخس عقابی بر کیفیت کمپوست شدن خاک اره گونه اورامریکان. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۶۱: ۸۰-۸۴.

جنگجو، م. (۱۳۸۸). اصلاح و توسعه مرتع. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

حامیان، پ.، المدرسی، س. ع.، عفتی، م.، کاوسی، ح.، رشیدی، ع. (۱۳۹۴). مکانیابی مجتمع گردشگری به روش تصمیم‌گیری چند معیاره با استفاده از سیستم اطلاعات جغرافیایی (مطالعه موردی شهرستان ماسال)، فصلنامه تحقیقات جغرافیایی، ۳۰(۴): ۱۳۰-۱۱۶.

حبیبی، ح.، مظاهری، د.، مجنون حسینی، ن.، چائی‌چی، م. ر.، فخرطباطبایی، م.، بیگدلی، م. (۱۳۸۵). اثر ارتفاع بر روغن، اسانس و ترکیبات گیاه دارویی آویشن وحشی (مطالعه موردی: منطقه طالقان)، پژوهش و سازندگی در باغبانی، ۱۹(۴): ۱-۱۰.

حسینی، س. ع.؛ دری، م. ع. (۱۳۸۳). بررسی مقدماتی استقرار و عملکرد سرشاخه گلدار گل راعی *Hypericum perforatum* جمع‌آوری شده از درازنو و گرمابدشت در استان گلستان. فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۰(۴): ۳۹۷-۴۰۶.

دادگر، ن.، قربانی، ا.، هاشمی مجد، ک. (۱۳۹۱). ارزیابی تغییرات پارامترهای شیمیایی خاک به ارتفاع در مراتع جنوب شرقی سبلان. دومین کنگره ملی کشاورزی ارگانیک و مرسوم، بخش دوم: مدیریت آب، خاک و اقلیم در کشاورزی مرسوم. ۲: ۲۱۴-

سروری، ا.، دیانتی تیلکی، ق.، رضایی، م. ب. زادبر، م. (۱۳۹۴). تاثیر برخی فاکتورهای محیطی بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه *Stachys lavandifolia vahl* در استان خراسان رضوی (چناران). فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۱۰ (۲): ۷-۱.

صالحی سورمقی، م. ح. (۱۳۸۵). گیاهان داروئی و گیاه درمانی. انتشارات دنیای تغذیه، ۱: صفحه ۴۰۳.

صفائی، ل.، شریفی عاشورآبادی، ا.، افیونی، د. (۱۳۹۶). بررسی فاکتورهای محیطی اثرگذار بر عملکرد کمی و کیفی آویشن دنیایی (*Thymus daenensis*) در شرایط رویشگاهی و مزرعه‌ای. مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی، ۹ (۲۹): ۱۹۵-۲۰۳.

کباری آغمیونی، م.، هاشمی مجد، ک.، قربانی، ا.، دستور، ع. (۱۳۹۴). ارزیابی اثر ارتفاع بر برخی خصوصیات شیمیایی خاک در دامنه جنوب شرقی سبلان. اولین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی، ۷-۱.

کریمی، ز.، هوشمند، س. ا.، محمدخانی، ع. ر.، یوسف زاده، ک. (۱۳۹۶). بررسی تاثیر زمان برداشت بر کمیت و کیفیت اسانس دو گونه از گیاه داروئی *Thymus lancifolius* و *Thymus armeniacus*، فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان داروئی، ۵ (۱): ۴۰-۵۱.

کلوندی، ر.، میرزا، م.، صفی‌خانی، ک.، نادری، م. (۱۳۹۲). شناسایی ترکیب‌های شیمیایی اسانس گونه *Rhabdosciadium aucheri boiss.* از ایران. فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۹ (۳): ۶۰۵-۶۱۰.

گودرزی، غ. ر.، احمدلو، ف.، ثاقب طالبی، خ. (۱۳۹۱). تأثیر فیزیوگرافی و برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بر پراکنش گونه بادامک در ۴ منطقه از استان مرکزی. مجله پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل، ۱۹ (۳): ۵۹-۷۶.

محمدنژاد گنجی، س. م.، مرادی، ح.، قنبری، ع.، اکبرزاده، م. (۱۳۹۳). بررسی تاثیر ارتفاع بر کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس گیاه *Rosmarinus officinalis L.* کشت شده در دو منطقه از استان مازندران. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۵ (۲): ۳۶-۴۲.

نصرالهی، ا. (۱۳۸۷). زراعت گیاهان دارویی و ادویه‌ای. انتشارات دانشگاه کشاورزی نراق.

نیکخواه امیرآباد، ح.، حسینی، ب.، قوستا، ی.، و فتاحی، م. (۱۳۹۶). اثر ارتفاع و مراحل فنولوژیک بر خصوصیات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی *Ferulago angulate (Schlecht.) Boiss.* از ارتفاعات دنا. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان

دارویی، ۱۷ (۵): ۱۶-۲۹.

- Awe, S., and Amobi, O. O. 2015. Antibacterial, phytochemical and proximate analysis of *Pteridium aquilinum*. *International Journal*, 2: 1-7.
- Bernath, J., 2000. *Medicinal and Aromatic Plant. Mezo. Publ. Budapest*, PP.667
- Curado, M. A., Oliveira, C. B., Jesus, J. G., Santos, S. C., Seraphin, J. C., and Ferri, P. H. 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, 67(21): 2363-2369.
- David, R., and Zbigniew, A. 2010. Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW 2647 murine macrophages. *Medicinal Plants Research*, 4(3): 225-234.
- Dantonio, C. M. and Chambers, J. C., 2006. Using ecological theory to manage or restore ecosystems affected by invasive plant species: 260-279. In: Falk, D. A., Palmer, M. A. and Zedler, J.B. (Eds.), *Foundations of restoration ecology*. Island Press, Washington, DC, 364p.
- Ehrenfeld, J.G. 2003. Effect of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems*, 6: 503-523.
- Garten, C.T., Post III, W.M., Hanson, P.J., Cooper, L.W., 1999. Forest carbon inventories and dynamics along an elevation gradient in the southern Appalachian Mountains. *Biogeochemistry*. 45: 115-145.
- Hall, I.H. Srarnes, Co, Lee, Kh. and Waddell, TG. 1980. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *J. Pharm Sci*, 69(5): 537-543.
- Harborne, J.B. 1988. *The Flavonoids, Advances in Research since 1980*. London: Chapman and Hall, 292-295: 479-500.
- Havsteen, B.H. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacologic potency. *Biochem pharmacol*, 32(7):1141-1148.
- Midgley, J.M. 1988. Drug development, from sorcery to science. *Pharm. J*, 241:358-365.
- Nwiloh, B. I., Monago, C. C., and Uwakwe, A. A. 2014. Chemical composition of essential oil from the fiddleheads of *Pteridium aquilinum* L. Kuhn found in Ogoni. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(1): 77-80.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watunabe., F.S. and pean L. A. 1954. Estimat on of available phosphoru in plant by efraction with sodiam bicarbonate. *U.S.A circ*, 939.
- Parnbam, M.J., and Kesselring, K. 1985. Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10(9):756-757.

- Schneider, L.C., and D.N. Frenando. 2010. An untidy cover: invasion of Bracken fern in the shifting cultivation systems of the Sothern Yucantan, Mexico. *Biotropica*, 42(1): 41-48.
- Thomas, G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. In: *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. Eds. Sparks, D.L. Pub: Agronomy Monograph, Madison. Pp.475-490.
- Vila, M., J.L. Espinar., M. Hejda., P.E. Hulme., V. Jarosik., J.L. Maron., J. Pergl., U. Schaffner., Y. Sun., and P. Pysek. 2011. Ecological impacts of invasive alien plants: A meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology Letters*, 14: 702-708.
- Walkely, A. and Black, I. A. 1934. An examination of the degty are method for determination of soil organic matter and proposed modification of chronic acid method. *Soil Science*, 37: 29-38.
- Wang, C.Y., H.G. Xiao., J. Liu., L. Wang., and D.L. Du. 2015. Insights into ecological effects of invasive plants on soil nitrogen cycles. *American Journal of Plant Sciences*, 6: 34-46.
- Wu, W., Fan, Y., Wang, Z., and Liu, H. 2008. Assessing effects of digital elevation model resolutions on soil-landscape correlations in hilly area. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 126: 209-216.
- Xiufeng Yan., Shuangxiu Wu., Yang Wang, Xinhai Shang., ShaojunDai. 2004. Soil nutrient factors related to salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* distributed in Chang Bai Mountain. *J. Environmental and Experimental Botany*, 52: 267-276.
- Yimer, F., S. Ledin & A. Abdelkadir, 2006. Soil property variations in relation to topographic aspect and vegetation community in the southeastern highlands of Ethiopia. *Journal of Forest Ecology and Management*, 232: 90-99.

Phytochemical Evaluation of *Pteridium aquilinum* in Masal Elevation Gradient of Gilan province

R. Tamartash^{1*}, M. R. Tatian², H. Andarz Chamani³, S. H. Zali⁴, S. M. Ehsani⁵

Received:2019.9.29

Accepted:2020.11.4

Abstract

Invasive species are globally endangered for ecosystems, and ecologists are increasingly concerned about them. *Pteridium aquilinum* is one of the most invasive species widely distributed in the world. This study investigated the phytochemical of *Pteridium aquilinum* species in different altitude gradients. So, random sampling was performed from vegetation and soil in three altitudes (0-700, 700-1400 and 1400-2100 meters) with three replications for both growth and reproduction stages. In the growth stage, the composition of Linalool was the highest value (1.09) in the altitude of 0-700m. During the reproductive stage, Sabinene and α Thujene had the highest values in the altitude of 0-700m with 0.15 and 0.13%, respectively. The amount of oil in the growth stage is more than the reproductive stage, so it can be concluded that the growth stage will have a significant effect on the amount of oil compounds.

Keywords: Essential oil, Invasive plant, *Pteridium aquilinum*, Masal

1- Associate Professor, Department of Range Management, Faculty of Natural Resources, Sari Agriculture Science and Natural Resource University, Iran

*(Corresponding Author: reza_tamartash@yahoo.com)

2- Associate Professor, Department of Range Management, Faculty of Natural Resources, Sari Agriculture Science and Natural Resource University, Iran

3- M.Sc. graduated in Rangeland Management, Sari Agriculture Science and Natural Resource University, Iran

4- Instructor, Department of Rangeland Management, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, Iran

5- Ph.D. Rangeland Science, Rangeland Management Department, Faculty of Range and Watershed Management, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

تأثیر عوامل اکولوژیکی و اداپیکی بر مواد مؤثره‌ی گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major L.*)

ناصر جعفری^{۱*}، مهدیه فغانی پنبه زاری^۲، اباصلت حسین زاده کلاگر^۳، محمدعلی ابراهیم زاده^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۹

چکیده

گیاه بارهنگ کبیر (*Plantago major L.*) یکی از گیاهان دارویی مهم بوده که در سراسر دنیا در طب سنتی به کار می‌رود. این تحقیق به منظور بررسی تأثیر عوامل اکولوژیکی و اداپیکی بر مواد مؤثره‌ی این گیاه صورت گرفت. برای این منظور گیاه بارهنگ کبیر از مناطق مختلف استان مازندران به نام های شوراب، پایین کلا، و پنبه زارکتی جمع آوری گردید. میزان فنول و فلاونوئید عصاره متانولی اسیدی نمونه های گیاهی، به ترتیب با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید و کوئرستین محاسبه شدند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها به سه روش بدام اندازی DPPH، نیتریک اکساید و قدرت احیاکنندگی بررسی شد. نتایج ما نشان داد همه بارهنگ های مناطق مختلف، دارای محتوای فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی هستند و میزان فعالیت بیولوژیکی عصاره به میزان فنول و فلاونوئید آن بستگی دارد. از سوی دیگر عملکرد آنتی اکسیدانی گونه ی بارهنگ کبیر تحت تأثیر شرایط آب و هوایی و همچنین خصوصیات رویشگاه و عوامل اداپیکی تغییر می کند. براساس این یافته ها پیشنهاد می شود، شناسایی پتانسیل عصاره ی بارهنگ کبیر و انتخاب رویشگاه و مرحله ی فنولوژی بهینه بسیار ضروری است و امکان فراهم کردن استخراج مواد مؤثره در استفاده های کاربردی از فرآورده ها و توان افزایش عملکرد دارویی گیاهان را سبب می شود.

واژه‌های کلیدی: بارهنگ کبیر، عوامل اداپیکی، عوامل اکولوژیکی، فعالیت آنتی اکسیدانی، قدرت احیاکنندگی، مواد مؤثره

۱- دانشیار گروه زیست شناسی علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

* (نویسنده مسئول: n.jafari@umz.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سیستماتیک-بومشناسی، دانشگاه مازندران

۳- استاد گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

۴- استاد گروه شیمی دارویی دانشگاه علوم پزشکی ساری، ایران

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده های حاصل از آن ها نقش گیاهان را در چرخه ی اقتصاد پراهمیت کرده است. به طوری که مصرف رو به افزایش آن ها تنها به کشورهای در حال توسعه محدود نشد بلکه اخیراً در کشورهای توسعه یافته نیز جایگاه ویژه ای به خود اختصاص داده است. در کشور ما به لحاظ تنوع جغرافیایی و اقلیمی، گونه های گیاهی متنوع در آن انتشار دارد. در این میان فلور غنی ایران بیش از ۷۵۰۰ گونه ی گیاهی را در بر می گیرد که تعداد بسیار زیادی از آن ها را گیاهان دارویی تشکیل می دهد و به عنوان مواد اولیه جهت تولید داروهای بیخطر برای انسان استفاده می شوند. اخیراً تحقیق و پژوهش بر روی گیاهان دارویی از نظر خواص آنتی اکسیدانی آن ها که می تواند به عنوان عوامل مؤثر در بهبود سلامتی انسان مطرح باشد، مورد توجه محققان قرار گرفته است (Shaghghi *et al.*, 2019). آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که می توانند از تولید پراکسیدان ها و رادیکال ها جلوگیری کرده و رادیکال های آزاد را خنثی و در نتیجه از ایجاد بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان (Collins, 2005) و حتی نازایی در مردان (Aftabi *et al.*, 2017; Jahantigh & Colagar, 2017) جلوگیری کنند. در واقع در حضور این ترکیبات، اکسید شدن یک ماده به تأخیر می افتد یا از آن جلوگیری می شود. آنتی اکسیدان ها تشکیل گونه های فعال اکسیژن را از روش های مختلفی مانند اتصال به فلزات یا روش آنزیمی مهار می کنند (Sinkakarimi *et al.*, 2018).

متابولیت های ثانوی گیاهی ترکیباتی هستند که توسط سلول های گیاهی تولید می شوند، اما غالباً به مصرف خود گیاه نمی رسند. متابولیت های ثانوی گیاهان دارای کاربردهای مهمی در صنایع مختلف است. اسانس ها، مواد معطر، مواد مؤثره دارویی، حشره کش ها، علف کش ها، قارچ ها، هورمون های گیاهی و مواد آللوپاتیک از این جمله هستند. فرآورده های حاصل از متابولیسم ثانوی گیاهی جزء گرانبهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند، و با استفاده از کشت بافت می توان متابولیت های ثانوی را در شرایط آزمایشگاهی تولید نمود. برخلاف متابولیت های اولیه، غیاب متابولیت های ثانوی به مرگ فوری یاخته منجر نمی شود، اما ممکن است در دراز مدت سبب اختلال در بقای موجود زنده، باروری یا ویژگی ظاهری آن گردد و یا ممکن است هیچ تغییری مشهودی را سبب نشود. این ترکیبات غالباً نقش مهمی را در سیستم های دفاعی گیاهان در مقابل گیاه خواری و دیگر سیستم های دفاعی بین گونه ها بازی می کنند. این ترکیبات معمولاً فرآورده های فرعی متابولیسم هستند (Esmailzadeh Bahabadi & Sharifi, 2013).

تولید متابولیت های ثانوی در گیاهان تحت استرس های محیطی افزایش می یابد. به همین دلیل گیاهان روییده در ارتفاعات کوهستانی به نسبت گیاهان مناطق پست، به دلیل شرایط خشکی، نور آفتاب و اشعه فرابنفش تحت استرس های شدید قرار گرفته و مواد مؤثره در آن ها افزایش می یابد. ارتفاع از سطح دریا از جمله فاکتورهای مهم و تأثیرگذار بر رشد و نمو و عملکرد گیاهان است. تغییرات دما در اثر تغییر ارتفاع، از مهم ترین عوامل مؤثر در تغییرات مربوط به ارتفاع محل زندگی گیاه

است، به طوری که با افزایش یا کاهش ارتفاع، عواملی چون دما، رطوبت نسبی، سرعت باد، میزان آب در دسترس و حتی تابش دریافتی تغییر می کند (Kaghazloo *et al.*, 2017). عوامل زیادی از جمله خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بر میزان متابولیت های ثانوی گیاهی مانند فنول کل، فلاونوئید کل و خواص آنتی اکسیدانی گیاهان دخالت دارند (Caco & Prior, 1998). سنتز ترکیبات ثانوی در گیاهان یکی از مهم ترین مکانیزم های دفاعی در برابر پاتوژن ها بوده و کمیت و کیفیت آن بسته به زیستگاه، اندام و شرایط رویشگاهی متفاوت است (Iranbakhsh *et al.*, 2008). به طور کلی عوامل محیطی شامل خصوصیات اقلیمی، توپوگرافی و خاکی است که باید تأثیر هر کدام از آن ها را بر رشد و نمو، عملکرد و میزان مواد مؤثره ی گیاهان دارویی مورد توجه قرار دارد (Somjen *et al.*, 2004).

جنس بارهنگ در حدود ۴۸۳ گونه دارد که اکثر گیاهان آن یک ساله و گونه های دائمی آن محدود است. این گیاه تقریباً در تمام نقاط ایران از جمله در شمال، غرب، مرکز، شرق، جنوب و جنوب شرقی ایران می روید و در شمال آمریکا، اروپا، ترکیه، آسیای مرکزی، سیریری، افغانستان، پاکستان، عراق، فلات فلسطین و شمال آفریقا رشد می کند. در ترکیبات شیمیایی گیاه بارهنگ گلیکوزیدی به نام اوکوبین و موادی همچون پلانتاژین و ساپونین وجود دارد (Fallahian, 2006). در این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره های متانولی استخراج شده از گیاه بارهنگ کبیر که از ۳ منطقه با ارتفاع متفاوت جمع آوری گردید، مورد بررسی قرار گرفت تا به بهترین شرایط برای بالاترین میزان آنتی اکسیدان پی برده شود.

مواد و روش ها

گیاه بارهنگ در استان مازندران، از سه منطقه با ارتفاع متفاوت به ترتیب از روستای شوراب با ارتفاع ۲۲۰۰ متر از شهرستان سوادکوه و روستای پایین کلا با ارتفاع ۲۶۳ متر و روستای پنبه زارکتی با ارتفاع ۲۰- متر از شهرستان ساری در بهار ۱۳۹۶ جمع آوری گردید. و بعد از شستشو توسط آب، در محیط سایه در هوای آزاد خشک شدند. نمونه های خشک شده پس از پودر شدن در یخچال نگهداری شدند و برای آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (Stark *et al.*, 2008). به منظور عصاره گیری از روش خیساندن استفاده شد. که در این روش ۱۵ گرم از اندام خشک گیاه با ۵۰ میلی لیتر متانول مخلوط شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد. سپس فاز آلی (متانول) جدا و مجدداً حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار گردید. در مرحله آخر، مجموعه ی حلال آلی جمع آوری و سپس توسط دستگاه تبخیر کننده ی چرخان حذف گردید (Rabiei *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری محتوای تام فنولی

محتوای تام فنولی با استفاده از واکنشگر فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی گرم/میلی لیتر) با ۰/۵ میلی لیتر محلول واکنشگر فولین سیوکالتیو و ۰/۰۵ میلی لیتر از محلول ۱۰ درصد کربنات سدیم مخلوط گردید و سپس جذب آن در ۷۶۰ نانومتر پس از هم زدن به مدت یک ساعت در مقابل شاهد قرائت شد. محلول پایه اسید گالیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد، و محتوای تام فنولی بر اساس میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد (Ghasemi *et al.*, 2009). آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین جذب در معادله خط بدست آمد و گزارش شد.

اندازه‌گیری محتوای تام فلاونوئید

میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش های رنگ سنجی ارزیابی شد (Chang *et al.*, 2002). برای این منظور ابتدا غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر از هر عصاره تهیه شد. مقدار ۰/۵ میلی لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات یک مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج ماوراء بنفش - مرئی (UV-Vis)، مدل LAMBDA365 از شرکت Perkin Elmer آمریکا) اندازه‌گیری شد (Chang *et al.*, 2002). محتوای فلاونوئید با استفاده از معادله منحنی استاندارد کوئرستین در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بر اساس میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره، پس از سه بار تکرار آزمایش، محاسبه و میانگین آن‌ها گزارش شد (Ghasemi *et al.*, 2009).

ارزیابی میزان توانایی بدام اندازی رادیکال DPPH

مقدار چهار میلی لیتر از هر عصاره، با غلظت های یک تا ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، را با یک میلی لیتر محلول متانولی از رادیکال چربی دوست ۲، ۲- دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) با غلظت ۱۰ میکرو مولار (بطوریکه غلظت پایانی ۰/۲ میلی مولار DPPH باشد) مخلوط و پس از هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی گرماگذاری شد و سپس جذب آن با استفاده از دستگاه طیف سنج ماوراء بنفش - مرئی (مدل فوق) در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل نمونه شاهد (حاوی ۵ میلی لیتر متانول) قرائت گردید. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی براساس توانایی عصاره در بدام اندازی رادیکال DPPH در مقایسه با توانایی بدام انداختن کنترل مثبت (ویتامین ث یا همان اسکوبیک اسید در غلظت های مشابه با نمونه) است. این میزان مطابق رابطه زیر پس از سه بار تکرار آزمایش، محاسبه و میانگین آن‌ها گزارش گردید.

$$I\% = [(Ab - As) \div AB] \times 100$$

در این رابطه جذب شاهد و جذب نمونه استاندارد به ترتیب با Ab و As نشان داده شده است. (Ebrahimzadeh *et al.*,

2010).

ارزیابی میزان بدام اندازی نیتریک اکساید

این روش بر این مبنا استوار بوده که سدیم نیترو پروساید در محلول های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید نموده که با اکسیژن محیط وارد عمل شده و یون نیتريت تولید می نماید. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنشگر گریس مورد سنجش قرار می گیرد. بدام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن موجب کاهش تولید یون نیتريت خواهد شد. به این منظور سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند، مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد. همان مخلوط واکنش بدون عصاره (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان شاهد بکار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی لیتر واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱ درصد در اسید فسفریک ۲ درصد) اضافه شد. جذب مخلوط در ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک (آب) قرائت شد. مطابق با این روش، میزان مهار رادیکال نیتریک اکساید با غلظت های مختلف عصاره در مقایسه با استاندارد کوئرتستین (با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم کوئرتستین در میلی لیتر)، در ۳ تکرار آزمایش برای هر مورد محاسبه شدند (Ebrahimzadeh *et al.*,

2010).

تعیین قدرت احیاکنندگی

میزان قدرت احیاکنندگی عصاره ها از روش Chen و Yen (۱۹۹۵) ارزیابی شد. غلظت مختلف از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار pH=۶ و ۲/۵ میلی لیتر محلول یک درصد پتاسیم فری سیانید [K₃Fe(CN)₆] مخلوط شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۵۰ ×g سانتریفوژ (مدل Universal 320R از شرکت Hettich، آلمان) شدند. پس از اتمام این مرحله ۲/۵ میلی لیتر از قسمت بالای محلول با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید (FeCl₃) به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آب مقطر به عنوان شاهد، و از آسکوربیک اسید در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد.

آنالیز خاک

نمونه برداری خاک در استان مازندران و از سه منطقه با ارتفاع متفاوت به ترتیب از روستای شوراب با ارتفاع ۲۲۰۰ متر از شهرستان سوادکوه، روستای پایین کلا با ارتفاع ۲۶۳ متر و روستای پنبه زارکتی با ارتفاع ۲۰- متر از شهرستان ساری در بهار ۹۶ صورت گرفت. از هر یک از این مناطق، سه نقطه به صورت تصادفی انتخاب شد و با بیلچه به عمق ۲۰-۳۰ سانتی متر و به وزن تقریبی ۱ کیلوگرم برداشته و سپس این نمونه ها کاملاً با هم مخلوط شدند ، و یک نمونه یک کیلوگرمی از آن به عنوان نمونه ی خاک آن منطقه به آزمایشگاه ارسال شد. خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک شامل بافت خاک (روش هیدرومتری)، کربن آلی و مواد آلی خاک (روش والکلی بلک)، پتاسیم قابل جذب (دستگاه Flame photometer)، فسفر قابل جذب به روش Olsen و همکاران (۱۹۵۴)، نیتروژن خاک (روش کج‌دال)، آهک خاک (خنثی نمودن با اسید کلریدریک)، عناصر کم مصرف به روش Norvell و Lindsay (۱۹۷۸) و هدایت الکتریکی (گل اشباع) در این مطالعه به روش Black (۱۹۷۹) اندازه گیری شدند. بافت خاک به روش هیدرومتری و با استفاده از مثلث بافت خاک اندازه گیری شد. در این روش ۵۰ گرم خاک نرم در داخل بشر ریخته و تا نصف آن آب مقطر و سپس ۱۰ میلی لیتر هگزا متافسفات سدیم (۱۰ درصد) افزوده و به وسیله ی همزن برقی ۱۵ دقیقه عمل هم زدن انجام شد. سپس مخلوط خاک و آب را داخل استوانه مدرج یک لیتری ریخته و حجم کل با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. قرائت اول پس از ۴۰ ثانیه هم زدن اولیه انجام شد. عدد قرائت شده میزان رس و سیلت را نشان داد. در این هنگام شن درشت تر وریز تر ته نشین می شوند (Bouyoucos, 1962). کربن و مواد آلی به روش Walkely و Black (۱۹۳۴) اندازه گیری شدند. برای این منظور ابتدا مقداری از خاک در هاون چینی کوبیده شد. سپس حدود یک گرم از نمونه خاک را در ارلن مایر ۲۵۰ سی سی ریخته و به آرامی ۱۰ سی سی دی کرومات پتاسیم به آن اضافه شد. سپس ۱۰ سی سی اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شد و نمونه با فرو آمونیوم سولفات تیترا شد. به محض اینکه به رنگ سبز لجنی درآمد، تیترا قطع گردید و حجم مصرفی فرو آمونیوم سولفات محاسبه شد (Walkely & Black, 1934). برای انجام پتاسیم قابل جذب، ابتدا از محلول ۱۰۰ ppm پتاسیم کلرید، محلول های استاندارد با غلظت های ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ تهیه شد. بعد با استفاده از دستگاه Flame photometer عدد مربوط به هر غلظت قرائت شد و سپس عدد مربوط به عصاره خاک نمونه با استفاده از این دستگاه به دست آمد و منحنی مربوط به آن رسم و نتایج تفسیر شدند (Trivedy & Goel, 1986).

فسفر قابل جذب به روش Olsen (۱۹۵۴) اندازه گیری شد. برای این منظور ابتدا ۵ گرم از نمونه ی خاک توزین و در بطری پلی اتیلن ۲۵۰ میلی لیتر قرار گرفت. دو نمونه بلانک به عنوان شاهد به نمونه ها اضافه شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر از محلول عصاره گیری بی کربنات سدیم به آن اضافه شد و بعد از نیم ساعت شیکر بلافاصله با کاغذ صافی شماره ۴۲ صاف شدند.

بعد از صاف شدن نمونه ها، ۵ میلی لیتر از عصاره، بلانک و استانداردها را در ارلن مایر ۱۲۵ میلی لیتر بطور جداگانه ریخته و ۵ میلی لیتر از مخلوط صاف شده به آن ها اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر با دور ۱۰۰ در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از گذشت یک ساعت، رنگ آبی کامل شد و با دستگاه اسپکتروفوتومتر روی طول موج ۸۸۰ نانومتر یا ۷۲۰ نانومتر قرائت شد (Olsen, 1954).

اندازه گیری نیتروژن کل در خاک به روش عمومی کج‌دال انجام شد (Bremner & Mulvaney, 1965). برای این منظور یک گرم خاک هاون و نرم شده که از الک ۵۰۰ میکرونی عبور داده شد را در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری پیرکس ریخته، سپس ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۳ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۱۸ مولار) به آن اضافه شد. پس از انجام فرآیند هضم که با افزایش تدریجی دمای مخلوط تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد، در مدت ۲/۵ تا ۲۴ ساعت که رنگ مخلوط به سبز مایل به آبی یا سفید شد، که نشان دهنده اتمام واکنش هضم است. مخلوط هضم شده، در دمای اتاق سرد شد و به آن ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس مقدار ۲۵ میلی لیتر از اسید بوریک (۲ درصد در آب) و اندیکاتور، در ارلن مایر ۱۲۵ ریخته شد و در دستگاه مبرد قرار گرفت. بعد از شستشوی بالن، مقدار ۲۰ میلی لیتر سود ۱۰ نرمال به نمونه اضافه شد. بلافاصله شیر قیف بسته شد و با برقراری حرارت در سیستم، حجم اسید بوریک زیر مبرد به ۷۵ میلی لیتر رسید. سپس ارلن از سیستم جدا و بعد از شستشوی انتهای مبرد، با اسید سولفوریک ۱ درصد نرمال تیترا شد تا رنگ از سبز به صورتی تبدیل شد. در این روش، نیتروژن موجود در خاک ابتدا به صورت سولفات آمونیوم و سپس به صورت آمونیوم آزاد و توسط اسید بوریک به بورات آمونیوم تبدیل شد (Bremner & Mulvaney, 1965).

برای تعیین مقدار عناصر کم مصرف (آهن، روی، مس، منگنز) قابل دسترس در خاک با روش Lindsay و Norvell (۱۹۸۷) صورت گرفت. برای این منظور مقدار ۵ گرم خاک مورد نظر در داخل یک ارلن ریخته شد و ۱۰ سی سی محلول عصاره گیر DTPA (دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید) با غلظت ۰/۰۰۵ مولار به آن اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت نیم ساعت شیکر گردید و توسط کاغذ صافی عصاره زلالی از آن به دست آمد. پس از تنظیم دستگاه شعله اسپکترومتری اتمیک و کالیبراسیون استانداردها، میزان جذب را قرائت و غلظت عناصر تعیین شد (Lindsay & Norvell, 1987).

اندازه گیری آهک خاک به روش خنثی نمودن با اسید کلریدریک صورت گرفت. بر روی وزن معینی از خاک مقدار معینی اسید کلریدریک ریخته شد، بخشی از اسید با آهک خنثی شد. باقی مانده اسید از طریق تیتراسیون با سود بدست آمد و از آنجا اسید مصرفی برای خنثی کردن آهک محاسبه شد (Trivedy & Goel, 1986). اندازه گیری هدایت الکتریکی خاک با روش گل اشباع صورت گرفت. برای اندازه گیری هدایت الکتریکی خاک ابتدا ۲۰ گرم از نمونه خاک در یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری وزن شد و سپس مقدار ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه به طور متناوب همزده و به مدت

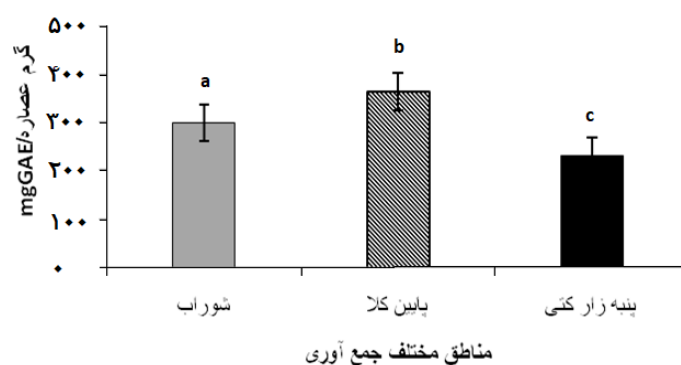
یک ساعت در حالت استراحت قرار گرفت. سپس با استفاده از یک دستگاه کنداکتومتر مقدار هدایت الکتریکی (EC) سوسپانسیون قرائت شد (Bouyoucos, 1962).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه آماری داده‌های به دست آمده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۶ استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها، با آزمون حداقل تفاوت معنی داری (LSD) انجام و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از برنامه Excel 2016 ترسیم شدند.

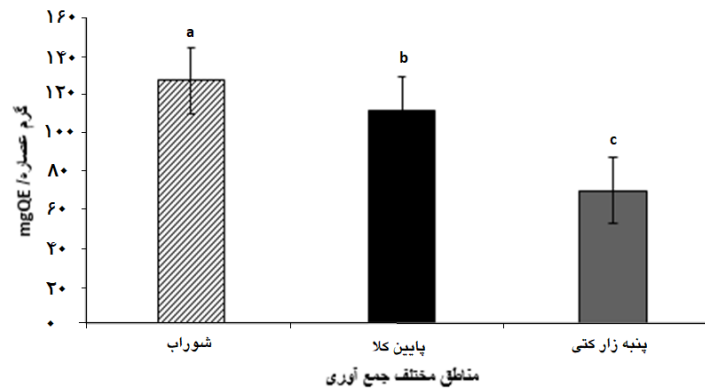
نتایج

محتوای تام فنولی با روش فولین سیوکالتیو به صورت اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره بر اساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد. همانطوریکه در شکل ۱ نشان داده شد، بیشترین مقدار ترکیبات فنولی کل مربوط به عصاره‌ی بارهنگ در منطقه‌ی پایین کلا با مقدار (۳۶۵/۰۷) و کمترین مقدار مربوط به پنبه زارکتی با مقدار (۲۳۱/۴۴) است. هم‌چنین بر طبق آنالیز واریانس داده‌ها، رابطه‌ی معنی داری میان میزان فنول در هر سه منطقه‌ی شوراب، پایین کلا و پنبه زارکتی در سطح $0/05$ مشاهده شد.



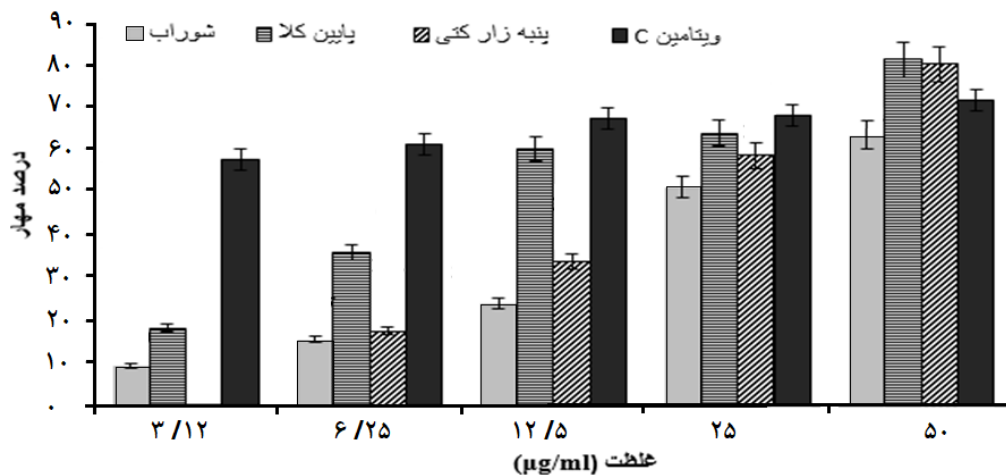
شکل ۱: مقدار ترکیبات فنولی تام عصاره‌های گیاه بارهنگ مناطق مختلف: مقادیر بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک عصاره است.

محتوای فلاونوئیدی تام بر مبنای معادله‌ی خط منحنی استاندارد به صورت اکی والان میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره محاسبه شد. نتایج نشان دادند که بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به گیاه بارهنگ در منطقه‌ی شوراب است (شکل ۲). هم‌چنین بر طبق آنالیز واریانس داده‌ها، رابطه‌ی معنی داری میان میزان فلاونوئید در هر سه منطقه‌ی شوراب، پایین کلا و پنبه زارکتی در سطح $0/05$ مشاهده شد.



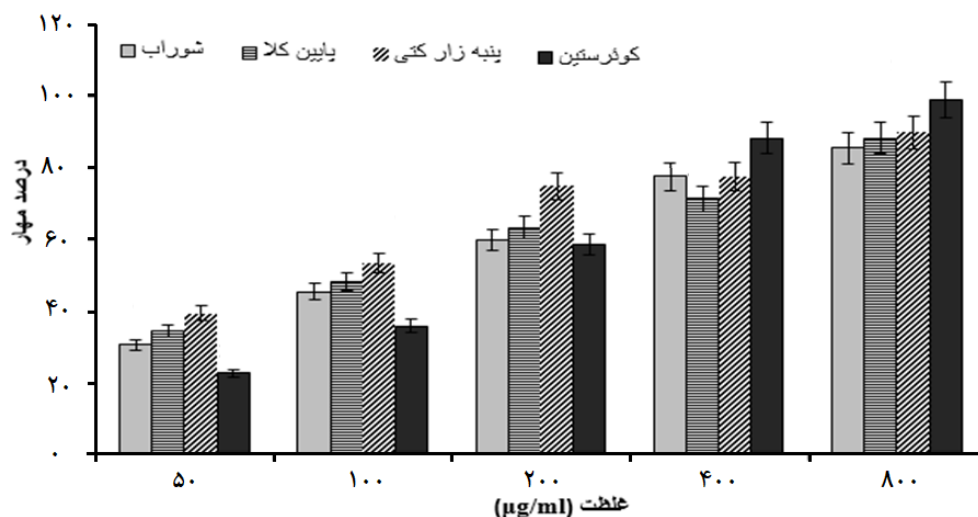
شکل ۲: مقدار ترکیبات فلاونوئیدی عصاره گیاه بارهنگ مناطق مختلف: مقادیر بر حسب میلی گرم کوئرستین در گرم وزن خشک عصاره می باشد.

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه بارهنگ مناطق مختلف، ارزیابی میزان توانایی عصاره در بدام اندازی رادیکال DPPH انجام شد. با توجه به اینکه رادیکال DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن است که با احیا توسط فرآیندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می شود. ترکیباتی که قابلیت انجام این عمل را دارند به عنوان یک آنتی اکسیدان مطرح می شوند. نتایج نشان داد رابطه ی معناداری بین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه بارهنگ منطقه ی شوراب و پابین کلا و منطقه ی شوراب و پنبه زار کتی در سطح ۰/۰۵ وجود دارد. اما میان منطقه ی پابین کلا و پنبه زار کتی اختلاف معناداری وجود ندارد. از طرفی طبق آنالیز آماری با مقایسه ی این سه منطقه با استاندارد ویتامین ث، هیچ گونه اختلاف معناداری میان آن ها مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۳: ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاه بارهنگ مناطق مختلف و استاندارد با روش DPPH

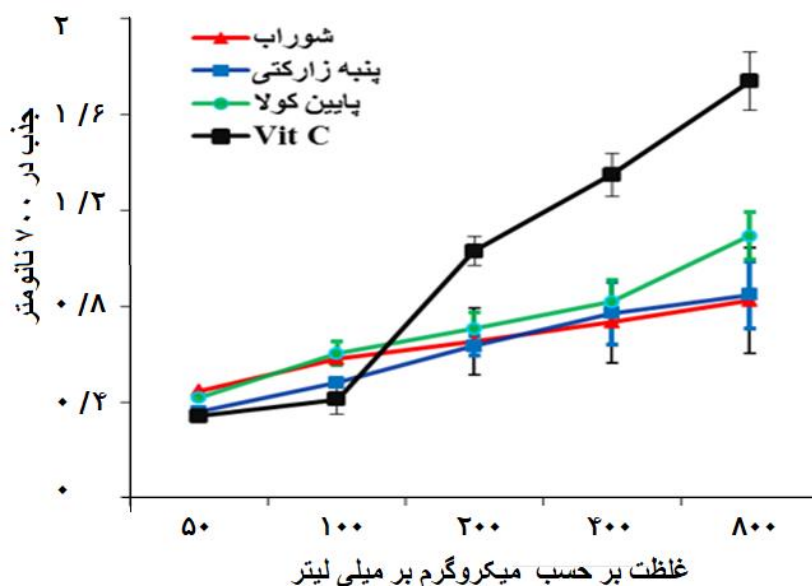
مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه بارهنگ در روش بدام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید که کوئرستین به عنوان استاندارد به کار گرفته شد، نشان داد رابطه‌ی معناداری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه بارهنگ منطقه‌ی شوراب و پایین کلا در سطح ۰/۰۵ و منطقه‌ی شوراب و پنبه زارکتی در این سطح وجود دارد (شکل ۴) اما میان منطقه‌ی پایین کلا و پنبه زارکتی اختلاف معناداری وجود ندارد. از طرفی طبق آنالیز آماری با مقایسه‌ی این سه منطقه با استاندارد کوئرستین، اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۵ میان آن‌ها مشاهده شد.



شکل ۴: ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاه بارهنگ مناطق مختلف و استاندارد با روش بدام اندازی رادیکال

نیتریک اکساید

نتایج مطالعه قدرت احیاکنندگی عصاره گیاه بارهنگ نشان داد که عصاره‌ی متانولی بارهنگ منطقه‌ی پایین کلا، قدرت احیاکنندگی بهتری نسبت به دو منطقه‌ی دیگر دارد (شکل ۵). بطوری که این قدرت احیاکنندگی با افزایش غلظت عصاره زیاد می‌شود. اما قدرت احیاکنندگی این عصاره‌ها در مقایسه با ویتامین ث با اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۵، میزان احیاکنندگی کمتری را نشان می‌دهند (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار مقایسه‌ای میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گیاه بارهنگ و استاندارد ویتامین ث در احیا آهن III

بررسی بین میانگین دمای سالیانه با فاکتورهای خاک از جمله هدایت الکتریکی (EC) و پتاسیم قابل جذب (av.P)، همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و با نیتروژن (N)، ماده‌ی آلی خاک (OM)، کربن آلی (OC) و شن (Sand)، همبستگی منفی در سطح ۰/۰۵ وجود دارد (جدول ۳). همچنین با فاکتورهایی از جمله pH، لای (Silt) و روی (Zn) به ترتیب همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۵) دارد. همچنین این مطالعه نشان داد بین میانگین حداقل دمای سالیانه با محتوای فلاونوئیدی همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و با آزمون نیتریک اکساید و DPPH همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ وجود دارد. ولی با محتوای فنولی کل و قدرت احیاکنندگی همبستگی معنی‌داری مشاهده نشده است. همچنین بین میانگین حداقل دمای سالیانه با فاکتورهای خاک از جمله نیتروژن (N)، ماده‌ی آلی خاک (OM)، کربن آلی (OC)، شن (Sand) و منگنز (Mn) دارای همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و با فسفر قابل جذب (av.P) و هدایت الکتریکی خاک (EC) در سطح ۰/۰۵ همبستگی دارد. میانگین حداقل دمای سالیانه نیز با pH، لای (Silt)، رس (Clay) و روی (Zn) همبستگی مثبت و معنی‌داری را در سطح ۰/۰۱ نشان داد.

از طرفی بین میانگین حداکثر دمای سالیانه با محتوای فلاونوئیدی همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و با آزمون نیتریک اکساید و DPPH همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ وجود دارد. ولی با محتوای فنولی کل و قدرت احیاکنندگی همبستگی معنی‌داری مشاهده نشده است. همچنین بین میانگین حداقل دمای سالیانه با فاکتورهای خاک از جمله نیتروژن (N)، ماده‌ی آلی خاک (OM)، کربن آلی (OC)، شن (Sand)، فسفر قابل جذب (av.P) و منگنز (Mn) همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ وجود دارد و با لای (Silt)، رس (Clay) و روی (Zn) دارای همبستگی مثبت در سطح ۰/۰۵ و با pH

در سطح ۰/۰۱ است. ولی با پارامترهای کلسیم کربنات (C.C.E)، مس (Cu) و آهن (Fe) همبستگی معنی داری مشاهده نشد (جدول ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گیاه بارهنگ کبیر منطقه ی پایین کلا بیشترین میزان فنول را نسبت به دو منطقه ی دیگر دارد. در راستای نتایج حاصل از این تحقیق گزارش شده است که بین فعالیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنولی رابطه ی خاص و معنی داری وجود ندارد (Hinneburg *et al.*, 2006). هم چنین برخلاف ارتباط معنی داری که قبلاً بین ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شده بود (Josuttis *et al.*, 2012) ارتباطی بین ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی اکسیدانی در این تحقیق یافت نشد.

در مورد ترکیبات فلاونوئیدی نیز بارهنگ منطقه ی شوراب بیشترین مقدار فلاونوئید را نسبت به دو منطقه ی دیگر نشان داد، افزایش سطح فلاونوئیدها در رژیم غذایی، به کاهش برخی بیماری ها در انسان منجر می شود (Hertog *et al.*, 1993). Hohtola و Jaakola (۲۰۱۰) در مورد عوامل مؤثر بر تولید فلاونوئیدها در این گونه بیان کردند که هر عاملی که در رشد و نمو گیاه مؤثر است، می تواند در تولید متابولیت ها نیز مؤثر باشد (Jaakola & Hohtola, 2010). همتی و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی گیاه سرخ ولیک نشان دادند که مکان بر میزان فلاونوئید گیاه اثر معنی داری دارد (Hemmati *et al.*, 2008). همچنین Oomaha و Mazza (۱۹۹۶) نشان دادند که با افزایش ارتفاع، بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی در اندام های گیاهی افزوده می شود که با نتایج حاضر همخوانی دارد (Oomaha & Mazza, 1996). طبق نتایج حاصل از این مطالعه، بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی در آزمون DPPH و در بالاترین غلظت (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) مربوط به منطقه ی پایین کلا است. نتایج آزمون DPPH نشان داد که توانایی عصاره های گیاه بارهنگ کبیر در سه منطقه ی مورد بررسی در مهار رادیکال های آزاد وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد رادیکالی آن ها افزایش می یابد.

Rakic و همکاران (۲۰۰۷) دو گونه ی بلوط کوئرکوس کریس و کوئرکوس روبرور را از نظر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت های مختلف مورد ارزیابی قرار دادند و دریافتند که با افزایش غلظت عصاره ی متانولی، درصد مهار رادیکال آزاد به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافت. نتایج تحقیق Young Kil و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH عصاره های گیاهی به غلظت بستگی دارد و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می یابد، که این گزارش ها با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

جدول ۱: همبستگی بین ترکیبات فنولی و فلاونوئید و فعالیت آنٹی اکسیدانی با فاکتورهای محیطی و خاک در عصاره گیاه بارهنگ

	flavo	fenol	DPPH	Reducing	Nitric	EC	PH	C.C.E	N	O.M	O.C	SAND	SILT
flavonoid	1	.719 ⁺	-.670 ⁻	.192	-.844 ⁻	.230	-.734 ⁻	-.281	.498	.499	.499	.421	-.393
fenol	.719 ⁺	1	.033	.802 ⁺	-.340	-.510	-.057	-.888 ⁻	-.245	-.243	-.243	-.327	.351
DPPH	-.670 ⁻	.033	1	.573	.860 ⁺	-.874 ⁻	.995 ⁺	-.523	-.975 ⁻	-.976 ⁻	-.976 ⁻	-.952 ⁻	.942 ⁺
Reducing	.192	.802 ⁺	.573	1	.133	-.881 ⁻	.503	-.968 ⁻	-.730 ⁻	-.728 ⁻	-.728 ⁻	-.784 ⁻	.785 ⁺
Nitric oxide	-.844 ⁻	-.340	.860 ⁺	.133	1	-.584	.881 ⁺	-.130	-.751 ⁻	-.754 ⁻	-.754 ⁻	-.807 ⁻	.697 ⁺
EC	.230	-.510	-.874 ⁻	-.881 ⁻	-.584	1	-.829 ⁻	.869 ⁺	.959 ⁺	.958 ⁺	.958 ⁺	.979 ⁺	-.978 ⁻
PH	-.734 ⁻	-.057	.995 ⁺	.503	.881 ⁺	-.829 ⁻	1	-.444	-.954 ⁻	-.954 ⁻	-.954 ⁻	-.924 ⁻	.908 ⁺
C.C.E	-.281	-.888 ⁻	-.523	-.968 ⁻	-.130	.869 ⁺	-.444	1	.693 ⁺	.691 ⁺	.691 ⁺	.752 ⁺	-.785 ⁻
N	.498	-.245	-.975 ⁻	-.730 ⁻	-.751 ⁻	.959 ⁺	-.954 ⁻	.693 ⁺	1	1.000 ⁺	1.000 ⁺	.995 ⁺	-.987 ⁻
O.M	.499	-.243	-.976 ⁻	-.728 ⁻	-.754 ⁻	.958 ⁺	-.954 ⁻	.691 ⁺	1.000 ⁺	1	1.000 ⁺	.995 ⁺	-.988 ⁻
O.C	.499	-.243	-.976 ⁻	-.728 ⁻	-.754 ⁻	.958 ⁺	-.954 ⁻	.691 ⁺	1.000 ⁺	1.000 ⁺	1	.995 ⁺	-.988 ⁻
SAND	.421	-.327	-.952 ⁻	-.784 ⁻	-.697 ⁺	.979 ⁺	-.924 ⁻	.752 ⁺	.995 ⁺	.995 ⁺	.995 ⁺	1	-.988 ⁻
SILT	-.393	.351	.942 ⁺	.785 ⁺	.697 ⁺	-.978 ⁻	.908 ⁺	-.785 ⁻	-.987 ⁻	-.988 ⁻	-.988 ⁻	-.988 ⁻	1
CLAY	-.438	.309	.959 ⁺	.787 ⁺	.723 ⁺	-.972 ⁻	.930 ⁺	-.737 ⁻	-.995 ⁻	-.995 ⁻	-.995 ⁻	-.996 ⁻	.993 ⁺
Fe	-.022	-.710 ⁻	-.726 ⁻	-.956 ⁻	-.386	.967 ⁺	-.862	.966 ⁺	.857 ⁺	.855 ⁺	.855 ⁺	.896 ⁺	-.904 ⁻
Mn	.945 ⁺	.455	-.873 ⁻	-.127	-.920 ⁻	.533	-.915 ⁻	.046	.751 ⁺	.753 ⁺	.753 ⁺	.662 ⁺	-.666 ⁻
Zn	-.319	.429	.916 ⁺	.839 ⁺	.637	-.995 ⁻	.877 ⁺	-.819 ⁻	-.980 ⁻	-.980 ⁻	-.980 ⁻	-.992 ⁻	.992 ⁺
Cu	-.169	-.806 ⁻	-.617	-.972 ⁻	-.235	.920 ⁺	-.545	.993 ⁺	.772 ⁺	.770 ⁺	.770 ⁺	.822 ⁺	-.833 ⁻
av.p	.982 ⁺	.585	-.786 ⁻	.016	-.886 ⁻	.398	-.842 ⁻	-.107	.642	.644	.644	.574	-.545
av.k	-.825 ⁻	-.986 ⁻	.134	-.699 ⁺	.478	.360	.223	.774 ⁺	.081	.078	.078	.165	-.191
Altitude	.786 ⁺	.136	-.984 ⁻	-.436	-.900 ⁻	.782 ⁺	-.997 ⁻	.372	.927 ⁺	.928 ⁺	.928 ⁺	.891 ⁺	-.873 ⁻
precipitation	-.315	.331	.93 ⁺	.84 ⁺	.537	-.55 ⁻	.89 ⁺	-.78 ⁻	-.98 ⁻	-.98 ⁻	-.98 ⁻	-.851 ⁻	.99 ⁺
Temp	-.688 ⁻	-.088	.86 ⁺	.404	.98 ⁺	-.99 ⁻	.90 ⁺	-.370	-.73 ⁻	-.73 ⁻	-.73 ⁻	-.811 ⁻	.65 ⁺
MinTemp	-.675 ⁻	-.036	.929 ⁺	.467	.889 ⁺	-.789 ⁻	.924 ⁺	-.421	-.882 ⁻	-.885 ⁻	-.885 ⁻	-.864 ⁻	.831 ⁺
MaxTemp	-.675 ⁻	-.134	.823 ⁺	.305	.878 ⁺	-.628	.825 ⁺	-.283	-.757 ⁻	-.760 ⁻	-.760 ⁻	-.735 ⁻	.693 ⁺

ادامه جدول ۱

	CLAY	Fe	Mn	Zn	Cu	av.p	av.k	Altitude	precipitation	Temp	MinTemp	MaxTemp
Flavonoid	-.438	-.022	.945 ⁺	-.319	-.169	.982 ⁺	-.825 ⁻	.786 ⁺	-.315	-.952 ⁻	-.675 ⁻	-.675 ⁻
fenol	.309	-.710 ⁻	.455	.429	-.806 ⁻	.585	-.986 ⁻	.136	.331	-.088	-.036	-.134
DPPH	.959 ⁺	-.726 ⁻	-.873 ⁻	.916 ⁺	-.617	-.786 ⁻	.134	-.984 ⁻	.93 ⁺	.884 ⁺	.929 ⁺	.823 ⁺
Reducing	.787 ⁺	-.956 ⁻	-.127	.839 ⁺	-.972 ⁻	.016	-.699 ⁺	-.436	.84 ⁺	.404	.467	.305
Nitric oxide	.723 ⁺	-.366	-.920 ⁻	.637	-.235	-.886 ⁻	.478	-.900 ⁻	.537	.886 ⁺	.889 ⁺	.878 ⁺
EC	-.972 ⁻	.967 ⁺	.533	-.995 ⁻	.920 ⁺	.398	.360	.782 ⁺	-.55 ⁻	-.713 ⁻	-.769 ⁻	-.628
PH	.930 ⁺	-.662	-.915 ⁻	.877 ⁺	-.545	-.842 ⁻	.223	-.997 ⁻	.89 ⁺	.880 ⁺	.924 ⁺	.825 ⁺
C.C.E	-.737 ⁻	.985 ⁺	.046	-.819 ⁻	.993 ⁺	-.107	.774 ⁺	.372	-.78 ⁻	-.370	-.421	-.283
N	-.995 ⁻	.857 ⁺	.751 ⁺	-.980 ⁻	.772 ⁺	.642	.081	.927 ⁺	-.98 ⁻	-.830 ⁻	-.882 ⁻	-.757 ⁻
O.M	-.995 ⁻	.855 ⁺	.753 ⁺	-.980 ⁻	.770 ⁺	.644	.078	.928 ⁺	-.96 ⁻	-.833 ⁻	-.885 ⁻	-.760 ⁻
O.C	-.995 ⁻	.855 ⁺	.753 ⁺	-.980 ⁻	.770 ⁺	.644	.078	.928 ⁺	-.98 ⁻	-.833 ⁻	-.885 ⁻	-.780 ⁻
SAND	-.996 ⁻	.896 ⁺	.662 ⁺	-.992 ⁻	.822 ⁺	.574	.165	.891 ⁺	-.851 ⁻	-.811 ⁻	-.804 ⁻	-.735 ⁻
SILT	.993 ⁺	-.904 ⁻	-.666 ⁻	.902 ⁺	-.833 ⁻	-.545	-.191	-.873 ⁻	.99 ⁺	.774 ⁺	.831 ⁺	.693 ⁺
CLAY	1	-.887 ⁻	-.705 ⁻	.991 ⁺	-.810 ⁻	-.586	-.146	-.898 ⁻	.838 ⁺	.819 ⁺	.872 ⁺	.742 ⁺
Fe	-.887 ⁻	1	.303	-.940 ⁻	.989 ⁺	.155	.583	.601	-.790 ⁻	-.566	-.622	-.478
Mn	-.705 ⁻	.303	1	-.609	.160	.987 ⁺	-.597	.944 ⁺	-.550	-.816 ⁻	-.841 ⁻	-.794 ⁻
Zn	.991 ⁺	-.940 ⁻	-.609	1	-.880 ⁻	-.480	-.272	-.837 ⁻	.852 ⁺	.764 ⁺	.819 ⁺	.692 ⁺
Cu	-.810 ⁻	.989 ⁺	.160	-.880 ⁻	1	.009	.696 ⁺	.477	-.731 ⁻	-.461	-.514	-.373
av.p	-.586	.155	.987 ⁺	-.480	.009	1	-.710 ⁻	.882 ⁺	-.433	-.748 ⁻	-.766 ⁻	-.739 ⁻
av.k	-.146	.583	-.597	-.272	.696 ⁺	-.710 ⁻	1	-.299	-.192	.214	.189	.269
Altitude	-.898 ⁻	.601	.944 ⁺	-.837 ⁻	.477	.882 ⁺	-.299	1	-.736 ⁻	-.879 ⁻	-.919 ⁻	-.829 ⁻
precipitation	.838 ⁺	-.790 ⁻	-.550	.852 ⁺	-.731 ⁻	-.433	-.192	-.736 ⁻	1	.620	.609 ⁺	.543
Temp	.819 ⁺	-.566	-.816 ⁻	.764 ⁺	-.461	-.748 ⁻	.214	-.879 ⁻	.620	1	.993 ⁺	.989 ⁺
MinTemp	.872 ⁺	-.622	-.841 ⁻	.819 ⁺	-.514	-.786 ⁻	.189	-.919 ⁻	.669 ⁺	.993 ⁺	1	.966 ⁺
MaxTemp	.742 ⁺	-.478	-.794 ⁻	.682 ⁺	-.373	-.739 ⁻	.269	-.829 ⁻	.543	.989 ⁺	.966 ⁺	1

* معنی دار در سطح ۵٪ ** معنی دار در سطح ۱٪ بدون ستاره عدم وجود اختلاف معنی دار

این پژوهش نشان داد که گیاه بارهنگ منطقه ی پنبه زارکتی، بهترین فعالیت آنٹی اکسیدانی را در آزمون نیتریک اکساید و در بالاترین غلظت (۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به دو منطقه ی دیگر داراست. هم چنین نتایج نشان داد که توانایی عصاره های گیاه بارهنگ کبیر در سه منطقه ی مورد بررسی، در مهار رادیکال های آزاد نیتریک اکساید وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آن ها افزایش می یابد. فضلی و همکاران (۲۰۱۳) با ارزیابی میزان فنول و فلاونوئید

تام و فعالیت آنتی اکسیدانی پوست درختان راش و بلوط دریافتند که با افزایش غلظت، درصد مهار رادیکال آزاد نیتریک اکساید افزایش می‌یابد (Fazli et al., 2013)، که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

از سوی دیگر براساس این یافته، بهترین فعالیت آنتی اکسیدانی در آزمون احیاکنندگی آهن III در بالاترین غلظت (۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، مربوط به گیاه بارهنگ منطقه ی پایین کلا می باشد، که در روش قدرت احیاکنندگی، جذب نوری نمونه ها رابطه ی مستقیمی با قدرت احیاکنندگی دارد. یعنی جذب نوری بیشتر، بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر است. نظری و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی خواص آنتی اکسیدانی و میزان فنول و فلاونوئید کل پوست درختان *اکالیپتوس کاملدولنسسیس* (*Eucalyptus camaldulensis*) و کاج جنگلی دریافتند که با افزایش غلظت، جذب نوری عصاره ها افزایش یافته است (Nazari et al., 2013) که با نتایج این بررسی همخوانی دارد. داده های جدول ۱ نشان می دهد که بین فاکتورهای خاک و میزان ترکیبات آنتی اکسیدانی فنولی در عصاره ی گیاه بارهنگ کبیر در هر سه منطقه ی شوراب، پایین کلا و پنبه زارکتی هم بستگی معنی داری وجود دارد. این همبستگی به این مفهوم است که سنتز ترکیبات فنولی می تواند تحت تأثیر عوامل مشترکی باشد. کربنات کلسیم، آهن، مس و پتاسیم قابل جذب موجود در خاک با ترکیبات فنولی در عصاره ی گیاه بارهنگ همبستگی منفی نشان دادند. اما با سایر پارامترهای خاک این همبستگی معنادار نبود. بین ترکیبات فلاونوئیدی با pH خاک و پتاسیم قابل جذب، همبستگی منفی و بین منگنز و فسفر قابل جذب با ترکیبات فلاونوئیدی همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد.

عواملی همچون شوری می تواند بر روی متابولیت های ثانوی تأثیر گذار باشد. EC بالا سبب محدود کردن رشد گیاه شده و در نهایت می تواند روی خاصیت آنتی اکسیدانی آن تأثیر گذاشته و میزان آن را پایین آورد. تحقیق Keltawi و Croteau (۱۹۸۷) نیز نشان داد که محیط های شور علاوه بر تأثیر منفی بر رشد گیاهان موجب کاهش تولید متابولیت های آن می شود. Dow و همکاران (۱۹۸۱) بیان کردند، که شوری عملکرد اسانس را در گیاهان خانواده نعناع کاهش می دهد. Ozturk و همکاران (۲۰۰۴) نیز به نتایج مشابهی در مورد بادرنجبویه رسیدند. این گزارش ها با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که گونه ی بارهنگ کبیر، دارای محتوای فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی قابل قبولی است. عملکرد آنتی اکسیدانی گونه ی بارهنگ کبیر تحت تأثیر شرایط آب و هوایی و همچنین خصوصیات رویشگاه و عوامل ادا فیزیکی تغییر می کند که این مطالعه این موضوع را ثابت کرد. شناسایی پتانسیل عصاره ی بارهنگ کبیر و انتخاب رویشگاه و مرحله ی فنولوژی بهینه، بسیار ضروری است و امکان فراهم کردن استخراج مواد مؤثره در استفاده های کاربردی از فرآورده ها و توان افزایش عملکرد دارویی گیاهان را سبب می شود.

منابع

- Aftabi, Y, Colagar A.H., Mehrnejad, F., Seyedrezazadeh, E. and Moudi E. (2017) Aryl hydrocarbon receptor gene transitions (c.-742C>T; c.1661G>A) and idiopathic male infertility: a case-control study with in silico and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(25):20599-20615.
- Black, C.A. (1979) *Methods of soil analysis*. American Society of Agronomy. 2: 1572-1771.
- Bouyoucos, G.J. (1962) Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*. 54: 464-465.
- Bremner, J.M., Mulvaney, C.S. (1965). Nitrogen-total. In: *Methods of soil analysis: part 2, Chemical and Microbiological Properties*. Page, A. L. (Ed). 1982. Second Edition. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wisconsin USA. Agronomy Series. 9(2):596-622.
- Caco, G. and Prior, R.L. (1998) Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 44: 1309-1315.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Analysis*. 10: 178-182.
- Collins, A.R. (2005) Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal Cancer*. 41(13): 1923-1930.
- Dow, A.I., Cline, T.A. and Homing, E.V. (1981) Salt tolerance studies on irrigated mint. *Bulletin of Agricultural Research Center, Washington State University, Pullman*. 906pp.
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M. and Eslami, B. (2010) Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Central European Journal of Biology*. 5(3): 338-345.
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M. and Pourmorad, F. (2010) Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 9(32): 5212-5217.
- Esmailzadeh Bahabadi, S. and Sharifi, M. (2013) Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites Using Biotic Elicitors. *Journal of Cell and Tissue*. 4(2): 119-128.
- Fallahian, F. (2006) *Medicinal plant of Iran*. 1 st-ed. Tehran, Vahed Oloom Tahghighatb Pub. 24-25.
- Fazli, R., Nazarneshad, N., Ebrahimzadeh, M.A. and Zabihzadeh, M. (2013) Evaluation of the antioxidant capacities and total phenolic contents of beech and oak Barks. *Armaghane Danesh*: 18(2): 137-145.

- Ghasemi, K., Ghasemi, Y. and Ebrahimzadeh, M.A. (2009) Antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences*. 22(3): 277-281.
- Hemmati, K.H., Sharifani, M., Kalati, H. and Badiie, P. (2008) Flavonoid content of hawthorn (*Crataegus monogyna*) in Iran. *International Horticultural Congress*. 765: 287-290.
- Hertog, M.L.G., Feskens, E.J.M., Hollman, P.H.C., Katan, M.B. and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidants flavonoids and the risk of coronary heart disease (the Zutphen elderly study). *Lancet*. 342: 1007-1011.
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H.J. and Hiltunen, R. (2006) Antioxidant activities of extract from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*. 97(1): 122-129.
- Iranbakhsh, A.R., Hamdi, S.M. and Assadi, M. (2008) Flora, life forms and chorotypes of plants of Garmsar region in Semnan province, Iran. *Pajouhesh and Sazandegi*. 79: 179-199.
- Jaakola, L. and Hohtola, A. (2010) Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant Cell and Environmental*. 33(8): 1239-1247.
- Jahantigh, D. and Colagar A.H. (2017) XRCC5 VNTR, XRCC6 -61C>G and XRCC7 6721G>T genes polymorphisms associated with male infertility risk: Evidences from a case-control and in silico studies. *International Journal of Endocrinology*. 2017: ID 4795076, 1-16.
- Josuttis, M., Carlen, C., Crespo, P., Nestby, R., Toldam- Andersen, T.B., Dietrich, H. and kruger, E. (2012) Acomparision of bioactive compound of straw berry fruit from Europe affected by genotype and latitude. *Berry Research*. 2(2): 73-93.
- Kaghazloo, Z., Hemati, K. and Khorasaninejad, S. (2017) The effect of height on some secondary metabolites of different organs of Sambucus (*Sambucus ebulus* L.) in three cities of Golestan province. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*. 12(47):31-43.
- Keltawi, N.E. and Croteau, R. (1987) Salinity depression of growth and essential oil formation in spearmint and marjoram and its reversal by foliar applied cytokinin. *Phytochemistry*. 26: 1333-1334.
- Lindsay, W.L. and Norvell, W.A. (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, managanez and Copper. *Journal of Soil Science*. 42: 421-428.
- Nazari, S., Nazarnezhad, N. and Ebrahimzadeh, M.A. (2013) Evaluation of antioxidant properties and total phenolic and flavonoids content of *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* bark. *Iranian journal of Wood and Paper Science Research*. 28(3): 522-533.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, C.A. (1954). Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(9): 1689-1699.

- Oomaha, B.D. and Mazza, G. (1996) Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(7): 1746-1750.
- Ozturk, A., Ipek, A., Unlukara, A. and Gurbuz, B. (2004) Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm depression of growth and essential oil formation in (*Melissa officinalis L.*). *Pakistan Journal of Botany*. 36: 787-792.
- Rabiei, K.H., Bekhradnia, S., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F. and Ebrahimzadeh, M.A. (2012) Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *Elburensis*. *Natural Product Research*. 26(24): 2353-2357.
- Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevc, V., Povrenovic, D. and Siler- Marinkovic, S. (2007) Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*. 104(2): 830-834.
- Shaghghi, A. Nejad Ebrahimi, S. and Sonboli, A. (2019) Study of total phenolic, total flavonoid content and antioxidant potential in various organs of genus *Papaver* and *Glaucium* collected from Iran. *Journal of Plant Production Research*. 26(2): 195-214.
- Sinkakarimi, M.H., Solgi, E. and Colagar, A.H. (2020). Subcellular partitioning of cadmium and lead in *Eisenia fetida* and their effects to sperm count, morphology and apoptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 187:109827. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109827>.
- Somjen, D., KnoII, E. and Vaya, J. (2004) Estrogen- like activity of licorice root constituents: glabridin and glabrene, in vascular tissues in vitro and in vivo. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology*. 91: 147-155.
- Stark, S., Julkunen tiitto, R., Holappa, E., Mikkola, K. and Nikula, A. (2008) Concentration of foliar quercetin in natural populations of white birch (*Betula pubescens*) increase with latitude. *Chemical Ecology*. 34: 1382-1391.
- Trivedy, R.K. and Goel, P.K. (1986) Chemical and biological methods for water pollution studies. *Environmental Publications*. 98-112.
- Walkley, A. and Black, I.A. (1934). Estimation of soil organic carbon by the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-38.
- Young Kil, H., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, III-M., Kwon, S.S., Jeong, J.D., Lee, D. and Yeon Yu, C. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*. 115(4): 1234-1239.

The Effect of Ecological and Edaphic Factors on Active Ingredients of *Plantago major* L.

N. Jafari^{1*}, M. Faghani Panbezari², A. Hosseinzadeh Collagar³, M. A. Ebrahimzadeh⁴

Received:2018.12.4

Accepted:2020.9.19

Abstract

Plantago major L. is one of the most important medicinal plants used in traditional medicine worldwide. This study was conducted to investigate the effect of ecological and edaphic factors on the active ingredients of this plant. For this purpose, the *Plantago major* was collected from different regions of Mazandaran province, namely Shorab, Pain Kola, and Panbeh Zar Koti. Phenol and flavonoid levels from acidic methanol extract of plant samples were calculated using standard curve of Gallic acid and Quercetin, respectively. Antioxidant activity of the samples were investigated by three methods of DPPH, Nitric oxide and Reducing power. Our results showed that all of the *Plantago major* not only have a total phenol, flavonoid content, and antioxidant activity but also, they have a biological activity of the extract depends on its phenol and flavonoid content. On the other hand, the antioxidant function of *Plantago major* species is affected by weather conditions as well as habitat characteristics and edaphic factors. On the basis of these findings, it is suggested that the identification of the potential of the *Plantago major* extract and selection of optimal phenological habitat and phases is essential and enables the extraction of effective ingredients in the applied of the products and the ability to enhance the medicinal yield of the plants.

Keywords: *Plantago major*, Edaphic factors, Ecological factors, Antioxidant activity, Reducing power, Active materials

1- Associate Professor of Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran

*(Corresponding author: n.jafari@umz.ac.ir)

2- MSc in Ecology and Systematics of Mazandaran University

3- Professor of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran

4- Professor of Pharmaceutical Chemistry, Sari University of Medical Sciences

بهینه‌سازی شرایط تولید اگزوپلی ساکارید توسط لوکونوستوک دکسترانیکوم جدا شده از پنیر سنتی سوریه

مهرداد حاج مصطفی^{۱*}، بسام العقلة^۲، قاسم عاشوری^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲

چکیده

تولید پلی‌ساکاریدهای لاکتیکی (با توجه به گراس بودن آن‌ها) می‌تواند به‌عنوان جایگزین ارزشمندی برای پلی‌ساکاریدهای میکروبی تولید شده فعلی باشد. در این تحقیق به بررسی منابع کربن و نیتروژن مناسب برای تولید اگزوپلی‌ساکاریدها^۱ (EPSs) توسط لوکونوستوک دکسترانیکوم (*Leuconostoc dextranicum*) که یک باکتری گراسی است (Fraquezza, 2015)، پرداخته شد. نتایج بررسی‌های انجام شده نشان داد که گلوکز (*Glu*) در مقایسه با قندهای دیگر و پپتون در مقایسه با منابع نیتروژن دیگر، باعث تولید EPSs بیشتری در محیط کشت شدند. لذا در ادامه تحقیق تنها از گلوکز و پپتون جهت بهینه‌کردن شرایط تولید EPSs استفاده شد. به منظور بررسی تأثیر و بهینه‌سازی شرایط تولید EPS، سه پارامتر دما، pH و زمان انکوباسیون، هر کدام در پنج سطح انتخاب شده و به‌طور جداگانه بهینه شدند. سپس برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که در نتیجه به کارگیری آن‌ها، بهترین محصول از واکنش به دست می‌آید، بهینه‌سازی انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، دمای انکوباسیون ۴۰ °C، pH برابر ۵/۵ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت به‌عنوان بهترین شرایط برای تولید آزمایشگاهی EPSs انتخاب شدند. به‌طور خلاصه نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می‌توان از باکتری بومی لوکونوستوک دکسترانیکوم و محیط کشت ارزان قیمت شیر پس چرخ (*Skimmed milk*) برای تولید این محصول با ارزش استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اگزوپلی‌ساکاریدها، باکتری‌های اسید لاکتیک، لوکونوستوک دکسترانیکوم، شیر پس چرخ

۱- دانشجوی دکترای پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

* (نویسنده مسئول: mustafa.muhammad@gmail.com)

۲- محقق در کمیسیون ملی بیوتکنولوژی دمشق، دمشق، سوریه

۳- دانشجوی دکترای پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

از نیمه دوم قرن حاضر استفاده هوشمندانه از میکروارگانیسم‌ها منجر به تولید صنعتی مواد متعددی مانند حلال‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و پلی‌ساکاریدها شده است. افزایش تقاضا برای کاربرد های صنعتی پلیمر های طبیعی مختلف، باعث افزایش توجه به استفاده از اگزوپلی‌ساکاریدها (EPSs) ساخته شده توسط میکروارگانیسم‌ها شده است. EPS ها، پلی‌ساکارید های بلند زنجیره ای از واحد های تکرار شونده قندی و غیر قندی هستند که شاخه دار نیز می باشند. واحد های قندی عمدتاً گلوکز^۱، گالاکتوز^۲ و رامنوز^۳ هستند (Welman and Maddox 2003). پلی‌ساکارید های میکروبی ترکیبات برون ریزی هستند که از سلول به بیرون ترشح می شوند و مقدار و ساختمان شیمیایی آن‌ها، بستگی به نوع میکروارگانیسم تولید کننده و سوبسترای کربنی دارد که در اختیار آنان قرار می گیرد (De Vuyst *et al.* 2001; Peant *et al.* 2005).

پلی‌ساکاریدها بر اساس موقعیت خود نسبت به سلول دسته بندی می شوند. برخی از آن‌ها به صورت داخل سلولی در سیتوزول^۴ قرار گرفته اند و به عنوان منبع کربن یا انرژی مطرح می باشند. گروه دوم، به عنوان اجزای دیواره سلولی نظیر پپتیدوگلیکان^۵ و تیکوئیک اسید^۶ شناخته می شوند. گروه سوم آن‌هایی هستند که در خارج از دیواره سلولی واقع می شوند. گروه اخیر به دو شکل وجود دارند یکی به صورت کپسوله^۷ که ارتباط بسیار نزدیکی با دیواره سلولی دارد و دیگری که به محیط خارج ترشح می شود. البته در برخی از موارد هر دو نوع پلی‌ساکارید (شکل کپسوله و شکل ترشحي) توسط یک میکروب تولید می شوند که در چنین حالتی تشخیص نوع پلی‌ساکارید مشکل است (Tallon *et al.* 2003).

EPS ها توسط باکتری تولید کننده به عنوان منبع انرژی مصرف نمی شوند زیرا باکتری های تولید کننده لایه چسبنده^۸ معمولاً قادر به شکستن EPS هایی که خود تولید می کنند، نیستند. EPS ها، پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند و کاربردهای صنعتی گسترده دارند و در زمینه هایی مانند غذاها، بهداشت (دارو و داروسازی، ایجاد برداشت‌های دندان)، بازیافت روغن، مواد آرایشی و به عنوان رنگ های پایه آب بکار می روند. همچنین این ترکیبات می توانند اثرات ثانویه ای به عنوان امولسیفایر^۹، پایدار کننده، تشکیل دهنده سوسپانسیون، کنترل کننده کریستالیزاسیون، عامل کنترل رئولوژیکی در سیستم های

¹ Glucose

² Galactose

³ Rhamnose

⁴ Cytosol

⁵ Peptidoglycan

⁶ Teichoic acid

⁷ Encapsulation

⁸ Slime

⁹ Emulsifier

آبی، تشکیل فیلم و کپسوله کردن ایفا کنند (Nwodo *et al.* 2012). در حال حاضر بیشتر پلی ساکارید های مورد استفاده در صنعت غذا، از منابع گیاهی (نظیر نشاسته و پکتین) و علف های دریایی (آلجینات^۱، کاراجینان^۲) یا حیوانی تأمین می شوند. عدم مطابقت ساختار پلی ساکارید های گیاهی یا حیوانی با نیاز های موجود در این صنعت، نیاز به انجام برخی اصلاحات شیمیایی بر روی آن ها را می طلبد. از سوی دیگر محدودیت منابع طبیعی و منع قانونی برای کاربرد پلی ساکارید های اصلاح شده شیمیایی موجب ورود نسل جدیدی از پلی ساکاریدها که همان پلی ساکاریدهای میکروبی می باشند به بازار شده است (De Vuyst and Degeest 1999; Mekhici *et al.* 2017).

بسیاری از گونه های باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ ها و بعضی از جلبک ها قادر به سنتز EPSs می باشند، ولیکن از میان عوامل مختلف تولید کننده آن ها، باکتری های اسید لاکتیک نظیر، پروپیونی باکتری ها^۳ و بیفیدوباکتری ها^۴ بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. سال ۱۸۷۸ که مصادف است با کشف باکتری تولید کننده اگزوپلی ساکارید، به عنوان سر آغاز استفاده از EPS های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک در مواد غذایی، محسوب می شود. به علت اهمیت گسترده پلی ساکارید ها در فرآورده های غذایی و صنعتی، جستجو برای یافتن گونه های بدون خطر اسید لاکتیک که تولید کننده پلی ساکارید باشند همچنان ادامه دارد (De Vuyst and Degeest 1999).

با توجه به مفید بودن باکتری های اسید لاکتیک و نقش مهم آن ها به عنوان آغازگر تخمیری، همچنین با لحاظ کردن این نکته که منبع میکروبی تولید برخی از پلی ساکارید های طبیعی که در حال حاضر تولید می شود از لحاظ بدون خطر بودن کاملاً تأیید شده نیست، تولید پلی ساکارید های لاکتیکی (با توجه به گراس^۵ بودن آن ها) می تواند به عنوان جایگزین ارزشمندی برای تولید پلی ساکارید های میکروبی تولید شده فعلی باشد (Kumar *et al.* 1998). شرایط ثابتی که بتوان در آن EPSs میکروبی را با راندمان بالا تولید کرد، وجود ندارد، زیرا میکروارگانیسم ها از نظر استفاده از منابع کربن و نیتروژن، دما و pH بهینه با یکدیگر متفاوت اند. راندمان تولید EPSs توسط باکتری های اسید لاکتیک، بستگی به ترکیب محیط کشت (کربن و نیتروژن)، شرایط رشد میکروارگانیسم نظیر دما، pH، فشار اکسیژن و شرایط انکوباسیون و نوع سویه میکروبی مورد استفاده دارد (Degeest *et al.* 2001; Macedo *et al.* 2002).

در این تحقیق به بررسی منابع کربن و نیتروژن مناسب برای تولید EPSs توسط لوکونوستوک دکسترانیکوم که یک باکتری گراس است (Benmechernene *et al.* 2013, Emmanuel *et al.* 2017) پرداخته شد. سپس به منظور بررسی

¹ Alginate

² Carrageenan

³ Propionibacterium

⁴ Bifidobacterium

⁵ GRAS (Generally Recognized as Safe)

تأثیر و بهینه‌سازی شرایط تولید EPSs، سه پارامتر دما، pH و زمان انکوباسیون، هر کدام در پنج سطح انتخاب و به طور جداگانه بهینه شدند. از آنجا که محیط MRS یک محیط سنتتیک بوده که گاهی در دسترس نیست و از طرفی جهت تولید انبوه، نسبتاً گران قیمت است، تصمیم گرفته شد تا جایگزین برای آن انتخاب شود. محیط کشت شیر پس چرخ^۱ (SM) در مقایسه با محیط کشت MRS یک محیط کاملاً ارزان قیمت بوده و در تجاری کردن فرآیندهای تخمیری قابل استفاده است. در سال ۲۰۰۶، آسلایم و همکاران میزان EPSs تولید شده توسط باکتری *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* زیر گونه بولگاریکوس^۲ و *Streptococcus thermophilus* ترموفیلوس^۳ در محیط کشت M17/MRS مایع و محیط کشت SM را بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق آنها، میزان EPSs تولید شده در SM در مقایسه با محیط کشت MRS، بیشتر بود (Aslim et al 2006). تولید مقدار بیشتر EPSs در محیط کشت SM در مقایسه با محیط کشت MRS احتمالاً به این دلیل است که وقتی لاکتوز هیدرولیز می‌شود، گالاکتوز بر عکس گلوکز توسط باکتری مصرف نمی‌شود بلکه در محیط کشت باقی می‌ماند و در سنتز EPSs به کار می‌رود (Gassem et al 1997). بنابراین در این مطالعه و با توجه به اینکه تولید EPSs در محیط کشت SM در مقایسه با محیط کشت MRS مایع بیشتر است، محیط کشت SM جهت مرحله بهینه کردن شرایط تولید آزمایشگاهی EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* که از پنیر سنتی سوریه تهیه شده از مخلوط شیر بز و گوسفند جدا شده بود (Mustafa et al. 2015) مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل هیدروکسید سدیم (تولید شده از شرکت مرک)، نیترات پتاسیم (تولید شده از شرکت مرک)، اسید سولفوریک (تولید شده از شرکت شارلوا با خلوص % ۹۵-۹۷)، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (تولید شده توسط شرکت مرک، با خلوص % ۹۹)، اسید تری کلرو استیک (تولید شده از شرکت مرک)، الکل ایزو آمیلیک (تولید شده از شرکت مرک)، فنول (تولید شده توسط شرکت مرک)، اتانول مطلق (تولید شده توسط شرکت شارلوا، با خلوص % ۹۹/۸)، قندها (تولید شده توسط شرکت مرک)، بی کرینات سدیم (تولید شده توسط شرکت مرک، با خلوص % ۹۹/۵)، محیط کشت MRS از نوع آزمایشگاهی (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا مجارستان)، شیر پس چرخ

¹ Skimmed milk (SM)

² *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

³ *Streptococcus thermophilus*

(SM) (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا)، عصاره مخمر (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا)، پپتون^۱ (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا)، کازئین (تولید شده توسط شرکت مرک)، سولفات آمونیوم (تولید شده از شرکت مرک) و کیسه دیالیز بود. همچنین باکتری لاکونوستوک دکسترانیکوم از پنیر سنتی جدا سازی شد و در کمیسیون ملی بیوتکنولوژی دمشق در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد و زیر گلسیرویل ۲۵٪ نگهداری شد (برای شناسایی باکتری از آزمون های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و سیستم های API استفاده شد) (Haj-Mustafa et al. 2015).

روش‌ها

آماده کردن کشت میکروبی

در طول فعالیت های آزمایشگاهی، جهت آماده کردن کشت میکروبی، لوله اپندروف که در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شد، از فریزر خارج و پس از ذوب شدن در شرایط کاملاً استریل، در زیر هود و در کنار شعله به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت MRS مایع استریل انتقال یافت. باکتری به مدت یک شبانه روز (۱۶ ساعت) در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت انجام آزمون ها، کشت ثانویه ای از کشت فعال شده، در شرایط مشابه تهیه و به عنوان کشت تازه در آزمایشات استفاده گردید (Haj-Mustafa et al. 2015).

آماده سازی مایه تلقیح

جهت تهیه مایه تلقیح، باکتری لاکونوستوک دکسترانیکوم در محیط MRS مایع استریل تلقیح شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس این آبگوشت فعال شده در شرایط کاملاً استریل، در زیر هود و در کنار شعله به فالكون استریل انتقال یافت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت آن دور ریخته شد. رسوب باکتریایی حاصل در آب مقطر استریل (۱۰ میلی لیتر) حل شده و بلافاصله مستقیماً به ظرف تخمیر حاوی محیط کشت SM مایع (٪ ۱۰ وزنی/حجمی) استریل منتقل شد (Kimmel et al. 1998; Haj-Mustafa et al. 2015).

انتخاب منبع کربن مناسب جهت تولید EPSs

برای انتخاب مناسب ترین منبع کربن جهت تولید EPSs، محیط کشت SM مایع با هر یک از قند های ساکارز، گلوکز، لاکتوز، فرکتوز و مالتوز (با غلظت ٪ ۲۰ وزنی/حجمی) به طور جداگانه غنی سازی شد، سپس توانایی تولید EPSs توسط

¹ Peptone

باکتری *لوکونوستوک دکستر/نیکوم* با آن قندها مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت پس از مقایسه مقدار EPSs تولید شده در هر یک از قندهای مورد مطالعه، یکی از آن‌ها براساس بیشترین میزان تولید جهت ادامه آزمایشات انتخاب شد (Haj-Mustafa *et al.* 2015).

انتخاب منبع نیتروژن مناسب برای تولید EPSs

جهت بهبود میزان تولید EPSs توسط باکتری منتخب، محیط کشت SM به طور جداگانه با منابع نیتروژن مختلف (عصاره مخمر، پپتون، کازئین، نیترات پتاسیم و سولفات آمونیوم با غلظت های ۵٪ وزنی/حجمی) غنی سازی شد و اثر هر یک از این منابع نیتروژنی بر روی سطح تولید EPSs مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت یکی از آن‌ها بر اساس بیشترین سطح تولید برای ادامه آزمایشات انتخاب شد.

در کلیه آزمایشات مربوط به بندهای ۲-۳ و ۲-۴ فرآیند تخمیر در فلاسک های یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت SM استریل شده (۱۰٪ وزنی/حجمی، ۱۱۰ درجه سانتی گراد، ۶ دقیقه)، ۱ درصد (حجمی/حجمی) مایه تلقیح و منبع قند و نیتروژن استریل شده (بر حسب غلظت مورد استفاده در هر Run) در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد، pH ۶/۰ و در دور ۱۰۰ rpm و به مدت ۳۶ ساعت انجام گرفت. لازم به ذکر است اندازه گیری مقدار EPSs در بند های مذکور، در سه تکرار انجام شد (Haj-Mustafa *et al.* 2015).

بهینه‌سازی شرایط تولید EPSs در سطح آزمایشگاهی

تولید EPS توسط سویه های باکتری های اسید لاکتیک بسته به شرایط کشت متفاوت است. عوامل محیطی و شرایط خاص کشت مانند pH، دما، نسبت کربن به نیتروژن (C/N)، میزان اکسیژن رسانی و منابع کربن می توانند بر تولید EPS تأثیر بگذارند (Ates. 2015). به منظور بررسی تأثیر و بهینه سازی شرایط تولید EPSs، سه پارامتر دما (Tem) بر حسب درجه سانتی گراد، pH و زمان (T) بر حسب ساعت در پنج سطح طبق جدول (۱) به کار گرفته شدند. پارامترها به صورت جداگانه بهینه شد و به دلیل زیاد بودن تعداد فاکتورها، انجام تمام آزمایشات امکان پذیر نبود، در نتیجه از طراحی فاکتوریل جزئی در قالب CCD برای انتخاب ترکیبات مورد نظر استفاده شد.

جدول ۱: فاکتورهای مورد استفاده برای بهینه سازی تولید EPSs

سطوح پارامترها					فاکتورها
۴۵	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	Tem (°C)
۶/۵	۶/۰	۵/۵	۵/۰	۴/۵	pH
۷۲	۴۸	۳۶	۲۴	۱۸	T (h)

عمل تخمیر برای بهینه‌سازی شرایط تولید EPSs در فلاسک‌های یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت SM استریل شده (٪۱۰ وزنی/حجمی، ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۶ دقیقه)، ۱ درصد (حجمی/حجمی) مایه تلقیح، منبع نیتروژن (پپتون) و منبع کربن گلوکز (Glu) به ترتیب با غلظت‌های ٪۵ و ٪۲۰ و در دور ۱۰۰ rpm انجام گرفت. لازم به ذکر است اندازه‌گیری مقدار EPSs در سه تکرار انجام شد.

جداسازی و خالص‌سازی EPSs تولید شده توسط باکتری لوکونوستوک دکسترانیکوم

جهت جداسازی EPSs، ابتدا مقداری از محیط کشت تخمیر شده برداشته شد و به فالكون‌های ۵۰ میلی لیتری منتقل شد سپس لوله‌ها به منظور غیر فعال کردن آنزیم‌های هیدرولیز کننده پلیمرها و آزاد کردن EPSs متصل به دیواره سلول‌ها، در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم حرارت داده شدند (Cerning *et al.* 1998). پس از آن لوله‌ها در دمای اتاق سرد شدند و به آن‌ها (۲۵۰ میکرولیتر) تری کلرو استیک اسید (٪۸۵) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Frengova *et al.* 2000). پروتئین‌ها و سلول‌ها با سانتریفوژ (در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه تحت ۸۰۰۰ g) جدا شدند و به سوپرناتانت حاصل از سانتریفوژ به منظور رسوب دهی EPSs، دو حجم اتانل سرد ٪۹۵ اضافه شده و پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، رسوب حاصل با سانتریفوژ (در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه تحت ۱۶۰۰۰ g) جمع‌آوری شد. EPSs حاصل در آب دیونیزه حل شد و خالص‌سازی آن با استفاده از غشای دیالیز (با حد آستانه وزن مولکولی برابر با ۱۲ کیلو دالتون)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت (روح بخش و حق شناس ۱۳۶۹).

روش سنجش EPSs

جهت تعیین غلظت EPSs خالص شده بر اساس روش دوبایس و همکاران (1956)، منحنی استاندارد همزمان با جذب خوانی نمونه‌ها رسم شد که در زیر به شرح آن پرداخته می‌شود.

رسم منحنی استاندارد: به منظور رسم منحنی استاندارد از محلول گلوکز، در پنج غلظت ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. به این ترتیب که به یک میلی لیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد فوق ابتدا یک میلی لیتر محلول فنل ٪۵ و پس از آن ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. محلول‌ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان جذب آنها در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد به صورت مقدار جذب محلول‌ها بر حسب غلظت رسم شد و معادله خط استاندارد محاسبه شد (Goh *et al.* 2005).

اندازه‌گیری مقدار کل کربوهیدرات در نمونه‌های مورد آزمایش: برای اندازه‌گیری غلظت EPSs هر نمونه، یک میلی لیتر از محلول دیالیز شده برداشته شد و به آن یک میلی لیتر محلول فنل ۵٪ و ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. پس از نیم ساعت نگهداری در دمای اتاق، جذب محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد (Goh *et al.* 2005). جذب نمونه در معادله خط استاندارد جایگزین و غلظت پلی ساکارید خارج سلولی بر حسب میلی گرم در لیتر گزارش شد. لازم به ذکر است اندازه‌گیری مقدار EPSs هر نمونه، در سه تکرار انجام شد.

آنالیز آماری

در این تحقیق، تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارها به ترتیب با کمک نرم افزارهای SPSS و EXCEL انجام شد. برای آنالیز واریانس داده‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) تحت نرم افزار IBM SPSS نسخه ۲۱/۰ و در سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد. اختلاف میان آزمایش‌ها با استفاده از آزمون Duncan (1955) آنالیز شد.

نتایج و بحث

تعیین منبع کربن برتر جهت تولید EPSs

منابع کربن متفاوتی به منظور تولید EPSs های میکروبی استفاده می‌شوند. انتخاب یک منبع کربن مناسب جهت تولید EPSs های میکروبی، بستگی به نوع سویه میکروبی مورد استفاده دارد. برای انتخاب منبع کربن مناسب جهت تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم*، این باکتری به طور جداگانه در محیط کشت شیر پس چرخ غنی شده با ۲۰٪ از قند های ذکر شده کشت داده شد. جدول ۲ نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین میزان تولید پلی ساکارید خارج سلولی تولید شده توسط *این باکتری* را نشان می‌دهد. باکتری مورد آزمایش مقدار ۲۱۴/۳۲ تا ۳۳۰/۷۹ میلی گرم EPSs را در هر لیتر از محیط کشت SM مایع تولید کرد که از بین آن‌ها گلوکز بیشترین و مالتوز کمترین مقدار EPSs را تولید کرد. مادلدو و همکاران (۲۰۰۵) پیشنهاد دادند که تفاوت مقادیر EPSs حاصل از این قندها ممکن است مربوط به اختلاف فعالیت آنزیم های شرکت کننده در سنتز نوکلئوتید های قندی باشد (Madledo *et al.* 2005). تجزیه واریانس حاصل از تأثیر منبع قند بر تولید EPSs (جدول ۲) نشان داد که منبع قند مورد استفاده در محیط کشت بر تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* اثر معنی داری دارد ($P < 0.05$). در این مطالعه با توجه به نتایج حاصل، از قند گلوکز جهت بهینه کردن شرایط تولید آزمایشگاهی EPSs استفاده شد.

جدول ۲: نتایج آزمون مقایسه میانگین تأثیر نوع قند بر تولید EPSs در محیط کشت SM

نوع قند	EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)
ساکارز	$288/65 \pm 4/28^c$
لاکتوز	$312/87 \pm 3/08^b$
گلوکز	$330/79 \pm 2/18^a$
فراکتوز	$241/36 \pm 8/24^d$
مالتوز	$214/32 \pm 5/15^{de}$

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0/05$) است.

بررسی تأثیر ماهیت منبع نیتروژن بر روی تولید EPSs

از آنجا که تولید پلی ساکارید در برخی از سویه های باکتریایی وابسته به رشد است و همچنین برخی از آن ها در ساختمان خود، دارای قندهای آمینه (ازت دار) به صورت ان-استیل گلوکز آمین و یا ان-استیل گالاکتوز آمین هستند (De Vuyst and Degeest 1999) بنابراین استفاده از منابع نیتروژنی، غالباً باعث افزایش تولید EPSs می شود (Kumar et al. 2007). در این آزمایش جهت بهبود میزان تولید EPSs توسط باکتری لوکونوستوک دکسترانیکوم، محیط کشت Glu-SM با منابع نیتروژنی مختلف غنی سازی شد و اثر نوع منبع نیتروژن بر روی مقدار EPSs و رشد این باکتری بررسی شد. بدین منظور توانایی تولید EPSs توسط باکتری لوکونوستوک دکسترانیکوم به طور جداگانه در محیط کشت Glu-SM غنی شده با ۵٪ پپتون، ۵٪ نیترات پتاسیم، ۵٪ عصاره مخمر، ۵٪ کازئین و ۵٪ سولفات آمونیوم مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت یکی از آن ها جهت ادامه آزمایشات انتخاب شد. نتایج تجزیه واریانس تأثیر منبع نیتروژن بر تولید EPSs (جدول ۳) نشان داد که منابع نیتروژنی مختلف مورد استفاده در محیط کشت، بر تولید EPSs توسط باکتری لوکونوستوک دکسترانیکوم اثر معنی داری ($P < 0/05$) داشته است. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود بیشترین میزان EPSs در محیط کشت Glu-SM غنی شده با ۵٪ عصاره مخمر و ۵٪ پپتون، و کمترین مقدار در محیط کشت Glu-SM غنی شده با کازئین و سولفات آمونیوم تولید شده است. این نتایج نشان دهنده اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید EPSs است. در برخی از مطالعات گزارش شده است برخی از محیط های کشت، به دلیل داشتن عصاره گوشت و عصاره مخمر برای اندازه گیری مقدار EPSs مناسب نیستند؛ زیرا در تعیین ساختار مونومرها دخالت کرده و گلوکومانان^۱ های موجود در این ترکیبات، مقدار EPSs تولیدی را بیش از حد واقعی نشان می دهد (Gancel and Novel 1994; Kimmel et al. 1998). بنابراین در این مطالعه، پپتون به عنوان منبع نیتروژن مناسب جهت بهینه کردن شرایط تولید آزمایشگاهی EPSs مورد استفاده قرار گرفت.

¹ Glucomannan

جدول ۳: نتایج آزمون مقایسه میانگین تأثیر نوع نیتروژن بر تولید EPSs در محیط کشت Glu- SM

نوع نیتروژن	EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)
پپتون	۳۲۲/۶۱ ± ۸/۱۳ ^{ab}
نیترات پتاسیم	۲۹۸/۳۶ ± ۲/۱۷ ^c
عصاره مخمر	۳۳۷/۱۹ ± ۳/۴۲ ^a
کازئین	۲۸۴/۱۱ ± ۱/۸۵ ^{de}
سولفات آمونیوم	۲۸۷/۴۲ ± ۳/۵۵ ^d

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) است.

بهینه‌سازی شرایط تولید EPSs

اثر دمای انکوباسیون (Tem)

برای بررسی اثر دما روی میزان تولید EPSs و دستیابی به دمای بهینه تولید، باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* در دماهای مختلف ذکر شده در جدول ۱ کشت داده شد. همان طور که در جدول (۴) نشان داده شده است، بیشترین مقدار تولید EPSs در دمای ۴۰ °C رخ داد ولی با ادامه افزایش دما به ۴۵ °C، مقدار تولید EPSs کاهش نشان داد. این نتایج با یافته‌های چندین نویسنده قابل مقایسه است که بیشترین مقدار تولید EPSs توسط باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای کشت بالاتر دیده می‌شود، زیرا دماهای بالا برخی از مسیرهای کاتابولیکی را که انرژی را برای باکتری‌های اسید لاکتیک فراهم می‌کند، متوقف می‌کند، بنابراین سنتز سلولی محدود می‌شود و سنتز EPSs افزایش پیدا می‌کند (De Vuyst *et al.* 2001; Laws *et al.* 2001).

جدول ۴: نتایج تأثیر دمای مختلف انکوباسیون بر مقدار تولید EPSs

دما (Tem) برحسب °C	EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)
۲۵	۱۶۷/۱۲ ± ۵/۰۳ ^e
۳۰	۲۲۳/۷۲ ± ۶/۱۱ ^d
۳۵	۳۱۲/۰۲ ± ۸/۰۹ ^{bc}
۴۰	۳۴۳/۳۲ ± ۶/۱۷ ^a
۴۵	۲۷۸/۴۷ ± ۱۰/۲۳ ^b

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) است.

اثر pH

همانطور که در جدول (۵) دیده می‌شود بیشترین مقدار EPSs در pH های حدود ۵/۵ و ۶ رخ می‌دهد و لی با ادامه افزایش pH به بیش از ۶، مقدار تولید EPSs کاهش می‌یابد. در ارتباط با چگونگی اثر pH بر تولید EPSs مطالعات بسیاری صورت گرفته و نتایج نشان داد، اثر pH به شرایط آزمایش و نوع سویه میکروبی بستگی دارد (Gassem *et al.* 1997). این تحقیقات پیشنهاد کردند بیشترین مقدار تبدیل قند به EPSs در pH ۵/۸، در حالی که تبدیل قند به بیومس، به طور مؤثری در pH ۶/۲ رخ می‌دهد (Kimmel *et al.* 1998). بنابراین کاهش میزان EPSs تولید شده با افزایش pH را می‌توان به افزایش میزان تبدیل قند به بیومس یا احتمالاً به فعالیت آنزیم های تجزیه کننده EPSs نسبت داد.

جدول ۵: نتایج تأثیر pH های مختلف بر مقدار تولید EPSs

EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)	pH
۱۵۸/۳۶ ± ۸/۹۳ ^c	۴/۵
۲۷۲/۷۲ ± ۶/۸۷ ^c	۵/۰
۳۴۹/۵۳ ± ۴/۱۷ ^a	۵/۵
۳۱۱/۶۲ ± ۳/۱۵ ^b	۶/۰
۲۱۵/۹۶ ± ۸/۳۷ ^d	۶/۵

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) است.

اثر مدت زمان انکوباسیون (T)

جدول (۶) نشان داد، با افزایش مدت T مقدار تولید EPSs حاصل، افزایش یافت و بهترین مدت زمان برای رسیدن به حد اکثر مقدار، حدود ۴۸ ساعت است، ولی با ادامه فرآیند تخمیر میزان تولید EPSs کاهش پیدا می‌کند که این امر می‌تواند به علت فعالیت آنزیم های تجزیه کننده (گلیکوهیدرولاز^۱) EPSs باشد که معمولاً در انکوباسیون طولانی مدت اتفاق می‌افتد (De Vuyst and Degeest 1999).

جدول ۶: نتایج تأثیر مدت زمان های مختلف بر مقدار تولید EPSs

EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)	زمان (T) به ساعت
۱۸۳/۰۳ ± ۱/۷۳ ^e	۱۸
۲۶۴/۱۶ ± ۲/۶۶ ^d	۲۴
۳۱۴/۴ ± ۵/۵۳ ^c	۳۶
۳۵۳/۲۲ ± ۷/۱۷ ^a	۴۸

¹ Glycohydrolase

زمان (T) به ساعت	EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)
۷۲	$340/22 \pm 6/3^{ab}$

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) است.

در مرحله بعدی پس از بررسی اثرات پارامترهای مورد نظر روی مقدار تولید EPSs، برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای که در نتیجه به کارگیری آن‌ها بهترین محصول از واکنش به دست خواهد آمد، بهینه سازی انجام شد (جدول ۷).

جدول ۷: سطوح بهینه متغیرها و مقدار EPSs تولید شده

متغیر	فاکتورهای متغیر			EPSs تولید شده (میلی گرم / لیتر)
	دما (°C)	pH	زمان (h)	
سطح بهینه	۴۰	۵/۵	۴۸	$368/36 \pm 7/17$

با توجه به مقدار EPSs به دست آمده از این آزمایش، مشخص شد که شرایط تعیین شده تا حدودی می تواند برای تولید EPSs با مقدار قابل قبول لحاظ گردد. بنهادریا و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیشترین میزان EPS تولید شده توسط باکتری لاکونوستوک با استفاده از محیط کشت MRS ساکارزدار را، $16/28$ میلی گرم / میلی لیتر در دمای انکوباسیون 37°C ، pH برابر $6/5$ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت گزارش کردند (Benhadria et al. 2017). نیز پراتیما و همکاران (سال ۲۰۱۴) میزان EPS تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس در محیط کشت پروتئین وی مایع را بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق آنها، بیشترین میزان EPS تولید شده $153/39$ میلی گرم / لیتر در دمای انکوباسیون 25°C ، pH برابر $6/8$ ، میزان گلوکز 10 میلی گرم و 1% میزان کازئین هیدرولیز شده بود (Prathima et al. 2014). در تحقیق انجام گرفته توسط کیمل و همکاران (سال ۱۹۹۸) ماکزیمم میزان EPS تولید شده توسط باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس با استفاده از محیط کشت MRS را، 295 میلی گرم / لیتر در دمای انکوباسیون 38°C ، pH برابر $5/0$ ، میزان منبع نیتروژن (Bacto-casitone) 30 گرم / لیتر گزارش کردند (Kimmel et al. 1998). این تنوع میزان تولید مشاهده شده در بین مطالعات مختلف ممکن است ناشی از تفاوت در نوع میکروارگانیسم های تولید کننده EPS، همچون نوع محیط کشت مورد استفاده برای ارزیابی میزان تولید و اختلاف در شرایط آزمایش باشد.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق پس از بررسی تأثیر شرایط مختلف روی تولید EPSs، دمای انکوباسیون 40°C ، pH برابر $5/5$ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت به عنوان شرایط بهینه تولید پیشنهاد می گردد. به علاوه استفاده از ماده ارزان قیمت شیر پس چرخ (SM) به عنوان سوبسترای محیط کشت بسیار قابل توجه بود. با توجه به اینکه شیر محیط مناسبی برای رشد باکتری های اسید لاکتیکی

است استفاده از این باکتری‌ها که توانایی تولید EPSs داشته باشند، می‌تواند گزینه مناسبی جهت بهبود خصوصیات بافتی و سلامتی بخشی از محصولات لبنی تخمیری باشد.

منابع

روح بخش، ع. و. حق شناس، ف. (۱۳۶۹). کنترل بهداشتی مواد خوراکی (نمونه برداری، آزمایش، تفسیر)، انتشارات شرکت سهامی چهر.

Aslim, B., Y. Beyatli and Z. N. Yuksekdog. (2006). Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. *Int. J. Food Sci and Technol.* 41:973–979.

Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Front Bioeng Biotechnol* 3: 200.

Benhadria, M. K., Touil, M. A. T. and Meddah, B. (2017). Optimization of production of Microbial Exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. *J. Appl. Biosci.* 111(1): 10925-10933.

Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P. and Barros-Velázquez, J. (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *Biomed Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/418132>.

Cerning, J., Bouillanne, C. and Desmazeaud, M.J. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* 10: 255–260.

De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 152-177.

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaniengelgem, F. and Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11: 687–707.

Dubois, M., Gilles, J.K., Hamilton, P.A., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28 (3): 350–356.

Duncan, D. B. (1955). "Multiple range and multiple F tests". *Biometrics.* 11: 1–42.

Emmanuel, C. K., Kalpy-Julien, C., Lessoy, T. and Esso, A. (2017). Probiotic profiling of *Leuconostoc* species isolated from a traditional fermented cassava product. *Afr. J. Microbiol. Res.* 11(10): 408-413.

- Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented
- Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z. I. (2000). Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Canadian J. Microbiol.* 46: 1123–1127.
- Gancel, F. and Novel, G. (1994). Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *J. Dairy Sci.* 77: 685–688.
- Gassem, M.A., Schmidt, K.A. and Frank, J. F. (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*. *J. Food Sci.* 62 (1): 171-174.
- Goh, K.K.T., Haisman, D.R., Archer, R.H. and Singh, H. (2005). Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Res. Int.* 38: 605–613.
- Haj-Mustafa, M., Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M. and Soleimani-Zad S. (2015). Statistical study on fermentation conditions in the optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* 519 in skimmed milk base media. *ISBAB.* 4: 521–527.
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F. and Ziegler, G.R. (1998). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a Semi defined Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (2): 659–664.
- Kumar, A.S., Mody, K. and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic. Microbiol.* 47:103–117.
- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 19: 1–28.
- Macedo, M.G., Lacroix, C. and Champagne, C.P. (2002). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. *Biotechnol. Prog.* 18: 167-173.
- Madledo, P.R. and Gavilán, C.G. (2005). Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88: 843–856.
- Mekhici, K.B., Meddah, T.T. and Boumédiene M. (2017). Optimization of production of microbial exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. *J. Appl. Biosci.* 111: 10925-10933.
- Mustafa, M. H., Lina, A.A, Oklah, B and Issa, S. (2015). Screening of locally isolated lactic acid bacteria for production of exopolysaccharides (EPS). *D. U. J. Agri. Sci.* 31 (1): 183-190.
- Nwodo, U. U., Green, E. and Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int. J. Mol.* 13 (11), 14002-14015.

Peant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. and Roy, D. (2005). Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. Microbiol. 151: 1839–1851.

Prathima, P. C., Lule, V. K., Tomar, S. K. and Singh, A. K. (2014). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* NCDC 191 by response surface methodology. Int J Curr Microbiol App Sci. 3(5): 835-854.

sausages. Int. J. Food Microbiol. 212: 76-88.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci M.C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Microbiol. Res. 154: 705–712.

Welman, A.D. and Maddox I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biot. 21 (6): 269-274.

Optimization of EPS production conditions by *Leuconostoc dextranicum* isolated from traditional Syrian cheese

M. Haj Mustafa^{1*}, B. Al-oklah², Gh. Ashouri³

Received:2018.5.1
Accepted:2020.9.23

Abstract

Increasing demand for industrial applications of various natural polymers has led to increased attention to the use of exopolysaccharides made by microorganisms. Since most lactic acid bacteria (LAB) are food-grade microorganisms with GRAS status (Generally Recognized As Safe), the use of the secreted EPS as natural alternatives to produce all-natural food products without additives from LAB has received increased attention. In this research, carbon and nitrogen sources suitable for the production of exopolysaccharides (EPSs) by *Leuconostoc dextranicum*, as GRAS bacterium, were investigated. The results showed that glucose (Glu) produced more EPSs in the medium compared to other sugars and peptone compared to other nitrogen sources. Therefore, only glucose and peptone were used to optimize the production conditions of EPSs. In order to investigate the effect and optimization of EPS production conditions, three parameters of temperature, pH and incubation time, each was selected at five levels and optimized separately. Then, optimization was performed to determine the levels at which independent variables attain the best production. Results showed that the best laboratory condition for EPSs production would be yielded at the incubation temperature of 40 °C, pH of 5.5 and fermentation time of 48 hours. In summary, the results of this study showed the potential of *Leu. dextranicum* as a native microorganism and the cheap culture medium of skimmed milk for producing such a valuable product.

Keywords: EPSs, Lactic acid bacteria, *Leu. dextranicum*, Skimmed milk

1- Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan

*(Corresponding author: mustafa.muhammad@gmail.com)

2- Researcher at the National Biotechnology Commission of Damascus, Damascus, Syria

3- Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan

تفاوت‌های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در جوانه‌زنی و سبز شدن بذر سه گونه علف هفت‌بند (*Polygonum*)

مرجان دیانت^{*۱}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۰

چکیده

علف هفت‌بند یک از مهمترین علف‌های هرز با وسیع‌ترین پراکنش در دنیاست که گونه‌های آن دارای خواب هستند. برای تعیین بهترین تیمار شکستن خواب سه گونه علف هفت‌بند خوابیده (*Polygonum aviculare* L.)، علف هفت‌بند پیچ (*P. convolvulus* L.) و علف هفت‌بند ایرانی (*P. persicaria*) آزمایشی انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل خراش‌دهی با اسید سولفوریک، نیترات پتاسیم، سرمادهی مرطوب، جیبرلیک اسید بودند. در بخش دیگر پژوهش اثرات دمایی متناوب شب/روز (۱۵/۵، ۲۰/۱۰، ۲۵/۱۵، ۳۰/۲۰ و ۳۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد) و نور (تاریکی مطلق، ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی و نور مداوم) روی ۱۰ جمعیت هفت‌بند، از سه گونه مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین جهت تعیین عمق مطلوب جوانه‌زنی، هفت عمق کاشت (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ سانتی‌متر) مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین تیمارها جهت شکستن خواب در گونه‌های علف هفت‌بند خوابیده و ایرانی سرمادهی مرطوب و در علف هفت‌بند پیچ، اسید سولفوریک بودند. تفاوت معنی‌داری در درصد و سرعت جوانه‌زنی بین جمعیت‌های علف هفت‌بند وجود داشت. جوانه‌زنی در طیف گسترده‌ای از نوسانات دمایی صورت گرفت و تفاوت‌های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در این سه گونه وجود داشت. جوانه‌زنی علف هفت‌بند پیچ به نور وابسته نبود. در همه جمعیت‌ها با افزایش عمق کاشت درصد سبز شدن کاهش یافت اما واکنش سبز شدن بذره‌های جمعیت‌ها به افزایش عمق کاشت، متفاوت بود. نیاز نوری دو گونه علف هفت‌بند خوابیده و ایرانی نشان داد که این گونه‌ها در مزارعی با شخم حداقل یا بدون شخم، فراوانی بیشتری خواهند داشت. بنابراین افزایش عمق شخم می‌تواند در مدیریت این گونه‌ها موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: بذر، دمایی متناوب، شکستن خواب علف هرز، نیترات پتاسیم

۱- استادیار دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول: ma_dyanat@yahoo.com)

مقدمه

جنس علف هفت‌بند (*Polygonum*) در دنیا در حدود ۱۷۰ گونه دارد که عمدتاً در مناطق معتدله شمالی گسترش یافته‌اند اما بعضی گونه‌ها در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر نیز یافت می‌شوند (Heywood *et al.*, 2007). علف هفت‌بند خوابیده (*Polygonum aviculare* L.) یکی از گسترده‌ترین علف‌های هرز در دنیا است (Tardif & Francois, 2005). علف هفت‌بند خوابیده بومی اروپا یا اوراسیا است (Magee & Ahles, 2007). پراکنش وسیع این گونه به دلیل پلی مورفیسم ژنتیکی، انعطاف‌پذیری فنوتیپی (Meerts, 1995)، تولید بذر بالا (Royer & Dickinson, 1999)، روش‌های مختلف پراکنش بذر، تولید بانک بذر پایا و دگرآسیبی (Allelopathy) است (Tardif & Francois, 2005). گلیکوسیدها، اسیدهای چرب با زنجیره بلند (Alsaadawi *et al.*, 1983)، ترکیبات فنولیک، اسیدهای لینولئیک و اگزالیک (Kim *et al.*, 1995) تولید شده از گیاه زنده یا بقایای آن در خاک از جوانه‌زنی یونجه (*Medicago sativa*) (Chung *et al.*, 1994)، کاهو (*Lactuca sativa* L.) و برنج (*Oryza sativa* L.) (Kim *et al.*, 1995) جلوگیری می‌کنند. کاهش عملکرد به دلیل حضور علف هفت‌بند خوابیده در اروپا در محصول نخود (*Pisum sativum* L.) (Wright & Baloch, 1999)، ذرت (*Zea mays* L.) (Bulcke *et al.*, 1987)، گندم (*Triticum aestivum* L.) (Catullo *et al.*, 1983)، گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) (Paolini *et al.*, 1998) و مراتع (López & Mattiacci, 1983) گزارش شده است. (Jones *et al.*, 2000). علف هفت‌بند پیچ (*Polygonum convolvulus* L.) بومی اروپا است و یکی از علف‌های هرز متداول در زمین‌های زراعی کانادا است همچنین یکی از مهم‌ترین علف‌های هرز یک ساله در مزارع دشت بزرگ آمریکای شمالی است (Stevenson & Wright, 1996). پایداری این علف هرز بخشی به دلیل وجود خواب در آکن‌های تازه رسیده آن است (Hume *et al.*, 1983). همچنین این گونه قادر است بیش از ۳۰ هزار بذر در هر گیاه تولید کند و بذره‌های آن از عمق بیش از ۹/۵ سانتی متری توانایی سبز شدن دارند (du Croix Sissons *et al.*, 2000). این ویژگی‌ها به علف هفت‌بند پیچ این توانایی را می‌دهد که در طول سالیان متمادی در بسیاری از مزارع گسترش یابد. کاهش عملکرد نتیجه رقابت علف هفت‌بند پیچ در گندم (Bostrom *et al.*, 2003)، کتان (*Linum usitatissimum* L.) (Gruenhagen & Nalewaja 1969)، و جو (*Hordeum vulgare* L.) (Friesen & Shebeski, 1960) گزارش شده است. هفت‌بند ایرانی (*P. persicaria*) علف‌هرزی بومی اروپا است و یکی از علف‌های هرز تابستانه در محصولات باغی، نهالستان‌ها (Lipecki 2005) و گیاهان زراعی (Kropff *et al.*, 1995) می‌باشد. علف هفت‌بند ایرانی در بسیاری از تناوب‌های هلند که حاوی هویج (*Dacus carrota* L.) و گندم بهاره هستند، رشد می‌کند (Mertens *et al.*, 2002). ژنوتیپ‌های علف هفت‌بند ایرانی انعطاف‌پذیری فنوتیپی مناسبی در واکنش به نور، رطوبت و مواد غذایی نشان می‌دهند (Sultan *et al.*, 1993a, b, c).

جوانه‌زنی یک از بحرانی‌ترین مراحل در سیکل زندگی گیاه است (Shoab *et al.*, 2012) که تحت تأثیر خواب بذر و عوامل محیطی مثل نور، خاک، پتانسیل اسمزی، تنش شوری، دما و عمق دفن در خاک قرار می‌گیرد (Martins & Christoffoleti 2014). خواب بذر به عنوان راهکار جلوگیری از جوانه‌زنی بذرهای زنده معرفی می‌شود که توزیع جوانه‌زنی را در طول زمان باعث می‌شود (Hilhorst 1995) و یکی از مهمترین راهکارهای بقا در علف‌های هرز یک ساله مهاجم است (Baskin *et al.*, 2004). در ایران هر سه گونه علف‌هرز پراکندگی زیادی داشته و از استان‌های مختلف گزارش شده‌اند (Minbashi *et al.*, 2015; Mozaffarian, 2012). گونه‌های علف هفت‌بند علاوه بر تفاوت‌های مورفولوژیکی و وراثتی از لحاظ گستردگی و فراوانی بسیار با یکدیگر متفاوتند. یکی از دلایل احتمالی در الگوی پراکنش متفاوت گونه‌ها، بیولوژی متفاوت بذر است. اگر هر سه گونه در بیولوژی بذر متفاوت باشند، موفقیت راهکارهای مدیریتی جهت کاهش بانک بذر وابسته به گونه خواهد بود. از این-رو جهت توضیح توانایی جوانه‌زنی متفاوت گونه‌های علف هفت‌بند و بهینه کردن راهکارهای مدیریتی جهت کنترل علف هفت‌بند، مطالعه بیولوژی بذر لازم است. بنابراین هدف از این تحقیق پاسخ به این سه سوال است: ۱- آیا بذرهای تازه تولید شده در پاییز در هر سه گونه دارای خواب اولیه هستند؟ ۲- آیا گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف علف هفت‌بند واکنش متفاوتی به تناوب دمایی و شرایط نوری نشان می‌دهند؟ ۳- عمق مطلوب جوانه‌زنی و حداکثر عمق جوانه‌زنی در این گونه‌ها چقدر است؟

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: بررسی خواب بذر

بذرهای سه گونه علف‌هرز علف هفت‌بند خوابیده، علف هفت‌بند پیچیده و علف هفت‌بند ایرانی از استان‌های مختلف ایران جمع‌آوری شدند (جدول ۱). بذرهای مورد استفاده ابتدا به مدت ۲ دقیقه با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر کاملاً شسته شدند. به دلیل عدم جوانه‌زنی بذرهای تازه برداشت شده در آب مقطر، تیمارهای شکستن خواب مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه زراعت مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات تهران در سال ۱۳۹۶ انجام شد. عامل‌های مورد بررسی شامل ۳ گونه علف‌هرز علف هفت‌بند (از هر گونه تنها جمعیت تهران مورد بررسی قرار گرفت) و تیمارهای شکستن خواب در ۵ سطح (خراش‌دهی با اسید سولفوریک ۲۰ دقیقه، خراش‌دهی با اسید سولفوریک ۱۰ دقیقه، نیترات پتاسیم ۲۰/۰۲ درصد، سرمادهی مرطوب در ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته، جیبرلیک اسید ۲۰۰ پی‌پی‌ام) بودند. پس از اعمال تیمارها بذر در دمای متناوب ۱۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. از هر گونه ۴۰ عدد بذر در پتری دیش‌هایی با قطر ۹ سانتی متر قرار داده شدند. شمارش بذرهای جوانه زده تا ۲۱ روز پس از شروع

آزمایش انجام شد که ملاک جوانه‌زنی خروج ریشه چه به میزان حداقل ۲ میلی متر بود (An et al., 1997). برای محاسبه درصد جوانه‌زنی از معادله (۱) استفاده شد (Alam et al., 2014) که در آن GP: درصد جوانه‌زنی، n: تعداد بذر جوانه‌زده در روز نام و N: تعداد کل بذرهای کشت شده است.

$$\text{معادله (۱)} \quad GP = 100 \times \frac{Ni}{S}$$

جدول ۱: جمعیت‌های علف هرز هفت بند

گونه	جمعیت	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
کردستان ۱	۴۶ درجه و ۲۳ دقیقه	۱۴ درجه و ۳۵ دقیقه	
تهران ۱	۵۱ درجه و ۲۰ دقیقه	۳۵ درجه و ۴۰ دقیقه	
خراسان ۱	۶۰ درجه و ۱۰ دقیقه	۳۶ درجه و ۸ دقیقه	هفت بند خوابیده
کرج ۱	۵۰ درجه و ۱۹ دقیقه	۳۵ درجه و ۴۱ دقیقه	
سمنان ۱	۵۳ درجه و ۴۰ دقیقه	۳۵ درجه و ۳۴ دقیقه	
تهران ۲	۵۱ درجه و ۶ دقیقه	۳۵ درجه و ۵ دقیقه	هفت بند پیچ
زنجان ۲	۴۸ درجه و ۵۲ دقیقه	۳۶ درجه و ۱۵ دقیقه	
گلستان ۲	۲۶ درجه و ۵۴ دقیقه	۳۶ درجه و ۵۰ دقیقه	
تهران ۳	۵۱ درجه و ۱۶ دقیقه	۳۵ درجه و ۳۰ دقیقه	هفت بند ایرانی
لرستان ۳	۴۸ درجه و ۲۱ دقیقه	۳۳ درجه و ۲۹ دقیقه	

آزمایش دوم: واکنش جوانه‌زنی به نور و دما

به منظور بررسی اثرات دما و نور بر جوانه‌زنی بذر سه گونه علف هرز هفت‌بند، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. عامل‌های مورد بررسی شامل ۱۰ جمعیت علف‌هرز هفت بند (جدول ۱)، دمای متناوب در پنج سطح (۱۵/۵، ۲۰/۱۰، ۲۵/۱۵، ۳۰/۲۰ و ۳۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد) و نور در سه سطح (تاریکی، ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی و نور مداوم) بودند. شدت نور ۳۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه بود. از هر گونه ۲۵ عدد بذر در پتری دیش‌هایی با قطر ۹ سانتی متر قرار گرفتند. پتری‌دیش‌ها در ژرminatور در معرض دماهای ذکر شده قرار گرفتند. برای اعمال تیمار تاریکی پتری‌ها با دو ورق آلومینیوم پوشانده شدند. کاغذ صافی داخل پتری‌دیش‌ها توسط ۵ میلی لیتر آب مقطر مرطوب نگه داشته شد. آزمایش ۲۱ روز ادامه یافت و در نهایت درصد جوانه‌زنی شبیه آزمایش اول به دست آمد. سرعت جوانه‌زنی طبق معادله ۲ محاسبه شد (Maguire, 1962).

$$\text{معادله (۲)} \quad GR = \sum \frac{Ni}{Ti}$$

که در آن، GR: سرعت جوانه‌زنی (تعداد بذر جوانه‌زده در روز)، Ni: تعداد بذر جوانه‌زده در روز نام و Ti: تعداد روز از شروع آزمایش تا شمارش نام است.

آزمایش سوم: واکنش سبز شدن بذر به عمق کاشت

به منظور تعیین عمق مطلوب سبز شدن و حداکثر عمق سبز شدن آزمایش به صورت گلدانی در اتاقک رشد به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. عامل‌های مورد بررسی شامل ۴ جمعیت علف هرز هفت‌بند (تهران ۱، کرج ۱، تهران ۲ و تهران ۳) و عمق کاشت در هفت سطح (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ سانتی متر) بودند. بذرها جمعیت‌های مورد بررسی بعد از اعمال تیمارهای شکستن خواب در گلدان‌هایی با ارتفاع ۳۰ و قطر دهانه ۱۶ سانتی‌متر در عمق‌های مورد نظر قرار گرفتند. تعداد بذر کاشته شده در هر گلدان ۵ عدد بود. خاک استفاده شده از نوع شنی-لومی (۵٪ رس، ۱۰٪ سیلت، ۸۵٪ شن، ۰/۲٪ ماده آلی و $\text{pH} = 7/3$) و شرایط نوری در گلخانه ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با تناوب دمایی ۱۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. گلدان‌ها در زمان نیاز با استفاده از آب پاش دستی آبیاری شدند. گیاهچه‌های سبز شده به مدت سه هفته و هر پنج روز یکبار شمارش شدند. درصد سبز شدن بذرها از تقسیم تعداد بذر سبز شده بر تعداد کل بذرها حاصل شد.

پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از نرم افزار MINITAB و روش اندرسون-دارلینگ (Anderson & Darling, 1952)، تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹:۱ انجام شد. مقایسه بین تیمارها با آزمون LSD حفاظت شده در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول: بررسی خواب بذر گونه‌ها

نتایج تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی گونه‌های علف هفت بند تحت تأثیر تیمارهای شکستن خواب در جدول ۲ آورده شده است. اثرات گونه و تیمار شکستن خواب معنی دار شده است. به دلیل معنی دار شدن اثر متقابل گونه × تیمار شکستن خواب، برش دهی روی گونه صورت گرفت.

جدول ۲: تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی گونه‌های هفت بند تحت تأثیر تیمارهای شکستن خواب

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد جوانه‌زنی
گونه	۲	۲۰۹/۲۶**
تیمار شکستن خواب	۴	۲۷۳۱/۵۰**
گونه × تیمار شکستن خواب	۸	۷۲۲۰/۳۵**
خطا	۴۴	۶/۷۵
ضریب تغییرات	-	۶/۶۶

*، ** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد و n.s عدم تفاوت معنی‌دار

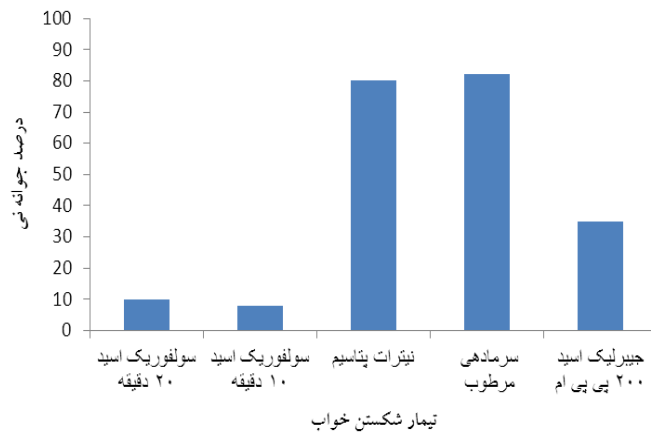
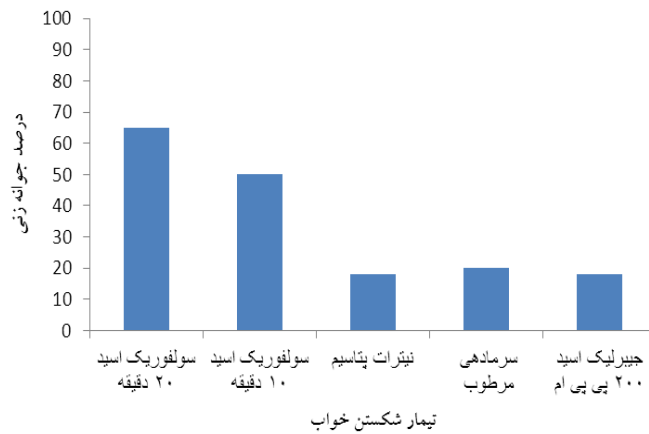
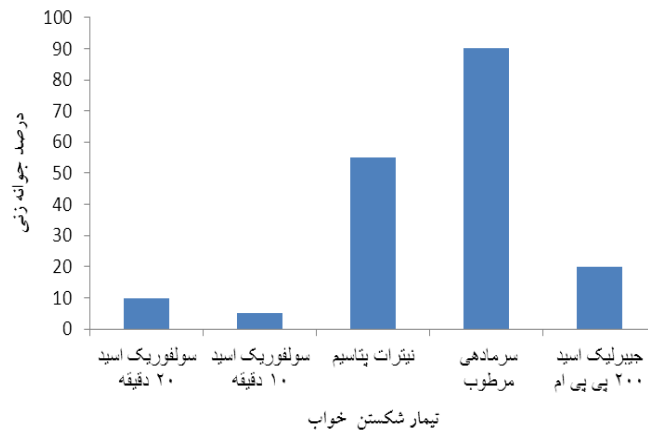
درصد جوانه‌زنی بین تیمارهای شکستن خواب در سه گونه علف هفت‌بند خوابیده، علف هفت‌بند پیچ و علف هفت‌بند ایرانی تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۳). بالاترین درصد جوانه‌زنی در گونه هفت‌بند خوابیده در تیمار سرمادهی مرطوب در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۱). در علف‌هرز علف هفت‌بند پیچ بهترین تیمار جهت شکستن خواب اسید سولفوریک به مدت ۲۰ دقیقه بود. بین تیمارهای نیترات پتاسیم ۰/۰۲ درصد و اسید جیبرلیک ۲۰۰ پی‌پی‌ام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بهترین تیمار جهت شکستن خواب در هفت بند ایرانی سرمادهی مرطوب در ۲ درجه سانتی‌گراد بود که تفاوت معنی‌داری با نیترات پتاسیم ۰/۰۲ درصد نداشت (شکل ۱).

جدول ۳: میانگین مربعات درصد جوانه‌زنی که توسط گونه برش داده شده است.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد جوانه‌زنی
گونه	۲	۲۰۹/۲۶**
تیمار شکستن خواب	۴	۲۷۳۱/۵۰**
گونه × تیمار شکستن خواب	۸	۷۲۲۰/۳۵**
خطا	۴۴	۶/۷۵
ضریب تغییرات	-	۶/۶۶

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

برای شکستن خواب و افزایش جوانه زنی سرمادهی مرطوب در حد وسیعی در بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wang & Berjak 2000; ISTA, 1999). اثر مثبت سرمادهی مرطوب در جوانه‌زنی بذر گونه‌های علف‌هرز قبلاً نیز توسط سایر محققان گزارش شده است (Wartidiningsih *et al.*, 1994). سرمادهی مرطوب احتمالاً تعادل هورمونی بذر را تغییر داده و جوانه‌زنی را از طریق جیبرلیک اسید و فعالیت سیتوکینین و کاهش اسید آبسزیک افزایش می‌دهد. سرمادهی مرطوب رطوبت کافی را جهت فعال شدن آنزیم‌های هیدرولیزی لازم جهت جوانه زنی بذرهایی که به دمای گرم برده شده اند، فراهم می‌سازد (Copeland & McDonald, 2001). تفاوت در نحوه شکستن خواب بذرهای سه گونه می‌تواند به دلیل تفاوت در ماهیت و نوع خواب آنها باشد. خواب بذر می‌تواند فیزیکی، فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی، مورفو-فیزیولوژیکی و یا ترکیبی از آنها باشد (Baskin & Baskin 2004). خواب بذر علف هفت‌بند پیچ عمدتاً به دلیل پریکارپ سخت آن است که تبادل آب و گازها را محدود کرده و به عنوان مانعی برای جوانه زنی عمل می‌کند (Timson, 1966). وجود تفاوت‌های بین گونه‌ای در نیازهای جوانه زنی در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (De Cauwer *et al.*, 2014). بذرهای تازه در گونه‌های مختلف علف‌هرز درمنه (*Artemisia halodendron*) توانایی جوانه‌زنی بالایی نشان دادند اما بذر گونه اسکوپاریا (*A.scoparia*) دارای خواب اولیه (ذاتی) بود که با سرمادهی و ذخیره در محیط خشک شکسته شد (De Cauwer *et al.*, 2014). بنابراین بهترین تیمار جهت شکستن خواب گونه‌های علف هفت‌بند خوابیده و علف هفت‌بند ایرانی سرمادهی مرطوب و در علف هفت‌بند پیچ اسید سولفوریک به مدت ۲۰ دقیقه بود.



شکل ۱: اثر تیمارهای شکستن خواب بر میانگین درصد جوانه زنی گونه های هفت بند. میل بارها انحراف معیار هر میانگین است. (هفت بند خوابیده $LSD=3.57$, علف هفت بند پیچ $LSD=4.94$ و علف هفت بند ایرانی $LSD=5.45$).

آزمایش دوم: واکنش جوانه زنی به نور و دما

جدول ۴ نتایج تجزیه واریانس درصد و سرعت جوانه‌زنی جمعیت‌های هفت بند در تیمارهای دمایی و نوری متفاوت

نشان می‌دهد. اثرات ساده جمعیت، تیمار دما، تیمار نور و تمام اثرات متقابل آنها بر این دو صفت معنی‌دار شده است (جدول ۴).

جدول ۴: میانگین مربعات درصد و سرعت جوانه‌زنی جمعیت‌های هفت بند تحت تاثیر عامل‌های مورد مطالعه

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی		
۰/۳۷۳۸**	۱۰۸۳۹/۵۶**	۹	جمعیت
۱/۵۲۴۲**	۴۳۹۶۶/۵**	۴	دما
۲/۷۵۶۲**	۸۰۰۹۹/۵**	۲	نور
۰/۰۲۲۴**	۶۵۲/۷۷۷۸**	۳۶	جمعیت × دما
۰/۱۳۱۰**	۳۷۷۷/۳۳۸**	۱۸	جمعیت × نور
۰/۱۵۳۵**	۴۴۴۰/۷۵**	۸	دما × نور
۰/۰۱۲۷**	۳۶۵/۸۱**	۷۲	جمعیت × دما × نور
۰/۰۰۰۸**	۲۴/۹۵	۴۵۰	خطا
۱۰/۷۰	۱۱/۶۱	-	ضریب تغییرات

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

به دلیل معنی‌دار شدن اثر متقابل جمعیت × تیمار دما × تیمار نور بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، برش‌دهی روی جمعیت صورت گرفت. بین تیمارهای مختلف دما و نور در هر جمعیت در دو صفت درصد و سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۵).

جدول ۵: میانگین مربعات درصد و سرعت جوانه‌زنی که توسط جمعیت برش داده شده است.

میانگین مربعات		درجه آزادی	جمعیت
سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی		
۰/۱۱۱**	۳۳۱۰**	۱۴	کردستان ۱
۰/۱۳۸**	۳۹۶۹/۵۲**	۱۴	تهران ۱
۰/۱۰۵**	۳۰۱۶/۹۶**	۱۴	خراسان ۱
۰/۱۶۲**	۴۶۵۴/۴۶**	۱۴	کرج ۱
۰/۱۱۱**	۳۲۲۵/۵۷**	۱۴	سمنان ۱
۰/۰۸۲**	۲۳۵۲/۸۲**	۱۴	تهران ۲
۰/۰۸۴**	۲۲۴۱/۸۲**	۱۴	زنجان ۲
۰/۰۸۱**	۲۱۴۵/۳۲**	۱۴	گلستان ۲
۰/۱۶۵**	۴۷۷۹/۱۷**	۱۴	تهران ۳
۰/۱۷۴**	۵۰۴۳/۳۹**	۱۴	لرستان ۳

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

در جمعیت‌های کردستان ۱ و تهران ۱ بیشترین درصد جوانه‌زنی در نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد و تیمار ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با دمای ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نداشت.

جدول ۶: مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی (\pm انحراف معیار) جمعیت‌های علف هفت‌بند تحت تأثیر تیمار دما \times تیمار نور

گونه	جمعیت	تیمار نور	دمای متناوب				
			۲۵/۳۵	۲۰/۳۰	۲۵/۱۵	۲۰/۱۰	۱۵/۵
کردستان ۱	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۴ \pm ۰/۴۱	۳/۵ \pm ۰/۲۹	۵ \pm ۰/۴۱	۴/۲۵ \pm ۰/۷۵	۳ \pm ۰/۴۱
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۴۶/۵ \pm ۴/۲۶	۸۱/۷ \pm ۱/۱۸	۹۰/۵ \pm ۱/۶۶	۳۸/۷ \pm ۱/۳۱	۱۶/۵ \pm ۱/۳۲
		نور پیوسته	۳۱/۷۵ \pm ۱/۶	۵۰/۲ \pm ۱/۴۴	۴۰/۷ \pm ۱/۱۱	۲۰/۷ \pm ۰/۴۸	۱۱/۲۵ \pm ۰/۴۸
LSD=۱۸/۰۷							
تهران ۱	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۶ \pm ۱/۶۸	۵/۷۵ \pm ۰/۹۵	۷ \pm ۲/۱۲	۵/۷۵ \pm ۱/۹۳	۵/۵ \pm ۱/۶۶
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۸۳/۲ \pm ۳/۳۳	۸۸ \pm ۱/۵۸	۹۲ \pm ۱/۰۸	۴۰/۲۵ \pm ۳/۷۵	۱۸ \pm ۳/۶۳
		نور پیوسته	۳۴/۲ \pm ۳/۸۲	۵۱/۷ \pm ۳/۶۴	۴۲/۲ \pm ۲/۹۵	۲۲/۲۵ \pm ۲/۸۴	۱۲/۷۵ \pm ۲/۳۶
LSD=۷/۶							
خراسان ۱	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۲/۷۵ \pm ۰/۲۵	۲ \pm ۰/۴۱	۳/۷۵ \pm ۰/۸۵	۳/۲۵ \pm ۰/۶۳	۴ \pm ۰/۴۱
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۵۵/۵ \pm ۲/۱۶	۸۴ \pm ۱/۷۸	۷۸/۲ \pm ۲/۹۸	۳۹ \pm ۱/۴۷	۱۹/۲۵ \pm ۱/۸۰
		نور پیوسته	۳۸ \pm ۱/۱۵	۵۲ \pm ۳/۸۲	۴۲/۲ \pm ۱/۶۰	۳۶/۷ \pm ۵/۰۶	۱۷ \pm ۱/۹۱
LSD=۵/۵۵							
کرج ۱	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۴/۷۵ \pm ۰/۵۰	۴/۲۵ \pm ۰/۷۵	۳/۵ \pm ۰/۲۹	۴/۷۵ \pm ۰/۴۵	۴/۲۵ \pm ۰/۴۹
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۶۲/۷ \pm ۱/۳۱	۹۲/۷ \pm ۱/۳۸	۹۳ \pm ۱/۹۱	۴۲/۵ \pm ۱/۵۵	۱۰ \pm ۰/۴۱
		نور پیوسته	۴۲/۵ \pm ۰/۸۷	۷۱/۲ \pm ۰/۹۵	۷۲ \pm ۱/۱۵	۳۷/۲۵ \pm ۱/۶	۷/۷۵ \pm ۱/۰۳
LSD=۳/۱۰							
سمنان ۱	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۳/۵ \pm ۰/۶۵	۳/۲۵ \pm ۰/۲۵	۳/۷۵ \pm ۰/۴۸	۴/۲۵ \pm ۰/۶۳	۴/۵ \pm ۰/۶۵
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۷۱/۲۵ \pm ۱/۳۱	۷۸/۵ \pm ۱/۳۲	۶۲/۲ \pm ۱/۳۱	۲۶ \pm ۰/۷۱	۱۱/۲۵ \pm ۰/۹۵
		نور پیوسته	۵۷/۵ \pm ۰/۴۴	۶۲/۲ \pm ۰/۸۵	۴۸/۵ \pm ۰/۶۵	۲۷ \pm ۰/۴۱	۱۲/۵ \pm ۰/۹۶
LSD=۲/۵۹							
تهران ۲	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۷۲/۷۵ \pm ۰/۶۳	۸۷/۲ \pm ۰/۹۵	۶۳ \pm ۱/۴۷	۴۶/۷ \pm ۰/۸۵	۱۷/۲۵ \pm ۰/۶۳
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۷۶/۷۵ \pm ۰/۶۳	۹۰ \pm ۱/۴۷	۶۶/۷ \pm ۱/۳۱	۵۰/۵ \pm ۱/۲۶	۲۱/۷۵ \pm ۱/۱۸
		نور پیوسته	۷۵/۷۵ \pm ۰/۸۵	۸۶/۷ \pm ۱/۰۳	۶۵ \pm ۱/۸۷	۵۰/۵ \pm ۰/۶۵	۲۱/۷۵ \pm ۰/۴۸
LSD=۳/۱۰							
زنجان ۲	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۴۸/۵ \pm ۱/۹	۸۸/۵ \pm ۱/۹	۸۹ \pm ۲/۸۵	۶۴/۷۵ \pm ۳/۱۲	۱۹ \pm ۱/۱۲
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۵۲/۲ \pm ۲/۳۲	۷۸/۵ \pm ۱/۷۶	۹۱/۷۵ \pm ۲/۴	۶۸/۵ \pm ۳/۲۱	۲۳/۵ \pm ۱/۴۵
		نور پیوسته	۵۲/۲۵ \pm ۳/۲۱	۷۷/۵ \pm ۱/۷۶	۷۴/۵ \pm ۱/۹۸	۶۶/۷۵ \pm ۳/۱۴	۲۳/۵ \pm ۱/۷۵
LSD=۴/۷۵							
گلستان ۲	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۷۷/۷۵ \pm ۱/۱۱	۹۱/۷۵ \pm ۱/۴۴	۶۸ \pm ۱/۲۹	۵۱/۷۵ \pm ۱/۴۴	۲۲/۲۵ \pm ۱/۱۱
		۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی	۷۱/۷۵ \pm ۱/۴۹	۹۵ \pm ۱/۱۵	۸۱/۷۵ \pm ۱/۱۱	۵۵/۵ \pm ۰/۸۷	۲۶/۷۵ \pm ۰/۸۵
		نور پیوسته	۷۰ \pm ۲/۴۸	۹۲/۲۵ \pm ۰/۷۵	۸۰/۷۵ \pm ۱/۶۵	۵۵/۵ \pm ۱/۱۹	۲۶/۷۵ \pm ۰/۴۸
LSD=۳/۷۰							

هفت بند خوابیده

هفت بند پیچ

گونه	جمعیت	تیمار نور	دمای متناوب				
			۱۵/۵	۲۰/۱۰	۲۵/۱۵	۲۰/۳۰	۲۵/۳۵
تهران ۳	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۳±۰/۲۳	۲/۵±۰/۸۷	۳/۲۵±۰/۹۰	۴±۱	۲/۷۵±۰/۵۴
			۱۸/۵ ± ۱/۲۳	۸۳/۷۵±۳/۵۴	۸۲/۷۵±۳/۹۸	۶۶/۵±۰/۵۴	۲۷/۲۵±۳/۳۳
			۱۸/۲۵±۲/۳۱	۸۳/۲۵±۳/۱۱	۸۱/۵±۲/۳۲	۶۶/۵±۴/۵۶	۲۸/۵±۴/۲۱
			LSD=۳/۱۱				
هفت بند ایرانی	۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی نور پیوسته	تاریکی	۲ ± ۰/۴۱	۴ ± ۰/۴۱	۲/۷۵ ± ۰/۴۸	۳ ± ۰/۵۸	۳/۷۵ ± ۰/۴۸
			۲۵/۲ ± ۱/۷۰	۸۳/۷۵ ± ۱/۳	۸۴/۵ ± ۱/۶۶	۷۶/۷۵ ± ۲/۲	۳۵/۲ ± ۱/۹۳
			۲۷/۵ ± ۲/۱۸	۸۶/۲۵ ± ۱/۱	۸۰/۷۵ ± ۲/۸	۷۷/۷۵ ± ۱/۳	۳۴/۷ ± ۱/۱۱
			LSD=۴/۳۴				

در تیمار ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی در مقایسه با تیمار نور پیوسته در همه دماها درصد جوانه‌زنی بالاتر بود. در تاریکی مطلق بین تیمارهای دمایی مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در جمعیت خراسان ۱ نیز تیمار نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد در ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی منجر به بالاترین درصد جوانه‌زنی شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد. در این جمعیت بین درصد جوانه‌زنی تیمارهای دمایی مختلف در تاریکی مطلق اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در جمعیت کرج ۱ بالاترین درصد جوانه‌زنی به تیمار دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی متعلق بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد نداشت و با افزایش دما درصد جوانه‌زنی کاهش یافت. در این جمعیت نیز در تاریکی مطلق بین تیمارهای دمایی در صفت درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بهترین تیمار جهت جوانه‌زنی جمعیت سمنان ۱ نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بود. در جمعیت تهران ۲ بهترین تیمار جهت جوانه‌زنی نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بود که اختلاف معنی‌داری با همین دما در تاریکی مطلق نداشت. در جمعیت زنجان ۲ نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بود بالاترین درصد جوانه‌زنی را نشان داد اما که اختلاف معنی‌داری با همین دما در تاریکی مطلق نداشت. در جمعیت گلستان ۲ شبیه به تهران ۲ بالاترین درصد جوانه‌زنی متعلق به نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بود که با همین نوسان دمایی در نور پیوسته و تاریکی مطلق اختلاف معنی‌داری نداشت. در جمعیت‌های تهران ۳ و لرستان ۳ تاریکی مطلق منجر به کاهش درصد جوانه‌زنی شد و در این تیمار بین دماهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در جمعیت تهران ۳ تیمار ۲۰/۱۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بالاترین درصد جوانه‌زنی را داشت و تفاوت معنی‌داری با

همین نوسان دمایی در نور پیوسته نداشت. در جمعیت لرستان ۳ نیز بین نوسان دمایی ۲۰/۱۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی و نور پیوسته اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۶).

جدول ۷ مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی جمعیت‌ها را در تیمارهای دما و نور نشان می‌دهد. در جمعیت کردستان ۱ اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای نوری در نوسان دمایی ۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد وجود نداشت. بالاترین سرعت جوانه‌زنی در نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی مشاهده شد که اختلاف معنی داری با نوسان دمایی ۳۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد نداشت. بالاترین سرعت جوانه‌زنی جمعیت تهران ۱ متعلق به نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی بود که تفاوت معنی‌داری با نوسان‌های دمایی ۳۰/۲۰ و ۳۵/۲۵ درجه سانتی‌گراد نداشت.

جدول ۷: مقایسه میانگین (\pm انحراف معیار) سرعت جوانه‌زنی (تعداد در روز) جمعیت‌های علف هفت‌بند تحت تأثیر تیمار دما \times تیمار نور

گونه	جمعیت	تیمار نور	دمای متناوب				
			۲۵/۱۵	۲۰/۱۰	۲۵/۱۵	۲۰/۳۰	۲۵/۳۵
هفت بند خوابیده	کردستان ۱	تاریکی	۰/۰۴۳±۰/۰۰۲	۰/۰۴۸±۰/۰۰۴	۰/۰۵۳±۰/۰۰۲	۰/۰۴۵±۰/۰۰۲	۰/۰۴۸±۰/۰۰۲
		۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی	۰/۱۲۰±۰/۰۰۸	۰/۰۲۵±۰/۰۰۸	۰/۰۵۵±۰/۰۰۱	۰/۰۲۹۸±۰/۰۱۴	۰/۰۵۰۳±۰/۰۰۷
		نور پیوسته	۰/۰۸۸±۰/۰۰۳	۰/۰۱۴۵±۰/۰۰۳	۰/۰۲۶۳±۰/۰۰۶	۰/۰۳۲±۰/۰۰۸	۰/۰۲۱۸±۰/۰۰۱
LSD=۰/۱۱							
تهران ۱	تهران ۱	تاریکی	۰/۰۵۸±۰/۰۰۱	۰/۰۵۵±۰/۰۰۱	۰/۰۶۵±۰/۰۰۱	۰/۰۵۵±۰/۰۰۵	۰/۰۵۸±۰/۰۰۱
		۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی	۰/۱۳۰±۰/۰۰۲	۰/۰۲۵±۰/۰۰۲	۰/۰۵۶±۰/۰۰۶	۰/۰۵۴±۰/۰۰۱	۰/۰۵۱±۰/۰۰۲
		نور پیوسته	۰/۰۱±۰/۰۰۱	۰/۰۱۵±۰/۰۰۲	۰/۰۲۷±۰/۰۰۲	۰/۰۳۲±۰/۰۰۲	۰/۰۲۲±۰/۰۰۲
LSD=۰/۰۴۵							
خراسان ۱	خراسان ۱	تاریکی	۰/۰۴۸±۰/۰۰۲	۰/۰۴۳±۰/۰۰۴	۰/۰۴۸±۰/۰۰۵	۰/۰۳۸±۰/۰۰۲	۰/۰۴±۰/۰۰۱
		۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی	۰/۱۳۸±۰/۰۰۱	۰/۰۲۵±۰/۰۰۹	۰/۰۴۸±۰/۰۰۱	۰/۰۳۳±۰/۰۰۵	۰/۰۳۵±۰/۰۰۱
		نور پیوسته	۰/۱۲۳±۰/۰۰۱	۰/۰۲۴±۰/۰۰۳	۰/۰۲۷±۰/۰۰۱	۰/۰۵۲±۰/۰۰۱	۰/۰۲۵±۰/۰۰۷
LSD=۰/۰۴۵							
کرج ۱	کرج ۱	تاریکی	۰/۰۴۸±۰/۰۰۳	۰/۰۵۳±۰/۰۰۳	۰/۰۴۵±۰/۰۰۲	۰/۰۴۸±۰/۰۰۴	۰/۰۵۳±۰/۰۰۳
		۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی	۰/۰۸۳±۰/۰۰۳	۰/۰۲۷±۰/۰۰۳	۰/۰۵۷±۰/۰۰۱	۰/۰۴۵±۰/۰۰۷	۰/۰۳۹±۰/۰۰۸
		نور پیوسته	۰/۰۰۷±۰/۰۰۶	۰/۰۲۴±۰/۰۰۱	۰/۰۵۷±۰/۰۰۸	۰/۰۴۵±۰/۰۰۵	۰/۰۲۷±۰/۰۰۵
LSD=۰/۰۱۸							
سمنان ۱	سمنان ۱	تاریکی	۰/۰۵±۰/۰۰۴	۰/۰۵±۰/۰۰۴	۰/۰۴۵±۰/۰۰۳	۰/۰۴۳±۰/۰۰۱	۰/۰۴۵±۰/۰۰۴
		۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی	۰/۰۹±۰/۰۰۶	۰/۰۱۷±۰/۰۰۴	۰/۰۳۹±۰/۰۰۸	۰/۰۴۸±۰/۰۰۸	۰/۰۴۴±۰/۰۰۸
		نور پیوسته	۰/۰۹۸±۰/۰۰۶	۰/۰۱۸±۰/۰۰۲	۰/۰۳۱±۰/۰۰۴	۰/۰۳۹±۰/۰۰۵	۰/۰۳۶±۰/۰۰۹
LSD=۰/۰۱۶							
هفت بند پیچ	تهران ۲	تاریکی	۰/۱۲۵±۰/۰۰۴	۰/۰۲۹±۰/۰۰۵	۰/۰۳۹±۰/۰۰۹	۰/۰۳۸±۰/۰۰۶	۰/۰۴۵±۰/۰۰۴
		۱۶ ساعت نور/ ۸ ساعت تاریکی	۰/۱۱۵±۰/۰۰۷	۰/۰۳۲±۰/۰۰۷	۰/۰۴۱±۰/۰۰۸	۰/۰۵۵±۰/۰۰۹	۰/۰۴۷±۰/۰۰۴

					ساعت تاریکی	
					نور پیوسته	
۰/۰۴۶۸±۰/۰۰۵	۰/۵۳۸±۰/۰۰۵	۰/۴۰۸±۰/۰۰۱	۰/۳۲±۰/۰۰۴	۰/۱۵۳±۰/۰۰۳		
LSD=۰/۰۲۷						
زنجان ۲						
۰/۴۶۳±۰/۰۰۱	۰/۴۰۵±۰/۰۰۷	۰/۵۸۴±۰/۰۰۶	۰/۳۱±۰/۰۰۱	۰/۱۳۵±۰/۰۰۹	تاریکی	۱۶ ساعت نور/۸
۰/۴۸±۰/۰۰۷	۰/۴۲۵±۰/۰۰۱	۰/۵۶±۰/۰۰۶	۰/۳۳±۰/۰۰۵	۰/۱۶۳±۰/۰۰۷	ساعت تاریکی	نور پیوسته
۰/۴۸±۰/۰۱۲	۰/۴۱۵±۰/۰۰۲	۰/۵۴۵±۰/۰۰۱	۰/۳۳±۰/۰۰۱	۰/۱۶۴±۰/۰۰۶		
LSD=۰/۰۲۸						
گلستان ۲						
۰/۴۸۳±۰/۰۰۷	۰/۵۶۳±0.008	۰/۴۲۵±۰/۰۰۸	۰/۳۲۸±۰/۰۰۸	۰/۱۵۵±۰/۰۰۶	تاریکی	۱۶ ساعت نور/۸
۰/۵۰۵±۰/۰۰۷	۰/۵۸±0.007	۰/۴۴۵±۰/۰۰۹	۰/۳۵±۰/۰۰۵	۰/۱۸±۰/۰۰۵	ساعت تاریکی	نور پیوسته
۰/۵±۰/۰۰۱	۰/۵۶۵±0.005	۰/۴۳۳±۰/۰۱۵	۰/۳۵±۰/۰۰۷	۰/۱۸۳±۰/۰۰۳		
LSD=۰/۰۲						
تهران ۳ هفت بند ایرانی						
۰/۰۴±۰/۰۰۱	۰/۰۴۸±۰/۰۰۶	۰/۰۴۵±۰/۰۰۳	۰/۰۴±۰/۰۰۲	۰/۰۴۳±۰/۰۰۲	تاریکی	۱۶ ساعت نور/۸
۰/۴۱۸±۰/۰۰۳	۰/۵۱±۰/۰۰۹	۰/۵۰۳±۰/۰۰۷	۰/۱۸۵±۰/۰۰۶	۰/۱۳۳±۰/۰۰۱	ساعت تاریکی	نور پیوسته
۰/۴۱۵±۰/۰۰۷	۰/۵۱۵±۰/۰۰۹	۰/۵۱۸±۰/۰۰۸	۰/۱۹±۰/۰۰۵	۰/۱۳±۰/۰۰۸		
LSD=۰/۱۸						
لرستان ۳						
۰/۰۴۵±۰/۰۰۳	۰/۰۴۸±۰/۰۰۲	۰/۰۴۵±۰/۰۰۳	۰/۰۴۳±۰/۰۰۳	۰/۰۳۸±۰/۰۰۲	تاریکی	۱۶ ساعت نور/۸
۰/۲۳±۰/۰۰۱	۰/۴۷۵±۰/۰۰۱	۰/۴۹۸±۰/۰۱۷	۰/۵۱۵±۰/۰۰۸	۰/۱۷۳±۰/۰۰۱	ساعت تاریکی	نور پیوسته
۰/۲۲۸±۰/۰۰۶	۰/۴۸±۰/۰۰۸	۰/۵۲۳±۰/۰۰۱	۰/۵۳۳±۰/۰۰۶	۰/۱۸۵±۰/۰۰۱		
LSD=۰/۲۵						

نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد در نور پیوسته منجر به حصول بالاترین سرعت جوانه‌زنی جمعیت خراسان ۱ شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. بالاترین سرعت جوانه‌زنی جمعیت کرج ۱ در نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد بود اما بین نور پیوسته و تناوب نوری اختلافی مشاهده نشد. در جمعیت سمنان ۱ نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی مناسب‌ترین تیمار جهت سرعت جوانه‌زنی بالا بود. شبیه به علف هفت‌بند خوابیده واکنش جمعیت‌های علف هفت‌بند پیچ به تیمارهای دما و نور متفاوت بود. در جمعیت تهران ۲ بین نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد در نور پیوسته و تاریکی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و مناسب‌ترین تیمار دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بود. در جمعیت زنجان ۲ بالاترین سرعت جوانه‌زنی در نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با نور پیوسته و تاریکی نداشت. در نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی جمعیت گلستان ۲ بالاترین سرعت جوانه‌زنی را داشت و اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. در جمعیت تهران ۳ نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد در نور پیوسته بالاترین سرعت جوانه‌زنی را نشان داد که اختلاف معنی‌داری با همین نوسان دمایی در ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی و نوسان دمایی ۳۰/۲۰ درجه سانتی‌گراد در دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی و نور پیوسته نداشت. نوسان دمایی ۲۰/۱۰ درجه

سانتی‌گراد در نور پیوسته منجر به بالاترین سرعت جوانه‌زنی جمعیت لرستان ۳ شد اما اختلاف معنی‌داری با همین نوسان دمایی در دوره نوری ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی و نوسان دمایی ۲۵/۱۵ درجه سانتی‌گراد در نور پیوسته نداشت (جدول ۷). واکنش بذرها به دما و نور بین گونه‌ها و بین جمعیت‌های مختلف در هر گونه متفاوت بود. این تفاوت توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Shimono & Kudo, 2003; Delanoy *et al.*, 2006; Pezzani & Montan, 2006). بذرهای دو گونه نیمه بوته‌ای درمنه (*Artemisia wudanic*, *A. halodendron*) برای جوانه‌زنی، نوسانات دمایی پایین‌تر (۱۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد) را ترجیح دادند و به نور حساس نبودند اما دو گونه یک ساله درمنه (*A. scoparia* و *A. sieversiana*) نوسانات دمایی بالاتر (۲۲-۳۴ درجه سانتی‌گراد) را ترجیح دادند و جوانه‌زنی آنها در حضور نور افزایش یافت. در علف‌هرز دم روباهی دمای مطلوب جوانه‌زنی برای دم روباهی سبز (*Setaria viridis*) ۱۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد، برای گونه دم‌روباهی زرد (*S. glauca*) ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و برای گونه چسبک (*S. verticillata*) ۲۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (Manthey & Nalawaja, 1987 و Norris & Schoner, 1980). تفاوت درون‌گونه‌ای در واکنش جوانه‌زنی جمعیت‌های گونه‌ای تاج خروس (*Amaranthus powellii*) به دما نیز گزارش شده است (Brainard *et al.*, 2007). واکنش جوانه‌زنی گیاهان نسبت به دما به عوامل متعددی از جمله گونه‌ها و ارقام گیاهی، منطقه رویش، کیفیت و سن بذر بستگی دارد (Copeland & McDonald 2001). نتایج آزمایش نشان داد که واکنش بذرهای به دما و نور بین گونه‌ها و بین جمعیت‌های مختلف علف هفت بند متفاوت است.

آزمایش سوم: واکنش سبز شدن بذر به عمق کاشت

همانطور که جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد اثرات ساده جمعیت و عمق کاشت و اثر متقابل آنها معنی‌دار شده است (جدول ۸). در جدول ۹ برش‌دهی روی جمعیت انجام شده است. در هر ۴ جمعیت بهترین شرایط برای جوانه‌زنی (عمق مطلوب سبز شدن) قرارگیری در سطح خاک بود و با افزایش عمق کاشت میزان سبز شدن آنها کاهش یافت (جدول ۱۰) اما واکنش جمعیت‌ها به افزایش عمق خاک متفاوت بود به نحوی که در جمعیت کرج ۱ از گونه علف هفت‌بند خوابیده درصد سبز شدن از عمق ۱۰ سانتی‌متر کاهش شدیدی نشان داد درحالی‌که در جمعیت تهران ۱ از همین گونه در عمق ۸ سانتی‌متر شاهد کاهش شدید درصد سبز شدن بذرهای هستیم. در جمعیت تهران ۲ از گونه هفت بند پیچ در عمق ۱۲ سانتی‌متر هنوز ۳۳/۷۵ درصد جوانه‌زنی وجود داشت. در جمعیت تهران ۳ از گونه علف هفت‌بند ایرانی در عمق ۶ سانتی‌متر درصد سبز شدن به کمتر از ۵۰ درصد کاهش یافت (جدول ۱۰). هر گونه گیاهی برای جوانه‌زنی به شرایط محیطی خاصی نیاز دارد (Shoab *et al.*, 2012).

جدول ۸: تجزیه واریانس درصد سبز شدن گیاهچه جمعیت‌های علف هفت‌بند تحت تاثیر عمق کاشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد سبز شدن
جمعیت	۳	۳۲۶۳/۱۵ **
عمق کاشت	۶	۱۳۶۶۳/۱۲ **
جمعیت × عمق کاشت	۱۸	۵۴۵/۶۶ **
خطا	۸۴	۶/۰۹
ضریب تغییرات	-	۴/۸۳

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۹: میانگین مربعات درصد سبز شدن گیاهچه که توسط جمعیت برش داده شده است.

میانگین مربعات درصد سبز شدن	درجه آزادی	جمعیت
کرج ۱	۶	۳۴۲۲/۴۸ **
تهران ۱	۶	۶۰۹۶/۸۰ **
تهران ۲	۶	۱۶۳۳/۴۱ **
تهران ۳	۶	۴۱۴۷/۴۰ **

** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

چندین عامل محیطی شامل نور، رطوبت (Karimmojeny et al., 2014)، شوری، اسیدیته و عمق کاشت بر جوانه‌زنی بذر و ظهور گیاهچه موثر هستند (Shoab et al., 2012). مشخص شده است که نور با نسبت بیشتر قرمز به قرمز دور، تشکیل فیتوکروم جذب کننده نور قرمز دور را افزایش می‌دهد که این فیتوکروم برای شکستن خواب در بذرهای نیازمند نور، لازم است. اما کاهش در سبز شدن بذر، بخشی می‌تواند به دلیل ناتوانی گونه‌ها در تولید یک گیاهچه طویل به دلیل ذخیره غذایی کم بذر باشد (Benvenuti et al., 2001). سبز شدن کمتر از اعماق خاک می‌تواند به دلیل حضور CO₂ ناشی از فعالیت‌های بیولوژیکی، توسط سایر محققان گزارش شده است (Benvenuti and Macchia, 1995). کاهش سبز شدن با افزایش عمق کاشت در چند گونه علف‌هرز دیگر مانند بیدنس (*Bidens pilosa*) (Reddy & Singh, 1992) علف اسب (*Conyza canadensis*) (Nandula et al., 2006) مشاهده شده است. گزارش شده که درصد سبز شدن بذرهای علف‌های هرز بی‌تی‌راخ (*Gallium aparine* L.) و خردل وحشی (*Brassica kaber* L.) بسته به عمق کاشت از ۴۴٪ تا ۸۴٪ متغیر بود (Mennan & Ngouajio 2006). در علف هرز بی‌تی‌راخ با افزایش عمق تا ۲۰ سانتی‌متر سبز شدن به میزان ۲۸٪ کاهش یافت. میزان خواب بذر آمبروزیا (*Ambrosia trifida* L.) و زمان جوانه‌زنی آن به عمقی که بذرها در آن قرار دارند بستگی دارد (Harrison et al., 2007).

جدول ۱۰: اثر عمق کاشت بر میانگین درصد سبز شدن (\pm انحراف معیار) گیاهچه جمعیت‌های علف هفت‌بند

عمق کاشت	جمعیت			
	تهران ۱	تهران ۲	تهران ۳	تهران ۴
۰	۸۷/۵ \pm ۰/۸۵	۸۷/۷۵ \pm ۰/۶۵	۸۷/۷۵ \pm ۰/۶۵	۷۸/۲۵ \pm ۰/۸۵
۲	۸۵/۵ \pm ۰/۶۵	۸۸/۵ \pm ۱/۹۴	۷۹/۷۵ \pm ۰/۶۳	۶۰/۲۵ \pm ۳/۰۷
۴	۷۳/۵ \pm ۰/۴۸	۸۴/۲۵ \pm ۱/۱۹	۷۳/۵ \pm ۱/۳۲	۵۲/۷۵ \pm ۱/۳۸
۶	۶۷/۲۵ \pm ۰/۸۵	۵۳/۷۵ \pm ۱/۰۳	۶۱/۲۵ \pm ۲/۱۰	۳۳/۵ \pm ۱/۰۴
۸	۶۴ \pm ۰/۸۷	۲۲/۵ \pm ۰/۷۱	۵۱/۷۵ \pm ۱/۴۴	۱۱/۵ \pm ۰/۶۵
۱۰	۳۷/۵ \pm ۰/۷۱	۷ \pm ۱/۰۴	۳۵/۷۵ \pm ۱/۷۵	۶/۲۵ \pm ۰/۴۸
۱۲	۵/۵ \pm ۰/۲۹	۰/۵ \pm ۰/۹۶	۳۳/۷۵ \pm ۱/۴۴	۰/۵ \pm ۰/۲۹
LSD	۳/۰۶	۲/۱۸	۵/۳۷	۲/۸۶

نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای مناسب برای شکستن خواب در گونه‌های علف هفت‌بند خوابیده و علف هفت‌بند پیچ به ترتیب سرمادهی مرطوب و اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۲۰ دقیقه بودند. در گونه علف هفت‌بند ایرانی بالاترین جوانه‌زنی در تیمار سرمادهی مرطوب مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با نیترات پتاسیم ۰/۲ درصد نداشت. تفاوت های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در واکنش درصد و سرعت جوانه‌زنی جمعیت‌ها به دما و نور مشاهده شد. در جمعیت‌های علف هفت‌بند خوابیده بین تیمارهای نوری تفاوت معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی وجود داشت و کمترین جوانه‌زنی در تاریکی مطلق مشاهده شد و تیمار ۱۶ ساعت نور/۸ ساعت تاریکی بهترین دما جهت جوانه‌زنی بود. جمعیت‌های علف هفت‌بند پیچ واکنش معنی‌داری به تیمار نور نشان ندادند و جوانه‌زنی آنها در تاریکی مطلق نیز بالا بود. جمعیت‌های علف هفت‌بند ایرانی به تیمار نور واکنش مثبتی نشان دادند و کمترین جوانه‌زنی در تاریکی مطلق مشاهده شد اما بین نور پیوسته و نوسان نوری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در همه جمعیت‌ها با افزایش عمق کاشت درصد سبز شدن کاهش یافت اما تفاوت‌هایی در واکنش به افزایش عمق کاشت بین درصد سبز شدن جمعیت‌ها وجود داشت. حداکثر عمق سبز شدن (عمقی که در آن سبز شدن بیشتر از یک درصد است) در جمعیت‌های تهران ۱ و تهران ۳ عمق ۱۰ سانتی‌متر بود در صورتیکه جمعیت‌های تهران ۲ و کرج ۱ به ترتیب ۳۳/۷۵ و ۵/۵ درصد از عمق ۱۲ سانتی‌متری سبز شدند. جوانه‌زنی یک از مهمترین مراحل بحرانی در نمو گیاهان است و اغلب پویایی جمعیت را کنترل می‌کند (Kamkar et al., 2008). هر گونه گیاهی برای جوانه‌زنی نیاز به دامنه خاصی از شرایط محیطی دارد (Lu et al., 2006). پی بردن به الگوی جوانه‌زنی و سبز شدن گونه‌های علف‌هرز می‌تواند اطلاعات جامعی برای توسعه راهکارهای مدیریت علف‌هرز در آینده فراهم نماید (Chauhan et al., 2006). درک شرایط مورد نیاز بذر برای جوانه‌زنی و اثرات گونه‌ای موثر بر آن جهت موفقیت در مدیریت علف‌های هرز لازم است. اطلاع از اینکه چه عاملی زمان جوانه‌زنی بذر علف هرز را کنترل می‌کند می‌تواند منجر به کنترل موثرتر علف‌هرز شود (Baskin & Baskin, 1998). نیاز

نوری گونه‌های علف هفت‌بند خوابیده و ایرانی نشان می‌دهد که این گونه‌ها در مزارعی با شخم حداقل یا بدون شخم، فراوانی بیشتری خواهند داشت. بنابراین افزایش عمق شخم می‌تواند در مدیریت این گونه‌ها موثر باشد. جمعیت تهران ۲ از گونه علف هفت‌بند پیچ توانست از عمق ۱۲ سانتی‌متری ۳۳/۷۵ درصد سبز شود بنابراین به نظر نمی‌رسد که افزایش شخم بتواند کارایی موثری در کنترل آن داشته باشد.

منابع

- Alam, A., Juraimi, A.S., Rafii M.Y., Abdul Hamid A. and Aslani. F. (2014) Screening of purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions for high salt tolerance. *Scientific World Journal* 1-12.
- Alsaadawi, I.S., Rice E.L. and Karns, T.K.B. (1983) Allelopathic effects of *Polygonum aviculare* L. III. Isolation, characterization, and biological activities of phytotoxins other than phenols. *Journal of Chemical Ecology* 9: 761-774.
- An, M., Pratley J.E. and Haig, T. (1997) Phytotoxicity of *Vulpia* Residues: I. Investigation of Aqueous Extracts. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1979-1994.
- Anderson, T. and Darling, D. (1952). Asymptotic theory of certain "goodness of fit" criteria based on stochastic processes. *The Annals of Mathematical Statistics* 23: 193-212.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (1998) *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, London.
- Baskin J.M. and Baskin, C.C. (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Baskin, C.C., P. Milberg., L. Andersson and J.M. Baskin. (2004) Germination ecology of the annual weeds *Capsella bursa-pastoris* and *Descurainia Sophia* originating from high northern latitudes. *Weed Research* 44: 60-68.
- Benvenuti, S. and Macchia, M. (1995) Hypoxia effect on buried weed seed germination. *Weed Research* 35: 343-351.
- Benvenuti, S., Macchia M. and Miele, S. (2001) Quantitative analysis of emergence of seedlings from buried weed seeds with increasing soil depth. *Weed Science* 49: 528-535.
- Bostro'm U., Milberg P. and Fogelfors, H. (2003) Yield loss in spring-sown cereals related to the weed flora in the spring. *Weed Science* 51:418-424.
- Brainard, D.C., DiTommaso A. and Mohler, C.L. (2007) Intraspecific variation in seed characteristics of Powell Amaranth (*Amaranthus powellii*) from habitats with contrasting crop rotation histories. *Weed Science* 55: 218-226.

- Bulcke, R., Willemijns, P., Stryckers, J. and Himme, M. (1987) Weed competition in maize. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 52: 1185–1194.
- Catullo, J.C., Sosa, C.A., Rodriguez, M.L. and Colombo, I. (1983) Weed incidence in wheat in relation to fertilization. *Malezas*, 11: 179–203. [in Spanish, English abstract].
- Chauhan, B. S., Gill, G. and Preston, C. (2006) Influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 54: 1004–1012.
- Chung, I.M., Kim, K.J., Kim, K.H. and Ahn, J.K. (1994) Allelopathic effect of some weed species extracts and residues on alfalfa. *Korean Journal of Crop Science* 39: 285–294.
- Copeland, L.O. and McDonald, M. (2001) *Principles of seed science and Technology*. Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA, USA.
- Delanoy, M., Van Damme, P., Scheldeman, X. and Beltran, J. (2006) Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey, *Passiflora tricuspid* Mast. and *Passiflora nov.* sp. seeds. *Scientific Horticulture* 110:198–203.
- De Cauwer, B., Devos, R., Claerhout, S., Bulcke, R. and Reheul, D. (2014) Seed dormancy, germination, emergence and seed longevity in *Galinsoga parviflora* and *G. quadriradiata*. *Weed Research* 54: 38–47.
- du Croix, M., Sissons, J., Van Acker, R.C., Derksen, D.A. and Thomas, A.G. (2000) Depth of seedling recruitment of five weed species measured in situ in conventional- and zero-tillage fields. *Weed Science* 48: 327–332.
- Friesen, G. and Shebeski, L.H. (1960) Economic losses caused by weed competition in Manitoba grain fields. I. Weed species, their relative abundance and their effect on crop yields. *Canadian Journal of Plant Science* 40:457–467.
- Gruenhagen, R.D. and J. D. Nalewaja. (1969) Competition between flax and wild buckwheat. *Weed Science* 17:380–384.
- Harrison, S.K., Regnier, E.E., Schmoll, J.T. and Harrison, J.M. (2007) Seed size and burial effects on giant ragweed (*Ambrosia trifida*) emergence and seed demise. *Weed Science* 55: 16–22.
- Heywood, V.H., R.K. Brummitt., A. Culham and O. Seberg. (2007) *Flowering plant families of the world*, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 424 pp.
- Hilhorst, H.W.M. (1995) A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*. 5: 61-73.
- Hume, L., J. Martinez and K. Best. (1983) The biology of Canadian weeds. 60. *Polygonum convolvulus* L. *Canadian Journal of Plant Science* 63:959–971.

- ISTA (International Seed Testing Association). (1999) International rules for seed testing, Seed Science and Technology.
- Jones, R., Alemged, Y., Medd, R. and Vere, D. (2000) The distribution, density and economic impact of weeds in Australian annual winter cropping systems. CRC for Weed Management Systems Technical Series No. 4, University of Adelaide, Australia. 58 pp.
- Karimmojeny, H., Rezvani, M., Zaefarian, F. and Nikneshan, P. (2014) Environmental and maternal factors affecting on oriental mustard (*Sisymbrium orientale* L.) and musk weed (*Myagrurn perfoliatum* L.) seed germination. Brazilian Journal of Botany 37: 121-127.
- Kearney, T.H., Peebles, R.H., Howell, J.T. and McClintock, E. (1960) Arizona flora. 2nd ed. Berkeley, CA: University of California Press. 1085 p.
- Kim, K.U., Y. G. Park and S. H. Kwack. (1995) Development of useful secondary product through plant cell culture. Korean Journal of Weed Science 15: 154-159.
- Kropff, M.J., Lotz, L.A.P., Weaver, S.E., Jbos, H., Wallinga, J. and Migo, T. (1995) A two parameter model for prediction of crop loss by weed competition from early observations of relative leaf area of the weeds. Annales applied Biology 126: 329-346.
- Lipecki, J. (2005) Weeds predominating in orchards throughout the world – a review paper. XXth Mtg. of the Herbological Team, Committee of Hort. Sci., Polish Academy of Sciences, Warszawa – Olsztyn, pp. 36-41 (in Polish with English Abstract).
- López, J.A. and Mattiacci, M.R. (1983) Damage caused by prostrate knotweed (*Polygonum aviculare* L.) during the establishment of a sown pasture. Malezas. 11: 246-251.
- Kamkar, B., Ahmadi, M., Soltani, A. and Zeinali, E. (2008) Evaluating non-linear regression models to describe response of wheat emergence rate to temperature. Seed Science Technology 2: 53-57.
- Lu, P., Sang, W. and Ma, K. (2006) Effects of environmental factors on germination and emergence of crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). Weed Science 54: 452-457.
- Magee, D.W. and Ahles, H.E. (2007) Flora of the Northeast: A manual of the vascular flora of New England and adjacent New York. 2nd ed. Amherst, MA: University of Massachusetts Press. 1214 p.
- Maguire, J.D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science. 2:176-177.
- Manthey, D.R. and Nalawaja, J.D. (1987). Germination of two foxtail (*Setaria*) species. Weed Technology. 1: 302-304.

- Martins, B.A.B. and Christoffoleti, P.J. 2014. Buttonweed emergence as affected by seed burial depth and straw on the soil surface. *Scientia Agricola* 72: 489-494.
- Meerts, P. (1995) Phenotypic plasticity in the annual weed *Polygonum aviculare*. *Botanica Acta* 108: 414-424.
- Mennan, H. and Ngouajjo, M. 2006. Seasonal cycles in germination and seedling emergence of summer & winter population of catch weed bed straw (*Gallium aparine*) and wild mustard (*Brassicae kaber*). *Weed Science* 54: 114-120.
- Mertens, S.K., Bosch, F.V.D and Heesterbeek, J.A.P. (2002) Weed populations and crop rotations: Exploring dynamics of a structured periodic system. *Ecological Applications* 12: 1125–1141.
- Minbashi Moeini, M., Esfandiari, H., Pour Azar, R., Baghestani, M.A., Zand, E., Veisi, M., Sabeti, P., Jamali, M.R., Hatami, S., Haghghi, A., Makenali, A., Mousavi, S.K., Nazer Kakhki, S.H., Narimani, V., Nour Alizadeh, M., Valiyollah Pour, R. and Nouroozzadeh, S. (2015) Evaluation of weed management in wheat fields of different area of Iran. *Iranian Journal of Weed Science*. 11:13-26.
- Mozaffarian, V. (2012) A revision of *Polygonum* L. sensu lato, (Polygonaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany* 18: 159–174.
- Nandula, V.K., Eubank, T.W., Poston, D.H., Koger, C.H. and Reddy, K.N. (2006) Factors affecting germination of horseweed. *Weed Science* 54: 898-902
- Norris, R.F. and Schoner, C.A. (1980) Yellow foxtail (*Setaria lutescens*) biotype studies: dormancy and germination. *Weed Science* 28: 159–163.
- Paolini, R., Del Puglia, S., Principi, M., Barcellona, O. and Riccardi, E. (1998) Competition between safflower and weeds as influenced by crop genotype and sowing time. *Weed Research* 38: 247–255.
- Pezzani, F. and Montaña, C. (2006). Inter- and intraspecific variation in the germination response to light quality and scarification in grasses growing in two-phase mosaics of the Chihuahuan desert. *Annales of Botany* 97:1063–1071.
- Reddy, K.N. and Singh, M. (1992) Germination and emergence of hairy beggarticks (*Bidens pilosa*). *Weed Science* 40: 195-199.
- Royer, F. and Dickinson, R. (1999) Weeds of the northern U.S. and Canada: a guide for identification. Edmonton, AB: The University of Alberta Press; Renton, WA: Lone Pine Publishing. 434 p.
- Shimono, Y. and Kudo, G. (2003) Intraspecific variations in seedling emergence and survival of *Potentilla matsumurae* (Rosaceae) between alpine fellfield and snowbed habitats. *Annales of Botany* 91:21–29.
- Shoab, M., Tanveer, A., Khaliq, A. and Haider, A.H. (2012) Effect of seed size and ecological factors on germination of *Emex spinosa*. *World Applied Science Journal* 17: 964–969.

- Stevenson, F.C. and Wright, A.T. (1996) Seeding rate and row spacing affect flax yields and weed interference. *Canadian Journal of Plant Science* 76: 537-544.
- Sultan, S.E. and Bazzaz, F.A. (1993a) Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. I. Diversity and uniformity in genotypic norms of reaction to light. *Evolution* 47:1009-1031.
- Sultan, S.E. and Bazzaz, F.A. (1993b) Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. II. Norms of reaction to soil moisture, ecological breadth, and the maintenance of genetic diversity. *Evolution* 47:1032-1049.
- Sultan, S.E. and Bazzaz, F.A. (1993c) Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. III. The evolution of ecological breadth for nutrient environment. *Evolution* 47:1050-1071.
- Tardif, M.C. and Francois, J. (2005) The biology of Canadian weeds. 131. *Polygonum aviculare* L. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 481-506.
- Timson, J. (1966) The germination of *Polygonum convolvulus* L. *New Phytologist*. 65: 423-428.
- Wang, B.S.P. and P. Berjak. 2000. Beneficial effects of moist chilling on the seeds of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B. S. P.). *Annals of Botany* 86: 29- 36.
- Wartidiningsih, N., Geneve, R.L. and Kester, S.T. (1994) Osmotic priming or chilling stratification improves seed germination of purple coneflower. *Horticultural Science* 29: 1445-1448.
- Wright, D. and Baloch, M.K. (1999) Effects of seven common arable weeds on the yield of normal and semi-leafless pea varieties. *Tests Agrochemical Culture* 20: 54-55.

**Interspecific and intraspecific variations in seed germination and emergence of three
*Polygonum species***

M. Diyanat^{1*}

Received:2019.11.11

Accepted:2020.10.11

Abstract

Polygonum is one of the most widespread weeds in the world. To determine the best dormancy-breaking treatment, five dormancy-breaking treatments consisted of 10 and 20 min soaking in sulfuric acid, 0.2% nitrate potassium, wet chilling and 200 ppm gibberellic acid were studied. At second experiment germination percentage was evaluated under different alternating temperature and light regimes. seeds of ten populations were exposed to three levels of light (24 h darkness, 16 h light/8 h darkness and continuous light) and five alternating day/night temperature regimes 15/5°C, 20/10°C, 25/15°C, 30/20°C and 35/25 °C for 21 days. For third experiment, seven depths (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 cm) were investigated. Results showed that best treatment for dormancy breaking was wet chilling for Prostrate knotweed and Lady's thumb and sulfuric acid 20 min for Wild buckwheat. Germination of *Polygonum* species seeds occurred over a wide range of alternating temperatures but there were inter- and intraspecific differences in optimal temperature. Wild buckwheat was not dependent to light for germination. Seedling emergence decreased exponentially with increasing burial depth with highest emergence for unburied seeds. The influence of burial depth was extremely dependent on population. High seedling emergence of Prostrate knotweed and Lady's thumb on the soil surface could be suggesting light requirements. Therefore, spreading of these species would be higher in fields with no-tillage or minimum-tillage practices. Increasing of tillage depth could be an effective weed management strategy to reduce seedling emergence of Prostrate knotweed and Lady's thumb.

Keywords: Alternating temperature, Dormancy breaking, Nitrate potassium, Seed, Weeds

1- Assistant professor, Department of Agriculture and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*(Corresponding author: ma_dyanat@yahoo.com)

ارزیابی سلامت رودخانه کارده با استفاده از شاخص‌های زیستی و جوامع ماکروبنتوز

سمیه سرگلزایی^۱، آریتا فراشی^{۲*}، امید صفری^۳، حمیدرضا احمدنایب مطلق^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۸

چکیده

رودخانه کارده، یکی از مهم‌ترین رودخانه‌های دائمی استان خراسان رضوی است که بخش عمده‌ای از آب شرب و کشاورزی شهر مشهد را تأمین می‌کند. در این پژوهش جهت ارزیابی کیفیت رودخانه کارده از شاخص‌های زیستی چندمعیاره و جهت درک تأثیر محرک‌های ساختار جامعه ماکروبنتوزها بر مدیریت اکوسیستم‌ها از آمار چند متغیره استفاده شد. بدین منظور از چهار ایستگاه مطالعاتی طی چهار فصل در سال ۹۷-۹۸ نمونه‌برداری ماکروبنتوزها انجام شد و پارامترهای فیزیکی و شیمیایی اندازه‌گیری گردید. در این مطالعه از راسته *Ephemeroptera* در مجموع خانواده‌های *Caenidae* و *Baetidae* بیش‌ترین فراوانی (۶۰/۶۶ درصد) را داشت. نتایج نشان داد شاخص یکپارچگی زیستی مبتنی بر ماکروبنتوزها بین ۳ تا ۱/۱ متغیر بوده و بر اساس این شاخص زیستی کیفیت آب رودخانه کارده در سه طبقه کیفی نسبتاً خوب، ضعیف و بسیار ضعیف طبقه‌بندی شد و شاخص سیگنال در دو طبقه کیفی آلودگی متوسط و آلودگی شدید قرار گرفت. همچنین آنالیز تطبیقی متعارف نشان داد که نیترات، اکسیژن خواهی بیوشیمیایی و اکسیژن خواهی شیمیایی، بیش‌ترین تأثیر را در پراکنش ماکروبنتوزها در ایستگاه‌های مطالعاتی دارد. در مجموع کیفیت آب رودخانه کارده نامطلوب ارزیابی شد و در بین ایستگاه‌های مطالعاتی شرایط ایستگاه یک نسبتاً بهتر از ایستگاه‌های دیگر است. از میان شاخص‌های موجود شاخص‌های چند معیاره مطمئن‌تر هستند. اما باید مطابق شرایط رودخانه‌های ایران درجه بندی این شاخص‌ها انجام شود.

واژه‌های کلیدی: آنالیز تطبیقی متعارف، ارزیابی زیستی، رودخانه کارده، سیگنال، ماکروبنتوزها، یکپارچگی زیستی.

۱- دانشجویی کارشناسی ارشد تنوع زیستی، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

* (نویسنده مسئول: farashi@um.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

مقدمه

افزایش آلودگی‌های رودخانه‌ها ناشی از فعالیت‌های انسانی در سراسر جهان منجر به کاهش تنوع زیستی آب شیرین شده است. رودخانه‌ها به دلیل بالا بودن سطح تغییرپذیری هیدرولوژیکی طبیعی و افزایش رشد جمعیت‌های انسانی، در برابر چنین اختلالاتی بسیار حساس هستند (Fierro *et al.*, 2017). دانش و سنجش دقیق تأثیرات این اختلالات یک بخش اساسی برای تصمیم‌گیری در برنامه‌های حفاظت است. علاوه بر این، بر پایه مفاهیم اکولوژیک، پروتکل‌ها و ابزارها برای نظارت زیستی باید کارآمد و سریع باشد و به‌طور مداوم در مناطق مختلف اعمال شود (Schmutz *et al.*, 2007).

امروزه بازسازی و حفاظت از اکوسیستم‌های آبی از اهداف اصلی دستیابی به توسعه پایدار است و این هدف اهمیت یکپارچگی زیستی اکوسیستم‌های آبی را برای خدمات زیست‌محیطی افزایش داده است (Corvalho *et al.*, 2019). تا دهه ۱۹۸۰ بیشتر تحقیقات در مورد تأثیر فعالیت‌های انسانی و ایجاد اختلال در اکوسیستم‌های آب شیرین، بر اساس ارزیابی عوامل تنش‌زای فیزیکی و شیمیایی کیفیت آب بوده است. اما این رویکرد فقط شرایط را در زمان و مکان نمونه‌برداری در نظر می‌گیرد (Fierro *et al.*, 2018; Aazami *et al.*, 2017). استفاده از شاخص‌های زیستی برای ارزیابی کیفیت آب دارای سابقه طولانی صد ساله است و پس از دستورالعمل چارچوب آب (WFD¹)، تلاش‌های قابل توجهی برای هماهنگ کردن شاخص‌های مختلف محیط‌زیستی در کشورهای عضو اتحادیه اروپا انجام شده است (Hering *et al.*, 2004). شاخص‌های زیستی عبارت‌های عددی‌اند که مقادیر کمی تنوع گونه‌ای را با اطلاعات کیفی، در مورد حساسیت‌های اکولوژیکی هر تاکسون در بین دیگران ترکیب می‌کند (Czeniawska-Kusza, 2005). شاخص محیط‌زیستی ابزار مهمی است که می‌تواند در ارزیابی سلامت اکوسیستم آبی استفاده شود و از شاخص‌ها می‌توان در تصمیم‌گیری کاربردی استفاده کرد (Pinto *et al.*, 2009; Diaz *et al.*, 2004). در حال حاضر بیش از ۸۵ درصد از برنامه‌های کیفیت آب، فرایند ارزیابی چند معیاره را برای ارزیابی سلامت رودخانه دنبال می‌کنند (Singh & Saxena, 2018). این رویکرد نقاط ضعف معیارهای منفرد را کاهش می‌دهد (Ofenböck *et al.*, 2004).

شاخص‌های چند معیاره مبتنی بر ماکروبن‌توزها انعطاف‌پذیرند، با اضافه یا حذف کردن معیارها قابل تنظیم‌اند (Gabriels *et al.*, 2010) و تاکنون به‌طور گسترده در بسیاری از اکوسیستم‌های جهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Silva *et al.*, 2017) و این شاخص با استفاده از معیاره‌های متعدد در مورد شرایط اکوسیستم اطلاع‌رسانی می‌کند (Van den Broeck *et al.*, 2015).

روش‌های آماری چند متغیره به‌عنوان یک مکمل مفید برای شاخص‌های چند معیاره با هدف ارائه دیدی بهتر از ویژگی‌های زیستی و غیر زیستی اکوسیستم، مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی از روش‌های چند متغیره برای بررسی

¹ Water Framework Directive

ماکروبن‌توزها به عنوان شاخص ارزیابی کیفی رودخانه‌ها، شامل تحلیل خوشه‌ای (CA^1)، تحلیل عامل (FA^2)، تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA^3)، تجزیه و تحلیل همبستگی (CA) (Odountan & Abou, 2015) تحلیل تطبیقی متعارف (CCA) است (S'milauer & Leps, 2014). همان‌طور که Sheela و همکاران (۲۰۱۱) برای دریاچه‌های شهری در هند نشان دادند، تکنیک‌های چند متغیره ابزارهای مناسب طبقه‌بندی و پایش اکوسیستم‌های آبی هستند.

ماکروبن‌توزها به‌عنوان یک منبع غذایی اساسی برای دوزیستان، ماهی‌ها و سایر مهره‌داران شناخته می‌شوند و بنابراین جزء جدایی‌ناپذیر از شبکه غذایی هستند (Dalu et al., 2012). ماکروبن‌توزها جزء متنوع‌ترین و فراوان‌ترین ارگانیسم‌ها در سیستم‌های آب شیرین هستند (Nhiwatiwa et al., 2017). به‌این‌ترتیب ماکروبن‌توزها به‌عنوان شاخص مفیدی برای تعیین وضعیت اکولوژیکی اکوسیستم‌های آبی در نظر گرفته می‌شوند (Tchakone et al., 2014).

رودخانه کارده یکی از مهم‌ترین رودخانه‌های دائمی استان خراسان رضوی می‌باشد و بخش عمده‌ای از آب شرب و کشاورزی شهر مشهد را تأمین می‌کند. این رودخانه مسافت طولانی از روستاهای آل، کارده، اندرخ، مارشک، پنج‌منه و اراضی کشاورزی می‌گذرد که این باعث آلودگی و ایجاد اختلال زیست محیطی این رودخانه می‌گردد. با توجه به اهمیت رودخانه کارده شناسایی کیفیت و ارزیابی سلامت اکوسیستم آن از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. لذا با شناسایی نمونه‌های مختلف ماکروبن‌توز در این منبع آبی در طی فصول مختلف می‌توان نسبت به برنامه‌ریزی آبی برای این منبع آب شیرین اقدام نمود. بر این اساس در مطالعه حاضر به بررسی سلامت اکوسیستم این رودخانه با استفاده از شاخص‌های چند معیاره و آمار چند متغیره (آنالیز آماری تطبیقی متعارف) پرداخته شد.

منطقه مورد مطالعه

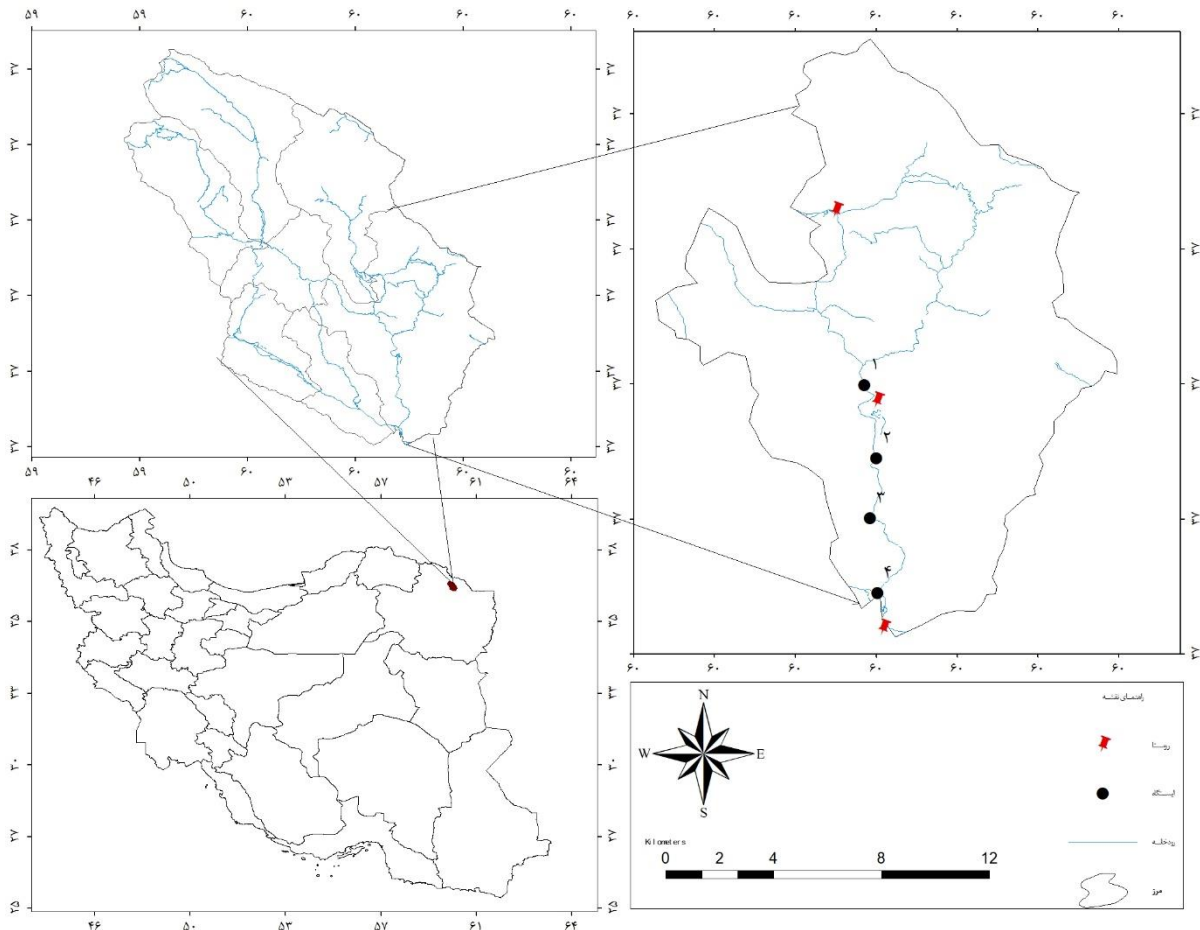
رودخانه کارده یکی از سرشاخه‌های کشف رود در حوضه قره‌قوم است. حوضه آبریز کارده منطقه‌ای کوهستانی با شیب تند است (Etemadian et al., 1391). حوضه آبخیز کارده با مساحت ۵۵۷/۹ کیلومتر مربع در شهرستان مشهد و در محدوده مختصات جغرافیایی ۲۶ درجه و ۵۹ دقیقه تا ۴۴ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۴۴ درجه و ۵۹ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۵۸ درجه و ۳۶ دقیقه عرض جغرافیایی قرار گرفته است (Nader Saft & Saedian, 1389). این رودخانه از دو چشمه کارستی در شمال حوضه آبخیز رودخانه کارده سرچشمه می‌گیرد و پس از عبور از روستاهای

¹ Cluster Analysis

² Factor Analysis

³ Principal component analysis

خرکت، مارشک، جنگ، پنج منه، آل و کارده در نهایت به سد کارده می‌ریزد (Heidarizadeh & Mohammadzadeh, 1390).
 طول این رودخانه ۲۵ کیلومتر است. فاصله پایین‌ترین قسمت حوضه تا شهر مشهد ۴۲ کیلومتر است (شکل-۱).



شکل ۱: رودخانه کارده و موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌گیری (۹۸-۱۳۹۷)

جدول ۱: مشخصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری در طول رودخانه کارده

ایستگاه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱	۳۶° ۴۳' ۱۷.۲۶"	۵۹° ۳۹' ۴۵.۵۲"
۲	۳۶° ۴۱' ۳۸.۰۶"	۵۹° ۳۹' ۵۹.۲۵"
۳	۳۶° ۴۰' ۳۷.۹۵"	۵۹° ۴۰' ۹.۸۳"
۴	۳۶° ۳۸' ۳۳.۵۹"	۵۹° ۳۹' ۴۹.۹۳"

روش پژوهش

نمونه‌برداری

این مطالعه در سال ۹۸-۱۳۹۷ در چهار ایستگاه تعیین شده در رودخانه کارده انجام شد. نمونه‌برداری از ماکروبتوزها به صورت فصلی و با توجه به تغییرات شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی و تغییرات جمعیت ماکروبتوزها از پاییز ۹۷ تا تابستان ۹۸ انجام شد. در هر ایستگاه نمونه‌برداری با سه تکرار و با دستگاه نمونه‌بردار سوربر انجام شد. سپس نمونه‌ها به وسیله فرمالین پنج درصد فیکس و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به کمک استریومیکروسکوپ و کلید شناسایی موجودات شاخص بی‌مهره در حد خانواده، جنس و تا حد ممکن گونه شناسایی شدند (Oscoz *et al.*, 2011).

اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی شامل اکسیژن محلول (DO)، اسیدیته آب (pH) و دما با سه تکرار توسط دستگاه پرتابل دماسنج و pH متر دیجیتال (Hanna Enstrument, Model: HI98193, Romania) در محل انجام گردید و همچنین نمونه‌های آب برای اندازه‌گیری اکسیژن خواهی بیوشیمیایی^۱ (BOD₅)، اکسیژن خواهی شیمیایی^۲ (COD) کلی فرم مدفوعی، نیتрат، فسفات، کدورت و کل جامدات معلق به آزمایشگاه منتقل شدند. در این مطالعه از شاخص B-IBI و SIGNAL^۳ به عنوان شاخص زیستی استفاده شد.

شاخص‌های چند معیاره

شاخص یکپارچگی زیستی (B-IBI)

شاخص یکپارچگی زیستی مبتنی بر ماکروبتوزها یک شاخص چند معیاره می‌باشد و جهت یکپارچه سازی اطلاعات معیارهای اکولوژیکی مختلف به کار می‌رود. این شاخص به صورت ارزش عددی که نشان‌دهنده رتبه‌بندی کیفیت اکوسیستم‌های آبی است نشان داده می‌شود. در نهایت نمره نهایی شاخص از میانگین نمرات به دست می‌آید و طبقات کیفیت آب برحسب نمره نهایی تعیین می‌شود که در جدول ۱ و ۲ به تفصیل آورده شده است (Mebane *et al.*, 2003).

لیست معیارهای مورد استفاده در این شاخص نیز به شرح زیر می‌باشد:

غنای گونه‌ها- شاخص EPT- خانواده Ephemeroptera- خانواده Diptera- خانواده‌های نابردبار- شاخص زیستی Beck

جدول ۲: امتیازات ماکروبتوزها جهت محاسبه شاخص زیستی B-IBI

معیارها	امتیازات		
	۱	۳	۵
تعداد کل خانواده‌ها	<۴	۴-۶	>۶
شاخص EPT	<۱۰	۱۰-۳۰	>۳۰

^۱ Biological oxygen demand

^۲ Chemical Oxygen Demand

^۳ Stream Invertebrate Grade Number Average Level

معیارها	امتیازات		
Ephemeroptera خانواده‌های	<۲	۳-۲	>۳
Diptera خانواده‌های	<۲	۳-۲	>۳
خانواده‌های حساس	<۱	۵-۱	>۸
شاخص زیستی Beck	<۱۰	۳۰-۱۰	>۳۰

جدول ۳: تحلیل کیفیت آب رودخانه‌ها بر اساس شاخص چند معیاره B-IBI

میزان شاخص B-IBI	تحلیل کیفیت آب
۵-۴	خوب
۳-۳/۹	نسبتاً خوب
۲-۲/۹	ضعیف
۱-۱/۹	بسیار ضعیف

شاخص SIGNAL

SIGNAL یک شاخص زیستی ساده است که برای اولین بار در شرق استرالیا توسط Chessman در سال ۱۹۹۵ برای ارزیابی سلامت اکوسیستم رودخانه‌ها توسعه یافت. این شاخص از میانگین امتیاز هر تاکسون (ASPT)، نسخه BMWP استفاده شده در انگلیس، اقتباس شده است (Chessman, 2003) و از میانگین میزان حساسیت به آلودگی خانواده‌های بنتوز موجود محاسبه می‌شود و به هر خانواده بر اساس حساسیت آن امتیاز داده می‌شود که بین صفر تا ۱۰ است. هر چه امتیاز خانواده بیشتر باشد، حساسیت به آلودگی در آن‌ها بیشتر است. کیفیت آب و فاکتور وزنی ماکروبن‌توزها را بر اساس جدول ۳ ارزیابی می‌کنند (Azami, 1396).

$$\text{SIGNAL} = \frac{\text{فاکتور وزنی} \times \text{درجه حساسیت (مجموع کل)}}{\text{مجموع کل فاکتورها وزنی}}$$

جدول ۴: فاکتورهای وزنی و تحلیل کیفیت آب رودخانه‌ها بر اساس شاخص چند معیاره SIGNAL

فاکتور وزنی	تعداد نمونه	تحلیل کیفیت آب	مقادیر شاخص SIGNAL
۱	۱-۲	عالی	>۷
۲	۳-۵	آب تمیز	۶-۷
۳	۶-۱۰	آلودگی خفیف احتمالی	۵-۶
۴	۱۱-۲۰	آلودگی متوسط	۴-۵
۵	>۲۰	آلودگی شدید	<۴

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها در نرم افزار Minitab 18 از طریق Normality test مورد بررسی قرار گرفت و جهت بررسی اختلاف بین ایستگاه‌ها و فصول مختلف نمونه‌برداری از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵

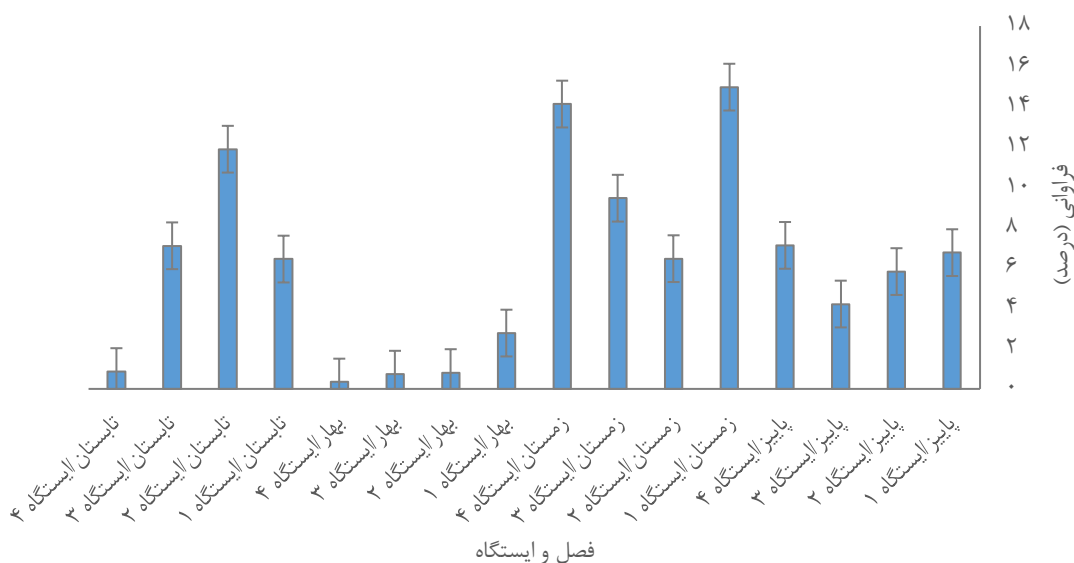
انجام شد. در ادامه از آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش توکی استفاده گردید. همچنین جهت بررسی همبستگی بین شاخص‌های زیستی چند معیاره و پارامترهای فیزیکی و شیمیایی از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید و از R بسته نرم‌افزاری Vegan برای تحلیل تطبیقی متعارف استفاده شد.

نتایج

در رودخانه کارده در طول یک سال نمونه‌برداری در چهار ایستگاه مطالعاتی حدود ۴۰۶۸ نمونه ماکروبن‌توز از ۱۰ راسته و ۲۲ خانواده به شرح جدول ۴ شناسایی شد. بیش‌ترین فراوانی را به ترتیب خانواده‌های Caenidae و Baetidae از راسته Ephemeroptera داشت و بعد از آن بیش‌ترین فراوانی متعلق به خانواده‌های Simuliidae و Chironomidae از راسته Dipteraها بود. از راسته‌های دیگر تعداد خیلی کم در فصل‌ها و ایستگاه‌های مختلف مشاهده گردید. در فصل پاییز بیش‌ترین فراوانی گونه‌های ماکروبن‌توز را در ایستگاه ۴ و کم‌ترین فراوانی در ایستگاه ۳ ثبت شد. در فصل زمستان بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی به ترتیب در ایستگاه ۱ و ۲ ثبت شد (شکل ۲ و ۳).

جدول ۵: راسته و خانواده‌های ماکروبن‌توزهای شناسایی شده رودخانه کارده (۹۸-۱۳۹۷)

راسته	خانواده	تعداد، فراوانی
Ephemeroptera	Caenidae	۱۳۴۷.۳۳/۱۱
	Baetidae	۱۱۲۱.۲۷/۵۵
	Chironomidae	۵۴۸.۱۳/۴۷
	Simuliidae	۸۳۱.۲۰/۴۲
Diptera	Tipulidae·Limoniidae	۱۵.۰/۳۶
	Ceratopogonidae	۲.۰/۰۴
	Tabanidae	۱۶.۰/۳۹
Coleoptera	Dytiscidae	۳۳.۰/۸۱
	Eelmidae	۳.۰/۰۷
Prosobranchiata	Limnaeidae	۴۷.۰/۱۵
	Valvatidae	۱.۰/۰۲
	Polycentropidae	۲.۰/۰۴
Tricoptera	Philopotamidae	۲.۰/۰۴
	Psychomyiidae	۲.۰/۰۴
Pulmonata	Physidae	۴۹.۰/۲۰
	Lymnaeidae	۱۳.۰/۳۱
Oligochaeta	Tubificidae	۲.۰/۰۴
	Lumbriculidae	۲.۰/۰۴
Odonata	Gomphidae	۶.۰/۱۴
Hirudinea	Erpobdellidae	۹.۰/۲۲
Hemiptera	Gerridae	۲۳.۰/۵۶
	Corixidae	۱.۰/۰۲



شکل ۲: درصد فراوانی ماکروبن‌توزهای جمع‌آوری شده از رودخانه کارده (۹۸-۱۳۹۷)

شاخص B-IBI

جدول ۵ تغییرات شاخص IBI را در ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. به منظور بررسی وجود اثر متقابل فصل و ایستگاه آزمون فاکتوریل این شاخص اثر معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). فصل و ایستگاه بر میزان این شاخص تأثیر داشتند. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین ایستگاه‌های مورد مطالعه در فصول مختلف وجود دارد ($P < 0.05$). در مجموع بیش‌ترین مقدار شاخص IBI در فصل زمستان در ایستگاه ۳ و کم‌ترین مقدار آن در فصل بهار در دو ایستگاه دوم و چهارم مشاهده شد. در فصل پاییز بین ایستگاه‌های ۱، ۲ و ۴ اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. اما در فصل تابستان همه ایستگاه‌ها با هم اختلاف آماری معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

بر اساس شاخص IBI شرایط کیفی ایستگاه ۴ در فصل پاییز و تابستان و در فصل بهار همه ایستگاه‌ها بر اساس این شاخص در شرایط کیفی بسیار ضعیف قرار دارند. اما در فصل زمستان ایستگاه ۳ شرایط نسبتاً خوبی داشت و بقیه ایستگاه‌ها ضعیف ارزیابی شدند.

جدول ۶: شاخص B-IBI میانگین \pm (انحراف معیار) ایستگاه‌های مطالعاتی در رودخانه کارده (۹۸-۱۳۹۷)

ایستگاه	پاییز	زمستان	بهار	تابستان
۱	$82/73 \pm 0/23$	$27/73 \pm 0/23$	$1/4 \pm 0/17$	$2/63 \pm 0/65$
۲	$2/4 \pm 0/15$	$2/4 \pm 0/15$	$1/1 \pm 0/15$	$2/16 \pm 0/45$
۳	$2/5 \pm 0/15$	3 ± 0	$1/3 \pm 0/25$	$2/96 \pm 0/3$
۴	$1/96 \pm 0/29$	$2/96 \pm 0/29$	$1/1 \pm 0/14$	$1/53 \pm 0/58$

شاخص SIGNAL

جدول ۷ تغییرات شاخص SIGNAL را در ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. فصل و ایستگاه دارای اثر متقابل بر یکدیگر هستند. همچنین ایستگاه‌های مطالعاتی در فصل‌های مختلف با هم اختلاف آماری معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). بیش‌ترین مقدار این شاخص در ایستگاه ۳ فصل بهار و کم‌ترین مقدار آن را در ایستگاه ۲ فصل پاییز مشاهده شد.

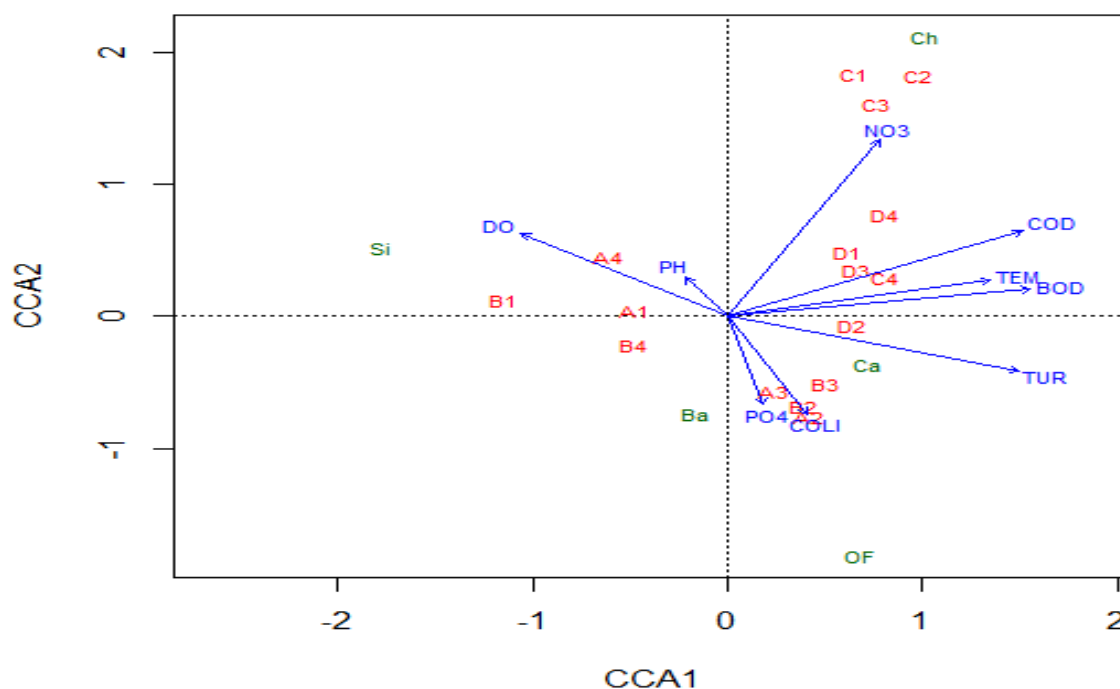
جدول ۷: شاخص SIGNAL میانگین \pm (انحراف معیار) ایستگاه مطالعاتی در رودخانه کارده (۹۸-۱۳۹۷)

ایستگاه	پاییز	زمستان	بهار	تابستان
۱	AB _{۴/۱۶} \pm ۰/۲۵	AB _{۴/۳۳} \pm ۰/۲۵	EFG _{۳/۷۸} \pm ۰/۵۰	AB _{۳/۸۰} \pm ۰/۰۰
۲	AB _{۲/۷۵} \pm ۰/۴۴	AB _{۳/۱۰} \pm ۰/۶۲	FG _{۳/۳۶} \pm ۰/۴۹	ABC _{۳/۹۶} \pm ۰/۱
۳	ABCD _{۳/۹۵} \pm ۰/۱۸	AB _{۳/۴۶} \pm ۰/۳۵	DEFG _{۴/۴۷} \pm ۰/۹۸	A _{۳/۷۳} \pm ۰/۱۸
۴	BCDE _{۴/۰۱} \pm ۰/۳۸	A _{۴/۴۲} \pm ۰/۲۵	G _{۲/۸۶} \pm ۰/۶۸	CDEF _{۲/۸۵} \pm ۱/۰۲

آنالیز تطبیقی متعارف (CCA^۱)

جدول ۸ تغییرات پارامترهای فیزیکوشیمیایی را نشان می‌دهد. در شکل ۳ bioplot ماکروبن‌توزها و پارامترهای محیطی ارائه شده است. نقاط رنگ سبز ارائه دهنده گونه‌ها و رنگ قرمز ارائه دهنده ایستگاه‌های نمونه‌برداری و فلش‌ها، ارائه دهنده هر کدام از متغیرهای محیطی هستند. نیترات در رج‌بندی در مقایسه با عوامل دیگر همبستگی بیش‌تری دارد و تأثیر بیش‌تری بر روی تغییرات جامعه در ایستگاه ۳ و در فصول پاییز، زمستان و بهار داشته است و در مورد خانواده‌ها، خانواده Chironomiidae بیش‌ترین تأثیر را از نیترات می‌پذیرد و همچنین نیترات با محور ۲ دارای ارتباط مثبت است و همچنین BOD و COD با اولین محور همبستگی بیش‌تری نشان می‌دهد. بنابراین پارامترهای دو محور اول و دوم CCA حدود ۸۳ درصد توزیع ماکروبن‌توزها بر اساس متغیرهای محیطی را توجیه می‌کند. مقدار ویژه محور ۱ و ۲ به ترتیب ۴۲ و ۲۷ درصد شد.

¹ Canonical Correspondence Analysis



شکل ۳: دوپلاتی CCA- اثر متغیرهای محیطی بر چهار خانواده غالب از ماکروبتوزها را در این مطالعه نشان می‌دهد.

Ch :Chironomidae ،Ca :Caenidae ،Ba :Baetidae ،Si :Simuliidae ،OF : خانواده‌های دیگر

حروف به رنگ قرمز ۴ ایستگاه‌های مطالعاتی (A- B- C- D) در ۴ فصل سال می‌باشد. فلش‌های آبی عوامل فیزیکی و شیمیایی است.

جدول ۸: مقادیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی رودخانه کارده (۹۸-۱۳۹۷)

پارا مترهای	فصل			
	تابستان	بهار	زمستان	پاییز
DO	۱۰/۰۱ ± ۰/۹۹	۹/۶۵ ± ۱/۳۲	۱۰/۲۱ ± ۱	۱۰/۴۷ ± ۱/۲۷
Ph	۸/۵۱ ± ۰/۳۷	۸/۳۴ ± ۰/۳۶	۸/۱۵ ± ۰/۴۶	۸/۳۷ ± ۰/۲۴
دما	۲۰/۰۶ ± ۱/۹۸	۱۲/۶۱ ± ۱/۸۵	۱۱/۶۰ ± ۱/۷۵	۱۳/۴۵ ± ۱/۶۶
کدورت	۲/۲۵ ± ۰/۲۱	۲/۰۷ ± ۰/۲۱	۲/۰۴ ± ۰/۲۸	۱/۹۸ ± ۰/۲۵
E.coli	۹/۰۶ ± ۰/۴۴	۸/۴۸ ± ۰/۳۰	۸/۹۶ ± ۰/۵۴	۹/۳۶ ± ۰/۷۰
BOD ₅	۲/۱۹ ± ۰/۲۳	۲/۱۷ ± ۰/۲۳	۱/۹۹ ± ۰/۱۵	۲/۱۲ ± ۰/۱۴
COD	۶/۶۸ ± ۰/۶۳	۶/۵۰ ± ۰/۶۴	۵/۸۵ ± ۰/۱۴	۶/۰۱ ± ۰/۱۲
نیترات	۰/۲۰ ± ۰/۰۲	۰/۲۸ ± ۰/۱۱	۰/۱۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۶ ± ۰/۰۱
فسفات	۰/۰۴ ± ۰/۰۲	۰/۱۰ ± ۰/۰۱	۰/۰۳ ± ۰/۰۳	۰/۰۵ ± ۰/۰۲
دبی	۴ ± ۴/۳۶	۵/۲۱ ± ۵/۹۸	۲/۴۲ ± ۱/۵۸	۲/۷۷ ± ۱/۷۰
سرعت	۰/۵۰ ± ۰/۱۲	۰/۹۲ ± ۰/۹۸	۰/۷۱ ± ۰/۱۲	۰/۶۲ ± ۰/۲۳

تجزیه و تحلیل همبستگی

به منظور بررسی همبستگی بین شاخص‌ها IBI و SIGNAL با پارامترهای فیزیکی و شیمیایی از ضرایب همبستگی پیرسون در این مطالعه استفاده شد. شاخص SIGNAL با اکثر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی همبستگی معنی‌داری ندارد به جز با کدورت، در مقابل شاخص IBI در سطح ۰/۰۵ فقط با فسفات همبستگی معنی‌داری دارد و با نیترات، در سطح ۰/۰۱ دارای همبستگی منفی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

شاخص‌های زیستی قادر به ارزیابی بهتری از وضعیت کلی کیفیت اکوسیستم‌های آبی در رابطه با شاخص‌های کیفیت فیزیکی و شیمیایی آب هستند. با این حال شاخص‌های زیستی همیشه به اندازه کافی فصیح نیستند زیرا بر مبنای حساسیت به تنش در چند گونه شاخص تعیین شده‌اند (Reiss & Kröncke, 2010). در مقابل، شاخص‌های چند معیاره در حال حاضر رایج‌ترین روش در بین روش‌های پیچیده ارزیابی وضعیت رودخانه‌ها هستند. رویکرده چند معیاره کاملاً مطابق اصول دستورالعمل چارچوب آب اروپا است (Moog *et al.*, 2018) زیرا تلاش می‌کند با به‌دست آوردن انواع ویژگی‌های زیستی قابل اندازه‌گیری (معیارها) و دانش یک تحلیل یکپارچه از جامعه زیستی یک منطقه ارائه دهد (Karr and Chu, 1999). ارزیابی چند معیاره ابزاری مطمئن‌تر از روش‌های ارزیابی براساس معیارهای واحد است (Dudley & Karr, 1981).

در مطالعه حاضر ماکروبتوزها به‌عنوان نشانگر زیستی استفاده شد به دلیل اینکه این زیست‌مندان برای تمایز بین ایستگاه‌ها نتایج بهتری می‌دهند. در مطالعه‌ای مشابه در جنوب برزیل با استفاده از شاخص IBI با هدف مقایسه پاسخ ماهی‌ها و ماکروبتوزها به تغییرات محیطی و شناسایی اینکه کدام گروه به بهترین وجه تفاوت بین ایستگاه‌ها را نشان می‌دهد انجام شد و نتایج آن نشان داد که ماکروبتوزها برای تمایز ایستگاه‌های مرجع از ایستگاه‌های تحت تأثیر موثرتر اند (Ruaro *et al.*, 2019). ماکروبتوزها به شدت به تغییرات ناشی از فعالیت‌های انسانی به ویژه موارد مرتبط با رسوبات و تغییرات زیستگاه واکنش نشان می‌دهند. رسوب بیش از حد رودخانه از طریق مکانیسم‌های مختلف بر جوامع ماکروبتوز تأثیر می‌گذارد (Sutherland *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر افزایش نسبت رسوبات باعث کاهش غنای و افزایش درصد ماکروبتوزهای مقاوم در فصل بهار شد. واکنش معمول جمعیت ماکروبتوز شامل افزایش تعداد گونه‌های مقاوم و کاهش غنای گونه‌ای و تنوع زیستی در جریان‌های تحت تأثیر است (Cuffney *et al.*, 2010). نسبت ارگانیس‌هایی که تحمل تغییرات محیطی را دارند به ارگانیس‌های حساس یکی از بهترین معیارهای تشخیص اثرات زیست‌محیطی است (Karr, 1981). به دلیل اینکه ماکروبتوزهای حساس بر اثر بروز آشفته‌گی اولین زیست‌مندانی هستند که از بین می‌روند (Ruaro *et al.*, 2016). در ایستگاه‌هایی که تحت تأثیر آشفته‌گی قرار دارند فقط یک یا چند گونه غالب باقی می‌ماند و تنوع گونه‌ای کاهش می‌یابد. بنابراین ماکروبتوزها به اثرات تخریب محیط زیست به

شدت پاسخ می‌دهند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کیفیت زیستی رودخانه پس از سیلاب شباهت زیادی با آب‌های آلوده دارد که مشابه نتایج مطالعه Smith و همکاران (۲۰۱۹) بود.

بر اساس شاخص B-IBI ایستگاه‌های مطالعاتی در سه گروه کیفی نسبتاً خوب، ضعیف و بسیار ضعیف قرار گرفتند. در فصل بهار هر چهار ایستگاه مطالعاتی در شرایط کیفی بسیار بد قرار گرفتند که می‌تواند به دلیل رسوبات ناشی از سیلاب‌ها باشد. همچنین شاخص B-IBI ایستگاه شماره چهار در فصل تابستان از لحاظ زیستی بسیار ضعیف ارزیابی شد و بقیه ایستگاه‌ها در شرایط ضعیف قرار گرفتند. این امر بدین صورت قابل توجیه خواهد بود که حجم آب رودخانه به دلیل کاهش بارندگی کاهش می‌یابد و این امر باعث افزایش اثر سوء آلاینده‌ها بر جامعه زیستی می‌گردد. از طرف دیگر مهم‌ترین عواملی که می‌توانند ساختار و ترکیب جامعه ماکروبن‌توز را تغییر دهد، فاکتورهای محیطی و نوسانات فصلی هستند. در این مطالعه بازسازی جوامع ماکروبن‌توز در تابستان بعد از سیلاب بهاره را داشتیم. در فصل زمستان نیز ایستگاه شماره سه و چهار از نظر کیفی شرایط نسبتاً خوب داشتند. علت شباهت مقداری شاخص B-IBI در ایستگاه اول و دوم فصل پاییز و زمستان می‌تواند این باشد که چون نمونه‌گیری در آخرین ماه فصل انجام شد پس از نظر ویژگی‌ها فصل پاییز و زمستان به هم نزدیک بود. همین‌طور کاهش فعالیت‌های کشاورزی می‌تواند دلیلی بر شرایط نسبتاً خوب در فصل زمستان باشد. در مطالعه‌ای مشابه Oosterhout و همکاران (۲۰۱۵) شاخص IBI را به عنوان شاخص سلامت اکوسیستم‌های رودخانه‌های کم عمق انتخاب کردند و در این پژوهش شکل پیشرفته‌ای از شاخص IBI را به صورت چند معیاره به نمایش در آوردند و شاخص چند معیاره نه تنها وضعیت کلی اکوسیستم را نشان می‌دهد بلکه علل خاص اختلالات زیست محیطی را نیز بیان می‌کند. شاخص‌های چند معیاره برای ارزیابی کیفیت اکوسیستم‌های آبی ابزار مهمی هستند. این شاخص‌ها انعطاف‌پذیر، قوی و حساسند و غالباً توانایی تمایز میان تغییرات طبیعی و انسانی را دارند (Aazami, 2015). نتایج حاصل از شاخص B-IBI با نتایج پژوهش پروندی و همکاران (۱۳۹۵) و سه‌بری و همکاران (۱۳۹۶) مطابقت دارد. ولی با نتایج Fohn و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت نداشت.

SIGNAL نوع آلودگی و عوامل موثر بر جامعه ماکروبن‌توز را نشان می‌دهد که به تصمیم‌گیری در مورد سلامت رودخانه کمک می‌کند. امتیاز بیش‌تر شاخص SIGNAL مربوط به کیفیت خوب آب می‌باشد. که نشان دهنده شوری، کدورت و مواد مغذی (مانند نیترات و فسفات) کم و بالا بودن میزان اکسیژن محلول است (Chessman, 2003). نتایج حاصل از شاخص SIGNAL از نظر آنالیزهای آماری تفاوت معنی‌داری بین ایستگاه‌های نمونه‌گیری در فصل‌های مختلف را نشان داد. بر اساس این شاخص اکثر ایستگاه‌ها در چهار فصل از نظر کیفی دارای آلودگی شدید بودند. فقط ایستگاه‌های یک و چهار در دو فصل پاییز و زمستان و ایستگاه سه در فصل بهار از نظر کیفی دارای آلودگی متوسط بودند. استفاده از اراضی در حوضه آبریز عامل تأثیرگذار بر ژئومورفولوژی و وضعیت زیستی رودخانه‌ها است (sear, 1996). در نتیجه اراضی موجود در حوضه آبریز برای طیف وسیعی از

کشاورزی، جاده‌سازی و تفرج مورد استفاده قرار گرفته است. در حالی که تأثیر مشاغل انسانی در چشم انداز مشهود است. کشاورزی استفاده غالب از اراضی در حوضه آبریز است. این کاربری اراضی در سرتاسر حوضه آبریز کارده به طور عمده در مجاورت رودخانه نزدیک‌تر از بخش‌های دیگر است. وجود روستاها و فعالیت‌های کشاورزی و همچنین تفرج در حاشیه رودخانه کارده و به دنبال آن تخلیه پساب آن‌ها به منابع آب باعث آلودگی این رودخانه می‌شود.

بر اساس نتایج همبستگی شاخص‌های زیستی و پارامترهای فیزیکوشیمیایی در این مطالعه رابطه همبستگی بین شاخص‌های زیستی و این پارامترهای آب بسیار ضعیف بود که بیانگر حساسیت اندک شاخص‌های زیستی مانند SIGNAL به پارامترهای نیترات، فسفات و کلی فرم آب است. می‌توان دلیل آن را متغیر بودن پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب رودخانه‌ها دانست (Williams, 1996).

رویکردهای چند متغیره برای ارزیابی زیستی در واقع روش‌هایی هستند که از ابزارهای آماری برای توسعه روابط بین جانوران و خصوصیات محیطی استفاده می‌کنند. رویکردهای چند متغیره از آزمون قیاسی فرضیه‌ها بر وضعیت جامعه استفاده می‌کنند که تحت تأثیر شیب آشفستگی ناشی از نتایج تحلیل قرار می‌گیرند (Abbasi & Abbasi, 2012). براساس مطالعات Nhiwatiwa و همکاران (۲۰۱۷) محرک‌های ساختار جامعه ماکروبن‌توزها نتایج آزمون CCA نشان دهنده این است که متغیرهای فیزیکی و شیمیایی تأثیر کمی بر روی خانواده‌های ماکروبن‌توز دارند. بجز نیترات، COD و BOD که بیش‌ترین تأثیر را بر روی پراکنش ماکروبن‌توزها در ایستگاه‌های مطالعاتی داشته‌اند.

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه ایستگاه ۱ که در بالا دست روستا آل قرار دارد شرایط نسبتاً بهتری از ایستگاه‌های دیگر داشت. حضور کم گونه‌های ماکروبن‌توز در رودخانه حاکی از ناپایداری اکوسیستم رودخانه بود که این ناپایداری در فصل پاییز و زمستان منشاء غیر طبیعی دارد و تغییر در شرایط محیطی رودخانه و اجزای آن منجر به دگرگونی و از بین رفتن گونه‌های حساس شده است. همچنین سیلاب در فصل بهار همه ایستگاه‌ها را تحت تأثیر قرار داد و جمعیت ماکروبن‌توزها به‌طور چشم گیری کاهش یافت. در چهار ایستگاه نمونه‌برداری اختلاف فصلی در ترکیب ماکروبن‌توزها مشاهده گردید. تفاوت فصلی مشاهده شده را می‌توان به تغییر در عواملی مانند در دسترس بودن مواد غذایی، شرایط هیدرولیک، دما و عوامل بیوتیک نسبت داد (Dallas & Day, 2004).

به دلیل اینکه ایران در منطقه خشک واقع شده است پس مدیریت منابع آب ضروری و مهم است. در مجموع عواملی که کیفیت آب رودخانه کارده را تهدید می‌کنند شامل: فاضلاب خانگی و کشاورزی، کشاورزی سنتی و ناپایداری، بهره‌برداری ناپایدار از منابع آب، گردشگری ناپایدار، تخریب اراضی، تغییر کاربری اراضی، سد سازی، تغییر اقلیم، جاده سازی است.

جهت مدیریت منابع آبی رودخانه‌های ایران پیشنهاد می‌شود: جلوگیری از ورود فاضلاب‌های خانگی، کشاورزی و استخرهای پرورش ماهی به رودخانه‌ها، جلب مشارکت مردم محلی و بالا بردن فرهنگ زیست محیطی آن‌ها، استفاده از الگوهای منظم پایش زیستی با توجه به مناسب بودن و قابل اعتمادتر بودن این شاخص‌ها، توسعه دادن یک شاخص زیستی ملی برای ارزیابی زیستی رودخانه‌های ایران

منابع

- اعظمی، ج. (۱۳۹۶). محاسبه شاخص‌های زیستی ماکروبن‌توزها جهت ارزیابی سلامت اکولوژیکی اکوسیستم‌های آبی. بهره‌برداری و پرورش آبزیان جلد ۶ (شماره ۳).
- اعتمادی، م، عزیزیان، غ، اکبری، م. (۱۳۹۱). کاربرد سامانه اطلاعات جغرافیایی (GIS) در پهنه‌بندی سیلاب.
- پروندی، ش. عبدلی، ا و هاشمی، س.ج. (۱۳۹۵). ارزیابی زیستی رودخانه جاجرود با استفاده از ساختار جمعیت ماکروبن‌توز. مجله بوم‌شناسی آبزیان، شماره ۶. صفحات ۳۳-۲۰.
- حیدری‌زاده، م. و محمدزاده، ح. (۱۳۹۰). "بررسی عوامل بررسی موثر بر کیفیت آب رودخانه کارده (شمال شهر مشهد) با استفاده از داده‌های هیدروشیمیایی و نمایه اشباع (Si) کانی‌های کربناته و سولفات، اولین همایش ملی علمی دانشجویی انجمن علمی زمین‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی.
- سه‌بری، س. صفری، ا. فراشی، آ. (۱۳۹۶). ارائه چارچوب برای ارزیابی سلامت رودخانه‌ها (مطالعه موردی: رودخانه ارتکند در خراسان رضوی). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.
- صفت، ن، سعیدیان، م. ح. سعیدیان، ف. (۱۳۸۹). "مطالعه روند سیل خیزی در حوزه‌های آبخیز از طریق بررسی تراوایی و پتانسیل ایجاد روان آب در سازنده‌های زمین‌شناسی".
- Aazami, J. Moradpour, H. Zamani, A. and Kianimehr, N. (2018). Ecological quality assessment of Kor River in Fars Province using macroinvertebrates indices. *International Journal of Environmental Science Technology*, 17(4), 1-10.
- Aazami, J., Sari, A. E., Abdoli, A., Sohrabi, H., & Van den Brink, P. J. (2015). Assessment of ecological quality of the Tajan River in Iran using a multimetric macroinvertebrate index and species traits. *Environmental management*, 56(1), 260- 269.
- Abbasi, T. and Abbasi, S.A. (2012). *Water Quality Indices*. Elsevier, 978-0-444-54304-2
- Chessman, Bruce C. (2003). "New Sensitivity Grades for Australian River Macroinvertebrates." *Marine and Freshwater Research* 54(2): 95-103.
- Czeniawska-Kusza, I. (2005). Comparing modified biological monitoring working party score system and several biological indices based on macroinvertebrates for water quality assessment. *Limnologia* 35, 169-176.
- Cuffney, Thomas F. Robin, A. Brightbill, Jason, T. and Ian, R Waite. (2010). "Responses of Benthic Macroinvertebrates to Environmental Changes Associated with Urbanization in Nine Metropolitan Areas." *Ecological Applications* 20(5): 1384-1401

- Diaz, R. J. olan, M. and Valente, R. M. A. (2004). Review of approaches for classifying benthic habitats and evaluating habitat quality. *Journal of Environmental Management* 73: 165-181.
- Dallas, H. F., & Day, J. A. (2004). The effect of water quality variables on aquatic ecosystems: a review. Pretoria: Water Research Commission.
- Dalu, T. Clegg, B. and Nhiwatiwa, T. (2012). Macroinvertebrate communities associated with littoral zone habitats and the influence of environmental factors in Malilangwe Reservoir, Zimbabwe. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 406, 6.
- Gabriels, W. Lock, K. De. Pauw, N. and Goethals, P. L. (2010). Multimetric Macroinvertebrate Index Flanders (MMIF) for biological assessment of rivers and lakes in Flanders (Belgium). *Limnological-Ecology and Management of Inland Waters*, 40(3), 199-207.
- Hering, D. Otto, M. Leonard, S. and Piet, F.M. Verdonshot. (2004). "Overview and Application of the AQEM Assessment System." *Hydrobiologia* 516(1-3): 1-20.
- Fierro, P. Valdovinos, C. Vargas-Chacoff, L. Bertrán, C. and Arismendi, I. (2017a). Macroinvertebrates and fishes as bioindicators of stream water pollution. In: Tutu, H. (Ed.), *Water Quality*. Intechopen, Rijeka, pp. 23-38.
- Fohn, M. Works, K. C. P., Fore, L. and Design, S. (2011). Measuring the Health of Kitsap County's Streams and Watersheds Using the Benthic Index of Biotic Integrity (B-IBI).
- Kröncke, I. and Reiss, H. (2010). Influence of macrofauna long-term natural variability on benthic indices used in ecological quality assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 60(1), 58-68.
- Karr, J. R. (1981). Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6(6), 21-27.
- Karr JR, Dudley DR. (1981). Ecological perspectives on water quality goals. *Environ. Manag.* 5:55-68.
- Karr JR, Chu EW. (1999). *Restoring Life in Running Waters: Better Biological Monitoring*. Washington, DC: Island. 200 pp.
- Mebane, Christopher A., Terry R. Hughes, and Robert M. Maret. (2003). "An Index of Biological Integrity (IBI) for Pacific Northwest Rivers."
- Moog, O., Schmutz, S., and Schwarzinger, I. (2018). Biomonitoring and bioassessment. *Riverine Ecosystem Management*, 371.
- Nhiwatiwa, T., Dalu, T. and Brendonck, L. (2017). Impact of irrigation based sugarcane cultivation on the Chiredzi and Runde rivers quality, Zimbabwe. *Sci. Total Environ.* 587-588, 316-325.
- Odountan, H, and Youssouf A. (2015). "Can Macroinvertebrate Assemblage Changes Be Used as Biological Indicator of Water Quality of the Nokoue Lake (Benin)?" *Journal of Environmental Protection* 6(12): 1402.
- Ofenböck, T, Otto M, Jeroen G, and Michael B. 2004. "A Stressor Specific Multimetric Approach for Monitoring Running Waters in Austria Using Benthic Macro-Invertebrates." In *Integrated Assessment of Running Waters in Europe*, Springer, 251-68.
- Oscoz, J. Galicia, D. and Miranda, R. (2011). Taxa description and biology. In *Identification Guide of Freshwater Macroinvertebrates of Spain* (pp. 47-148). Springer, Dordrecht.
- Pinto, R., Patrício, J., Baeta, A., Fath, B. D., Neto, J. M., & Marques, J. C. (2009). Review and evaluation of estuarine biotic indices to assess benthic condition. *Ecological indicators*, 9(1), 1-25.
- Ruaro, R., Gubiani, É. A., Cunico, A. M., Moretto, Y., and Piana, P. A. (2016). Comparison of fish and macroinvertebrates as bioindicators of Neotropical streams. *Environmental monitoring and assessment*, 188(1), 45.

- Ruaro, R., Gubiani, É. A., Cunico, A. M., Higuti, J., Moretto, Y., and Piana, P. A. (2019). Unified Multimetric Index for the Evaluation of the Biological Condition of Streams in Southern Brazil Based on Fish and Macroinvertebrate Assemblages. *Environmental management*, 64(5), 661-673.
- Sear, D.A. (1996). Fine Sediment Accumulations in the River Rother, West Sussex; Report to Southern Region NRA: Southampton, UK, p. 27.
- Schmutz, S., Cowx, I. G., Haidvogel, G., and Pont, D. (2007). Fish-based methods for assessing European running waters: a synthesis. *Fisheries Management and Ecology*, 14(6), 369-380
- Sheela, A. M., Letha, J., Joseph, S., Ramachandran, K. K., & Sanalkumar, S. P. (2011). Trophic state index of a lake system using IRS (P6-LISS III) satellite imagery. *Environmental monitoring and assessment*, 177(1), 575-592.
- Silva, D., Herlihy, A.T., Hughes, R.M. and Callisto, M. (2017). An improved macroinvertebrate multimetric index for assessment of Wadeable streams in the neotropical savanna. *Ecol. Indic.* 81, 514–525.
- Singh, P. K., and Saxena, S. (2018). Towards developing a river health index. *Ecological Indicators*, 85, 999-1011.
- Šmilauer, P., & Lepš, J. (2014). *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO 5*. Cambridge university press.
- Smith, A. J., Baldigo, B. P., Duffy, B. T., George, S. D., and Dresser, B. (2019). Resilience of benthic macroinvertebrates to extreme floods in a Catskill Mountain River, New York, USA: Implications for water quality monitoring and assessment. *Ecological Indicators*, 104, 107-115
- Sutherland, A. B., Culp, J. M., and Benoy, G. A. (2012). Evaluation of deposited sediment and macroinvertebrate metrics used to quantify biological response to excessive sedimentation in agricultural streams. *Environmental Management*, 50(1), 50-63.
- Tchakonté, S. Ajeegah, G.A. Diomandé, D. Camara, A.I. and Ngassam, P., (2014). Diversity, dynamic and ecology of freshwater snails related to environmental factors in urban and suburban streams in Douala–Cameroon (Central Africa). *Aquat. Ecol.* 48, 379–395.
- Van den Broeck, M. Waterkeyn, A. Rhazi, L. and Grillas, P. (2015). “Assessing the Ecological Integrity of Endorheic Wetlands, with Focus on Mediterranean Temporary Ponds.” *Ecological Indicators* 54: 1–11.
- Van Oosterhout, M. P., & Van Der Velde, G. (2015). An advanced Index of Biotic Integrity for use in tropical shallow lowland streams in Costa Rica: Fish assemblages as indicators of stream ecosystem health. *Ecological Indicators*, 48, 687-698.
- Williams, D.D. (1996). Environmental constraints in temporary fresh waters and their consequences for the insect fauna. *Journal of the North American Benthological Society*, 15, 634-650.

Assessment of Kardeh River Health Using Multimetric Biological Index and Macroinvertebrate Communities

S. sargolzaie¹, A. Farashi^{2*}, O. Safari³, H. Ahmadniaye motlagh⁴

Received:2019.11.11

Accepted:2020.10.11

Abstract

Kardeh River is one of the most important permanent rivers of Khorasan Razavi province Which supplies a large part of Mashhad's drinking and agricultural water. Multivariate analysis was used to find out the quality of Kardeh River in this study and to understand the impact of macroinvertebrates community structure drivers on ecosystem management. For this purpose, macroinvertebrates sampling was performed from four study stations during four seasons in 2018-2019, physical and chemical parameters also were measured. In this study, Of the Ephemeroptera, the total number of Caenidae and Baetidae families had the highest abundance (66 / 60 %). The results showed that the Index of Biotic Integrity varied from 3 to 1.1 and based on this biodiversity indicator, Kardeh River water quality was classified into three relatively good, poor and very poor-quality classes. The Stream Invertebrate Grade Number Average Level index was classified into two categories: moderate pollution and severe pollution. Canonical Correspondence Analysis also showed that nitrate, biochemical oxygen demand and chemical oxygen demand had the most effect on the distribution of macroinvertebrates at the study stations. In general, the Kardeh River water quality was poorly evaluated and among the study stations the station conditions were relatively better than the other stations. Therefore, among the available indices, multimetric indices are more reliable. However, these index should be calibrated according to the conditions of Iranian rivers.

Key words: Biological Assessment, Biotic Integrity, Canonical Correspondence Analysis, Kardeh River, SIGNAL, Macroinvertebrates

1- MSc in Environment Science, Ferdowsi University of Mashhad

2- Associate Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad

* (Corresponding Author: farashi@um.ac.ir)

3- Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad

4- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad

ارزیابی رفتار شناگری و ترجیحات رنگی در ماهی زبرا بالغ (*Danio rerio*) با استفاده از مدل T-maze

سعید شفیعی ثابت^{۱*}، شقایق جامی^۲، فاطمه علیزاده لادمخی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۶

چکیده

جهت بررسی رفتار شناگری و ترجیحات رنگی ماهی زبرا تعداد ۱۶ قطعه ماهی بالغ به صورت انفرادی به روش T-maze استفاده شدند. شاخص‌های رفتاری شامل زمان خوگیری در منطقه آغازین، زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری، تعداد دفعات گزینش رنگ و مدت‌زمان سپری‌شده در ترکیبات بازوهای رنگی (سبز-قرمز و آبی-زرد) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین و رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری به‌طور میانگین به ترتیب ۳۰۰ و ۱۲۰ ثانیه بود. در مورد تعداد دفعات گزینش، ماهی زبرا رنگ قرمز را نسبت به رنگ سبز ترجیح داد ($P < 0.05$). اما تعداد دفعات گزینش رنگ آبی-زرد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). همچنین، مدت‌زمان سپری‌شده در هر دو گروه بازوهای رنگی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). با توجه به نتایج این مطالعه ماهی زبرا توانایی تشخیص رنگ‌ها را دارد و T-maze یک ابزار معتبر برای ارزیابی ترجیحات رنگی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بینایی، خوگیری، رفتار، زیست‌شناسی، فعالیت شناگری

۱- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا

* (نویسنده مسئول: s.shafiei.sabet@guilan.ac.ir)

۲- کارشناسی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا

مقدمه

رنگ‌ها در زیستگاه‌های خشکی و آبی با استفاده از قدرت بینایی توسط گونه‌های جانوری قابل‌درک می‌باشند و امکان شناسایی و تشخیص دقیق‌تر محیط پیرامون این‌گونه‌ها را فراهم می‌سازد. بینایی یکی از حواسی است که ماهی‌ها در کنار سایر حواس از آن استفاده می‌کنند. برخی از مزایای استفاده از قدرت بینایی در شناخت محیط اطراف و زیستگاه گونه‌های جانوری شامل انجام فعالیت‌های تغذیه‌ای روزانه، دفاع از قلمرو، زندگی در اجتماعات گروهی، مهاجرت و جفت‌یابی می‌باشد (Blackiston *et al.*, 2011; Hughes & Blight, 2000).

قدرت بینایی رنگ‌ها یکی از مهم‌ترین روش‌ها در شناخت محرک‌های مهم زیست‌شناسی است و نقش مهمی در ادراک بینایی دارد (Park *et al.*, 2016). ماهی‌ها توانایی تشخیص رنگ‌ها در طیف وسیعی از آبی تا مادون‌قرمز (Levine & MacNichol, 1982) و همچنین تشخیص ابعاد و اندازه اجسام را دارند (Miletto Petrazzini *et al.*, 2012). ادراک رنگ‌ها و ترجیحات رنگی به‌طور مستقیم بر یادگیری (Spence & Smith, 2008)، شکل‌گیری حافظه (Colwill *et al.*, 2005) و تصمیم‌گیری (Avdesh *et al.*, 2010) ماهی‌ها اثرگذار است. در مطالعه‌ای Avdesh و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند یکی از متداول‌ترین ابزارهای ارزیابی حافظه و یادگیری در مدل‌های جانوری، استفاده از محرک‌های بینایی نظیر اولویت‌های رنگیست (Avdesh *et al.*, 2012). مطالعات قبلی نشان داده است که رنگ زمینه و معرفی منابع رنگی جدید در محیط بر مسیریابی و جهت‌گیری (Hughes & Blight, 2000)، پراکنش مکانی (Parker *et al.*, 2012) و رفاه ماهی‌ها (Serra *et al.*, 1999) تأثیر می‌گذارد. اگرچه مطالعات کمی در خصوص قابلیت‌ها و توانایی ماهی‌ها در تشخیص و تمایز رنگ‌ها و اجسام محیط اطرافشان انجام شده است (Gerlai, 2010).

ماهی زبرا یک ماهی کوچک استخوانی آب شیرین از خانواده Cyprinidae و با نام علمی *Danio rerio* است (شکل ۱) (Spence *et al.*, 2008). این ماهی بومی منطقه هیمالیا و دامنه پراکنش آن‌ها از شمال هند، بنگلادش تا بخش‌هایی از نپال جنوبی است (Spence *et al.*, 2008). ماهی زبرا به‌طور عمده در ستون آب تغذیه می‌کند (Spence *et al.*, 2008) و رژیم غذایی ماهی زبرا از زئوپلانکتون‌ها و حشرات تشکیل شده (Engeszer *et al.*, 2007) و به‌عنوان یک‌گونه همه‌چیزخوار شناخته شده است (Spence *et al.*, 2008). در این ماهیان جنس‌های نر و ماده از هم جدا بوده و به‌راحتی قابل تشخیص هستند. بدن جنس ماده چاق‌تر، دارای برجستگی مشخصی در ناحیه شکم درحالی‌که نرها دارای بدنی دوکی‌شکل کشیده می‌باشند. این‌گونه در محدوده دمایی بین ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد و در بازه pH بین ۶/۸ تا ۷/۵ در محیط طبیعی‌شان زندگی می‌کنند. همچنین طول بدن آن‌ها در مرحله بلوغ به ۵ سانتی‌متر می‌رسد (Spence *et al.*, 2008). ماهی زبرا، عمدتاً از حس بینایی برای شناخت محیط اطراف، شکار مواد غذایی و جلوگیری از شکارچیان استفاده می‌کند و به همین دلیل داشتن سیستم بینایی تکامل‌یافته‌تر و

پیشرفته برای حفظ بقاء این گونه بسیار ضروری می‌باشد (Fleisch & Neuhauss, 2006; Siregar *et al.*, 2020). سیستم بینایی ماهی زبرا در مرحله رسیدن لارو به پنج‌روزگی توسعه می‌یابد که این تکامل زود هنگام سیستم بینایی ماهی زبرا را می‌توان به‌عنوان سازگاری با تنش‌های اکولوژیکی لاروهای جوان آزاد شناگر برای شکار مواد غذایی، دانست (Fleisch & Neuhauss, 2006). در همین راستا، مطالعات قبلی نشان داده است که ماهی زبرا، بینایی رنگی با جذب بیشینه رنگ‌ها در طول موج‌های ماوراءبنفش (۳۶۲ نانومتر)، آبی (۴۱۵ نانومتر)، سبز (۴۸۰ نانومتر) و قرمز (۵۷۰ نانومتر) را دارد (Spence & Smith, 2008; Avdesh *et al.*, 2010; Siregar *et al.*, 2020).

استفاده از ماهی زبرا به‌عنوان یک‌گونه آزمایشگاهی برای اولین بار در دهه ۱۹۷۰ توسط استرای سینگر و همکارانش به‌عنوان یک مدل ژنتیکی به اثبات رسید و پس‌از آن از این ماهی به‌صورت گسترده جهت ارزیابی‌های ژنتیکی در آزمایشگاه‌های مختلف استفاده شد (Haffter *et al.*, 1996). از ویژگی‌های گونه‌ای ماهی زبرا می‌توان به نگهداری آسان، شفافیت جنین و لارو، رشد سریع، دوره تولیدمثلی کوتاه و هزینه کم در مراحل مختلف تخم، لاروی و بلوغ این‌گونه اشاره داشت. هم‌چنین این‌گونه به‌عنوان گونه مدل در علوم شناختی، عصبی، یادگیری و حافظه نیز استفاده می‌گردد (Spence *et al.*, 2008; Spence & Smith, 2008). تاکنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی ویژگی‌های رفتاری ماهی زبرا و ترجیحات رنگی در ایران صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت موضوع، هدف از انجام این پژوهش، بررسی رفتار شناگری و ارزیابی ترجیحات رنگی ماهی زبرا با استفاده از تانک آکواریومی ویژه T-maze می‌باشد. شاخص‌های مورداندازه‌گیری شامل: (۱) مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین، (۲) مدت‌زمان رسیدن به ساقه T در منطقه تصمیم‌گیری، (۳) تعداد دفعات گزینش تیمار بازوهای رنگی (قرمز-سبز) و (آبی-زرد) و (۴) مدت‌زمان سپری‌شده در هر تیمار بازوهای رنگی (قرمز-سبز) و (آبی-زرد) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

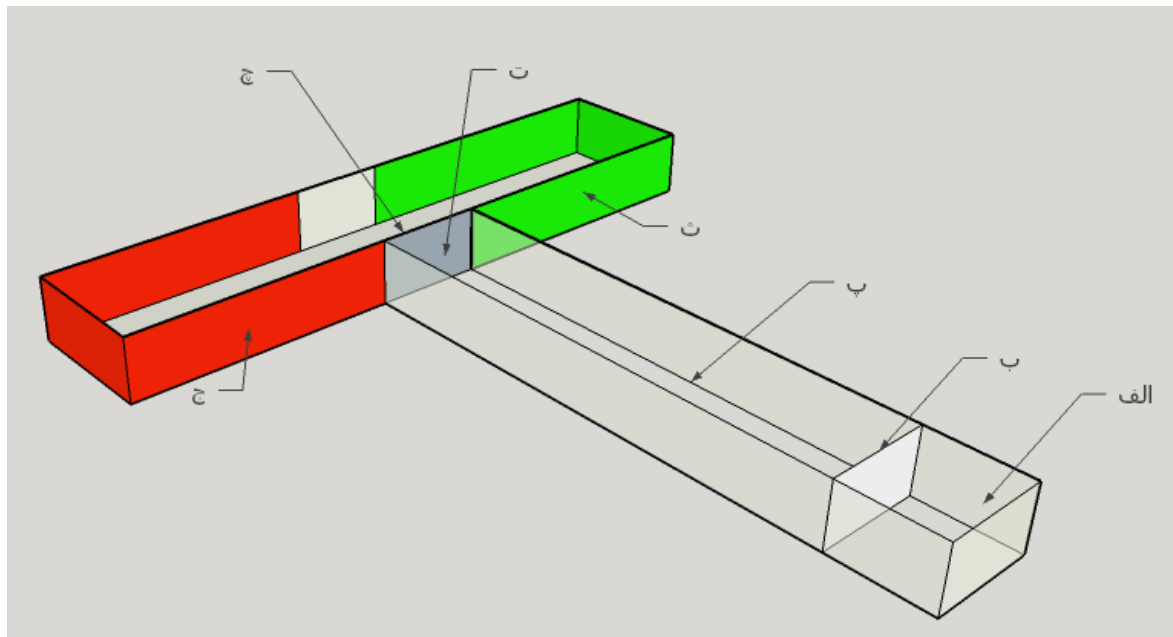
تهیه ماهی و مشخصات آکواریوم مدل T-maze

این مطالعه در آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان واقع در شهرستان صومعه‌سرا به مدت ۱۴ روز در ساعات ۸:۳۰ الی ۱۳:۳۰ از روز انجام شد. تعداد ۱۶ قطعه ماهی زبرا (*Danio rerio*) (شکل ۱) بالغ بی‌رنگ با میانگین طول 4 ± 1 سانتی‌متر و با نسبت تقریبی جنسی ۱ به ۱ (۸ قطعه ماده و ۸ قطعه ماهی نر) از یکی از مراکز فروش ماهیان زینتی در شهر رشت در شهریورماه سال ۱۳۹۸ تهیه شد. آکواریوم‌های ذخیره ماهی به تعداد ۲ عدد و ابعاد $20 \times 10 \times 30$ سانتی‌متر مجهز به هواده جهت نگهداری ماهیان قبل و بعد از انجام آزمایش، استفاده گردیده است. درجه حرارت آب در آکواریوم‌ها به‌طور میانگین 22 ± 1 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری محیط آزمایشگاه (دوره روشنایی- تاریکی) ۱۲:۱۲ بود (Colwill *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2015).

غذادهی ماهی‌ها (غذای تجاری بیومار آسیاب شده) در دو نوبت صبح و عصر انجام گرفت. جهت انجام آزمایش رفتارشناسی و ارزیابی ترجیحات رنگی، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش غذادهی متوقف گردید. تانک آزمایشی مورد استفاده، یک آکواریوم به صورت T شکل، به نام مدل T-maze (شکل ۲) بود که به ارتفاع 1 ± 8 سانتی‌متر از آب با درجه حرارت 1 ± 22 درجه سانتی‌گراد پر گردید. این تانک دارای مناطقی به نام‌های (۱) منطقه آغازین (Start box): در ابتدای ساقه دمی به ابعاد $10 \times 10 \times 10$ سانتی‌متر، (۲) منطقه تصمیم‌گیری (Decision area): از انتهای ساقه دمی به سمت فضای بین دو بازوی چپ و راست به ابعاد $10 \times 10 \times 10$ سانتی‌متر و (۳) بازوها (تعداد ۲ بازو) دارای ابعاد $20 \times 10 \times 10$ سانتی‌متر بود. جهت بررسی فرایند خوگیری ماهی زبرا در منطقه آغازین، محوطه منطقه آغازین با استفاده از یک درپوش شیشه‌ای (که توسط گاز استریل و دستمال کاغذی با لایه‌ای از چسب جهت جلوگیری از فرار احتمالی ماهی زبرا از محل اتصال دیواره‌های درپوش پوشیده شده بود) از سایر قسمت‌های آکواریوم مدل T-maze جدا گردید (Avdesh et al., 2012). از کاغذهای رنگی به رنگ‌های سبز، قرمز، آبی و زرد برای آماده‌سازی گزینش رنگ توسط ماهی با پوشاندن دیواره‌های خارجی بازوها انجام گردید. جهت بررسی ترجیحات رنگی ماهی زبرا در این آزمایش از دو گروه بازوهای رنگی (سبز- قرمز) و (آبی- زرد) استفاده گردید. در ادامه برای گروه رنگی اول، به صورت تصادفی دیواره‌های بازوی سمت چپ قرمز و دیواره‌های بازوی سمت راست سبز انتخاب شد. هم‌چنین برای گروه رنگی دوم به صورت تصادفی دیواره‌های بازوی سمت چپ زرد و دیواره‌های بازوی سمت راست آبی انتخاب شد (Oliveira et al., 2015).



شکل ۱: ماهی زبرا *Danio rerio*. مورد استفاده در این آزمایش. نوارهای طولی آبی و طلایی را که در طول بدن ماهی تا باله دمی کشیده شده است مشاهده می‌گردد.



شکل ۲. تصویر شماتیک از محیط آزمایش بررسی رفتار شناگری و ترجیحات رنگی با استفاده از آکواریوم مدل T-maze. الف) منطقه خوگیری (ب) درپوش جداکننده بین منطقه خوگیری و ساقه‌ی T (پ) ساقه‌ی T (ت) درپوش جداکننده بین منطقه تصمیم‌گیری و ساقه‌ی T (ج) منطقه تصمیم‌گیری (ت و ج) بازوهای رنگی که در هر سری آزمایش شامل قرمز و سبز و (آبی و زرد) می‌باشد.

مراحل انجام آزمایش، معرفی تیمارها و پارامترهای اندازه‌گیری شده

برای انجام آزمایش، ابتدا انتقال ماهی زبرا از آکواریوم ذخیره توسط یک تور ساچوک چشمه ریز به داخل یک بشر به‌صورت انفرادی قرار گرفت. پس از گذشت ۴ دقیقه بدون انجام تورکشی مجدد، ماهی زبرا به منطقه آغازین معرفی گردید. هدف از قرارگیری اولیه ماهی در بشر، شروع اولین مرحله آماده‌سازی ماهی به شرایط اسارت برای انجام آزمایش به‌صورت انفرادی، کاهش اضطراب ناشی از صید شدن و کمبود کوتاه‌مدت اکسیژن ناشی از آن بوده است (Oliveira *et al.*, 2015). در ادامه با معرفی به منطقه آغازین آکواریوم مدل T-maze آزمایش آغاز می‌گردید. در ابتدای معرفی ماهی به منطقه آغازین، به علت قرارگیری در محیط جدید دو رفتار مشاهده شد؛ ۱) شنای کند و آهسته در قسمت‌های زیرین (کف) منطقه آغازین و ۲) حرکت انفجاری شدید (Startle) و در ادامه عدم تحرک و سکون (Freezing) که به‌صورت ساکن و ثابت ماندن در یک نقطه تعریف می‌گردد. در مطالعات قبلی سایر محققین نشان داده‌شده است که این رفتارها در پاسخ به اضطراب و تنش‌های بسیار شدید می‌باشد (Shafiei Sabet *et al.*, 2015; 2016; Haghani *et al.*, 2019). "این رفتارهای مرتبط با اضطراب و تنش در مدت زمانی که در آزمایش پایلوت بررسی گردید با گذشت زمان مشاهده نگردید و ماهی به محیط آکواریوم آزمایش با اصطلاح خو گرفت." در این مطالعه نشانه خوگیری، شنای آزاد و همه‌جانبه در ستون آبی منطقه آغازین تعریف گردید. از ابتدای زمان رهاسازی ماهی

زبرا به داخل منطقه آغازین تا شنای آزاد و همه‌جانبه در ستون آبی منطقه آغازین و مشاهده علائم خوگیری به‌عنوان مدت‌زمان سپری‌شده جهت خوگیری و اولین شاخص رفتار شناگری ثبت گردید. سپس درپوش موجود در بخش جلویی منطقه آغازین (شکل ۲) برداشته شد تا ماهی به‌صورت انفرادی بتواند از منطقه آغازین به سمت منطقه تصمیم‌گیری و انتخاب رنگ‌ها وارد شود. در این مرحله، دومین شاخص رفتار شناگری یعنی مدت‌زمان سپری‌شده از زمان برداشته شدن درپوش مانع در بخش جلویی منطقه آغازین و عبور از طول ساقه T و رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری با استفاده از یک‌زمان سنج اندازه‌گیری و ثبت گردید. جهت ارزیابی ترجیحات رنگی ماهی زبرا، از دو گروه تیمارهای رنگی (سبز- قرمز) و (آبی و زرد) در قسمت دو بازوی آکواریوم آزمایش مدل T-maze استفاده گردید. پارامترهای اندازه‌گیری شده در این بخش شامل (۱) تعداد دفعات انتخاب رنگ توسط ماهی زبرا در هر گروه از تیمارهای رنگی و (۲) مدت‌زمان سپری‌شده در هر یک از بازوهای رنگی گروه‌های رنگی بود. پس از گزینش یکرنگ، ماهی در بازوی رنگی مدت‌زمانی را شنا می‌کرد که این مدت‌زمان توسط زمان‌سنج اندازه‌گیری شد. طول کل دوره زمانی آزمایش در این بخش برای بررسی ترجیحات رنگی ماهی زبرا ۶۰ دقیقه بوده است (Peeters et al., 2016).

تجزیه و تحلیل آماری

در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. پارامترهای رفتاری مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین، مدت‌زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری، گزینش بازوهای رنگی و مدت‌زمان ماندن در هر بازوی رنگی با استفاده از آزمون Paired Samples T-test انجام گرفت. معنی‌داری داده‌ها در سطح ۰/۰۵ تعیین گردید. آنالیز آماری داده‌ها در نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی و مقایسه داده‌های این پژوهش در دو بخش کلی ارزیابی رفتار شناگری و ترجیحات رنگی ماهی زبرا با استفاده از آکواریوم مدل T-maze می‌باشد. در بخش اول، ارزیابی رفتار شناگری پارامترهای زمان خوگیری در منطقه آغازین، زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری بررسی گردید و در بخش دوم، ارزیابی ترجیحات رنگی پارامترهای تعداد دفعات گزینش رنگ‌ها و مدت‌زمان سپری‌شده در ترکیبات بازوهای رنگی (سبز-قرمز و آبی-زرد) اندازه‌گیری شد.

رفتار شناگری ماهی زبرا

میانگین مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین برای تمامی ماهی‌های زبرا ($n=16$) برابر با $5 \pm 3/6$ دقیقه محاسبه گردید (نمودار ۱ الف). کمترین مدت‌زمان لازم برای خوگیری ۳۶ ثانیه و بیشترین مدت‌زمان لازم برای انجام خوگیری ۱۷ دقیقه

اندازه‌گیری شد. این مدت‌زمان خوگیری به منطقه آغازین در مشاهدات (Peeters *et al.*, 2016) در ماهی زبرا ۱۰ دقیقه گزارش شد که با این بخش از مشاهدات و نتایج این تحقیق متفاوت است. این تفاوت مشاهده‌شده در مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین می‌تواند با شاخص‌هایی چون سن ماهی، شرایط نگهداری ماهی و سازگاری‌های ژنتیکی ماهی در ارتباط باشد (Spence *et al.*, 2006; Haghani *et al.*, 2019) و همکاران (۲۰۱۹) بیان داشتند که ماهی‌های مسن‌تر نسبت به ماهی‌های جوان‌تر سرعت خوگیری بالاتری به تانک آزمایش در شرایط یکسان می‌باشند. همین‌طور اندازه تانک و شدت تابش نور هم می‌تواند بر مدت‌زمان خوگیری ماهی‌ها تأثیرگذار باشد (Haghani *et al.*, 2019).

در خصوص شاخص دوم رفتار شناگری اندازه‌گیری شده، به‌طور میانگین $2 \pm 1/3$ دقیقه طول کشید تا ماهی‌های زبرا به منطقه تصمیم‌گیری برسند (نمودار ۱ ب). کمترین زمان لازم برای رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری ۲ ثانیه و بیشترین مدت‌زمان لازم ۶ دقیقه ثبت شد. دامنه گسترده مشاهده‌شده تفاوت پاسخ‌های رفتار شناگری ماهی زبرا از نظر علمی قابل‌تأمل و بررسی می‌باشد. علاوه بر تنوع ژنتیکی، یکی از دلایل تفاوت مشاهده‌شده در مدت‌زمان خوگیری و سرعت شناگری رسیدن به منطقه آغازین، تنوع شرایط زیستگاهی و محیطی ماهی زبرا می‌باشد (Suriyampola *et al.*, 2016). در این پژوهش ماهی زبرا همانند روش کار در مطالعه (Peeters *et al.*, 2016) بعد از قرارگیری در آکواریوم و خوگیری در منطقه آغازین جهت رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری و انجام ترجیحات رنگی رهاسازی گردید و مراحل خوگیری در ۵ دقیقه اول آزمایش صورت پذیرفت. درحالی‌که در مطالعه برخی دیگر از پژوهشگران قبل از انجام آزمایش ترجیحات رنگی، ماهی‌ها به محیط آکواریوم موردنظر رهاسازی شدند تا خوگیری اولیه‌ای را داشته باشند (Avdesh *et al.*, 2012; Bault *et al.*, 2015). همین موضوع تفاوت در روش کار و انجام آزمایش ترجیحات رنگی نیز می‌تواند بیانگر دلیل وجود تفاوت‌ها در نتایج تحقیقات مدت‌زمان خوگیری و ترجیحات رنگی باشد.

با توجه به نتایج شاخص‌ها رفتار شناگری بررسی شده در این مطالعه (مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین و مدت‌زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری)، به نظر می‌رسد که استراتژی پاسخ‌های رفتاری مشاهده‌شده در ماهی زبرا به‌صورت انفرادی نسبت به تغییرات محیطی و قرار گرفتن در شرایط مختلف دارای همبستگی و ارتباط مستقیم بوده و به‌صورت یک الگو تا حدود زیادی برای هر ماهی زبرا قابل پیش‌بینی می‌باشد. قابل پیش‌بینی بودن پاسخ‌های رفتاری انفرادی ماهی زبرا در این پژوهش نیز مشاهده گردید به‌گونه‌ای که ماهی با مدت‌زمان خوگیری کم در منطقه آغازین، مدت‌زمان کمی هم صرف جستجو در طول ساقه T و رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری کرده است (نمودار ۱).

سندروم‌های رفتاری در ماهی زبرا

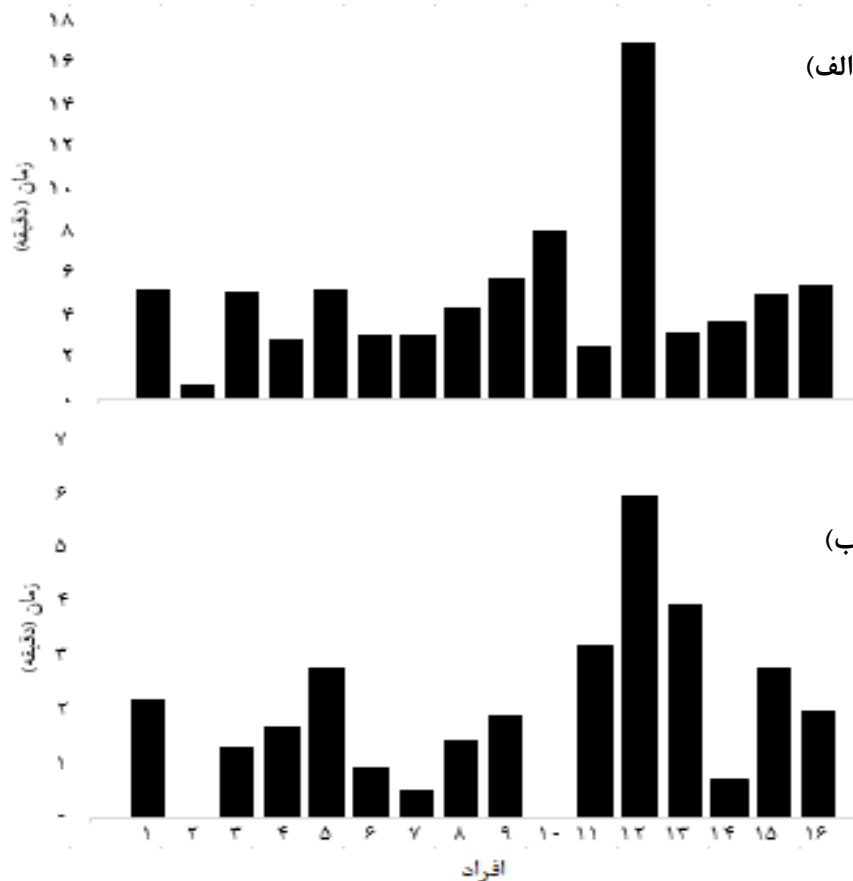
تفاوت‌های بین فردی ویژگی‌ها و صفات رفتاری که باگذشت زمان و زمینه‌فعالیتی در یک‌گونه جانور ثابت و پایدار باقی می‌مانند به‌عنوان سندروم‌های رفتاری شناخته می‌شوند که پژوهش‌های قبلی در بسیاری از گونه‌های جانوری نشان داده‌شده

است (Sih *et al.*, 2004; Sih & Bell, 2008; Sih *et al.*, 2004). در این مطالعه برای اولین بار در ایران، سندروم رفتاری ماهی زبرا با اندازه‌گیری دو پارامتر مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین و مدت‌زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری بررسی گردید. مطالعات قبلی نشان داده است که گونه‌های جانوری در پاسخ به محرک‌های زیستی و تغییرات محیطی در سطح انفرادی یکی از استراتژی‌های فنوتیپی رفتاری پیش فعال (Proactive) و یا انفعالی (Reactive) را انتخاب می‌کنند. از ویژگی‌های افراد با فنوتیپ پیش فعال می‌توان گستاخی، پرخاشگری و پذیرش ریسک خطر بیشتر را ذکر نمود درحالی‌که ویژگی‌های افراد یک‌گونه با فنوتیپ انفعالی معمولاً خجالتی، آرام و عدم ریسک‌پذیری می‌باشد.

افراد یک‌گونه با فنوتیپ‌های رفتاری متفاوت الگوهای فعالیتی متفاوتی را در محیط‌های طبیعی زیست (Montiglio *et al.*, 2010) و هم‌چنین شرایط آزمایشگاهی (Tran & Gerlai, 2013) انتخاب می‌کنند. در پژوهش حاضر پاسخ‌های رفتار شناگری ماهی زبرا در پارامترهای اندازه‌گیری شده مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین و مدت‌زمان لازم برای رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری نشان‌دهنده این فنوتیپ‌های رفتاری پیش فعال (Proactive) و یا انفعالی (reactive) می‌باشند. به‌طوری‌که اکثر ماهی‌هایی که به‌عنوان پیش فعال زمان کمتری صرف خوگیری در منطقه آغازین داشته‌اند، به همان نسبت زمان کمتری را هم‌جهت رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری صرف کردند. درحالی‌که ماهی‌هایی که مدت‌زمان بیشتری صرف خوگیری در منطقه آغازین داشتند زمان بیشتری هم طول کشید تا به منطقه تصمیم‌گیری برسند (نمودار ۱). البته در مواردی هم مغایرت‌هایی در بیان این الگو و ارتباط رفتاری مشاهده شده است. به‌عنوان مثال در نمونه شماره ۱۰، مدت‌زمان عادت به محیط در منطقه آغازین ۸ دقیقه بوده است و از لحاظ مدت‌زمان، زمان زیادی را صرف عادت به محیط کرده است؛ لذا پیش‌بینی می‌شد که این نمونه مدت‌زمان زیادی را نیز صرف جستجوی ساقه T کرده باشد. اما با توجه به داده ثبت‌شده این نمونه در مدت‌زمان کمتر از ۱ دقیقه (۲ ثانیه) خود را به منطقه تصمیم‌گیری رسانده است که عدد بسیار کمی از لحاظ مقدار در بین سایر ماهی‌ها بوده است. این تفاوت و عدم پایایی پاسخ‌های رفتاری می‌تواند به ژنتیک والدین، شرایط محیطی، بیماری‌ها و قدرت متفاوت سازگاری با محیط جدید آزمایشی مرتبط باشد (Spence *et al.*, 2006) که از نظر رفتارشناسی و تکامل دارای اهمیت می‌باشد.

به نظر می‌رسد پاسخ‌های رفتاری ماهی زبرا به دو پارامتر ذکرشده بیان‌کننده ویژگی‌های سندروم رفتاری در این‌گونه بوده است به‌طوری‌که شواهد موجود در این پژوهش به‌نوعی نشان می‌دهد ماهی‌هایی که زمان زیادی را صرف خوگیری در منطقه آغازین نمودند و رفتارهای شناگری طبیعی خود را نشان دادند هم‌چنین زمان زیادی نیز طول کشید تا خود را به منطقه تصمیم‌گیری برسانند. درحالی‌که آن دسته از ماهی‌های زبرا که در مدت کوتاهی در منطقه آغازین خوگیری آن‌ها انجام شد مدت‌زمان کمی هم طول کشید تا خود را به منطقه تصمیم‌گیری برسانند که این الگوهای مشاهده‌شده رفتاری می‌تواند به سندروم‌های رفتاری ماهی‌ها مرتبط و وابسته باشد (Conrad *et al.*, 2011; Sih *et al.*, 2004; Sih & Bell, 2008; Sih *et al.*,

(Sih & Del Giudice, 2012; Sih *et al.*, 2011; Sih *et al.*, 2012; Sih *et al.*, 2004). البته برای قطعی شدن وجود این ارتباط رفتاری بین مدت زمان خوگیری در منطقه آغازین و مدت زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری، انجام آزمایش‌های تکمیلی در این خصوص و همچنین بررسی‌های آماری تکمیلی جهت بررسی میزان همبستگی‌های بین دو متغیر رفتاری پیشنهاد می‌گردد.



نمودار ۱. مشاهدات رفتار شناگری ماهی زبرا در آکواریوم آزمایش مدل T-maze. (الف) مدت زمان (دقیقه) خوگیری ماهی زبرا در منطقه آغازین و (ب) مدت زمان (دقیقه) رسیدن ماهی زبرا به منطقه تصمیم‌گیری. (تعداد کل ماهی زبرا: ۱۶ قطعه).

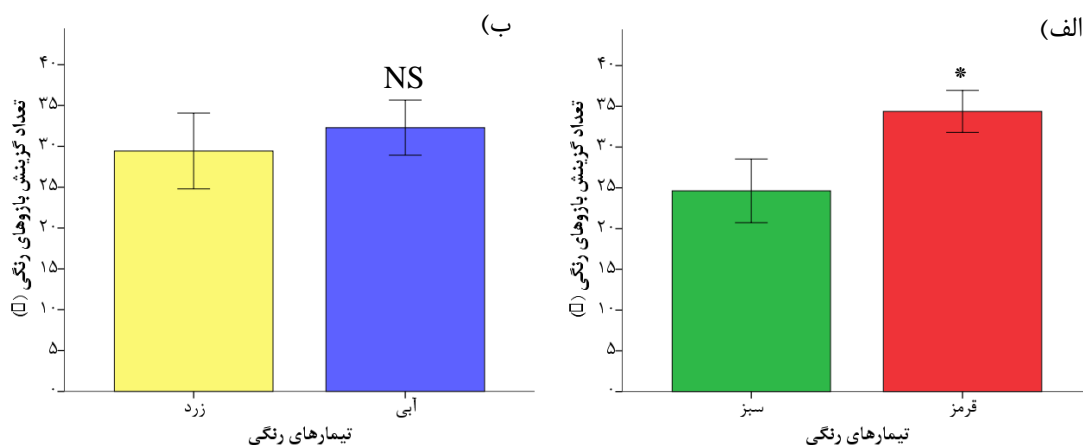
ترجیحات رنگی ماهی زبرا

تعداد دفعات گزینش رنگ‌ها توسط ماهی زبرا

آکواریوم مدل T-maze یک ابزار استاندارد و پذیرفته‌شده برای ارزیابی ترجیحات (Serra *et al.*, 1999)، یادگیری (Colwill *et al.*, 2005) و حافظه (Blaser *et al.*, 2010) و (Ninkovic & Bally-Cuif, 2006) در مدل‌های جانوری متداول می‌باشد که اخیراً برای استفاده گونه مدل ماهی زبرا نیز معتبر شناخته‌شده است (Colwill *et al.*, 2005). نتایج در بررسی پارامتر تعداد دفعات گزینش رنگ در تیمار بازوهای رنگی، ماهی زبرا رنگ قرمز را نسبت به رنگ سبز ترجیح داد ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

الف). مشاهدات این بخش از نتایج ما با پژوهش (Avdesh *et al.*, 2012) همخوانی دارد که نشان دادند ماهی زبرا در انتخاب ترکیبات رنگی متنوع‌تر، بیشترین میزان تعداد گزینش را به رنگ قرمز نشان داده است (Avdesh *et al.*, 2012). اما تعداد دفعات گزینش رنگ آبی - زرد تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$) اگرچه تعداد گزینش رنگ آبی بیشتر از زرد بود. (نمودار ۲ ب). جذابیت رنگ قرمز و تمایل ماهی زبرا به رنگ قرمز می‌تواند به دلیل بوم‌شناسی و خصوصیات زیستگاهی درزمینه ارتباط این رنگ با فعالیت‌های جفت‌یابی مرتبط با الگوهای رنگی قرمز و همچنین دلایل تغذیه‌ای باشد (Spence *et al.*, 2007). به طوری که جیره غذایی طبیعی ماهی زبرا از سخت‌پوستان ریزی می‌باشد که در ساختار بدنی‌شان رنگ‌دانه‌های متمایل به رنگ قرمز فراوان‌تر هستند (Spence & Smith, 2008). با توجه به نتایج ارزیابی ترجیحات رنگی پژوهش‌های قبلی می‌توان نتیجه گرفت که روش و ابزارهای بکار گرفته‌شده برای بررسی ترجیحات رنگی در این پژوهش در دامنه بینایی و قابل‌رؤیت توسط ماهی زبرا بوده است.

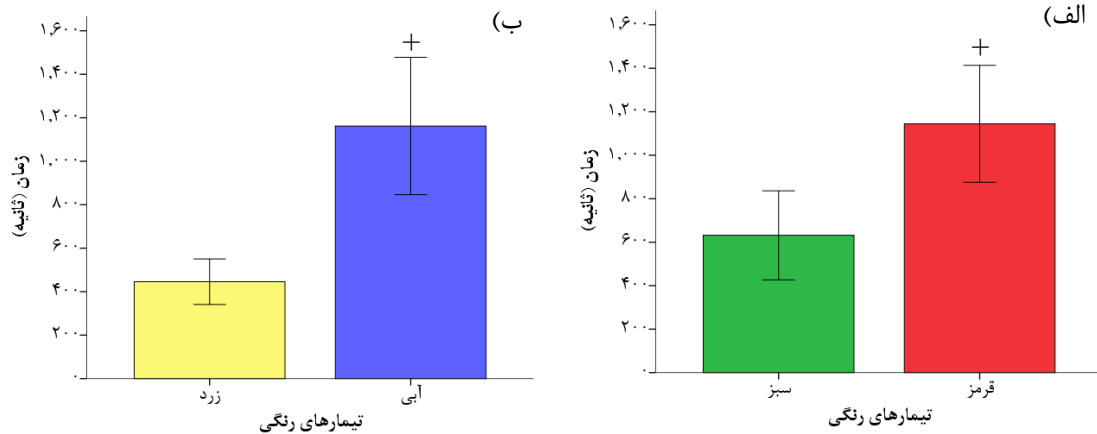
شاخص تعداد گزینش بازوهای رنگی در گروه رنگی قرمز- سبز بیشتر به سمت رنگ قرمز بوده و تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). در گروه رنگی زرد-آبی گرایش بیشتر به سمت رنگ آبی بوده است ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). همچنین شاخص مدت‌زمان ماندن تکرارها در بازوهای رنگی در گروه رنگی قرمز- سبز گرایش بیشتر به سمت رنگ قرمز بوده و تفاوت آن‌ها به سطح معنی‌داری نزدیک بوده است ($P = 0.06$). در گروه زرد-آبی گرایش بیشتر به سمت رنگ آبی بوده و تفاوت آن‌ها به سطح معنی‌داری نزدیک بوده است ($P = 0.09$).



نمودار ۲. تعداد دفعات گزینش رنگ گروه‌های تیماری الف) بازوهای رنگی (قرمز و سبز) و ب) (آبی و زرد) در ماهی

زبرا. تعداد ماهی در هر یک از گروه‌های رنگی ۸ قطعه بوده است (N:8). علامت * معنی‌داری آماری در سطح $P < 0.05$ و

NS عدم معنی‌داری آماری می‌باشد.



نمودار ۳. مدت زمان (ثانیه) سپری شده در گروه‌های تیماری الف) بازوهای رنگی (قرمز و سبز) و ب) (آبی و زرد) در ماهی زبرا. تعداد ماهی در هر یک از گروه‌های رنگی ۸ قطعه بوده است (N:8). علامت + به معنی میل به معنی‌داری (trend) می‌باشد $P < 0.1$ و $P > 0.05$.

جدول ۱: مقدار داده‌های اندازه‌گیری شده برای شاخص‌های رفتارشناسی (n=8) شامل مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین (دقیقه، ثانیه) و مدت‌زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری (دقیقه، ثانیه) و شاخص‌های ترجیحات رنگی (n=8) شامل تعداد دفعات گزینش بازوهای رنگی قرمز-سبز (ثانیه) و مدت‌زمان سپری شده در هر بازوی رنگی قرمز-سبز (ثانیه).

افراد	شاخص اول		شاخص دوم		شاخص سوم		شاخص چهارم	
	مدت زمان خوگیری	مدت زمان رسیدن به منطقه ی تصمیم‌گیری	قرمز	سبز	قرمز	سبز	قرمز	سبز
۱	۵': ۱۳"	۲': ۱۳"	۴۴	۱۹	۴۴	۱۹	۲۳۶"	۱۹۸۲"
۲	۰': ۳۶"	۰': ۲"	۴۰	۳۵	۴۰	۳۵	۱۰۰۲"	۱۱۲۴"
۳	۵': ۰۴"	۱': ۲۰"	۴۱	۴۶	۴۱	۴۶	۱۸۶۰"	۱۸۵۲"
۴	۲': ۵۰"	۱': ۴۳"	۳۵	۲۳	۳۵	۲۳	۴۰۹"	۷۵۳"
۵	۵': ۱۳"	۲': ۴۷"	۳۱	۲۳	۳۱	۲۳	۸۰۸"	۲۱۵۳"
۶	۳': ۰۰"	۰': ۵۶"	۲۶	۱۵	۲۶	۱۵	۲۷۳"	۴۹۳"
۷	۳': ۰۰"	۰': ۳۱"	۳۰	۲۴	۳۰	۲۴	۳۲۲"	۶۶۷"
۸	۴': ۱۸"	۱': ۲۷"	۱۶	۱۲	۱۶	۱۲	۱۳۹"	۱۳۲"

جدول ۲: مقدار داده‌های اندازه‌گیری شده برای شاخص‌های رفتارشناسی ($n=8$) شامل مدت‌زمان خوگیری در منطقه آغازین (دقیقه، ثانیه) و مدت‌زمان رسیدن به منطقه تصمیم‌گیری (دقیقه، ثانیه) و شاخص‌های ترجیحات رنگی ($n=8$) شامل تعداد دفعات گزینش بازوهای رنگی آبی-زرد (ثانیه) و مدت‌زمان سپری‌شده در هر بازوی رنگی آبی-زرد (ثانیه).

افراد	شاخص اول		شاخص دوم		شاخص سوم		شاخص چهارم	
	مدت زمان خوگیری	مدت زمان رسیدن به منطقه ی تصمیم گیری	آبی	زرد	آبی	زرد	آبی	زرد
۱	۵': ۴۳"	۱': ۵۹"	۴۴	۳۲	۷۵۸"	۸۷۳"		
۲	۸': ۰۰"	۰': ۲"	۱۹	۲۵	۱۳۴"	۱۵۹"		
۳	۲': ۳۰"	۳': ۱۳"	۴۳	۳۶	۲۶۶۱"	۲۶۸"		
۴	۱۷': ۰۰"	۵': ۰۰"	۲۸	۵۴	۱۰۰۴"	۸۲۲"		
۵	۳': ۰۵"	۳': ۵۹"	۴۰	۲۶	۶۱۹"	۳۱۹"		
۶	۳': ۳۵"	۰': ۴۴"	۳۱	۲۷	۵۸۳"	۵۹۹"		
۷	۵': ۰۰"	۲': ۴۸"	۲۱	۷	۲۳۷۳"	۷۶"		
۸	۵': ۲۲"	۱': ۵۹"	۳۲	۳۰	۱۱۶۱"	۴۴۵"		

(Park et al., 2016) هم در مطالعه خود بر ترجیحات رنگی ماهی زبرا در مراحل لاروی نتایجی مشابه با این پژوهش را گزارش نمودند. در نتایج آن‌ها نشان داده شده است که ترجیحات رنگی در بروز رفتارهای گله‌ای و تغذیه‌ای نقش بااهمیتی را ایفا می‌کند (Engeszer et al., 2004; Peichel, 2004). با توجه به اینکه ساختار بدن ماهی‌ها در گونه‌های مختلف و حتی جمعیت‌های متفاوت، الگوهای رنگی متنوعی دارد بنابراین ماهی‌ها می‌توانند بر اساس همین الگوهای رنگی گله‌های تولیدمثلی خود را شناسایی کنند (Peichel, 2004). همچنین مطالعات نشان داده است که دلیل تفاوت‌ها و تنوع در پاسخ‌های رفتاری گونه‌های جانوران می‌تواند وابسته به نژاد و به‌نوعی ویژگی‌ها و اختصاصات ژنتیکی نیز باشد (Avdesh et al., 2011).

مدت‌زمان سپری‌شده توسط ماهی زبرا در بازوهای رنگی

در خصوص مدت‌زمان سپری‌شده در بازوهای رنگی، نتایج این پژوهش نشان داد که ماهی زبرا مدت‌زمان بیشتری را در بازوی قرمز (تیمار بازوهای قرمز و سبز) سپری کرده است. اگرچه این بخش از ارجحیت‌های مشخص‌شده از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (شکل ۵) ولی با نتایج و مشاهدات (Avdesh et al., 2012 Roy et al., 2019) همخوانی دارد. (Peeters et al., 2016) همین‌طور نشان دادند که ماهی زبرا در مرحله لاروی رنگ قرمز را نسبت به رنگ سبز ترجیح می‌دهد. (Peeters et al., 2016) همچنین ماهی زبرا مدت‌زمان بیشتری را در بازوی آبی (تیمار بازوهای آبی و زرد) سپری کرده است که این بخش از نتایج با مشاهدات (de Abreu et al., 2010) همخوانی دارد. اگرچه این بخش از ارجحیت‌های مشخص‌شده از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (شکل ۵) (نشان‌دهنده تمایل آماری ماهی زبرا برای بالغ به انتخاب رنگ آبی نسبت به رنگ زرد می‌باشد ($P < 0.1$ و $P > 0.05$)) که البته با مشاهدات ترجیحات رنگ آبی در تیمار (آبی - زرد) در مرحله لاروی و بلوغ ماهی زبرا (Peeters et al., 2016) همخوانی دارد. ترجیح رنگ آبی در تیمار بازوهای رنگی آبی-زرد الزاماً فقط به دلیل ترجیح دادن ماهی زبرا به رنگ آبی ایجاد

نمی‌شود، بلکه می‌تواند به دلیل عدم تمایل یا پاسخ اضطراب برای حضور در منطقه رنگ زرد باشد (Peeters *et al.*, 2016). عوامل استرس و ترس می‌تواند بر قدرت تصمیم‌گیری و تشخیص ماهی‌ها تأثیرگذار باشد. برخی از محققین ترجیح به رنگ آبی در ماهی زبرا را ناشی از ویژگی‌ها و شرایط نگهداری این گونه می‌دانند به طوری که رنگ محل نگهداری ماهی می‌تواند یادآور شرایط امن و مطلوب گونه موردنظر باشد (Blaser & Peñalosa, 2011). de Abreu و همکاران (۲۰۲۰) بیان نمودند که نگهداری ماهی زبرا در آکواریوم‌های بارنگ زمینه آبی منجر به کاهش رفتارهای مرتبط با تشویش و اضطراب (Anxiety-like behaviour) شده و همچنین در این شرایط نگهداری سطوح هورمون کورتیزول کل بدن نیز کاهش پیدا کرد.

در مطالعه‌ای دیگر (Bault *et al.*, 2015) نشان دادند که جنس نر و ماده ماهی زبرا رنگ‌های با طول موج کوتاه‌تر (آبی) را ترجیح دادند که با نتایج این پژوهش متفاوت می‌باشد. Oliveira و همکاران (2015) بیان داشتند که ماهی زبرا به رنگ‌های آبی و سبز تمایل بیشتری دارد (Oliveira *et al.*, 2015) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد. (Risner *et al.*, 2006) همچنین نشان دادند که ماهی زبرا تمایل بیشتری به طیف‌های نوری با طول موج‌های کوتاه‌تر دارد. دلایل تفاوت مشاهدات و نتایج ترجیحات رنگی این پژوهش با مطالعات ذکر شده می‌تواند مربوط به تغییر موقعیت هر رنگ در بازوهای راست و چپ برای هر ماهی آزمون شده، تفاوت در ابعاد و تعداد بازوها، تفاوت‌های نژادی ماهی زبرا (تفاوت‌های ژنتیکی)، شرایط نگهداری متفاوت در مراکز تکثیر و پرورش ماهی، تغذیه از منابع غذایی متفاوت و عامل جنسیت باشد. همچنین بیان شده است که محتوا و ترکیبات معدنی آب نیز می‌تواند بر رفتار و فعالیت‌های یادگیری ماهی زبرا اثرگذار باشد (Pilehvar *et al.*, 2020).

این فرضیه وجود دارد که با توجه به اینکه ماهی زبرا همانند چندگونه دیگر از ماهیان آب شیرین دارای دید چهار رنگی (Tetrachromatic vision) با چهار نوع از سلول‌های مخروطی حساس به ماوراءبنفش، آبی-سبز، بنفش و زرد می‌باشند، دامنه پاسخ‌های طیفی آن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه تبعیض رنگ در طول موج‌های کوتاه باشد (Connaughton & Nelson, 2010; Risner *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 1993). همچنین نتایج بخش ترجیحات رنگی ماهی زبرا در این پژوهش با نتایج (Avdesh *et al.*, 2012) همخوانی داشت. ماهی زبرا جوان و بالغ، عمدتاً رنگ‌های زرد و سبز را کمتر ترجیح می‌دهند (Taylor *et al.*, 2013). پیشنهاد می‌گردد که خصوصیات طیفی رنگ‌های مورد استفاده در آزمون ترجیحات رنگی اندازه‌گیری شود تا دقیقاً در دامنه قابل مشاهده طیف نوری توسط ماهی زبرا (۷۵۰-۴۰۰ نانومتر) قرار داشته باشد. همچنین اثرات احتمالی سن نیز بر ترجیحات رنگی این گونه بررسی گردد. با توجه به نتایج مطالعات محققین قبلی در بررسی ارزیابی ارجحیت رنگی در ماهی زبرا تناقضاتی دیده می‌شود که قابل تأمل می‌باشد. برای ارزیابی ارجحیت رنگی و بررسی رفتارهای شناگری در این گونه نیاز به مراقبت و دقت در انتخاب ماهی‌های مورد آزمایش، یکسان‌سازی شرایط نگهداری ماهی‌ها قبل از آزمایش، گزارش نسبت‌های جنسی و برخی از ویژگی‌های زیستی شامل مرحله زندگی (لاروی، جوانی و بالغ) می‌باشد تا بتوان

پتانسیل اثرگذاری سایر عوامل که به‌عنوان عامل مخدوش‌کننده (confounding factor) شناخته می‌شوند تا حد امکان حذف و یا کمتر گردد (Siregar *et al.*, 2020).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پارامترهای رفتاری اندازه‌گیری شده نشان داد که ماهی زبرا توانایی خوگیری به محیط آکواریوم مدل T-maze را داشته و با ورود به منطقه تصمیم‌گیری ترجیحات رنگی خود را نشان داد. هم‌چنین در بخش دیگر نتایج این پژوهش نشان داد که ارزیابی ترجیحات رنگی ماهی زبرا با استفاده از این نوع مدل آکواریوم T-maze قابل‌اندازه‌گیری می‌باشد. البته پیشنهاد می‌گردد که برای درک بهتر پاسخ‌های رفتاری و ترجیحات رنگی ماهی، سنجش شدت و طول موج‌های ساطع‌شده از رنگ‌های مورد استفاده و تطابق آن با دامنه طول‌موج‌های قابل دریافت و دامنه بینایی ماهی زبرا اندازه‌گیری شود. مطالعات بیشتر رفتارشناسی نیاز می‌باشد تا در مرحله اول شواهد بیشتری از جزئیات سندروم‌های رفتاری گونه‌های ماهی‌ها مطالعه گردد و در مرحله بعدی در این زمینه بتوان به بررسی توانایی تصمیم‌گیری و حافظه در ماهی‌ها پرداخته و اهمیت و نقش رنگ‌ها در زیستگاه‌های طبیعی و آزمایشگاهی این گونه و هم‌چنین سایر گونه‌ها پی برده شود.

تشکر و قدردانی

احتراماً از ریاست محترم دانشکده منابع طبیعی، مدیر محترم گروه شیلات به جهت فراهم نمودن شرایط، صدور مجوزها و مقدمات اداری و جناب مهندس محمدی مسئول محترم آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، به جهت همکاری برای استفاده از امکانات آزمایشگاهی دانشکده نهایت قدردانی را داریم. هم‌چنین از جناب آقای دکتر ترکمن عضو محترم هیئت‌علمی گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان به‌واسطه مساعدت‌های ایشان در راهنمایی محاسبات آماری قدردانی می‌گردد. در پایان از داوران محترم که با پیشنهادها و ارائه نظرات علمی‌شان موجب افزایش کیفیت و ساختار این مقاله شدند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Avdesh, A., Chen, M., Martin-iverson, M. T., Verdile, G., Mondal, A., & Martins, R. N. (2010). Natural Colour Preference in the Zebrafish (*Danio rerio*). In *Proceedings of Measuring Behaviour* (Vol. 2010, pp. 155–157).
- Avdesh, A., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Chen, M., Askraha, S., Morgan, N., Martins, R. N. (2012). Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110704>

- Avdesh, A., Wong, P., Martins, R. N., & Martin-Iverson, M. T. (2011). Memory function in a mouse genetic model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 25(3), 433–444. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101944>
- Bault, Z. A., Peterson, S. M., & Freeman, J. L. (2015). Directional and color preference in adult zebrafish: Implications in behavioral and learning assays in neurotoxicology studies. *Journal of Applied Toxicology*, 35(12), 1502–1510. <https://doi.org/10.1002/jat.3169>
- Blackiston, D., Briscoe, A. D., & Weiss, M. R. (2011). Color vision and learning in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Nymphalidae). *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.048728>
- Blaser, R. E., Chadwick, L., & McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009>
- Blaser, R. E., & Peñalosa, Y. M. (2011). Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiology and Behavior*, 104(5), 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.07.029>
- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., & Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.03.001>
- Connaughton, V. P., & Nelson, R. (2010). Spectral responses in zebrafish horizontal cells include a tetraphasic response and a novel UV-dominated triphasic response. *Journal of Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1152/jn.00644.2009>
- Conrad, J. L., Weinersmith, K. L., Brodin, T., Saltz, J. B., & Sih, A. (2011). Behavioural syndromes in fishes: A review with implications for ecology and fisheries management. *Journal of Fish Biology*, 78(2), 395–435. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02874.x>
- De Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Genario, R., dos Santos, B. E., Marcon, L., Demin, K. A., & Kalueff, A. V. (2020). The impact of housing environment color on zebrafish anxiety-like behavioral and physiological (cortisol) responses. *General and Comparative Endocrinology*, 113499.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4, 21–40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Engeszer, Raymond E., Ryan, M. J., & Parichy, D. M. (2004). Learned social preference in zebrafish. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.042>
- Fleisch, V. C., & Neuhauss, S. C. F. (2006). Visual behaviour in zebrafish. *Zebrafish* 3 (2), 191–201.
- Gerlai, R. (2010). High-throughput behavioral screens: The first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules15042609>
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., ... Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123, 1–36.

- Haghani, S., Karia, M., Cheng, R. K., & Mathuru, A. S. (2019). An automated assay system to study novel tank induced anxiety. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 180.
- Hughes, R. N., & Blight, C. M. (2000). Two intertidal fish species use visual association learning to track the status of food patches in a radial maze. *Animal Behaviour*. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1351>
- Levine, J. S., & MacNichol, E. F. (1982). Color vision in fishes. *Scientific American*. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0282-140>
- Miletto Petrazzini, M. E., Agrillo, C., Piffer, L., Dadda, M., & Bisazza, A. (2012). Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.044>
- Montiglio, P. O., Garant, D., Thomas, D., & Réale, D. (2010). Individual variation in temporal activity patterns in open-field tests. *Animal Behaviour*. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.08.014>
- Ninkovic, J., & Bally-Cuif, L. (2006). The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.12.007>
- Oliveira, J., Silveira, M., Chacon, D., & Luchiani, A. (2015). The Zebrafish World of Colors and Shapes : Preference and Discrimination, *12*(2), 166–173. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1019>
- Park, J., Ryu, J., Choi, T., Bae, Y., Lee, S., & Kang, H. J. (2016). Innate Color Preference of Zebrafish and Its Use in Behavioral Analyses, *39*(10), 750–755.
- Parker, M. O., Gaviria, J., Haigh, A., Millington, M. E., Brown, V. J., Combe, F. J., & Brennan, C. H. (2012). Discrimination reversal and attentional sets in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.035>
- Peeters, B. W. M. M., Moeskops, M., & Veenliet, A. R. J. (2016). Color Preference in *Danio rerio*: Effects of Age and Anxiolytic Treatments. *Zebrafish*, *13*(4), 330–334. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1150>
- Peichel, C. L. (2004). Social behavior: How do fish find their shoal mate? *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.037>
- Pilehvar, A., Town, R. M., & Blust, R. (2020). The effect of copper on behaviour, memory, and associative learning ability of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 188, 109900.
- Risner, M. L., Lemerise, E., Vukmanic, E. V., & Moore, A. (2006). Behavioral spectral sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*). *Vision Research*. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2005.12.014>
- Robinson, J., Schmitt, E. A., Hárosi, F. I., Reece, R. J., & Dowling, J. E. (1993). Zebrafish ultraviolet visual pigment: Absorption spectrum, sequence, and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6009>
- Roy, T., Suriyampola, P. S., Flores, J., López, M., Hickey, C., Bhat, A., & Martins, E. P. (2019). Color preferences affect learning in zebrafish, *Danio rerio*. *Scientific reports*, 9.

- Serra, E. L., Medalha, C. C., & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999001200016>
- Shafiei Sabet, S., Neo, Y. Y., & Slabbekoorn, H. (2015). The effect of temporal variation in sound exposure on swimming and foraging behaviour of captive zebrafish. *Animal Behaviour*, 107, 49-60.
- Shafiei Sabet, S., Wesdorp, K., Campbell, J., Snelderwaard, P., & Slabbekoorn, H. (2016). Behavioural responses to sound exposure in captivity by two fish species with different hearing ability. *Animal Behaviour*, 116, 1-11.
- Sih, A., Bell, A., & Johnson, J. C. (2004). Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(7), 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.04.009>
- Sih, A., & Bell, A. M. (2008). Insight for behavioral ecology from behavioral syndromes. *Advances in the Study of Behavior*, 38(08), 227-281. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)00005-3).Insights
- Sih, A., Bell, A. M., Johnson, J. C., & Ziemba, R. E. (2004). Behavioral syndromes: An integrative overview. *Quarterly Review of Biology*, 79(3), 241-277. <https://doi.org/10.1086/422893>
- Sih, A., Cote, J., Evans, M., Fogarty, S., & Pruitt, J. (2012). Ecological implications of behavioural syndromes. *Ecology Letters*, 15(3), 278-289. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01731.x>
- Sih, A., & Del Giudice, M. (2012). Linking behavioural syndromes and cognition: A behavioural ecology perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1603), 2762-2772. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0216>
- Sih, A., Ferrari, M. C. O., & Harris, D. J. (2011). Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change. *Evolutionary Applications*, 4(FEBRUARY 2011), 367-387. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00166.x>
- Siregar, P., Juniardi, S., Audira, G., Lai, Y. H., Huang, J. C., Chen, K. H. C., Chen, J.R. & Hsiao, C. D. (2020). Method Standardization for Conducting Innate Color Preference Studies in Different Zebrafish Strains. *Biomedicines*, 8(8), 271.
- Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x>
- Spence, Rowena, Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2006). The behaviour and ecology of the zebrafish , *Danio rerio*.
- Spence, Rowena, Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(1), 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Spence, Rowena, & Smith, C. (2008). Innate and learned colour preference in the zebrafish, *Danio rerio*. *Ethology*,

114, 582-588. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2008.01515.x>

Suriyampola, P. S., Shelton, D. S., Shukla, R., Roy, T., Bhat, A., & Martins, E. P. (2016). Zebrafish Social Behavior in the Wild. *Zebrafish*. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1159>

Taylor, C., Schloss, K., Palmer, S. E., & Franklin, A. (2013). Color preferences in infants and adults are different. *Psychonomic Bulletin and Review*. <https://doi.org/10.3758/s13423-013-0411-6>

Tran, S., & Gerlai, R. (2013). Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.040>

Assessment of swimming behaviour and colour preferences in adult zebrafish (*Danio rerio*) using the T-maze model

S. Shafiei Sabet^{1*}, Sh. Jami², F. Alizadeh Ladehmakhi²

Received:2020.3.5
Accepted:2020.10.27

Abstract

In order to assess zebrafish swimming behaviour and colour preferences, 16 adult zebrafish were used individually using a T-maze model. Behavioural indices such as habituation time in the start box, approaching time to the decision area, the number of crossings and the time spent in each combination of coloured arms (green-red and blue-yellow) were calculated. Habituation time in the start box and approaching time to the decision area were 300 and 120 s, respectively. The results indicated that zebrafish have more crossings to the red arm and preferred red colour rather than green colour. ($P < 0.05$). But, there was no significant difference for the number of crossings in the blue- yellow combination ($P > 0.05$). Also, the time spent in each combination of coloured arms was not significant ($P > 0.05$). Based on the current results, zebrafish have the ability to discriminate between colours and the T-maze is a valid tool for assessing colour preferences in zebrafish.

Keywords: Behaviour, Biology, Habituation, Swimming activity, Vision

1- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara
*(Corresponding author: s.shafiei.sabet@guilan.ac.ir)

2- Bachelor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara

جداسازی مخمر با ویژگی‌های پروبیوتیکی از پوست انسان

محدثه غفاری^۱، فرشاد درویشی^۲، سنبل ناظری^{۴*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در پیشگیری و درمان از بیماری‌ها نقش مهمی دارند. با توجه به اهمیت مخمرهای پروبیوتیک، هدف این تحقیق جداسازی مخمر با ویژگی‌های پروبیوتیکی است. نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف پوست انسان انجام شد. توانایی رشد مخمر جدا شده در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۵ و ۱ درصد اکسگال، غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد NaCl pH های ۲، ۴، ۵/۸، ۹ و ۱۱ و دمای ۳۷، ۴۰ و ۴۲ درجه سلسیوس بررسی شدند. فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، پروتاز، پکتیناز، سلولاز، لیپاز، اوره‌آز، کاتالاز، سیتراز و همولیزین نمونه جدا شده بررسی شد. این مخمر توانایی رشد در ۰/۳ درصد اکسگال، غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد NaCl pH های ۲، ۴، ۵/۸، ۹ و ۱۱ و همچنین دمای ۳۷ درجه سلسیوس را داشت. مخمر جدا شده ویژگی اولیه پروبیوتیک را دارد و می‌تواند در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، مخمر، اکسگال، تحمل نمکی، فعالیت آنزیمی

۱- کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، آذربایجان شرقی، ایران

۲- استاد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۳- استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، آذربایجان شرقی، ایران

۴- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

* (نویسنده مسئول: snazeri@basu.ac.ir)

مقدمه

استفاده اکوسیستم پوست به دلیل ساختار فیزیکی و در معرض عوامل محیطی قرار گرفتن، محیطی پیچیده محسوب می‌شود (Bojar & Holland., 2002). به همین دلیل جمعیت میکروبی متنوع و فراوانی روی پوست انسان ساکن است. پوست مواد مغذی به شکل لیپید و پروتئین را در اختیار میکروب‌ها قرار می‌دهد (Fredricks, 2001) و به روش‌های مختلف در بهینه سازی، حفظ و ترمیم میکروبیوتای پوست نقش دارد (Tester & Al-Ghazzewi., 2012). اولین مطالعات بالینی روی پروبیوتیک‌ها در دهه ۱۹۳۰ در مورد اثر بخشی بر یبوست انجام شد. بعد از آن تعداد این مطالعات روز به روز افزایش یافت و بسیاری از این مطالعات در اروپا و آسیا انجام گرفت. تعریف دقیق واژه پروبیوتیک به معنای "برای زندگی" از یک واژه یونانی مشتق شده است و برای اولین بار توسط Lilly و Stillwell در سال ۱۹۶۵ به منظور توضیح مواد ترش‌چی بوسیله یک میکروارگانیسم که رشد میکروارگانیسم دیگر را تحریک می‌کند بکار برده شد (Lilly & Stillwell., 1965). طبق تعریف سازمان غذا و کشاورزی و بهداشت جهانی (FAO/WHO) در سال ۲۰۰۲ پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی مصرف شوند سلامتی را به میزبان اعطا می‌کنند. این سازمان دستورالعمل‌های ارزیابی پروبیوتیک‌ها را منتشر کرد. این دستورالعمل‌ها مقاومت در برابر شرایط نامطلوب بدن انسان، توانایی اتصال به بافت اپی تلیال، فعالیت ضد میکروبی و ایمن بودن برای استفاده را شامل می‌شود (de Melo Pereira *et al.*, 2018). در این رابطه مقاومت به اسید کلریدریک، ترکیبات صفراوی و آنزیم‌های گوارشی مهم‌ترین ویژگی پروبیوتیک‌ها هستند (Stadler *et al.*, 2003). استفاده مدام و طولانی مدت داروهای ضد میکروبی به تدریج باعث ایجاد سویه‌های مقاوم عوامل بیماری‌زا نسبت به آنتی بیوتیک‌ها شده است. در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین روش‌های درمان آنتی بیوتیکی مطرح گردیده و به نظر می‌رسد استفاده از آن می‌تواند بسیاری از مشکلات ناشی از درمان و یا کنترل بیماری را مرتفع سازد (Talebi *et al.*, 2016). مطالعات مختلف نشان داده است که استفاده از پروبیوتیک‌ها از جمله مخمرها، می‌تواند در درمان بیماری‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها موثر واقع گردد. در مطالعات مختلف، اثر درمانی مخمرهای پروبیوتیک در التهاب و عفونت‌های دستگاه گوارش نشان داده شده است، از انواع این مخمرها می‌توان به *Saccharomyces cerevisiae*، *Saccharomyces boulardii*، *Debaryomyces hansenii*، *Yarrowia lipolytica*، *Kluyveromyces marxianus*، *Kluyveromyces lactis*، *Torulaspora delbrueckii* اشاره کرد (Chen *et al.*; Kurugol & Koturoglu., 2005; Psani & Kotzekidou., 2006). مکانیسم اثر درمانی مخمرهای پروبیوتیک رقابت برای مواد غذایی، تغییرات pH در محیط با تولید اسید آلی، تولید غلظت بالای اتانول، ترشح ترکیبات ضدباکتریایی، آزادسازی ترکیبات ضد میکروبی مانند مایکوسین‌ها و تقویت سیستم ایمنی را شامل می‌شود (Golubev, 2006). همچنین استفاده از مخمرهای پروبیوتیک به عنوان عوامل ضد قارچ

برای درمان عفونت قارچی انسان و حیوان بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Schmitt & Breinig, 2002). مطالعات نشان داده‌اند که مخمرهای پروبیوتیک توانایی از بین بردن یا دفع میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای از جمله مخمرهایی مانند *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* را دارند (Lew & Liong, 2013). بررسی‌های دیگر نشان داده است که استفاده از مخمرها می‌تواند در درمان یا توقف رشد سرطان‌هایی مانند سرطان سینه موثر باشد. در چند مطالعه مختلف نشان داده شد که استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، بصورت زنده و یا کشته شده توسط حرارت، در القا مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی و کاهش حجم تومور موثر بود (Ghoneum et al., 2008). برخی بررسی‌های انجام گرفته نشان می‌دهد که ترکیبات استخراج شده از دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* می‌توانند پاسخ‌های ایمنی را در شرایط *in vivo* و *in vitro* تنظیم کنند (Estrada et al., 1997). مطالعات اخیر نشان داده است که سوبه‌های پروبیوتیکی خوراکی می‌توانند میزان بروز و شدت عفونت‌های ویروسی دستگاه تنفسی ناشی از COVID-19 را نیز کاهش دهند (Baud et al., 2020). علاوه بر کاربردهای بالینی، مخمرهای پروبیوتیکی در زمینه دامپروری و دامپزشکی سابقه‌ای طولانی دارد. مزیت استفاده از مخمرهای پروبیوتیکی به عنوان مکمل برای خوراک حیوانات مانند ماکیان، گوسفندان، نشخوارکنندگان و ماهی‌ها به اثبات رسیده است، از جمله حضور مخمرها در جیره غذایی باعث افزایش وزن و کیفیت بهتر گوشت می‌شود (Sauerwein et al., 2007). *Saccharomyces cerevisiae* در بسیاری از داروهای پروبیوتیکی استفاده می‌شود (Edens, 2003).

هرچند مطالعه روی پروبیوتیک‌ها قدمت طولانی دارد، اما پروبیوتیک‌های یوکاریوتی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این در حالی است که توانایی آنها به عنوان یوکاریوت به ویژه در تغییرات پس از ترجمه که قادر به بیان انواع مختلف پروتئین‌های درمانی در ترکیبات سازگار با میزبان هستند، یکی از مزیت‌های عمده در استفاده از مخمرهای پروبیوتیک است (Ragavan & Das, 2017). ویژگی مخمرها در سلامت و محافظت از پوست نیز به اثبات رسیده است (Kunyeit et al., 2019). با توجه به موارد ذکر گردیده، هدف این پژوهش بررسی حضور مخمر با ویژگی پروبیوتیک پروبیوتیکی از پوست انسان بود. تاکنون آزمایشات متعددی از جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از پوست و جداسازی مخمر با ویژگی پروبیوتیکی از منابع مختلف انجام شده است، تا زمان انجام این پژوهش مطالعه‌ای از جداسازی مخمر با ویژگی‌های پروبیوتیکی از پوست انسان مشاهده نگردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری بطور تصادفی از پنج ناحیه از قسمت‌های مختلف پوست بدن انسان توسط سواب‌های استریل، سه بار، انجام شد. نمونه‌ها بر روی محیط کشت YGC (Yeast Glucose chloramphenicol) کشت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انکوبه شدند. از محیط کشت MRS، برای جداسازی مخمر پروبیوتیک و نیز جهت خالص سازی استفاده شد. از محیط YPD مورب همراه با گلیسرول استریل ۵۰ درصد در دمای چهار درجه سلسیوس برای نگهداری طولانی مدت استفاده شد (Qvirist *et al.*, 2016).

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه‌ها

رشد نمونه‌های کشت داده شده بصورت روزانه بررسی شدند. کلنی‌های ظاهرشده روی پلیت‌ها از نظر مورفولوژی، شکل، رنگ و قوام بررسی شدند. کلنی‌های با ویژگی مخمر، عموماً سفید، کرم رنگ، حالت خامه‌ای بوده و یا سطحی صاف دارند (Kurtzma & Fell, 2011). به منظور بررسی اشکال میکروسکوپی مخمر توسط متیلن بلو رنگ آمیزی شد و توسط میکروسکوپ نوری (عدسی ۴۰× و ۱۰۰×) مشاهده شد (Vakhlu, 2006).

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی

در اولین مرحله ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی، توانایی رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط اسیدی و قلیایی بررسی شد. توانایی رشد مخمر در محیط YPD مایع با pH ۲، ۴، ۵/۸، ۹ و ۱۱ مورد آزمایش قرار گرفت. pH معده بعد از صرف غذا به سه تا شش می‌رسد، و رشد مخمر در شرایط اسیدی و قلیایی به عنوان معیاری برای غلبه بر شرایط استرسی استفاده می‌شود (Perricone *et al.*, 2014). برای انجام این آزمایش، ابتدا از جدایه در محیط YPD مایع در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت فعال تهیه شد و به نسبت یک درصد از این محیط به محیط‌های کشت مایع با pH های ذکر شده اضافه شد. لوله‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. در ابتدا، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح، رشد میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام گردید و از محیط فاقد مخمر به عنوان شاهد استفاده شد (Ragavan & Das, 2017). برای ارزیابی توانایی رشد مخمر در محیط حاوی صفرا، از محیط MRS جامد حاوی ۰/۳، ۰/۵ یا ۱ درصد اکسگال استفاده شد. بعد از کشت مخمر در محیط، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند (Kumura *et al.*, 2004). برای ارزیابی توانایی رشد مخمر در محیط نمکی، از محیط YPD آگار حاوی غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد نمک NaCl براساس مطالعه Zeng و همکاران

استفاده شد. مخمر پس از کشت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری و سپس هر روز پلیت‌ها بررسی شدند (Zeng et al., 2019).

یکی از ویژگی‌های میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک توانایی رشد آنها در دمای فیزیولوژی بدن (۳۷ درجه سلسیوس) است و دمای ۴۲ درجه سلسیوس دمای محدودکننده برای مخمرها می‌باشد (Hu et al., 2019). پس از کشت مخمر بر روی محیط YPD آگار، در دمای ۳۷، ۴۰ و ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (Fernandes et al., 2019).

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی

آنزیم آمیلاز: برای بررسی کیفی فعالیت آنزیم آمیلاز از محیط‌های نشاسته آگار حاوی یک درصد نشاسته و محیط YPD آگار حاوی یک درصد نشاسته با pH هفت استفاده شد. از سوبستراهای مختلفی مانند نشاسته ذرت، نشاسته گندم، آرد برنج، سیبوس گندم استفاده شد. پس از کشت، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. از معرف لوگول (۱/۰ درصد ید و ۰/۲ درصد پتاسیم یدید) استفاده شد. ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی‌ها نشان دهنده فعالیت آنزیم آمیلاز و هاله بنفش اطراف آنها عدم فعالیت آنزیم آمیلاز است (Sathish et al., 2012).

آنزیم پروتئاز: برای بررسی کیفی فعالیت آنزیم پروتئاز از محیط‌های ژلاتین آگار (۱ درصد ژلاتین)، کازئین آگار (۱ درصد کازئین)، YPD آگار (۱ درصد ژلاتین) و YPD آگار (۱ درصد کازئین) استفاده شد. این آزمایش در pH های ۵/۸، ۷، ۹ و ۱۱ (برای بررسی پروتئازهای قلیایی) انجام شد. پس از کشت، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. از معرف کلرید جیوه (۱۵ گرم کلرید جیوه در ۲۰ میلی لیتر HCl حل شده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ رسید) استفاده شد. در صورت فعالیت پروتئازی مخمر، اطراف آنها هاله شفاف و در صورت حضور پروتئین رسوب سفید رنگ دیده می‌شود (Hasan et al., 2013).

آنزیم سلولاز: فعالیت آنزیم سلولاز، در محیط حاوی ۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد پیتون، ۱ درصد کربوکسی متیل سلولز و ۱/۵ درصد آگار بررسی شد. پس از کشت لکه‌ای، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه روز گرماگذاری شدند. برای بررسی فعالیت آنزیم سلولاز از معرف ۰/۵ درصد کنگو رد استفاده گردید، بدین ترتیب که ابتدا کنگو رد به پلیت‌ها اضافه و پس از ۱۵ دقیقه با محلول NaCl یک مولار شسته شد. وجود هاله زرد رنگ اطراف کلنی‌ها نشان دهنده فعالیت آنزیم سلولاز و عدم تغییر رنگ به عنوان عدم فعالیت آنزیم سلولاز است (Kaur et al., 2011).

آنزیم پکتیناز: برای بررسی کیفی فعالیت آنزیم پکتیناز، از محیط YPD آگار حاوی یک درصد پکتین استفاده شد. پس از کشت، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه روز گرماگذاری شدند. برای بررسی فعالیت آنزیم پکتیناز همانطور که برای فعالیت سلولاز شرح داده شد، از معرف کنگو رد ۰/۵ درصد و محلول یک مولار NaCl استفاده شد (Yadav *et al.*, 2015).

آنزیم لیپاز: برای بررسی کیفی فعالیت آنزیم لیپاز، از محیط YPD آگار حاوی یک درصد سوسترای آنزیم لیپاز استفاده شد. سوسترهای مورد استفاده در این آزمایش شامل روغن زیتون، توئین ۲۰، روغن آفتابگردان و همچنین نفت خام بودند. بعد از کشت، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت دو روز گرماگذاری شدند. از معرف فنل رد ۰/۰۱ درصد استفاده شد که در صورت فعالیت آنزیم لیپاز، معرف فنل رد از رنگ قرمز به رنگ زرد تبدیل می‌شود. (Amara *et al.*, 2009).

آنزیم کاتالاز: برخی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند با تولید آنزیم کاتالاز خود را در برابر هیدروژن پراکسید محافظت نموده و آن را به آب و O₂ تبدیل کنند. به همین علت تشکیل حباب گاز O₂ نشان دهنده عمل کاتالاز است (Dye, 1986). برای بررسی کیفی فعالیت آنزیم کاتالاز از آب اکسیژنه (سه درصد حجمی) استفاده شد. تشکیل یا عدم تشکیل حباب در مدت دو دقیقه مورد بررسی قرار گرفت (Al-Kobaisi, 2007).

آنزیم اوره‌آز: برای بررسی کیفی فعالیت آنزیم اوره‌آز از محیط اوره کریستنسن آگار با معرف فنل رد استفاده شد. بعد از کشت، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت دو الی هفت روز گرماگذاری شد. زمانی که اوره هیدرولیز می‌شود، CO₂ و آمونیاک تولید می‌کند. تولید آمونیاک باعث قلیایی شدن محیط و تغییر رنگ فنل رد می‌شود. ایجاد رنگ قرمز در محیط کشت، نشان دهنده واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره است (Cappucino *et al.*, 1996).

آنزیم سیتراتاز: برای این آزمون از محیط سیمون سیترات آگار استفاده شد که تنها منبع کربن، سیترات و تنها منبع نیتروژن، نمک‌های آمونیوم می‌باشد. پس از کشت مخمر روی سطح شیدار، لوله کشت به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. رنگ آبی نشان دهنده وجود آنزیم سیتراتاز در نظر گرفته شد (Schaad *et al.*, 2001).

تست همولیز: عدم فعالیت همولیتیک از جمله معیارهای *in vitro* میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک است که توسط (FAO/WHO, 2000) برای ارزیابی پروبیوتیک پیشنهاد شده است. برای انجام این آزمایش از محیط بلاگ آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند استفاده شد. نمونه مخمر بر روی محیط به صورت خطی در مرکز محیط، کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد (Manns *et al.*, 1994).

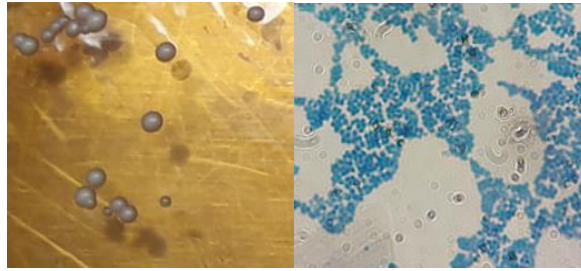
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های رشد مخمر با استفاده از نرم افزار SPSS 16.1 در pH های مختلف ۲، ۴، ۵/۸، ۹ و ۱۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها حداقل با دو تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

جداسازی مخمر

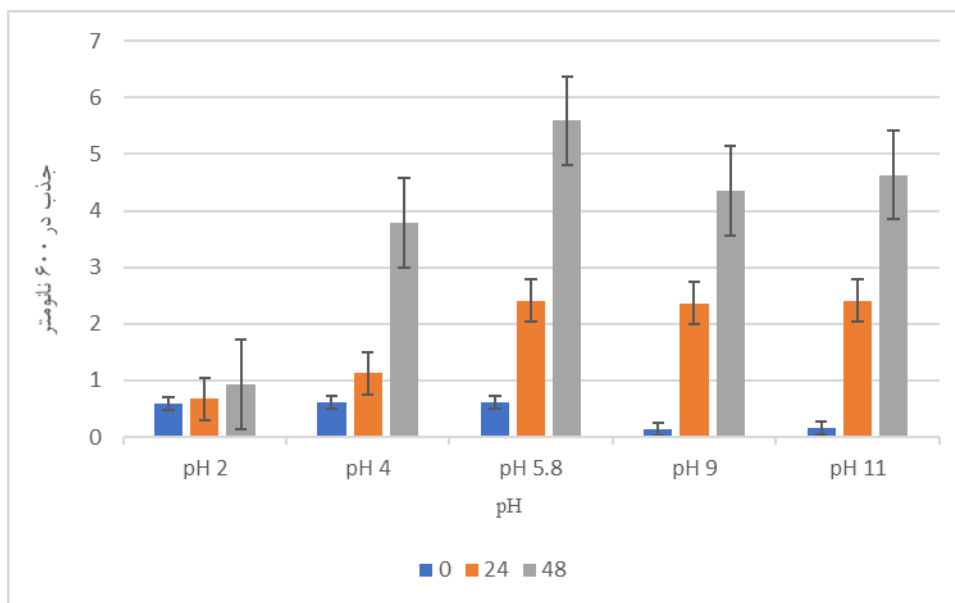
پوست انسان بدلیل شرایط فیزیکی و در معرض عوامل محیطی قرار گرفتن، دارای جمعیت میکروبی متنوع و فراوانی است، که ویژگی های منحصر به فردی، از جمله غیر بیماری‌زایی و مفید بودن برای میزبان را، دارا هستند. در این میان، مخمرها به دلیل عدم حساسیت به ترکیبات ضد باکتریایی و ویژگی‌های بیوشیمیایی خود می‌توانند جمعیت میکروبی پوست را کنترل کنند (Fredricks, 2001; Bojar & Holland., 2002; Grice & Segre, 2011). از طرف دیگر مخمرهای به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله، اندازه بزرگتر از باکتری ها و نیز بویژه توانایی آنها در تغییرات پس از ترجمه مناسب برای بیان انواع مختلف پروتئین‌های درمانی، ابزارهایی مناسب برای مطالعه هستند (Agarbati et al., 2020; Moslehijenabian et al., 2010; Ragavan & Das, 2017). در این مطالعه پس از نمونه‌برداری از پوست، پلیت‌های کشت داده شده برای تشکیل کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموعه میکروارگانیسم‌های رشد یافته، تنها یک کلنی که از نظر مورفولوژی با ویژگی مخمر شباهت داشت، جداسازی شد. کلنی جدا شده از پوست انسان، سفید رنگ، کوچک و صاف بودند. در مشاهدات میکروسکوپی جدایه به شکل کروی بود (شکل-۱). گزارشی از جداسازی مخمرها از بدن انسان وجود دارد، ولی در تعداد کمی از آنها، به جداسازی مخمر پروبیوتیک اشاره کرده‌اند. طی مطالعه‌ای روی میکروارگانیسم‌های مدفوع نوزاد انسان، به حضور مخمرهای پروبیوتیک اشاره کردند (Psomas et al., 2001). در تحقیق Boix-Amoros و همکاران، مخمرهای *Saccharomyces* و *Candida* و *Malassezia* از شیر انسان جداسازی شدند (Boix-Amoros et al., 2017). جداسازی این مخمرها از حیوانات یا محصولات آنها در چند تحقیق اشاره شده است، از جمله در دستگاه گوارش اردک، ماهی، محتویات روده بز، شکمبه گاو و شیر بز، حضور مخمرهای پروبیوتیک نیز گزارش شده است (Ragavan & Das, 2017; Hu et al., 2018; Fernandes et al., 2019). در تحقیق Saber و همکاران مخمرهای پروبیوتیک از ماست و پنیر محلی جداسازی شدند (Saber et al., 2019). این اولین گزارش از جداسازی مخمر با ویژگی پروبیوتیکی از پوست انسان است.



شکل ۱: کلنی‌ها و شکل میکروسکوپی مخمر جدا شده از پوست انسان در محیط MRS

ویژگی پروبیوتیکی

انتخاب مخمرهای پروبیوتیک معمولاً با انجام آزمایش‌های مبتنی بر رشد در محیط‌های اسیدی، قلیایی و حاوی صفراوی صورت می‌گیرد (Zeng *et al.*, 2019). در اولین مرحله از ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی، مخمرها از نظر توانایی رشد و مقاومت به اسید در محیط YPD مایع، در pH اسیدی ۲، ۴، ۵/۸ و محیط قلیایی با pH ۹ و ۱۱ سنجیده شدند. جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری در زمان تلقیح و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح اندازه‌گیری شدند (شکل-۲).



شکل ۲: رشد مخمر جدا شده از پوست انسان در pH های مختلف در زمان صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت (ERROR BAR انحراف

استاندارد را نشان می‌دهد).

با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول-۱)، اختلاف معنی داری بین رشد مخمر در pH های مختلف وجود دارد زیرا

مقدار $P < 0.05$ است. اثر زمان، اثر pH و اثر متقابل آنها در سطح ۹۹ درصد معنی دار است. می‌توان نتیجه گرفت زمان و pH

بر رشد مخمر تاثیر دارد.

جدول ۱: تغییرات واریانس رشد مخمر در pH های مختلف

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
زمان	۲۹/۱۵	۲	۱۴/۵۷	۳۷۲/۷۶**
pH	۲۲/۱۶	۴	۵/۵۴	۱۴۱/۶۸**
pH*زمان	۱۴/۴۴	۸	۱/۸۰	۴۶/۱۵**
خطا	۰/۵۸	۱۵	۰/۰۳۹	
کل	۱۲۳/۶۲	۳۰		

رشد جدایه مخمر، ۴۸ ساعت بعد از تلقیح در pH های اسیدی و قلیایی افزایش داشت. مخمر در محیط های قلیایی ۹ و ۱۱ از رشد بهتری برخوردار بود. طی مطالعه انجام شده مخمرها در برابر تغییرات pH قلیایی روده مقاوم هستند (Psomas et al., 2001). در محیط‌های اسیدی در pH ۵/۸ و ۴ نسبت به pH ۲ رشد و بقا بهتری داشت. مطالعات صورت گرفته بر مخمرها، نتایج متفاوت از توانایی رشد و زنده مانی را در pH های مختلف ذکر کرده اند. Hu و همکاران درصد زنده ماندن جدایه‌های مخمر را در pH های ۲، ۳، ۴ و ۵/۵ بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سنجیدند و گزارش کردند که هفت مخمر پروبیوتیک جدا شده توانایی رشد در pH ۳، ۴، ۵/۵ را داشتند ولی فقط دو مخمر توانستند در pH ۲ زنده بمانند (Hu et al., 2018). Pennacchia و همکاران از ۲۲ مخمر جدا شده از مواد غذایی، ۱۹ جدایه در pH ۲/۵ بعد از ۲/۵ ساعت بیش از ۹۰ درصد زنده ماندند (Pennacchia et al., 2007). Zeng و همکاران توانایی زنده ماندن مخمرهای جدا شده از ماهی تخمیرشده در نمک را در pH ۲/۵، ۳، ۴، ۵/۹ بررسی کردند که نه جدایه بیش از ۹۵ درصد در pH ۹ و ۱۸ سویه بیش از ۷۵ درصد در pH ۲/۵ زنده ماندند (Zeng et al., 2018). Das و Ragavan. (Zeng et al., 2018). کارخانه‌ها را در pH های ۱ تا ۱۲ بررسی کردند (Ragavan & Das, 2017). اولین سدی که میکروارگانیسم‌ها پس از مصرف با آن روبرو می‌شوند، شیره معده است که اثر بازدارندگی آن با pH و غلظت اسیدکلریدریک مرتبط است. pH اسید معده ۰/۹ است که با حضور غذا به ۳ می‌رسد. میکروارگانیسم‌ها باید بتوانند از شرایط اسیدی معده عبور کنند. برای غربالگری پروبیوتیک‌ها بقای آنها در pH ۲/۵ - ۳/۵ مورد بررسی قرار می‌گیرد (Erkkila & Petaja, 2000).

مخمر جدا شده توانایی رشد در غلظت ۰/۳ درصد اکسگال را داشت، ولی در غلظت های بالاتر ۰/۵ و یک درصد اکسگال رشد ضعیفی داشت. براساس روش Gilliland و Walker رشد در محیط MRS حاوی ۰/۳ درصد اکسگال در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می‌تواند به عنوان شاخص پروبیوتیکی باشد (Gilliland & Walker, 1990). Van der Aa Kuhle و همکاران گزارش کردند بقای مخمر در ۰/۳ درصد نمک صفر، یک مرحله مهم برای غربالگری مخمرهای پروبیوتیک می‌باشد و مخمر جدا شده آنها از خمیرترش توانایی رشد در ۰/۳ درصد اکسگال را داشت و در نهایت به عنوان یک پروبیوتیک شناخته شد (Van

Kumura (der Aa Kuhle *et al.*, 2005) و همکاران مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از لبنیات را در ۰/۳ و ۰/۵ درصد صفرا مورد آزمایش قرار دادند، که همگی توانایی رشد در ۰/۳ درصد صفرا را داشتند و دارای خاصیت پروبیوتیکی می‌باشند (Kumura *et al.*, 2004) و همکاران مخمرهای جدا شده از دستگاه گوارش اردک را در ۰/۳ و ۰/۶ درصد نمک صفرا بررسی کردند و گزارش کردند، بیشتر مخمرها در غلظت ۰/۳ درصد اکسگال قادر به رشد بودند و فقط چهار مخمر در ۰/۶ درصد قادر به زندگی بودند (Hu *et al.*, 2019). صفرا موثرترین ترکیب بازدارنده رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها و عامل کنترل فلور میکروبی موجود در روده است زیرا صفرا از طریق بهم ریختن ساختمان دیواره سلولی باعث مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌گردد، بنابراین مقاومت به صفرا و رشد در روده یکی از ضروری‌ترین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها می‌باشد (Pennacchia *et al.*, 2008).

به منظور بررسی توانایی مخمرها برای تحمل فشارهای اسمزی متفاوت، از محیط حاوی درصدهای ۲، ۴ و ۶ درصد NaCl استفاده شد. این مخمر رشد بسیار خوبی در هر سه غلظت NaCl داشت. Zeng و همکاران سویه‌های مخمر جدا شده از ماهی تخمیر شده در نمک را در غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد NaCl بررسی کردند، در تحقیق آنها مخمرها قادر بودند رشد ۶۷ درصدی در محیط ۶ درصد نمک از خود نشان دهند و همچنین مخمرها در غلظت‌های نمکی بالا مقاومت بالاتری نسبت به باکتری‌ها نشان دادند (Zeng *et al.*, 2019). در مطالعات دیگر گزارش شده که جدایه‌های مخمر در برابر غلظت‌های بالای نمک مقاوم هستند (Ogunremi *et al.*, 2015). نمک NaCl با اثر بر ویژگی‌های اسمزی محیط یکی از عوامل جلوگیری از تکثیر میکروارگانیسم‌ها بشمار می‌رود و تحمل غلظت نمکی یکی از عوامل مهم غربالگری پروبیوتیک‌ها است (Sanchez-Ortiz *et al.*, 2015).

رشد نمونه‌ها در دمای ۳۷، ۴۰ و ۴۲ درجه سلسیوس در محیط کشت جامد بررسی شد. مخمر جدا شده در دمای فیزیولوژی بدن (دمای ۳۷ درجه سلسیوس) رشد خوبی داشت ولی در دمای ۴۰ و ۴۲ درجه سلسیوس رشد ضعیفی داشت. Fernandes و همکاران جدایه‌های مخمر جدا شده از شکمبه گاو را در دماهای ۳۷، ۳۹ و ۴۱ درجه سلسیوس بررسی کردند. تمامی جدایه‌ها توانایی رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس را داشتند اما در دماهای بالاتر تعداد کمتری قادر به رشد بودند که با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مشابه است (Fernandes *et al.*, 2019). Psomas و همکاران طی مطالعه‌ای بر رشد مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از مدفوع نوزاد انسان در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس دریافتند که همه جدایه‌ها توانایی رشد در هر سه دما را داشتند ولی میزان رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بیشتر بود (Psomas *et al.*, 2001) و همکاران طی مطالعه‌ای رشد مخمرهای جدا شده از دستگاه گوارش اردک را در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس، به نتیجه مشابه رسیدند (Hu *et al.*, 2019). Ogunremi و همکاران نیز دمای ۳۷ درجه سلسیوس، دمای بهینه برای مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از مواد غذایی دانستند. دمای بهینه برای رشد مخمرها ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس است ولی مخمرهای پروبیوتیک باید

توانایی زنده ماندن در دمای بدن (۳۷ درجه سلسیوس) را داشته باشند (Ogunremi *et al.*, 2015). مخمر جدا شده از پوست انسان این ویژگی پروبیوتیکی را دارا بود.

مخمر جدانشده قادر به رشد در محیط بلاد آگار بود ولی توانایی همولیز را نداشت (گاما همولیتیک). این ویژگی در جهت تایید ایمنی مصرف این سویه به عنوان پروبیوتیک حائز اهمیت است (Maragkoudakis *et al.*, 2006). مخمرهای جدا شده از منابع مختلف می توانند الفا همولیز، بتا همولیز و یا گاما همولیز باشند. Das و Ragavan گزارش کردند مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از منابع مختلف: غذایی (لبنیات، میوه و سبزیجات)، حیوانی (بز و ماهی) و گیاهی همگی همولیز منفی (گاما همولیتیک) بودند (Ragavan & Das, 2018)، که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مشابه است. Gut و همکاران گزارش کردند مخمرهای جدا شده از کفیر، در سطح پایینی الفا همولیتیک و بتا همولیتیک بودند (Gut *et al.*, 2019).

خصوصیات بیوشیمیایی

فعالیت‌های آنزیم‌های خارج سلولی، از جمله لیپاز، یکی از عوامل موثر در زنده مانی و نقش حفاظتی پروبیوتیک‌ها است. مطالعات نشان داده است که این آنزیم‌ها همچنین به پروبیوتیک امکان استفاده از مواد مغذی بدن، مانند روده، را می‌دهد (Buzzini & Martini, 2002؛ Syal & Vohra, 2013). نتایج فعالیت آنزیمی مخمر جدا شده از پوست انسان نشان داد که این جدایه دارای فعالیت لیپاز، سیتراتاز و کاتالاز بود. لیپازهای میکروبی از مهم ترین انواع آنزیم‌ها هستند که به علت پایداری بالا در حلال‌های آلی، توانایی کاتالیز واکنش‌های هیدرولیزی، سهولت در تولید و هزینه‌های نسبتاً پایین آن یکی از منابع مهم تولید در صنعت محسوب می‌شود (Esteban-Torres *et al.*, 2015). مخمر جدا شده در این تحقیق دارای فعالیت لیپازی قوی در محیط حاوی روغن زیتون، روغن آفتابگردان، توئین ۲۰ بودند. فعالیت لیپازی در محیط حاوی نفت خام نیز مشاهده گردید. Mahdhi و همکاران در بررسی مخمر *Candida famata* دریافتند که مخمر در محیط حاوی توئین ۸۰ دارای فعالیت لیپازی بود (Mahdhi *et al.*, 2011). Psomas و همکاران گزارش کردند تمامی مخمرهای جدا شده از مدفوع نوزاد انسان دارای فعالیت لیپازی بودند (Psomas *et al.*, 2001).

مخمر جدانشده دارای فعالیت کاتالازی بود. Sharma و Bajwa طی بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از غذای سیدرا (ماهی تخمیر شده) گزارش کردند از ۱۳ مخمر جدانشده، شش مخمر کاتالاز مثبت بودند (Bajwa & Sharma, 2018). مخمر مورد مطالعه در این تحقیق دارای فعالیت سیتراتازی بود. امینی و همکاران طی مطالعه بر روی مخمرهای از جنس *Pseudozyma*، گزارش کردند که مخمرها توانایی استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن را دارند (Amini *et al.*, 2014).

در این مطالعه هر چند مخمر توانایی رشد در محیط حاوی یک درصد پکتین را داشت، ولی تجزیه پکتین (توسط آنزیم پکتیناز) مشاهده نشد. امینی و همکاران گزارش کردند مخمرهای جدا شده از شالیزار متعلق به جنس *Pseudozyma* فاقد فعالیت پکتینازی بودند (Amini et al., 2013). جدایه مخمر دارای فعالیت آمیلازی نبود. Reed و Nagodawithana گزارش کردند قدرت مخمرها در تولید انواع آمیلازها محدود بوده و تنها چند جنس معروف، نظیر گونه‌های جنس *Choiromyces*، *Cryptococcus* و *Lipomyces* دارای فعالیت آمیلازی هستند (Reed & Nagodawithana, 1991). Syal و Vohra گزارش کردند مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از میوه‌های تخمیری، همگی فاقد فعالیت آمیلازی بودند (Syal & Vohra, 2013). Psomas و همکاران گزارش کردند مخمرهای پروبیوتیکی جدا شده از مدفوع نوزاد انسان نیز فاقد فعالیت آمیلازی بودند (Psomas et al., 2001).

همچنین مخمر جدا شده فاقد فعالیت پروتئازی در حضور سوبستراهای مورد استفاده بود. عدم تجزیه ژلاتین عدم حضور آنزیم ژلاتیناز را نشان داد. ژلاتیناز معمولاً توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تولید می‌شود و عدم حضور این آنزیم یکی از موارد ایمن بودن میکروارگانیسم به عنوان پروبیوتیک محسوب می‌گردد (Zhao et al., 2011). طی تحقیقی که توسط سجادی بروی غربالگری آنزیم‌های هیدرولیتیک مخمرهای خانواده *Zygoascus* انجام شد، فعالیت پروتئازی مشاهده نشد (Sajadi., 2018). در گزارش Syal و Vohra از ۲۰ مخمر پروبیوتیک جدا شده از میوه‌های تخمیری، ۱۸ مخمر فاقد فعالیت پروتئازی بودند (Syal & Vohra, 2013).

مخمر جدا شده در این مطالعه فاقد فعالیت سلولازی در محیط حاوی یک درصد کربوکسی متیل سلولز بود. نتیجه بدست آمده مشابه با نتایج امینی و همکاران در بررسی مخمرهای جنس *Pseudozyma* جدا شده از شالیزارهای برنج بود (Amini et al., 2013). در این مطالعه مخمر مورد مطالعه اوره آز منفی بود. در پژوهشی که Zeng و همکاران انجام دادند از ۲۱ مخمر جدا شده، هشت مخمر فاقد فعالیت اوره‌آزی بودند. برخی مطالعات نشان داده است که مخمرهای آسکومیست توانایی هیدرولیز اوره را ندارند (Zeng et al., 2019). Perricone و همکاران در بررسی مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از خمیر ترش، از ۵۰ جدایه، ۳۹ جدایه اوره آز منفی بودند (Perricone et al., 2013).

مطالعات نشان داده است که مخمرها می‌توانند آنزیم‌هایی را ترشح کنند و ترکیبات خارج سلولی را تجزیه و جذب کنند اما به دلیل اندازه بزرگ مولکول‌های آنزیم و کوچک بودن منافذ دیواره سلولی قارچ، امکان ترشح از طریق انتشار وجود ندارد و آنزیم‌ها توسط وزیکول‌ها به محل جوانه زنی مخمر منتقل می‌شوند و یا به سطح سلول ترشح می‌شوند (Kavanagh, 2011). ماکرومولکول‌ها جز سوبستراهای رایج مخمرها نیستند و تنها تعداد محدودی از مخمرها آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی تولید می‌کنند (Rosa & Peter, 2006).

نتیجه‌گیری

تا کنون مخمرهای پروبیوتیک از منابع مختلف نظیر لبنیات (شیر، پنیر، دوغ، کفیر، ماست)، میوه‌ها، سبزیجات، گیاهان (چای سبز، ریشه گندم، گل آفتابگردان)، حیوانات (محتویات روده بز، ماهی، دستگاه گوارش اردک، شکمبه گاو) و پسماند کارخانجات (کارخانه قند، کارخانه مشروب سازی) جداسازی شده‌اند، ولی تعداد گزارشات از مخمرهای پروبیوتیک جدا شده از منابع انسانی محدود است (مدفوع نوزاد و شیر مادر). در این تحقیق مخمر از پوست جدا سازی شد و مطالعات اولیه ویژگی‌های پروبیوتیکی این مخمر را نشان داد. آزمایشات بیشتر بر روی ویژگی این مخمر در حال انجام است. با توجه به مطالعات انجام شده در مورد خواص مخمرهای پروبیوتیک، این تحقیق می‌تواند گامی در بررسی‌های بعدی این مخمر در حفاظت در پوست و یا در استفاده در موارد دیگر در انسان و حیوان داشته باشد.

منابع

- Agarbati, A., Canonico, L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., and Comitini, F. (2020). Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods*, 9(3): 287-312.
- Al-Ghazzewi, F. H., Tester, R. F. and Alvani, K. (2012). The synbiotic effects of konjac glucomannan hydrolysates (GMH) and *lactobacilli* on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Nutrition & Food Science*, 42(2): 97-10.
- Al-Ghazzewi, F. H. and Tester, R. F. (2014). Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Journal of Beneficial microbes*, 5(2): 99-107.
- Al-Kobaisi, M. F. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology 24th Edition. Sultan Qaboos University Medical Journal, 7(3): 273-275.
- Amini, L., Soudi, M. and Nasr, Sh. (2013). Isolation of yeasts from rice farms and study of secretory enzyme profile in two species of the genus *Pseudozyma*. *Journal of Biological Science*, 28(1): 23-24.
- Amara, A. A., Salem, S. R. and Shabeb, M. S. (2009). The possibility to use bacterial protease and lipase as biodetergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2): 104-114.
- Baud, D., Agri, V. D., Gibson, G. R., Reid, G. and Giannoni, E. (2020). Using Probiotics to Flatten the Curve of *Coronavirus* Disease COVID-2019 Pandemic. *Journal of Frontiers in Public Health*, 8(186): 1-5.

- Bateup, J. M., McConnell, M. A., Jenkinson, H. F. and Tannock, G. W. (1995). Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 61(3): 1147-1149.
- Bajwa, J. and Sharma, N. (2018). Evaluation of probiotic properties of yeasts isolated from Sidra—An ethnic fermented fish product of North East India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2): 2632-2643.
- Bojar, R. A. and Holland, K. T. (2002). The human cutaneous microflora and factors controlling colonisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(9): 889-903.
- Boix-Amorós, A., Martínez-Costa, C., Querol, A., Collado, M. C. and Mira, A. (2017). Multiple approaches detect the presence of fungi in human breastmilk samples from healthy mothers. *Journal of Scientific reports*, 7(1): 1-13.
- Buzzini, P., and Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of applied microbiology*, 93(6): 1020-1025.
- Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V. and Baeza, M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *Journal of BMC microbiology*, 16(1), 1-9.
- Chen, L. S., Ma, Y., Maubois, J. L., He, S. H., Chen, L. J. and Li, H. M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Journal of Dairy Science & Technology*, 90(5): 537-548.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. (1996). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pages 129-182, The Benjamin/Cummings Publishing Company New York.
- Dye, D. W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. The " amylovora" group. *New Zealand Journal of Science*, 11: 590-607.
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V. and Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Journal of Biotechnology advances*, 36(8): 2060-2076.
- Edens, F. W. (2003). An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(2): 75-97.
- Erkkila, S. and Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Journal of Meat science*, 55(3): 297-300.

- Estrada, A., Yun, C. H., Kessel, A. V., Li, B., Hauta, S. and Laarveld, B. (1997). Immunomodulatory activities of oat β -glucan in vitro and in vivo. *Journal of Microbiology & Immunology*, 41(12): 991-998.
- Esteban-Torres, M., Mancheno, J. M., de las Rivas, B. and Munoz, R. (2015). Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *Journal of Food Science & Technology*, 60(1): 246-252.
- Fernandes, T., Carvalho, B. F., Mantovani, H. C., Schwan, R. F. and Ávila, C. L. S. (2019). Identification and characterization of yeasts from bovine rumen for potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3): 845-855.
- Fredricks, D. N. (2001). Microbial ecology of human skin in health and disease. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3): 167-169.
- Ghoneum, M., Matsuura, M., Braga, M. and Gollapudi, S. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* induces apoptosis in human metastatic breast cancer cells by altering intracellular Ca^{2+} and the ratio of Bax and Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 33(3): 533-539.
- Gonzalez-Lopez, C. I., Szabo, R., Blanchin-Roland, S. and Gaillardin, C. (2002). Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Genetics*, 160(2): 417-427.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T. and Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58: 56-66.
- Golubev, W. I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, Springer, 197-219 Pp. Berlin, Heidelberg.
- Gilliland, S. E. and Walker, D. K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of dairy science*, 73(4): 905-911.
- Hasan, S., Ahmad, A., Purwar, A., Khan, N., Kundan, R. and Gupta, G. (2013). Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*, 9(5): 238-242.
- Hu, X. Q., Liu, Q., Hu, J. P., Zhou, J. J., Zhang, X., Peng, S. Y. and Wang, X. D. (2018). Identification and characterization of probiotic yeast isolated from digestive tract of ducks. *Journal of Poultry Science*, 97(8): 2902-2908.
- Kurtzman, C., Fell, J. W. and Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Pages 2354, Elsevier.

- Kaur, A., Mahajan, R., Singh, A., Garg, G. and Sharma, J. (2010). Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. *Journal of Bioresource Technology*, 101(23): 9150-9155.
- Kurugol, Z. and Koturoğlu, G. (2005). Effects of *Saccharomyces boulardii* in children with acute diarrhoea. *Journal of Acta Paediatrica*, 94(1): 44-47.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T. and Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87(12): 4050-4056.
- Kunyeit, L., Kurrey, N. K., Anu-Appaiah, K. A., and Rao, R. P. (2019). Probiotic yeasts inhibit virulence of non-*albicans Candida* species. *Journal of MBio*, 10(5): e02307-19.
- Kavanagh, K. (2005). *Biology and Applications*, John Wiley and Sons Ltd, 267 Pp. New York, USA.
- Lew, L. C., and Liong, M. T. (2013). Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits. *Journal of applied microbiology*, 114(5): 1241-1253.
- Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Journal of Science*, 147(3659): 747-748.
- Manns, J. M., Mosser, D. M. and Buckley, H. R. (1994). Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Journal of Infection & Immunity*, 62(11): 5154-5156.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3): 189-199.
- Mahdhi, A., Hmila, Z., Behi, A. and Bakhrouf, A. (2011). Preliminary characterization of the probiotic properties of *Candida famata* and *Geobacillus thermoleovorans*. *Iranian journal of microbiology*, 3(3): 129-134.
- Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard, L., and Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4): 449-473.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I. and Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.
- Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O. and Villani, F. (2008). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6): 1919-1928.

- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R. and Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Journal of Food Microbiology*, 38: 26-35..
- Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A. and Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2): 125-133.
- Psani, M. and Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22: 1329–1336.
- Qvirist, L. A., De Filippo, C., Strati, F., Stefanini, I., Sordo, M., Andlid, T. and Cavalieri, D. (2016). Isolation, identification and characterization of yeasts from fermented goat milk of the Yaghnob Valley in Tajikistan. *Journal of Frontiers in Microbiology*, 7(1690): 1-17.
- Rosa, C. A. and Peter, G. (2006). *The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts*, Springer-Verlag, 559 Pp. Berlín, Alemania.
- Reed, G. and Nagodawithana, T. W. (1991). Baker's yeast production. In *Yeast technology*. Pages 261-314. Springer, Dordrecht.
- Ragavan, M. L. and Das, N. (2017). Isolation and characterization of potential probiotic yeasts from different sources. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(4): 451-455.
- Saber, A., Khosroushahi, A. Y., Faghfoori, Z., Seyyedi, M. and Alipour, B. (2019). Molecular identification and probiotic characterization of isolated yeasts from Iranian traditional dairies. *Journal of progress in nutrition*, 21: 445-457.
- Sauerwein, H., Schmitz, S., and Hiss, S. (2007). Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91(9-10): 369-380.
- Schmitt, M. J. and Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *Journal of Microbiology Reviews*, 26(3): 257-276.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. Pages 373, American Phytopathological Society: APS Press.
- Sajadi, F. (2018). Screening of *zygoascus hellenicus* yeast hydrolytic enzymes and optimization of temperature and pH of growth and activity of its hydrolytic enzymes. *Tabriz university of medical sciences* Pp 112.

- Stadler, M. and Viernstein, H. (2003). Optimization of a formulation containing viable lactic acid bacteria. *International Journal of Pharmaceutics*, 256(1-2): 117-122.
- Sathish, L., Pavithra, N. and Ananda, K. (2012). Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *eucalyptus*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 3(8): 25-74.
- Syal, P. and Vohra, A. (2013). Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2): 390-398.
- Sánchez-Ortiz, A. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á. I., Escamilla-Montes, R., del Carmen Flores-Miranda, M. and Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1): 123-136.
- Talebi, F., Manaffar, R., Esmaili Fereidouni, A. and Abdi, J. (2016). Comparative effects of manipulated beaker's yeast and Lansy PZ on fatty acid composition of adults in *Artemia urmiana* and *A. franciscana*. *Journal of Marine Science & Technology*, 15(2): 51-65.
- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K. and Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International journal of food microbiology*, 101(1): 29-39.
- Vakhlu, J. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1):69-85.
- Yadav, R., Singh, A. V., Joshi, S. and Kumar, M. (2015). Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*. *African Journal of Microbiology Research*, 9(29): 1783-1788.
- Zeng, X., Fan, J., He, L., Duan, Z. and Xia, W. (2019). Technological properties and probiotic potential of yeasts isolated from traditional low-salt fermented Chinese fish Suan yu. *Journal of Food Biochemistry*, 43(8): 1-14.
- Zhao, Q., Liu, Z. D., Xue, Y., Wang, J. F., Li, H., Tang, Q. J., and Xue, C. H. (2011). Ds-echinoid A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF-κB-dependent MMP-9 and VEGF expressions. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12(7): 534-544.

Isolation of yeast with probiotic properties from human skin

Mohadeseh Ghaffari¹, Farshad Darvishi^{2,3}, Sonbol Nazeri^{4*}

Received:2020.9.17
Accepted:2020.11.21

Abstract

Probiotics are living microorganisms that have an important role in prevention and treatment of diseases. The aim of this study was isolate yeast with probiotic properties due to the importance of probiotic yeasts. Sampling was performed from different parts of human skin. Growth ability of isolated yeast at concentrations of 0.3, 0.5 and 1% oxgall, 2, 4 and 6% NaCl, pHs of 2, 4, 5.8, 9 and 11 and temperature 37, 40 and 42°C were investigated. The activity of amylase, protease, pectinase, cellulase, lipase, urease, catalase, citratase and hemolysin was investigated. The yeast was able to grow in 0.3% oxgall, concentrations of 2, 4 and 6% NaCl, pHs of 2, 4, 5.8, 9 and 11 and also at a temperature of 37°C. The isolated yeast has the primary properties of probiotics and can be used in future studies.

Keywords: Probiotic, Yeast, Enzyme activity, Oxgall, Salt tolerance

1- Master of Microbial Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, East Azarbaijan, Iran

2- Professor, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

3- Professor, Faculty of Sciences, University of Maragheh, East Azarbaijan, Iran

4- Associate professor, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

*(Corresponding author: snazeri@basu.ac.ir)

سنتز نانو ذرات متخلخل اکسید آهن و بررسی اثرات زیستی آن بر روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن (K۵۶۲)

معصومه محرابی^۱، محمد فائزی قاسمی^{۲*}، بهنام راستی^۳، مجتبی فلاحی^۴، امیر میرزایی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۵

چکیده

نانو ذرات اکسید آهن متخلخل کاربردهای مختلفی در صنایع پزشکی و دارویی دارند بنابراین بررسی اثرات آن‌ها روی سلول‌های سرطانی بسیار مهم است. بر این اساس، هدف از این مطالعه سنتز نانو ذرات اکسید آهن متخلخل و مقایسه تأثیر آن‌ها بین سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن (K۵۶۲) است. نانو ذرات اکسید آهن متخلخل توسط روش آبگرمایی ساخته شد و اثر غلظت‌های مختلف این نانو ذرات بر روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) با به کارگیری آزمون MTT و تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری بررسی شد. مطالعه‌های پراش اشعه X، میکروسکوپ الکترونی عبوری و هیستوگرام پراکندگی نور پویا ساخته شدن نانو ذرات اکسید آهن متخلخل را تأیید کرد نتایج نشان داد که نانو ذرات به شکل کروی با قطر متوسط حدود ۱۰۰ نانومتر هستند. آزمون MTT آشکار کرد که نانو ذرات اکسید آهن متخلخل باعث کاهش حیات سلول‌ها وابسته به دوز می‌شوند، این سمیت در سلول‌های نسبت (K۵۶۲) به سلول‌های لنفوسیتی بیشتر بود. پس از مشخص شدن غلظت IC_{۵۰} نانو ذرات، تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری به منظور بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) بر روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) در مقایسه با سلول‌های بدون تیمار (کنترل)، انجام پذیرفت. میزان مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز در سلول‌های (K۵۶۲) تیمار شده توسط نانو ذرات اکسید آهن متخلخل نسبت به سلول‌های لنفوسیتی به مراتب بیشتر بود. می‌توان استنباط کرد که نانو ذرات اکسید آهن متخلخل به عنوان عوامل ضد سرطان محتمل استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن (K ۵۶۲)، سلول‌های لنفوسیتی، فلوسایتومتری، مرگ

برنامه‌ریزی شده سلولی، نانو ذرات اکسید آهن متخلخل

۱- دانشجوی دکترا، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان

* (نویسنده مسئول: faezi_m@yahoo.com)

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان

۴- استادیار گروه نانو تکنولوژی، دانشکده علوم پیشرفته، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران

۵- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند

مقدمه

توسعه فناوری در سطح نانو باعث گسترش کاربردهای مختلف آن در زمینه پزشکی از جمله تشخیص، شناسایی زیستی، درمان و تحویل دارو در محل شده است (Riviere et al., 2006; Suri et al., 2007). همچنین علم زیست‌شناسی پزشکی در حد نانو در حال توسعه بوده و علاوه بر آن استفاده از نانوذرات به‌عنوان مواد ضد سرطان در حال افزایش است (Nel et al., 2009). نانوذرات اکسید آهن دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که برای کاربردهای مختلف در پزشکی از جمله تشخیص، تصویربرداری، هایپرترمی، جداسازی مغناطیسی، تکثیر سلولی، ترمیم بافت و تحویل دارو در محل مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rao et al., 2015). تحقیقات مختلفی روی ترکیبات اکسید آهن در زمینه تولید ساختارهایی با اندازه نانو مانند مگنیتیت (γ - Fe_2O_3) یا مگنیتیت (Fe_2O_3) انجام شده که اندازه‌های مابین ۵ تا ۲۰ نانومتر قطر دارند و در این میان مگنیتیت دارای اهمیت بیشتری است زیرا سازش‌پذیری زیستی آن ثابت شده است. همچنین این نانوذرات دارای ویژگی‌های چندمنظوره از جمله سایز بهینه و سطح تغییر یافته و تخلخل فراوان هستند. در این میان با توجه به خواص منحصر به فرد نانوذرات اکسید آهن متخلخل، از جمله: زیست‌سازگاری بالا، مساحت بالا و حجم حفره‌های متعدد، قابل تنظیم بودن اندازه حفره‌ها، قابلیت بارگذاری مولکول‌های دارویی، انعطاف‌پذیری در برابر اتصال گروه‌های شیمیایی مختلف بر روی سطح به‌منظور انتقال هدفمند دارو و پایداری شیمیایی، می‌تواند بسیار سودمند باشند (Gupta & Gupta, 2005; Huber, 2005). علاوه بر این، نانوذرات سوپر مغناطیس آهن به دلیل پایداری کلوئیدی، زیست‌سازگاری و خاصیت مغناطیسی انتخاب مناسبی برای کاربردهای زیست پزشکی هستند (Hong et al., 2011). نانوذرات اکسید آهن در بدن می‌توانند متابولیزه شوند و به راحتی یون‌های آهن را آزاد کنند که این یون‌ها می‌توانند توسط پروتئین‌های فریتین، ترانس فریتین و هموسیدرین انتقال یابند و به‌عنوان ذخایر آهن برای استفاده‌های بعدی مورد استفاده قرار بگیرند (Santhosh & Ulrich, 2013). علاوه بر مزایای فوق، استفاده از نانوذرات متخلخل به دلیل افزایش در دسترس بودن دارو در سلول‌های سرطانی هدف و بارگذاری دارو بر روی نانوذرات بسیار مناسب هستند. در این رابطه سو و همکارانش (Su et al., 2015) و بنیتو و همکارانش (Benyettou et al., 2016) نشان دادند که علاوه بر افزایش بارگیری دارو در نانوذرات متخلخل اکسید آهن حاوی پوشش پروتئینی باعث تجمع و رهاسازی بیشتر دارو در سلول‌های سرطانی هدف در مقایسه با نانوذرات اکسید آهن به‌تنهایی می‌شوند. چن و همکارانش (Chen et al., 2016) با طراحی نانوذرات اکسید آهن حاوی هم علاوه بر تجمع دارویی بر روی سلول‌های لوسمی میلوئیدی با فعال کردن کاسپاز ۳، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ به‌طور قابل توجه باعث کاهش فعالیت سلول‌های فوق از طریق القای آپوپتوزیس شدند. با این وجود، چالش‌های مختلفی در رابطه با سمیت نانوذرات فلزی و آزادسازی سریع آن‌ها از خون به سیستم رتیکولاندوتلیال (Shen et al., 2018) وجود دارد که با استفاده از روکش‌های پلیمری و یا پروتئینی می‌توان بر آن غلبه کرد (Feng et al., 2018).

کانوار و همکارانش (Kanwar *et al.*, 2016) نشان دادند که استفاده از پروتئین لاکتوفرین به عنوان پوشش روی نانوذرات متخلخل اکسید آهن باعث افزایش ماندگاری نانوذره حاوی دارو بیش از ۲۴ ساعت بعد از تزریق می‌شود. به طور مشابه زو و همکارانش (Xue *et al.*, 2018) با استفاده از نانوذرات اکسید آهن چندمنظوره با تثبیت پلیمری منجر به مرگ سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد و ثبات طولانی داروی دوکسوروبیسین در خون شد. همچنین نشان داده شد که استفاده از پلیمرهای پلی‌اتیلن گلیکول یا پلورونیک باعث پایداری بیشتر نانوذرات در خون می‌شود (Benyettou *et al.*, 2016; Ostroverkhov *et al.*, 2019). نانوذرات آهن می‌توانند از طریق پدیده القا پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و یا اتوفازی به واسطه میتوکندری، موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی سر، گردن (Huang *et al.*, 2017; Shieh *et al.*, 2017) و سلول‌های سرطانی تخمدان (Shieh *et al.*, 2017) شوند. تعیین عوارض جانبی و اثرات نانوذرات روی تغییرات ساختاری برخی پروتئین‌های حامل مثل آلبومین سرم انسانی (Tabish *et al.*, 2016) و سمیت بر سلول‌های طبیعی و سرطانی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در دهه اخیر از نانوذرات اکسید آهن در تحقیقات زیست پزشکی بسیار استفاده شده است. این نانوذرات به عنوان حامل‌های دارویی و ژن به کار گرفته شده‌اند. اخیراً اثرات سمی این نانوذرات نیز مورد توجه قرار گرفته است، به ویژه غلظت‌های بالای این نانوذره روی پروتئین‌های اکتین در اسکلت سلولی تاثیرگذار است و موجب توقف تقسیم سلولی می‌شود. همچنین تولید گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (Reactive oxygen species) را تحریک می‌کند (Soenen *et al.*, 2011). به این ترتیب تنش اکسیداتیو باعث آسیب زدن به مولکول‌های زیستی شده و از این طریق باعث آسیب به سلول‌ها و در نهایت بافت‌ها می‌شود (Stroh *et al.*, 2004). امروزه مشخص شده است که نانو ذرات متخلخل توانایی نفوذپذیری عمیق تری در ساختار سلول‌های سرطانی دارند (Su *et al.*, 2015). از آنجائی که اطلاعات زیادی در زمینه اثرات نانو ذرات متخلخل اکسید آهن بر روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن در دسترس نیست لذا هدف این تحقیق بررسی اثرات سمیت نانو ذرات متخلخل اکسید آهن (MIONPs) (Mesoporous iron oxide nanoparticles) روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K562) است.

مواد و روش‌ها

سنتز نانو ذرات اکسید آهن متخلخل

نانو ذرات اکسید آهن متخلخل از طریق واکنش آب‌گرمایی با انجام بعضی تغییرات به روش سو و همکاران ساخته شد (Su *et al.*, 2015). به این منظور ۲ میلی‌لیتر اولئیک اسید (Sigma، آمریکا) و سیترات سدیم (Sigma، آمریکا) به عنوان ماده همراه کننده در ۵ میلی‌لیتر اتیلن گلیکول (Sigma، آمریکا) برای تشکیل محلول شفاف، حل شد و سپس ۲۰ میلی‌مولار $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma، آمریکا) و ۲۰ میلی‌مولار سدیم استات (Sigma، آمریکا) بدون آب به مجموعه اضافه شد و این ترکیب

در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت به‌منظور تشکیل مخلوط یکنواخت همزده شد. این مجموعه با یک پوشش تفلون در اتوکلاو در ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واکنش آب‌گرمایی به مدت ۱۲ ساعت حرارت داده شد. سپس پارتیکل‌های مغناطیسی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جمع‌آوری شد. شستشوی نانو ذرات تشکیل شده با اتانل (Merck، آلمان) در سه مرحله انجام و در شرایط خلا در دمای اتاق خشک و استریلیزاسیون با اشعه فرابنفش (UV) انجام شد.

خصوصیات نانو ذرات متخلخل اکسید آهن

اندازه نانو ذرات متخلخل اکسید آهن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (FESEM EOL6700, Japan) تعیین گردید. برای بررسی اندازه منافذ و کانال‌های نانو ذرات اکسید آهن متخلخل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با مدل (HRTEM, JEM-2010, Japan) با قدرت تفکیک بالا با افزایش ولتاژ ۱۰۰ kV استفاده گردید. طیف پراش اشعه ایکس با کمک پراش سنج اشعه ایکس مدل (XRD-6000; Japan) با دامنه تصویربرداری ۵ درجه تا ۷۵ درجه با تابش $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54178$) انجام پذیرفت. نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم به ازای میلی‌لیتر در محلول ۱ درصد دی‌متیل سولفواکسید (DMSO) به ۲۰ دقیقه همزده شد و مقدار شعاع هیدرودینامیکی توسط دستگاه پراکندگی نور پویا مدل (DLS; Brookhaven Instrument, Holtsville, NY, USA) تعیین شد.

تهیه و کشت سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن

جمع‌آوری سلول‌های لنفوسیتی نمونه خون طبیعی از افراد سالم براساس اصول مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه آزاد اسلامی با استفاده از سانتریفیوژ شیب مدل (Ficoll- paque Plus, Sigma USA) انجام شد. سلول‌های لنفوسیت در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ (Sigma، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد FBS (Sigma، آمریکا) ۱۰۰ U/ml و پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Sigma، آمریکا) ۱۰۰ µg/ml کشت داده شدند. سپس PHA ۵µg/ml (Sigma، آمریکا) برای تحریک تکثیر سلول‌های لنفوسیت اضافه شد. رده سلولی لوسمی میلوئیدی مزمن (K۵۶۲) از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین در ۳۷°C در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شد.

آزمون (MTT) 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

یکی از جنبه‌های کلیدی در زیست‌شناسی سلولی تعیین میزان تکثیر وزنده‌مانی سلول‌ها در زمان حضور عوامل مختلف است. یکی از آزمایش‌هایی که برای زنده‌مانی و تکثیر سلولی استفاده می‌شود آزمون MTT است. این آزمون به‌عنوان روشی برای

بررسی میزان زنده‌مانی سلول یا بررسی اثر سمیت داروها یا دیگر مکمل‌ها بر سلول است که با تأثیر بر روی اندامک‌های درون‌سلولی می‌تواند بین سلول زنده و مرده تمایز قائل شود. این آزمایش بر پایه تبدیل سوبسترای زردرنگ نمک تترازولیوم بروماید یا نمک‌های دیگر تترازولیوم به بلوره‌های ارغوانی فورمازان به‌وسیله سلول‌هایی که از نظر متابولیسی فعال هستند انجام می‌شود. واکنش احیای سلولی با واسطه فاکتورهای NADPH و NADH انجام و بلوره‌های فورمازان ساخته‌شده به کمک حلال دی‌متیل سولفوکسید به فرم محلول درآمده و محلول ارغوانی رنگ ایجاد می‌شود. جذب محلول رنگی حاصل را می‌توان با اسپکتروفتومتر و یا الیزا ریدر، قرائت کرد. میزان جذب با تعداد سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. در این مطالعه اثر بیولوژیک و سمیت نانو ذرات اکسید آهن متخلخل بر روی سلول‌های (K562) و سلول‌های لنفوسیتی بررسی شد. سلول‌های K562 و لنفوسیت‌ها تحت تأثیر محدوده غلظت‌های مؤثر نانو ذرات اکسید آهن متخلخل (0/01 تا 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت 24 ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. در این مطالعه با توجه به احتمال اثرات سمیت بالا بر روی سلول‌های طبیعی، غلظت‌های بالاتر از 20 میکروگرم به ازای میلی‌لیتر در نظر گرفته نشد. درصد زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT در طول موج 570 nm با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت 96 خانه‌ای مدل (Expert 96, Asys Hitch, Ec Austria) سنجش شد. برای هر تیمار سه تکرار انجام و غلظت IC₅₀ نانو ذرات اکسید آهن متخلخل در برابر سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K562) تعیین شد.

فلوسایتومتری

القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های تیمار شده با نانو ذرات اکسید آهن متخلخل به مدت 24 ساعت با غلظت 5. IC₅₀ (μg/ml) برای سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K562) و مقایسه آن با گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری دریافت نکردند طبق پروتکل (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) انجام پذیرفت. کیت Annexin V-FITC (Abcam ab14085) آمریکا جهت تشخیص مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و رنگ‌آمیزی سلول‌ها برای تعیین درصد سلول‌های در حال مرگ و نکروز استفاده شد. بعد از تیمار سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K562) با غلظت IC₅₀ نانوذره اکسید آهن متخلخل در 500 میکرولیتر بافر اتصال‌دهنده 1X Annexin V-FITC مخلوط گردید سپس با 5 میکرولیتر Annexin V-FITC و 5 میکرولیتر یدید پروپیدیوم رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت تعیین کمیت مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و نکروز با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مدل (FACSCalibur. BD Biosciences, San Jose, CA, USA) انجام شد.

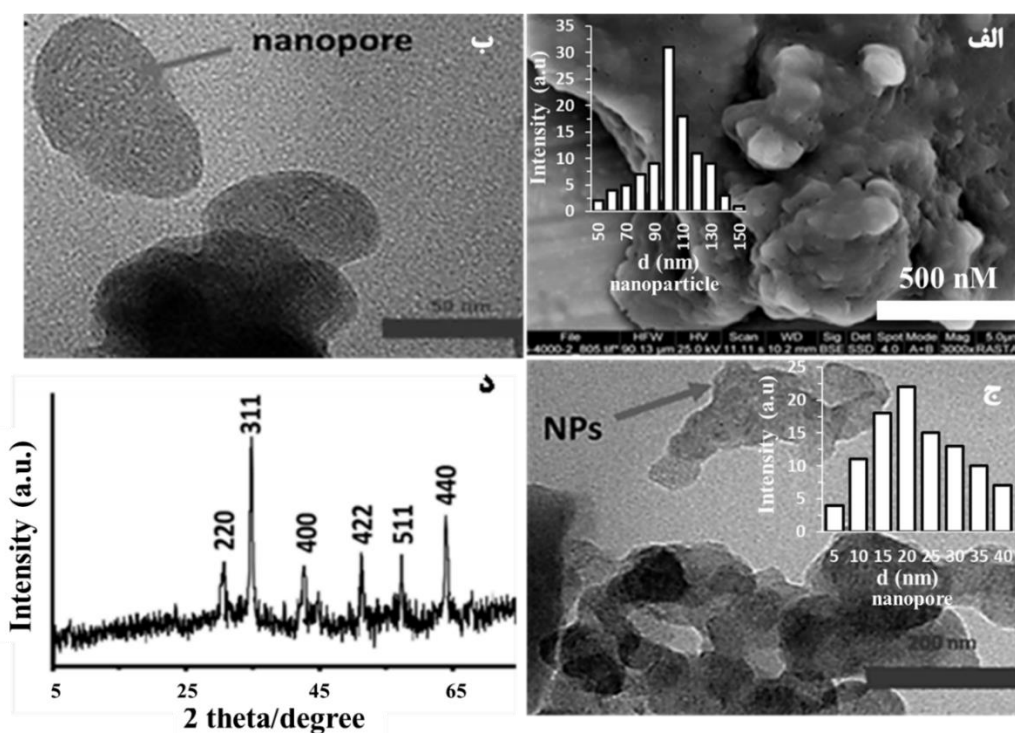
تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (Version 16.0) و آزمون آماری Tukey استفاده شد. نتایج به صورت (انحراف معیار \pm مقدار میانگین) برای هر داده نشان داده شد و معنی‌دار بودن نتایج براساس مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری دارای اهمیت گزارش شد.

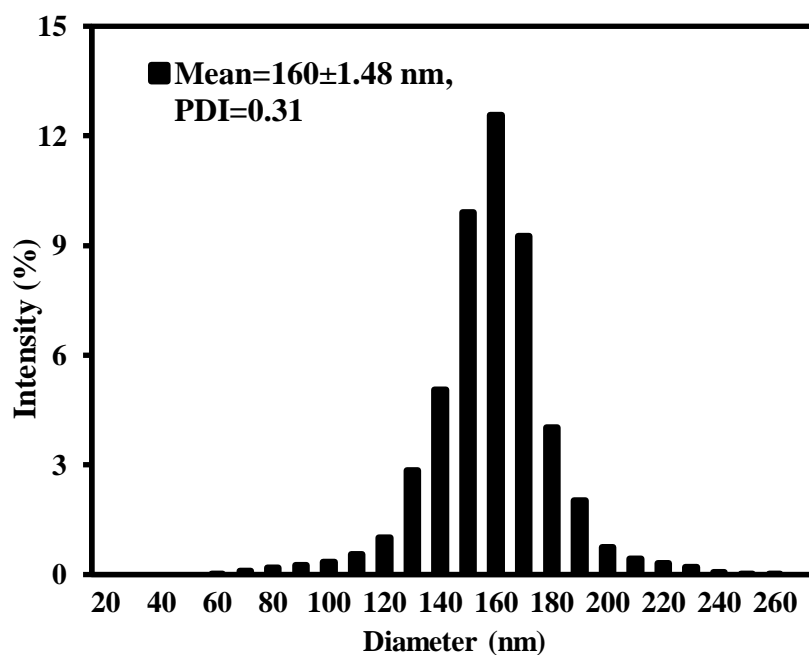
نتایج و بحث

خصوصیات نانو ذرات اکسید آهن متخلخل

خصوصیات نانو ذرات متخلخل اکسید آهن ساخته شده به روش آبگرمایی و ویژگی‌های آن توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۱-الف) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (شکل ۱-ب و ج) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱-الف نشان داده شده است نانو ذرات سنتز شده شکل کروی با قطر متوسط حدود ۱۰۰ نانومتر دارند. همان‌طوری که در نمودار هیستوگرام داخل شکل مشاهده می‌شود، توزیع نانوذرات توسط نرم‌افزار ImageJ رسم و میانگین اندازه قطر ۱۰۰ نانومتری بیشترین توزیع را در نانوذره اکسید آهن به خود اختصاص داد. همچنین برخی حفراتی که در سطح نانوذرات مشاهده می‌شود نشان‌دهنده منافذ یا کانال‌ها در سطح نانوذره است. در شکل ۱-ب و ج می‌توان منافذ و کانال‌های درون نانوذرات را مشاهده کرد. هیستوگرام داخل شکل ۱-ج توزیع بیشتر منافذ و کانال‌ها را با قطر متوسط ۲۰ نانومتر نشان می‌دهد. شکل ۱-د طیف پراش اشعه X نانو ذرات متخلخل اکسید آهن را نشان می‌دهد. با توجه به طیف نتیجه می‌شود نانوذره متخلخل اکسید آهن به خوبی تشکیل و پایداری خوبی داشت. پیک‌های پراش واقع در زاویه 2θ برابر ۳۰/۱، ۳۵/۵، ۴۲/۶، ۵۳/۶، ۵۷/۰ و ۶۲/۸ درجه که به ترتیب به صفحات (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) مربوط‌اند و به ساختار اسپینل (Spinel) نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن نسبت داده می‌شوند (JCPDS card no.82-1533). شکل ۲ هیستوگرام پراکندگی نور پویا Dynamic light scattering (DLS) نانو ذرات اکسید آهن متخلخل را نشان می‌دهد. همان‌طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود نانو ذرات متخلخل اکسید آهن به طور متوسط دارای شعاع هیدرودینامیک ۱۶۰ نانومتر با PDI ۰/۳۱ بوده که نشان‌دهنده یکنواختی مناسب محلول کلئیدی نانوذرات تشکیل شده است. به طور مشخص هرچقدر میزان PDI پایین‌تر باشد تمایل به تجمع در نانو ذرات نیز پایین‌تر بوده و محلول کلئیدی نانوذره یکنواخت‌تر هست.



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات متخلخل اکسید آهن الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی به همراه هیستوگرام پراکندگی قطر متوسط نانوذرات تشکیل شده، ب) و ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مربوط به قطر متوسط منافذ و کانال‌های تشکیل شده روی نانوذرات به ترتیب با بزرگ‌نمایی کوچک و بزرگ‌تر به همراه هیستوگرام (در تصویر ج) و د) طیف پراش اشعه X نانوذرات اکسید آهن متخلخل

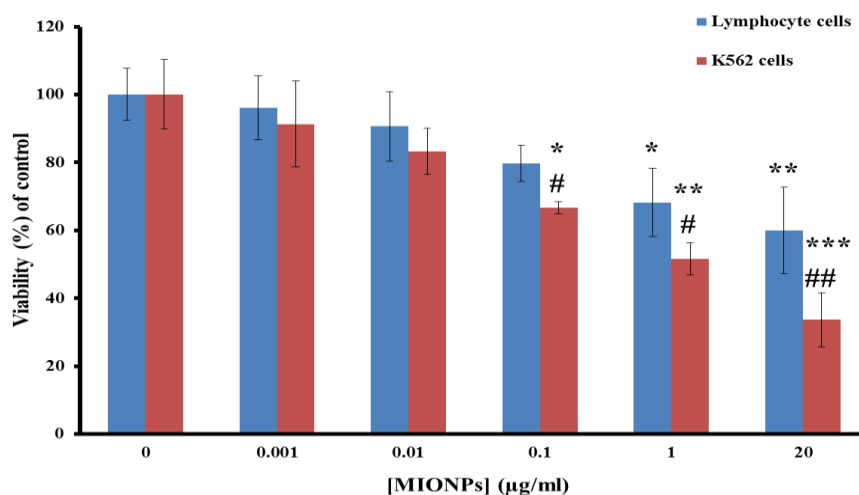


شکل ۲: هیستوگرام پراکندگی نور پویا Dynamic light scattering (DLS) نانو ذرات اکسید آهن متخلخل

تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش MTT

آزمون MTT برای تعیین میزان سمیت سلولی نانو ذرات متخلخل اکسید آهن در برابر سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده نانو ذرات متخلخل اکسید آهن باعث کاهش حیات سلولی به صورت وابسته به دوز می‌شوند. محور افقی نشان‌دهنده غلظت‌های صفر تا $20 \mu\text{g/ml}$ نانو ذرات اکسید آهن متخلخل است. البته این سمیت در برابر سلول‌های لوسمی لنفوئیدی مزمن نسبت به سلول‌های لنفوسیتی شدیدتر است. در این روش درصد زنده ماندن سلولی بعد از انجام دوره گرماگذاری برای سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید آهن متخلخل به ترتیب $0/1$ ، $0/01$ ، $0/001$ و $20 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.

درصد زنده ماندن سلول‌ها برای سلول‌های لنفوسیتی به ترتیب برای غلظت‌های ذکر شده $96/12$ درصد، $90/62$ درصد، $80/73$ درصد، $68/19$ درصد و $59/97$ درصد و برای سلول‌های (K۵۶۲) به ترتیب $91/31$ درصد، $83/28$ درصد، $66/71$ درصد، $51/71$ درصد و $33/63$ درصد کاهش پیدا کرد. غلظت IC_{50} نانو ذرات متخلخل اکسید آهن در برابر سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) به ترتیب به میزان $20 \mu\text{g/ml}$ به بالا و $5 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. شکل ۳ میزان زنده ماندن سلول‌های (K۵۶۲) و سلول‌های لنفوسیتی را بعد از آزمون MTT و ارتباط معناداری این دو را با نمونه‌ی کنترل (غلظت صفر نانو ذرات) نشان می‌دهد. با توجه به نتایج شکل ۳ نانو ذرات متخلخل اکسید آهن تا غلظت $0/1 \mu\text{g/ml}$ بر روی دو گروه سلولی هیچ تأثیری نداشت. میزان سمیت نانو ذرات متخلخل اکسید آهن در غلظت $1/0 \mu\text{g/ml}$ بر روی سلول‌های (K۵۶۲)، بیشتر از سلول‌های کنترل ($p < 0.05$) سلول‌های لنفوسیت طبیعی ($\#p < 0.05$) و معنی‌دار است. در غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ نانو ذرات اثر سمیت بر روی سلول‌های (K۵۶۲) نسبت به سلول‌های کنترل ($p < 0.01$) و لنفوسیت طبیعی ($\#p < 0.05$) بیشتر و معنی‌دار بود. در غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ نانو ذرات نیز اثر سمیت قابل توجهی بر روی سلول‌های (K۵۶۲) نسبت به سلول‌های کنترل ($p < 0.001$) و سلول‌های طبیعی ($\#\#\#p < 0.05$) دیده شد و کاملاً معنی‌دار است. این نتایج نشان داد که نانو ذرات متخلخل اکسید آهن در یک‌روند وابسته به غلظت باعث کاهش حیات سلول‌های (K۵۶۲) به صورت انتخابی شده‌اند. آزمون‌های مرگ برنامه‌ریزی شده برای سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) در دو حالت تیمار نشده و تیمار شده با نانو ذرات متخلخل اکسید آهن با کمک سنجش فلوسایتومتری انجام پذیرفت.

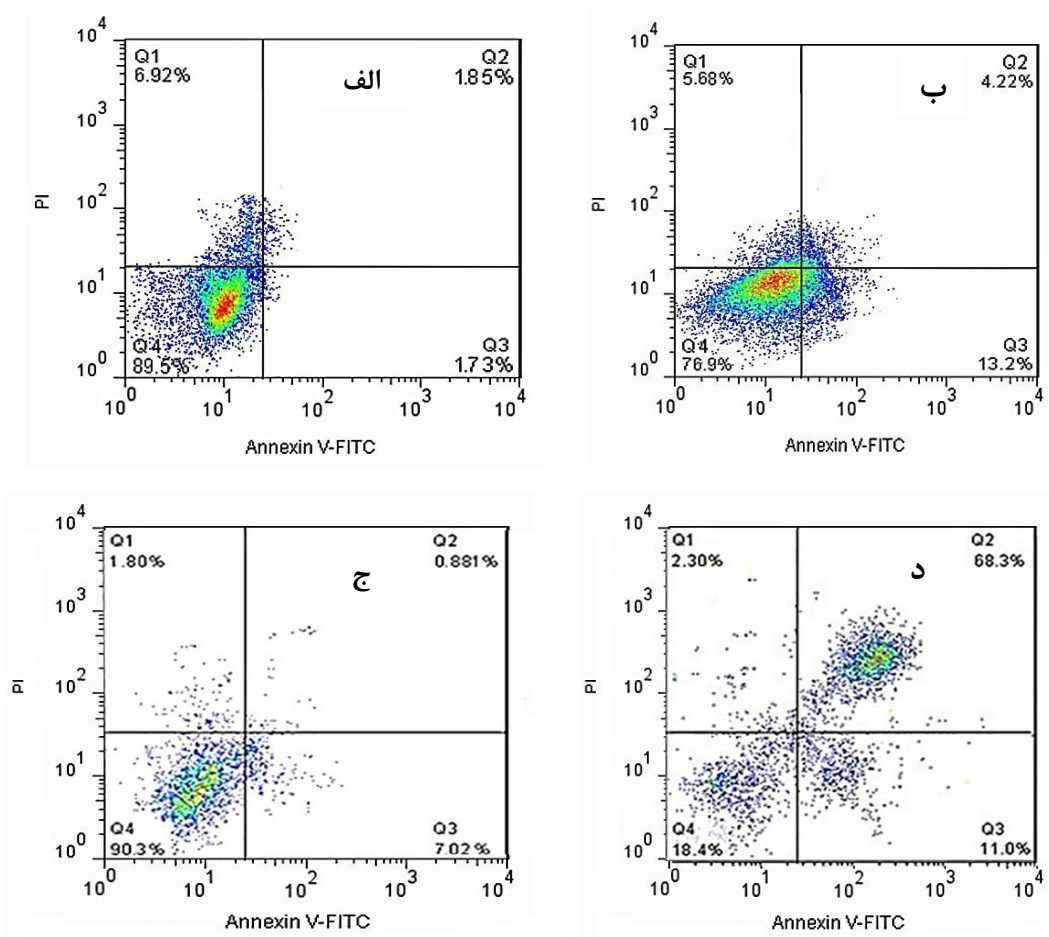


شکل ۳: نتایج اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات متخلخل اکسید آهن بر روی سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K562) نسبت به نمونه‌های کنترل برای هر دو نوع سلول (غلظت صفر نانو ذرات اکسید آهن) در مدت زمان ۲۴ ساعت. میزان سمیت بر روی سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن ($p < 0.05$, #, $p < 0.05$, ##) و سلول‌های لنفوسیتی ($p < 0.05$, *، $p < 0.01$, ** و $p < 0.001$, ***). نسبت به سلول‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد.

تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری

به منظور بررسی شروع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ناشی از اثر نانو ذرات متخلخل اکسید آهن فلوسایتومتری انجام شد. سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K562) به صورت کنترل و نمونه آزمایش با غلظت IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) نانو ذرات متخلخل اکسید آهن مورد تیمار قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۴ (الف) نشان داده شده ۸۹/۵ درصد از سلول‌های لنفوسیتی کنترل (تیمار نشده با نانو ذرات) در وضعیت طبیعی (Q_4)، ۱/۷۳ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده اولیه (Q_3)، ۱/۸۵ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری (Q_2) و ۶/۹۲ درصد در وضعیت نکروز قرار دارند (Q_1). وضعیت سلول‌های لنفوسیتی در حالت تیمار با نانو ذرات اکسید آهن متخلخل در شکل ۴ (ب) نشان داده شده است. در این شرایط ۷۶/۹ درصد از سلول‌های لنفوسیتی در وضعیت طبیعی (Q_4)، ۱۳/۲ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده اولیه (Q_3)، ۴/۲۲ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری (Q_2) و ۵/۶۸ درصد در وضعیت نکروز قرار دارند (Q_1). نتایج تیمار سلول‌های (K562) با غلظت IC_{50} نانو ذرات متخلخل اکسید آهن، نشان داد که جمعیت سلول‌های زنده کاهش و تعداد سلول‌های دارای مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز شده به طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند، همان‌طوری که در شکل ۲ (ج) نشان داده شده است، ۹۰/۳ درصد سلول‌های (K562) در حالت کنترل در وضعیت طبیعی (Q_4)، ۷/۰۲ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده اولیه (Q_3)، ۰/۸۸ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری (Q_2) و ۱/۸۰ درصد در وضعیت نکروز قرار دارند (Q_1). شکل ۲ (د) نشان می‌دهد که به ترتیب ۱۸/۴ درصد از سلول‌های (K562) تحت تیمار با نانوذره اکسید آهن در وضعیت طبیعی (Q_4)، ۱۱ درصد در وضعیت مرگ

برنامه‌ریزی شده اولیه (Q_3)، ۶۸/۳ درصد در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری (Q_2) و ۲/۳۰ درصد در وضعیت نکروز قرار دارند (Q_1). افزایش معنی‌دار سلول‌های در وضعیت مرگ برنامه‌ریزی شده تأخیری، نشان‌دهنده اثر قابل توجه نانو ذرات اکسید آهن متخلخل در غلظت IC_{50} بر سلول‌های (K۵۶۲) نسبت به سلول‌های لنفوسیتی است.



شکل ۴: تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری الف) سلول‌های لنفوسیتی کنترل (بدون حضور نانو ذرات متخلخل اکسید آهن)، ب) سلول‌های لنفوسیتی تحت تیمار با نانو ذرات اکسید آهن متخلخل ج) سلول‌های (K۵۶۲) و د) سلول‌های (K۵۶۲) تحت تیمار با نانو ذرات متخلخل اکسید آهن به مدت ۲۴ ساعت.

القای مرگ برنامه‌ریزی شده، یکی از روش‌ها در از بین بردن سلول‌های سرطانی است و استفاده از نانو ذرات در این زمینه روزبه‌روز بیشتر می‌شود. در پژوهش حاضر نشان داده شد که نانو ذرات متخلخل اکسید آهن در غلظت IC_{50} قادر به ایجاد اثرات القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های (K۵۶۲) هستند. همان‌طوری که در تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری مشاهده می‌شود افزایش معنی‌داری در سلول‌های آپوپتوز شده نسبت به سلول‌های لنفوسیتی طبیعی وجود دارد. بررسی این نوع مرگ القاشده توسط نانوذره متخلخل اکسید آهن نشان داد که این ترکیب سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن را به سمت آپوپتوز هدایت می‌کند و تمایل این نانوذره نسبت به نفوذ در سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های لنفوسیتی است. سمیت نانو ذرات

وابسته به اندازه دقیق آن‌ها است، هر چه اندازه نانو ذرات کوچک‌تر باشد راحت‌تر به ساختارهای بیولوژیکی نفوذ کرده و عملکرد طبیعی آن‌ها را مختل می‌کنند. با توجه به تغییرات ساختاری که به‌ویژه در سطح سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی اتفاق می‌افتد، نفوذ نانوذره با اندازه یکسان به درون آن‌ها نسبت به لنفوسیت‌های طبیعی مؤثرتر انجام می‌شود. در این تحقیق به نظر می‌رسد که همین مکانیسم موجب اثربخشی مؤثرتر این نانو ذرات بر روی سلول‌های سرطانی شده است. همچنین به نظر می‌رسد که وجود تخلخل بیشتر در ساختار نانوذره اکسید آهن به این فرآیند کمک می‌کند. اگرچه کاربردهای پزشکی مختلفی در مورد انواع نانو ذرات اکسید آهن مطالعه شده است، اما خصوصیات پزشکی نانو ذرات متخلخل اکسید آهن به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار نگرفته است. میزان نفوذپذیری نانو ذرات بستگی کامل به شرایط فیزیکی و شیمیایی آن‌ها دارد و ویژگی‌های سطحی نانوذره، داشتن ساختارهای تخلخلی می‌تواند متفاوت باشد که موجب افزایش نفوذپذیری، به‌ویژه در سلول‌های سرطانی می‌گردد. همچنین واکنش بین نانو ذرات و پروتئین، نقش مهمی در کاربرد دارویی نانو ذرات دارد. فعل‌وانفعالات بین نانو ذراتی مانند کربن با آلبومین سرم و گاماگلوبین‌ها توسط نیروهای آب‌گریز و واندروالسی هدایت می‌شوند و نانو ذرات فوق ساختار پروتئین را تغییر نمی‌دهند (Xue *et al.*, 2018). همچنین واکنش بین نانو ذرات نقره با آلبومین سرم گاوی BSA از طریق نیروهای آب‌گریز و الکترواستاتیک اتفاق می‌افتد و این تعاملات تغییرات ساختاری پروتئین را تحریک می‌کند (Wang *et al.*, 2017). تعامل بین نانوذره Fe_2O_3 و BSA از طریق نیروهای آب‌گریز و آب‌دوست رخ می‌دهد که وابسته به گروه‌های عملکردی نانوذره می‌توانند منجر به تغییر قابل توجه در ساختار آلبومین سرم گاوی شوند (Hao *et al.*, 2017). انبوهی، بهزادی و رودبانه و همکارانشان نشان دادند که نانوذرات آهن بدون ظرفیت، نانو ذرات اکسید منیزیم و نانو ذرات اکسید سریم می‌توانند به آلبومین سرم خون انسان متصل شوند و فقط تغییرات جزئی در ساختار پروتئین ایجاد کنند (Anbouhi *et al.*, 2019; Behzadi *et al.*, 2019; Roudbaneh *et al.*, 2019).

کاربرد نانوذرات معدنی به‌عنوان امیدی نو در جهت درمان سرطان‌ها است. در بین نانوذرات، نانوذرات متخلخل اکسید آهن به دلیل داشتن خاصیت مغناطیسی، جهت درمان سرطان‌های مختلف بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gobbo *et al.*, 2015; Nosrati *et al.*, 2018). بدین معنی که این نانوذرات با ایجاد یک میدان مغناطیسی می‌توانند دارو را به‌صورت هوشمند به بافت مورد نظر رسانده و بدون صدمه به بافت‌های دیگر، سبب بهبود بافت شوند. با در نظر گرفتن رفتار مغناطیسی نانو ذرات و همچنین توانایی حمل مواد دارویی، این ذرات کاربردهای چندگانه‌ای در زیست پزشکی از جمله دارورسانی هدفمند به تومورها، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی و درمان سرطان پیدا کرده‌اند. طبق گزارش‌های انجام شده نانوذرات اکسید آهن با قطر بیش از ۱۰۰ نانومتر به سرعت از طریق فاگوسیتوز، ماکروفاژها در کبد و طحال حذف می‌شوند، درحالی‌که نانوذرات اکسید آهن کوچک‌تر از قطر ۱۰ نانومتر احتمالاً از طریق ترشح کلیوی حذف می‌شوند.

همچنین مطالعات نشان داده که ساخت نانوذرات اکسید آهن بر پایه اکسید گرافن و به همراه آن می‌تواند فعالیت آنزیمی‌هایی مثل کاتالاز یا پراکسیداز را تقلید کرده و این فعالیت به شکل قوی وابسته به فاکتورهای مانند pH و دما است (Gao et al., 2016; Song et al., 2017). از این جهت این نانوذرات می‌توانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز داشته باشند. همچنین اثر ممانعت‌کنندگی رشد سلول‌های سرطانی نانوذرات اکسید آهن همراه با هوموهارینگتونین (Homoharringtonine) که یک دارو جهت درمان لوسمی میلوئیدی مزمن است، مشخص شده است (Chen et al., 2016). به این ترتیب از نانوذرات متخلخل اکسید آهن می‌توان در درمان انتخابی و هوشمند سرطان استفاده کرد. در واقع نانوذرات به‌ویژه آن‌هایی که مغناطیسی هستند در کاربردهای پزشکی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما اثرات سوء آن‌ها نیز می‌بایست مدنظر قرار گیرد (Fard et al., 2015). رخدادهای لوسمی میلوئیدی مزمن در میانسالان و سالمندان بیشتر است. همچنین گزارش‌هایی از سمیت‌های داروهای مورد استفاده جهت درمان این نوع سرطان وجود دارد. به‌طور مثال استفاده از داروهای مانند هوموهارینگتونین با توجه به اثرات بسیار سمی بر روی سلول‌های طبیعی با محدودیت‌های زیادی به‌ویژه در افراد سالمند مواجه است. لذا استفاده از نانوذرات به‌عنوان حامل دارویی یا حتی جایگزین دارویی با اثرات کمتر سمی بسیار مورد توجه است. از میان رده‌های سلولی لوسمی میلوئیدی مزمن، رده‌ی (K۵۶۲) به‌عنوان یکی از معمول‌ترین رده‌های سلولی که در این‌گونه تحقیقات به‌کاربرده می‌شود انتخاب شد. در این مطالعه نشان داده شد که رفتار سلول‌های لنفوسیتی و سلول‌های (K۵۶۲) پس از قرارگیری در معرض نانوذرات متخلخل اکسید آهن متفاوت است. در واقع ساختارهای سلولی متفاوت که نانوذرات متخلخل اکسید آهن در آن نفوذ می‌کنند می‌تواند دلیل این رفتار متفاوت باشد. به نظر می‌رسد که این نانوذرات موجب تحریک تولید رادیکال‌های آزاد و شروع مرگ برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن می‌شوند و اثرات کشندگی آن‌ها بر روی سلول‌های (K۵۶۲) نسبت به سلول‌های لنفوسیتی معنی‌دار و بیشتر است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که نانوذرات متخلخل اکسید آهن به‌صورت انتخابی باعث القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده بیشتری در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های لنفوسیتی می‌شوند، از این رو می‌توان نتیجه گرفت که از این نانوذرات می‌توان در توسعه برنامه‌های دارویی به‌عنوان یک عامل یا داروی ضد سرطانی متحمل استفاده کرد.

منابع

Anbouhi, T. S., Esfidvajani, E. M., Nemati, F., Haghghat, S., Sari, S., Attar, F., Falahati, M. (2019). Albumin binding, anticancer and antibacterial properties of synthesized zero valent iron nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 14, 243.

- Behzadi, E., Sarsharzadeh, R., Nouri, M., Attar, F., Akhtari, K., Shahpasand, K., & Falahati, M. (2019). Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 14, 257.
- Benyettou, F., Ocadiz Flores, J. A., Ravaux, F., Rezgui, R., Jouiad, M., Nehme, S. I., Trabolsi, A. (2016). Mesoporous γ -iron oxide nanoparticles for magnetically triggered release of doxorubicin and hyperthermia treatment. *Chemistry–A European Journal*, 22(47), 17020-17028.
- Chen, M., Xiong, F., Ma, L., Yao, H., Wang, Q., Wen, L., Chen, S. (2016). Inhibitory effect of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles coloaded with homoharringtonine on human leukemia cells in vivo and in vitro. *International journal of nanomedicine*, 11, 4413.
- Fard, J. K., Jafari, S., & Eghbal, M. A. (2015). A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(4), 447.
- Feng, Q., Liu, Y., Huang, J., Chen, K., Huang, J., & Xiao, K. (2018). Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Gao, L., Fan, K., & Yan, X. (2017). Iron oxide nanozyme: a multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications. *Theranostics* 7 (13): 3207–3227.
- Gobbo, O. L., Sjaastad, K., Radomski, M. W., Volkov, Y., & Prina-Mello, A. (2015). Magnetic nanoparticles in cancer theranostics. *Theranostics*, 5(11), 1249.
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.
- Hao, C., Xu, G., Feng, Y., Lu, L., Sun, W., & Sun, R. (2017). Fluorescence quenching study on the interaction of ferrous oxide nanoparticles with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 184, 191-197.
- Hong, S. C., Lee, J. H., Lee, J., Kim, H. Y., Park, J. Y., Cho, J., Han, D.-W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International journal of nanomedicine*, 6, 3219.
- Huang, K.-J., Wu, S.-R., & Shieh, D.-B. (2017). Zero-valent iron nanoparticles inhibited head and neck cancer cells growth: a pilot evaluation and mechanistic characterization. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, S39.
- Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
- Kanwar, J. R., Kamalapuram, S. K., Krishnakumar, S., & Kanwar, R. K. (2016). Multimodal iron oxide (Fe_3O_4)-saturated lactoferrin nanocapsules as nanotheranostics for real-time imaging and breast cancer therapy of claudin-low, triple-negative (ER-/PR-/HER2-). *Nanomedicine*, 11(3), 249-268.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543-557.
- Nosrati, H., Salehiabar, M., Davaran, S., Danafar, H., & Manjili, H. K. (2018). Methotrexate-conjugated L-lysine coated iron oxide magnetic nanoparticles for inhibition of MCF-7 breast cancer cells. *Drug development and industrial pharmacy*, 44(6), 886-894.
- Ostroverkhov, P., Semkina, A., Naumenko, V., Plotnikova, E., Melnikov, P., Abakumova, T., Abakumov, A. (2019). Synthesis and characterization of bacteriochlorin loaded magnetic nanoparticles (MNP) for personalized MRI guided photosensitizers delivery to tumor. *Journal of colloid and interface science*, 537, 132-141.

- Rao, J. P., Gruenberg, P., & Geckeler, K. E. (2015). Magnetic zero-valent metal polymer nanoparticles: Current trends, scope, and perspectives. *Progress in Polymer Science*, 40, 138-147.
- Riviere, C., Roux, S., Tillement, O., Billotey, C., & Perriat, P. (2006). Nano-systems for medical applications: biological detection, drug delivery, diagnosis and therapy. *Annales de Chimie. Science des Materiaux (Paris)*, 31(3), 351-367.
- Roudbaneh, S. Z. K., Kahbasi, S., Sohrabi, M. J., Hasan, A., Salihi, A., Mirzaie, A., Aziz, F. M. (2019). Albumin binding, antioxidant and antibacterial effects of cerium oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 296, 111839.
- Santhosh, P. B., & Ulrih, N. P. (2013). Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics. *Cancer letters*, 336(1), 8-17.
- Shen, L., Li, B., & Qiao, Y. (2018). Fe₃O₄ nanoparticles in targeted drug/gene delivery systems. *Materials*, 11(2), 324.
- Shieh, D.-B., Yang, L.-X., Lee, W.-T., Huang, K. J., Wu, Y.-N., Su, W.-C., Tsang, B. (2017). Zero-valent iron based nanoparticles selectively inhibit cancerous cells through mitochondria-mediated autophagy. Paper presented at the 2017 IEEE 17th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO).
- Soenen, S. J., Himmelreich, U., Nuytten, N., & De Cuyper, M. (2011). Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32(1), 195-205.
- Song, L., Huang, C., Zhang, W., Ma, M., Chen, Z., Gu, N., & Zhang, Y. (2016). Graphene oxide-based Fe₂O₃ hybrid enzyme mimetic with enhanced peroxidase and catalase-like activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 506, 747-755.
- Stroh, A., Zimmer, C., Gutzeit, C., Jakstadt, M., Marschinke, F., Jung, T., Grune, T. (2004). Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(8), 976-984.
- Su, Y.-L., Fang, J.-H., Liao, C.-Y., Lin, C.-T., Li, Y.-T., & Hu, S.-H. (2015). Targeted mesoporous iron oxide nanoparticles-encapsulated perfluorohexane and a hydrophobic drug for deep tumor penetration and therapy. *Theranostics*, 5(11), 1233.
- Suri, S. S., Fenniri, H., & Singh, B. (2007). Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of occupational medicine and toxicology*, 2(1), 16.
- Tabish, T. A., Ashiq, M. N., Ullah, M. A., Iqbal, S., Latif, M., Ali, M., Iqbal, F. (2016). Biocompatibility of cobalt iron oxide magnetic nanoparticles in male rabbits. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33(7), 2222-2227.
- Wang, G., Lu, Y., Hou, H., & Liu, Y. (2017). Probing the binding behavior and kinetics of silver nanoparticles with bovine serum albumin. *RSC advances*, 7(15), 9393-9401.
- Xue, W., Liu, X.-L., Ma, H., Xie, W., Huang, S., Wen, H., Fan, H. M. (2018). AMF responsive DOX-loaded magnetic microspheres: transmembrane drug release mechanism and multimodality postsurgical treatment of breast cancer. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(15), 2289-2303.

Mesoporous Iron Oxide Nanoparticle Synthesis: Study of Its Biological Effects on Lymphocytes and Chronic Myelogenous Leukemia Cells K562

M. Mehrabi¹, M. Faezi Ghasemi^{2*}, B. Rasti³, M. Falahati⁴, A. Mirzaie⁵

Received:2020.9.29

Accepted:2021.2.23

Abstract

Mesoporous iron oxide nanoparticles (MIONPs) have various applications in the medical and pharmaceutical industries. Therefore, investigating their effects on cancer cells could be of great essence. Accordingly, the aim of this study was to synthesize MIONPs and to compare their effect between lymphocytes and chronic myeloid leukemia cells (K562). MIONPs were made by the hydrothermal method. The effects of different concentrations of MIONPs on lymphocytes and K562 cells were then investigated using MTT and flow cytometry (FCM) approaches. X-ray diffraction, transmission electron microscope, and dynamic light scattering (DLS) analysis verified the synthesis of MIONPs. The results showed that the nanoparticles were spherical in shape with an average diameter of about 100 nanometres. The results of the MTT test showed that the MIONPs reduced the life of the cells in a dose-dependent manner, although this toxicity was higher for the K562 cells compared to the lymphocytes. After the determination of IC_{50} concentration for MIONPs, flow cytometry was performed to investigate the programmed cell death (apoptosis) on K562 and lymphocytes cells. The rate of programmed death and necrosis in K562 cells treated with MIONPs was much higher than in lymphocytes. As a result, it can be concluded that porous iron oxide nanoparticles can be used as a possible anti-cancer agents.

Keywords: Chronic myelogenous leukemia cells (K562), lymphocyte cells, flow cytometry, programmed cell death, Mesoporous iron oxide nanoparticles

1- PhD Candidate of Microbiology, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University (IAU), Lahijan

2- Associate Professor of Microbiology, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University (IAU), Lahijan

*(Corresponding author: faezi_m@yahoo.com)

3- Assistant Professor of Bioinformatics, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University (IAU), Lahijan

4- Assistant Professor of Biophysics, Department of Nanotechnology, Faculty of Advance Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran

5- Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand

حذف زیستی اورانیوم از محلول‌های آبی توسط جاذب زیستی تیمار شده به عنوان یک استراتژی کارآمد در زیست پالایی اورانیوم

نساء نامداریان^۱، پریسا تاجر محمد قزوینی^{۲*}، اکرم سادات طباطبایی بفرویی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۰

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی توانایی آزولا فیلیکولیدس تیمار شده در جذب اورانیوم به عنوان جاذب زیستی جدید است. در این پژوهش آزمایشات جذب اورانیوم توسط زیست توده تیمار نشده و تیمار شده با فروسیانید و $H_2O_2/MgCl_2$ انجام شد. بررسی‌ها مشخص کرد که حداکثر ظرفیت جذب اورانیوم توسط زیست توده های مختلف تیمار شده در pH 5 است. ایزوترم فروندلیش برای ارزیابی داده‌های تجربی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جاذب تیمار شده با $H_2O_2/MgCl_2$ کارآمدتر از دیگر جاذب‌ها است و جذب اورانیوم توسط آن نسبتاً سریع و در ۶۰ دقیقه به حداکثر می‌رسد. حداکثر جذب اورانیوم با استفاده از ذرات بزرگتر جاذب (سایز ۲-۴ میلی‌متر) بدست آمد. حداکثر ظرفیت جذب یون های اورانیوم توسط جاذب تیمار شده با $H_2O_2/MgCl_2$ در شرایط بهینه حدود ۴۲/۲ میلی گرم بر گرم زیست توده خشک است. نتایج نشان داد که پیش تیمار می‌تواند روش مناسبی در جهت افزایش ظرفیت جذب جاذب‌های زیستی باشد.

واژه‌های کلیدی: اورانیوم، پیش تیمار، جذب زیستی، ضایعات رادیواکتیو، فیلتر زیستی

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: ptajer@aeoi.org.ir

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

استفاده امروزه حضور فلزات سنگین و رادیونوکلیدها در پساب‌ها به علت سمیت و غیر قابل تجزیه بودنشان از نگرانی‌های بزرگ زیست محیطی است. این آلاینده‌ها باید به شکلی مناسب، ایمن و مطمئن از پساب‌ها حذف شوند. تمام ایزوتوپ‌های اورانیوم رادیواکتیو و سمی هستند و به عنوان یک عنصر طبیعی در سنگ‌ها، خاک‌ها و آب‌ها در غلظت پایین یافت می‌شوند. اما اورانیوم در غلظت‌های قابل توجهی در برخی از مواد مانند سنگ‌های رسوبی فسفاته و مواد معدنی مانند لیگنیت^۱ و موناژیت^۲ در سنگ معدن اورانیوم وجود دارد (Yasmin *et al.*, 2018). علاوه بر حوادث ناگوار اتفاقی مانند فاجعه چرنوبیل در سال ۱۹۸۶ و فاجعه هسته‌ای فوکوشیما در سال ۲۰۱۱، استفاده گسترده از مواد رادیواکتیو در تحقیق و توسعه، پزشکی و صنایع باعث تولید و انباشت زباله‌های رادیواکتیو شده است. تجمع عناصر سوخت هسته‌ای و فلزات سمی در محیط زیست به علت افزایش خطرات برای سلامت انسان و محیط زیست یک عامل نگران‌کننده مهم است. این آلاینده‌ها می‌تواند از طریق فعالیت‌های هسته‌ای، زباله‌های صنعتی، کارخانه‌های فرآوری، ذوب و محل‌های دفن زباله‌ها وارد محیط زیست شوند (Prakash *et al.*, 2013). امروزه ثابت شده است که استفاده از روش‌های زیستی یا زیست‌پالایی در حذف فلزات از پساب‌ها، می‌تواند برخی از محدودیت‌ها و مشکلات مربوط به روش‌های فیزیکوشیمیایی را برطرف نماید و راه حل اقتصادی تری محسوب شود. بر این اساس در سال‌های اخیر استفاده از توده‌های زیستی مختلف برای حذف فلزات سنگین از پساب‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009; Guo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2019; Vanhoudt *et al.*, 2018; Vijayaraghavan & Yun, 2008). امروزه گیاه‌پالایی به عنوان یکی از فن‌آوری‌های جایگزین برای حذف آلاینده‌های فلزی از محیط زیست ظهور کرده است (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009; Prusty & Satapathy, 2020; Yang & Volesky, 1999). علاقه به استفاده از گیاهان برای تیمار محیط زیست به دلیل ظرفیت طبیعی آنها برای تجمع فلزات سنگین و کاهش ترکیبات آلی در حال افزایش است (Dushenkov *et al.*, 1995; Prusty & Satapathy, 2020). اگرچه از مدت‌ها پیش شناخته شده است که گیاهان آبی‌زی قادر به تجمع رادیونوکلیدها هستند، اما در رابطه با جذب زیستی اورانیوم توسط آزولا گزارش‌های کمی موجود است (Vanhoudt *et al.*, 2018; Yang & Volesky, 1999).

مطالعات نشان می‌دهد پیش‌تیمار توده‌های زیستی با استفاده از تیمارهای شیمیایی به دلیل تشکیل جایگاه‌های جذب جدید، ظرفیت جذب فلزات سنگین را بالا می‌برد. بیشتر زیست توده‌ها به نوعی به تیمارهای شیمیایی نیاز دارند تا عملکرد خوبی در جذب زیستی داشته باشند. اثر تیمارها ممکن است با نوع زیست توده متفاوت باشد. در حال حاضر، از تغییرات شیمیایی

¹ C₃₉H₃₅O₁₀NS

² [(Ce, La, Nd, Th) PO₄]

زیست توده در آزمایش های جذب زیستی استفاده شده است تا بتواند ظرفیت جذب فلز را افزایش دهد. موفقیت پیش تیمارهای شیمیایی اساساً به اجزای سلولی زیست توده بستگی دارد. بنابراین توصیه می شود روش های مختلفی برای ارتقای این گروه های عملکردی روی زیست توده استفاده شود. به طور کلی، گروه های مهم عملکردی را می توان از طریق چندین تغییر شیمیایی به گروه های فعال عملکردی تبدیل کرد (Aryal & Liakopoulou-Kyriakides, 2015; Kasra-Kermanshahi *et al.*, 2019; Vijayaraghavan & Balasubramanian, 2015). امروزه توسعه جاذب های زیستی جدید بر اساس زیست توده های تیمار شده جهت پاکسازی پساب های آلوده به رادیونوکلئیدها می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی توانایی آزولا فیلیکولیدس^۱ تیمار شده با مواد شیمیایی و بررسی عوامل موثر در جذب زیستی اورانیوم توسط جاذب های تیمار شده از محلول های آبی بود.

مواد و روش ها

آماده سازی زیست توده

زیست توده آزولا فیلیکولیدس از تالاب انزلی ایران جمع آوری گردیده بود. جهت آماده سازی زیست توده، ابتدا زیست توده با آب مقطر دیونیزه شسته و سپس در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. زیست توده خشک شده در مخلوط کن آزمایشگاهی خرد گردید و قبل از استفاده توسط RETSCH analytical sieve shaker AS 200 دانه بندی گردید.

تیمارهای شیمیایی زیست توده

-زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید/ منیزیم کلرید^۲

نمونه های آزولا (هر نمونه سه گرم) توسط دو میلی گرم $MgCl_2$ و H_2O_2 هشت میلی مولار در حجم ۳۰ میلی لیتر به مدت ۱۲ ساعت در ۱۵۰ دور در دقیقه و به دور از نور در pH ۷ تیمار گردید. سپس نمونه ها در محلول NaOH با pH ۱۰/۵ به مدت شش ساعت خیسانده شدند (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009). در پایان نمونه های تیمار شده سه مرتبه با آب مقطر شسته و در آن در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردیدند. این نوع جاذب تیمار شده از آزولا، جاذب HAS^۳ نامیده شد.

^۱ *Azolla filiculoides*

^۲ $H_2O_2/MgCl_2$

^۳ Hydrogen Peroxide *Azolla* Sorbent

- زیست توده تیمار شده با فروسیانید

برای این منظور دو روش استفاده گردید. در روش اول، سه گرم زیست توده خشک به ۱۰۰ میلی لیتر محلول اتیلن دی آمین ۱ M اضافه شد و در شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت گرماگذاری گردید. سپس زیست توده با استفاده از فیلتر کاغذی (Whatman No. 40 Ashless) جدا گردید و بعد از شست و شو با آب مقطر به مدت ۱۸ ساعت با ۱۰۰ میلی لیتر محلول CuCl_2 مخلوط گردید. بعد از این مرحله، زیست توده فیلتر گردیده و به مدت ۴۸ ساعت با ۱۰۰ میلی لیتر محلول پتاسیم هگزا سیانوفرات ۶۰ میلی مولار تیمار شد. در نهایت زیست توده فیلتر شده با آب مقطر شسته و در آون با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009; Jalali-Rad *et al.*, 2004). این نوع زیست توده‌های تیمار شده FAS1^۱ نامیده شد.

در روش دوم، سه گرم زیست توده خشک اتصال عرضی^۲ شده با گلو تار آلدهید (Jalali-Rad *et al.*, 2004; Leusch *et al.*, 1995) به ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ اضافه گردید و به مدت ۱۸ ساعت در شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از جداسازی زیست توده تیمار شده به وسیله فیلترهای کاغذی و شست شو با آب مقطر، زیست توده به ۱۰۰ میلی لیتر محلول پتاسیم هگزا سیانوفرات ۲۵ گرم بر لیتر اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. در نهایت، زیست توده با فیلتراسیون جدا و با آب مقطر شسته شد و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد خشک گردید (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009; Jalali-Rad *et al.*, 2004; Leusch *et al.*, 1995). این نوع زیست توده‌های تیمار شده FAS2^۲ نامیده شد.

آزمایش‌های جذب زیستی اورانیوم به حالت ناپیوسته

جهت ساخت محلول‌های اورانیوم از نمک نترات اورانیل هگزا هیدرات ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) استفاده شد. برای جلوگیری از اثر تداخلی آلاینده‌ها تمام ظروف بکار رفته با HNO_3 یک نرمال و آب مقطر شسته شدند. کار در کلیه موارد آزمایشگاهی با رعایت اصول ایمنی و در آزمایشگاه ویژه مواد رادیواکتیو پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای انجام شد. در آزمایش‌ها جذب زیستی اورانیوم، ۶۰ میلی گرم (وزن خشک) زیست توده‌های آزولا فیلیکولیدس تیمار نشده و تیمار شده مختلف به ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۳۰ میلی لیتر محلول فلزی حاوی اورانیوم اضافه شد. ارلن‌ها در شیکر انکوباتور

¹ Ferrocyanide Azolla Sorbent Type 1

² Cross-link

با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت گرماگذاری شدند. در نهایت زیست‌توده‌ها از هر محلول توسط فیلتر کاغذی جدا شدند و غلظت اورانیوم در محلول‌ها توسط دستگاه طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) سنجش شدند. ارلن‌های حاوی محلول بدون اورانیوم و ارلن‌های بدون جاذب‌های زیستی به عنوان شاهد استفاده شدند.

به منظور بررسی اثر pH بر جذب زیستی اورانیوم، محلول‌های حاوی نیترات اورانیل به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در pH های مختلف ۲ تا ۶ تهیه گردید و جذب زیستی اورانیوم مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش‌ها از HNO₃ و NaOH جهت تنظیم pH استفاده شد (Kasra-Kermanshahi et al., 2019).

در آزمایش مقایسه جذب زیستی اورانیوم جاذب‌ها، ۶۰ میلی‌گرم (وزن خشک) زیست‌توده‌های آزولا فیلیکولیدس تیمار نشده و تیمار شده مختلف به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محلول فلزی در غلظت‌های مختلف اولیه اورانیوم (۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در pH بهینه به دست آمده، اضافه شد. ارلن‌ها در شیکر انکوباتور با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت گرماگذاری شدند. در نهایت زیست‌توده‌ها از هر محلول توسط فیلتر جدا و غلظت اورانیوم در محلول‌ها توسط دستگاه طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) سنجش گردید.

نتایج جذب اورانیوم توسط آزولا تیمار شده شیمیایی و غیر تیمار شده، توسط مدل ایزوترمی شناخته شده فرویندلش (Freundlich) جهت انتخاب جاذب برتر تجزیه و تحلیل شد. غلظت اورانیوم در آزمایش‌ها توسط دستگاه ICP-Optical Emission Spectroscopy سنجیده شد.

مدل ایزوترمی جذب فرویندلش توسط معادله زیر مطالعه گردید (Vijayaraghavan & Yun, 2008):

$$Q = K_f C_f^{\frac{1}{n}}$$

در این معادله C_f غلظت نهایی فلز در محلول (میلی‌گرم بر لیتر)، K_f ثابت فرویندلش است که ظرفیت جذب را نشان می‌دهد و n شدت جذب را مشخص می‌کند.

به منظور بررسی اثر زمان در جذب زیستی و زمان تعادل جذب زیستی اورانیوم، آزمایش‌ها جذب زیستی اورانیوم در فواصل زمانی مختلف تماس بین ۵ دقیقه تا ۶ ساعت درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت، زیست‌توده‌ها از محلول‌های فلزی جدا شده و غلظت اورانیوم در محلول‌ها توسط دستگاه ICP تجزیه و تحلیل شدند (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009).

در این پژوهش، تاثیر اندازه جاذب بر جذب اورانیوم توسط زیست توده‌های دارای سایز مختلف (۴-۰/۴۵ میلی متر) مورد بررسی قرار گرفت (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009; Jalali-Rad *et al.*, 2004).

رهاسازی اورانیوم از زیست توده‌ها و استفاده دوباره از زیست توده‌ها با استفاده از ۳۰ میلی لیتر از عوامل رهاساز مختلف مانند کربنات سدیم، سدیم سیترات، هیدروکسید سدیم، EDTA و اسید نیتریک در غلظت‌های مختلف ۰/۳، ۰/۵ و ۱ مولار عامل رهاساز درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه پس از فرآیند جذب زیستی اورانیوم مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش‌ها، زیست توده‌ها از هر محلول با فیلتراسیون جدا شده و غلظت اورانیوم رها شده توسط دستگاه ICP مورد سنجش قرار گرفت. سپس زیست توده‌های جدا شده با آب مقطر شسته و در سیکل جذب اورانیوم مورد استفاده مجدد قرار گرفتند. آزمایش جذب- واجذب در چهار چرخه انجام شد.

ارزیابی داده‌ها

در فرآیند جذب زیستی، مقدار یون فلزی جذب شده توسط زیست توده‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$Q = (V_0 C_0 - V_f C_f) / M$$

که Q مقدار جذب فلز (میلی گرم بر گرم وزن خشک)، V_0 و V_f به ترتیب حجم اولیه و نهایی محلول فلزی (لیتر)، C_0 غلظت اولیه فلز در محلول (میلی گرم بر لیتر)، C_f غلظت نهایی فلز در محلول (میلی گرم بر لیتر)، M وزن خشک زیست توده (گرم) است (Kasra-Kermanshahi *et al.*, 2019; Vijayaraghavan & Yun, 2008).

بازده جذب یا R (%) نیز از فرمول زیر محاسبه شد (Vijayaraghavan & Yun, 2008):

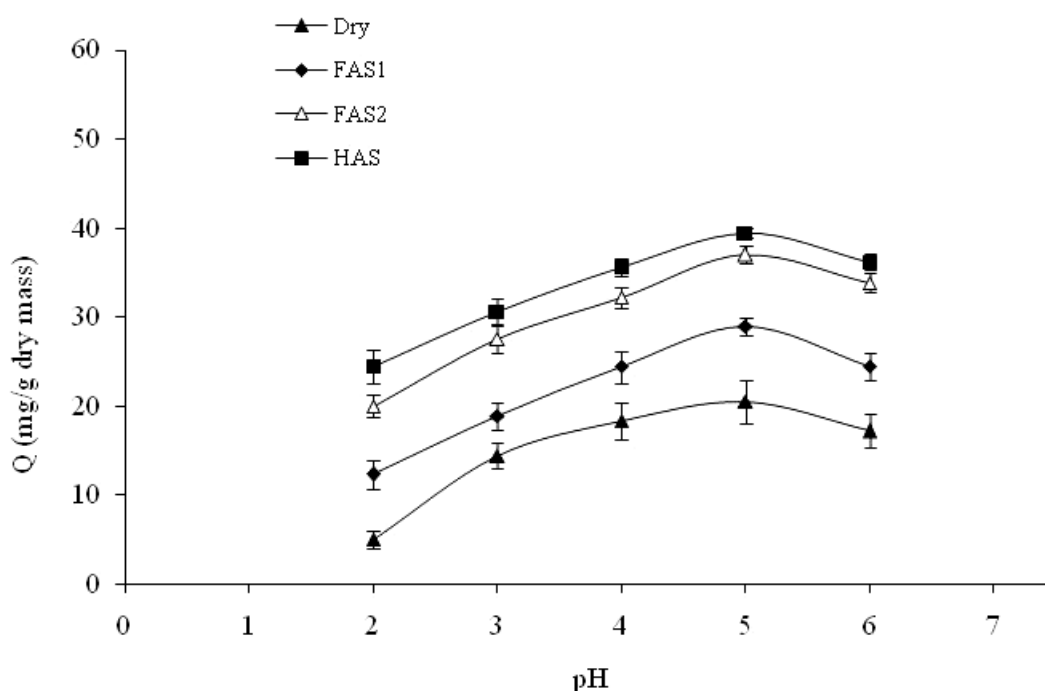
$$R = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100$$

C_0 غلظت اولیه فلز در محلول (میلی گرم بر لیتر)، C_f غلظت نهایی فلز در محلول (میلی گرم بر لیتر) است.

نتایج و بحث

آب‌های آلوده به فلزات سنگین و پساب‌های حاوی مواد رادیواکتیو غالباً دارای pH های مختلف هستند. در این مطالعه اثر pH بر ظرفیت جذب زیستی اورانیوم توسط جاذب‌های تیمار شده مختلف و نمونه شاهد مطالعه شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، مقادیر pH بین ۲ تا ۶ بر جذب زیستی اورانیوم توسط جاذب‌های تیمار شده مختلف و نمونه شاهد آرزولا فلیکولیدس تاثیر گذار بوده است. نتایج نشان داد که بیشترین حذف اورانیوم در pH ۵ است. مشاهده شده است که pH هم

جایگاه‌های اتصال فلز بر سطح جاذب و هم شیمی فلز محلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با پایین آمدن pH و با افزایش H^+ محیط، بار کلی سطح جاذب مثبت خواهد بود، بنابراین جذب یون‌های اورانیل کاهش می‌یابد. این امر به دلیل رقابت بین یون‌های H^+ و یون UO_2^{2+} در محیط اسیدی است. در pH بالاتر از ۵ نیز به دلیل افزایش یون هیدروکسید، مقادیر اورانیوم جذب شده به جاذب‌ها به سبب تشکیل کمپلکس‌های آنیونی با هیدروکسید، کاهش یافته است. در تحقیقات قبلی مشخص شده است که در pH‌های بالا، یون‌های هیدروکسید، اورانیوم را جذب می‌کنند. بنابراین از دسترس سلول خارج می‌شود و جذب کاهش می‌یابد. پس بالاترین میزان جذب در pH برابر ۵ به علت ترکیب مطلوب بین گروه‌های عاملی فعال در سطح جاذب و فرم‌های کاتیونی اورانیوم است (Kasra- Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer Mohammad Ghazvini, 2009; Kermanshahi et al., 2019; Liu et al., 2019).



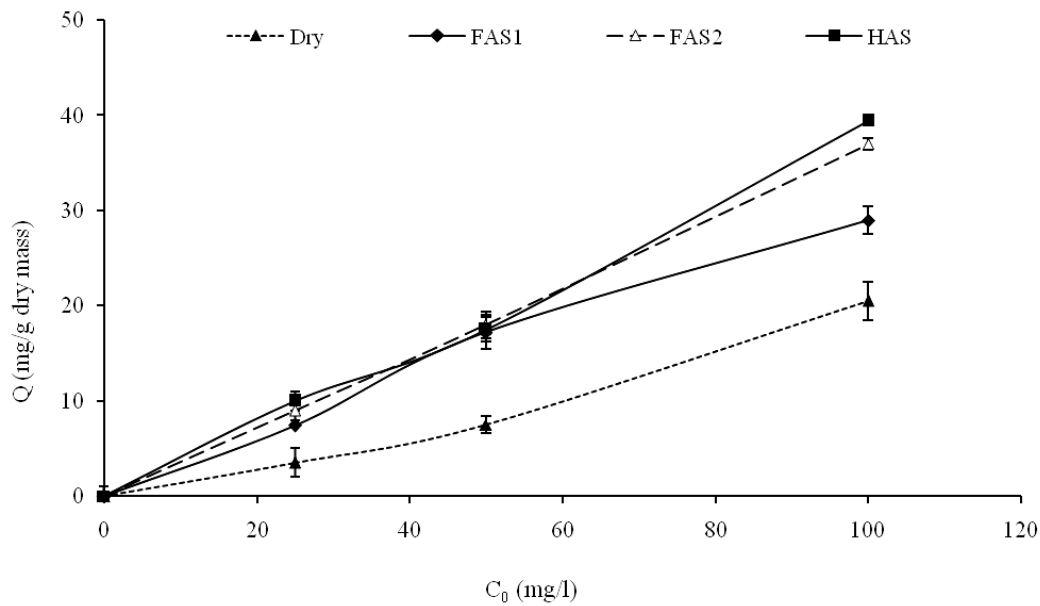
شکل ۱: تأثیر مقادیر مختلف PH در جذب اورانیوم توسط جاذب‌های مختلف (Q=مقدار جذب فلز، DRY=جاذب

خشک تیمار نشده، FAS1=زیست توده تیمار شده با فروسیانید/روش اول، FAS2=زیست توده تیمار شده با

فروسیانید/روش دوم، HAS=زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید/منیزیم کلرید).

به منظور مقایسه ظرفیت جذب جاذب‌ها، آزمایش جذب تعادلی اورانیوم به مدت ۳ ساعت انجام شد. نمودار مقدار

جذب فلز (Q) و غلظت اولیه اورانیوم در محلول (C_0) جهت مقایسه ظرفیت جذب جاذب‌ها در شکل ۲ ترسیم شد.



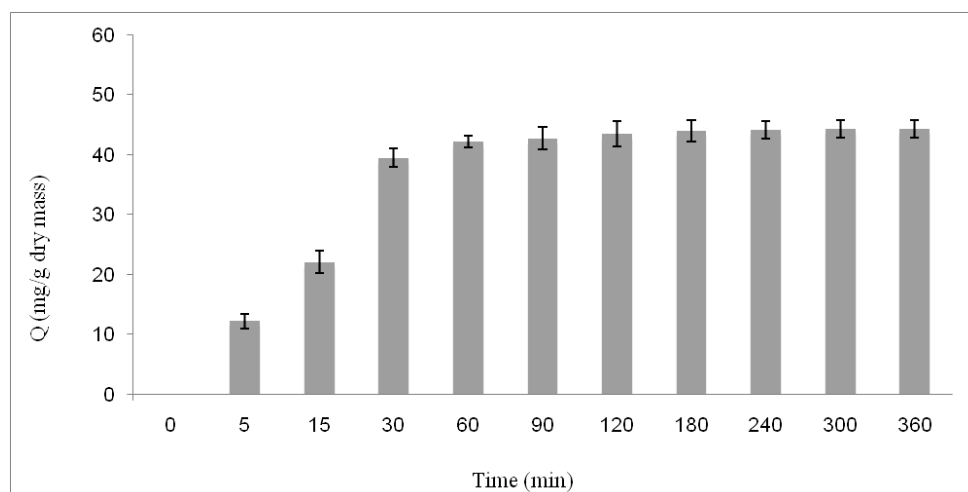
شکل ۲: مقایسه جذب اورانیوم توسط جاذب های مختلف در غلظت های مختلف اولیه اورانیوم (Q = مقدار جذب فلز، C_0 غلظت اولیه فلز در محلول، DRY = جاذب خشک تیمار نشده، $FAS1$ = زیست توده تیمار شده با فروسیانید/روش اول، $FAS2$ = زیست توده تیمار شده با فروسیانید/روش دوم، HAS = زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید/منیزیم کلرید).

در این تحقیق به منظور مقایسه ظرفیت جذب جاذب ها از مدل ایزوترم فرویندلیش نیز استفاده شد (جدول ۱). این ایزوترم یک رابطه تجربی برای سطوح ناهمگن و یا سطوح دارای مکان هایی با میزان تمایل جذب متنوع است. در این مدل فرض بر این است که جایگاه های اتصال قوی تر، ابتدا پر می شوند و با افزایش این مقدار میزان جذب کاهش می یابد. در این معادله K_f ثابت فرویندلیش است که ظرفیت جذب را نشان می دهد و n شدت جذب را مشخص می کند. مقدار K_f و n نشان دهنده جذب بالای جاذب و جداسازی آسان یون ها از محلول است (Adamson & Gast, 1997; Aksu & Kutsal, 1991; Kasra- (Kermanshahi *et al.*, 2019; Lu & Wilkins, 1996; Vijayaraghavan & Yun, 2008). همبستگی خوب (R^2) بین داده های تجربی و مدل جذب فرویندلیش برای جذب اورانیوم نشان داد که آزولاهای تیمار شده، ظرفیت جذب و میل ترکیبی بالا به اورانیوم دارند (جدول ۱). همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، مقادیر K_f و n آزولای اصلاح شده شیمیایی افزایش یافته و این افزایش نشانگر آن است که HAS جاذب بهتری نسبت به بقیه است که برای ادامه مطالعات انتخاب گردید. در این بررسی با توجه به اینکه n برابر ۱/۴۹ و بیشتر از ۱ است، گویای آن است که اورانیوم در محلول به راحتی می تواند جذب جاذب تیمار شده گردد (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

جدول ۱: بررسی عوامل مدل فرویندلیش برای جذب زیستی اورانیوم توسط جاذب‌های مختلف (K_F = ثابت فرویندلیش که ظرفیت جذب را نشان می‌دهد و N شدت جذب، DRY = جاذب خشک تیمار نشده، $FAS1$ = زیست توده تیمار شده با فروسیانید/روش اول، $FAS2$ = زیست توده تیمار شده با فروسیانید/روش دوم، HAS = زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید/ منیزیم کلرید).

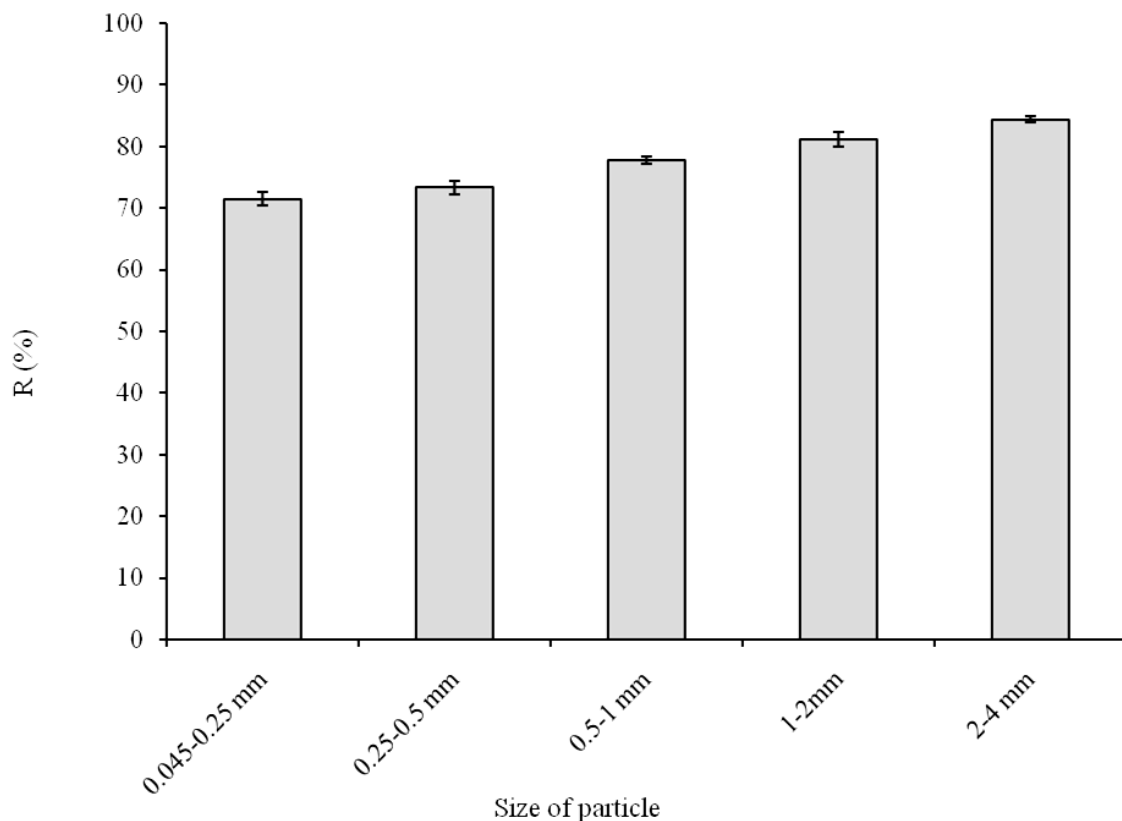
جاذب‌ها	اورانیوم		
	R^2	k_f	n
Dry	۰/۹۱	۰/۲۱	۰/۹۸
FAS1	۰/۸۷	۱/۸۹	۱/۳۹
FAS2	۰/۹۳	۲/۴۶	۱/۳۴
HAS	۰/۹	۳/۵۷	۱/۴۹

نتیجه بررسی تأثیر زمان تماس در جذب یون‌های اورانیوم توسط جاذب تیمار شده HAS در شکل ۳ مشاهده می‌گردد. نتایج نشان داد که جذب زیستی اورانیوم توسط جاذب HAS سریع و در طی ۶۰ دقیقه اول بوده است و در مدت ۶۰ دقیقه به بیشترین مقدار خود برابر با ۴۲/۲ میلی گرم بر گرم زیست توده خشک می‌رسد، پس از آن، تغییرات جذبی تقریباً به شکل ثابت است. زمان تعادل به بسیاری از عوامل مانند نوع زیست توده (تعداد و نوع جایگاه‌های اتصال فلز)، اندازه و شکل زیست توده و وضعیت فیزیولوژیکی زیست توده (فعال یا غیرفعال، آزاد یا بی حرکت) وابسته است (Kasra-Kermanshahi *et al.*, 2019; Lu & Wilkins, 1996). جذب سریع اورانیوم از محلول نشان می‌دهد که محل‌های اتصال اورانیوم بر سطح جاذب هستند و سطح جاذب اولین قسمتی است که در تماس با یون‌های فلزی قرار می‌گیرد. سریع بودن عمل جذب زیستی توسط جاذب‌های زیستی به عنوان یک مزیت در فرآیندهای صنعتی است.



شکل ۳: اثر زمان بر جذب اورانیوم توسط جاذب تیمار شده HAS (Q = مقدار جذب فلز، HAS = زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید/ منیزیم کلرید).

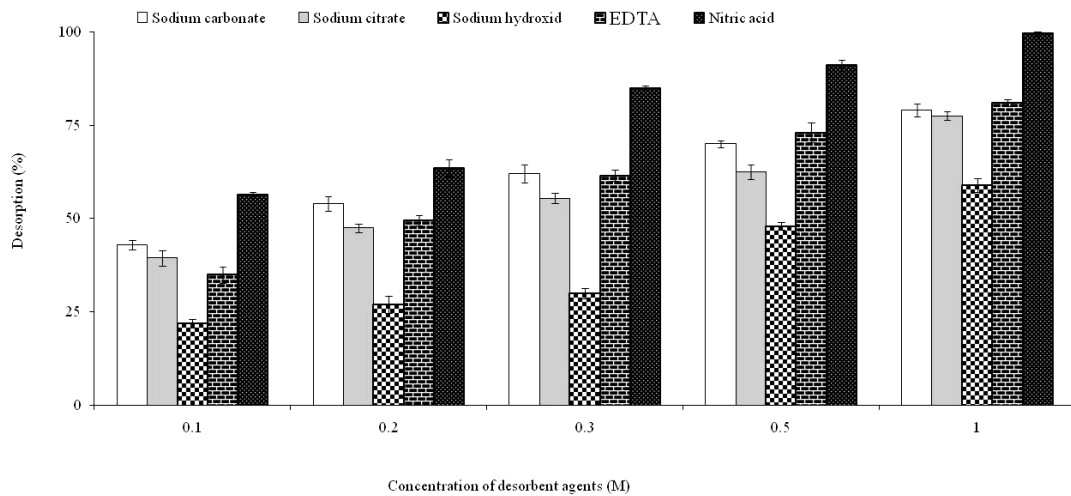
در پژوهش حاضر، بررسی جذب اورانیوم توسط کوچکترین (۰/۲۵ - ۰/۴۵ میلی متر) و بزرگترین (۲-۴ میلی متر) ذرات HAS به دست آمده از آزولا تیمار شده، جهت تأثیر اندازه ذرات بر ظرفیت جذب زیستی اورانیوم بررسی شد. بررسی‌ها نشان دادند که ذرات با اندازه ۲-۴ میلی متر بالاترین میزان حذف اورانیوم را دارند (۸۴/۴٪) که برای کاربرد در مقیاس بزرگ مطلوب هستند (شکل ۴). تحقیقات نشان داده است که میزان جذب فلزات سنگین می‌تواند به اندازه ذرات جاذب بستگی داشته باشد. به عنوان مثال، در تحقیقاتی تأیید شده است که جذب یون‌های Co و Cs , Cd , Ni , Cu , Pb , Zn توسط ذرات بزرگ زیست توده جلبک‌های دریایی بیشتر از ذرات کوچکتر است (Jalali-Rad *et al.*, 2004; Leusch *et al.*, 1997). در صورتیکه، در تحقیقات دیگر مشخص شده است که حداکثر جذب کادمیوم با استفاده از ذرات بسیار ریز از پوست کاج و کیتوزان به دست می‌آید که به دلیل افزایش سطح در جاذب‌ها و کاهش اندازه ذرات آنها است (Al-Asheh & Duvnjak, 1997). اما محققین بر این عقیده‌اند که ساختار و معماری جاذب در سایزهای مختلف نقش مهمی در اتصال یون‌های فلزات دارد که می‌تواند مسئول برخی از اختلافات مشاهده شده در اتصال فلزات توسط جاذب‌ها در سایزهای مختلف باشد (Leusch *et al.*, 1997).



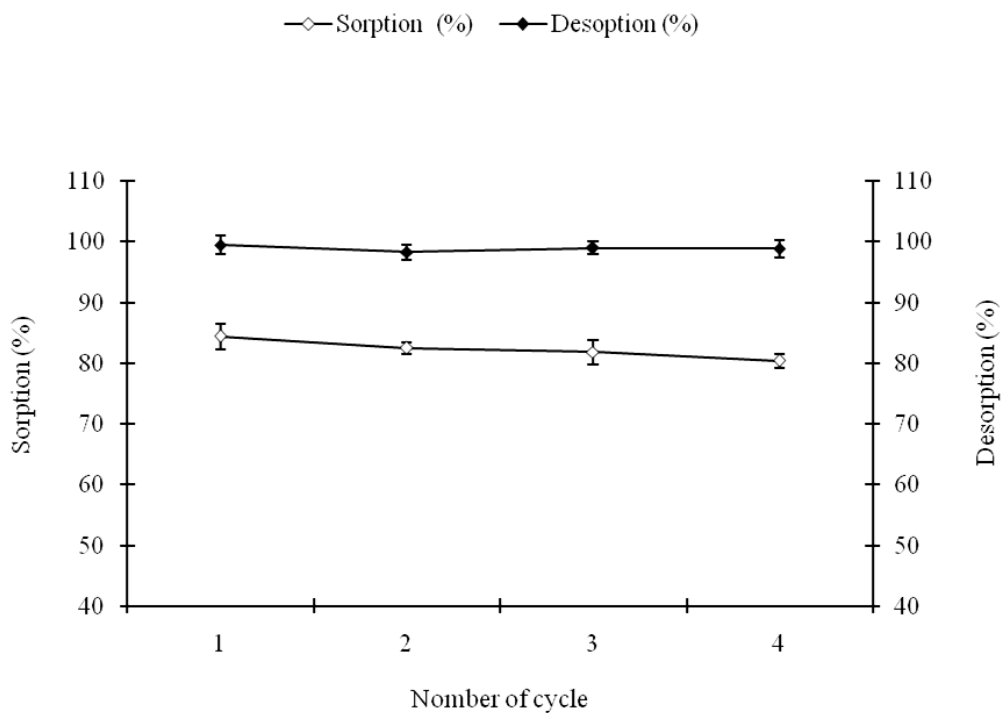
شکل ۴: اثر اندازه ذرات بر حذف زیستی اورانیوم توسط جاذب تیمار شده HAS (R= بازده جذب فلز، HAS= زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید/ منیزیم کلرید).

رهاسازی فلز از جاذب پس از فرایند جذب، بدون آسیب رساندن به ظرفیت جاذب و استفاده مجدد از جاذب یک عامل بسیار مهم برای موفقیت در توسعه فناوری زیست پالایی است. چندین فرآیند ممکن است در جذب زیستی دخیل باشد (به عنوان مثال جذب فیزیکی و یا شیمیایی، تبادل یونی، کمپلکس، رسوب و غیره) (Volesky, 2001). بنابراین اتصالات فلزی با توجه به مکانیسم اتصال آن فلز می‌تواند توسط اسیدها، بازها، عوامل کلات^۱ کننده یا گرما رها شوند. نتایج حاصل از واجذب اورانیوم با استفاده از عوامل رها ساز مختلف در غلظت‌های مختلف از جاذب تیمار شده HAS پس از فرایند جذب اورانیوم نشان داد که HNO_3 یک مولار در بازیافت تقریباً کامل اورانیوم (۹۹/۵٪) از جاذب تیمار شده HAS بسیار کارآمد است (شکل ۵). استفاده مکرر از زیست توده تیمار شده در چندین بار در فرآیندهای جذب و واجذب نشان داد که بازیافت اورانیوم جذب شده بر روی جاذب بسیار کارآمد بوده و ظرفیت جذب اورانیوم توسط جاذب پس از ۴ سیکل جذب- واجذب نزدیک به چرخه اول بوده است و کاهش کمی داشته است (شکل ۶). در صورتیکه آزمایشات سیکل جذب- واجذب سزیم و استرانسیوم توسط همین جاذب تا ۷ سیکل جذب- واجذب نزدیک به چرخه اول بوده است (Ghorbanzadeh Mashkani & Tajer, 2009). نتایج این تحقیق نشان داد که این زیست توده تیمار شده جدید نیز می‌تواند حداقل تا ۴ مرتبه در فرایندهای زیست پالایی اورانیوم به صورت مکرر استفاده شود و هیچگونه تغییر قابل توجهی در ظرفیت جذب اولیه اورانیوم نداشته باشد. این امر در کاهش هزینه‌های آماده سازی، تولید زیست توده و صرفه‌جویی در زمان مقیاس صنعتی فرایندهای زیست پالایی از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا کاهش هزینه فرآیند و همچنین وابستگی فرآیند به تأمین مداوم جاذب زیستی با استفاده مجدد زیست توده امکان پذیر می‌گردد (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

¹ Chelating agent



شکل ۵: رها سازی اورانیوم از جاذب HAS/اورانیوم توسط عوامل رها ساز مختلف (HAS=زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید / منیزیم کلرید).



شکل ۶: اثر چرخه جذب/وا جذب اورانیوم بر حذف زیستی اورانیوم توسط جاذب تیمار شده HAS (HAS=زیست توده تیمار شده با هیدروژن پراکسید / منیزیم کلرید).

نتیجه گیری

حذف و بازیافت رادیونوکلیدها و فلزات سنگین با توجه به ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی بسیار مهم است. در این پژوهش امکان حذف اورانیوم توسط جاذب های مختلف به دست آمده از تیمار آزولا فیلیکولیدس با موفقیت نشان داده شد.

نتایج نشان دادند که برای جذب زیستی اورانیوم از محلول‌ها، جاذب تیمار شده با هیدروژن پراکسید/ منیزیم کلرید به طور قابل توجهی کارآمدتر از زیست توده غیر تیمار شده و دیگر جاذب‌ها است. امروزه ثابت شده است که در جذب زیستی فلزات با استفاده از پیش تیمار جاذب زیستی، می‌توان گروه‌های عاملی غیرفعال جاذب را به گروه‌های عاملی فعال در فرآیند جذب تبدیل کرد. پژوهش حاضر، با تیمار شیمیایی زیست توده *آزولا فیلیکولیدس*، موفق به معرفی جاذب زیستی بسیار موثر HAS جهت حذف اورانیوم از محلول‌ها گردید که می‌تواند به عنوان کاندید خوبی برای حذف اورانیوم از پساب‌های هسته‌ای در آینده باشد.

منابع

- Adamson, A. and Gast, A. (1997) Adsorption of gases and vapors on solids. in: Physical chemistry of surfaces, Vol. 210, Wiley, pp. 599-676.
- Aksu, Z. and Kutsal, T. (1991) A bioseparation process for removing lead (II) ions from waste water by using *C. vulgaris*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 52(1), 109-118.
- Al-Asheh, S. and Duvnjak, Z. (1997) Sorption of cadmium and other heavy metals by pine bark. Journal of hazardous materials, 56(1-2), 35-51.
- Aryal, M. and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2015) Bioremoval of heavy metals by bacterial biomass. Environmental monitoring and assessment, 187(1), 4173.
- Dushenkov, V., Kumar, P.N., Motto, H. and Raskin, I. (1995) Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. Environmental science & technology, 29(5), 1239-1245.
- Ghorbanzadeh Mashkani, S. and Tajer Mohammad Ghazvini, P. (2009) Biotechnological potential of *Azolla filiculoides* for biosorption of Cs and Sr: Application of micro-PIXE for measurement of biosorption. Bioresource technology, 100 (6), 1915-1921.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y. and Chen, J. (2010) Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. Bioresource technology, 101(22), 8599-8605.
- Jalali-Rad, R., Ghafourian, H., Asef, Y., Dalir, S., Sahafipour, M. and Gharanjik, B. (2004) Biosorption of cesium by native and chemically modified biomass of marine algae: introduce the new biosorbents for biotechnology applications. Journal of hazardous materials, 116(1-2), 125-134.
- Kasra-Kermanshahi, R., Bahrami-Bavani, M. and Tajer-Mohammad-Ghazvini, P. (2019) Microbial clean-up of uranium in the presence of molybdenum using pretreated *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, 322(2), 1139-1149.

- Leusch, A., Holan, Z.R. and Volesky, B. (1995) Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically reinforced biomass of marine algae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 62(3), 279-288.
- Leusch, A., Holan, Z.R. and Volesky, B. (1997). Solution and particle effects on the biosorption of heavy metals by seaweed biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 61(3), 231-249.
- Liu, L., Liu, J., Liu ,X., Dai, C., Zhang, Z., Song, W. and Chu, Y. (2019) Kinetic and equilibrium of U (VI) biosorption onto the resistant bacterium *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of environmental radioactivity*, 203, 117-124.
- Lu, Y. and Wilkins, E. (1996) Heavy metal removal by caustic-treated yeast immobilized in alginate. *Journal of hazardous materials*, 49(2-3), 165-179.
- Prakash, D., Gabani, P., Chandel, A.K., Ronen, Z. and Singh, O.V. (2013) Bioremediation: a genuine technology to remediate radionuclides from the environment. *Microbial Biotechnology*, 6(4), 349-360.
- Prusty, P.K. and Satapathy, K.B. (2020) Phytoremediation of Waste Water by Using Azolla-Anabaena Consortium and Its Aquatic Associates: A review. *Plant Archives*, 20, 1933-1943.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Leys, N. and Janssen, P. (2018) Potential of higher plants, algae, and *cyanobacteria* for remediation of radioactively contaminated waters. *Chemosphere*, 207, 239-254.
- Vijayaraghavan, K. and Balasubramanian, R. (2015) Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. *Journal of environmental management*, 160, 283-296.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.-S. (2008) Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26(3), 266-291.
- Volesky, B. (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 203-216.
- Yang, J. and Volesky, B. (1999) Biosorption of uranium on Sargassum biomass. *Water Research*, 33(15), 3357-3363.
- Yasmin, S., Barua, B.S., Uddin Khandaker, M., Kamal, M., Abdur Rashid, M., Abdul Sani, S.F., Ahmed, H., Nikouravan, B. and Bradley, D.A. (2018) The presence of radioactive materials in soil, sand and sediment samples of Potenga sea beach area, Chittagong, Bangladesh: Geological characteristics and environmental implication. *Results in Physics*, 8, 1268-1274.

Bio-removal of uranium by the treated biosorbent from aqueous solutions as an efficient strategy in uranium bioremediation

N. Namdarian¹, P. Tajer Mohammad Ghazvini^{2*}, A. S. Tabatabaee bafroee³

Received:2020.09.11

Accepted:2020.10.11

Abstract

The aim of this study was to evaluate the ability of treated *Azolla filiculoides* to uranium biosorption as a new biosorbent. In this study, uranium biosorption experiments were performed by untreated biomass and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -treated biomass and $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MgCl}_2$ -treated biomass. Studies showed that the maximum uranium uptake capacity by various treated sorbents is pH 5. Freundlich isotherm was examined to evaluate the experimental data. The results showed that the treated sorbent with $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MgCl}_2$ is more efficient than other sorbents and its uranium adsorption is relatively rapid, reaching to the maximum in 60 minutes. Maximum uranium adsorption was obtained using the large adsorbent particles (2-4 mm). The maximum adsorption capacity of uranium ions by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MgCl}_2$ -treated sorbent under optimal conditions is about 42.2 mg /g dry biomass. The results showed that pretreatment can be a good way to increase the adsorption capacity of biosorbents.

Keywords: Biofilter, Biosorption, Pretreatment, Radioactive Wastes, Uranium

1- MSc, Department of biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

*(Corresponding author: ptajer@aeoi.org.ir)

3- Assistant Professor, Department of biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Content

Morphological comparison of the <i>Cobitis</i> species from Iranian inland waters using geometric morphometric method	
S. Eagderi, A. Mouludi-Saleh	20
Phytochemical Evaluation of <i>Pteridium aquilinum</i> in Masal Elevation Gradient of Gilan province	
R. Tamartash, M.R. Tatian, H. Andarz Chamani, S.H. Zali, S.M. Ehsani	37
The Effect of Ecological and Edaphic Factors on Active Ingredients of <i>Plantago major</i> L.	
N. Jafari, M. Faghani Panbezari, A. Hosseinzadeh Collagar, M.A. Ebrahimzadeh	55
Optimization of EPS production conditions by <i>Leuconostoc dextranicum</i> isolated from traditional Syrian cheese	
M. Haj Mustafa, B. Al-Oklah, Gh. Ashouri	71
Interspecific and intraspecific variations in seed germination and emergence of three <i>Polygonum</i> species	
M. Diyanat	92
Assessment of Kardeh River Using multimetric Biological Index and Multivariate Statistics	
S. Sargolzaei, A. Farashi, O. Safari, H. Ahmadnia Motlagh	109
Assessment of swimming behaviour and colour preferences in adult zebrafish (<i>Danio rerio</i>) using the T-maze model	
S. Shafiei Sabet, Sh. Jami, F. Alizadeh Ladehmakhi	128
Isolation of yeast with probiotic properties from human skin	
M. Ghaffari, F. Darvishi, S. Nazeri	147
Mesoporous iron oxide nanoparticle synthesis: Study of its biological effects on lymphocytes and chronic myelogenous leukemia cells K562	
M. Mehrabi, M. Faezi Ghasemi, B. Rasti, M. Falahati, A. Mirzaie	162
Bio-removal of uranium by the treated biosorbent from aqueous solutions as an efficient strategy in uranium bioremediation	
N. Namdarian, P. Tajer-Mohammad-Ghazvini , A.S. Tabatabaee bafroee	178

Journal of Applied Biology
Spring 2020

Alzahra University - Vice Chancellery for Research

Chief Editor: M. Soudi, Professor of Alzahra University

Director in charge: M.Seifali, Assistant Professor of Alzahra University

Associate Editor: P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

Editorial Boards

M. Aghdasi, Associate Professor of Golestan University

N. Hosseinmardi, Associate Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences.

F. Darvishi, Professor of Alzahra University

M. Seyyedi , Associate Professor of Tehran University

A. Abdi Ali, Associate Professor of Alzahra University

A. Saboora, Associate Professor of Alzahra University

P. Ghadam, Associate Professor of Alzahra University

Z. Minochehr, Associate Professor of Tehran University

T. Valinassabpouri, Research Professor of Iranian Fisheries Science Research Institute

International Editorial Board: H. Rajaei, Professor of Zoology Research Alexander Quinn

SH. Shahabi, Professor, Research Director of Highland Pharmaceutical Company and Associate Professor of South West Nechroathy Medical College

Executive Manager: Sh. Borjian

Publisher: Alzahra University - Vice Chancellery for Research

English& Persian Editor: Banafsheh Mohamadi

Printing and Binding: Graduate Publishing

Circulation: 10 copies

Publication Frequency: Quarterly

Price: 10000 Rls

In order to have access to the table of Contents and abstracts contact:

Address: Alzahra University-Vice Chancellery for Research, Vanak Sq, Tehran, 1993891176, Iran.

Tel/Fax:021- 85692205

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>

ISSN: 1607- 9884

Email: Japplbiol@alzahra.ac.ir