وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان:

کنترل بیولوژیکی توده های شکوفا شده در حوزه جنوبی دریای خزر

مجری:
رضا صفری

شماره ثبت
۵۱۵۹۷

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان طرح/پروژه : کنترل بیولوژیکی توده‌های شکوفا شده در حوزه جنوبی دریای خزر
شماره مصوب پروژه : ۹۱۰۹۸-۱۲-۷۶-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : رضا صفری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : رضا صفری
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : غلامعباس زرشناس، رضا پورغلام، علی گنجیان، حسن نصرالله زاده ساروی، فریبا واحدی، فرامرز لالویی، یوسف علومی، زهرا یعقوب زاده، فریبا اسماعیلی، مرتضی طهماسبی، غلامرضا رازقیان، اسحاق علوی، حسن ملائی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : حسین نگارستان
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۹۱/۶/۱
مدت اجرا : ۳ سال و ۴ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: کنترل بیولوژیکی توده های شکوفا شده در حوزه جنوبی دریای خزر

کد مصوب : ۹۱۰۹۸-۱۲-۷۶-۲

شماره ثبت (فروست) : ۵۱۵۹۷ تاریخ : ۹۶/۲/۶

با مسئولیت اجرایی جناب آقای رضا صفری دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اکولوژی منابع آبی در تاریخ ۹۵/۱۰/۷ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس بخش ژنتیک آبزیان در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱ سیانوباکترها ۳
۱-۲-اثرات مضر سموم سیانوباکترها در اکوسیستم های آبی ۷
۱-۳- روش‌های کنترل و جلوگیری از شکوفایی و فاکتورهای موثر بر فرآیند ۹
۱-۴- مروری مطالعات انجام شده ۱۴
۲-مواد و روش کار ۱۷
۲-۱-مواد و دستگاهها ۱۷
۲-۲-روش کار ۱۷
۲-۳- تجزیه و تحلیل داده ها ۲۱
۳-نتایج ۲۲
۳-۱- نتایج تست های بیوشیمیایی ۲۲
۳-۲- نتایج رویارویی باکتری و جلبک در مقیاس آکواریوم ۲۲
۳-۳- نتایج رویارویی باکتری و جلبک در محیط کشت دو لایه ۲۴
۳-۴- تغییرات کلروفیل a ۲۴
۳-۵- تغییرات اکسیژن محلول ۲۵
۳-۶- تغییرات فسفات ۲۶
۳-۷- تغییرات نیترات ۲۷
۴-بحث و نتیجه گیری ۲۸
۴-۱- سودوموناس ۲۸
۴-۲- کلروفیل a ۳۰
۴-۳- پارامترهای شیمیایی ۳۰
منابع ۳۲
چکیده انگلیسی ۳۶

چکیده

در سال های اخیر بروز بلوم جلبکی ناشی از نودولاریا به یکی از مشکلات جدی تبدیل شده که زندگی موجودات آبزی ساکن در حوضه جنوبی دریای خزر را به مخاطره انداخته است. نودولاریا جزء جلبک های سبز-آبی بوده و بواسطه تولید سم نودولارین از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. در این مطالعه، ابتدا سه گونه سودوموناس شامل آئروجینوزا، پوتیدا و فلورسانس از مصب رودخانه تجن جداسازی و با استفاده از تست های بیوشیمیایی و مقایسه با سوش های استاندارد شناسایی شدند. به منظور ارزیابی روند تغییرات نودولاریا (لوگ ۵) و گونه های سودوموناس (لوگ های ۷ و ۸) در مقیاس آکواریوم، ۳۰ تیمار انتخاب و به مدت ۱۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهایی نظیر کلروفیل a، اکسیژن محلول، فسفات و نیترات نیز همزمان آزمایش شدند. نتایج نشان داد که روند کاهشی نودولاریا در تیمارهای حاوی گونه آئروجینوزا و مخلوط باکتریها نسبت به سایر بهتر بوده و لوگ ۸ باکتری دارای تاثیر مهارکننده بیشتری نسبت به لوگ ۷ بوده است. در کشت دو لایه نیز تیمارهای اخیر دارای اثر با جلبک کشی و دو تیمار فلورسانس و پوتیدا دارای خاصیت مهارکننده رشد جلبک بودند. روند تغییرات کلروفیل a ، اکسیژن محلول و نیترات در تمامی تیمارهای حاوی باکتری خصوصا آئروجینوزا و مخلوط باکتریها کاهشی بوده و در بیشتر زمان هانیز معنی دار بوده است. روند تغییر پارامترهای مذکور در تیمار شاهد تقریبا ثابت بوده است. هر چند که تغییرات فسفات در زمان های مختلف کاهش نسبی داشته ولی با این وجود اختلاف معنی داری مشاهد نگردید. پارامترهای مورد بررسی در این مطالعه در ارتباط مستقیم با جمعیت جلبک بوده و کاهش یا افرایش آنها باعث کاهش یا افزایش جمعیت جلبک میگردد. نتیجه گیری که از این مطالعه حاصل میشود آن است که گونه های مختلف سودوموناس قادر به کاهش جمعیت جلبک نودولاریا در شرایط آزمایشگاهی بوده و در تیمارهای ترکیبی ، نتایج بدست آمده بهتر بوده است. با انجام مطالعات مذکور در قالب مزوکوزم و ارزیابی متابولیت های باکتری، آنالیز کمی و کیفی پارامترهای شیمیایی دخیل در انجام فرآیند و دستیابی به نتایج مستدل، میتوان از این جنس بعنوان باکتری شاخص در هنگام بروز بلوم جلبکی در اکوسیستم بزرگتر استفاده نمود.

کلمات کلیدی: شکوفایی جلبک، نودولاریا، سودوموناس، کنترل بیولوژیک

۱-مقدمه

دریای خزر از نظر شیلاتی، اقتصادی و تجاری، اقلیمی و بوم شناختی دارای اهمیت زیادی است. وجود کشورهای مختلف در حاشیه ی این دریا سبب گردیده تا ضوابط حقوقی آن در حوزه های متفاوت از جمله کشتیرانی، صید و بهره برداری از منابع نفتی و گازی مورد بحث و تبادل نظر قرار گیرد. اما حفظ سلامت محیط زیست و آبزیان آن زیاد مورد توجه قرار نگرفته و فعالیتهای انسانی اعم از صنعتی، کشاورزی بصورت متمرکز وغیر متمرکز بدون تقریبا" هیچ گونه ضوابطی در اطراف آن و یا در دریا صورت میگیرد. در نتیجه، وضعیت زیستی و غیرزیستی آن را به جایی رسانده که عزم ملی و منطقه ای را در جهت پیشگیری و توقف اثرات منفی اعمال شده بر آن طلب می کند(Nasrollahzadeh *et al*., 2011).

اثرات منفی فعالیتهای انسانی بر موجودات زنده ی دریای خزر بر سطوح مختلف زیستی، از میکرو ارگانیسم ها تا موجودات و ماهیان بزرگ دریایی نمایان می گردد. یکی از رویدادهای مهم که عموما" با تغییر فصل در دریا رخ می دهد، رشد و افزایش تعداد گونه های خاصی از فیتوپلانکتون ها (تولید کنندگان اولیه دریا و اولین حلقه از زنجیره ی غذایی) می باشد. این رویداد در محیطهای طبیعی و دست نخورده به نحوی صورت می پذیرد که عدم توازن را در اکوسیستم سبب نمی گردد. اما اضافه شدن عوامل خارجی از جمله فعالیتهای انسانی (مستقیم و غیر مستقیم) زمینه رشد و تکثیر بیش از حد این فیتوپلانکتون ها و یا سایر فیتوپلانکتون های فرصت طلب را فراهم می کند. از اثرات مستقیم ناشی از فعالیتهای انسانی میتوان به وارد نمودن فاضلابهای کشاورزی، صنعتی و خانگی به دریا اشاره نمود که سبب ورود مواد مغذی اضافی به دریا می گردند. افزایش مواد مغذی سبب اختلال در توازن زیستی شده و پدیده اوتریفیکاسیون در دریا می گردد (Seng, 2001; Kumar & Kakvan, 2000; EPA, 2000) برخی از جلبکها نظیر جلبک های سبز- آبی از مواد معدنی نیز همانند مواد آلی می توانند به عنوان منابع غذایی استفاده کنند، لذا شکوفایی سیانوفیتی در شرایط مناسب (دما، مواد مغذی و ...) بیش از سایر گروههای جلبکی اکوسیستم های آبی را تهدید می کند(EPA, 2000) . سیانوفیتا بصورت طبیعی بخش کوچکی از هر اکوسیستم آبی اعم از شیرین، شور و لب شور را تشکیل می دهند. رشد این گروه درتراکم انبوه (به تعداد ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ عدد در میلی لیتر) اصطلاحا" شکوفایی جلبکی (bloom) نامیده شده و گاها" ممکن است که تعداد سلولهای جلبک به بیش از یک میلیون در میلی لیتر برسد. شکوفائی جلبکی به رنگهای سبز، قهوه ای مایل به زرد و قرمز دیده می شود (Tsaloglou, 2016; Seng, 2001).

بعضی از جلبک‌های سبز-آبی سمومی تولید می‌کنند که وجود این سموم و افزایش آنها در اکوسیستم های آبی باعث به مخاطره انداختن حیات موجودات زندهٔ آبزی و اقتصادی میگردد. همانطوریکه اشاره شد فعالیت‌های انسانی مانند ورود فاضلابهای شهری، صنعتی و کشاورزی که حاوی عناصر غذایی فراوانی هستند باعث شکوفایی این جلبک‌ها می‌گردد و در نتیجه اکسیژن آب کاهش یافته و آب رنگ و بوی نامطبوع به خود می گیرد. این امر سبب افزایش مرگ و میر موجودات زنده میگردد(Kumar & Kakvan, 2000). با

ارزیابی شکوفایی جلبکی در منابع آبی و اتخاذ روشهای مناسب برای مبارزه و کنترل آنها می‌توان میزان آلودگی منابع آبی و متعاقب آن سموم جلبکی خصوصا سیانوباکترها را تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش داد و سلامت و بقاء موجودات زنده را تضمین کرد(EPA, 2000).

۱-۱- سیانوباکترها

جلبک‌های سبز- آبی با بیش از ۳ میلیون سال قدمت از قدیمی‌ترین موجودات بوده که سالانه با بلوم خود سبب مرگ و میر بسیاری از آبزیان و احشام می‌گردند (Tsaloglou, 2016). این گروه از جلبک ها جزء ارگانیسم های پروکاریوت بوده که در تمام اکوسیستمهای آبی اعم از آب شیرین، لب شور و شور وجود دارند. سیانوباکترها ، تحت شرایط مناسب، به سرعت تکثیر یافته و باعث بروز بلوم یا شکوفایی جلبکی می شوند(Kaloudis *et al.*, 2013). مطالعات نشان داد که بیش از ۱۰۰ گونه از سیانوباکترها در غالب ۴۰ جنس توانایی تولید توکسین را دارا می باشند (Jayatissa *et al.*, 2006) .مهمترین گروه تولید کننده توکسین های جلبکی شامل میکروسیستیس، نودولاریا، آنابنا، Aphanizomenon ،Planktothrixو Cylimdraspermopsis میباشند(Nasrollazodeh *et al.*, 2011).

۱-۱-۱- تاریخچه

سیانوفیت‌ها یا جلبک‌های سبز - آبی در واقع همان سیانوباکترها هستند که تا سال ۱۹۷۸ این میکروارگانیسم‌ها جزء جلبک‌ها محسوب می‌شدند تا اینکه در سال ۱۹۷۸ دانشمندی به نام Stanier و همکارانش بررسی علمی بسیار منطقی روی این میکروارگانیسم‌ها انجام دادند و ثابت نمودند که سیانوفیت‌ها نه تنها فاقد هسته و غشاء هسته می‌باشند، بلکه از نظر ضریب رسوب‌گذاری میتوکندری 16sRNA بوده و شباهت بسیار زیاد بین آنها و باکتریها وجود دارد(Tsaloglou, 2016).

۱-۱-۲- ویژگیهای ساختاری و بیولوژیکی سیانوباکترها

سیانوباکترها فاقد هستهٔ مشخص، مژک و تاژک بوده و گروه اصلی پروکاریوتها را تشکیل می‌دهند. از نظر ساختمانی حاوی دیوارهٔ سلولی هستند، که در باکتریهای گرم منفی وجود دارد. با این تفاوت که در بسیاری از آنها لایهٔ پکتینی و سلولزی نیز وجود دارد. این میکروارگانیسم دارای رنگدانه‌های مخصوص فیکوبیلی پروتئین‌ها (فیکواریترین، آلوفیکوسیانین و فیکوسیانین)، گزانتین، کلروفیل a و کاروتن بوده و معمولاً فاقدکلروفیل c و b می باشند. جلبک‌های سبز - آبی علاوه بر کلروفیل a دارای رنگ خاص آبی به نام فیکوسیانین نیز که کاربرد گسترده ای در صنایع غذایی و دارویی داشته و در گروه فیکوبیلی پروتئین ها قرار میگیرد (Yan et al., 2014; Lee et al., 2013). تقریباً در تمامی گونه‌ها اطراف سلول را یک غشاء ژله‌ای فرا گرفته است که از بخش غشاء سلولی و یا از سلول مستقیماً ترشح می‌شود. واکوئل در سیانوباکترها از انواع هوایی و یا غذایی هستند که واکوئل‌های

هوایی موجب شناوری سیانوباکترها در سطح آب و بهبود فتوسنتز می‌گردند. معمولاً ذرات رنگی (کروموبلاست) بر روی تیلاکوئید قرار دارند. سنتروبلاست‌ها در مرکز سلول قرار دارند و برخلاف کروموبلاست‌ها ناحیهٔ بی‌رنگ محسوب می‌شوند. طیف رنگ و رنگدانه‌ها در سیانوباکترها با توجه به نوع گونه متفاوت است. معمولاً، هیدراتهای کربن در سیانوباکترها وجود دارند که به آمیلوپکتین معروفند(Tsaloglou, 2016).

جلبک‌های سبز – آبی براساس نوع و نسبت رنگدانه‌ها ممکن است به رنگ‌های چمنی، سیاه، قرمز، قهوه‌ای، زرد و یا بنفش دیده شوند و با وجودی که سیانوباکترها فاقد هرگونه مژک یا تاژک‌اند، ولی نوعی حرکت ویژه در گونه‌های رشته‌ای دیده شده که هنوز مکانیسم دقیق آن روشن نشده است. در حقیقت گونه‌های رشته‌ای یک حرکت بطئی خزنده داشته و گونه‌های تک سلولی و تشکیل دهندهٔ کلنی فاقد تحرک هستند. اندازه سلول در برخی از گونه های جلبک‌های سبز – آبی (در گونه‌های رشته‌ای) تا حدی بزرگ می‌شود که با چشم غیرمسلح قابل دید می باشد. در جلبک‌های رشته‌ای مواد ژله‌ای به شکل لوله بوده و سلولها در امتداد یکدیگر از طریق پلاسمودیوم به یکدیگر متصل می باشند(Tsaloglou, 2016).

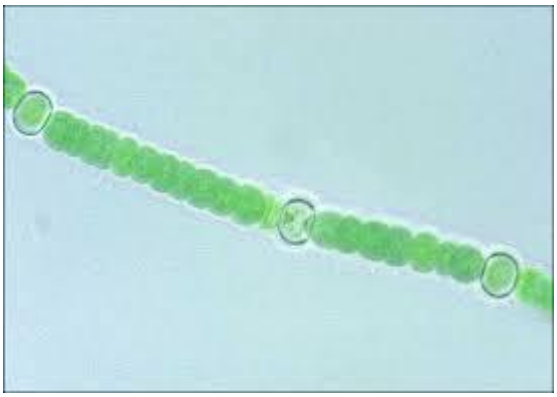
۳-۱-۱- شکوفایی (Bloom)

بلومهای سمی سیانوباکترها در ابتدا از طریق گزارشات موجود پیرامون مرگ و میر آبزیان مورد توجه قرار گرفت. اولین مدرک از این نوع گزارشات در سال ۱۸۷۸ در استرالیا مشاهده شده است (Nasrollahzadeh *et al.*, 2011). سیانوباکترها معمولاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شوند و معمولاً در تمام طول سال حضور دارند. امروزه با استفاده از دستگاه‌های مدرن اغلب می‌توان ایجاد بلوم‌های سمی با فرکانس زیاد را حتی قبل از اینکه مسمومیتی اتفاق بیفتد، گزارش و پیش‌بینی نمود. در زمان بلوم، سیانوباکترها بر روی سطح آب به صورت غلاف موسیلاژی درآمده (به دلیل داشتن واکوئل‌های گازی) و اکسیژن محلول را کاهش می‌دهند. تولید توکسین (سم) توسط این جلبک‌ها زندگی آبزیان و سایر مصرف‌کنندگان را به مخاطره می‌اندازد. در دریاچه‌های غنی از فسفر و نیتروژن، جلبک‌های سبز – آبی از گونه‌های غالب جلبک به شمار می‌روند. این جلبک‌ها قادر به جذب مستقیم نیتروژن از اتمسفر بوده ولی با این وجود فسفر را از محیط آبی و به شکل معدنی فسفات مورد استفاده قرار میدهند. بنابراین برای کنترل غنی شدن اکوسیستم های آبی، در درجهٔ اول می‌بایست غلظت فسفر، به عنوان یک عامل محدودکننده، را تحت کنترل قرار داد. پس فسفر مهمترین عنصر محدودکنندهٔ سیانوباکترها است. غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر فسفر در آب قابل قبول، در حالی که غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر از آن بسیار زیاد و غیرقابل قبول بوده زیرا باعث رشد و تکثیر و متعاقب آن شکوفایی جلبک میشود(Nasrollahzadeh *et al.*, 2011). بلوم ناشی ازجلبکهای مضر باعث بروز مشکلات زیست محیطی در اکوسیستمهای آبی میشود. بلوم جلبکی باعث تغییر در تعادل اکوسیستم شده و این پدیده زندگی سایر موجودات

دریایی را تحت تاثیر قرار میدهد(Kononen, 2001) .هر چند که بلوم وشکوفایی جلبکی عمدتا ناشی از جلبکهای سمی می باشد ولی با این وجود برخی از جلبکهای غیر سمی نیز قادر به شکوفایی بوده که خود دارای اثرات منفی بر اکوسیستم می باشد. با تجزیه این جلبکها میزان اکسیژن محلول کاهش یافته که این امر باعث مرگ آبزیان شده واز طرف دیگر باعث ایجاد بوی بد و بدنبال آن کاهش کیفیت آب میشود.کاهش اکسیژن در محیطهای دریایی منجر به تشکیل مقادیر بسیار بالایی از سولفید سمی میشود (Welsh *et al.*, 2001). بلوم زمانی رخ می دهد که اتروفیکاسیون افزایش یافته که خود ناشی از ورود فاضلاب انسانی و پسابهای صنعتی می باشد(Bonsdorff *et al.*, 2002). اتروپیکاسیون هنگامیکه مقادیر بسیار بالا از مواد مغذی عمدتا" نیتروژن و فسفر وارد محیط آبی شده و باعث رشد جلبک ها وگیاهان میشود، رخ میدهد. مطالعات نشان داده به هنگامیکه نسبت N:P ۱۶ باشد شکوفایی جلبکی اتفاق می افتد(Locas *et al.*, 2003). علاوه بر فسفرونیتروژن ، عناصر دیگرنظیر آهن وسولفات از پارامترهایی هستند که بر بلوم جلبکی تاثیر گذار می باشند. سولفات در غلظتهای بالا باعث کاهش بلوم جلبکی می شود.اهمیت نور و روشنایی بیشتر از دمای آب در جهت بروز شکوفایی جلبک می باشد.به هنگامیکه نور کافی جهت فرایند فتوسنتز در دسترس می باشد جلبک با سرعت بیشتری شروع به رشد وتکثیر کرده و بلوم تشکیل میگردد(Stal and Walsby, 2000).

۴-۱-۱- جلبک نودولاریا

نودولاریا اسپومیجناسیانوباکتررشته ای هتروسیت بوده ومتعلق به پروکاریوتهای فتواتوتروف هوازی می باشد که با داشتن آکینت هایی بادیواره ضخیم ، از سایر گونه ها متمایز می باشد(تصویر ۱-۱). گونه مذکور باعث بلوم جلبکی درآبهای باشوری پائین تالب شوروهمچنین شور مثل دریاچه ها ،دریاچه های ساحلی ، مصب ودریاها میشود. تریکوم های این جلبک مستقیم، سیلندری بوده وطول آن بیشتراز ۵۰۰ میکرومتر میباشد. اندازه سلولهای رویشی بین ۹/۵–۷/۸ میکرومتر در ۳/۹–۲/۵ میکرومتربوده و دارای چند آئروتوپ میباشند. هتروسیتها ما بین سلولهای رویشی تریکوم قرارگرفته و اندازه آنها نیز ۱۱/۳– ۹/۸ میکرومتر در ۶/۷–۴/۶ میکرومتر میباشد. آکینت ها نیز به شکل کروی– بیضوی بوده و اندازه آن نیز ۱۱/۷–۱۰/۶ میکرومتر در ۸–۴/۸ میکرومتر بوده و بصورت منفرد ویا دوتایی وگاهگاهی ۵–۳تایی دیده میشود(Guiry,2014; McGregor *et al.*, 2012).



تصویر ۱-۱: شکل میکروسکوپی نودولاریا

۵-۱-۱- سم نودولارین

از مهمترین سموم سیانوباکتریایی میتوان به میکروسیس‌تین، نودولارین، آناتوکسین a، آناتوکسین a(S) و ساکسی‌توکسین اشاره نمود. نودولارین در گونهٔ *Nodularia spumigena* در مناطق طبیعی نظیر دریای بالتیک و آب‌های شور، مصب‌ها و دریاچه‌های ساحلی استرالیا و نیوزیلند گزارش شده است. با این وجود بهترین محل شناخته شدهٔ بلوم *N. spumigena* در سال ۱۸۷۸، دریاچهٔ الکساندرینا استرالیا بوده که دارای شوری نسبتا پائینی بوده است. نمونه‌برداری‌های مستمر که به مدت چندین سال از دریای بالتیک صورت گرفته وجود سم نودولارین را به عنوان ترکیب غالب تائید کرده است. نودولاریا تولیدکننده هپاتوتوکسین قوی تحت عنوان نودرلارین می باشد. ساختمان این توکسین پنتاپپتدحلقوی بوده که مشابه هپتاپپتدهای حلقوی موسوم به میکروسیستین ها بوده که عمدتا توسط سیانوباکترهای آب شیرین تولید میشوند. (Akcaaulan *et al.*, 2009).مطالعات نشان داده که توکسین نودولارین درآب شیرین نیز وجود داشته است(Kaloudis *et al.*, 2013). هپاتوتوکسیسیته وسرطان زایی نودولارین همراه با مهار فسفاتاز پروتئین های یوکاریوت که کاتالیزکننده ساب یونیت های نوع ۱ و A ۲ میباشد انجام میگیرد. این توکسین بردامنه وسیعی از ارگانیسمها از جمله بی مهرگان و ماهیان تاثیر منفی دارد. مطالعات نشان داده که مصرف آب آلوده به توکسین نودورلارین باعث مرگ حیوانات شده که این امر باخونریزی کبد همراه بوده است . (Pearson *et al.*, 2010). در برخی از مطالعات به تاثیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی نظیر دما، شوری ، پرتوزایی ، غلظت مواد غذایی بر رشد جلبک و تولید نودرلارین اشاره شده و نتایج حاکی ازآن بوده که به هنگام رشد لگاریتمی جلبک، بیشترین میزان نودرلارین تولید میشود(Kocasari *et al.*, 2015; Repka *et al.*, 2001).

مطالعات نشان داد که کاهش فسفات باعث افزایش دو برابری بیان ژن nda (ژن بیان کننده سم نودولارین)شده در صورتیکه افزایش آمونیاک باعث کاهش دوبرابری این ژن میگردد،ولی با این وجود وباتوجه به تغییر در بیان ژن مذکور، غلظت درون وبیرون سلولی نودولارین ثابت باقی می ماند (Jonasson *et al.*, 2008).

۲-۱-اثرات مضر سموم سیانوباکترها در اکوسیستم های آبی

۱-۲-۱- اثر بر ماهیان

اگر سیانوتوکسین به ماهی تزریق شود و یا از طریق تغذیه وارد بدن ماهی گردد علائم مشابهی با پستانداران که در آزمایشگاه مورد بررسی قرار می‌گیرند نشان می‌دهد. ورود سم از طریق تغذیه و جذب روده‌ای و معدی باعث نکروز وسیع کبدی و به دنبال آن، مرگ ماهی می‌گردد. در حالی که غوطه‌وری، ماهی جوان در آب جاری هیچ اثر سمی را به وجود نمی‌آورد. مدارک دیگری در دست است که نشان می‌دهد غوطه‌وری ماهی در سیانوتوکسین یا آب حاوی سیانوباکتر سمی باعث ایجاد ضایعات جلدی میشود (Olofsson, M. 2009; Torunska *et al.*, 2008; Zimba *et al.*, 2001).

مطالعات نشان میدهد که در بین گونه‌های مختلف آبزی، اختلاف حساسیت به توکسین های جلبکی وجود دارد. مثلاً ماهی طلایی در برابر تزر یق میکروسیس‌تین نسبت به موش ۳۰ بار مقاوم‌تر است. در مطالعات بافت‌شناسی بر روی اندامهای ماهیان مرده (کشته شده در اثر بلوم سیانوفیسه‌ها) مشخص گردید که علت مرگ اغلب ناشی از آسیب آبشش‌ها، لوله‌های گوارشی و کبد بوده است. آسیب آبشش‌ها اغلب ناشی از pH بالای محیط بوده که ناشی از متلاشی و تجزیهٔ شدن سیانوباکترها و آزادسازی آمونیوم بوده که در نهایت به تبدیل به آمونیاک سمی میشود(Olofsson, M. 2009; Torunska *et al.*, 2008; Zimba *et al.*, 2001).

آسیب‌دیدگی آبشش‌ها توسط میکروسیس‌تین LR محلول به طور آزمایشی در تیلاپیا و قزل‌آلا انجام شده است. مطالعات همچنین نشان داده که میکروسیس تین باعث اختلال در عملکرد توبولهای کلیه و گلومرولها در کپور دریایی میشود. آتروفی سلولهای کبدی، نکروز در آبشش‌ها ، ورقه ورقه شدن اپی‌تلیوم لامینار و همچنین افزایش غلظت بیلی‌روبین سرم از تأثیرات دیگر سموم سیانوباکتری می باشد (Sivonen *et al.*, 1989; Sipia *et al.*, 2001a; Palikova *et al.*, 2003).

مطالعات نشان داده که میکروسیس‌تین محلول بر جنین ماهی و رفتار ماهی تأثیر سوء دارد. بیشتر این تحقیقات با بررسی ماهی آزاد اقیانوس اطلس که در Netpens در آبهای ساحلی کلمبیا و واشنگتن پرورش یافته‌اند صورت گرفته است. ارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ میکروسیس‌تین که هنوز کاملاً شناخته شده نیستند، باعث تخریب سریع و تصاعدی کبد در اسمولت سالمون که در NetPens پرورش یافته‌اند می‌گردد و بیماری (NPLD) Net Pens Liver Disease را به وجود آورده و خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت آبزی پروری وارد می‌سازد (; Sivonen *et al.*, 1989; Sipia *et al.*, 2001a).

اثر سم بر موجودات آبزی از دو طریق صورت می‌گیرد. تأثیر مستقیم در اثر مصرف آب حاوی سیانوباکترها یا غیرمستقیم از طریق تغذیه از جانوران آلوده به سیانوباکترها. سیانوتوکسین‌ها در مهره‌داران و بی‌مهرگان آبزی نظیر ماهیان و دوکفه‌ایها و زئوپلانکتونها انباشته شده و از طریق زنجیره غذایی باعث انتقال سموم به سایر

موجودات هرم غذایی میشود (Sandström and Karås 2002; Pääkkönen *et al.*, 2008; Palikova *et al.*, 2003; Oberemm *et al.*, 1999).

راه دیگری که سیانوباکترها باعث مرگ و میر می‌گردند از طریق کاهش غلظت اکسیژن محلول آب بوده که پس از متلاشی شدن بلوم به دنبال فعالیت باکتریها ایجاد می‌گردد. بهترین روش برای بدست میزان توان (پتانسیل) اثرات سمی روی موجودات آبزی در مجاورت قرار دادن حیوان یا سیانوباکتر یا محلول بدون سلول که تنها حاوی سموم این جلبک است، در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. سیانوباکترها به عنوان عامل تولیدکنندهٔ تعدادی از ترکیبات بیواکتیو شناخته شده‌اند که پاره‌ای از آنها کاربرد پزشکی داشته و برخی ترکیبات سمی برای سایر سیانوباکترها، باکتریها، جلبک‌ها و زئوپلانکتونها محسوب می‌شوند (Sandström and Karås 2002; Pääkkönen *et al.*, 2008; Palikova *et al.*, 2003; Oberemm *et al.*, 1999).

۲-۲-۱- اثر بر زئوپلانکتونها

نتایج مطالعات بر روی پتانسیل سیانوتوکسین‌ها بر زئوپلانکتونها که در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است متناقض و پیچیده است. در کل می‌توان گفت که سیانوتوکسین‌ها اثرات زیانباری بر زئوپلانکتونها دارند اما نوع این اثرات در جنس‌ها و گونه‌ها و حتی بین کلونی‌های یک گونهٔ خاص بسیار متنوع است. از مشکلاتی که در طرح مطالعات وجود دارد این است که آیا موجود در معرض آب آلوده به سیانوتوکسین قرار می‌گیرد و یا از سیانوباکتر سمی تغذیه می‌کند. آزمایشات نشان داده است که وقتی دافنی در مجاورت میکروسیس‌تین محلول قرار می‌گیرد تأثیر آن زمانی ظاهر می‌شود که غلظت سم چندین برابر موجود در شرایط طبیعی خودش باشد. اختلاف فاحشی در پاسخ گونه‌های مختلف زئوپلانکتونها به سموم سیانوباکترها و حتی سیانوباکترهای غیرسمی دیده شده است. مثلاً ۴ گونه از زئوپلانکتون نسبت به هپاتوتوکسین حساسیت‌های متفاوتی حتی تا دو برابر نشان می‌دهند، اما علائم مسمومیت فقط در غلظت‌های خیلی زیاد که معمولاً در طبیعت نادر است دیده شده است (LC_{50} ۴۸ ساعت بین ۴۵۰ تا ۲۱/۴۰۰ میکروگرم از میکروسیس‌تین در لیتر است). مطالعات نشان داد که اختلاف حساسیت بین گونه‌ها و جمعیت مختلف زئوپلانکتونها در محل‌هایی که به طور مکرر بلوم سمی اتفاق می‌افتد باعث انتخاب و افزایش گونه‌های مقاوم گردد. برخی از گونه‌های خاص از زئوپلانکتونها تحت تأثیر سم قرار نمی‌گیرند در حالی که بسیاری از گونه‌ها متأثر می‌شوند. بنابراین سیانوتوکسین در طی مدت طولانی می‌توانند در ترکیب زئوپلانکتونی منطقه تأثیر گذاشته و آن را تغییر دهد به شرطی که سیانوباکترها در محیط به میزان زیاد یافت شوند (Reinkainen et al., 1994; DeMott et al., 1991; Engström et al., 2001).

۳-۲-۱- اثر بر باکتریهای آبزی

اثر توکسین‌های سیانوباکترها بر روی باکتریها کاملاً شناخته نشده است و اظهارات متناقضی در این‌باره وجود دارد. به عقیدهٔ بعضی از دانشمندان حضور میکروسیس‌تین و حتی میکروسیس‌تین خالص اثرات مرگ‌آوری بر روی *Bacillus subtilus*، *Echerichia coli* و *Aeromonas hydrophila* ندارد. البته این تست‌های محدود نمی‌توانند به عنوان شاخص‌های کل از توان اثر سیانوتوکسین‌ها بر روی باکتریها تلقی شود. میکروسیس‌تین برای تمام باکتریها سمی نیست. چندین گونه باکتری شناخته شده است که باعث کاهش غلظت این سموم می‌گردند. این عمل از طریق کاهش رهاسازی سیانوتوکسین‌ها از سطح سلولی انجام می‌شود. این باکتریها می‌توانند به صورت همزیست همراه با سیانوباکترها وجود داشته باشند(Parveen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Simonato *et al.*, 2010)

۳-۱- روش‌های کنترل و جلوگیری از شکوفایی و فاکتورهای موثر بر فرآیند

۱-۳-۱- انعقاد یا چسبیدن، معلق بودن هوای محلول و جذب سطحی کربن فعال

انعقاد یا چسبیدن شامل جمع شدن ذرات کوچک‌تر در داخل ذرات بزرگ‌تر با استفاده از مواد شیمیایی نظیر فریک کلراید یا سولفات آلومینیم می‌باشد. انعقاد می‌تواند روش موثری برای ارزیابی سلولهای سیانوباکتر در آب باشد، در حالیکه سیانوتوکسین‌های محلول با این روش به شکل مؤثری از بین برده نمی‌شوند. کارآیی از بین بردن سیانوباکترها بستگی به اپتیمم کردن (بهینه‌سازی) دوزهای مواد شیمیایی و PH انعقادی دارد. ممکن است در فرآیند انعقاد، پس تجزیه سلول‌های سیانوباکتری، سموم و متابولیتهای جلبکی آزاد شده که خود یکی از معایب سیستم انعقاد می باشد(Bibak and Hosseini 2013).

۲-۳-۱-کلرزنی

به طور معمول کلرزنی یک فرآیند مؤثر در از بین بردن سیانوتوکسین‌ها نمی‌باشد. به نظر می‌رسد کارآیی کلرزنی تا حد زیادی بستگی به ترکیبات کلریدی و غلظت مورد استفاده دارد. هیپوکلریت و کلرین محلول در آب با غلظت بیش از یک میلی‌گرم بر لیتر، بیش از ۹۵٪ از میکروسیس‌تین‌ها یا نودولارین‌ها را از بین می‌برند، در حالی که هیپوکلریت سدیم با همان دوز یا کلرامین در بیشترین حد ممکنه، ۸۰-۴۰٪ از آنها را از بین می‌برند. بنابراین حساسیت توکسین های جلبکی نسبت به کلر متفاوت می باشد. افزایش دوز کلر در یک زمان کلره کردن ۳۰ دقیقه‌ای یا از طریق تغییر PH، باعث از بین بردن آناتوکسین a یا ساکسی توکسین‌ها نمی شود. از طرف دیگرغلظت ۲۴-۲۰ میکروگرم بر لیتر Cylindrospermopsin در PH برابر با ۷/۴-۷/۲،تحت تاثیر اکسیداسیون قرار گرفته و غیرفعال میگردد(Bibak and Hosseini 2013).

۳-۳-۱- فرآیندهای غشایی

تکنولوژیهای فیلتراسیون ریز (MF) و فیلتراسیون درشت (UF) که در سالهای اخیر ایجاد شده، مورد توجه محققین قرار گرفته است. مطالعات نشان می دهد که UF و MF، هر دو می‌توانند در از بین بردن سلول‌های کامل میکروسیس تیس آئروجینوزای سمی، بسیار قوی و مؤثر (بیش از ۹۸٪) عمل کنند.امروزه از غشاهای بسیار ریز تحت عنوان نانوفیلتر در جهت جذب میکروارگانیسم های آلوده کننده محیط زیست از جمله جلبک های سمی استفاده میشود ولی با این وجود بایستی اذعان نمود که روش فیلتراسیون به لحاظ هزینه بالا و زمان بر بودن فرآیند ، مقرون به صرفه نمی باشد(Bibak and Hosseini 2013).

۴-۳-۱-تغییرات دمایی

از آنجایی که عمدتاً بلوم در فصل تابستان اتفاق می‌افتد، ارتباط آن با دما غیرمنتظره نیست. در مطالعات انجام شده در دریای بالتیک مشخص گردید که برای بیوماس بیش از یک میلی‌گرم در لیتر گونهٔ *N. spumigena* به دمای بیش از ۱۶ درجهٔ سانتی‌گراد و برای .Aphanizomenon sp به دمای بیش از ۱۷ درجهٔ سانتی‌گراد نیاز بوده و با کاهش دما خصوصا در فصول سرد سال، جمعیت سیانوباکترها بطور معنی داری کاهش می یابد. به نظر می‌رسد که دما مؤثرترین عامل برای بلوم سیانوباکترها است زیرا علاوه بر تأثیر مستقیم درجه حرارت بر رشد سیانوباکتر، باعث آزاد شدن فسفر از رسوب خصوصا در مناطق کم عمق میشود (Bibak and Hosseini 2013; Davis *et al.*, 2009).

۵-۳-۱- اسیدیته

اگرچه سیانوباکترها نسبت به شرایط سخت مقاومند ولی PH مهم‌ترین عامل فیزیکوشیمیایی محدودکنندهٔ سیانوباکترهاست. میزان PH در طی شکوفایی نودولاریا در محدوده ۱۰/۴-۱۰ می باشد (Bibak and Hosseini 2013; Davis *et al.*, 2009).

۶-۳-۱- فسفر و نیتروژن

افزایش غلظت فسفات و آمونیوم رشد سیانوباکترها را محدود نموده و باعث افزایش گونه‌های کلروفیسه می‌شود. رشد بیش از حد سیانوفیت‌ها در دریاچه‌ها و رودخانه‌ها به دلیل افزایش فسفر و نیتروژن در آب ورودی این مناطق است. برای کنترل جلبک‌ها در چنین مواقعی می‌توان از سولفات مس، کلرین، آرسنات سدیم، کربن فعال و همچنین فیلترهای شنی استفاده نمود. فیلتری شنی قادرند برخی از جلبک‌ها مانند .Aphanizomenon sp را جذب نمایند. سیانوباکترهای محتوی نیتروژن توسط فسفر محدود می‌شوند. نتایج مطالعات نشان داده که فسفات محلول، قبل از شکوفایی سیانوباکترها، کاهش می‌یابد که علت آن جذب و ذخیره فسفر توسط سیانوباکترها می باشد(Lu *et al.*, 2006; Nasrollazadeh *et al.*, 2011).

۷-۳-۱- سولفات مس

سولفات مس ($CuSo_4$) مادهای کریستالی و آبی رنگی است که بر طیف وسیعی از جلبک ها از جمله جلبکهای سبز - آبی اثر مهارکننده دارد. این ماده به صورت حمامهای کوتاه و بلندمدت تأثیر به سزایی در ضدعفونی کردن ماهیان آب شیرین، لب شور و دریایی دارد. غلظت حمام سولفات مس تابعی از سختی آب است. در آبهای سبک در غلظت ۰/۵ و در آبهای سخت و سنگین تا میزان ۲ppm مورد استفاده قرار میگیرد. کاربرد سولفات مس در حمامهای کوتاهمدت، با غلظت بالا باید حداکثر به مدت یک الی دو دقیقه باشد. سمیت سولفات مس در جلبکها با افزایش PH و قلیائیت کل کاهش مییابد. تکرار مصرف این ماده نیز مقاومت جلبک را افزایش میدهد. غلظت مورد استفاده سولفات مس در محدودهٔ ۱-۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر بوده که بسته به سختی آب تنظیم میشود(Bibak and Hosseini 2013). این روش دارای معایب متعددی بوده که میتوان به باقیمانده مس درآب ورسوب وهمچنین عوارض جانبی مس برموجودات غیرهدف اشاره نمود. (Oliveira-Filho *et al*., 2004)

۸-۳-۱- سیمازین

از ترکیبات قوی بازدارندهٔ فتوسنتز بوده و دارای اثر مهارکننده بر فیتوپلانکتونها میباشد. یکی از ترکیبات تجاری سیمازین آکوازین نامیده میشود که در محدودهٔ ۰/۶-۱/۲۵ میلیگرم در لیتر و یا ۱۸-۱۰ کیلوگرم در هکتارو قبل از آبگیری استفاده میشود. تأثیر آکوازین بر جلبکهای سبز - آبی بیشتر از سیمازین میباشد. یکی از معایب سیمازین، کاهش اکسیژن محلول آب بوده و اگر در مصرف آن دقت نشود باعث مرگ و میر ماهیان میگردد(Bibak and Hosseini 2013).

۹-۳-۱- نور

میکروسیستینها تحت نور طبیعی خورشید بسیار پایدارند، در حالیکه نور ماوراء بنفش (UV) اطراف که به میزان حداکثر جذب میکروسیستین LR و میکروسیستین RR میشود، به سرعت توکسینها را تجزیه میکند. یک فرآیند کاتالیز نوری با استفاده از کاتالیزور TiO_2 و پرتو ماوراء بنفش هم سریعاً میکروسیستین LR و YR و YA با نیمهٔ عمر کمتر از ۵ دقیقه را تجزیه میکند. کارآئی این فرآیند تا حد زیادی بستگی به تجمع مادهٔ آلی در آب دارد(Bibak and Hosseini 2013; Davis *et al*., 2009).

۱۰-۳-۱- کنترل بیولوژیک

- تغذیه توسط زئوپلانکتونها و ماهیان

زئوپلانکتونها قادر به تغذیه از فیتوپلانکتونها در استخرها و آبگیرها بوده و با افزایش فیتوپلانکتونها تعداد زئوپلانکتونها نیز افزایش یافته و تراکم آنها به طور نسبی کنترل میگردد.

کپور نقره‌ای یا فیتوفاگ از میان ماهیان بومی رودخانه‌های بزرگ آسیای مرکزی تا آسیای غربی، شرق چین، روسیهٔ مرکزی و شرق اروپا می‌باشد. این ماهی از نظر تغذیه‌ای پلانکتون و دیتریت خوار است. محتویات رودهٔ این ماهی و تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده که فیتوفاگ از فیتوپلانکتون‌های بزرگتر از ۱۰ میکرون و زئوپلانکتون‌ها تغذیه می‌کند. فیتوفاگ به طور گسترده از جلبک‌های سبز – آبی تغذیه نموده و به عنوان فیلتر کنندهٔ انتخابی این جلبک‌ها در تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

همانطور که بیان شد فیتوفاگ علاوه بر فیتوپلانکتون‌ها از زئوپلانکتون‌های ریز مثل روتیفرها، باکتریها و دیتریت‌ها و برخی از موجودات کفزی تغذیه می‌کند(Anderson, 2009; Lu *et al.*, 2006).

به دنبال تشکیل بلوم سیانوباکترها، از این ماهی به عنوان فیلترکننده و کاهش پلانکتون‌های نامطلوب استفاده می‌نمایند. مطالعات نشان داده است اگر کمپلکسی از زئوپلانکتون‌ها و فیتوفاگ به طور توأم استفاده شوند کاهش سیانوباکترها بیشتر خواهد بود، این ماهی دارای اثرات بسیار مهمی در سطوح اصلی غذایی و تولید مجدد منبع غذایی و افزایش غلظت آنها می‌باشد. مطالعات نشان داده که میزان فیلتراسیون، بلعیدن و تغذیهٔ بچه ماهی فیتوفاگ از جلبک‌های سبز – آبی جنس‌های Oscillatoriaafrica و Anabaena flos-aquae متفاوت و به اندازهٔ سلول و غلظت آنها نیز بستگی دارد، به طوری که رابطهٔ مستقیم بین میزان فیلتراسیون جلبک‌ها و غلظت آنها به عنوان مادهٔ غذایی وجود دارد. با افزایش غلظت جلبک از اولین سطح غذایی، میزان فیلتراسیون به تدریج کاهش می‌یابد. از طرف دیگر رابطهٔ مستقیمی بین میزان بلعیدن و تغذیه بچه ماهی فیتوفاگ از جلبک‌های سبز – آبی وجود دارد. بنابراین هنگام استفاده از فیتوفاگ جهت کاهش جلبک‌های سبز – آبی بایستی فاکتورهای مختلف محیطی، گونهٔ جلبک، اندازه و غلظت آنها در نظر گرفته شود (Anderson, 2009; Davis *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2006).

-استفاده از گیاهان

مطالعات مختلفی در خصوص گیاهان و مواد موثره آنها بر رشد جلبک های سمی و متابولیتهای آنها انجام گرفته است. عصاره آبی برگ گیاه *Lantana camara* باعث حذف جلبک های میکروسیستیس، آئروجینوزا و Eichhorniacrassipes میشود(kong *et al.*, 2006). همچنین مطالعات نشان داده که عصاره اتیل استاتی ریشه گیاه Rutagraveolens دارای فعالیت جلبک کشی بر علیه جلبک سبز – آبی اوسیلاتوریا Peronata میباشد (Meepagala Mulderigi.*et al.*, 2005) و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که عصاره گیاه Stratiotosaloides باعث کاهش تراکم فیتوپلانکتون در مقیاس مزوکوزم میشود. Park و همکاران در سال ۲۰۰۶ همچنین گزارش کردند که عصاره ساقه برنج اثرات مهار کننده بر میکروسیستیس آئروجینوزا دارد.

-استفاده از میکروارگانیسمها

میکروارگانیسمهای مختلف نظیر قارچ ها ، ویروسها، پروتوزئوها و باکتریها بعنوان موجودات بیولوژیک کنترل کننده جلبک مورد استفاده قرارمی گیرند. ازقارچ ها میتوان به Chytridiomyceteها و اوومیست ها اشاره نمود که جهت کنترل بلوم جلبکی مورد استفاده قرارگرفتند ولی با این وجود در مقیاس بزرگتر، استفاده از قارچ ها محدود میگردد(Elbrachter & Schnof 1998 , Ibelings *et al.*, 2004)

ویروسها به لحاظ کوتاه بودن زمان تقسیم، بعنوان کنترل کننده بیولوژیک جلبک در مقیاس مزوکزوم مورد استفاده قرارگرفته اند. سیانوفاژLPP-1 دارای فعالیت ضد جلبکی میباشد. اما با این وجود به دلیل اختصاصی بودن ویروس و میزبان آن ، وجود میزبانهای جهش یافته مقاوم واثرات زیست محیطی ویروسهای مورداستفاده ، استفاده از آنها در مقیاس بزرگ محدود می شود(Manage,1999).

تک یاخته ها یا پروتوزآها با شکار فیتوپلانکتونها جمعیت آنها را کاهش میدهند. از مهمترین پروتوزآها که از جلبک به عنوان غذای خود استفاده می کند می توان به مژه دار Nassula، تاژکدارOchromonas، آمیبهای اکانتا موبا وMayolella اشاره نمود. اثرات ضد جلبکی پروتوزآها به عواملی نظیر رشد پروتوزآها ، نوع گونه مورد استفاده و همچنین نوع گونه و مقاومت جلبک بستگی دارد(Scholrenetal., 2005).

واکنش بین جلبکها وتولید متابولیتهای ثانویه از آنها باعث مهار رشد گونه های دیگر جلبکی می گردد. Yingying وهمکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که مایع رویی آزاد شده از جلبک Isochrysisgalbana حاوی ایزوپروپیل دو دکوتئیک اسید بوده و باعث مهار رشد جلبکهای دونالیا سالینا، *Platymonaselliptica*، کلرلا ولگاریس، *Nitzschiaclostrium*، *Chaetocerosgracilis* میشود.

هفت پارامتر بر ویژگیهای باکتریها به منظور کاهش جلبک تاثیر گذار بوده که میتوان به سازگاری باکتری در شرایط فیزیکی جدید ، توانایی تماس با جلبک ، توانایی تکثیر، استفاده ازجلبک بعنوان طعمه،توانایی زنده ماندن در غلظتهای پائین جلبک ،توانایی زندگی با میزبانهای مختلف جلبکی وتوانایی پاسخ به تغییرات حاصله در میزبان اشاره نمود. بطورکلی توانایی جلبک کشی باکتریها یا از طریق مستقیم و یا ازطریق حمله غیرمستقیم صورت میگیرد(Kim *et al.*,2008). استفاده از باکتری به عنوان یک ارگانیسم جهت حذف جلبک دریک محیط طبیعی به میزان تلقیح اولیه باکتری، میزبانهای موجود، پاسخ به گونه های غیرهدف،روش تولید، پایداری، فرمولاسیون تلقیح ، pH، دما و سایر پارامترهای محیطی بستگی دارد(Ahn *et al.*, 2003). مطالعات نشان داده که برخی از متابولیت های خارج سلولی باکتریها نظیر هیدروکسیل آمیل،فنازین ها،آمینوفنل ها، رامنولیپید، پروتئازها، باسیل آمید ،سورفاکتین وسوفورولیپید ویزگی جلبک کشی دارند(Lee *et al.*, 2000).

۴-۱- مروری مطالعات انجام شده

۱-۴-۱- مطالعات انجام شده در خصوص بلوم جلبکی

در مطالعه انجام شده توسط کارشناسان CEP (Caspian Sea Environment Programme) و اداره کل محیط زیست گیلان در سال ۲۰۰۵ ، اولین وقوع بلوم جلبکی به مساحت ۲۰۰۰۰ کیلومتر مربع در حوضه جنوبی دریای خزر گزارش شد(Soloviev, 2005). بلوم بعدی در سال ۲۰۰۹ رخ داده که توسط محققین پژوهشکده اکولوژی دریای خزر گزارش شده که جلبک قالب در بلوم ذکر شده نودولاریا بوده است.

در مطالعه انجام گرفته توسط Nasrollahzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر پارامترهای محیطی و تغییرات فصلی بر روند افزایش یا کاهش بلوم جلبکی و همچنین پراکنش جلبک های مختلف در هنگام بلوم جلبکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین بلوم جلبکی در اواسط تابستان و اوایل پائیز رخ داده و گروه سیانوفیت ها بترتیب با بیوماس و فراوانی ۹۶ و ۹۸ درصد جزء جلبک های غالب بودند.

در مطالعه انجام شده توسط Kocasari وهمکاران در سال ۲۰۱۵ تراکم و غلظت سیانوتوکسین نودولارین سیانوباکتر نودولاریا گونه *spumigena* در دریاچه Burdur (قلیایی وشور) ترکیه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادکه بیشترین فراوانی جلبک و توکسین آن به ترتیب ۱۱۲/۱۴۷ سلول در میلی لیتر و۴/۸۲ میلیگرم در لیتر بوده و بالاترین میزان کلروفیل a نیز۲۷/۱۵ میلی گرم در لیتر و دما در این وضعیت ۲۹ درجه سانتیگراد بوده است. اگر چه بلوم ایجاد شده توسط این جلبک تاثیر چندانی بر جمعیت ماهی وسایر آبزیان نداشته ولی با این وجود، سلامت موجودات ساکن در اکوسیستم مذکور، در دراز مدت، تحت تاثیر قرار خواهد گرفت.

در مطالعه انجام شده توسط El-Shehawy و Gorokhova در سال ۲۰۱۳ ، بلوم جلبکی ناشی از نودولاریا در دریای بالتیک مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان دادکه این جلبک به لحاظ توانایی تثبیت ازت و متعاقب آن افزایش حجم سالانه نیتروژن در دریا ، پتانسیل بروز بلوم جلبکی را دارا بوده و با مناسب شدن شرایط محیطی، بلوم جلبکی رخ میدهد . با بروز بلوم ، غلظت توکسین نودرلارین درآب افزایش داشته و این امر ناشی از ارتباط مستقیم ما بین بروز بلوم وافزایش غلظت هپاتوتوکسین نودرلارین میباشد. در برخی از مطالعات به تاثیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی نظیر دما، شوری ، پرتوزایی، غلظت مواد غذایی بر رشد و تولید نودرلارین اشاره شده و نتایج حاکی از آن بوده که به هنگام رشد لگاریتمی جلبک، بیشتر میزان نودرلارین تولید میشود.

درمطالعه انجام شده توسط Kabir و Mandal درسال ۲۰۱۲، جلبک نودرلاریا و ارتباط آن با تشکیل بلوم جلبکی در دریای بالتیک مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج این مطالعه حاکی از تاثیر دو پارامتر شوری متوسط و افزایش غلظت فسفر بر بروز بلوم جلبکی داشته است. با تغییر این پارامترها در اواخر تابستان ، شکوفایی جلبکی رخ میدهد.

در مطالعه انجام شده توسط McGregor و همکاران در سال ۲۰۱۲، به اولین بلوم جلبکی ناشی از نودولاریا اسپومیجنا در دریاچه Carbrook واقع در قسمت جنوب شرقیQueen land استرالیا اشاره شد. بلوم حاصل از این

جلبک به مدت ۳ ماه ادامه داشته و غلظت هپاتوکسین نودولارین بیش از ۲۰۰ میکرو گرم در لیتر بوده که بسیار بالاتر از دامنه استاندارد بوده است. فاکتورهایی نظیر شوری ،زمان و شرایط مواد مغذی بر مدت زمان شکوفایی جلبک تاثیر گذار بوده اند.

Oliva و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بلوم جلبکی ناشی از جلبک نودولاریا در دریاچه شور Alchichica مکزیک اشاره کردند. جلبک جدا شده رشته ای مستقیم، معمولا" بی رنگ، حاوی وزیکولهای گازی و فاقد آکینت بوده است. بلوم حاصل از این جلبک، با افزایش هدایت الکتریکی از ۱۳/۴۷ به ۱۴/۱۴ میکروزیمنس بر سانتیمتر نشان داده شد. دمای آب بین ۱۴/۱ تا ۲۱/۲ سانتیگراد، pH بین ۸/۸ تا ۱۰ و اکسیژن محلول بین صفر تا ۹/۳ میلیگرم در لیتر در نوسان بوده اند. میانگین غلظت سالانه نیترات درسال ۲۰۰۱ بالاترین (۱ میکرومول) و در سال ۲۰۰۰ پائین ترین (۰/۴میکرومول) بوده و غلظت فسفات نیز به ترتیب ۰/۸ میکرومول (سال ۲۰۰۰) و۰/۴ میکرومول (سال ۱۹۹۹) بوده است . بیشترین غلظت جلبکی درسال ۲۰۰۱ (۱۰^۱۱ ×۱/۳۶ سلول در متر مربع) وکمترین غلظت آن نیز درسال ۲۰۰۰ (۱۰^۱۰ ×۱/۵۴ سلول در مترمربع) بوده است. جمیعت جلبک نودولاریا ۳ ماه ازسال افزایش داشته و پیک شکوفایی جلبکی نیز چند هفته بوده است. درهوای آفتابی، رشته های نودولاریا در سطح دریاچه جمع شده و باعث بروز بلوم جلبکی میشدند. ارتباط مستقیم ما بین شدت رشد جلبک و غلظت سالانه نیترات وجود داشته است. یکی ازعوامل مهم درتشکیل بلوم جلبکی غلظت نیتروژن میباشد. کاهش نیتروژن باعث تقویت رشد سیانوباکترهای تثبیت کننده نیتروژن نظیر نودولاریا میشود. به هنگام کاهش نیتروژن، این جلبکها با تثبیت نیتروژن مانع از در اختیارگرفتن آن برای سایر فیتوپلانکتون ها شده و در نتیجه در رقابت غذایی موفق تر از سایر پلانکتون ها عمل کرده و با رشد وتکثیر بی رویه منجر به شکوفایی جلبکی میشوند. با بروز بلوم جلبکی غلظت فسفات کاهش می یابد. سیانوباکترهای بلوم داده پس ازگذاشت زمان به مرورتجزیه شده و مقادیر بالایی ازآمونیوم ، نیترات و مواد مغذی آلی را به آب آزاد می کنند. بنابر این با افزایش غلظت جلبک و متعاقب آن بلوم جلبکی انتظار برآن است که غلظت ترکیبات ذکرشده افزایش یابد.

Mazur وPlinski درسال ۲۰۰۳، بلوم جلبکی حاصل از جلبک نودولاریا درخلیج Godank اشاره کردند و فاکتورهای کلیدی در شکوفایی جلبک را دمای آب ، شدت نور و غلظت مواد مغذی برشمردند. غلظت نیتروژون و فسفر از پارامترهای بسیار مهم در شدت و مدت بلوم جلبکی میباشند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که غلظت نودولارین از۱۸۱۳۵-۹۰ میکروگرم در دسی مترمکعب متغیر بوده است. همچنین وزن خشک جلبک از ۳۵۲۰-۳۰۰۰ میکروگرم درگرم متفاوت بوده است. نتایج بررسیهای انجام گرفته همچنین نشان دادکه شدت بلوم جلبکی درسال ۲۰۰۱ شدیدتر از ۲۰۰۲ بوده و غلظت نودولارین و وزن خشک جلبک درسال ۲۰۰۲ به ترتیب ۱۲/۶ میکروگرم در دسی متر مکعب و ۹۱۹ میکروگرم درگرم بوده است.

۲-۴-۱- مطالعات انجام شده در خصوص کنترل بلوم جلبکی

باکتریهای آبی پتانسیل کاهش بلوم های جلبکی را دارا بوده و مطالعات مختلفی در این زمینه انجام شده است (Yamamoto *et al*., 1993; Manage *et al*., 2000 ; Kang *et al*., 2007)

جنسهای مختلف نظیر آلکالی ژتر، آلتروموناس، باسیلوس، ستیوفاگا، فلادوباکتریوم، فلکسی باکتر، میکروکوکوس، میکسوباکتریوم، سودوموناس وگزانتوموناس بعنوان باکتریهای شاخص کنترل کننده مورداستفاده قرارگرفتند(Wang *et al*.,2005; Kim *et al*., 2008; Mu *et al*., 2007).

در مطالعه انجام شده توسط Shekoohiyan و همکاران درسال ۲۰۱۳ ، به روشهای بیولوژیک جهت حذف سیانوباکترها از منابع آبی اشاره شده است. آنها در مطالعه خود از چهار جنس باکتری سودوموناس آئروجینوزا، انتروباکترآئروژنز،کلبسیلا اکسی توکا و سیتروباکتر فروندیی جهت حذف سیانوباکترها در دوره صفرتا۱۰ روز استفاده کردند. نتایج نشان داد که سودوموناس و سیتروباکتریا باعث کاهش معنی دار جمعیت سیانوباکتر در۶-۵ روز اول به میزان ۶۳/۵٪ و ۵۶/۵۹٪ میگردند. همچنین باکتریهای مورداستفاده باعث کاهش فسفات و نیترات نیز میشوند.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- مواد و دستگاهها

مواد اولیه جهت تهیه محیط های کشت جلبک از شرکت های Merck آلمان و Biolife ایتالیا تهیه گردید. محیط های کشت جهت جداسازی و همچنین تشخیص افتراقی گونه های مختلف سودوموناس نیز از شرکتهای Himedia هند و Merck آلمان تهیه شدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده دارای گرید آزمایشگاهی بودند. دستگاه های مورد استفاده در این مطالعه شامل انکوباتور شیکردار، ترازوی آزمایشگاهی، هود لامینار، میکروسکوپ نوری، دستگاه اسپکتوفتومتر و اتوکلاو بوده است.

۲-۲-روش کار

۲-۲-۱- جدا سازی باکتری

آزمایشات مربوط به جداسازی گونه های مختلف سودوموناس در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انجام گرفت. نمونه برداری از عمق ۵ سانتی متر مصب رودخانه تجن و با استفاده از شیشه های در سمبادهای استریل انجام گردید. نمونه ها در مجاورت زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال یافته وپس از آماده سازی اولیه وتهیه رقت های متوالی در محیط های کشت کینگ آگار بیس و ستریمید آگار به صورت سطحی کشت داده شده ودر دمای ۳۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کلنی هایی با پیگمان سبز – آبی و سبز- زرد انتخاب وجهت انجام تستهای اولیه نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و تست پتاس ۳٪ و همچنین تستهای بیوشیمیایی مثل تخمیر انواع قندها، رشد در محیطهای کشت مختلف، توانایی رشد در دماهای متفاوت، تولید آنزیمهای دکربوکسیلاز، دهیدرولاز و ژلاتیناز مورد آزمایش قرار گرفته و در نهایت با استفاده از کتاب مرجع Bergy جنس وگونه سودوموناس شناسایی گردید. سه گونه مورد نظر جهت آزمایشات مهار جلبک سودوموناس آئروجینوزا، پوتیدا و فلورسانس بودند. به هنگام انجام تست های بیوشیمیایی از سوشهای استاندارد به منظور تائید آزمایشات استفاده شد. دو گونه آئروجینوزا (*Pseudomonas aeroginosa* PTCC 1570) و پوتیدا (*Pseudomonad putida* PTCC 1694) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران و گونه فلورسانس نیز از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید(Shekoohiyan *et al.*, 2013; Breed *et al.*, 2009).

۲-۲-۲-کشت جلبک

استوک جلبک نودولاریا از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید. آزمایشات مربوط به کشت جلبک و رویاورویی باکتری و جلبک نیز در آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز مذکور انجام گرفت. به منظورکشت جلبک نودولاریا از دو محیط کشت Z_8 و BG-11 مدیوم (Blue Green medium) استفاده شده که ترکیبات شاخص این محیطها، عناصر کمیاب و افزودنیهای لازم در جداول ۲-۱ تا ۲-۴ نشان داده شده است.

پس از کشت اولیه این باکتری در ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری و هوادهی ملایم و همچنین نوردهی متناوب (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی)، نمونه ها به ارلن یک لیتری انتقال داده شدند. pH محیطهای مورد استفاده ۷/۵ بوده و دمای نگهداری آنها نیز ۲۰ درجه سانتیگراد در نظرگرفته شد. نمونه های جلبک در ارلن های یک لیتری با نوردهی متناوب به میزان ۴۰ میکرومول فوتون در مترمربع درثانیه و شیکر ۱۵۰ دوردر دقیقه به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۰ درجه قرار داده شد (Shekoohiyan *et al.*, 2013; Breed *et al.*, 2009).

جدول ۲-۱: ترکیبات و غلظت مواد تشکیل دهنده محیط Z_8

نام ماده	مقدار
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲۵ گرم
$NaNo_3$	۰/۴۶۷ گرم
$Ca(No_3)_2.4H_2O$	۰/۰۵۹ گرم
Na_2CO_3	۰/۰۲ گرم
NH_4Cl	۰/۰۳۱ گرم
محلول Fe EDTA	۱۰ میلی لیتر
میکرو المنت Gaffron	۱ میلی لیتر
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه محلول Fe EDTA:

محلول A: ۲/۸ گرم FeCl3 در ۱۰۰ میلی لیتر HCl۰/۱ نرمال

محلول B: ۳/۹ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر NaOH۰/۱ نرمال

۱۰ میلی لیتر از محلول A و۹/۵ میلی لیتر از محلول B به حجم یک لیتر رسانده میشود.

جدول ۲-۲ : ترکیبات و مقادیر میکروالمنت های Gaffron

نام ماده	مقدار
$H_3\ BO_3$	۳/۱ گرم
$MnSO_4\ .4H_2O$	۲/۲۳ گرم
$ZnSO_4\ .7H_2O$	۰/۲۲ گرم
$(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}\ 4H_2O$	۰/۰۸۸ گرم
$Co(NO_3)_2\ 6H_2O$	۰/۱۴۶ گرم
$VoSO_4\ .6H_2O$	۰/۰۵۴ گرم
$Al_2\ (SO_4)_3\ K_2SO_4\ 2H_2O$	۰/۴۷۴ گرم
$Ni\ SO_4\ (NH_4)_2\ SO_{4o}\ 6H_2O$	۰/۱۹۸ گرم
$Cl(NO_3)_2\ 4H_2O$	۰/۱۵۴ گرم
$Cr(NO_3)_3\ 7H_2O$	۰/۰۳۷ گرم

نام ماده	مقدار
KBr	۰/۱۱۹ گرم
KI	۰/۰۸۳ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

جدول ۲-۳ : ترکیبات و غلظت مواد تشکیل دهنده محیط BG –11

نام ماده	مقدار
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۷۵ گرم
$NaNo_3$	۱/۵۹ گرم
فریک آمونیوم سیترات	۰/۰۰۶ گرم
Na_2CO_3	۰/۰۲ گرم
$CaCl_2.2H_2O$	۰/۰۳۶ گرم
اسید سیتریک	۰/۰۰۶ گرم
K_2HPO_4	۰/۰۴ گرم
EDTA	۰/۰۰۱ گرم
عناصر کمیاب	۱ میلی لیتر
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

جدول ۲-۴ : ترکیبات و غلظت مواد تشکیل دهنده عناصر کمیاب

نام ماده	مقدار
$H_3 BO_3$	۲/۸۶ گرم
$MnCl_2 .4H_2O$	۱/۸۱۹ گرم
$ZnSO_4 .7H_2O$	۰/۲۲۲ گرم
$CuSO_4 .4H_2O$	۰/۰۷۹ گرم
$Co(NO_3)_2 6H_2O$	۴۹/۴ میلی گرم
$NaMoO_4 .2H_2O$	۰/۳۹۹ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

۳-۲-۲-آماده سازی باکتری جهت تلقیح

پس از کشت خالص از کلنی های سودوموناس ، نسبت به آماده سازی آنها در محیط کشت تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy broth) اقدام شده بدین ترتیب که ابتدا کشت اولیه باکتری درمحیط مذکور انجام و سپس در دمای ۳۰ درجه بمدت ۱۸ ساعت انکوبه شده (۱۵۰ دور در دقیقه) و پس از رساندن باکتری به فاز لگاریتمی، عمل سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ دور دردقیقه بمدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از ریختن مایع رویی ، به رسوب حاصله بافر فسفات اضافه شده وعمل سانتریفوژبرای ۳ بار تکرار گردید. به رسوب نهایی حاصله مقداری بافر

فسفات اضافه کرده وسپس با لوله ۰/۵ مک فارلند مقایسه شده که معادل^{8} ۱۰× ۱/۵ سلول باکتری در هر میلی لیتر می باشد(Su *et al.*, 2011; Canelhas, 2011; Jung *et al.*, 2007).

۴-۲-۲- ارزیابی اثرات ضد جلبکی گونه های سودوموناس

جهت ارزیابی روند ضد جلبکی سه گونه سودوموناس ، کشت جلبک در مقیاس آکواریوم انجام شد. پس از رساندن رشد جلبک به فاز لگاریتمی در آکواریوم حاوی محیط کشتBG-11 (در آزمایشات اولیه انجام شده ، تفاوت چندانی ما بین تغییرات رشد نودولاریا در دو محیطZ_8 وBG11 مشاهده نگردید)، باکتریها درقالب تیمارهای مختلف و در دو لوگ ۷ و ۸ به آکواریوم اضافه شدند. لوگ نهایی جلبک جهت رویارویی با باکتری در آکواریوم نیز ۵ در نظر گرفته شد. تیمارهای انتخاب شده شامل سه گونه باکتری ، تیمار شاهد و تیمار ترکیبی بوده که با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر تیمار و دو غلظت برای گونه های سودوموناس، در مجموع ۳۰ آکواریوم در طی دوره ۱۰ روزه مورد ارزیابی قرار گرفتند. تغییرات جلبک از طریق شمارش روزانه با استفاده از لام سدویک رافتر انجام شده بدین ترتیب که ابتدا نمونه ها در فرمالدئید ۱٪ فیکس شده و با استفاده از لام مذکور و میکروسکوپ نوری ، تعداد جلبک شمارش شد. تغییرات سودوموناس نیز با استفاده از نمونه گیری، تهیه رقت و کشت در محیط ستریمید آگار و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه بمدت ۴۸ ساعت بوده و در نهایت شمارش سودوموناس انجام گرفت . علاوه بر ارزیابی تغییرات میکروبی اعم از جلبک و گونه های سودوموناس ، تغییرات کلروفیل a، نیترات و فسفات و اکسیژن محلول نیز همگام با اندازه گیری پارامترهای بیولوژیک انجام گرفت روش اندازه گیری پارامترهای شیمیایی طبق روش استاندارد ارزیابی آب و پساب انجام گرفت (Rice *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2011; Canelhas, 2011). (روش های اندازه گیری به تفصیل در ضمیمه آمده است).

-اندازه گیری کلروفیل a

۱- مرحله فیلتراسیون

ابتدا یک لیتر از آب حاوی جلبک با استفاده از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون فیلتر و کاغذ صافی تا زمان انجام ازمایش در فریز نگهداری شد.

۲-مرحله استخراج

برای استخراج، ابتدا کاغذ صافی حاوی جلبک در ۱۰ میلی لیتر از استن ۹۰ درصد خیسانده شده و پس از شیک کردن، عصاره بدست به لوله ازمایش انتقال داده شد. حجم نهایی عصاره جمع آوری شده در لوله بایستی ۱۰ میلی لیتر باشد. جهت جمع اوری مایع رویی، نمونه ها در دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵

دقیقه سانتریفوژ شده و عصاره بدست در ۴ طول موج ۷۵۰، ۶۳۰، ۶۴۷ و ۶۶۴ نانومتر قرائت گردید (Rice *et al.*, 2012). پس از قرائت نمونه ها، عددهای بدست امده در فرمول های ذیل قرار داده میشوند:

$$A630 - A750 = E630$$
$$A647 - A750 = E647$$
$$A664 - A750 = E664$$
$$\text{Cholorophyl a (Ca)} = (1.85 \times E664) - (1.54 \times E647) - (0.08 \times E630)$$
$$\text{Cholorophyl a } (mg/m^3) = Ca \times V_1 / V_2 \times Z$$

V_1: حجم عصاره جمع آوری شده که معادل ۱۰ میلی لیتر می باشد

V_2 : حجم آب فیلتر شده

Z: عدد ثابت که معادل ۱ می باشد

۲-۲-۵- کشت دو لایه در محیط آگار و ارزیابی نواحی عدم رشد

ابتدا ۰/۱ میلی لیتر از جلبک نودولاریا (فاز رشد لگاریتمی معادل لوگ ۵) بصورت پورپلیت در محیط کشت BG- 11 آگار کشت داده شد. محیط فوق بمدت ۴-۳ روز در دمای ۲۰ درجه انکوبه شده و هر ۱۲ ساعت متناوب در مقابل روشنایی و تاریکی قرار گرفت. پس از رشد جلبک، ۰/۰۱ میلی لیتر از سوسپانسیون گونه های سودوموناس که درفاز رشد لگاریتمی قرارداشتند بصورت نقطه ای در پلیت حاوی جلبک کشت داده شدند. نمونه ها بمدت ۶ ساعت دردمای ۲۵ درجه انکوبه شده و نقاط عدم رشد جلبک مشخص شدند (Su *et al.*, 2011; Canelhas, 2011; Jung *et al.*, 2007).

۲-۳- تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. به منظور مقایسه میانگین تیمارها و بررسی روند رشد باکتری و جلبک در فواصل زمانی مختلف از روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن استفاده شده و ارزش P با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات مورد بررسی در این تحقیق تغیرات باکتری و جلبک، پرامترهای شیمیایی و کلروفیل a بوده است.

۳-نتایج

۳-۱- نتایج تست های بیوشیمیایی

نتایج تستهای اولیه و بیوشیمیایی جهت شناسایی سه گونه از سودوموناس در جدول ۳-۱ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱ تستهای بیوشیمیایی انجام شده برای تشخیص گونه های سودوموناس

نوع گونه / تستهای انجام شده	*P.aeruginosa*	*P. fluorescens*	*P.putida*
کاتالاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
احیای نیترات	+	+	V
رشد در ۴ درجه سانتیگراد	NG	G	V
رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد	G	NG	NG
رشد مکانکی آگار	G	G	G
تخمیر گلوکز	A	A	A
تخمیر اینوزیتول	–	A	–
تخمیر تری هالوز	–	A	–
آرژینین دهیدرولاز	–	+	+
اسکولین هیدرولاز	–	–	–
ذوب ژلاتین در ۲۲ درجه	–	+	–
لیزین دکربوکسیلاز	–	–	–
لستیناز	–	+	–
لیپاز	–	–	–
هیدرولیز نشاسته	–	–	–

V: متغیر

NG: عدم رشد در محیط کشت

A: تولید اسید

G: رشد مثبت در محیط کشت

۳-۲- نتایج رویارویی باکتری و جلبک در مقیاس آکواریوم

نتایج تغییرات باکتری و جلبک که در مقیاس آکواریوم انجام گرفته در جداول ۳-۲ و ۳-۳ نشان داده شده است. نتایج جدول ۳-۲ نشان دهنده آن است که رشد و تکثیر جلبک نودولاریا در حضور سه گونه سودوموناس و نمونه ترکیبی حاوی سه گونه در لوگ ۸، روند کاهشی داشته در صورتیکه در نمونه شاهد، جلبک دارای روند رشد صعودی بوده است. در بین تیمارهای مورد بررسی، روند کاهش جلبک به ترتیب:

آئروجینوزا>ترکیبی>پوتیدا>فلورسانس بوده است. در تیمار حاوی گونه آئروجینوزا ، تعداد جلبک از لوک ۴/۸۱ در روز صفر به لوگ ۲/۱۶ در روز ۱۰ رسیده و تغییران مشاهده شده نیز معنی دار بوده است($p<0.05$). در تیمار حاوی ترکیب گونه ها ، تعداد جلبک از لوگ ۴/۷۸ به ۲/۳۲ به ترتیب از روز صفر به روز ۱۰ رسیده و نتایج مشابه تیمار آئروجینوزا در زمان های مختلف معنی دار بوده است($p<0.05$). در تیمارهای حاوی پوتیدا و فلورسانس، تعداد جلبک در روز صفر به ترتیب ۴/۸۶ و ۴/۸۰ در روز صفر بوده که در روز ۱۰ ام به ترتیب به ۲/۴۲ و ۳/۱۳ کاهش داشته و نتایج بدست آمده در تمامی زمان ها بجز زمان های ۶ و ۸ معنی دار بوده است($p<0.05$).

جدول۳-۲ : ارزیابی تغییرات جلبک نودولاریا در مقیاس آکواریوم در قالب تیمارهای مختلف سه گونه از سودوموناس(لوگ ۸) در زمانهای متفاوت

زمان / نوع گونه	صفر	۲	۴	۶	۸	۱۰
آئروجینوزا	۴/۸۱±۰/۰۴aA	۴/۱۹±۰/۰۳bD	۳/۲۲±۰/۰۳cE	۲/۴۰±۰/۰۶dE	۲/۲۷±۰/۰۲eD	۲/۱۶±۰/۰۲fD
پوتیدا	۴/۸۶±۰/۰۶aA	۴/۳۷±۰/۰۳bC	۳/۴۹±۰/۰۲cC	۳/۲۲±۰/۰۱dC	۳/۰۸±۰/۰۵dC	۲/۴۲±۰/۰۹eC
فلورسانس	۴/۸۰±۰/۰۹aA	۴/۵۰±۰/۰۲bB	۴/۱۹±۰/۰۱cB	۳/۴۹±۰/۰۳dB	۳/۲۹±۰/۰۲dB	۳/۱۳±۰/۰۱eB
ترکیبی	۴/۷۸±۰/۰۳aA	۴/۲۸±۰/۰۶bC	۳/۳۰±۰/۰۵cD	۲/۶۳±۰/۰۳dD	۲/۵۵±۰/۰۷eD	۲/۳۲±۰/۰۲fC
شاهد	۴/۸۹±۰/۰۱fA	۵/۳۶±۰/۰۷eA	۵/۵۵±۰/۰۴dA	۵/۸۰±۰/۰۷cA	۶/۳۳±۰/۰۴bA	۶/۵۷±۰/۰۸aA

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد ($p<0.05$)

نتایج جدول۳-۳ نشان میدهد که رشد و تکثیر جلبک نودولاریا در حضور سه گونه سودوموناس و نمونه ترکیبی حاوی سه گونه در لوگ ۷، روند کاهشی داشته در صورتیکه در نمونه شاهد، جلبک دارای روند رشد صعودی بوده است. بطور کلی روند تغییرات در لوگ ۸ گونه ها بهتر از لوگ ۷ بوده ولی هیچگونه احتلاف معنی داری ما بین داده های مورد نظر وجود نداشته است. در بین تیمارهای مورد بررسی، روند کاهش جلبک به ترتیب آئروجینوزا>ترکیبی>پوتیدا>فلورسانس بوده است. در تیمار حاوی گونه آئروجینوزا ، تعداد جلبک از لوک ۴/۹۵ در روز صفر به لوگ ۲/۲۰ در روز ۱۰ رسیده و تغییران مشاهده شده نیز معنی دار بوده است($p<0.05$). در تیمار حاوی ترکیب گونه ها ، تعداد جلبک از لوگ ۴/۵۳ به ۲/۲۵ به ترتیب از روز صفر به روز ۱۰ رسیده و نتایج مشابه تیمار آئروجینوزا در زمان های مختلف معنی دار بوده است($p<0.05$). در تیمارهای حاوی پوتیدا و فلورسانس، تعداد جلبک در روز صفر به ترتیب ۵/۰۳ و ۴/۶۱ در روز صفر بوده که در روز ۱۰ ام به ترییب به ۲/۸۰ و ۳/۱۹ کاهش داشته و نتایج بدست آمده در تمامی زمان ها بجز زمان های ۶ و ۸ معنی دار بوده است($p<0.05$).

جدول ۳-۳ : ارزیابی تغییرات جلبک نودولاریا در مقیاس آکواریوم در قالب تیمارهای مختلف سه گونه از سودوموناس(لوگ ۷) در زمانهای متفاوت

زمان نوع گونه	صفر	۲	۴	۶	۸	۱۰
آئروجینوزا	۴/۹۵±۰/۰۴aA	۴/۲۳±۰/۰۲bD	۳/۲۹±۰/۰۲cE	۲/۸۰±۰/۰۶dE	۲/۵۸±۰/۰۴eD	۲/۲۰±۰/۰۳fD
پوتیدا	۵/۰۳±۰/۱aA	۴/۳۳±۰/۰۳bC	۳/۷۴±۰/۰۲cC	۳/۲۴±۰/۰۴dC	۳/۱۴±۰/۰۴dC	۲/۸۰±۰/۰۶eC
فلورسانس	۴/۶۱±۰/۰۶aA	۴/۵۰±۰/۰۲bB	۴/۲۲±۰/۰۳cB	۳/۶۱±۰/۰۵dB	۳/۲۸±۰/۰۳dB	۳/۱۹±۰/۰۳eB
ترکیبی	۴/۵۳±۰/۰۴aA	۴/۳۱±۰/۰۵bC	۳۰۳۸±۰/۰۶cD	۳/۱۱±۰/۰۸dD	۲/۸۳±۰/۰۴eD	۲/۲۵±۰/۰۳fC
شاهد	۴/۸۳±۰/۰۵fA	۵/۲۹±۰/۰۲eA	۵/۴۸±۰/۰۹dA	۵/۸۴±۰/۰۴cA	۶/۲۸±۰/۰۶bA	۶/۵۱±۰/۰۸aA

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد ($p<0.05$)

۳-۳- نتایج رویارویی باکتری و جلبک در محیط کشت دو لایه

نتایج آزمایشات اثر مهارکنندگی گونه های سودوموناس بر جلبک نودولاریا در محیط کشت BG-11 نشان داد که به هنگام استفاده از ترکیب باکتریها و گونه آئروجینوزا ، هیچگونه رشدی از جلبک مشاهده نشده و با طولانی تر کردن زمان انکوباسیون، روند مذکور ادامه داشته و به نوعی اشاره به خاصیت جلبک کشی گونه آئروجینوزا و همچنین اثر سینرژیسمی به هنگام استفاده ترکیبی گونه ها داشته است. نتایج همچنین نشان داد که زمانیکه از دو گونه فلورسانس و پوتیدا استفاده میشود هر چند که هاله عدم رشد اولیه بعد از پایان دور انکوباسیون مشاهده شد ولی با این وجود پس از طولانی تر کردن دوره نگهداری، رشد مجدد جلبک به آرامی صورت میگیرد. این واکنش نشان دهنده آن است که دو گونه اخیر دارای خاصیت مهارکننده جلبک نودولاریا بوده و ممکن است جلبک مجددا توانایی رشد را کسب نماید.

۴-۳- تغییرات کلروفیل a

برای اندازه گیری پارامترهای شیمیایی و کلروفیل ، از آنجائیکه نتایج تیمارهای مربوط به لوگ ۸ بهتر از لوگ ۷ بوده از اینرو در این مرحله فقط لوگ ۸ استفاده گردید. نتایج تغییرات کلروفیل a در جدول ۳-۴ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که میزان کلروفیل در زمان صفر در محدوده ۱۶۸ تا ۱۷۱ میکروگرم در لیتر بوده و با گذشت زمان روند کاهشی بخود گرفته ولی در تیمار شاهد، میزان کلروفیل ثابت بوده است. در بین تیمارهای مورد بررسی، بیشترین روند کاهش کلروفیل مربوط به تیمار ترکیبی و آئروجینوزا بوده است. در تیمار حاوی گونه آئروجینوزا ، میزان کلروفیل از ۱۷۱/۲۲ در روز صفر به ۵۴/۴۱ میکروگرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییران مشاهده شده نیز معنی دار بوده است($p<0.05$). در تیمار حاوی ترکیب گونه ها ، میزان کلروفیل از ۱۷۱/۶۳ در روز صفر به ۵۲/۴۴ میکروگرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییرات مشاهده شده مشابه تیمار آئروجینوزا در زمان های مختلف معنی دار بوده است. در تیمارهای حاوی پوتیدا و فلورسانس، میزان

کلروفیل در روز صفر به ترتیب ۱۶۸/۳۱ و ۱۷۱/۱۷ در روز صفر بوده که در روز ۱۰ ام به ترتیب به ۱۱۰/۲۵ و ۱۱۷/۱۸ کاهش داشته و نتایج بدست آمده در تمامی زمان ها معنی دار بوده است($p<0.05$).

جدول۳-۴ : ارزیابی تغییرات کلروفیل a **(بر حسب میکروگرم بر لیتر) در مقیاس آکواریوم در قالب تیمارهای مختلف سه گونه از سودوموناس(لوگ ۸) در زمانهای متفاوت**

زمان / نوع گونه	صفر	۲	۴	۶	۸	۱۰
آئروجینوزا	۱۷۱/۲۲±۲/۲۴aA	۱۳۰/۳۶±۳/۲۳bD	۱۰۰/۴۱±۱/۲۳cE	۸۵/۴۰±۱/۱۶dD	۶۸/۳۲±۱/۳۲eD	۵۴/۴۱±۱/۴۲fD
پوتیدا	۱۶۸/۳۱±۳/۱۶aA	۱۴۵/۴۵±۲/۱۳bC	۱۳۶/۲۰±۳/۱۲cC	۱۲۰/۴۵±۱/۲۱dC	۱۱۵/۳۵±۱/۴۵eC	۱۱۰/۲۵±۱/۱۹fC
فلورسانس	۱۷۱/۱۷±۱/۲۹aA	۱۵۰/۵۲±۲/۲۲bB	۱۴۱/۳۱±۲/۱۱cB	۱۳۱/۳۱±۲/۱۳dB	۱۲۴/۱۷±۲/۳۲eB	۱۱۷/۱۸±۱/۲۱fB
ترکیبی	۱۷۱/۶۳±۱/۴۳aA	۱۲۱/۵۷±۱/۱۶bE	۹۳/۳۶±۱/۲۵cD	۷۱/۱۷±۱/۳۳dE	۶۴/۶۳±۲/۱۷eD	۵۱/۴۴±۲/۱۲fD
شاهد	۱۶۹/۲۵±۲/۲۱aA	۱۶۸/۳۳±۲/۲۷aA	۱۷۱/۱۷±۲/۱۴aA	۱۷۰/۲۵±۲/۲۷aA	۱۶۷/۴۱±۱/۳۴aA	۱۷۰/۲۳±۱/۱۸aA

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد ($p<0.05$)

۵-۳- تغییرات اکسیژن محلول

نتایج تغییرات اکسیژن محلول در جدول ۳-۵ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که میزان اکسیژن محلول در زمان صفر در محدوده ۷/۱۶ تا ۷/۷۵ میلی گرم در لیتر بوده و با گذشت زمان روند کاهشی داشته است. در بین تیمارهای مورد بررسی، بیشترین روند کاهش اکسیژن مربوط به تیمار ترکیبی و آئروجینوزا بوده است. در تیمار حاوی گونه آئروجینوزا ، میزان اکسیژن از ۷/۱۶ در روز صفر به ۲/۲۵ میلی گرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییران مشاهده شده ، بجز زمان آخر، نیز معنی دار بوده است($p<0.05$). در تیمار حاوی ترکیب گونه ها ، میزان اکسیژن از ۸/۱۶ در روز صفر به ۲/۲۰ میلی گرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییرات مشاهده شده مشابه تیمار آئروجینوزا بوده است. در تیمارهای حاوی پوتیدا و فلورسانس، میزان اکسیژن در روز صفر به ترتیب ۷/۳۶ و ۷/۷۴ در روز صفر بوده که در روز ۱۰ ام به ترتیب به ۴/۲۶ و ۴/۳۱ کاهش داشته و نتایج بدست آمده در برخی از زمان ها معنی دار بوده است($p<0.05$).

جدول۳-۵ : ارزیابی تغییرات اکسیژن محلول (بر حسب میلی گرم بر لیتر) در مقیاس آکواریوم در قالب تیمارهای مختلف سه گونه از سودوموناس(لوگ ۸) در زمانهای متفاوت

زمان / نوع گونه	صفر	۲	۴	۶	۸	۱۰
آئروجینوزا	۷/۱۶±۰/۱۴aA	۴/۵۵±۰/۱۳bC	۳/۲۲±۰/۴۳cD	۲/۵۶±۰/۲۶dD	۲/۳۱±۰/۱۲eD	۲/۲۵±۰/۲۲eD
پوتیدا	۷/۳۶±۰/۲۱aA	۶/۴۱±۰/۲۳bB	۴/۴۵±۰/۵۲cB	۴/۳۴±۰/۳۱dC	۴/۴۱±۰/۳۵cB	۴/۲۶±۰/۲۹deC
فلورسانس	۷/۷۴±۰/۰۹aA	۶/۴۵±۰/۳۵bB	۴/۳۶±۰/۴۱cC	۴/۴۱±۰/۵۳cB	۴/۳۵±۰/۲۲cC	۴/۳۱±۰/۳۱cB
ترکیبی	۸/۶۱±۰/۱۱aA	۴/۳۴±۰/۲۶bD	۳/۲۴±۰/۳۵cD	۲/۳۲±۰/۱۳dE	۲/۲۵±۰/۳۷eE	۲/۲۰±۰/۳۲eE
شاهد	۷/۷۵±۰/۱۰aA	۷/۴۱±۰/۴۱bA	۶/۳۸±۰/۲۴cA	۶/۴۱±۰/۳۷cA	۵/۸۸±۰/۱۴dA	۵/۴۵±۰/۲۸eA

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد ($p<0.05$)

۶-۳- تغییرات فسفات

نتایج تغییرات فسفات در جدول ۳-۶ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که میزان فسفات در زمان صفر در محدوده ۲/۶۰ تا ۲/۶۶ میلی گرم در لیتر بوده و در زمان های اولیه روند کاهشی داشته و با گذشت زمان روند تقریبا ثابت بخود میگیرد. در بین تیمارهای مورد بررسی، بیشترین روند کاهش فسفات مربوط به تیمار ترکیبی و آئروجینوزا بوده است. در تیمار حاوی گونه آئروجینوزا ، میزان فسفات از ۲/۶۵ در روز صفر به ۱/۲۸ میلی گرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییران مشاهده شده ، بجز زمان صفر و ۲ ، در بقیه زمان ها معنی دار نبوده است. در تیمار حاوی ترکیب گونه ها ، میزان فسفات از ۲/۶۳ در روز صفر به ۱/۲۴ میلی گرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییرات مشاهده شده مشابه تیمار آئروجینوزا بوده است. در تیمارهای حاوی پوتیدا و فلورسانس، میزان فسفات در روز صفر به ترتیب ۲/۶۰ و ۲/۶۵ در روز صفر بوده که در روز ۱۰ ام به ترتیب به ۲/۳۸ و ۲/۴۰ کاهش داشته و نتایج بدست آمده فقط بین زمان صفر و ۲ روز معنی دار بود($p<0.05$).

جدول۳-۶ : ارزیابی تغییرات فسفات (بر حسب میلی گرم بر لیتر) در مقیاس آکواریوم در قالب تیمارهای مختلف سه گونه از سودوموناس(لوگ ۸) در زمانهای متفاوت

زمان / نوع گونه	صفر	۲	۴	۶	۸	۱۰
آئروجینوزا	۲/۶۵±۰/۱۲aA	۲/۱۶±۰/۱۵bC	۱/۳۱±۰/۱۷cD	۱/۲۹±۰/۲۰cC	۱/۲۹±۰/۲۲cC	۱/۲۸±۰/۲۲cC
پوتیدا	۲/۶۰±۰/۱۷aA	۲/۴۶±۰/۲۱bB	۲/۴۵±۰/۳۲bB	۲/۴۲±۰/۳۵bB	۲/۴۰±۰/۳۲bB	۲/۳۸±۰/۲۹dbB
فلورسانس	۲/۶۵±۰/۱۱aA	۲/۴۴±۰/۲۷bB	۲/۴۲±۰/۱۱bB	۲/۴۰±۰/۳۳bB	۲/۴۰±۰/۲۴bB	۲/۴۰±۰/۳۱bB
ترکیبی	۲/۶۳±۰/۱۳aA	۲/۱۴±۰/۱۷bC	۱/۲۶±۰/۲۵cC	۱/۲۵±۰/۲۳cC	۱/۲۴±۰/۲۷cC	۱/۲۴±۰/۳۲cC
شاهد	۲/۶۶±۰/۱۷aA	۲/۶۵±۰/۳۳aA	۲/۶۴±۰/۳۲aA	۲/۶۴±۰/۳۵aA	۲/۶۵±۰/۱۱aA	۲/۶۵±۰/۲۸aA

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد ($p<0.05$)

۷-۳- تغییرات نیترات

نتایج تغییرات نیترات در جدول ۳-۷ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که میزان نیترات در زمان صفر در محدوده ۲۰/۳۱ تا ۲۱/۲۷ میلی گرم در لیتر بوده و روند تغییرات آن در زمان های مختلف کاهشی بوده ولی با این وجود از نظم خاصی تبعیت نکرده است. در بین تیمارهای مورد بررسی، بیشترین روند کاهش نیترات مربوط به تیمار ترکیبی و آئروجینوزا بوده است. در تیمار حاوی گونه آئروجینوزا ، میزان نیترات از ۲۰/۳۱ در روز صفر به ۱۵/۳۶ میلی گرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییران مشاهده شده ، بجز زمان صفر و ۲ ، در بقیه زمان ها معنی دار نبوده است. در تیمار حاوی ترکیب گونه ها ، میزان نیترات از ۲۱/۲۷ در روز صفر به ۱۴/۶۳ میلی گرم در لیتر در روز ۱۰ رسیده و تغییرات مشاهده شده مشابه تیمار آئروجینوزا بوده است. در تیمارهای حاوی پوتیدا و فلورسانس، میزان نیترات در روز صفر به ترتیب ۲۱/۱۵ و ۲۰/۳۵ در روز صفر بوده که در روز ۱۰ ام به ترتیب به ۱۶/۱۵ و ۱۵/۲۵ کاهش داشته و نتایج بدست آمده فقط بین زمان صفر و ۲ با سایر زمان ها معنی دار بوده است($p<0.05$).

جدول۳-۷ : ارزیابی تغییرات نیترات (بر حسب میلی گرم بر لیتر) در مقیاس آکواریوم در قالب تیمارهای مختلف سه گونه از سودوموناس(لوگ ۸) در زمانهای متفاوت

زمان / نوع گونه	صفر	۲	۴	۶	۸	۱۰
آئروجینوزا	۲۰/۳۱±۱/۴۵aA	۱۸/۴۵±۱/۳۲bB	۱۵/۵۲±۱/۲۷cB	۱۶/۳۶±۱/۲۳cB	۱۵/۱۱±۱/۵۲cBC	۱۵/۳۶±۱/۴cB
پوتیدا	۲۱/۱۵±۱/۳۶aA	۲۰/۲۵±۱/۱۴aA	۱۷/۳۲±۱/۳۶bA	۱۷/۱۱±۱/۱۱bA	۱۶/۳۶±۱/۱۲bB	۱۶/۱۵±۱/۳۱bB
فلورسانس	۲۰/۳۵±۱/۲۵aA	۱۹/۳۱±۱/۳۴aA	۱۷/۴۱±۱/۱۸bA	۱۷/۱۶±۱/۱۳bA	۱۵/۱۲±۱/۱۸cBC	۱۵/۲۵±۱/۵۱cB
ترکیبی	۲۱/۲۷±۱/۲۳aA	۱۸/۳۳±۱/۴۳bB	۱۴/۳۵±۱/۲۸cB	۱۵/۱۸±۱/۲۶cB	۱۴/۳۶±۱/۳۱cBC	۱۴/۶۳±۱/۱۲cBC
شاهد	۲۰/۳۲±۱/۴۵aA	۱۹/۴۱±۱/۲۴aA	۱۸/۴۷±۱/۵۱bA	۱۸/۲۱±۱/۲۵bA	۱۸/۳۶±۱/۱۵bA	۱۸/۱۱±۱/۲۲bA

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان دهنده ارتباط معنی دار ما بین داده ها می باشد ($p<0.05$)

۴-بحث و نتیجه گیری

۴-۱- سودوموناس

مطالعات مختلفی در خصوص کاهش بلوم جلبکی توسط میکروارگانیسمهای مختلف از جمله باکتریها انجام گرفته است. باکتریهای مختلف قادر به مهار رشد جلبک وتخریب ساختمان سلولی آن بوده که از مهمترین جنس های مورد بررسی میتوان به استافیلوکوکوس، باسیلوس و سودوموناس اشاره نمود(Zhao *et al.*, 2005). در این میان ،گونه های مختلف سودوموناس جزء باکتریهای شاخص بوده و قادر به حذف جلبکهای مختلف میباشند(Roth *et al.*,2008 ; Ren *et al.*, 2010).

مکانیسم جلبک کشی باکتری بدو صورت مستقیم و غیر مستقیم میباشد . در روش مستقیم اتصال فیزیکی ما بین باکتری و جلبک رخ داده ولی درروش غیرمستقیم ، باکتری با ترشح مواد ضد جلبکی ، اثرات مهارکننده خود را نشان میدهد و به نوعی دیواره جلبک را تحت تاثیر قرار داده و آنرا از بین می برد. تقریبا ۷۰٪ از مکانیسم جلبک کشی باکتریها بصورت غیرمستقیم بوده و ۳۰٪ بصورت اتصال فیزیکی میباشد (Mayali and Azam, 2004; Roth *et al.*, 2008)

Kristyanto و Kim در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که باکتریهای مختلف مثل سودوموناس،سودوآلتروموناس، ویبریو، روگریا، جوستلا، باسیلوس، مارینوموناس و پورفیروباکتر قادر به کاهش جمعیت جلبکهایی نظیر Heterosigma, Skeletonema, Chattonella, Cochlidinium، Scrippsiella, Prorocentrum بوده و دامنه اثرات مهار کننده آنها از ۶۲ تا ۹۴ درصد متغیر بوده در این میان بیشترین باکتری موثر، سودوموناس (۲۶ سویه) بوده که در روش دو لایه بیشترین اثرات ضد جلبکی را نشان داده است. نتایج تحقیق فوق با تحقیق حاضر همخوانی داشته و حاکی از اثرات ضد جلبکی هر سه گونه سودوموناس مورد استفاده در مدت ۶ ساعت در روش کشت دو لایه بوده ولی با این وجود گونه آئروجینوزا و تیمار ترکیبی بهتر از سایر تیمارها نشان دادند. اثر تیمارهای اخیر بر جلبک نودولاریا در روش کشت دولایه بصورت جلبک کشی بوده در صورتیکه در سایر تیمارها به شکل مهارکننده جلبک بوده است. یکی از راههای افزایش کارآیی سودوموناس و یا سایر باکتریها، تلقیح در غلظتهای بیشتر بوده که با این روش، فاز سکون باکتری کوتاه تر شده و در نتیجه، باکتری قادر به انجام سریع تر فرآیند میباشد (Liu *et al.*,2007). بر اساس پیش تستهای اولیه انجام گرفته در این تحقیق مشخص گردید که لوگ ۸ سودوموناس قادر به کاهش معنی دار جمعیت جلبک در طول ۱۰ روز بوده است. این نتیجه با مطالعات انجام شده توسط Yang و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Oh و همکاران در سال ۲۰۱۱ همخوانی دارد.

مطالعه Kim و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده که سودوموناس فلورسانس باعث مهار رشد جلبک *Cochlodinium polykrikoides* شده که با مطالعه حاضر نیز همخوانی داشته ولی میزان اثرات مهارکنندکی کمتراز نمونه گزارش شده توسط Kim بوده است .همچنین در مطالعه وی آمده است که علت اصلی اثرات مهارکننده سودوموناس فلور سانس ، ترشح ماده ضد میکروبی بوده و اثرات خود را بصورت غیر مستقیم نشان میدهد. مواد

مترشحه دارای ماهیت بتاگالاکتوزیدازی بوده و ممکن است بر سایر گونه های جلبکی تاثیر چندانی نداشته باشند (Kim *et al.*,2007).

اثرات جلبک کشی باکتریها ، علاوه برمتابولیتهای ترشح شده ، به فاز رشد باکتری (سکون ، لگاریتمی و ثابت) آنها بستگی داشته بطوریکه میزان تولید متابولیتها در فاز رشد لگاریتمی بیشتر از ثابت و فاز اخیر نیز بیشتر از سکون میباشد (Kim *et al.*, 2007). علاوه بر متابولیت های مختلف باکتریایی، غلظت و لوگ باکتریهای مورد استفاده نیز از پارامترهای مهم در افزایش اثرات ضد جلبکی میباشند (Seong and Jeong, 2013). آزمایشات انجام شده در این تحقیق حاکی از آنست که لوگ ۸ نسبت به لوگ ۷ دارای تاثیر بیشتری بوده که تائید کننده مطالعه Seong و همکارش میباشد. یکی از تیمارهای مورد نظر در این مطالعه، استفاده از مخلوط باکتریها به منظور ارزیابی اثرات مهارکننده بر جلبک نودولاریا بوده است. نتایج نشان داد که به هنگام استفاده از مخلوط گونه های سودوموناس، روند کاهش جلبک بطور معنی داری بهتر از سایر تیمارها ، بجز تیمار آئروجینوزا، بوده است. در مطالعه انجام شده توسط Shekoohiyan و همکاران ۲۰۱۳ مشخص گردید که گونه های سیتروباکتر و سودوموناس بهتر سایر تیمارها بوده و به هنگام استفاده ترکیبی از باکتریها، نتایج بدست آمده قابل مقایسه با تیمارهای منفرد نبوده که با نتایج این تحقیق مغایرت دارد. علت احتمالی آن استفاده از جنس های مختلف باکتریایی در قالب تیمار ترکیبی بوده و ممکن است باکتریها نسبت به یکدیگر اثر آنتاگونیسمی نشان دهند در صورتیکه در این تحقیق از گونه های مختلف سودوموناس استفاده شده که به علت تشابه گونه ای اثرات سینرژیسمی از خود نشان میدهند.

دراین مطالعه از گونه های مختلف سودوموناس استفاده شده است. سودوموناس به علت تولید طیف وسیعی از متابولیتها و آنزیمهای مهارکننده، رشد در شرایط نامناسب زیست محیطی ، رشد در محیطهای کشت دارای حداقل مواد غذایی و همچنین تنوع میزبانهای مختلف از اهمیت خاصی در مطالعات بیولوژییک برخوردار میباشد. Kang و همکاران ۲۰۰۸ گزارش کردند که باکتریهایی که قادر به رشد درحضور میزبانهای متفاوت بوده و در شرایط موجود نیز توانایی تولید آنزیمهای مختلف را دارا میباشند نسبت به سایر باکتریها پتانسیل بالاتری داشته و بعنوان استوک های مناسب در آزمایشات کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار میگیرند.

مطالعات Yamamoto و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان داد که برخی از سویه های سودوموناس دارای اثرات مهارکننده بر سیانوباکترها میباشند. Kodani و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کرد که سودوموناس سویه K44-1 دارای اثرات بسیار بالای ضد جلبکی بوده و باعث مهار رشد سیانوباکترها میشود. سودوموناس پوتیدا دارای اثرات ضد جلبکی بر علیه دیاتومه Stephanodiscus و جلبک سبز- آبی میکروسیستیس میباشد (Kang *et al.*,2007). در مطالعه حاضر نیز گونه پوتیدا دارای اثرات مهارکننده بر نودولاریا بوده و بعد از تیمارهای ترکیبی و آئروجینوزا و بالاتر از فلورسانس قرار داشته است.

۴-۲- کلروفیل a

کلروفیلa از پارامترهای مهم در کاهش بیولوژیک جلبک بوده و ارتباط مستقیم بین روند کاهشی این پارامتر و جمعیت جلبک وجود دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان کاهش کلروفیل a در تیمارهای آئروجینوزا و ترکیبی بهتر از سایر تیمارها عمل کرده و در تیمار شاهد تغییر خاصی در غلظت کلروفیل a مشاهده نشد. مطالعه Shekoohiyan و همکاران ۲۰۱۳ نشان داد که غلظت کلروفیل a در محیطهای کشت حاوی سودوموناس و سیتروباکترکاهش چشمگیری خصوصا در روزهای ۵ تا ۶ داشته و بر این اساس ، کارآیی حذف به ترتیب ۶۳/۵٪ و ۵۶/۵۹٪ تخمین زده شد. در نمونه کنترل ، کلروفیل a هیچگونه تغییری نداشته است. درنمونه هایی که باکتریها بصورت ترکیبی مورد استفاده قرارگرفتند میزان کارآیی حذف چندان بالا نبوده و در حدود ۲۱/۲۹٪ بوده است. نتایج تحقیقات انجام شده با تحقیق حاضر نشان میدهد که اولا روند کاهش کلروفیل در این تحقیق روند منظمی در طول زمان داشته ثانیا بیشترین میزان کاهش در تیمار ترکیبی بوده است.

۴-۳- پارامترهای شیمیایی

روند تغییرات پارامترهای شیمیایی در تیمارهای مختلف کاهش داشته ولی این روند در خصوص اکسیژن و نیترات در مقایسه با فسفات معنی دار بوده و تغییرات فسفات در طول دوره ۱۰ روز چندان مشهود نبوده است.

جلبک نودولاریا مانند سایر جنس های گروه سیانوفیت، از میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن از اتمسفر بوده و با افزایش نسبت نیتروژن به فسفر ، میزان رشد و تکثیر این جلبک افزایش می یابد ولی با این وجود، نودولاریا فسفر را از محیط آبی و به شکل معدنی فسفات مورد استفاده قرار میدهند. بنابراین برای کنترل غنی شدن اکوسیستم های آبی، در درجهٔ اول می‌بایست غلظت فسفر، به عنوان یک عامل محدودکننده، را تحت کنترل قرار داد. غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر فسفر در آب قابل قبول، در حالی که غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر از آن بسیار زیاد و غیرقابل قبول بوده زیرا باعث رشد و تکثیر و متعاقب آن شکوفایی جلبک میشود(Nasrollahzadeh *et al.*, 2011). در مطالعه انجام شده توسط Shekoohiyan و همکاران ۲۰۱۳ مشخص گردید که میزان اکسیژن محلول، فسفات و نیترات در تیمارهای منفرد (سودوموناس، سیتروباکتر، انتروباکتر و کلبسیلا) در مقایسه با تیمار ترکیبی، کاهش بیشتری داشته که با مطالعه حاضر مغایرت دارد. در مقایسه تیمارهای منفرد نیز نتایج متفاوت بوده ودر اکثر موارد سودوموناس و سیتروباکتر بهتر از دو جنس کلبسیلا و انتروباکتر بوده ولی با این وجود در تغییرات مربوط به نیترات ، دو جنس اخیر نتایج بهتری را نشان دادند. نتایج مربوط به باکتریهای منفرد با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری که از این مطالعه حاصل میشود آن است که گونه های مختلف سودوموناس قادر به کاهش جمعیت جلبک نودولاریا در شرایط آزمایشگاهی بوده و در تیمارهای ترکیبی ، نتایج بدست آمده بهتر بوده است. با انجام مطالعات مذکور در قالب مزوکوزم و ارزیابی متابولیت های باکتری، آنالیز کمی و کیفی پارامترهای

شیمیایی دخیل در انجام فرآیند و دستیابی به نتایج مستدل، میتوان از این جنس بعنوان باکتری شاخص در هنگام بروز بلوم جلبکی در اکوسیستم بزرگتر استفاده نمود.

منابع

- Akcaalan R, Mazur Marzec H, Zalewska A, Albay M, 2009. Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey. *Harmful Algae* 8:273-278.
- Anderson, D.M. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean Coast Manage*, 52: 342-347.
- Bibak, M. Hosseini, S.A. 2013. Review Ways to Control Harmful Algal Bloom (HAB). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5 (1): 42-44.
- Bonsdorff, E.; Ronnberg, C.; Aarnio, K. 2002. Some ecological properties in relation to eutrophication in the Baltic Sea. *Hydrobiologia* 475: 371-377.
- Breed, R. Murray, E.G.D. Smith, N.R. Bergey,s Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins. *Brunensis*, 72, 437-443.
- Canelhas, M.R. 2011. The biocontrol potential of lytic bacteria against cyanobacterial blooms. Degree project in biology , Master of science. Uppsala. University. Cyanobacteria for Embryos and Larvae of Carp (*Cyprinus carpio* L.) *Acta Veterinara*
- Davis, T.W. Berry, D. Boyer, G.L. and Gobler, C.J. 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. *Algae*, 8: 715-725.
- DeMott W. R., Zhang Q-X., Carmichael W. W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia. Limnology and Oceanography*, 36 (7), 1346-1357.
- El- Shehway, R. Gorokhova, E. 2013. The bloom-forming cyanobacterium N. *spumigena*: a pecullar nitogen- fixer in the Baltic Sea food webs. Chapter 3. Cyanobacteria: *Ecology, Toxicology, Management*, pp: 47- 71.
- Elbrächter, M. & Schnepf, E. 1998. Parasites of harmful algae. In: *Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Series 41.* (Ed D. M.Anderson & A. D.Cembella & G.M. Hallegraeff), 351–369.Springer, New York.
- Engström J., Viherluoto M., Viitasalo M. 2001. Effects of toxic and non-toxiccyanobacteria on grazing, zooplanktivory and survival of the mysid shrimp *Mysismixta. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 257, 269–280.
- EPA. 1999. Nutrient Criteria Technical Guidance Manual Lakes and Reservoirs.
- Gobler C.J. and Davis, T.W. 2016. Global Expansion of Harmful Cyanobacterial Blooms: Diversity, ecology, causes, and controls. Elsevier Publition.pp: 1-238.
- Guiry MD, Guiry GM, 2014. Algae Base.World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Ibelings, B.W., Bruin, A.D., Kagami, M., Rijkeboer, M., Brehm, M. & Donk, E.V. 2004. Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi (Chytridiomycota). *J Phycol*, 40, 437-453.
- Jayatissa LP, Silva EIL, McElhiney J, Lawton LA, 2006. Occurrence of toxigenic cyanobacterial blooms in freshwaters of Sri Lanka. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:156-164.
- Jonasson, S.; Vintila, S.; Sivonen, K.; El-Shehawy, R. 2008. Expression of the nodularin synthetise genes in the Baltic Sea bloom-former cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain AV1. *FEMS Microbial Ecology* 65: 31–39.
- Jung, S.W. Kim, B.H. Katano, T. Kong, D.S. 2007. *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 offers species specific biological control of winter algal blooms caused by freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*. *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.
- Kabir, A.H. Mandal, A. 2012. *Nodularia spumigena* and its attribute to bloom formation in the Baltic Sea. *Environmental Research, Engineering and Management.* 1(59), P. 5-9.
- Kaloudis T, Zervou SK, Tsimeli K, Triantis TM, Fotiou T, HiskiaA, 2013. Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC-MS/MS. Monitoring of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece. *J. Hazard. Mater.* 263 P:105-115.
- Kang, Y.-K., Cho, S.-Y., Kang, Y.-H., Katano, T., Jin, E.-S., Kong, D.-S. & Han, M.-S. 2007. Isolation, identification and characterization of algicidal bacteria against *Stephanodiscus hantzschii* and *Peridinium bipes* for the control of freshwater winter algal blooms. *J Appl Phycol.***,** DOI 10.1007/s10811-10007-19267-10813.

- Kim, M.-J., Jeong, S.-Y. & Lee, S.-J. 2008. Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*. *J Appl Phycol,* DOI
- Kim, Y.S., Lee, D.S., Jeong, S.Y., Lee, W.J., and Lee, M.S. 2009. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the harmful Raphidophyceae *Chattonella marina*. *J.Microbiol.* 47, 9–18.
- Kocasari,F.S ,I. Gulle, S. Kocasari, S. Pekkaya,and F. Mor.2015. The occurrence and levels of cyanotoxin nodularin from *Nodularia spumigena* in the alkaline and salty Lake Burdur, Turkey. *J. Limnol.* 74(3): 530-536.
- Kodani, S., Imoto, A., Mitsutani, A. & Murakami, M. 2002. Isolation and identification of the antialgal compound, harmane(1-methyl β carboline), produced by the algicidal bacterium *Pseudomonas* sp. K44-1. *Journal of Applied phycology,* 14**,** 109 - 114.
- Kong, C.H., Wang, P., Zhang, C.X., Zhang, M.X. & Hu, F. 2006. Herbicidal potential of allelochemicals from *Lantana camara* against *Eichhornia crassipes* and the alga *Microcystis aeruginosa*. *Weed Research,*46**,** 290–295.
- Kononen, K. 2001. Eutrophication, harmful algal blooms and species diversity in phytoplankton ommunities:examples from the Baltic Sea. *Ambio* 30: 184–189.
- Kristyanto, S. Kim, J. 2016. Isolation of marine algicidal bacteria from surface seawater and sediment samples associated with harmful algal blooms in Korea. *Korean Journal of Microbiology.* Vol. 52, No. 1, pp. 40-48.
- Kumar, U. Kakvani, B. 2000.Water Environment and Pollution. Published by Agrobioslindial
- Lee, J.C, Hou, M.F. Huang, H.W. 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13, 55, 1-7.
- Li H, Xing P, Wu QL. 2013. Characterization of the bacterial community composition in a hypoxic zone induced by Microcystis blooms in Lake Taihu, China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79: 773–784.
- Liu J, Pan WB, Qin Yj, Qiu YI, Huang HW .2007. Isolation and Identification of Two Algae-lysing Bacteria and Their Lytic Character. *Environ. Sci. Technol*. 2 pp.
- Lu, K.H., C.H. Jin, S.L. Dong, B.H. Gu and S.H. Bowen, 2006. Feeding and control of blue-green algal blooms by tilapia (*Oreochromis niloticus*). (HABs). *Hydrobiologia*, 568: 111-120.
- Lucas, J.S.; Patrizia, A.; Birgitta, B.; Klaus von, B.; John, R.G.; Paul, K.H.; Kaarina, .S; Anthony, E.W. 2003. BASIC: Baltic Sea cyanobacteria. An investigation of the structure and dynamics of water blooms of cyanobacteria in the Baltic Sea-responses to a changing environment. *Continental Shelf Research* 23: 1695–1714.
- Mayali, X. and Azam, F. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 139–144.
- Mazur, H. Pliński, M. 2003. *Nodularia spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdańsk. *OCEANOLOGIA*, 45 (1).pp. 305–316.
- McGregor, G.B. Stewart, I. Sendall, B.C. Sadler, C. 2012. First Report of a Toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/Cyanobacteria) Bloom in Sub-Tropical Australia.I. Phycological and Public Health Investigations .*Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012, *9*, 2396-2411.
- Meepagala, K.M., Schrader, K.K., Wedge, D.E. & Duke, S.O. 2005 .Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs *Phytochemistry,* 66, 2689–2695.
- Mulderij, G., Smolders, A.J.P. & Donk, E.V. 2006. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. *Freshwater Biology,* 51, 554–561.
- Nasrollahzadeh, H. Makhlough, A. Pourgholam R. Vahedi, F. Qanqermeh, A. Foong, S.Y. 2011. The study of *Nodularia spumigena* bloom event in the Southern Caspian Sea. *Applied Ecology and Environmental Research* 9(2): 141-155
- Oberemm A., Becker J., Codd G. A., Steinberg C. 1999. Effects of Cyanobacterial Toxins and Aqueous Crude Extracts of Cyanobacteria on the Development of Fish and Amphibians. *Environmental Toxicology,* 14, 77-88.
- Oh, J.I., Kim, M.J., Lee, J.Y., Ko, I.J., Kim, W., and Kim, S.W. 2011. Isolation and characterization of algicidal bacteria from *Cochlodinium polykrikoides* culture. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 16, 1124–1133.
- Oliveira-Filho, E.C.D., Lopes, R.M. & Paumgartten, F.J.E.R. 2004. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere,* **56,** 369 - 374.
- Olofsson, M. 2009. The influence of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* on the growth of perch (*Perca fluviatilis*). Degree project work in biology,University of Kalmar.
- Pääkkönen J.-P., Rönkkönen S., Karjalainen M., Viitasalo M. 2008. Physiological effects in juvenile three-spined sticklebacks feeding on toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena*-exposed zooplankton. *Journal of Fish Biology*, **72**, 485-499.

- Palikova M., Navratil S., Marsalek B., Blaha L. 2003. Toxicity of Crude Extract of
- Park, M.-H., Han, M.-S., Ahn, C.-Y., Kim, H.-S., Yoon, B.-D. & Oh, H.-M. 2006. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract. *Letters in Applied Microbiology,* 43, 307–312.
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D. 2013. Bacterial communities associated with Microcystis colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ. Microbiol. Rep*. 5: 716–724.
- Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B, 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermposin. *Mar. Drugs* 8:1650-1680.
- Reinkainen M., Ketolo M., Walls M. 1994. Effects of the concentrations of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography*, 39 (2), 424-432.
- Ren H, Zhang P, Liu C, Xue Y, Lian B .2010. The potential use of bacterium strain R219 for controlling of the bloom-forming cyanobacteria in freshwater lake. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 26(3):465-472.
- Repka, S. Mehtonen, J. Vaitomaa, J. 2001. Effect of nutrient on growth and nodularin production of nodularia dtrain GR8b. *Microbial Ecology*, 42, 606-613.
- Rice**,** E.W. Baird**,** R.B. Eaton**,** A.D. Clesceri**,** L.S. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Roth P, Twiner M, Mikulski CM, Barnhorst AB, Doucette GJ .2008.. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. Harmful Algae 7(5):682-691.
- Sandström A. Karås P. 2002. Effects of eutrophication on young-of-the-year freshwater fish communities in coastal areas of the Baltic. *Environmental Biology of Fishes* 63, 89-101.
- Seng, L. W. 2001. Water Quality Modeling for Waste loud Allocations And TMDLS. Published simultaneously in Canada.
- Seong, K.A. and Jeong, H.J. 2013. Interactions between marine bacteria and red tide organisms in Korean waters. *Algae* 28, 297–305.
- Shekoohiyan, S. Mahvi, A.H. Alimohammadi, A. Mesdaghinia, A.R. Nabizadeh, R. and Dabbagh, R. 2013. Performance evaluation of cyanobacteria removal from water reservoirs by biological method. *African Journal of Microbiology Research*. 7(617), pp. 1729-1734.
- Simonato F, Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Amann R. 2010. Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 128–138.
- Sipiä V. O., Kankaanpää H. T., Flinkman J., Lahti K., Meriluoto J. A. O. 2001a.
- Sivonen K., Kononen K., Carmichael W.W., Dahlem A.M., Rinehart K.L., Kiviranta
- Soloviev, D. 2005. Identification of the extent and causes of Cyanobacterial bloom in September–October 2005 and development of the capacity for observation and predictionof HAB in the Southern Caspian Sea using Remote Sensing Technique. wwwPagehttp://www.caspianenvironment.org/newsite/DocCenter/2006/HABrepFinalFull_corrected_compressed_pictures.doc. sorption of nodularin (NOD) in fine-grained sediments. *Chemosphere*, **70**, 2039–2046.
- Stal, L.J.; Walsby, A.E. 2000. Photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterial bloom in the Baltic Sea. *European Journal of Phycology* 35: 97–108.
- Su, J. Yang, X. Zhou, Z. Zheng, T. 2011. Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species Alexandrium tamarense (Dinophyceae) *Biological Control*, 56 132–138.
- Time-Dependent Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins in Flounders (*Platichthys flesus*) and Mussels (*Mytilus edulis*) from the Northern Baltic Sea. *Environmental Toxicology*, 16, 330-336.
- Time-Dependent Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins in Flounders (*Platichthys flesus*) and Mussels (*Mytilus edulis*) from the Northern Baltic Sea. *Environmental Toxicology*, 16, 330-336.
- Torunska A., Bolałek J., Plinski M., Mazur-Marzec H. 2008. Biodegradation and Tsaloglou, M.N. 2016. Microalgae Current Research and Applications. Caister Academic Press.
- Wang H, Liu L, Liu Z, Qin S .2010. Investigations of the characteristics and mode of action of an algalytic bacterium isolated from Tai Lake. *J. Appl. Phycol*. 22(4):473-478.
- Welsh, D.T.; Donnelly, A.; Cifuentes, A.; Antlon, J.; Finster, K.; Nielsen, L.B.; Underlien, P.; Neubauer, A.G.; Colangelo, A.T.; Heijs, M.A. 2001. ROBUST: the role of buffering capacities in stabilising coastal lagoon ecosystems. *Continental Shelf Research* 21: 2021–2041.
- Yan, M. Liu, B. Jiao, X. Qin, S. 2014. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 89–97.

- Yang, F., Wei, H.Y., Li, X.Q., Li, Y.H., Li, X.B., Yin, L.H., and Pu, Y.P. 2013. Isolation and characterization of an algicidal bacterium indigenous to lake Taihu with a red pigment able to lyse *Microcystis aeruginosa*. *Biomed. Environ. Sci*. 26, 148–154.
- Zhao P, Pu YP, Yin LH .2005. Development of research on algicidal bacteria and its evaluation. *J. Southeast Univ*. 24(3):202-206.
- Zimba P.V., Khoo L., Gaunt P.S., Brittain S., Carmichael W.W. 2001. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. *Journal of Fish Diseases*, 24, 41-47.

Abstract
In recent years the incidence of algal blooms caused by Nodularia to become one of the serious problems and is threated life of aquatic organisms in the southern Caspian Sea. Nodularia is a Blue-green algae (cyanobacteria group) and due to production of nodularin toxin is importance. In this study, the first, three species of Pseudomonas including *aeruginosa*, *putida* and *fluorescens* were isolated from Tajan river estuary and identified using biochemical tests and compared to standard species. The trend of *Nodularia spumigena* biomass (log 5) and pseudomonas species (log 7 and 8) were examined in 30 treatments for 10 days in aquarium scale. Parameters such as chlorophyll a, dissolved oxygen, phosphate and nitrate were tested at different time the same time. The results showed that the decline trend of nodularia in *aeruginosa* and mixed species treatments were better than other treatments and log 8 of bacterium was also more inhibitory effect than to log 7. Similar results were observed in double layer on agar medium and latter treatments had algaecide effect on nodularia. However, *putida* and *fluorescens* treatments had algaestatic properties. Concentration of chlorophyll a, dissolved oxygen and nitrate in all treatments, especially *aeruginosa* and mixed bacteria have been often decreased ($p<0.05$). Changes of latter factors in control treatment have been relatively consistent. Although the phosphate changes at different time of relative decline, but nevertheless significant differences were observed. The parameters examined in this study were in direct contact with the algae population and decrease or increase of these factors cause significant change in algae biomass. The conclusion showed that different strains of pseudomonas are able to reduce the population of algae *N. spumigena* in aquarium scale and the results observed in combination treatment were better than other treatments. The challenge examination of pseudomonas and nodularia in mesocosm scale, evaluation of bacterial metabolites, and also quality and quantity analysis of chemical and biological factors involved in the process is recommended and with achieve reasonable results can be made from this indicator bacteria during algal bloom in the larger ecosystem.

Keywords: Nodularia, Pseudomonas, algal bloom, biological control

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Project Title : Biological control of bloom algae in the southern of Caspian Sea
Approved Number: 2-76-12-91098
Author: Reza Safari
Project Researcher : Reza Safari
Collaborator(s) *:* R. Pourgholam, A. Gangian, H. Nasrollazadeh, F. Vahedi, F. Laloei, Y. Olomi, Z. Yaghobzadeh, F. Esmaeili, M. Tahmasbi, E. Alavi, Gh.R. Razeghian, H. Molaei, Gh. Zarshenas
Advisor(s): -
Supervisor: H. Negarestan
Location of execution: Mazandaran province
Date of Beginning : 2012
Period of execution : 3 Years & 4 Months
Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute -Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

Biological control of bloom algae in the southern of Caspian Sea

Project Researcher :

Reza Safari

Register NO.
51597